

©Коллектив авторов

ИЗУЧЕНИЕ ПРОТЕКТОРНОГО ЭФФЕКТА МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ РАЗОБЩИТЕЛЕЙ ПРИ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ ФУНГИЦИДА ДИФЕНОКОНАЗОЛА В РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНАХ МЫШЕЙ

*Е.В. Чернышова¹, Д.В. Потанина¹, И.С. Садовникова¹,
Е.П. Крутских¹, Д.Е. Володина¹, Н.А. Самойлова¹, А.П. Гуреев^{1,2*}*

¹Воронежский государственный университет,
394018 Воронеж, Университетская пл., 1; *эл. почта: gureev@bio.vsu.ru
²Воронежский государственный университет инженерных технологий,
394036 Воронеж, Воронеж, ул. Сакко и Ванцетти, 72

Пестициды представляет собой серьёзную проблему для работников сельского хозяйства из-за их нейротоксического действия. Цель данного исследования — оценить способность фармакологических разобщителей окислительного фосфорилирования снижать эффект дифеноконазола на митохондриальную ДНК (мтДНК) различных органов у мышей. Инъекции дифеноконазола вызывали когнитивные дефициты у мышей, а протонофор 2,4-динитрофенол (2,4-ДНФ) и азур I (AzI) — деметилированный метаболит метиленового синего (МС) — предотвращали ухудшение когнитивных способностей у мышей при введении дифеноконазола. Дифеноконазол увеличивает скорость продукции активных форм кислорода (АФК), вероятно, за счёт ингибирования комплекса I дыхательной цепи митохондрий. мтДНК лёгких, семенников и среднего мозга наиболее чувствительна к накоплению повреждений после внутрибрюшинного введения дифеноконазола. Напротив, кора головного мозга и гиппокамп не устойчивы к действию дифеноконазола. Протонофор 2,4-динитрофенол (2,4-ДНФ) снижал скорость образования АФК и значительно сокращал количество повреждений мтДНК, вызванных дифеноконазолом в среднем мозге, а также, частично, в лёгких и семенниках. МС — альтернативный переносчик электронов, способный обходить ингибированный комплекс I, — не оказывал влияния на эффект дифеноконазола на мтДНК, тогда как его метаболит AzI — деметилированный метаболит МС — способен защищать мтДНК среднего мозга и семенников. Таким образом, митохондриально-направленная терапия является перспективным подходом к снижению токсичности пестицидов для работников сельского хозяйства.

Ключевые слова: дифеноконазол; метиленовый синий; 2,4-динитрофенол; азур I; митохондриальная ДНК; разобщённое дыхание

DOI: 10.18097/PBMC20247001041

ВВЕДЕНИЕ

Широкое применение пестицидов является одним из факторов, способствующих значительному повышению производительности сельского хозяйства за последние 100 лет, что сделало возможным столь быстрый рост населения во всем мире. Однако присутствие пестицидов в окружающей среде, их химическая устойчивость и способность к накоплению в организме представляют серьёзную угрозу для рыб, птиц, насекомых-опылителей и здоровья человека [1].

Значительная часть пестицидов является препаратами направленного на митохондрии действия; они способны ингибировать митохондриальную электронно-транспортную цепь (ЭТЦ), нарушать окислительное фосфорилирование, стимулировать апоптоз и воспаление [2]. Все эти процессы вызывают митохондриальную дисфункцию, которая часто является причиной многих хронических заболеваний. Эпидемиологические исследования зафиксировали, что у лиц, непосредственно работавших с пестицидами, повышен риск развития таких заболеваний, как рак, болезнь Паркинсона, сердечные, неврологические и репродуктивные нарушения [3].

Известно, что митохондрии растений гораздо менее восприимчивы к повреждениям по сравнению с митохондриями животных. Возможно, причиной устойчивости растительных митохондрий является разветвлённость дыхательных путей, которые отвечают за разобщённое дыхание [4]. Неоднократно было показано, что трансгенные модели животных, экспрессирующие альтернативные NADH-дегидрогеназы [5] или альтернативные оксидазы, демонстрируют устойчивость к различным ингибиторам направленного на митохондрии действия. Поэтому в данном исследовании мы предлагаем способ снизить токсичность пестицидов путём разобщения митохондриального окислительного фосфорилирования.

2,4-динитрофенол (2,4-ДНФ) является протонофором, который способствует переносу протонов обратно в матрикс без синтеза АТФ. Ранее 2,4-ДНФ использовался в медицине в качестве биологической добавки. После обнаружения некоторых токсических свойств он был запрещён к применению в ряде стран [7]. Тем не менее, вероятно, он может быть использован в качестве антидота при отравлении пестицидами. Метиленовый синий (МС) обеспечивает альтернативный транспорт электронов, минуя

ПРОТЕКТОРНЫЙ ЭФФЕКТ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ РАЗОБЩИТЕЛЕЙ

повреждённые или ингибированные компоненты ЭТЦ. Этот препарат может быть миметиком разобщённого дыхания, как в трансгенных моделях животных, экспрессирующих альтернативные оксидазы [8]. Азур I (AzI) — деметилированный метаболит МС, отличающийся состоянием ионизации окисленной формы. Окисленный AzI может переходить в нейтральную хинониминную форму, которая легко диффундирует через мембраны [9].

Целью данного исследования было изучение влияния одного из самых распространённых фунгицидов дифеноконазола на митохондриальную токсичность в различных органах при остром отравлении организма и в моделях *in vitro*, а также оценка способности МС, AzI и 2,4-ДНФ нивелировать токсичный эффект дифеноконазола. Для оценки степени митохондриальной токсичности пестицида мы изучали количество повреждений мтДНК, что является достаточно надёжным маркером окислительного стресса в митохондриях.

МЕТОДИКА

Животные

В эксперименте использовали двухмесячных мышей линии C57Bl/6, полученных из филиала “Столбовая” Научного центра биомедицинских технологий питомника (Россия). Животных содержали в стандартных условиях вивария при 25°C, относительной влажности воздуха не менее 40% и 12-часовом цикле свет/темнота, доступ к пище и воде был свободным.

План эксперимента

В эксперименте *in vivo* было задействовано 45 мышей, которые были разделены на пять групп: животные контрольной группы (n=11), получали стандартный рацион и воду в течение 28 дней и на 22 день эксперимента внутрибрюшинную инъекцию физраствора (“Solopharm”, Россия). Животные второй группы (n=8) в течение 28 дней получали стандартный рацион и воду, а на 22 день эксперимента — однократную внутрибрюшинную инъекцию дифеноконазола (ТМ Раёк, “Август”, Россия) в дозе 1 г/кг. Мыши третьей группы (n=9) получали стандартный рацион и воду с добавлением 2,4-ДНФ (“Sigma-Aldrich”, США) в дозе 15 мг/кг в день.

Животные четвёртой группы (n=8) получали стандартный рацион и воду с добавлением МС (“Sigma-Aldrich”) в дозе 15 мг/кг в день. Мыши пятой группы (n=9) получали стандартный рацион и воду с добавлением AzI (“Интерхим”, Россия) в дозе 15 мг/кг в день. На 22 день эксперимента животным третьей, четвёртой и пятой групп вводили дифеноконазол в дозе 1 г/кг (таблица).

На 24-28 дни эксперимента был проведён тест “Т-образный лабиринт” (таблица). На 29 день эксперимента животные были умерщвлены путём быстрой дислокации шейных позвонков с последующей декапитацией, и для молекулярной части эксперимента были извлечены кора головного мозга, гиппокамп, средний мозг, мозжечок, лёгкие, сердце, печень, почки и семенники.

Физиологические тесты

Для оценки когнитивных параметров использовали стандартный протокол теста Т-образный лабиринт, описанный ранее [10]. Тест проводили с 24 по 28 день эксперимента. Первый день — фаза привыкания: группу животных помещали в лабиринт на 15 мин, при этом по всему лабиринту на небольшом расстоянии друг от друга в случайном порядке были разбросаны кусочки пищи, чтобы животные знали, что в лабиринте есть корм. Второй день — продолжение этапа привыкания: группу животных помещали в лабиринт на 15 мин, но пища находилась в двух противоположных рукавах лабиринта. Испытания проводили на 3–5 день. Первая попытка для каждого животного была тренировочной. Во время тренировки награду помещали в каждую руку, но одна из них оставалась закрытой. Животное должно было войти в открытую руку и полностью съесть вознаграждение. Вторую попытку выполняли сразу же, без пятиминутного перерыва. Экспериментатор открывал ранее закрытую руку, и, если животное входило в руку, где его до этого не было, оно получало вознаграждение. В следующей попытке производили смену руки, содержащей вознаграждение. Если животное не попадало в нужную руку, то в следующей попытке награда оставалась в той же руке. Всего в день проводилось 10 попыток с пятиминутным интервалом. Количество правильных попыток соответствовало количеству баллов (минимум 0, максимум 10).

Таблица. Временная шкала эксперимента

Группа \ День	Контроль (обычная вода с 1 по 29 день)	Диф (n=8) (обычная вода с 1 по 29 день)	2,4-ДНФ+Диф (n=9) (вода с добавлением 2,4-ДНФ в дозе 15 мг/кг в день с 1 по 29 день)	МС+Диф (n=8) (вода с добавлением МС в дозе 15 мг/кг в день с 1 по 29 день)	AzI+Диф (n=9) (вода с добавлением AzI в дозе 15 мг/кг в день с 1 по 29 день)
22	Инъекция физраствора	Инъекция Диф (1 г/кг)	Инъекция Диф (1 г/кг)	Инъекция Диф (1 г/кг)	Инъекция Диф (1 г/кг)
24–28	Т-лабиринт	Т-лабиринт	Т-лабиринт	Т-лабиринт	Т-лабиринт
29	Умерщвление	Умерщвление	Умерщвление	Умерщвление	Умерщвление

Примечание: Диф – дифеноконазол, 2,4-ДНФ – 2,4-динитрофенол, МС – метиленовый синий, AzI – Азур I.

Измерение скорости дыхания митохондрий

Для экспериментов *in vitro* использовали интактные митохондрии головного мозга, которые выделяли отдельно из коры и среднего мозга мышей по методике, описанной ранее [11]. Выделение митохондрий осуществляли с использованием дигитонина. Буфер для гомогенизации содержал 200 мМ маннитола, 75 мМ сахарозы, 20 мМ HEPES (pH 7,4), 1 мМ ЭГТА и 2 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (BSA), не содержащего жирных кислот. Промывочный буфер имел тот же состав, но без BSA. Части мозга мышей гомогенизировали с помощью гомогенизатора типа Даунса. Гомогенат центрифугировали 5 мин при 900 g. Супернатант переносили в чистые пробирки и центрифугировали 10 мин при 14000 g. После этого супернатант удаляли и осадок ресуспендировали в промывочном буфере. В пробирки добавляли 0,2% дигитонин и инкубировали 2 мин на льду. Пробирки центрифугировали 15 мин при 14000 g. Супернатант удаляли, а осадок дважды промывали в промывочном буфере центрифугированием в течение 10 мин при 14000 g. Конечный осадок ресуспендировали в 100 мкл промывочного буфера. Определение белка в полученной суспензии органелл осуществляли с помощью набора Pierce™ BCA Protein Assay Kits (“Thermo Fisher Scientific”, США). Скорость дыхания митохондрий измеряли с помощью электрода типа Кларка (“Hansatech Instruments”, Великобритания). Все измерения проводили в буфере для выделения митохондрий с 4 мМ KH_2PO_4 , дыхательными субстратами (5 мМ пируват + 5 мМ малат) и 50 мкг митохондриального белка. Скорость дыхания представляли в скорости расходования кислорода (нмоль/мин/мг белка). Дифеноконазол добавляли в концентрации 20 мкМ.

Измерение мембранного потенциала

Мембранный потенциал измеряли путём регистрации изменения флуоресценции сафранина O (“Sigma-Aldrich”) при длине волны возбуждения 495 нм и длине волны эмиссии 586 нм (спектрофлуорометр Hitachi F-7000, “Hitachi High Technologies”, Япония). В инкубационную среду (1 мл) вносили буфер А, 2 мкМ сафранин O, 4 мМ KH_2PO_4 , дыхательные субстраты (5 мМ пируват + 5 мМ малат) и 50 мкг митохондриального белка. Мембранный потенциал оценивали без ADP и с 2 мМ ADP. Дифеноконазол добавляли в концентрации 20 мкМ. Полная потеря мембранного потенциала достигалась добавлением 1 мкМ 2,4-ДНФ.

Измерение скорости выделения H_2O_2

Измерение скорости выделения H_2O_2 проводили на флуоресцентном спектрофотометре Hitachi F-7000. Концентрацию H_2O_2 определяли по интенсивности флуоресценции резорурфина, образующегося при реакции H_2O_2 . Добавляли 1 ЕД Amplex UltraRed (“Invitrogen”, США) и 4 ЕД пероксидазы хрена (“ThermoFisher Scientific”). Длина волны возбуждения составляла 568 нм, длина волны эмиссии — 581 нм.

Все измерения проводили в акриловой кювете в буфере для выделения митохондрий. Для каждого исследуемого соединения проводили не менее 3 независимых измерений.

Оценка количества повреждений мтДНК

Выделение ДНК проводили с помощью набора ПРОБА-ГС (“ДНК-Технология”, Россия). Количество повреждений мтДНК оценивали с помощью ПЦР длинных фрагментов, протокол и праймеры были описаны ранее [12].

Статистический анализ

Статистический анализ проводили с использованием программы Statistica 12. Результаты выражали как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего. Данные анализировались с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Для определения уровня значимости использовали *post hoc* тест Тьюки. Для количественной оценки повреждений мтДНК использовали программу DNADamageCalculator (Воронеж, Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Введение дифеноконазола вызывало когнитивные нарушения у мышей, которые были зафиксированы в тесте Т-образный лабиринт (рис. 1). Животные, которым вводили дифеноконазол, набрали на 17% меньше баллов, чем контрольные животные, которым вводили физраствор ($p < 0,05$). Совместное введение дифеноконазола с 2,4-ДНФ, и Аз1 не не MS нивелировало эффект этого фунгицида (рис. 1).

Дифеноконазол оказывал повреждающий эффект на мтДНК исследованных органов. По степени повреждения (от максимального к минимальному) органы располагаются в следующем порядке: лёгкие (+104% повреждений (увеличение с $2,5 \pm 0,3$ в группе мышей, получавших физраствор, до $5,0 \pm 0,2$

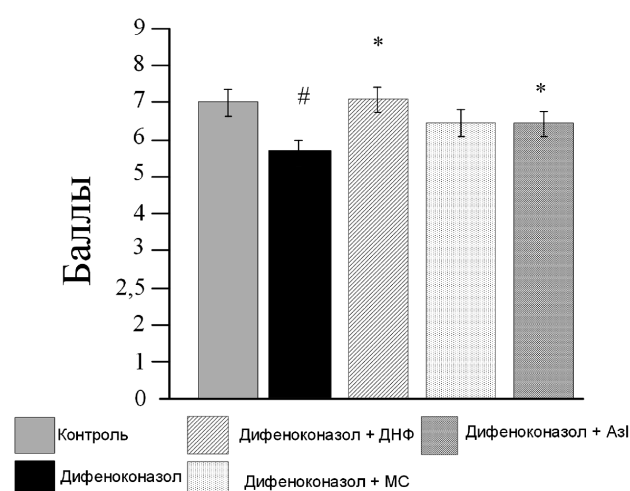


Рисунок 1. Результаты теста “Т-лабиринт”. * $p < 0,05$ – различия статистически значимы по сравнению с животными, которым вводили дифеноконазол. # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$ – различия статистически значимы по сравнению с животными, которым вводили физраствор.

ПРОТЕКТОРНЫЙ ЭФФЕКТ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ РАЗОБЩИТЕЛЕЙ

в группе мышей, получавших инъекцию пестицида), $p < 0,001$), семенники (+57% (с $2,4 \pm 0,2$ до $3,7 \pm 0,3$), $p < 0,001$), печень (+36% (с $2,2 \pm 0,3$ до $3,1 \pm 0,3$), $p = 0,08$), сердце (+30% (с $4,1 \pm 0,5$ до $5,4 \pm 0,3$), $p < 0,05$), почки (+14% (с $4,9 \pm 0,5$ до $5,6 \pm 0,2$)), мозг (+9% (с $3,7 \pm 0,2$ до $4,1 \pm 0,2$)) (рис. 2А). Таким образом, можно отметить, что лёгкие являются наиболее чувствительным органом к воздействию этого фунгицида. Хорошо известно, что профессиональное воздействие пестицидов связано с повышенным риском развития респираторных симптомов, астмы и хронического бронхита [13]. В нашем остром эксперименте

дифеноконазол вводили внутривентриально, но даже при таком способе поступления в организм он вызывал сильное повреждение мтДНК в лёгких (рис. 2А, 3Б). Лёгкие — это высокоспециализированный орган, обеспечивающий поглощение кислорода, который при наличии токсикантов может стать источником АФК [14]. Вполне вероятно, что вызванное пестицидами удвоение повреждений мтДНК в лёгких является следствием усиления окислительного стресса.

Сильное повреждение, вызванное пестицидом, наблюдалось в семенниках (рис. 2А, 3Е). Эти результаты подтверждают данные о том, что у крыс хроническое воздействие дифеноконазола

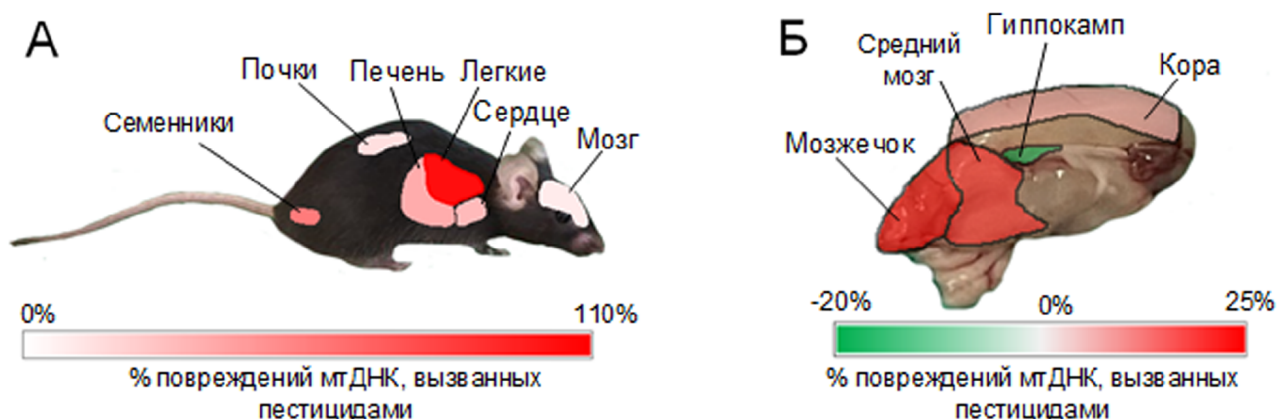


Рисунок 2. Степень индуцированного дифеноконазолом повреждения мтДНК во внутренних органах (А) и отделах головного мозга (Б). Цветной рисунок доступен в электронной версии на сайте журнала.

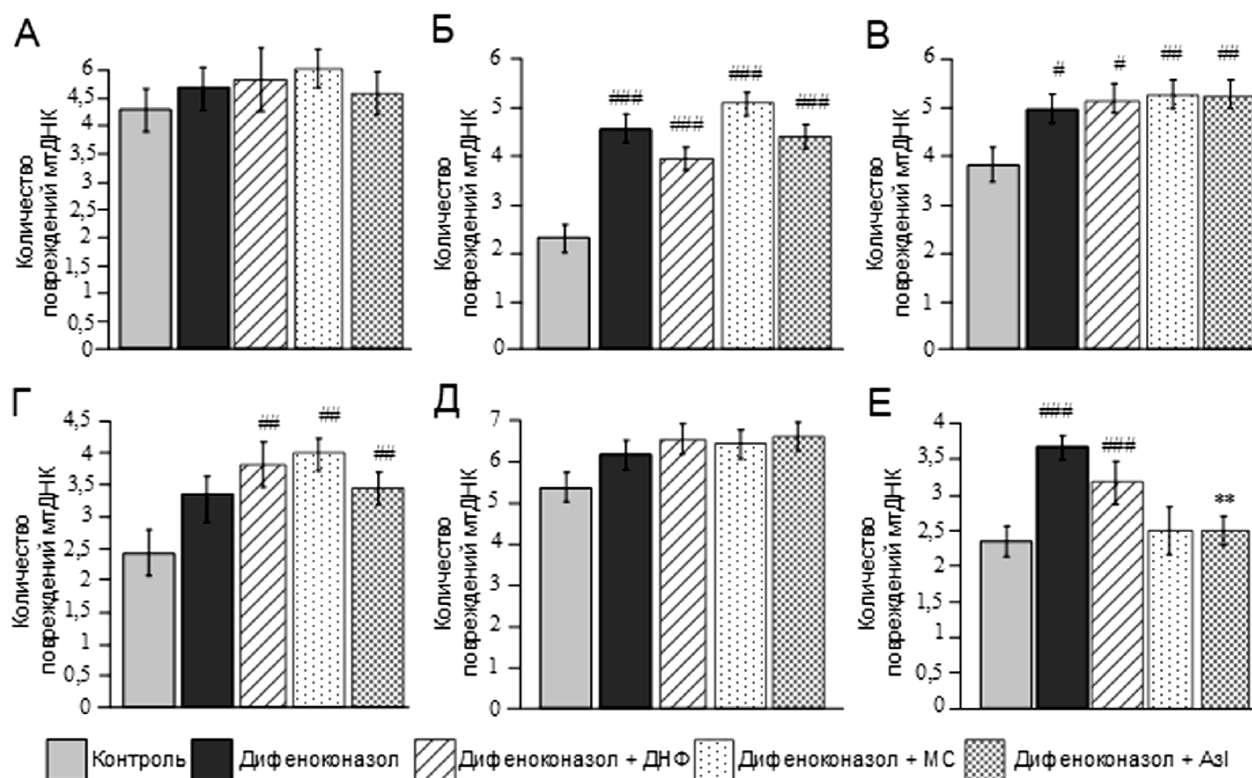


Рисунок 3. Количество повреждений мтДНК в исследованных органах: (А) мозг, (Б) лёгкие, (В) сердце, (Г) печень, (Д) почки, (Е) семенники. Все измерения проводили не менее чем для шести фрагментов мтДНК. ** $p < 0,01$ – различия статистически значимы по сравнению с животными, получавшими дифеноконазол. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ – различия статистически значимы по сравнению с животными, которым вводили физраствор.

снижает качество спермы, повреждает ДНК, уменьшает уровень тестостерона, лютеинизирующего гормона и фолликулостимулирующего гормона в сыворотке крови [15]. Существуют популяционные исследования, согласно которым длительное воздействие пестицидов может быть связано с отдельными репродуктивными нарушениями, наблюдаемыми спустя десятилетие [16].

В печени мы также обнаружили увеличение повреждений на 36%, однако различия не были статистически значимыми ($p=0,08$) (рис. 3Г). В некоторых исследованиях показано, что воздействие дифеноконазола вызвало гепатотоксичность и дегенерацию печени у личинок рыб, а также некрозы и новообразования в печени [17].

Инъекции дифеноконазола имели серьёзные последствия для мтДНК сердца (рис. 2А, 3В). Предыдущие исследования показали, что воздействие дифеноконазола может вызывать сердечно-сосудистые заболевания. Накопление АФК способствовало развитию окислительного стресса в сердце. В целом индуцированная дифеноконазолом сердечно-сосудистая токсичность приводит к апоптозу и торможению сокращений сердечной мышцы [18].

В почках мы не обнаружили статистически значимого увеличения числа повреждений мтДНК после воздействия дифеноконазола (рис. 2А, 3Д).

В целом наши данные показали, что мтДНК головного мозга наименее подвержена влиянию инъекций дифеноконазола по сравнению с другими органами. Было отмечено увеличение числа поражений на 9%, но различия не были значимыми ($p=0,11$). Эти данные противоречат предыдущим исследованиям, в которых было показано, что дифеноконазол разрушает гематоэнцефалический барьер, вызывает накопление АФК, воспаление и ингибирует защитные сигнальные пути (в частности, путь Nrf2/ARE) у рыб [19]. Дифеноконазол вызывает серьёзное повреждение мтДНК в мозге шмелей как при контактном воздействии, так и при добавлении в питательный сироп [20]. Тем не менее, наши данные показывают, что мтДНК головного мозга менее подвержена окислительному повреждению по сравнению с внутренними органами (рис. 2А), при этом стоит учитывать, что мозг является структурно неоднородным органом и различные отделы мозга в разной степени подвержены пестицидному повреждению. Действительно, мы показали, что инъекции дифеноконазола вызывают сильное повреждение мтДНК среднего мозга (+22% (с $4,7 \pm 0,3$ до $5,7 \pm 0,2$), $p<0,05$). Вызванное пестицидами увеличение повреждений мтДНК в мозжечке (+25% (с $3,1 \pm 0,4$ до $3,9 \pm 0,3$), $p=0,11$) и коре головного мозга (+8% (с $2,8 \pm 0,3$ до $3,1 \pm 0,2$), $p=0,38$) не было статистически значимым (рис. 4).

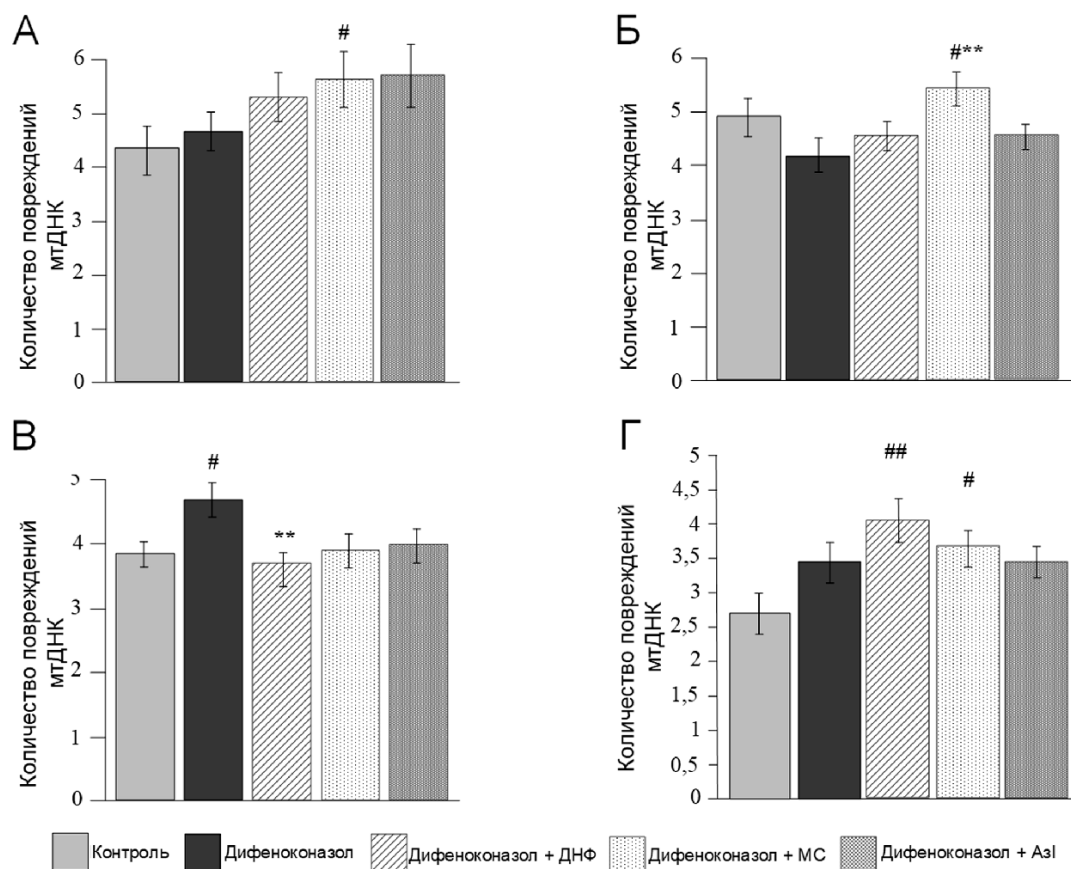


Рисунок 4. Влияние 2,4-ДНФ, МС и АзI на количество индуцированных дифеноконазолом повреждений мтДНК в отделах головного мозга: (А) кора головного мозга, (Б) гиппокамп, (В) средний мозг, (Г) мозжечок. Все измерения проводили не менее чем для шести фрагментов мтДНК. ** $p<0,01$ – различия статистически значимы по сравнению с животными, получавшими дифеноконазол. # $p<0,05$, ## $p<0,01$ – различия статистически значимы по сравнению с животными, которым вводили физраствор.

Можно предположить, что средний мозг более восприимчив к дифеноконазол-индуцированным повреждениям. Для проверки этой гипотезы мы обработали интактные митохондрии, полученные из среднего мозга и коры головного мозга, различными концентрациями дифеноконазола. Дифеноконазол вызывал повреждение мтДНК в коре головного мозга только при концентрации 200 мкМ, тогда как в среднем мозге он значительно повреждал мтДНК уже при концентрации в 10 раз меньшей (рис. 5).

Ранее аналогичные данные были получены при изучении влияния ротенона на повреждение мтДНК головного мозга. Инъекции ротенона приводили к увеличению количества повреждений мтДНК в среднем мозге, но не в коре головного мозга [21]. Есть данные, показывающие, что средний мозг накапливает больше oxo8dG (маркер окислительного повреждения ДНК), чем, например, кора головного мозга, и это связывают с особенностью активности гликозилазы, отвечающей за удаление oxo8dG [22]. Было показано, что скорость генерации O_2^- под действием низких концентраций ротенона в культурах вентрального мезенцефалия значительно выше, чем в культурах коры головного мозга [23]. Предполагается, что такая чувствительность среднего мозга обусловлена особенностями дофаминовых нейронов. Дофаминергические нейроны обладают ритмичной электрической активностью и испытывают повышенный окислительный стресс, предположительно связанный с высокой скоростью синтеза дофамина [24]. При окислительном дезаминировании дофамина моноаминоксидазами образуется H_2O_2 . Кроме того, окисление дофамина может происходить через взаимодействие с лабильным железом, которое необходимо для реакции Фентона и образования $\cdot\text{OH}$ [25].

Мы показали, что в интактных митохондриях мозга дифеноконазол увеличивает скорость выработки H_2O_2 на 46% (рис. 6). Гиперпродукция H_2O_2 , вероятно, происходит во всех отделах мозга, но их чувствительность к повреждению определяется популяцией нейронов. Почти 75% дофаминергических нейронов находится в вентральном среднем мозге [26].

Преимущественное накопление лабильного железа в среднем мозге [27] способствует образованию гидроксильного радикала в реакции Фентона, которая усиливает повреждение мтДНК, поскольку способность $\cdot\text{OH}$ повреждать ДНК в несколько раз выше, чем у H_2O_2 [28].

Ни одно из изученных соединений не снижало количество повреждений мтДНК при добавлении к изолированным препаратам митохондрий, которые инкубировали вместе с дифеноконазолом. При этом *in vivo* 2,4-ДНФ проявлял наибольший защитный эффект в среднем мозге, снижая количество индуцированных дифеноконазолом повреждений мтДНК на 21% ($p < 0,01$) (рис. 7).

Кроме того, 2,4-ДНФ снижал количество повреждений мтДНК в лёгких на 16% (различия не являются статистически значимыми, $p = 0,08$). Ранее было показано, что 2,4-ДНФ эффективно снижал уровень окислительного стресса мозга, препятствовал повреждению нейронов и апоптозу, в вызванных ротеноном [29] и 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридином (MPTP) [30] моделях болезни Паркинсона. Защитная способность 2,4-ДНФ связана с его способностью к разобщению окислительного фосфорилирования, что приводит к увеличению скорости митохондриального дыхания, снижению образования O_2^- , снижению уровня NADH и, таким образом, предотвращению образования АФК митохондриальными флавопротеинами [31]. Напротив, дифеноконазол ингибирует комплекс I ЭТЦ [32], что должно приводить к повышению уровня NADH и гиперпродукции АФК (рис. 8). Мы показали, что добавление 2,4-ДНФ к интактным митохондриям увеличивает скорость дыхания от $61,01 \pm 5,3$ нмоль/мин/мг белка до $79,16 \pm 8,2$ нмоль/мин/мг белка (рис. 9), а также снижает индуцированное дифеноконазолом увеличение скорости продукции H_2O_2 до $47,80 \pm 8,7$ пмоль/мин/мг белка ($p < 0,01$), до уровня контрольных митохондрий (рис. 6).

Хотя ранее была показана эффективность 2,4-ДНФ при лечении болезни Альцгеймера [33], болезни Паркинсона [34], болезни Гентингтона [35], фокальной

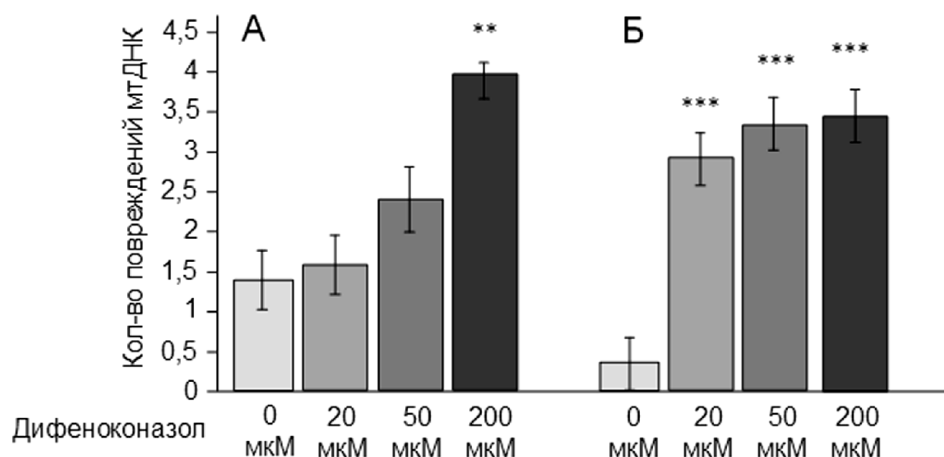


Рисунок 5. Влияние дифеноконазола в различных концентрациях *in vitro* на количество повреждений мтДНК в коре головного мозга (А) и среднем мозге (Б). Все измерения проводили не менее чем для шести фрагментов мтДНК. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ – различия статистически значимы по сравнению с контрольными митохондриями.

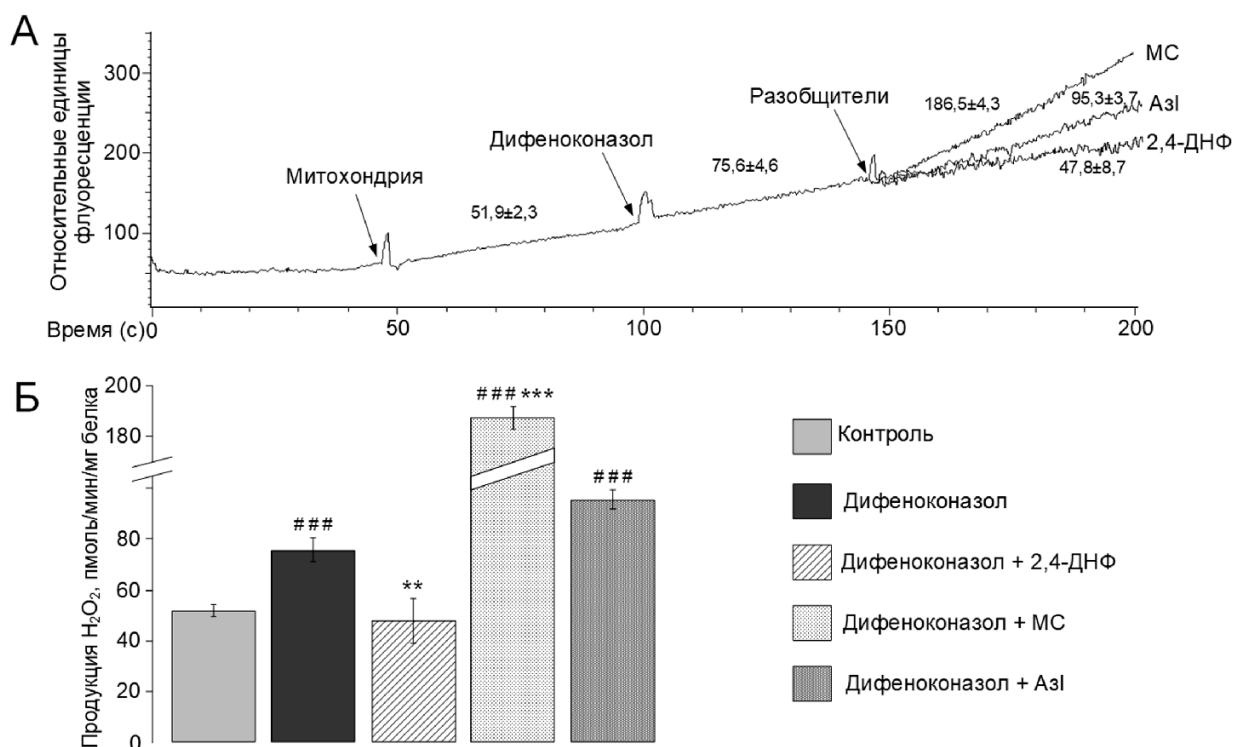


Рисунок 6. Влияние дифеноконазола и разобщителей на скорость образования H_2O_2 . (А) Кривая накопления H_2O_2 после добавления каждого из исследуемых соединений. (Б) Скорость выделения H_2O_2 . Все измерения проводились не менее чем в трёх повторностях. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ – различия статистически значимы по сравнению с митохондриями, обработанными дифеноконазолом. ### $p < 0,001$ – различия статистически значимы по сравнению с контрольными митохондриями.

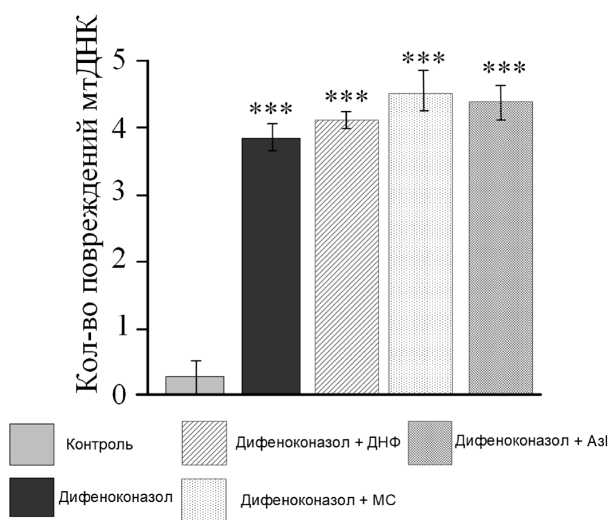


Рисунок 7. Влияние дифеноконазола и разобщителей на количество повреждений мтДНК в митохондриях среднего мозга *in vitro*. Концентрации исследуемых веществ: 20 мкМ дифеноконазол, 1 мМ 2,4-ДНФ, 1 мкМ МС, 1 мкМ АзI. Все измерения проводили не менее чем для шести фрагментов мтДНК. *** $p < 0,001$ – различия статистически значимы по сравнению с контрольными митохондриями.

ишемии головного мозга [36], травматического повреждения мозга [37], маловероятно, что в ближайшее время он найдёт применение в клинике. В нашем исследовании была показана его эффективность в защите мтДНК при отравлении дифеноконазолом (рис. 4).

В этом отношении МС находится в более выгодном положении, чем 2,4-ДНФ. В настоящее время МС одобрен для лечения метгемоглобинемии (торговое название PROVAYBLUE®) (NCT03446001, 2018) и проходит клинические испытания для лечения болезни Альцгеймера. МС осуществляет альтернативный транспорт электронов, минуя комплекс I ЭТЦ (рис. 8). Кроме того, МС может активировать антиоксидантные, антиапоптотические, противовоспалительные сигнальные пути, ингибировать моноаминоксидазу и NO-синтазу, что оказывает нейропротекторное действие при целом ряде заболеваний [38]. Однако мы показали, что МС не влиял на снижение количества повреждений мтДНК (рис. 3, 4) и улучшение памяти (рис. 1). Можно предположить, что причина отсутствия защитного эффекта МС связана с его прооксидантными свойствами. МС может обходить ингибированный комплекс I, но этот процесс связан с увеличением продукции H_2O_2 [39]. Мы показали, что МС увеличивает скорость продукции H_2O_2 в 2,5 раза по сравнению с митохондриями мозга, обработанными только дифеноконазолом (рис. 6). Возможно, связанное с МС увеличение продукции H_2O_2 в низкой концентрации может запускать сигнальный путь, который защищает клеточные компоненты, в том числе и митохондрии [40]. Однако в условиях “жёсткого окислительного стресса”, когда дифеноконазол вызывал резкое увеличение скорости продукции АФК, компенсаторные реакции, которые вызывает МС, не могут оказать защитного эффекта.

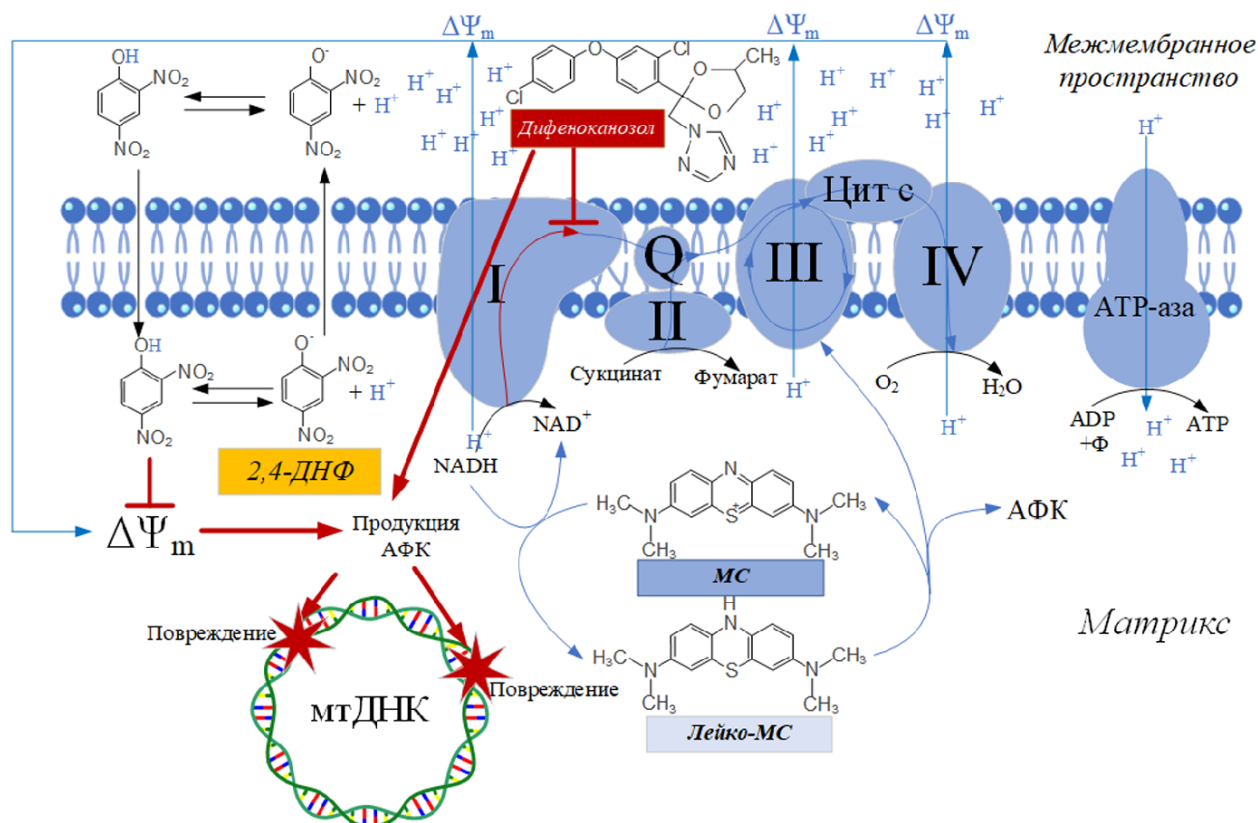


Рисунок 8. Механизм действия дифеноконазола, 2,4-ДНФ и МС в клетках.

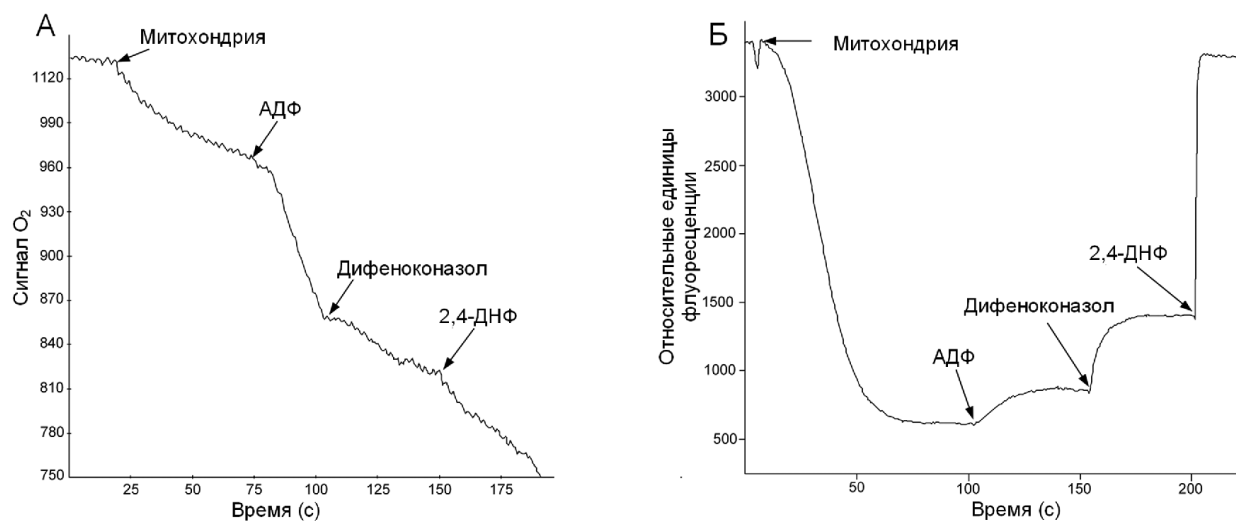


Рисунок 9. Биоэнергетические параметры митохондрий интактного мозга. (А) Скорость потребления O₂, (Б) Флуоресценция сафранина О. Добавляли 20 мкМ дифеноконазол, 2 мМ ADP, 1 мкМ 2,4-ДНФ, 2 мкМ сафранин О.

АзI, как и МС, может быть использован в качестве антидота при отравлении цианидами даже в низких концентрациях [41]. АзI эффективнее, чем МС ингибирует провоспалительный цитокин фактор некроза опухоли альфа (TNF- α) и моноаминоксидазу А (MAO-A), что делает его чрезвычайно перспективным антидепрессантом [42]. Действительно, мы показали, что АзI снижает индуцированное дифеноконазолом повреждение мтДНК в семенниках на 31% ($p < 0,001$) (рис. 2А) и в среднем мозге на 14% ($p = 0,058$) (рис. 2Б). Кроме того, АзI предотвращал ухудшение

когнитивных способностей у мышей при введении дифеноконазола (рис. 1). В результате проведённого исследования можно сделать вывод, что АзI более эффективен, чем МС, в качестве препарата для снижения токсичности, вызванной дифеноконазолом. Одной из причин потенциально более высокой эффективности АзI, чем МС, может быть то, что АзI нейтрален в своей хинониминной форме и, таким образом, может иметь более быструю/лучшую диффузию через клеточные и митохондриальные мембраны, чем МС, который заряжен положительно [43].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, мы показали, что введение дифеноконазола вызывает острую токсичность, которая проявляется в значительном увеличении повреждений мтДНК. Этот эффект наиболее выражен в лёгких, семенниках, сердце и среднем мозге. В то же время другие отделы мозга повреждаются в значительно меньшей степени. Фармакологическое разобщение окислительного фосфорилирования может в той или иной степени защитить мтДНК от дифеноконазол-индуцированного повреждения и предотвратить ухудшение когнитивных функций.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Изучение когнитивных функций животных и целостности мтДНК было выполнено при поддержке гранта РНФ №22-74-00115, изучение биоэнергетических характеристик митохондрий было выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и Высшего образования Российской Федерации в рамках Государственного задания университетам в области научной деятельности (проект № FZGU-2023-0009).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Выращивание, содержание и умерщвление животных осуществляли 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. Syromyatnikov M.Y., Gureev A.P., Starkova N.N., Savinkova O.V., Starkov A.A., Lopatin A.V., Popov V.N. (2020) Method for detection of mtDNA damages for evaluating of pesticides toxicity for bumblebees (*Bombus terrestris* L.). *Pestic. Biochem. Physiol.*, **169**, 104675. DOI: 10.1016/j.pestbp.2020.104675
2. Sule R.O., Condon L., Gomes A.V. (2022) A common feature of pesticides: Oxidative stress — the role of oxidative stress in pesticide-induced toxicity. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2022**, 5563759. DOI: 10.1155/2022/5563759
3. Mostafalou S., Abdollahi M. (2013) Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **268**(2), 157-177. DOI: 10.1016/j.taap.2013.01.025
4. Gureev A.P., Simikov V.V., Pogorelov D.I., Vitkalova I.Y., Igamberdiev A.U., Popov V.N. (2022) The effect of pesticides on the NADH-supported mitochondrial respiration of permeabilized potato mitochondria. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **183**, 105056. DOI: 10.1016/j.pestbp.2022.105056
5. Арутюнян А.В., Козина Л.С. (2009) Механизмы свободнорадикального окисления и его роль в старении. *Успехи геронтологии*, **22**, 104-116. [Harutyunyan A.V., Kozina L.S. (2009) Mechanisms of free radical oxidation and its role in aging. *Successes of Gerontology*, **22**, 104-116.]
6. Skulachev V.P. (1999) Uncoupling of Respiration and Phosphorylation. In: *Frontiers of Cellular Bioenergetics: Molecular Biology, Biochemistry, and Physiopathology* (Papa S., Guerrieri F., Tager J.M., eds.), Kluwer Academic/Plenum Press, pp. 89-118. DOI: 10.1007/978-1-4615-4843-0_4
7. Geisler J.G. (2019) 2,4 dinitrophenol as medicine. *Cells*, **8**, 280. DOI: 10.3390/cells8030280
8. Rajendran J., Purhonen J., Tegelberg S., Smolander O.-P., Mörgelin M., Rozman J., Gailus-Durner V., Fuchs H., Hrabe de Angelis M., Auvinen P., Mervaala E., Jacobs H.T., Szibor M., Fellman V., Kallijärvi J. (2019) Alternative oxidase-mediated respiration prevents lethal mitochondrial cardiomyopathy. *EMBO Mol. Med.*, **11**(1), e9456. DOI: 10.15252/emmm.201809456
9. Schirmer R.H., Adler H., Pickhardt M., Mandelkow E. (2011) Lest we forget you — methylene blue. *Neurobiol. Aging*, **32**, 2325.e7-2325.e16. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2010.12.012
10. Gureev A.P., Syromyatnikov M.Yu., Ignatyeva D.A., Valuyskikh V.V., Solodskikh S.A., Panevina A.V., Gryaznova M.V., Kokina A.V., Popov V.N. (2020) Effect of long-term methylene blue treatment on the composition of mouse gut microbiome and its relationship with the cognitive abilities of mice. *PLoS One*, **15**(11), e0241784. DOI: 10.1371/journal.pone.0241784
11. Gureev A.P., Shaforostova E.A., Popov V.N., Starkov A.A. (2019) Methylene blue does not bypass complex III antimycin block in mouse brain mitochondria. *FEBS Lett.*, **593**, 499-503. DOI: 10.1002/1873-3468.13332
12. Gureev A.P., Shaforostova E.A., Starkov A.A., Popov V.N. (2017) Simplified qPCR method for detecting excessive mtDNA damage induced by exogenous factors. *Toxicology*, **382**, 67-74. DOI: 10.1016/j.tox.2017.03.010
13. Mamane A., Baldi I., Tessier J.F., Raherison C., Bouvier G. (2015) Occupational exposure to pesticides and respiratory health. *Eur. Respir. Rev.*, **24**, 306-329. DOI: 10.1183/16000617.00006014
14. Rosanna D.P., Salvatore C. (2012) Reactive oxygen species, inflammation, and lung diseases. *Curr. Pharm. Des.*, **18**, 3889-3890. DOI: 10.2174/138161212802083716
15. Khwanes S.A., Mohamed R.A., Ibrahim K.A., Abd El-Rahman H.A. (2022) Ginger reserves testicular spermatogenesis and steroidogenesis in difenoconazole-intoxicated rats by conducting oxidative stress, apoptosis and proliferation. *Andrologia*, **54**, e14241. DOI: 10.1111/and.14241
16. Koifman S., Koifman R.J., Meyer A. (2002) Human reproductive system disturbances and pesticide exposure in Brazil. *Cad. Saude Publica*, **18**, 435-445. DOI: 10.1590/s0102-311x2002000200008
17. Jiang J., Chen L., Wu S., Lv L., Liu X., Wang Q., Zhao X. (2020) Effects of difenoconazole on hepatotoxicity, lipid metabolism and gut microbiota in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Pollut.*, **265**, 114844. DOI: 10.1016/j.envpol.2020.114844
18. Zhu J., Liu C., Wang J., Liang Y., Gong X., You L., Ji C., Wang S.L., Wang C., Chi X. (2021) Difenoconazole induces cardiovascular toxicity through oxidative stress-mediated apoptosis in early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **216**, 112227. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2021.112227

19. Liu F., Wang Y., Chen L., Bello B.K., Zhang T., Yang H., Li X., Pan E., Feng H., Dong J. (2022) Difenoconazole disrupts the blood-brain barrier and results in neurotoxicity in carp by inhibiting the Nrf2 pathway mediated ROS accumulation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **244**, 114081. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2022.114081
20. Syromyatnikov M.Y., Kokina A.V., Lopatin A.V., Starkov A.A., Popov V.N. (2017) Evaluation of the toxicity of fungicides to flight muscle mitochondria of bumblebee (*Bombus terrestris* L.). *Pestic. Biochem. Physiol.*, **135**, 41-46. DOI: 10.1016/j.pestbp.2016.06.007
21. Gureev A.P., Shafarostova E.A., Laver D.A., Khorolskaya V.G., Syromyatnikov M.Y., Popov V.N. (2019) Methylene blue elicits non-genotoxic H₂O₂ production and protects brain mitochondria from rotenone toxicity. *J. Appl. Biomed.*, **17**, 107-114. DOI: 10.32725/jab.2019.008
22. Baynes J.W., Thorpe S.R. (2000) Glycoxidation and lipoxidation in atherogenesis. *Free Radic. Biol. Med.*, **28**, 1708-1716. DOI: 10.1016/s0891-5849(00)00228-8
23. Horowitz M.P., Milanese C., di Maio R., Hu X., Montero L.M., Sanders L.H., Tapias V., Sepe S., van Cappellen W.A., Burton E.A., Greenamyre J.T., Mastroberardino P.G. (2011) Single-cell redox imaging demonstrates a distinctive response of dopaminergic neurons to oxidative insults. *Antioxid. Redox Signal.*, **15**, 855-871. DOI: 10.1089/ars.2010.3629
24. Filograna R., Lee S., Tiklová K., Mennuni M., Jonsson V., Ringnér M., Gillberg L., Sopova E., Shupliakov O., Koolmeister C., Olson L., Perlmann T., Larsson N.-G. (2021) Mitochondrial dysfunction in adult midbrain dopamine neurons triggers an early immune response. *PLoS Genet.*, **17**, e1009822. DOI: 10.1371/journal.pgen.1009822
25. Trist B.G., Hare D.J., Double K.L. (2019) Oxidative stress in the aging *substantia nigra* and the etiology of Parkinson's disease. *Aging Cell*, **18**, e13031. DOI: 10.1111/acer.13031
26. Hegarty S.V., Sullivan A.M., O'Keefe G.W. (2013) Midbrain dopaminergic neurons: A review of the molecular circuitry that regulates their development. *Dev. Biol.*, **379**, 123-138. DOI: 10.1016/j.ydbio.2013.04.014
27. Collin F. (2019) Chemical basis of reactive oxygen species reactivity and involvement in neurodegenerative diseases. *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 2407. DOI: 10.3390/ijms20102407
28. de Gray A. (2005) Reactive oxygen species production in the mitochondrial matrix: Implications for the mechanism of mitochondrial mutation accumulation. *Rejuvenation Res.*, **8**, 13-17. DOI: 10.1089/rej.2005.8.13
29. Mposhi A., van der Wijst M., Faber K.N., Rots M.G. (2017) Regulation of mitochondrial gene expression the epigenetic enigma. *Front. Biosci.*, **22**, 1099-1113. DOI: 10.2741/4535
30. Abdel-Salam O.M.E., Youness E., Mohamed N., Shaffie N. (2017) The effect of 2,4-dinitrophenol on oxidative stress and neuronal damage in rat brain induced by systemic rotenone injection. *Reactive Oxygen Species*, **3**, 135-147. DOI: 10.20455/ros.2017.813
31. Lee Y., Heo G., Lee K.M., Kim A.H., Chung K.W., Im E., Chung H.Y., Lee J. (2017) Neuroprotective effects of 2,4-dinitrophenol in an acute model of Parkinson's disease. *Brain Res.*, **1663**, 184-193. DOI: 10.1016/j.brainres.2017.03.018
32. Geisler J.G., Marosi K., Halpern J., Mattson M.P. (2017) DNP, mitochondrial uncoupling, and neuroprotection: A little dab'll do ya. *Alzheimers Dement.*, **13**, 582-591. DOI: 10.1016/j.jalz.2016.08.001
33. Stott S.R.W., Barker R.A. (2014) Time course of dopamine neuron loss and glial response in the 6-OHDA striatal mouse model of Parkinson's disease. *Eur. J. Neurosci.*, **39**, 1042-1056. DOI: 10.1111/ejn.12459
34. Wu B., Jiang M., Peng Q., Li G., Hou Z., Milne G.L., Mori S., Alonso R., Geisler J.G., Duan W. (2017) 2,4-DNP improves motor function, preserves medium spiny neuronal identity, and reduces oxidative stress in a mouse model of Huntington's disease. *Exp. Neurol.*, **293**, 83-90. DOI: 10.1016/j.expneurol.2017.03.020
35. Korde A.S., Pettigrew L.C., Craddock S.D., Maragos W.F. (2005) The mitochondrial uncoupler 2,4-dinitrophenol attenuates tissue damage and improves mitochondrial homeostasis following transient focal cerebral ischemia. *J. Neurochem.*, **94**, 1676-1684. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2005.03328.x
36. Pandya J.D., Pauly J.R., Nukala V.N., Sebastian A.H., Day K.M., Korde A.S., Maragos W.F., Hall E.D., Sullivan P.G. (2007) Post-injury administration of mitochondrial uncouplers increases tissue sparing and improves behavioral outcome following traumatic brain injury in rodents. *J. Neurotrauma*, **24**, 798-811. DOI: 10.1089/neu.2006.3673
37. Patel S.P., Sullivan P.G., Pandya J.D., Rabchevsky A.G. (2009) Differential effects of the mitochondrial uncoupling agent, 2,4-dinitrophenol, or the nitroxide antioxidant, tempol, on synaptic or nonsynaptic mitochondria after spinal cord injury. *J. Neurosci. Res.*, **87**, 130-140. DOI: 10.1002/jnr.21814
38. Wen Y., Li W., Poteet E.C., Xie L., Tan C., Yan L.-J., Ju X., Liu R., Qian H., Marvin M.A., Goldberg M.S., She H., Mao Z., Simpkins J.W., Yang S.-H. (2011) Alternative mitochondrial electron transfer as a novel strategy for neuroprotection. *J. Biol. Chem.*, **286**, 16504-16515. DOI: 10.1074/jbc.M110.208447
39. Krutskikh E.P., Potanina D.V., Samoylova N.A., Gryaznova M.V., Sadovnikova I.S., Gureev A.P., Popov V.N. (2022) Brain protection by methylene blue and its derivative, azur B, via activation of the Nrf2/ARE pathway in cisplatin-induced cognitive impairment. *Pharmaceuticals (Basel)*, **15**, 815. DOI: 10.3390/ph15070815
40. Gureev A.P., Syromyatnikov M.Y., Gorbacheva T.M., Starkov A.A., Popov V.N. (2016) Methylene blue improves sensorimotor phenotype and decreases anxiety in parallel with activating brain mitochondria biogenesis in mid-age mice. *Neurosci. Res.*, **113**, 19-27. DOI: 10.1016/j.neures.2016.07.006
41. Haouzi P., McCann M., Tubbs N. (2020) Azure B as a novel cyanide antidote: Preclinical *in-vivo* studies. *Toxicol. Rep.*, **7**, 1459-1464. DOI: 10.1016/j.toxrep.2020.10.015
42. Pakavathkumar P., Sharma G., Kaushal V., Foveau B., LeBlanc A.C. (2015) Methylene blue inhibits caspases by oxidation of the catalytic cysteine. *Sci. Rep.*, **5**, 13730. DOI: 10.1038/srep13730
43. Wainwright M., Amaral L. (2005) Review: The phenothiazinium chromophore and the evolution of antimalarial drugs. *Tropical Medicine International Health*, **10**, 501-511. DOI: 10.1111/j.1365-3156.2005.01417.x

Поступила в редакцию: 23. 10. 2023.
После доработки: 18. 12. 2023.
Принята к печати: 19. 12. 2023.

THE STUDY OF THE PROTECTIVE EFFECT OF MITOCHONDRIAL UNCOUPLERS DURING ACUTE TOXICITY OF THE FUNGICIDE DIFENOCONAZOLE IN DIFFERENT ORGANS OF MICE

*E.V. Chernyshova¹, D.V. Potanina¹, I.S. Sadovnikova¹,
E.P. Krutskikh¹, D.E. Volodina¹, N.A. Samoylova¹, A.P. Gureev^{1,2*}*

¹Voronezh State University,
1 Universitetskaya sq., Voronezh, 394018 Russia; *e-mail: gureev@bio.vsu.ru

²Voronezh State University of Engineering Technologies,
72 Sakko and Vanzetti str., Voronezh, 394036 Russia

Pesticides represent a serious problem for agricultural workers due to their neurotoxic effects. The aim of this study was to evaluate the ability of pharmacological oxidative phosphorylation uncouplers to reduce the effect of the difenoconazole fungicide on mitochondrial DNA (mtDNA) of various organs in mice. Injections of difenoconazole caused cognitive deficits in mice, and the protonophore 2,4-dinitrophenol (2,4-DNP) and Azur I (AzI), a demethylated metabolite of methylene blue (MB), prevented the deterioration of cognitive abilities in mice induced by difenoconazole. Difenoconazole increased the rate of reactive oxygen species (ROS) production, likely through inhibition of complex I of the mitochondrial respiratory chain. After intraperitoneal administration of difenoconazole lungs, testes, and midbrain were most sensitive to the accumulation of mtDNA damage. In contrast, the cerebral cortex and hippocampus were not tolerant to the effects of difenoconazole. The protonophore 2,4-DNP reduced the rate of ROS formation and significantly reduced the amount of mtDNA damage caused by difenoconazole in the midbrain, and partially, in the lungs and testes. MB, an alternative electron carrier capable of bypassing inhibited complex I, had no effect on the effect of difenoconazole on mtDNA, while its metabolite AzI, a demethylated metabolite of MB, was able to protect the mtDNA of the midbrain and testes. Thus, mitochondria-targeted therapy is a promising approach to reduce pesticide toxicity for agricultural workers.

The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.

Key words: difenoconazole; methylene blue; 2,4-dinitrophenol; azur I; mitochondrial DNA; uncoupled respiration

Funding. The study of animal cognitive functions and mtDNA integrity was supported by RSF grant No. 22-74-00115, the study of mitochondrial bioenergetic characteristics was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the framework of the State task of universities of the Russian Federation. The study of mitochondrial bioenergetic characteristics was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the framework of the State task for universities in the field of scientific activity (project No. FZGU-2023-0009).

Received: 23.10.2023; revised: 18.12.2023; accepted: 19.12.2023.