

ОКСИДАТИВНЫЙ СТРЕСС И СТАРЕНИЕ: ВОЗМОЖНОСТИ КОРРЕКЦИИ

**Т. Титова,
Л. Кудряшова,
И. Болгова, кандидат медицинских наук,
И. Павлова**
Белгородская областная клиническая больница

E-mail: lit.86@mail.ru

Наиболее актуальная на сегодня теория старения – теория оксидативного стресса (свободных радикалов). С возрастом в клетках увеличивается уровень активных форм кислорода, повышается интенсивность окислительных процессов в митохондриях, снижается антиоксидантная защита. В настоящее время ведутся поиски методов воздействия на оксидативный стресс, изучаются естественные и синтетические антиоксиданты, оценивается их влияние на интенсивность окислительных процессов в клетках и организме человека в целом. Разрабатываются новые антиоксиданты, трехмерные супрамолекулярные ансамбли, обладающие внутренней антиоксидантной активностью.

Ключевые слова: оксидативный стресс, старение, антиоксиданты.

Старение – разрушительный процесс, вызываемый комплексом регуляторных и стохастических факторов и определяемый генетически детерминированной биологической организацией живой системы [8].

Существует множество теорий, объясняющих причины старения: эволюции; митохондриальная; гликозилирование белков; повреждения ДНК; накопления ошибок; предел Хейфлика и теория теломер; онтогенетическая теория Дильмана; иммунологическая теория. Одна из основных – теория оксидативного стресса (свободных радикалов – СР) – впервые была сформулирована в 1950-х годах D. Harman, который выдвинул гипотезу, согласно которой имеются некие общие механизмы, модифицируемые генетическими и негенетическими факторами и приводящие к аккумуляции в организме с возрастом эндогенных активных молекул – СР кислорода. Эта теория на некоторое время была забыта, но к ней вернулись в 1972 г., когда в качестве возможных локусов свободнорадикального окисления стали рассматриваться митохондрии. Было постулировано, что продолжительность жизни зависит именно от скорости свободнорадикального повреждения митохондрий. Усиление с возрастом оксидативного стресса приводит к нарушению баланса между продукцией СР и антиоксидантной защитой (АОЗ) организма. Оксидативный стресс поражает практически все структуры организма, включая ДНК, белки и липиды [5].

Изучение процессов старения весьма актуально, поскольку, по данным демографического отдела ООН, за последние 50 лет в мире более чем в 3 раза увеличилась численность населения пожилого и старческого возраста (лиц от 60 до 89 лет). Согласно рекомендациям ООН, население считается старым, если доля лиц в возрасте 65 лет и старше превышает 7% от общей численности населения. По прогнозам демографов,

в ближайшее время будет наблюдаться дальнейшее старение населения, связанное с увеличением общей продолжительности жизни и снижением численности молодых людей. Например, в РФ в 2000 г. было около 18 млн лиц старше 65 лет, а в 2020 г. их будет уже 21 млн [10].

Однако население Земли не просто стареет; с возрастом оно активно приобретает гораздо большее число заболеваний, чем наши предшественники еще 20–40 лет назад. Так, отмечается выраженный рост заболеваемости сахарным диабетом; этот процесс, согласно прогнозам экспертов ВОЗ, скоро может перейти из разряда мировых неинфекционных эпидемий XXI века в разряд новых мировых неинфекционных пандемий. Постепенное одряхление жителей планеты сопровождается уменьшением продолжительности качественной, активной жизни [5].

Современной геронтологией накоплен обширный фактический материал о механизмах старения человеческого организма, выявлен вклад в старение разных метаболических нарушений. Так, показано влияние перекисного окисления липидов (ПОЛ) на темпы старения организма и геропротективные свойства антиоксидантов, определено увеличение с возрастом доли в тканях гликозилированных белков [4].

Оксидативным стрессом называют процесс повреждения клетки в результате окисления. В процессе жизнедеятельности любого организма в клетках и межклеточном пространстве происходит один из самых универсальных процессов — образование СР. Они составляют особый класс химических веществ, которые различаются по атомарному составу, но все характеризуются наличием в молекуле непарного электрона. СР — непременные спутники кислорода, которые обладают высокой химической активностью, направленной на повреждение белков, нуклеиновых кислот и липидов биологических мембран клеток. Они представляют собой активные неустойчивые частицы, образующиеся в ходе процессов естественно-го метаболизма клеток [1].

Оксидативный стресс возникает в результате нарушения равновесия между прооксидантами и антиоксидантами, при котором преобладают прооксиданты. В качестве прооксидантов, т.е. факторов, которые вызывают повышенное образование СР, выступают самые разные стимулы: внешние (курение, некоторые пищевые продукты, поллютанты и т.д.) и внутренние (прежде всего — активированные кислородные метаболиты) [3].

Разрушительное действие избыточных концентраций СР проявляется ускорением процессов старения, провоцированием воспалительных процессов в мышечных, соединительных и других тканях, неправильным функционированием циркуляционной, нервной систем.

Окисление ненасыщенных жирных кислот в составе клеточных мембран — один из основных эффектов СР. СР повреждают также белки (особенно тиолсодержащие) и ДНК. Морфологическим исходом окисления липидов клеточной стенки является формирование полярных каналов проницаемости, что увеличивает пассивную проницаемость мембраны для ионов Ca^{2+} . Типы вызываемых СР повреждений определяются не только их агрессивностью, но и структурными и биохимическими характеристиками объекта воздействия. Например, во внеклеточном пространстве СР разрушают гликозаминогликаны основного вещества соединительной ткани, что может быть одним из механизмов деструкции суставов (например, при ревматоидном артрите). Они изменяют проницаемость (следовательно, и барьерную функцию) цитоплазматических мембран в связи с формированием кана-

лов повышенной проницаемости, что приводит к нарушению водно-ионного гомеостаза клетки [1].

Существуют доказательства того, что стрессопосредованная агрегация белков может быть основной причиной гибели нейронов при некоторых связанных со старением нейродегенеративных заболеваниях [18].

По-прежнему в научном мире ведутся споры о влиянии митохондриального оксидативного стресса на старение. Как известно, митохондрии — энергетические «станции» клеток, которые отвечают за синтез в них аденозинтрифосфата, а поскольку в добыче энергии задействован кислород, попутно происходит накопление вредных побочных продуктов — СР. Ученые из Гетеборгского университета (Швеция) обнаружили, что «выключение» некоторых митохондриальных белков замедляет процесс старения. Речь идет о белках «внутреннего хозяйства», называемых белками трансляционного контроля митохондрий (mitochondrial translational control — МТС) и необходимых для нормального биосинтеза в этих органеллах. МТС-белки влияют на стабильность генома клетки, упаковку хроматина и способность клетки избавляться от поврежденных и опасных белков. Исследователи экспериментально подавляли синтез ряда белков из МТС-группы и наблюдали «засыпание» значительной части клеточного генома (ДНК в хромосомах оказывалась плотно упакованной и закрытой для чтения), увеличение срока жизни клеточных белков и активизацию «систем уборки». В итоге при «выключенных» МТС-белках клетки жили дольше [14].

Однако в ряде исследований, опубликованных в 2009 г., свободнорадикальная теория старения подверглась критическому пересмотру. Было продемонстрировано, что снижение уровня энергетического метаболизма и усиление окислительного стресса в митохондриях молодых мышей линии Mcl1k1+/- обеспечивает практически абсолютную защиту от ассоциированного с возрастом снижения функциональности митохондрий. Более того, такое измененное состояние митохондрий оказалось взаимосвязанным со значительным снижением скорости формирования окислительных биомаркеров старения. Таким образом, митохондриальный оксидативный стресс не является причиной старения [13].

Недавно группой ученых под руководством Т. Финкела обнаружено, что перенос активированного гена *ras* в первичные фибробласты при помощи ретровирусов значительно ускоряет старение клеток. Т. Финкел и соавт. использовали эту систему *in vitro* для выявления медиаторов опосредованного *ras*-старения. Они показали, что экспрессия данного гена вызывает возрастание продукции внутриклеточных и, особенно, митохондриальных активных форм кислорода (АФК). Кроме того, обнаружилось, что способность гена *ras* вызывать остановку роста клеток и старение частично ингибируется совместной экспрессией гена *rac1*. Т. Финкел и соавт. показали также, что при помещении клеток в среду с низким содержанием кислорода (т.е. в среду, в которой угнетается образование АФК; например, в среду, в которой содержание кислорода составляет 1%) *ras* не способен вызывать повышение уровня ингибитора циклинзависимых киназ p21 и активировать программу запуска старения. При нормальных условиях (20% кислорода) нейтрализаторы супероксида не оказывают влияния на старение, вызываемое *ras*, однако оно предотвращается при добавлении нейтрализаторов пероксида водорода. Эти данные свидетельствуют о том, что в нормальных диплоидных клетках ген *ras* регулирует синтез оксидантных молекул, а повышение уровня внутриклеточного H_2O_2 представляет собой критический сигнал для запуска репликативного старения [21].

В настоящее время СР разных видов в биологических системах обнаруживают с помощью электронного парамагнитного резонанса. При этом используют магнитные свойства неспаренных электронов; СР оставляет характерные «следы», которые могут быть обнаружены на электромагнитном спектре. Как резюмируется в обзоре [20], в последние годы разработаны некоторые другие методы, специфичные для отдельных видов АФК, такие как реакция *dihydro ethidium* с O₂ для получения красной флюоресценции. С помощью этих методов показано, что уровни АФК увеличиваются с возрастом в основных органах, таких как печень, сердце, мозг и скелетные мышцы [18]. Для оценки интенсивности ПОЛ также часто используют определение количества малонового диальдегида. Его повышение свидетельствует о метаболических нарушениях в организме даже на доклинической стадии заболевания [6, 9].

До сих пор обычной практикой оценки уровня оксидативного стресса было определение степени окисления молекулы глутатиона в клеточных экстрактах. Ученые Немецкого онкологического научно-исследовательского центра (Deutsches Krebs for Schungszentrum – DKFZ) установили, что в клетках в состоянии стресса окисленный глутатион находится в хранилище для биохимических отходов, что защищает клетки от оксидативного стресса и ставит под вопрос состоятельность традиционного метода его оценки и достоверность полученных на основе этого метода данных. Результаты исследования означают, что уровень окисленного глутатиона не является показателем оксидативного стресса, испытываемого клеткой [16].

Группе шведских, британских и американских ученых удалось впервые измерить уровень АФК в митохондриях стареющего организма. Согласно полученным данным, с возрастом концентрации АФК в них существенно возрастают, что подтверждает один из вариантов свободнорадикальной теории старения. Ученые использовали вещество MitoV, синтезированное на основе липофильных катионов; вещество обладает избирательным сродством к митохондриям и способно накапливаться внутри них; взаимодействуя с АФК, это соединение преобразуется в окисленную форму – MitoP. По соотношению MitoV/MitoP в препарате клеток можно определить уровень АФК в митохондриях при их жизни.

Объектом исследования стали генно-модифицированные мыши, лишенные механизма исправления ошибок при репликации (удвоении) митохондриальной ДНК. С возрастом в митохондриях таких животных накапливаются митохондриальные мутации, которые приводят к комплексу дегенеративных изменений в тканях (нейродегенерация, потеря мышечной массы, снижение зрения, обоняния и т.д.) и ускоренному старению – прогерии. Продолжительность жизни этих животных в несколько раз ниже, чем у обычных грызунов. При этом выявленное повышение уровней АФК в митохондриях было недостаточным для того, чтобы вызвать массовую гибель клеток разных тканей, наблюдаемую у лабораторных мышей с прогерией. В то же время вполне вероятно, что оно было сигналом к запуску деструктивных процессов, связанных, например, с избыточной активностью иммунной системы. Это предположение подтверждено наблюдениями, согласно которым параллельно с ростом уровней АФК в организмах стареющих мышей увеличивалась выработка ряда медиаторов воспаления. Изучалось также действие митохондриально-направленных антиоксидантов SkQ1. Результаты оказались впечатляющими: небольшие концентрации SkQ1 повы-

шали продолжительность жизни животных на 25%, и, что еще важнее, они практически полностью избавляли их от основных признаков заболевания: потери мышечной массы, ограничения подвижности, выпадения шерсти и усов и прочих признаков старения, которые обычно развиваются у этих грызунов в очень раннем возрасте [7].

В исследовании Л. Ниендерхофер (Исследовательский институт Скриппс, Флорида, США) показано, что вызываемые АФК повреждения ДНК приводят к клеточному старению. Исследования проводились на мышах с синдромом преждевременного старения, вызванным мутацией в гене эндонуклеазы *ERCC1-XPF*, которая участвует в репарации при 3 типах повреждения ДНК. Такие мыши стареют в 6 раз быстрее нормальных, у них в 5–6 раз быстрее накапливаются оксидативные повреждения ДНК; у мутантных мышей также больше воспалительных цитокинов, и их клетки характеризуются гиперметаболическим фенотипом. Изменения у мутантных мышей аналогичны изменениям у нормальных мышей в старости. Обработка мутантных мышей агентом, снижающим уровень АФК в митохондриях, способствует снижению числа повреждений ДНК. Авторы делают вывод: повреждения ДНК и одряхление клеток запускают системные эффекты старения [11].

Исследованиями на мышинных эмбриональных фибробластах (MEFs) показано, что чем выше концентрация кислорода, используемого для выращивания эмбриона, тем больше нестабильность генома. Показано, что у MEFs, выращенных при 20% концентрации кислорода, уровень окислительно поврежденной ДНК в 3–4 раза больше, чем у клеток, выращенных при 3% концентрации кислорода. Интересно, что в то время как мышинные клетки, выращенные при 20% концентрации кислорода, подверглись старению, те же самые клетки при 3% концентрации кислорода были меньше ему подвержены [21].

В физиологических условиях повреждающему действию СР противостоит система АОЗ, состоящая из поступающих с пищей и образующихся эндогенно веществ-антиоксидантов, способных препятствовать образованию СР и (или) нивелировать их чрезмерную окислительную активность путем объединения свободных электронов в пары, что не только предотвращает клеточное и тканевое повреждение, но и обеспечивает восстановление поврежденных структур [2]. В ряде исследований снижение АОЗ при старении подтверждено [17]. По другим данным, генерализованное снижение антиоксидантной ферментной функции отсутствует [18].

Антиоксиданты – важнейшие средства борьбы со свободнорадикальными процессами, спасители клеток. Они защищают клетки от внешних и внутренних токсических воздействий. Действуя как ловушки для СР, они способны их нейтрализовывать и поддерживать в незначительной концентрации. Антиоксиданты подразделяют на природные и синтезированные. К числу природных антиоксидантов относят токоферолы, каротиноиды, витамины А, К, убихиноны (коэнзим Q), убихроменолы (QC), флавоноиды. По механизму действия антиоксиданты подразделяют на:

- «мусорщики», или скавенжеры (scavenger of free radicals); они очищают организм от всех СР, чаще всего восстанавливая их до стабильных неактивных продуктов; многочисленная группа скавенжеров представлена тиоловыми соединениями, из которых наиболее активны глутатион и его предшественники – метионин, глутаминовая кислота, глутамин;

- «ловушки» (trap of free radicals) — антиоксиданты, имеющие сродство к какому-то определенному свободнорадикальному продукту («ловушки» синглетного кислорода, гидроксилрадикала и т.д.); «ловушки» часто используют для уточнения механизма свободнорадикальной реакции; к «ловушкам» относят витамин Е — токоферол, который функционирует в комплексе с витамином С, восстанавливающим его при окислительных реакциях, а также коэнзим Q10 (убихинон);
- антиоксиданты, обрывающие цепи (chain breaking antioxidants) — вещества, молекулы которых более реакционноспособны, чем их радикалы; чаще всего это фенолы, которые легко отдают свои электроны, превращая радикал, с которым они прореагировали, в молекулярный продукт, а сами при этом превращаются в слабый феноксил-радикал, который уже не способен участвовать в продолжении цепной реакции [2].

Терапевтические мероприятия должны быть направлены на устранение резистентности к гормонам и повышение эффективности функционирования митохондрий, в первую очередь — в клетках скелетной мышцы, которая составляет >50% общей массы соматических клеток. Показано, что постоянные физические упражнения стимулируют окисление жирных кислот в митохондриях и снижают резистентность к инсулину. Отказ от потребления насыщенных жиров и включение в ежедневный рацион рыбьего жира способствует снижению вязкости мембраны, увеличению ее проницаемости, снижению резистентности к инсулину, усилению окисления жирных кислот в пероксисомах и митохондриях, нормализации уровня глюкозы в крови. Олеиновая кислота, содержащаяся в оливковом масле, является антагонистом пальмитиновой кислоты и предотвращает ее действие как индуктора апоптоза. Снижение уровня глюкозы в крови после восстановления чувствительности к инсулину останавливает процесс гликозилирования белков. Подобную терапию можно назвать прооксидантной.

В настоящее время в рамках нанотехнологий активно ведется разработка трехмерных супрамолекулярных ансамблей, которые обладают внутренней антиоксидантной активностью, что делает их эффективным средством борьбы с оксидативным стрессом [19]. М. Конрад (Marcus Conrad) из Института клинической молекулярной биологии и генетики опухолей при Мюнхенском центре им. Гельмгольца расшифровал молекулярный механизм, с помощью которого оксидативный стресс вызывает гибель клеток. Известно, что глутатион — основной антиоксидант, вырабатываемый нашим организмом. Чтобы выяснить, какую роль молекулярный механизм уменьшения концентрации глутатиона играет в метаболическом пути гибели клеток, вызванной оксидативным стрессом, учеными были выведены специальные клетки и мыши, у которых отсутствует пероксидаза глутатиона-4 (GPx4) — один из наиболее важных глутатион-обуславливающих ферментов. Индуцированная инактивация GPx4 стала причиной массового окисления липидов и в конечном счете — клеточной смерти. Аналогичное явление можно наблюдать, если с помощью химического ингибитора биосинтеза глутатиона удалить внутриклеточный глутатион из клеток дикого (немутантного) типа. Любопытно, что такую гибель клеток может полностью предотвратить витамин Е, но не водорастворимые антиоксиданты. Фармакологические и реверсивные генетические анализы показали, что липидные пероксиды не случайно появляются

в GPx4-дефицитных клетках, а накапливаются в результате повышения активности конкретного фермента метаболизма арахидоновой кислоты — 12/15-липоксигеназы. Обнаружено, что активация апоптоз-индуцирующего фактора, о чем свидетельствует его миграция из митохондрии в ядро клетки, — еще одно важное звено в этой цепочке событий [18]. Есть способ, позволяющий быстро, надежно и в широких масштабах изменять окислительно-восстановительный потенциал (ОВП) и pH внутренних сред организма: использование электрохимически активированных систем (ЭХАС) в виде водных растворов или даже просто воды в количестве 1,0–1,5 кг/сут.

Метод ЭХАС позволяет вводить в организм стандартизированную по показателям ОВП и pH воду, обогащенную по ОН⁻ или Н⁺-группам путем электрохимической обработки и с регулируемым ОВП. Механизм действия ЭХАС заключается, видимо, в том, что ЭХАС сами способны генерировать продукцию супероксидных радикалов, оказывая таким образом умеренное тренирующее действие на активность ферментов АОЗ, что повышает ее активность. Наличие отрицательного ОВП для ЭХАС указывает на избыток электронов, возникающий при электрохимической активации, что в принципе как раз и является условием генерации в биологических системах ионов супероксида [12].

Установлено, что антиоксиданты не всегда проявляют ожидаемую активность в борьбе с СР. Это зависит от уровня оксидативного стресса, т.е. от количества радикалов, при котором их действие становится негативным. На эффективность антиоксидантов влияет также исходное состояние самой клетки. Вот почему в одних случаях антиоксиданты работают, а в других их действие может быть слабым. И хотя антиоксиданты не всегда проявляют ожидаемую активность, многочисленные исследования подтверждают их способность нейтрализовать СР, поэтому они заслуженно являются важной частью арсенала противозрастных средств [15].

Проблемы старения широко обсуждаются научным сообществом. Рассматриваются разные теории старения организма, среди которых все большую популярность приобретает теория оксидативного стресса (теория СР). Большинство исследователей отмечают, что с возрастом в клетках повышается уровень АФК, увеличивается интенсивность окислительных процессов в митохондриях, снижается АОЗ. Активно ведутся поиски средств воздействия на оксидативный стресс, изучаются разные виды антиоксидантов, ведется разработка трехмерных супрамолекулярных ансамблей, обладающих внутренней антиоксидантной активностью и способных эффективно противостоять оксидативному стрессу. Однако практически все указанные исследования проведены на клетках животных. Поэтому до сих пор обсуждается вопрос, насколько правомерно экстраполировать приведенные данные на процессы старения организма в целом и на человеческий организм. Исследования в этом направлении продолжаются.

Литература

1. Баджиян С.А. Влияние оксидативного стресса на организм человека URL: http://www.armic.am/modules.php?name=News&file=view&news_id=337 (дата обращения 13.11.2013).
2. База знаний по биологии человека. Оксидантный (окислительный) стресс и его профилактика. URL: <http://humbio.ru/humbio/immunology/imm-gal/000623dd.htm> (дата обращения 14.04.14).
3. Горохова С.Г. Сердечно-сосудистый континуум: возможность коэнзима Q10 в коррекции окислительного стресса // Кардиология. — 2011; 10: 61–7.

4. Емельянов В.В. Метаболические факторы ускоренного старения организма у больных сахарным диабетом 2-го типа и их коррекция: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Екатеринбург, 2007; 18 с.
5. Калинин С.Ю., Ворслов Л.О., Тюзиков И.А. и др. Окислительный стресс как причина системного старения. Роль препаратов α -липоевой кислоты (эспа-липон) в лечении и профилактике возраст-ассоциированных заболеваний // Фарматека. – 2014; 6: 44–56.
6. Курашвили В.А., Майлэм Л. Новые возможности предотвращения оксидативного стресса // Журнал натуральной медицины. – 2001; 1: 7–14.
7. Медицинский вестник: Старение – результат окислительного стресса. URL: http://medvestnik.by/ru/issues/n_8871.html (дата обращения 2.04.14).
8. Москалев А. А. Старение и гены / СПб: Наука, 2008; 358 с.
9. Нагорная Н.В., Четверик Н.А. Оксидативный стресс: влияние на организм человека, методы оценки // Здоровье ребенка. – 2010; 2 (23): 36–40.
10. Окунева Г.Н. Сердечно-сосудистая система и функция левого желудочка у пациентов ИБС старше 60 лет // Клиническая геронтология. – 2006; 12 (10): 29–32.
11. Отчет о конференции «Молекулярная генетика старения» в Колд Спринг Харбор. URL: <http://m-batin.livejournal.com/165610.html> (дата обращения 19.10.14).
12. Подколзин А.А., Мегреладзе А.Г., Донцов В.И. и др. Система антиоксидантной защиты организма и старение // Профилактика старения. – 2000; 3: 78–84.
13. Портал Вечная молодость. URL: <http://www.vechnayamolodost.ru/pages/teoriistarenija/mitokstist93.html> (дата обращения 28.09.2011).
14. Стасевич К. Как митохондрии управляют старением // Биотехнологии и медицина. URL: <http://compulenta.computerra.ru/archive/biotechnology/609769/> (дата обращения 11.05.2011).
15. Терешина Е.В. Старение, окислительный стресс и антиоксиданты // Геронтология и гериатрия. – 2006; 5: 38–48.
16. Morgan B., Ezeriņa D., Amoako T. et al. Multiple glutathione disulfide removal pathways mediate cytosolic redox homeostasis. URL: <http://www.lifesciencetoday.ru/index.php/vesti-iz-laboratoriy/790-role-of-oxidative-stress-in-development-of-diseases-should-be-reconsidered> (дата обращения 21.12.12).
17. Hagen T. Oxidative stress, redox imbalance, and the aging process // Antioxid Redox Signal. – 2003; 5: 503–6.
18. Kregel K., Zhang H. An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations // Am. J. Physiol. Regul., Integr. Comp. Physiol. – 2007; 292 (1): 18–36.
19. Richard P., Duskey J., Stolarov S. et al. New concepts to fight oxidative stress: nanosized three-dimensional supramolecular antioxidant assemblies. Pubmed. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=New+concepts+to+fight+oxidative+stress%3A+nanosized+three-dimensional+supramolecular+antioxidant+assemblies> (дата обращения 16.04.15).
20. Tarpey M., Wink D., Grisham M. Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: *in vitro* and *in vivo* considerations // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. – 2004; 286: 431–44.
21. Teng Lu and Toren Finkel. Free Radicals and Senescence // Exp. Cell Res. – 2008; 314 (9): 1918–22.

OXIDATIVE STRESS AND AGING: POSSIBLE CORRECTION

T. Titova; L. Kudryashova; I. Bolgova, Candidate of Medical Sciences; **I. Pavlova**
Belgorod Regional Clinical Hospital of St Ioasaf, Belgorod

The article presents literature data on the problem of aging, a marked increase in the number of elderly and senile age in the world; examines various theories of aging. It was found that the most relevant theory of aging, at the moment, is the theory of oxidative stress (free radical theory). It is revealed that with age there is an increase in the number of active forms of oxygen in the cells, the intensity of oxidative processes in the mitochondria and decreased antioxidant protection. Currently actively being sought methods of influence on oxidative stress, we conducted a study of natural and synthetic antioxidants, evaluates their impact on the intensity of oxidative processes in cells and the human body in General. Underway to develop new antioxidants, a three-dimensional supramolecular compounds that have intrinsic antioxidant activity.

Key words: oxidative stress, aging, antioxidants.

УДК 615.015

КОНВЕНЦИОНАЛЬНЫЕ ПОДХОДЫ К ТЕРАПИИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ МИОПАТИЙ

М.В. Покровский¹, М.В. Корокин¹, А.М. Краюшкина¹, Н.С. Жунусов¹, К.Н. Лапин²,
М.О. Солдатова³, Е.А. Кузьмин⁴, О.С. Гудырев¹, И.С. Кочкарова¹, А.В. Дейкин¹

¹ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» 308015, Россия, г. Белгород, ул. Победы, д. 85

² Научно-исследовательский институт общей реаниматологии имени В.А. Неговского Федерального научно-клинического центра реаниматологии и реабилитологии 107031, Россия, г. Москва, ул. Петровка, д. 25, стр. 2

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации 305041, Россия, г. Курск, ул. Карла Маркса, д. 3

⁴ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) 11999, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

E-mail: mkorokin@mail.ru

Получена 05.09.2022

После рецензирования 10.10.2022

Принята к печати 25.10.2022

Цель. Проанализировать доступные терапевтические опции для конвенциональной терапии наследственных миопатий.

Материалы и методы. При поиске материала для написания обзорной статьи использовали такие реферативные базы данных, как PubMed и Google Scholar. Поиск осуществлялся по публикациям за период с 1980 г. по сентябрь 2022 г. Параметрами для отбора литературы были выбраны следующие слова и их сочетания: “myopathy”, “Duchenne”, “myodystrophy”, “metabolic”, “mitochondrial”, “congenital”, “symptoms”, “replacement”, “recombinant”, “corticosteroids”, “vitamins”, “tirasemtiv”, “therapy”, “treatment”, “evidence”, “clinical trials”, “patients”, “dichloracetate”.

Результаты. Врожденные миопатии представляют собой гетерогенную группу патологий, которые вызваны атрофией и дегенерацией мышечных волокон вследствие мутаций в генах. На основании ряда клинических и патогенетических особенностей наследственные миопатии разделяют на: 1) врожденные миопатии; 2) мышечные дистрофии; 3) митохондриальные и 4) метаболические миопатии. При этом, подходы к лечению значительно варьируют в зависимости от типа миопатии и могут быть основаны на 1) замещении мутантного белка; 2) увеличении его экспрессии 3) стимуляции экспрессии внутренних компенсаторных путей; 4) восстановлении баланса соединений, связанных с функцией мутантного белка (для ферментов); 5) воздействии на функцию митохондрий (при метаболических и митохондриальных миопатиях); 6) снижении воспаления и фиброза (при мышечных дистрофиях); а также на 7) увеличении мышечной массы и силы. В текущем обзоре представлены современные данные о каждом из перечисленных подходов, а также конкретные фармакологические агенты с описанием их механизмов действия.

Заключение. В настоящее время для лечения различных типов миопатий используются или проходят клинические исследования следующие фармакологические группы: инотропные, противовоспалительные и антифибротические препараты, антимиостатиновая терапия и препараты, способствующие трансляции через стоп-кодоны (применима при нонсенс-мутациях). Кроме того, для лечения миопатий могут быть применены метаболические препараты, кофакторы метаболических ферментов, стимуляторы митохондриального биогенеза и антиоксиданты. Наконец, клинически одобрены рекомбинантные препараты аллглюкозидаза и аваллглюкозидаза для заместительной терапии метаболических миопатий (болезнь Помпе).

Ключевые слова: наследственные миопатии; миодистрофия Дюшенна; метаболическая терапия; фармакологическая коррекция

Список сокращений: ЭТЦ – электронно-транспортная цепь; мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота; тРНК – транспортная рибонуклеиновая кислота; миРНК – малая интерферирующая рибонуклеиновая кислота; НАД – никотинамидадениндинуклеотид; ФАД – флавинадениндинуклеотид; НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат; АТФ – аденозинтрифосфат; АДФ – аденозиндифосфат; CTGF – фактор роста соединительной ткани; TGFβ – трансформирующий фактор роста-бета; НПВП – нестероидные противовоспалительные препараты; XLMTM – X-сцепленная миотубулярная миопатия; ЦТК – цикл трикарбоновых кислот; ФНО-α – фактор некроза опухоли-альфа; CTGF/CCN2 – фактор роста соединительной ткани.

Для цитирования: М.В. Покровский, М.В. Корокин, А.М. Краюшкина, Н.С. Жунусов, К.Н. Лапин, М.О. Солдатова, Е.А. Кузьмин, О.С. Гудырев, И.С. Кочкарова, А.В. Дейкин. Конвенциональные подходы к терапии наследственных миопатий. *Фармация и фармакология*. 2022;10(5):416-431. DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-5-416-431

© М.В. Покровский, М.В. Корокин, А.М. Краюшкина, Н.С. Жунусов, К.Н. Лапин, М.О. Солдатова, Е.А. Кузьмин, О.С. Гудырев, И.С. Кочкарова, А.В. Дейкин, 2022

For citation: M.V. Pokrovsky, M.V. Korokin, A.M. Krayushkina, N.S. Zhunusov, K.N. Lapin, M.O. Soldatova, E.A. Kuzmin, O.S. Gudyrev, I.S. Kochkarova, A.V. Deikin. Conventional approaches to the therapy of hereditary myopathies. *Pharmacy & Pharmacology*. 2022;10(5):416-431. DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-5-416-431

CONVENTIONAL APPROACHES TO THE THERAPY OF HEREDITARY MYOPATHIES

M.V. Pokrovsky¹, M.V. Korokin¹, A.M. Krayushkina¹, N.S. Zhunusov¹, K.N. Lapin²,
M.O. Soldatova³, E.A. Kuzmin⁴, O.S. Gudyrev¹, I.S. Kochkarova¹, A.V. Deikin¹

¹ Belgorod State National Research University,
85, Pobeda Str., Belgorod, Russia, 308015

² V.A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology,
Federal Scientific and Clinical Center for Resuscitation and Rehabilitology,
Bld. 2, 25, Petrovka Str., Moscow, Russia, 107031

³ Kursk State Medical University,
3, Karl Marx Str., Kursk, Russia, 305041

⁴ Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University),
Bld. 2, 8, Trubetskaya Str., Moscow, Russia, 119991

E-mail: mkorokin@mail.ru

Received 05 Sep 2022

After peer review 10 Oct 2022

Accepted 25 Oct 2022

The aim of the work was to analyze the available therapeutic options for the conventional therapy of hereditary myopathies.

Materials and methods. When searching for the material for writing a review article, such abstract databases as PubMed and Google Scholar were used. The search was carried out on the publications during the period from 1980 to September 2022. The following words and their combinations were selected as parameters for the literature selection: "myopathy", "Duchenne", "myodystrophy", "metabolic", "mitochondrial", "congenital", "symptoms", "replacement", "recombinant", "corticosteroids", "vitamins", "tirasemtiv", "therapy", "treatment", "evidence", "clinical trials", "patients", "dichloracetate".

Results. Congenital myopathies are a heterogeneous group of pathologies that are caused by atrophy and degeneration of muscle fibers due to mutations in genes. Based on a number of clinical and pathogenetic features, hereditary myopathies are divided into: 1) congenital myopathies; 2) muscular dystrophy; 3) mitochondrial and 4) metabolic myopathies. At the same time, treatment approaches vary significantly depending on the type of myopathy and can be based on 1) substitution of the mutant protein; 2) an increase in its expression; 3) stimulation of the internal compensatory pathways expression; 4) restoration of the compounds balance associated with the mutant protein function (for enzymes); 5) impact on the mitochondrial function (with metabolic and mitochondrial myopathies); 6) reduction of inflammation and fibrosis (with muscular dystrophies); as well as 7) an increase in muscle mass and strength. The current review presents current data on each of the listed approaches, as well as specific pharmacological agents with a description of their action mechanisms.

Conclusion. Currently, the following pharmacological groups are used or undergoing clinical trials for the treatment of various myopathies types: inotropic, anti-inflammatory and antifibrotic drugs, antimyostatin therapy and the drugs that promote translation through stop codons (applicable for nonsense mutations). In addition, metabolic drugs, metabolic enzyme cofactors, mitochondrial biogenesis stimulators, and antioxidants can be used to treat myopathies. Finally, the recombinant drugs alglucosidase and avaglusosidase have been clinically approved for the replacement therapy of metabolic myopathies (Pompe's disease).

Keywords: hereditary myopathies; Duchenne's muscle dystrophy; metabolic therapy; pharmacological correction

Abbreviations: ETC – electronic transport chain; mRNA – matrix ribonucleic acid; tRNA – transport ribonucleic acid; siRNAs – small interfering ribonucleic acids; NAD, nicotinamide-adenine dinucleotide; FAD – flavin adenine dinucleotide; NADP – nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; ATP – adenosine triphosphate; ADP – adenosine diphosphate; CTGF – connective tissue growth factor; TGFβ – transforming growth factor-beta; NSAIDs – non-steroidal anti-inflammatory drugs; XLMTM – X-linked myotubular myopathy; TCA – tricarboxylic acid cycle; TNF-α – tumor necrosis factor-alpha; CTGF/CCN2 – connective tissue growth factor.

ВВЕДЕНИЕ

Наследственные миопатии представляют собой клинически, гистологически и генетически гетерогенную группу мышечных патологий, которые вызваны атрофией и дегенерацией поперечнополосатых мышц вследствие мутаций в генах, роль которых тесно связана с функционированием миоцитов. Чаще всего белки, кодируемые этими генами, участвуют в образовании или поддержании структурной

целостности цитоскелета и плазматической мембраны. При этом миопатии, связанные с патологией белков цитоскелета, характеризуются прогрессирующим течением (мышечные дистрофии), а миопатии, вызванные потерей функции мембранных белков, проявляются в полной мере уже с рождения (врожденные миопатии). Кроме того, наследственные миопатии могут быть вызваны мутациями в генах, связанных с работой митохондрий (митохондриальные миопатии), или

генами, кодирующими ферменты внутриклеточного обмена веществ (метаболические миопатии) [1].

Первоначально, классификации наследственных миопатий были основаны на клинической картине или типичных гистологических признаках, обнаруживаемых в биоптатах мышечной ткани. Однако, согласно современным рекомендациям, диагноз миопатии должен сопровождаться данными молекулярно-генетических исследований. Помимо прецизионной диагностики, подобный подход приводит к расширению списка генетических коррелятов нозологической группы [2].

ЦЕЛЬ. Проанализировать доступные терапевтические опции для конвенциональной терапии наследственных миопатий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

При поиске материала для написания обзорной статьи использовали такие реферативные базы данных, как PubMed и Google Scholar. Поиск осуществлялся по публикациям за период с 1980 г. по сентябрь 2022 г. Параметрами для отбора литературы были выбраны следующие слова и их сочетания: “myopathy”, “Duchenne”, “myodystrophy”, “metabolic”, “mitochondrial”, “congenital”, “symptoms”, “replacement”, “recombinant”, “corticosteroids”, “vitamins”, “tirasemtiv”, “therapy”, “treatment”, “evidence”, “clinical trials”, “patients”, “dichloracetate”.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Общая характеристика наследственных миопатий

Наиболее типичными симптомами миопатий являются мышечная слабость, миалгии, миопения, непереносимость физической нагрузки. Клиническая картина миопатий может варьировать от бессимптомных форм с повышением сывороточных значений креатинкиназы и увеличением склонности к гипертермии до тяжелых форм, приводящих к скелетным деформациям, а также дыхательной и сердечной недостаточности. Группы пораженных мышц могут значительно отличаться: от изолированного поражения глазодвигательных мышц [3] до системной мышечной атрофии с вовлечением миокарда и диафрагмы. Вариабельность клинических признаков связана как с разнообразием каузативных генов, так и со степенью утраты их функции. Например, тяжелый мышечный фенотип при болезни Дюшенна ассоциирован с психоневрологическими нарушениями [4], а мышечные симптомы при дефиците фосфофруктокиназы (болезнь Таруи) сопровождаются гемолитической анемией и гиперурикемией [5]. Особенно высокой клинической гетерогенностью характеризуются митохондриальные миопатии [6]. Поскольку митохондриальная дисфункция зачастую сопровождается мультисистемными нарушениями, в

патологический процесс могут вовлекаться нервная, пищеварительная, мочевыделительная, сердечно-сосудистая, эндокринная и репродуктивная системы, а также органы зрения и слуха (табл. 1).

1.1. Мышечные дистрофии

Идентифицировано более 30 мышечных дистрофий, самыми распространенными из которых являются дистрофия Дюшенна, плечелопаточно-лицевая дистрофия, дистрофия Беккера, пояснично-конечностная и миотоническая дистрофия. Этиологически эти заболевания весьма гетерогенны. Например, дистрофия Дюшенна и дистрофия Беккера вызваны мутациями дистрофина, в то время как пояснично-конечностные мышечные дистрофии могут быть вызваны нарушением функции кальпаина, дисферлина, саркогликана, ламина, аноктамина и др. [7]. Во всех случаях обычно обнаруживаются ранние признаки дегенерации, а затем регенерации некоторых мышечных волокон. Те волокна, которые регенерируют, становятся больше, чем обычно, и, в конечном итоге, мышцы практически полностью заменяются фиброзной рубцовой тканью и жиром.

Наиболее классический тип таких мышечных нарушений – дистрофия Дюшенна. Она вызвана мутациями со сдвигом рамки считывания в гене MDD, кодирующем белок дистрофин, который является плазмалемма-ассоциированным белком, играющим критическую роль в стабилизации сарколеммы при механических сдвигах во время сокращения или растяжения мышц [8, 9]. Отсутствие дистрофина приводит к снижению резистентности сарколеммы и последующему некрозу мышечных волокон [10]. Разрушение мышечных волокон усугубляется механическим стрессом и улучшается при иммобилизации мышц [11, 12]. Таким образом, накопление поврежденных мышечных волокон является причиной прогрессирующего течения миодистрофии Дюшенна. При этом точные молекулярные механизмы, с помощью которых дистрофин играет роль механического стабилизатора, все еще неясны [13].

1.2. Врожденные миопатии

В отличие от мышечных дистрофий, врожденные миопатии манифестируют уже в неонатальном периоде [14]. Это связано с тем, что функция дефектных белков связана не с поддержанием целостности уже дифференцированных миоцитов, а со структурной организацией мышечной ткани еще на этапе гистогенеза. В основном это белки, задействованные в формировании цитоскелета или межклеточного вещества. В то же время это могут быть такие многофункциональные белки как миотубуларин, который участвует в переносе эндосом, сопряжении возбуждения и сокращения, организации промежуточных филаментов и апоптозе.

Несмотря на то, что точная эпидемиология врожденных миопатий неизвестна, по оценкам исследователей их частота составляет около 1:25000 [15]. Классификация врожденной миопатии постоянно пересматривается по мере того, как идентифицируется все больше генов, связанных с ее различными фенотипическими и гистологическими проявлениями. На данный момент она продолжает основываться главным образом на особенностях, наблюдаемых при биопсии мышц [16]. В соответствии с этим, врожденную миопатию можно разделить на следующие пять форм: немалиновая миопатия; сердечная миопатия; центронуклеарная миопатия; врожденная миопатия диспропорции типа волокон; миопатия накопления миозина.

Клинически врожденные миопатии проявляются мышечной гипотонией и слабостью, присутствующими при рождении или появляющимися в младенчестве и не прогрессирующими в течение жизни. В зависимости от причинного гена и характера мутации, клинический спектр варьирует от тяжелых неонатальных форм с врожденным артрогрипозом до легких форм с изолированной гипостенией [14, 16]. В неонатальном периоде симптомы, как правило, более выражены и могут заключаться в уменьшении движений плода и последующем развитии артрогрипоза и косолапости. Тяжелая мышечная гипотония часто присутствует при рождении и в первые месяцы жизни (признак вялого ребенка) вместе с лягушачьей позой, затруднением сосания и дыхательной недостаточностью [17].

1.3. Метаболические миопатии

Метаболические миопатии связаны с мутациями генов, кодирующих ферменты энергетического обмена. Биохимические нарушения включают нарушения окисления жирных кислот, глюкозы или гликогена. В результате функциональные резервы мышечной ткани снижаются, что проявляется гипотонией, повышенной утомляемостью, миалгией, судорогами, эпизодами рабдомиолиза и т.д. [18]. При этом для дефектов утилизации жирных кислот характерна низкая толерантность к длительным упражнениям на выносливость, в то время как нарушения обмена глюкозы и гликогена проявляются непереносимостью быстрых высокоинтенсивных нагрузок [19]. Также отдельным признаком миопатий, связанных с мутациями гликогенолитических ферментов, является накопление внутриклеточных включений гликогена [20].

1.4. Митохондриальные миопатии

Патогенетическим базисом митохондриальных миопатий является нарушение процессов энергетического обмена вследствие дефектов окислительного фосфорилирования. В этой связи некоторые авторы рассматривают

митохондриальные миопатии как подтип метаболических. Тем не менее ряд особенностей наследования и патогенеза, а также некоторые клинические признаки позволяют выделить их в отдельную группу. Так, митохондриальные миопатии всегда связаны с нарушением функционирования электронно-транспортной цепи (ЭТЦ), причем чаще всего с дефектами работы комплекса 1 [21–23]. Кроме того, митохондриальные миопатии могут быть вызваны мутациями как ядерных, так и митохондриальных генов. В случае мутаций митохондриальной ДНК наследование происходит почти исключительно только по материнской линии [24]. Степень выраженности симптомов определяется не только патогенностью мутации, но и количеством копий мутантной митохондриальной ДНК, которые организм унаследовал от матери [25]. Дело в том, что митохондриальный геном гетерогенен (феномен гетероплазии) и наряду с мутантными в клетке всегда присутствуют здоровые митохондрии. Таким образом, доля дефектных митохондрий определяется случайным образом при случайном распределении митохондрий между дочерними клетками, что получило название феномен «бутылочного горлышка» [26].

В общих терминах митохондриальные миопатии – это митохондриальные заболевания, в спектре клинических манифестаций которых присутствуют выраженные симптомы со стороны мышечной ткани. Митохондриальные миопатии характеризуются прогрессирующим течением и широким спектром сопутствующих симптомов, включая эпилепсию, нейропатию, сенсорные нарушения и др. [27].

2. Лечение наследственных миопатий

Лечение наследственных миопатий широко варьирует в зависимости от типа и конкретного заболевания. Значительную долю терапевтических вмешательств при лечении пациентов с миопатиями занимают подходы, основанные на диете, лечебной физкультуре и массаже. Например, при метаболических миопатиях, связанных с нарушением утилизации глюкозы, важнейшим терапевтическим подходом является кетогенная диета с ограничением поступления углеводов [53]. При коррекции врожденных миопатий пациентам рекомендованы контролируемые физические нагрузки, а также использование специальных корсетов для предотвращения развития костных деформаций.

Фармакологические подходы занимают важное место как в симптоматической и поддерживающей, так и в патогенетически-ориентированной терапии. Кроме того, высокие темпы развития анτισмысловых и генной терапии позволяют в последнее время акцентировать внимание на этиотропных подходах в лечении пациентов с миопатиями.

Таблица 1 – Общая клиническая характеристика наследственных миопатий

Группа врожденных миопатий	Примеры заболеваний	Клинические проявления	Белки с нарушенной функцией	Патогенез
Мышечные дистрофии	Миопатия Миоши	Слабость дистальных скелетных мышц Повышение уровня креатинкиназы крови Первые симптомы возникают в подростковом возрасте [28, 29]	Дисферлин [30]	Дисферлин является линкерным мембрана-ассоциированным белком, функция которого заключается в опосредовании кальций-зависимой регенерации механических повреждений сарколеммы. При мутациях, нарушающих функцию дисферлина, происходит накопление повреждений сарколеммы, что ведет к прогрессирующей дистрофии скелетных мышц [31].
	Поясно-конечностная мышечная дистрофия типа 2В (LGMD2B)	Слабость проксимальных скелетных мышц Повышение уровня креатинкиназы крови Манифестация в возрасте от 10 до 30 лет [32, 33]		
	Миодистрофия Дюшенна	Мышечная гипотония Сердечная недостаточность Затруднение дыхания Дебют в раннем постнатальном или постнатальном возрасте Смерть в возрасте до 20 лет [34, 35]	Дистрофин [36]	Дистрофин участвует в механической стабилизации сарколеммы. В случае утраты белкового продукта дисферлина вследствие крупных делеций или сдвига рамки считывания, сарколемма становится уязвимой к механическим деформациям, возникающим при сокращении или растяжении мышц [37] Поскольку дистрофин играет важную роль в процессах митотического деления, при болезни Дюшенна нарушается клеточная полярность и миогенная дифференцировка стволовых клеток. Стволовые клетки, лишенные функционального дистрофина, подвергаются aberrantному асимметричному делению с амплификацией centrosom, ошибками ориентации веретена и удлинением клеточным циклом [38, 39].
Врожденные миопатии	Миопатия накопления миозина	Мышечная гипотония Гипертрофическая или дилатационная кардиомиопатия Манифестация в неонатальном или постнатальном периоде	MYH7 (Тяжелая цепь медленного/ β -кардиального миозина)	MYH7 является основной изоформой миозина в медленных окислительных мышечных волокнах 1 типа скелетных мышц и миокарда. Многочисленные миссенс-мутации в глобулярной головке MYH7 приводят к нарушению структурной функции белка и образованию крупных включений, состоящих из цепей миозина.
	Мышечная дистрофия Бетлема	Слабость проксимальных мышц Контрактура суставов Гипотония прогрессирует медленно, и более двух третей больных старше 50 лет продолжают передвигаться самостоятельно Возможно поражение дыхательных мышц [40]	Коллаген VI типа	Коллаген VI представляет собой белок внеклеточного матрикса, образующий микрофибрилярную сеть. Белок состоит из трех разных α -цепей, кодируемых отдельными генами, названными COL6A1, COL6A2 и COL6A3 у человека. Потенциальные эффекты на мышцы включают прогрессирующие дистрофические изменения, фиброз и признаки повышенного апоптоза [41].
Метаболические миопатии	Болезнь Помпе	Мышечная гипотония Гепатомегалия Сердечная недостаточность Неврологические нарушения Дебют в любом возрасте (раннее начало коррелирует с более тяжелым течением) [42]	Кислая мальтаза [43]	После попадания в лизосомы посредством взаимодействия с маннозо-6-фосфатным рецептором кислая мальтаза опосредует каталитическое расщепление гликогена [44]. Обнаружено более, чем 500 мутаций, включая инсерции, делеции, мутации сайтов сплайсинга, нонсенс- и миссенс-мутации, которые нарушают функциональную активность кислой мальтазы, приводя к гликогенозу и энергетическому дефициту мышечной ткани [45, 46].
	Болезнь Таруи	Мышечная слабость Мышечные судороги Энцефалопатия Гемолитическая анемия Риск рабдомиолиза Дебют в любом возрасте [47]	Фосфофруктокиназа [48]	Фосфофруктокиназа катализируют перенос фосфатной группы от АТФ к фруктозо-6-фосфату, что является одним из ключевых элементов гликолиза. У человека идентифицированы три изофермента, названные М (мышцы), L (печень) и Р (тромбоциты). Мутации в фосфофруктокиназе-М приводят к мышечной слабости из-за энергетического дефицита в работающих мышцах [49].
Митохондриальные миопатии	Миоклонус-эпилепсия с миопатией и сенсорной атаксией (MEMSA)	Проксимальная и/или дистальная миопатия Мышечная гипотония Миоклоническая эпилепсия Энцефалопатия Сенсорная атаксия Дебют в любом возрасте [50]	Полимераза гамма (POLG) [51]	Полимераза гамма является ключевым ферментом репликации митохондриальной ДНК. Мутации в гене POLG приводят к возникновению энергетического дефицита за счет накопления дефектных митохондрий и уменьшения количества копий мтДНК (истощение мтДНК), особенно в клетках мышц, головного мозга или печени [52].

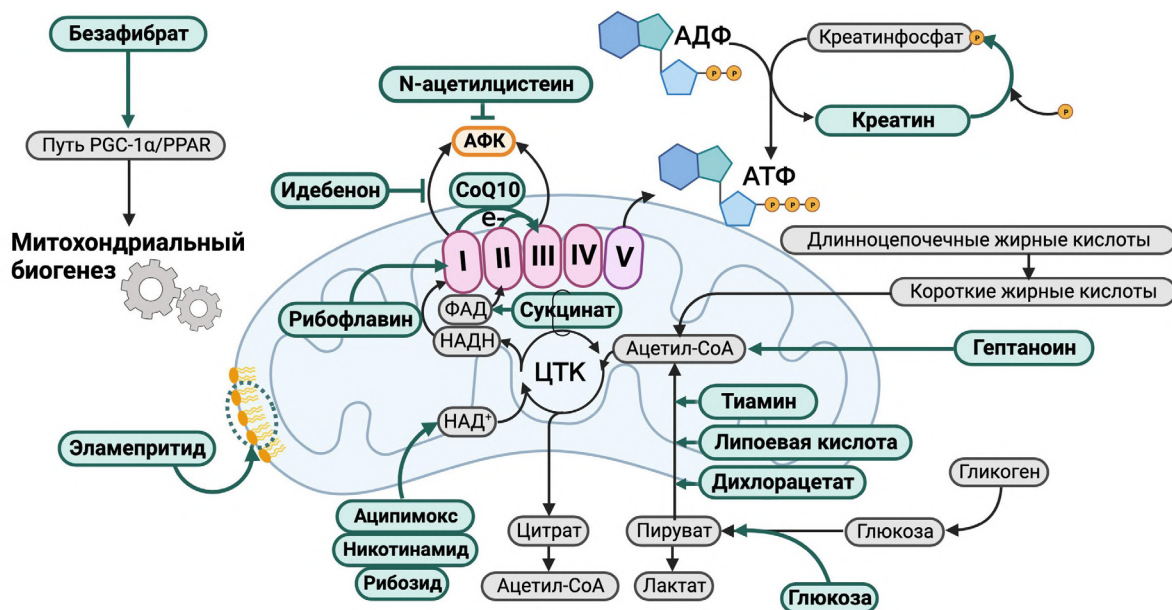


Рисунок 1 – Классические фармакологические методы компенсации неадекватного функционирования митохондрий

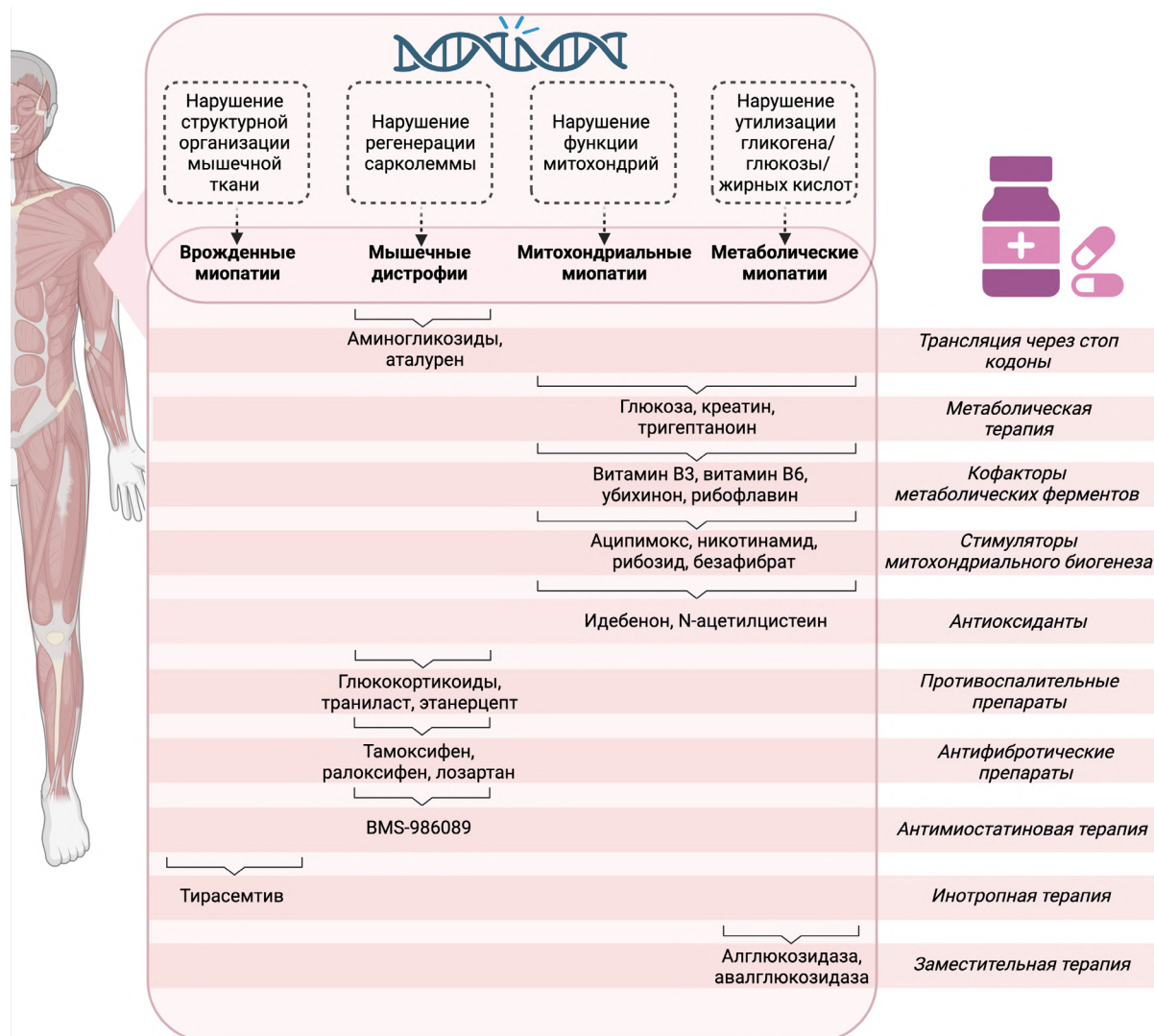


Рисунок 2 – Варьирование существующих фармакологических методов коррекции наследственных миопатий в зависимости от типа заболевания

Как и для большинства моногенных заболеваний, связанных с потерей функции гена, конвенциональная специфическая терапия может быть направлена на: 1) замещение мутантного белка; 2) увеличение его экспрессии; 3) стимуляцию экспрессии внутренних компенсаторных путей; 4) восстановление баланса соединений, связанных с функцией мутантного белка (для ферментов).

2.1. Замещение мутантного белка

В настоящее время ряд рекомбинантных ферментов был одобрен для специфической терапии миопатий. Один из одобренных подходов – ферментозаместительная терапия гликогеназа типа II (болезнь Помпе) рекомбинантной человеческой алглукозидазой альфа (rhGAA; Myozyme® (ex-US) и Lumizyme® (США), которая доступна с 2006 года или авалглукозидазой альфа (NEXVIAZYME™; avalglucosidase alfa-ngpt) доступной с 2021 года [54, 55].

Очевидно, что заместительная терапия рекомбинантными формами белков не является основной стратегией, поскольку большинство экзогенных белков не могут проникнуть внутриклеточно для осуществления своих функций. Тем не менее, подходы к прямой модификации белков и пептидов для улучшения цитозольной транслокации продолжают оставаться многообещающим методом повышения эффективности доставки и расширения жизнеспособности внутриклеточных белковых терапевтических средств. Среди подходов к улучшению цитозольной доставки экзогенных белков были предложены такие, как химическая перезарядка или включение мотивов внутриклеточной интернализации [56]. Например, ферментозаместительная терапия модифицированным рекомбинантным белком была предложена для лечения X-сцепленной миотубулярной миопатии. В доклиническом исследовании на мышах Mtm1 δ4 с нокаутом гена миотубуларина, заместительная терапия рекомбинантным белком 3E10Fv-MTM1 (0,1 мг/кг) в переднюю большеберцовую мышцу два раза в неделю значительно улучшала мышечные функции [57].

2.2. Увеличение экспрессии

Некоторые нуклеотидные замены, получившие название нонсенс-мутации, приводят к образованию стоп-кодона в кодирующем участке гена, в результате чего происходит преждевременная терминация синтеза нужного белка. Кроме того, мРНК, образующаяся в результате нонсенс-мутаций, стабилизируется нонсенс-опосредованным распадом [58]. Подобные мутации достаточно часто являются причиной наследственных миопатий. Такие мутации обнаруживаются примерно у 10% пациентов с миодистрофией Дюшенна [59] и у 20% лиц с X-сцепленной миотубулярной миопатией (XLMTM) [60].

Для восстановления экспрессии полной аминокислотной последовательности были предложены препараты, форсирующие считывание терминирующих кодонов [61]. Например, аминогликозиды, содержащие 2-дезоксистрептаминовое кольцо, связываются с малой рибосомальной субъединицей РНК, снижая точность трансляции [62]. Это свойство позволило предложить использование аминогликозидов для терапии миодистрофии Дюшенна [63] и ряда других моногенных заболеваний, вызванных мутациями преждевременного стоп-кодона [64, 65].

Однако серьезные побочные эффекты аминогликозидов, такие как нефро- и ототоксичность, ограничивают возможность их длительного применения. В этой связи были предложены альтернативные средства, включая супрессорные тРНК и малые интерферирующие РНК (миРНК) [66] и аталурен [67]. При этом в настоящее время только аталурен одобрен для клинического использования [68].

Теоретически подход форсирования терминации может помочь в лечении всех наследственных миопатий, связанных с преждевременными стоп-кодонами. Восстановление трансляции не всегда приводит к образованию функционального белка, что, по всей видимости, связано с нарушением внутриклеточного трафика и посттрансляционных модификаций продукта [69]. На сегодняшний день стратегия форсирования терминации одобрена для применения только при нонсенс-мутациях, вызывающих миодистрофию Дюшенна. Кроме того, несмотря на высокую долю нонсенс мутаций при миопатиях, их гетерогенность и низкая распространенность каждого конкретного заболевания в общей популяции затрудняют проведение полноценных клинических исследований [57].

2.3. Стимуляция экспрессии внутренних компенсаторных путей

В ряде случаев снижение или отсутствие экспрессии белка может быть частично компенсировано за счет гиперактивации внутренних путей, способных функционально смягчить дефект. Например, выраженность мышечной патологии при дефектах дистрофина может быть снижена за счет миогенной стимуляции, приводящей к увеличению экспрессии структурных белков миоцитов. Неклинические исследования демонстрируют, что ингибиторы гистоновых деацетилаз оказывают выраженный терапевтический эффект при некоторых миопатиях. По всей видимости, за счет регулирующей активности в отношении эпигенетических модификаций подобные соединения увеличивают активность миогенной дифференцировки предшественников миоцитов. В исследованиях *in vitro* было обнаружено, что ингибиторы гистоновых деацетилаз усиливают миогенез и образование скелетных мышечных

трубок увеличенного размера [70, 71]. При введении мышам с дистрофией препараты оказывали аналогичные положительные эффекты. У мышей mdx ингибиторы увеличивали площадь поперечного сечения миофибрилл, уменьшая гистологические признаки воспаления и ремоделирования [72]. Интересно, что среди соединений с ингибирующей активностью в отношении гистоновых деацетилаз можно выделить такие широко известные препараты, как трихостатин А и вальпроевая кислота. При этом методами вычислительной биологии было показано, что трихостатин А обладает способностью ослаблять посттранскрипционную репрессию утروفина, который имеет значительное сходство последовательности и функциональных мотивов с дистрофином, включая способность связывать тот же самый дистрофин-ассоциированный гликопротеиновый комплекс [73, 74]. Утрофин экспрессируется на высоких уровнях в тканях плода и подавляется в ходе развития у взрослых. Было обнаружено, что у мышей запрограммированное в эмбриогенезе снижение уровня утروفина соответствует началу некроза мышц [75]. При этом геннотерапевтические подходы, направленные на доставку утروفина значительно улучшают состояние мышечной ткани с миодистрофией Дюшенна [76]. В настоящее время трихостатин А проходит клинические испытания как средство для лечения миодистрофии Дюшенна. При этом специфический модулятор утروفина эзутромида/SMT C1100 продемонстрировал неудовлетворительные результаты в клинических испытаниях фазы II и был отозван [77]. В настоящее время поиски оптимального кандидата для повышения экспрессии утروفина продолжаются [78].

2.4. Восстановление баланса соединений, связанных с функцией мутантного белка

В некоторых случаях, помимо восстановления дефицита самого белка, может быть использована стратегия доставки соединений, связанных с его каталитической функцией (Рис. 1). Очевидно, что подобный подход может быть реализован только при метаболических и митохондриальных миопатиях, где причиной заболевания является выключение функции фермента метаболического обмена, а не структурного белка или киназы. Основной принцип данного подхода базируется на том, что применение экзогенного метаболита компенсирует его эндогенный дефицит, восстанавливая эффективность всей биохимической цепи. Например, с 1960-х годов известно, что внутривенное введение глюкозы улучшает толерантность к физической нагрузке у пациентов с болезнью Мак-Ардла, связанной с дефектом превращения гликогена в глюкозу [79]. Глюкозотерапия также эффективна при некоторых других заболеваниях, связанных с мутациями проксимальных ферментов катаболизма

гликогена [80–82]. Другой пример – применение тригептаноина, синтетического триглицерида средней длины, который восстанавливает энергоэффективность окисления длинноцепочечных жирных кислот при мутациях проксимальных ферментов катаболизма [83]. Тригептаноин продемонстрировал значительное улучшение сердечных и мышечных симптомов у пациентов с синдромом VLCAD и у пациентов с дефицитом карнитинпальмитоилтрансферазы 2 [84, 85]. В ряде случаев, эффективной стратегией также является увеличение концентрации соединений, служащих субстратами шунтирующего или альтернативного биохимического каскада. Таким образом, например, при дефекте образования АТФ по пути окисления жирных кислот, увеличение концентрации глюкозы может компенсировать суммарный энергетический дефицит за счет гликолиза [86]. Подобный эффект может быть достигнут при применении креатина. Креатин представляет собой аминокислоту скелетных мышц, которая служит субстратом для образования креатинфосфата, донора фосфатной группы для превращения АДФ в АТФ ферментом креатинкиназой. В ряде исследований, введение экзогенного креатина показало терапевтический эффект в отношении мышечных симптомов при метаболических миопатиях [62, 63].

2.5. Митотропные препараты

Для частичной компенсации нарушений, вызванных дисфункцией одного из метаболических путей, могут быть использованы различные кофакторы, включая рибофлавин, коэнзим Q10, витамины B6 и B3 (Рис. 1). Данные препараты могут частично увеличивать энергоэффективность клеток за счет положительного влияния на окислительное фосфорилирование в митохондриях [88]. Известно, что витамин B3 (никотиновая кислота) служит субстратом для образования НАД и НАДФ, способствуя тем самым переносу водорода из цикла трикарбоновых кислот на комплекс I. Коэнзим Q10 (убихинон), в свою очередь, напрямую принимает участие в переносе электронов с НАДН-дегидрогеназного комплекса (комплекс I) и сукцинатдегидрогеназного комплекса (II) на комплекс III.

Применение кофакторов является одной из главных терапевтических опций при митохондриальных миопатиях. Однако ввиду отсутствия полноценных клинических исследований невозможно судить об эффективности данного подхода в терминах доказательной медицины. Более того, подавляющее большинство этих соединений зарегистрированы как пищевые добавки [89]. Очевидно, что подходы, основанные на применении кофакторов, не оказывают драматически выраженного клинического эффекта ввиду слабого митохондриального транспорта, неселективности

действия и слабого перекрытия с патогенетическими механизмами заболевания [90, 91]. Использование коктейлей витаминов и кофакторов более оправдано при уменьшении количества рассматриваемых факторов ввиду их дефицита или дефекта транспорта в те моменты, когда этот подход может быть рассмотрен как заместительная терапия [42, 68, 69].

В целом эффективных с точки зрения доказательной медицины способов восстановления митохондриальной функции при митохондриальных мутациях пока не так много. Помимо кофакторов, митотропные соединения представлены, антиоксидантами, митопротекторами, в т.ч. дихлорацетатом, аргинином, коэнзимом Q10, идебеноном и др. [70, 71]. Фармакологические подходы, направленные на улучшение функции митохондрий, базируются на применении очень широкого спектра препаратов [89, 90, 94]. Некоторые из наиболее востребованных соединений представлены на рисунке 1.

Классические фармакологические методы компенсации неадекватного функционирования митохондрий основаны на усилении активности митохондриальных метаболических каскадов и уменьшении содержания токсических агентов, таких как лактат и активные формы кислорода (АФК). Например, показано, что безафибрат стимулирует митохондриальный биогенез за счет активации пути PGC-1 α /PPAR. Кроме того, аципимокс, никотинамид и рибозид восстанавливают содержание НАД⁺, увеличивая эффективность переноса электронов на ЭТЦ.

Тиамин, липоевая кислота и дихлорацетат активируют пируватдегидрогеназу, что приводит к уменьшению накопления лактата за счет превращения пирувата в другой метаболит ацетил-КоА. Сукцинат, рибофлавин и CoQ10 способствуют передаче электронов ЭТЦ или восстановлению функции комплексов I и II. Некоторые соединения, такие как идебенон, N-ацетилцистеин и липоевая кислота, обладают способностью снижать выработку АФК или инактивировать их. Эламепритид стабилизирует липиды митохондриальной мембраны, предотвращая разрушение митохондрий.

При дефиците некоторых ферментов липидного или углеводного обмена терапевтической эффективностью обладает стратегия восполнения дефицита соединений, стоящих в биохимической цепи после реакции, катализируемой мутантным ферментом. Например, при дефекте утилизации длинноцепочечных жирных кислот оправдано применение гептаноина, более проксимального компонента, включающегося в цикл трикарбоновых кислот (ЦТК). Аналогично при дефектах расщепления гликогена, терапевтический потенциал представляет применение экзогенной глюкозы. Наконец дефекты окислительного фосфорилирования и работы митохондрий могут быть частично компенсированы

за счет применения креатина, выполняющего в мышцах роль альтернативного носителя макроэргической фосфатной связи при образовании креатинфосфата.

2.6. Противовоспалительная терапия

Противовоспалительная терапия является одним из ключевых подходов к лечению мышечных дистрофий [96]. Воспалительные изменения могут сопровождать и другие виды миопатий, но это наблюдается исключительно редко [97].

В настоящее время единственным одобренным подходом, направленным на подавление воспалительного процесса при миодистрофиях, является терапия кортикостероидами. Однако важно подчеркнуть, что, несмотря на прогрессирующую гибель мышечных волокон, противовоспалительная терапия необходима не при всех мышечных дистрофиях. Например, при лечении дефлазакортом пациентов с дисферлинопатиями не только не наблюдалось улучшения, но и была обнаружена тенденция к снижению мышечной силы [98].

В клинических испытаниях было показано, что кортикостероиды улучшают мышечную силу и функцию без клинически серьезных побочных эффектов [99, 100]. Более того, было показано, что глюкокортикоиды увеличивают экспрессию утрофина [101].

Ввиду серьезных побочных эффектов, развивающихся при длительном применении кортикостероидов, продолжается поиск других стратегий противовоспалительной терапии. Например, среди стратегий, опробованных при миодистрофиях можно выделить ингибиторы циклооксигеназы (ЦОГ), ФНО- α и его рецептора, а также TRPV2-каналов.

Нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) продемонстрировали относительно скромную эффективность в мышечной модели дистрофии Дюшенна. Несмотря на то, что применение аспирина и ибупрофена улучшало морфологическую картину мышц и снижало воспалительную инфильтрацию и некроз, процент регенерирующих миофибрилл и изометрическое напряжение не претерпели значимого изменения [102].

Применение противоаллергического препарата траниласт, в спектр фармакологической активности которого входит блокада TRPV2 [103], привело к снижению фиброза в скелетных мышцах и повышению толерантности к нагрузкам [104, 105].

Некоторый потенциал при лечении миодистрофии продемонстрировали ингибиторы фактора некроза опухоли-альфа (ФНО- α). Применение этанерцепта или антитела против ФНО- α замедляли течение заболевания, а также уменьшали воспаление и разрушение дистрофических мышц у мышей mdx без развития выраженных побочных эффектов [106, 107].

2.7. Антифибротические средства

Внеклеточный матрикс является важным компонентом скелетных мышц. Он обеспечивает каркасную структуру, которая удерживает миофибриллы и сосуды. Кроме того он играет основную роль в процессах биомеханического сокращения, а также в поддержании целостности и восстановлении мышечных волокон. Чрезмерное накопление компонентов внеклеточного матрикса, особенно коллагена, определяется как фиброз. Избыточное образование соединительной ткани как следствие гибели и дефекта пролиферации мышечных клеток служит важнейшей отличительной чертой мышечных дистрофий. Поскольку динамика фибротического замещения при миодистрофиях ярко коррелирует с развитием мышечных симптомов, антифибротическая терапия является одним из основных подходов к лечению пациентов [108].

Тамоксифен является пролекарством, некоторые из метаболитов которого взаимодействуют с ядерным рецептором эстрогена, опосредуя антифибротический и миопротективный эффекты. Многоцентровое проспективное исследование с участием 13 амбулаторных мальчиков в возрасте 6–14 лет с генетически подтвержденной миодистрофией Дюшенна продемонстрировало, что у пациентов, получавших лечение тамоксифеном в дозе 20 мг/сут, сохранялись моторная и дыхательная функции, по сравнению со значительным ухудшением у пациентов того же возраста в анамнезе, получавших только кортикостероиды [109].

Схожий подход также продемонстрировал эффективность на мышинной модели дистрогликанопатии. В исследованиях Wu B. и соавт. продемонстрировано, что тамоксифен и ралоксифен значительно облегчают прогрессирование заболевания у животных с мутацией с.1343C>T гена FKRP, демонстрирующих выраженный фенотип пояснично-конечностной мышечной дистрофии [110].

Первичным профибротическим сигналом в скелетных мышцах, как и в других тканях, является трансформирующий фактор роста-бета (TGFβ) [111]. Высокая экспрессия TGFβ является характерным признаком дистрофических мышц [112] и считается одной из основных терапевтических мишеней для снижения фиброза. Было показано, что Wnt-TGFβ2 является одним из ключевых факторов, опосредующих дифференцировку дистрофин-дефицитных предшественников мышечных клеток в фиброгенном направлении. Высокую эффективность продемонстрировали антитела, стабилизирующие LTBP4, который является связывающим фактором TGFβ. Лечение анти-LTBP4 также уменьшило мышечный фиброз и увеличило мышечную силу, в том числе в мышцах диафрагмы [113].

Важную роль в передаче профибротических сигналов играет ренин-ангиотензиновая система. В частности, активация рецептора ангиотензина 1

стимулирует фиброз. При этом было показано, что антигипертензивный препарат с ингибирующей активностью в отношении TGFβ2 лозартан привел к увеличению уровня миогенных факторов со сниженной экспрессией фиброгенных генов у мышей mdx (модель миодистрофии Дюшенна) [112].

Интересно, что другой препарат, блокирующий ренин-ангиотензин-альдостероновую ось, эналаприл, также демонстрирует ингибирующие действие в отношении фактора роста соединительной ткани (CTGF/CCN2) [114] и является еще одним регулятором передачи профибротических сигналов [115, 116]. Было показано, что фармакологическая блокада CTGF замедляет прогрессирование фиброза и улучшает мышечную функцию у мышей mdx [114]. Более того, терапия антителами к мышечному CTGF в настоящее время проходит клинические испытания как средство для лечения миодистрофии Дюшенна [117].

2.8. Средства с положительным влиянием на мышечную силу

Снижение мышечной силы является основным симптомом миопатий. В этой связи, в дополнение к прочим подходам, были разработаны стратегии, направленные на увеличение эффективности мышечного сокращения или предупреждения миопении.

Например, тирасемтив, быстрый активатор скелетного тропонина, действующий на тонкие нити, продемонстрировал свою эффективность в качестве средства, которое увеличивает мышечную силу и может быть применено для компенсации гипотонии при мышечной дисфункции. В исследованиях на генетически-модифицированных мышцах и клетках пациента с немалиновой миопатией, несущих мутацию актина (ACTA1N40Y), лечение тирасемтивом увеличивало инотропные показатели до показателей сравнимых со здоровым контролем [118].

Одной из наиболее популярных мишеней для регулирования мышечной массы является миостатин. Снижение передачи сигналов данного миокина приводит к резкому увеличению мышечной массы вследствие интенсификации роста мышечных волокон [119]. Первый подобный препарат домагрозумаб (PF-06252616, Pfizer), представляющий собой рекомбинантное гуманизованное антитело к миостатину, был отозван во время второй фазы клинических исследований несмотря на то, что в первой фазе был показан 6,1% прирост мышечной массы после лечения в сравнении с группой плацебо [120]. Другой антимиостатиновый препарат BMS-986089 продемонстрировал высокую эффективность в доклинических тест-системах на мышцах и циномольтусовых обезьянах и в настоящее время проходит клинические испытания. Однако в целом, несмотря на теоретическую перспективность подхода и положительные начальные результаты,

последние клинические данные демонстрируют, что антимиостатиновая терапия показывает меньшую эффективность, чем ожидалось. Кроме того, долгосрочные последствия антимиостатиновой терапии требуют особо пристального изучения, ввиду возможного негативного влияния в отношении пула миосателлитных клеток [121].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наследственные миопатии представляют собой группу неизлечимых заболеваний с широким спектром симптомов и высокой вариабельностью клинического течения. В настоящее время разработано и одобрено большое количество терапевтических подходов для применения при разных типах миопатий (Рис. 2). Наиболее разработаны методы коррекции мышечных дистрофий, которые в связи с прогрессирующим характером течения, имеют наибольшее количество патогенетических путей, которые могут являться мишенями для терапии. При этом наименьшее количество терапевтических опций доступно для лечения врожденных миопатий, где наследственный дефект перманентно проявляется в течение жизни и отсутствуют вторичные факторы альтерации, такие как воспаление и фиброз. Кроме того, за исключением некоторых нозологий, отсутствуют эффективные подходы к коррекции метаболических и митохондриальных миопатий.

При лечении всех миопатий, важную роль играет симптоматическая и поддерживающая терапия, направленная на лечение болевого синдрома и симптомов со стороны других органов и систем.

Закономерными последствиями, возникающими при миопатиях гиподинамии, является остеопороз [122] и пневмония, лечение которых осуществляется согласно стандартным схемам.

Стоит отметить, что в последнее время все большую актуальность приобретают геннотерапевтические подходы, исправляющие или компенсирующие дефект на генном уровне. Данные подходы не были освещены в работе, целью которой являлся разбор существующих конвенциональных стратегий. Однако на сегодняшний день именно генная и клеточная терапия составляют наиболее растущий и перспективный пласт фармакологических агентов для лечения наследственных миопатий.

При врожденных миопатиях была показана эффективность тирасемтива, быстрого активатора скелетного тропонина, воздействующего на тонкие нити. Теоретически, данный подход может быть эффективен при других видах миопатий. Для лечения мышечных дистрофий могут быть использованы противовоспалительные и антифибротические препараты, а также антимиостатиновая терапия и стратегия, направленная на трансляцию через стоп-кодона (применима при нонсенс мутациях). Кроме того, для лечения митохондриальных и метаболических миопатий могут быть применены метаболические препараты, кофакторы метаболических ферментов, стимуляторы митохондриального биогенеза и антиоксиданты. Наконец, клинически одобрены рекомбинантные препараты алглюкозидазы и авалглюкозидазы для заместительной терапии метаболических миопатий (болезнь Помпе).

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Минобрнауки Российской Федерации, Соглашение № 075-15-2021-1346.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

М.В. Покровский – создание идеи, планирование концепции статьи, консультирование по вопросам написания отдельных секций рукописи; М.В. Корокин – разработка идеи, написание статьи; А.М. Краюшкина – анализ литературы, написание статьи; Н.С. Жунусов – анализ литературы, написание статьи; К.Н. Лапин – написание статьи, подготовка графического материала; М.О. Солдатова – анализ литературы, написание статьи; Е.А. Кузьмин – анализ литературы, написание статьи; О.С. Гудырев – анализ литературы, написание статьи; И.С. Кочкарова – анализ литературы, написание статьи; А.В. Дейкин – планирование концепции и написание статьи.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Cardamone M., Darras B.T., Ryan M.M. Inherited myopathies and muscular dystrophies // *Semin. Neurol.* – 2008. – Vol. 28, No. 2. – P. 250–259. DOI: 10.1055/s-2008-1062269
2. Butterfield R.J. Congenital Muscular Dystrophy and Congenital Myopathy // *Continuum (Minneapolis Minn).* – 2019. – Vol. 25, No. 6. – P. 1640–1661. DOI: 10.1212/CON.000000000000079
3. Yu Wai Man C.Y., Smith T., Chinnery P.F., Turnbull D.M., Griffiths P.G. Assessment of visual function in chronic progressive external ophthalmoplegia // *Eye (Lond).* – 2006. – Vol. 20, No. 5. – P. 564–568. DOI: 10.1038/sj.eye.6701924
4. Naidoo M., Anthony K. Dystrophin Dp71 and the Neuropathophysiology of Duchenne Muscular Dystrophy // *Mol. Neurobiol.* – 2020. – Vol. 57, No. 3. – P. 1748–1767. DOI: 10.1007/s12035-019-01845-w
5. Toscano A., Musumeci O. Tarui disease and distal glycogenoses: clinical and genetic update // *Acta Myol.* – 2007. – Vol. 26, No. 2. – P. 105–107.
6. Pfeiffer G., Chinnery P.F. Diagnosis and treatment of

- mitochondrial myopathies // *Ann. Med.* – 2013. – Vol. 45, No. 1. – P. 4–16. DOI: 10.3109/07853890.2011.605389
7. Исабекова П.Ш. Алексеева Т.М. Наследственная прогрессирующая поясно-конечностная мышечная дистрофия 2I типа (аноктаминопатия) // *Современные проблемы науки и образования.* – 2020. – № 4. – С. 62. DOI: 10.17513/spno.29974
 8. Ervasti J.M., Campbell K.P. A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin // *J. Cell. Biol.* – 1993. – Vol. 122, No. 4. – P. 809–823. DOI: 10.1083/jcb.122.4.809
 9. Vilquin J.T., Brussee V., Asselin I., Kinoshita I., Gingras M., Tremblay J.P. Evidence of mdx mouse skeletal muscle fragility in vivo by eccentric running exercise // *Muscle Nerve.* – 1998. – Vol. 21, No. 5. – P. 567–576. DOI: 10.1002/(sici)1097-4598(199805)21:5<567::aid-mus2>3.0.co;2-6
 10. Weller B., Karpati G., Carpenter S. Dystrophin-deficient mdx muscle fibers are preferentially vulnerable to necrosis induced by experimental lengthening contractions // *J. Neurol. Sci.* – 1990. – Vol. 100, No. 1–2. – P. 9–13. DOI: 10.1016/0022-510x(90)90005-8
 11. Mizuno Y. Prevention of myonecrosis in mdx mice: Effect of immobilization by the local tetanus method // *Brain and Development.* – 1992. – Vol. 14, Issue 5. – P. 319–322. DOI: 10.1016/S0387-7604(12)80151-3
 12. Mokhtarian A., Lefaucheur J.P., Even P.C., Sebille A. Hindlimb immobilization applied to 21-day-old mdx mice prevents the occurrence of muscle degeneration // *J. Appl. Physiol.* (1985). – 1999. – Vol. 86, No. 3. – P. 924–931. DOI: 10.1152/jappl.1999.86.3.924
 13. Le S., Yu M., Hovan L., Zhao Z., Ervasti J., Yan J. Dystrophin As a Molecular Shock Absorber // *ACS Nano.* – 2018. – Vol. 12, No. 12. – P. 12140–12148. DOI: 10.1021/acsnano.8b05721
 14. North K.N., Wang C.H., Clarke N., Jungbluth H., Vainzof M., Dowling J.J., Amburgey K., Quijano-Roy S., Beggs A.H., Sewry C., Laing N.G., Bönnemann C.G.; International Standard of Care Committee for Congenital Myopathies. Approach to the diagnosis of congenital myopathies // *Neuromuscul. Disord.* – 2014. – Vol. 24, No. 2. – P. 97–116. DOI: 10.1016/j.nmd.2013.11.003
 15. Tubridy N., Fontaine B., Eymard B. Congenital myopathies and congenital muscular dystrophies // *Curr. Opin. Neurol.* – 2001. – Vol. 14, No. 5. – P. 575–582. DOI: 10.1097/00019052-200110000-00005
 16. Jungbluth H., Voermans N.C. Congenital myopathies: not only a paediatric topic // *Curr. Opin. Neurol.* – 2016. – Vol. 29, No. 5. – P. 642–650. DOI: 10.1097/WCO.0000000000000372
 17. Cassandrini D., Trovato R., Rubegni A., Lenzi S., Fiorillo C., Baldacci J., Minetti C., Astrea G., Bruno C., Santorelli F.M.; Italian Network on Congenital Myopathies. Congenital myopathies: clinical phenotypes and new diagnostic tools // *Ital. J. Pediatr.* – 2017. – Vol. 43, No. 1. – Art. ID: 101. DOI: 10.1186/s13052-017-0419-z
 18. Olpin S.E., Murphy E., Kirk R.J., Taylor R.W., Quinlivan R. The investigation and management of metabolic myopathies // *J. Clin. Pathol.* – 2015. – Vol. 68, No. 6. – P. 410–417. DOI: 10.1136/jclinpath-2014-202808
 19. Tein I. Metabolic myopathies // *Semin. Pediatr. Neurol.* – 1996. – Vol. 3, No. 2. – P. 59–98. DOI: 10.1016/S1071-9091(96)80038-6
 20. Tarnopolsky M.A. Metabolic Myopathies // *Continuum (Minneapolis, Minn.)*. – 2016. – Vol. 22, No. 6. – P. 1829–1851. DOI: 10.1212/CON.0000000000000403
 21. Kirby D.M., Crawford M., Cleary M.A., Dahl H.H., Dennett X., Thorburn D.R. Respiratory chain complex I deficiency: an underdiagnosed energy generation disorder // *Neurology.* – 1999. – Vol. 52, No. 6. – P. 1255–1264. DOI: 10.1212/wnl.52.6.1255
 22. Fassone E., Rahman S. Complex I deficiency: clinical features, biochemistry and molecular genetics // *J. Med. Genet.* – 2012. – Vol. 49, No. 9. – P. 578–590. DOI: 10.1136/jmedgenet-2012-101159. Erratum in: *J. Med. Genet.* – 2012. – Vol. 49, No. 10. – Art. ID: 668.
 23. Abramov A.Y., Angelova P.R. Cellular mechanisms of complex I-associated pathology // *Biochem. Soc. Trans.* – 2019. – Vol. 47, No. 6. – P. 1963–1969. DOI: 10.1042/BST20191042
 24. Chiaratti M.R., Macabelli C.H., Augusto Neto J.D., Grejo M.P., Pandey A.K., Perecin F., Collado M.D. Maternal transmission of mitochondrial diseases // *Genet. Mol. Biol.* – 2020. – Vol. 43, No. 1. – e20190095. DOI: 10.1590/1678-4685-GMB-2019-0095
 25. van den Amele J., Li A.Y.Z., Ma H., Chinnery P.F. Mitochondrial heteroplasmy beyond the oocyte bottleneck // *Semin. Cell. Dev. Biol.* – 2020. – Vol. 97. – P. 156–166. DOI: 10.1016/j.semcdb.2019.10.001
 26. Floros V.I., Pyle A., Dietmann S., Wei W., Tang W.C.W., Irie N., Payne B., Capalbo A., Noli L., Coxhead J., Hudson G., Crosier M., Strahl H., Khalaf Y., Saitou M., Ilic D., Surani M.A., Chinnery P.F. Segregation of mitochondrial DNA heteroplasmy through a developmental genetic bottleneck in human embryos // *Nat. Cell. Biol.* – 2018. – Vol. 20, No. 2. – P. 144–151. DOI: 10.1038/s41556-017-0017-8
 27. Ahmed S.T., Craven L., Russell O.M., Turnbull D.M., Vincent A.E. Diagnosis and Treatment of Mitochondrial Myopathies // *Neurotherapeutics.* – 2018. – Vol. 15, No. 4. – P. 943–953. DOI: 10.1007/s13311-018-00674-4
 28. Miyoshi K., Kawai H., Iwasa M., Kusaka K., Nishino H. Autosomal recessive distal muscular dystrophy as a new type of progressive muscular dystrophy. Seventeen cases in eight families including an autopsied case // *Brain.* – 1986. – Vol. 109, Part 1. – P. 31–54. DOI: 10.1093/brain/109.1.31
 29. Bushby K., Straub V. One gene, one or many diseases? Simplifying dysferlinopathy // *Neurology.* – 2010. – Vol. 75, No. 4. – P. 298–299. DOI: 10.1212/WNL.0b013e3181e1649
 30. Nguyen K., Bassez G., Bernard R., Krahn M., Labelle V., Figarella-Branger D., Pouget J., Hammouda el H., Bérout C., Urtizberea A., Eymard B., Leturcq F., Lévy N. Dysferlin mutations in LGMD2B, Miyoshi myopathy, and atypical dysferlinopathies // *Hum. Mutat.* – 2005. – Vol. 26, No. 2. – Art. ID: 165. DOI: 10.1002/humu.9355
 31. Le Rumeur E., Winder S.J., Hubert J.F. Dystrophin: more than just the sum of its parts // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2010. – Vol. 1804, No. 9. – P. 1713–1722. DOI: 10.1016/j.bbapap.2010.05.001
 32. Liu J., Aoki M., Illa I., Wu C., Fardeau M., Angelini C., Serrano C., Urtizberea J.A., Hentati F., Hamida M.B., Bohlega S., Culper E.J., Amato A.A., Bossie K., Oeltjen J., Bejaoui K., McKenna-Yasek D., Hosler B.A., Schurr E., Arahata K., de Jong P.J., Brown R.H. Jr. Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy // *Nat. Genet.* – 1998. – Vol. 20, No. 1. – P. 31–36. DOI: 10.1038/1682
 33. Harris E., Bladen C.L., Mayhew A., James M., Bettinson K., Moore U., Smith F.E., Rufibach L., Cnaan A., Bharucha-Goebel D.X., Blamire A.M., Bravver E., Carlier P.G., Day J.W., Díaz-Manera J., Eagle M., Grieben U., Harms M., Jones K.J., Lochmüller H., Mendell J.R., Mori-Yoshimura M., Paradas C., Pegoraro E., Pestronk A., Salort-Campana E., Schreiber-Katz O., Semplicini C., Spuler S., Stojkovic T., Straub V., Takeda S., Rocha C.T., Walter M.C., Bushby K.;

- Jain COS Consortium. The Clinical Outcome Study for dysferlinopathy: An international multicenter study // *Neurol. Genet.* – 2016. – Vol. 2, No. 4. – e89. DOI: 10.1212/NXG.0000000000000089
34. Yiu E.M., Kornberg A.J. Duchenne muscular dystrophy // *Neurol. India.* – 2008. – Vol. 56. – P. 236–247. DOI: 10.4103/0028-3886.43441
35. Yiu E.M., Kornberg A.J. Duchenne muscular dystrophy // *J. Paediatr. Child. Health.* – 2015. – Vol. 51, No. 8. – P. 759–764. DOI: 10.1111/jpc.12868
36. Flanigan K.M. Duchenne and Becker muscular dystrophies // *Neurol. Clin.* – 2014. – Vol. 32, No. 3. – P. 671–688. DOI: 10.1016/j.ncl.2014.05.002
37. Muntoni F., Torelli S., Ferlini A. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes // *Lancet Neurol.* – 2003. – Vol. 2, No. 12. – P. 731–740. DOI: 10.1016/s1474-4422(03)00585-4
38. Chang N.C., Chevalier F.P., Rudnicki M.A. Satellite Cells in Muscular Dystrophy – Lost in Polarity // *Trends Mol. Med.* – 2016. – Vol. 22, No. 6. – P. 479–496. DOI: 10.1016/j.molmed.2016.04.002
39. Dumont N.A., Wang Y.X., von Maltzahn J., Pasut A., Bentzinger C.F., Brun C.E., Rudnicki M.A. Dystrophin expression in muscle stem cells regulates their polarity and asymmetric division // *Nat. Med.* – 2015. – Vol. 21, No. 12. – P. 1455–1463. DOI: 10.1038/nm.3990
40. Bönnemann C.G. The collagen VI-related myopathies Ullrich congenital muscular dystrophy and Bethlem myopathy // *Handb. Clin. Neurol.* – 2011. – Vol. 101. – P. 81–96. DOI: 10.1016/B978-0-08-045031-5.00005-0
41. Bönnemann C.G. The collagen VI-related myopathies: muscle meets its matrix // *Nat. Rev. Neurol.* – 2011. – Vol. 7, No. 7. – P. 379–390. DOI: 10.1038/nrneurol.2011.81.
42. Katzin L.W., Amato A.A. Pompe disease: a review of the current diagnosis and treatment recommendations in the era of enzyme replacement therapy // *J. Clin. Neuromuscul. Dis.* – 2008. – Vol. 9, No. 4. – P. 421–431. DOI: 10.1097/CND.0b013e318176dbe4
43. Taverna S., Cammarata G., Colomba P., Sciarrino S., Zizzo C., Francofonte D., Zora M., Scalia S., Brando C., Curto A.L., Marsana E.M., Olivieri R., Vitale S., Duro G. Pompe disease: pathogenesis, molecular genetics and diagnosis // *Aging (Albany NY).* – 2020. – Vol. 12, No. 15. – P. 15856–15874. DOI: 10.18632/aging.103794
44. Ghosh P., Dahms N.M., Kornfeld S. Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* – 2003. – Vol. 4, No. 3. – P. 202–212. DOI: 10.1038/nrm1050
45. Kohler L., Puertollano R., Raben N. Pompe Disease: From Basic Science to Therapy // *Neurotherapeutics.* – 2018. – Vol. 15, No. 4. – P. 928–942. DOI: 10.1007/s13311-018-0655-y
46. Peruzzo P., Pavan E., Dardis A. Molecular genetics of Pompe disease: a comprehensive overview // *Ann. Transl. Med.* – 2019. – Vol. 7, No. 13. – Art. ID: 278. DOI: 10.21037/atm.2019.04.13
47. Tarlow M.J., Ellis D.A., Pearce G.W., Anderson M. Muscle phosphofructokinase deficiency (Tarui's disease) // *Proc. Nutr. Soc.* – 1979. – Vol. 38, No. 3. – Art. ID: 110A.
48. Vorgerd M., Zange J., Kley R., Grehl T., Hüsing A., Jäger M., Müller K., Schröder R., Mortier W., Fabian K., Malin J.P., Luttmann A. Effect of high-dose creatine therapy on symptoms of exercise intolerance in McArdle disease: double-blind, placebo-controlled crossover study // *Arch. Neurol.* – 2002. – Vol. 59, No. 1. – P. 97–101. DOI: 10.1001/archneur.59.1.97
49. Yamasaki T., Nakajima H. [Phosphofructokinase (PFK)]. *Nihon Rinsho.* – 2004. – Vol. 62, Suppl. 12. – P. 835–839.
50. Wong L.J., Naviaux R.K., Brunetti-Pierri N., Zhang Q., Schmitt E.S., Truong C., Milone M., Cohen B.H., Wical B., Ganesh J., Basinger A.A., Burton B.K., Swoboda K., Gilbert D.L., Vanderver A., Saneto R.P., Maranda B., Arnold G., Abdenur J.E., Waters P.J., Copeland W.C. Molecular and clinical genetics of mitochondrial diseases due to POLG mutations // *Hum. Mutat.* – 2008. – Vol. 29, No. 9. – P. 150–172. DOI: 10.1002/humu.20824
51. Cohen B.H., Chinnery P.F., Copeland W.C. POLG-Related Disorders / In: Adam M.P., Everman D.B., Mirzaa G.M., et al., editors // *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle. – 1993–2022.
52. Rajakulendran S., Pitceathly R.D., Taanman J.W., Costello H., Sweeney M.G., Woodward C.E., Jaunmuktane Z., Holton J.L., Jacques T.S., Harding B.N., Fratter C., Hanna M.G., Rahman S. A Clinical, Neuropathological and Genetic Study of Homozygous A467T POLG-Related Mitochondrial Disease // *PLoS One.* – 2016. – Vol. 11, No. 1. – e0145500. DOI: 10.1371/journal.pone.0145500
53. Adler M., Shieh P.B. Metabolic Myopathies // *Semin. Neurol.* – 2015. – Vol. 35, No. 4. – P. 385–397. DOI: 10.1055/s-0035-1558973
54. Meena N.K., Raben N. Pompe Disease: New Developments in an Old Lysosomal Storage Disorder // *Biomolecules.* 2020 Sep 18;10(9):1339. DOI: 10.3390/biom10091339.
55. Dhillon S. Avalglucosidase alfa: First Approval // *Drugs.* – 2021. – Vol. 81, No. 15. – P. 1803–1809. DOI: 10.1007/s40265-021-01600-3
56. Horn J.M., Obermeyer A.C. Genetic and Covalent Protein Modification Strategies to Facilitate Intracellular Delivery // *Biomacromolecules.* – 2021. – Vol. 22. – P. 4883–4904. DOI: 10.1021/acs.biomac.1c00745
57. Lawlor M.W., Armstrong D., Viola M.G., Widrick J.J., Meng H., Grange R.W., Childers M.K., Hsu C.P., O'Callaghan M., Pierson C.R., Buj-Bello A., Beggs A.H. Enzyme replacement therapy rescues weakness and improves muscle pathology in mice with X-linked myotubular myopathy. *Hum Mol Genet.* – 2013. T. 22, № 8. C. 1525–1538. DOI: 10.1093/hmg/ddt003
58. Wu R.P., Youngblood D.S., Hassinger J.N., Lovejoy C.E., Nelson M.H., Iversen P.L., Moulton H.M. Cell-penetrating peptides as transporters for morpholino oligomers: effects of amino acid composition on intracellular delivery and cytotoxicity // *Nucleic. Acids Res.* – 2007. – Vol. 35, No. 15. – P. 5182–5191. DOI: 10.1093/nar/gkm478
59. Bladen C.L., Salgado D., Monges S., Foncuberta M.E., Kekou K., Kosma K., Dawkins H., Lamont L., Roy A.J., Chamova T., Guergueltcheva V., Chan S., Korngut L., Campbell C., Dai Y., Wang J., Barišić N., Brabec P., Lahdetie J., Walter M.C., Schreiber-Katz O., Karcagi V., Garami M., Viswanathan V., Bayat F., Buccella F., Kimura E., Koeks Z., van den Bergen J.C., Rodrigues M., Roxburgh R., Lusakowska A., Kostera-Pruszczyk A., Zimowski J., Santos R., Neagu E., Artemieva S., Rasic V.M., Vojinovic D., Posada M., Bloetzer C., Jeannet P.Y., Joncourt F., Díaz-Manera J., Gallardo E., Karaduman A.A., Topaloğlu H., El Sherif R., Stringer A., Shatillo A.V., Martin A.S., Peay H.L., Bellanger M.I., Kirschner J., Flanigan K.M., Straub V., Bushby K., Verschuuren J., Aartsma-Rus A., Bérout C., Lochmüller H. The TREAT-NMD DMD Global Database: analysis of more than 7,000 Duchenne muscular dystrophy mutations // *Hum. Mutat.* – 2015. – Vol. 36, No. 4. – P. 395–402. DOI: 10.1002/humu.22758
60. Laporte J., Biancalana V., Tanner S.M., Kress W., Schneider V., Wallgren-Pettersson C., Herger F., Buj-Bello A., Blondeau F., Liechti-Gallati S., Mandel J.L. MTM1 mutations in X-linked myotubular myopathy // *Hum. Mutat.* – 2000. – Vol. 15, No. 5. – P. 393–409. DOI: 10.1002/(SICI)1098-1004(200005)15:5<393::AID-HUMU1>3.0.CO;2-R

61. Diop D., Chauvin C., Jean-Jean O. Aminoglycosides and other factors promoting stop codon readthrough in human cells // *C.R. Biol.* – 2007. – Vol. 330, No. 1. – P. 71–79. DOI: 10.1016/j.crvi.2006.09.001
62. Schroeder R., Waldsich C., Wank H. Modulation of RNA function by aminoglycoside antibiotics // *EMBO J.* – 2000. – Vol. 19, No. 1. – P. 1–9. DOI: 10.1093/emboj/19.1.1
63. Barton-Davis E.R., Cordier L., Shoturma D.I., Leland S.E., Sweeney H.L. Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice // *J. Clin. Invest.* – 1999. – Vol. 104, No. 4. – P. 375–381. DOI: 10.1172/JCI17866
64. Clancy J.P., Bebök Z., Ruiz F., King C., Jones J., Walker L., Greer H., Hong J., Wing L., Macaluso M., Lyrene R., Sorscher E.J., Bedwell D.M. Evidence that systemic gentamicin suppresses premature stop mutations in patients with cystic fibrosis // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2001. – Vol. 163. – No. 7. – P. 1683–1692. DOI: 10.1164/ajrccm.163.7.2004001
65. Howard M., Frizzell R.A., Bedwell D.M. Aminoglycoside antibiotics restore CFTR function by overcoming premature stop mutations // *Nat. Med.* – 1996. – Vol. 2, No. 4. – P. 467–469. DOI: 10.1038/nm0496-467
66. Carnes J., Jacobson M., Leinwand L., Yarus M. Stop codon suppression via inhibition of eRF1 expression // *RNA.* – 2003. – Vol. 9, No. 6. – P. 648–653. DOI: 10.1261/rna.5280103
67. Welch E.M., Barton E.R., Zhuo J., Tomizawa Y., Friesen W.J., Trifillis P., Paushkin S., Patel M., Trotta C.R., Hwang S., Wilde R.G., Karp G., Takasugi J., Chen G., Jones S., Ren H., Moon Y.C., Corson D., Turpoff A.A., Campbell J.A., Conn M.M., Khan A., Almstead N.G., Hedrick J., Mollin A., Risher N., Weetall M., Yeh S., Branstrom A.A., Colacino J.M., Babiak J., Ju W.D., Hirawat S., Northcutt V.J., Miller L.L., Spatrick P., He F., Kawana M., Feng H., Jacobson A., Peltz S.W., Sweeney H.L. PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations // *Nature.* – 2007. – Vol. 447, No. 7140. – P. 87–91. DOI: 10.1038/nature05756
68. Berger J., Li M., Berger S., Meilak M., Rientjes J., Currie P.D. Effect of Ataluren on dystrophin mutations // *J. Cell. Mol. Med.* – 2020. – Vol. 24, No. 12. – P. 6680–6689. DOI: 10.1111/jcmm.15319
69. Allamand V., Bidou L., Arakawa M., Floquet C., Shiozuka M., Paturneau-Jouas M., Gartiaux C., Butler-Browne G.S., Mouly V., Rousset J.P., Matsuda R., Ikeda D., Guicheney P. Drug-induced readthrough of premature stop codons leads to the stabilization of laminin alpha2 chain mRNA in CMD myotubes // *J. Gene Med.* – 2008. – Vol. 10, No. 2. – P. 217–224. DOI: 10.1002/jgm.1140
70. Iezzi S., Cossu G., Nervi C., Sartorelli V., Puri P.L. Stage-specific modulation of skeletal myogenesis by inhibitors of nuclear deacetylases // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – Vol. 99, No. 11. – P. 7757–7762. DOI: 10.1073/pnas.112218599
71. Iezzi S., Di Padova M., Serra C., Caretti G., Simone C., Maklan E., Minetti G., Zhao P., Hoffman E.P., Puri P.L., Sartorelli V. Deacetylase inhibitors increase muscle cell size by promoting myoblast recruitment and fusion through induction of follistatin // *Dev. Cell.* – 2004. – Vol. 6, No. 5. – P. 673–684. DOI: 10.1016/s1534-5807(04)00107-8
72. Minetti G.C., Colussi C., Adami R., Serra C., Mozzetta C., Parente V., Fortuni S., Straino S., Sampaolesi M., Di Padova M., Illi B., Gallinari P., Steinkühler C., Capogrossi M.C., Sartorelli V., Bottinelli R., Gaetano C., Puri P.L. Functional and morphological recovery of dystrophic muscles in mice treated with deacetylase inhibitors // *Nat. Med.* – 2006. – Vol. 12, No. 10. – P. 1147–1150. DOI: 10.1038/nm1479
73. Love D.R., Hill D.F., Dickson G., Spurr N.K., Byth B.C., Marsden R.F., Walsh F.S., Edwards Y.H., Davies K.E. An autosomal transcript in skeletal muscle with homology to dystrophin // *Nature.* – 1989. – Vol. 339, No. 6219. – P. 55–58. DOI: 10.1038/339055a0
74. Khurana T.S., Hoffman E.P., Kunkel L.M. Identification of a chromosome 6-encoded dystrophin-related protein // *J. Biol. Chem.* – 1990. – Vol. 265, No. 28. – P. 16717–16720.
75. Khurana T.S., Watkins S.C., Chafey P., Chelly J., Tomé F.M., Fardeau M., Kaplan J.C., Kunkel L.M. Immunolocalization and developmental expression of dystrophin related protein in skeletal muscle // *Neuromuscul. Disord.* – 1991. – Vol. 1, No. 3. – P. 185–194. DOI: 10.1016/0960-8966(91)90023-1
76. Starikova A.V., Skopenkova V.V., Polikarpova A.V., Reshetov D.A., Vassilieva S.G., Velyaev O.A., Shmidt A.A., Savchenko I.M., Soldatov V.O., Egorova T.V., Bardina M.V. Therapeutic potential of highly functional codon-optimized microtrophin for muscle-specific expression // *Sci. Rep.* – 2022. – Vol. 12, No. 1. – Art. ID: 848. DOI: 10.1038/s41598-022-04892-x
77. Vuorinen A., Wilkinson I.V.L., Chatzopoulou M., Edwards B., Squire S.E., Fairclough R.J., Bazan N.A., Milner J.A., Conole D., Donald J.R., Shah N., Willis N.J., Martínez R.F., Wilson F.X., Wynne G.M., Davies S.G., Davies K.E., Russell A.J. Discovery and mechanism of action studies of 4,6-diphenylpyrimidine-2-carbohydrazides as utrophin modulators for the treatment of Duchenne muscular dystrophy // *Eur. J. Med. Chem.* – 2021. – Vol. 220. Art. ID: 113431. DOI: 10.1016/j.ejmech.2021.113431
78. Chatzopoulou M., Conole D., Emer E., Rowley J.A., Willis N.J., Squire S.E., Gillc B., Broughc S., Wilson F.X., Wynne G.M., Davies S.G., Davies K.E., Russell A.J. Structure-activity relationships of 2-pyrimidinecarbohydrazides as utrophin modulators for the potential treatment of Duchenne muscular dystrophy // *Bioorg. Med. Chem.* – 2022. – Vol. 69. – Art. ID: 116812. DOI: 10.1016/j.bmc.2022.116812
79. Pearson C.M., Rimer D.G., Mommaerts W.F. A metabolic myopathy due to absence of muscle phosphorylase // *Am. J. Med.* – 1961. – Vol. 30. – P. 502–517. DOI: 10.1016/0002-9343(61)90075-4
80. Preisler N., Pradel A., Husu E., Madsen K.L., Becquemin M.H., Mollet A., Labrune P., Petit F., Hogrel J.Y., Jardel C., Maillot F., Vissing J., Laforêt P. Exercise intolerance in Glycogen Storage Disease Type III: weakness or energy deficiency? // *Mol. Genet. Metab.* – 2013. – Vol. 109, No. 1. – P. 14–20. DOI: 10.1016/j.ymgme.2013.02.008
81. Preisler N., Laforêt P., Echaniz-Laguna A., Ørngreen M.C., Lonsdorfer-Wolf E., Doutreleau S., Geny B., Stojkovic T., Piraud M., Petit F.M., Vissing J. Fat and carbohydrate metabolism during exercise in phosphoglucomutase type 1 deficiency // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2013. – Vol. 98, No. 7. – P. 1235–1240. DOI: 10.1210/jc.2013-1651
82. Stojkovic T., Vissing J., Petit F., Piraud M., Orngreen M.C., Andersen G., Claeys K.G., Wary C., Hogrel J.Y., Laforêt P. Muscle glycogenosis due to phosphoglucomutase 1 deficiency // *N. Engl. J. Med.* – 2009. – Vol. 361, No. 4. – P. 425–427. DOI: 10.1056/NEJMc0901158
83. Roe C.R., Mochel F. Anaplerotic diet therapy in inherited metabolic disease: therapeutic potential // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 2006. – Vol. 29, No. 2–3. – P. 332–340. DOI: 10.1007/s10545-006-0290-3
84. Roe C.R., Sweetman L., Roe D.S., David F., Brunengraber H. Treatment of cardiomyopathy and rhabdomyolysis in long-chain fat oxidation disorders using an anaplerotic odd-chain triglyceride // *J. Clin. Invest.* – 2002. – Vol. 110, No. 2. – P. 259–269. DOI: 10.1172/JCI15311
85. Roe C.R., Yang B.Z., Brunengraber H., Roe D.S., Wallace M.,

- Garritson B.K. Carnitine palmitoyltransferase II deficiency: successful anaplerotic diet therapy // *Neurology*. – 2008. – Vol. 71, No. 4. – P. 260–264. DOI: 10.1212/01.wnl.0000318283.42961.e9
86. Laforêt P., Ørngreen M., Preisler N., Andersen G., Vissing J. Blocked muscle fat oxidation during exercise in neutral lipid storage disease // *Arch. Neurol.* – 2012. – Vol. 69, No. 4. – P. 530–533. DOI: 10.1001/archneurol.2011.631
87. Farshidfar F., Pinder M.A., Myrie S.B. Creatine Supplementation and Skeletal Muscle Metabolism for Building Muscle Mass- Review of the Potential Mechanisms of Action // *Curr. Protein Pept. Sci.* – 2017. – Vol. 18, No. 12. – P. 1273–1287. DOI: 10.2174/1389203718666170606105108
88. Marriage B., Clandinin M.T., Glerum D.M. Nutritional cofactor treatment in mitochondrial disorders // *J. Am. Diet. Assoc.* – 2003. – Vol. 103, No. 8. – P. 1029–1038. DOI: 10.1016/s0002-8223(03)00476-0
89. Avula S., Parikh S., Demarest S., Kurz J., Gropman A. Treatment of mitochondrial disorders // *Curr. Treat. Options Neurol.* – 2014. – Vol. 16, No. 6. – P. 292. DOI: 10.1007/s11940-014-0292-7
90. Tinker R.J., Lim A.Z., Stefanetti R.J., McFarland R. Current and Emerging Clinical Treatment in Mitochondrial Disease *Mol. Diagn. Ther.* – 2021. – Vol. 25, No. 2. – P. 181–206. DOI: 10.1007/s40291-020-00510-6
91. Visconi C., Bottani E., Zeviani M. Emerging concepts in the therapy of mitochondrial disease // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2015. – Vol. 1847, No. 6–7. – P. 544–557. DOI: 10.1016/j.bbabi.2015.03.001
92. Barshop B.A., Naviaux R.K., McGowan K.A., Levine F., Nyhan W.L., Loupis-Geller A., Haas R.H. Chronic treatment of mitochondrial disease patients with dichloroacetate // *Mol. Genet. Metab.* – 2004. – Vol. 83, No. 1–2. – P. 138–149. DOI: 10.1016/j.ymgme.2004.06.009
93. Prietsch V., Lindner M., Zschocke J., Nyhan W.L., Hoffmann G.F. Emergency management of inherited metabolic diseases // *J. Inher. Metab. Dis.* – 2002. – Vol. 25, No. 7. – P. 531–546. DOI: 10.1023/a:1022040422590
94. Parikh S., Saneto R., Falk M.J., Anselm I., Cohen B.H., Haas R., Medicine Society T.M. A modern approach to the treatment of mitochondrial disease // *Curr. Treat. Options. Neurol.* – 2009. – Vol. 11, No. 6. – P. 414–430. DOI: 10.1007/s11940-009-0046-0
95. Angelova P.R., Esteras N., Abramov A.Y. Mitochondria and lipid peroxidation in the mechanism of neurodegeneration: Finding ways for prevention // *Med. Res. Rev.* – 2021. – Vol. 41, No. 2. – P. 770–784. DOI: 10.1002/med.21712
96. Birnkrant D.J., Bushby K., Bann C.M., Apkon S.D., Blackwell A., Brumbaugh D., Case L.E., Clemens P.R., Hadjiyannakis S., Pandya S., Street N., Tomezsko J., Wagner K.R., Ward L.M., Weber D.R. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and neuromuscular, rehabilitation, endocrine, and gastrointestinal and nutritional management // *Lancet Neurol.* – 2018. – Vol. 17, No. 3. – P. 251–267. DOI: 10.1016/S1474-4422(18)30024-3. Erratum in: *Lancet Neurol.* – 2018.
97. McNeil S.M., Woulfe J., Ross C., Tarnopolsky M.A. Congenital inflammatory myopathy: a demonstrative case and proposed diagnostic classification // *Muscle Nerve.* – 2002. – Vol. 25, No. 2. – P. 259–264. DOI: 10.1002/mus.10043
98. Walter M.C., Reilich P., Thiele S., Schessl J., Schreiber H., Reiners K., Kress W., Müller-Reible C., Vorgerd M., Urban P., Schrank B., Deschauer M., Schlotter-Weigel B., Kohlen R., Lochmüller H. Treatment of dysferlinopathy with deflazacort: a double-blind, placebo-controlled clinical trial // *Orphanet J. Rare Dis.* – 2013. – Vol. 8. Art. ID: 26. DOI: 10.1186/1750-1172-8-26
99. Bonifati M.D., Ruzza G., Bonometto P., Berardinelli A., Gorni K., Orcesi S., Lanzi G., Angelini C. A multicenter, double-blind, randomized trial of deflazacort versus prednisone in Duchenne muscular dystrophy // *Muscle Nerve.* – 2000. – Vol. 23, No. 9. – P. 1344–1347. DOI: 10.1002/1097-4598(200009)23:9<1344::aid-mus4>3.0.co;2-f
100. Escolar D.M., Hache L.P., Clemens P.R., Cnaan A., McDonald C.M., Viswanathan V., Kornberg A.J., Bertorini T.E., Nevo Y., Lotze T., Pestronk A., Ryan M.M., Monasterio E., Day J.W., Zimmerman A., Arrieta A., Henricson E., Mayhew J., Florence J., Hu F., Connolly A.M. Randomized, blinded trial of weekend vs daily prednisone in Duchenne muscular dystrophy // *Neurology.* – 2011. – Vol. 77, No. 5. – P. 444–452. DOI: 10.1212/WNL.0b013e318227b164
101. Pasquini F., Guerin C., Blake D., Davies K., Karpati G., Holland P. The effect of glucocorticoids on the accumulation of utrophin by cultured normal and dystrophic human skeletal muscle satellite cells // *Neuromuscul. Disord.* – 1995. – Vol. 5, No. 2. – P. 105–114. DOI: 10.1016/0960-8966(94)00042-8
102. Serra F., Quarta M., Canato M., Toniolo L., De Arcangelis V., Trotta A., Spath L., Monaco L., Reggiani C., Naro F. Inflammation in muscular dystrophy and the beneficial effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs // *Muscle Nerve.* – 2012. – Vol. 46, No. 5. – P. 773–784. DOI: 10.1002/mus.23432
103. Aoyagi K., Ohara-Imaizumi M., Nishiwaki C., Nakamichi Y., Nagamatsu S. Insulin/phosphoinositide 3-kinase pathway accelerates the glucose-induced first-phase insulin secretion through TrpV2 recruitment in pancreatic β -cells // *Biochem. J.* – 2010. – Vol. 432, No. 2. – P. 375–386. DOI: 10.1042/BJ20100864
104. Iwata Y., Katanosaka Y., Shijun Z., Kobayashi Y., Hanada H., Shigekawa M., Wakabayashi S. Protective effects of Ca^{2+} handling drugs against abnormal Ca^{2+} homeostasis and cell damage in myopathic skeletal muscle cells // *Biochem. Pharmacol.* – 2005. – Vol. 70, No. 5. – P. 740–751. DOI: 10.1016/j.bcp.2005.05.034
105. Swiderski K., Todorov M., Gehrig S.M., Naim T., Chee A., Stapleton D., Koopman R., Lynch G.S. Tranilast administration reduces fibrosis and improves fatigue resistance in muscles of mdx dystrophic mice // *Fibrogenesis Tissue Repair.* – 2014. – Vol. 7, No. 1. – Art. ID: 1. DOI: 10.1186/1755-1536-7-1
106. Hodgetts S., Radley H., Davies M., Grounds MD. Reduced necrosis of dystrophic muscle by depletion of host neutrophils, or blocking TNF α function with Etanercept in mdx mice // *Neuromuscul. Disord.* – 2006. – Vol. 16, No. 9–10. – P. 591–602. DOI: 10.1016/j.nmd.2006.06.011
107. Piers A.T., Lavin T., Radley-Crabb H.G., Bakker A.J., Grounds M., Pinniger G.J. Blockade of TNF *in vivo* using cV1q antibody reduces contractile dysfunction of skeletal muscle in response to eccentric exercise in dystrophic mdx and normal mice // *Neuromuscul. Disord.* – 2011. – Vol. 21, Issue 2. – P. 132–141. DOI: 10.1016/j.nmd.2010.09.013
108. Mahdy M.A.A. Skeletal muscle fibrosis: an overview // *Cell. Tissue Res.* – 2019r. – Vol. 375, No. 3. – P. 575–588. DOI: 10.1007/s00441-018-2955-2
109. Tsabari R., Simchovitz E., Lavi E., Eliav O., Avrahami R., Ben-Sasson S., Do T. Safety and clinical outcome of tamoxifen in Duchenne muscular dystrophy // *Neuromuscul. Disord.* – 2021. – Vol. 31. – P. 803–813. DOI: 10.1016/j.nmd.2021.05.005
110. Wu B., Shah S.N., Lu P., Bollinger L.E., Blaeser A., Sparks S., Harper A.D., Lu Q.L. Long-Term Treatment of Tamoxifen and Raloxifene Alleviates Dystrophic Phenotype and Enhances Muscle Functions of FKRP Dystroglycanopathy // *Am. J. Pathol.* – 2018. – Vol. 188, No. 4. – P. 1069–1080. DOI: 10.1016/j.ajpath.2017.12.011

111. Ceco E., McNally E.M. Modifying muscular dystrophy through transforming growth factor- β // *FEBS J.* – 2013. – Vol. 280, No. 17. – P. 4198–4209. DOI: 10.1111/febs.12266
112. Biressi S., Miyabara E.H., Gopinath S.D., Carlig P.M., Rando T.A. A Wnt-TGF β 2 axis induces a fibrogenic program in muscle stem cells from dystrophic mice // *Sci. Transl. Med.* – 2014. – Vol. 6, No. 267. – Art. ID: 267ra176. DOI: 10.1126/scitranslmed.3008411
113. Demonbreun A.R., Fallon K.S., Oosterbaan C.C., Vaught L.A., Reiser N.L., Bogdanovic E., Velez M.P., Salamone I.M., Page P.G.T., Hadhazy M., Quattrocchi M., Barefield D.Y., Wood L.D., Gonzalez J.P., Morris C., McNally E.M. Anti-latent TGF β binding protein 4 antibody improves muscle function and reduces muscle fibrosis in muscular dystrophy // *Sci. Transl. Med.* – 2021. – Vol. 13, No. 610. – Art. ID: eabf0376. DOI: 10.1126/scitranslmed.abf0376
114. Morales M.G., Cabrera D., Céspedes C., Vio C.P., Vazquez Y., Brandan E., Cabello-Verrugio C. Inhibition of the angiotensin-converting enzyme decreases skeletal muscle fibrosis in dystrophic mice by a diminution in the expression and activity of connective tissue growth factor (CTGF/CCN-2) // *Cell Tissue Res.* – 2013. – Vol. 353, No. 1. – P. 173–187. DOI: 10.1007/s00441-013-1642-6
115. Sun G., Haginoya K., Wu Y., Chiba Y., Nakanishi T., Onuma A., Sato Y., Takigawa M., Iinuma K., Tsuchiya S. Connective tissue growth factor is overexpressed in muscles of human muscular dystrophy // *J. Neurol. Sci.* – 2008. – Vol. 267, No. 1–2. – P. 48–56. DOI: 10.1016/j.jns.2007.09.043
116. Frazier K., Williams S., Kothapalli D., Klapper H., Grotendorst G.R. Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor // *J. Invest. Dermatol.* – 1996. – Vol. 107, No. 3. – P. 404–411. DOI: 10.1111/1523-1747.ep12363389
117. Smith L.R., Barton E.R. Regulation of fibrosis in muscular dystrophy // *Matrix. Biol.* – 2018. – Vol. 68–69. – P. 602–615. DOI: 10.1016/j.matbio.2018.01.014
118. de Winter J.M., Gineste C., Minardi E., Brocca L., Rossi M., Borsboom T., Beggs A.H., Bernard M., Bendahan D., Hwee D.T., Malik F.I., Pellegrino M.A., Bottinelli R., Gondin J., Ottenheijm C.A.C. Acute and chronic tirasemtiv treatment improves *in vivo* and *in vitro* muscle performance in actin-based nemaline myopathy mice // *Hum. Mol. Genet.* – 2021. – Vol. 30, No. 14. – P. 1305–1320. DOI: 10.1093/hmg/ddab112
119. McPherron A.C., Lawler A.M., Lee S.J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member // *Nature.* – 1997. – Vol. 387, No. 6628. – P. 83–90. DOI: 10.1038/387083a0
120. Guiraud S., Davies K.E. Pharmacological advances for treatment in Duchenne muscular dystrophy // *Curr. Opin. Pharmacol.* – 2017. – Vol. 34. – P. 36–48. DOI: 10.1016/j.coph.2017.04.002
121. Rybalka E., Timpani C.A., Debruin D.A., Bagaric R.M., Campelj D.G., Hayes A. The Failed Clinical Story of Myostatin Inhibitors against Duchenne Muscular Dystrophy: Exploring the Biology behind the Battle // *Cells.* – 2020. – Vol. 9, No. 12. – Art. ID: 2657. DOI: 10.3390/cells9122657
122. Корокин М.В., Солдатов В.О., Гудырев О.С., Коклин И.С., Таран Э.И., Мишенин М.О., Корокина Л.В., Кочкаров А.А., Покровский М.В., Варакин М.В., Чулахин О.Н. Роль метаболизма кортизола в реализации патогенетических звеньев развития остеопороза – обоснование поиска новых фармакотерапевтических мишеней (обзор). Научные результаты биомедицинских исследований. – 2022. – Т. 8, № 4. – С. 457–473. DOI: 10.18413/2658-6533-2022-8-4-0-5

АВТОРЫ

Покровский Михаил Владимирович – доктор медицинских наук, профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии, руководитель НИИ фармакологии живых систем, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»). ORCID ID: 0000-0002-2761-6249. E-mail: mpokrovsky@yandex.ru

Корокин Михаил Викторович – доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»). ORCID ID: 0000-0001-5402-0697. E-mail: mkorokin@mail.ru

Краюшкина Анастасия Михайловна – ассистент кафедры фармакологии и клинической фармакологии, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»). ORCID ID: 0000-0002-6830-3820. E-mail: annkrayushkina98@gmail.com

Жунусов Никита Сергеевич – ассистент кафедры фармакологии и клинической фармакологии, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»). ORCID ID: 0000-0002-1969-3615. E-mail: nzhun@mail.ru

Лاپин Константин Николаевич – научный сотрудник лаборатории экспериментальных исследований НИИ общей реаниматологии имени В.А. Неговского РАН. ORCID ID: 0000-0002-7760-3526. E-mail: k.n.lapin@gmail.com

Солдатова Мария Олеговна – лаборант-исследователь НИИ Популяционной генетики и эпидемиологии ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет». ORCID ID: 0000-0001-6637-1654. E-mail: mar.sold46@gmail.com

Кузьмин Егор Александрович – лаборант кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова». ORCID ID: 0000-0003-4098-1125. E-mail: eg.ku@yandex.ru

Гудырев Олег Сергеевич – кандидат медицинских наук, доцент, доцент кафедры фармакологии и клинической фармакологии, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»). ORCID ID: 0000-0003-0097-000X. E-mail: gudyrev@mail.ru

Кочкарова Индира Султановна – младший научный сотрудник НИИ Фармакологии живых систем ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»). ORCID ID: 0000-0001-6202-9923. E-mail: kochkarova@bsu.edu.ru

Дейкин Алексей Васильевич – кандидат биологических наук, доцент кафедры фармакологии и клинической фармакологии, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»). ORCID ID: 0000-0002-8151-6337. E-mail: deykin@bsu.edu.ru

Исследование антиоксидантного эффекта митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 на модели изолированного сердца крысы

Е. А. Сенокосова^{1*}, С. С. Крутицкий¹, О. В. Груздева¹, Л. В. Антонова¹,
М. В. Скулачев², Е. В. Григорьев¹

¹ НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний,
Россия, 650002, г. Кемерово, Сосновый б-р, д. 6

² Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского,
Россия, 119992, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40

Для цитирования: Е. А. Сенокосова, С. С. Крутицкий, О. В. Груздева, Л. В. Антонова, М. В. Скулачев, Е. В. Григорьев. Исследование антиоксидантного эффекта митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 на модели изолированного сердца крысы. *Общая реаниматология*. 2022; 18 (4): 36–44. <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2022-4-36-44> [На русск. и англ.]

Резюме

Митохондриально-направленные антиоксиданты на основе ионов Скулачёва (SkQ1) крайне привлекательны для нейтрализации активных форм кислорода непосредственно в матриксе митохондрий.

Цель — изучить антиоксидантный и кардиопротективный эффект митохондриально-направленного антиоксиданта — SkQ1 на модели ишемии и реперфузии изолированного сердца крысы в условиях холодовой кардиоopleгии.

Материалы и методы. Исследование эффектов SkQ1 (1200 нг/мл, 120 нг/мл, 12 нг/мл) провели на изолированных сердцах крыс линии Wistar ($n=50$) в условиях 240-минутной холодовой кардиоopleгии. Оценили уровень окислительного стресса, динамику маркеров повреждения миокарда (классические и высокоспецифичные) и функцию сердечной мышцы (скорость коронарного протока, частоту сердечных сокращений, систолическое давление).

Результаты. Использование SkQ1 в концентрации 12 нг/мл привело к статистически значимой нейтрализации проявлений окислительного стресса ($p<0,05$): минимальное содержание NO-метаболитов — нитратов и нитритов (36,2 [30,8; 39,8] мкмоль/мл) поддерживалось на доишемическом уровне всю 30-минутную реперфузию, а концентрация малонового диальдегида (49,5 [41,1; 58,9] мкмоль/г) была ниже в сравнении с применением SkQ1 в концентрации 120 нг/мл. Вследствие «смягчения» окислительного стресса внутриклеточные ферменты и высокоспецифичные маркеры повреждения миокарда при реперфузии нарастали медленно, а восстановление сердечной функции произошло более высокими темпами и показало свою стабильность при возобновлении перфузии.

Заключение. SkQ1 в концентрации 12 нг/мл проявил выраженные антиоксидантные и кардиопротективные свойства в исследовании *ex vivo*.

Ключевые слова: пластомитин; SkQ1; искусственное кровообращение; изолированное сердце; окислительный стресс

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0419-2022-0001 «Молекулярные, клеточные и биомеханические механизмы патогенеза сердечно-сосудистых заболеваний в разработке новых методов лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы на основе персонализированной фармакотерапии, внедрения малоинвазивных медицинских изделий, биоматериалов и ткане-инженерных имплантатов».

The Antioxidant Effect of Mitochondrially Targeted Antioxidant SkQ1 on the Isolated Rat Heart Model

Evgeniya A. Senokosova^{1*}, Sergey S. Krutitsky¹, Olga V. Gruzdeva¹,
Larisa V. Antonova¹, Maxim V. Skulachev², Evgeniy V. Grigoriev¹

¹ Research Institute of Complex Problems of Cardiovascular Disease
6 Sosnovy bulvar, 650002 Kemerovo, Russia

² A. N. Belozersky Research Institute of Physical and Chemical Biology, M. V. Lomonosov Moscow State University,
1 Leninskie gory, Bldg 40, 119992 Moscow, Russia

Адрес для корреспонденции:

Евгения Андреевна Сенокосова
E-mail: sergeewa.ew@yandex.ru

Correspondence to:

Evgeniya A. Senokosova
E-mail: sergeewa.ew@yandex.ru

Summary

Mitochondrially targeted antioxidants based on Skulachev ions (SkQ1) are extremely attractive for neutralizing reactive oxygen species directly in the mitochondrial matrix.

The aim was to examine the antioxidant and cardioprotective status of the SkQ1 mitochondrially targeted antioxidant in an isolated rat heart model of ischemia and reperfusion after cold cardioplegia.

Material and methods. The effects of different concentrations of SkQ1 (1200 ng/ml, 120 ng/ml, 12 ng/ml) were explored on isolated hearts of Wistar rats ($n=50$) during 240-min cold cardioplegia. The levels of oxidative stress, changes in myocardial damage markers (classical and highly specific) and cardiac function (coronary flow velocity, heart rate, systolic pressure) were assessed.

Results. The use of SkQ1 at 12 ng/ml resulted in a significant neutralization of oxidative stress manifestations ($P<0.05$). The minimum concentration of NO metabolites (nitrates and nitrites) (36.2 [30.8; 39.8] $\mu\text{mol/ml}$) was maintained at pre-ischemic level throughout the 30-minute reperfusion period, while the malonic dialdehyde concentration (49.5 [41.1; 58.9] $\mu\text{mol/g}$) was lower compared with SkQ1 use at 120 ng/ml dose. Due to the «mitigation» of oxidative stress, intracellular enzymes and highly specific markers of myocardial damage rose more slowly during reperfusion, while cardiac function recovery occurred at a higher rate and showed stability upon restoration of perfusion.

Conclusion. SkQ1 at 12 ng/ml concentration showed strong antioxidant and cardioprotective properties in an *ex vivo* study.

Keywords: *plastomitin; SkQ1; bypass circulation; isolated heart; oxidative stress*

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

The full text version of the paper is available at www.reanimatology.com

Введение

Операции на открытом сердце в условиях искусственного кровообращения остаются крайне востребованы. Коморбидность пациентов кардиохирургического профиля, искусственное кровообращение, продолжительное время ишемии/аноксии, которое испытывает миокард во время операции, реперфузия в совокупности обуславливают накопление продуктов метаболизма, развитие окислительного стресса и системного воспалительного ответа, которые могут привести к различным послеоперационным осложнениям, в том числе к полиорганной недостаточности [1, 2]. Поэтому активно развиваются исследования, направленные на поиск активных веществ и разработку методов, способных минимизировать послеоперационные осложнения в кардиохирургии. Окислительный стресс как одна из причин осложнений инициируется при нарушении нормального митохондриального дыхания и приводит к образованию активных форм кислорода (АФК), запускающих множество патофизиологических процессов [3]. Локальная нейтрализация АФК, находящихся в матриксе митохондрий, может стать наиболее эффективным способом смягчения окислительного стресса.

Большой интерес вызывают митохондриально-направленные антиоксиданты. Пластомитин является лекарственной формой одного из таких антиоксидантов — препаратом системного действия, основанного на ионах Скулачева (SkQ1). Собственную формулу антиоксиданта, содержащего пластохинон (SkQ1), разработала и активно изучает команда ученых под руководством академика РАН В. П. Скулачева [4, 5]. Антиоксидант SkQ1 в виде коммерческого продукта уже занял свои ниши в фарминдустрии и кос-

метологии: глазные капли «Визомитин» используются при синдроме сухого глаза и начальных стадиях катаракты, в основе патогенеза которых лежит окислительный стресс, а сыворотка для лица «Mitovitan» применяется для уменьшения выраженности признаков старения, при котором АФК играют немаловажную роль [6–8]. В изучении эффективности SkQ1 нуждаются также многие отрасли медицины, ветеринарии и сельского хозяйства [9, 10]. В частности, наша исследовательская группа заинтересована в разработке методов снижения послеоперационных осложнений в кардиохирургии, в основе развития которых в большинстве случаев лежит окислительный стресс, и способах сохранения жизнеспособности трансплантата сердца [11]. Выполненная работа посвящена исследованию эффектов SkQ1 на изолированном сердце, подвергнутом длительной аноксии и реперфузии *ex vivo*. В данном случае отсутствие системной регуляции со стороны организма позволило судить о «чистых» эффектах самого препарата.

Цель исследования — оценить антиоксидантный и кардиопротективный эффект митохондриально-направленного антиоксиданта — SkQ1 на модели ишемии и реперфузии изолированного сердца крысы в условиях холодовой кардиopleгии.

Материал и методы

Препарат Пластомитин (концентрация SkQ1 1,7 мг/мл) был предоставлен в рамках договора о научном сотрудничестве с ООО «Митотех» (Россия). Рабочие растворы SkQ1 готовили разведением препарата Пластомитин перфузионным раствором в соответствующей пропорции.

Эксперименты провели на изолированных сердцах здоровых самцов крыс линии Wistar ($m=300\pm 50$ г),

$n=50$. Животных содержали в стандартных условиях вивария без ограничения в пище и воде. Эксперименты и процедуры с лабораторными животными соответствовали правилам Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986). Исследование было одобрено локальным этическим комитетом (протокол № 150 от 16.11.2021).

Перфузия изолированных сердец по методу Langendorff. Подобную схему эксперимента мы уже использовали в исследованиях эффективности других препаратов [12]. Изначально крыс анестезировали внутрибрюшинным введением тиопентала натрия (25 мг/кг). Далее проводили торакотомию, сердца с необходимым участком аорты иссекали и сразу погружали в раствор Кребса–Хензеляйта ($t=4^{\circ}\text{C}$). Далее аорту каниюлировали к системе перфузирования собственной сборки, включающей газовый и температурный контуры, с подачей стандартного раствора Кребса–Хензеляйта (ммоль/л): NaCl — 118,0, NaHCO_3 — 25,0, глюкоза — 11,0, KCl — 4,8, KH_2PO_4 — 1,2, MgSO_4 — 1,2; CaCl_2 — 1,2, обогащенного смесью газов — 95% O_2 и 5% CO_2 , pH=7,3 — 7,4. Во время всех этапов эксперимента на изолированных сердцах поддерживали стабильную температуру перфузионного раствора в допустимом диапазоне от 37°C до 38°C , а также постоянное давление столба жидкости в 80 см вод. ст.

Протокол перфузирования.

Пилотный этап эксперимента. Стабилизация сердца — 20 минут; нормотермическая гипоперфузия (20 мл/ч) раствором Кребса–Хензеляйта с SkQ1 — 20 минут; реперфузия — 15 минут. Для сердец первой опытной группы провели гипоперфузию перфузионным раствором с SkQ1 в концентрации 12 нг/мл (группа «SkQ1 12», $n=5$), для второй опытной группы — 120 нг/мл («SkQ1 120», $n=5$), третьей — 1200 нг/мл («SkQ1 1200», $n=5$). В контрольной группе ($n=5$) исключили добавление SkQ1 в период гипоперфузии.

Исследуемые параметры. На 20-й минуте перфузии (доишемический уровень, ДУ) и 15-й минуте реперфузии регистрировали скорость коронарного потока (СКП, мл/мин). В оттекаемом от сердец перфузате устанавливали активность ферментов: креатинфосфокиназы миокардиальной фракции (КФК-МБ, Ед/л) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ, Ед/л) методом ферментативной кинетики на автоматическом биохимическом анализаторе «Konelab 30i» (Thermo Fisher, США).

Основной этап эксперимента. Стабилизация сокращения сердца — 20 минут; подключение второго потока перфузионного раствора с SkQ1 — 10 минут; гипоперфузия (20 мл/ч) охлажденным ($t=4^{\circ}\text{C}$) кардиоплегическим раствором (кустоидол, Dr. EKONLER CHEMIE, GmbH, Германия) — 10 минут; глобальная кардиоплегическая ишемия — 240 минут; реперфузия — 30 минут. Сердца первой опытной группы перфузировали двойным потоком раствором Кребса–Хензеляйта с SkQ1 в концентрации 120 нг/мл («SkQ1 120», $n=10$). Сердца второй опытной группы перфузировали аналогично первой группе с отли-

чем в концентрации SkQ1, которая составила 12 нг/мл («SkQ1 12», $n=10$). В контрольной группе ($n=10$) исключили добавление SkQ1 во второй поток перфузионного раствора.

Исследуемые параметры. На доишемическом уровне, 1-й, 10-й, 20-й и 30-й минутах реперфузионного периода регистрировали СКП, частоту сердечных сокращений (ЧСС, уд/мин), систолическое давление (мм рт. ст.) при помощи аппарата прикроватного мониторинга, BSM-2301K (Nihon Kohden, Япония).

Активность таких ферментов, как КФК-МБ, ЛДГ, аспаратаминотрансферазы (АСТ, Ед/л) определяли аналогично пилотному этапу исследования. Концентрации сердечного белка, связывающего жирные кислоты (сБСЖК, нг/мл) и сердечного тропонина I (пг/л) определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием наборов Hycult biotech (США) и Cusabio (КНР), соответственно. Общую концентрацию нитритов и нитратов, митохондриальной супероксиддисмутазы (СОД-2), маркера перекисного повреждения митохондриальной ДНК (8-OHdG), изучали методом ИФА при помощи наборов Biomedica (Австрия) и R&D (США). Малоновый диальдегид (МДА) в гомогенате миокарда определяли коммерческим набором OxiSelect™ TBARS Assay Kit MDA Quantitation (Cell Biolabs, США).

Полученные данные статистически обработали с помощью программы «GraphPad Prism 7.0». Разницу регистрируемых показателей определяли с использованием непараметрического U -критерия Манна–Уитни для несвязанных пар, и критерием Вилкоксона — для зависимых групп. Различия между группами принимали статистически значимыми при $p<0,05$. Также применили поправки Данна и Тьюки при множественных сравнениях. Данные в разделе «Результаты и обсуждение» представили в виде Ме [25%; 75%], а также — полученных значений в исследуемом диапазоне или конкретной точке.

Результаты и обсуждение

Молекула SkQ1 (10-(6'-пластохинонилдецил) трифенилфосфоний бромид) имеет уникальное строение, позволяющее ей направленно и конформационно верно встраиваться в мембрану митохондрий (рис. 1).

Пилотный этап эксперимента. Известно, что SkQ1 проявляет высокую антиоксидантную активность в наномолярных концентрациях [15]. Известно также, что другой митохондриально-направленный антиоксидант MitoQ оказывал выраженный антиоксидантный эффект в концентрации 50 нмоль/л на модели ишемии почки свиньи, что привело к повышению общего кровотока и диуреза [16]. Однако, учитывая, что в собственном исследовании предполагали крайне продолжительный этап аноксии, при котором неизбежны серьезные нарушения клеточного дыхания и проницаемости мембраны митохондрий [17], провели пилотный эксперимент для

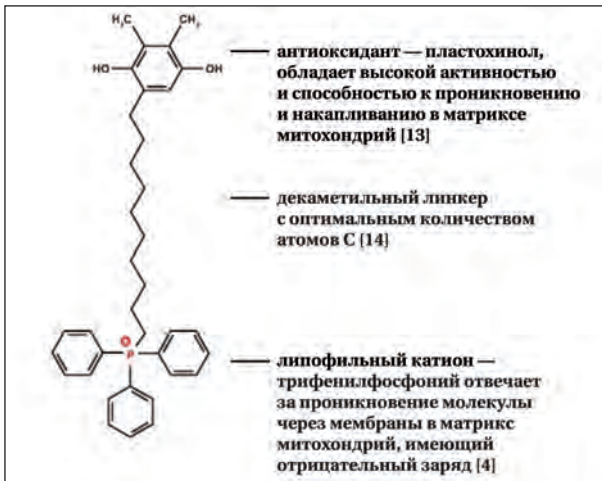


Рис. 1. Молекула SkQ1.

выбора адекватной концентрации SkQ1. Изолированные сердца крыс перфузировали тремя разными концентрациями антиоксиданта: 12 нг/мл, 120 нг/мл и 1200 нг/мл. На начальном этапе определили, какое количество SkQ1 проникает и депонируется в миокарде.

Как и предполагалось, количество ионов на 1 г ткани возросло соответственно уве-

личению концентрации ионов в перфузионном растворе. Так максимальную концентрацию ионов установили в группе «SkQ1 1200» — 6234,0 [4569,0; 8867,0] нг/г, в «SkQ1 120» — 1059,0 [825,5; 1317,0] нг/г, в «SkQ1 12» — 268,1 [100,2; 293,0] нг/г (рис. 2, а).

Скорость коронарного протока восстановилась до исходного уровня во всех опытных группах после периода гипоперфузии и реперфузии. Следует отметить, что в «SkQ1 120» медиана СКП (15,1 [14,7; 16,0] мл/мин) была статистически значимо выше относительно значений группы контроля (10,0 [9,0; 14,0] мл/мин, $p=0,003$) и на 15,8 % выше исходных значений 13,0 [12,1; 15,1] мл/мин. Однако повышение концентрации SkQ1 в перфузионном растворе до 1200 нг привело к снижению СКП на 3% относительно исходного уровня (рис. 2, б). Уровень активности КФК-МБ статистически не отличался при межгрупповом сравнении, но увеличение концентрации SkQ1 до 1200 нг/мл способствовало повышению активности КФК-МБ на 38,5% относительно исходных значений (рис. 2, с). Уровень активности ЛДГ в «SkQ1 1200» достиг 5,0 [0,0; 8,0] Ед/л, что было значимо

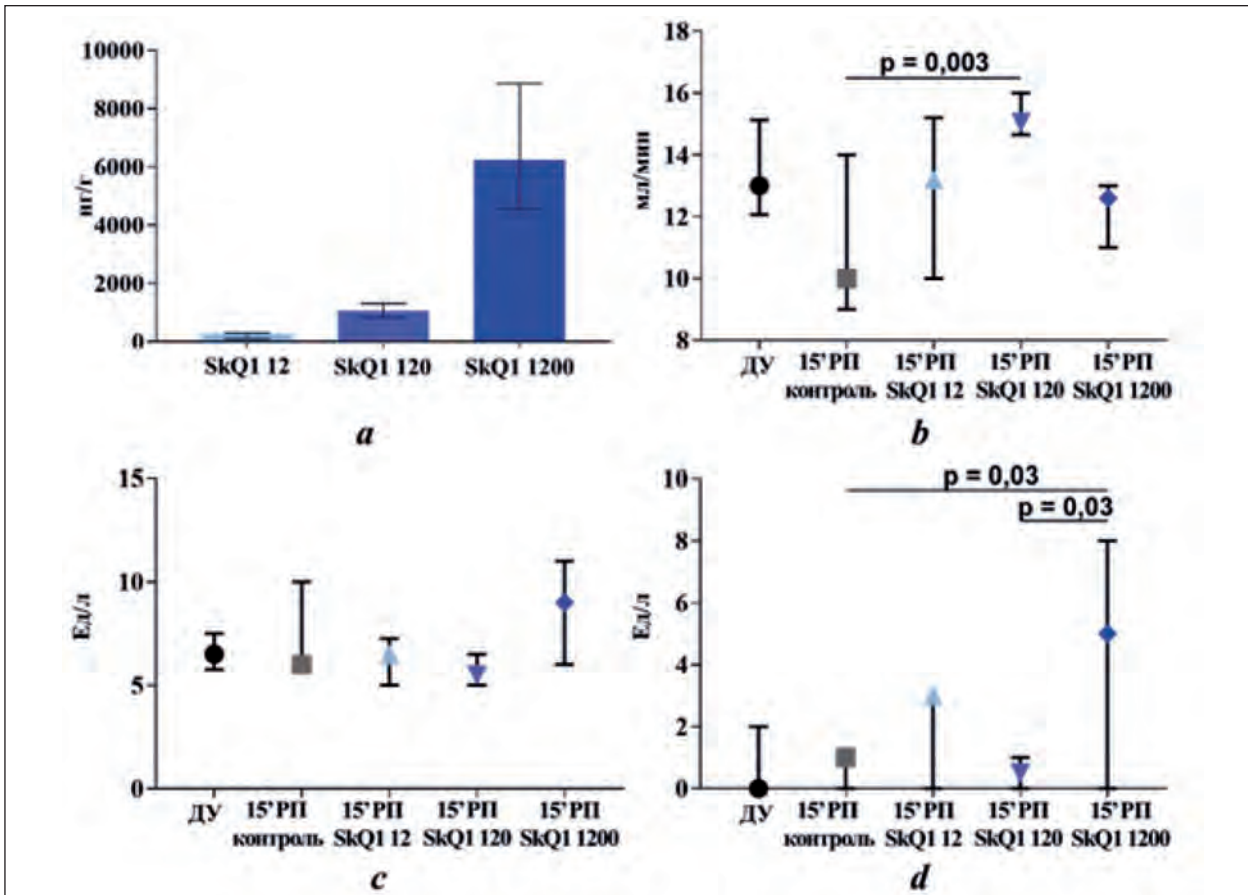


Рис. 2. Результаты пилотного исследования SkQ1 на модели изолированного сердца крысы.

а — концентрация SkQ1 в ткани миокарда; б — скорость коронарного протока; с — креатинфосфокиназа миокардиальная фракция; д — лактатдегидрогеназа.

Примечание. Для рис. 2, 4–6: ДУ — доишемический уровень; РП — реперфузия.

выше уровня активности в группе контроля (1,0 [0,0; 1,0] Ед/л) и «SkQ1 120» (0,5 [0,0; 1,0] Ед/л, $p=0,003$, рис. 2, *d*). Рост активности ЛДГ, как и КФК-МБ на 15-й минуте реперфузии в группе «SkQ1 1200», может указывать на повышение интенсивности анаэробного дыхания, образования АФК и повреждения сарколеммы кардиомиоцитов при наличии в перфузионном растворе SkQ1 в концентрации 1200 нг/мл, что можно рассматривать как токсические эффекты препарата в данной концентрации.

Проведение пилотного этапа исследования позволило выделить потенциально эффективные и безопасные концентрации SkQ1 на модели изолированного сердца крысы без окклюзии аорты. Нормотермическая гипоперфузия, предполагающая содержание SkQ1, равное 12 нг/мл или 120 нг/мл, не повлияла на изначальные параметры изолированных сердец, в отличие от концентрации 1200 нг/мл, которая спровоцировала повышение выхода внутриклеточных ферментов на фоне снижения СКП. Поэтому в основной этап исследования включили концентрации SkQ1 12 нг/мл и 120 нг/мл.

Основной этап эксперимента. Исследование нового митохондриально-направленного антиоксиданта на лабораторном этапе предполагало усложнение и приведение к клиническим условиям эксперимента на изолированном сердце, включившего 240-минутную кардиоплегическую тотальную ишемию (аноксию) с целевой температурой миокарда $+11^{\circ}\text{C}$. Спектр изучаемых параметров расширили и объединили в 3 части: окислительный стресс, маркеры повреждения миокарда и сердечные показатели.

Окислительный стресс. Антиоксидантная поддержка в концентрации 12 нг/мл привела к статистически значимому снижению стабильных NO-метаболитов по сравнению с контролем и группой «SkQ1 120»: общая концентрация нитратов и нитритов в исследуемом гомогенате ткани миокарда равнялась 36,2 [30,8; 39,8] мкмоль/мл ($p=0,02$), тогда как в группе «SkQ1 120» — 52,3 [46,6; 55,0] мкмоль/мл ($p=0,0006$, рис. 3, *a*). Известно, что NO является прооксидантом и вместе с пероксинитритом непосредственно повреждает ДНК [18, 19]. Однако в наших экспериментах не установили наличие продукта окислительного стресса митохондриальной ДНК — 8-ОН-дезоксигуанозина в гомогенате миокарда ни в одной группе исследования. Концентрация МДА, отражающая перекисное окисление липидов, была наименьшей в группе «SkQ1 12 нг» — 49,5 [41,1; 58,9] мкмоль/г, что статистически значимо ниже в сравнении с контролем ($p=0,02$, рис. 3, *b*) [20]. В норме в клетке постоянно образуются АФК в низких концентрациях. Для поддержания их безопасного уровня

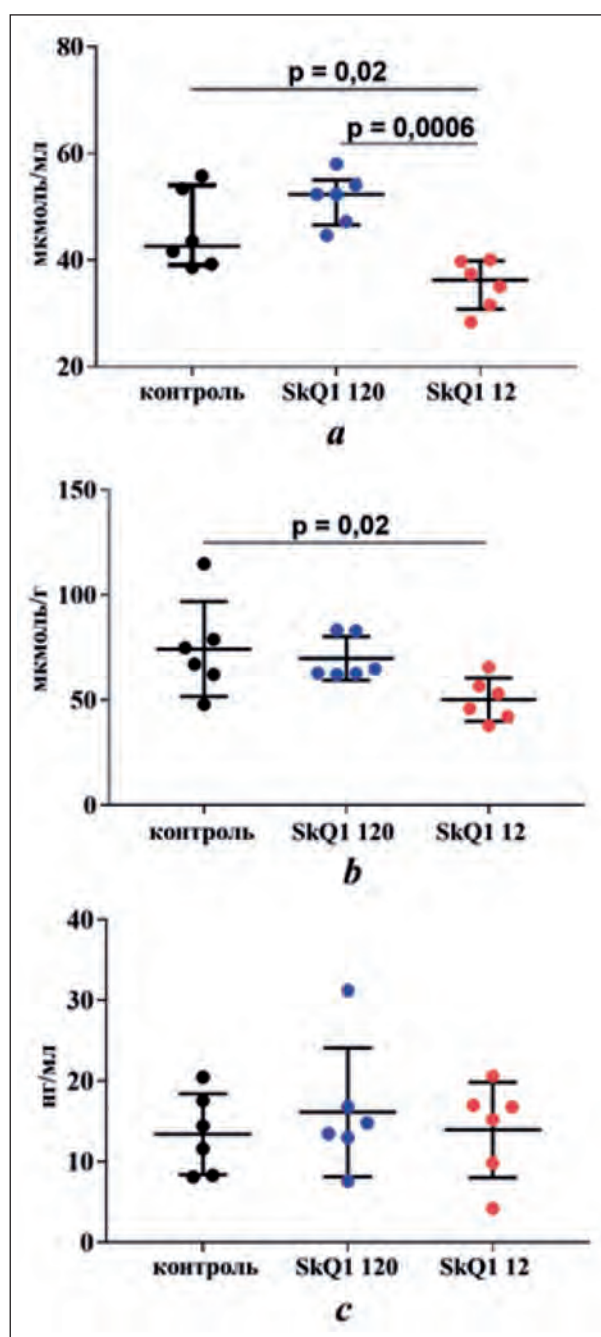


Рис. 3. Продукты окислительного стресса.

a — общая концентрация нитритов и нитратов; *b* — малоновый диальдегид; *c* — митохондриальная супероксиддисмутаза.

существует антиоксидантная система, включающая фермент СОД-2 [21, 22]. Однако по митохондриальной СОД значимых отличий между группами сравнения не отметили: в среднем, концентрация фермента составляла 14,4 нг/мл (рис. 3, *c*). Поэтому можно предположить, что снижение окислительного стресса в группе «SkQ1 12» связано именно с антиоксидантной активностью SkQ1.

Маркеры повреждения миокарда. При единовременном измерении динамики выхода КФК-МБ и ЛДГ до и после ишемии и реперфузии

миокарда примечательно то, что изменение активности обоих ферментов не превышало 1–2 Ед/л (рис. 4, *a, b*). Однако добавление SkQ1 к перфузионному раствору способствовало статистически значимому увеличению выхода АСТ в миокардиальный отток относительно исходных значений и группы контроля ($0,01 \leq p \leq 0,047$, рис. 4, *c*). Наибольший прирост выхода АСТ отмечен при концентрации ионов 120 нг/мл: к 30-й минуте активность фермента превосходила доишемическую в 12 раз. Данную динамику можно расценивать как признак кардиотоксичности SkQ1 в концентрации 120 нг/мл.

Уменьшение концентрации SkQ1 до 12 нг/мл привело к удержанию высвобождения АСТ на 1-й минуте (3,0 [1,0; 16,0] Ед/л). К концу реперфузии медиана активности данного фермента в 5,5 раз превысила исходную, но эти изменения не имели статистической значимости и не отличались от значений данного показателя на 30-й минуте реперфузии в контрольной группе (рис. 4, *c*).

Наиболее активное высвобождение высокоспецифичного маркера повреждения миокарда — сБСЖК, согласно определению его концентрации в перфузате, наблюдали в группе «SkQ1 120»: в среднем — 14,6 нг/мл весь период реперфузии. В группе «SkQ1 12» отметили активное снижение концентрации сБСЖК в перфузате, которая достигла 0,8 [0,6; 6,0] нг/мл к 30-й минуте реперфузии что было статистически значимо ниже концентрации маркера на 10-й минуте реперфузии ($p=0,03$, рис. 5, *a*).

Добавление к перфузионному раствору антиоксиданта опосредованно защищало миофибриллы миокарда в течение всего периода реперфузии: при его концентрациях 12 нг/мл и 120 нг/мл активность повреждения сократительных структур сердца снизилась относительно группы контроля, в которой концентрация сердечного тропонина I достигла 47,4 [29,3; 54,15] пг/мл к 30-й минуте после восстановления оксигенированного потока перфузионного раствора к ишемизированному миокарду (рис. 5, *b*).

Сердечные показатели. Введение в состав перфузионного раствора SkQ1 в концентрации 12 нг/мл до периода холодной кардиopleгии способствовало положительным эффектам при реперфузии. ЧСС стабилизировалась и достигла исходного уровня (211 [200; 225] уд/мин) только в условиях антиоксидантной поддержки, тогда как в группе контроля наблюдали статистически значимое «угасание» ЧСС к концу эксперимента до значений, составивших только 52% от исходных (рис. 6, *a*). В группе «SkQ1 12» отметили восстановление стабильного систолического давления — 98 [90; 102] мм рт. ст. уже с 10-й мин реперфузии (рис. 6, *b*).

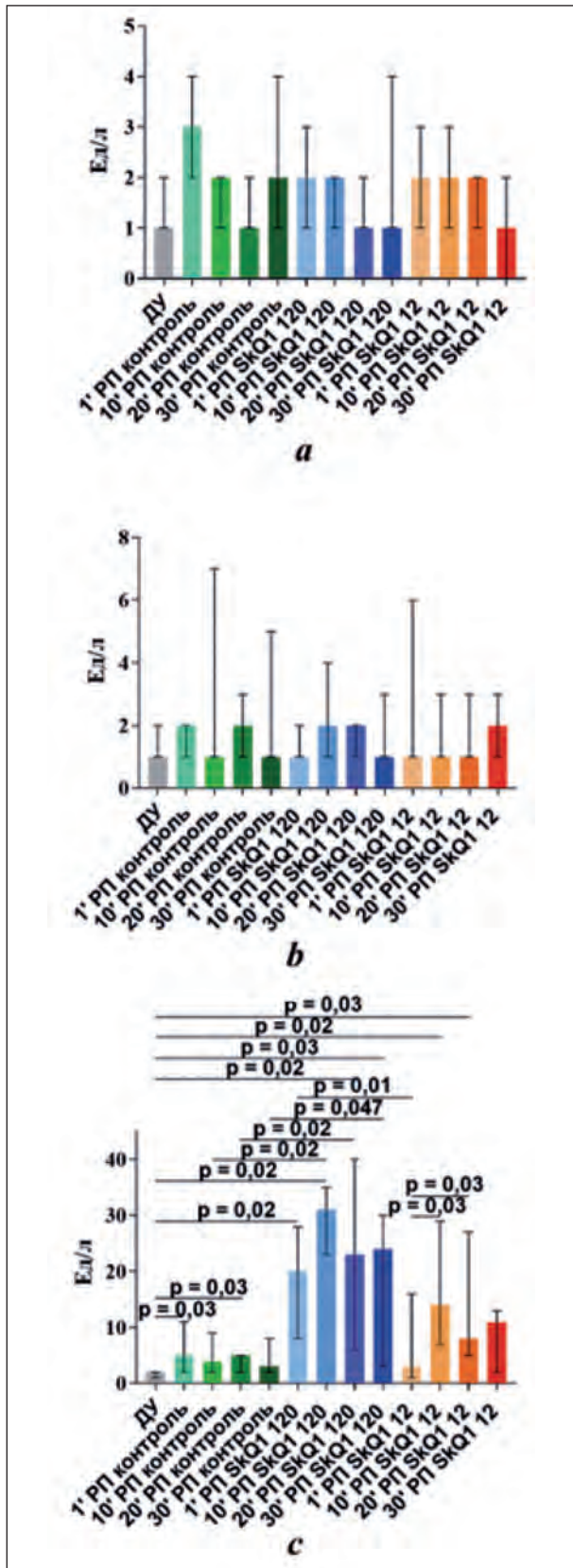


Рис. 4. Динамика содержания внутриклеточных ферментов в перфузате, оттекающем от изолированного сердца крысы. а — креатинфосфокиназа миокардиальная фракция; б — лактатдегидрогеназа; с — аспаратаминотрансфераза.

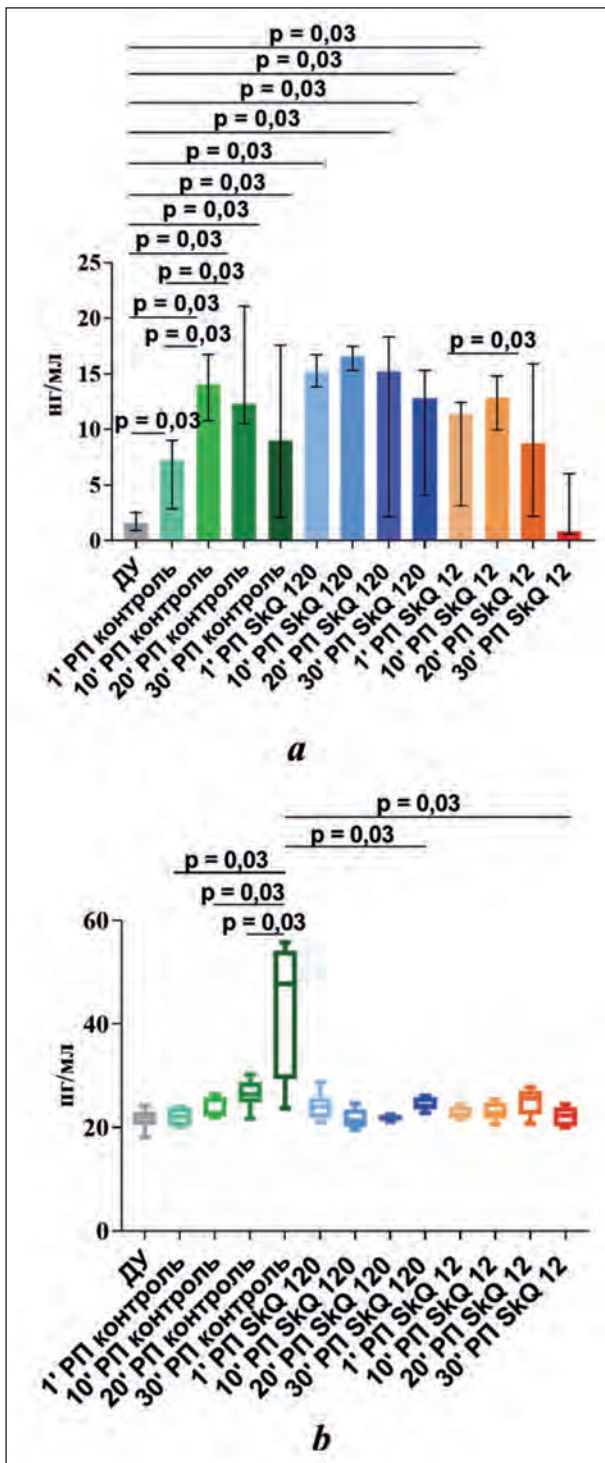


Рис. 5. Высокоспецифичные маркеры повреждения миокарда. *a* — сердечный белок, связывающий жирные кислоты; *b* — сердечный тропонин I.

СКП восстановилась к 10-й минуте реперфузии только в группе «SkQ1 12» и оставалась равной 11,0 [8,4; 12,0] мл/мин к концу эксперимента. В группе «SkQ1 120» наблюдали снижение СКП на 14,4 % относительно исходного уровня — 10,4 [10,0; 11,8] мл/мин (рис. 6, *c*). Использование более низкой концентрации ан-

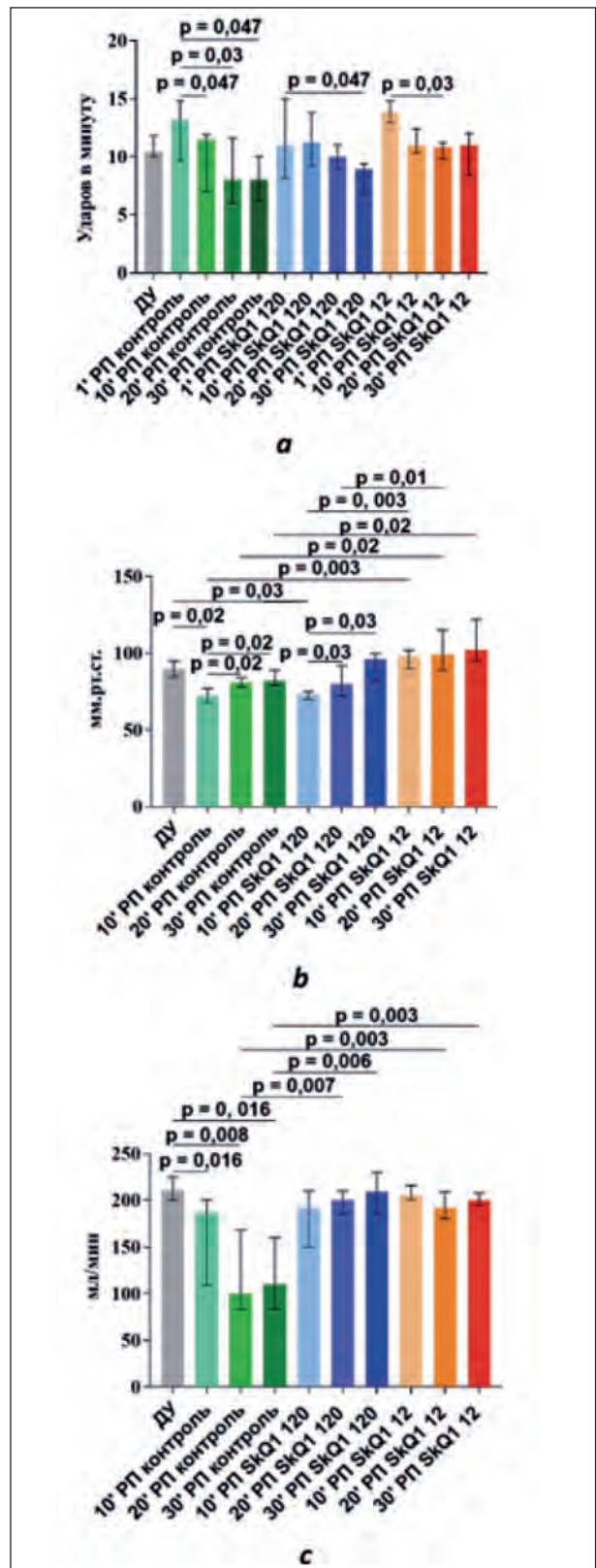


Рис. 6. Физиологические показатели деятельности изолированного сердца крысы.

a — частота сердечных сокращений; *b* — систолическое давление; *c* — скорость коронарного протока.

тиоксиданта оказалось эффективнее в отношении восстановления сердечных показателей. В исследованиях под руководством профессора

В. И. Капелько также отмечены положительные эффекты SkQ1 в отношении поддержки сократительной функции миокарда в экспериментах *in vivo* [23]. Нарушения ритма на 1–2-й минуте в каждой группе исследования отметили в 100% наблюдений. В группе «SkQ1 120» отметили 40 % частоту появления краткосрочных периодов аритмий в период с 15-й по 30-ю минуту реперфузии, тогда как в «SkQ1 12» — только в 1 случае. Контрольная группа характеризовалась максимальным количеством аритмий — 50%, в 1 случае нарушения ритма сердца сохранялись с 16-й по 30-ю минуту реперфузии. Полученные нами результаты согласуются с данными В. И. Капелько и В. Л. Лакомкина, которым удалось значительно снизить выраженность аритмий изолированного сердца при минимальных дозировках SkQ1 [24]. Bakeeva L. E. с коллегами в исследовании на крысах установили также, что при приеме с пищей чрезвычайно низкой дозировки SkQ1 (0,02 нмоль/кг в сутки в течение 3 недель) устранялась сердечная аритмия, а повышение дозировки до

125–250 нмоль/кг в сутки в течение 3 недель уменьшало площадь инфаркта миокарда [25].

Заключение

Модель холодовой кардиологической ишемии/аноксии изолированного миокарда позволяет имитировать состояние сердца при операциях в условиях искусственного кровообращения. Кардиоплегический раствор в сочетании с низкой температурой сердца около +11°C снижает скорость метаболизма сердца в период аноксии, но не сводит к безопасному минимуму накопление продуктов окислительного стресса. Антиоксидантная поддержка SkQ1 в концентрации 12 нг/мл, оказанная до периода аноксии, максимально эффективно нейтрализовала АФК, предупреждала увеличение уровня молекулярных маркеров повреждения миокарда и восстанавливала его сократимость в реперфузионном периоде. Минимальные дозы митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 оказывают кардиопротективное действие.

Литература

- Suleiman M.S., Zacharowski K., Angelini G.D. Inflammatory response and cardioprotection during open-heart surgery: the importance of anaesthetics. *Br J Pharmacol.* 2008; 153 (1): 21–33. DOI: 10.1038/sj.bjp.0707526. PMID: 17952108.
- Bartels K., Karhausen J., Clambey E.T., Grenz A., Eltzschig H.K. Perioperative organ injury. *Anesthesiology.* 2013; 119 (6): 1474–1489. DOI: 10.1097/ALN.0000000000000022. PMID: 24126264.
- Betteridge D.J. What is oxidative stress? *Metabolism.* 2000; 49 (2 Suppl 1): 3–8. DOI: 10.1016/s0026-0495 (00)80077-3. PMID: 10693912.
- Skulachev M.V., Antonenko Y.N., Anisimov V.N., Chernyak B.V., Cherepanov D.A., Chistyakov V.A., Egorov M.V., Kolosova N.G., Korshunova G.A., Lyamzaev K.G., Plotnikov E.Y., Roginsky V.A., Savchenko A.Y., Severina I.I., Severin F.F., Shkurat T.P., Tashlitsky V.N., Shidlovsky K.M., Vyssokikh M.Yu., Zamyatnin A.A. Jr., Zorov D.B., Skulachev V.P. Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives. Effect on senescence and acute age-related pathologies. *Curr Drug Targets.* 2011; 12 (6): 800–826. DOI: 10.2174/138945011795528859. PMID: 21269268.
- Anisimov V.N., Egorov M.V., Krasilshchikova M.S., Lyamzaev K.G., Mansikh V.N., Moshkin M.P., Novikov E.A., Popovich I.G., Rogovin K.A., Shabalina I.G., Shekarova O.N., Skulachev M.V., Titova T.V., Vygodin V.A., Vyssokikh M.Yu., Yurova M.N., Zabezhinsky M.A., Skulachev V.P. Effects of the mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 on lifespan of rodents. *Aging (Albany NY).* 2011; 3 (11): 1110–1119. DOI: 10.18632/aging.100404. PMID: 22166671.
- Яни Е.В., Катаргина Л.А., Чеснокова Н.Б., Безнос О.В., Савченко А.Ю., Выгодин В.А., Гудкова Е.Ю., Замятнин А.А., Скулачев М.В. Первый опыт использования препарата Визомитин® в терапии «сухого глаза». *Практическая медицина.* 2012; 4 (59): 134–137. УДК: 615: 617.764.1-008.811.4 [Yani E.V., Katargina L.A., Chesnokova N.B., Beznos O.V., Savchenko A.Yu., Vygodin V.A., Gudkova E.Yu., Zamyatnin A.A., Skulachev M.V. The first experience of using the drug Visomitin® in the therapy of «dry eyes». *Practical medicine/Prakticheskaya medicina.* 2012; 4 (59): 134–137. (in Russ.). UDC: 615: 617.764.1-008.811.4].
- Егоров Е.А. Особенности терапии синдрома «сухого глаза». *РМЖ. Клиническая офтальмология.* 2018; 3: 146–149. DOI: 10.21689/2311-7729-2018-18-3-146-149. [Egorov E.A. Features of dry eye syndrome treatment. *RMJ. Clinical ophthalmology/RMJ. Klinicheskaya oftalmologiya.* 2018; 3: 146–149. (in Russ.). DOI: 10.21689/2311-7729-2018-18-3-146-149].
- Gu Y., Han J., Jiang C., Zhang Y. Biomarkers, oxidative stress and autophagy in skin aging. *Ageing Res Rev.* 2020; 59: 101036. DOI: 10.1016/j.arr.2020.101036. PMID: 32105850.
- Усков А.И., Ускова Л.Б., Кравченко Д.В., Галушка П.А., Закабунина Е.Н. Регуляция процессов физиологического старения при длительном репродукции картофеля. *Земледелие.* 2018; 5: 40–44. DOI: 10.24411/0044-3913-2018-10511. [Uskov A.I., Uskova L.B., Kravchenko D.V., Galushka P.A., Zakabunina E.N. Regulation of physiological aging processes during long-term potato reproduction. *Agriculture/Zemledelije.* 2018; 5: 40–44. (in Russ.). DOI: 10.24411/0044-3913-2018-10511].
- Ловать М.Л., Аврущенко М.Ш., Аверина О.А., Павшинцев В.В., Острова И.В., Заржецкий Ю.В., Мороз В.В., Егоров М.В. Действие антиоксиданта SkQ1 на структурнофункциональное состояние мозга в постреанимационном периоде. *Общая реаниматология.* 2016; 12 (2): 6–19. DOI: 10.15360/1813-9779-2016-2-6-19 [Lovat M.L., Avrushchenko M.Sh., Awerina O.A., Pavshintsev V.V., Ostrava I.V., Zarzhetsky Y.V., Moroz V.V., Egorov M.V. Effect of SkQ1 antioxidant on structural and functional conditions of the brain in postresuscitation period. *General Reanimatology/ Obshchaya reanimatologiya.* 2016; 12 (2): 6–19. (in Russ.). DOI: 10.15360/1813-9779-2016-2-6-19].
- Sponga S., Bonetti A., Ferrara V., Beltrami A.P., Isola M., Vendramin I., Finato N., Ortolani F., Livi U. Preservation by cold storage vs ex vivo normothermic perfusion of marginal donor hearts: clinical, histopathologic, and ultrastructural features. *J Heart Lung Transplant.* 2020; 39 (12): 1408–1416. DOI: 10.1016/j.healun.2020.08.021. PMID: 33041182.
- Сенокосова Е.А., Крутицкий С.С., Великанова Е.А., Цепкина А.В., Кузьмина А.А., Третьяк В.М., Денисова С.В., Груздева О.В., Антонова Л.В., Григорьев Е.В. Применение левосимендана и фосфокреатина в целях коррекции ишемических и реперфузионных повреждений миокарда: экспериментальное исследование *ex vivo*. *Анестезиология и реаниматология.* 2019. 2: 67–74. DOI: 10.17116/anaesthesiology201902167. [Senokosova E.A., Krutitsky S.S., Velikanova E.A., Tsepokina A.V., Kuzmina A.A., Tretyak V.M., Denisova S.V., Gruzdeva O.V., Antonova L.V., Grigoriev E.V. Levosimendan and phosphocreatin administration for the correction of myocardial ischemic — reperfusion injury: experimental research *ex vivo*. *Anesthesiology and intensive care/Anesteziology i reanimatologiya.* 2019. 2: 67–74. (in Russ.). DOI: 10.17116/anaesthesiology201902167].
- Antonenko Y.N., Roginsky V.A., Pashkovskaya A.A., Rokitskaya T.I., Kotova E.A., Zasp A.A., Chernyak B.V., Skulachev V.P. Protective effects of mitochondria-targeted antioxidant SkQ in aqueous and lipid membrane environments. *J Membr Biol.* 2008; 222 (3): 141–149. DOI: 10.1007/s00232-008-9108-6. PMID: 18493812.
- Anisimov V.N., Egorov M.V., Krasilshchikova M.S., Lyamzaev K.G., Mansikh V.N., Moshkin M.P., Novikov E.A., Popovich I.G., Rogovin K.A., Shabalina I.G., Shekarova O.N., Skulachev M.V., Titova T.V., Vygodin V.A., Vyssokikh M.Yu., Yurova M.N., Zabezhinsky M.A., Skulachev V.P. Effects of the mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 on lifespan of rodents. *Aging (Albany NY).* 2011; 3 (11): 1110–1119. DOI: 10.18632/aging.100404. PMID: 22166671.
- Antonenko Y.N., Avetisyan A.V., Bakeeva L.E., Chernyak B.V., Chertkov V.A., Domnina L.V., Ivanova O.Yu., Izyumov D.S., Khailova L.S., Klislin S.S., Korshunova G.A., Lyamzaev K.G., Muntyan M.S., Nepryakhina O.K., Pashkovskaya A.A., Pletjushkina O.Yu., Pustovidko A.V., Roginsky V.A., Rokitskaya T.I., Ruuge, E.K., Saprunova V.B., Severina I.I., Simonyan R.A., Skulachev I.V., Skulachev M.V., Sumbatyan N.V., Sviryaeva I.V., Tashlitsky V.N., Vassiliev J.M., Vyssokikh M.Yu., Yaguzhinsky L.S., Zamyatnin A.A. Jr., Skulachev V.P. Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 1. Cationic plastoquinone derivatives: synthesis and *in vitro* studies. *Biochemistry (Mosc).* 2008; 73 (12): 1273–1287. DOI: 10.1134/s0006297908120018. PMID: 19120014.

16. Hamed M., Logan A., Gruszczak A.V., Beach T.E., James A.M., Dare A.J., Barlow A., Martin J., Georgakopoulos N., Gane A.M., Crick K., Fouto D., Fear C., Thiru S., Dolezalova N., Ferdinand J.R., Clatworthy M.R., Hosgood S.A., Nicholson M.L., Murphy M.P., Saeb-Parsy K. Mitochondria-targeted antioxidant MitoQ ameliorates ischaemia-reperfusion injury in kidney transplantation models. *Br J Surg.* 2021; 108 (9): 1072 — 1081. DOI: 10.1093/bjs/zxab108. PMID: 33963377.
17. Сергеева Е.А., Крутицкий С.С., Великанова Е.А., Цепоккина А.В., Кузьмина А.А., Груздева О.В., Антонова Л.В., Григорьев Е.В. Диагностическая значимость оптической биопсии миокарда для оценки выраженности ишемического и реперфузионного повреждения. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний.* 2016; 5 (3): 10–15. DOI: 10.17802/2306-1278-2016-3-10-15. [Sergeeva E.A., Krutitskiy S.S., Velikanova E.A., Tsepokina A.V., Kuzmina A.A., Gruzdeva O.V., Antonova L.V., Grigoriev E.V. Diagnostic significance of optical myocardial biopsy to assess the severity of ischemic and reperfusion injury. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases/ Kompleksnye Problemy Serdechno-Sosudistykh Zabolevaniy.* 2016; (3): 10–15. (In Russ.). DOI: 10.17802/2306-1278-2016-3-10-15].
18. Tomomi G., Masataka M. Nitric oxide and endoplasmic reticulum stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26 (7): 1439–1446. DOI: 10.1161/01.ATV.0000223900.67024.15. PMID: 16645155.
19. Беленичев И.Ф. Рациональная нейропротекция: в монографии: Беленичев И.Ф., Черный В.И., Колесник Ю.М., Павлов С.В., Андронova И.А., Абрамов А.В., Островая Т.В., Бухтиярова Н.В., Кучеренко Л.И. Донецк: Издатель Заславский А.Ю.; 2009: 262. ISBN 978-611-7001-00-0. [Belenichev I.F. Rational neuroprotection: in the monograph: Belenichev I.F., Cherniy V.I., Kolesnik Yu.M., Pavlov S.V., Andronova I.A., Abramov A.V., Ostrovaya T.V., Bukhtiyarova N.V., Kucherenko L.I. Donetsk: Publisher Zaslavsky A.Yu.; 2009: 262. ISBN 978-611-7001-00-0].
20. Weismann D., Binder C.J. The innate immune response to products of phospholipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta.* 2012; 1818 (10): 2465–2475. DOI: 10.1016/j.bbame.2012.01.018. PMID: 22305963.
21. Balaban R.S., Nemoto S., Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell.* 2005; 120 (4): 483–495. DOI: 10.1016/j.cell.2005.02.001. PMID: 15734681.
22. Mizobuti D.S., Fogaça A.R., Moraes F.D.S.R., Moraes L.H.R., Mancio R.D., Hermes T.A., Macedo A.B., Valduga A.H., de Lourenco C.C., Pereira E.C.L., Minatel E. Coenzyme Q10 supplementation acts as antioxidant on dystrophic muscle cells. *Cell Stress Chaperones.* 2019; 24 (6): 1175–1185. DOI: 10.1007/s12192-019-01039-2. PMID: 31620981.
23. Абрамов А.А., Лакомкин В.Л., Просвирнин А.В., Лукошкова Е.В., Капелько В.И. Улучшение функции сердца под влиянием митохондриального антиоксиданта пластомитина при доксорубициновой кардиомиопатии. *Кардиология.* 2019; 59 (6): 35–41. DOI: 10.18087/cardio.2019.6.2649. [Abramov A.A., Lakomkin V.L., Prosvirnin A.V., Lukoshkova E.V., Kapelko V.I. Mitochondrial antioxidant plastoquinone improves cardiac function in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Kardiologiya.* 2019; 59 (6): 35–41. (in Russ.). DOI: 10.18087/cardio.2019.6.2649. PMID: 31242839].
24. Лакомкин В.Л., Капелько В.И. Профилактический эффект нового антиоксиданта SkQ1 на аритмии при окислительном стрессе. *КардиоСоматика.* 2011; 2 (2): 105–110. eLIBRARY ID: 16542330. [Lakomkin V.L., Kapelko V.I. Prophylactic effect of new antioxidant SkQ1 on arrhythmias at oxidative stress. *Cardiosomatics/ CardioSomatika.* 2011; 2 (2): 105–110. (in Russ.). eLIBRARY ID: 16542330].
25. Bakeeva L.E., Barskov I.V., Egorov M.V., Isaev N.K., Kapelko V.I., Kazachenko A.V., Kirpatovsky V.I., Kozlovsky S.V., Lakomkin V.L., Levina S.B., Pisarenko O.I., Plotnikov E.Y., Saprunova V.B., Serebryakova L.I., Skulachev M.V., Stelmashook E.V., Studneva I.M., Tskitshvili O.V., Vasilyeva A.K., Victorov I.V., Zorov D.B., Skulachev V.P. Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 2. Treatment of some ROS- and age-related diseases (heart arrhythmia, heart infarctions, kidney ischemia, and stroke). *Biochemistry (Mosc).* 2008; 73 (12): 1288–299. DOI: 10.1134/s000629790812002x. PMID: 19120015.

Поступила 08.04.2022

[https:// 10.36396/MS.2020.62.62.004](https://10.36396/MS.2020.62.62.004)

Митохондриальный антиоксидант пластомитин изменяет энергетический статус и предотвращает развитие систолической дисфункции при доксорубициновой кардиомиопатии

В.Л. ЛАКОМКИН, И.М. СТУДНЕВА, А.А. АБРАМОВ, А.В. ПРОСВИРНИН, О.М. ВЕСЕЛОВА, Е.В. ЛУКОШКОВА, О.И. ПИСАРЕНКО, В.И. КАПЕЛЬКО

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава России, Москва

Резюме

Цель исследования. Настоящая работа предпринята с целью изучения влияния митохондриального антиоксиданта пластомитина (ПМ, препарат SkQ1) на энергетическое состояние и функцию сердца крыс с кардиомиопатией, вызванной введением доксорубина (ДОКС).

Материалы и методы. Использовали крыс-самцов вистар, которым вводили подкожно ДОКС (2 мг/кг/нед.) в течение 5 недель (группа ДОКС). Животным группы ДОКС+ПМ наряду с доксорубицином 5 недель подкожно вводили ПМ в дозе 0,32 мг/кг ежедневно. Контрольной группе животных в течение 5 недель вводили такой же объем физиологического раствора. Перед началом введения препаратов и через 8 недель у всех крыс была выполнена эхокардиография (ЭхоКГ) левого желудочка (ЛЖ). Дополнительно у части животных была изучена сократительная функция ЛЖ при помощи PV-катетера. Содержание адениннуклеотидов (АТФ, АДФ и АМФ), фосфокреатина (ФКр), креатина (Кр) и лактата в безбелковых экстрактах сердец определяли энзиматическими методами. Дыхание митохондрий в скинированных сапонином волокнах ЛЖ определяли полярографическим методом.

Результаты. В конце исследования у животных группы ДОКС фракция выброса и фракция укорочения были достоверно снижены, а диастолический объем ЛЖ уменьшен по сравнению с этими показателями в контрольной группе. В группе ДОКС+ПМ фракция выброса, фракция укорочения, индекс сократимости миокарда, максимальная скорость развития давления и работа сердца были выше, чем в группе ДОКС, и недостоверно отличались от величин в контроле. Эти изменения сочетались с достоверным увеличением в сердце содержания общего фонда адениннуклеотидов и креатина животных группы ДОКС+ПМ по сравнению с этими показателями у животных, получавших только ДОКС. Показатели скорости дыхания митохондрий в волокнах ЛЖ, выделенных из сердец животных группы ДОКС+ПМ, были выше, чем в группе ДОКС.

Заключение. Применение ПМ предотвращало развитие систолической дисфункции у животных, получавших ДОКС. Это было связано с улучшением окислительного фосфорилирования и сохранением фонда адениннуклеотидов в сердце.

Ключевые слова: доксорубин, пластомитин, кардиомиопатия, крыса, ХСН, энергетический обмен, сократимость миокарда.

Mitochondrial antioxidant plastomitin alters the myocardial energy state and prevented the development of systolic dysfunction in doxorubicin-induced cardiomyopathy

V.L. LAKOMKIN, I.M. STUDNEVA, A.A. ABRAMOV, A.V. PROSVIRNIN, O.M. VESELOVA, E.V. LUKOSHKOVA, O.I. PISARENKO, V.I. KAPELKO

National Medical Research Center for Cardiology, Moscow, Russia

Summary

Aim. This study was designed to explore effects of the mitochondrial antioxidant plastomitin (PM) on the energy state and heart function of rats with cardiomyopathy induced by doxorubicin (Dox) administration.

Material and methods. Male Wistar rats were injected subcutaneously with Dox (2 mg / kg / weekly) for 5 weeks (Dox group). Animals of the Dox + PM group were subcutaneously injected with PM for 5 weeks at a dose of 0.32 mg/kg daily along with Dox. The control group of animals was injected for 5 weeks with the same volume of saline. Before the administration of drugs and after 8 weeks of the study, all rats were underwent echocardiography of the left ventricle (LV). Additionally, the LV contractile function was studied using a PV catheter in some animals. The contents of adenine nucleotides (ATP, ADP and AMP), phosphocreatine (PCr), creatine (Cr) and lactate in protein-free extracts of hearts were determined by enzymatic methods. Mitochondrial respiration in saponin-skinned LV fibers was determined using the polarographic method.

Results. At the end of the study, in animals of Dox group, the ejection fraction, fractional shortening and LV diastolic volume were significantly reduced in comparison with these indices in the control group. In Dox + PM group, the ejection fraction, fractional shortening, myocardial contractility index, maximum rate of pressure development and heart work were significantly higher than in Dox group and did not differ from the control values. These functional alterations were combined with a significant increase in the content of myocardial adenine nucleotide pool and creatine in animals of Dox + PM group compared with these parameters in animals treated with Dox alone. The rate of mitochondrial respiration in LV fibers isolated from the hearts of animals of Dox + PM group was higher than in Dox group.

Conclusion. Treatment with PM prevented the development of LV systolic dysfunction in animals received Dox. This beneficial effect was due to an improvement in oxidative phosphorylation and preservation of myocardial adenine nucleotide pool.

Keywords: doxorubicin, plastoquinone, cardiomyopathy, rat, CHF, energy exchange, myocardial contractility.

Сведения об авторах:

Лаборатория экспериментальной патологии сердца Института экспериментальной кардиологии ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России:

Лакоткин Владимир Леонидович — к. м. н., в. н. с., тел.: (495) 414-67-55. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5155-7699>

Капелько Валерий Игнатьевич — д. м. н., проф., гл. н. с., тел.: (495) 414-67-54. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3096-7434>

Абрамов Александр Александрович — н. с., тел.: (495) 414-67-55. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8294-8273>

Лукошкова Елена Владимировна — д. м. н., в. н. с., тел.: (495) 414-67-51. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1564-3469>

Лаборатория метаболизма сердца Института экспериментальной кардиологии ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России:

Студнева Ирина Михайловна — к. б. н., в. н. с., тел.: (495) 414-67-37. ORCID: 0000-0002-7904-3817.

Писаренко Олег Иванович — д. б. н., гл. н. с., тел.: (495) 414-67-64. ORCID: 0000-0002-1894-5761.

Веселова Оксана Михайловна — к. б. н., с. н. с., тел.: (495) 414-67-37. ORCID: 0000-0002-9132-8866.

Отдел ультразвуковых методов исследования Института клинической кардиологии им. А.Л. Мясникова ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России:

Провирнин Антон Викторович — врач функциональной диагностики отдела ультразвуковых методов исследования ИКК им. А.Л. Мясникова, тел.: (495) 414-67-49. E-mail: fo_ton@mail.ru

Введение

Сократительная функция кардиомиоцитов обеспечивается взаимодействием трех клеточных систем — системой ионного транспорта, сократительного аппарата и митохондриями, поставляющими энергию для этих систем. Ключевым звеном в этой системе являются ионы Ca^{++} . Повышение их уровня в миоплазме при возбуждении активирует акт сокращения миофибрилл, и одновременно часть ионов Ca^{++} попадает в митохондрии, где Ca^{++} выступает в роли активатора некоторых ключевых ферментов цикла Кребса [1], ускоряя темп синтеза АТФ. Если же по каким-то причинам митохондрии не смогут поставлять нужное количество АТФ для сокращения-расслабления, возникает опасность нерегулируемого повышения Ca^{++} в цитоплазме — это чревато возникновением аритмий или гибелью клетки. Поэтому митохондрии постоянно контролируют количество Ca^{++} -активатора посредством выделения супероксида, обязательно образующегося при прохождении молекул кислорода по электронно-транспортной цепи митохондрий.

Тиоловые группы цистеина белков СР и кальциевых каналов очень чувствительны к редокс-регуляторам [2, 3]. При этом супероксид, окисляя тиоловые группы в умеренных дозах, облегчает выход Ca^{++} из саркоплазматического ретикулума, а в повышенных дозах оказывает противоположное действие. Поэтому в условиях окислительного стресса митохондрии ограничивают выделение Ca^{++} из ретикулума, чтобы снизить функцию и ограничить энергозатраты.

Окислительный стресс в миокарде закономерно возникает в условиях гипоксии-реоксигенации, ишемии-реперфузии, а также при повреждении митохондрий. Одним из распространенных факторов повреждения митохондрий миокарда является эффективный антиопухольный антибиотик доксорубин, применение которого вызывает развитие кардиомиопатии [4]. В результате доксорубин изменяет энергетическую кардиомиоцитов, снижая способность митохондрий к окислительному фосфорилированию и нарушая перенос энергии из митохондрий к мио-

фибриллам [5]. Для уменьшения степени повреждения миокарда мы решили использовать синтезированный в МГУ митохондриально-ориентированный антиоксидант SkQ1 (коммерческий препарат пластомилин, ПМ) [6]. Он проникает в клетки и затем в митохондрии благодаря слабому положительному заряду трифенилфосфония, перенося туда молекулу пластохинона — мощного растительного антиоксиданта. Препарат SkQ1 значительно уменьшал аритмии, вызванные пероксидом водорода [6], а также уменьшал размеры инфаркта миокарда при ишемии и реперфузии [7] и улучшал восстановление функции сердца после ишемии-реперфузии [8]. Однако исследования, выполненные с применением митохондриальных антиоксидантов при ХСН, в современной литературе отсутствуют. В связи с этим целью данной работы состояла в изучении влияния введения ПМ в организм лабораторных животных на повреждения метаболизма и функции сердца, возникающие при длительном применении ДОКС.

Методика

В работе использованы крысы-самцы вистар весом 250–300 г. Исходно было отобрано 34 животных. Все манипуляции с лабораторными животными производили в соответствии с Международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными, с требованиями этического комитета ФГБУ «НМИЦ кардиологии» МЗ РФ и принципами национального стандарта ГОСТП 53434-2009. Крыс после ЭхоКГ разделили на 3 группы: 10 — в контрольной и по 12 голов в экспериментальных группах с ДОКС и ДОКС+ПМ. ДОКС (Адриабластин, Pfizer, Германия) вводили подкожно в дозе 2 мг/кг еженедельно в течение 5 недель, причем половина животных наряду с ДОКС подкожно получала ПМ в дозе 0,32 мг/кг ежедневно. Животным контрольной группы 5 недель вводили подкожно равный объем физиологического раствора. Перед началом введения препаратов и через 8 недель у всех крыс была выполнена эхокардиография (ЭхоКГ).

Трансторакальная ЭхоКГ была выполнена на аппарате фирмы FUJIFILM VisualSonics модель Vevo 1100 (Нидерланды) с линейным датчиком 13–24 МГц и максимальной глубиной лоцирования 30 мм. У крыс под наркозом (Золетил 100, Virbac Sante Animale, Франция, 5 мг/кг) выбривали переднюю стенку грудной клетки, использовали парастернальный доступ по короткой и длинной осям. В В-режиме измеряли диастолические и систолические размеры ЛЖ, на их основе рассчитывали объем ЛЖ в диастоле и систоле, толщину стенок, а также фракцию выброса. Полученные изображения сохраняли на приборе Vevo 1100 для дальнейшего анализа и затем их архивировали на внешних носителях.

Инвазивное исследование сократительной функции сердца выполняли у наркотизированных (Золетил 100, 5 мг/кг) крыс при помощи стандартного PV-катетера FTH-1912B-8018, усилителя ADV 500 (Trasonic, Канада), а также АЦП PowerLab 4/35 с программой LabChart 8.1 (ADInstruments, Австралия). Левый желудочек (ЛЖ) катетеризировали через правую сонную артерию PV-катетером, а яремную вену — полиэтиленовым катетером PE-60. Регистрацию параметров гемодинамики и сократительной функции начинали после поиска оптимального места расположения измерительного катетера в ЛЖ путем перемещения вдоль длинной оси желудочка.

Для изучения энергетических метаболитов у части животных под наркозом выполняли торакотомию и быстро замораживали сердца щипцами Волленбергера, охлажденными в жидком азоте. Замороженную ткань гомогенизировали в холодной 6%-ной HClO_4 (10 мг/г ткани) в гомогенизаторе Ultra-Turrax T-25 (IKA-Labortechnik, Германия). Белки осаждали центрифугированием (центрифуга Sorvall RT1, Thermo Fisher Scientific, США) при 2800 g в течение 10 минут при 40 °С. Супернатанты нейтрализовали 5 М K_2CO_3 до pH 7,4. Осадок KClO_4 отделяли центрифугированием в тех же условиях. Безбелковые экстракты хранили при –200 °С до определения метаболитов. Сухой вес гомогенизированной ткани определяли после высушивания образцов в течение суток при 110 °С. АТФ и ФКр в тканевых экстрактах определяли энзиматически, используя глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу, гексокиназу и креатинкиназу [9]. Содержание АДФ и АМФ в тканевых экстрактах определяли с помощью миокиназы, пируваткиназы и лактатдегидрогеназы [10]. Для определения креатина использовали сопряженные реакции с креатинкиназой, пируваткиназой и лактатдегидрогеназой [11]. Лактат определяли с помощью лактатдегидрогеназы [12]. Измерения выполнены на спектрофотометре Shimadzu UV-1800 (Япония). Содержание метаболитов выражали в мкмоль/г сухого веса. Измерения, выполненные после опыта, занимали несколько больше времени в связи с необходимостью аккуратного удаления катетера из ЛЖ. Скинирование сапонином волокон из миокарда ЛЖ проводили как указано в работе [13]. Исследуемую часть ЛЖ сердца крысы вырезали и немедленно помещали в охлажденный раствор А, содержащий 2,77 мМ CaK_2EGTA , 7,23 мМ K_2EGTA , 6,56 мМ $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,5 мМ DTT, 50 мМ KMES, 20 мМ имидазол, 20 мМ таурин, 5,3 мМ АТР, 15 мМ фосфокреатин (pH=7,1). Выделенные со стороны эндокарда параллельные волокна были разделены на пучки длиной 3–4 мм и толщиной около 1 мм. Волокна инкубировали в растворе А с сапонином (50 мкг/мл) в течение 30 минут при температуре 4 °С и перемешивании с целью частичного скинирования мембраны [14]. Затем пучки волокон отмывали от сапони-

на и инкубировали в течение 30 минут (3 раза по 10 минут) в растворе Б: 2,77 мМ $\text{CaK}_2\text{ЭГТА}$, 7,23 мМ $\text{K}_2\text{ЭГТА}$, 1,38 мМ MgCl_2 , 0,5 мМ DTT, 100 мМ KMES, 20 мМ имидазол, 20 мМ таурин, 3 мМ K_2HPO_4 (pH=7,1), содержащим 2 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, свободного от жирных кислот. Дыхание митохондрий оценивали с помощью электрода Кларка и полярографа Oxygraph plus system (Hansatech Instr., UK) при 22 °С, были выбраны следующие параметры: скорость потребления кислорода на субстратах, в качестве которых использовались 10 мМ глутамат и 5 мМ малат. АДФ-зависимую скорость дыхания стимулировали 2 мМ АДФ. После измерений волокна извлекали из полярографической ячейки, высушивали при температуре +95 °С и затем взвешивали, что позволяло нормировать параметры дыхания на 1 мг сухого веса. Статистическая обработка результатов была выполнена с применением t-теста Стьюдента.

Результаты

Исходные показатели ЭхоКГ в исследуемых группах животных не различались (таблица 1а). В дальнейшем мы сравнивали экспериментальные группы животных с контрольной группой того же помета и возраста, а не с исходными показателями в группах, так как со временем по мере роста животных эти показатели изменялись.

Введение ДОКС сопровождалось задержкой роста животных — их масса незначительно увеличилась по сравнению с исходной и через 8 недель была снижена на 20% по сравнению с контрольными животными. Результаты ЭхоКГ-исследования, выполненного через 8 недель после начала введения ДОКС, показали наличие систолической дисфункции сердца (таблица 1б). Фракция выброса и фракция укорочения были снижены на 22–23%, это сочеталось с уменьшением диастолического объема ЛЖ на 28%.

Крысы, которым одновременно с ДОКС вводили ПМ, также замедляли свой рост, их вес был меньше на 13% по сравнению с контролем, но все же был выше по сравнению с крысами, получавшими только ДОКС. Конечный диастолический объем ЛЖ у них был снижен на 34%, но фракция выброса и фракция укорочения не отличались от контроля и были достоверно выше на 22 и 18% соответственно по сравнению с группой ДОКС. Таким образом, применение ПМ предотвратило развитие систолической дисфункции у животных, получавших ДОКС. Показатель

Таблица 1а. Исходные ЭхоКГ-показатели функции сердца крыс до начала эксперимента

	Контроль	ДОКС	ДОКС+пластомитин
Количество животных	10	12	12
Вес, г	341±20	353±28	319±9
ЧСС/мин.	475±17	459±16	467±34
КДО, мл	0,29±0,08	0,22±0,03	0,26±0,06
ФВ, %	83±3	81±5	76±10
ФУ, %	49±2	48±3	45±6
Е/а	2,08±0,17	2,33±0,31	2,15±0,1

Таблица 1б. ЭхоКГ-показатели функции сердца крыс через 8 недель исследования

	Контроль	ДОКС	ДОКС+ пластомитин
Количество животных	8	12	12
Вес, г	440±15	354±9 ***	383±6 ** #
ЧСС/мин.	432±19	433±5	444±7
КДО, мл	0,29±0,04	0,21±0,01 **	0,19±0,01 **
ФВ, %	71±3	55±2,5 **	67±2,4##
ФУ, %	42±2	33±1,5 **	39±1,4#
E/a	2,37±0,14	2,26±0,05	2,12±0,08

Примечание. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ по сравнению с контролем. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ по сравнению с ДОКС.

E/a, характеризующий скорость быстрого наполнения ЛЖ, был немного снижен в обеих экспериментальных группах по сравнению с контролем.

Измерение показателей энергетического обмена в миокарде, выполненное с помощью быстрого замораживания сердца *in situ* в жидком азоте, показало, что у крыс, получавших ДОКС, уровень АТФ, так же как и общий пул адениннуклеотидов, близок к контрольным величинам (таблица 2). Однако содержание фосфокреатина (ФКр) и отношение ФКр/АТФ было снижено вдвое. Эти изменения сочетались со значительным повышением уровня лактата, что свидетельствует о мобилизации анаэробного гликолиза.

У крыс, которым одновременно с ДОКС вводили ПМ, наблюдалось еще большее снижение ФКр и отношения ФКр/АТФ, а также повышение уровня лактата. Однако наряду с этими типичными для действия ДОКС изменениями были выявлены положи-

тельные изменения в содержании адениннуклеотидов. Их общий пул был выше, чем в контроле, за счет повышенного содержания АДФ. Естественно, что и уровень АДФ, и общий пул адениннуклеотидов были достоверно выше по сравнению с величинами в группе, получавшей только ДОКС. Содержание креатина в группе ДОКС+ПМ было достоверно выше, чем в группе ДОКС и в контроле при неизменном содержании общего креатина.

Также энергетические метаболиты в группе ДОКС были измерены после острого опыта. При этом пул адениннуклеотидов сохранялся, но содержание фосфокреатина и отношение ФКр/АТФ было снижено в три раза по сравнению с этими показателями в группе ДОКС до опыта, а содержание лактата было повышено вдвое, что, вероятно, связано с задержкой извлечения сердца, как указано в методике.

В специальной серии опытов в каждой группе ($n=4$) было измерено дыхание митохондрий в сканированных волокнах ЛЖ. Скорость дыхания в состоянии V4 (в отсутствие АДФ) и V3 (при добавлении АДФ) в миокарде крыс, получавших ДОКС, была снижена по сравнению с контролем (1,0±0,3 и 3,9±1,0 против 1,7±0,2 и 11,8±3,8 нмоль O_2 /мин./мг сухого веса). В группе с добавлением ПМ эти величины составляли соответственно 1,8±0,7 и 6,7±1,8 нмоль O_2 /мин./мг сухого веса, то есть были почти вдвое выше, чем в группе ДОКС.

Катетеризация ЛЖ позволила получить представление о состоянии сократимости миокарда и сократительной функции сердца (таблица 3). Выяснилось, что применение ДОКС не изменило величину минутного объема, отнесенного к единице массы, но существенно изменило параметры функции миокарда. Так, частота сокращений была снижена на 23%, а КДО — на 19%. Фракция выброса была меньше на 24% за счет сниженного индекса сократимости миокарда на 27% и максимальной скорости развития давления более чем вдвое. Естественно, была снижена на 34% и работа сердца. Систолическая дисфункция этих сердец сочеталась, однако, с мало измененной максимальной скоростью выброса из ЛЖ.

Таблица 2. Показатели энергетического метаболизма сердца крыс через 8 недель исследования

	Контроль	ДОКС	ДОКС+ пластомитин	ДОКС
	Перед острым опытом			После острого опыта
Количество животных	3	5	6	10
АТФ	13,7±0,8	10,9±2,0	13,5±1,3	11,2±1,1
АДФ	5,7±0,2	5,7±0,4	7,5±0,4 *#	8,3±0,4
АМФ	1,5±0,4	1,2±0,2	2,6±0,5	3,0±0,3
ΣАН	21,0±0,3	17,8±1,8	23,7±0,9 #	22,1±1,5
ЭЗ	0,79±0,03	0,76±0,04	0,73±0,03	0,69±0,01
ФКр	27,4±0,3	13,1±4,9 *	8,5±2,3 ***	4,3±1,5
Кр	40,3±0,7	38,2±4,1	53,8±2,3 ***#	56,4±2,1***#
ΣКр	67,7±0,9	51,3±4,4 *	62,2±2,9	59,3±2,8
ФКр/АТФ	2,01±0,12	1,01±0,3 *	0,57±0,14 ***	0,31±0,09
Лактат	1,7±0,3	16,7±4,8 *	22,2±6,4 *	36,4±4,9

Примечание. ΣАН — общий фонд адениннуклеотидов (АТФ+АДФ+АМФ), ЭЗ — энергетический заряд кардиомиоцитов (АТФ+0,5АДФ)/ΣАН, ФКр — фосфокреатин, Кр — креатин, ΣКр — общий креатин (ФКр+Кр).

* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ по сравнению с контролем. # $p < 0,05$ по сравнению с группой ДОКС перед опытом.

Таблица 3. Гемодинамические показатели сердца крыс

	Контроль	ДОКС	ДОКС+ пластомитин
Количество животных	7	8	7
Минутный объем, мл/мин./г	0,31±0,02	0,28±0,02	0,27±0,02
Частота сокращений, уд./мин.	361±4	277±15 ***	372±15 #
Конечнодиастолический объем, мл	0,48±0,02	0,39±0,02 *	0,35±0,03 **
Фракция выброса, %	63±2	48±5 *	59±5
Макс. скорость развития давления, мм рт. ст./с	13 290±979	6470±794 ***	10 540±597 #
Индекс сократимости, с-1	128±9	94±6 *	112±5
Работа сердца, мм рт. ст. х мл	44,8±4,2	29,7±3,6 *	31,0±2,1
Конечнодиастолическое давление в ЛЖ, мм рт. ст.	3,0±0,5	5,5±0,9 *	6,6±1,7
Макс. скорость выброса, мл/мин.	11,2±1,1	8,4±0,9	8,6±1,1
Артериальная эластичность Ea, mmHg/ μ L	0,43±0,06	0,29±0,02 *	0,51±0,06 #

Примечание. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ по сравнению с контролем. # $p < 0,001$ по сравнению с группой доксорубина.

Крысы, получавшие ДОКС+ПМ, имели значительно лучшие функциональные показатели. Так, частота сокращений, фракция выброса, индекс сократимости миокарда, максимальная скорость развития давления и работа сердца превышали величины в группе ДОКС и недостоверно отличались от контрольных величин. Показатель артериальной эластичности Ea, сниженный в группе ДОКС на 33%, был нормализован в группе с добавлением ПМ. Таким образом, применение ПМ одновременно с ДОКС предотвратило развитие систолической дисфункции, развивающейся под влиянием этого антрациклина.

Обсуждение

Основной результат данной работы состоит в том, что применение ПМ вместе с ДОКС предотвратило развитие систолической дисфункции при формировании ХСН. Этот впервые полученный результат был подтвержден как при неинвазивном (ЭхоКГ), так и при инвазивном (катетеризация ЛЖ) исследовании. Отличительными чертами действия ПМ являются сохранение высокой частоты сокращений, усиление сократимости миокарда и повышение артериальной эластичности при уменьшенном объеме ЛЖ. Обсуждение особенностей ремоделирования сердца при действии ПМ выполнено в другой статье [15].

Можно было ожидать, что повышение сократимости миокарда связано с улучшением энергетического состояния миокарда. Однако показатели энергетического обмена в миокарде этой группы оказались не лучшими по сравнению с группой животных, получавших только ДОКС. Более того, содержание фосфокреатина и отношение ФКр/АТФ в группе ДОКС+ПМ было еще ниже, чем в группе ДОКС. Неожиданным для действия ПМ было повышение уровня АДФ и общего фонда адениннуклеотидов не только по сравнению с группой ДОКС, но и с контролем. Причиной такого накопления адениннуклеотидов при значительно сниженном уровне фосфокреатина, вероятно, является нарушение преобразования молекул АТФ в ФКр, осуществляемое митохондриальной креатинфосфокиназой (МтКФК).

Действительно, имеются сведения о нарушении функции этого фермента при доксорубициновом повреждении миокарда — наиболее быстро нарушается связывание МтКФК с мембраной митохондрий и снижается ее активность [16]. Эти эффекты, по-видимому, обусловлены связыванием ДОКС с кардиолипином, образующим комплекс с молекулой МтКФК [1, 16]. Наряду с этим нарушается и фосфорилирование АМР киназы, а также ее субстрата ацетил-СоА-карбоксилазы [17]. Очевидным следствием этого является нарушение работы ферментов цикла Кребса с последующим снижением окислительного фосфорилирования, стимулированного как АДФ, так и креатином [18]. Поэтому наши данные, показавшие почти двукратное увеличение скорости дыхания в скинированных волокнах ЛЖ миокарда крыс, получавших ПМ, могут свидетельствовать о меньшей степени повреждения митохондрий. Также и значительно повышенный общий фонд адениннуклеотидов в этой группе предполагает улучшение окислительного фосфорилирования. Кроме того, увеличение содержания креатина в сердцах животных группы ДОКС+ПМ может способствовать уменьшению окислительного стресса, индуцируемого введением ДОКС [19].

Начальное действие ДОКС на кардиомиоциты сопряжено с изменением экспрессии генов, кодирующих ферменты гликолиза и цикла Кребса [20], которое имеет компенсаторный характер. Наблюдаемое в миокарде крыс группы ДОКС повышенное накопление лактата согласуется с таким представлением. Дальнейшее токсическое действие ДОКС на митохондрии кардиомиоцитов, вероятно, неодинаково. Больше всего должны повреждаться поверхностно расположенные субсарколеммальные митохондрии, отличающиеся наиболее высоким содержанием белков (около 50% всего пула) и высокой скоростью синтеза белков [21]. Эти митохондрии отличаются повышенной чувствительностью к физическим нагрузкам и к окислительному стрессу. Они тесно контактируют с мембранами саркоплазматического ретикулума и, вероятно, обеспечивают энергией процесс сопряжения возбуждения с сокращением. Защитное действие ПМ, наблюдаемое в наших опытах при окислительном стрессе или действии адреналина, в наибольшей степени проявлялось именно в предотвращении аритмий [6–8]. Интерфибрилярные митохондрии отличаются наиболее высокой

скоростью дыхания и синтеза АТФ, что вполне объяснимо необходимостью поставлять большие количества АТФ в саркомеры [22]. Поэтому они в большей степени изменяются при длительном действии ДОКС, что проявляется развитием субконтрактуры миокарда и повышением диастолического давления в ЛЖ.

Заключение

Применение митохондриального антиоксиданта ПМ предотвратило развитие у крыс систолической дисфункции, вызванной длительным введением ДОКС. Защитное действие ПМ проявлялось в сохранении частоты сокращений, увеличении сократимости миокарда и повышении артериальной эластичности. Эти эффекты сочетались с изменением энергетического состояния сердца: более высоким содержанием АДФ и общего фонда адениннуклеотидов и четкой тенденцией к увеличению скорости дыхания митохондрий в волокнах ЛЖ. Эти результаты свидетельствуют о целесообразности дальнейшего изучения возможности снижения дисфункции ЛЖ, вызванной химиотерапией антрациклинами, с помощью этого соединения.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ №18-015-00271 и № 18-015-00008.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Mitry M.A., Edwards J.G. Doxorubicin induced heart failure: Phenotype and molecular mechanisms. *International Journal of Cardiology. Heart & Vasculture*. 2016; 10: 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.ijcha.2015.11.004>
2. Singal P.K., Iliskovic N., Li T., Kumar D. Adriamycin cardiomyopathy: pathophysiology and prevention. Federation of American Societies for Experimental. *Biology Journal*. 1997; 11: 931–936. <https://doi.org/10.1096/fasebj.11.12.9337145>
3. Nohl H., Gille L., Staniek K. The exogenous NADH dehydrogenase of heart mitochondria is the key enzyme responsible for selective cardiotoxicity of anthracyclines. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 1998; 53 (3–4): 279–85.
4. Tokarska-Schlattner M., Wallimann T., Schlattner U. Alterations in myocardial energy metabolism induced by the anti-cancer drug doxorubicin. *Comptes Rendus Biologies*. 2006; 329 (9): 657–668. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2005.08.007>
5. Skulachev V.P., Anisimov V.N., Antonenko Yu.N., Bakeeva L.E., Chernyak B.V., Elichev V.P., Filenko O.F., Kalinina N.I., Kapelko V.I., Kolosova N.G., Kopnin B.P., Korshunova G.A., Lichinitser M.R., Obukhova L.A., Pasyukova E.G., Pisarenko O.I., Roginsky V.A., Ruuge E.K., Senin I.I., Severina I.I., Skulachev M.V., Spivak I.M., Tashlitsky V.N., Tkachuk V.A., Vyssokikh M.Yu., Yaguzhinsky L.S., Zorov D.B. An attempt to prevent senescence: A mitochondrial approach. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009; 1787: 437–461. <https://doi.org/10.1016/j.bbabo.2008.12.008>
6. Бакеева Л.Е., Барсков И.В., Егоров М.В., Исаев Н.К., Капелько В.И., Казаченко А.В., Кирпатовский В.И., Козловский С.В., Лакомкин В.Л., Левина С.В., Писаренко О.И., Плотников Е.Ю., Сапрунова В.Б., Серебрякова Л.И., Скулачев М.В., Стельмашук Е.В., Студнева И.М., Цитишвили О.В., Васильева А.К., Викторов И.В., Зоров Д.Б., Скулачев В.П. Производное пластохинона, адресованное в митохондрии, как средство, прерывающее программу старения. Терapiя некоторых старческих патологий, опосредованных АФК (сердечной аритмии, инфарктов сердца и почки и инсульта головного мозга). *Биохимия*. 2008; 73 (12): 1607–1621. [Bakeeva L.E., Barskov I.V., Egorov M.V., Isaev N.K., Kapelko V.I., Kazachenko A.V., Kirpatovskiy V.I., Kozlovskiy S.V., Lakomkin V.L., Levina S.B., Pisarenko O.I., Plotnikov E.Yu., Saprunova V.B., Serebryakova L.I., Skulachev M.V., Stelmashuk E.V., Studneva I.M., Tskitishvili O.V., Vasil'eva A.K., Viktorov I.B., Zorov D.B., Skulachev V.P. Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 2. Treatment of some ROS- and age-related diseases (heart arrhythmia, heart infarctions, kidney ischemia, and stroke). *Biochemistry (Mosc)*. 2008; 73 (12): 1288–99. (In Russ.)].DOI: 10.1134/s000629790812002x
7. Лакомкин В.Л., Абрамов А.А., Капелько В.И. Митохондриальный антиоксидант SkQ1 уменьшает интенсивность желудочковых аритмий,

Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования: В.И. Капелько, О.И. Писаренко.

Сбор и обработка материала: В.Л. Лакомкин, А.А. Абрамов, И.М. Студнева, А.В. Просвирнин, Е.В. Лукошкова, О.М. Веселова.

Статистическая обработка: И.М. Студнева, Е.В. Лукошкова, А.А. Абрамов.

Написание текста: В.И. Капелько, О.И. Писаренко, В.Л. Лакомкин.

Редактирование: В.И. Капелько, И.М. Студнева, Е.В. Лукошкова, В.Л. Лакомкин, О.И. Писаренко.

Автор, ответственный за контакт с редакцией: Лакомкин Владимир Леонидович (Lakomkin Vladimir Leonidovich),

Раб. тел.: (495) 414-67-55.

Моб. тел.: 8 (916) 089-22-40.

E-mail: v.lakomkin@yandex.ru

Все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Поступила 15.12.2019

Принята в печать 29.12.2019

1. вызванных адреналином. *Кардиология*. 2011; 51 (11): 69–73. ISSN: 0022-9040 [Lakomkin V.L., Abramov A.A., Kapelko V.I. Mitochondrial antioxidant SkQ1 reduces the intensity of adrenaline-induced ventricular arrhythmias. *Кардиология*. 2011; 51 (11): 69–73. (In Russ.)]
8. Лакомкин В.Л., Капелько В.И. Защитный эффект митохондриального антиоксиданта SkQ1 при ишемии и реперфузии сердца. *Кардиология*. 2009; 49 (10): 55–60. [Lakomkin V.L., Kapelko V.I. The protective effect of mitochondrial antioxidant SkQ1 in ischemia and reperfusion of the heart. *Кардиология*. 2009; 49 (10): 55–60. (In Russ.)]. PMID: 19845521
9. Lamprecht W., Stein P., Heinz F., Weisser H. Creatine Phosphate. Methods of enzymatic analysis. Ed. Bergmeyer H.U. 2nd ed. N.Y.: Academic Press, 1974. V. 4. P. 1777–1781.
10. Jaworek D., Gruber W., Bergmeyer H.U. Adenosine-5'-diphosphate and Adenosine-5'-monophosphate. Methods of enzymatic analysis. Ed. Bergmeyer H.U. 2nd ed. N.Y.: Academic Press, 1974. V. 4. P. 2127–2131.
11. Bernt E., Bergmeyer H.U., Mollering H. Creatine. Methods of enzymatic analysis. Ed. Bergmeyer H.U. 2nd ed. N.Y.: Academic Press, 1974. V. 4. P. 1772–1776.
12. Gutman I., Wahlenfeld A.W.L. L-(+)-Lactate. Methods of enzymatic analysis. Ed. Bergmeyer H.U. 2nd ed. N.Y.: Academic Press, 1974. V. 3. P. 1464–1467.
13. Studneva I., Palkeeva M., Veselova O., Molokoedov A., Ovchinnikov M., Sidorova M., Pisarenko O. Protective effects of a novel agonist of galanin receptors against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Cardiovascular Toxicology*. 2019, 19 (2): 236–246. <https://doi.org/10.1007/s12012-018-9483-x>
14. Saks V.A., Veksler V.I., Kuznetsov A.V., Kay L., Sikk P., Tiivel T., Tranqui L., Olivares J., Winkler K., Wiedemann F., Kunz W.S. Permeabilized cell and skinned fiber techniques in studies of mitochondrial function in vivo. *Mol. Cell. Biochem*. 1998; 184 (1–2): 81–100. PMID: 9746314
15. А.А. Абрамов, В.Л. Лакомкин, А.В. Просвирнин, В.И. Капелько. Митохондриальный антиоксидант пластомилин улучшает функцию сердца при доксорубициновой кардиомиопатии. *Кардиология*. 2019; 59 (6): 35–41. DOI: 10.18087/cardio.2019.6.2649 14
16. Tokarska-Schlattner M., Wallimann T., Schlattner U. Multiple interference of anthracyclines with mitochondrial creatine kinases: preferential damage of the cardiac isoenzyme and its implications for drug cardiotoxicity. *Molecular Pharmacology*. 2002; 61 (3): 516–523. <https://doi.org/10.1124/mol.61.3.516>
17. Tokarska-Schlattner M., Zaugg M., da Silva R., Lucchinetti E., Schaub M.C., Wallimann T., Schlattner U. Acute toxicity of doxorubicin on isolated perfused heart: response of kinases regulating energy supply. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. 2005; 289 (1): H37–H47. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01057.2004>

18. Tokarska-Schlattner M., Dolder M., Gerber I., Speer O., Wallimann T., Schlattner U. Reduced creatine-stimulated respiration in doxorubicin challenged mitochondria: particular sensitivity of the heart. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2007; 1767 (11): 1276–1284. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2007.08.006>
19. Wallimann T., Tokarska-Schlattner M., Schlattner U. The creatine kinase system and pleiotropic effects of creatine. *Amino Acids*. 2011; 40 (5): 1271–1296. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-0877-3>
20. Tokarska-Schlattner M., Lucchinetti E., Zaugg M., Kay L., Gratia S., Guzun R., Saks V., Schlattner U. Early effects of doxorubicin in perfused heart: transcriptional profiling reveals inhibition of cellular stress response genes. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2010; 298 (4): R1075–R1088. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00360.2009>
21. Boengler K., Kosiol M., Mayr M., Schulz R., Rohrbach S. Mitochondria and ageing: role in heart, skeletal muscle and adipose tissue. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. 2017; 8 (3): 349–369. <https://doi.org/10.1002/jcsm.12178>
22. Schwarzer M., Schreppe A., Amorim P.A., Osterholt M., Doenst T. Pressure overload differentially affects respiratory capacity in interfibrillar and subsarcolemmal mitochondria. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*. 2013; 304 (4): H529–H537. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00699.2012>

СОВРЕМЕННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ КОРРЕКЦИИ НАРУШЕНИЙ КЛЕТОЧНОЙ ЭНЕРГЕТИКИ В ОФТАЛЬМОЛОГИИ

Ильмира Рифовна Газизова*

Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа

Реферат

Нарушение функций митохондрий, отвечающих за энергетический метаболизм клетки, играет важную роль в развитии многих заболеваний органа зрения. Среди болезней органа зрения с доказанной митохондриальной патологией выделяют болезнь Лебера, связанную с мутациями митохондриальной дезоксирибонуклеиновой кислоты. В статье представлен обзор литературных данных об изысканиях современных способов и средств коррекции нарушения функций митохондрий при воспалительных и нейродегенеративных глазных заболеваниях. Описаны потенциальные методы заместительной терапии и защиты митохондрий от агрессивного воздействия свободных радикалов. При помощи генных технологий достигают повышения количества ферментов антиоксидантной защиты в клетках сетчатки глаза. Современные авторы делают акцент на возможностях применения митохондриально-адресованных антиоксидантов. В эксперименте исследовали возможность контроля основных звеньев апоптозного каскада и сокращения гибели ганглионарных клеток сетчатки при помощи генной терапии. Восстановление баланса кальция и мембранного потенциала митохондрий при явлении эксайтотоксичности показано при использовании блокаторов кальциевых каналов. Самым перспективным направлением в коррекции нарушений клеточной энергетики в офтальмологии мы считаем генную терапию дисфункции митохондрий.

Ключевые слова: клеточная энергетика, митохондрии, глазные болезни, генная терапия, апоптоз, окислительный стресс, эксайтотоксичность.

MODERN POSSIBILITIES FOR CORRECTION OF DISTURBANCES OF CELLULAR ENERGETICS IN OPHTHALMOLOGY *I.R. Gazizova, Bashkir State Medical University, Ufa, Russia.* Disturbances in the mitochondrial functions that are responsible for energy metabolism of the cell, plays an important role in the development of many diseases of the eye. Among diseases of the vision organ the one with sufficient evidence of mitochondrial pathology is Leber's release, which is associated with mutations of the mitochondrial deoxyribonucleic acid. This article provides an overview of the published literature on the research investigations of modern methods and means of correction of mitochondrial dysfunction during inflammatory and neurodegenerative diseases of the eye. Describe were the potential methods of replacement therapy and protection of mitochondria from the aggressive effects of free radicals. With the help of gene technology an increase in the number of antioxidant enzymes in the cells of the retina can be achieved. Recent authors have focused on the possibility of using mitochondria-targeted antioxidants. The possibility of controlling the main links of the apoptotic cascade and reducing the loss of retinal ganglion cells using gene therapy has been investigated in an experiment. Restoration of the balance of calcium and mitochondrial membrane potential in the phenomenon of excitotoxicity has been shown by using calcium channel blockers. We believe that gene therapy of mitochondrial dysfunction is the most promising trend for the correction of cellular energetic disturbances in ophthalmology. **Keywords:** cellular energetics, mitochondria, eye diseases, gene therapy, apoptosis, oxidative stress, excitotoxicity.

В последнее время в медицине интенсивно развивается так называемое «метаболическое» направление, рассматривающее изменения клеточного энергетического обмена на различных уровнях как основу или фон многих заболеваний, в том числе и офтальмологических [2, 3, 5, 8, 10].

Ключевыми органеллами, ответственными за клеточную энергетику, служат митохондрии, основная функция которых – аэробное биологическое окисление (тканевое дыхание) с накоплением энергии в виде макроэргических фосфатных соединений (аденозинтрифосфата, креатинфосфата и др.), то есть окислительное фосфорилирование. Открытие в последние годы ведущей роли митохондрий в чувствительности к лекарственным средствам, их ключевой роли в старении, апоптозе и нейродегенеративных расстройствах привело к созданию «митохондриальной медицины» [2, 3, 6, 8, 10, 18, 29].

Среди заболеваний органа зрения с доказанной митохондриальной дисфункцией особо

выделяется атрофия зрительного нерва Лебера [7, 27]. Заболевание начинается, как правило, в возрасте от 18 до 30 лет, передаётся по материнской линии и проявляется быстро или постепенно развивающимся двусторонним снижением центрального зрения. Данное заболевание развивается в результате точечных мутаций в генах митохондриальной дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), субъединиц кодирования комплекса ферментов окислительного фосфорилирования [4, 26, 29].

Митохондрии служат главным источником супероксидных анионов в клетках. В ходе транспорта электронов к молекулярному кислороду от 1 до 5% электронов в цепи дыхания теряются, участвуя в формировании супероксид-аниона. Количество супероксидов и перекисное окисление липидов увеличиваются в ходе апоптоза [6, 14, 18, 26].

Современные возможности антиоксидантной терапии

В 2003 г. группа академика В.П. Скулачёва начала разработку нового митохондриально-адресованного антиоксиданта. Тестируемые

ими ранее соединения — липофильные катионы (например, ионы фосфония), способные адресно проникать в митохондрии, движимые электрическим полем на митохондриальной мембране. В 1974 г. такие соединения были названы известным американским биохимиком Д. Грином «ионами Скулачёва». Было сконструировано и синтезировано вещество SkQ1, эффективность которого оказалась выше предыдущих аналогов в сотни раз [24, 33].

Исследования влияния SkQ1 при глазных заболеваниях проводили на крысах линии OXYS, страдающих от постоянного окислительного стресса. К 3-му месяцу жизни у этих животных развивается катаракта и проявляются признаки патологии сетчатки. SkQ1 не только препятствовал дистрофии сетчатки, но также улучшал её функциональное состояние, которое определяли с помощью электроретинографии. В отсутствие SkQ1 сетчатка старых (24-месячных) крыс линии OXYS не отвечала электрическим сигналом на вспышку света, что указывало на практически полную слепоту животного. В то же время животные, получавшие с пищей SkQ1, показывали гораздо лучший ответ сетчатки на вспышку света, близкий к результатам молодых (3-месячных) крыс [1, 24].

Для изучения действия SkQ1 при воспалительных заболеваниях глаз, которые сопровождаются сильнейшим окислительным стрессом, в эксперименте был воспроизведён увеит. Его вызывали иммунизацией кролика арестином — белком фоторецепторных клеток. Заболевание приводило к слепоте, после чего в один глаз инстиллировали 250 нМ SkQ1 4 раза в день. Спустя несколько дней признаки воспаления нивелировались, животные начинали видеть, но только тем глазом, в который инстиллировали SkQ1. Та же процедура предотвращала развитие увеита, если капли давали в период иммунизации. При этом успеха достигали в 100% случаев — как при предотвращении увеита, так и при лечении уже развившейся болезни [1, 24].

В литературе сообщают о применении антиоксидантов [ретинол, витамин Е, аскорбиновая кислота, витамин Е + ретинол (аевит), метилэтилпиридинол (эмоксипин)] для лечения глаукомной нейрооптикопатии. Также было показано, что естественные антиоксиданты, содержащие супероксиддисмутазу (эрисод), играют ключевую роль в антиоксидантной защите организма, предотвращают развитие адреналин-индуцированной глаукомы у кроликов. Иностранные же авторы не спешат применять антиоксиданты в лечении нейродегенеративных расстройств [11, 30]. На первом месте стоит задача защиты митохондрий как основного источника активных форм кислорода [21, 22].

Повышение уровня ферментов антиоксидантной защиты

Неврит зрительного нерва сопровождается окислительным стрессом [15, 19]. Для повышения уровня антиоксидантной защиты было

апробировано экзогенное введение ферментов (каталазы) при воспалении зрительного нерва в эксперименте. Однако был выявлен ряд неудобств. Во-первых, вводить каталазу необходимо ежедневно, учитывая период полураспада. Во-вторых, молекула фермента с высоким молекулярным весом проходит через гематоэнцефалический барьер только в активный период воспаления [15].

В связи с этим был найден способ повысить синтез эндогенных антиоксидантных ферментов с помощью доставки в клетку вирус-опосредованной комплементарной ДНК (кДНК), кодирующей синтез каталазы. В эксперименте *in vitro* было продемонстрировано, что в эндотелиальных клетках человека через 1 день после введения комплекса вирусной кДНК каталазы её количество увеличивается в 4 раза по сравнению с исходным [16].

Кроме того, продемонстрировано увеличение уровня антиоксидантной защиты вирус-опосредованной передачей человеческих генов каталазы *in vivo* у животных с воспалением зрительного нерва на фоне экспериментального аллергического энцефалита. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус, содержащий человеческий ген каталазы, вводили в головку зрительного нерва правого глаза мышей с невритом. Через 1 мес активность каталазы увеличивалась приблизительно в 2 раза. После инъекций отмечали уменьшение демиелинизации на 38%, отёка зрительного нерва — на 29%, клеточной инфильтрации — на 34%, нарушения гематоэнцефалического барьера — на 64%, содержания H_2O_2 — на 61% [17].

Для длительной защиты зрительного нерва от демиелинизации необходим перенос гена, кодирующего синтез фермента антиоксидантной защиты. С этой целью морским свинкам с индуцированным экспериментальным аллергическим энцефалитом вводили рекомбинантный ген AAV, штамм 13, трансдуцированный с репортёром LacZ-SV40 полиА гена и гуманизированный зелёным флюоресцирующим белком (GFP) репортёрного гена [17]. Сохранение активности каталазы в головке зрительного нерва было высоким с 1-й недели после однократной внутриглазной инъекции и сохранялось в течение 1 года, однако уже со 2-12-й недели эксперимента прослеживалось снижение количества фермента.

Генная терапия мутаций митохондриальной ДНК (митДНК)

Разработка патогенетических методов лечения митохондриальной дисфункции, связанных с накоплением мутантной митДНК, в частности генной терапии, ещё находится в стадии экспериментов [11, 13]. Одно из наиболее перспективных направлений генной терапии — попытка изменить уровень гетероплазмы путём или селективного ингибирования репликации митохондрий, или разрушения мутантной митДНК [13, 19, 32].

Гены митохондрий кодируют две группы

признаков — работу дыхательных систем и устойчивость к антибиотикам и токсинам [31]. Экспрессию белков в митохондриях исследуют уже более 15 лет [13]. Сообщают об успешных попытках внедрения GFP в митохондриях культивируемых клеток и первичных гепатоцитов с применением вирусного вектора [28]. Если этот метод работает в условиях эксперимента *in vivo*, то он может в последующем дать возможность исправления патологических состояний путём генной терапии в митохондриях при болезни Лебера, связанной с мутациями митДНК.

Возможности контроля апоптоза

Множество ключевых этапов апоптоза происходит в митохондриях, включая высвобождение активаторов каспазы (таких, как цитохром C), синтез про- и антиапоптотических белков семейства Bcl-2 [11, 14, 18]. На сегодняшний день накоплены доказательства апоптоза ганглионарных клеток сетчатки при глаукоме [9, 23]. Апоптоз происходит в аксонах зрительного нерва у животных с экспериментальной глаукомой [9, 34]. Также продемонстрированы доказательства апоптоза нейроцитов сетчатки глаза у больных первичной открытоугольной глаукомой [12, 34].

Возможность применения генной терапии для контроля основных звеньев апоптотного каскада изучали при экспериментальной глаукоме у крыс. При интравитреальном введении векторов AAV с антиапоптотическим геном его белок Bcl-XL был обнаружен в клетках сетчатки: фоторецепторах, пигментном эпителии сетчатки, ганглионарных волокнах [20]. AAV вектор-опосредованная экспрессия Bcl-XL в ганглионарных волокнах сетчатки у крыс привела к мощной нейропротекции зрительного нерва при повышенном внутриглазном давлении [12].

Исследована возможность контроля активации каспаз. Для этого использовали рекомбинантный аденоассоциированный вирус, несущий ген BIRC4, продукт которого является мощным ингибитором каспаз. Это привело к выраженной защите аксонов зрительного нерва в условиях длительного воздействия повышенного внутриглазного давления у крыс [12].

Считают, что антагонисты NMDA-рецепторов снижают эксайтотоксичность путём стабилизации клеточных мембран [25]. В эксперименте на обезьянах при длительном повышении внутриглазного давления отмечено замедление гибели аксонов зрительного нерва при введении мемантина (антагониста медиаторов NMDA-рецепторов). У животных длительно сохранялись зрительные функции, при регистрации электроретинограммы были выявлены лишь незначительные изменения [35].

Основные препараты, применяемые при митохондриальных нарушениях

Лечение метаболических расстройств — одна из сложных проблем современной медицины.

Важная характеристика энерготропной терапии — её комплексность. В нашей стране такие комплексы активно разрабатывают в Московском научно-исследовательском институте педиатрии и детской хирургии (Николаева Е.А.). Лекарственные компоненты, как правило, включают группы препаратов: переносящие электроны в дыхательной цепи (витамины K₁ и K₃, коэнзим Q₁₀, янтарная кислота, цитохром C), кофакторы энергообмена (витамины PP, B₁, B₂, липовая кислота, биотин, карнитин), уменьшающие степень лактат-ацидоза (димефосфон), антиоксиданты. При этом на первое место по значимости выдвигаются такие препараты, как L-карнитин, коэнзим Q₁₀, цитохром C и их комплексы с другими вышеперечисленными лекарственными средствами [5].

Из изложенного можно заключить, что нарушение функций митохондрий, отвечающих за энергетический метаболизм клетки, играет определённую роль в развитии многих заболеваний органа зрения. Самым перспективным направлением в коррекции нарушений клеточной энергетики в офтальмологии мы считаем генную терапию дисфункции митохондрий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Архипова Л.Т., Архипова М.М., Бакеева Л.Е. и др. Производное пластохинона, адресованное в митохондрии, как средство, прерывающее программу старения. Связанные с возрастом заболевания глаз. SkQ возвращает зрение слепым животным // Биохимия. — 2008. — Т. 73, №12. — С. 1641-1654.
2. Вельтищев Ю.Е., Темина П.А. Митохондриальные болезни. Наследственные болезни нервной системы. — М.: Медицина, 1998. — Т. 4. — 409 с.
3. Газизова И.Р. Митохондриальная патология и глаукома // Глаукома. — 2011. — №4. — С. 58-65.
4. Поздняков О.М., Бабакова Л.Л., Гехт Б.М. Митохондриальные цитопатии // Журн. неврол. и психиатр. — 2007. — №2. — С. 64-69.
5. Сухоруков В.С. Нарушения клеточного энергообмена у детей // Рос. вестн. перинатол. и педиатр. — 2002. — Т. 47, №5. — С. 44-50.
6. Bredesen D.E., Rao R.V., Mehlen P. Cell death in the nervous system // Nature. — 2006. — Vol. 443 — P. 796-802.
7. Brown M.D., Trounce I.A., Jun A.S. et al. Functional analysis of lymphoblast and cybrid mitochondria containing the 3460, 11778, or 14484 Leber's hereditary optic neuropathy mitochondrial DNA mutation // J. Biol. Chem. — 2000. — Vol. 275 — P. 39831-39836.
8. Browne S.E., Beal M.F. The energetics of Huntington's disease // Neurochem. Res. — 2004. — Vol. 29. — P. 531-546.
9. Calandrella N., Scarsella G., Pescosolido N. et al. Degenerative and apoptotic events at retinal and optic nerve level after experimental induction of ocular hypertension // Mol. Cell. Biochem. — 2007. — Vol. 301, N 1-2. — P. 155-163.
10. Carelli V., Ross-Cisneros F.N., Sadun A.A. Mitochondrial dysfunction as a cause of optic neuropathies // Prog. Retin. Eye Res. — 2004. — Vol. 23, N 1. — P. 53-89.
11. Danesh-Meyer H.V. Neuroprotection in glaucoma: recent and future directions // Curr. Opin. in Ophthalmol. — 2011. — Vol. 22, N 2. — P. 78-86.
12. Demetriades A.-M. Gene therapy for glaucoma // J. of Glaucoma. — 2011. — Vol. 22, N 2. — P. 73-77.
13. D'Souza G.G., Weissig V. Approaches to mitochon-

drial gene therapy // *Curr. Gene Ther.* — 2004. — Vol. 4, N 3. — P. 317-328.

14. *Green D.R., Reed J.C.* Mitochondria and apoptosis // *Science.* — 1998. — Vol. 281. — P. 1309-1312.

15. *Guy J.* New therapies for optic neuropathies: development in experimental models // *Neuroophthalm. J.* — 2000. — Vol. 11, N 6. — P. 421-429.

16. *Guy J., Qi X., Hauswirth W.W.* Adenoassociated viral-mediated catalase expression suppresses optic neuritis in experimental allergic encephalomyelitis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1998. — Vol. 95. — P. 13847-13852.

17. *Guy J., Qi X., Wang H. et al.* Adenoviral gene therapy with catalase suppresses experimental optic neuritis // *Arch. Ophthalmol.* — 1999. — Vol. 117. — P. 1533-1539.

18. *Kroemer G., Reed J.C.* Mitochondrial control of cell death // *Nat. Med.* — 2000. — Vol. 6. — P. 513-519.

19. *Kujoth G.C., Hiona A., Pugh T.D. et al.* Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging // *Science.* — 2005. — Vol. 309, N 5733. — P. 481-484.

20. *Malik J.M., Shevtova Z., Bahr M., Kugler S.* Long-term *in vivo* inhibition of CNS neurodegeneration by Bcl-XL gene transfer // *Mol. Ther.* — 2005. — Vol. 11. — P. 373-381.

21. *Mihara K., Omura T.* Protein import into mammalian mitochondria // *Methods Enzymol.* — 1995. — Vol. 260. — P. 302-310.

22. *Murphy M.P., Smith R.A.* Targeting antioxidants to mitochondria by conjugation to lipophilic cations // *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.* — 2007. — Vol. 47. — P. 629-656.

23. *Nucci C., Tartaglione R., Cerulli A. et al.* Retinal damage caused by high intraocular pressure-induced transient ischemia is prevented by coenzyme Q10 in rat // *Int. Rev. Neurobiol.* — 2007. — Vol. 82. — P. 397-406.

24. *Plomnikov E.Y., Chupyrkina A.A., Jankauskas S.S. et al.* Mechanisms of nephroprotective effect of mitochondria-targeted antioxidants under rhabdomyolysis and ischemia/reperfusion // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2011. — Vol. 1812, N 1. — P. 77-86.

25. *Rego A.C., Oliveira C.R.* Mitochondrial dysfunction

and reactive oxygen species in excitotoxicity and apoptosis: implications for the pathogenesis of neurodegenerative diseases // *Neurochem. Res.* — 2003. — Vol. 28, N 10. — P. 1563-1574.

26. *Ricci J.E., Gottlieb R.A., Green D.R.* Caspase-mediated loss of mitochondrial function and generation of reactive oxygen species during apoptosis // *J. Cell Biol.* — 2003. — Vol. 160, N 1. — P. 65-75.

27. *Riordan-Eva P., Sanders M.D., Govan G.G.* The clinical features of Leber's hereditary optic neuropathy defined by the presence of a pathogenic mitochondrial DNA mutation // *Brain.* — 1995. — Vol. 118. — P. 319-337.

28. *Rizzuto R., Brini M., Pizzo P. et al.* Chimeric green fluorescent protein as a tool for visualizing subcellular organelles in living cells // *Curr. Biol.* — 1995. — Vol. 5. — P. 635-642.

29. *Schapiro A.H.* Mitochondrial disorders // *Biochem. Biophys. Acta.* — 1999. — Vol. 1410. — P. 99-102.

30. *Sheu S.S., Nauduri D., Anders M.W.* Targeting antioxidants to mitochondria: a new therapeutic direction // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2006. — Vol. 1762. — P. 256-265.

31. *Shoffner J.M., Wallace D.C.* Oxidative phosphorylation diseases: disorders of two genomes // *Adv. Hum. Genet.* — 1990. — Vol. 19. — P. 267-330.

32. *Srivastava S., Moraes C.T.* Manipulating mitochondrial DNA heteroplasmy by a mitochondrial targeted endonuclease // *Human Mol. Genet.* — 2001. — Vol. 10. — P. 3093-3099.

33. *Stefanova N.A., Fursova A.Zh., Kolosova N.G.* Behavioral effects induced by mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 in Wistar and senescence-accelerated OXYS rats // *J. Alzheimers Dis.* — 2010. — Vol. 21, N 2. — P. 479-491.

34. *Tatton W.G., Chalmers-Redman R.M., Tatton N.A.* Apoptosis and anti-apoptosis signalling in glaucomatous retinopathy // *Eur. J. Ophthalmol.* — 2001. — Vol. 11, N 12. — P. 12-22.

35. *Volbracht C., van Beek J., Zhu C. et al.* Neuroprotective properties of memantine in different *in vitro* and *in vivo* models of excitotoxicity // *Eur. J. Neurosci.* — 2006. — Vol. 23, N 10. — P. 2611-2622.



КОРРЕКЦИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ КАК ОСНОВА НЕЙРОПРОТЕКЦИИ ПРИ ГЛАУКОМЕ

УДК 617.7:576.311.347 (048.8)

ГРНТИ 76.29.56

БАК 14.01.07

© *И. Р. Газизова*

Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа

✧ **Нарушение функций митохондрий, отвечающих за энергетический метаболизм клетки, играет определенную роль в развитии нейродегенеративных заболеваний посредством прямого участия в ряде клеточных процессов. В статье представлен обзор данных литературы о современных способах и средствах коррекции нарушения функций митохондрий при глаукоме, проанализирован ряд фундаментальных исследований, направленных как на возможность проведения заместительной терапии, так и выявления способов протекции митохондрий от агрессивного воздействия свободных радикалов. Одним из самых перспективных направлений исследований в этом направлении является экспериментальное изучение возможности генной терапии дисфункции митохондрий.**

✧ **Ключевые слова:** дисфункция митохондрий; первичная открытоугольная глаукома; генная терапия; апоптоз; антиоксидантная терапия; эксайтотоксичность; биоэнергетика.

В последние годы первичную открытоугольную глаукому (ПОУГ) относят к нейродегенеративным заболеваниям [1, 2, 15]. Основной причиной развития нейрооптикопатии и гибели аксонов зрительного нерва при глаукоме принято считать повышенное внутриглазное давление (ВГД). Заболевание развивается с возрастом и характеризуется прогрессирующим течением. Несмотря на многочисленные исследования особенностей этиологии и патогенеза и очевидные успехи в диагностике и лечении ПОУГ, у большинства больных с длительным течением глаукомы даже на фоне нормализованного уровня офтальмотонуса установлено прогрессирующее ухудшение зрительных функций с переходом заболевания в более тяжелую стадию. Актуальным вопросом офтальмологии является изучение таких факторов прогрессирования этого заболевания, как нарушение процессов тканевого дыхания и перекисного окисления липидов, окислительно-восстановительных реакций. Все вышеперечисленные патогенетические изменения возникают при нарушениях функции митохондрий, как основной энергетической единицы клетки [7, 8, 40, 62]. В последние годы выявлена ведущая роль именно митохондрий в старении, апоптозе и нейродегенеративных расстройствах. Исследователи, занимающиеся данной проблемой, считают, что митохондриальная патология является базой, на основе которой развиваются многие сочетанные заболевания, а некоторые из них протекают более тяжело [7, 8, 14, 40]. При болезнях Паркин-

сона и Альцгеймера первичное патогенетическое поражение митохондрий уже доказано [33].

Клетка с поврежденными митохондриями не способна производить достаточное количество энергии для своей жизнедеятельности, не может поддерживать необходимый уровень кальция и вырабатывает повышенное количество повреждающих ее молекул-окислителей [21, 52, 55]. Вместе с тем иностранные авторы, отводя «окислительно-му стрессу» одну из важных ролей в развитии нейродегенеративных заболеваний, не спешат применять антиоксиданты в их лечение [55]. На первом месте стоит задача протекции митохондрий как основного источника активных форм кислорода (АФК) [34].

В данной статье представлена попытка обобщения результатов современных изысканий способов и средств нейропротекции при первичной открытоугольной глаукоме. При этом сделан акцент на патогенетические механизмы, через которые митохондриальная дисфункция может приводить к гибели аксонов зрительного нерва, и, следовательно, на возможности коррекции этих нарушений.

РОЛЬ ДИСФУНКЦИИ МИТОХОНДРИЙ В ГИБЕЛИ АКСОНОВ ЗРИТЕЛЬНОГО НЕРВА ПРИ ГЛАУКОМЕ

Митохондрия — внутриклеточная органелла, продуцирующая АТФ и содержащая уникальный геном, наследуемый по материнской линии. Причин для возникновения нарушений функций митохондрий множество. С возрастом происходит

накопление мутантной митохондриальной ДНК (мтДНК), повышение их делеции и точковых мутаций [33, 40]. При биологическом старении также происходит активация свободно-радикального перекисного окисления липидов клеточных мембран. В эксперименте на крысах было продемонстрировано, что ганглионарные волокна зрительного нерва в большей степени страдают у старых крыс в сравнении с молодыми особями при длительном воздействии повышенного ВГД [58]. Авторы предполагают, что возрастное снижение митохондриального дыхания и функции окислительного фосфорилирования и связанное с этим увеличение свободных радикалов могут лежать в основе повышенной восприимчивости зрительного нерва к повреждающим воздействиям [62]. Возможно генетически детерминированное снижение функций митохондрий. Экспрессия миоцилина обнаружена в астроцитах головки зрительного нерва, что в случае мутации гена миоцилина может привести к деполяризации митохондриальных мембран [63].

Структурно-функциональные изменения митохондрий приводят к снижению продукции АТФ и чрезмерной продукции АФК [30]. Митохондрии являются главным источником создания супероксидных анионов в клетках. В ходе транспорта электронов к молекулярному кислороду от 1 до 5 % электронов в цепи дыхания теряются, участвуя в формировании супероксид-аниона. На сегодняшний день имеется множество научных работ о роли «окислительного стресса» в гибели аксонов зрительного нерва при ПОУГ [19, 38, 57, 65]. Иммуногистохимическими методами показано, что свободные радикалы повреждают ДНК ганглионарных клеток сетчатки [52]. Повышение антиоксидантной защиты было выявлено в эксперименте на крысах, при моделировании офтальмогипертензии путем длительного введения в переднюю камеру глаза гиалуроновой кислоты. Активность супероксиддисмутазы (СОД) в глазах с экспериментальной глаукомой была в 5 раз выше, чем в парных глазах [38].

При изменении разности потенциалов на внутренней и внешней мембранах митохондрий происходит увеличение уровня Ca^{2+} в цитоплазме. Нарушение гомеостаза кальция является пусковым механизмом в развитии нейродегенерации, происходящей по механизму «метаболической» эксайтотоксичности. Исследователями было обнаружено повышение уровня глутамата в стекловидном теле при глаукоме как в эксперименте, так и в клинических исследованиях [43]. Кроме того, чувствительность к глутамату ганглионарных клеток сетчатки при явлении эксайтотоксичности

увеличивается в нейронах с митохондриальной дисфункцией [60].

Увеличение проницаемости митохондриальных мембран влечет за собой высвобождение активаторов каспаз и запуск физиологически заложенной смерти клетки в результате апоптоза. При нейродегенеративных заболеваниях митохондрии «контролируют» процесс гибели нервных клеток [10, 56]. На сегодняшний день накоплены доказательства того, что апоптоз является важным механизмом необратимых изменений ганглионарных клеток сетчатки при глаукоме. Исследователи показали, что апоптоз наблюдается в аксонах зрительного нерва у животных с экспериментальной глаукомой [13, 56]. Также доказано наличие апоптозных нейроцитов сетчатки глаза у больных ПОУГ [32]. АФК и Ca^{2+} открывают митохондриальную пору, что вызывает набухание митохондрий, повреждение их наружной мембраны и выход в цитоплазму цитохрома С — активатора каспаз. При поступлении апоптотического сигнала происходит транслокация апоптоз-индуцирующего фактора из митохондрии в цитоплазму, а затем в ядро [21, 59].

Можно предположить, что нарушение функций изучаемых органелл играет определенную роль в развитии глаукомы посредством прямого участия в ряде клеточных процессов. Митохондриальная дисфункция усугубляется у пожилых людей, влечет за собой явления «окислительного стресса» и эксайтотоксичности. Врожденные или приобретенные функциональные нарушения митохондрий могут снижать толерантность аксонов зрительного нерва к воздействию ВГД.

БИОЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ НЕЙРОПРОТЕКЦИИ ПРИ ГЛАУКОМЕ

Ключевым звеном комплекса, ответственного за клеточный энергообмен (биоэнергетику), является митохондрия. В основе лежит уникальная способность накапливать выделяющуюся в ходе переноса электронов энергию в виде макроэргических фосфатных соединений (АТФ, креатинфосфат и др.). При нарушении функций митохондрий происходит снижение продукции энергии для поддержания жизнедеятельности клетки [29, 41].

Биоэнергетические методы нейропротекции, основанные на процессах энергоснабжения, оказались успешными в экспериментах на лабораторных животных при моделировании нейродегенеративных заболеваний [9, 12, 45, 51, 53]. Заместительную терапию креатином и АТФ проводили и на выделенных нейроцитах зрительного нерва [27, 31]. Эффект нейропротекции был крат-

кросочный, но при этом значительно увеличивалась устойчивость клетки к острой гипоксии.

Повышение энергообеспечения нейронов, или биоэнергетика, является перспективным нейропротекторным направлением [54]. На модели острой ишемии/реперфузии сетчатки при введении никотинамида снижалось повреждающее действие гипоксии на аксоны зрительного нерва. Никотинамид является предшественником НАДН, который является субстратом для комплекса I в электрон-транспортной цепи митохондрий [26]. В экспериментах на крысах при моделировании повышенного офтальмотонуса авторы показали нейропротективные свойства коэнзима Q_{10} . Он является кофактором электрон-транспортной цепи митохондрий, снижает уровень свободных радикалов и участвует в регуляции проницаемости митохондриальных мембран [42, 49]. Лекарственные компоненты, как правило, включают в себя группы препаратов, переносящих электроны в дыхательной цепи (витамины K_1 и K_3 , коэнзим Q_{10} , янтарную кислоту, цитохром C); кофакторы энергообмена (витамины PP, B_1 , B_2 , липоевую кислоту, биотин, карнитин); уменьшающие степень лактат-ацидоза (димефосфон). При этом на первое место по значимости выдвигаются такие препараты как L-карнитин, коэнзим Q_{10} , цитохром C и их комплексы с другими лекарственными средствами [8].

ПОДХОДЫ К ЗАЩИТЕ АКСОНА ЗРИТЕЛЬНОГО НЕРВА ОТ СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ

В 2003 г. под руководством академика В. П. Скулачева начата разработка нового митохондриально-адресованного антиоксиданта. Среди тестируемых соединений — липофильные катионы (например, ионы фосфония), способные адресно проникать в митохондрии, движимые электрическим полем на митохондриальной мембране. Эти разработки основаны на хемиосмотической гипотезе П. Митчелла, постулировавшего наличие разности электрических потенциалов на мембране митохондрий. В 1974 г. такие соединения были названы известным американским биохимиком Д. Грином «ионами Скулачева». Было сконструировано и синтезировано вещество SkQ1, эффективность которого оказалась выше предыдущих аналогов в сотни раз [44].

Высокая терапевтическая активность глазных капель, содержащих митохондриально-адресованный антиоксидант, показана при экспериментальной глаукоме. У кроликов с индуцированной глаукомой после инстилляции пластохинонилдецилтрифенилфосфония бромида (ПДТФ) снижалось ВГД по сравнению с интактными глазами. Данное митохондриально-

направленное соединение оказывало и выраженный нейропротективный эффект на аксоны зрительного нерва. Отмечена полная сохранность аксонов преламинарной зоны зрительного нерва. ПДТФ легко проникает через бислойную фосфолипидную мембрану митохондрий, электрофоретически накапливается на внутренней мембране и оказывают высокую антиоксидантную активность [4].

На сегодняшний день, накоплено множество доказательств успешного применения антиоксидантов при лечении ПОУГ [3, 6, 22, 55, 57]. Так показано, что естественные антиоксиданты (например, препарат Эрисод), содержащие СОД — ключевой фермент антиоксидантной защиты в организме, предотвращают развитие адrenaлин-индуцированной глаукомы у кроликов [5].

С целью нейропротекции и повышения уровня антиоксидантной защиты было апробировано экзогенное введение ферментов (каталазы) при воспалении зрительного нерва в эксперименте. Однако это вызывало ряд неудобств. Во-первых, вводить каталазу необходимо было ежедневно, учитывая период полураспада. Во-вторых, молекула фермента имеет большой молекулярный вес и проходит через гемато-энцефалический барьер (ГЭБ) только в активный период воспаления [36, 50]. В связи с этим был найден способ повысить синтез эндогенных антиоксидантных ферментов — доставка в клетку вирус-опосредованной комплементарной ДНК (кДНК), кодирующей синтез каталазы. В эксперименте *in vitro* было продемонстрировано, что в эндотелиальных клетках человека через 1 день после введения комплекса вирусной кДНК каталазы уровень этого фермента увеличивается в четыре раза по сравнению с исходной [18].

Значительный эффект защиты аксонов зрительного нерва от свободных радикалов достигнут при вирус-опосредованной передаче генов каталазы *in vivo* в экспериментальных условиях у животных с воспалением зрительного нерва [23]. Рекомбинантный адено-ассоциированный вирус (АВВ), содержащий человеческий ген каталазы, вводили в головку зрительного нерва правого глаза мышей с невритом. Даже через 1 месяц активность каталазы была увеличена примерно в два раза. После инъекций отмечалось уменьшение демиелинизации на 38 %, отека зрительного нерва на 29 %, клеточной инфильтрации на 34 %, нарушений ГЭБ на 64 % [24].

Все же, говоря об антиоксидантной защите при глаукоме, на первом месте стоит задача протекции митохондрий как основного источника АФК в клетке [39, 55].

РЕГУЛЯЦИЯ ГОМЕОСТАЗА Ca^{2+} ПРИ ГЛАУКОМЕ

С прошлого века известно, что блокаторы кальциевых каналов обладают нейропротекторными свойствами. Как сообщается, нифедипин способствует усилению глазного кровотока [64]. При длительном лечении препаратами данной группы наблюдается положительный эффект в стабилизации полей зрения у больных с компенсированной глаукомой [20]. Повышается контрастная чувствительность, замедляется прогрессирование глаукомной нейрооптикопатии.

Эксайтотоксичность (от англ. excitotoxicity — токсичность, развивающаяся при возбуждении) — пусковой механизм апоптотической гибели зрительного нерва при глаукоме в результате чрезмерной стимуляции нейронов нейромедиатором глутаматом. Основой патологии при эксайтотоксичности является нарушение кальциевого гомеостаза и активация NMDA-рецепторов (NMDA — N-метил-D-аспартат). «Кальциевая перегрузка» нейронов и активация Ca^{2+} -зависимых процессов ведет к значительным изменениям в митохондриях, неконтролируемому действию свободных радикалов и необратимой клеточной гибели [60].

Считается, что антагонисты NMDA-рецепторов снижают эксайтотоксичность путем стабилизации клеточных мембран, дестабилизированных при митохондриальной дисфункции и снижении продукции АТФ [46, 61]. В эксперименте на животных при длительном повышении ВГД отмечалось замедление гибели аксонов зрительного нерва при введении мемантина (антагонист медиаторов NMDA-рецепторов) [25]. У обезьян длительно сохранялись зрительные функции, при регистрации электроретинограммы были выявлены лишь незначительные изменения [25].

ВОЗМОЖНОСТИ КОНТРОЛЯ АПОПТОЗА

Альтернативным подходом в нейропротекции является активизация антиапоптотических белков (регуляторов апоптоза) семейства Bcl-2. В эксперименте *in vivo* продемонстрировано данное качество у низкомолекулярного белка 5-S-GAD [28].

В эксперименте исследовалась возможность контроля основных звеньев апоптотического каскада и сокращения гибели ганглионарных клеток сетчатки при генной терапии [16]. На модели экспериментальной глаукомы у крыс для доставки антиапоптотических генов сетчатки был использован рекомбинантный вектор на основе аденоассоциированного вируса (ААВ). При интравитреальном введении ААВ-вектора с геном, кодирующим синтез антиапоптотического белка, последний был обнаружен в клетках сетчатки:

фоторецепторах, пигментном эпителии, ганглионарных волокнах. Антиапоптотический белок Bcl-XL является членом Bcl-2 семейства и синтезируется с участием митохондриальных ферментов. ААВ вектор-опосредованная экспрессия Bcl-XL в ганглионарных волокнах сетчатки у крыс привела к мощной нейропротекции зрительного нерва. Аксоны зрительного нерва при морфологическом исследовании оставались нетронутыми повышенным ВГД [34].

Также было проведено исследование возможности контроля активации каспаз, играющих важную роль в процессе апоптоза. При снижении активности каспазного механизма возможна протекция ганглионарных волокон сетчатки [56]. Для этого использован рекомбинантный ААВ, несущий ген, кодирующий синтез белка BIRC4, который является мощным ингибитором каспаз. Это привело к выраженной протекции аксонов зрительного нерва в условиях длительного воздействия повышенного ВГД у крыс [35, 47].

ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ МУТАЦИЙ МТДНК

Разработка методов генной терапии и вообще патогенетических методов лечения митохондриальной дисфункции, связанных с накоплением мутантной мтДНК, еще находится в стадии экспериментов [16, 17]. Есть сообщения об успешных попытках внедрения зеленого флуоресцирующего белка (GFP) в митохондрии культивируемых клеток и первичных гепатоцитов [48]. Для достижения стабильного эффекта такого слияния был использован вирусный вектор. Было выявлено, что ААВ-опосредованный перенос митохондриального GFP был адресно сосредоточен в митохондриях эмбриональных клетках. Если этот метод работает в условиях эксперимента *in vivo*, то он может в последующем дать возможность исправления патологических состояний путем генной терапии в митохондриях при болезни Лебера (LHON), связанной с наличием мутаций мтДНК [11].

ВЫВОД

На основании обзора данных литературы об изысканиях современных способов и средств коррекции нарушения функций митохондрий при глаукоме показано, что митохондриальная дисфункция может быть одним из ключевых звеньев патогенеза нейродегенеративных заболеваний, включая ПОУГ. Можно предположить, что нарушение функций изучаемых органелл играет определенную роль в развитии глаукомы посредством прямого участия в ряде клеточных процессов. Для решения этих проблем проводится большое ко-

личество фундаментальных работ, направленных как на изучение возможностей заместительной терапии, так и выявление способов протекции митохондрий от агрессивного воздействия свободных радикалов. Самым перспективным направлением исследований методов коррекции нарушений клеточной энергетики в офтальмологии является экспериментальное обоснование возможности генной терапии дисфункции митохондрий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеев В. Н., Мартынова Е. Б., Малеванная О. А. и др. Значение митохондриальной патологии в медицине и в офтальмологии // Глаукома: теория и практика. Рос. глаукомная школа: Сб. ст. — Спб., 2011. — С. 3–5.
2. Волков В. В. Глаукома при псевдонормальном давлении: Руководство для врачей. — М.: Медицина, 2001. — 352 с.
3. Егоров Е. А., Алексеев В. Н., Мартынова Е. Б. и др. Патогенетические аспекты лечения первичной открытоугольной глаукомы. — М., 2001. — 118 с.
4. Иомдина Е. Н., Сенин И. И., Хорошилова-Маслова И. П. и др. Доклиническое исследование безопасности и эффективности использования митохондриально-направленного антиоксиданта для профилактики и лечения глаукомы // Сб. статей IX междунар. конф. «Глаукома: теория, тенденции, технологии»: — М., 2011. — С. 111–119.
5. Мартынова Е. Б. Экспериментально-клиническое обоснование применения нового антиоксиданта «Эрисод» в терапии открытоугольной глаукомы // Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — СПб., 1995. — 21 с.
6. Мошетьева Л. К., Корецкая Ю. М. О тактике подхода к лечению больных глаукомой // Клин. офтальмология. — 2005. — Т. 6, № 2. — С. 78–80.
7. Поздняков О. М., Бабакова Л. Л., Гехт Б. М. Митохондриальные цитопатии // Журн. неврол. и психиатрии. — 2007. — № 2. — С. 64–69.
8. Сухоруков В. С. Нарушения клеточного энергообмена у детей // Российский вестник перинатологии и педиатрии. — 2002. — Т. 47, № 5. — С. 44–50.
9. Bender A., Koch W., Elstner M. et al. Creatine supplementation in Parkinson disease: a placebo-controlled randomized pilot trial // Neurology. — 2006. — N. 67. — P. 1262–1264.
10. Bredesen D. E., Rao R. V., Mehlen P. Cell death in the nervous system // Nature. — 2006. — Vol. 443. — P. 796–802.
11. Brown M. D., Trounce I. A., Jun A. S. et al. Functional analysis of lymphoblast and cybrid mitochondria containing the 3460, 11778, or 14484 Leber's hereditary optic neuropathy mitochondrial DNA mutation // J. Biol. Chem. — 2000. — Vol. 275. — P. 39831–39836.
12. Browne S. E., Beal M. F. The energetics of Huntington's disease // Neurochem. Res. — 2004. — N. 29. — P. 531–46.
13. Calandrella N., Scarsella G., Pescosolido N. et al. Degenerative and apoptotic events at retinal and optic nerve level after experimental induction of ocular hypertension // Mol. Cell. Biochem. — 2007. — Vol. 301, N. 1–2. — P. 155–163.
14. Carelli V., Ross-Cisneros F. N., Sadun A. A. Mitochondrial dysfunction as a cause of optic neuropathies // Prog. Retin. Eye Res. — 2004. — Vol. 23, N 1. — P. 53–89.
15. Danesh-Meyer H. V. Neuroprotection in glaucoma: recent and future directions // Curr. Opin. in Ophthalm. — 2011. — Vol. 22, N. 2. — P. 78–86.
16. Demetriades A.-M. Gene therapy for glaucoma // Curr. Opinion in Ophthalm. — 2011. — Vol. 22, N 2. — P. 73–77.
17. D'Souza G. G., Weissig V. Approaches to mitochondrial gene therapy // Curr. Gene Ther. — 2004. — Vol. 4, N 3. — P. 317–328.
18. Erzurum S. C., Lemarchand P., Rosenfeld M. A. et al. Protection of human endothelial cells from oxidant injury by adenovirus-mediated transfer of the human catalase cDNA // Nucleic Acids Res. — 1993. — Vol. 21, N 7. — P. 1607–1612.
19. George Y. X., Van Bergen N. J., Trounce I. A. et al. Mitochondrial Dysfunction and Glaucoma // J. of Glaucoma. — 2009. — Vol. 18, N 2. — P. 93–100.
20. Geyer O., Neudorfer M., Kessler A. et al. Effect of oral nifedipine on ocular blood flow in patients with low-tension glaucoma // Br. J. Ophthalmol. — 1996. — N 80. — P. 1060–1062.
21. Green D. R., Reed J. C. Mitochondria and apoptosis // Science. — 1998. — Vol. 281. — P. 1309–1312.
22. Guy J. New therapies for optic neuropathies: development in experimental models // Curr. Opinion in Ophthalm. — 2000. — Vol. 11, N 6. — P. 421–429.
23. Guy J., McGorray S., Fitzsimmons J. et al. Reversals of blood-brain barrier disruption by catalase: a serial magnetic resonance imaging study of experimental optic neuritis // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. — 1994. — Vol. 35, N 9. — P. 3456–3465.
24. Guy J., Qi X., Wang H. et al. Adenoviral gene therapy with catalase suppresses experimental optic neuritis // Arch. Ophthalmol. — 1999. — Vol. 117, N 11. — P. 1533–1539.
25. Hare W., WoldeMussie E., Lai R. et al. Efficacy and safety of memantine, an NMDA-type open-channel blocker, for reduction of retinal injury associated with experimental glaucoma in rat and monkey // Surv. Ophthalmol. — 2001. — Vol. 45, N 3. — P. 284–289.
26. Ji D., Li G. Y., Osborne N. N. Nicotinamide attenuates retinal ischemia and light insults to neurons // Neurochem. Int. — 2007. — N 52. — P. 786–798.
27. Juravleva E., Barbakadze T., Mikeladze D., Kekelidze T. Creatine enhances survival of glutamate-treated neuronal/glial cells, modulates ras/NF-kappa B signaling, and increases the generation of reactive oxygen species // J. Neurosci. Res. — 2005. — N 79. — P. 224–30.
28. Koriyama Y., Tani H., Ohno M. et al. A novel neuroprotective role of a small peptide from flesh fly, 5-S-GAD in the rat retina *in vivo* // Brain Res. — 2008. — N. 1240. — P. 1960–2203.
29. Kroemer G., Galluzzi L., Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death // Physiol. Rev. — 2007. — N 87. — P. 99–163.
30. Kujoth G. C., Hiona A., Pugh T. D. et al. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging // Science. — 2005. — Vol. 309, N 5733. — P. 481–484.

31. *Lensman M., Korzhevskii D. E., Mourovets V. O.* et al. Intracerebroventricular administration of creatine protects against damage by global cerebral ischemia in rat // *Brain Res.* — 2006. — N 1114. — P. 187–194.
32. *Libby R. T., Li Y., Savinova O. V.* et al. Susceptibility to neurodegeneration in a glaucoma is modified by Bax gene dosage // *PLoS Genet.* — 2005. — N 1. — P. 17–26.
33. *Lin M. T., Simon D. K., Ahn C. H.* et al. High aggregate burden of somatic mtDNA point mutations in aging and Alzheimer's disease brain // *Hum. Mol. Genet.* — 2002. — Vol. 11, N 4. — P. 133–145.
34. *Malik J. M., Shevtova Z., Bahr M., Kugler S.* Long-term *in vivo* inhibition of CNS neurodegeneration by Bcl-XL gene transfer // *Mol. Ther.* — 2005. — Vol. 11. — P. 373–381.
35. *McKinnon S. J., Lehman D. M., Tahzib N. G.* et al. Baculoviral IAP repeat-containing-4 protects optic nerve axons in a rat glaucoma model // *Mol. Ther.* — 2002. — Vol. 5. — P. 780–787.
36. *Mihara K., Omura T.* Protein import into mammalian mitochondria // *Methods Enzymol.* — 1995. — Vol. 260. — P. 302–310.
37. *Mitchell P.* Keilins respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences // *Science.* — 1979. — Vol. 206. — P. 1148–1159.
38. *Moreno M. C., Campanelli J., Sande P.* et al. Retinal oxidative stress induced by high intraocular pressure // *Free Radic. Biol. Med.* — 2004. — Vol. 37, N. 6. — P. 803–812.
39. *Murphy M.P., Smith R.A.* Targeting antioxidants to mitochondria by conjugation to lipophilic cations // *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.* — 2007. — Vol. 47. — P. 629–656.
40. *Navarro A., Boveris A.* The mitochondrial energy transduction system and the aging process // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* — 2007. — Vol. 292, N. 2. — P. C670–C686.
41. *Nicotera P., Leist M., Ferrando-May E.* Intracellular ATP, a switch in the decision between apoptosis and necrosis // *Toxicol. Lett.* — 1998. — N 103. — P. 139–142.
42. *Nucci C., Tartaglione R., Cerulli A.* et al. Retinal damage caused by high intraocular pressure-induced transient ischemia is prevented by coenzyme Q10 in rat // *Int. Rev. Neurobiol.* — 2007. — N 82. — P. 397–406.
43. *Nucci C., Tartaglione R., Rombola L.* et al. Neurochemical evidence to implicate elevated glutamate in the mechanisms of high intraocular pressure (IOP)-induced retinal ganglion cell death in rat // *Neurotoxicology.* — 2005. — Vol. 26, N 5. — P. 935–941.
44. *Plotnikov E. Y., Chupyrkina A. A., Jankauskas S. S.* et al. Mechanisms of nephroprotective effect of mitochondria-targeted antioxidants under rhabdomyolysis and ischemia/reperfusion // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2011. — Vol. 1812, N 1. — P. 77–86.
45. *Prass K., Royl G., Lindauer U.* et al. Improved reperfusion and neuroprotection by creatine in a mouse model of stroke // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* — 2007. — N 27. — P. 452–459.
46. *Rego A. C., Oliveira C. R.* Mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species in excitotoxicity and apoptosis: implications for the pathogenesis of neurodegenerative diseases // *Neurochem. Res.* — 2003. — Vol. 28, N 10. — P. 1563–1574.
47. *Renwick J., Narang M. A., Coupland S. G.* et al. XIAP-mediated neuroprotection in retinal ischemia // *Gene Ther.* — 2006. — Vol. 13. — P. 339–347.
48. *Rizzuto R., Brini M., Pizzo P.* et al. Chimeric green fluorescent protein as a tool for visualizing subcellular organelles in living cells // *Curr. Biol.* — 1995. — Vol. 5. — P. 635–642.
49. *Russo R., Cavaliere F., Rombola L.* et al. Rational basis for the development of coenzyme Q10 as a neurotherapeutic agent for retinal protection // *Prog. Brain Res.* — 2008. — N 173. — P. 575–582.
50. *Ruuls S. R., Bauer J., Sontrop K.* et al. Reactive oxygen species are involved in the pathogenesis of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats // *J. Neuroimmunol.* — 1995. — Vol. 56. — P. 207–217.
51. *Ryu H., Rosas H. D., Hersch S. M., Ferrante R. J.* The therapeutic role of creatine in Huntington's disease // *Pharmacol. Ther.* — 2005. — N 108. — P. 193–207.
52. *Sacca S. C., Izzotti A.* Oxidative stress and glaucoma: injury in the anterior segment of the eye // *Sour. Progr. in Brain Research.* — 2008. — Vol. 173. — P. 385–407.
53. *Schlattner U., Tokarska-Schlattner M., Wallimann T.* Mitochondrial creatine kinase in human health and disease // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* — 2006. — N 1762. — P. 164–180.
54. *Schober M. S., Chidlow G., Wood J.* et al. Bioenergetic-based neuroprotection and glaucoma // *Clin. & Exper. Ophthalmol.* — 2008. — Vol. 36, N 4. — P. 377–385.
55. *Sheu S. S., Nauduri D., Anders M. W.* Targeting antioxidants to mitochondria: a new therapeutic direction // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2006. — Vol. 1762. — P. 256–265.
56. *Tatton W. G., Chalmers-Redman R. M., Tatton N. A.* Apoptosis and anti-apoptosis signalling in glaucomatous retinopathy // *Eur. J. Ophthalmol.* — 2001. — Vol. 11, N 2. — P. 12–22.
57. *Tezel G.* Oxidative stress in glaucomatous neurodegeneration: mechanisms and consequences // *Prog. Retin. Eye Res.* — 2006. — Vol. 25, N 5. — P. 490–513.
58. *Tezel G., Luo C., Yang X.* Accelerated aging in glaucoma: immunohistochemical assessment of advanced glycation end products in the human retina and optic nerve head // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* — 2007. — Vol. 48, N 3. — P. 1201–1211.
59. *Tezel G., Yang X.* Caspase-independent component of retinal ganglion cell death, *in vitro* // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* — 2004. — Vol. 45, N. 11. — P. 4049–4059.
60. *Trump B. F., Berezsky I. K.* The mechanisms of calcium-mediated cell injury and cell death [corrected] // *New Horiz.* — 1996. — N 4. — P. 139–150.
61. *Vorwerk C. K., Lipton S. A., Zurakowski D.* et al. Chronic low-dose glutamate is toxic to retinal ganglion cells. Toxicity blocked by memantine // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* — 1996. — Vol. 37, N 8. — P. 1618–1624.
62. *Wei Y. H., Lu C. Y., Lee H. C.* et al. Oxidative damage and mutation to mitochondrial DNA and age-dependent decline of mitochondrial respiratory function // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 1998. — Vol. 854. — P. 155–170.

63. *Wiggs J. L.* Genetic etiologies of glaucoma // *Arch. Ophthalmol.* — 2007. — Vol. 125, N 1. — P. 30–37.
64. *Wilson R. P., Chang W. J., Sergott R. C.* et al. A color Doppler analysis of nifedipine-induced posterior ocular blood flow changes in open-angle glaucoma // *J. Glaucoma.* — 1997. — N 6. — P. 231–236.
65. *Zanon-Moreno V., Marco-Ventura P., Lleo-Perez A.* Oxidative stress in primary open-angle glaucoma // *J. of Glaucoma.* — 2008. — Vol. 17, N 4. — P. 263–268.

CORRECTION OF MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION AS A NEUROPROTECTION BASIS IN GLAUCOMA

Gazizova I. R.

✧ **Summary.** The dysfunction of mitochondria (responsible for the cellular energy metabolism) plays

a role in the development of neurodegenerative diseases through direct involvement in a number of cell processes. This article provides an overview of literature data on the investigations of modern ways and means of correction of mitochondrial dysfunction in glaucoma. Several basic research studies are analyzed aiming both at the opportunity of replacement therapy, and at the identification of ways to protect mitochondria from aggressive free radicals. The most promising investigational trend in this area is an experimental research on the possibility of mitochondrial dysfunction gene therapy.

✧ **Key words:** dysfunction of mitochondria; primary open-angle glaucoma; gene therapy; apoptosis; anti-oxidant therapy; excitotoxicity, bioenergetics.

Сведения об авторах:

Газизова Ильмира Рифовна — к. м. н., ассистент кафедры офтальмологии. ГОУ ВПО Башкирский государственный медицинский университет. Россия, 450000, Республика Башкортостан, г. Уфа, ул. Ленина, д. 3. E-mail: ilmira_ufa@rambler.ru.

Gazizova Ilmira Rifovna — M.D., the assistant of chair of ophthalmology. Bashkir state medical university. Russia, 450000, Ufa, Lenin st., 3. E-mail: ilmira_ufa@rambler.ru.

Е.М. КАРТЕР, к. х. н., МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва

«Визомитин» — не только кератопротектор

«Визомитин» – инновационный препарат, демонстрирующий принципиально новый подход к терапии синдрома «сухого глаза». В основе «Визомитина» – антиоксидант нового поколения, благодаря которому «Визомитин» не только устраняет симптомы болезни, но и борется с причиной ее возникновения.

«Визомитин» был разработан компанией ООО «Митотех» в рамках проекта, проводимого в МГУ им. М.В. Ломоносова. Препарат был зарегистрирован для медицинского применения в 2011 г. по показанию «синдром сухого глаза». Начиная с июля 2012 г. «Визомитин» поступил на реализацию в аптеки и начал применяться офтальмологами в рутинной клинической практике как кератопротекторное средство.

Активное вещество препарата «Визомитин» – пластохинонилдецилтрифенилфосфония бромид (ПДТФ) – антиоксидант нового поколения.

Благодаря иону трифенилфосфония, входящему в состав синтезированной молекулы, ПДТФ обладает уникальным свойством накапливаться в митохондриях клеток. Через химический «мостик» децила ион трифенилфосфония ковалентно присоединен к мощному антиоксиданту пластохинолилу, который, будучи заякоренным в митохондриях, выполняет функции антиоксиданта, нейтрализуя активные формы кислорода. В биологической литературе данное вещество известно как SkQ1.

Общеизвестно, что в патогенезе многих болезней ключевую роль играет

окислительный стресс – повреждение свободными радикалами молекул, клеток, тканей и органов. Ткани глаза особенно уязвимы для атаки свободными радикалами и активными формами кислорода (АФК), поскольку, в отличие от остальных органов и тканей, глаз не может быть защищен от главных факторов окислительного стресса – света и высоких концентраций кислорода.

Кванты света, постоянно проникающие в ткани глаза, превращают молекулы кислорода в свободные радикалы, запускающие цепную реакцию окислительного стресса.

Препараты, нейтрализующие АФК, известны еще с 60-х годов – это антиоксиданты. К сожалению, сейчас приходится констатировать крайне низкую эффективность традиционных

антиоксидантов, в том числе и в офтальмологии. Главная проблема – отсутствие препаратов, направленных в митохондрии, поскольку именно митохондрии являются основным источником АФК в клетке, и именно в эти органеллы необходимо доставить существенные количества антиоксиданта. АФК как крайне реакционно-способные вещества запускают перекисное окисление липидов и другие процессы окислительного стресса. Недостаточная антиоксидантная защита митохондрий приводит к запуску необратимых процессов запрограммированной клеточной смерти. К настоящему моменту показано, что митохондриальные АФК являются если не главной причиной, то весьма существенным фактором патогенеза ряда глазных болезней — глаукомы, различных видов дегенерации сетчатки и др.

Действующее вещество глазных капель «Визомитин» — митохондриальный антиоксидант SkQ1. В малой концентрации это вещество проявляет мощные антиоксидантные свойства, положительно влияет на процессы обмена в глазных тканях, ускоряет заживление роговицы.

При применении препарата «Визомитин» для лечения синдрома «сухого глаза» увеличивается стабильность слезной пленки, клетки тканей глаза получают защиту от свободных радикалов. В результате устраняются симптомы «сухого глаза»: чувство сухости, инородного тела, покраснение. Проведенные исследования продемонстрировали выраженные терапевтический и посттерапевтический эффекты.

Лечебное действие «Визомитина» было успешно использовано для лечения пациентов, использующих мягкие контактные линзы дневного ношения и страдающих от повреждений роговицы.

Мягкие контактные линзы (МКЛ) в настоящее время широко вошли в офтальмологическую практику. Однако МКЛ, помещенная на роговицу, вступает во взаимодействие со слезной плен-

кой (СП), и такое взаимодействие может быть разделено на два вида. С одной стороны, МКЛ может истощать состав СП, сорбируя ее компоненты и уменьшая их количество. С другой стороны, контактные линзы способны усиливать СП, благодаря стимуляции притока новых компонентов СП или увеличения количества существующих. Однако у пациентов с несостоятельной СП (при дисфункции мейбомиевых желез, пониженной слезопродукции и нарушенной стабильности СП) МКЛ способны приводить к изменениям, способствующим развитию симптоматического синдрома «сухого глаза» (ССГ). Ситуация заметно усугубляется, если поверхность МКЛ обладает какими-либо дефектами, пусть даже самыми минимальными. Существует потенциальная опасность либо стимулировать у пациента, применяющего контактные линзы, развитие симптоматического ССГ, либо утяжелить уже имеющееся, но не диагностированное ранее заболевание этого вида.

Кроме того, при использовании контактных линз возникает и усиливается дискомфорт, обусловленный появлением поверхностных микротравм, и, как следствие, воспалительных процессов роговицы. В таких случаях пациенты либо отказываются от данного вида коррекции, либо совместно с офтальмологом ищут иные пути устранения проблемы.

В проведенных исследованиях* препарат «Визомитин» применяли после снятия МКЛ форсированным курсом (инстиляции вечером 4-6 раз в течение часа), которые увеличивают количество поступающего в глаз препарата и усиливают его эффективность. Практически все пациенты на контрольных осмотрах отметили повышение комфорта при ношении линз, часть из них отметили выраженное улучшение при первом контрольном посещении, остальные – при последующем наблюдении. Пациентов, не ощутивших эффекта, не было.

При ношении контактных линз роговица страдает больше остальных тканей глаза. Наиболее яркий эффект

лечения препаратом «Визомитин» был показан именно на заживлении поврежденных роговицы. Не только мелкие дефекты, но и линейные эрозии имели склонность к более выраженной и ранней эпителизации. В ходе исследования не было зарегистрировано ни одного связанного с препаратом нежелательного явления.

Таким образом, применение препарата «Визомитин» форсированным курсом после снятия контактных линз, кроме кератопротекторного действия, обладает лечебным эффектом: значительно снижаются жалобы пациентов, увеличивается длительность ношения линз в течение дня, уменьшается выраженность симптомов раздражения век и конъюнктивы, заметно уменьшаются или исчезают повреждения роговицы. Полученные в ходе исследования результаты позволяют рекомендовать данную методику применения препарата «Визомитин» в качестве профилактического и лечебного средства пациентам, использующим контактные линзы дневного ношения.

Сегодня свойства «Визомитина» продолжают изучаться, проводятся исследования, как препарат влияет на состояние глаза при ВМД, катаракте и других глазных болезнях. В клинических исследованиях, проведенных в известных офтальмологических центрах Москвы и С.-Петербурга было продемонстрировано антиоксидантное действие препарата у пациентов с возрастной катарактой. Применение «Визомитина» в течение 6 месяцев достоверно увеличивало остроту зрения у пациентов с начальной стадией катаракты, причем эффект был наиболее выраженным у пациентов старшего возраста. По результатам проведенных исследований в инструкцию «Визомитина» добавлено еще одно показание – начальная стадия возрастной катаракты. ®

* О.И. Максимова, Е.М. Каргер, М.В. Скулачев. Профилактика и лечение повреждений роговицы у лиц, применяющих мягкие контактные линзы. Медицинский совет, 2014, 17: 134-136.