

ВОЗРАСТ-ЗАВИСИМЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРОДУКЦИИ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЕ ЧЕЛОВЕКА

© 2024 М.Ю. Высоких^{1,2,3*}, М.А. Виговский⁴, В.В. Филиппов⁴, Я.Р. Бородай⁴,
М.В. Марей², О.А. Григорьева⁴, Т.Ф. Вепхвадзе³, Н.С. Курочкина³,
Л.А. Манухова², А.Ю. Ефименко⁴, Д.В. Попов³, В.П. Скулачев¹

¹ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119992 Москва, Россия; электронная почта: mikhail.vyssokikh@gmail.com; mike@genebee.msu.ru

² Национальный медицинский исследовательский центр акушерства,
гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова, 117997 Москва, Россия

³ Институт медико-биологических проблем РАН, 123007 Москва, Россия

⁴ Медицинский научно-образовательный центр
Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119192 Москва, Россия

Поступила в редакцию 12.12.2023

После доработки 30.01.2024

Принята к публикации 01.02.2024

Уменьшение массы мышц и их функциональных возможностей (сила, работоспособность и ин-
сулиновая чувствительность) – это один из интегральных признаков старения. Одним из триг-
геров старения является увеличение продукции митохондриальных активных форм кислорода.
В нашем исследовании впервые для скелетной мышцы человека изучались возраст-зависимые
изменения продукции митохондриальных активных форм кислорода, ассоциированные со сни-
жением доли связанной с митохондриями гексокиназы-2. Для этого брали биопсию *m. vastus
lateralis* у 10 молодых здоровых добровольцев и 70 пациентов (26–85 лет) с многолетним пер-
вичным артрозом коленного/тазобедренного сустава. Оказалось, что старение (сопоставление
разных групп пациентов), в отличие от снижения двигательной активности/хронического вос-
паления (сопоставление молодых здоровых людей и молодых пациентов), вызывает выражен-
ное увеличение продукции перекиси изолированными митохондриями. Это коррелировало
с возраст-зависимым распределением гексокиназы-2 между митохондриальной и цитозольной
фракциями, снижением скорости сопряжённого дыхания выделенных митохондрий и дыхания
при стимуляции глюкозой (субстратом гексокиназы). Обсуждается, что эти изменения могут быть
вызваны возраст-зависимым снижением содержания кардиолипина – потенциального регулятор-
а митохондриального микрокомпартамента, содержащего гексокиназу. Полученные результаты
способствуют более глубокому пониманию возрастных патогенетических процессов в скелетных
мышцах и открывают перспективы для поиска фармакологических/физиологических подходов
к коррекции этих патологий.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: старение, скелетная мышца, митохондрия, митохондриальные активные
формы кислорода, гексокиназа.

DOI: 10.31857/S0320972524020088 EDN: XMILPQ

ВВЕДЕНИЕ

Старение – это комплексный процесс, прису-
щий всем организмам и включающий ряд общих
черт, в частности, прогрессирующее снижение

функциональных и регенеративных возможностей
организма, развивающееся на фоне нарушения
адаптации к внешним и внутренним стрессорным
воздействиям и приводящее в конечном итоге к
смерти. Одной из наиболее хорошо разработанных
теорий старения является митохондриальная те-
ория, впервые предложенная Харманом в 1956 г.,
согласно которой триггером старения считается
дисфункция митохондрий, ассоциированная с про-

Принятые сокращения: МАФК – митохондриальные
активные формы кислорода.

* Адресат для корреспонденции.

дукцией ими активных форм кислорода (АФК) и окислительными повреждениями биологических макромолекул [1]. Один из интегральных признаков старения – уменьшение массы и силы скелетных мышц, приводящее к выраженному снижению физической работоспособности и качества жизни. Последнее связано с тем, что скелетные мышцы не только обеспечивают движение и поддержание позы, но также играют важную роль в регуляции метаболизма всего организма. Так, в норме скелетные мышцы, составляя до 40% массы тела, потребляют от 20 до 30% производимой энергии [2] и являются одним из основных инсулиноточивых потребителей глюкозы [3]. Считается, что, в отличие от других тканей, снижение функций митохондрий скелетных мышц является основным медиатором снижения их массы и силы у пожилых людей [4].

Важнейшую роль в регуляции метаболизма и потребления глюкозы из крови [5] играет фермент гексокиназа (ЕС 2.7.1.1), катализирующий скорость-лимитирующую реакцию гликолиза и осуществляющий перенос фосфорильного остатка с АТФ на глюкозу с образованием глюкозо-6-фосфата – интермедиата гликолиза и пентозофосфатного пути. В мышцах, как и в других инсулин-чувствительных тканях, преимущественно экспрессируются I и II из пяти известных изотипов гексокиназы; они имеют высокое сходство аминокислотных последовательностей, однако довольно сильно различаются по кинетическим параметрам и метаболическим функциям (для обзора см. работу Wilson et al. [6]). В скелетных мышцах большая часть гексокиназы локализована на поверхности митохондрий, формируя метаболический компартмент, в котором для фосфорилирования гексоз используется АТФ, синтезируемый в митохондриях, что стимулирует дыхание митохондрий и функционально связывает гликолиз с окислительным фосфорилированием [7]. Связывание гексокиназы с митохондриями опосредовано белок-белковыми взаимодействиями с VDAC1 – основным белком внешней мембраны митохондрий, обеспечивающим транспорт различных соединений между митохондриями и остальной частью клетки [8]. Формирование этого белкового комплекса приводит к сближению мембран митохондрий и стабилизации так называемых контактных сайтов, являющихся структурной основой метаболического микрокомпартамента митохондрий, отвечающего за челночное движение АТФ/АДП между активными центрами АТФ-синтетазы и гексокиназы [9, 10].

Примерно 1–2% молекулярного кислорода в клетке при участии комплексов I и III дыхательной цепи конвертируется в супероксид, спонтанно или при помощи ферментных систем, регулирующих продукцию перекиси водорода с последую-

щим образованием митохондриальных активных форм кислорода (мАФК), способных повреждать биологические макромолекулы [11]. Установлено, что дисбаланс продукции и утилизации активных форм кислорода (АФК) лежит в основе окислительного стресса и индукции программированной гибели клетки, что является одной из ключевых причин развития сердечно-сосудистых и нейродегенеративных патологий [12]. Важно отметить, что небольшое снижение митохондриального мембранного потенциала практически полностью останавливает генерацию мАФК [13]. В частности, в изолированных митохондриях активация окислительного фосфорилирования при добавлении АДФ приводила к снижению трансмембранного потенциала на небольшую величину – примерно на 20% (мягкая деполяризация), предотвращая образование H_2O_2 . Исследуя этот эффект, А. Галина с коллегами описали новый антиоксидантный механизм, состоящий в циклическом движении АДФ, образующегося при фосфорилировании глюкозы за счёт АТФ, производимого при окислительном фосфорилировании и попадающего к активному центру гексокиназы через канал VDAC1 [14].

Ранее на моделях коротко- и долгоживущих грызунов нами было показано, что мягкая деполяризация митохондрий, ассоциированная с активацией связанной гексокиназы, приводит к снижению продукции мАФК в различных тканях (в том числе в скелетных мышцах), а нарушение этого механизма коррелирует с возрастом короткоживущих животных [15]. Целью этого исследования было изучение возрастного характера распределения гексокиназы, а также зависимости скорости продукции перекиси водорода митохондриями от активации митохондриальной гексокиназы её субстратами в скелетной мышце человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн исследования. Исследование было одобрено Комитетом по биомедицинской этике ГНЦ РФ – ИМБП РАН и Локальным этическим комитетом МНОЦ МГУ имени М.В. Ломоносова (протокол № 2/20 от 16.03.2020). Все добровольцы подписали добровольное согласие на участие в исследовании.

В исследовании приняли участие 10 здоровых добровольцев (возраст от 25 до 43 лет) и 70 пациентов с многолетним первичным артрозом коленного/тазобедренного сустава (возраст от 26 до 85 лет), разделённых на группы молодого ($n = 8$, 39 (26–45) лет), среднего ($n = 20$, 59 (58–62) лет) и пожилого ($n = 42$, 72 (66–83) года) возраста (табл. 1). Эту патологию использовали ранее как модель для изучения эффектов снижения двигательной

активности и хронического воспаления для скелетных мышц бедра, в том числе и при старении [16–19]. Критериями невключения добровольцев в исследование были: онкологические или системные заболевания в анамнезе; психические, физические и прочие причины, не позволяющие адекватно оценивать своё поведение и правильно выполнять условия протокола исследования; наличие в анамнезе любого существенного, по мнению врача-исследователя, состояния/заболевания или обстоятельства, препятствующего включению в исследование; противопоказания для проведения оперативного лечения на момент включения; беременность и лактация. У всех участников исследования был собран анамнез, оценен субъективный уровень физических возможностей (анкета SF12 [20]), а также уровень глюкозы и инсулина в крови натощак. У пациентов в начале плановой операции по замене тазобедренного/коленного сустава брали биопсию наружной головки четырёхглавой мышцы бедра (~500 мг). У здоровых добровольцев пробы из наружной головки четырёхглавой мышцы бедра (~200 мг) брали с помощью игольчатой биопсии с аспирацией под местной анестезией (1 мл 2%-ного лидокаина), как описано ранее [21]. Образец мышечной ткани сразу же помещали в пробирку с кардиоплегическим раствором («Custodiol», США); через 10 мин часть пробы отбирали на гистологические и биохимические исследования (см. ниже), а оставшуюся часть переносили в свежую аликвоту раствора Custodiol для выделения митохондрий.

Гистологический анализ. Образцы скелетных мышц фиксировали в 10%-ном забуференном нейтральном формалине в течение 24–48 ч. Гистологическая проводка осуществлялась по стандартной методике с использованием 8 смен изопропилового спирта (общая продолжительность – 5,5 ч при 37 °C) и 3 смен парафина (общая продолжительность – 5 ч при 62 °C). Затем препараты заливали в парафиновые блоки, изготавливали срезы толщиной 1 мкм и монтировали их на предметные стёкла («Menzel GmbH & Co KG», Германия). Окрашивание производили по стандартной методике с использованием гематоксилина Майера и эозина («PanReac AppliChem», Испания). Микроскопическое исследование проводили на микроскопе Leica DM600B с камерой Leica DFC 420X («Leica Microsystems GmbH», Германия), используя репрезентативные поля зрения для получения микрофотографий. Обработку и анализ изображений проводили с помощью программного обеспечения LasX («Leica Microsystems GmbH») и Fiji.

Выделение митохондрий. Выделение митохондрий проводили, как описано ранее [15]. Биопсийные образцы мышечной ткани ополаскивали ледяным раствором 0,9%-ного NaCl, обсушивали

фильтровальной бумагой, взвешивали и фрагментировали на кусочки размером 0,5–1 мм охлаждёнными и промытыми средой выделения (см. ниже) ножницами с загнутыми концами. Полученные фрагменты гомогенизировали с помощью микрогомогенизатора Поттера (стекло/тефлон) с клиренсом 200 микрон в течение 2 мин при 4 °C в соотношении 10 : 1 (v/m) в среде выделения следующего состава: 300 мМ маннит, 0,5 мМ ЭГТА, 20 мМ HEPES/NaOH, pH 7,6 и 0,1% БСА. Гомогенат центрифугировали при 1000 g в течение 10 мин при 4 °C на центрифуге 5410 («Eppendorf», Германия). Супернатант собирали и центрифугировали при 9000 g в тех же условиях. Осадок митохондрий суспендировали в том же объёме среды выделения без БСА (использовали микрогомогенизатор) и центрифугировали при 10 500 g в течение 10 мин и при 4 °C. Полученный осадок суспендировали в минимальном объёме, типичная концентрация белка полученного препарата митохондрий составляла 90–100 мг/мл, что определялось методом бицинхониновой кислоты («Pierce», США). Содержание белка в препаратах митохондрий определяли с бицинхониновой кислотой и 1 мг/мл раствором БСА в качестве стандарта согласно инструкции производителя («Pierce»). Все процедуры по выделению и хранение митохондрий во время экспериментов проводили при 4 °C.

Измерение скорости дыхания. Скорость потребления кислорода митохондриями измеряли при 30 °C с помощью электрода Кларка закрытого типа на оксиграфе («Hansatech», Великобритания), как описано ранее [15, 22]. Митохондрии (0,05–0,1 мг белка) инкубировали в ячейке оксиграфа, содержащей 0,5 мл дыхательной среды MIR05 [23] (0,5 мМ ЭГТА, 3 мМ MgCl₂, 60 мМ калия лактобионат, 20 мМ таурин, 10 мМ KН₂РO₄, 20 мМ HEPES, 110 мМ сахароза, 1 г/л БСА (свободный от жирных кислот), 100 мкМ ди-аденозинпентафосфат калия), и оценивали эффективность дыхания в присутствии 5,5 мМ пирувата/малата или 10 мМ сукцината/2 мкМ ротенона, 1 мкМ олигомицина, 0,1 мМ ADP, 5 мМ глюкозы, 10 нМ карбонил цианид-4-(трифлуорометокси)фенилгидразона (FCCP) (все реагенты – «Sigma-Aldrich», США).

Измерение скорости продукции перекиси. Скорость продукции перекиси водорода митохондриями оценивали по методу Zhou et al. [24] с модификациями, описанными нами ранее [25, 26]. Для регистрации продукции H₂O₂ митохондриями использовали реагент Amplex Red (10-ацетил-3,7-дигидроксифеноксазин; «Invitrogen», США). Резорурфин, продукт индуцированного H₂O₂ окисления Amplex Red, измеряли путём мониторинга его флуоресценции (максимумы возбуждения/эмиссии ~550/595 нм) на спектрофотометре Cary Eclipse («Agilent», США) в течение 10–15 мин.

Митохондрии (0,15 мг/мл митохондриального белка) инкубировали при 37 °C с перемешиванием встроенной магнитной мешалкой в среде MIR05, содержащей 5 мкМ Amplex Red, пероксидазу хрена (12 ед./мл, «Sigma-Aldrich») и супероксиддисмутазу (45 ед./мл, «Sigma-Aldrich»). Реакцию инициировали добавлением 10 мМ сукцината, после достижения максимальной скорости продукции перекиси вносили ADP (до 0,1 мМ конечной концентрации) и глюкозу (конечная концентрация 5 мМ). Скорость образования H_2O_2 рассчитывали по изменению интенсивности флуоресценции, как описано ранее [27]. Калибровочные кривые получали добавлением к аналитической среде свеже-разбавленной H_2O_2 (концентрацию маточного раствора перекиси водорода проверяли при 240 нм с использованием молярного коэффициента экстинкции 43,6).

Измерение активности ферментов. Определение ферментативной активности гексокиназы проводили в нефракционированном гомогенате ткани мышц, цитозольной и митохондриальной фракциях по методу Scheer et al. [28] с небольшими модификациями. Буфер для анализа содержал 50 мМ Tris-HCl, 5 мМ меркаптоэтанол, 5 мМ ATP, 10 мМ $MgCl_2$, 0,5 мМ глюкозу, 0,8 мМ NAD^+ и 1 ед./мл дегидрогеназы глюкозо-6-фосфата из *Leuconostoc mesenteroides* («Roche», Австрия) при pH 7,5. Все анализы проводили при 25 °C в общем объёме 1,0 мл, активность фермента определяли с использованием спектрофотометра Cary Varion 300 («Agilent») путём измерения увеличения оптической плотности при длине волны 340 нм, где за 1 единицу фермента принимали количество, катализирующее превращение 1 мкмоль субстрата в продукт в течение 1 мин. Расчёты проводили с учётом фактора разведения, различного для разных фракций. Для каждого измерения проводили три технических повтора. Использовали реагенты фирмы «Sigma-Aldrich».

Электрофорез в ПААГ и вестерн-блот анализ содержания гексокиназы в митохондриальных препаратах. Электрофорез в полиакриламидном геле проводили по методу Лэммли [29]. Митохондрии лизировали в буфере следующего состава: 150 мМ хлорид натрия, 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 0,5% Нонидет П-40, 1%-ный дезоксихолат натрия, 0,5%-ный додецилсульфат натрия с коктейлем ингибиторов протеаз («Thermo Fisher Scientific», США). После разделения (30 мкг белка на дорожку) белки из 12%-ного полиакриламидного геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану при помощи комбинированной системы для электрофореза/иммуноблоттинга («Bio-Rad», США) и проводили иммуноблоттинг, как описано ранее [30]. Использовали первичные мышинные моноклональные антитела против человеческих изозимов гексо-

киназы-1 и -2 (ab150013, ab227198, «Abcam», США) и против белка внешней мембраны митохондрий VDAC1 (ab186321, «Abcam»), а также вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (ab97023, «Abcam») в соответствии с рекомендациями производителя. Для визуализации сигнала использовали кит Novex ECL Kit («Invitrogen», США) и сканер ChemiDoc («Bio-Rad»).

Экстракция липидов и анализ содержания кардиолипина методом ВЭТСХ. Экстракцию липидов проводили по методу Блай и Дайера в потоке азота бескислородными растворами, барботированными в течение ночи 99,9%-ным N_2 [31]. Экстрагированные липиды растворяли в смеси хлороформ/метанол 2 : 1 (v/v), хранили под азотом при -80 °C в эксикаторе с силикагелем. Тонкослойную хроматографию проводили по методике Pinault et al. [32], используя органические растворители аналитической чистоты и ВЭТСХ хроматографические пластины с силикагелем на алюминиевой подложке («Merck», Дармштадт, ФРГ). Перед нанесением образца или стандарта в день использования пластины для ВЭТСХ размером 10 на 10 см готовили следующим образом: однократно погружали в 2,3%-ную борную кислоту в этаноле, сушили в течение 2 ч под вытяжным шкафом и активировали при 110 °C в течение 20 мин на песчаной бане. Образцы наносили с помощью самодельного стеклянного капиллярного аппликатора с шаровым клапаном (приводимым в действие потоком азота) в виде полос длиной 10 мм на расстоянии 15 мм от края пластины с постоянной скоростью нанесения около 200 нл/с при непрерывной сушке потоком азота при давлении 1,5–2,0 бар. Для стандартов фосфолипидов («Avanti Polar Lipids», Франция) готовили исходный раствор (1 мг/мл) в смеси хлороформ/метанол (2 : 1, v/v). Элюирование проводили в стеклянной камере, уравновешенной парами элюента не менее 1 ч перед хроматографией; элюент состоял из смеси хлороформ/этанол/триэтиламин/вода (3 : 3,5 : 3,5 : 0,7, v/v). Хроматографию прекращали при достижении фронтом 10 мм от верхнего края пластины, после двухчасовой сушки в вытяжном шкафу проводили окрашивание пластины путём погружения на 2 мин в 0,5%-ный сульфат меди (m/v) в 1,16 М ортофосфорной кислоте, высушивания в вытяжном шкафу в течение 2 ч при комнатной температуре в потоке азота и проявления на песчаной бане в течение 15 мин при 155 °C. Пластины фотографировали в сканере ChemiDoc («Bio-Rad»). Измеренные величины интенсивности полос фосфолипидов были интегрированы и значения площади поверхности пиков были выражены в условных единицах с помощью программы ImageJ, далее рассчитывали концентрацию кардиолипина и моноизокардиолипина (нмоль/мг митохондриального белка),

используя калибровочные кривые для соответствующих стандартов.

Статистические методы. Сравнение групп проводили с использованием дисперсионного анализа и критерия множественного сравнения Тьюки. Данные представлены в виде медианы с интерквартильным разбросом, значения $p < 0,05$ считались значимыми. Корреляционный анализ проводили, используя ранговый коэффициент корреляции Спирмана. Статистическую обработку проводили при помощи программы Prism 7.0 («Graph Software Inc.», Ла-Джолла, Калифорния, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Характеристика групп добровольцев. Клинико-anamnestические характеристики участников исследования представлены в табл. 1; было показано, что субъективная оценка физических возможностей у пациентов значительно ниже, чем у молодых здоровых людей, а индекс массы тела и индекс инсулинорезистентности увеличены только у средневозрастных и пожилых пациентов.

Гистологический анализ выявил прогрессирующие с возрастом нарушения мышечных волокон у пациентов, а именно: атрофию мышечных волокон, смещение ядер от периферии волокна, инфильтрации иммунными клетками и увеличение расстояния между волокнами, предположительно связанное с увеличением доли соединительнотканного компонента (рис. 1).

Распределение гексокиназы между клеточными фракциями. Между здоровыми добровольцами и молодыми пациентами не было найдено различий в активности гексокиназы ни в гомогенате, ни в изолированных фракциях (рис. 2).

У пожилых пациентов было выявлено снижение общей активности гексокиназы по сравнению с остальными группами ($p < 0,01$ для ЗД, $p < 0,05$ для МП и СП, рис. 2, а) и достоверное повышение её активности для цитозольной фракции по сравнению с группой молодых пациентов ($p < 0,05$, рис. 2, б). Однако у средневозрастных и пожилых пациентов активность гексокиназы в митохондриальной фракции была ниже по сравнению как со здоровыми добровольцами ($p < 0,01$ и $0,001$ соответственно), так и с молодыми пациентами ($p < 0,05$ и $0,01$ соответственно); более того, различия были обнаружены между средневозрастными и пожилыми пациентами ($p < 0,05$) (рис. 2, в).

Известно, что в скелетных мышцах человека соотношение I и II изозимов гексокиназы варьирует и по данным разных авторов составляет от 1/10 до 1/3 [5, 33, 34]. При этом более 90% изозима I связано с митохондриями [35], и уровень экспрессии этого гена, равно как и представленность белка в скелетной мышце, не зависят ни от метаболической нагрузки, ни от физической активности, ни от концентрации глюкозы или инсулина в крови [36]. Напротив, для изозима II такая зависимость ярко выражена – экспрессия мРНК и концентрация белка для гексокиназы-2 в скелетной мышце может кратно изменяться при изменении концентрации глюкозы или инсулина в крови, а также при изменении уровня (повседневной) двигательной активности [2, 5, 8, 37, 38].

Учитывая различный уровень связывания этих изозимов с митохондриальной мембраной и разную регуляцию их экспрессии, измерение активности проводили при 42 °С, когда подавляющая часть гексокиназы-2 инактивирована, а активность гексокиназы-1 меняется незначительно [5]. Было показано отсутствие различий активности гексокиназы-1 во фракции митохондрий

Таблица 1. Характеристика групп участников исследования

	<i>n</i>	Возраст, лет	ИМТ, кг/м ²	НОМА-IR, у.е.	Физические возможности SF-12, у.е.
<i>Норма</i>			18,5–25,0	< 2,7	40–60
Здоровые добровольцы (ЗД)	10	25–43 (34,5)	18,9–29,4 (22,5)	0,14–3,3 (1,3)	52,0–59,8 (56,3)
Молодые пациенты (МП)	8	26–44 (38)	20,8–30,9 (25,7)	1,43–4,65 (2,7)	16,1–31,7 (26,8)
Средневозрастные пациенты (СП)	20	52–64 (59)	21,3–49,3 (34,5)	0,81–12,5 (4,6)	19,1–29,8 (25,2)
Пожилые пациенты (ПП)	42	65–85 (72)	20,8–45 (30,4)	1,12–10,96 (3,4)	15,5–37,7 (23,0)

Примечание. Представлен разброс, минимальные и максимальные значения. ИМТ – индекс массы тела, НОМА-IR – индекс инсулинорезистентности.

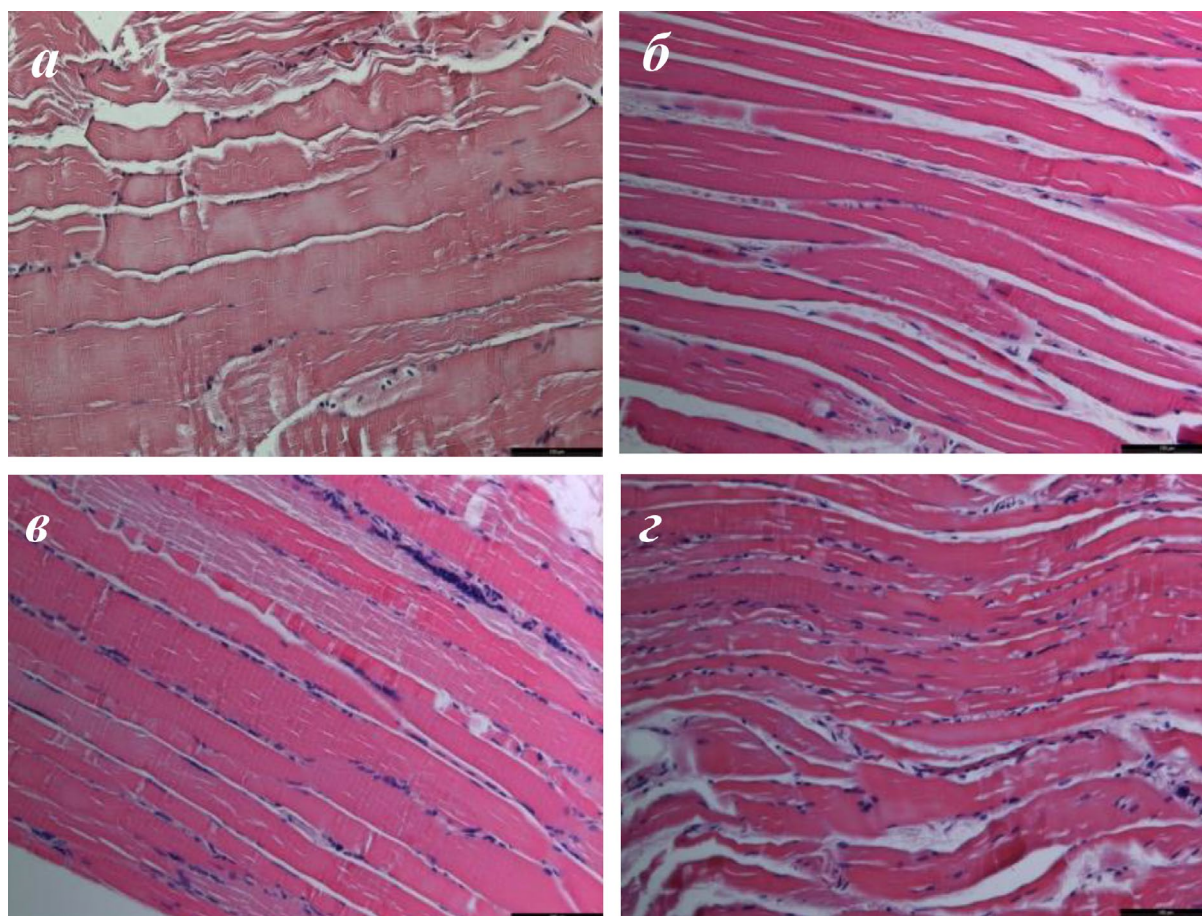


Рис. 1. Репрезентативные микрофотографии продольных срезов скелетных мышц, окрашенные гематоксилин-эозином. Объектив 20×. *а* – Образец участника исследования 35 лет (группа ЗД, $n = 10$); *б* – образец пациента 37 лет (группа МП, $n = 8$); *в* – образец пациента 56 лет (группа СП, $n = 20$); *г* – образец пациента 72 лет (группа ПП, $n = 42$)

вне зависимости от возраста и клинического статуса (рис. 4, *г*).

Данные анализа распределения изозимов в группах различного возраста были подтверждены при помощи электрофореза митохондриальных белков с последующим иммуноблоттингом; репрезентативные блоты представлены на рис. 3.

Полученные данные позволили предположить, что, во-первых, наблюдаемые различия в распределении активности гексокиназы между митохондриями и цитозолем в большей степени определяются возрастом, а не снижением двигательной активности/хроническим воспалением, а во-вторых, выявленные различия связаны с изменением содержания гексокиназы-2, а не -1.

Дыхание изолированных митохондрий. Скорость дыхания изолированных митохондрий определяли при помощи полярографа, оценивая изменение концентрации кислорода во времени; репрезентативные полярограммы представлены на рис. 4, *а*. Полученные значения скорости дыхания митохондрий скелетных мышц в разных состояниях в зависимости от возраста участни-

ков исследования представлены на рис. 4, *б–ж*. Эндогенное дыхание (состояние 1) инициировали добавлением респираторного субстрата пирувата совместно с малатом, как описано выше, а после внесения ингибитора комплекса I – ротенона – дыхание вновь активировали сукцинатом. Он несколько стимулировал дыхание; теперь оно было ограничено отсутствием ADP (акцептора энергии, состояние 2). Добавление 0,1 mM ADP увеличивало частоту дыхания до максимального уровня (состояние 3); однако в течение нескольких минут потребление O_2 снижалось до уровня, предшествующего добавлению ADP, поскольку ADP истощался при фосфорилировании до АТФ (состояние 4). Максимальная скорость потребления O_2 была достигнута после добавления протонофорного разобщителя дыхания и фосфорилирования – FCCP. Блокирование дыхания достигалось добавлением 1 mM цианида калия (KCN), скорость дыхания в его присутствии вычиталась из всех полученных ранее значений [22].

Представленные на рис. 4, *а, е* и *ж* данные демонстрируют изменение скорости дыхания при

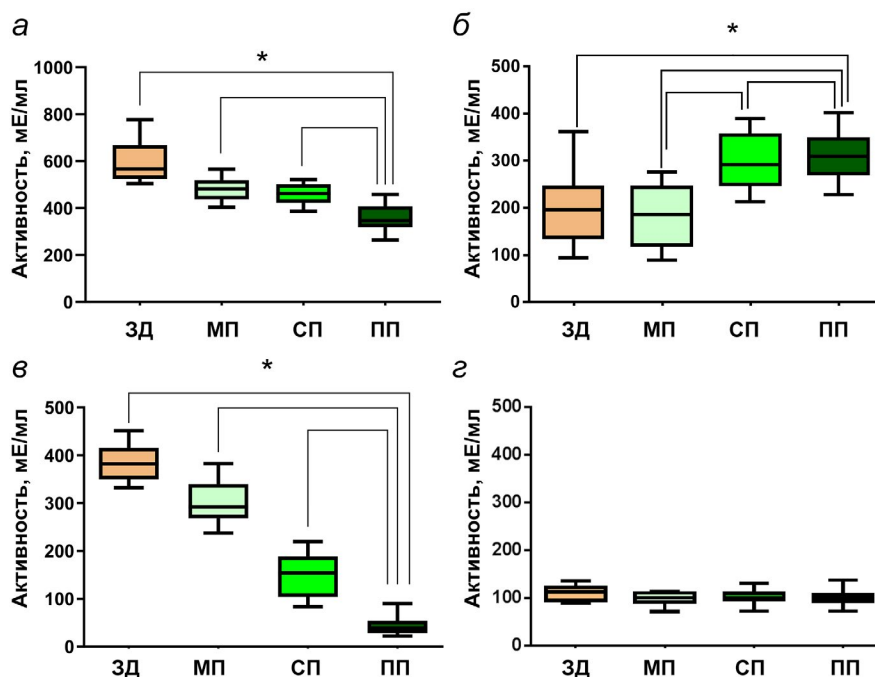


Рис. 2. Активность гексокиназы в скелетной мышце молодых здоровых добровольцев (ЗД, $n = 10$), молодых (МП, $n = 8$), средневозрастных (СП, $n = 20$) и пожилых (ПП, $n = 42$) пациентов. а – Суммарная активность гексокиназы в гомогенате; б – активность гексокиназы цитозольной фракции; в – активность гексокиназы-2, связанной с митохондриями; г – активность гексокиназы-1, связанной с митохондриями. Представлены медианы и интерквартильные разбросы. * $p < 0,05$

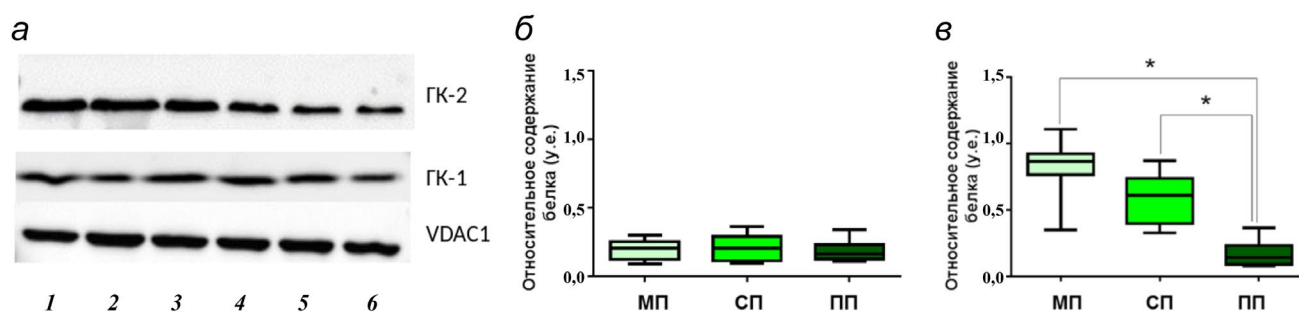


Рис. 3. Содержание I и II изоформ гексокиназы (ГК-1 и 2 соответственно) в митохондриях скелетной мышцы пациентов разного возраста. а – Репрезентативные электрофореграммы: 1 и 2 – молодые пациенты (МП) 37 и 39 лет, 3 и 4 – средневозрастные пациенты (СП) 59 и 60 лет, 5 и 6 – пожилые пациенты (ПП) 77 и 81 лет. Мембранный белок VDAC1 использован как контроль нагрузки митохондриального белка. б – Возрастные изменения содержания ГК-1 (слева) и ГК-2 (справа), для всех групп пациентов $n = 8$, * $p < 0,001$

добавлении 5 мМ глюкозы к митохондриям в состоянии 4 на фоне сукцината после истощения ADP. При этом фактически состояние 3 продолжается и дыхание происходит практически с максимальной скоростью, как если бы добавленный ADP не был истощен, что говорит о его постоянном уровне в микрокомпарменте вследствие гексокиназной реакции при насыщающей концентрации глюкозы и доступе к митохондриальному АТФ, что полностью подтверждает ранее полученные С. Бессманом и Д. Вильсоном данные [7, 39]. Таким образом, можно утверждать, что связанная на поверхности митохондрий гексокиназа сохра-

нила функциональную сопряженность в составе микрокомпартамента при фракционировании митохондрий, т.е. после выделения митохондрии представляли собой высокосопряженный препарат (рис. 4, ж–и).

Было показано, что субстратное дыхание в состоянии 2 достоверно снижается, как при активации комплекса I, так и комплекса II (рис. 4, б и в) для групп средневозрастных и пожилых пациентов в сравнении не только со здоровыми добровольцами, но и с молодыми пациентами. При этом стимулированное дыхание (ADP или FCCP) не различалось между здоровыми добровольцами

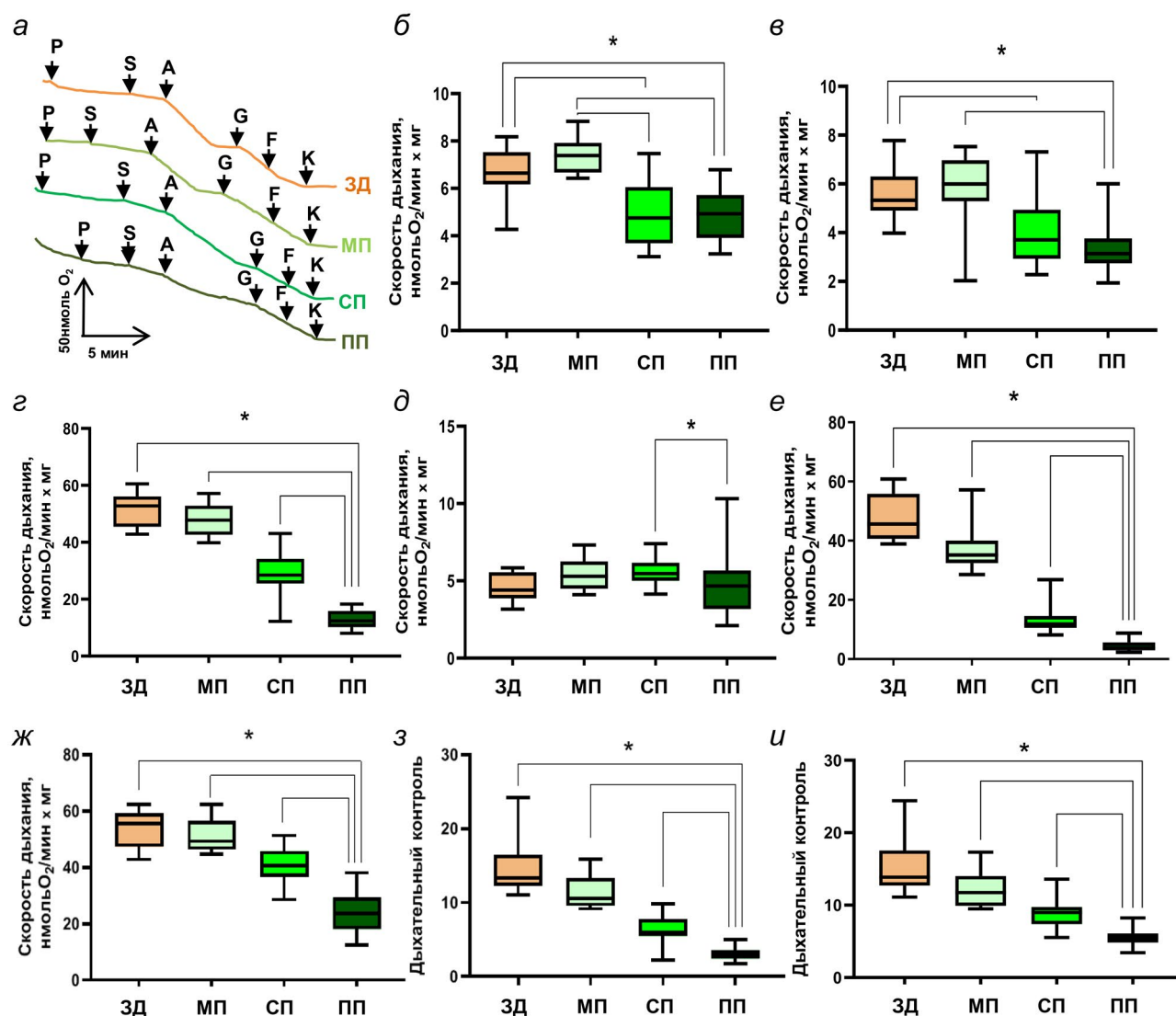


Рис. 4. Дыхание митохондрий скелетной мышцы молодых здоровых добровольцев (ЗД, $n = 10$), молодых (МП, $n = 8$), средневозрастных (СП, $n = 20$) и пожилых (ПП, $n = 42$) пациентов. а – Репрезентативные полярограммы: Р – пируват + малат, S – сукцинат + ротенон, А – ADP, G – глюкоза, F – FCCP, K – KCN; б – скорость дыхания на пирувате с малатом; в – скорость дыхания на сукцинате в присутствии ротенона; г – скорость фосфорилирующего дыхания на сукцинате с ротеноном в присутствии ADP (состояние 3); д – скорость дыхания на сукцинате с ротеноном в состоянии 4; е – скорость фосфорилирующего дыхания на сукцинате с ротеноном в присутствии ADP и глюкозы; ж – скорость разобщенного дыхания в присутствии FCCP; з и и – дыхательный контроль по ADP и FCCP соответственно. Представлены медианы и интерквартильные разбросы; * $p < 0,05$

и молодыми пациентами, но демонстрировало выраженное (кратное) возрастное снижение: для групп «СП» и «ПП» по сравнению со здоровыми добровольцами и для «ПП» по сравнению с молодыми пациентами (рис. 4, г и ж). Эффект продолженного состояния 3 (см. выше) при измерении скорости дыхания в присутствии глюкозы исчезал с возрастом, причём для группы «ПП» различия были значимы по отношению ко всем остальным группам, в том числе средневозрастных пациентов (рис. 4, е).

Продукция перекиси митохондриями. Было показано, что генерация перекиси митохондриями, энергизованными сукцинатом, имеет тен-

денцию к увеличению уже у молодых пациентов по сравнению со здоровыми добровольцами того же возраста (рис. 5, а), однако достоверный прирост этого показателя наблюдался при увеличении возраста пациентов, что коррелировало со степенью диссоциации гексокиназы с мембраной митохондрии (рис. 2, табл. 2) и снижением скорости фосфорилирующего дыхания (рис. 3, рис. S1, в Приложения и табл. 2). Подтверждая ранее полученные нами и другими исследователями данные [15, 40–46], мы обнаружили значимое снижение генерации перекиси водорода митохондриями при стимуляции дыхания в присутствии субстрата гексокиназной реакции ($p < 0,05$ для групп «ЗД»

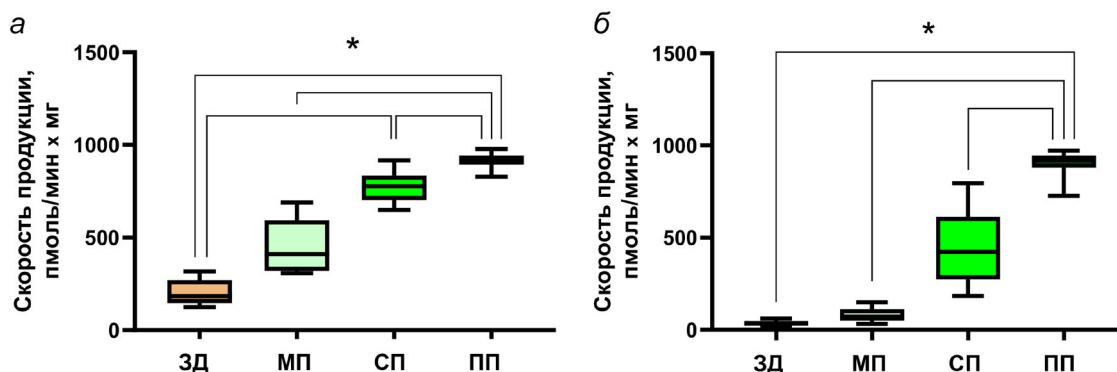


Рис. 5. Продукция перекиси водорода митохондриями скелетной мышцы молодых здоровых добровольцев (ЗД, $n = 10$), молодых (МП, $n = 8$), средневозрастных (СП, $n = 20$) и пожилых (ПП, $n = 42$) пациентов. *а* – Продукция в присутствии сукцината; *б* – продукция в присутствии сукцината при активации митохондриальной гексокиназы субстратами ферментативной реакции. Представлены медианы и интерквартильные разбросы; * $p < 0,05$

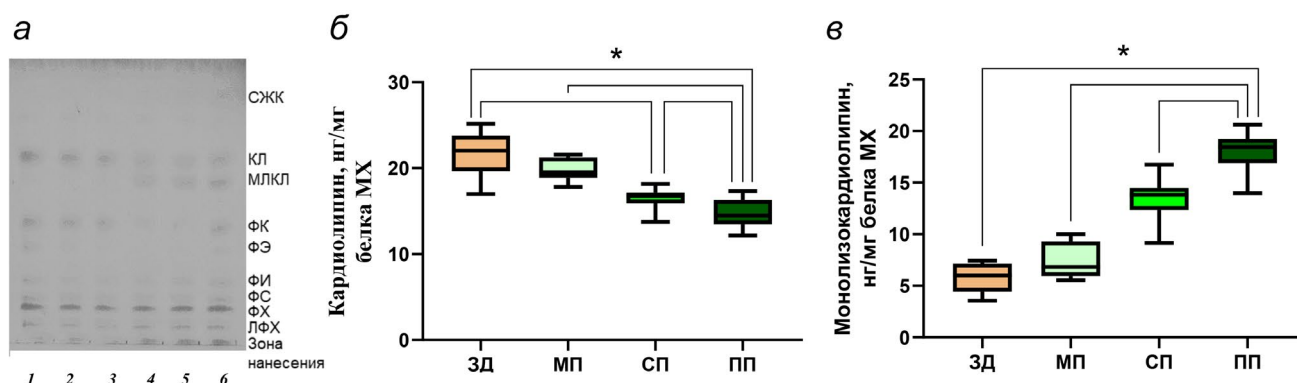


Рис. 6. Содержание кардиолипина в митохондриях скелетной мышцы молодых здоровых добровольцев (ЗД), молодых (МП), средневозрастных (СП) и пожилых (ПП) пациентов, для всех групп $n = 8$. *а* – Репрезентативная тонкослойная хроматограмма: 1–3 – молодые пациенты, 4–6 – пожилые пациенты. СЖК – свободные жирные кислоты, КЛ и МЛКЛ – кардиолипин и монолизокардиолипин, ФК – фосфатидная кислота, ФЭ – фосфатидилэтаноламин, ФИ – фосфатидилинозитол, ФС – фосфатидилсерин, ФХ и ЛФХ – фосфатидилхолин и лизофосфатидилхолин; *б* и *в* – усреднённые значения содержания кардиолипина и монолизокардиолипина, нормированные на содержание фосфатидилхолина

и «МП» на рис. 5, *а* и *б*, см. также рис. S1, *д* Приложения) и выявили отсутствие достоверных изменений для групп «СП» и «ПП». Кроме того, оказалось, что для молодого возраста, вне зависимости от клинического статуса, значения скорости продукции перекиси достоверно снижаются в присутствии глюкозы, т.е. при активации ATP/ADP-челнока в микрокомпарменте гексокиназы и внешней мембраны митохондрий, в то время как в среднем и пожилом возрасте продукция перекиси при добавлении субстрата гексокиназной реакции остаётся высокой (как в присутствии сукцината) (рис. 5, *а* и *б*, а также рис. S2 Приложения).

Содержание кардиолипина в митохондриях. Ранее мы показали важность сохранения интактной структуры и общего содержания митохондриального липида кардиолипина, а также продемонстрировали, что кардиолипин присутствует в составе протеолипидных комплексов ми-

тохондрий, включающих гексокиназу, связанную с VDAC1 [10, 47]. В настоящей работе были выявлены значимые различия в содержании кардиолипина в митохондриях скелетных мышц пожилых пациентов по сравнению с группой здоровых добровольцев ($p < 0,01$) и группой молодых пациентов ($p < 0,05$) (рис. 6, *б*), в то время как для монолизокардиолипина значимые различия наблюдали между следующими группами: пациенты среднего возраста по отношению к здоровым добровольцам ($p < 0,01$) и молодым пациентам ($p < 0,05$); пожилые пациенты и здоровые добровольцы ($p < 0,001$); пожилые пациенты и молодые пациенты ($p < 0,01$). Таким образом, уменьшение содержания митохондриального кардиолипина и накопление монолизокардиолипина не происходит у молодых пациентов относительно здоровых людей, но наблюдается при увеличении возраста пациентов (рис. 6), и это коррелирует с продукцией мАФК (табл. 2).

Таблица 2. Взаимосвязь (коэффициент корреляции Спирмана) показателей, характеризующих функции митохондрии в скелетных мышцах человека, в отдельных группах

Группы	ЗД (n = 10)	МП (n = 8)	СП (n = 20)	ПП (n = 42)
ГК связанная/возраст	нет	r = -0,809 p = 0,015	r = -0,953 p = 0,0012	r = -0,866 p = 0,0002
Дыхание (сукц. + ADP)/возраст	r = -0,814 p = 0,004	нет	r = -0,88 p = 3,2e-7	r = -0,514 p = 3,6e-4
Дыхание (сукц. + ADP + глюк.)/возраст	r = -0,843 p = 0,002	r = -0,8 p = 0,017	r = -0,917 p = 0,001	r = -0,746 p = 0,002
Дыхание (сукц. + ADP + глюк.)/ГК связанная	r = 0,793 p = 0,006	r = 0,921 p = 0,001	r = 0,836 p = 4,5e-6	r = 0,824 p = 6,37e-12
Продукция перекиси (сукц.)/возраст	r = 0,87 p = 0,01	r = 0,77 p = 0,025	r = 0,872 p = 5,5e-7	r = 0,555 p = 9,57e-5
Продукция перекиси (сукц.)/ГК связанная	r = -0,761 p = 0,037	нет	r = -0,887 p = 1,85e-7	r = -0,556 p = 8,92e-5
Продукция перекиси (сукц.)/дыхание (сукц. + ADP + глюк.)	r = -0,703 p = 0,023	нет	r = -0,762 p = 9,34e-5	r = -0,477 p = 0,001
Продукция перекиси (сукц. + ADP + глюк.)/дыхание (сукц. + ADP + глюк.)	r = -0,765 p = 0,01	нет	r = -0,791 p = 3,25e-5	r = -0,766 p = 1,35e-9
Продукция перекиси (сукц. + ADP + глюк.)/ГК связанная	нет	нет	r = -0,932 p = 2,32e-9	r = -0,813 p = 2,07e-11
Продукция перекиси (сукц. + ADP + глюк.)/возраст	r = 0,94 p = 5,21e-5	r = 0,882 p = 0,004	r = 0,925 p = 5,67e-9	r = 0,674 p = 5,22e-7
Продукция перекиси (сукц. + ADP + глюк.)/дыхание (сукц. + ADP)	r = -0,754 p = 0,012	нет	r = -0,854 p = 1,7e-6	нет
ГК общая/возраст	нет	нет	нет	r = -0,361 p = 0,016
Содерж. кардиолипина/дыхание (сукц. + ADP + глюк.)	нет	нет	нет	r = 0,622 p = 6,7e-06
Содерж. кардиолипина/ГК связанная	нет	нет	нет	r = 0,841 p = 9,53e-13
Содерж. кардиолипина/продукция перекиси (сукц.)	нет	нет	нет	r = -0,521 p = 0,00029
Содерж. кардиолипина/продукция перекиси (сукц. + ADP + глюк.)	r = -0,802 p = 0,005	нет	нет	r = -0,612 p = 1,03e-05
Содерж. моноизокардиол./дыхание (сукц. + ADP + глюк.)	нет	r = -0,71 p = 0,048	нет	r = -0,594 p = 2,13e-05
Содерж. моноизокардиол./ГК связанная	нет	r = -0,805 p = 0,016	нет	r = -0,718 p = 3,99e-08
Содерж. моноизокардиол./продукция перекиси (сукц.)	нет	нет	нет	r = 0,432 p = 0,003
Содерж. моноизокардиол./продукция перекиси (сукц. + ADP + глюк.)	нет	нет	нет	r = 0,544 p = 0,00014
Дых. контроль (FCCP)/возраст	нет	нет	нет	r = -0,874 p = 0,0002

Таблица 2 (окончание)

Группы	ЗД (n = 10)	МП (n = 8)	СП (n = 20)	ПП (n = 42)
Дыхание (сукц. + ADP)/ИМТ	нет	$r = 0,719$ $p = 0,044$	нет	нет
НОМА-IR/ГК связанная	нет	нет	нет	нет
НОМА-IR/дыхание (сукц. + ADP)	нет	нет	нет	нет
НОМА-IR/возраст	$r = 0,94$ $p = 5e-5$	$r = 0,882$ $p = 0,004$	$r = 0,925$ $p = 0,0001$	$r = 0,674$ $p = 2e-5$
НОМА-IR/ИМТ	нет	нет	$r = 0,453$ $p = 0,045$	$r = 0,472$ $p = 0,001$
НОМА-IR/ дыхание (сукц. + ADP + глюк.)	нет	нет	$r = 0,448$ $p = 0,047$	нет

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В работе исследовали влияние снижения двигательной активности/хронического воспаления у молодых людей, а также возраста у пациентов с артрозом коленного/тазобедренного сустава на регуляцию продукции мАФК в скелетной мышце человека. Впервые для мышечной ткани человека была показана ассоциация возраст-зависимого увеличения продукции перекиси водорода митохондриями со снижением доли гексокиназы-2, связанной с митохондриями. Это подтверждается данными о возраст-зависимом изменении распределения гексокиназы-2 между митохондриальной и цитозольной фракциями и снижении скорости сопряжённого дыхания выделенных митохондрий и дыхания при стимуляции глюкозой – субстратом гексокиназы. Эти наблюдения хорошо согласуются и дополняют наши предыдущие данные по исследованию продукции мАФК тканями долго- и короткоживущих грызунов [15].

Можно предположить, что описанное нами возраст-зависимое снижение эффективности сопряжённого дыхания митохондрий скелетных мышц (рис. 4, 2) связано с увеличением энергодефицита в стареющей мышце, которое ранее было показано в работах на грызунах и первичных миобластах человека (для обзора см. работы Bratic et al., Pedersen et al. [48, 49]). Выраженное возрастное падение чувствительности выделенных митохондрий к ADP (рис. 4, 2) подтвердило показанный Г. Холлоуэй и коллегами эффект уменьшения ADP-индуцируемого снижения продукции перекиси в пермеабилizованных мышечных волокнах пожилых людей по сравнению с молодыми [50]. При этом отсутствие влияния добавления гексокиназы на дыхание и генерацию перекиси в цитируемой работе можно объяснить тем, что, во-первых, для сохранения микрокомпартамента в интактном со-

стоянии при фракционировании митохондрий необходимо присутствие в среде ионов Mg^{2+} ; во-вторых, при выделении митохондрий реассоциация гексокиназы с внешней мембраной не происходит зеркально диссоциации и требует специальных условий; в-третьих, добавленный фермент примерно в десять раз менее эффективен, в сравнении с адсорбированным, для стимуляции дыхания ADP, образующимся при фосфорилировании глюкозы [39, 51].

Вызванные окислительным стрессом патологические состояния скелетных мышц особенно ярко проявляются при старении, что приводит к апоптозу, атрофии и мышечной дисфункции [52–54]. Всё больше данных в литературе указывает на связь между окислительным стрессом, вызываемым избыточной продукцией мАФК гиперполяризованными митохондриями, и гипергликемией [13, 15, 44, 55]. Наши данные подтверждают это наблюдение и частично объясняют механизмы, ответственные за эти изменения [52]. Гексокиназа-2, в отличие от остальных изозимов этого фермента, имеет второй (не каталитический) сайт связывания глюкозы; оккупация этого сайта, вызванная гипергликемией, блокирует связывание с ним шаперона HSP7C (Heat shock cognate 71, кодируемого геном *HSPA8*), индуцирующего протеолитическую деградацию гексокиназы [44]. Это приводит к повышению внутриклеточного содержания гексокиназы-2 и накоплению глюкозо-6-фосфата, который обладает солубилизирующим действием и вызывает десорбцию гексокиназы с поверхности митохондрий. По-видимому, эти события лежат в основе наблюдаемого нами и другими авторами возраст-зависимого разрушения микрокомпартамента внешней мембраны, включающего гексокиназу-2 [14, 15], что ведёт не только к увеличению мембранного потенциала, повышению продукции мАФК и окислительному стрессу, но и может вы-

звать апоптоз за счёт связывания проапоптотического белка Вах с VDAC1 [56].

Мы обнаружили коррелирующее с возрастом снижение содержания кардиолипина в митохондриях скелетных мышц (рис. 5, табл. 2). Известно, что ADP/АТР-трансфераза 1 (ANT), входящая в микрокомпартмент и локализованная во внутренней мембране, входит в протеолипидный комплекс контактных сайтов митохондрий [57], включающий 3 молекулы прочносвязанного кардиолипина; при этом окисление кардиолипина приводит к нарушению структуры этого комплекса [58, 59]. Ранее было показано, что нарушение конформации ANT приводит к разрушению его комплекса с VDAC1 и контактных сайтов митохондрии [60]. Можно предположить, что обнаруженное нами возраст-зависимое снижение содержания кардиолипина в митохондриях скелетных мышц человека, коррелирующее с количеством связанной гексокиназы, продукцией МАФК и фосфорилирующего дыхания, является частью общего механизма нарушения мягкой деполяризации митохондрий скелетных мышц при старении. Это предположение открывает перспективы для дальнейших исследований по изучению механизмов, лежащих в основе возраст-зависимого нарушения структуры контактных сайтов митохондрий, которые ассоциированы с ремоделингом кардиолипина при окислительном стрессе. Исследование этих механизмов представляется перспективным для поиска фармакологических/физиологических подходов к коррекции возрастных патологий скелетных мышц, вызванных нарушениями в окислении глюкозы и продукции МАФК.

Вклад авторов. М.Ю. Высоких, А.Ю. Ефименко, Д.В. Попов, В.П. Скулачёв – концепция и руководство работой; М.Ю. Высоких, М.А. Виговский, В.В. Филиппов, Я.Р. Бородай, М.В. Марей, О.А. Григорьева, Т.Ф. Вепхвадзе, Н.С. Курочкина, Л.А. Манухова – проведение экспериментов; М.Ю. Высоких, М.А. Виговский, А.Ю. Ефименко, Д.В. Попов, В.П. Скулачёв – обсуждение результатов исследования; М.Ю. Высоких, А.Ю. Ефименко, Д.В. Попов – написание текста; М.Ю. Высоких, А.Ю. Ефименко, Д.В. Попов – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа была поддержана грантом РНФ № 21-15-00405 (исследование со здоровыми добровольцами, эксперименты с дыханием митохондрий) и государственным заданием МНОЦ МГУ имени М.В. Ломоносова (исследование с пациентами, клинические и гистологические исследования).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и её последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включённых в исследование участников было получено информированное добровольное согласие. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием животных в качестве объектов.

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Harman, D. (1972) The biologic clock: the mitochondria? *J. Am. Geriatr. Soc.*, **20**, 145-147, <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.1972.tb00787.x>.
2. Anderson, C. M., Hu, J., Barnes, R. M., Heidt, A. B., Cornelissen, I., and Black, B. L. (2015) Myocyte enhancer factor 2C function in skeletal muscle is required for normal growth and glucose metabolism in mice, *Skelet. Muscle*, **5**, 7, <https://doi.org/10.1186/s13395-015-0031-0>.
3. Hargreaves, M. (2004) Muscle glycogen and metabolic regulation, *Proc. Nutr. Soc.*, **63**, 217-220, <https://doi.org/10.1079/PNS2004344>.
4. Fealy, C. E., Grevendonk, L., Hoeks, J., and Hesselink, M. K. C. (2021) Skeletal muscle mitochondrial network dynamics in metabolic disorders and aging, *Trends Mol. Med.*, **27**, 1033-1044, <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2021.07.013>.
5. Vogt, C., Yki-Jarvinen, H., Iozzo, P., Pipek, R., Pendergrass, M., Koval, J., Ardehali, H., Printz, R., Granner, D., Defronzo, R., and Mandarino, L. (1998) Effects of insulin on subcellular localization of hexokinase II in human skeletal muscle *in vivo*, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **83**, 230-234, <https://doi.org/10.1210/jcem.83.1.4476>.
6. Wilson, J. E. (2003) Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function, *J. Exp. Biol.*, **206**, 2049-2057, <https://doi.org/10.1242/jeb.00241>.
7. Gots, R. E., Gorin, F. A., and Bessman, S. P. (1972) Kinetic enhancement of bound hexokinase activity by mitochondrial respiration, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **49**, 1249-1255, [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(72\)90602-x](https://doi.org/10.1016/0006-291x(72)90602-x).
8. Sui, D., and Wilson, J. E. (1997) Structural determinants for the intracellular localization of the isozymes of mammalian hexokinase: intracellular localization of fusion constructs incorporating structural elements from the hexokinase isozymes and the green fluorescent protein, *Arch. Biochem. Biophys.*, **345**, 111-125, <https://doi.org/10.1006/abbi.1997.0241>.

9. Brdiczka, D., Knoll, G., Riesinger, I., Weiler, U., Klug, G., Benz, R., and Krause, J. (1986) Microcompartmentation at the mitochondrial surface: its function in metabolic regulation, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **194**, 55-69, https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5107-8_5.
10. Vyssokikh, M., and Brdiczka, D. (2004) VDAC and peripheral channelling complexes in health and disease, *Mol. Cell Biochem.*, **256-257**, 117-126, <https://doi.org/10.1023/b:mcbi.0000009863.69249.d9>.
11. Cadenas, E., Boveris, A., Ragan, C. I., and Stoppani, A. O. (1977) Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria, *Arch. Biochem. Biophys.*, **180**, 248-257, [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(77\)90035-2](https://doi.org/10.1016/0003-9861(77)90035-2).
12. Morse, P. T., Wan, J., Bell, J., Lee, I., Goebel, D. J., Malek, M. H., Sanderson, T. H., and Huttemann, M. (2022) Sometimes less is more: inhibitory infrared light during early reperfusion calms hyperactive mitochondria and suppresses reperfusion injury, *Biochem. Soc. Trans.*, **50**, 1377-1388, <https://doi.org/10.1042/BST20220446>.
13. Korshunov, S. S., Skulachev, V. P., and Starkov, A. A. (1997) High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria, *FEBS Lett.*, **416**, 15-18, [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(97\)01159-9](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(97)01159-9).
14. Da-Silva, W. S., Gomez-Puyou, A., de Gomez-Puyou, M. T., Moreno-Sanchez, R., De Felice, F. G., de Meis, L., Oliveira, M. F., and Galina, A. (2004) Mitochondrial bound hexokinase activity as a preventive antioxidant defense: steady-state ADP formation as a regulatory mechanism of membrane potential and reactive oxygen species generation in mitochondria, *J. Biol. Chem.*, **279**, 39846-39855, <https://doi.org/10.1074/jbc.M403835200>.
15. Vyssokikh, M. Y., Holtze, S., Averina, O. A., Lyamzaev, K. G., Panteleeva, A. A., Marey, M. V., Zinovkin, R. A., Severin, F. F., Skulachev, M. V., Fasel, N., Hildebrandt, T. B., and Skulachev, V. P. (2020) Mild depolarization of the inner mitochondrial membrane is a crucial component of an anti-aging program, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 6491-6501, <https://doi.org/10.1073/pnas.1916414117>.
16. Callahan, D. M., Miller, M. S., Sweeny, A. P., Tourville, T. W., Slaughterbeck, J. R., Savage, P. D., Maugan, D. W., Ades, P. A., Beynnon, B. D., and Toth, M. J. (2014) Muscle disuse alters skeletal muscle contractile function at the molecular and cellular levels in older adult humans in a sex-specific manner, *J. Physiol.*, **592**, 4555-4573, <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.279034>.
17. Callahan, D. M., Tourville, T. W., Miller, M. S., Hackett, S. B., Sharma, H., Cruickshank, N. C., Slaughterbeck, J. R., Savage, P. D., Ades, P. A., Maughan, D. W., Beynnon, B. D., and Toth, M. J. (2015) Chronic disuse and skeletal muscle structure in older adults: sex-specific differences and relationships to contractile function, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **308**, C932-943, <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00014.2015>.
18. Miller, M. S., Callahan, D. M., Tourville, T. W., Slaughterbeck, J. R., Kaplan, A., Fiske, B. R., Savage, P. D., Ades, P. A., Beynnon, B. D., and Toth, M. J. (2017) Moderate-intensity resistance exercise alters skeletal muscle molecular and cellular structure and function in inactive older adults with knee osteoarthritis, *J. Appl. Physiol.*, **122**, 775-787, <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00830.2016>.
19. Suetta, C., Aagaard, P., Magnusson, S. P., Andersen, L. L., Sipila, S., Rosted, A., Jakobsen, A. K., Duus, B., and Kjaer, M. (2007) Muscle size, neuromuscular activation, and rapid force characteristics in elderly men and women: effects of unilateral long-term disuse due to hip-osteoarthritis, *J. Appl. Physiol.*, **102**, 942-948, <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00067.2006>.
20. Ware, J., Jr., Kosinski, M., and Keller, S. D. (1996) A 12-Item Short-Form Health Survey: construction of scales and preliminary tests of reliability and validity, *Med. Care*, **34**, 220-233, <https://doi.org/10.1097/00005650-199603000-00003>.
21. Popov, D. V., Makhnovskii, P. A., Shagimardanova, E. I., Gazizova, G. R., Lysenko, E. A., Gusev, O. A., and Vinogradova, O. L. (2019) Contractile activity-specific transcriptome response to acute endurance exercise and training in human skeletal muscle, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **316**, E605-E614, <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00449.2018>.
22. Skulachev, V. P., Bogachev, A. V., and Kasparinsky, F. O. (2013) Comprehensive up-to-date treatment of molecular bioenergetic mechanisms, *Principl. Bioenerg.*, <https://doi.org/10.1007/978-3-642-33430-6>.
23. Gnaiger, E., Kuznetsov, A. V., Schneeberger, S., Seiler, R., Brandacher, G., Steurer, W., and Margreiter, R. (2000) Mitochondria in the cold, *Life Cold*, 431-442, https://doi.org/10.1007/978-3-662-04162-8_45.
24. Zhou, M., Diwu, Z., Panchuk-Voloshina, N., and Haugland, R. P. (1997) A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases, *Anal. Biochem.*, **253**, 162-168, <https://doi.org/10.1006/abio.1997.2391>.
25. Shabalina, I. G., Vyssokikh, M. Y., Gibanova, N., Csikasz, R. I., Edgar, D., Hallden-Waldemarson, A., Rozhdestvenskaya, Z., Bakeeva, L. E., Vays, V. B., Pustovidko, A. V., Skulachev, M. V., Cannon, B., Skulachev, V. P., and Nedergaard, J. (2017) Improved health-span and lifespan in mtDNA mutator mice treated with the mitochondrially targeted anti-oxidant SkQ1, *Aging (Albany NY)*, **9**, 315-339, <https://doi.org/10.18632/aging.101174>.
26. Antonenko, Y. N., Avetisyan, A. V., Bakeeva, L. E., Chernyak, B. V., Chertkov, V. A., Domnina, L. V., Ivanova, O. Y., Izyumov, D. S., Khailova, L. S., Klishin, S. S., Korshunova, G. A., Lyamzaev, K. G., Muntyan, M. S., Nepryakhina, O. K.,

- Pashkovskaya, A. A., Pletjushkina, O. Y., Pustovidko, A. V., Roginsky, V. A., Rokitskaya, T. I., Ruuge, E. K., et al. (2008) Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 1. Cationic plastoquinone derivatives: synthesis and *in vitro* studies, *Biochemistry (Moscow)*, **73**, 1273-1287, <https://doi.org/10.1134/s0006297908120018>.
27. Shabalina, I. G., Vrbacky, M., Pecinova, A., Kalinovich, A. V., Drahota, Z., Houstek, J., Mracek, T., Cannon, B., and Nedergaard, J. (2014) ROS production in brown adipose tissue mitochondria: the question of UCP1-dependence, *Biochim. Biophys. Acta*, **1837**, 2017-2030, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2014.04.005>.
 28. Scheer, W. D., Lehmann, H. P., and Beeler, M. F. (1978) An improved assay for hexokinase activity in human tissue homogenates, *Anal. Biochem.*, **91**, 451-463, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90531-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90531-6).
 29. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685, <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
 30. Buscher, T., Luh, E., and Pette, D. (1964) Simple and Compound Optical Tests with Pyridine Nucleotides, in *Hoppe-Seyler/Thierfelder, Handbook of Physiological and Pathological Chemical Analysis* [in German], **VI/A**, 292-339.
 31. Bligh, E. G., and Dyer, W. J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911-917, <https://doi.org/10.1139/o59-099>.
 32. Pinault, M., Guimaraes, C., Dumas, J., Servais, S., Chevalier, S., Besson, P., and Goupille, C. (2020) A 1D high performance thin layer chromatography method validated to quantify phospholipids including cardiolipin and monolysocardiolipin from biological samples, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **122**, <https://doi.org/10.1002/ejlt.201900240>.
 33. Kruszynska, Y. T., Mulford, M. I., Baloga, J., Yu, J. G., and Olefsky, J. M. (1998) Regulation of skeletal muscle hexokinase II by insulin in nondiabetic and NIDDM subjects, *Diabetes*, **47**, 1107-1113, <https://doi.org/10.2337/diabetes.47.7.1107>.
 34. Vestergaard, H., Bjoerbaek, C., Hansen, T., Larsen, F. S., Granner, D. K., and Pedersen, O. (1995) Impaired activity and gene expression of hexokinase II in muscle from non-insulin-dependent diabetes mellitus patients, *J. Clin. Invest.*, **96**, 2639-2645, <https://doi.org/10.1172/JCI118329>.
 35. Ritov, V. B., and Kelley, D. E. (2001) Hexokinase isozyme distribution in human skeletal muscle, *Diabetes*, **50**, 1253-1262, <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.6.1253>.
 36. Mandarino, L. J., Printz, R. L., Cusi, K. A., Kinchington, P., O'Doherty, R. M., Osawa, H., Sewell, C., Consoli, A., Granner, D. K., and DeFronzo, R. A. (1995) Regulation of hexokinase II and glycogen synthase mRNA, protein, and activity in human muscle, *Am. J. Physiol.*, **269**, E701-708, <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1995.269.4.E701>.
 37. Wilson, J. E. (1995) Hexokinases, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **126**, 65-198, <https://doi.org/10.1007/BFb0049776>.
 38. Cunha, T. F., Vieira, J. S., Santos, J. B., Coelho, M. A., Brum, P. C., and Gabriel-Costa, D. (2022) Lactate modulates cardiac gene expression in mice during acute physical exercise, *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **55**, e11820, <https://doi.org/10.1590/1414-431X2022e11820>.
 39. BeltrandelRio, H., and Wilson, J. E. (1991) Hexokinase of rat brain mitochondria: relative importance of adenylate kinase and oxidative phosphorylation as sources of substrate ATP, and interaction with intramitochondrial compartments of ATP and ADP, *Arch. Biochem. Biophys.*, **286**, 183-194, [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(91\)90026-f](https://doi.org/10.1016/0003-9861(91)90026-f).
 40. Saraiva, L. M., Seixas da Silva, G. S., Galina, A., da-Silva, W. S., Klein, W. L., Ferreira, S. T., and De Felice, F. G. (2010) Amyloid-beta triggers the release of neuronal hexokinase 1 from mitochondria, *PLoS One*, **5**, e15230, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015230>.
 41. De-Souza-Ferreira, E., Rios-Neto, I. M., Martins, E. L., and Galina, A. (2019) Mitochondria-coupled glucose phosphorylation develops after birth to modulate H₂ O₂ release and calcium handling in rat brain, *J. Neurochem.*, **149**, 624-640, <https://doi.org/10.1111/jnc.14705>.
 42. Silva-Rodrigues, T., de-Souza-Ferreira, E., Machado, C. M., Cabral-Braga, B., Rodrigues-Ferreira, C., and Galina, A. (2020) Hyperglycemia in a type 1 Diabetes Mellitus model causes a shift in mitochondria coupled-glucose phosphorylation and redox metabolism in rat brain, *Free Radic. Biol. Med.*, **160**, 796-806, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.09.017>.
 43. Tan, V. P., Smith, J. M., Tu, M., Yu, J. D., Ding, E. Y., and Miyamoto, S. (2019) Dissociation of mitochondrial HK-II elicits mitophagy and confers cardioprotection against ischemia, *Cell Death Dis.*, **10**, 730, <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1965-7>.
 44. Rabbani, N., Xue, M., and Thornalley, P. J. (2022) Hexokinase-2-linked glycolytic overload and unscheduled glycolysis-driver of insulin resistance and development of vascular complications of diabetes, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, <https://doi.org/10.3390/ijms23042165>.
 45. Bryson, J. M., Coy, P. E., Gottlob, K., Hay, N., and Robey, R. B. (2002) Increased hexokinase activity, of either ectopic or endogenous origin, protects renal epithelial cells against acute oxidant-induced cell death, *J. Biol. Chem.*, **277**, 11392-11400, <https://doi.org/10.1074/jbc.M110927200>.
 46. Ahmad, A., Ahmad, S., Schneider, B. K., Allen, C. B., Chang, L. Y., and White, C. W. (2002) Elevated expression of hexokinase II protects human lung epithelial-like A549 cells against oxidative injury, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, **283**, L573-584, <https://doi.org/10.1152/ajplung.00410.2001>.

47. Shilovsky, G. A., Putyatina, T. S., Ashapkin, V. V., Yamskova, O. V., Lyubetsky, V. A., Sorokina, E. V., Shram, S. I., Markov, A. V., and Vyssokikh, M. Y. (2019) Biological diversity and remodeling of cardiolipin in oxidative stress and age-related pathologies, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 1469-1483, <https://doi.org/10.1134/S000629791912006X>.
48. Bratic, I., and Trifunovic, A. (2010) Mitochondrial energy metabolism and ageing, *Biochim. Biophys. Acta*, **1797**, 961-967, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.01.004>.
49. Pedersen, Z. O., Pedersen, B. S., Larsen, S., and Dysgaard, T. (2023) A scoping review investigating the “gene-dosage theory” of mitochondrial DNA in the healthy skeletal muscle, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, <https://doi.org/10.3390/ijms24098154>.
50. Holloway, G. P., Holwerda, A. M., Miotto, P. M., Dirks, M. L., Verdijk, L. B., and van Loon, L. J. C. (2018) Age-associated impairments in mitochondrial ADP sensitivity contribute to redox stress in senescent human skeletal muscle, *Cell Rep.*, **22**, 2837-2848, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.02.069>.
51. BeltrandelRio, H., and Wilson, J. E. (1992) Coordinated regulation of cerebral glycolytic and oxidative metabolism, mediated by mitochondrially bound hexokinase dependent on intramitochondrially generated ATP, *Arch. Biochem. Biophys.*, **296**, 667-677, [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(92\)90625-7](https://doi.org/10.1016/0003-9861(92)90625-7).
52. Vincent, A. M., Olzmann, J. A., Brownlee, M., Sivitz, W. I., and Russell, J. W. (2004) Uncoupling proteins prevent glucose-induced neuronal oxidative stress and programmed cell death, *Diabetes*, **53**, 726-734, <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.3.726>.
53. Bellanti, F., Lo Buglio, A., and Vendemiale, G. (2022) Muscle delivery of mitochondria-targeted drugs for the treatment of sarcopenia: rationale and perspectives, *Pharmaceutics*, **14**, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14122588>.
54. Russell, J. W., Golovoy, D., Vincent, A. M., Mahendru, P., Olzmann, J. A., Mentzer, A., and Feldman, E. L. (2002) High glucose-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurons, *FASEB J.*, **16**, 1738-1748, <https://doi.org/10.1096/fj.01-1027com>.
55. Green, K., Brand, M. D., and Murphy, M. P. (2004) Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes, *Diabetes*, **53 Suppl 1**, S110-118, <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.2007.s110>.
56. Vyssokikh, M. Y., Zorova, L., Zorov, D., Heimlich, G., Jurgensmeier, J. J., and Brdiczka, D. (2002) Bax releases cytochrome c preferentially from a complex between porin and adenine nucleotide translocator. Hexokinase activity suppresses this effect, *Mol. Biol. Rep.*, **29**, 93-96, <https://doi.org/10.1023/a:1020383108620>.
57. Beutner, G., Ruck, A., Riede, B., and Brdiczka, D. (1997) Complexes between hexokinase, mitochondrial porin and adenylate translocator in brain: regulation of hexokinase, oxidative phosphorylation and permeability transition pore, *Biochem. Soc. Trans.*, **25**, 151-157, <https://doi.org/10.1042/bst0250151>.
58. Kunji, E. R., Aleksandrova, A., King, M. S., Majd, H., Ashton, V. L., Cerson, E., Springett, R., Kibalchenko, M., Tavoulari, S., Crichton, P. G., and Ruprecht, J. J. (2016) The transport mechanism of the mitochondrial ADP/ATP carrier, *Biochim. Biophys. Acta*, **1863**, 2379-2393, <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.03.015>.
59. Duncan, A. L., Ruprecht, J. J., Kunji, E. R. S., and Robinson, A. J. (2018) Cardiolipin dynamics and binding to conserved residues in the mitochondrial ADP/ATP carrier, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, **1860**, 1035-1045, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.01.017>.
60. Allouche, M., Pertuiset, C., Robert, J. L., Martel, C., Veneziano, R., Henry, C., dein, O. S., Saint, N., Brenner, C., and Chopineau, J. (2012) ANT-VDAC1 interaction is direct and depends on ANT isoform conformation *in vitro*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **429**, 12-17, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.10.108>.

AGE-DEPENDENT CHANGES IN THE PRODUCTION OF MITOCHONDRIAL REACTIVE OXYGEN SPECIES IN HUMAN SKELETAL MUSCLE

**M. Y. Vyssokikh^{1,2,3*}, M. A. Vigovskiy⁴, V. V. Philippov⁴, Y. R. Boroday⁴, M. V. Marey²,
O. A. Grigorieva⁴, T. F. Vepkhvadze³, N. S. Kurochkina³, L. A. Manukhova²,
A. Yu. Efimenko⁴, D. V. Popov³, and V. P. Skulachev¹**

¹ Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
119992 Moscow, Russia; e-mail: mikhail.vyssokikh@gmail.com; mike@genebee.msu.ru

² National Medical Research Center for Obstetrics,
Gynecology and Perinatology Named after Academician V. I. Kulakov, 117997 Moscow, Russia

³ Institute of Biomedical Problems of the Russian Academy of Sciences, 123007 Moscow, Russia

⁴ Medical Research and Educational Center of Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia

A decrease in muscle mass and its functionality (strength, performance and insulin sensitivity) is one of the integral signs of aging. One of the triggers of aging is an increase in the production of mitochondrial reactive oxygen species. In our study, for the first time, age-dependent changes in the production of mitochondrial reactive oxygen species associated with a decrease in the proportion of mitochondria-associated hexokinase-2 in human skeletal muscle were studied. For this purpose, a biopsy from *m. vastus lateralis* in 10 young healthy volunteers and 70 patients (26-85 years old) with long-term primary arthrosis of the knee/hip joint was taken. It turned out that aging (comparison of different groups of patients), in contrast to inactivity/chronic inflammation (comparison of young healthy people and young patients), causes a pronounced increase in peroxide production by isolated mitochondria. This correlated with an age-dependent disruption of the mechanism of mild depolarization of mitochondria, namely with the distribution of hexokinase between the mitochondrial and cytosolic fractions, a decrease in the rate of coupled respiration of isolated mitochondria and respiration stimulated by glucose (the substrate of hexokinase). It is discussed that these changes may be caused by an age-dependent decrease in the content of cardiolipin, a potential regulator of the mitochondrial microcompartment containing hexokinase. The results obtained contribute to a deeper understanding of age-related pathogenetic processes in skeletal muscles and open prospects for the search for pharmacological/physiological approaches to the correction of these pathologies.

Keywords: aging, skeletal muscle, mitochondria, mitochondrial reactive oxygen species, hexokinase