

УДК 615.0354



СИНЕРГИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРЕПАРАТА С КООРДИНАЦИОННЫМ КОМПЛЕКСОМ ТРИМЕТИЛГИДРАЗИНИЯ ПРОПИОНАТА И ЭТИЛМЕТИЛГИДРОКСИПИРИДИНА СУКЦИНАТА НА ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ ОБМЕН И ДЫХАНИЕ КЛЕТКИ

М.В. Журавлева^{1,2}, М.В. Грановская³, К.Я. Заславская⁴, Ю.Г. Казаишвили⁵,
В.С. Щербакова⁵, А.А. Андреев-Андреевский⁶, Д.И. Поздняков⁷, М.Ю. Высоких⁸

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 127051, Россия, г. Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

³ Институт системной биологии, Университетский колледж Дублина, D04 V1W8, Ирландия, Белфилд, Дублин, 4

⁴ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва», 430005, Россия, Республика Мордовия, г. Саранск, ул. Большевикская, д. 68

⁵ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тверской государственный медицинский университет Минздрава России», 170100, Россия, г. Тверь, ул. Советская, д. 4

⁶ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Российской Федерации Институт медико-биологических проблем Российской академии наук, 123007, Россия, г. Москва, Хорошевское шоссе, д. 76А

⁷ Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 357532, Россия, г. Пятигорск, пр-т Калинина, д. 11

⁸ Государственное учреждение «Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского» Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119992, Россия, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40

E-mail: kiryonok@yandex.ru

Получена 08.07.2022

После рецензирования 12.08.2022

Принята к печати 22.08.2022

В статье представлены результаты *in vitro* исследования оценки синергического действия препарата лекарственного препарата на основе координационного комплекса этилметилгидроксипиридина сукцината и триметилгидразиния пропионата на энергетический обмен и дыхание клетки.

Целью данного исследования являлась оценка митохондриально-направленного действия метаболического и антиоксидантного лекарственного средства на основе янтарно-кислого координационного комплекса с триметилгидразинием в отношении оптимизации энергообмена в клетках в условиях оксидативного стресса, а также на фоне ишемических процессов.

Для цитирования: М.В. Журавлева, М.В. Грановская, К.Я. Заславская, Ю.Г. Казаишвили, В.С. Щербакова, А.А. Андреев-Андреевский, Д.И. Поздняков, М.Ю. Высоких. Синергическое действие препарата с координационным комплексом триметилгидразиния пропионата и этилметилгидроксипиридина сукцината на энергетический обмен и дыхание клетки. *Фармация и фармакология*. 2022;10(4):387-399. DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-4-387-399

© М.В. Журавлева, М.В. Грановская, К.Я. Заславская, Ю.Г. Казаишвили, В.С. Щербакова, А.А. Андреев-Андреевский, Д.И. Поздняков, М.Ю. Высоких, 2022

For citation: M.V. Zhuravleva, M.V. Granovskaya, K.Ya. Zaslavskaya, Yu.G. Kazaishvili, V.S. Shcherbakova, A.A. Andreev-Andrievsky, D.I. Pozdnyakov, M.Yu. Vysokikh. Synergic effect of preparation with coordination complex "trimethyldrazinium propionate+ethylmethylhydroxypyridine succinate" on energy metabolism and cell respiration. *Pharmacy & Pharmacology*. 2022;10(4):387-399. DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-4-387-399

Материалы и методы. Исследование действия гидросукцинатного комплекса компонентов препарата Брейнмакс® проводили на изолированных митохондриях печени мыши. В процессе исследования оценивали потенциал митохондрий, скорость генерации в ходе дыхания перекиси водорода, а также скорость дыхания: а) нестимулированного малатом и пируватом, б) стимулированного малатом и пируватом (субстраты комплекса I), сукцинатом (субстрат комплекса II), в) на фоне блокады начального участка электрон-транспортной цепи ротеноном, г) при блокаде фосфорилирования олигомицином, д) на фоне вызванного FCCP разобщения и е) при заблокированном цианидом комплексе IV (цитохром С оксидазе).

Результаты. Было показано, что янтарно-кислый координационный комплекс с триметилгидразинием, являющийся действующим началом лекарственного препарата Брейнмакс®, значительно снижал трансмембранный потенциал митохондрий ($IC_{50}=197\pm 5 \mu M$), по сравнению с широко применяемыми препаратами этилметилгидроксипиридина сукцинатом и мельдонием, что облегчает перенос продуцируемых АТФ в клетку и сохраняет жизнедеятельность митохондрий даже в условиях стресса. При исследовании дыхания митохондрий, стимулированного субстратами комплекса I (НАДФ-коэнзим Q-оксидоредуктазы), пирувата и малата, изучаемый препарат приводил к более выраженному росту потребления кислорода с $IC_{50}=75\pm 6 \mu M$. При оценке влияния комплекса на продукцию митохондриями АТФ, наиболее выраженное действие наблюдалось при добавлении изучаемого комплекса, что свидетельствовало о разобщении дыхания и окислительного фосфорилирования при данных концентрациях исследуемых соединений. При оценке влияния комплекса на продукцию изолированными митохондриями перекиси водорода, было показано значимое снижение продукции перекиси в пробах, содержащих комплекс триметилгидразиния пропионата и ЭМГПС.

Заключение. По совокупности полученных результатов можно предполагать, что выгодная конформация фармакофорных групп координационного комплекса этилметилгидроксипиридина сукцината и триметилгидразиния пропионата в составе лекарственного препарата Брейнмакс® приводит к синергетическому взаимодействию и более выраженному фармакологическому воздействию на клетки-мишени. Данный комплекс обеспечивает стабилизацию митохондриальной функции, интенсификацию выработки энергии аденозинтрифосфата и оптимизацию энергетических процессов в клетке, снижает выраженность оксидативного стресса и устраняет нежелательные эффекты ишемически-гипоксического повреждения тканей.

Ключевые слова: этилметилгидроксипиридина сукцинат; триметилгидразиния пропионат; янтарно-кислый координационный комплекс с триметилгидразинием; гидроксисукцинатный комплекс с триметилгидразинием; митохондрии; дыхание; оксидативный стресс; продукция перекиси

Список сокращений: ЭМГПС – этилметилгидроксипиридина сукцинат; ТМГП – триметилгидразиния пропионат; FCCP – карбонилцианид-п-трифторметокси-фенилгидразон; АТФ – аденозинтрифосфат; АТФ-азы – аденозинтрифосфатаза; АФК – активные формы кислорода; DAMPs – молекулярные паттерны клеточного повреждения; АДФ – аденозиндифосфат; НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат; МРБ – митохондриальные разобщающие белки.

SYNERGIC EFFECT OF PREPARATION WITH COORDINATION COMPLEX “TRIMETHYDRAZINIUM PROPIONATE+ETHYMTM METHYLHYDROXYPIRIDINE SUCCINATE” ON ENERGY METABOLISM AND CELL RESPIRATION

M.V. Zhuravleva^{1,2}, M.V. Granovskaya³, K.Ya. Zaslavskaya⁴, Yu.G. Kazaihvili⁵,
V.S. Shcherbakova⁵, A.A. Andreev-Andrievsky⁶, D.I. Pozdnyakov⁷, M.Yu. Vysokikh⁸

¹ Scientific Center for Expertise of Medicinal Products,
Bldg. 2, 8, Petrovsky Blvd., Moscow, Russia, 127051

² Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University),
Bld. 2, 8, Trubetskaya Str., Moscow, Russia, 119991

³ Institute of Systems Biology of University College Dublin,
4, Dublin, Belfield, Ireland, D04 V1W8

⁴ National Research Ogarev Mordovia State University,
68, Bolshevistskaya Str., Saransk, Republic of Mordovia, Russia, 430005

⁵ Tver State Medical University,
4, Sovetskaya Str., Tver, Russia, 170100

⁶ Institute for Biomedical Problems of the Russian Academy of Sciences,
76A, Khoroshevskoe Hwy, Moscow, Russia, 123007

⁷ Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University,
11, Kalinin Ave., Pyatigorsk, Russia, 357532

⁸ A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology of Moscow State University named after M.V. Lomonosov,
Bldg. 40, 1, Leninskie Gory, Moscow, Russia, 119234

E-mail: kiryonok@yandex.ru

Received 08 July 2022

After peer review 12 Aug 2022

Accepted 22 Aug 2022

The article presents the results of an *in vitro* study of the synergetic effect evaluation of the combined preparation based on coordination complex ethylmethylhydroxypyridine succinate and trimethylhydrazinium propionate on energy metabolism and cell respiration.

The aim of the study was to evaluate the mitochondria-directed action of the metabolic and antioxidant preparation based on succinic acid coordination complex with trimethylhydrazinium in relation to optimizing the energy metabolism in the cells under the oxidative stress conditions, as well as against the background of ischemic processes.

Materials and methods. The study of the hydroxysuccinate complex effect of the drug Brainmax[®] components was carried out on isolated mouse liver mitochondria. In the course of the study, the potential of mitochondria, the generation rate of hydrogen peroxide during the respiration, the respiration rate were evaluated in the following positions: a) unstimulated by malate and pyruvate, b) stimulated by malate and pyruvate (complex I substrates), by succinate (complex II substrates), c) against the background of the initial section of the electron transport chain blockade by rotenone, d) in phosphorylation blockade by oligomycin, e) against the background of the FCCP-induced uncoupling, and f) in cyanide-blocked complex IV (cytochrome C oxidase).

Results. It has been shown that the succinic acid coordination complex with trimethylhydrazinium, which is the active principle of the Brainmax[®] drug, significantly reduced the transmembrane potential of mitochondria ($IC_{50}=197\pm 5 \mu M$), compared with the widely used preparations of ethylmethylhydroxypyridine succinate and trimethylhydrazinium propionate, which facilitates the transfer of the produced ATP into the cell and preserves a vital activity of mitochondria even under stress. In the study of the mitochondrial respiration stimulated by the substrates of complex I (NADP-coenzyme Q-oxidoreductase), pyruvate and malate, the studied drug led to a more pronounced increase in the oxygen consumption with $IC_{50}=75\pm 6 \mu M$. When evaluating the effect of the complex on the production of ATP by mitochondria, the most pronounced effect was observed with the addition of studied complex, which indicated to the uncoupling of respiration and oxidative phosphorylation at the given concentrations of the studied compounds. When assessing the effect of the complex on the production of hydrogen peroxide by isolated mitochondria, a significant decrease in the peroxide production was shown in the samples containing the complex of trimethylhydrazinium propionate and EMHPS.

Conclusion. Based on totality of the results obtained, it can be assumed that a favorable conformation of the pharmacophore groups of ethylmethylhydroxypyridine succinate and trimethylhydrazinium propionate coordination complex included in the composition of Brainmax[®] leads to a synergetic interaction and more pronounced pharmacological effects on target cells. This complex provides stabilization of a mitochondrial function, intensification of the adenosine triphosphate energy production and the optimization of energy processes in the cell, reduces the severity of the oxidative stress and eliminates undesirable effects of an ischemic-hypoxic tissue damage.

Keywords: ethylmethylhydroxypyridine succinate; trimethylhydrazinium propionate; succinic acid coordination complex with trimethylhydrazinium; hydroxysuccinate complex with trimethylhydrazinium; mitochondria; breath; oxidative stress; peroxide production.

Abbreviations: EMHPS – ethylmethylhydroxypyridine succinate; TMHP – trimethylhydrazinium propionate; FCCP – carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone; ATP – adenosine triphosphate; ATPase – adenosine triphosphatase; ROS – reactive oxygen species; DAMPs – damage associated molecular patterns; ADP – adenosine diphosphate; NADP – nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; MUPS – mitochondrial uncoupling proteins.

ВВЕДЕНИЕ

Патологические состояния, ассоциированные с дисциркуляторными расстройствами и ишемией тканей, являются самыми распространенными причинами смертности и первичной инвалидности населения. Согласно данным WHO Health Estimates¹, лидирующие позиции в списке ведущих неинфекционных заболеваний с высоким риском летального исхода занимают ишемическая болезнь сердца (терминально – инфаркт миокарда) и ишемический инсульт.

В основе патогенеза любого ишемического повреждения тканей лежит дисбаланс между метаболической активностью клеток, выражаемой в потреблении кислорода и субстратов биологического окисления, и адекватной доставкой необходимых питательных элементов [1].

Современные исследования показывают, что ключевым патогенетическим аспектом, определяющим выраженность данного дисбаланса, является нарушение функциональной активности

митохондрий клетки. Митохондрии – двумембранные органеллы, выполняющие в клетках множество функций. Прежде всего, митохондриям отводится роль «энергетических станций», обеспечивающих оптимальный пул внутриклеточной энергии [2].

Также митохондрии, регулируют окислительно-восстановительные процессы и реакции апоптоза. В этой связи нарушение митохондриальной активности может привести к дефициту макроэргических соединений, повышению генерации активных форм кислорода (АФК) и программированной гибели клетки по апоптотическому пути [3]. Основным триггером, инициирующим данные процессы, является нехватка кислорода и субстратов окисления [4].

Окклюзия сосуда и последующая гипоксия вызывает ряд тяжелых биохимических и метаболических нарушений, опосредующих собой функциональной активности митохондрий. Метаболизм клеток переключается с митохондриального окислительного фосфорилирования на анаэробный гликолиз, что приводит к внутриклеточному накоплению лактата и протонов, снижая pH с дальнейшей активацией

¹ World Health Organization. The top 10 causes of death. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>

аденозинтрифосфатазы (АТФ-азы), прежде всего отвечающей за Na^+/H^+ обменник. Однако, в силу быстрого истощения энергоресурсов в виде АТФ, возникает перегрузка клетки ионами натрия и, впоследствии, кальция (в условиях натриевой перегрузки активируется $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ АТФ-аза) [5].

Высокое внутриклеточное содержание кальция в ишемизированной клетке нарушает буферную емкость митохондрий, в связи с чем активируется поступление ионов кальция в митохондриальный матрикс. [6]. Поступившие внутрь митохондрий ионы кальция вызывают дисфункцию дыхательной цепи, способствуя гиперпродукции активных форм кислорода и активации механизма гибели клетки (некроз, апоптоз). Также в результате поступления ионов кальция митохондрии «набухают» (феномен митохондриального блеббинга) и разрушаются, высвобождая в цитозоль соединения, усиливающие степень клеточного повреждения [7].

Прежде всего, данные вещества представлены молекулярными паттернами клеточного повреждения (DAMPs), которые активируют путь AGE/RAGE, усиливая иммунологическую реактивность в очаге ишемии [8].

Учитывая особенности описанных выше патогенетических путей ишемического повреждения клеток и центральную роль митохондрий в данных процессах, неудивительно, что именно «энергетические станции» клеток стали главной мишенью для направленной цитопротекции. С целью коррекции митохондриальной дисфункции при ишемии, в настоящий момент применяется ряд химически модифицированных веществ со скаффолдом бенз- γ -пирона, убихинона и трифенилфосфониевым линкером [9], а также вещества, имеющие белковую природу, примером которых могут служить пептиды группы *Szeto-Schiller* (SS-31) [9, 10]. Однако ряд исследований показывает, что нативные, не подвергшиеся модификации молекулы, могут выступать в качестве средств коррекции митохондриальной дисфункции. Например, сукцинат и его производные [11] или средства, шунтирующие метаболические процессы (триметилгидразиния пропионат, триметазидин) могут препятствовать необратимому повреждению митохондрий клетки [12, 13].

В Российской Федерации в 2022 г. зарегистрирован новый лекарственный препарат из группы нейропротекторов и антиоксидантов – Брейнмакс®, представляющий оригинальный комплекс этилметилгидроксипиридина сукцината (ЭМГПС) и триметилгидразиния пропионата (ТМГП) в виде раствора для внутривенных и внутримышечных инъекций или капсул. Обычно триметилгидразиния пропионат существует в виде цвиттер-иона (дигидрата), имеющего положительный заряд на гидразиновом фрагменте и отрицательный на карбоксилатной группе [14]. В литературе описано, что соли некоторых многоосновных кислот (кислые соли фумаровой и малеиновой кислот, дигидрофосфат, кислая соль

щавелевой кислоты, моно- или дизамещенная соль слизиной кислоты, соли памоевой и оротовой кислот) с триметилгидразиния пропионатом демонстрировали особые фармакокинетические и фармакодинамические свойства [15]. Особенностью рассматриваемого лекарственного препарата является образование в процессе приготовления готовой лекарственной формы гидросукцинатного комплекса с триметилгидразином. Компоненты комплекса связаны между собой водородными связями и электростатическим межмолекулярным взаимодействием, что обеспечивает выгодную конформацию фармакофорных фрагментов для лучшего связывания с рецепторами и более выраженного действия. При этом важно, что компоненты комплекса имеют разные точки приложения действия, в результате чего при их комбинированном применении возможно развитие синергетического эффекта.

ЦЕЛЬ. Оценка митохондриально-направленного действия компонентов гидросукцинатного комплекса с триметилгидразином, входящего в состав нового лекарственного препарата Брейнмакс®.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные

В исследование было включено 50 самцов мышей СВА×В6 возрастом 4–5 мес, полученных из центра генетических ресурсов лабораторных животных ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук». При работе соблюдались требования Закона РФ «О защите животных от жестокого обращения» от 24.06.1998 г., правил лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 3 51000.3-96 и ГОСТ Р 53434-2009), директивы Европейского сообщества (86/609 EC), правил Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997 г.) и Правил лабораторной практики, принятых в Российской Федерации (приказ МЗ РФ № 708 от 29.08.2010 г.). Протокол исследования прошел экспертизу в комиссии по биоэтике ООО «Научно-исследовательский институт митоинженерии МГУ» (закключение № 171 от 13.01.2022).

Дизайн исследования

Исследование проводили на изолированных митохондриях печени мыши. Оценивали: потенциал митохондрий, скорость генерации перекиси водорода, скорость дыхания: а) нестимулированного малатом и пируватом, б) стимулированного малатом и пируватом (субстраты комплекса I), сукцинатом (субстрат комплекса II), в) на фоне блокады начального участка электрон-транспортной цепи ротеноном, г) при блокаде фосфорилирования олигомицином, д) на фоне вызванного карбонилцианид-п-трифторметокси-фенилгидразоном (FCCP) разобщения и е) при заблокированном цианидом комплексе IV (цитохром С оксидазе).

Для каждого из показателей в трех экспериментах регистрировали: 1) реакцию на мельдоний, 2) реакцию на ЭМГПС и 3) реакцию на янтарнокислый координационный комплекс триметилгидразиния пропионата и ЭМГПС. Для каждого из опытов проводили 7 независимых повторов эксперимента.

Выделение митохондрий печени

Для получения печени мышей подвергали эктаназии путем цервикальной дислокации, после немедленно вскрывали брюшную полость животных и иссекали печень. Печень помещали в ледяной фосфатно-солевой буфер (рН=7,0) и хранили на льду до выделения митохондрий, но не дольше 3 мин.

После гомогенизации в приблизительно 20 объемах изотонического раствора суспензию ткани печени переносили в пробирки и осаждали остатки неразрушенных тканей центрифугированием при 1000 g и 4°C в течение 10 мин. Супернатант собирали, избегая попадания в пипетку молочно-белой суспензии, на поверхности и центрифугировали при 14 000 g и 4°C в течение 10 мин. Полученный темный осадок митохондрий отмывали от верхнего светлого рыхлого слоя, собирая последний пипеткой и промывая митохондрии буфером следующего состава: 250 mM сахароза, 20 mM Hepes/NaOH, pH 7,5, 0,5 mM EGTA, 0,1% BSA. Осадок суспендировали в 0,5 мл данного буфера и осторожно гомогенизировали 5–10 проходами тefлонового пестика в стеклянном гомогенизаторе на 1 мл (G-Biosciences, США). Гомогенат количественно переносили в новую пробирку и осаждали митохондрии центрифугированием при 12 000 g и 4°C в течение 10 мин. Осадок суспендировали на льду в 70–100 мкл буфера для выделения при помощи пластикового пестика до получения гомогенной суспензии.

Измерение дыхательной функции митохондрий

Аликвоту полученного препарата митохондрий в количестве 50 мкг по белку, определенному по методу с бицинониновой кислотой (Pierce, США), использовали для определения скорости дыхания, интенсивности окислительного фосфорилирования, степени сопряженности и кальциевой нагрузки митохондрий. Для определения скорости дыхания использовали метод прямой регистрации поглощения кислорода при помощи высокочувствительного оксиграфа (Hansatech, Англия). Для этого аликвоту митохондрий помещали в стеклянную кювету, заполненную 0,5 мл буфера, содержащего: 120 mM сахарозы, 75 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 5 mM K₂HPO₄, 20 mM HEPES, pH=7,5 (титрование NaOH). Измерение потребления кислорода проводили в закрытой системе при 37°C и постоянном перемешивании на магнитной мешалке со скоростью 500 об/мин.

Полученные величины (изменение O₂ во времени, dO₂ /dt) нормировали на содержание белка. Энергизацию митохондрий осуществляли при

помощи субстратов I и II комплексов дыхательной цепи. После регистрации скорости дыхания, активированного добавлением в систему 4 mM пирувата в присутствии 1 mM малата, исследовали действие ротенона (2 мкМ), блокирующего I комплекс. Для регистрации скорости дыхания митохондрий с активированным комплексом II после добавления ротенона в систему измерения вносили 10 mM сукцината калия.

Исследование степени сопряженности полученных препаратов проводили в присутствии аденозиндифосфата (АДФ) после стимуляции дыхания путем внесения 0,1 mM АДФ в систему 1 мкг олигомицина и регистрировали ингибирование стимулированного дыхания. Отношение скоростей стимулированного и нестимулированного дыхания использовали как характеристическую величину (коэффициент дыхательного контроля), позволяющую оценить качество полученного препарата митохондрий и их состояние в исследуемых тканях. Максимальную скорость разобщенного дыхания определяли в присутствии 20–50 nM протонофора FCCP. При анализе скоростей дыхания из всех значений вычитали величину, соответствующую скорости потребления кислорода в присутствии 0,5 mM KCN.

Измерение трансмембранного потенциала митохондрий

Для всех полученных препаратов исследовали способность митохондрий к образованию трансмембранного потенциала, величину которого оценивали при помощи измерения отношения поглощения красителя сафранина O при длинах волн 555/523 нм по методу Викстрема [16]. Для этого в микрокювету объемом 250 мкл вносили 25 мкг белка митохондрий и в двухволновом режиме на спектрофотометре Aminco DW2000 (Olis Inc., США) производили регистрацию кинетики изменения соотношения 555/523 нм до и после добавления субстратов дыхания и специфических ингибиторов переноса электрона в дыхательной цепи митохондрий, таких как ротенон, антимицин, малонат и миксотиазол. Диссипация трансмембранного потенциала достигали при помощи FCCP.

Измерение кальциевой емкости

Кальциевую емкость митохондрий определяли методом титрования при измерении светорассеяния на 575 нм, спектрофотометрически на Cary Varian 300 (Agilent, США) и в среде 250 mM сахарозы, 2 mM MgCl₂, 5 mM K₂HPO₄, 20 mM HEPES, pH=7,4 (титрование NaOH). При этом исследовали как общее количество кальция, индуцирующего падение поглощения, соответствующее максимальному набуханию митохондрий в изоосмотической системе (кальциевой емкости), так и кинетику набухания, характеризующую способность митохондрий к транспорту кальция.

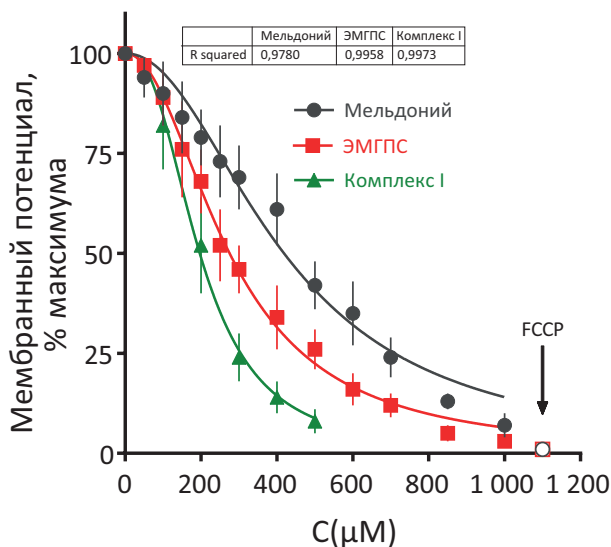


Рисунок 1 – Зависимость мембранного потенциала митохондрий от дозы мельдония, ЭМГПС или комплекса триметилгидразиния пропионата и ЭМГПС (Комплекс I)

Примечание: точками показаны экспериментальные данные ($M \pm SEM$), линиями – логистическая регрессия; ЭМГПС – этилметилгидроксипиридина сукцинат.

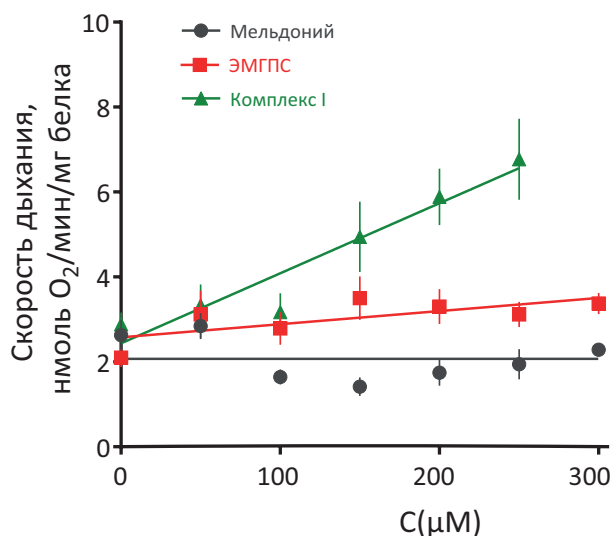


Рисунок 2 – Скорость базального дыхания (без добавления экзогенных субстратов) митохондрий печени мыши в присутствии мельдония, ЭМГПС или комплекса компонентов (Комплекс I)

Примечание: точками показаны экспериментальные данные ($M \pm SEM$), линиями — линейная регрессия; ЭМГПС – этилметилгидроксипиридина сукцинат

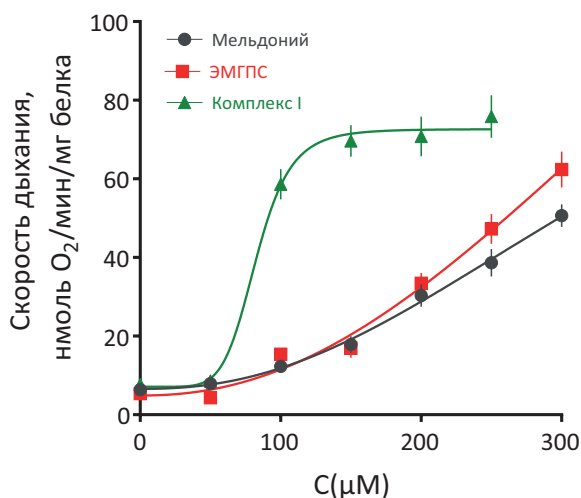


Рисунок 3 – Скорость дыхания митохондрий печени мыши, стимулированного 5 мМ пирувата и 1 мМ малата, в присутствии мельдония, ЭМГПС или комплекса компонентов (Комплекс I)

Примечание: точками показаны экспериментальные данные ($M \pm SEM$), линиями — логистическая регрессия; ЭМГПС – этилметилгидроксипиридина сукцинат;

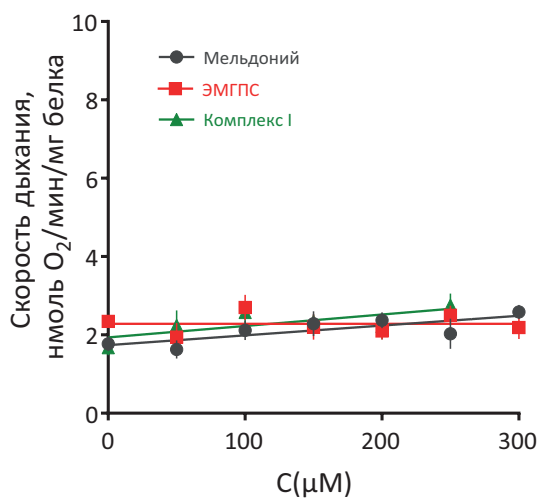


Рисунок 4 – Скорость дыхания митохондрий печени мыши, стимулированного 5 мМ пирувата и 1 мМ малата, в присутствии мельдония, ЭМГПС или комплекса компонентов (Комплекс I) и ингибитора комплекса I ротенона (2 μM)

Примечание: точками показаны экспериментальные данные ($M \pm SEM$), линиями – линейная регрессия; ЭМГПС – этилметилгидроксипиридина сукцинат.

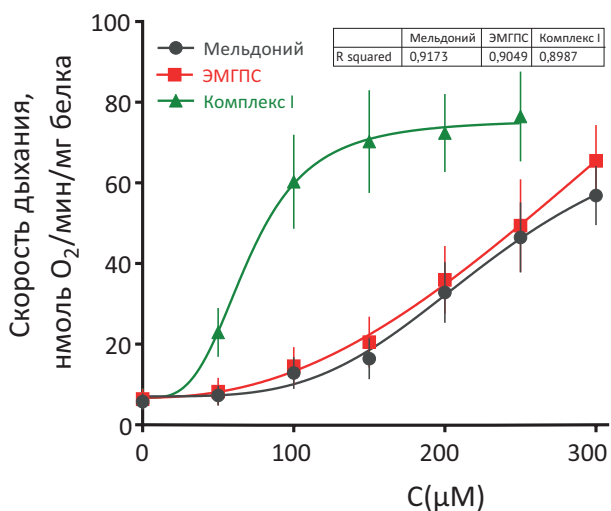


Рисунок 5 – Скорость дыхания митохондрий печени мыши, стимулированной 1 мМ сукцината, в присутствии мельдония, ЭМГПС или изучаемого комплекса (Комплекс I) и ингибитора комплекса I ротенона (2 μM)

Примечание: точками показаны экспериментальные данные (M±SEM), линиями — логистическая регрессия; ЭМГПС – этилметилгидроксипиридинна сукцинат.

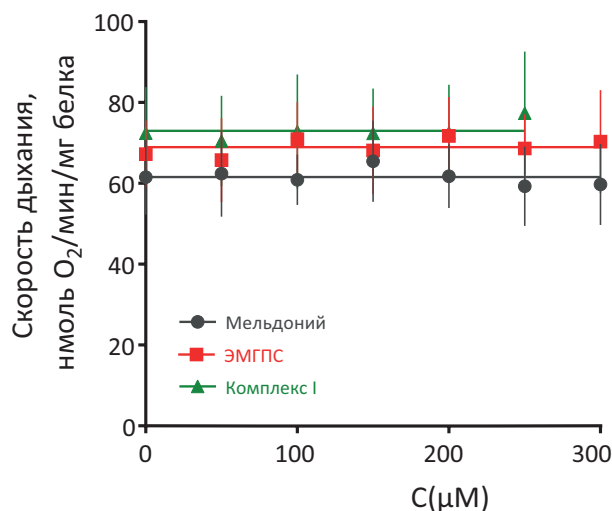


Рисунок 6 – Скорость дыхания митохондрий печени мыши, стимулированной 1 мМ АДФ, в присутствии мельдония, ЭМГПС или комплекса с триметилгидразином (Комплекс I)

Примечание: точками показаны экспериментальные данные (M±SEM), линиями — логистическая регрессия; ЭМГПС – этилметилгидроксипиридинна сукцинат.

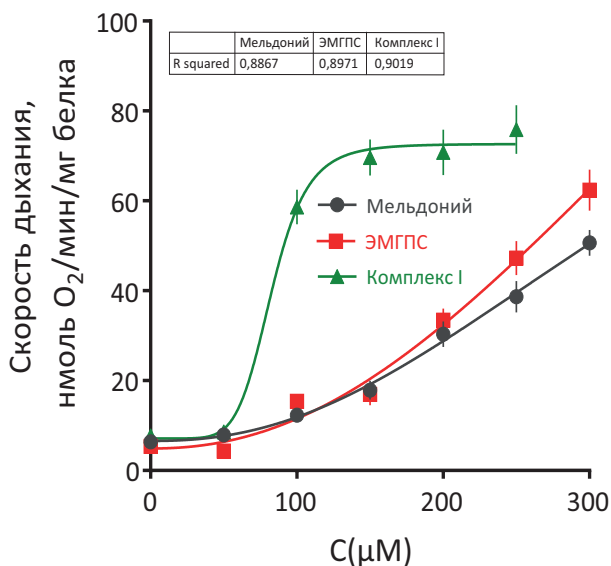


Рисунок 7 – Скорость дыхания митохондрий печени мыши, стимулированной 1 мМ АДФ, в присутствии мельдония, ЭМГПС или рассматриваемого комплекса (Комплекс I) и блокатора АТФ-синтазы олигомицина (1 μM)

Примечание: точками показаны экспериментальные данные (M±SEM), линиями — логистическая регрессия; ЭМГПС – этилметилгидроксипиридинна сукцинат.

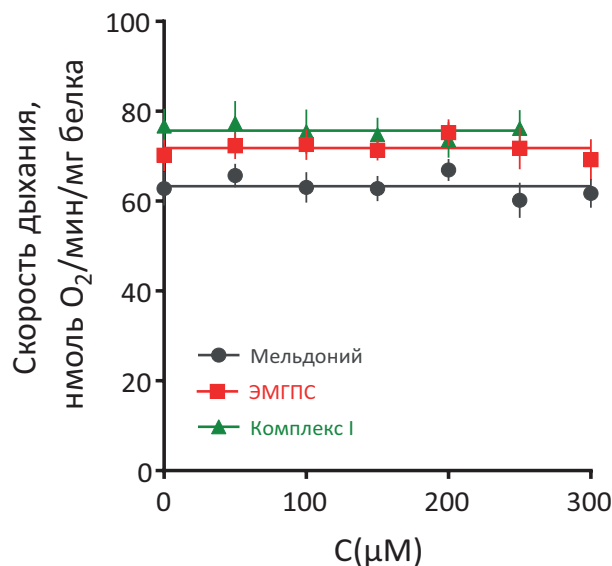


Рисунок 8 – Скорость дыхания митохондрий печени мыши, стимулированной 1 мМ АДФ, в присутствии мельдония, ЭМГПС или рассматриваемого комплекса (Комплекс I) и протонофора FCCP (1 μM)

Примечание: точками показаны экспериментальные данные (M±SEM), линиями — логистическая регрессия; ЭМГПС – этилметилгидроксипиридинна сукцинат.

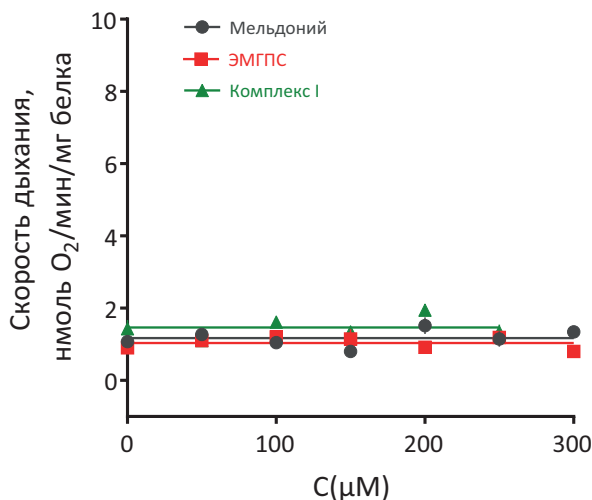


Рисунок 9 – Скорость дыхания митохондрий печени мыши, стимулированного 1 мМ АДФ, в присутствии мельдония, ЭМГПС или изучаемого комплекса (Комплекс I) и цианида (1 μM)

Примечание: точками показаны экспериментальные данные (M±SEM), линиями — логистическая регрессия; ЭМГПС – этилметилгидроксипиридина сукцинат.

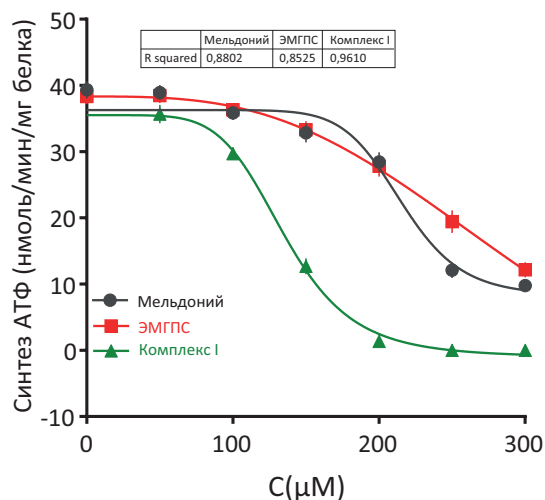


Рисунок 10 – Скорость синтеза АТФ митохондриями печени мыши в присутствии мельдония, ЭМГПС или изучаемого комплекса (Комплекс I)

Примечание: точками показаны экспериментальные данные (m±sem), линиями — логистическая регрессия; ЭМГПС – этилметилгидроксипиридина сукцинат.

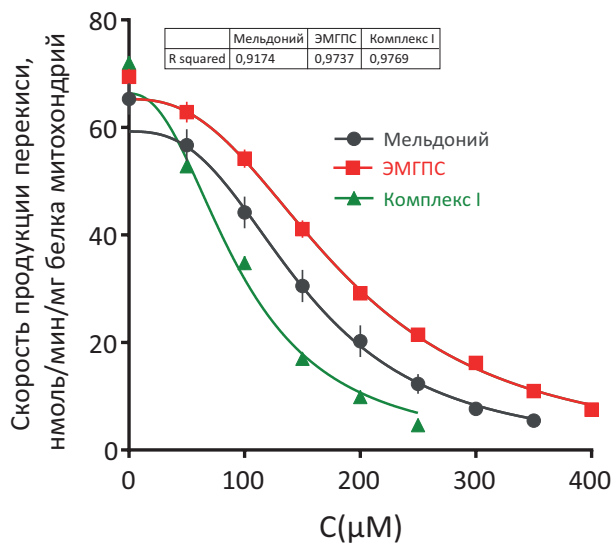


Рисунок 11 – Скорость продукции H₂O₂ митохондрий печени мыши в присутствии мельдония, ЭМГПС или комплекса ЭМГПС с триметилгидразином (Комплекс I)

Примечание: точками показаны экспериментальные данные (M±SEM), линиями — логистическая регрессия; ЭМГПС – этилметилгидроксипиридина сукцинат.

Оценка синтеза АТФ

Уровень синтеза аденозинтрифосфата (АТФ) определяли по АТФ-зависимой люминесценции суспензии митохондрий в различных состояниях, при энергизации субстратами различных комплексов дыхательной цепи. Поскольку уровень продукции АТФ митохондриями при аэробном окислении субстратов определяется активностью АТФ-синтетазы, чувствительной к олигомицину, применение этого ингибитора позволяет рассчитать общее максимальное количество синтезированного в митохондриях АТФ, характеризуя, таким образом, различия в возможностях митохондрий поддерживать энергетический метаболизм.

Измерение генерации перекиси водорода

Генерацию перекиси водорода митохондриями оценивали, используя пероксидазу хрена (Thermo Scientific, США) и её флюорогенный субстрат Amplex Red reagent (Thermo Scientific, США), на флюоресцентном спектрофотометре Cary Eclipse (Agilent, США) в присутствии ингибитора каталазы специфическим ингибитором 3-амино-1,2,4-триазолом.

Статистический анализ данных

Для первичного анализа данные табулировали и рассчитывали показатели описательной статистики: среднее (M), стандартное отклонение (SD), стандартную ошибку среднего (SEM). Полученные данные подчинялись закону распределения Гаусса, на основании чего были выбраны параметрические методы статистической обработки. Статистический анализ данных проводили с использованием методов нелинейной регрессии, теста Стьюдента для сравнения и однофакторного дисперсионного анализа (для сравнения нескольких выборок). Различия считали значимыми при $p < 0,05$. Для анализа данных использовали программное обеспечение Microsoft Excel 2016 (Microsoft, США) и Prism 5.0 (Graphpad, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Измерение трансмембранного потенциала митохондрий

При оценке влияния исследуемых препаратов на показатели трансмембранного потенциала митохондрий, было показано, что при добавлении возрастающих концентраций препаратов он снижался. Наименее выраженное влияние оказывал мельдоний, для которого величина полуэффективной концентрации (IC_{50}) составляла $419 \pm 17 \mu M$. ЭМГПС оказывал значимо ($F(1,22) = 82,90$; $p < 0,0001$) более выраженное влияние на потенциал ($IC_{50} = 275 \pm 6 \mu M$).

Комплекс компонентов триметилгидразиния пропионата и ЭМГПС снижал потенциал митохондрий до $IC_{50} = 197 \pm 5 \mu M$, что значимо меньше по сравнению только с мельдонием ($F(1,15) = 166,5$; $p < 0,0001$) или только с ЭМГПС ($F(1,22) = 107,5$; $p < 0,0001$). При добавлении разобщителя FCCP, потенциал митохондрий снижался до нуля вне зависимости от наличия в инкубационной смеси мельдония, ЭМГПС или изучаемого комплекса (Рис. 1).

Дыхание митохондрий

Фоновое дыхание митохондрий, в отсутствие экзогенных субстратов дыхания не изменялось при добавлении возрастающих концентраций мельдония. ЭМГПС также несущественно увеличивал скорость базального дыхания митохондрий с $2,2 \pm 0,2$ до $3,4 \pm 0,25$ нмоль O_2 /мин/мг белка ($F(1,47) = 4,34$; $p = 0,0426$), а при добавлении комплекса компонентов скорость базального дыхания увеличивалась с $2,9 \pm 0,3$ до $6,8 \pm 1,0$ нмоль O_2 /мин/мг белка ($F(1,40) = 28,95$; $p < 0,0001$), что может свидетельствовать о разобщающем действии митохондрий действием комплекса ТМГП и ЭМГПС (Рис. 2). Такой эффект позволяет протонам транслоцироваться в межмембранное пространство посредством специфических респираторных комплексов электронно-транспортной цепи и возвращаться в митохондриальный матрикс независимо от АТФ-синтазы. Установленное протонное «протекание» является важным механизмом распределения энергии в клетке и составляет до 25% основного обмена. Разобщение митохондрий на фоне действия компонентов исследуемого комплекса может рассматриваться как цитопротекторная стратегия, опосредованная митохондриальными разобщающими белками (МРБ), в условиях оксидативного стресса при любом ишемическом повреждении, включая процессы старения, а также диабет и резистентность к противоопухолевым препаратам.

Затем исследовали дыхание митохондрий, стимулированное субстратами комплекса I (НАДФ-коэнзим Q-оксидоредуктазы), пирувата и малата (Рис. 3). Было обнаружено повышение скорости, стимулированного субстратами комплекса I, дыхания при повышении в ячейке концентрации янтарнокислого комплекса ТМГП и ЭМГПС. Полуэффективные концентрации мельдония и ЭМГПС составили 273 ± 67 и $350 \pm 204 \mu M$, соответственно, и значимо не различались ($F(1,90) = 0,21$; $p = 0,6470$). Добавление исследуемого комплекса приводило к более выраженному росту потребления кислорода ($IC_{50} = 75 \pm 6 \mu M$), что значимо меньше по сравнению с мельдонием ($F(1,83) = 34,37$; $p < 0,0001$) и ЭМГПС ($F(1,83) = 30,17$; $p < 0,0001$).

После добавления ингибитора комплекса ротенона ($2 \mu M$), скорость стимулированного пируватом и малатом дыхания митохондрий снижалась практически до нуля и не изменялась в зависимости от концентрации мельдония, ЭМГПС или изучаемого комплекса (Рис. 4).

Сукцинат является субстратом комплекса II электронно-транспортной цепи, таким образом, в присутствии ротенона стимулированное сукцинатом дыхание позволяет оценить состояние комплексов II, III и IV электронно-транспортной цепи митохондрий. Как показано на рисунке 5, действие исследуемого комплекса на скорость потребления кислорода при поддерживаемом субстратом второго комплекса электронно-транспортной цепи (ЭТЦ) дыхании было сходно. Полуэффективная концентрация для этих двух веществ составляла $237 \pm 81 \mu M$ и $453 \pm 1059 \mu M$

и значимо не различалась ($F(1,90) = 0,20$; $p = 0,6596$). Эквимолярная смесь компонентов в комплексе стимулировала дыхание с $IC_{50} = 141 \pm 27 \mu M$. Различия с мельдонием ($F(1,83) = 3,55$; $p = 0,0632$) и ЭМГПС ($F(1,83) = 3,90$; $p = 0,0516$) приближались к уровню статистической значимости.

Для оценки сопряженности митохондрий измеряли скорость дыхания в присутствии избытка АДФ и фосфата (Рис. 6), а затем — в присутствии $1 \mu M$ олигомицина, ингибитора АТФ-синтазы (Рис. 7). Было установлено, что в присутствии избытка АДФ мельдоний и ЭМГПС не оказывали влияния на скорость дыхания, ни сами по себе, ни в комплексе. На фоне блокады АТФ-синтазы олигомицином мельдоний, ЭМГПС и янтарно-кислый комплекс с триметилгидразином повышали скорость дыхания с $IC_{50} = 380 \pm 699$, 536 ± 1578 и $165 \pm 40 \mu M$. Существенные по величине различия IC_{50} не достигали статистической значимости.

Скорость разобщенного FCCP дыхания при добавлении мельдония, ЭМГПС или рассматриваемого комплекса не изменялась (Рис. 8).

Наконец, скорость дыхания при угнетении цитохромом С оксидазы при добавлении мельдония, ЭМГПС или комплекса компонентов не изменялась (Рис. 9).

Таким образом, данные по влиянию изучаемого комплекса на дыхание митохондрий свидетельствуют о восстановлении обмена кислорода в клетках для обеспечения нормальной жизнедеятельности и модуляцию клеточного метаболизма в условиях кардиоваскулярных рисков.

Оценка синтеза АТФ

По результатам проведенного эксперимента, было установлено, что мельдоний, ЭМГПС и янтарно-кислый координационный комплекс с триметилгидразином оказывают выраженное влияние на продукцию митохондриями АТФ (Рис. 10). Так, наименее выраженное влияние на скорость продукции АТФ оказывал ЭМГПС, для которого концентрация полумаксимального ингибирования составляла $321 \pm 168 \mu M$. Полумаксимальное снижение продукции АТФ при добавлении мельдония наблюдалось при концентрации вещества $216 \pm 6 \mu M$. Наиболее выраженное снижение продукции АТФ наблюдалось при добавлении координационного комплекса ТМГП и ЭМГПС с $IC_{50} = 136 \pm 4 \mu M$.

Скорость продукции перекиси

Скорость продукции перекиси оценивали флуорометрически. Как показано на рисунке 11, ТМГП, ЭМГПС и изучаемый комплекс снижали продукцию изолированными митохондриями перекиси водорода. Наименьшее влияние на генерацию перекиси проявлял ЭМГПС ($EC_{50} = 186 \pm 6 \mu M$), что значимо меньше, чем у мельдония ($IC_{50} = 153 \pm 11 \mu M$, $F(1,113) = 16,36$; $p < 0,0001$). Наибольшее подавление продукции перекиси наблюдалось при добавлении к изолированным митохондриям печени мыши комплекса ТМГП и ЭМГПС ($IC_{50} = 96 \pm 10 \mu M$), что значимо меньше, чем для мельдония ($F(1,92) = 68,94$,

$p < 0,0001$) или для только ЭМГПС ($F(1,99) = 310,2$, $p < 0,0001$). Данные результаты свидетельствуют о выраженном снижении выработки реактивных форм кислорода и антиоксидантном действии рассматриваемого комплекса, что определяет его протективное воздействие на клетки в условиях ишемии и гипоксии.

ОБСУЖДЕНИЕ

Средства метаболической терапии находят все большее применение в практической медицине. Одними из представителей данной фармакотерапевтической группы являются широко известные на отечественном фармацевтическом рынке триметилгидразиния пропионат и этилметилгидроксипиридина сукцинат. Мельдоний является средством, позволяющим «шунтировать» биоэнергетические процессы, переключая клетку на более энергетически выгодный режим функционирования. Как правило, это отражается в снижении интенсивности реакций β -окисления жирных кислот и преобладании реакций углеводного обмена в энергопродукции. Важно, что мельдоний оказывает селективное действие именно на ишемизированную ткань, практически не влияя на интактные тканевые участки, что дает возможность избежать эффекта «обкрадывания» [17].

Действие этилметилгидроксипиридина сукцината направлено, прежде всего, на подавление процессов перекисного окисления липидов и снижение общего пула АФК в клетке, а также стимулирование выработки энергии. Применение ЭМГПС ограничивает продукцию реактивных форм кислорода и азота, устраняет негативные эндотелиальные эффекты в виде повышения активности индуцибельной синтазы оксида азота, повышает активность ферментов эндогенной антиоксидантной защиты (супероксиддисмутазы, каталазы). Наличие в структуре молекулы сукцинатного фрагмента позволяет данному соединению выступать не только в роли антиоксидантного средства, но и в качестве непосредственного субстрата митохондриального комплекса II, что, учитывая высокую биодоступность, может способствовать высокой метаболической активности. Вариабельность таргетного воздействия ТМГП и ЭМГПС, может лежать в основе их синергизма по отношению к энергопродуцирующей функции клеток. В настоящий момент на отечественном фармацевтическом рынке представлен нейро- и цитопротектор на основе координационного комплекса триметилгидразиния пропионата и этилметилгидроксипиридина сукцината — Брейнмакс® — оказывающий антиамнестический, противогипоксический, антиоксидантный и противоишемический эффекты [18].

В этой связи было проведено исследование, посвященное изучению митохондриально-направленного действия рассматриваемого комплекса. В итоге было показано, что в культуре митохондрий, соединения с pK около 4 (комплекс триметилгидразиния пропионата и этилметилгидроксипиридина сукцинат) действуют

как умеренные разобщители митохондриального дыхания. Данный факт может быть связан с наличием в структуре данных соединений положительно заряженного атома третичного азота (триметилгидразиний) и гетероциклического азота (этилметилгидроксипиридина сукцинат), в связи с чем можно предполагать формирование ионных пар между данными соединениями при физиологических условиях и соответствующем значении pH. Интересно, что закрытый метильными группами азот с положительным зарядом может играть роль проникающего катиона и при образовании ионной пары повышать эффективность доставки протоннона (в данном случае сукцината), в том числе и с последующей диссоциацией протона. Таким образом, рассматриваемый координационный комплекс может являться донором дополнительных протонов (протонофором), так необходимых для обеспечения функционирования дыхательной цепи.

Использование разобщителей дыхания (исследуемый комплекс), умеренно увеличивающих протонную проводимость митохондрий, способно элиминировать негативные эффекты, вызванные повышением генерации АФК митохондриями [19].

Данное предположение подтверждается, во-первых, активацией утилизации эндогенных субстратов (пирувата и малата), но в значительно большей степени — при совместном действии исследуемых веществ в диапазоне концентраций порядка десятков нмоль на параметры энергизованных митохондрий. Полученные данные по диссипации мембранного потенциала хорошо коррелируют с данными по снижению генерации перекиси при обратном переносе), при этом, кинетика подавления генерации перекиси обгоняет кинетику подавления синтеза АТФ, что позволяет отнести наблюдаемый феномен к так называемой мягкой деполяризации, когда потенциал ниже порогового значения для образования перекиси, но синтез АТФ еще возможен.

Для того чтобы протонофоры не обладали токсичным действием и не проявляли свою активность в тех случаях, когда клетке требуется синтез АТФ, необходимо, чтобы их активность зависела от функционального состояния митохондрий, например, от потенциала на ее внутренней мембране. В состоянии гиперполяризации протонофор должен снимать только избыток потенциала, но не снижать его чрезмерно, что неизбежно приведет к ингибированию процесса дыхания. Идеальный протонофор не должен ингибировать дыхание митохондрий даже при относительно высоких концентрациях. Ранее предпринимались попытки синтеза веществ, обладающих свойствами «мягких» митохондриальных разобщителей, однако они потерпели неудачу [20].

Таким образом, рассматриваемый янтарнокислый комплекс, вероятно, выступает в качестве такого «мягкого» разобщителя, что уменьшает интенсивность образования АФК и оптимизирует синтез АТФ. В результате работы было показано высокое влияние комплекса на дыхательную

функцию митохондрий. Данное исследование показало, что комплекс средств метаболического и антиоксидантного действия повышает базальный уровень дыхания митохондрий, что может быть актуально для повышения исходно нормальной респирометрической функции митохондрий, например, в профилактике гипоксических состояний при отсутствии патологии. Увеличение интенсивности стимулированного дыхания также представляет собой интересный аспект метаболического действия комплекса.

Было показано, что изучаемый комплекс увеличивал интенсивность субстратного дыхания, причем выраженные изменения были получены на всем протяжении митохондриальной дыхательной цепи, что является важным терапевтическим преимуществом в условиях дефицита субстратов окисления — при ишемически-гипоксическом повреждении.

Универсальным метаболическим паттерном ишемий является накопление предшественника сукцината — циклической лимонной кислоты, ответственной за митохондриальную выработку реактивных форм кислорода. Избыток сукцината повторно окисляется сукцинатдегидрогеназой, что приводит к стремительному накоплению реактивных форм кислорода. Триметилгидразиниевый компонент изучаемого комплекса, переводя клетку в анаэробный цикл, снижает доступность молекулярных форм кислорода для окисления сукцината, таким образом, прерывая патологический каскад образования разрушительных свободных радикалов и оказывая выраженное антигипоксическое действие [21].

Кроме того, учитывая метаболический профиль действия триметилгидразиния пропионата, а именно ограничение требующих кислорода процессов окисления жирных кислот с переводом клетки на интенсивный углеводный обмен и шунтирующий эффект этилметилгидроксипиридина сукцината, можно предположить увеличение устойчивости клеток к кислородному дефициту на разных сопряженных метаболических уровнях. Так, фрагмент триметилгидразиния, за счет повышения транспорта углеводов в клетку и ограничения гликолиза, опосредованного ингибированием фосфофруктокиназы, может увеличивать эффективность степени воздействия этилметилгидроксипиридина сукцината на электронотранспортные процессы, модулируя тем самым оптимальную продукцию АТФ в условиях ишемии, достаточную для поддержания нормального функционирования клетки [22].

В сложившихся условиях ишемии тканей модуляция синтеза АТФ может иметь важное значение для выживания клетки. Известно, что в условиях ишемического инсульта снижение концентрации внутриклеточного пула АТФ до критического уровня опосредует активацию каспазо-зависимых реакций апоптоза, ведущих к гибели клетки и усилению реакций нейровоспаления [23, 24]. Также при манифестации болезни Альцгеймера — одного из самых распространенных нейродегенеративных

заболеваний – повышение образования АТФ за счет активации субстрат-зависимого дыхания, а именно переключение биоэнергетических процессов с одного используемого субстрата на другой, может препятствовать спонтанной самоагрегации тау-белка, подавляя тем самым основной патогенетический каскад болезни Альцгеймера (в данном случае АТФ выступает как естественный гидротроп, стабилизирующий белковые молекулы) [25].

Значительное усиление сукцинат зависимого дыхания под влиянием комплекса (триметилгидразиния пропионат+ этилметилгидроксипиридина сукцинат) в условиях блокады активности митохондриального комплекса I ротеноном, сопряженное с АФК-ингибирующей активностью, вероятно, позволит добиться определенных терапевтических преимуществ при болезни Паркинсона. Установлено, что одним из патогенетических триггеров данного заболевания является дисфункция митохондриального комплекса I с последующим усилением утечки электронов из митохондриальной дыхательной цепи и развитием окислительного повреждения нейронов черной субстанции [26]. В данных условиях применение рассматриваемого комплекса компонентов позволит

достичь эффекта «метаболического обхода» комплекса I, что позволит уменьшить ретроградный ток и утечку электронов, снизив образование АФК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По совокупности полученных результатов, можно предполагать, что лекарственный препарат Брейнмакс® приводит к стабилизации митохондриальной функции, рационализации работы клетки в условиях стресса, нормализации энергообмена в клетке даже в условиях гипоксии и устранению нежелательных эффектов ишемически-гипоксического повреждения тканей. Причем для комплекса активных компонентов, обладающих синергетическим взаимодействием, эти эффекты более выражены, чем для их применения по отдельности. Спектр биохимических реакций, происходящих в клетке под действием янтарнокислого комплекса с триметилгидразинием, и соответствующие фармакологические эффекты могут являться предметом дальнейших, более детализированных исследований на соответствующих экспериментальных моделях патологических процессов.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование проводилось при поддержке компании ООО «ПРОМОМЕД РУС». Спонсор не оказывал влияния на выбор материала для публикации, анализ и интерпретацию данных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

М.В. Журавлева – анализ результатов, редактирование текста; М.В. Грановская – интерпретация результатов; К.Я. Заславская – разработка концепции исследования, редактирование текста; Ю.Г. Казаишвили – статистическая обработка результатов, написание текста; В.С. Щербакова – написание текста, подбор литературных источников; А.А. Андреев-Андриевский – организация и проведение исследования, интерпретация результатов; Д.И. Поздняков – анализ результатов, написание текста; М.Ю. Высоких – разработка дизайна и написание программы исследования.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Mui D., Zhang Y. Mitochondrial scenario: roles of mitochondrial dynamics in acute myocardial ischemia/reperfusion injury // *J. Recept. Signal. Transduct. Res.* – 2021. – Vol. 41, No. 1. – P. 1–5. DOI: 10.1080/10799893.2020.1784938
2. Johnson J., Mercado-Ayon E., Mercado-Ayon Y., Dong Y.N., Halawani S., Ngaba L., Lynch D.R. Mitochondrial dysfunction in the development and progression of neurodegenerative diseases // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2021. – Vol. 702. – Art. ID:108698. DOI: 10.1016/j.abb.2020.108698
3. Воронков А.В., Поздняков Д.И., Нигарян С.А., Хури Е.И., Мирошниченко К.А., Сосновская А.В., Олохова Е.А. Оценка респирометрической функции митохондрий в условиях патологий различного генеза // *Фармация и фармакология.* – 2019. – Т. 7, № 1. – С. 20–31. DOI: 10.19163/2307-9266-2019-7-1-20-31
4. Hernandez-Resendiz S., Prunier F., Girao H., Dorn G., Hausenloy D.J.; EU-CARDIOPROTECTION COST Action (CA16225). Targeting mitochondrial fusion and fission proteins for cardioprotection // *J. Cell. Mol. Med.* – 2020. – Vol. 24, No. 12. – P. 6571–6585. DOI: 10.1111/jcmm.15384
5. Dia M., Gomez L., Thibault H., Tessier N., Leon C., Chouabe C., Ducreux S., Gallo-Bona N., Tubbs E., Bendridi N., Chanon S., Leray A., Belmudes L., Couté Y., Kurdi M., Ovize M., Rieusset J., Paillard M. Reduced reticulum-mitochondria Ca²⁺ transfer is an early and reversible trigger of mitochondrial dysfunctions in diabetic cardiomyopathy // *Basic. Res. Cardiol.* – 2020. – Vol. 115, No. 6. – Art. No. 74. DOI: 10.1007/s00395-020-00835-7
6. Wang P., Xu S., Xu J., Xin Y., Lu Y., Zhang H., Zhou B., Xu H., Sheu S.S., Tian R., Wang W. Elevated MCU Expression by CaMKIIδB Limits Pathological Cardiac Remodeling // *Circulation.* – 2022. – Vol. 145, No. 14. – P. 1067–1083. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.121.055841
7. Wolf P., Schoeniger A., Edlich F. Pro-apoptotic complexes of BAX and BAK on the outer mitochondrial membrane // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Res.* – 2022. – Vol. 1869, No. 10. – Art. ID: 119317. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2022
8. Marchi S., Guilbaud E., Tait S.W.G., Yamazaki T., Galluzzi L. Mitochondrial control of inflammation // *Nat. Rev. Immunol.* – 2022. – P. 1–15. DOI: 10.1038/s41577-022-00760-x
9. Kafkova A., Trnka J. Mitochondria-targeted compounds in the treatment of cancer // *Neoplasma.* – 2020. – Vol. 67, No. 3. – P. 450–460. DOI: 10.4149/neo_2020_190725N671
10. Zhu Y., Luo M., Bai X., Li J., Nie P., Li B., Luo P. SS-31, a Mitochondria-Targeting Peptide, Ameliorates Kidney

- Disease // *Oxid. Med. Cell Longev.* – 2022. – Vol. 2022. – Art. ID: 1295509. DOI: 10.1155/2022/1295509
11. Chouchani E.T., Pell V.R., Gaude E., Aksentijević D., Sundier S.Y., Robb E.L., Logan A., Nadtochiy S.M., Ord E.N.J., Smith A.C., Eyassou F., Shirley R., Hu C.H., Dare A.J., James A.M., Rogatti S., Hartley R.C., Eaton S., Costa A.S.H., Brookes P.S., Davidson S.M., Duchon M.R., Saeb-Parsy K., Shattock M.J., Robinson A.J., Work L.M., Frezza C., Krieg T., Murphy M.P. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS // *Nature.* – 2014. – Vol. 515, No. 7527. – P. 431–435. DOI: 10.1038/nature13909
 12. Wang D., Liu F., Yang W., Sun Y., Wang X., Sui X., Yang J., Wang Q., Song W., Zhang M., Xiao Z., Wang T., Wang Y., Luo Y. Meldonium Ameliorates Hypoxia-Induced Lung Injury and Oxidative Stress by Regulating Platelet-Type Phosphofructokinase-Mediated Glycolysis // *Front. Pharmacol.* – 2022. – Vol. 13. – Art. ID: 863451. DOI: 10.3389/fphar.2022.863451
 13. Dedkova E.N., Seidlmayer L.K., Blatter L.A. Mitochondria-mediated cardioprotection by trimetazidine in rabbit heart failure // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2013. – Vol. 59. – P. 41–54. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2013.01.016
 14. Балькова Л.А., Ивянский С.А., Самошкина Е.С., Чигинева К.Н., Варлашина К.А., Плешков С.А. Стимуляторы работоспособности в спортивной медицине: многообразие выбора и влияния на здоровье // *Consilium Medicum. Педиатрия.* – 2017. – № 4. – С. 78–83.
 15. Görgens C., Guddat S., Dib J., Geyer H., Schänzer W., Thevis M. Mildronate (Meldonium) in professional sports – monitoring doping control urine samples using hydrophilic interaction liquid chromatography – high resolution/high accuracy mass spectrometry // *Drug Test. Anal.* – 2015. – Vol. 7, No. 11–12. – P. 973–979. DOI: 10.1002/dta.1788
 16. Wikstrom M.K. Proton pump coupled to cytochrome c oxidase in mitochondria // *Nature.* – 1977. – Vol. 266, No. 5599. – P. 271–273. DOI: 10.1038/266271a0
 17. Стаценко М.Е., Шилина Н.Н., Туркина С.В. Применение мeldonия в комплексном лечении больных с сердечной недостаточностью в раннем постинфарктном периоде // *Терапевтический архив.* – 2014. – Т. 86. – № 4. – С. 30–35.
 18. Танашян М.М., Раскураев А.А., Заславская К.Я., Кузнецова П.И., Меркулова И.Ю. Новые возможности нейропротективной терапии пациентов в остром и раннем восстановительном периоде ишемического инсульта // *Терапевтический архив.* – 2022. – Т. 94, № 6. – С. 748–755. DOI: 10.26442/00403660.2022.06.201743
 19. Патент РФ № 2527519. Мягкие катионные митохондриальные разобщители. Авторы: Скулачев В.П., Скулачев М.В., Зиновкин Р.А., Северин Ф.Ф., Антоненко Ю.Н., Зоров Д.Б., Плотников Е.Ю., Исаев Н.К., Силачёв Д.Н., Кнорре Д.А. Патентообладатель ООО «Митотех». 2011. № публикации WO/2011/162633.
 20. Blaikie F.H., Brown S.E., Samuelsson L.M., Brand M.D., Smith R.A., Murphy M.P. Targeting dinitrophenol to mitochondria: limitations to the development of a self-limiting mitochondrial protonophore // *Biosci. Rep.* – 2006. – Vol. 26, No. 3. – P. 231–243. DOI: 10.1007/s10540-006-9018-8
 21. Jespersen N.R., Yokota T., Støttrup N.B., Bergdahl A., Paelestik K.B., Povlsen J.A., Dela F., Bøtker H.E. Pre-ischaemic mitochondrial substrate constraint by inhibition of malate-aspartate shuttle preserves mitochondrial function after ischaemia-reperfusion // *J. Physiol.* – 2017. – Vol. 595, No. 12. – P. 3765–3780. DOI: 10.1113/JP273408
 22. Wang D., Liu F., Yang W., Sun Y., Wang X., Sui X., Yang J., Wang Q., Song W., Zhang M., Xiao Z., Wang T., Wang Y., Luo Y. Meldonium Ameliorates Hypoxia-Induced Lung Injury and Oxidative Stress by Regulating Platelet-Type Phosphofructokinase-Mediated Glycolysis // *Frontiers in pharmacology.* – 2022. – Vol. 1. – Art. ID: 863451. DOI: 10.3389/fphar.2022.863451
 23. Воронков А.В., Поздняков Д.И., Нигарян С.А. Церебропротективное действие некоторых феноликов в условиях экспериментальной ишемии головного мозга // *Фармация и фармакология.* – 2019. – Т. 7. № 6. – С. 332–339. DOI: 10.19163/2307-9266-2019-7-6-332-338
 24. Sun Y., Zhang Y., Cheng B., Dong Y., Pan C., Li T., Xie Z. Glucose may attenuate isoflurane-induced caspase-3 activation in H4 human neuroglioma cells // *Anesth. Analg.* – 2014. – Vol. 119, No. 6. – P. 1373–1380. DOI: 10.1213/ANE.0000000000000383
 25. Sarkar S., Mondal J. Mechanistic Insights on ATP's Role as a Hydrotrope // *J. Phys. Chem. B.* – 2021. – Vol. 125, No. 28. – P. 7717–7731. DOI: 10.1021/acs.jpcc.1c03964
 26. Franco-Iborra S., Vila M., Perier C. The Parkinson Disease Mitochondrial Hypothesis: Where Are We at? // *Neuroscientist.* – 2016. – Vol. 22, No. 3. – P. 266–277. DOI: 10.1177/107385841557460025761946.

АВТОРЫ

Журавлева Марина Владимировна – доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет); заместитель начальника научного отдела клинической фармакологии Института исследований и разработок ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-9198-8661. E-mail: mvzhuravleva@mail.ru

Грановская Марина Викторовна – адъюнкт профессора Института системной биологии Университетского колледжа Дублина, Дублин, Ирландия. ORCID ID: 0000-0002-6867-5376. E-mail: mgranovsk@gmail.com

Заславская Кира Яковлевна – ассистент кафедры биологической и фармацевтической химии с курсом организации и управления фармацией Медицинский институт ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарева». ORCID ID: 0000-0002-7348-9412. E-mail: kiryonok@yandex.ru

Казаишвили Юрий Георгиевич – кандидат биологических наук, ассистент кафедры фармакологии

ФГБОУ ВО Тверского ГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0003-0826-4177. E-mail: ykaza@bk.ru

Щербакова Виктория Сергеевна – кандидат биологических наук, ассистент кафедры фармакологии ФГБОУ ВО Тверского ГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-7251-8744. E-mail: Victoria_kaptar@mail.ru

Андреев-Андреевский Александр Александрович – руководитель отдела исследований на животных, ГНЦ РФ ИМБП РАН. ORCID ID: 0000-0002-1173-8153. E-mail: aaa@mitotech.ru

Поздняков Дмитрий Игоревич – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармакологии с курсом клинической фармакологии ПМФИ – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-5595-8182. E-mail: pozdniackow.dmitry@yandex.ru

Высоких Михаил Юрьевич – кандидат биологических наук, заведующий лабораторией молекулярных механизмов старения, НИИ Физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ. ORCID ID: 0000-0002-4047-6201. E-mail: mikhail.vyssokikh@gmail.com