

созданы путем скрещивания мышей, экспрессирующих мутантный ген APP, с мышами, экспрессирующими мутантный ген PSEN1. Особи жизнеспособны и плодовиты. У этих особей наблюдается видимое отложение бляшек в возрасте шести месяцев с еще большей нагрузкой амилоида в 18 месяцев. Когнитивные нарушения (сложность в запоминании объектов, пространственная ориентация) возникают после отложения бляшек, причем явное отличие в поведении от других мышей наблюдается в возрасте 18 месяцев [3].

Модель мышей Tg2576. Гены: APP. Мутации: APP KM670 / 671NL. Модификация: APP: Transgenic. Модель Tg2576 - одна из наиболее хорошо охарактеризованных и широко используемых мышей модели БА. Она сверхэкспрессирует мутантную форму APP гена (изоформа 695) со шведской мутацией (KM670 / 671NL), что приводит к повышенным уровням A β и к образованию амилоидных бляшек. Мыши Tg2576 развиваются нормально, но проявляют возрастные когнитивные сложности. Исследования показали, что у мышей в возрасте менее шести месяцев наблюдались нарушения пространственного обучения, дефицит рабочей памяти и контекстуальный страх. Прогрессирующее ухудшение когнитивных процессов происходит в 12 месяцев. К 11-13 месяцам образуются многочисленные паренхиматозные бляшки A β , однако нейрофибриллярных клубков не образуется.

Данная работа выполнена при поддержке стипендии Президента Российской Федерации молодым ученым и аспирантам (Проект СП-2802.2021.4)

Список литературы

1. Chin J. Selecting a mouse model of Alzheimer's disease / *Methods Mol. Biol.* –2011. – Vol. 670. – P. 169-189.
2. Molecular and cellular mechanisms of sporadic Alzheimer's disease: Studies on Rodent Models in vivo / N.V. Gulyaeva [et al.] // *Biochemistry.* – 2017. – Vol.3. – P. 315-326.
3. Pica—a model of nausea? Species differences in response to cisplatin / Y.L. Liu [et al.] // *Physiology & Behavior.* – 2005. – Vol.3. – P.271–277.
4. Presenilin 1 transgene addition to amyloid precursor protein overexpressing transgenic rats increases amyloid beta 42 levels and results in loss of memory retention // C. Agca [et al.] // *BMC Neuroscience.* – 2006, - Vol.1. – P.48.
5. The neurotoxicity of β -amyloid peptide toward rat brain is associated with enhanced oxidative stress, inflammation and apoptosis, all of which can be attenuated by scutellarin / L.L. Guo [et al.] // *Exp Toxicol Pathol.* – 2013. – V.5. – P.579–584.
6. The role of vascular factors in late-onset sporadic Alzheimer's disease. Genetic and molecular aspects. / A. Rocchi [et al.] // *Current Alzheimer Research.* – 2009. – Vol.6. – P. 224-37.

РОЛЬ ТИАЗИНОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ В РЕГУЛЯЦИИ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ФУНКЦИЙ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В МЕДИЦИНЕ

Самойлова Н.А.

студент кафедры генетики, цитологии и биоинженерии Воронежского государственного университета

Гуреев А.П.

старший преподаватель кафедры генетики, цитологии и биоинженерии Воронежского государственного университета

Попов В.Н.

ректор Воронежского государственного университета инженерных технологий

THE ROLE OF THIAZINE DYES IN THE REGULATION OF MITOCHONDRIAL FUNCTIONS AND THEIR USE IN MEDICINE

Samoylova N.

student of department genetics, cytology and bioengineering of Voronezh State University

Gureev A.

senior lecturer of department genetics, cytology and bioengineering of Voronezh State University

Popov V.

rector of Voronezh State University of Engineering Technology

Аннотация

Известно, что окислительно-восстановительный краситель метиленовый синий способен накапливаться в митохондриях и оказывает благотворное влияние на лечение различных нейродегенеративных заболеваний. Считается, что данные эффекты соединения связаны с его воздействием на метаболизм митохондрий. Метиленовый синий способен функционировать как альтернативный переносчик электронов, который эффективно перемещает электроны между NADH и цитохромом c (cyt c). Происходит перенаправление переноса электронов при ингибировании, что приводит к поддержанию и стимулированию биоэнергетических процессов в митохондриях.

Метаболит метиленового синего, Азур В, тоже обладает фармакологическими эффектами, однако его действия еще подробно не изучены. Возможно, что некоторые, если не большинство центральных эффектов метиленового синего могут быть связаны именно с его N-деметилованными метаболитами. Неизвестно способен ли Азур В осуществлять альтернативный транспорт электронов в электрон-транспортной цепи, и как он влияет на биоэнергетические процессы митохондрий. Предположительно из-за структурного сходства с метиленовым синим он будет осуществлять данные процессы даже в более низких концентрациях. Это помогло бы решить проблему ряда побочных эффектов, к которым может приводить использование метиленового синего в высоких концентрациях.

Abstract

It is known that the redox dye methylene blue is able to accumulate in mitochondria and has a beneficial effect on the treatment of various neurodegenerative diseases. These effects of the compound are believed to be related to its effects on mitochondrial metabolism. Methylene blue is able to function as an alternative electron carrier that efficiently transfers electrons between NADH and cytochrome c (cyt c). Redirection of electron transfer occurs during inhibition, which leads to the maintenance and stimulation of bioenergetic processes in mitochondria.

The methylene blue metabolite, Azur B, also has pharmacological effects, but its actions have not yet been studied in detail. It is possible that some, if not most of the central effects of methylene blue may be due precisely to its N-demethylated metabolites. It is not known whether Azur B is able to carry out alternative transport of electrons in the electron transport chain, and how it affects the bioenergetic processes of mitochondria. Presumably, due to its structural similarity with methylene blue, it will carry out these processes even at lower concentrations. This would solve the problem of a number of side effects that can be caused by the use of methylene blue in high concentrations.

Ключевые слова: метиленовый синий, азур В, митохондриальное дыхание, трансмембранный потенциал, активные формы кислорода, продукция перекиси водорода.

Keywords: methylene blue, azure B, mitochondrial respiration, membrane potential, reactive oxygen species, hydrogen peroxide production.

Метиленовый синий: характеристика, строение и свойства

В конце XIX века в текстильной промышленности произошел рост спроса на красители, что привело к быстрому исследованию и изготовлению различных синтетических красителей. Первые красители были изготовлены на основе анилина, поэтому он получил очень широкое распространение и использование.

В 1876 году Генрих Каро синтезировал метиленовый синий (МС) в качестве флуоресцентного, триазинового красителя на основе анилина. МС не совсем соответствовал стандартам текстильной промышленности, однако краситель получил более широкое применение в других областях [3].

МС – гетероциклическое ароматическое соединение, обладающее уникальной молекулярной формулой, которая делает его эффективным лекарственным средством. При комнатной температуре соединение выглядит как твердые темно-зеленые кристаллы или порошок без запаха. При смешивании с водой порошок растворяется и дает характерный темно-синий раствор. При нагревании МС выделяет очень токсичные пары: оксиды азота, оксиды серы и хлорид. Характерный цвет связан с тем, что он хорошо поглощает спектр видимого света 600-700 нм, а спектр 350-600 нм не трогает, это и придает соединению характерный синий цвет. В восстановленной форме соединение бесцветно, так как является не фоточувствительным для видимого спектра. МС используется в качестве красителя нуклеиновой кислоты из-за его способности связывать ДНК и РНК.

Ароматическое кольцо МС обеспечивает высокую липофильность соединения и, следова-

тельно, делает его легко проникающим сквозь липидные мембраны, в том числе и гемато-энцефалический барьер. Положительный же заряд на МС обеспечивает межмембранный потенциал ($\Delta\Psi$) митохондрий.

Применение метиленового синего

МС, впервые обнаруженный и использованный в качестве красителя в текстильной промышленности, долгое время использовался для биологического окрашивания в гистологии, бактериологии и гематологии. Благодаря своим уникальным физико-химическим свойствам, это было первое синтетическое лекарство, использованное в медицине, которое применялось для лечения малярии более века назад [5].

Противомалярийное действие соединения обусловлено тем, что он может действовать как sensibilizator хлорохина. В качестве противопаразитарного лекарства МС является плейотропным средством: он препятствует метаболизму гемоглобина и гема в органеллах пищеварения и является селективным ингибитором глутатионредуктазы *Plasmodium falciparum*. Последний эффект приводит к истощению запасов глутатиона, что повышает чувствительность паразита к действию лекарственного препарата хлорохина.

В настоящее время МС получил широкое применение в лечении различных метгемоглобинемий. Некоторые процессы в организме могут приводить к окислению иона железа в гемоглобине до степени окисления +3. При этом образуется форма гемоглобина, известная как метгемоглобин (HbOH), что приводит к нарушению процессов транспортировки кислорода белком. Благодаря способности МС участвовать в реакциях окислительно-восста-

новительного цикла этот препарат успешно используется для лечения данного заболевания. МС разрешен FDA (управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов) для лечения приобретенной метгемоглобинемии, но также используется не по назначению для лечения врожденной метгемоглобинемии [5].

Было обнаружено действие МС и на инактивацию микробов, что сделало его первым соединением, которое использовали в роли антисептика в клинической терапии, а также первым антисептическим красителем для терапевтических целей [3].

Идентификация бактерий и открытие структурной организации нервных тканей, осуществились тоже благодаря свойствам МС. Еще в начале двадцатого века МС использовался по широкому кругу медицинских и гигиенических показаний. Среди прочего, его добавляли к лекарствам психиатрических пациентов, чтобы изучить их соблюдение, что можно было контролировать по наблюдаемому цвету мочи. Эти исследования привели к открытию, что МС обладает антидепрессивным и дополнительным положительным психотропным действием [6].

Согласно опубликованным библиографиям, эффективное лечение отравления цианидом МС у лабораторных животных известно давно. А уже в 1932 году в Калифорнийском университете был успешно пролечен случай отравления человека цианидом. Имеются данные, которые говорят о том, что МС, ингибитор сосудорасширяющего действия, может иметь терапевтический эффект при лечении вазоплегии - системного воспалительного ответа, связанного с глубоким расширением сосудов.

В последние годы МС стали рассматривать как потенциальное средство лечения нейродегенеративных расстройств. В исследованиях как *in vitro*, так и *in vivo* МС продемонстрировал впечатляющую эффективность в смягчении нейродегенерации и сопутствующих поведенческих фенотипов на животных моделях таких состояний, как инсульт, глобальная церебральная ишемия, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и черепно-мозговые травмы.

Интересны сообщения о том, что МС обладает антидепрессивной и анксиолитической активностью на доклинических моделях и показал многообещающие результаты в клинических исследованиях шизофрении и биполярного расстройства. МС - заслуживающий внимания ингибитор моноаминоксидазы А (МАО-А), которая является хорошо известной мишенью для антидепрессивного действия. Поскольку МС работает как альтернативный акцептор и донор электронов, это позволяет ему повышать производство энергии нейронами и подавляет образование супероксида, т.е. регенерировать функцию митохондрий. Эти эффекты также могут способствовать его терапевтической активности [6].

Участие МС в дыхательной цепи митохондрий

МС в низких дозах стимулирует митохондриальное дыхание, отдавая электроны в цепь переноса

электронов. Это возможно благодаря уникальным химическим свойствам автоокислительно-восстановительного потенциала, которое позволяет МС при низких концентрациях формировать окислительно-восстановительное равновесие за счет циклической смены электронов, т.е. выступая в качестве донора и акцептора. Это свойство позволяет совершать круговорот электронов от химических веществ внутри митохондриальной матрицы к белкам, переносящим электроны в митохондриях. Эти транспортные белки действуют как акцепторы электронов, донором которых служит МС в митохондриях. Кислород, получаемый из оксигемоглобина, транспортируемого в кровотоке, выступает конечным акцептором электронов в ЭТЦ. Молекулярный кислород восстанавливается до воды в реакции, катализируемой митохондриальным ферментом цитохромоксидазой (комплекс IV, цитохром с оксидаза). Цепь переноса электронов связана с биохимическим процессом окислительного фосфорилирования, что приводит к повышенному потреблению кислорода и образованию АТФ из АДФ [1].

Роль метиленового синего в регуляции метаболизма активных форм кислорода

Перекись водорода интересна для исследований тем, что она принимает участие в двух аспектах жизнедеятельности клетки. С одной стороны, она поддерживает нормальное функционирование клетки, а с другой - одновременно является угрозой для неё, так как при ее неокончательном восстановлении может образовываться самая опасная форма АФК (активные формы кислорода) – гидроксил-радикал. Сейчас активно разрабатываются методы лечения, направленные на противодействие продукции АФК, происходящих из митохондрий. Одним из последних соединений, представляющих значительный интерес, является МС [7].

Как известно, МС значительно увеличивает продукцию H_2O_2 в митохондриях и в состоянии покоя, синтезирующих АТФ и в митохондриях с нарушенным дыханием, с учетом того, что каждая комбинация субстратов поддерживает дыхание. Образование H_2O_2 без образования супероксида, наблюдаемое в присутствии МС, объясняется как результат восстановления молекулярного кислорода до перекиси. Эти эффекты предположительно связаны с конкуренцией между МС и кислородом за электроны, что приводит к двухэлектронному восстановлению МС до MSH_2 , а не к одноэлектронному восстановлению O_2 до O_2^- [4].

Однако, по некоторым данным МС не может обеспечить защиту от прямого воздействия перекиси водорода. Таким образом, альтернативная стратегия переноса электрона МС отличается от традиционного подхода улавливания свободных радикалов. Предположительно соединение позволяет избежать производства АФК за счет изменения маршрута переноса электронов и обхода блокировки комплекса I / III [1].

Азур В

Азур В – катионный краситель, основной метаболит МС, полученный в результате окислительного деметилирования. Представляет собой темно-

зеленые кристаллы, растворимые в воде. Отсутствие метильной группы приводит к тому, что заряд соединения распределен неравномерно, а смещен в одну сторону. Предположительно, именно эта особенность Азура В и способствует его лучшему проникновению в органы и ткани. Также соединение лучше метаболизируется, что делает его безопасным и в ряде случаев более эффективным, чем МС.

Считается, что Азур В обладает фармакологическими эффектами, однако его действия еще подробно не изучены. Возможно, что некоторые, если не большинство центральных эффектов МС могут быть связаны именно с его N-деметилованными метаболитами [2].

Применение Азура В, сравнение с метиленовым синим

Для Азура В МС является пролекарством. Важно отметить, что Азур В обладает превосходной активностью в отношении множества биохимических мишеней по сравнению с МС, например, является более мощным ингибитором агрегации амилонного бета (Аβ) -пептида, более сильным ингибитором МАО-А. Одно не очень заметное исключение из этого правила - влияние на рост и передачу паразита *Plasmodium falciparum*.

Азур В обладает окислительно-восстановительными свойствами, очень похожими на свойства МС, который является мощным антидотом цианида. Преимущество метаболита в том, что он может иметь более высокую внутриклеточную диффузию, уже присутствует в коммерчески доступных растворах МС, и очень быстро появляется в крови после введения препарата. Таким образом, Азур В может быть членом семейства фенотиазиевых хромофоров, представляющих интерес для лечения цианидной интоксикации.

Примечательные антидепрессантоподобные эффекты Азура В позволяют говорить о том, что он имеет доступ к ЦНС. Азур В ($C_{15}H_{16}ClN_3S$) структурно похож на МС ($C_{16}H_{18}ClN_3S$), но они различаются по степени ионизации их окисленных форм. Хотя оба соединения существуют в виде катиона при физиологических значениях pH, Азур В может до некоторой степени депротонировать с образованием нейтральных хинониминовых (промежуточных) разновидностей. Следовательно, можно ожидать, что фракция Азура В, которая существует в виде хинониминов, будет легко диффундировать через биологические мембраны и, таким образом, с большей вероятностью проникнет через гематоэнцефалический барьер, чем МС [6].

Биологические красители, МС и его метаболит Азур В, были оценены как противоопухолевые и противовоспалительные средства. Азур В, вводимый с питьевой водой мышам, подавлял рост пересаженных опухолей и рост первичных опухолей (только у самок), индуцированных метилхолантроном. Азур В, вводимый внутривенно мышам, чувствительным к БЦЖ (BCG-sensitized - *Bacillus Calmette*, бацилла Кальметта-Герена), за 15 минут

до заражения липополисахаридом грамотрицательных бактерий, снижает продукцию TNF (*tumor necrosis factor* – фактор некроза опухоли) до 10% от контрольных значений и предотвращает смерть от эндотоксического шока. МС снижает продукцию TNF до 50% от контрольных значений, но не защищает животных от эндотоксического шока. Эти результаты показывают, что некоторые из эффектов, ранее приписываемых МС, вероятно, опосредуются его метаболитом, то есть Азуром В. Именно низкая токсичность и простота применения красителей объясняют их использование в клинических условиях. МС является селективным ингибитором синтазы оксида азота (NO) и растворимой гуанилатциклазы 2, ферментов, участвующих в опосредованной оксидом азота вазодилатации – снижение тонуса мышц сосудов способствует увеличению просвета кровеносных сосудов; по этой причине МС используется при резистентном к катехоламинам септическом шоке. Влияние Азура В на эти ферменты в сигнальном пути, индуцированном NO еще не изучено.

В сравнительных исследованиях следует помнить, что кривые доза-ответ для МС и Азура В могут иметь необычную форму, что указывает на горметические эффекты, означающие, что при высоких концентрациях лекарство может иметь гораздо меньшую активность, чем на промежуточных уровнях.

Данная работа выполнена при поддержке стипендии Президента Российской Федерации молодым ученым и аспирантам (Проект СП-2802.2021.4)

Список литературы

1. Alternative Mitochondrial Electron Transfer as a Novel Strategy for Neuroprotection. / Y. Wen [et al.] // *J Biol Chem.* – 2011. – Vol. 286. – P. 16504–16515.
2. Azure B, a metabolite of methylene blue, is a high-potency, reversible inhibitor of monoamine oxidase. / A. Petzer. [et al.] // *Toxicol Appl Pharmacol.* – 2012. – Vol. 258. – P. 403–409.
3. Cellular and Molecular Actions of Methylene Blue in the Nervous System. / M. Oz [et al.] // *Med Res Rev.* – 2011. – Vol. 31. – P. 93–117.
4. Enhanced hydrogen peroxide generation accompanies the beneficial bioenergetic effects of methylene blue in isolated brain mitochondria. / L. Tretter [et al.] // *Original Contribution.* – 2014. – Vol. 77. – P. 317–330.
5. Howland R. H. Methylene Blue: The Long and Winding Road from Stain to Brain: Part 1. // *J Psychosoc Nurs Ment Health Serv.* – 2016. – Vol. 9. – P. 21.
6. Methylene blue and its analogues as antidepressant compounds. / A. Delpont [et al.] // *Metab Brain Dis* – 2017. – Vol. 5. – P. 1357–1382.
7. Methylene blue improves sensorimotor phenotype and decreases anxiety in parallel with activating brain mitochondria biogenesis in mid-age mice. / A.P. Gureev [et al.] // *Neurosci Res.* – 2016. – Vol. 113. – P. 19–27.