

©Коллектив авторов

## ВЛИЯНИЕ МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО И ЕГО МЕТАБОЛИТА — АЗУРА I — НА БИОЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ИЗОЛИРОВАННЫХ МИТОХОНДРИЙ МОЗГА МЫШЕЙ

А.П. Гуреев<sup>1,2\*</sup>, Н.А. Самойлова<sup>1</sup>, Д.В. Потанина<sup>1</sup>, В.Н. Попов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Воронежский государственный университет,  
394018, Воронеж, Университетская пл., 1; \*эл. почта: gureev@bio.vsu.ru

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

Метиленовый синий — фенотиазиновый краситель, который широко применяется в медицине и на данный момент проходит клинические испытания для лечения болезни Альцгеймера. Одним из факторов уникального терапевтического эффекта метиленового синего являются его окислительно-восстановительные свойства, которые позволяют ему принимать электроны от восстановительных эквивалентов в митохондриях и передавать на другие компоненты дыхательной цепи или молекулярный кислород, то есть осуществлять альтернативный транспорт электронов. Азур I — N-деметилованный метаболит метиленового синего — по ряду показателей потенциально более эффективное соединение, чем метиленовый синий, но его способность к альтернативному транспорту электронов ранее не была изучена. Мы показали, что азур I в изолированных митохондриях мозга мышей, в отличие от метиленового синего, не способен восстанавливать мембранный потенциал, который был ингибирован ротеноном и, следовательно, не способен осуществлять шунтирование I комплекса дыхательной цепи. Кроме того, добавление азура I не влияет на скорость дыхания митохондрий в отличие от метиленового синего, который увеличивает скорость не стимулированного ADP дыхания. При этом оба красителя вызывали увеличение продукции H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Таким образом, только метиленовый синий способен осуществлять альтернативный транспорт электронов, а его деметилированная форма — азур I — не производит шунтирование комплекса I, что несколько ограничивает его терапевтический потенциал как митохондриально-направленного препарата, но не ставит под сомнения его антидепрессантные свойства.

**Ключевые слова:** метиленовый синий; азур I; митохондрии; альтернативный транспорт электронов

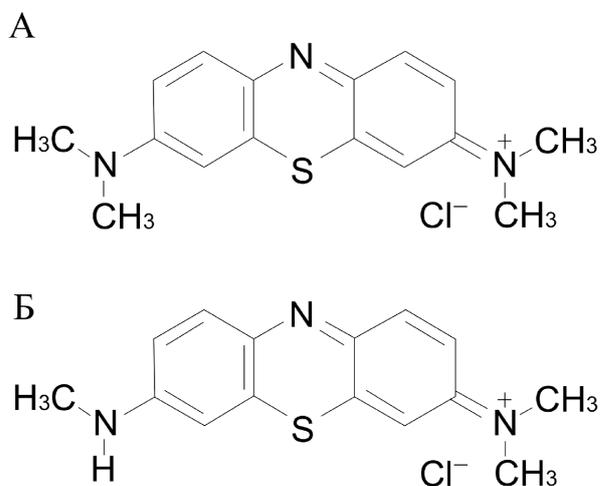
**DOI:** 10.18097/PBMC20216706485

### ВВЕДЕНИЕ

Митохондрии являются важнейшим центром, где сходятся не только метаболические, но и сигнальные пути, которые определяют выживание клетки или её смерть. Митохондрии являются основным источником энергии и местом производства большого количества активных форм кислорода (АФК). Для производства АТФ требуется высокий мембранный потенциал, при котором наблюдается максимальная продукция АФК [1]. Митохондрии животных имеют системы разобщения сопряженной дыхательной цепи, но они характерны не для всех тканей и менее эффективны, чем, например, альтернативные дыхательные пути растений [2]. Поэтому фармакологические подходы к разобщению электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) митохондрий — многообещающий способ лечения метаболических заболеваний.

2,4-динитрофенол был одним из первых подобных метаболических модуляторов, широко используемых в медицине, в частности, для лечения ожирения. Однако позже был выявлен широкий спектр побочных эффектов, что привело к его полному запрету в некоторых странах, например, в США и Великобритании [3]. В последнее десятилетие было сформулировано понятие “альтернативный транспорт электронов”, которое в какой-то степени тоже является способом разобщения сопряженного дыхания [4].

Метиленовый синий (рис. 1А), который относится к классу фенотиазинов, благодаря своим уникальным окислительно-восстановительным свойствам может принимать электроны от восстановительных эквивалентов (например, NADH или FADH<sub>2</sub>) и передавать их на другие компоненты дыхательной цепи (например, на комплекс III или цитохром c) или молекулярный кислород. Такой подход позволяет “обходить” поврежденные или ингибированные участки дыхательной цепи [4]. В отличие



**Рисунок 1.** Структурные формулы метиленового синего (А) и азура I (Б).

от 2,4-динитрофенола, метиленовый синий является безопасным соединением, для которого практически не показано никаких побочных эффектов. Он широко используется для лечения метгемоглобинемии, малярии, при отравлении цианидом. Фотодинамическая активность соединения позволяет использовать его при лечении онкологических заболеваний и в качестве противовирусного агента [5]. Есть данные, показывающие эффективность красителя против Covid-19 [6].

Но, тем не менее, описаны и единичные побочные эффекты метиленового синего. При лечении метгемоглобинемии у пациентов с недостаточностью глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы метиленовый синий приводит к резкому падению уровня NADPH и может стать причиной гемолиза [7], который также может происходить и у новорожденных при применении соединения [8]. Внутриамниотическое введение метиленового синего вызывает гемолитическую анемию [9] и повреждение печени [10]. В обзоре [11] описаны редкие случаи аллергической реакции на метиленовый синий при лапароскопии. В недавнем исследовании мы выявили, что в высоких концентрациях метиленовый синий (50 мг/кг/день 4 недели перорально) может вызывать изменения в составе микробиома кишечника, которые ассоциированы с развитием дисбактериоза [12].

Метиленовый синий активно изучается как потенциальный нейропротектор. На данный момент ведутся его клинические испытания в качестве возможного лекарственного средства для лечения болезни Альцгеймера [13]. Метиленовый синий ингибирует моноаминоксидазу, что делает его довольно сильным антидепрессантом [14]. Однако сравнительно недавно было показано, что N-деметилованный метаболит метиленового синего — азур I (рис. 1Б) — потенциально более сильный ингибитор моноаминоксидазы [14, 15]. Вероятно, именно это приводит к тому, что азур I в 14 раз лучше проникает в ткани [16]. За счёт того, что азур I метаболизируется лучше, чем метиленовый синий, его безопасность и эффективность по некоторым параметрам выше. Азур I более эффективен и при ингибировании провоспалительного цитокина — фактора некроза опухоли (TNF $\alpha$ , Tumor necrosis factor- $\alpha$ ) [17]. Есть данные о том, что азур I не менее эффективно, чем метиленовый синий, ингибирует каспазы [18] и подавляет экспрессию мутантных белков, которые ответственны за тау-агрегацию и развитие болезни Альцгеймера [19]. Было показано, что азур I можно использовать в качестве антидота при отравлении цианидом, при этом даже в более низких концентрациях, чем метиленовый синий. Концентрация азура I 4 мг/кг по терапевтическому эффекту соответствует концентрации 20 мг/кг метиленового синего [20].

Таким образом, по некоторым параметрам азур I эффективнее, чем метиленовый синий, но, несмотря на это, изучен значительно хуже. Нет данных о том, способен ли азур I подобно метиленовому синему осуществлять альтернативный транспорт электронов в ЭТЦ митохондрий. Потенциально, использование

азура I в более низких дозах позволило бы решить проблему побочных эффектов, свойственных высоким концентрациям метиленового синего.

Цель данной работы — изучить влияние азура I в сравнении с метиленовым синим на биоэнергетические свойства изолированных митохондрий, оценить его влияние на скорость дыхания митохондрий, мембранный потенциал и скорость продукции АФК. Понимание биоэнергетических свойств азура I на уровне интактных митохондрий поможет оценить его терапевтический потенциал для лечения различных патологий, в основе которых лежат митохондриальные дисфункции.

## МЕТОДИКА

### *Объект исследования*

В эксперименте использовали 8 самцов мышей линии C57BL/6. Животных содержали в стандартных условиях вивария при температуре 25°C и влажности воздуха не менее 40%. Мыши получали стандартную лабораторную диету и питьевую воду *ad libitum*. Умерщвление животных проводили путём быстрой дислокации шейных позвонков с последующей декапитацией без использования наркотизирующих средств, так как использование анестетиков может вызывать изменение биоэнергетических характеристик митохондрий, в частности, разобщение окислительного фосфорилирования [21]. Измерения всех биоэнергетических параметров митохондрий производили не менее чем в шести технических повторах.

### *Выделение митохондрий*

После декапитации у мышей извлекали головной мозг, который гомогенизировали с помощью гомогенизатора KIMBLE Dounce tissue grinder (“Sigma-Aldrich”, США) в буфере А, состоящем из 225 мМ маннита (“Sigma-Aldrich”), 75 мМ сахарозы (“Диаэм”, Россия), 5 мМ Hepes (“BioClot”, Германия), 1 мМ этиленгликольтетрауксусной кислоты (EGTA) (“Sigma-Aldrich”), pH 7,4 с добавлением 2 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (БСА) (“Диаэм”), свободного от жирных кислот. Промывочный буфер (буфер Б), используемый на этапе центрифугирования, имел такой же состав, за исключением добавления БСА. Полученный гомогенат центрифугировали с помощью центрифуги Z 36 НК (“Hermle Labortechnik”, Германия) в течение 5 мин при 900 g. Супернатант перенесли в чистые пробирки и центрифугировали в течение 10 мин при 14000 g. После супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в 100 мкл буфера Б, добавляли дигитонин (“Sigma-Aldrich”) (конечная концентрация 0,02%) и инкубировали во льду 2 мин. Пробирки центрифугировали в течение 15 мин при 14000 g. Супернатант снова удаляли, осадок ресуспендировали в 100 мкл буфера Б, а затем центрифугировали в течение 10 мин при 14000 g. Последний этап повторяли дважды. Полученный в конечном итоге осадок ресуспендировали в 20 мкл буфера Б [22].

*Измерение биоэнергетических параметров*

Все последующие эксперименты проводились в буфере А, состав которого был описан выше, и включали не менее шести независимых измерений. Скорость митохондриального дыхания измеряли с помощью респирометрической системы высокого разрешения Oxygraph (“Hansatech Instruments”, Великобритания) и закрытого электрода Кларка по уменьшению концентрации кислорода в среде измерения. В среду 1 мл буфера А добавляли субстрат — 5 мМ пируват + 5 мМ малат (“Sigma-Aldrich”), 4 мМ фосфат ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) и 10 мкл суспензии митохондрий (концентрация 100 мкг/мл). Дыхание митохондрий стимулировали добавлением 200 нМ ADP (“Sigma-Aldrich”). Изменение интенсивности дыхания регистрировали после добавления 1 мкМ метиленового синего (“Sigma-Aldrich”) и 1 мкМ азур I (“Интерхим”, Россия) в разных измерениях независимо друг от друга.

Измерения мембранного потенциала осуществляли с использованием флуоресцентного спектрофотометра Hitachi F-7000 (“Hitachi High Technologies”, Япония). Величину трансмембранного потенциала измеряли по интенсивности флуоресценции катионного липофильного зонда сафранина О (“Sigma-Aldrich”). Длина волны возбуждения составляла 495 нм, а излучения — 586 нм. В 1 мл буфера А добавляли субстрат — 5 мМ пируват + 5 мМ малат, 4 мМ фосфат ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), 1 мкМ сафранин О и 10 мкл суспензии митохондрий (концентрация 100 мкг/мл). Для ингибирования мембранного потенциала добавляли 1 мкМ ротенона (“Sigma-Aldrich”). Восстановление мембранного потенциала стимулировали добавлением 1 мкМ метиленового синего и 1 мкМ азур I в разных измерениях независимо друг от друга.

Скорость продукции  $\text{H}_2\text{O}_2$  в митохондриях измеряли с помощью флуоресцентного маркера Amplex Ultra Red (“Invitrogen”, США). Длина волны возбуждения составляла 530 нм, длина волны излучения — 590 нм. В 1 мл буфера А добавляли субстрат — 5 мМ пируват + 5 мМ малат, 4 мМ фосфат ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), 1 ед. Amplex Ultra Red, 4 ед. пероксидазы хрена (“Amresco”, США) и 10 мкл суспензии митохондрий (концентрация 100 мкг/мл). Изменения скорости продукции  $\text{H}_2\text{O}_2$  регистрировали после добавления 1 мкМ метиленового синего и 1 мкМ азур I в разных измерениях независимо друг от друга. Концентрацию  $\text{H}_2\text{O}_2$  измеряли как интенсивность флуоресценции резорурфина, образующегося во время реакции при окислении Amplex Ultra Red.

Концентрацию белка измеряли с помощью набора Pierce™ BCA Protein Assay Kit (“ThermoFisher Scientific”, США).

*Статистическая обработка*

Статистический анализ был выполнен с использованием программного обеспечения STATISTICA 10. Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  ошибка средней. Проверку нормальности распределения осуществляли с помощью теста Шапиро-Вилка (W-тест). Оценку

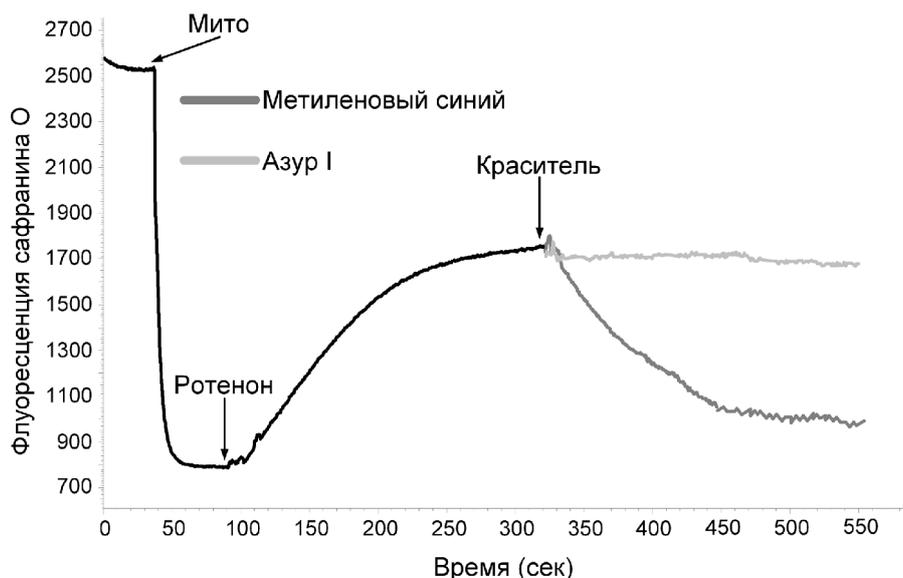
различий между группами производили с помощью теста Манна-Уитни (U-тест). В работе обсуждаются только статистически достоверные различия при значении  $p < 0,05$ .

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ***Мембранный потенциал митохондрий*

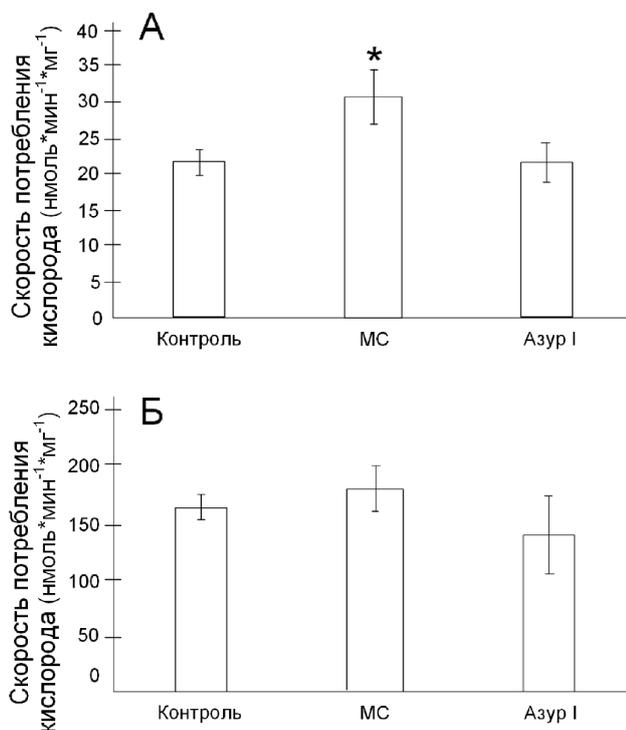
Метиленовый синий обладает широким спектром функций внутри клетки, среди которых одной из наиболее обсуждаемых является альтернативный транспорт электронов в ЭТЦ митохондрии. Ранее неоднократно было показано, что метиленовый синий шунтирует движение электронов при заблокированном I комплексе [4, 23]. Ротенон — классический ингибитор I комплекса, который подавляет движение электронов в непосредственной близости от сайта связывания убихинона [24]. Как видно на рисунке 2, это способствует подавлению мембранного потенциала, что выражается в увеличении уровня флуоресценции сафранина О. Последующее добавление 1 мкМ метиленового синего приводит к частичному восстановлению мембранного потенциала, о чём свидетельствует падение уровня флуоресценции сафранина О (рис. 2). Добавление 1 мкМ азур I не вызывало изменений флуоресценции сафранина О, следовательно, не происходило восстановления мембранного потенциала, который был ингибирован ротеноном (рис. 2). Таким образом, азур I, в отличие от метиленового синего, не способен осуществлять шунтирование компонентов ЭТЦ митохондрий как минимум I комплекса.

*Дыхание изолированных митохондрий*

Скорость дыхания митохондрий при использовании NADH-зависимых субстратов без добавления ADP составляла  $21,59 \pm 1,81$  нмоль  $\text{O}_2$  мин $^{-1}$ мг $^{-1}$  белка. Добавление 1 мкМ метиленового синего стимулировало увеличение скорости дыхания до  $30,67 \pm 3,77$  нмоль  $\text{O}_2$  мин $^{-1}$ мг $^{-1}$  белка ( $p < 0,05$ ) (рис. 3А). Эти данные соответствуют результатам, которые показали, что метиленовый синий увеличивает скорость дыхания, не стимулируемого ADP, при использовании сукцината в качестве субстрата дыхания изолированных митохондрий из печени крыс [25]. При этом метиленовый синий не влиял на скорость дыхания при стимулировании ADP, что позволило авторам сделать вывод о том, что метиленовый синий способен разобщать сопряжённое окислительное фосфорилирование [25]. Мы показали, что добавление метиленового синего к митохондриям в присутствии ADP не влияло на скорость дыхания ( $165,39 \pm 11,07$  нмоль  $\text{O}_2$  мин $^{-1}$ мг $^{-1}$  белка у контроля и  $182,57 \pm 19,83$  нмоль  $\text{O}_2$  мин $^{-1}$ мг $^{-1}$  белка в митохондриях после добавления метиленового синего) (рис. 3Б). Похожие данные (увеличение скорости дыхания без добавления ADP и отсутствие стимулирования дыхания в митохондриях при добавлении ADP) были получены [23] при использовании в качестве субстрата для дыхания сукцината,  $\alpha$ -глицерофосфата и комбинации малат+глутамат.

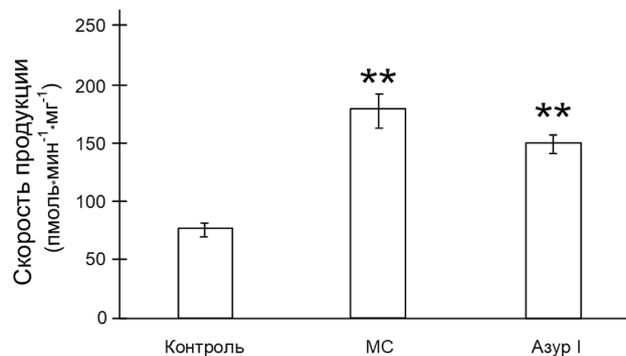


**Рисунок 2.** Изменение мембранного потенциала интактных митохондрий мозга мыши после добавления ротенона, метиленового синего (тёмно-серая линия) или азура I (светло-серая линия). Мито — добавление суспензии митохондрий.



**Рисунок 3.** Влияние метиленового синего (МС) и азура I на скорость дыхания интактных митохондрий мозга мыши. Различия статистически достоверны, \* —  $p < 0,05$ . А. Не стимулированное ADP дыхание митохондрий. Б. Стимулированное ADP дыхание митохондрий.

Мы показали, что добавление 1 мкМ азура I не влияло на скорость, как не стимулированного ADP дыхания митохондрий ( $21,58 \pm 2,74$  нмоль  $O_2$  мин<sup>-1</sup> мг<sup>-1</sup> белка) (рис. 3А), так и на скорость стимулированного ADP дыхания митохондрий, составившую  $140,23 \pm 35,99$  нмоль  $O_2$  мин<sup>-1</sup> мг<sup>-1</sup> белка (рис. 3Б). Таким образом, азур I не проявляет свойства разобщителя окислительного фосфорилирования.



**Рисунок 4.** Влияние метиленового синего (МС) и азура I на скорость продукции  $H_2O_2$  в интактных митохондриях мозга мыши. Различия статистически достоверны, \*\* —  $p < 0,01$ .

*Скорость продукции  $H_2O_2$  в изолированных митохондриях*

Скорость продукции  $H_2O_2$  в изолированных митохондриях составляла  $45,39 \pm 5,95$  пмоль  $H_2O_2$  мин<sup>-1</sup> мг<sup>-1</sup>. Добавление 1 мкМ метиленового синего увеличивало более чем в три раза скорость продукции  $H_2O_2$  ( $177,6 \pm 14,99$  пмоль  $H_2O_2$  мин<sup>-1</sup> мг<sup>-1</sup>;  $p < 0,01$ ). Добавление 1 мкМ азура I также стимулировало продукцию  $H_2O_2$  в изолированных митохондриях ( $150,23 \pm 7,34$  пмоль  $H_2O_2$  мин<sup>-1</sup> мг<sup>-1</sup>,  $p < 0,01$ ) (рис. 4). Таким образом, с одной стороны, данные говорят о том, что азур I продуцирует на 15% меньше  $H_2O_2$ . Однако, если рассчитать долю образовавшегося  $H_2O_2$  от израсходованного  $O_2$ , то результаты будут противоположными. Митохондрии без добавления фенотиразиновых веществ производят 0,21%  $H_2O_2$ . Добавление метиленового синего приводит к тому, что доля  $H_2O_2$  составляет 0,58%, в то время как добавление азура I увеличивает эту долю до 0,7%. Эти данные частично коррелируют со значениями LD<sub>50</sub>.

Значение LD<sub>50</sub> для азур I при внутривенном введении мышам составляет 65 мг/кг [26], что немного ниже, чем для метиленового синего (77 мг/кг) [27].

Однако эти результаты не могут свидетельствовать о том, что азур I потенциально может быть более токсичным для организма. Есть данные, которые показывают, что азур I в 14 раз лучше проникает в ткани [16], а концентрация азур I 4 мг/кг по терапевтическому эффекту соответствует концентрации 20 мг/кг метиленового синего [20].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, и метиленовый синий, и азур I могут увеличивать скорость продукции H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in vitro* в изолированных митохондриях. Это не вполне согласуется с положением о том, что они могут являться мягкими разобщителями, так как увеличение скорости продукции H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> невозможно при высоком значении мембранного потенциала [1]. Мы можем сделать предположение, что альтернативный транспорт электронов является формой несопряжённого дыхания, но оно не связано со снижением производства АФК. При этом только метиленовый синий способен осуществлять альтернативный транспорт электронов, что проявляется в шунтировании компонентов ЭТЦ. Азур I — деметилированная форма метиленового синего — не производит шунтирование комплекса I, что несколько ограничивает его функционал как митохондриально-направленного препарата, но не ставит под сомнение его терапевтический потенциал как мощного ингибитора моноаминоксидазы, воспалительных и апоптотических процессов.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке стипендии Президента Российской Федерации молодым учёным и аспирантам (Проект СП-2802.2021.4), гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских учёных и по государственной поддержке ведущих научных школ (НШ-2535.2020.11) и гранта РФФИ (19-44-360011 p\_a).

## 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. Korshunov S.S., Skulachev V.P., Starkov A.A. (1997) FEBS Lett., **416**(1), 15-18.
2. Ricquier D. (2011) Front. Endocrinol., **2**, 85. DOI: 10.3389/fendo.2011.00085
3. Grundlingh J., Dargan P., El-Zanfaly M., Wood D.M. (2011) J. Med. Toxicol., **7**(3), 205-212.
4. 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) J. Biol. Chem., **286**(18), 16504-16515.
5. Schirmer R.H., Adler H., Pickhardt M., Mandelkow E. (2011) Neurobiol. Aging, **32**(12), 2325.e7-2325.e16. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2010.12.012
6. Hamidi-Alamdari D., Hafizi-Lofabadi S., Bagheri-Moghaddam A., Safari H., Mozdourian M., Javidarabshahi Z., Peivandi-Yazdi A., Ali-Zeraati A., Sedaghat A., Poursadegh F., Barazandeh-Ahmadabadi F., Agheli-Rad M., Tavousi S.M., Vojouhi S., Amini S., Amini M., Majid-Hosseini S., Tavanaee-Sani A., Ghiabi A., Nabavi-Mahalli S., Morovaidar N., Rajabi O., Koliakos G. (2021) Rev. Invest. Clin., **73**(3), 190-198.
7. Scolding N.J., Pasquini M., Reingold S.C., Cohen J.A. (2017) Brain, **140**(11), 2776-2796.
8. Cragan J.D. (1999) Teratology, **60**(11), 42-48.
9. Sills M.R., Zinkham W.H. (1994) Arch. Pediatr. Adolesc. Med., **148**(3), 306-310.
10. McFadyen I. (1992) BJOG: Int. J. Obstet. Gynaecol., **99**, 89-95.
11. Akazawa M., Igarashi A., Ebata N., Murata T., Zeniya S., Haga Y., Nozawa K., Fujii K., Taguchi T. (2019) J. Pain Res., **12**, 2785-2797.
12. Gureev A.P., Syromyatnikov M.Y., Ignatyeva D.A., Valuyskikh V.V., Solodskikh S.A., Panevina A.V., Gryaznova M.V., Kokina A.V., Popov V.N. (2020) PLoS One, **15**(11), e0241784. DOI: 10.1371/journal.pone.0241784
13. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03446001.
14. Delpont D., Schoeman R., van der Merwe N., van der Merwe L., Fisher L.R., Geiger D., Kotze M.J. (2014) Metab. Brain Dis., **29**(2), 377-384.
15. Petzer A., Harvey B.H., Wegener G., Petzer J.P. (2012) Toxicol. Appl. Pharmacol., **258**(3), 403-409.
16. Warth A., Goepfert B., Bopp C., Schirmacher P., Flechtenmacher C., Burhenne J. (2009) Virchows Arch., **454**(3), 341-344.
17. Culo F., Sabolović D., Somogyi L., Marusić M., Berbiguier N., Galey L. (1991) Agents Actions, **34**, 424-428.
18. Pakavathkumar P., Sharma G., Kaushal V., Foveau B., LeBlanc A.C. (2015) Sci. Rep., **5**, 13730. DOI: 10.1038/srep13730
19. Biberoglu K., Yuksel M., Tacal O. (2019) Chem. Biol. Interact., **299**, 88-93.
20. Haouzi P., McCann M., Tubbs N. (2020) Toxicol. Rep., **7**, 1459-1464.
21. Rottenberg H. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci., **80**(11), 3313-3317.
22. Gureev A.P., Shaforostova E.A., Popov V.N., Starkov A.A. (2019) FEBS Lett., **593**(5), 499-503.
23. Tretter L., Horvath G., Hölgyesi A., Essek F., Adam-Vizi V. (2014) Free Radic. Biol. Med., **77**, 317-330.
24. Андреев А.Ю., Кушнарева Ю.Е., Старков А.А. (2005) Биохимия, **70**(2), 246-264. [Andreev A.Yu., Kushnareva Yu.E., Starkov A.A. (2005) Biochemistry (Moscow), **70**(2), 246-264.]

25. Visarius T.M., Stucki J.W., Lauterburg B.H. (1997) FEBS Lett., 412(1), 157-160.  
26. Luty G.A. (1978) Toxicol. Appl. Pharmacol., 44(2), 225-249.  
27. Necina J., Jakubovic A., Mikulaskova J. (1963) Cesk. Farm., 12, 94-101.

Поступила в редакцию: 05. 06. 2021.  
После доработки: 19. 10. 2021.  
Принята к печати: 20. 10. 2021.

EFFECT OF METHYLENE BLUE AND ITS METABOLITE — AZURE I —  
ON BIOENERGETIC PARAMETERS OF INTACT MICE BRAIN MITOCHONDRIA

A.P. Gureev<sup>1,2\*</sup>, N.A. Samoylova<sup>1</sup>, D.V. Potanina<sup>1</sup>, V.N. Popov<sup>1,2</sup>

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

Methylene blue is a phenothiazine dye that is widely used in medicine and clinical trials for the treatment of Alzheimer's disease. One of the factors of the unique therapeutic effect of methylene blue is its redox properties, allowing implementation of alternative electron transport — the dye accepts electrons from reducing equivalents in the mitochondria and transfer it them to other components of the respiratory chain or molecular oxygen. Azure I, an N-dimethylated metabolite of methylene blue, is potentially a more effective compound than methylene blue, but its ability for alternative electron transport has not been studied. We have shown that azure I, unlike methylene blue, is unable to restore the membrane potential in isolated mouse brain mitochondria, inhibited by rotenone and, therefore, is unable to perform bypass of the respiratory chain Complex I. Moreover, the addition of azure I does not affect the rate of mitochondrial respiration in contrast to methylene blue, which increases the rate of non-phosphorylation respiration. At the same time, both dyes stimulate an increase in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production. As a consequence, only methylene blue is capable of alternative electron transport, while azure I does not produce complex I bypass. This limits its therapeutic application only as a mitochondrial-targeted drug, but not as a substance with a potentially powerful antidepressant effect.

**Key words:** methylene blue; azure I; mitochondria; alternative electron transport

**Funding.** This work was supported by a scholarship of the President of the Russian Federation for young scientists and PhD students (Project SP-2802.2021.4), by the President grant for support of leading scientific school (Agreement NSh 2535.2020.11), and a grant from the Russian Foundation for Basic Research (19-44-360011 r\_a).

Received: 05.06.2021, revised: 19.10.2021, accepted: 20.10.2021.