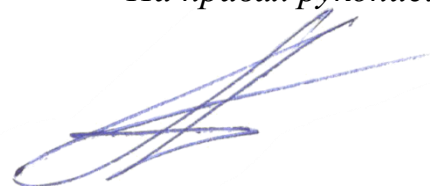


*На правах рукописи*



Гуреев Артем Петрович

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

Специальность 03.01.04 – Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Воронеж 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Воронежский государственный университет»

**Научный руководитель** доктор биологических наук, профессор РАН,  
**Попов Василий Николаевич**

**Официальные оппоненты:** **Белоусов Всеволод Вадимович**  
доктор биологических наук, профессор РАН,  
ФГБУН Институт биоорганической химии им.  
академиков М.М. Шемякина и Ю.А.  
Овчинникова РАН, отдел метаболизма и редокс-  
биологии, заведующий отдела

**Белослудцев Константин Николаевич**  
доктор биологических наук, ФГБОУ ВО  
«Марийский государственный университет»,  
кафедра биохимии, клеточной биологии и  
микробиологии, профессор

**Ведущая организация** ФГБОУ ВО «Московский государственный  
университет имени М.В. Ломоносова».

Защита диссертации состоится 23 декабря 2019 г. в 13.30 на заседании диссертационного совета Д.212.038.03 при Воронежском государственном университете по адресу: 394018, Воронеж, Университетская пл., 1, ауд. 59.

Автореферат диссертации размещен на официальном сайте Минобрнауки Российской Федерации и на сайте Воронежского государственного университета <http://www.science.vsu.ru>.

С диссертацией можно ознакомиться в зональной научной библиотеке Воронежского госуниверситета

Автореферат разослан «13» ноября 2019 года.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
доктор биологических наук



Грабович М.Ю.

## 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 (Патрушев и др., 2015). 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. 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 (Van Bulck et al., 2019).

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), разрушение дофаминергических нейронов (причина болезни Паркинсона). 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% (Шабунова и Барсуков, 2015). 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 и антиоксидантов растительного происхождения. Значительная часть этих препаратов показала свою эффективность при лечении онкологических заболеваний, диабета, сердечно-сосудистых заболеваний (Окуневич и Сапронов, 2004). 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 (Uittenbogaard and Chiaramello, 2014). 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 $\alpha$  (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 (Ryoo and Kwak, 2018). Nrf2 активируется соединениями, которые способны нарушать его взаимодействие с негативными регуляторами. К этим соединениям относятся полифенолы, флавоноиды, фенилендиамины, а также радикалы кислорода (Зенков и др., 2017). 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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  в мозге стареющих 15-месячных мышей. Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить характер возрастных изменений митохондриального биогенеза и физиологических параметров мышечной ткани.

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 мышечных тканей.

4. Изучить влияние дефицита креатина, индуцированного инъекциями  $\beta$ -гуанидинопропионовой кислоты, на митохондриальный биогенез и физиологические параметры 15-месячных мышечных тканей.

5. Изучить влияние фенофибрата на митохондриальный метаболизм и биогенез в мозге и печени, а также физиологические параметры 15-месячных мышечных тканей.

6. Оптимизировать метод ПЦР длинных фрагментов для детекции окислительных повреждений мтДНК мышечной ткани.

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

8. Установить токсикологические свойства фенофибрата и  $\beta$ -гуанидинопропионовой кислоты по отношению к различным клеточным компонентам мозга и печени мышечных тканей.

**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,  $\beta$ -гуанидинопропионовой кислоты и фенофибрата использовались именно 15-месячные мышечные ткани – 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  $\beta$ -гуанидинопропионовой кислотой также может активировать митохондриальный биогенез в мозге 15-месячных мышечных тканей. В нашем эксперименте данный эффект достигался за счет активирования оси AMPK/Nrf2/ARE, но не AMPK/PGC-1 $\alpha$ , как предполагалось ранее. Мы выявили различия в метаболизме  $\beta$ -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 мышей. 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 болезнь 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 мышей 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 $\alpha$ . По крайней мере это справедливо для мозга, где метаболизм липидов вносит меньший вклад в общие обменные процессы, по сравнению с другими тканями.

**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).

**Благодарности.** Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 16-04-01014 А и 19-44-360011 р\_а, гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых и по государственной поддержке ведущих научных школ (соглашение 14.Z57.18.3451-НШ). Автор выражает глубокую признательность А.А. Старкову за помощь в организации дизайна экспериментов; Е.А. Шафоростовой за помощь в поддержании популяции лабораторных мышей, выполнении оформительских работ; И.Ю. Виткаловой за помощь в организации работы с изолированными митохондриями мозга.

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

**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.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Объектом исследования являлись мышцы линии C57BL6. Мыши были получены из питомника ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (филиал «Столбовая»). Для экспериментов использовались ткани среднего и переднего мозга. В отдельных случаях использовалась печень. В эксперименте по изучению возрастных изменений в поведении и митохондриальном биогенезе были задействованы 7-месячные (n=8) и 15-месячные мыши (n=8).

При изучении влияние метиленового синего (МС) на митохондриальный биогенез 15-месячные опытные мыши получали метиленовый синий 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%. 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 эксперимента по изучению влияния  $\beta$ -гуанидинопропионовой кислоты ( $\beta$ -ГПК) на митохондриальный биогенез 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  $\beta$ -гуанидинопропионовой кислоты (n=7). Мыши получали инъекции 3 раза в неделю в течение 21 дня. Целевым показателем являлось увеличение физической силы и выносливости мышей.

Для эксперимента по изучению влияния фенофибрата на митохондриальный биогенез использовались 15-месячные мыши, которые были разделены на пять групп: мыши, получавшие чистый корм и четыре группы мышей, получавшие корм, смешанный с фенофибратом 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.

Измерение скорости дыхания осуществлялось при помощи оксиметра (Vernier, США). Скорость дыхания представлена в  $\mu\text{моль O}_2(\text{CO}_2)/\text{мин/г}$  массы тела. Рассчитывали значение дыхательного коэффициента как отношение скорости образования  $\text{CO}_2$  к потреблению  $\text{O}_2$ . Силу и выносливость устанавливали с помощью теста «Струна» согласно методике, описанной Cardozo-Pelaez et al. (1999). Поведенческие параметры оценивали с помощью тестов «Открытое поле» Fraser et al. (2010) и «Приподнятый крестообразный лабиринт» Crawley (1981).

Выделение ДНК из всех типов тканей производилось с помощью набора *diaGene* для выделения ДНК (Диа-М, Россия). Нормализованный уровень мтДНК относительно ядерной ДНК рассчитывался по формуле  $2^{(-\Delta\Delta C_q)}$ . Выделение РНК производилось с использованием набора *ExtractRNA* (Евроген, Россия) согласно прилагаемому протоколу. 500  $\mu\text{кг}$  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<sup>TM</sup> Real-Time System (Bio-Rad, США) с использованием набора *qPCRmix-NS SYBR* (Евроген, Россия). В качестве референсов использовались гены *18s*, *Actb* и *Gapdh*. Количество повреждений мтДНК оценивали с помощью ПЦР



длинных фрагментов с использованием Encuslo-полимераза (Евроген, Россия). Для оптимизации метода мы амплифицировали ПЦР-фрагменты разной длины (295, 1326, 2069, 4546 и 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 для оценки количества окислительных повреждений. Повреждения мтДНК инициировали за счет добавления к изолированным митохондриям 500 мкМ  $H_2O_2$ . Значение  $\Delta Cq$  контрольных и опытных (поврежденных) длинных фрагментов сравнивалось с  $\Delta Cq$  контрольных и опытных коротких фрагментов, которые использовали в качестве референсов.

Выделение митохондрий мозга осуществляли в среде, содержащей 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; рН 7,4. Среда для промывки митохондрий содержала те же компоненты, но без БСА. Ткани мозга промывали и гомогенизировали в гомогенизаторе Доунса в 6 мл среды выделения при температуре +4°C. Гомогенат центрифугировали в течение 5 мин при 900 g. Осаждение фракций свободных митохондрий и синапсом осуществляли при помощи центрифугирования в течение 10 мин при 14000 g. Осадок ресуспендировали в 200 мкл среды промывки и наносили на 23% раствор Перколла. Центрифугирование в градиенте Перколла проводили в течение 15 мин при 23000 g. Промывку осуществляли путем центрифугирования дважды в течение 10 мин при 18000 g, а затем при 14000 g.

Измерения биоэнергетических параметров проводились в среде, содержащей 45 мМ KCl, 20 мМ HEPES, 4 мМ  $KH_2PO_4$ , 1 мМ ЭГТА, 0,2 мг/мл БСА и 10 мкМ соответствующего субстрата. Измерение мембранного потенциала и скорости продукции  $H_2O_2$  проводилось на спектрофлюориметре Hitachi F-7000 (Hitachi, Япония). Мембранный потенциал митохондрий определялся по интенсивности флюоресценции катионного красителя Сафранина О (Sigma-Aldrich, США). 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 резорфуфина, образующегося в ходе реакции. Измерение скорости потребления кислорода проводилось на оксиграфе (Hansatech Instruments, Великобритания) с соответствующим программным обеспечением. 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).

Для измерения активности цитратсинтазы использовали буфер, содержащий 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. За 1 мЕ принимали количество фермента, катализирующего восстановление 1 нмоль ДТНБ в минуту (Shepherd and Garland, 1969). Количество продуктов перекисного окисления липидов определяли по концентрации диеновых конъюгатов. К гомогенату ткани добавляли физиологический раствор, гептан и изопропиловый спирт.

Смесь центрифугировали при 3000 g в течение 10 мин. К супернатанту добавляли 1/10 объема дистиллированной воды. 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.

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 ( $p < 0,05$ ).

## ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО БИОГЕНЕЗА

Мы продемонстрировали, что с возрастом снижается количество копий митохондрий в мозге. Об этом говорит снижение количество копий мтДНК у 15-месячных мышей (в сравнении с 7-месячными мышами) и снижение активности цитратсинтазы (Рис. 1).

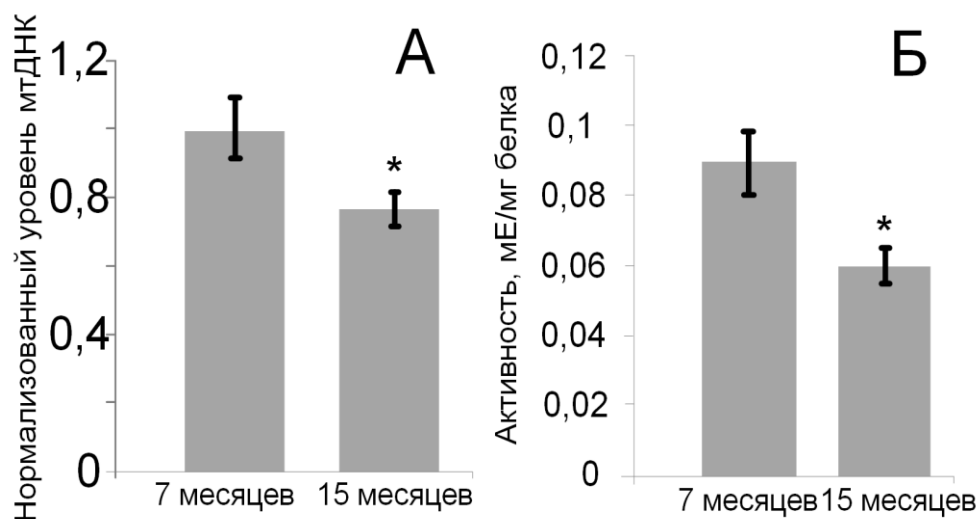


Рис. 1. Изменение количества митохондрий у 7- и 15-месячных мышей. А. Нормализованный уровень мДНК. Б. Активность цитратсинтазы. \*  $p < 0,05$ .

Наиболее вероятно, что это связано с возрастным снижением функциональности Nrf2/ARE-сигнального каскада, что ранее было показано рядом авторов (Suh et al., 2004; Shih and Yen, 2007; Duan et al., 2009; Ungvari et al., 2011). 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. Мы обнаружили, что у 15-месячных мышей снижается уровень экспрессии основных маркеров митохондриального биогенеза *Tfam* и *Nrf1*.

Нарушение стабильности митохондриального биогенеза может являться первым звеном в цепи дегенеративных процессов, которые, в конце концов, могут привести к патогенезу 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.

## ВЛИЯНИЕ МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО НА МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ БИОГЕНЕЗ

Благодаря высокой липофильности метиленовый синий (МС) может проникать через гематоэнцефалический барьер и мембраны митохондрий (Rojas et al., 2012). Там МС проявляет свойства редокс-компонента электрон-транспортной цепи за счет того, что может окислять NADH и переносить электроны на цитохром *c*. Однако мы обнаружили, что антимицин снижает скорость МС-индуцированной 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.

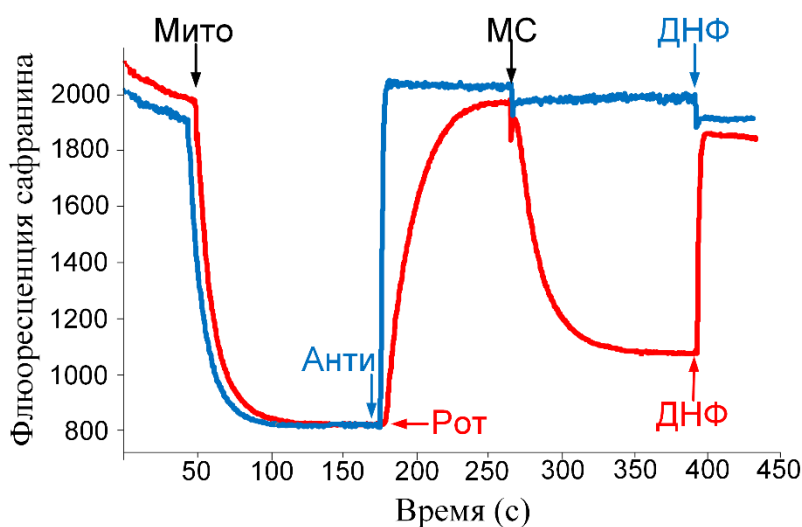


Рис. 2. Мембранный потенциал при использовании в качестве субстрата малат+пируват. Синяя линия – ингибирование мембранного потенциала антимицином. Красная линия – ингибирование мембранного потенциала ротеноном.

Кроме того, МС не восстанавливает скорость митохондриального дыхания при ингибировании III комплекса антимицином. Блокирование ЭТЦ антимицином также приводило к потере мембранного потенциала, но добавление 1 мкМ МС не способствовало его восстановлению у митохондрий. При аналогичном ингибировании ЭТЦ ротеноном 1 мкМ МС частично восстанавливал скорость митохондриального дыхания и мембранный потенциал (рис. 2). В результате проведенных экспериментов мы можем сделать вывод о необходимости пересмотра стандартной модели функционирования МС как альтернативного переносчика электронов. Наша модификация предполагает, что акцептором электронов с МС- $H_2$  является III комплекс, а МС-индуцированная продукция  $H_2O_2$  происходит как при взаимодействии МС с молекулярным кислородом, так и за счет одноэлектронного транспорта на уровне III комплекса (рис. 3).

Ранее было неоднократно показано, что МС является хорошим нейропротектором. Мы выявили положительные изменения в поведенческих особенностях 15-месячных мышей, индуцируемые МС. Это проявляется в снижении уровня тревожности и увеличении доли исследовательского поведения, что свидетельствует об анксиолитическом эффекте МС.

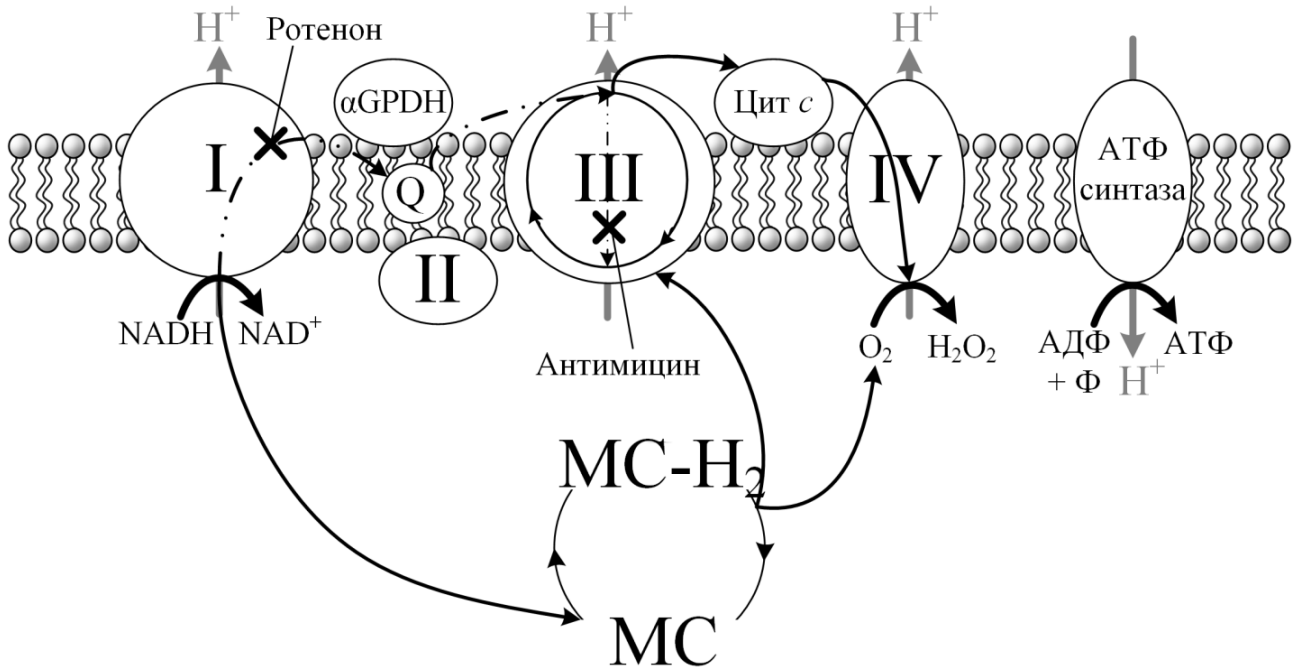


Рис. 3. Гипотетическая схема альтернативного транспорта электронов, осуществляемого метиленовым синим

Однако статус МС в качестве антиоксиданта мы подвергаем значительному сомнению, так как *in vitro* МС способствует увеличению скорости продукции  $H_2O_2$ . 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  $H_2O_2$  за счет активации Nrf2/ARE-сигнального пути. Мы обнаружили МС-индуцированное увеличение экспрессии генов *Ho-1*, *Sod2*, *Prdx3*, что позволяет сделать вывод о том, что антиоксидантный эффект МС, неоднократно отмечаемый разными группами исследователей, заключается не в прямой детоксификации радикалов кислорода, а в индукции экспрессии антиоксидантных ферментов.

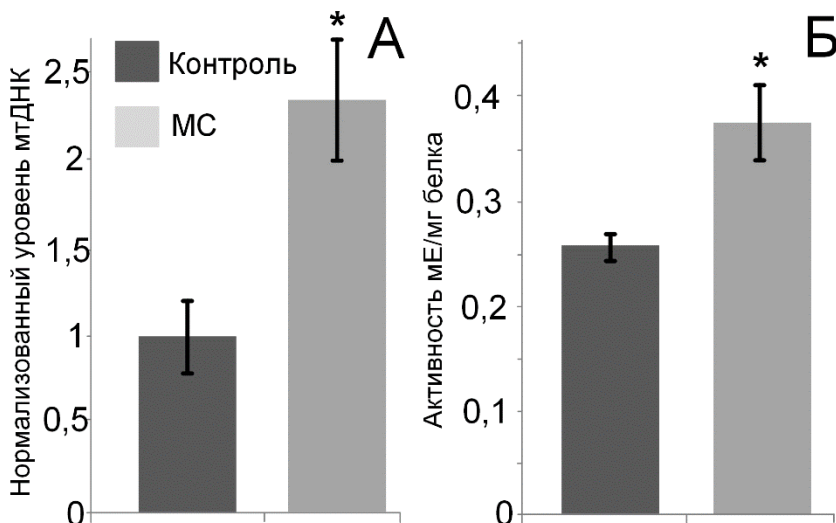


Рис. 4. Влияние метиленового синего на количества митохондрий у 15-месячных мышей.  
 А. Нормализованный уровень мДНК.  
 Б. Активность цитратсинтазы. \*  $p < 0,05$ .

Перспективность использования активаторов Nrf2 в качестве способа терапии нейродегенеративных заболеваний обусловлена не только его способностью обеспечивать антиоксидантную защиту митохондрий. Мы показали, что MS обеспечивает увеличение количество копий митохондрий у 15-месячных мышей. Это выражается в увеличении количества копий мтДНК и увеличении активности цитратсинтазы (рис. 4).

## ВЛИЯНИЕ $\beta$ -ГУАНИДИНОПРОПИОНОВОЙ КИСЛОТЫ НА МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ БИОГЕНЕЗ

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 (Wallimann, 2007).  $\beta$ -ГПК действует как конкурентный ингибитор поглощения креатина, в результате чего в тканях возникает локальный дефицит АТФ, что приводит к стимулированию окислительного метаболизма. Физиологическим ответом является увеличение физической силы и выносливость 15-месячных животных по сравнению с контролем. Мы наблюдали тенденцию к увеличению исследовательского поведения в группе мышей, которая подвергалась лечению  $\beta$ -ГПК, по сравнению с мышами, которым вводили инъекции физиологического раствора. Кроме того, мы наблюдали рост уровня тревожности, вызванной инъекциями, в то время как  $\beta$ -ГПК снижала эту тревожность.

Изменения в метаболизме приводили к снижению дыхательного коэффициента мышей, получавших инъекции  $\beta$ -ГПК с  $0,96 \pm 0,01$  до  $0,9 \pm 0,02$  ( $p < 0,05$ ). Однако маловероятно, что это связано с повышением окисления жирных кислот в головном мозге, поскольку мы не наблюдали увеличения экспрессии гена *Ppara*, продукт которого является транскрипционным фактором для генов, участвующих в  $\beta$ -окислении. Напротив, количество мРНК для ацетил-СоА-дегидрогеназы (*Acadm*), ацетил-СоА-оксидазы (*Acox1*) и карнитин-пальмитоил-транспортера (*Cpt1*) было несколько снижено в коре больших полушарий. Статистически значимых изменений в экспрессии данных генов в среднем мозге не наблюдалось. Можно предположить, что различия в экспрессии связаны с отличающейся физиологической ролью креатинового цикла в разных отделах мозга. Другим вероятным объяснением данных различий является особенность транспорта  $\beta$ -ГПК через гематоэнцефалический барьер.

Инъекции  $\beta$ -ГПК вызывают в клетках дефицит АТФ. Смещения равновесия АТФ:АДФ в сторону АДФ приводит к активации аденозинмонофосфат-активируемой протеинкиназы (АМПК) (Новикова и др., 2015). АМПК может непосредственно фосфорилировать и тем самым активировать PGC-1 $\alpha$ . Тем не менее, мы не обнаружили увеличения экспрессии гена *Ppargc1a*, кодирующего PGC-1 $\alpha$ , хотя в коре и среднем мозге было отмечено увеличение количества митохондрий. Инъекции  $\beta$ -ГПК увеличивали число копий мтДНК в коре головного мозга и в среднем мозге по сравнению с контролем. В обоих отделах мозга была увеличена активность цитратсинтазы (рис. 5).

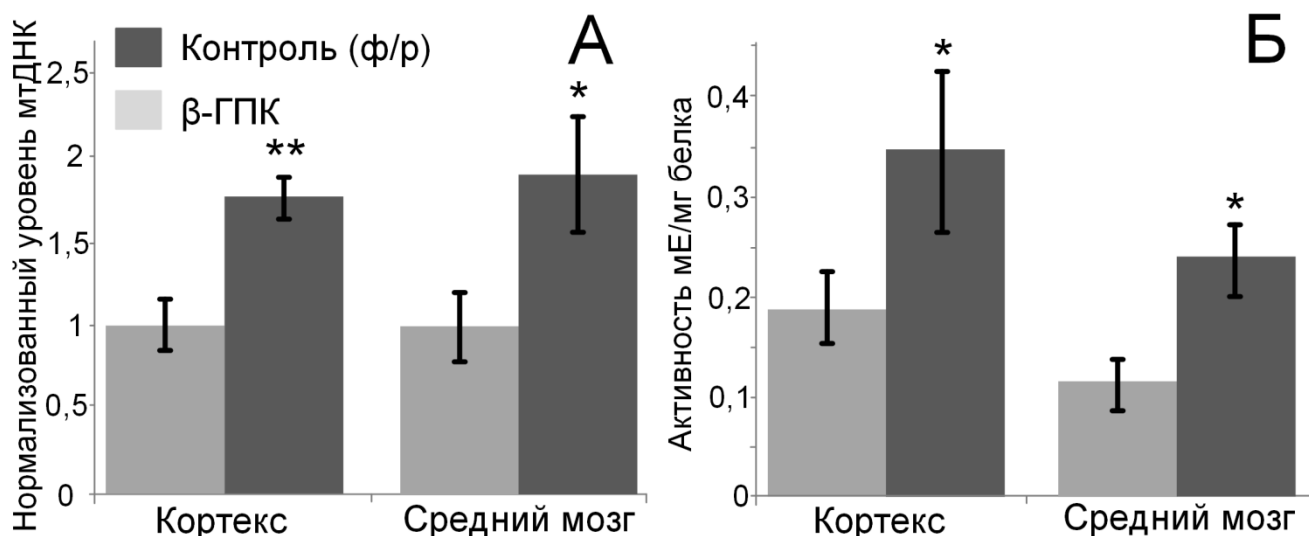


Рис. 5. Влияние инъекций β-ГПК на количество митохондрий в кортексе и среднем мозге. Нормализованный уровень мтДНК (А) и активность цитратсинтазы (Б). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$

Мы предполагаем, что 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 АМРК, которая может непосредственно фосфорилировать Nrf2, и за счет фосфорилирования инактивировать GSK3β (Joo et al., 2016). По всей видимости, данный процесс является PGC-1α-независимым, так как активация данного транскрипционного фактора должна быть сопряжена с коактивацией ферментов класса PPAR (в частности PPARα), которые увеличивают экспрессию генов, участвующих в β-окислении жирных кислот. Данных изменений в мозге мы не наблюдали.

## ВЛИЯНИЕ ФЕНОФИБРАТА НА МЕТАБОЛИЗМ ЖИРНЫХ КИСЛОТ И БИОГЕНЕЗ МИТОХОНДРИЙ

На первом этапе эксперимента проводилось определение оптимальной концентрации фенофибрата, при которой наблюдался бы терапевтический эффект препарата без выраженных физиологических отклонений. Диета, содержащая 0,3% фенофибрата, приводила к равномерному снижению массы тела в течение 10 дней эксперимента на 16,3% по сравнению с контролем ( $p < 0,001$ ). 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. Фенофибрат приводил к незначительному увеличению экспрессии генов *Ppargc1a* и *Ppara* в мозге, что должно быть сопряжено с увеличением экспрессии генов, участвующих в β-окислении. Фенофибрат способствовал увеличению экспрессии гена *Acadm*, но не *Acadvl*, который окисляет более длинные цепи жирных кислот. Мы обнаружили фенофибрат-индуцированное увеличение экспрессии гена *Cpt1a*, который кодирует одну из субъединиц переносчика жирных кислот. Таким образом, налицо коактивация PGC-1α и PPARα, что подтверждается активацией митохондриального β-окисления.

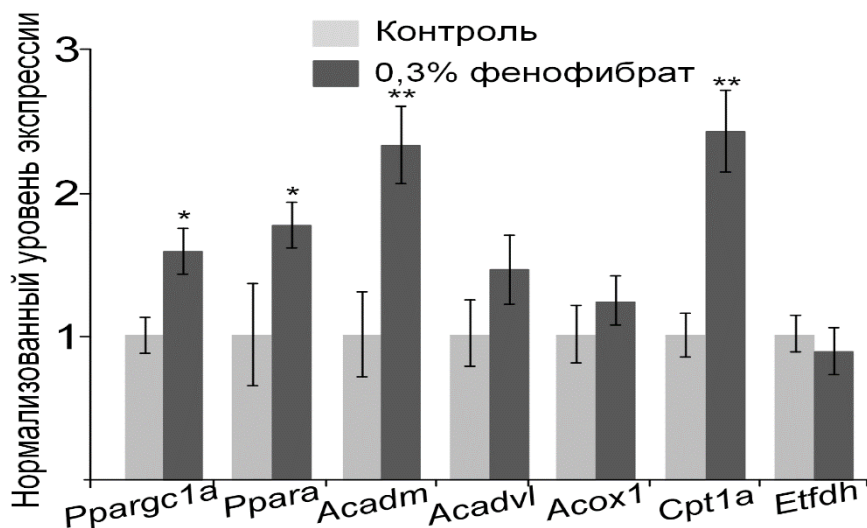


Рис. 6. Изменение экспрессии генов, регулирующих  $\beta$ -окисление жирных кислот, индуцируемое 0,3% фенофибратом в мозге. \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ .

Тем не менее, мы не обнаружили увеличения количества митохондрий в мозге. Не было отмечено увеличение количества копий мтДНК и активности цитратсинтазы. Не наблюдалось увеличение экспрессии митохондриального гена *Cox1*. Увеличение экспрессии маркеров митохондриального биогенеза – *Tfam* и *Nrf1* – было статистически недостоверно. Имеются работы, показывающие возможность коактивации Nrf2/ARE и PPAR $\gamma$ , что имеет большой фармакологический потенциал для лечения метаболических заболеваний, таких как диабет (Lee, 2017). Но мы показываем, что, судя по всему, нет прямого взаимодействия между PPAR $\alpha$  и Nrf2-сигнальным каскадом. По крайней мере, активация PPAR $\alpha$  не сопряжена с запуском компенсаторных реакций, которые приводили бы к запуску митохондриального биогенеза в мозге через Nrf2/ARE или PGC-1 $\alpha$  сигнальные пути.

Несмотря на то, что головной мозг может использовать жирные кислоты для синтеза АТФ, все равно данный орган не является основным потребителем липидов (Schönfeld and Reiser, 2013). Для уточнения роли фенофибрата в метаболизме PPAR $\alpha$  и его потенциальной связи с Nrf2/ARE-сигнальным путем, мы изучили экспрессию генов в печени. Мы обнаружили оверэкспрессию генов, регулирующих окисление жирных кислот в митохондриях и пероксисомах, что может быть сопряжено с увеличением уровня окислительного стресса в митохондриях. Следствием этого являлось увеличение содержания диеновых конъюгатов в печени мыши на 47% ( $p<0,001$ ) по сравнению с контролем. Это свидетельствует об интенсификации процессов перекисного окисления липидов в печени. Кроме того, в качестве побочного эффекта приёма 0,3% фенофибрата наблюдалось заметное увеличение массы печени (более чем в 2 раза) ( $p<0,001$ ). Гиперплазия печени часто наблюдается при употреблении фибратов грызунами, но данный побочный эффект не был отмечен у людей (Bentley et al., 1993).

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*.

## ИЗМЕРЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ МТДНК

Предполагается, что накопление ошибок в мтДНК вследствие окислительных повреждений является одной из причин дегенеративных метаболических расстройств и энергетического кризиса в стареющих тканях. Нарушения в мтДНК можно рассматривать не только как причину метаболических дисфункций, но и как биомаркер их развития, который может характеризовать уровень окислительного стресса в митохондриях. Метод детекции количества повреждений мтДНК с помощью ПЦР длинных фрагментов 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 (Maslov et al., 2013). 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 (Van Houten et al., 2000; Santos et al., 2006; Maslov et al., 2013; Lehle et al., 2014). В ходе оптимизации ПЦР длинных фрагментов с использованием Encyclo-полимеразы нами было показано, что с увеличением длины продукта снижается эффективность ПЦР, что приводит к снижению чувствительности и воспроизводимости метода. При амплификации с использованием Encyclo-полимеразы фрагментов мтДНК значительно больше 2 т.п.н. будет наблюдаться низкая эффективность ПЦР и, следовательно, низкая валидность полученных результатов.

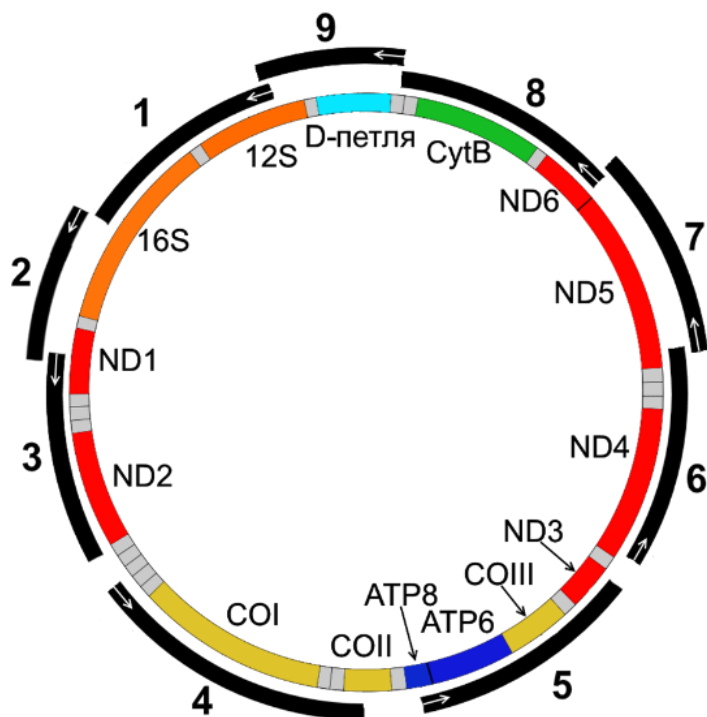


Рис. 7. Схематическое изображение покрытия мтДНК 9 фрагментами. 1) ChrM: 298–2036; 2) ChrM: 2078–3403; 3) ChrM: 3318–4992; 4) ChrM: 5784–7517; 5) ChrM: 7858–9763; 6) ChrM: 9895–11856; 7) ChrM: 11775–13717; 8) ChrM: 13650–15381; 9) ChrM: 15361–369. Чёрные линии обозначают собственно ПЦР фрагменты. Голубой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



Для экспериментального получения повреждений мтДНК изолированные митохондрии печени и мозга в течение 30 минут инкубировали с 500 мкМ  $H_2O_2$ . 9 фрагмент, соответствующий D-петле, наиболее подвержен окислительным повреждениям в митохондриях мозга (3,2 повреждений / 10 т.п.н.). 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 тимином, находящимся в окружении трех пуриновых оснований, последовательность RTGR (где R это A или G) более доступна для реакции Фентона. Впоследствии это было подтверждено данными ЯМР (Rai, 2001). 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), чем с более ранними данными Henle et al. (1999), однако описанный в данной работе механизм повреждения специфических нуклеотидных реакций ДНК объясняет полученные нами данные.

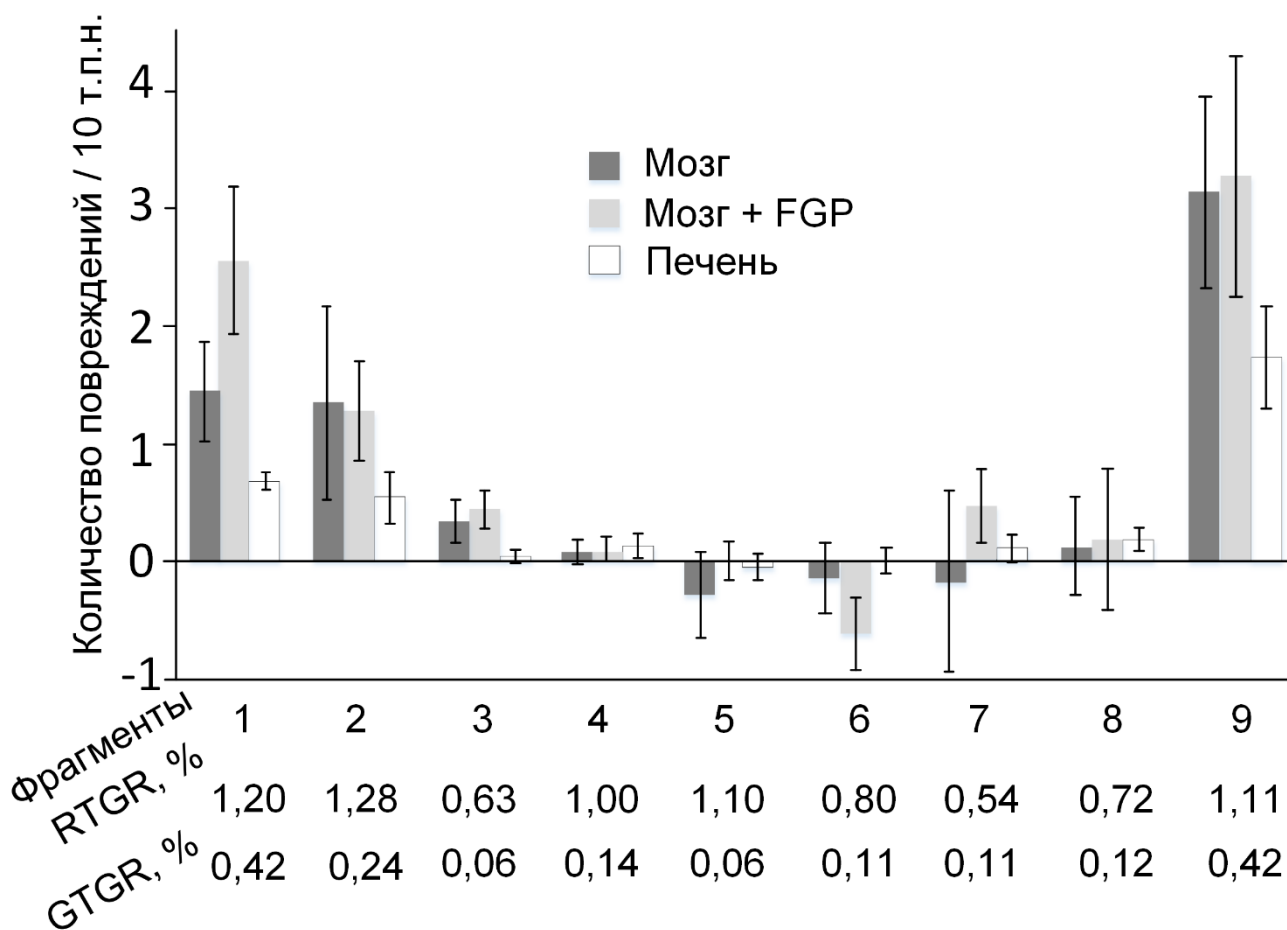


Рис. 8. Количество повреждений в мтДНК, индуцируемых добавлением к митохондриям 500 мкМ  $H_2O_2$  в каждом из 9 фрагментах.

Удивительным выглядит отрицательное значение количества повреждений в 5, 6 и 7 фрагментах мтДНК. Вероятно, причиной этого являются изменения в суперспиральной конформации мтДНК при воздействии с повреждающими факторами. Мы можем предположить, что в участках, богатых GTGR, при добавлении  $H_2O_2$  происходят значительные повреждения мтДНК, что ведет к одноцепочечным разрывам, которые вызывают ослабление 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.

Далее были установлены генотоксичные свойства исследуемых активаторов митохондриального биогенеза. Инкубация митохондрий с МС в концентрации 10 мкМ и 20 мкМ в течение 30 минут не вызывает повреждений в мтДНК ни в одном из исследуемых фрагментов. При добавлении к митохондриям 100 мкМ МС сильные повреждения присутствуют в 1, 2 и 9 фрагменте. Эти результаты в целом совпадают с данными, полученными при исследовании влияния экзогенной  $H_2O_2$  на изолированных митохондриях, так как повреждались те же регионы, содержащие наибольшее количество GTRG последовательностей. Дополнительно для индукции повреждений при 20 мкМ МС мы использовали свет длиной волны 630 нм. В комбинации с освещением МС, использующийся в качестве фотосенсибилизатора, продуцирует значительное количество синглетного кислорода (Costa et al., 2016), который приводит к значительным повреждениям мтДНК во всех исследуемых фрагментах. 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.

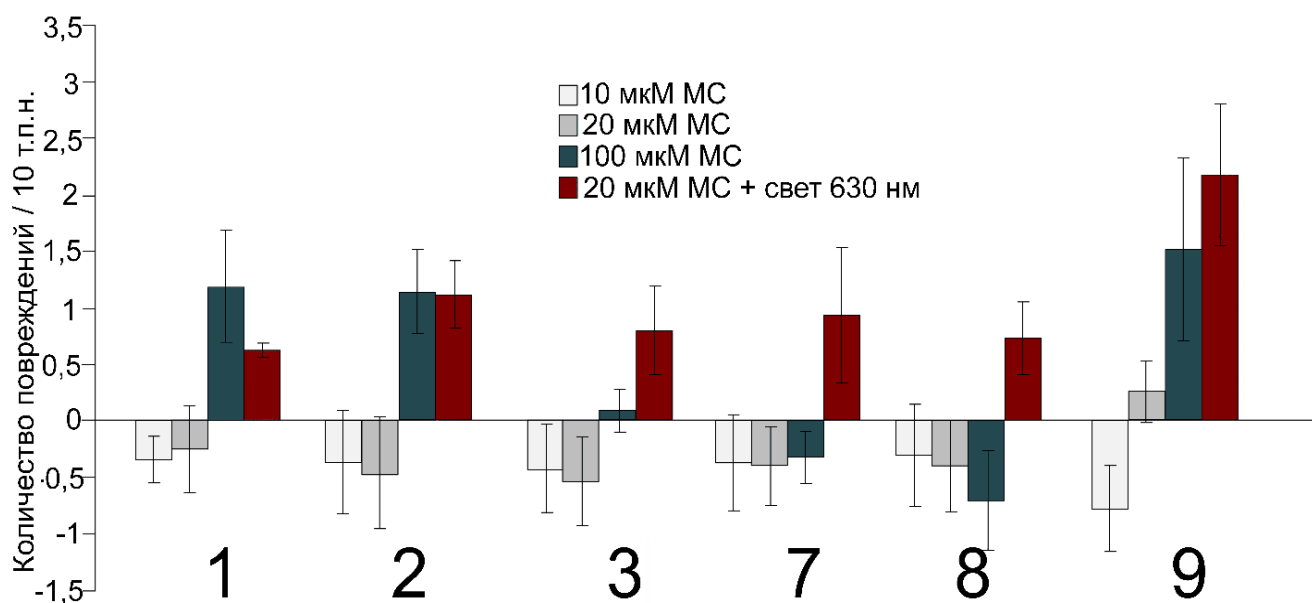


Рис. 9. Количество повреждений в мтДНК, индуцируемое 10, 20 и 100 мкМ МС, а также при фотодинамической терапии с 20 мкМ и облучением лазером с длиной волны 630 нм.

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. 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. Мы предполагаем, что это связано с особенностью транспорта ротенона через гематоэнцефалический барьер. 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. Концентрация диеновых конъюгатов была ниже на 28%. Таким образом, проведенные исследования показывают, что МС может частично препятствовать ротенон-индуцируемой нейротоксичности в среднем мозге. Эти результаты подтверждают перспективность данного соединения в терапии возрастных нейродегенеративных заболеваний.

Мы не обнаружили повреждений в мтДНК ни в одном из исследуемых фрагментов у мышей, получавших инъекции  $\beta$ -ГПК в течение 3 недель. Это исследование подтверждает возможность безопасного использования данного аналога креатина для стимуляции митохондриального биогенеза в мозге стареющего организма с целью продления активного долголетия. Активаторы PPAR $\alpha$  являются более токсичными соединениями. Помимо увеличения содержания диеновых конъюгатов в печени, 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.

## 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. Нарушение стабильности митохондриального биогенеза может быть первым звеном в цепи дегенеративных процессов, которые, в конце концов, могут привести к развитию нейродегенеративных заболеваний. Согласно полученным результатам мы можем предположить, что Nrf2/ARE-сигнальный путь играет более важную роль в активации митохондриального биогенеза в мозге, чем PGC-1 $\alpha$ . Вероятно, что PGC-1 $\alpha$  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 $\alpha$ , в мозге экспрессируется меньше, чем в других метаболически активных тканях (Villena, 2015). Еще в работе Tritos et al. (2003) было показано, что влияние PGC-1 $\alpha$  на гомеостаз в мозге не столь

существенно, как в печени, белой и бурой жировой ткани. Однако бурное изучение физиологической роли PGC-1 $\alpha$  с 2008 года, которое во многом связано с работами Ricard Scarpulla (Scarpulla, 2008; Scarpulla, 2011; Scarpulla et al., 2012), привело к тому, что в данной области науки утвердилось мнение, что именно PGC-1 $\alpha$  полностью регулирует митохондриальный биогенез. Только недавно были опубликованы работы, которые показывали, что не во всех случаях индукция митохондриального биогенеза сопровождается активацией PGC-1 $\alpha$  (Merry and Ristow, 2016; Bernard et al., 2017). Наши результаты не позволяют опровергнуть причастность PGC-1 $\alpha$  к митохондриальному биогенезу в мозге, однако позволяют точно сказать, что Nrf2/ARE-сигнальный путь играет большую роль в поддержании количества митохондрий, чем PGC-1 $\alpha$ . Это может объясняться спецификой нервной ткани. Головной мозг расходует примерно 20% кислорода от общего количества, расходуемого организмом (Herculano-Houzel, 2011). 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 $\alpha$ , 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. Мы можем предположить, что это является одной из причин, почему Nrf2/ARE-сигнальный путь в большей мере, чем PGC-1 $\alpha$ , 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.

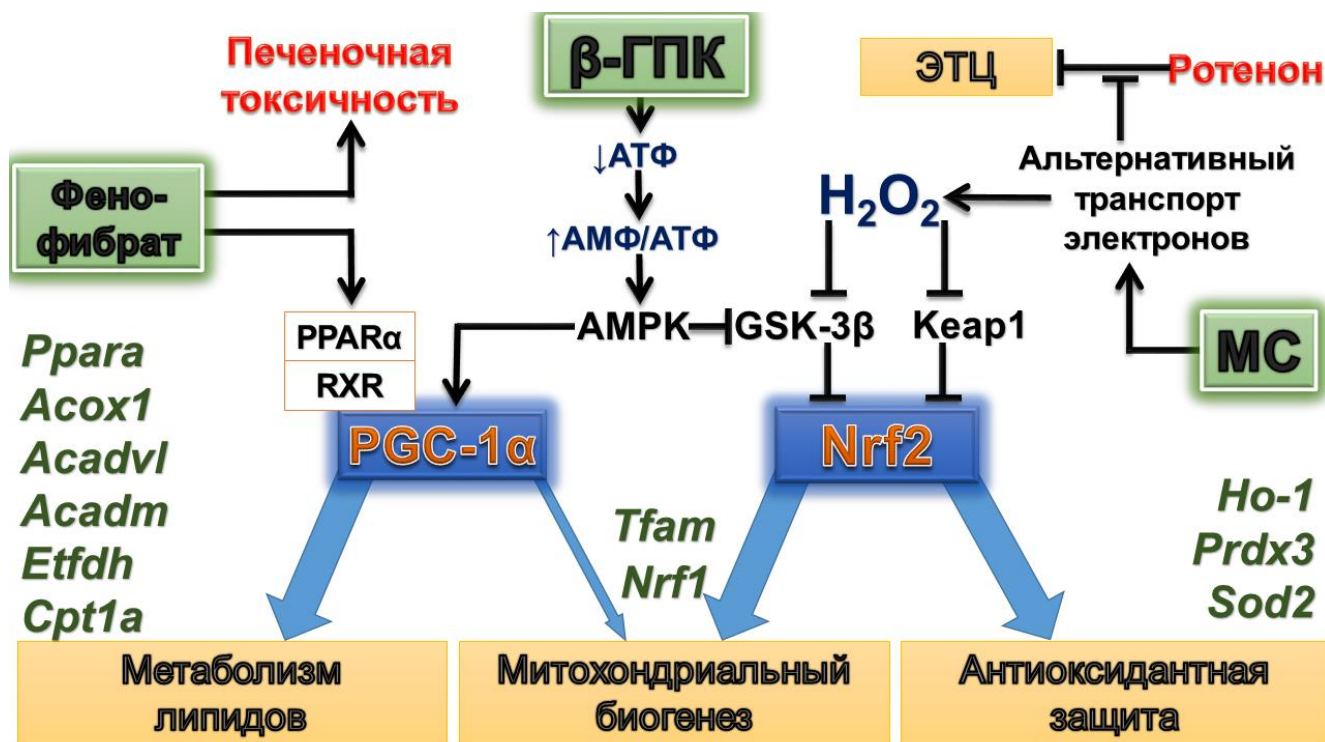


Рис. 10. Роль PGC-1 $\alpha$  и Nrf2 в регуляции митохондриального гомеостаза в мозге

## 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 перцептивная для тестирования потенциальных геронтопротекторов.

2. Установлено, что метиленовый синий в изолированных митохондриях мозга мышцы 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  $\beta$ -гуанидинопропионовой кислоты за счет снижения уровня креатина в мозге могут приводить к индукции АМФ-активированной протеинкиназы. Данный фермент по PGC-1 $\alpha$ -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 $\alpha$  и PPAR $\alpha$  вызывает увеличение экспрессии генов  $\beta$ -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  $\beta$ -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.  $\beta$ -гуанидинопропионовая кислота не вызывает окислительных повреждений.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

### Статьи из перечня журналов индексируемых Web of science, Scopus, ВАК

1. **Gureev A.P.**, Shaforostova E.A., Starkov A.A., Popov V.N. Simplified qPCR method for detecting excessive mtDNA damage induced by exogenous factors // *Toxicology*. – 2017. – Vol. 382. – P. 67-74 (Импакт-фактор – 3,639)

2. **Gureev A.P.**, Shaforostova E.A., Popov V.N. Regulation of mitochondrial biogenesis as a way for active longevity: interaction between the Nrf2 and PGC-1 $\alpha$  signaling pathways // *Frontiers in Genetics*. – 2019. - Vol. 10. – P. 435 (Импакт-фактор – 3,517)

3. **Gureev A.P.**, Shaforostova E.A., Popov V.N., Starkov A.A. Methylene blue does not bypass Complex III antimycin block in mouse brain mitochondria // *FEBS Letters*. – 2019. – Vol. 593. – P. 499-503 (Импакт-фактор – 3,373)

4. **Gureev A.P.**, Popov V.N. Nrf2/ARE pathway as a therapeutic target for the treatment of Parkinson diseases // *Neurochemical Research*. – 2019. – Vol. 44. – P. 2273–2279 (Импакт-фактор – 2,772)

5. **Gureev A.P.**, Syromyatnikov M.Y., Gorbacheva T.M., Starkov A.A., Popov V.N. Methylene blue improves sensorimotor phenotype and decreases anxiety in parallel with activating brain mitochondria biogenesis in mid-age mice // *Neurosci Res*. – 2016. – Vol. 113. – P. 19-27 (Импакт-фактор – 2,157)

6. **Gureev A.P.**, Shaforostova E.A., Laver D.A., Khorolskaya V.G., Popov V.N. Methylene blue elicits non-genotoxic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and protects brain mitochondria from rotenone toxicity // *Journal of Applied Biomedicine*. – 2019. – Vol. 17. – P. 107-114 (Импакт-фактор – 1,760)

7. **Gureev A.P.**, Shaforostova E.A., Starkov A.A., Popov V.N.  $\beta$ -Guanidinopropionic Acid Stimulates Brain Mitochondria Biogenesis and Alters Cognitive Behavior in Nondiseased Mid-Age Mice // *J Exp Neurosci*. – 2018. – Vol. 12. – P. 1179069518766524 (Импакт-фактор – 1,250)

8. **Гуреев А.П.**, Шматкова М.Л., Башмаков В.Ю., Старков А.А., Попов В.Н. Влияние фенофибрата на экспрессию генов бета-окисления жирных кислот и связанные с ним свободнорадикальные процессы // *Биомедицинская химия*.— 2016.— Т. 62, вып. 4. - С. 426-430. (Импакт-фактор - 0,941)

9. Хорольская В.Г., **Гуреев А.П.**, Шафоростова Е.А., Лавер Д.А., Попов В.Н. Влияние фенофибрата на генотоксичность в мозге и печени, а также на экспрессию генов, регулирующих метаболизм жирных кислот у мышей // *Биомедицинская химия*.— 2019. – Т. 65, вып. 5. (Импакт-фактор - 0,941)

### Статьи в сборниках

10. **Гуреев А.П.**, Кокина А.В., Сыромятников М.Ю., Попов В.Н. Оптимизация методов выделения митохондрий из разных тканей мышцы // Вестник Воронежского государственного университета. Сер. Химия. Биология. Фармация. — Воронеж, 2015. — № 4. - С. 61-65.

11. **Гуреев А.П.**, Шматкова М.Л., Солодских С.А., Попов В.Н. Сравнение профиля экспрессии генов бета-окисления при индукции рецепторов, активируемых пероксисомными пролифераторами субтипов альфа и гамма // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов. — Воронеж, 2014. — Вып. 16. - С. 34-37.

12. **Гуреев А.П.**, Кокина А.В., Сыромятников М.Ю., Горбачева Т.М., Попов В.Н. Скорость продукции перекиси водорода в различных тканях мышечной // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов. — Воронеж, 2015. — Вып. 17. - С. 65-68.

13. Шафоростова Е.А., **Гуреев А.П.**, Сыромятников М.Ю., Попов В.Н. Влияние внешних факторов на целостность структуры митохондриальной ДНК // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов: межрегиональный сборник научных работ. — Воронеж, 2016. — Вып. 18. - С. 192-196.

14. Виткалова И.Ю., Таможникова Д.Г., **Гуреев А.П.**, Попов В.Н. Изучение характера распределения псевдогенов митохондриальной ДНК млекопитающих // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов: межрегиональный сборник научных работ. — Воронеж, 2017. — Вып. 19. - С. 35-39. — 0,4 п.л.

### Тезисы конференций

15. **Gureev A.P.**, Syromyatnikov M.Y., Starkov A.A., Popov V.N. Methylene Blue Rejuvenates Behavior and Induces Brain Mitochondria Biogenesis in Aging Mice // «biomedical innovation for healthy longevity» international conference, Saint-Petersburg, 25-28 April 2016.— P. 84.

16. **Gureev A.P.**, Starkov A.A., Popov V.N. NRF2 Activators Can Support Mitochondrial Functionality in Aged Animals for Possible Maintaining of Active Longevity // International conference «Interventions to extend healthspan and lifespan», 23-26 April 2018 г., Kazan.

17. **Гуреев А.П.**, Шафоростова Е.А., Сыромятников М.Ю. Влияние метиленового синего на биогенез митохондрий мозга мышечной // Ломоносов - 2015. Секция "Биология": тезисы 22 международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, 13-17 апреля 2015 г. — Москва, 2015.— С. 252-253.

18. **Гуреев А.П.** Технология использования активных форм кислорода как биомиметиков для создания инновационных препаратов для лечения нейродегенеративных заболеваний // Актуальные направления научных исследований XXI века: теория и практика: сборник научных трудов по материалам Международной заочной научно-практической конференции. — Воронеж, 2014. — № 4, ч. 3 (9-3). - С. 433-43.

19. **Гуреев А.П.**, Шафоростова Е.А., Попов В.Н. Взаимодействие ядерного и митохондриального генома и терапия нейродегенерации // Постгеномные

технологии в медицине: от теории к практике: тезисы международной научной конференции, Воронеж 2-3 ноября 2015 г., Воронеж. — С. 56-58.

20. Шафоростова Е.А., Гуреев А.П., Сыромятников М.Ю., Попов В.Н. Определение количества повреждений митохондриальной ДНК, индуцированных перекисью водорода // Постгеномные технологии в медицине: от теории к практике: сборник тезисов 2 Международной научной конференции, Воронеж, 1-2 ноября 2016 г. — Воронеж, 2016. — С. 82-88.

21. Таможникова Д.Г., Шафоростова Е.А., Виткалова И.Ю., Гуреев А.П., Попов В.Н. Использование метиленового синего в качестве фотосенсибилизатора при фотодинамической терапии // Прикладные информационные аспекты медицины: 3 Международная научная конференция "Постгеномные технологии в медицине: от теории к практике", Воронеж, 17-18 октября 2017 г. — Воронеж, 2017. — Т. 20 № 4. - С. 42-45.