

©Коллектив авторов

## ВЛИЯНИЕ ИСТОЩЕНИЯ L-КАРНИТИНА ПРИ ДЛИТЕЛЬНОЙ ТЕРАПИИ МЕЛЬДОНИЕМ НА МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ БАЛАНС В МОЗГЕ МЫШЕЙ

Е.А. Шафоростова<sup>1\*</sup>, А.П. Гуреев<sup>1,2</sup>, И.Ю. Виткалова<sup>1,2</sup>, В.Н. Попов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Воронежский государственный университет,  
394018, Воронеж, Университетская пл., 1; \*эл. почта: ekaterina-shaforostova@mail.ru

<sup>2</sup>Воронежский государственный университет инженерных технологий,  
394036, Воронеж, просп. Революции, 19

Мельдоний — это метаболический препарат, использующийся для лечения ишемических болезней сердца. Его эффект заключается в способности ингибировать синтез и транспорт L-карнитина. При этом длительный дефицит L-карнитина теоретически может негативно сказываться на активности транскрипционного фактора *Nrf2*, который крайне важен для поддержания митохондриального баланса в клетках. Мы показали, что введение мельдония мышам в течение 3 месяцев в дозе 100 мг/кг (перорально с водой) вызывает снижение экспрессии гена *Nrf2* в мозге. Это приводит к подавлению митохондриального биогенеза, что проявляется в снижении уровня мтДНК и уровня экспрессии *Cox1*. При этом не отмечено негативного эффекта мельдония на биоэнергетические параметры митохондрий, что проявляется в поддержании стабильного митохондриального потенциала и уровня продукции активных форм кислорода. Вероятно, в качестве компенсаторного эффекта активируется процесс слияния митохондрий, что позволяет митохондриям поддерживать основные биоэнергетические характеристики. Через месяц после прекращения приема мельдония наблюдается, напротив, увеличение экспрессии генов, ответственных за митохондриальный биогенез и митофагию, и возвращение уровня экспрессии генов, ответственных за слияние митохондрий, к контрольным значениям. Вероятно, это связано с нормализацией уровня L-карнитина в клетках мозга. Таким образом, положительный эффект мельдония на центральную нервную систему вызывается способностью активировать слияние митохондрий в мозге, что является компенсаторным эффектом на подавление митохондриального биогенеза, вызванного дефицитом L-карнитина и дезактивации *Nrf2*.

**Ключевые слова:** мельдоний; L-карнитин; *Nrf2*; митохондриальный биогенез; митофагия; слияние/деление митохондрий

**DOI:** 10.18097/PBMC20216701074

### ВВЕДЕНИЕ

Мельдоний — это метаболический препарат, использующийся в кардиологии для лечения ишемических болезней сердца и входящий в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов [1]. Эффект препарата заключается в его способности ингибировать одновременно и синтез L-карнитина [2], и его поступление в клетки [3], что вызывает нарушение транспорта жирных кислот в митохондрии. Жирные кислоты — это основной субстрат для сердечной мышцы, однако в условиях гипоксии полное окисление жирных кислот невозможно, поэтому сердце испытывает недостаток энергии и происходит накопление токсичного ацил-карнитина [4]. Мельдоний “переключает” метаболизм сердца с окисления жирных кислот на окисление глюкозы, что энергетически более выгодно в условиях недостатка кислорода [5].

Продолжительное время считалось, что глюкоза выступает основным источником энергии головного мозга, а жирные кислоты не способны проходить через гематоэнцефалический барьер, тем самым не участвуя в энергетическом метаболизме мозга [6]. Однако в последние десятилетия стали появляться работы, подтверждающие поступление жирных кислот в мозг [7]. Астроциты характеризуются более выраженным окислением жирных кислот [8]. Полученные ранее результаты свидетельствуют о том,

что благодаря окислению жирных кислот мозг получает примерно 20% энергии [9].

Есть данные, которые показывают важность L-карнитина для когнитивных процессов [10], поэтому вызванное мельдонием истощение L-карнитина должно негативно сказываться на мозговой деятельности. В то же время есть данные, которые показывают, что мельдоний может оказывать определенный нейропротекторный эффект: улучшает память, общую активность и внимание у пациентов с ишемическими инсультами [11], улучшает память, внимание и подвижность нервных процессов у пациентов с дисциркуляторной энцефалопатией [12, 13]. Вероятно, митохондрии мозга адаптируют свой метаболизм под дефицит L-карнитина, в том числе и за счёт регуляции динамики митохондрий. Ранее нами было изучено влияние мельдония на метаболизм глюкозы и жирных кислот в мозге [14]. Целью данной работы было изучение влияния мельдония на экспрессию генов, кодирующих белки, отвечающих за процессы (1) митохондриального биогенеза: *Nrf2* (The Nuclear factor-2 erythroid related factor-2), *Cox1* (Cytochrome c oxidase 1), *Nrf1* (Nuclear respiratory factor 1), *Tfam* (Transcription Factor A, Mitochondrial); (2) митофагии: *p62*, *Pink1* (PTEN-induced kinase 1), *Nrf2*; (3) деления: *Fis1* (Fission, Mitochondrial 1); (4) слияния митохондрий: *Mfn1* (Mitofusin-1), *Mfn2* (Mitofusin-2), а также их биоэнергетические параметры.

## МЕТОДИКА

### Лабораторные животные

В нашем исследовании были задействованы двухмесячные мыши *Mus Musculus* линии C57BL/6. Мыши были доставлены из питомника Научного центра биомедицинских технологий (филиал “Столбовая”). В начале эксперимента 32 мыши обоих полов случайным образом разделили на две группы. Контрольная группа (n=12) получала чистую питьевую воду *ad libitum*. Экспериментальная группа (n=20) получала мельдоний перорально с питьевой водой в ежедневной дозе 100 мг/кг/день в течение 2 месяцев.

Затем экспериментальная группа была разделена на группы М2 (группа, принимавшая мельдоний в течение 2 месяцев) и М3 (группа, принимавшая мельдоний в течение 3 месяцев). Животные группы М2 получали чистую питьевую воду в течение последующего месяца, а животные группы М3 продолжали получать препарат в течение этого месяца.

По истечении 3 месяцев эксперимента все мыши были умерщвлены, ткани коры больших полушарий мозга были извлечены и использованы в молекулярно-генетических и биохимических исследованиях.

### Выделение тотальной ДНК

Выделение тотальной ДНК проводили с помощью набора *diaGene* (“Диа-М”, Россия) строго по протоколу, предоставленному производителем.

### Измерение количества копий мтДНК

Количество мтДНК оценивали с помощью количественной ПЦР фрагмента мтДНК с использованием подхода  $\Delta\Delta C_q$ . Последовательности праймеров для мтДНК были следующими:

F: 5'-ACGAGGGTCCAACCTGTCTCTTA-3';

R: 5'-AGCTCCATAGGGTCTTCTCGT-3'.

В качестве референса использовали гены *Gapdh* и *18s* ядерной ДНК. Последовательности праймеров были следующими:

*Gapdh*—F: 5'-GGCTCCCTAGGCCCTCTCTG-3';

R: 5'-TCCCAACTCGGCCCCCAACA-3';

*18s*—F: 5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3';

R: 5'-GCTGGAATTACTGTGGCT-3'

### Выделение тотальной РНК

Полученный образец гомогенизировали в растворе *ExtractRNA*, инкубировали лизат при комнатной температуре в течение 10-15 мин для полной диссоциации нуклеопротеидных комплексов. Лизат центрифугировали в течение 10 мин при 12000-15000 g для удаления нерастворимых фрагментов. Супернатант переливали в новую пробирку. Добавляли на каждый 1 мл реагента *ExtractRNA*, который был использован при гомогенизации, по 0,2 мл хлороформа. После плотного закрытия крышки встряхивали образец в течение 15 с.

Смесь инкубировали в течение 3-5 мин при комнатной температуре, периодически встряхивая, и далее центрифугировали при 12000 g в течение 15 мин при 4°C. Аккуратно отбирали водную фазу, держа пробирку под углом примерно 45°, избегая касания интерфазы или органической фазы, и перемещали в новую пробирку. В водную фазу добавляли 0,5 мл 100% изопропанола на каждый 1 мл реагента. Полученную смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. Затем центрифугировали образец в течение 10 мин при 12000 g. Супернатант тщательно отбирали, оставляя осадок РНК на дне пробирки. По стенке пробирки добавляли 2 мл 75% этанола на каждый 1 мл изопропанола. Образец центрифугировали при 16500 g в течение 5 мин при комнатной температуре. После удаления этанола, осадок высушивали на воздухе в пробирке с открытой крышкой в течение 5-7 мин. Осадок, содержащий РНК, растворяли в нужном объеме воды, свободной от РНКаз.

### Реакция обратной транскрипции

Обратную транскрипцию РНК проводили на приборе *Eppendorf Mastercycler personal* (“Eppendorf”, Германия). При 70°C инкубировали 5 мин смесь РНК (5 мкг), олиго(dT)18 (0,5 мкг) и деионизированной воды. После добавления десятикратного буфера для ПЦР (“*SybEnzyme®*”, Россия) (2 мкл) и 10 мМ смеси dNTP (2 мкл) содержимое инкубировали при 37°C. В реакции обратной транскрипции использовали *M-MuLV* обратной транскриптазы (“*SybEnzyme®*”) (40 ед.). Содержимое инкубировали в течение 1 ч при 37°C.

### Количественный ПЦР-анализ

На приборе “*Bio-Rad CFX96TM Real-Time System*” был проведён количественный ПЦР-анализ. Компоненты реакционной смеси: *qPCRmix-HS SYBR+ROX* (5 мкл), комбинация ПЦР праймеров (прямой и обратный) (20 нМ); ДНК-матрица (12 нг). Общая денатурация проходила 3 мин при 94°C; стартовая денатурация при 10 с при 94°C; отжиг праймеров 20 с при 59°C, элонгация 30 с при 72°C; количество циклов 35; общая элонгация 5 с при 72°C; кривая плавления от 65°C до 95°C. Гены *18s* и *Gapdh* использовались в качестве референса. Количественно нормализованная экспрессия генов была выражена относительными единицами флуоресценции (RFU).

Последовательности праймеров для ПЦР были следующими:

*Cox1*—F: 5'-TCGCAATTCCTACCGGTCTC-3';

R: 5'-CGTGTAGGGTTGCAAGTCAGC-3';

*Nrf1*—F: 5'-AGCACGGAGTGACCCAAA-3';

R: 5'-TGTACGTGGCTACATGGACCT-3';

*p62*—F: 5'-GCCAGAGGAACAGATGGAGT-3';

R: 5'-TCCGATTCTGGCATCTGTAG-3';

*Tttn*—F: 5'-TCCCCTCGTCTATCAGTCTTGT-3';

R: 5'-TCTTTGTATGCTTTCCACTCAGC-3';

*Mfn1*—F: 5'-CAGAGAAGAGGGTTTATTCA-3';

R: 5'-ACTCATCAACCAAAACAGAT-3';

*Mfn2*—F: 5'-TGAATGTTGTGTTCTTTCTG-3';  
R: 5'-AAGTGCTCTCTGCTAAATGT-3';  
*Fis1*—F: 5'-CTACAGGGGTGCAGGAGAAA-3';  
R: 5'-AGATGGACTGGTAGGCATGG-3';  
*Pink1*—F: 5'-GAGCAGACTCCCAGTTCTCG-3';  
R: 5'-GTCCCACTCCACAAGGATGT-3';  
*Nrf2*—F: 5'-CTCTCTGAACTCCTGGACGG-3';  
R: 5'-GGGTCTCCGTAAATGGAAG-3';  
*18s*—F: 5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3';  
R: 5'-GCTGGAATTACTGTGGCT-3';  
*Gapdh*—F: 5'-GGCTCCCTAGGCCCTCTCTG-3';  
R: 5'-TCCCAACTCGGCCCCCAACA-3'.

#### Выделение митохондрий из мозга мыши

Среда для выделения митохондрий мозга содержала 220 мМ маннитол, 100 мМ сахарозу, 20 мМ HEPES, 1 мМ ЭГТА, 0,2 мг/мл бычий сывороточный альбумин (БСА), свободный от жирных кислот, pH 7,4. В среду для промывки митохондрий входили все те же компоненты, кроме БСА. Подготовка перколльной среды заключалась в растворении 220 мМ маннитола, 100 мМ сахарозы, 20 мМ HEPES, 1 мМ ЭГТА в 100% Перколле, pH 7,4. 23% раствор Перколлы готовили, используя 100% Перколл, который растворяли в среде для промывки митохондрий.

Ткани мозга были промыты в среде для выделения и гомогенизированы в стеклянном гомогенизаторе Доунса (Пестик А) в 6 мл среды для выделения при температуре 4°C. Полученный гомогенат перемещали в пробирку объемом 1,7 мл, доводили до необходимого объема средой выделения и центрифугировали гомогенат в течение 5 мин при 900 g. Полученный супернатант центрифугировали в течение 10 мин при 14000 g для осаждения фракции свободных митохондрий и синапсом. После удаления супернатанта осадок ресуспендировали в 200 мкл среды для промывки, переносили в одну чистую пробирку и аккуратно наслаивали по 200 мкл сверху на 23% перколльный раствор. После центрифугирования в градиенте в течение 15 мин при 23000 g удаляли верхний и средний слои, а нижний слой ресуспендировали, доводили средой для промывки до объема 1,7 мл и центрифугировали в течение 10 мин при 18000 g. После удаления супернатанта полученный осадок ресуспендировали, переносили в одну пробирку и центрифугировали при 14000 g в течение 5 мин. Супернатант удаляли, а конечный осадок ресуспендировали в 50 мкл среды для промывки.

#### Измерение биоэнергетических параметров

Среда для измерения содержала 45 мМ KCl, 20 мМ HEPES, 4 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 мМ ЭГТА, 0,2 мг/мл БСА, а так же NADH-зависимые субстраты: 5 мМ пируват и 5 мМ малат.

Все измерения были проведены на спектрофлуориметре Hitachi F-7000 ("Hitachi", Япония). Измерение мембранного потенциала митохондрий было определено по интенсивности

флуоресценции катионного красителя Сафранина О ("Sigma-Aldrich", США) ( $\lambda_{\text{ex}}=495$  нм,  $\lambda_{\text{em}}=586$  нм). Снижение флуоресценции Сафранина О свидетельствовало о его проникновении внутрь митохондрий в обмен на катионы  $\text{H}^+$ , что соответствует генерации мембранного потенциала. Для полного подавления мембранного потенциала добавляли 5 мМ 2,4-динитрофенола (ДНФ).

Для измерения продукции  $\text{H}_2\text{O}_2$  использовали Amplex Ultra Red ("Invitrogen", США) и пероксидазу хрена ("ThermoFisher Scientific", США). Благодаря изменению интенсивности флуоресценции резорурфина, которое образовалось в ходе реакции, определяли кинетику образования  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $\lambda_{\text{ex}}=568$  нм,  $\lambda_{\text{em}}=581$  нм).

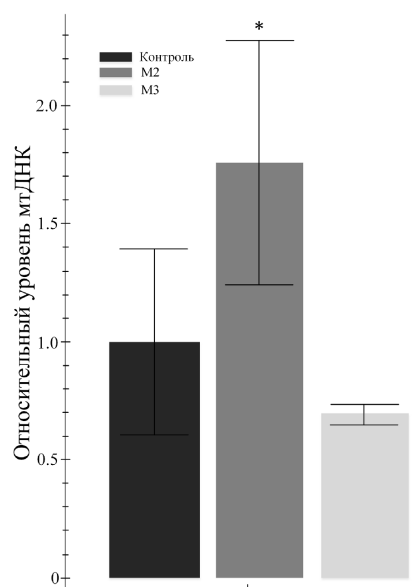
#### Статистическая обработка

Статистический анализ проводили с использованием методов статистической дисперсии программы Statistica 10 ("StatSoft", США). Результаты представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка средней. Значение различий между группами оценивалось с помощью t-критерия Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

#### Влияние мельдония на количество копий мтДНК

Пероральное введение мельдония мышам в течение 2 месяцев (группа M2) увеличивало количество копий мтДНК в мозге в 1,75 раз у мышей по сравнению с контролем. У мышей, получавших мельдоний с питьевой водой в течение 3 месяцев (группа M3), количество копий мтДНК было ниже, чем в контроле, но различия статистически не достоверны (рис. 1). При этом уровень мтДНК в мозге в группе M2 выше в 2,5 раза по сравнению с группой M3 ( $p<0,05$ ).



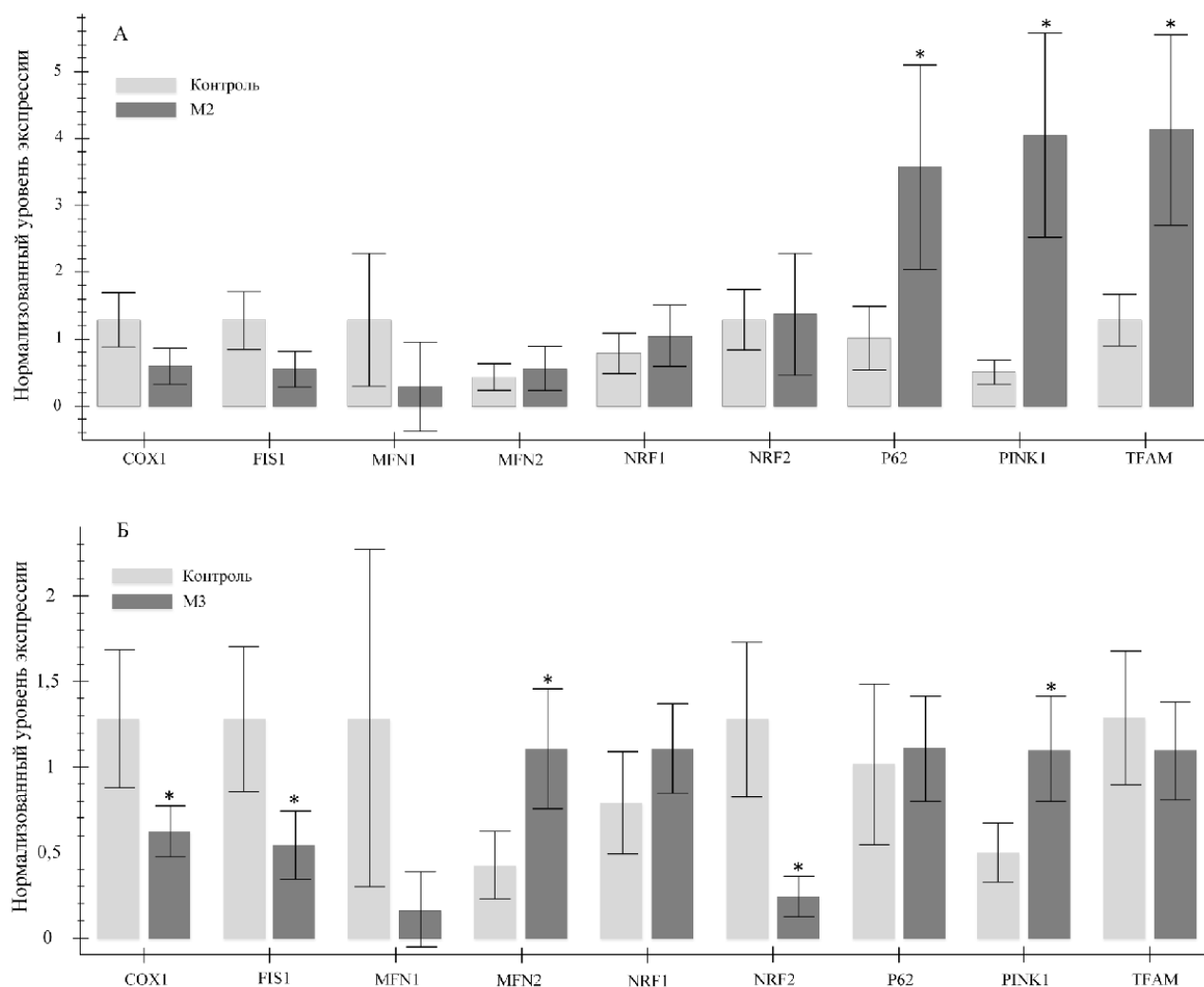
**Рисунок 1.** Количество копий мтДНК, вызванных длительным лечением мельдонием, в сравнении с контролем. Данные представлены в виде среднего арифметического  $\pm$  стандартная ошибка, \* —  $p<0,05$  (t-критерий Стьюдента).

Влияние мелодии на митохондриальный биогенез и митофагию

Экспрессия митохондриального гена *Cox1* в мозге снижалась в 2 раза у мышей, которые подвергались терапии мелодией в течение 3 месяцев ( $p < 0,05$ ). Это в совокупности с данными о снижении количества копий мтДНК в группе М3 может свидетельствовать о снижении интенсивности митохондриального биогенеза. Митохондриальный биогенез сложно скоординированный процесс, который регулируется как минимум двумя транскрипционными факторами. С одной стороны, есть PGC-1 $\alpha$ , который регулирует экспрессию *Nrf1* и *Tfam*. Ранее мы показали, что в мозге мелодия вызывает снижения уровня гена, кодирующего PGC-1 $\alpha$  [14]. С другой стороны, митохондриальный биогенез регулируется транскрипционным фактором Nrf2 [15]. Введение мелодии в течение 3 месяцев не изменяло уровень экспрессии генов *Nrf1*, *p62* и *Tfam*, но снижало уровень экспрессии *Nrf2*. Наблюдалось приблизительно 2-кратное увеличение уровня экспрессии гена *Pink1*, ответственного за митофагию. В группе мышей (М2), которые принимали мелодию с питьевой водой 2 месяца а затем пили чистую воду в течение

1 месяца, в мозге уровень экспрессии генов *Cox1*, *Nrf2* статистически достоверно не отличался от контроля. В то же время было обнаружено значительное увеличение уровня экспрессии генов, ответственных за митофагию и участвующих в регуляции биогенеза митохондрий (*p62*, *Pink1*, *Tfam*) (все  $p < 0,05$ , рис. 2).

Вероятно, что различие уровней экспрессии гена *Nrf2* между группами М2 и М3 зависит от уровня L-карнитина, который, как известно, является хорошим активатором транскрипционного фактора Nrf2 [16]. Существуют экспериментальные доказательства того, что прием мелодии снижает содержание карнитина, в чем и заключается терапевтический эффект мелодии для сердца в условиях ишемии [17]. Возможно, именно поэтому мы наблюдали значительное снижение уровня экспрессии гена *Nrf2* в мозге у группы мышей М3, получавших мелодию в течение 3 месяцев. С учётом того, что у мышей группы М2, получавших питьевую воду без мелодии в течение месяца, уровень экспрессии гена *Nrf2* практически не отличался от контроля, можно предположить, что уровень L-карнитина достиг исходного уровня.



**Рисунок 2.** Изменение экспрессии генов у групп М2 (А) и М3 (Б) в сравнении с контролем. Данные представлены в виде среднего арифметического  $\pm$  стандартная ошибка, \* —  $p < 0,05$  (t-критерий Стьюдента).

## Влияние мельдония на митохондриальную динамику

Митохондрии являются высоко динамичными органеллами, способными к процессам деления и слияния, которые регулируются несколькими GTP-азами [18]. Слияние и деление митохондрий являются противоположными друг другу процессами, в клетках необходим баланс между ними, который способствует и сохранению морфологии, и функциональности митохондрий, а также быстрой их адаптации при изменении окружающей среды. Метаболические сдвиги являются одним из основных факторов, способствующих изменению конформации митохондрий [19].

Мы показали, что экспрессия гена *Fis1* также снижалась примерно в 2 раза ( $p < 0,05$ ) у группы мышей, которая получала мельдоний в течение 3 месяцев. Уровень экспрессии *Mfn1* не изменялся, но при этом мы наблюдали увеличение экспрессии гена *Mfn2* более чем в 2 раза ( $p < 0,05$ ). У мышей, которые прекратили получать мельдоний на 2 месяце эксперимента, уровень экспрессии в мозге генов *Fis1*, *Mfn1*, *Mfn2* статистически достоверно не отличался от контроля.

У мышей группы МЗ, которые 3 месяца получали мельдоний, снижается экспрессия гена, отвечающего за разделение митохондрий (*Fis1*), и увеличивается экспрессия гена *Mfn2*, отвечающего за слияние митохондрий. Известно, что такие противоположные процессы, как слияние и деление митохондрий, всегда должны находиться в состоянии баланса между ними в клетке, это способствует нормальной работоспособности митохондрий и сохранению морфологии, а динамическое поведение митохондрий позволяет клетке реагировать на постоянно меняющиеся физиологические условия [20-22]. Сдвиг в сторону слияния способствует образованию взаимосвязанных митохондрий, тогда как сдвиг в сторону деления даёт большое количество отдельных органелл [23].

Мы показали, что при приёме мельдония уровень экспрессии *Nrf2* и *Cox1* снижается, что может указывать на подавление процесса митохондриального биогенеза. Так как образования новых митохондрий не происходит, закономерным компенсаторным ответом является слияние митохондрий, что может сопровождаться более высоким сопряжением мембранных электрохимических процессов с синтезом АТФ [24].

При этом стоит отметить, что после окончания курсового введения мельдония уровень экспрессии генов, ответственных за слияние/деление нормализуется относительно контроля, что может быть связано с нормализацией уровня экспрессии гена *Nrf2*. Значительное увеличение экспрессии генов *p62*, *Pink1*, *Tfam* (рис. 2) позволяет предположить интенсификацию процессов митофагии и митохондриального биогенеза, которые регулируются транскрипционным фактором *Nrf2* и не требуют смещения равновесия процессов слияния/деления митохондрий в сторону слияния. Эти результаты согласуются с данными литературы о том, что жировая диета вызывает деление митохондрий [25]. Наши результаты показывают, что ограничение транспорта жирных кислот в митохондрии, которое вызывает мельдоний [14], напротив, способствует процессам слияния митохондрий, о чём свидетельствует увеличение экспрессии *Mfn2* и снижение экспрессии *Fis1*.

## Влияние мельдония на мембранный потенциал и продукцию $H_2O_2$ митохондриями

Интактные митохондрии, выделенные из мозга контрольных мышей и мышей из группы, которой вводили мельдоний в течение 3 месяцев, генерируют одинаковый мембранный потенциал (рис. 3).

Известно, что *Nrf2* является ключевой молекулой для поддержания баланса активных форм кислорода [26]. Мы предположили,

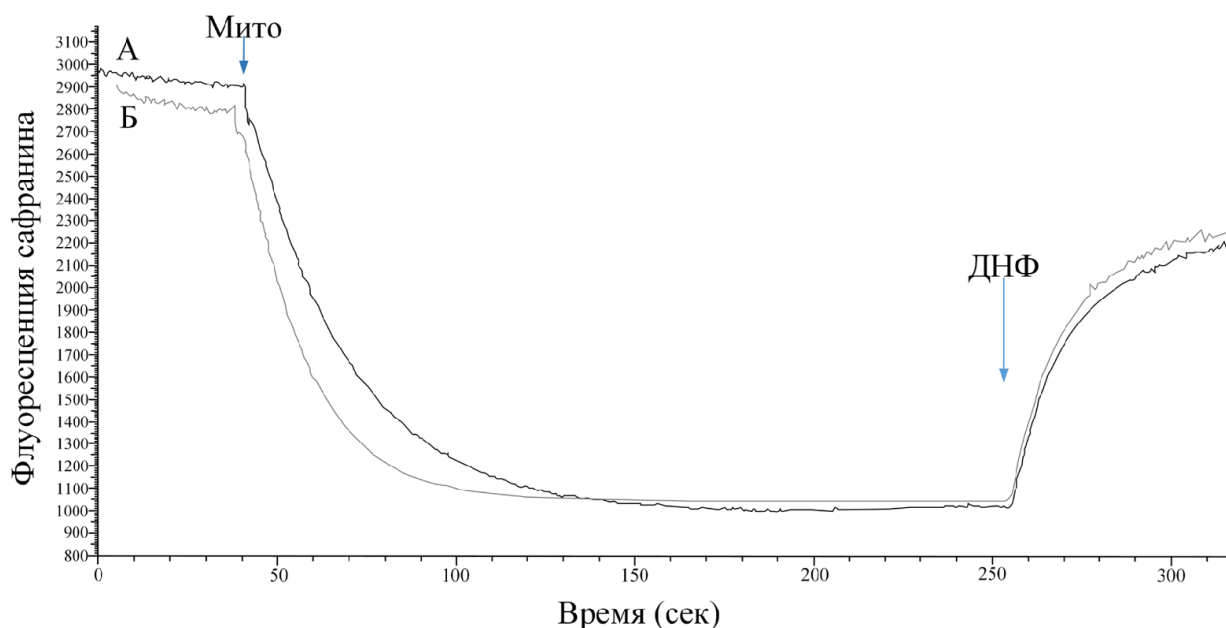
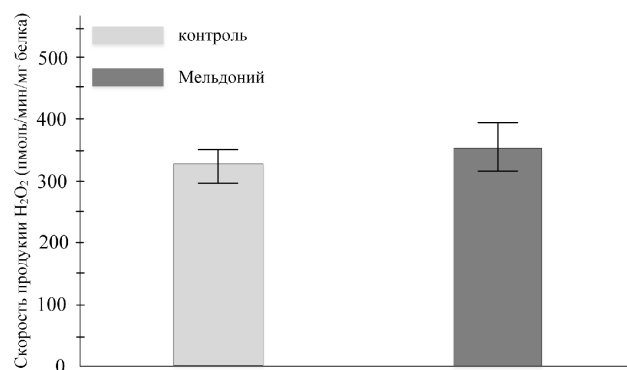


Рисунок 3. Влияние мельдония на мембранный потенциал в митохондриях. А — Контроль, Б — МЗ.

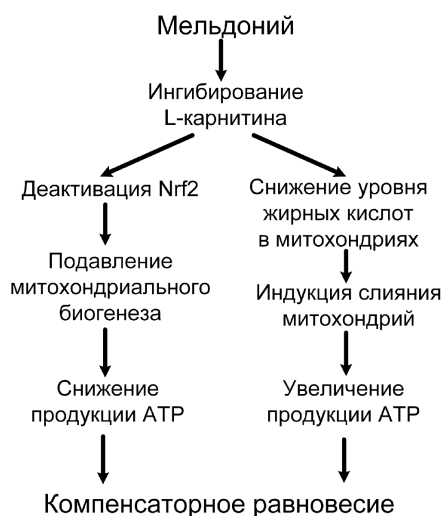
что вызванное мельдонием снижение экспрессии *Nrf2* могло приводить к увеличению окислительного стресса, в связи с большей продукцией активных форм кислорода (АФК). Однако в нашем эксперименте было показано, что статистически значимых различий у группы, принимающей мельдоний ( $356 \pm 39$  пмоль/мин/мг белка), с контролем ( $327 \pm 27$  пмоль/мин/мг белка) не наблюдалось. Это может быть связано с активацией процессов слияния митохондрий, которые, как было показано ранее, ассоциированы со снижением уровня продукции АФК [27]. Возможно, данный процесс также компенсировал снижение экспрессии *Nrf2*, вызванной мельдонием (рис. 4).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Мы показали, что прием мельдония вызывает снижение экспрессии гена *Nrf2* в мозге, вероятно, из-за снижения уровня L-карнитина, который является активатором данного транскрипционного фактора. Снижение уровня *Nrf2* вызывает подавление митохондриального биогенеза, что проявляется в снижении уровня экспрессии *Cox1*, кодируемого мтДНК, и уровня мтДНК. Однако это не сказывается негативным образом на биоэнергетических параметрах



**Рисунок 4.** Влияние длительного введения мельдония мышам на продукцию  $H_2O_2$  митохондриями мозга в группе МЗ в присутствии NADH-зависимых субстратов дыхания.



**Рисунок 5.** Схема влияния мельдония на мозг мышей.

митохондрий, так как в качестве компенсаторного эффекта активируется процесс слияния митохондрий (рис. 5). При этом стоит отметить, что спустя месяц после прекращения приёма мельдония наблюдается возвращение метаболических показателей практически до контрольных, по-видимому, из-за нормализации уровня L-карнитина в клетках мозга.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Данная работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 19-34-90110 и гранта “Skoltech Systems Biology Fellowship” (1-10-1202).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Выращивание, содержание и умерщвление животных осуществлялось согласно правилам, установленным Комитетом по уходу и использованию животных Воронежского государственного университета, которые соответствуют директиве, установленной Европейским Союзом 2010/63/EU в отношении экспериментов с использованием животных.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Sjakste N., Gutcaits A., Kalvinsh I. (2006) CNS Drug Rev., **11**, 151-168.
2. Dambrova M., Liepinsh E., Kalvinsh I. (2002) Trends Cardiovasc. Med., **12**, 275-279.
3. Jaudzems K., Kuka J., Gutsaits A., Zinovjevs K., Kalvinsh I., Liepinsh E., Liepinsh E., Dambrova M. (2009) J. Enzyme Inhib. Med. Chem., **24**, 1269-1275.
4. Grynberg A., Demaison L. (1996) J. Cardiovasc. Pharmacol., **28**(suppl.), S11-S17.
5. Liepinsh E., Vilskersts R., Skapare E., Svalbe B., Kuka J., Cirule H., Pugovics O., Kalvinsh I., Dambrova M. (2008) Life Sci., **83**, 613-619.
6. Schönfeld P., Reiser G. (2013) Cereb. Blood Flow Metab., **33**(10), 1493-1499.
7. Hamilton J.A., Brunaldi K. (2007) J. Mol. Neurosci., **33**(10), 12-17.
8. Eraso-Pichot A., Brasó-Vives M., Golbano A., Menacho C., Claro E., Galea E., Masgrau R. (2018) Glia, **66**(8), 1724-1735.
9. Panov A., Orynbayeva Z., Vavilin V., Lyakhovich V. (2014) Biomed. Res. Int., **2014**, 472459. DOI: 10.1155/2014/472459.
10. Alzoubi K.H., Rababa'h A.M., Owaisi A., Khabour O.F. (2017) Brain Research Bulletin, **131**, 176-182.
11. Максимова М.Ю., Федорова Т.Н. (2008) Неврологический журнал, **2**, 33-37. [Maksimova M.Yu., Fedorova T.N. (2008) Neurological Journal, **2**, 33-37.]
12. Абеуов Б.А., Раимкулов Б.Н., Митрохин Д.А., Нуржанова Р.Б., Есенбеков К.А., Есмуратов М.Е., Орсариева К.А., Кудайбергенова А.С. (2004) Медицина, **2**, 78-81. [Abeuov B.A., Raimkulov B.N., Mitrokhin D.A., Nurzhanova R.B., Esenbekov K.A., Esmuratov M.E., Orsarieva K.A., Kudaibergenova A.S. (2004) Medicine, **2**, 78-81.]

## МЕЛЬДОНИЙ ВЛИЯЕТ НА МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ БАЛАНС В МОЗГЕ

13. Дамулин И.В., Коберская Н.Н., Антоненко Л.М. (2006) Неврологический журнал, **1**, 1-6. [Damulin I.V., Koberskaya N.N., Antonenko L.M. (2006) Neurological Journal, **1**, 1-6.]
14. Gureev A.P., Shaforostova E.A., Vitkalova I.Yu., Sadovnikova I.S., Kalinina Yu.I., Cherednichenko V.R., Reznikova K.A., Valuyskikh V.V., Popov V.N. (2020) Toxicol. Appl. Pharmacol., **398**, 115031. DOI: 10.1016/j.taap.2020.115031.
15. Gureev A.P., Shaforostova E.A., Popov V.N. (2019) Front. Genet., **10**, 435. DOI: 10.3389/fgene.2019.00435.
16. Zhang D.M., Guo Z.X., Zhao Y.L., Wang Q.J., Gao Y.S., Yu T., Chen Y.K., Chen X.M., Wang G.Q. (2019) Fish Shellfish Immunology, **93**, 1100-1110.
17. Liepinsh E., Vilskersts R., Loca D., Kirjanova O., Pugovichs O., Kalvinsh I., Dambrova M. (2006) J. Cardiovasc. Pharmacol., **48**(6), 314-319.
18. Патрушев М.В., Мазунин И.О., Виноградова Е.Н., Каменский П.А. (2015) Биохимия, **80**(11), 1673-1682. [Patrushev M.V., Mazunin I.O., Vinogradova E.N., Kamenski P.A. (2015) Biochemistry (Moscow), **80**(11), 1457-1464.]
19. van der Bliek A.M., Shen Q., Kawajiri S. (2013) Cold Spring Harb. Perspect. Biol., **5**(6), a011072. DOI: 10.1101/cshperspect.a011072.
20. Tomasello M.F., Guarino F., Reina S., Messina A., de Pinto V. (2013) PLoS One, **8**(12), e81522. DOI: 10.1371/journal.pone.0081522.
21. An H.J., Cho G., Lee J.O., Paik S.G., Kim Y.S., Lee H. (2013) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **110**(32), 13014-13019.
22. Otera H., Ishihara N., Mihara K. (2013) Biochim. Biophys. Acta, **1833**(5), 1256-1268.
23. Westermann B. (2010) Nat. Rev. Mol. Cell Biol., **11**(12), 872-884.
24. Bergeron R., Ren J.M., Cadman K.S., Moore I.K., Perret P., Pypaert M., Young L.H., Semenkovich C.F., Shulman G.I. (2001) Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., **281**(6), E1340-E1346.
25. Putti R., Sica R., Migliaccio V., Lionetti L. (2015) Front. Physiol., **6**, 109. DOI.org/10.3389/fphys.2015.00109.
26. Liu D., Xue J., Liu Y., Gu H., Wei X., Ma W., Luo W., Ma L., Jia S., Dong N., Huang J., Wang Y., Yuan Z. (2018) Neurotoxicology, **69**, 84-92.
27. Picard M., Shirihai O.S., Gentil B.J., Burelle Y. (2013) Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., **304**(6), R393-R406.

Поступила в редакцию: 26. 11. 2020.  
После доработки: 11. 01. 2021.  
Принята к печати: 14. 01. 2021.

## THE EFFECT OF L-CARNITINE DEPLETION INDUCED BY LONG-TERM THERAPY OF MICE WITH MELDONIUM ON BRAIN MITOCHONDRIAL BALANCE

E.A. Shaforostova<sup>1\*</sup>, A.P. Gureev<sup>1,2</sup>, I.Yu. Vitkalova<sup>1,2</sup>, V.N. Popov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Voronezh State University,  
1 Universitetskaya sq., Voronezh, 394018 Russia; \*e-mail: ekaterina-shaforostova@mail.ru  
<sup>2</sup>Voronezh State University of Engineering Technologies,  
19 Revolution ave., Voronezh, 394036 Russia

Meldonium is a metabolic drug used for treatment of coronary heart disease. The effect of the drug lies in its ability to inhibit synthesis and transport of L-carnitine. At the same time, a long-term deficiency of L-carnitine can theoretically negatively affect the activity of the transcription factor Nrf2, which is extremely important for maintaining mitochondrial balance in cells. We have shown that meldonium therapy for 3 months at a dose of 100 mg/kg in mice causes a decrease in the expression of the *Nrf2* gene in the brain. A decrease in the *Nrf2* level causes suppression of mitochondrial biogenesis, which is manifested in a decrease in the level of mtDNA and the level of *CoxI* expression. However, no negative effect of meldonium on the bioenergetics parameters of mitochondria was found, as evidenced by the maintenance of a stable mitochondrial potential and the level of production of reactive oxygen species. One month after the end of the meldonium therapy, expression of the genes responsible for mitochondrial biogenesis and mitophagy (*p62*, *Pink1*, *Tfam*) was observed and the expression level of genes responsible for mitochondrial fusion returned to control values. These changes may be associated with the normalization of the level of L-carnitine in brain cells.

**Key words:** meldonium; L-carnitine; Nrf2; mitochondrial biogenesis; mitophagy; mitochondrial fusion/fission

**Funding.** This study was supported by a grant from the Russian Foundation for Basic Research (19-34-90110) and a grant "Skoltech Systems Biology Fellowship" (1-10-1202).

Received: 26.11.2020, revised: 11.01.2021, accepted: 14.01.2021.