

УДК 577.3

ПРЕДОТВРАЩЕНИЕ ДИСФУНКЦИИ МИТОХОНДРИЙ КАРНИТИНАТОМ 2-ЭТИЛ-6-МЕТИЛ-3-ГИДРОКСИПИРИДИНА

© 2024 г. И.В. Жигачева*., И.Ф. Русина**., Н.И. Крикунова*, Ю.В. Кузнецов*,
М.М. Расулов***., М.А. Яковлева*, А.Н. Голощапов*

*Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, ул. Косыгина, 4, Москва, 119334, Россия
#E-mail: zhigacheva@mail.ru

**Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН,
ул. Косыгина, 4, Москва, 119334, Россия

##E-mail: rusina939@mail.ru

***ГНЦ РФ «Государственный научно-исследовательский институт химии и технологии элементоорганических соединений», шоссе Энтузиастов, 38, Москва, 105118, Россия

###E-mail: rasulovmaksud@gmail.com

Поступила в редакцию 10.10.2023 г.

После доработки 07.11.2023 г.

Принята к публикации 15.11.2023 г.

Исследована биологическая активность карнитината 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина. Препарат проявлял высокую антирадикальную и антиоксидантную активность, что могло свидетельствовать о наличии у него антистрессовых свойств, наличие которых изучали на модели острой гипобарической гипоксии. Острая гипобарическая гипоксия в 2.3 раза активировала перекисное окисление липидов, что приводило к изменениям в содержании C_{18} и C_{20} жирных кислот в мембранах митохондрий: индекс двойных связей C_{18} жирных кислот снизился на 18.2%, содержание 20:3 ω 3 – на 13%, 20:2 ω 6 – на 80% и 20:1 ω 9 – на 33%. Эти изменения сопровождались изменением биоэнергетических характеристик митохондрий. Максимальные скорости окисления НАД-зависимых субстратов сократились на 28–35%. Введение животным 10^{-6} моль/кг карнитината 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина в течение пяти суток предотвращало перекисное окисление липидов, предупреждало изменения состава жирных кислот мембран митохондрий, а, следовательно изменения биоэнергетических характеристик митохондрий, что, вероятно, определило антистрессовые свойства препарата: увеличение продолжительности жизни в 3.5–4.0 раза и повышение выживаемости мышей на 12–40% в условиях различных видов гипоксии. Кроме того, препарат стимулировал всхожесть и рост проростков пшеницы.

Ключевые слова: митохондрии, антиоксиданты, перекисное окисление липидов, жирные кислоты, гипоксия, динамическая работоспособность.

DOI: 10.31857/S0006302924020105, EDN: OUCNRP

Производные 3-гидроксипиридина имеют широкий спектр биологического действия: антиоксидантное, антигипоксическое, противовоспалительное и противоишемическое [1], кардио- и эндотелиопротекторное [2, 3], антистрессовое и нейропротекторное [1] действие. Они получили широкое применение в медицине. Это эмоксипин (3-окси-6-метил-2-этилпиридина гидрохлорид), мексидол (2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцинат), этоксидол (2-этил-6-метил-3-гидрокси-пиридиний гидроксидиоат). В настоящее

время идет поиск новых синтетических производных 3-гидроксипиридина и исследование их биологической активности.

В качестве объекта исследования был выбран карнитинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина (КП) (рис. 1).

Выбор данного препарата в качестве объекта исследования обусловлен тем, что входящий в состав препарата 2-этил-6-метил-3-гидрокси-пиридин обладает антирадикальными свойствами: он, как и другие 3-гидроксипиридины, активно взаимодействует с гидроксильными радикалами и первичными свободными радикалами белков. Более того, показано, что он может ингибировать ферментативное и не ферментативное перекис-

Сокращения: КП – карнитинат 2-этил-6-метил-3-гидрокси-пиридина, ПОЛ – перекисное окисление липидов, МЭЖК – метиловые эфиры жирных кислот, ЖК – жирные кислоты, ОГГ – острая гипобарическая гипоксия.

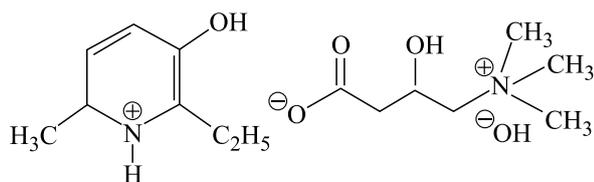


Рис. 1. Схематическая формула карнитината 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина.

ное окисление липидов (ПОЛ), а также влиять на активность антиоксидантных ферментов [4].

Второй компонент этого соединения – L-карнитин – является прямым антиоксидантом, ингибирующим свободнорадикальное окисление, а также подавляющим генерацию активных форм кислорода ферментами в цитоплазме клеток и непосредственно в дыхательной цепи митохондрий, поскольку L-карнитин образует комплексы с ионами Fe^{2+} и Cu^{2+} в их активных центрах. При этом он повышает активность ряда антиоксидантных ферментов и неферментативных антиоксидантов, в основном через факторы транскрипции, включая Nrf2 и NF- κ B [5].

Основываясь на этих данных исследовали антиоксидантные, антирадикальные свойства КП и возможность его использования в качестве антистрессового препарата.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Карнитинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина впервые синтезировали в ИБХФ РАН. В настоящее время подана заявка на патент РФ № 2023117835.

Антирадикальные свойства препарата оценивали хемилюминисцентным методом по эффекту торможения жидкофазного окисления этилбензола, которое инициировали термическим распадом азобисизобутиронитрила (50°). Интенсивность хемилюминисценции усиливали 9,10-дибромантраценом. Эффективную константу ингибирования свободнорадикального окисления (k_{INH}) рассчитывали из серии хемилюминисцентных кривых с разной концентрацией карнитината 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина [6]. Концентрации компонентов в реакционном растворе: КП – $5.2 \cdot 10^{-6}$ М, этилбензол – 20%, инициатор – $2 \cdot 10^{-3}$ М, дибромантрацен – $5 \cdot 10^{-3}$ М. Реакционным сосудом служила термостатированная при 50°C цилиндрическая стеклянная кювета. Реакционную смесь барботировали воздухом для ее насыщения кислородом и перемешивания.

Объекты. Работу проводили на мышах линии Valb/c массой 20–25 г. Мышам в течение 5 суток внутрибрюшинно вводили 10^{-6} моль/кг карнити-

нат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина. Последнее введение состоялось за 45 мин до опыта.

Регулирующие стандарты. Исследования выполняли согласно Правилам лабораторной практики в Российской Федерации в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123), Strasburg, 1986), согласно утвержденному письменному протоколу, а также с «Руководством по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях» [7]. Наше исследование выполнено по утвержденной Министерством науки и высшего образования Российской Федерации теме 44.4 «Комплексное изучение механизмов и эффектов действия природных и синтетических антиоксидантов, противоопухолевых препаратов, химических и физических факторов. Изучение биологических механизмов старения». На эту тему работа проводится с использованием разрешенных лабораторных животных (мышей) на постоянной основе под контролем Комитета по этике Института биохимической физики РАН.

Проращивание семян пшеницы. Эксперимент также проводили на проростках пшеницы (*Triticum L.*). Использовали семена пшеницы сорта Калико. Контрольные семена замачивали в воде и проращивали на влажной фильтровальной бумаге, а опытные семена замачивали в $2.48 \cdot 10^{-3}$ или $1.20 \cdot 10^{-3}$ М карнитинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридине и проращивали, используя эти растворы. Проращивание проводили при комнатной температуре ($18\text{--}20^\circ\text{C}$) в закрытых крышками чашках Петри при дневном освещении. На пятые сутки фильтровальную бумагу во всех чашках Петри дополнительно смачивали водой. Измерения проводили на третьи и девятые сутки. На девятые сутки срезали и взвешивали зеленую биомассу. Корни проростков обрабатывали таким же образом.

Выделение митохондрий из печени мышей проводили методом дифференциального центрифугирования [8]. Первое центрифугирование при 600 g в течение 10 мин, второе – при 9000 g, 10 мин. Осадок ресуспендировали в среде выделения. Соотношение ткань: среда – 1:0.25. Среда выделения содержала 0.25 М сахарозы, 10 мМ HEPES, pH 7.4.

Уровень перекисного окисления липидов оценивали флуоресцентным методом [9]. Липиды экстрагировали смесью хлороформ : метанол = 2 : 1 (по объему) из митохондрий, содержащих 3–5 мг белка. Соотношение митохондрии : смесь хлороформ–метанол = 1 : 10. Регистрацию флуоресценции проводили в десяти миллиметровых кварце-

вых кюветах на спектрофлуориметре FluoroMax (Horiba Yvon GmbH, Германия). В контрольную кювету добавляли 3 мл хлороформа, а затем 0.3 мл метанола. Длина волны возбуждения флуоресценции была 360 нм, испускания — 420–470 нм. Результаты выражали в условных единицах флуоресценции, пересчитанных на мг белка.

Исследование жирнокислотного состава мембран митохондрий печени мышей проводили методом газо-жидкостной хроматографии и хромато-масс-спектрометрии.

Метилловые эфиры жирных кислот получали кислотным метанолизом липидов мембран митохондрий [10, 11]. Метилловые эфиры жирных кислот (МЭЖК) экстрагировали гексаном, полученные растворы анализировали.

Определение количественного состава МЭЖК проводили на хроматографе марки «Кристалл 2000М» (Россия) с пламенно-ионизационным детектором и кварцевой капиллярной колонкой DB-1 (60 м × 0.32 мм, слой 0.25 мкм (J&W Scientific, США)). Анализ МЭЖК выполняли при программировании температуры от 120 до 270°C со скоростью 4°C/мин. Температура инжектора и детектора — 270°C, скорость газа-носителя гелия составляла 2.0 мл/мин, деление потока на входе в колонку — 1:40. Идентификацию МЭЖК осуществляли по величинам индексов удерживания [12]. Содержание МЭЖК в образцах рассчитывали по соотношению площади пика соответствующей кислоты к сумме площадей пиков, соответствующих найденным МЭЖК. Стандартное отклонение средних значений площадей пиков, полученных в трех измерениях, не превышало 5% (относительное значение). Математическую обработку результатов проводили с использованием программ Microsoft Excel и Sigma Plot 10.

Идентификацию МЭЖК в образцах осуществляли также на основе масс-спектров, полученных после разделения МЭЖК в условиях, аналогичных ГХ анализу, на приборе Hewlett Packard-6890 (США). Масс-спектры получали в режиме электронного удара при ионизирующем напряжении 70 эВ и скорости сканирования 1 с на декаду масс в области 40–400 дальтон.

Модель «старения» митохондрий. Выделенные митохондрии (2–3 мг белка) помещали в 0.5 мл среды, содержащей 65 мМ КСl, 10 мМ НЕРЕС и 1 мМ КН₂РО₄, рН 7.4. Митохондрии инкубировали 20–25 мин при комнатной температуре.

Протекторную активность препарата исследовали, используя модели острой гипобарической гипоксии (ОГГ), острой гемической гипоксии, острой цитотоксической гипоксии и динамической работоспособности.

Острую гипобарическую гипоксию у мышей Balb/c моделировали в стеклянной барокамере в атмосфере низкого давления (206 мм рт. ст.), что

соответствует высоте 11000 м над уровнем моря. В первые минуты в камере создавали разрежение, соответствующее 5000 м над уровнем моря (давление 405 мм рт. ст.). В каждую последующую минуту проводили «подъем» еще на одну тысячу метров. Регистрировали время пребывания мышей на «высоте» 11000 м над уровнем моря.

Острую гемическую гипоксию вызывали внутрибрюшинным введением мышам линии Balb/c нитрита натрия в дозе 250 мг/кг.

Острую цитотоксическую гипоксию вызывали внутрибрюшинным введением мышам азида натрия из расчета 20 мг/кг.

Динамическую работоспособность мышей определяли в тесте принудительного плавания с грузом 2% от массы тела в воде при температуре 10°C до утомления животных [13].

Реактивы. В эксперименте использовали реактивы следующих фирм: метанол, хлороформ, карбонат калия — Merck, Германия; сахароза и Трис — Sigma, США; НЕРЕС — MP Biomedicals, Германия; гексан — Panreac, Испания; ацетилхлорид — Acros, Бельгия.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Способность карнитинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина предотвращать перекисное окисление липидов исследовали по его влиянию на интенсивность флуоресценции конечных продуктов ПОЛ (оснований Шиффа) в мембранах митохондрий печени мышей. Перекисное окисление липидов в мембранах этих органелл активировали, используя модель «старения» митохондрий. При этом интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий возрастала в 2.5–3.0 раза (рис. 2). Введение различных концентраций КП в среду инкубации митохондрий приводило к снижению флуоресценции вплоть до контрольных значений. При этом наиболее эффективными концентрациями оказались 10^{-6} – 10^{-12} М. Однако в концентрации 10^{-3} М препарат проявлял прооксидантный эффект. Отметим, что введение КП в различной концентрации в среду инкубации митохондрий, которые не подвергались «старению», не влияло на интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ, что свидетельствовало о влиянии препарата только на активацию перекисного окисления липидов.

Карнитинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридин проявлял также антирадикальные свойства, которые оценивали хемилюминесцентным методом (см. раздел «Материалы и методы»). Кинетическая кривая ингибированного окисления этилбензола в присутствии КП представлена на рис. 3.

Максимальный наклон (tgφ) кинетической кривой тушения хемилюминесценции в точке перегиба позволяет определить константу скорости

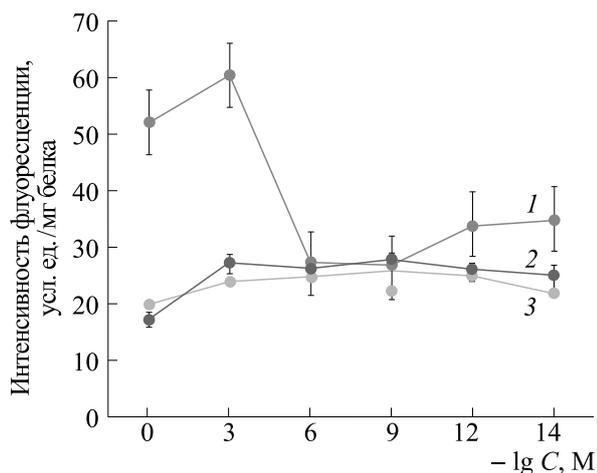


Рис. 2. Влияние «старения» и карнитината 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина на интенсивность флуоресценции продуктов перекисного окисления липидов в мембранах митохондрий печени мышей: кривая 1 – «старение» + КП, кривая 2 – контроль + КП, кривая 3 – контроль. По оси ординат – интенсивность флуоресценции (усл. ед./мг белка), по оси абсцисс – концентрация КП.

k_{inh} реакции ингибирования окисления (реакции антиоксиданта с перекисным радикалом) по формуле:

$$(k_{inh})_{tg\phi} = \frac{\sqrt{2k_t}}{\sqrt{W_i \cdot 0.273 \cdot T_{sec}}}, \quad (1)$$

где W_i – скорость инициирования радикалов; $T_{sec} = 1/tg\phi$; k_t – константа скорости диспропорционирования пероксильных радикалов этилбензола: $2k_t = 1.64 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ [6]. W_i рассчитыва-

ли по известной формуле: $W_i = 2e \cdot k_0 \cdot [Y]$, где e – эффективность выхода радикалов из клетки, k_0 – константа скорости распада инициатора Y [21].

Для концентрации инициатора $[Y] = 2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ при температуре реакции 50°C скорость инициирования радикалов составила $W_i = 1.12 \cdot 10^{-8} \text{ M} \cdot \text{c}^{-1}$. При известных W_i и $2k_t$ из кинетической кривой определяли k_{inh} по формуле (1).

Константа ингибирования пероксильных радикалов карнитинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина (k_{inh}) составляла $2.3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, а стехиометрический коэффициент f ингибирования свободнорадикальных реакций, показывающий, сколько цепей (радикалов) обрывается при участии одной молекулы антиоксиданта, равен двум, что сопоставимо с антирадикальными свойствами ресвератрола (табл. 1).

Обладая антирадикальными и антиоксидантными свойствами, карнитинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридин, вероятно, может проявлять антистрессовую активность, поскольку в условиях стресса активизируется свободнорадикальное окисление, а следовательно и ПОЛ. Проверку на наличие антистрессовых свойств у препарата проводили, используя модель острой гипобарической гипоксии. ОГГ приводила к активации ПОЛ. При этом интенсивность флуоресценции возрастала почти в 2.3 раза (рис. 4). Введение мышам 10^{-6} моль/кг КП предупреждало активацию ПОЛ. Отметим, что введение мышам 10^{-3} моль/кг КП не только не предотвращало ПОЛ, но даже его активировало. При этом интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ в районе 410–420 нм возрастала в 2.5 раза, что свидетельствовало о преиму-

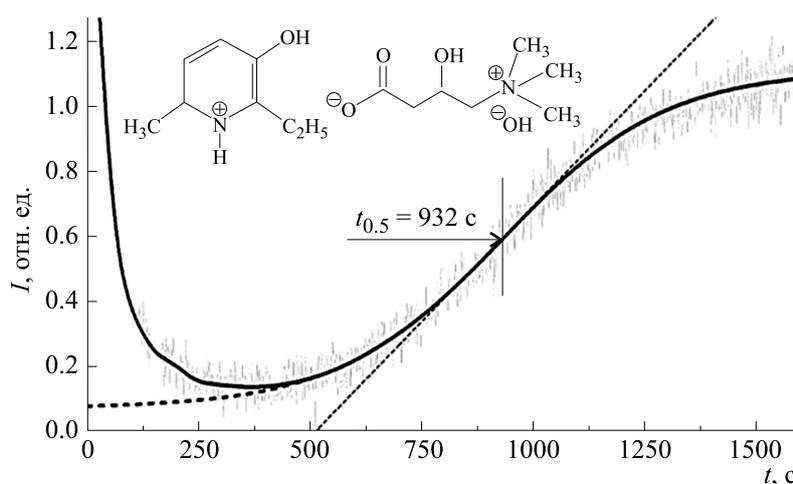


Рис. 3. Кинетическая кривая тушения хемилуминесценции, сопровождающей окисление этилбензола, инициированное карнитинатом 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина: $[КП]_0 = 5.2 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, $W_i = 1.12 \cdot 10^{-8} \text{ M} \cdot \text{c}^{-1}$, активатор (дибромантрацен) = $5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, 50°C .

Таблица 1. Сравнительная антирадикальная активность антиоксидантов

Антиоксидант	$k_{inh} \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$	f	Ссылки
Соль карнитината 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина	23.0 ± 0.04	$2.0 + 0.2$	–
2-Этил-6-метил-3-гидроксипиридин	3.3 ± 0.05	2.0	–
Дибунол	2.0 ± 0.2	1.9	[21]
Мексидол	4.7	1.9	[21]
Хроман СгСl	452	2.0	[21, 22]
Пирокатехин (о-дигидроксибензол)	60.0	2.0	[23]
Ресвератрол	23.6	2.1	[24]

ществленном образовании в результате ПОЛ 4-гидрокси-2,3-нонаналей. На основании полученных данных для экспериментов по выявлению антистрессовых свойств препарата было выбрано введение животным КП в дозе 10^{-6} моль/кг.

Активация перекисного окисления липидов, по-видимому, должна была повлиять на жирнокислотный состав общей липидной фракции митохондрий. Действительно острая гипобарическая гипоксия вызывала изменения в содержании C_{18} и C_{20} жирных кислот (ЖК). Так, содержание 18:3 ω 6 снизилось в 2.6 раза, а содержание 18:1 ω 9 – в 1.4 раза. При этом индекс двойных связей C_{18} ЖК понизился с 0.35 ± 0.01 до 0.29 ± 0.01 (рис. 5). Введение мышам 10^{-6} моль/кг КП не

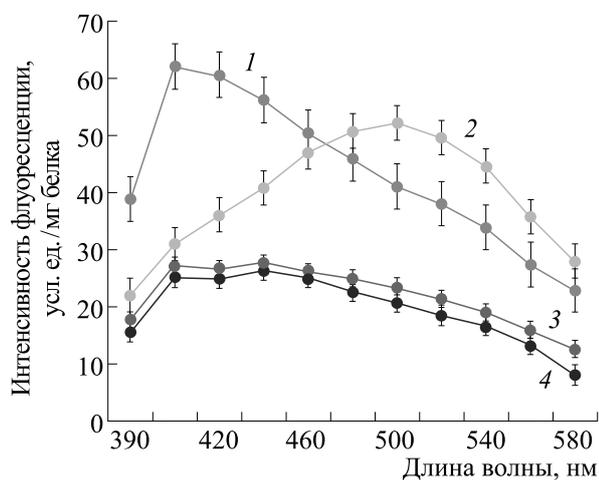


Рис. 4. Влияние острой гипобарической гипоксии и карнитината 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина на спектры флуоресценции продуктов перекисного окисления липидов в мембранах митохондрий печени мышей: кривая 1 – ОГГ+ введение мышам 10^{-3} моль/кг КП; кривая 2 – ОГГ; кривая 3 – контроль; кривая 4 – ОГГ+ введение мышам 10^{-6} моль/кг КП. По оси ординат – интенсивность флуоресценции (усл. ед./мг белка), по оси абсцисс – длина волны испускания.

только предотвращало изменения в содержании C_{18} ненасыщенных ЖК, но в 1.6 раза и в 1.4 раза увеличивало содержание 18:3 ω 6 и 18:2 ω 6 по сравнению с контролем.

Отметим, что ОГГ вызывала изменения и в содержании C_{20} ЖК в мембранах митохондрий печени мышей (рис. 6). Содержание эйкозатриеновой кислоты в мембранах митохондрий в условиях ОГГ снижалось на 13%, эйкозодиеновой – на 80%, а эйкозеновой – на 33%. Соотношение между ЖК – предшественниками и ингибиторами синтеза эйкозаноидов – 20:4 ω 6/22:6 ω 3 в условиях ОГГ снизилось с 2.22 ± 0.12 до 1.43 ± 0.10 , что свидетельствовало о снижении метаболизма в эйкозаноидном цикле.

Известно, что эйкозаноиды являются сигнальными молекулами и имеют широкий спектр биологических функций, включая усиление или подавление воспалительных и аллергических реакций, контроль артериального давления, сокращения или расслабления гладких мышц и многое

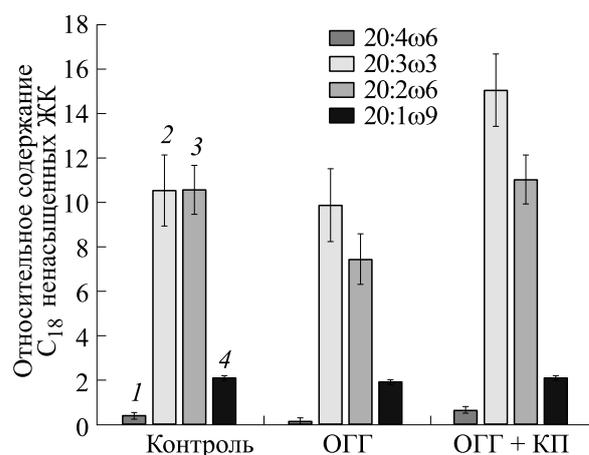


Рис. 5. Влияние ОГГ и карнитината 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина на относительное содержание (в %) C_{18} ЖК в мембранах митохондрий печени мышей: 1 – 18:3 ω 6, 2 – 18:2 ω 6, 3 – 18:1 ω 9, 4 – 18:1 ω 7.

другое [15]. Снижение содержания этих ЖК, возможно, так же как и снижение содержания линолевой кислоты, могло повлиять на устойчивость организма к стрессовым воздействиям. КП предотвращал изменения в содержании ненасыщенных C_{20} ЖК в мембранах митохондрий. При этом содержание эйкозеновой кислоты возросло более чем в пять раз по сравнению с контролем.

ОГГ, влияя на жирнокислотный состав мембран митохондрий, приводила к изменению биоэнергетических характеристик митохондрий. При этом максимальные скорости окисления НАД-зависимых субстратов в присутствии АДФ снижались на 28%, а в присутствии разобщителя (FCCP) – на 35%. Введение животным КП восстанавливало биоэнергетические характеристики митохондрий (табл. 2).

Влияя на функциональное состояние митохондрий препарат оказывал протекторный эффект в условиях стресса. Пятисуточное введение карнитинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина в дозе 10^{-6} моль/кг в 3.5–4.3 раза увеличивало продолжительность жизни и на 12–40% повышало выживаемость мышей в условиях различных видов гипоксии. При этом препарат увеличивал динамическую работоспособность животных: продолжительность плавания мышей с грузом в холодной воде увеличивалась более чем в три раза (табл. 3). Более того, препарат оказывал стимулирующее воздействие на семена пшеницы. Так, на третьи сутки появились проростки высотой 2–3 мм из семян, замоченных в растворах препарата (70% семян). В контроле семена только набухли и появились лишь единичные проростки (20%). На девятые сутки вес зеленой массы в опытной группе семян превышал контрольные значения на 51% ($2.48 \cdot 10^{-3}$ М) и 68% ($1.2 \cdot 10^{-3}$ М), а вес корней – на 13% ($2.48 \cdot 10^{-3}$ М) и 24% ($1.2 \cdot 10^{-3}$ М) (табл. 4).

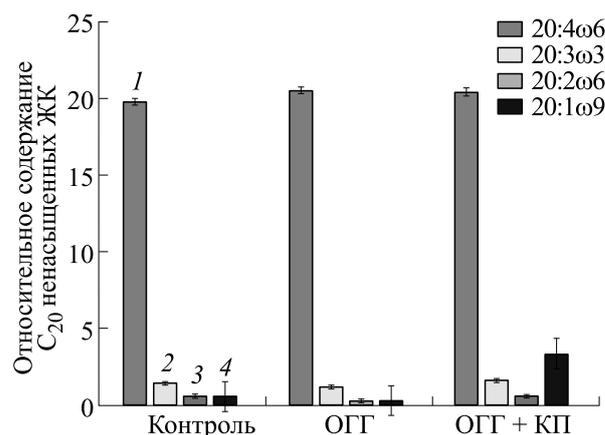


Рис. 6. Влияние ОГГ и карнитината 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина на относительное содержание (в %) C_{20} ЖК в мембранах митохондрий печени мышей: 1 – 20:4ω6, 2 – 20:3ω3, 3 – 20:2ω6, 4 – 20:1ω9.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На основании полученных данных можно прийти к заключению, что исследуемый препарат обладает антистрессовой активностью благодаря своим антиоксидантным и антирадикальным свойствам. Он представляет собой комплекс алкилпроизводного 3-гидроксипиридина и карнитина. Как и другие 3-гидроксипиридины, он является гетероциклическим аналогом ароматического фенолов, содержащим в ароматическом цикле гидроксильные и алкильные группы, что обеспечивает липофильность и антирадикальную активность этого соединения. Более того, наличие алкильной цепи в ароматическом цикле позволяет ему легко проникать в живые клетки [16]. Входящий в состав препарата 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридин способен активно реагировать с перекисными радикалами липидов, радикалами пептидов и белков. Кроме этого, в качестве производного 3-гидроксипиридина он обладает спо-

Таблица 2. Влияние ОГГ и карнитинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина на скорости окисления НАД-зависимых субстратов митохондриями мышей

Группа	V_0	V_3	V_4	V_3/V_4	FCCP
Контроль	7.5 ± 1.5	30.8 ± 1.1	8.0 ± 0.4	3.85 ± 0.03	31.5 ± 1.2
ОГГ	9.3 ± 1.3	22.4 ± 1.5	10.3 ± 0.2	2.17 ± 0.02	20.4 ± 1.1
ОГГ+КП	7.0 ± 1.8	32.0 ± 1.6	8.2 ± 0.9	3.90 ± 0.02	31.4 ± 1.5

Примечание. Скорости даны в нг·молях O_2 /мг белка × мин по данным 10 опытов. Среда инкубации: 0.25 М сахарозы, 10 мМ Трис-НСl, 2 мМ KH_2PO_4 , 5 мМ $MgSO_4$, 10 мМ KCl, pH 7.5. Дополнительные добавки: 200 мкМ АДФ, 10^{-6} М FCCP (карбонилцианид-*n*-трифторметоксифенилгидразон), 4 мМ глутамата, 1 мМ малата. Обозначения: V_0 – скорости окисления субстратов, V_3 – скорости окисления субстратов в присутствии АДФ, V_4 – скорости окисления в состоянии покоя (скорости окисления субстрата при исчерпании АДФ).

Таблица 3. Протекторная активность карнитинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина

Воздействие	Измеряемый параметр	Контроль	[КП]·10 ⁻⁶ моль/кг
Подъем на высоту 11000 тыс. м (гипобарическая гипоксия)	Время жизни в минутах, % выживших	3.8 ± 1.2 11%	13.5 ± 2.0 35%
Инъекция нитрита натрия 250 мг/кг (гемическая гипоксия)	Время жизни в минутах, % выживших	4.1 ± 1.5 14%	12.3 ± 2.1 28%
Инъекция азиды натрия 20 мг/кг (цитотоксическая гипоксия)	Время жизни в минутах, % выживших	2,4 ± 0.5 0%	10.3 ± 0.9 40%
Плавание с грузом при температуре	Время жизни в минутах, % выживших	3.6 ± 0.5 0%	11.4 ± 1.1 12%

Примечание. Представлены результаты 10 опытов.

Таблица 4. Рост зеленой массы и корней пшеницы при обработке семян водным раствором карнитинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина

№ п/п	[КП]·10 ⁻³ М	Вес зеленой массы, г	Прирост зеленой массы, г	% прироста зеленой массы, г	Вес корней, г	Прирост корней, г	% прироста корней, г
1	2.48	1.56 ± 0.08	0.53±0.03	57.3	3.61 ± 0.18	0.43 ± 0.02	13.40
2	1.20	1.73 ± 0.09	0.70±0.04	67.9	3.96 ± 0.20	0.77 ± 0.04	24.19
3*	0.00	1.03 ± 0.05	—	—	3.1 ± 0.16	—	—

Примечание. * — Контроль (замачивание семян пшеницы в воде без препарата). Прирост зеленой массы на девятые сутки проращивания — 68% (1.2·10⁻³ М КП). Прирост корней на девятые сутки проращивания — 24% (1.2·10⁻³ М КП). Измеряли вес 50 побегов или 50 корней проростков пшеницы.

способностью повышать активность антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутаза, каталазы и др.) [4]. В условиях стресса, когда активируется гипоталамо-гипофизарная система и увеличивается уровень глюкокортикоидов в крови, повышается активность моноаминоксидаз, приводящая к образованию H₂O₂, избыточная генерация которой приводит к свободнорадикальному повреждению липидов, белков и нуклеиновых кислот. Показано, что производные 3-гидроксипиридина являются ингибиторами моноаминоксидаз и, следовательно, ингибируют ПОЛ, обладают антиапоптотическим и органопротекторным действием при различных стрессовых воздействиях [17]. Более того, производные 3-гидроксипиридина модулируют активность NF-κB-сигнальной системы, контролирующую процессы воспаления, пролиферации клеток и апоптоз [18].

Второй компонент препарата L-карнитин является антиоксидантом: он ингибирует свободнорадикальное окисление, а также подавляет генерацию активных форм кислорода ферментами в цитоплазме клеток и непосредственно в дыха-

тельной цепи митохондрий, что обусловлено образованием комплексов L-карнитина с ионами Fe²⁺ и Cu²⁺ в активных центрах ферментов. Показано, что антиоксидантное действие карнитина в значительной степени связано с окислительно-восстановительной сигнализацией в клетке. Так, L-карнитин усиливает регуляцию Nrf2 и PPARα и подавляет NF-κB, что приводит к экспрессии генов антиоксидантных ферментов, таких как супероксиддисмутаза, глутатиопероксидаза, глутатионредуктаза, каталаза и др. При этом L-карнитин повышает устойчивость организма к стрессу за счет активации синтеза протекторных молекул: белков теплового шока, сиртуинов, тиреоредоксинов и небольших молекул антиоксидантов [19].

L-Карнитин повышает энергетический статус организма за счет транспорта длинноцепочечных жирных кислот из цитозоля в матрикс митохондрий, где происходит β-окисление жирных кислот, он стабилизирует отношение коэнзим А/ацетил-коэнзим А (CoASH/acetylCoA) в митохондриях и снижает выработку лактата [20]. Особое значение имеет β-окисление жирных кислот, протекающее в митохондриях мышечных тка-

ней в условиях повышенных мышечных нагрузок. Именно наличием L-карнитина, вероятно, объясняется наблюдаемое повышение динамической работоспособности у мышцей, получавших карнитинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина. Кроме того, повышая энергетический статус организма, препарат обладает ростостимулирующими свойствами для растений. При этом наиболее эффективной концентрацией препарата является $1.2 \cdot 10^{-3}$ М.

ВЫВОДЫ

На основании полученных данных можно предположить, что исследуемый препарат обладает антистрессовой активностью благодаря своим антиоксидантным и антирадикальным свойствам. Предотвращая перекисное окисление жирных кислот, входящих в состав липидной фазы мембран митохондрий, КП, вероятно, предотвращает дисфункцию митохондрий при стрессовых воздействиях и, следовательно, способствует сохранению энергетического метаболизма на высоком уровне, что, возможно, обеспечивает устойчивость организма к действию стрессовых факторов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем огромную благодарность сотрудникам лаборатории фото- и хемилюминесцентных процессов Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН Ю. Б. Цаплеву за помощь в регистрации спектров флуоресценции конечных продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий печени мышей.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской академии наук (номер государственной регистрации темы 44.4-1201253310) и Госзадания № 1220328000859).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследования осуществлялись в соответствии с требованиями Этического комитета РАН по работе с использованием лабораторных животных, с соблюдением международных рекомендаций по медико-биологическим исследованиям (СИ-ОМС), согласно приказу Министерства здравоохранения и социального развития России «Об утверждении лабораторной практики. Правила»

(№ 708 от 23.08.2019) и другим нормативным документам по этой проблеме.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Воронина Т. А. Мексидол: основные нейропсихотропные эффекты и механизм действия. *Фарматека*, **6**, 28–31 (2009).
2. Коробкин М. В., Пашин Е. Н., Бобер К. Е., Покровский М. В., Рагулина В. А., Артющкова Е. Б., Покровская Т. Г., Корокина Л. В., Цепелев В. Ю. и Даниленко Л. М. Изучение эндотелиопротективного и коронарного действия производных 3-оксипиридина. *Кубанский науч.-мед. вестн.*, **109** (4), 137–140 (2009).
3. Бугрова М. Л., Абросимов Д. А. и Яковлева Е. И. Влияние мексидола на мозговой натрийуретический пептид кардиомиоцитов в постреперфузионном периоде в эксперименте. *Современные технологии в медицине*, **7** (3), 40–47 (2015). DOI: 10.17591/stm2-15.7.3.05
4. Дюмаев К. М., Воронина Т. А. и Смирнов Л. Д. *Антиоксиданты в профилактике и терапии патологий ЦНС* (Изд-во Ин-та биомедицинской химии РАН, М. 1995).
5. Surai P. Carnitine Enigma: From antioxidant action to vitagene regulation. Part 2. Transcription factors and practical application. *Veterinary Sci.*, **2** (1), 66–84, (2015). DOI: 10.13188/2325-4645.1000018
6. Шляпинтох В. Я., Карпунин О. Н., Постников Л. М., Захаров И. В., Вичутинский А. А. и Цепалов В. Ф. 1966. *Хемилюминесцентные методы исследования медленных химических процессов* (Наука, М., 1966).
7. Каркищенко Н. Н. и Грачевой С. В. *Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях* (Профиль, М., 2010).
8. Mokhova E. N., Skulachev V. P., and Zhigacheva I. V. Activation of the external pathway of NADH oxidation in liver mitochondria of cold-adapted rats. *Biochim. Biophys. Acta*, **501**, 415–423 (1977). DOI: 10.1016/0005-2728(78)90109-3
9. Fletcher B. I., Dillard C. D., and Tappel A. L. Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues, *Anal. Biochem.*, **52**, 1–9 (1973). DOI: 10.1016/0003-2697(73)90327-8
10. Carreau J. P. and Dubacq J. P. Adaptation of a macro-scale method to the micro-scale for fatty acid methyl transesterification of biological lipid extracts. *J. Chromatogr.*, **151** (3), 384 (1979). DOI: 10.1016/S0021-9673(00)88356-9Get
11. Wang J., Sunwoo H., Cherian G., and Sim I. S. Fatty acid determination in chicken egg yolk: a comparison of different methods. *Poult Sci.*, **79** (8), 1168 (2000). DOI: 10.1093/ps/79.8.1168
12. Golovina R. V. and Kuzmenko T. E. Thermodynamic evaluation of the interaction of fatty acid methyl esters with polar and non-polar stationary phases, based on

- their retention indices. *Chromatography*, **10** (9), 545 (1977).
13. Каркищенко В. Н., Каркищенко Н. Н., Шустов Е. Б., Берзин И. А., Фокин Ю. В. и Алимкина О. В. Особенности интерпретации показателей работоспособности лабораторных животных по плавательным тестам с нагрузкой. *Биомедицина*, **4**, 34–46 (2016).
 14. Островская Р. У., Клейменова Н. Н., Камышева В. А., Молодавкин Г. М., Яворский А. Н. и Бойко С. С. В кн. *Фармакологическая коррекция утомления*, под ред. Ю. Г. Бобкова (Медицина, М., 1982), сс. 39–42.
 15. De Carvalho C. S. C. R., and Caramujo M. J. The Various roles of fatty acids. *Molecules*, **23** (10), 2583 (2018), DOI: 10.3390/molecules23102583
 16. Danilenko L. M., Skachilova S. Ya., Nadezhdin S. V., Timokhina A. S., Shcheblykina O. V., and Kotelnikova A. S. Pharmacological screening of substances with cardioprotective effect in the group of 3-oxypyridine derivatives. *Res. Result: Pharmacol.*, **4**, 125–131 (2018). DOI: 10.3897/rp-pharmacology.4.28414
 17. Волчегорский А., Сеницкий А. И., Мирошниченко И. Ю. и Рассохина Л. М. Влияние производных 3-оксипиридина и янтарной кислоты на активность моноаминоксидаз *in vitro*. *Хим.-фармацевт. журн.*, **52** (1), 3–7 (2018).
 18. Skachilova S. Ya., Ragulina V. A., Kostina D. A., and Burda Y. E. Test system for evaluation of the influence of the biological activity of substances on the signal system of NF-κB: focus on the derivatives of 3-hydroxypyridine. *Res. Result: Pharmacol. Clin. Pharmacol.*, **3** (2), 50–56 (2017). DOI: 10.18413/2313-8971-2017-3-2-50-56
 19. Асташкин Е. И. и Глейзер М. Г. Влияние L-карнитина на оксидативный стресс при сердечно-сосудистых заболеваниях. *Мед. совет.*, **10**, 94–100 (2016).
 20. Gnoni A., Longo S., Gnoni G. V., and Giudetti A. M. Carnitine in human muscle bioenergetics: Can carnitine supplementation improve physical exercise? *Molecules*, **25** (1), 182 (2020). DOI: 10.3390/molecules25010182
 21. Русина И. Ф., Карпунин О. Н. и Касаикина О. Т. Хемилюминесцентные методы в исследовании ингибированного окисления. *Хим. физика*, **32** (8), 53, (2013). DOI: 10.7868/s0207401x13080098
 22. Беляков В. А., Васильев Р. Ф. и Федорова Г. Ф. Кинетика окси-хемилюминесценции и ее использование для анализа антиоксидантов *Кинетика и каталит.*, **45** (3), 355–362 (2004)
 23. Русина И. Ф., Вепринцев Т. Л. и Васильев Р. Ф. Антиоксидантная активность двухатомных фенолов. *Хим. физика*, **41** (2), 12–19 (2022). DOI: 10.31857/S0207401X22020108
 24. Жигачева И. В., Бинюков В. И., Русина И. Ф., Миль Е. М. и Генерозова И. П. Антиоксидантные и антирадикальные свойства ресвератрола и его антистрессовая активность. *Хим. физика*, **39** (7), 41–48 (2020). DOI: 10.1134/S1990793120040120

Prevention of Mitochondrial Dysfunction with 2-Ethyl-6-Methyl-3-Hydroxypyridine Carnitinate

I.V. Zhigacheva*, I.F. Rusina**, N.I. Krikunova*, Yu.V. Kuznetsov*, M.M. Rasulov***,
M.A. Yakovleva*, and A.N. Goloshchapov*

*N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia

**N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences,
ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia

***State Scientific Center “State Research Institute of Chemistry and Technology of Organoelement Compounds”,
shosse Entuziastov 38, Moscow, 105118 Russia

The biological activity of 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridine carnitinate was studied. This substance exhibited high antiradical and antioxidant activity. It could indicate that 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridine carnitinate might have the ability to modulate stress-related alterations. The aim of this study was to examine the results supporting antistress property of this drug using a model of acute hypobaric hypoxia. Acute exposure to hypobaric hypoxia increased the rate of lipid peroxidation by 2.3 times, leading to changes in the content of C18 and C20 fatty acids in mitochondrial membranes: the double bond index of C18 fatty acids decreased by 18.2%, the content of 20:3 ω 3, 20:2 ω 6 and 20:1 ω 9 dropped by 13%, 80% and 33%, respectively. These changes were accompanied by changes in the bioenergetic characteristics of mitochondria. The maximum rates of NAD-dependent substrate oxidation decreased by 28–35%. Administration of 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridine carnitinate (10^{-6} mol/kg) to animals for 5 days suppressed lipid peroxidation, prevented changes in fatty acids composition of mitochondrial membranes, and, consequently, alterations in mitochondrial bioenergetics what most likely determined the anti-stress properties of the drug: 3.5–4.0-fold increase in life expectancy and 12–40% increase in the survival rate of mice under various types of hypoxia. The preparation was also able to enhance wheat seed germination and seedlings growth.

Keywords: mitochondria, antioxidants, lipid peroxidation, fatty acids, hypoxia, dynamic performance