

УДК 57.03:53.05:615.272.03

КАРНИТИНАТ 2-ЭТИЛ-6-МЕТИЛ-3-ГИДРОКСИПИРИДИН — АДАПТОГЕН ШИРОКОГО СПЕКТРА ДЕЙСТВИЯ, СТИМУЛИРУЮЩИЙ АУТОФАГИЮ В ТКАНИ ПЕЧЕНИ

© 2025 г. Е. М. Миль¹, И. В. Жигачева^{1,*}, М. А. Коровин¹, В. В. Кувыркова¹, Л. И. Матиенко¹, А. А. Албантова^{1,**}, А. Н. Голощапов¹, М. М. Расулов²

¹Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва, 119334, Россия

²Государственный научно-исследовательский институт химии и технологии элементоорганических соединений, Москва, 105118, Россия

*E-mail: elenamil2004@mail.ru

**E-mail: albantovaaa@mail.ru

Поступила в редакцию 10.03.2025

После доработки 05.04.2025

Принята к публикации 09.04.2025

Обоснование и цель. В условиях стресса митохондрии становятся источником избыточной генерации активных форм кислорода (АФК), которые могут служить либо в качестве сигнальных молекул, либо повреждать структуры клетки. Антиоксиданты, снижая генерацию АФК, могут быть адаптогенами к стрессовым воздействиям. Показано, что ряд антиоксидантов способен вызывать аутофагию, которая может активировать систему антиоксидант-респонсивного элемента. В связи с этим цель исследования — изучить антистрессовые свойства нового антиоксиданта карнитинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина (КП) и его способности активировать синтез белков аутофагии Beclin-1 и LC3. **Материал и методика.** Исследовали спектрофлуоресцентным методом влияние острой гипобарической гипоксии и КП на интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) в липидной фракции мембран митохондрий печени мышей. Белки аутофагии определяли методом Вестерн-блоттинга. **Результаты.** Введение мышам 10^{-6} моль/кг КП в течение 5 сут предупреждало рост интенсивности ПОЛ в условиях острой гипобарической гипоксии. КП увеличивал продолжительность жизни и повышал выживаемость мышей в условиях различных видов гипоксии. Показана инициация препаратом белков-биомаркеров аутофагии (LC3B). При этом содержание белков Beclin-1 имело тенденцию к повышению, что характеризует начало процесса аутофагии. **Выводы.** Новый антиоксидант КП, вероятно, может быть использован в качестве адаптогена к различным видам гипоксии и активатора аутофагии.

Ключевые слова: антиоксиданты, карнитинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина, гипоксия, аутофагия, Beclin-1, LC3B

Принятые сокращения: АФК — активные формы кислорода; КП — карнитинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина; ОГГ — острая гипобарическая гипоксия; ПОЛ — перекисное окисление липидов.

DOI: 10.31857/S0041377125020029, EDN: FVHZTF

Программируемая гибель клеток — важнейший физиологический механизм функционирования отдельных клеток, их популяций и организма в целом. К наиболее распространенным видам программируемой клеточной гибели и репарации относятся апоптоз и аутофагия. В настоящее время особый интерес у исследователей вызывает процесс аутофагии, способствующий не только гибели поврежденных клеток, но и их сохранению за счет отторжения старых или поврежденных компонентов путем образования аутофагосом с последующим выведением ненужных компонентов из клетки. Наряду с классическим апоптозом

аутофагия имеет особое значение при развитии различных патологических процессов (онкологических, аутоиммунных и нейродегенеративных). Исследование сигнальных механизмов открывает новые перспективы в предотвращении и лечении целого ряда серьезных заболеваний (Ковалева, 2014; Калугина, 2021).

Основным стимулом к усилению процессов аутофагии может служить нехватка питательных веществ, голодание, наличие в цитоплазме поврежденных органелл, частично денатурировавших белков и их агрегатов. Кроме голодания аутофагия может быть индуцирована окислительным или

токсическим стрессом, а также введением препаратов, таких как рапамицин, интерферон γ , витамин D и других. Известно, что нарушения аутофагии играют роль в развитии новообразований, кардиомиопатии, мышечных и нейродегенеративных заболеваний (Levine, Klionsky, 2004; Калугина, 2021).

Существуют морфологические признаки, характеризующие аутофагию: формирование вакуолей (аутофагосом), уменьшение митохондрий и площади эндоплазматического ретикулаума, увеличение аппарата Гольджи. В некоторых случаях идет интенсивный эндоцитоз. На поздних стадиях аутофагии количество аутофагосом увеличивается, многие из них содержат включения липидов, при этом ядро может конденсироваться (Okada, Mak, 2004; Фрейдлин и др., 2019). Наиболее исследованными белками аутофагии являются такие белки, как Beclin-1 и белки семейства LC3. Белок Beclin-1 регулирует образование и созревание аутофагосом посредством взаимодействия с другими комплексами белков в составе комплекса Р1ЗК класса III при аутофагии.

В связи с тем, что ряд антиоксидантов может вызывать аутофагию (Koukourakis et al., 2015; Меньшикова и др., 2018), цель настоящей работы заключалась в изучении возможности активации аутофагии антиоксидантом карнитинатом 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина (КП). Как производное 3-гидроксипиридинол КП обладает антирадикальными свойствами: он, как и другие 3-гидроксипиридинолы, активно взаимодействует с гидроксильными радикалами и первичными свободными радикалами белков. Более того, показано, что он может ингибировать ферментативное и неферментативное перекисное окисление липидов (ПОЛ), а также влиять на активность антиоксидантных ферментов (Дюмаев и др., 1995).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Препарат КП. Структурная формула препарата, который представляет собой комплекс алкилпроизводного 3-гидроксипиридина и L-карнитина, показана на рис. 1. Препарат синтезировали в ФИЦ химической физики РАН (патент: Русина и др., 2024).

Животные и эксперименты с ними. В работе использовали мышей линии Balb/c весом 20–25 г и белых беспородных мышей (питомник «Столбо-

вая») возрастом 3 мес. Для определения антистрессовых свойств КП мышам линии Balb/c в течение 5 сут внутрибрюшинно вводили препарат в дозе 10^{-6} моль/кг (группа КП). Через 45 мин после последнего введения препарата давали стрессовое воздействия (гипоксия, плавание). Исследования проводили на модели острой гипобарической гипоксии (ОГГ), которая достигалась помещением на 5 мин мышей в стеклянную барокамеру в атмосферу низкого давления (270 мм рт. ст.), которое соответствовало высоте 9 тыс. м над уровнем моря (Zhigacheva et al., 2023b).

Динамическую работоспособность мышей определяли в тесте принудительного плавания с грузом 2 % от массы тела в воде температурой 10 °С до утомления животных (Каркищенко и др., 2016).

Способность КП активировать аутофагию оценивали на белых беспородных мышах. Мышей делили на 3 группы: 1-я — контроль; 2-я — мыши, которым в течение 3 сут внутрибрюшинно вводили КП в дозе 10^{-5} моль/кг (группа КП); 3-я — группа сравнения — мыши, подвергшиеся двухсуточному голоданию (группа «Голод»).

Известно, что голодание вызывает активацию аутофагии. На третьи сутки мышей группы КП забивали, после чего извлекали их печень для получения гомогената. Его получали в стеклянном ручном гомогенизаторе. Среда гомогенизации: 0.25 М сахарозы, 10 мМ HEPES pH 7.4. Соотношение сырой ткани (г) и среды (мл) составляло 1:5. Затем гомогенат центрифугировали в течение 5 мин при 8 тыс. g в центрифуге Multi Centrifuge CM 6M (ELMI, Латвия), супернатант использовали для гель-электрофореза. Электрофорез проводили в 10 %-ном ПААГ с последующим полусухим переносом на нитроцеллюлозную мембрану.

Выделение митохондрий печени проводили методом дифференциального центрифугирования

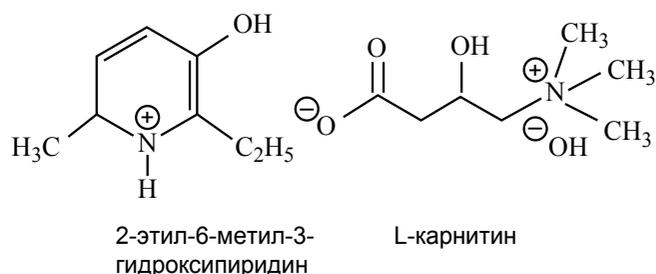


Рис. 1. Структурная формула антиоксиданта карнитината 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина (КП).

(Mokhova et al., 1977). Первое центрифугирование при 600 g в течение 10 мин, второе — при 9000 g 10 мин. Осадок ресуспендировали в среде выделения (0.25 M сахараза, 10 mM HEPES pH 7.4; объемное соотношение ткань/среда — 1:0.25. Количество митохондрий определяли по объему и белку, который оценивали по биуретовой реакции. В пробы добавляли митохондрии, соответствующие 2—3 мг белка, расчеты проводили на 1 мг белка.

Старение митохондрий осуществляли инкубированием органелл в течение 20—25 мин в среде, содержащей 65 mM KCl, 10 mM HEPES и 1 mM KH_2PO_4 pH 7.4 при комнатной температуре.

Интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий. Использовали известный метод (Fletcher et al., 1973) регистрации флуоресценции оснований Шиффа, которые образуются при взаимодействии продуктов ПОЛ — малонового диальдегида и 4-гидрокси-2,3-ноненаля с аминокетонами белков. Липиды экстрагировали смесью хлороформа и метанола (2:1 по объему) из митохондрий, содержащих 3—5 мг белка, соотношение смеси хлороформ/метанол с митохондриями составляло 1:10 (v:v). Интенсивность флуоресценции регистрировали в десяти миллиметровых кварцевых кюветках на спектрофлуориметре FluoroMax-HoribaYvonGmbH (Германия). Длина волны возбуждения флуоресценции была 360 нм, испускания — 420—470 нм. Результаты выражали в усл. ед., пересчитанных на 1 мг белка.

Оценка влияния КП на активацию аутофагии в ткани печени. Наличие биомаркеров аутофагии в гомогенате печени исследовали с помощью первичных мышечных антител белков Beclin-1 и LC3B (TransGenBiotech, Китай), а также вторичных антител козы к IgG мыши, меченных пероксидазой хрена (HS201-01; ProteinFind® GoatAnti-MouseIgG (H+L), TransGenBiotech, Китай). После переноса с геля на нитроцеллюлозную мембрану полосы белков окрашивали DAB для детекции пероксидазы (Biotium, США). Мембрану сканировали и определяли интенсивность полос с помощью программы BMP scale (BMP Image Editor download/Sourceforge.net; <http://aourceforge.net/projects/bmpeditor>).

Статистическая обработка. Определяли средние арифметические значения полученных данных и их стандартные ошибки. Достоверность различий между вариантами оценивали при уровне значимости $P \leq 0.05$. Результаты обрабатывали с помощью пакета программ Microsoft Excel и SigmaPlot 10.

Использованные реактивы: метанол, хлороформ, карбонат калия (Merck, Германия), сахараза, Трис, (Sigma, США), HEPES (MP Biomedicals, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Одним из методов анализа процесса аутофагии является применение антител, специфичных к белкам LC3 и Beclin-1. LC3 является единственным белком, присутствующим как на внутренней, так и на внешней мембранах аутофагосом. Обычно при Вестерн-блотинге LC3 (семейство белков) обнаруживается в виде одной или нескольких полос LC3 — А, В, С и т. д. и 1, 2, 3 и т. д. Ранее было показано, что аутофагосомные белки LC3A, LC3B и LC3C обладают разным субклеточным распределением и уровнем экспрессии в линиях раковых клеток (Кукес и др., 2020).

На рис. 2а, б приведены данные по определению содержания белков LC3B и Beclin-1 в клетках печени мышей. Показаны данные Вестерн-блот-анализа с помощью антител к этим белкам, а также соответствующие денситограммы для оценки их содержания в клетках печени.

В результате выявлен высокий активирующий эффект КП на инициацию биомаркера аутофагии LC3B у мышей. При этом в группе «Голод» видна одна четкая полоса, принадлежащая белку LC3B, а в группе КП на окрашенной мембране в ряде экспериментов обнаружено более одной полосы или несколько полос белков семейства LC3 (1, 2, 3), что может быть связано с существованием нескольких паттернов этого белка.

Кроме того, при голодании и введении препарата КП клетки печени могли находиться на разных стадиях процесса аутофагии. Механизм, по которому этот антиоксидант вызывает аутофагию, еще предстоит изучить, однако пока известно только, что на стадии инициации цитоплазматическая форма LC3A (18—16 кДа) подвергается химическому превращению с присоединением фосфатидилэтаноламина, что приводит к образованию активной формы LC3B (16—14 кДа), что и видно на Вестерн-блотах в виде разных полос.

Определение содержания белка Beclin-1, который регулирует образование и созревание аутофагосом, проводили тоже с помощью Вестерн-блотинга. На рис. 2б приведены данные о влиянии КП и голодания на инициацию белка Beclin-1 в печени мышей. После трехдневного введения

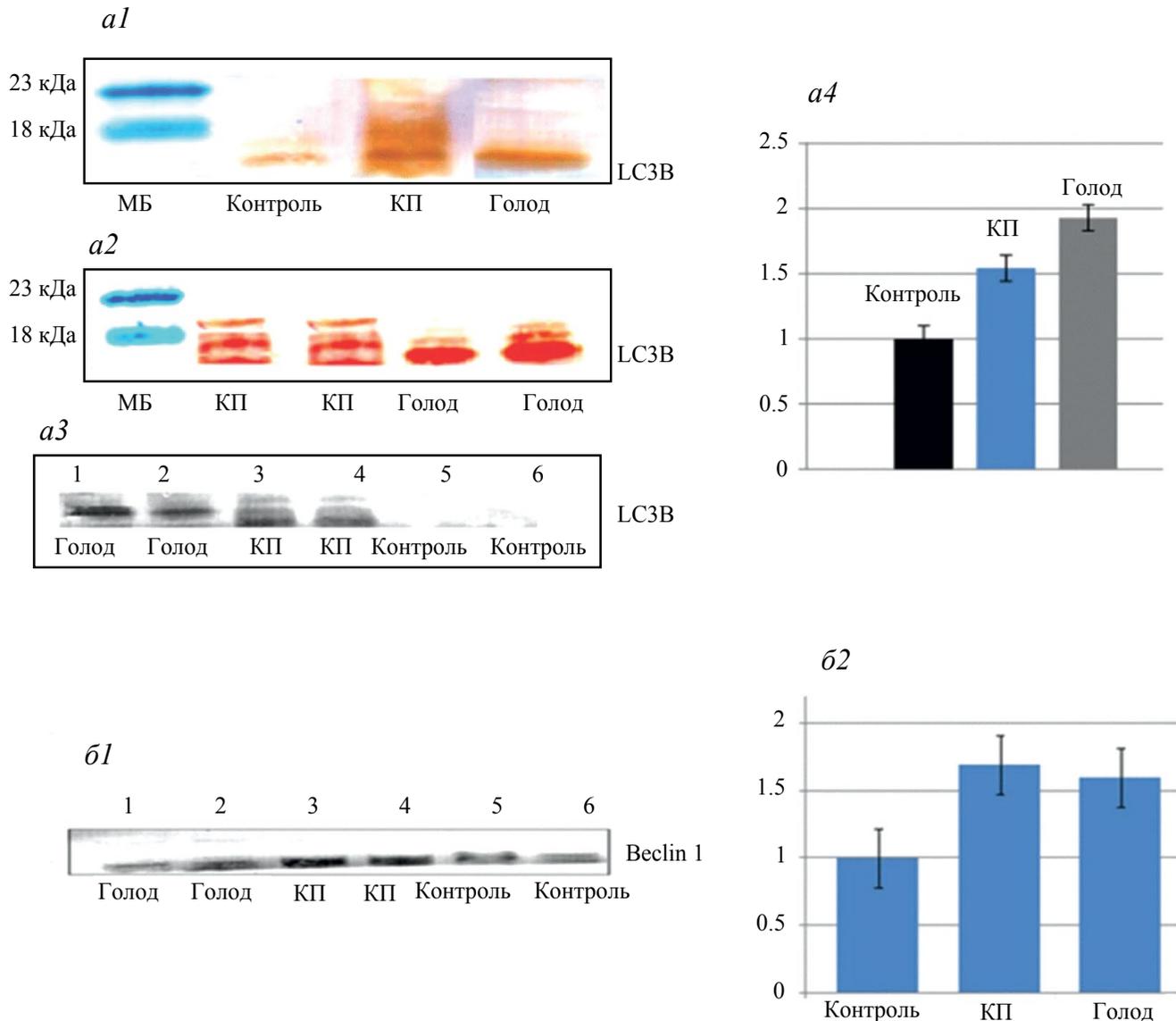


Рис. 2. Влияние предполагаемого инициатора аутофагии (препарата КП, 10^{-5} моль/кг и голода) на содержание белков LC3B (*a1–a4*) и Beclin1 (*b1, b2*) в клетках печени мышей. Представлены результаты Вестерн-блот-анализа (*a1–a3, b1*) и соответствующие им денситограммы (*a4, b2*). Электрофорез проводили в 10%-ном ПААГ с использованием соответствующих антител для выявления полос белков; окраска ДАВ. Обозначения: контроль — интактные сытые мыши, голод — мыши после 2-суточного голодания, КП — мыши после ежедневного введения КП в течение 3 сут; МБ — маркерные белки. Повторные эксперименты по введению КП мышам (контроль и голод) проводили с интервалом в 1 мес. На гистограммах показаны средние значения плотности полос белков LC3B и Beclin-1. *a1* — Полосы LC3B во всех трех вариантах; *a2* — проявляются паттерны белка LC3B при введении КП; LC3A соответствует мол. массе 16 КДа, а LC3B — 14 КДа. *a3* — Плотность полос LC3B при введении КП близка к плотности полос при 2-суточном голодании.

препарата наблюдается тенденция к возрастанию интенсивности полосы белка Beclin-1. Таким образом, в работе показана возможность стимулирования процесса аутофагии в клетках печени при трехдневном введении мышам 10^{-5} моль/кг КП.

Поскольку аутофагия при окислительном стрессе способствует удалению из клеток потен-

циально опасных источников АФК (поврежденных митохондрий) (Зенков и др., 2019), а КП как антиоксидант, возможно, синергически усиливает процессы детоксикации в клетке, мы исследовали его антиоксидантные и антистрессовые свойства. Способность предотвращать избыточную генерацию АФК и, следовательно, ПОЛ с помощью КП

изучали по его влиянию на интенсивность флуоресценции конечных продуктов ПОЛ (оснований Шиффа) в мембранах митохондрий печени мышей.

Активацию ПОЛ в мембранах этих органелл стимулировали, используя модель старения митохондрий (25-минутной инкубацией их в гипотонической солевой среде при комнатной температуре). В результате старения митохондрий происходило их слабое набухание и рост генерации АФК, что вызывало 2—3-кратное увеличение интенсивности флуоресценции конечных продуктов ПОЛ в образцах. В этих условиях введение КП в среду инкубации в концентрации 10^{-5} — 10^{-12} моль/кг снижало интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ и предотвращало его активацию.

Отметим, что в большой дозе (10^{-3} моль/кг) КП проявлял прооксидантный эффект, повышая интенсивность флуоресценции конечных продуктов ПОЛ в 2 раза, что характерно для действия ряда антиоксидантов. Это указывает на необходимость четко придерживаться концентраций, в которых препарат проявляет антиоксидантный эффект. Отметим, что введение КП в концентрациях 10^{-5} — 10^{-12} моль/кг в среду инкубации митохондрий, которые не подвергались «старению», не влияло на интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ (Жигачева и др., 2024).

Предотвращая активацию ПОЛ, КП, вероятно, может проявлять и антистрессовую активность, поскольку в условиях стресса активируется свободнорадикальное окисление, а следовательно, и ПОЛ.

Проверку на наличие антистрессовых свойств у препарата проводили, используя модель ОГГ, которая приводила к активации ПОЛ (росту интенсивности флуоресценции его продуктов) в 3—4 раза (рис. 3, кривая 1). При этом наблюдали 2 максимума: в области 420—460 нм и в области 540—560 нм, что может быть связано с образованием 4-гидрокси-2,3-ноненаля и малонового диальдегида. Как видно из рис. 3 (кривая 2), 5-суточное введение КП в дозе 10^{-6} моль/кг снижало интенсивность ПОЛ почти до контрольных значений (рис. 3, кривая 3). Такое введение препарата мышам в 3.5—4.3 раза увеличивало продолжительность жизни и на 16—42% повышало выживаемость мышей в условиях различных видов гипоксии. Адаптогенные свойства препарата имеют значение и в торможении опухолевого роста в условиях внутриопухолевой гипоксии (Пожилова и др., 2013). При этом препарат увеличивал динамическую работоспособность мышей: продолжительность плавания мышей с грузом в холодной воде увеличивалась более чем в 3 раза (табл. 1).

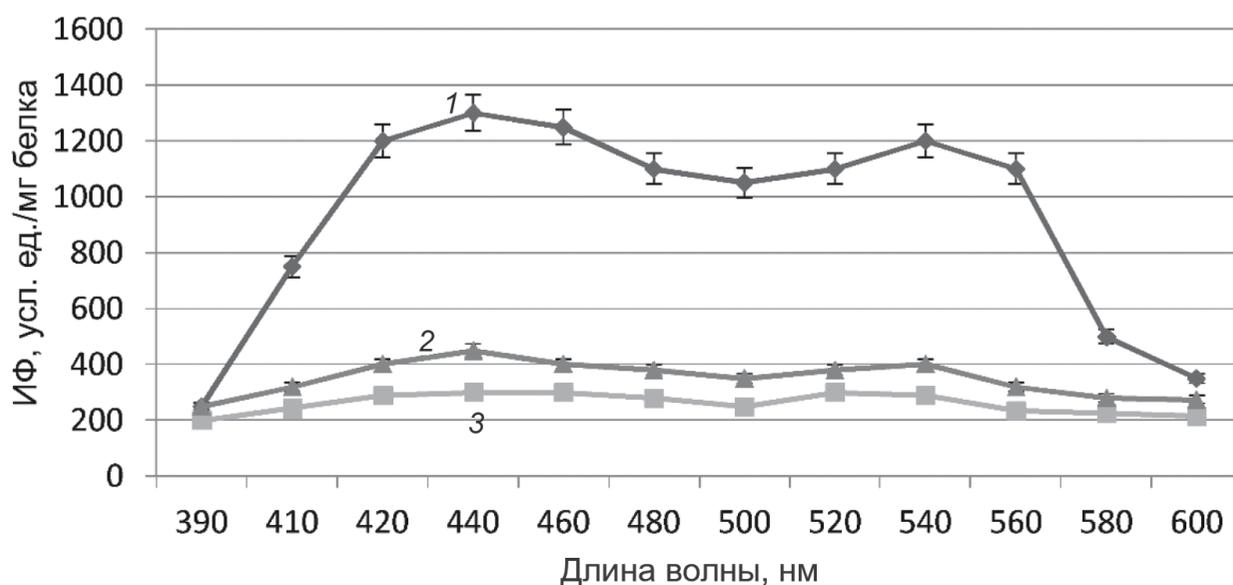


Рис. 3. Влияние острой гипобарической гипоксии (ОГГ) на фоне КП (10^{-6} моль/кг в течение 5 сут) на спектры флуоресценции продуктов перекисного окисления липидов в мембранах митохондрий печени мышей. ИФ — интенсивность флуоресценции, усл. ед. на 1 мг белка. Кривые: 1 — ОГГ; 2 — КП + ОГГ (мышей подвергали 5-минутной ОГГ через 45 мин после окончания ведения КП); 3 — контроль.

Таблица 1. Протекторная активность препарата КП в отношении мышей по показателям их выживания и плавания

Воздействие	Измеряемый параметр	Контроль	Группа КП (10 ⁻⁶ моль/кг)
Гипобарическая гипоксия (ОГГ, атм. давление 215 мм рт. ст.)	Время жизни, мин Выжившие, %	4.0 ± 1.2* 10	12.3 ± 1.8* 36
Гемическая гипоксия (инъекция нитрита натрия, 250 мг/кг)		3.1 ± 1.0** 15	14.2 ± 1.5** 29
Цитотоксическая гипоксия (инъекция азида натрия, 20 мг/кг)		2.1 ± 0.3* 0	11.4 ± 0.9* 42
Плавание с грузом при температуре 2 °С	Время плавания, мин Выжившие, %	3.6 ± 0.5* 100	11.4 ± 1.1* 100

Примечание. Показаны средние значения и их ошибки времени жизни мышей и их выживаемости при действии стрессовых воздействий (из 10 экспериментов). Различия между показателями групп достоверны при $P \leq 0.05$ (*) или $P \leq 0.01$ (**).

ОБСУЖДЕНИЕ

В клетке существует несколько жизненно важных процессов, некоторые из которых генетически обусловлены и тесно взаимосвязаны, — это процессы утилизации клеток путем апоптоза и аутофагии — освобождение от накопленных поврежденных органелл. Ранее было показано (Меньщикова и др., 2018), что ряд антиоксидантов способен вызывать аутофагию. При поиске таких препаратов особое внимание уделяется производным 3-гидроксипиридина, которые являются гетероциклическими аналогами ароматических фенолов и в этой связи проявляют антиоксидантные и антирадикальные свойства (Дюмаев и др., 1995).

Свойства синтезированных новых антиоксидантов зависят от заместителей у 3-гидроксипиридина. Так, мексидол, который представляет собой комплекс 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина и сукцината, вызывает усиление компенсаторной активности аэробного гликолиза и снижение степени угнетения окислительных процессов в цикле Кребса. Мексидол проникает через гематоэнцефалический барьер, поступает в нервные клетки и концентрируется в митохондриях, что обеспечивает его высокую фармакологическую активность и нормализацию метаболических процессов в нервной ткани (Капица и др., 2019).

Этоксидол отличается от мексидола наличием в его составе малата вместо сукцината. В физиологических условиях малат является промежуточным компонентом цикла Кребса, но становится дефицитным при острой гипоксии. В зависимости от степени гипоксии и потребности клетки в энергии малат может окисляться с образованием АТФ

при достаточном количестве кислорода в митохондриях и даже способен окисляться в условиях ишемии, или же восстанавливаться до сукцината «про запас».

Сукцинат способен только окисляться и не так эффективен при выраженной гипоксии (Zhigacheva et al., 2023a). Поэтому этоксидол применяется при комплексной терапии гипоксических состояний: нарушениях сердечного ритма, опосредованных ишемией, и нарушениях мозгового кровообращения (Кукес и др., 2020). Другое производное 3-гидроксипиридина — N-ацетилцистеинат — также проявляет антиоксидантную активность (Zhigacheva et al., 2023c); последняя объясняется способностью N-ацетилцистеина действовать как предшественник восстановленного глутатиона.

Тиоловая группа N-ацетилцистеина способна взаимодействовать с электрофильными группами АФК, восстанавливая их. Антиоксидантная активность N-ацетилцистеина, вероятно, связана с его способностью восстанавливать тиоловые группы белков (Aguoma et al., 1989). Препарат N-ацетилцистеинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина рекомендован для применения при окислительном стрессе.

И, наконец, КП — препарат, представляющий собой комплекс 3-гидроксипиридина и L-карнитина. Последний повышает антиоксидантные свойства препарата за счет ингибирования свободнорадикального окисления, а также подавления генерации АФК клеток и непосредственно в дыхательной цепи митохондрий. Ингибирование избыточной генерации АФК обусловлено образованием комплексов L-карнитина с ионами Fe²⁺ и Cu²⁺ в активных центрах ферментов (Жигачева

и др., 2024). Кроме того, нами обнаружено, что трехсуточное введение КП мышам вызывает увеличение содержания белка-маркера аутофагии LC3B в клетках печени мышей, сопоставимое с эффектом двухсуточного голодания.

Известно, что процесс аутофагии регулирует не только выживаемость клеток и целого организма, но и клеточную смерть. Один из ключевых белков аутофагии — белок Beclin-1 — может образовывать комплекс с антиапоптотическим белком Bcl-2 (Beclin-1–Bcl-2), который усиливает апоптоз и снижает аутофагию (Kang et al., 2011; Liu et al., 2023). Распад этого комплекса может как предотвращать апоптоз, так и активировать аутофагию. Поэтому обнаруженная нами тенденция к увеличению содержания белка Beclin-1, который регулирует образование и созревание аутофагосом, свидетельствует как об активации аутофагии, так и об усилении влияния на молекулярные мишени апоптоза (Kang et al., 2011; Fernández et al., 2018; Liu et al., 2023).

Изучение роли белка LC3 в процессе аутофагии в настоящее время продолжается. Ранее было показано, что комплекс LC3/ATG8 играет центральную роль в аутофагии, перенося различные цитоплазматические материалы в лизосомы, где они разлагаются. В последних работах было обнаружено, что LC3B действует как РНК-связывающий белок и фактор распада мРНК, необходимый для эффективной аутофагии (Hwang et al., 2022).

В работе (Зенков и др., 2019) показано, что аутофагия может активировать систему антиоксидант-респонсивного элемента и повышать экспрессию генов антиоксидантных ферментов. В связи с этим активация аутофагии, вероятно, сопровождается повышением устойчивости к окислительному стрессу. При этом необходимо отметить, что КП, как и другие 3-гидроксипиридины, может также повышать активность антиоксидантных ферментов (Жигачева и др., 2024). Кроме того, входящий в состав КП L-карнитин, по-видимому, повышает устойчивость организма к стрессу за счет активации синтеза протекторных молекул: белков теплового шока и ряда антиоксидантов (Fernández et al., 2018).

На основании полученных данных можно заключить, что, с одной стороны, исследуемый препарат КП является адаптогеном, способным активировать экспрессию белка LC3, стимулируя аутофагию, защитная роль которой может быть полезной при многих патологиях, сопровождаю-

щихся развитием окислительного стресса, а также снижать риск онкогенеза. С другой стороны, аутофагия может быть причиной химиорезистентности и снижать эффективность противоопухолевой терапии (Зенков и др., 2019). В связи с обнаруженными свойствами можно предположить, что синтетический препарат КП может быть перспективным терапевтическим средством.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена по теме, утвержденной Министерством науки и высшего образования Российской Федерации: 44.4 «Комплексное изучение механизмов и эффектов действия природных и синтетических антиоксидантов, противоопухолевых препаратов, химических и физических факторов. Исследование механизмов биологического старения. Разработка новых методов терапии и диагностики социально-значимых заболеваний НИОКТР: 122041300207-2»

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работу с животными проводили в соответствии с принципами биомедицинской этики, изложенными в Хельсинкской декларации 1964 г. и последующих поправках к ней (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS123), Strasburg, 1986), а также с Руководством по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях (Каркищенко, Грачева, 2010). Эксперименты одобрены комитетом по этике Института биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН (протокол № 19 от 25 сентября 2023 г., Москва).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Дюмаев К. М., Воронина Т. А., Смирнов Л. Д. 1995. Антиоксиданты в профилактике и терапии патологий ЦНС. М.: Ин-т Биомед. химии РАН. (Dyumaev K. M., Voronina T. A., Smirnov L. D. 1995. Antioxidants in the prevention and therapy of CNS

- pathologies. Moscow: Publishing House of the Institute of Biomed. Chem. Russ. Acad. Med. Sci.)
- Жигачева И. В., Русина И. Ф., Крикунова Н. И., Кузнецов Ю. В., Расулов М. М., Яковлева М. А., Голощапов А. Н.* 2024. Предотвращение дисфункции митохондрий карнитинатом 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина. Биофизика. Т. 69.2. С. 252. (*Zhigacheva I. V., Rusina I. F., Krikunova N. I., Kuznetsov Y. V., Rasulov M. M., Yakovleva M. A., Goloshchapov A. N.* 2024. Prevention of mitochondrial dysfunction with 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridine carnitinate. *Biophysika*. V. 69. No. 2. P. 294.)
<https://doi.org/10.31857/S0006302924020105>
- Зенков Н. К., Чечушков А. В., Кожин П. М., Мартинович Г. Г., Кандалинцева Н. В., Меньщикова Е. Б.* 2019. Аутофагия как механизм защиты при окислительном стрессе. Бюллетень сибирской медицины. Т. 18. № 2. С. 195. (*Zenkov N. K., Chechushkov A. V., Kozhin P. M., Martinovich G. G., Kandalintseva N. V., Menshchikova E. B.* 2019. Autophagy as a defense mechanism under oxidative stress. *Bull. Siberian Med.* V. 18. No. 2. P. 195.)
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-195-214>
- Калугина К. К., Сухарева К. С., Чуркина А. И., Костарева А. А.* 2021. Аутофагия как звено патогенеза и мишень для терапии заболеваний скелетно-мышечной системы. Росс. Физиол. журнал им. И. М. Сеченова. Т. 107. № 6—7. С. 810. (*Kalugina K. K., Sukhareva K. S., Churkina A. I., Kostareva A. A.* 2021. Autophagy as a link in the pathogenesis and a target for the therapy of diseases of the musculoskeletal system. *Sechenov Russ. Physiol. J.* V. 107. No. 6-7. P. 810.)
<https://doi.org/10.31857/S0869813921060042>
- Капица И. Г., Иванова Е. А., Воронина Т. А.* 2019. Влияние мексидола на физическую и умственную работоспособность при стрессогенных воздействиях в эксперименте. Фармакокинетика и фармакодинамика, № 1. С. 12—17. (*Kapitsa I. G., Ivanova E. A., Voronina T. A.* 2019. The effect of mexidol on physical and mental performance under stressful influences in the experiment. *Pharmacokinetics Pharmacodynamics (Russ.)*. No. 1. P. 12.)
<https://doi.org/10.24411/2587-7836-2019-10034>
- Каркищенко Н. Н., Грачева С. В.* 2010. Справочник по лабораторным животным и альтернативам модели в биомедицинских исследованиях. М.: Профиль. (*Karkishchenko N. N., Gracheva S. V.* 2010. Handbook of laboratory animals and model alternatives in biomedical research. Moscow: Profile.)
- Каркищенко В. Н., Каркищенко Н. Н., Шустов Е. Б., Берзин И. А., Фокин Ю. В., Алимкина О. В.* 2016. Особенности интерпретации показателей работоспособности лабораторных животных по плавательным тестам с нагрузкой. Биомедицина. № 4. С. 34. (*Karkishchenko V. N., Karkishchenko N. N., Shustov E. B., Berzin I. A., Fokin Yu. V., Alimkina O. V.* 2016. Features of interpretation of performance indicators of laboratory animals according to swimming tests with load. *Biomed.* No. 4. P. 34.)
- Ковалева О. В., Шитова М. С., Зборовская И. Б.* 2014. Аутофагия: клеточная гибель или способ выживания? Клиническая онкогематология. Т. 7. № 2. С. 103. (*Kovaleva O. V., Shitova M. S., Zbovovskaya I. B.* 2014. Autophagy: cell death or a way of survival? *Clinical oncohematol.* V. 7. No. 2. P. 103.)
- Кукес В. Г., Парфенова О. К., Романов Б. К., Прокофьев, Е. В. Парфенова А. Б., Сидоров Н. Г., Газданова А. А., Павлова Л. И., Зозина В. И., Андреев А. Д., Чернова С. В., Раменская Г. В.* 2020. Механизм действия этоксидола на показатели окислительного стресса при сердечной недостаточности и гипертонии. СТМ. Клинические приложения. Т. 12. № 2. С. 67. (*Kukes V. G., Parfenova O. K., Romanov B. K., Prokofiev A. B., Parfenova E. V., Sidorov N. G., Gazdanova, A. A., Pavlova L. I., Zozina V. I., Andreev A. D., Aleksandrova T. V., Chernova S. V., Ramenskaya G. V.* 2020. The mechanism of action of ethoxidol on oxidative stress in dicesin heart failure and hypotension. *Modern Technol. Medicine*. V. 12. No. 2. P. 67.)
<https://doi.org/10.17691/stm2020.12.2.08>
- Меньщикова Е. Б., Чечушков А. В., Кожин П. И., Хольшин С. В., Кандалинцева Н. В., Мартинович Г. Г., Зенков Н. К.* 2018. Синтетические монофенольные антиоксиданты активируют аутофагию в опухолевых клетках: зависимость от структуры и концентрации. Вестник ВолГУ. Серия 11. Естественные науки. 2018. Т. 8. № 1. С. 53. (*Menshchikova E. B., Chechushkov A. V., Kozhin P. M., Kholshin S. V., Kandalintseva N. V., Martinovich G. G., Zenkov N. K.* 2018. Activation of autophagy in tumor cells by synthetic monophenol antioxidants: dependence on structure and concentration. *Science VolSU. Natural Sci.* V. 8. No 1. P. 54.)
<https://doi.org/10.15688/jvolsu11.2018.1.10>
- Пожилова Е. В., Новиков В. Е., Новикова А. В.* 2013. Роль фактора адаптации к гипоксии в развитии опухолей. Вестник Смоленской гос. мед. акад. Т. 12. № 3. С. 56. (*Pozhilova E. V., Novikov V. E., Novikova A. V.* 2013. The role of the factor of adaptation to hypoxia in the development of tumors. *Bull. Smolensk State Med. Acad.* V. 12. No. 3. P. 56.)
- Русина И. Ф., Касаикина О. Т., Кузнецов Ю. В., Трофимов А. В., Вепринцев Т. Л., Егорова Ю. Н.* 2024. Соль-2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина с гидратом карнитина, обладающая антиоксидантной активностью, и способ ее получения. Патент RU2817094 С1. 09.04.2024. (*Rusina I. F., Kasaiikina O. T., Kuznetsov Yu. V., Trofimov A. V., Veprintsev T. L., Egorova Yu. N.* 2024. Salt of 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridine with carnitine hydrate, possessing anti-

- oxidant activity, and a method for its preparation. Patent RU2817094 C1. 09.04.2024.)
- Фрейдлин И. С., Маммедова Дж.Т., Старикова Э. А. 2019. Роль аутофагии при инфекциях. Росс. физиол. журнал им. И. М. Сеченова. 2019. Т. 105. № 12. С. 1486. (Freidlin I. S., Mammedova J. T., Starikova E. A. 2019. The role of autophagy in infections. Russ. Physiol. Sechenov J. V. 105. No. 12. P. 1486.) <https://doi.org/10.1134/S0869813919120057>
- Aruoma O. I.; Halliwell B.; Hoey B. M.; Butler J. 1989. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. Free Rad. Biol. Med. V. 6. P. 593–597.
DOI 10.1016/0891-5849(89)90066-x
- Fernández Á. F., Wei S. Y., Zou Zh., Shi M., McMillan K.L., He C., Tin T., Liu Y., Chiang W-Ch., Marciano D. K., Schiattarella G., Bhagat G., Moe O. W., Hu M. Ch., Levine B. 2018. Disruption of the beclin 1-BCL2 autophagy regulatory complex promotes longevity in mice. Nature. V. 558. P. 136.
<https://doi.org/10.1038/s41586-018-0162-7>
- Fletcher B. I., Dillard C. D., Tappel A. L. 1973. Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues. Anal. Biochem. V. 52. P. 1. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(73\)90327-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(73)90327-8)
- Hwang H. J., Ha H., Lee B. S., Kim B. H., Song H. K., Kim Y. K. 2022. LC3B is an RNA-binding protein to trigger rapid mRNA degradation during autophagy. Nature Commun. V. 13. Art. ID: 1436.
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-29139-1>
- Kang R., Zeh H. J., Lotze M. T., Tang D. 2011. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. Cell Death Differ. V. 18. P. 571.
<https://doi.org/10.1038/cdd.2010.191>
- Koukourakis M. I., Kalamida D., Giatromanolaki A., Zois Ch.E., Sivridis E., Pouliliou S., Mitrakas A., Gatter K. C., Harris A. L. 2015. Autophagosome proteins LC3A, LC3B and LC3C have distinct subcellular distribution kinetics and expression in cancer cell lines. PLoS One. V. 10. Art. ID: e0137675.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137675>
- Levine B., Klionsky D. J. 2004. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy Dev. Cell. V. 6. P. 463.
[https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(04\)00099-1](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(04)00099-1)
- Liu S., Yao S., Yang H., Liu S., Wang Y. 2023. Autophagy: regulator of cell death. Cell Death Disease. V. 14. No. 10. Art. ID: 648.
<https://doi.org/10.1038/s41419-023-06154-8>
- Mokhova E. N., Skulachev V. P., Zhigacheva I. V. 1977. Activation of the external pathway of NADH oxidation in liver mitochondria of cold-adapted rats. Biochim. Biophys. Acta. V. 501. P. 415.
[https://doi.org/10.1016/0005-2728\(78\)90109-3](https://doi.org/10.1016/0005-2728(78)90109-3)
- Okada H., Mak T. W. 2004. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. Nat. Rev. Cancer. V. 4. P. 592.
<https://doi.org/10.1038/nrc1412>
- Zhigacheva I. V., Krikunova N. I., Binyukov V. I., Mil E., Rusina I., Goloshchapov A. 2023a. Ethoxidol as a broad-spectrum adaptogen. Curr. Mol. Pharmacol. V. 16. P. 109.
<https://doi.org/10.2174/1874467215666220308115514>
- Zhigacheva I. V., Kricunova N. I., Rasulov M. M. 2023b. Adaptogenic properties of 1-(germatran-1-il)-oxyethylamine. Current Chem. Biol. V. 17. P. 49.
<https://doi.org/10.2174/2212796817666221205164816>
- Zhigacheva I. V., Rusina I. F., Krikunova N. I., Goloshchapov A. N., Veprintsev T. L., Yablonskaya O. I., Trofimov A. V. 2023c. Resveratrol and 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridine N-acetyl cysteinate as protecting agents upon the stress exposure. Int. J. Mol. Sci. V. 24.
<https://doi.org/10.3390/ijms241713172>

2-ETHYL-6-METHYL-3-HYDROXYPYRIDINE CARNITINATE IS A BROAD-SPECTRUM ADAPTOGEN, THAT STIMULATES AUTOPHAGY IN LIVER TISSUE

E. M. Mil^{a,*}, I. V. Zhigacheva^a, M. A. Korovin^a, V. V. Kuvyrkova^a, L. I. Matienko^a,
A. A. Albantova^{a,**}, A. N. Goloshchapov^a, M. M. Rasulov^b

^a Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334, Russia

^b State Research Institute of Chemistry and Technology of Organoelement Compounds, Moscow, 105118, Russia

* e-mail: elenamil2004@mail.ru

** e-mail: albantovaaa@mail.ru

Background: Under stress conditions, mitochondria become sources of excessive generation of reactive oxygen species (ROS), which can serve either as signaling molecules or damage cell structures. Antioxidants, reducing ROS generation, can serve as adaptogens to stress effects. It has been shown that a number of antioxidants are able to induce autophagy, which is able to activate the antioxidant-response element system. In this regard, the aim of the study was to investigate the anti-stress properties of a new antioxidant 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridine carnitinate (CP) and its ability to activate the synthesis of autophagy proteins Beclin-1, LC3. **Methods:** Since the body's resistance to stress factors primarily depends on energy metabolism, the effects of acute hypobaric hypoxia and CP on the LPO intensity in the lipid fraction of mice liver mitochondrial membranes were studied using the spectrofluorescence method. Autophagy proteins were determined by Western blotting using primary mice antibodies to Beclin-1 and LC3B proteins, as well as secondary antibodies labeled with horseradish peroxidase. **Results:** Injection of 10^{-6} mol/kg CP to mice for 5 days prevented the growth of LPO intensity under conditions of acute hypobaric hypoxia (AHH). This drug increased life expectancy and increased survival of mice under conditions of various types of the hypoxia. The initiation of autophagy biomarker proteins (LC3B) by the drug was shown. At the same time, the content of Beclin-1 proteins tended to increase, which characterizes the onset of the autophagy process. **Conclusion:** The new antioxidant CP can probably be used as an adaptogen to various types of hypoxia and an activator of autophagy.

Keywords: antioxidants, 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridine carnitinate, hypoxia, autophagy, Beclin-1, LC3B