

ВЛИЯНИЕ TRO19622 (ОЛЕСОКСИМА) НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ИЗОЛИРОВАННЫХ МИТОХОНДРИЙ И ВЫЖИВАЕМОСТЬ КЛЕТОК

© 2024 г. А.И. Ильзоркина^{*,**}, Н.В. Белослудцева^{*,**}, А.А. Семёнова^{*}, М.В. Дубинин^{*}, К.Н. Белослудцев^{*,#}

^{*}Марийский государственный университет, пл. Ленина, 1, Йошкар-Ола, 424000, Россия

^{**}Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, ул. Институтская, 3, Пущино Московской области, 142290, Россия

[#]E-mail: bekonik@gmail.com

Поступила в редакцию 15.03.2024 г.

После доработки 15.03.2024 г.

Принята к публикации 19.06.2024 г.

TRO19622 (олесоксим, холестерин-подобный цитопротектор) – экспериментальный препарат, разработанный для потенциальной терапии ряда неизлечимых дегенеративных заболеваний. Основной молекулярной мишенью данного соединения в клетке служат пориновые белки внешней митохондриальной мембраны, которые выполняют ключевую роль в регуляции обмена метаболитами между митохондриями и остальной частью клетки. Нарушения активности данных каналов может вызывать развитие митохондриальной дисфункции в здоровых клетках. В работе проведена оценка основных показателей функционирования митохондрий и индекса жизнеспособности клеток в культурах после их инкубации с TRO19622. Установлено, что TRO19622 в концентрациях 15–30 мкМ ингибирует скорости фосфорилирующего и разобщенного дыхания изолированных митохондрий (состояния 3 и 3UDNP) при использовании сукцината в качестве субстрата, однако не влияет на ферментативную активность комплексов I–IV дыхательной цепи. Показано, что TRO19622 в исследуемых дозах не влияет на скорость образования H_2O_2 в митохондриях и параметр кальциевой емкости, отражающий резистентность органелл к открытию кальций-зависимой неспецифической поры. Инкубация фибробластов кожи человека и клеток аденокарциномы молочной железы (MCF-7) с 30 мкМ TRO19622 в течение 48 ч не оказывает влияния на продукцию активных форм кислорода и жизнеспособность клеток. Обсуждаются механизмы действия TRO19622 на систему окислительного фосфорилирования и перспективы использования данного митохондриально-направленного терапевтического агента.

Ключевые слова: VDAC, митохондрии, митохондриальное дыхание, окислительное фосфорилирование, АФК, жизнеспособность клеточных культур.

DOI: 10.31857/S0006302924040068, EDN: NHRMXT

Работа клеток в нормальных условиях зависит от скоординированного обмена метаболитами между клетками и внутриклеточными структурами. Митохондрии играют центральную роль в регуляции метаболизма клеток. Они обеспечивают клетки энергией, высвобождаемой в результате окисления субстратов в ходе реакций окислительного фосфорилирования, и участвуют в целом ряде других жизненно важных процессов, таких как кальциевая сигнализация, клеточный цикл, коммуникация между органеллами, кле-

точная дифференцировка, пролиферация и запрограммированная гибель. Таким образом, митохондрии часто выступают как ключевой центр, определяющий судьбу клетки при физиологических и патологических состояниях [1–3].

Ключевыми белками внешней митохондриальной мембраны, обеспечивающими транспорт большинства водорастворимых метаболитов (включая молекулы АТФ, АДФ и т.д.) и ионов, являются потенциал-зависимые ионные каналы (VDAC), или порины. Это группа порообразующих белков с β -баррельной структурой, кодируемых тремя разными генами у эукариот и имеющих молекулярную массу 30–35 кДа [4]. Все три изоформы VDAC-каналов экспрессируются в разных тканях

Сокращения: VDAC – потенциал-зависимые ионные каналы, МРПР – кальций-зависимая неселективная пора (mitochondrial permeability transition pore), АФК – активные формы кислорода.

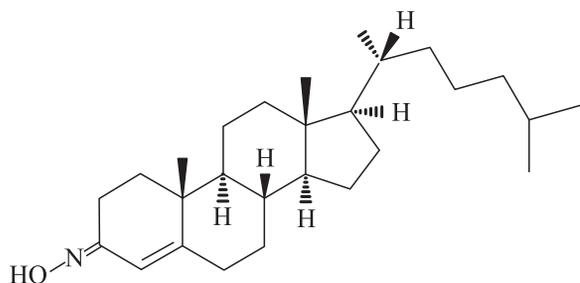


Рис. 1. Структура TRO19622.

и играют важную роль в энергетическом метаболизме клеток. В полностью открытом состоянии VDAC-каналы имеют диаметр 2.5–3.0 нм и пропускают основные метаболиты и анионы, тогда как в закрытом состоянии диаметр поры сокращается до 1.8 нм и их транспорт резко снижается, но ускоряется транспорт ионов кальция в 4–10 раз. Такие изменения в активности VDAC происходят при модуляции мембранного потенциала на внешней мембране митохондрий (переход от 0 мВ к ± 20 –40 мВ) или действию ряда соединений-эффекторов, способных изменять потенциал-зависимые характеристики каналов [5]. Хотя закрытие VDAC может способствовать установлению стабильного состояния и предотвращению изменения объема митохондриального матрикса за счет подавления транспорта одновалентных ионов, чрезмерное накопление ионов Ca^{2+} способно вызвать открытие кальций-зависимой неселективной поры (mitochondrial permeability transition pore, MPTP) в митохондриях и запустить программируемую клеточную гибель [6].

Исследования продемонстрировали, что VDAC1- и VDAC2-каналы участвуют в регуляции митохондриального апоптоза, вступая во взаимодействие с белками семейства Bcl2, обладающими как про-, так и антиапоптотической активностью. VDAC1 способен образовывать во внешней мембране олигомерные поры, через которые происходит выход проапоптотических белков. Также предполагается, что VDAC1 играет важную роль в активации и стабилизации пор, образованных белками Bax, что приводит к высвобождению проапоптотических факторов и запуску апоптоза. В то же время обнаружено, что взаимодействие с VDAC2 подавляет олигомеризацию белка Bak и апоптоз [7]. Недавно было установлено, что VDAC3 участвует в регуляции образования активных форм кислорода и контроле качества митохондрий. Убедительные доказательства важной роли VDAC в регуляции митохондриальной функции и метаболизма позволяют рассматривать модуляцию активности данных белков как потенциальную стратегию для коррекции нарушений энергетического обмена при различных

патологиях, таких как сахарный диабет, онкологические, нейродегенеративные и другие заболевания [8].

TRO19622 (олесоксим), холестерин-подобное синтетическое соединение — это экспериментальный препарат, который был разработан для потенциальной терапии ряда неизлечимых дегенеративных заболеваний нервно-мышечной системы, включая боковой амиотрофический склероз, спинальную мышечную атрофию и другие (рис. 1) [9]. Исследования показали, что основным цитопротекторный эффект TRO19622 связан с его взаимодействием с VDAC-белками митохондрий. Было установлено, что ингибирование активности VDAC при помощи TRO19622 оказывает нейропротекторное действие за счет подавления избыточного транспорта ионов кальция в митохондрии и предотвращения гибели нейронов. TRO19622 прошел доклинические испытания и продемонстрировал нейропротекторные свойства в моделях дегенеративных заболеваний [10]. Однако клинические испытания 3-й фазы были прекращены, а эффективность этого соединения и безопасность для человека не была подтверждена. Также на данный момент отсутствуют комплексные исследования механизмов действия данного ингибитора на функционирование митохондрий, включая параметры энергетического, ионного и окислительного обмена в этих органеллах.

В связи с этим целью данной работы было изучение влияния TRO19622 на основные показатели функционирования митохондрий и индекс жизнеспособности культивируемых клеток. Мы оценили способность TRO19622 оказывать влияние на биоэнергетические функции изолированных митохондрий, митохондриальный мембранный потенциал, ферментативную активность комплексов митохондриальной дыхательной цепи, скорость образования пероксида водорода в митохондриях и восприимчивость этих органелл к открытию кальций-зависимой неселективной поры, участвующей в выходе ионов кальция и активации апоптоза. Кроме того, мы исследовали действие TRO19622 на продукцию активных

форм кислорода и жизнеспособность клеток линии MCF-7 (аденокарциномы молочной железы) и фибробластов кожи человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы и материалы. В работе использовали соединение TRO19622 (Tocris bioscience, Ref. 2906, Bio-Techne SAS, Франция). KCl, HEPES, АДФ и остальные реактивы были приобретены у фирмы-производителя Sigma-Aldrich (США), если не указано иначе. В серии контрольных экспериментов вместо TRO19622 добавляли 1 мкл растворителя (диметилсульфоксид). Концентрация диметилсульфоксида в пробах не превышала 0.1%.

Условия культивирования клеток и определение их жизнеспособности. Клеточная линия аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 была получена из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия). Фибробласты кожи человека, полученные из участка кожи здоровых доноров ($n = 3$), были получены из биобанка Института регенеративной медицины Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, идентификатор коллекции: MSU_FB (<https://human.depo.msu.ru>). Клетки культивировали в среде DMEM с низким содержанием глюкозы (#11885084, Gibco, США), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (#SH30071.02HI, HyClone, США), 1% раствора противогрибкового антибиотика (Pep/стрептококк/фунгизон) (#SV30079.01, HyClone, США) и 1 мг/мл инсулина (MCF-7).

Для оценки жизнеспособности клетки трижды промывали сбалансированным солевым раствором Хэнкса и инкубировали с 5 мкМ пропидий йодида ($\lambda_{ex} = 493$ нм, $\lambda_{em} = 636$ нм) и 5 мкг/мл красителя Hoechst 33342 ($\lambda_{ex} = 361$ нм, $\lambda_{em} = 497$ нм) при 37°C [11].

Производство активных форм кислорода (АФК) в клетках измеряли с помощью флуоресцентного красителя 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеиндиацетата ($\lambda_{ex} = 490$ нм, $\lambda_{em} = 520$ нм). Клетки в экспериментальных группах инкубировали с 20 мкМ красителя в течение 30 мин при 37°C [11]. Не менее 200–400 клеток из разных полей зрения было проанализировано для каждого образца.

Уровни флуоресценции определяли с помощью системы визуализации клеток Evos Fluid (Thermo Fisher Scientific, США), а дальнейший анализ данных проводили с использованием программного обеспечения Image J2 (Национальный институт здравоохранения, Бетесда, США).

Выделение митохондрий и оценка их функциональной активности. Митохондрии были выделены из ткани печени крыс самцов линии Wistar ме-

тодом дифференциального центрифугирования, как описано ранее [12]. Буфер для гомогенизации содержал 70 мМ сахарозы, 210 мМ D-маннита, 1 мМ ЭДТА и 10 мМ HEPES/КОН (pH 7.4). Последующее центрифугирование проводили в том же буфере, за исключением того, что вместо ЭДТА использовали 100 мкМ ЭГТА. Полученные суспензии содержали 60–70 мг митохондриального белка/мл. Концентрацию белка в суспензии митохондрий определяли по методу Брэдфорда, используя обезжиренный бычий сывороточный альбумин в качестве стандарта.

Измерение поглощения кислорода изолированными митохондриями проводили полярографическим методом в герметичной термостатируемой ячейке объемом 1 мл с постоянным перемешиванием магнитной мешалкой с помощью респирометра Oxygraph Plus (Hansatech Instruments Ltd., Великобритания) [13]. Среда инкубации содержала 130 мМ KCl, 5 мМ NaH₂PO₄ и 10 мМ HEPES/КОН (pH 7.4). В работе использовали 2.5 мМ глутамата калия + 2.5 мМ малата калия или 5 мМ сукцината калия (в присутствии 1 мкМ ротенона) в качестве физиологических субстратов окисления для комплексов I и II дыхательной цепи соответственно. Скорость поглощения кислорода регистрировались в последовательных метаболических состояниях митохондрий: а) скорость фосфорилирующего дыхания после добавки 200 мкМ АДФ (состояние 3); б) скорость дыхания после завершения фосфорилирования (состояние 4); в) максимальная скорость дыхания в присутствии разобщителя – 50 мкМ 2,4-динитрофенола (состояние 3UDNP). Данные параметры в их комбинации позволяют получить оценку состояния биоэнергетики изолированных митохондрий.

Мембранный потенциал митохондрий ($\Delta\Psi$) оценивали с помощью флуоресцентного зонда сафранина O (длина волны возбуждения 520 нм; длина волны излучения 580 нм) с использованием спектрофлуориметра Rapogama Fluorat-02 («Люмекс», Россия) [14]. Инкубационная среда содержала 210 мМ D-маннита, 70 мМ сахарозы, 10 мкМ ЭГТА и 10 мМ HEPES/КОН (pH 7.4). В качестве субстратов дыхания использовали 2.5 мМ глутамата + 2.5 мМ малата калия или 5 мМ сукцината калия в присутствии 1 мкМ ротенона. Сафранин O добавляли в среду в концентрации 10 мкМ. Концентрация митохондриального белка в кювете составляла 0.5 мг/мл.

Активность комплексов электрон-транспортной цепи (I, II, III, IV) оценивали по скорости специфических окислительно-восстановительных реакций в соответствии с ранее описанными протоколами [15, 16] с помощью планшетного ридера Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific, США). Анализ проводили на предварительно

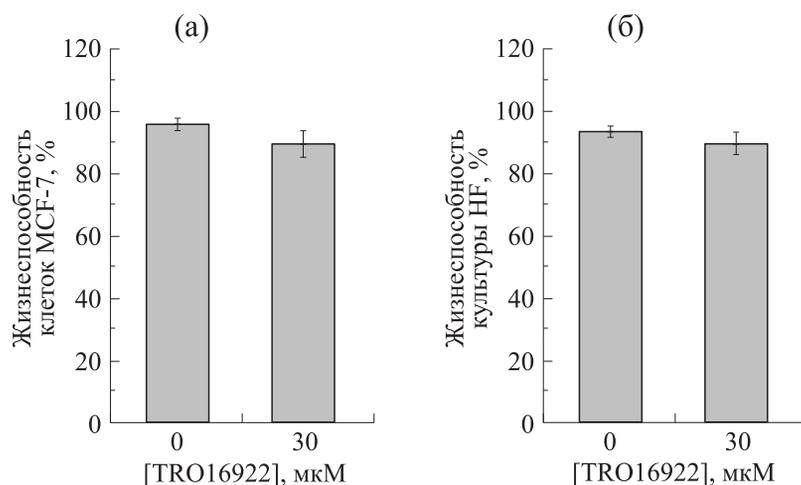


Рис. 2. Влияние 30 мкМ TRO16922 на жизнеспособность опухолевых клеток молочной железы линии MCF-7 (а) и первичной культуры фибробластов кожи человека (HF) (б). Результаты представлены в виде средних значений \pm стандартная ошибка среднего ($n = 4$).

разрушенных путем трехкратного замораживания/оттаивания ($-20/+30^{\circ}\text{C}$) митохондриях, суспендированных в 10 мМ Трис-НСI-буфере (рН 7.6). Концентрация митохондриального белка в пробах составляла 50 мкг/мл.

Скорость образования пероксида водорода в митохондриях измеряли с помощью флуоресцентного зонда Amplex Red (длины волн возбуждения 560 нм; длина волны излучения 590 нм) на планшетном ридере Tecan Spark 10M (Tecan Group Ltd., Швейцария) при 37°C [14]. Митохондрии в концентрации 0.15 мг/мл инкубировали в среде, содержащей 70 мМ сахарозы, 210 мМ D-маннита, 1 мМ KH_2PO_4 , 10 мкМ ЭГТА, 1 Ед./мл пероксидазы хрена, 10 мкМ Amplex Red, 10 мМ НЕРЕС/КОН (рН 7.4). Регистрировали изменение флуоресценции в течение 3 мин. Количество образовавшегося пероксида водорода рассчитывали по калибровочной кривой [14].

Концентрацию ионов кальция в среде определяли с использованием индикатора Арсенazo III при длинах волн 675–685 нм на планшетном ридере Spark 10M (Tecan Group Ltd., Швейцария) [17]. Митохондрии в концентрации 0.5 мг/мл инкубировали в среде, содержащей 70 мМ сахарозы, 210 мМ D-маннита, 5 мМ сукцината калия, 1 мМ KH_2PO_4 , 1 мМ ротенона, 10 мМ ЭГТА, 10 мМ НЕРЕС/КОН (рН 7.4). Затем в пробу последовательно добавляли CaCl_2 (10 мкМ) до полного выхода ионов из митохондрий вследствие открытия МРТР-поры. Общее количество Ca^{2+} , внесенного в митохондрии до открытия МРТР-поры, рассматривали как показатель кальциевой емкости митохондрий и выражали в нмолях Ca^{2+} /мг митохондриального белка.

Статистическая обработка данных. Статистический анализ данных проводился с использованием программного обеспечения GraphPad Prism версии 8.4 (GraphPad Software Inc., США). Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего ($n = 3-6$). Для проверки нормальности распределения данных использовался тест Шапиро–Уилка. В случае нормального распределения значений применяли однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с последующим множественным сравнением групп по критерию Тьюки. Различия между группами оценивали как статистически значимые при значении $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

TRO16922 не оказывает влияния на продукцию активных форм кислорода и жизнеспособность клеток линии MCF-7 и фибробластов кожи человека. В настоящей работе было исследовано влияние TRO16922 на продукцию активных форм кислорода и жизнеспособность клеток аденокарциномы молочной железы линии MCF-7 и первичной культуры фибробластов кожи человека. Стоит отметить, что, согласно литературным данным, используемая концентрация данного агента составляет 0.1–10 мкМ [10]. Можно видеть, что TRO16922 в концентрациях 0.1–30 мкМ (48 ч инкубации) не влияет на жизнеспособность клеток линии MCF-7 и фибробластов кожи человека (рис. 2). Параллельно с этим, TRO16922 в концентрации 30 мкМ достоверно не влиял на продукцию АФК в раковых клетках линии MCF-7 и в фибробластах кожи человека, хотя наблюдался тренд к увеличению их продукции (рис. 3).

Таблица 1. Влияние TRO19622 на параметры дыхания изолированных митохондрий в разных метаболических состояниях

TRO19622, мкМ	Скорость митохондриального дыхания, нмоль $O_2 \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ белка			Дыхательный контроль (V_3/V_4)
	Состояние 3	Состояние 4	Состояние 3U _{DNP}	
Сукцинат калия + ротенон				
0	70.3 ± 3.6	24.4 ± 1.2	72.6 ± 2.8	2.9 ± 0.2
15	61.8 ± 3.5*	25 ± 1.2	65 ± 1.3*	2.5 ± 0.1*
30	58.2 ± 3.5*	25.6 ± 1.0	62.8 ± 0.3*	2.2 ± 0.1*
Глутамат + малат калия				
0	45.3 ± 1.8	12 ± 2.5	51.5 ± 1.8	3.9 ± 0.1
15	42.3 ± 0.7	11.3 ± 0.5	51.9 ± 2.7	3.9 ± 0.2
30	42.6 ± 0.5	11.4 ± 0.8	47.8 ± 2.6	3.8 ± 0.3

Примечание. Результаты представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего ($n = 5$); * – $p < 0.05$ – различия достоверны относительно контрольных значений (0 мкМ TRO19622).

TRO19622 вызывает ингибирование окислительного фосфорилирования в изолированных митохондриях. В работе была проведена оценка влияния TRO19622 на биоэнергетические параметры изолированных митохондрий. В табл. 1 представлены данные о влиянии TRO19622 на параметры дыхания и окислительного фосфорилирования изолированных митохондрий печени крыс в присутствии субстратов комплексов I и II дыхательной цепи (2.5 мМ глутамата + 2.5 мМ малата калия или 5 мМ сукцината калия соответственно). Можно видеть, что TRO19622 дозозависимо снижает скорости АДФ-стимулированного (состояние 3) и разобщенного (состояние 3U_{DNP}) дыхания митохондрий при окислении сукцината в качестве физиологического субстрата. Параллельно

наблюдалось снижение коэффициента дыхательного контроля, отражающего степень сопряжения митохондриального дыхания и окислительного фосфорилирования. Так, TRO19622 (30 мкМ) снижал этот параметр на 24% при окислении сукцината. При этом TRO19622 в исследуемых концентрациях не влиял на скорость митохондриального дыхания в состоянии покоя (состояние 4), а также на скорость митохондриального дыхания при окислении субстратов комплекса I.

На рис. 4 приведены данные о влиянии TRO19622 на митохондриальный мембранный

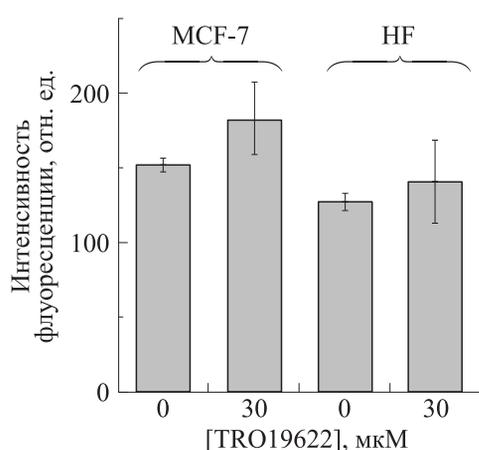


Рис. 3. Оценка влияния TRO19622 (30 мкМ) на уровень образования АФК в первичной культуре фибробластов кожи человека (HF) и опухолевых клеток молочной железы линии MCF-7. Результаты представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка средней ($n = 5$).

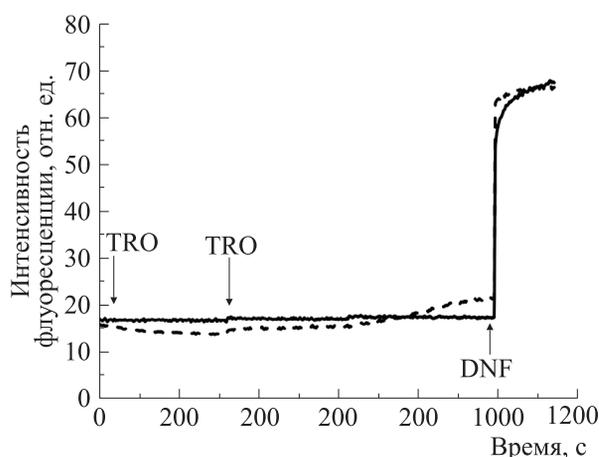


Рис. 4. Типичные кинетические кривые интенсивности флуоресценции сафранина О, которые отражают изменение мембранного потенциала изолированных митохондрий в присутствии субстратов комплекса I (2.5 мМ глутамата калия + 2.5 мМ малата) (пунктирная линия) или субстратов комплекса II (5 мМ сукцината калия в присутствии 1 мкМ ротенона) (сплошная линия). Добавки: 15 мкМ TRO19622, 50 мкМ ДНФ. Показаны типичные кривые ($n = 5$).

Таблица 2. Влияние TRO19622 на ферментативную активность изолированных комплексов дыхательной цепи

TRO19622, мкМ	Ферментативная активность, % от контроля			
	Комплекс I	Комплекс II	Комплекс III	Комплекс IV
0	100 ± 3.5	100 ± 4.2	100 ± 3.4	100 ± 3.3
15	95.4 ± 3.3	101.5 ± 7	96.0 ± 1.5	89.7 ± 3
30	96.7 ± 3.3	110.9 ± 6.4	102.4 ± 2.8	96.0 ± 6.3

Примечание. В отсутствие TRO19622 (контроль, 0 мкМ) ферментативная активность комплексов I–IV составляла 25 ± 1 , 614 ± 10 , 743 ± 14 , 340 ± 30 , 1016 ± 25 нмоль·мин⁻¹·мг⁻¹ белка соответственно. Значения активности в отсутствие TRO19622 были приняты за 100%. Результаты представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка среднего ($n = 3-5$).

потенциал, оцененный с помощью флуоресцентного зонда сафранина O. Две последовательные добавки 15 мкМ TRO19622 не приводили к изменению мембранного потенциала митохондрий, окисляющих глутамат/малат или сукцинат калия в качестве субстратов дыхания.

Далее мы оценили действие TRO19622 на ферментативную активность комплексов I, II, III и IV дыхательной цепи в изолированных митохондриях. Как показано в табл. 2, TRO19622 не оказывал влияния на активность митохондриальных комплексов I–IV в исследуемых концентрациях.

TRO19622 не приводит к гиперпродукции H₂O₂ и снижению резистентности митохондрий к открытию кальций-зависимой неселективной поры. Известно, что модуляция активности VDAC может способствовать усилению продукции активных

форм кислорода и открытию кальций-зависимой неселективной MPT-поры [5]. В связи с этим в следующей части работы мы оценили влияние TRO19622 на продукцию H₂O₂ и параметр кальциевой емкости изолированных митохондрий.

Как показано на рис. 5, инкубация митохондрий с TRO19622 в концентрациях 15–30 мкМ не приводила к повышению скорости образования H₂O₂, вне зависимости от используемого субстрата дыхания.

На рис. 6 показано, что 30 мкМ TRO19622 не вызывал снижения параметра кальциевой емкости митохондрий. Результаты свидетельствуют о том, что TRO19622 в используемой концентрации не влияет на резистентность митохондрий к открытию MPT-поры.

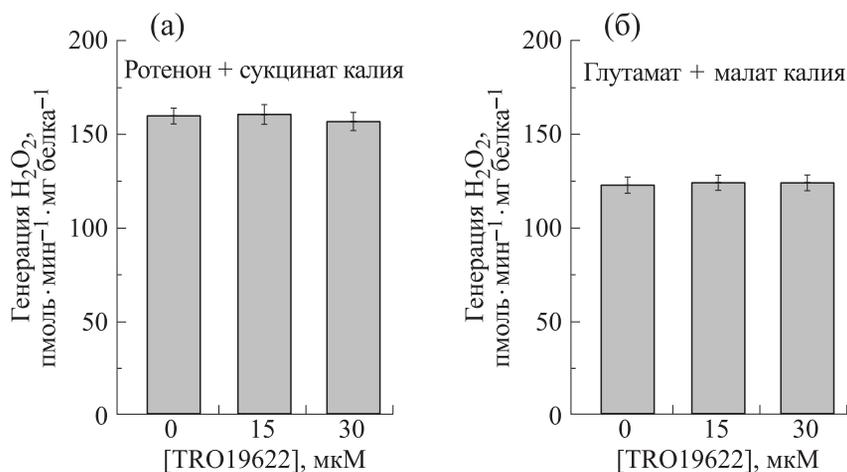


Рис. 5. Влияние TRO19622 на генерацию митохондриями печени крыс H₂O₂, окисляющего сукцинат (5 мМ) в присутствии ротенона (а) и 2.5 мМ глутамата калия + 2.5 мМ малата калия (б). Инкубационная среда содержала 210 мМ маннитола, 70 мМ сахарозы, 1 мМ КН₂РО₄, 10 мкМ ЭГТА и 10 мМ НЕРЕС–КОН, рН 7.4. Результаты представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка среднего ($n = 5$).

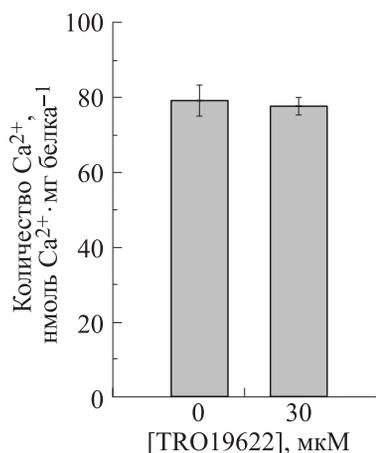


Рис. 6. Оценка действия TRO19622 на параметр кальциевой емкости митохондрий печени крыс. Результаты представлены в виде средних значений \pm стандартная ошибка среднего ($n = 4$).

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время регуляция активности VDAC является одним из важнейших механизмов метаболического перепрограммирования клеток, а также рассматривается в качестве перспективного терапевтического подхода при многих заболеваниях [2, 3]. Показано, что ингибирование олигомеризации VDAC1 во внешней мембране митохондрий предотвращает инициацию апоптоза [2]. С другой стороны, эффекторные молекулы, закрывающие VDAC, могут, наоборот, вызывать избыточное накопление ионов Ca^{2+} в митохондриальном матриксе, открывать MPT-пору и вызывать гибель клетки. Баланс этих разнонаправленных процессов зависит от концентрации регуляторных молекул и определяет их использование при различных патологических состояниях [18].

Обнаружено, что TRO19622 (олесоксим) обладает цитопротекторным действием за счет подавления избыточного транспорта ионов кальция в митохондрии и предотвращения гибели клеток в моделях бокового амиотрофического склероза, болезни Альцгеймера, сахарного диабета и других [10]. Исследования показали, что терапевтический эффект TRO19622 может быть опосредован его взаимодействием с VDAC каналами внешней мембраны митохондрий. Однако недавние клинические испытания выявили негативные побочные эффекты этого препарата. Мы предположили, что TRO19622, вероятно, способствует развитию дисфункции митохондрий в клетках, особенно при его избыточном накоплении. В данной работе мы исследовали, может ли TRO19622 негативно влиять на функциональную активность

изолированных митохондрий и митохондриальных ферментов, а также жизнеспособность клеточных культур.

Наши данные показывают, что TRO19622 оказывает дозозависимое торможение скорости потребления кислорода изолированными митохондриями в фосфорилирующем состоянии V_3 при окислении субстрата комплекса II (сукцинатдегидрогеназы) сукцината. Наряду с этим, TRO19622 подавляет скорость ДНФ-стимулированного (разобщенного) дыхания и параметр дыхательного контроля, что указывает на снижение максимальной окислительной мощности митохондрий и эффективности окислительного фосфорилирования. Полученные данные свидетельствуют о том, что TRO19622 способен сам по себе подавлять процесс синтеза АТФ в митохондриях при окислении сукцината, но не субстратов комплекса I (NADH:убихинон-оксидоредуктазы) глутамата и малата. Обнаруженная нами субстрат-специфическая регуляция митохондриального дыхания с помощью TRO19622 может быть связана с разной эффективностью транспорта протонов и электронов от субстратов FAD- и NADH-зависимых дегидрогеназ. Известно, что окисление сукцината митохондриями может генерировать более высокую протон-движущую силу для синтеза АТФ в дыхательной цепи, чем окисление NADH-зависимых субстратов (глутамата и малата) [19]. Кроме того, ингибиторы VDAC каналов существенно подавляют транспорт анионных метаболитов, таких как АТФ и АДФ в митохондриальный матрикс [10, 18]. Это может способствовать подавлению процесса окислительного фосфорилирования с участием сукцинатдегидрогеназы, локализованной на внутренней поверхности внутренней митохондриальной мембраны.

С другой стороны, анализ активности комплексов дыхательной цепи в присутствии TRO19622 показал, что данное соединение не оказывает непосредственного влияния на каталитические свойства комплексов I–IV электрон-транспортной цепи. Кроме того, TRO19622 не вызывает изменения мембранного потенциала внутренней митохондриальной мембраны. Отсутствие деполяризующего эффекта TRO19622 при использовании субстратов комплексов I и II электрон-транспортной цепи позволило нам предположить, что мишенями данного соединения могут являться как VDAC-каналы, транспортирующие фосфонуклеотиды, так и, возможно, FoF1-АТФ-синтетаза или ферменты цикла Кребса в матриксе митохондрий.

Ранее было показано, что накопление TRO19622 в митохондриях может ингибировать клеточную гибель посредством его взаимодействия с белками, участвующими в индукции MPT-поры. Считалось, что это свойство лежит в основе нейро- и кардиопротекторных свойств TRO19622. Вместе с тем, мы не обнаружили увеличение параметра кальциевой емкости митохондрий печени в присутствии TRO19622. Кроме того, в работе не обнаружено усиление генерации пероксида водорода при инкубации митохондрий с данным соединением. Эти наблюдения находятся в соответствии с литературными данными о том, что TRO19622, в отличие от циклоспорина А, практически не влиял на параметры образования MPT-поры в митохондриях [2].

Наши данные также свидетельствуют о том, что TRO19622 в исследуемых концентрациях не влияет на индекс жизнеспособности и продукцию активных форм кислорода в клетках линии MCF-7 и первичной культуры фибробластов кожи человека. Стоит отметить, что в работе мы использовали достаточно высокие концентрации данного агента (30 мкМ) со временем инкубации 48 ч. Все это позволяет говорить об отсутствии негативного токсического действия TRO19622 на клеточные культуры в исследуемых условиях. Подобные наблюдения TRO19622 были отмечены также и для других клеточных культур при сходных экспериментальных условиях [2, 5].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе мы продемонстрировали, что митохондриально-направленное соединение TRO19622 в концентрациях до 30 мкМ (при действующих концентрациях около 10 мкМ) может оказывать ингибирующее действие на биоэнергетические параметры митохондрий, окисляющих сукцинат. Недавние данные указывают на то, что сукцинат накапливается в клетках при целом ряде патологических состояний, включая рак, воспаление, эпилепсию, ишемию и другие, что может вызывать его неконтролируемое окисление и метаболическое перепрограммирование [19–21]. Согласно литературным данным, TRO19622 является относительно новым терапевтическим агентом (в том числе взаимодействующим с VDAC), однако его клинические испытания для лечения нервно-мышечных заболеваний потерпели неудачу [22, 23]. Полученные нами данные углубляют представления о механизме действия данного соединения на функциональное состояние митохондрий и клеток и могут быть использованы для дальнейшей разработки перспективных соединений, способных целенаправленно

модулировать работу биоэнергетического аппарата клетки.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 20-15-00120-П).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kim J., Gupta R., Blanco L. P., Yang S., Shteinfer-Kuzmine A., Wang K., Zhu J., Yoon H. E., Wang X., Kerkhofs M., Kang H., Brown A. L., Park S.-J., Xu X., Rilland E. Z., Kim M. K., Cohen J. I., Kaplan M. J., Shoshan-Barmatz V., and Chung J. H. VDAC oligomers form mitochondrial pores to release mtDNA fragments and promote lupus-like disease. *Science*, **366** (6472), 1531 (2019). DOI: 10.1126/science.aav4011
2. Shoshan-Barmatz V., Maldonado E. N., and Krelin Y. VDAC1 at the crossroads of cell metabolism, apoptosis and cell stress. *Cell Stress*, **29**, 1 (1), 11–36 (2017). DOI: 10.15698/cst2017.11.104
3. Shoshan-Barmatz V. and Golan M. Mitochondrial VDAC1: function in cell life and death and a target for cancer therapy. *Curr. Med. Chem.*, **19** (5), 714 (2012). DOI: 10.2174/092986712798992110
4. Belosludtseva N. V., Dubinin M. V., and Belosludtsev K. N. Pore-forming vdac proteins of the outer mitochondrial membrane: regulation and pathophysiological role. *Biochemistry (Moscow)*, **89** (6), 1061 (2024). DOI: 10.1134/S0006297924060075
5. Varughese J. T., Buchanan S. K., and Pitt A. S. The role of voltage-dependent anion channel in mitochondrial dysfunction and human disease. *Cells*, **10** (7), 1737 (2021). DOI: 10.3390/cells10071737
6. Ott M., Robertson J. D., Gogvadze V., Zhivotovsky B., and Orrenius S. Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99** (3), 1259–1263 (2002). DOI: 10.1073/pnas.241655498
7. Tsujimoto Y. and Shimizu S. The voltage-dependent anion channel: an essential player in apoptosis. *J. Biochimie*, **84** (2–3), 187–193, (2002). DOI: 10.1016/s0300-9084(02)01370-6
8. Yang M., Camara A. K. S., Aldakkak M., et al. Identity and function of a cardiac mitochondrial small conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel splice variant.

- Biochim. Biophys. Acta – Bioenergetics*, **1858** (6), 442 (2017). DOI: 10.1016/j.bbabo.2017.03.005
9. Tricaud N., Gautier B., Berthelot J., Gonzalez S., and Hameren G. V. Traumatic and diabetic schwann cell demyelination is triggered by a transient mitochondrial calcium release through voltage dependent anion channel 1. *Biomedicines*, **10** (6), 1447 (2022). DOI: 10.3390/biomedicines10061447
 10. Bordet T., Berna P., Abitbol J.-L., and Rebecca M. P. Olesoxime (TRO19622): a novel mitochondrial-targeted neuroprotective compound. *Pharmaceuticals (Basel)*, **3** (2), 345–368 (2010). DOI: 10.3390/ph3020345
 11. Serov D., Tikhonova I., Safronova V., and Astashev M. Calcium activity in response to nAChR ligands in murine bone marrow granulocytes with different Gr-1 expression. *J. Cell Biol. Int.*, **45** (7), 1533–1545 (2021). DOI: 10.1002/cbin.11593
 12. Dubinin M. V., Nedopekina D. A., Ilzorkina A. I., Semenova A. A., Sharapov V. A., Davletshin E. V., Mikhina N. V., Belsky Y. P., Spivak A. Yu., Akatov V. S., Belosludtseva N. V., Jiankang L., and Belosludtsev K. N. Conjugation of triterpenic acids of ursane and oleanane types with mitochondria-targeting cation F16 synergistically enhanced their cytotoxicity against tumor cells. *Membranes*, **13** (6), 563 (2023). DOI: 10.3390/membranes13060563
 13. Belosludtsev K. N., Belosludtseva N. V., Kosareva E. A., Talanov E. Y., Gudkov S. V., and Dubinin M. V. Itaconic acid impairs the mitochondrial function by the inhibition of complexes II and IV and induction of the permeability transition pore opening in rat liver mitochondria. *Biochimie*, **176**, 150–157 (2020). DOI: 10.1016/j.biochi.2020.07.011
 14. Belosludtseva N. V., Starinets V. S., Semenova A. A., Igoshkina A. D., Dubinin M. V., and Belosludtsev K. N. S-15176 Difumarate salt can impair mitochondrial function through inhibition of the respiratory complex III and permeabilization of the inner mitochondrial membrane. *Biology (Basel)*, **11** (3), 380 (2022). DOI: 10.3390/biology11030380
 15. Dubinin M. V., Semenova A. A., Nedopekina D. A., Davletshin E. V., Spivak A. Y., and Belosludtsev K. N. Mitochondrial dysfunction induced by F16-betulin conjugate and its role in cell death initiation. *Membranes*, **11** (5), 352 (2021). DOI: 10.3390/membranes11050352
 16. Spinazzi M., Casarin A., Pertegato V., Salviati L., Angelini C. Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells. *Nature Protoc.*, **7** (6), 1235–1246 (2012). DOI: 10.1038/nprot.2012.058
 17. Belosludtsev K. N., Dubinin M. V., Talanov E. Yu., Starinets V. S., Tenkov K. S., Zakharova N. M., and Belosludtseva N. V. Transport of Ca^{2+} and Ca^{2+} -dependent permeability transition in the liver and heart mitochondria of rats with different tolerance to acute hypoxia. *Biomolecules*, **10** (1), 114 (2020). DOI: 10.3390/biom10010114
 18. Verma A., Shteinfein-Kuzmine A., Kamenetsky N., Pit-tala S., Paul A., Crystal E. N., Ouro A., Chalifa-Caspi V., Pandey S. K., Monsonogo A., Vardi N., Knafo S., and Shoshan-Barmatz V. Targeting the over-expressed mitochondrial protein VDAC1 in a mouse model of Alzheimer's disease protects against mitochondrial dysfunction and mitigates brain pathology. *Transl. Neurodegener.*, **11** (1), 58 (2022). DOI: 10.1186/s40035-022-00329-7
 19. Mookerjee S. A., Gerencser A. A., Watson M. A., and Brand M. D. Controlled power: how biology manages succinate-driven energy release. *Biochem. Soc. Trans.*, **49** (6), 2929–2939 (2021). DOI: 10.1042/BST20211032
 20. Martin J. L., Costa A. S. H., Gruszczczyk A. V., Beach T. E., Allen F. M., Prag H. A., Hinchey E. C., Mahbubani K., Hamed M., Tronci L., Nikitopoulou E., James A. M., Krieg T., Robinson A. J., Huang M. M., Caldwell S. T., Logan A., Pala L., Hartley R. C., Frezza Ch., Saeb-Parsy K., and Murphy M. P. Succinate accumulation drives ischaemia-reperfusion injury during organ transplantation. *Nature Metab.*, **1**, 966–974 (2019). DOI: 10.1038/s42255-019-0115-y
 21. Chouchani E. T., Pell V. R., Gaude E., Aksentijević D., Sundier S. Y., Robb E. L., Logan A., Nadtochiy S. M., Ord E. N. J., Smith A. C., Eyassu F., Shirley R., Hu Ch.-H., Dare A. J., James A. M., Rogatti S., Hartley R. C., Eaton S., Costa A. S. H., Brookes P. S., Davidson S. M., Duchon M. R., Saeb-Parsy K., Shattock M. J., Robinson A. J., Work L. M., Frezza Ch., Krieg T., and Murphy M. P. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature*, **515** (7527), 431–435 (2014). DOI: 10.1038/nature13909
 22. Bordet T., Buisson B., Michaud M., Drouot C., Galéa P., Delaage P., Akentieva N. P., Evers A. S., Covey D. F., Ostuni M. A., Lacapère J. J., Massaad C., Schumacher M., Steidl E. M., Maux D., Delaage M., Henderson C. E., and Pruss R. M. Identification and characterization of cholest-4-en-3-one,oxime (TRO19622), a novel drug candidate for amyotrophic lateral sclerosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **322** (2), 709–720 (2007). DOI: 10.1124/jpet.107.123000
 23. Muntoni F., Bertini E., Comi G., Kirschner J., Luskowska A., Mercuri E., Scoto M., Ludo van der Pol W., Vuillerot C., Burdeska A., El-Khairi M., Fontoura P., Ives J., Gorni K., Reid C., and Fuerst-Recktenwald S. Long-term follow-up of patients with type 2 and non-ambulant type 3 spinal muscular atrophy (SMA) treated with olesoxime in the OLEOS trial. *Neuromusc. Disorders*, **30** (12), 959–969 (2020). DOI: 10.1016/j.nmd.2020.10.008

Effect of TRO19622 (Olesoxime) on the Functional Activity of Isolated Mitochondria and Cell Viability

A.I. Ilzorkina^{*, **}, N.V. Belosludtseva^{*, **}, A.A. Semenova^{*}, M.V. Dubinin^{*}, and K.N. Belosludtsev^{*}

^{*}*Mari State University, pl. Lenina 1, Yoshkar-Ola, 424000 Russia*

^{**}*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

TRO19622 (olesoxime), a cholesterol-like cytoprotector, is an experimental drug developed as a potential treatment for a range of incurable degenerative diseases. Recent studies have shown that the main molecular targets of this compound in the cell are porins of the outer mitochondrial membrane, which play a crucial role in regulating the exchange of metabolites between mitochondria and the rest of the cell. Disruption of this channel activity may lead to mitochondrial dysfunction in healthy cells. In this study, key indicators of mitochondrial function and the viability of cells in cultures after incubation with TRO19622 were assessed. It was found that TRO19622 at 15–30 μM concentrations inhibits the coupled and uncoupled respiration rates in isolated mitochondria (state 3 rate and 3UDNP) with succinate as substrate, but does not affect the enzymatic activity of respiratory chain complexes I–IV. It was shown that TRO19622 at the studied doses has no effect on the rate of H_2O_2 formation in mitochondria and the calcium retention capacity index, which reflects the resistance of the organelles to the calcium-dependent nonspecific pore opening. Incubation of human skin fibroblasts and mammary adenocarcinoma cells (MCF-7) with 30 μM TRO19622 for 48 h has no impact on ROS production and cell viability. How TRO19622 works in the oxidative phosphorylation system and therapeutic prospects for using this mitochondrial-targeted agent are discussed.

Keywords: VDAC, mitochondria, mitochondrial respiration, oxidative phosphorylation, ROS, cell viability