

Влияние Мексидола на церебральный митохондриогенез в молодом возрасте и при старении

© Ю.И. КИРОВА¹, Ф.М. ШАКОВА¹, Э.Л. GERMANOVA¹, Г.А. РОМАНОВА¹, Т.А. ВОРОНИНА²

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», Москва, Россия;

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии им. В.В. Закусова», Москва, Россия

Резюме

Цель исследования. Изучение способности лекарственного препарата Мексидол индуцировать церебральный митохондриогенез в мозге молодых и стареющих крыс.

Материал и методы. В коре головного мозга молодых (3 мес; $n=216$) и стареющих (6, 9, 12 и 15 мес; $n=168$) аутбредных крыс-самцов методом вестерн-блот-анализа оценивали уровень экспрессии белков-маркеров церебрального митохондриогенеза при курсовом применении Мексидола (20, 40, 100 мг/кг; 20 дней; внутривнутрибрюшинно).

Результаты. Впервые показано, что курсовое введение Мексидола в дозах 40 и 100 мг/кг сопровождается дозозависимой индукцией сукцинатного рецептора SUCNR1 и белков-маркеров биогенеза митохондрий: транскрипционного коактиватора PGC-1 α , транскрипционных факторов (NRF1, TFAM), каталитических субъединиц дыхательных ферментов (NDUFV2, SDHA, cyt b, COX2) и АТФ-синтазы (ATP5A) в коре головного мозга аутбредных крыс-самцов молодого и стареющего возраста. Мексидолзависимая гиперэкспрессия субъединиц митохондриальных ферментов и PGC-1 α отмечается только при курсовом применении препарата.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о способности Мексидола индуцировать церебральный митохондриогенез и устранять митохондриальную дисфункцию у молодых и стареющих животных и, таким образом, оказывать влияние на одно из ключевых патогенетических звеньев развития нарушений при старении и нейродегенеративных заболеваниях.

Ключевые слова: старение, митохондриальная дисфункция, Мексидол, сукцинатный рецептор, церебральный митохондриогенез, транскрипционный коактиватор PGC-1 α

Информация об авторах:

Кирова Ю.И. — <https://orcid.org/0000-0002-2436-3661>; e-mail: bioenerg@mail.ru

Шакова Ф.М. — <https://orcid.org/0000-0002-0494-2500>; e-mail: shakova.fatima@yandex.ru

Германова Э.Л. — <https://orcid.org/0000-0003-1191-8477>; e-mail: elgerm@mail.ru

Романова Г.А. — <https://orcid.org/0000-0003-0090-351X>; e-mail: romanovaga@mail.ru

Воронина Т.А. — <https://orcid.org/0000-0001-7065-469X>; voroninata38@gmail.com

Как цитировать:

Кирова Ю.И., Шакова Ф.М., Германова Э.Л., Романова Г.А., Воронина Т.А. Влияние Мексидола на церебральный митохондриогенез в молодом возрасте и при старении. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2020;120(1):55-62. <https://doi.org/10.17116/jnevro202012001155>

The effect of Mexidol on cerebral mitochondriogenesis at a young age and during aging

© YU.I. KIROVA¹, F.M. SHAKOVA¹, E.L. GERMANOVA¹, G.A. ROMANOVA¹, T.A. VORONINA²

¹Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia;

²Zakusov Research Institute of Pharmacology, Moscow, Russia

Abstract

Objective. To study the ability of mexidol to induce cerebral mitochondriogenesis in the brain of young and aging rats.

Material and methods. Expression level of marker proteins of cerebral mitochondriogenesis was evaluated during treatment with mexidol (20, 40, 100 mg/kg; 20 days; intraperitoneally) in the cerebral cortex of young (3 month) and aging (6, 9, 12, and 15 month) outbred male rats, using the Western blot analysis.

Results. It has been shown for the first time that the course injections of mexidol in doses of 40 and 100 mg/kg is accompanied by dose-dependent induction of the succinate receptor SUCNR1 and protein markers of mitochondrial biogenesis: transcription coactivator PGC-1 α , transcription factors (NRF1, TFAM), catalytic subunits of respiratory enzymes (NDUV2, NDUV2, cyt b, COX2) and ATP synthase (ATP5A) in the cerebral cortex of young and aging outbred male rats. Mexidol-dependent overexpression of subunits of mitochondrial enzymes and PGC-1 α is observed only with the course of the drug.

Автор, ответственный за переписку: Кирова Юлия Игоревна — e-mail: bioenerg@mail.ru

Corresponding author: Kirova Yu.I. — e-mail: bioenerg@mail.ru

Conclusion. The results indicate the ability of mexidol to induce cerebral mitochondriogenesis and eliminate mitochondrial dysfunction in young and aging animals and, thus, exert an effect on one of the key pathogenetic links of the development of disorders in aging and neurodegenerative diseases.

Keywords: aging, mitochondrial dysfunction, mexidol, succinate receptor, cerebral mitochondriogenesis, transcriptional coactivator PGC-1 α , respiratory enzyme subunits, rats, Western blot analysis.

Information about authors:

Kirova Yu.I. — <https://orcid.org/0000-0002-2436-3661>; e-mail: bioenerg@mail.ru
Shakova F.M. — <https://orcid.org/0000-0002-0494-2500>; e-mail: shakova.fatima@yandex.ru
Germanova E.L. — <https://orcid.org/0000-0003-1191-8477>; e-mail: elgerm@mail.ru
Romanova G.A. — <https://orcid.org/0000-0003-0090-351X>; e-mail: romanovaga@mail.ru
Voronina T.A. — <https://orcid.org/0000-0001-7065-469X>; e-mail: voroninata38@gmail.com

To cite this article:

Kirova YuI, Shakova FM, Germanova EL, Romanova GA, Voronina TA. The effect of mexidol on cerebral mitochondriogenesis at a young age and during aging. *S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry = Zhurnal Nevrologii i Psikhatrii im. S.S. Korsakova*. 2020;120(1):55-62. (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/jnevro202012001155>

Старение является процессом прогрессирующего замедления всех физиологических функций организма и характеризуется нарушением биологических процессов, приводящим к аккумуляции негативных изменений в клеточных и субклеточных структурах. При старении нарушается весь функциональный спектр реакций: когнитивные и моторные функции, эмоции, память, ощущения, адаптивное поведение, скорость реакций и др. Старение провоцирует возрастные нейродегенеративные заболевания [1, 2].

Одной из гипотез старения является свободнорадикальная гипотеза, согласно которой избыток свободных радикалов является лимитирующей детерминантой продолжительности жизни. Согласно В.П. Скулачеву, старение рассматривается как «медленный феноптоз, который запускается с помощью внутримитохондриальных активных форм кислорода», и «если построить кривые зависимости продолжительности жизни организма от количества свободных радикалов в митохондриях, то выясняется определенная закономерность: чем больше в клетке свободных радикалов, тем меньше мы живем» [3].

В клинической и амбулаторной практике для лечения различных заболеваний, в том числе ишемии мозга и возрастных нейродегенеративных болезней, с успехом применяется отечественный оригинальный лекарственный препарат Мексидол (2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцинат). Его механизм действия определяется влиянием на процессы, которые являются базисными в повреждающем действии на клеточные структуры, в том числе при старении, а именно, он обладает антиоксидантным, антигипоксантным и мембранотропным эффектами [4], способностью улучшать энергетический статус клетки [5], уменьшать глутаматную эксайтотоксичность [6]. Мексидол восстанавливает биохимические процессы в цикле Кребса, подавляет аскорбатзависимое (неферментативное) и НАДФН₂-зависимое перекисное окисление липидов, значительно повышает активность Se-зависимой глутатионпероксидазы, снижает активность индуцибельной NO-синтазы, в высоких концентрациях способен связывать супероксидный анион-радикал [7].

Наличие сукцината в структуре Мексидола послужило основанием для изучения его влияния на митохондриальную дисфункцию, которая является ключевым патогене-

тическим звеном при старении и различных нейродегенеративных заболеваниях. Известно, что сукцинат реализует сигнальную функцию через сукцинатный рецептор SUCNR1/GPR91 (succinate receptor 1/G protein-coupled receptor 91), сопряженный с G-белком [8]. SUCNR1 экспрессируется во всех органах и тканях, в подавляющем большинстве типов клеток, является сенсором экстраклеточного уровня янтарной кислоты, продукция которой митохондриями увеличивается в условиях гипоксии, ишемии, интоксикации. Активация сукцинатного рецептора сопровождается развитием тканеспецифичных эффектов, таких как стимуляция сердечной деятельности, повышение артериального давления, активация эритропоэза и ангиогенеза. В целом эффекты от активации рецептора могут быть охарактеризованы как антигипоксические, адrenomиметические, направленные на преодоление энергетического дисбаланса [9]. Сукцинатная сигнализация выявляется в нейронах, астроцитах, микроглии, в условиях физиологической нормы и при ишемии, на этапе эмбрионального и постнатального развития, имеет критическое значение для васкуляризации и ангиогенеза мозга [9, 10].

Активация сукцинатного рецептора в нейронах инициирует G α_q -белок-сопряженные сигнальные пути, причастные не только к ангиогенезу, но и биогенезу митохондрий, контролируемому транскрипционным коактиватором PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha) [10–12]. PGC-1 α интегрирует метаболические и нейрогормональные сигналы, служит детектором энергетического состояния клетки и осуществляет тонкую настройку митохондриального аппарата клеток к текущим энергетическим потребностям. PGC-1 α активирует транскрипционные факторы (NRF, nuclear respiratory factor; PPAR, proliferator peroxisome activated receptor; ERR, estrogen-related receptor), контролирующие экспрессию генов ферментов дыхательной цепи митохондрий, β -окисления высших жирных кислот, цикла трикарбоновых кислот, ангиогенных факторов и антиоксидантных ферментов, т.е. обеспечивает усиление тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования без ущерба от окислительного повреждения [11, 12].

Арсенал активаторов митохондриогенеза крайне ограничен и включает: фибраты — агонисты рецептора, ак-

тивируемого пролифератором пероксисом (индуцируют PGC-1 α); метформин, 5-аминоимдазол-4-карбоксамид-рибонуклеозид (AICAR) — активаторы АМР-активируемой протеинкиназы (фосфорилируют и активируют PGC-1 α); изофлавоноиды (ресвератрол) — активаторы деацетилазы Sirt1 (деацетируют и активируют PGC-1 α) [11], которые (фибраты и метформин) имеют существенные нейротоксические эффекты [12].

Цель исследования — изучение способности Мексидола, опосредуемой сукцинатным рецептором, индуцировать церебральный митохондриогенез в мозге молодых и стареющих крыс.

Материал и методы

Исследование было выполнено на белых беспородных крысах-самцах разных возрастных групп (3, 6, 9, 12, 15 мес; $n=384$), выращенных в стандартных условиях вивария ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» при естественном чередовании суточной освещенности, свободном доступе к пище и воде.

Мексидол использовали в инъекционной форме (ООО «НПК «ФАРМАСОФТ», 50 мг/мл), вводили внутривенно (в/в), ежедневно на протяжении 20 дней. Изучение дозозависимого влияния Мексидола на индукцию церебрального митохондриогенеза проводили на крысах в возрасте 3 мес. Было проведено три серии экспериментов: курс Мексидола в дозе 20 мг/кг (M_{20}), 40 мг/кг (M_{40}), 100 мг/кг (M_{100}). Кроме того, применяли 8-дневный курс в/в введения Мексидола в дозе 40 мг/кг крысам в возрасте 3, 6, 9, 12, 15 мес. Для каждого анализируемого периода курса (1, 3, 8, 12, 20-й день) были сформированы группы контроля (курс ежедневных инъекций физиологического раствора; 17 групп, в каждой $n=6$) и опытные группы (42 группы, в каждой $n=6$). Для каждого возраста формировали группу интактных крыс (5 возрастных групп, в каждой $n=6$). Забой животных осуществляли декапитацией под эфирным наркозом через 1, 3, 8, 12, 20-е сутки после начала эксперимента (группы контроля), через 2 ч и 24 ч после 1, 3, 8, 12, 20-й инъекции (опытные группы).

Кору головного мозга отделяли на льду, замораживали и хранили в жидком азоте.

Индукцию митохондриогенеза оценивали методом вестерн-блот-анализа [13]. Определяли уровень экспрессии транскрипционного коактиватора PGC-1 α , транскрипционных факторов NRF1 (nuclear respiratory factor 1) и TFAM (mitochondrial transcription factor A), каталитических субъединиц митохондриальных ферментов: НАДН дегидрогеназы флавопротеин 2 (NDUFV2); сукцинатдегидрогеназы субъединица А (SDHA); цитохром b (cyt b); цитохром с оксидазы II субъединица (COX2); АТФ-синтазы альфа цепь (ATP5A). Также в образцах коры головного мозга оценивали уровень экспрессии сукцинатного рецептора (SUCNR1/GPR91) и фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) — маркера активации SUCNR1.

Белки цитозольного экстракта коры головного мозга [14] разделяли в 10% полиакриламидном геле, переносили на нитроцеллюлозную мембрану электроотлюющей. Мембрану инкубировали с первичными поликлональными антителами (разведение 1:500; 14 ч; 4 °C; Santa Cruz Biotechnology, США; sc-518025; sc-101102; sc-166965; sc-324161; sc-27992; sc-11436; sc-514489; sc-49162; sc-50466; sc-365578) и вторичными антителами (разведение 1:5000; 1 ч; 4 °C; sc-516102;

sc-2030; sc-2768), конъюгированными с пероксидазой хрена. В качестве контроля использовали антитела к актину (sc-10731). Детектирование белков осуществляли в реакции с ECL-реагентами («Pierce Biotechnology, Inc.», США) на пленку фирмы «Kodak» с последующей денситометрией в программе Adobe Photoshop. О содержании искомого белка судили по плотности окрашивания полосы связывания антител с белком. Результат выражали в относительных денситометрических единицах.

Эксперименты проводили в соответствии с Национальным стандартом РФ ГОСТ Р-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики», Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. Протоколы экспериментов были утверждены этическим комитетом ФГБНУ НИИОПП.

Статистический анализ данных выполняли с помощью программных пакетов Statistica 10,0 («Stat Soft Inc.», США) с использованием непараметрического рангового U-критерия Уилкоксона (Уилкоксона—Манна—Уитни). Различия между сравниваемыми группами считали статистически достоверными при $p<0,05$.

Результаты и обсуждение

Влияние Мексидола на экспрессию каталитических субъединиц дыхательных ферментов и АТФ-синтазы в коре головного мозга 3-месячных крыс

Мексидол в дозе 20 мг/кг (20 дней) не оказывал влияния на экспрессию каталитических субъединиц дыхательных ферментов. Курсовое применение Мексидола в дозах 40 и 100 мг/кг сопровождалось индукцией каталитических субъединиц всех четырех комплексов дыхательных ферментов митохондрий, при этом с увеличением дозы эффект развивался раньше, был более выраженным и продолжительным (рис. 1).

На фоне введения Мексидола наиболее значительной и длительной была индукция каталитической субъединицы SDHA (см. рис. 1, б). Увеличение уровня экспрессии субъединицы имело линейный характер, происходило дозозависимо на протяжении 8 дней (повышение от доз 40 и 100 мг/кг на 30 и 60% соответственно), но на этапе 12—20-х суток дозозависимые различия нивелировались, что свидетельствует о достижении максимального эффекта индукции SDHA. Полученные данные были ожидаемыми, поскольку отражают реализацию регуляторного гомеостатического механизма — индукцию фермента субстратом. Кроме того, об активации SDHA при введении в организм янтарной кислоты сообщалось ранее [15].

На фоне введения Мексидола также отмечена ранняя, выраженная, но менее продолжительная в сравнении с SDHA индукция cyt b (см. рис. 1, в). После 3-й инъекции Мексидола (40 и 100 мг/кг) наблюдали максимальный уровень экспрессии cyt b (160 и 170% в сравнении с контролем), после чего уровень снижался, составляя на этапе 8 и 20-го дня 130 и 140% соответственно. Известно, что сукцинат является предшественником молекулы гема [16] и в условиях гипоксической аккумуляции или экзогенного введения потенцирует синтез гемсодержащих белков, в частности cyt b. По мере увеличения уровня экспрессии SDHA и скорости окисления сукцината синтез гема и cyt b должен тормозиться, что и выражается в ограничении индукции cyt b.

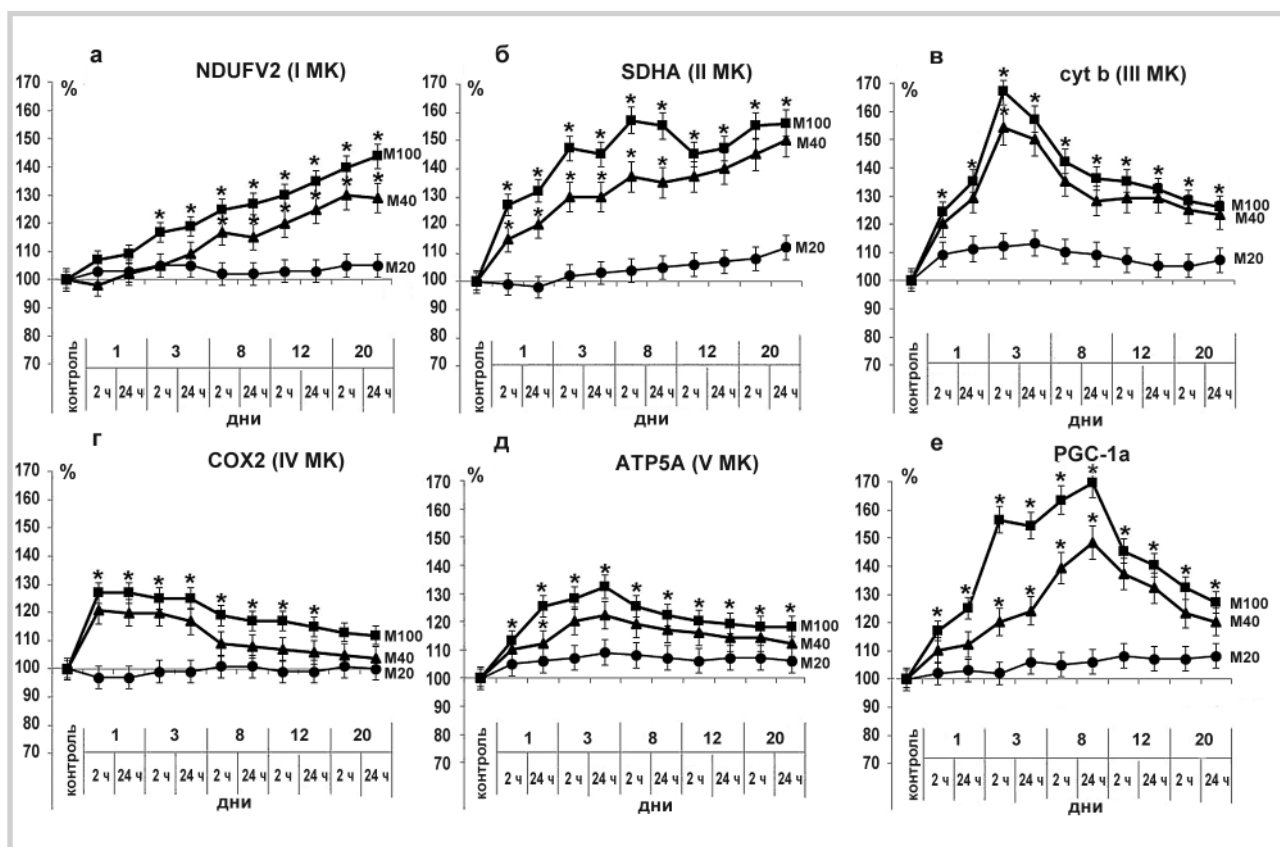


Рис. 1. Динамика экспрессии каталитических субъединиц дыхательных ферментов (NDUFV2, SDHA, cyt b, COX2) и АТФ-синтазы (АТP5A), транскрипционного коактиватора PGC-1α в коре головного мозга крыс при курсовом применении Мексидола (20, 40, 100 мг/кг, в/б, ежедневно, 20 дней).

По оси ординат представлены данные вестерн-блот-анализа в % от контроля, принятого за 100%. По оси абсцисс — дни, в которые проводили забор ткани (через 2 ч и 24 ч после инъекции). М20 — введение Мексидола в дозе 20 мг/кг, М40 — 40 мг/кг, М100 — 100 мг/кг. МК — митохондриальный комплекс. * — данные статистически значимо отличаются от контроля ($p < 0,01$). «Контроль» — первая отметка по оси абсцисс.

Fig. 1. Dynamics of expression of catalytic subunits of respiratory enzymes (NDUFV2, SDHA, cyt b, COX2) and ATP synthase (ATP5A), transcriptional coactivator PGC-1α in cerebral cortex of rats subjected to course application of Mexidol (20, 40, 100 mg/kg, intraperitoneal injection, daily, 20 days).

The ordinate axis presents the Western blot analysis data in % of the control taken as 100%. The abscissa marks the days of the course when the cerebral cortex tissue was taken (2 hours and 24 hours after the injection). M20 — injection of mexidol at a dose of 20 mg/kg, M40 — 40 mg/kg, M100 — 100 mg/kg MC — mitochondrial complex. * — data are statistically significantly different from the control ($p < 0.01$).

Паттерн экспрессии каталитической субъединицы IV комплекса COX2 после введения Мексидола был сходен с динамикой уровня cyt b, но индукция была менее выраженной (см. рис. 1, г). Максимальное содержание COX2 выявляли в первые 3 дня курсового применения Мексидола в дозах 40 и 100 мг/кг (130 и 140% в сравнении с контролем), к завершению курсов наблюдали снижение содержания COX2 до уровня контроля.

Таким образом, отличительной особенностью мексидол-индуцированной экспрессии субъединиц дыхательной цепи является первичная выраженная индукция гемосодержащих дыхательных ферментов (cyt b), синтез которых является сукцинатзависимым, которая сменяется умеренно повышенной экспрессией по мере усиления индукции SDHA.

Индукция cyt b имеет важное значение в связи с увеличением экспрессии каталитической субъединицы NDUFV2 I комплекса дыхательных ферментов, которое происходило линейно дозозависимо на протяжении курсов Мексидола (40 и 100 мг/кг), составляя к 20-му дню 30 и 40% соответственно. Известно, что I комплекс формирует суперком-

плекс или респирасому с III (b-c1 комплекс) и IV митохондриальными комплексами. Недостаточная экспрессия цитохромов в процессе биогенеза митохондрий приводит к увеличению продукции активных форм кислорода и снижению активности I комплекса [17–19].

Паттерн экспрессии АТP5A при введении Мексидола отличался от динамики содержания субъединиц субстратного и цитохромного участков дыхательной цепи — уровень АТP5A был умеренно и равномерно повышен в ходе курсов применения Мексидола в дозах 40 и 100 мг/кг, составляя 120 и 130% в сравнении с контролем соответственно (см. рис. 1, д).

Влияние Мексидола на экспрессию транскрипционного коактиватора PGC-1α, транскрипционных факторов NRF1 и TFAM, сукцинатного рецептора SUCNR1, фактора роста эндотелия сосудов VEGF в коре головного мозга 3-месячных крыс

В настоящее время накоплены данные о сигнальных механизмах, причастных к индукции PGC-1α. Они включают кальций-/кальмодулинзависимую протеинкиназу

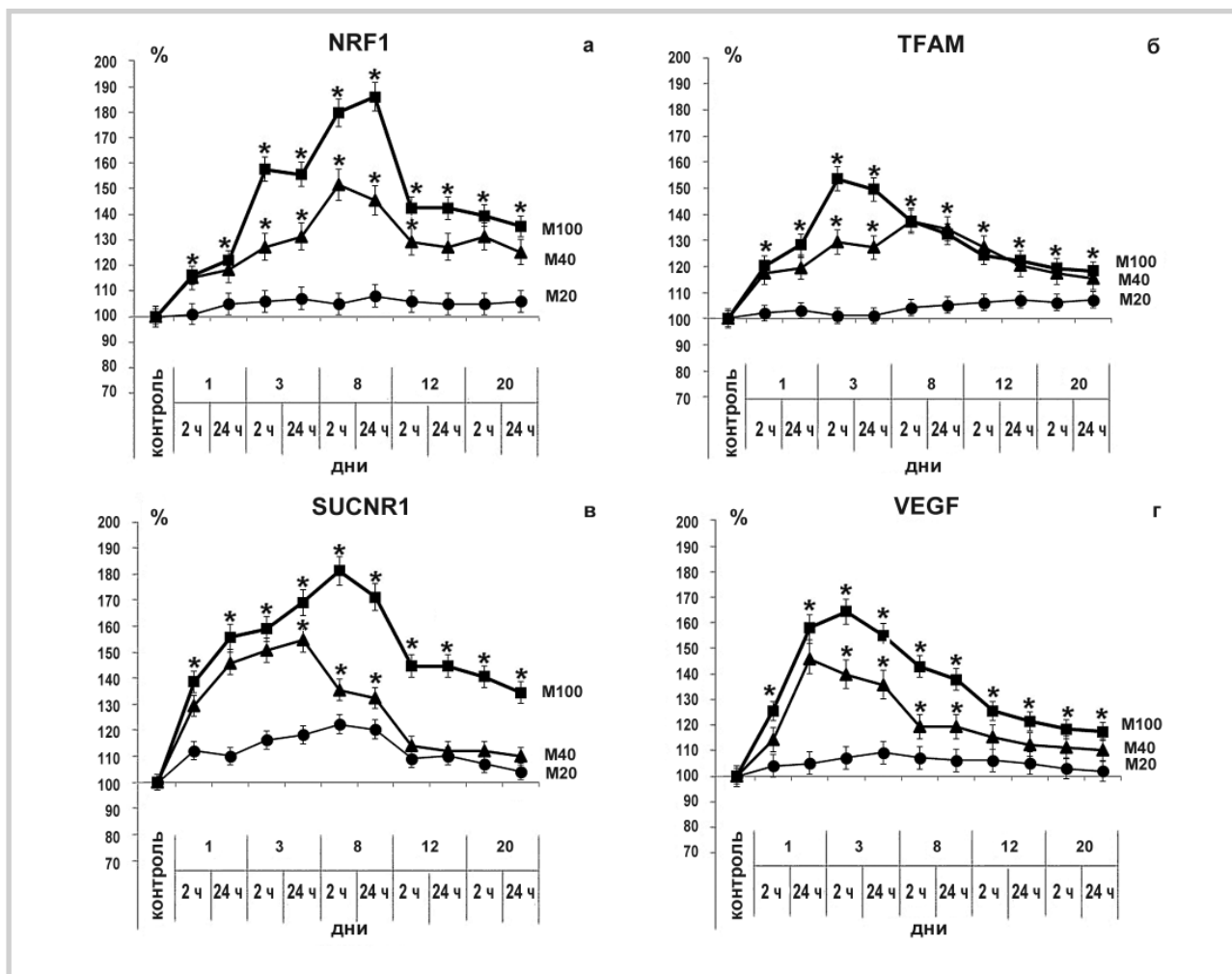


Рис. 2. Динамика экспрессии транскрипционных факторов NRF1 и TFAM, сукцинатного рецептора SUCNR1, фактора роста эндотелия сосудов VEGF в коре головного мозга крыс при курсовом применении Мексидола (20, 40, 100 мг/кг, в/б, ежедневно, 20 дней). По оси ординат представлены данные вестерн-блот-анализа в % от контроля, принятого за 100%. По оси абсцисс — дни, в которые проводили забор ткани (через 2 ч и 24 ч после инъекции). M20 — введение Мексидола в дозе 20 мг/кг, M40 — 40 мг/кг, M100 — 100 мг/кг. * — данные статистически значимо отличаются от контроля ($p < 0,01$). «Контроль» — первая отметка по оси абсцисс.

Fig. 2. Dynamics of expression of transcription factors NRF1 and TFAM, succinate receptor SUCNR1, vascular endothelial growth factor VEGF in cerebral cortex of rats subjected to course application of mexidol (20, 40, 100 mg/kg, intraperitoneal injections, daily, 20 days). The ordinate axis presents the Western blot analysis data in % of the control taken as 100%. The abscissa marks the days of the course when the cerebral cortex tissue was taken (2 hours and 24 hours after the injection). M20 — injection of mexidol at a dose of 20 mg/kg, M40 — 40 mg/kg, M100 — 100 mg/kg. * — data are statistically significantly different from the control ($p < 0.01$).

(CaMK) и АМФ-активируемую протеинкиназу (АМПК), NO-зависимую растворимую гуанилатциклазу, кальциневрин А, β-адренергический/цАМФ-путь [10, 12]. Са⁺²-, СаМК-, PGE2-, NO-зависимые сигнальные пути известны для церебральной сукцинат/SUCNR1 сигнализации [9, 10] и, таким образом, индукция PGC-1α может осуществляться через активацию сукцинатного рецептора.

Индукция каталитических субъединиц митохондриальных ферментов под влиянием Мексидола (40 и 100 мг/кг) происходила сопряженно с дозозависимым увеличением уровня экспрессии PGC-1α (см. рис. 1, е), NRF1, TFAM (рис. 2, а, б). Введение Мексидола в дозе 20 мг/кг не влияло на экспрессию коактиватора PGC-1α и транскрипционных факторов NRF1 и TFAM. Известно, что NRF1, активированный под действием PGC-1α, контролирует экспрессию субъединиц дыхательных ферментов, закодированных в ядре (NDUFV2, SDHA, ATP5A) и TFAM. TFAM акти-

вирует экспрессию субъединиц, кодируемых мтДНК (сyt b, COX2) [11, 12]. Таким образом, курсовое применение Мексидола сопровождалось не только активацией критически значимых регуляторов митохондриального биогенеза, но и их индукцией.

При курсовом применении Мексидола в дозах 40 и 100 мг/кг выявлено дозозависимое увеличение экспрессии SUCNR1 и сопряженная индукция VEGF (см. рис. 2, в, г). Известно, что индукция VEGF служит маркером активации SUCNR1 [8—10]. В настоящем исследовании впервые установлено, что сукцинатная сигнализация сопровождается в коре головного мозга не только увеличением экспрессии SUCNR1 и VEGF, но также индукцией ключевого регулятора митохондриогенеза млекопитающих PGC-1α и маркеров биогенеза митохондрий — NRF1, TFAM, каталитических субъединиц дыхательной цепи и АТФ-синтазы. Впервые показано, что ключевой механизм повышения то-

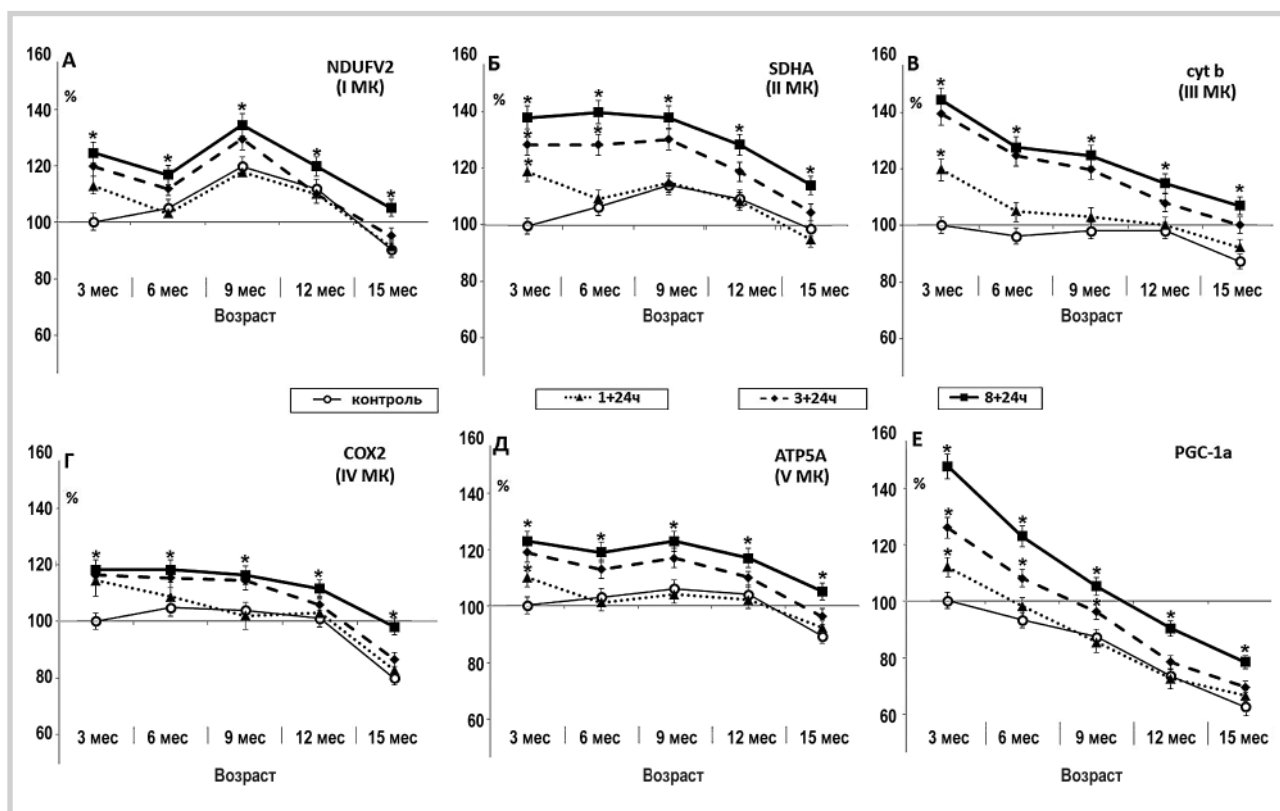


Рис. 3. Динамика экспрессии каталитических субъединиц дыхательных ферментов митохондрий (NDUFV2, SDHA, cyt b, COX2), АТФ-синтазы (ATP5A), транскрипционного коактиватора PGC-1α в коре головного мозга крыс разных возрастных групп (от 3 до 15 мес) на протяжении 8-дневного курса инъекций Мексидола (40 мг/кг, в/б, ежедневно).

По оси ординат представлены данные вестерн-блот-анализа. 100% — базовый уровень экспрессии тестируемых белков в коре головного мозга интактных крыс в возрасте 3 мес. По оси абсцисс — анализируемые возрастные группы. МК — митохондриальный комплекс. 1, 3, 8 — дни, в которые проводили взятие образцов коры головного мозга (через 24 ч после инъекции). * — данные статистически значимо отличаются от базового уровня экспрессии белка в коре головного мозга интактных крыс соответствующей возрастной группы ($p < 0,01$).

Fig. 3. Dynamics of expression of the catalytic subunits of mitochondrial respiratory enzymes (NDUFV2, SDHA, cyt b, COX2), ATP synthase (ATP5A), transcriptional coactivator PGC-1α in the cerebral cortex of rats of different age groups (from 3 to 15 months) subjected to 8-day course of injection of Mexidol (40 mg/kg, intraperitoneally, daily).

The ordinate axis presents the Western blot analysis data. Basic level of expression of the tested proteins in cerebral cortex rats at the age of 3 months taken as 100%. The abscissa marks the analyzed age groups. MC — mitochondrial complex. 1, 3, 8 — the days of the course when the cerebral cortex samples were taken (24 hours after the injection). * — data is statistically significantly different from the basic level of protein expression in the corresponding age group ($p < 0.01$).

лерантности мозга к гипоксии/ишемии биогенез митохондрий является сукцинат/SUCNR1-опосредуемым.

Индукция Мексидола PGC-1α, продемонстрированная в работе, расширяет представления о механизмах плейотропной нейропротекторной активности этого препарата.

Динамика экспрессии каталитических субъединиц дыхательных ферментов митохондрий, АТФ-синтазы и транскрипционного коактиватора PGC-1α в коре головного мозга крыс разных возрастных групп

Угнетение биогенеза митохондрий при старении связано с возрастным снижением уровня важнейших индукторов биогенеза митохондрий — тиреоидных гормонов, глюкокортикоидов, эстрогенов. Старческая митохондриальная дисфункция положительно коррелирует с репрессией PGC-1α и особенно ярко проявляется в ЦНС [20]. Увеличение уровня PGC-1α принципиально в защите нервных клеток от окислительного стресса и клеточной гибели. PGC-1α индуцирует белки, которые поддерживают устойчивость нейронов к метаболическим, окислительным, эксайтотоксическим и протеотоксическим стрессам, причастным к па-

тогенезу инсульта, болезни Альцгеймера, паркинсонизму [11]. Таким образом, PGC1-1α является уникальной потенциальной мишенью для коррекции возрастзависимой митохондриальной репрессии.

Для оценки эффективности Мексидола в индукции митохондриогенеза в коре головного мозга крыс разных возрастных групп препарат вводили в дозе 40 мг/кг (8 дней) животным в возрасте 3, 6, 9, 12, 15 мес.

Определение базового уровня экспрессии каталитических субъединиц дыхательных ферментов и АТФ-синтазы в коре головного мозга крыс разных возрастных групп (от 3 до 15 мес) показало, что увеличение их содержания отмечается только для субъединиц ферментов субстратного участка дыхательной цепи (NDUFV2 и SDHA) у крыс в возрасте 9 мес (рис. 3). У крыс в возрасте 15 мес уровень экспрессии NDUFV2, cyt b, COX2 и ATP5A достоверно снижались. Содержание SDHA, в отличие от других тестируемых субъединиц значимо не снижалось при старении крыс (см. рис. 3). SDHA (СДГ, комплекс II) отличается от других ферментных комплексов энергопродуцирующей системы митохондрий исключительно ядерным кодированием [19]. Именно этим

обстоятельством объясняется сохранение активности SDHA у стареющих животных, в то время как другие ферментные комплексы, кодируемые как ядерной, так и мтДНК, демонстрируют возрастзависимое снижение активности [20].

Выявленное у стареющих животных снижение экспрессии большинства исследованных каталитических субъединиц митохондриальных ферментов происходило сопряженно со снижением содержания ключевого активатора митохондриогенеза PGC-1 α (см. рис. 3, е).

Мексидолзависимая индукция митохондриальных субъединиц и PGC-1 α отмечена у молодых животных (возраст 3 мес) уже через 24 ч после первой инъекции Мексидола, у крыс в возрасте 6 и 9 мес — через 3 дня введения, а у крыс «возрастных» групп (12 и 15 мес) — через 8 дней введения Мексидола.

Наиболее значительным под влиянием Мексидола было увеличение экспрессии SDHA (II комплекс) и *cyt b* (III комплекс). Наблюдаемая избирательность эффектов Мексидола на экспрессию ферментов дыхательной цепи может быть связана с посттрансляционной модификацией (метилование, фосфорилирование, сукцинирование) PGC-1 α , что определяет разную специфичность транскрипционного коактиватора по отношению к генам-мишеням [12].

Полученные данные позволяют заключить, что индуцированный Мексидолом церебральный митохондриогенез характеризуется:

1) согласованной индукцией каталитических субъединиц всех комплексов энергопродуцирующей системы митохондрий, кодируемых ядерным и митохондриальным геномом, что может расцениваться как адаптивный (корректный) митохондриогенез;

2) значительной устойчивой индукцией каталитической субъединицы SDHA — важнейшей молекулярного нейротропного фактора, повышающего толерантность мозга к гипоксии, ишемии, интоксикации, что определяется целым рядом уникальных особенностей фермента: SDH — единственный ферментный комплекс дыхательной цепи, четыре субъединицы которого кодируются ядерной ДНК.

Остальные комплексы закодированы также в мтДНК, мутации которой накапливаются с возрастом и затрагивают все комплексы, исключая SDH, которая не теряет активности при старении; SDH проявляет фумаратредуктазную активность в условиях гипоксии/ишемии, в результате чего продуцируется сукцинат, поддерживается пул НАД⁺ и НАД⁺-зависимый гликолиз; SDH отличается наиболее высокой активностью среди всех ферментов цикла трикарбоновых кислот, устойчивостью к воздействию перекисных соединений и дыхательных ядов; SDH поддерживает электрон-транспортную и энергосинтезирующую функцию митохондрий в условиях гипоксии, ишемии, стресса, интоксикации [19].

Таким образом, Мексидол у молодых и стареющих животных вызывает индукцию сукцинатного рецептора SUCNR1, транскрипционного коактиватора PGC-1 α , транскрипционных факторов NRF1, TFAM, каталитических субъединиц дыхательных ферментов и АТФ-синтазы, что свидетельствует о сукцинат/SUCNR1-опосредованной индукции церебрального митохондриогенеза. Выявленный факт индукции Мексидолом биогенеза митохондрий в мозге расширяет представления о его механизме действия и терапевтическом потенциале, так как известно, что подавление митохондриального биогенеза и дисфункции митохондрий составляют патогенетическое звено нейродегенеративных заболеваний, ишемических повреждений мозга, старческих когнитивных нарушений и неврологических расстройств [12, 20].

Проведенное исследование впервые выявило вовлеченность Мексидола в механизмы индукции церебрального митохондриогенеза, что определяет возможность его использования для коррекции возрастзависимой и патологической репрессии биогенеза митохондрий в мозге, наблюдаемой при старении и различных нейродегенеративных заболеваниях.

**Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
The authors declare no conflicts of interest.**

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Анисимов В.Н. *Молекулярные и физиологические механизмы старения*. СПб.: Наука; 2003.
Anisimov VN. *Molecular physiology mechanisms of aging*. SPb.: Nauka; 2003. (In Russ.).
- Гомазков О.А. Клеточные и молекулярные принципы старения мозга. *Успехи современной биологии*. 2012;132(2):141-154.
Gomazkov OA. Cellular and molecular principles of brain aging. *Uspekhi Sovremennoi Biologii*. 2012;132(2):141-154. (In Russ.).
- Skulachev VP. A biochemical approach to the problem of aging: «Megaproject» on membrane-penetrating ions. The first results and prospects. *Biochemistry (Moscow)*. 2007;72(12):1385-1396.
<https://doi.org/10.1134/s0006297907120139>
- Воронина Т.А. Мексидол: основные нейropsychотропные эффекты и механизм действия. *Фарматека*. 2009;180(6):1-4.
Voronina TA. Mexidol: main neuropsychotropic effects and mechanisms of action. *Farmateka*. 2009;180(6):1-4. (In Russ.).
- Лукьянова Л.Д. Современные проблемы адаптации к гипоксии. Сигнальные механизмы и их роль в системной регуляции. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2011;1:2-18.
Luk'yanova LD. Current issues of adaptation to hypoxia. Signal mechanisms and their role in systemic regulation. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya*. 2011;1:2-18. (In Russ.).
- Щулькин А.В. Влияние мексидола на развитие феномена эксайтотоксичности нейронов *in vitro*. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2012;112(2):35-39.
Shchul'kin AV. Effect of mexidol on the development of the phenomenon of the neuronal excitotoxicity *in vitro*. *Zhurnal Nevrologii i Psikhiiatrii im. S.S. Korsakova*. 2012;112(2):35-39. (In Russ.).
- Воронина Т.А. Мексидол: спектр фармакологических эффектов. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2012;112(12):86-90.
Voronina TA. Mexidol: the spectrum of pharmacological effects. *Zhurnal Nevrologii i Psikhiiatrii im. S.S. Korsakova*. 2012;112(12):86-90. (In Russ.).
- He W, Miao FJP, Lin DCH, Schwandner RT, Wang Z, Gao J, Chen JL, Tian H, Ling L. Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors. *Nature*. 2004;429(6988):188-193.
<https://doi.org/10.1038/nature02488>
- Ariza AC, Deen MPT, Robben JH. The succinate receptor as a novel therapeutic target for oxidative and metabolic stress-related conditions. *Front Endocrinol*. 2012;3:1-8.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2012.00022>
- Hamel D, Sanchez M, Duhamel F, Roy O, Honore J-C, Noueihed B, Zhou T, Nadeau-Vallee M, Hou X, Lavoie J-C, Mitchell G, Mamer OA, Chemtob S. G-Protein — coupled receptor 91 and succinate are key contrib-

- utors in neonatal postcerebral hypoxia-ischemia recovery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34:285-293. <https://doi.org/10.1161/atvbaha.113.302131>
11. Uittenbogaard M, Chiaramello A. Mitochondrial biogenesis: a therapeutic target for neurodevelopmental disorders and neurodegenerative diseases. *Curr Pharm Des.* 2014;20(35):55745593. <https://doi.org/10.2174/1381612820666140305224906>
 12. Austin S, St-Pierre J. PGC1 α and mitochondrial metabolism — emerging concepts and relevance in ageing and neurodegenerative disorders. *Journal of Cell Science.* 2012;125:4963-4971. <https://doi.org/10.1242/jcs.113662>
 13. Wille M, Schümann A, Kreutzer M, Glocker MO, Wree A, Mutzbauer G, Schmitt O. Differential proteomics of the cerebral cortex of juvenile, adult and aged rats: an ontogenetic study. *Proteomics Bioinform.* 2017;10(2):41-59. <https://doi.org/10.4172/jpb.1000424>
 14. Baghirova S, Hughes BG, Hendzel MJ, Schulz R. Sequential fractionation and isolation of subcellular proteins from tissue or cultured cells. *MethodsX.* 2015;2:440-445. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2015.11.001>
 15. Кондрашова М.Н. Гормоноподобное действие янтарной кислоты. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.* 2002;1:7-12. Kondrashova MN. Hormone-like action of succinic acid. *Voprosy Biologicheskoi, Meditsinskoi i Farmatsevticheskoi Khimii.* 2002;1:7-12. (In Russ.).
 16. Tretter L, Patocs A, Chinopoulos C. Succinate, an intermediate in metabolism, signal transduction, ROS, hypoxia, and tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2016;1857:1086-1101. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.03.012>
 17. Genova ML, Lenaz G. Functional role of mitochondrial respiratory supercomplexes. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2014;1837(4):427-443. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.11.002>
 18. Morrish F, Hockenbery D. MYC and mitochondrial biogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014;4(5):014225-014242. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a014225>
 19. Farshbaf JM, Kiani-Esfahani A. Succinate dehydrogenase: prospect for neurodegenerative diseases. *Mitochondrion.* 2018;42:77-83. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2017.12.002>
 20. Bratic A, Larsson N-G. The role of mitochondria in aging. *J Clin Invest.* 2013;123(3):951-957. <https://doi.org/10.1172/JCI64125>

Поступила 17.10.19

Received 17.10.19

Принята к печати 22.10.19

Accepted 22.10.19