

©Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ ФЕНОФИБРАТА НА ГЕНОТОКСИЧНОСТЬ В МОЗГЕ И ПЕЧЕНИ И НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ, РЕГУЛИРУЮЩИХ МЕТАБОЛИЗМ ЖИРНЫХ КИСЛОТ, У МЫШЕЙ

В.Г. Хорольская^{1*}, А.П. Гуреев¹, Е.А. Шафоростова¹, Д.А. Лавер¹, В.Н. Попов^{1,2}

¹Воронежский государственный университет,

394018, Воронеж, Университетская пл., 1; *эл. почта: vik26648368@yandex.ru

²Воронежский государственный университет инженерных технологий, 394036, Воронеж, просп. Революции, 19

Среди агонистов семейства PPAR (peroxisome proliferator-activated receptors) хорошо известен класс фибратов – веществ, используемых в терапии дислипидемии и атеросклероза. Одним из них является фенофибрат – синтетический лиганд рецептора PPAR α . При пероральном введении 0,26 мг/кг/сут фенофибрата лабораторным животным обнаружено снижение их выносливости вследствие потери массы тела при одновременном улучшении поведенческих показателей. Исследование митохондриальной ДНК клеток печени выявило генотоксический эффект фенофибрата, который, предположительно, обуславливается накоплением активных форм кислорода, что, вероятно, связано с активацией процессов пероксисомального β -окисления, а также отсутствием увеличения экспрессии генов, кодирующих белки антиоксидантной защиты. При введении фенофибрата не обнаружено повреждений мтДНК в переднем мозге, что связано с активной работой антиоксидантной системы клетки. При этом обнаружено повышение экспрессии генов, кодирующих ферменты β -окисления (*Acadm* и *Cpt1a*), а также *Ppargc1a* и *Ppara*, в мозге. В исследовании не было обнаружено влияния фенофибрата на увеличение интенсивности митохондриального биогенеза в клетках мозга и печени. Таким образом, можно сделать вывод, что прием фенофибрата значительно влияет на экспрессию генов, регулирующих метаболизм липидов в печени и головном мозге; в печени это может быть ассоциировано с возрастанием уровня окислительного стресса, косвенными маркерами которого являются повреждения мтДНК. Однако фенофибрат-индуцированное увеличение экспрессии *Ppargc1a* не ассоциировано с увеличением интенсивности митохондриального биогенеза. Это подтверждает недавнее предположение о том, что PGC-1 α не является главным регулятором митохондриального биогенеза.

Ключевые слова: фенофибрат; печень; мозг; генотоксичность; жирные кислоты; митохондриальный биогенез

DOI: 10.18097/PBMC20196505388

ВВЕДЕНИЕ

Белок PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor type α) относится к семейству ядерных рецепторов PPAR, играющих роль факторов транскрипции. При участии лигандов и коферментов этот белок связывается с энхансерными последовательностями регулируемых генов, повышая их транскрипцию [1]. Впервые PPAR α был клонирован в клетках печени грызунов в 1990 году [2]. С тех пор было обнаружено большое число лигандов к рецепторам семейства PPAR, среди которых жирные кислоты и их производные, включая эйкозаноиды и простагландины. Все гены, транскрипция которых контролируется PPAR, связаны с метаболизмом липидов и превращением энергии. В частности, PPAR α влияет на метаболизм липидов в печени, скелетных мышцах, бурой жировой ткани. Он активируется в ситуациях нехватки энергии и необходим для кетогенеза. Такой механизм служит адаптацией организма к длительному голоданию – кетоновые тела служат энергетическим материалом для мышечной ткани, почек и мозга [3, 4].

Позднее было показано, что вещества, применяемые для лечения таких заболеваний, как диабет и дислипидемия, также являются сигнальными молекулами, преимущественно воздействующими на рецепторы PPAR. Синтетическими лигандами PPAR α служат фибраты – амфифильные карбоновые

кислоты, используемые в терапии гиперлипидемии и атеросклероза [5]. Фенофибрат (ФФ) избирательно активирует PPAR α по отношению к другим рецепторам семейства [6].

Рецептор PPAR α , кодируемый геном *Ppara*, регулирует усвоение клеткой, активацию и β -окисление жирных кислот; он стимулирует экспрессию белка, транспортирующего жирные кислоты (FATP), и белка CD36 (FAT), которые переносят жирные кислоты через клеточную мембрану [7].

Активация рецептора PPAR α происходит при образовании комплекса с RXR α (retinoid X receptor α) и PGC-1 α (PPAR γ Coactivator-1 α) [8-10]. Предполагается, что PGC-1 α является главным регулятором митохондриального биогенеза. Ряд исследований по выключению и сверхэкспрессии гена указывают на важность PGC-1 α для поддержания оптимального количества митохондрий, активности митохондриальных ферментов и дыхательной функции [11]. Хотя изначально PGC-1 α был открыт как корегулятор PPAR γ , впоследствии было обнаружено, что он может служить коактиватором ядерных дыхательных факторов NRF1 и NRF2, влияющих на процессы транскрипции и трансляции митохондриальной ДНК [12]. В частности, NRF1 способен регулировать экспрессию гена *Tfam* (transcription factor A, mitochondrial), который непосредственно связан с процессами репликации мтДНК [11].

У грызунов приём ФФ вызывает пролиферацию пероксисом в печени, гепатомегалию и гепатокарциногенез [2]. У человека, однако, таких эффектов не обнаружено [13]. Это может быть связано с тем, что экспрессия PPAR α в печени грызунов в десятки раз выше, чем у человека. Также у человека транскрипция генов, участвующих в пролиферации пероксисом, в том числе гена, кодирующего ацетил-КоА-оксидазу, связана с иными элементами ответа пролиферации пероксисом, чем у грызунов: человеческая энхансерная последовательность гена ацетил-КоА-оксидазы не активируется PPAR α в экспериментах по трансактивации [14].

Несмотря на то, что ФФ и его клинические эффекты хорошо изучены в терапии заболеваний, связанных с нарушениями липидного обмена, его влияние на процессы, происходящие в мозге, не так хорошо известно. Существует риск, что патологические процессы, происходящие в печени при приёме ФФ, могут также иметь место и в мозге.

Целью данной работы было рассмотрение различных параметров, таких как уровень экспрессии генов, регулирующих пероксисомальное и митохондриальное β -окисление жирных кислот, а также генов, регулирующих митохондриальный биогенез и антиоксидантную защиту в клетках мозга и печени. Кроме того, мы оценили генотоксические эффекты, оказываемые ФФ в мозге и печени животных, а также поведенческие и физиологические изменения, происшедшие при пероральном приёме 0,26 мг/кг/сут ФФ.

МЕТОДИКА

Лабораторные животные

В эксперименте использовали 12 мышей линии C57BL/6 массой 22 г. Животные были получены из питомника Научного центра биомедицинских технологий (Филиал “Столбовая”). Мыши были разделены на 2 группы по 6 животных, с равным количеством самцов и самок в каждой. Опытные группы получали кормовую смесь комбикорма (“Ssniff Spezialdiäten GmbH”, Германия) с 0,3% ФФ (Lipanthil®, “Recipharm Fontain”, Франция) и воду. Из расчёта, что одно животное потребляет 4 г корма в сутки, выходит, что на каждое животное приходится 12 мг/сут ФФ. Из расчёта на единицу массы животного концентрация ФФ составила 0,26 мг/кг/сут. Контрольная группа получала чистый комбикорм (4 г/сут) и воду. Эксперимент продолжался в течение 10 дней.

Тест “Открытое поле”

Животное помещали в открытую арену квадратной формы, открытое поле которой расчерчено линиями для того, чтобы определить положение животного. Новая обстановка может вызвать два типа реакции: исследовательское поведение, направленное на ознакомление животного с окружающей средой,

и оборонительное поведение при возникновении страха. В данном опыте мы оценивали такие показатели, как двигательная активность (с), активность в центре (с), уровень интереса к “норкам” (искусственным отверстиям на дне коробки), количество вертикальных стоек, актов дефекации и актов груминга.

Тест “Струна”

В данном тесте животное, держась передними конечностями, подвешивается на струну длиной 50 см на высоте 50 см над поверхностью. Состояние животного оценивалось в баллах через 60 с согласно следующей схеме: 0 = мышь упала; 1 = мышь держится за струну двумя лапами; 2 = держится за струну двумя лапами и перемещается вдоль струны; 3 = две передние лапы + одна или две задние лапы; 4 = четыре лапы и хвост вокруг струны; 5 = выход до конца струны; более 5 баллов присваивалось в случае достижения цели быстрее 60 с (5,5 = выход до конца струны за 30 с).

Дыхательный коэффициент

Оценку скорости дыхания проводили при помощи сенсорного датчика фирмы “Vernier” (США). Уровень потребления кислорода и выделения диоксида углерода измеряли с 10-минутными интервалами. Дыхательный коэффициент рассчитывается как соотношение продукции диоксида углерода к потреблению кислорода:

$$Д.К. = \frac{V(CO_2)}{V(O_2)} \quad (1);$$

где $V(CO_2)$ – объём выделяемого из организма углекислого газа; $V(O_2)$ – объём поглощаемого за то же время кислорода.

Выделение тотальной ДНК

Тотальную ДНК выделяли при помощи набора diaGene (“Диа-М”, Россия), следуя рекомендациям производителя.

Измерение количества повреждений мтДНК

Количество повреждений мтДНК оценивали с помощью ПЦР длинных фрагментов с использованием Encyclo-полимеразы (“Eurogen”, Россия) на термоциклере CFX96TM Real-Time System (“Bio-Rad”, США).

Значение ΔCq контрольных и опытных длинных фрагментов сравнивали с ΔCq контрольных и опытных коротких фрагментов, которые использовали в качестве референсов. Количество добавочных повреждений в мтДНК рассчитывали на 10 т.п.н. по формуле:

$$\text{Повреждения} = (1 - 2^{-(\Delta \text{длинный} - \Delta \text{короткий})}) \times \frac{10000 \text{ (п.н.)}}{\text{длина фрагмента (п.н.)}} \quad (2).$$

Последовательности праймеров, используемых для детекции количества повреждений ДНК, приведены в таблице 1.

ВЛИЯНИЕ ФЕНОФИБРАТА НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ

Таблица 1. Последовательности праймеров, используемых для детекции количества повреждений мтДНК

Ген	Прямой праймер 5'–3'	Обратный праймер 5'–3'
12s-16s	TAAATTTCTGTGCCAGCCACC	GTTGACACGTTTTACGCCGA (кор.)
		ATGCTACCTTTGCACGGTCA (дл.)
16s-Nd1	ACGAGGGTCCAACGTCTCTTA	AGCTCCATAGGGTCTTCTCGT (кор.)
		CCGGCTGCGTATTCTACGTT (дл.)
Nd1-Nd2	CTAGCAGAAACAAACCGGGC	CCGGCTGCGTATTCTACGTT (кор.)
		TTAGGGCTTTGAAGGCTCGC (дл.)
Nd5	TCAATCTTCTACTATCCCCAATCC	ATGTGGTGGTGACAGTGGG (кор.)
		TGGTTTGGGAGATTGGTTGATG (дл.)
Nd6-CytB	CCCAATCCCTCCTTCCAAC	TGGTTTGGGAGATTGGTTGATG (кор.)
		GGTGGGAGTAGCTCCTTCTT (дл.)
D-loop	AAGAAGGAGCTACTCCCCACC	AGCTTATATGCTTGGGGAAAATAGT (кор.)
		GTTGACACGTTTTACGCCGA (дл.)

Измерение количества копий мтДНК

Количество мтДНК оценивали с помощью количественной ПЦР. Для этого производили амплификацию фрагментов мтДНК с использованием следующих праймеров:

F: 5'-ACGAGGGTCCAACGTCTCTTA-3';

R: 5'-AGCTCCATAGGGTCTTCTCGT-3'.

В качестве референса использовался ген *Gapdh*. Последовательности праймеров были следующими:

F: 5'-GGCTCCCTAGGCCCTCCTG-3';

R: 5'-TCCCAACTCGGCCCAACA-3'.

Нормализованный уровень мтДНК относительно ядерной ДНК рассчитывался по формуле $2(-\Delta\Delta Cq)$.

Выделение тотальной РНК

Образец ткани массой 50 мг гомогенизировали в 1 мл раствора ExtractRNA, лизат инкубировали при комнатной температуре в течение 10-15 мин. Далее лизат центрифугировали при 12000 g в течение 10 мин для удаления нерастворённых фрагментов. Супернатант переливали в новую пробирку. Для разделения фаз добавляли 0,2 мл хлороформа на каждый 1 мл реагента ExtractRNA, добавленного на этапе гомогенизации. Смесь инкубировали в течение 3-5 мин при комнатной температуре. Центрифугировали образец при 12000 g в течение 15 мин при 4°C. В работе была использована высокоскоростная центрифуга с охлаждением Hermle Z36 НК ("Hermle", Германия) с угловым ротором модели Z326-3020H-36.

Для выделения РНК в водную фазу добавляли 0,5 мл 100% изопропанола на каждый 1 мл реагента, добавленного на первом этапе. Образец инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин, далее центрифугировали при 12000 g в течение 10 мин при комнатной температуре. После отбора супернатанта, добавляли 2 мл 75% этанола на каждый 1 мл изопропанола, использованного на первом этапе. Образец вновь центрифугировали в течение 5 мин, после чего удаляли этанол. Осадок высушивали на воздухе в пробирке с открытой крышкой

в течение 5-7 мин. Растворили РНК в необходимом объёме свободной от РНКаз воды.

Реакция обратной транскрипции

Для проведения обратной транскрипции использовался прибор Eppendorf Mastercycler personal ("Eppendorf", Германия). 5 мкг РНК смешивали с 0,5 мкг олиго(dT) и деионизированной водой, инкубировали 5 мин при 70°C, после чего добавляли 2 мкл 10xБуфера (SybEnzyme®, "Сибэнзим", Россия) и 2 мкл 10 mM раствора dNTP и инкубировали при 37°C. Для реакции обратной транскрипции использовали M-MuLV обратной транскриптазы ("Сибэнзим") (40 ед.). Инкубация продолжалась в течение 60 мин при 37°C.

Количественный ПЦР-анализ

Для проведения количественного ПЦР-анализа был использован прибор Bio-Rad CFX96™ Real-Time System ("Bio-Rad"). Реакционная смесь состояла из следующих компонентов: 5 мкл qPCRmix-HS SYBR+ROX, 20 пМ комбинация праймеров (прямой и обратный), 12 нг ДНК-матрица. В качестве референсного гена использовали ген *18s* рРНК и *Gapdh*.

Общую денатурацию проводили при 95°C 3 мин; денатурация в начале цикла при 95°C 30 с; отжиг праймеров при 61°C 30 с, элонгация 72°C 30 с; количество циклов 38; общая элонгация 72°C 5 с; кривая плавления от 65°C до 95°C. Количественно нормализованную экспрессию генов выражали в относительных единицах флуоресценции (RFU). Последовательности праймеров приведены в таблице 2.

Статистическая обработка

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ Microsoft Office Excel 2013. Результаты представлены в виде средних значений \pm стандартная ошибка среднего арифметического. Полученные данные обрабатывали с использованием t-критерия Стьюдента. Статистический анализ теста "Открытое поле" проводили с использованием 1-факторного дисперсионного анализа.

Таблица 2. Последовательности праймеров, используемых для измерения экспрессии генов

Ген	Прямой праймер 5'-3'	Обратный праймер 5'-3'
<i>18s</i>	CGGCTACCACATCCAAGGAA	GCTGGAATTACTGTGGCT
<i>Acadm</i>	AGGGTTTAGTTTGTGACGG	CCCCGCTTTTGTTCATATCCG
<i>Acadvl</i>	CTACTGTGCTTCAGGGACAAC	CAAAGGACTTCGATTCTGCC
<i>Acox1</i>	TAACCTCCTCACTCGAAGCCA	AGTTCCATGACCCATCTCTGCC
<i>Cat</i>	AGCGACCAGATGAAGCAGTG	TCCGCTCTCTGTCAAAGTGTG
<i>Cox1</i>	TCGCAATTCCTACCGGTCTC	CGTGTAGGGTTGCAAGTCAGC
<i>Cpt1a</i>	CTCCGCCTGAGCCATGAAG	CACCAGTGATGATGCCATTCT
<i>Gapdh</i>	GGCTCCCTAGGCCCCCTCTG	TCCCAACTCGGCCCCCAACA
<i>Nfe2l2</i>	CTCTCTGAACCTCTGGACGG	GGGTCTCCGTAATGGAAG
<i>Nrf1</i>	AGCACGGAGTGACCCAAA	TGTACGTGGCTACATGGACCT
<i>Ppara</i>	AGAGCCCCATCTGTCTCTC	ACTGGTAGTCTGCAAAACCAAA
<i>Ppargc1a</i>	ATGTGTGCGCTTCTTGCTCT	CACGACCTGTGTGAGAAAA
<i>Prdx3</i>	GGTTGCTCGTCATGCAAGTG	CCACAGTATGTCTGTCAAACA
<i>Prdx5</i>	GGCTGTTCTAAGACCCACCTG	GGAGCCGAACCTTGCCCTTC
<i>Sod1</i>	AACCAGTTGTGTTGTGAGGAC	CCACCATGTTTCTTAGAGTGAGG
<i>Sod2</i>	CAGACCTGCCTTACGACTATGG	CTCGGTGGCGTTGAGATTGTT
<i>Tfam</i>	ATTCCGAAGTGTTTTTCCAGCA	TCTGAAAGTTTTCGATCTGGGT

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Физиологические и поведенческие тесты

В предыдущих исследованиях было показано, что оптимальной для проведения опыта является концентрация ФФ, равная 0,3%; такая концентрация не является токсической, хотя приводит к таким эффектам, как потеря веса и увеличение печени [7]. Результаты теста “Открытое поле” показывают, что количество актов груминга в группе, принимавшей ФФ, снижается по сравнению с контролем, что свидетельствует о повышении стрессоустойчивости животных из опытной группы. При этом такие показатели, как двигательная активность и уровень интереса к норкам, снижается по сравнению с контролем, что можно объяснить потерей веса, происшедшей у животных из опытной группы как следствие приёма фенофибратов (рис. 1). Однако в исследовании 2014 года Babiero и соавт. при использовании экспериментальной модели болезни Паркинсона, индуцированной введением 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП), было показано, что в группе животных, принимавших ФФ, и которой вводили МФТП, улучшаются показатели двигательной активности по сравнению с группой животных без ФФ [15].

Ранее было показано, что диета, приводящая к резкой потере веса, вызывает снижение двигательной активности [16]. По результатам теста “Струна” видно, что в группе животных, получавших ФФ, происходит значительное снижение физической силы, что, вероятно, также связано с потерей веса (рис. 2).

Влияние ФФ на экспрессию генов, кодирующих ферменты β -окисления жирных кислот и антиоксидантной защиты, в мозге

Ранее считалось, что нейрональные митохондрии не окисляют жирные кислоты [17], однако ряд наблюдений ставит под сомнение это утверждение [18]. Исследование изолированных митохондрий мозга

крысы показало, что жирные кислоты используются в качестве источника энергии в астроцитах и нейронах; а исследование, проведённое на *Drosophila sp.*, продемонстрировало, что мозг взрослого организма способен катаболизировать жирные кислоты и продуцировать кетоновые тела [19].

Исследования нейропротекторного действия ФФ показывают, что он оказывает противовоспалительный эффект [20], снижает симптомы паркинсонизма, индуцированного МФТП [21], но не окислительного стресса, индуцированного 6-гидроксидофамином [22]. Полученные данные свидетельствуют о том, что ФФ оказывает воздействие на метаболизм жирных кислот в мозге.

В условиях эксперимента продемонстрировано (рис. 3), что повышается экспрессия гена *Acadm* ($p \leq 0,01$), кодирующего фермент митохондриального β -окисления – среднецепочечную ацил-КоА-дегидрогеназу, и гена *Cpt1a* ($p \leq 0,01$), кодирующего субъединицу карнитин-пальмитоилтрансферазы I – фермента, определяющего перемещение жирных кислот на внутреннюю мембрану митохондрий, где происходит их катаболизм [23]. Также ФФ приводит к повышению экспрессии гена *Ppargc1a*, кодирующего белок PGC-1 α , и гена *Ppara*, кодирующего белок PPAR α , что связано с процессом β -окисления. Повышение экспрессии гена *Ppara* наблюдается в метаболически активных тканях [24]. При этом повышение экспрессии гена *Ppargc1a* также может быть связано с повышением метаболизма [25].

При оценке экспрессии генов, кодирующих ферменты, относящиеся к антиоксидантной системе клеток мозга (рис. 4), было отмечено повышение экспрессии гена *Sod2*, кодирующего митохондриальный фермент супероксиддисмутазу 2, который катализирует дисмутацию супероксида с образованием кислорода и пероксида водорода, а также гена *Prdr5*, кодирующего белок, семейства пероксиредоксинов, активный как в митохондриях, так и в цитоплазме и пероксисомах [1].

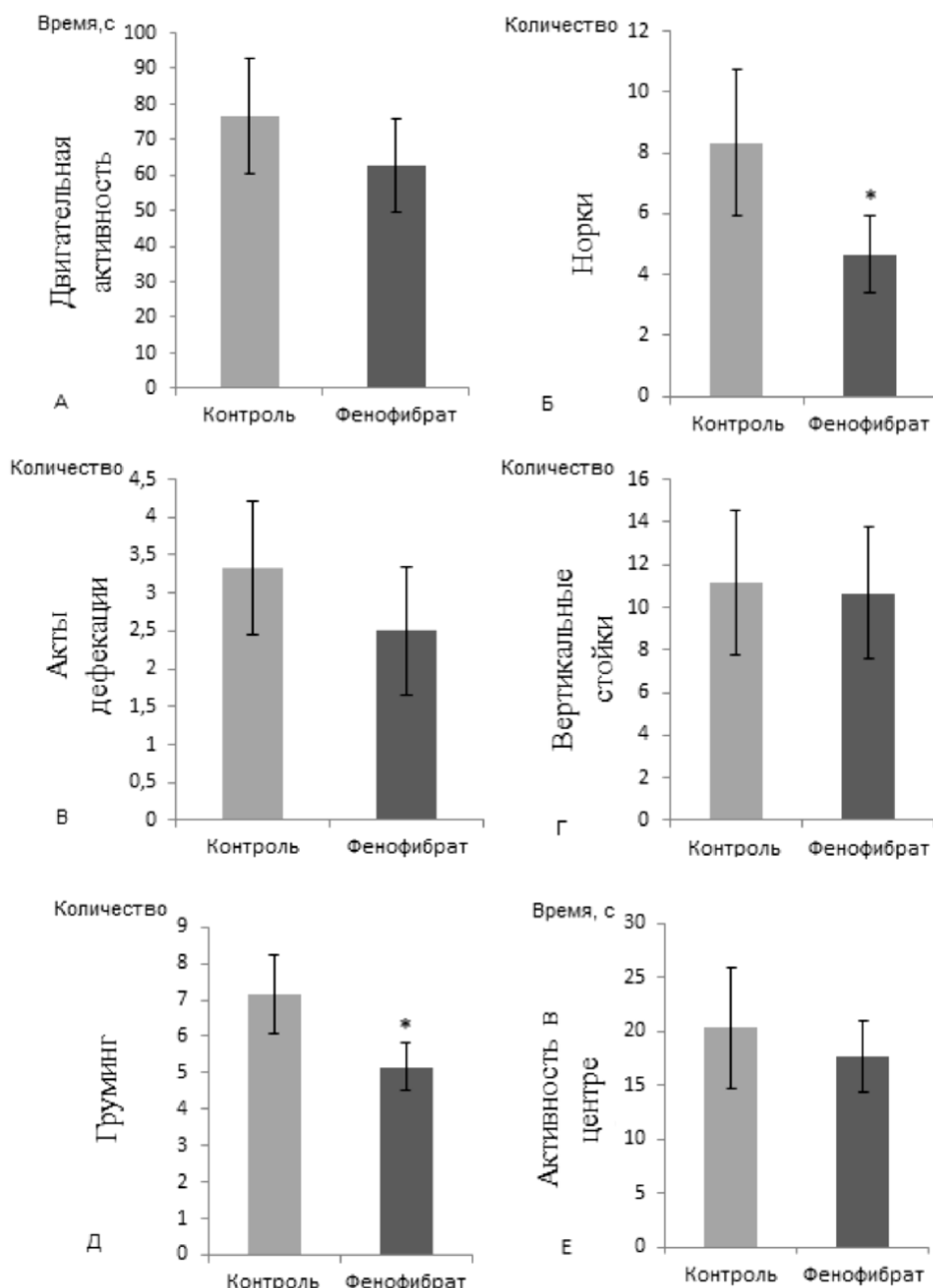


Рисунок 1. Результаты теста “Открытое поле”, * – $p < 0,05$.

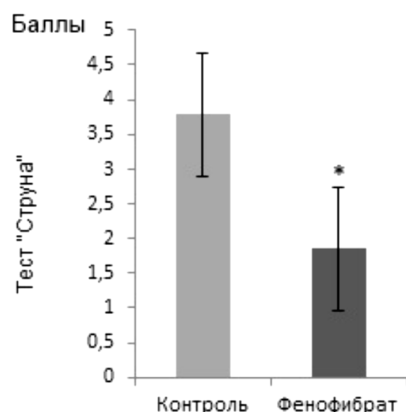


Рисунок 2. Результаты теста “Струна”, * – $p < 0,05$.

Влияние ФФ на изменение скорости дыхания мышей

При исследовании изменения скорости дыхания при приёме ФФ обнаружено, что скорость эмиссии CO_2 снижается по сравнению с контролем, в то время как скорость потребления O_2 повышается (табл. 3). Дыхательный коэффициент для группы, принимавшей ФФ, составил $0,96 \pm 0,04$, что ниже, чем в контрольной группе на 9,43% ($p < 0,05$). При окислении углеводов отношение поглощённого кислорода к выделенному углекислому газу равняется 1, однако при окислении жиров наблюдается снижение продукции углекислого газа на каждую потребляемую молекулу кислорода [26]. Данные, приведённые в таблице 3, могут указывать на смещение метаболизма от окисления глюкозы к окислению жирных кислот.

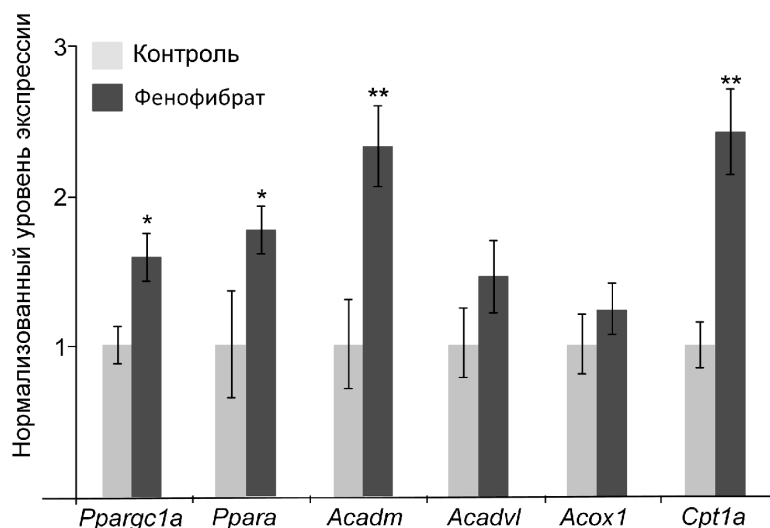


Рисунок 3. Изменение экспрессии генов, регулирующих β -окисление жирных кислот, индуцируемое 0,26 мг/кг/сут фенофибрата в мозге. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$.

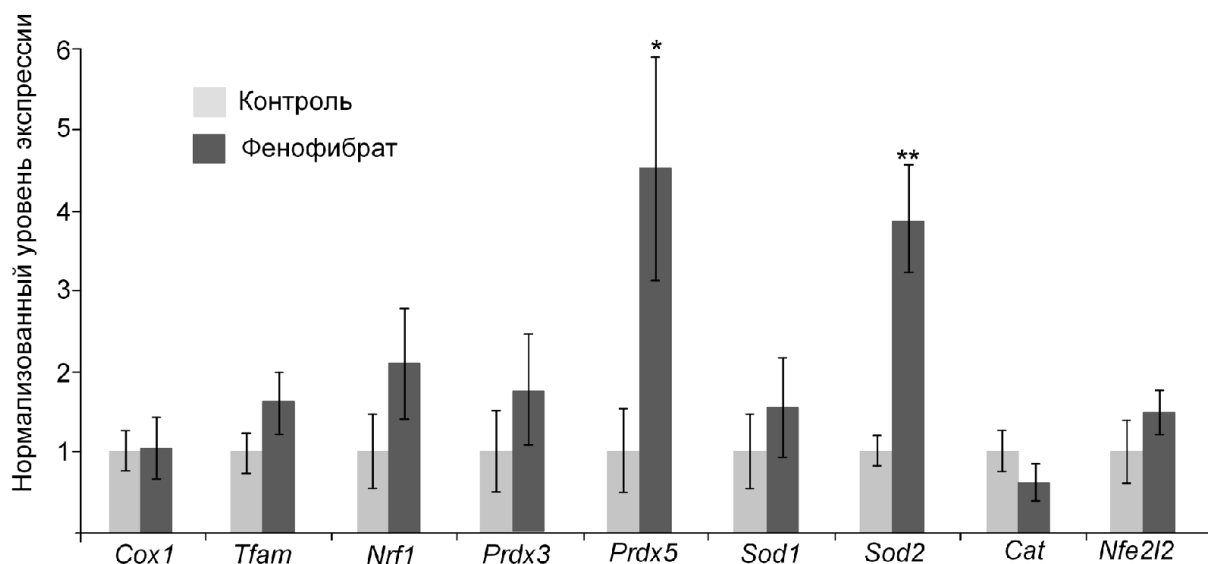


Рисунок 4. Изменение экспрессии генов, регулирующих митохондриальный биогенез и антиоксидантную защиту, индуцируемое фенофибратом в мозге. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$.

Таблица 3. Изменение скорости дыхания мышей при приёме 0,26 мг/кг/сут ФФ

Показатели	Контроль	0,26 мг/кг/сут фенофибрата
Скорость эмиссии CO ₂ , мкмоль/мин/г (массы животных)	4,69±0,13	4,39±0,11*
Скорость потребления O ₂ , мкмоль/мин/г (массы животных)	4,44±0,38	4,57±0,28
Дыхательный коэффициент	1,06±0,07	0,96±0,04

Примечание. Данные статистически достоверны (* – $p < 0,05$).

Воздействие ФФ на антиоксидантную защиту и митохондриальный биогенез в мозге

Хотя PGC-1 α считается главным регулятором митохондриального биогенеза, относительно недавно была высказана идея о существовании другого сигнального пути, предусматривающего возможность прямого воздействия NRF2 на транскрипцию гена *Nrf1* [27].

На рисунке 4 представлен график изменения экспрессии генов, регулирующих митохондриальный биогенез и антиоксидантную защиту клетки. В ходе исследования не было отмечено изменения экспрессии генов *Nrf1* и *Nfe2l2*, соответственно, не было обнаружено и связи между транскрипционным фактором PGC-1 α и NRF2-сигнальным путём.

Уровень митохондриального биогенеза можно оценить по количеству копий мтДНК в образце. Из графика на рисунке 5 видно, что количество митохондрий в мозге при приёме ФФ не увеличивается.

Также на рисунке 4 представлены графики, показывающие уровень экспрессии гена *Tfam* и другого митохондриального гена *Cox1*. Отсутствие значимых изменений экспрессии данных генов в опытной группе по сравнению с контролем косвенно указывает на то, что интенсивность процесса митохондриального биогенеза в мозге при приёме ФФ не изменяется. Если принять во внимание увеличение экспрессии гена *Ppargc1a*, можно предположить, что PGC-1 α не является основным регулятором митохондриального биогенеза.

Генотоксичность

Что касается генотоксического эффекта, производимого введением ФФ, в мозге мышей не было обнаружено повреждений, индуцируемых ФФ указанной концентрации. Однако были отмечены повреждения в 1 и 9 фрагментах мтДНК в клетках печени ($p < 0,05$). Регион 1 включает в себя последовательности, кодирующие 16s и 12s рРНК, повреждение мтДНК в этой области нарушает работу транскрипционного аппарата митохондрий [28]. Регион 9 содержит структуру, называемую D-петля. Это некодирующая последовательность мтДНК, чрезвычайно важная для регуляции процессов репликации и трансляции (рис. 6).

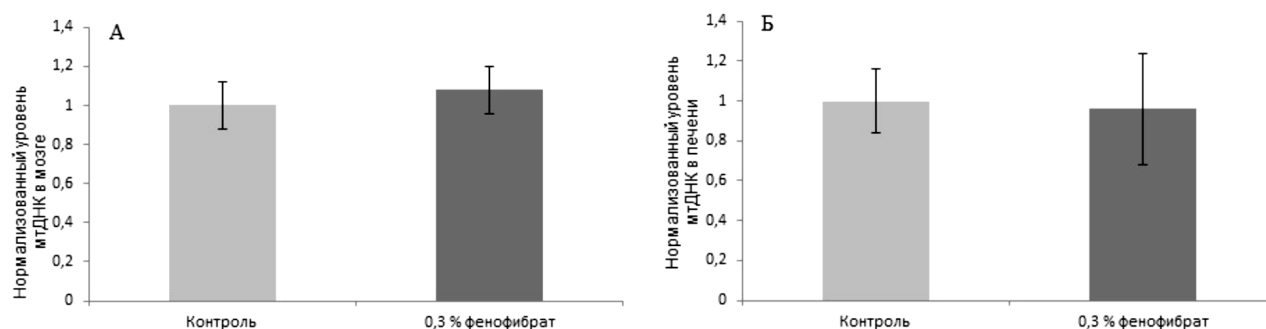


Рисунок 5. Количество митохондрий в мозге (А) и печени (Б) мышей, принимавших 0,26 мг/кг/сут фенофибрата.

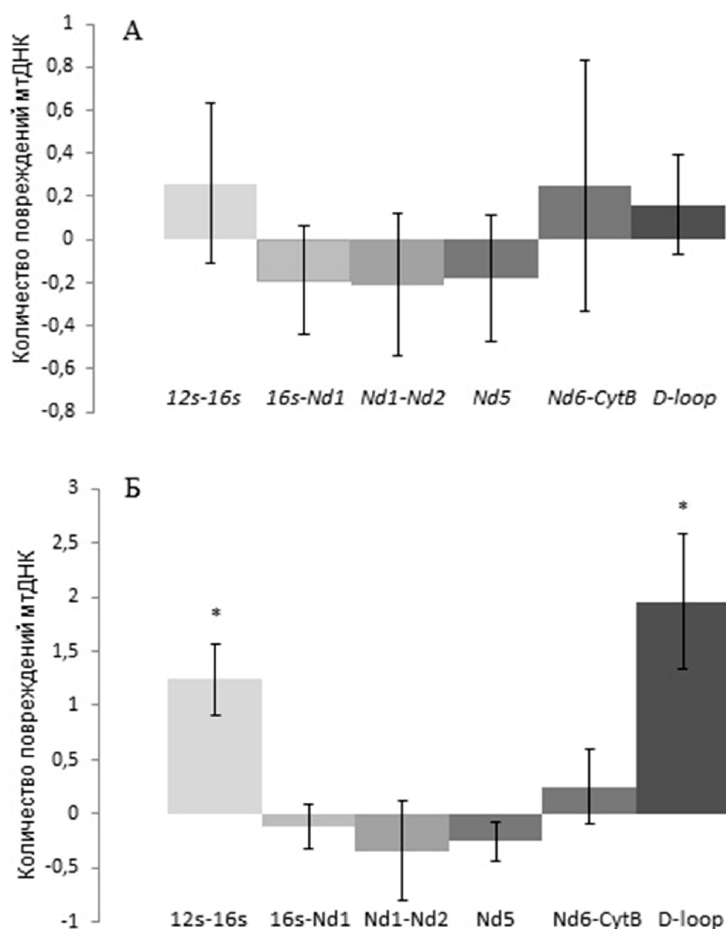


Рисунок 6. Повреждения мтДНК, индуцируемые приёмом 0,26 мг/кг/сут фенофибрата в мозге (А) и печени (Б), * – $p < 0,05$.

Генотоксический эффект ФФ может быть связан с высокой активностью фермента ацил-КоА-оксидазы, повышающей пероксисомальное β -окисление (см. ниже). Отличие пероксисомального β -окисления от митохондриального заключается в высокой продукции пероксида водорода, который, при недостаточном функционировании антиоксидантной системы, оказывает повреждающее действие на мтДНК.

В нашей предыдущей работе было показано [7], что приём ФФ приводит к накоплению диеновых конъюгатов в печени мышей. С одной стороны, это говорит об усилении процессов перекисного окисления липидов, а с другой, – столь интенсивные процессы перекисного окисления липидов могут, при недостаточной активности системы антиоксидантной защиты, вызывать генотоксичность и, как следствие, канцерогенез.

Изменения экспрессии генов β -окисления жирных кислот и антиоксидантной защиты, вызываемые приёмом ФФ, в печени

Ранее было показано существенное (почти в 30 раз) повышение экспрессии гена *Acadm* ($p < 0,01$), кодирующего митохондриальный фермент среднецепочечную ацил-КоА-дегидрогеназу, и чуть меньшее (в 20 раз) повышение экспрессии гена *Acadvl*, отвечающего за синтез митохондриального фермента очень длинноцепочечной ацил-КоА-дегидрогеназы [7]. К другим ферментам, повышение экспрессии генов которых было отмечено, относятся митохондриальный фермент (электронпереносащий флавопротеин) дегидрогеназа и пероксисомальный фермент ацил-КоА-оксидаза I, который катализирует первую реакцию пероксисомального пути β -окисления – дегидрирование и десатурацию ацил-КоА с образованием *транс*-2-еноил-КоА [7].

На рисунке 7 приведены данные по влиянию ФФ на экспрессию некоторых других генов, принимающих участие в процессах β -окисления жирных кислот. Наблюдается повышение экспрессии гена *Cpt1a*

($p \leq 0,01$), что говорит в пользу гипотезы об увеличении интенсивности митохондриального β -окисления. Кроме того, обнаружено повышение экспрессии генов *Ppara* и *Ppargc1a*, а также *Nrf1*. При этом не наблюдается значимого изменения экспрессии гена *Nfe2l2*, белковый продукт которого служит транскрипционным фактором ряда генов, кодирующих белки антиоксидантной защиты. Не было отмечено и значимого изменения экспрессии генов *Cox1* и *Tfam*. Эти результаты, а также результаты измерения количества митохондрий, приведённые на рисунке 5, говорят об отсутствии значимых изменений в биогенезе митохондрий в печени при приёме ФФ.

Эти данные, а также данные о низкой активности ферментов антиоксидантной защиты клеток печени при приёме ФФ [7], предположительно, указывают на то, что одновременно с усилением процессов перекисного окисления липидов, в печени мышей происходит накопление активных форм кислорода. Хотя в клетках печени при приёме ФФ повышается экспрессия *SOD2* и *PRDX3*, судя по всему, наиболее важным в данном случае является накопление пероксида водорода, связанное с низкой активностью каталазы [7].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Полученные данные указывают на то, что влияние, оказываемое приёмом ФФ на метаболизм мышей, неоднозначно. Так, при приёме 0,26 мг/кг/сут ФФ в течение 10 дней у модельных животных в физиологических опытах наблюдалось улучшение поведенческих показателей с одновременным снижением физической силы. Что касается генотоксического эффекта ФФ, оказываемого им на клетки печени, причиной его могут быть процессы пероксисомального β -окисления, активно протекающие в печени, а также недостаточная активность антиоксидантной системы. При этом в мозге наблюдается увеличение экспрессии генов, регулирующих митохондриальное β -окисление.

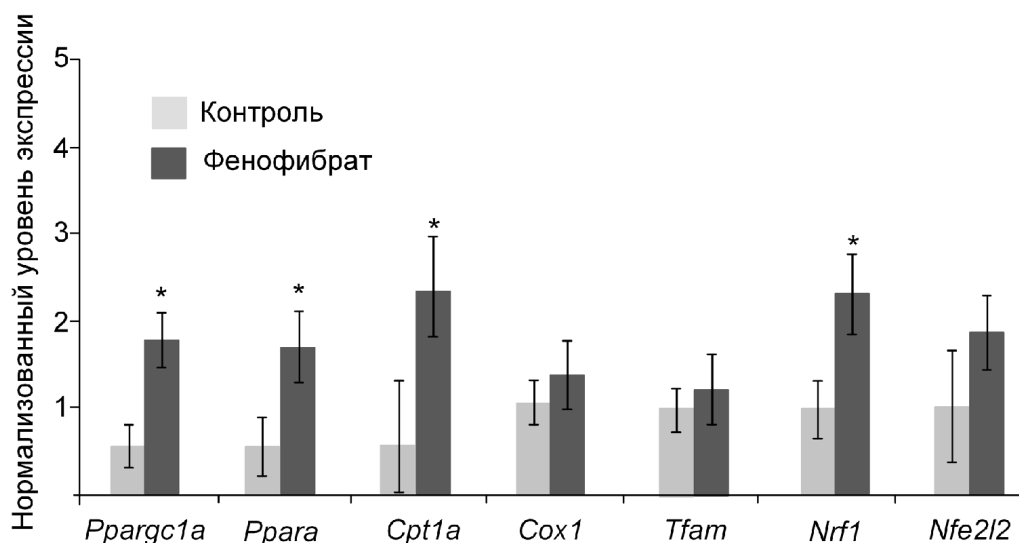


Рисунок 7. Изменение экспрессии генов, регулирующих β -окисление жирных кислот, митохондриальный биогенез и антиоксидантную защиту, индуцируемое приёмом 0,26 мг/кг/сут ФФ в печени. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$.

Однако ФФ-индуцированное увеличение экспрессии *Ppargc1a* не ассоциировано с увеличением интенсивности митохондриального биогенеза. Это подтверждает недавнее предположение [11] о том, что PGC-1α не является главным регулятором митохондриального биогенеза.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа поддержана грантом РФФИ (19-44-360011 p_a) и грантом Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских учёных и по государственной поддержке ведущих научных школ (соглашение 14.Z57.18.3451-НШ).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Выращивание, содержание, проведение инъекций 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.

ЛИТЕРАТУРА

- Berger J., Moller D.E. (2002) Ann. Rev. Nutr., **53**, 409-435.
- Issemann I., Green S. (1990) Nature, **347**, 645-650.
- Kersten S., Seydoux J., Peters J.M., Gonzalez F.J., Desvergne B., Wahli W. (1999) J. Clin. Invest., **103**(11), 1489-1498.
- Cahill G.F. Jr. (2006) Ann. Rev. Nutr., **26**, 1-22.
- Superko H.R. (1989) J. Inte. Med. Res., **17**(2), 99-112.
- Willson T.M., Brown P.J., Sternbach D.D., Henke B.R. (2000) J. Med. Chem., **43**(4), 527-550.
- Гуреев А.П., Шматкова М.Л., Баумаков В.Ю., Старков А.А., Попов В.Н. (2016) Биомед. химия, **62**(4), 426-430. [Gureev A.P., Shmatkova M.L., Bashmakov V.Y., Starkov A.A., Popov V.N. (2016) Biomed. khimiya, **62**(4), 426-430.]
- Ghosh A., Jana M., Modi K., Gonzalez F.J., Sims K.B., Berry-Kravis E., Pahan K. (2015) J. Biol. Chem., **290**(16), 10309-10324.
- Khan S.A., Sathyanarayan A., Mashek M.T., Ong K.T., Wollaston-Hayden E.E., Mashek D.G. (2015) Diabetes, **64**(2), 418-426.
- Shi Y., Li Y., Huang C., Ying L., Xue J., Wu H., Chen Z., Yang Z. (2016) Scientific Reports, **6**(1), 1-12.
- Islam H., Hood D.A., Gurd B.J. (2019) Appl. Physiol. Nutr. Metab., **44**, 1-55.
- Fernandez-Marcos P.J., Auwerx J. (2011) Am. J. Clin. Nutr., **93**, 884-890.
- Cattley R.C., DeLuca J., Elcombe C., Fenner-Crisp P., Lake B.G., Marsman D.S., Pastoor T., Popp J.A., Robinson D.E., Schwetz B., Tugwood J.D., Wahli W. (1998) Regulatory Toxicol. Pharmacol., **27**, 47-60.
- Lambe K.G., Woodyatt N.J., Macdonald N., Chevalier S., Roberts R.A. (1999) Toxicol. Letts., **110**(1-2), 119-127.
- Barbiero J.K., Santiago R.M., Persike D.S., da Silva Fernandes M.J., Tonin F.S., da Cunha C., Boschen S.L., Vital M.A.B.F. (2014) Behavioural Brain Res., **274**, 390-399.
- Sullivan E.L., Cameron J.L. (2010) Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., **298**(4), 1068-1074.
- Schönfeld P., Reiser G. (2016) Aging Disease, **7**(2), 136-149.
- Romano S., Mitro N., Giatti S., Diviccaro S., Pesaresi M., Spezzano R., Audano M., Garcia-Segura L.M., Caruso D., Melcangi R.C. (2018) J. Steroid Biochem. Mol. Biol., **178**, 108-116.
- Panov A., Orynbayeva Z., Vavilin V., Lyakhovich V. (2014) BioMed Res. Int., **2014**, 472459. DOI:10.1155/2014/472459.
- Inoue H., Xiao-Fan Jiang X.-F., Katayama T., Osada S., Umesono K., Namurab S. (2003) Neurosci. Letts., **352**(3), 203-206.
- Barbiero J.K., Santiago R., Tonin F.S., Boschen S., da Silva L.M., Werner M.F.P., da Cunha C., Lima M.M.S., Maria A.B.F., Vital M.A.B.F. (2014) Progr. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry, **53**, 35-44.
- Kreisler A., Duhamel A., Vanbesien-Mailliot C., Destée A., Bordet R. (2010) Behavioural Pharmacology, **21**, 194-205.
- Eaton S., Bartlett K., Quant P.A. (2001) Biochem. Biophys. Res. Commun., **285**(2), 537-539.
- Grygiel-Górniak B. (2014) Nutr. J., **13**(1), 1-10.
- Zhang Y., Uguccioni G., Ljubic V., Irrcher I., Iqbal S., Singh K., Ding S., Hood D.A. (2014) Physiological Reports, **2**(5), 1-12.
- Grandl G., Straub L., Rudigier C., Arnold M., Wueest S., Konrad D., Wolfrum C. (2018) J. Physiology, **596**(19), 4597-4609.
- Piantadosi C.A., Carraway M.S., Babiker A., Suliman H.B. (2008) Circulation Res., **103**(11), 1232-1240.
- Gureev A.P., Shaforostova E.A., Starkov A.A., Popov V.N. (2017) Toxicology, **382**, 67-74.

Поступила в редакцию: 28. 06. 2019.
После доработки: 23. 07. 2019.
Принята к печати: 25. 07. 2019.

THE FENOFIBRATE EFFECT ON GENOTOXICITY IN BRAIN AND LIVER
AND ON THE EXPRESSION OF GENES REGULATING FATTY ACIDS METABOLISM OF MICE

V.G. Khorolskaya^{1*}, A.P. Gureev¹, E.A. Shaforostova¹, D.A. Laver¹, V.N. Popov^{1,2}

¹Voronezh State University,

1 Universitetskaya sq., Voronezh, 394018 Russia; *e-mail: vik26648368@yandex.ru

²Voronezh State University of Engineering Technologies, 19 Revolutionary ave., Voronezh, 394036 Russia

Fibrates are well-known agonists of the PPAR family (peroxisome proliferator-activated receptors). This class of drugs is used for the treatment of dyslipidemia and atherosclerosis. Fenofibrate is one of the members of this class of synthetic PPAR α receptor ligands. The oral administration of 0.3% fenofibrate caused a decrease in strength due to loss of body weight in laboratory animals when improving behavioural features. Analysis of the mitochondrial DNA of liver cells showed a genotoxic effect of fenofibrate, due to accumulation of reactive oxygen species, which could be attributed to activation of peroxisomal β -oxidation processes, as well as to the lack of increase in the expression of genes encoding antioxidant defense proteins. Treatment with fenofibrate did not cause brain mtDNA damage. It has been shown that fenofibrate induced mitochondrial β -oxidation in the brain, as indicated by the increased expression of the *Acadm* and *Cpt1a* and *Ppargc1a* and *Ppara*. The study found no effect of fenofibrate on the increase of mitochondrial biogenesis in brain and liver cells. Thus, we can conclude that fenofibrate significantly affects lipid metabolism in the liver and brain, but in the liver it is associated with an increase of oxidative stress, resulting in mtDNA oxidative damage. However, fenofibrate-induced increase in the expression of *Ppargc1a* is not associated with an increase of mitochondrial biogenesis. This is consistent with the recent suggestion that PGC-1 α might not be a master regulator of mitochondrial biogenesis.

Key words: fenofibrate; liver; brain; genotoxicity; fatty acids; mitochondrial biogenesis

Funding. This study was supported by a grant from the Russian Foundation for Basic Research (19-44-360011 p_a) and a grant from the President of the Russian Federation for state support of young Russian scientists and for state support of leading scientific schools (agreement 14.Z57.18.3451-NSh).

Received: 28.06.2019, revised: 23.07.2019, accepted: 25.07.2019.