

**ТРИТЕРПЕНОИДЫ ЛУПАНОВОГО РЯДА КАК МОДУЛЯТОРЫ
ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС**
Дубинин М.В.¹, Семенова А.А.¹, Выдрина В.А.², Шарапов В.А.¹, Степанова А.Е.¹,
Теньков К.С.¹, Хорошавина Е.И.¹, Белослудцев К.Н.^{1,3}

¹ Марийский государственный университет
пл. Ленина, 1, г. Йошкар-Ола, 424001, РФ; e-mail: dubinin1989@gmail.com

² Уфимский Институт химии УФИЦ РАН
г. Уфа, РФ

³ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН
г. Пуццино, РФ

Поступила в редакцию: 07.07.2020

Аннотация. В работе рассматривается влияние растительного тритерпеноида бетулина и его производного бетулоновой кислоты на митохондрии печени крыс. Установлено, что бетулоновая кислота и, в меньшей степени, бетулин активируют митохондриальное дыхание в состояниях 2 и 4 и ингибируют дыхание, стимулированное ADP и ДНФ. В этом случае эффект бетулоновой кислоты приводит к значительному снижению дыхательного контроля и коэффициента АДФ/О, а также к снижению мембранного потенциала. Эффекты обоих соединений были наиболее выражены в случае использования сукцината как субстрата дыхания. Установлено, что действие указанных агентов на функциональные показатели органелл обусловлено как протонофорным эффектом бетулоновой кислоты, так и ингибированием комплексов дыхательной цепи обоими соединениями. Оба агента также достоверно усиливали генерацию H₂O₂ в митохондриях, окисляющих сукцинат, в то время как бетулоновая кислота оказывала антиоксидантное действие в присутствии НАД-зависимых субстратов. Было также обнаружено, что бетулин индуцирует митохондриальную агрегацию. Бетулоновая кислота гораздо менее эффективно индуцировала агрегацию митохондрий. Обсуждаются возможные механизмы влияния бетулина и бетулоновой кислоты на функционирование митохондрий печени крысы.

Ключевые слова: бетулин, бетулоновая кислота, митохондрии, ингибирование, агрегация.

Поиск новых высокоэффективных препаратов является одной из актуальных задач современной биологии и медицины. К соединениям, сочетающим доступность и ценную биологическую активность, относятся вещества растительного происхождения, в том числе тритерпеноиды различной структуры [1,2]. Наиболее перспективные соединения включают в себя тритерпеноиды ряда лупана, в частности бетулин и его производные. В настоящее время считается, что бетулин и его производные обладают противовирусными (проявляют активность против ВИЧ, вируса герпеса и вируса Эпштейна-Барра), противовоспалительными, антиоксидантными и другими свойствами [3-5]. Неудивительно, что создание препаратов на основе бетулина и его производных является рассматривается как перспективное направление фармакологии и медицины.

Известно, что бетулин и его производные бетулоновая и бетулиновая кислоты проявляют выраженные цитотоксические свойства, включая ингибирующую активность в отношении различных линий раковых клеток [6-8]. Учитывая гидрофобную природу этих агентов, неудивительно, что их основными клеточными мишенями являются мембранные структуры, в частности митохондриальные мембраны. Эти органеллы играют центральную роль в энергетическом метаболизме, а также участвуют в запуске внутреннего пути клеточной гибели путем апоптоза [9]. Ключевую роль в митохондриальной дисфункции при этих патологиях играет открытие митохондриальной МРТ поры, что приводит к деполяризации органелл, набуханию матрикса, нарушению синтеза АТР и выделению проапоптотических белков из межмембранного пространства, таких как, например, цитохром *c* [9,10]. Ранее было показано, что бетулин и его производные способны вызывать окислительный стресс в митохондриях, что сопровождается открытием МРТ поры, выделением цитохрома *c* в цитоплазму с последующей активацией каспаз и иницированием гибели клеток по пути некроза или апоптоза [11,12]. Предполагается, что митохондриально-направленные эффекты лежат в основе цитотоксического действия этих соединений.

Следует отметить, что, несмотря на значительный прогресс в этой области, результаты изучения влияния бетулина и его производных на функционирование митохондрий и проницаемость их мембран фрагментарны и скорее демонстрируют долгосрочные последствия (снижение $\Delta\psi$, индукция апоптоза) без раскрытия каких-либо молекулярных мишеней и механизмов действия. Поэтому в настоящей работе нами изучены митохондриально-направленные эффекты тритерпеноидов лупанового ряда: бетулина и бетулоновой кислоты.

Эксперименты проводили на митохондриях печени лабораторных крыс, которые выделяли общепринятым методом дифференциального центрифугирования [13]. При исследовании окислительного фосфорилирования дыхание митохондрий регистрировали полярографическим методом с помощью систем Oxygraph Plus (Hansatech Instruments). Применяли следующие показатели дыхания и окислительного фосфорилирования: состояние 2 – скорость дыхания митохондрий в присутствии неорганического фосфата (Φ_n) до добавления ADP; состояние 3 – скорость дыхания митохондрий в присутствии Φ_n и ADP; состояние 4 – скорость дыхания

митохондрий в присутствии Φ_n после того, как весь добавленный ADP был израсходован в процессе синтеза АТФ (состояние 4 по Чансу); состояние $3U_{\text{днф}}$ – максимальная скорость дыхания в присутствии протонофорного разобщителя 2,4-динитрофенола. RC – отношение скоростей дыхания органелл в состояниях 3 и 4 (дыхательный контроль по Чансу); ADP/O – стехиометрический коэффициент, показывающий эффективность окислительного фосфорилирования. Значение коэффициента ADP/O определяли пульсовым методом [14]. Разность электрических потенциалов ($\Delta\psi$) на внутренней мембране митохондрий оценивали по распределению катиона тетрафенилфосфония через внутреннюю мембрану, концентрацию которого регистрировали с помощью ТФФ⁺-чувствительного электрода. Активность комплексов дыхательной цепи митохондрий оценивали спектрофотометрически. Скорость образования H_2O_2 суспензией митохондрий измерялась с помощью флуоресцентного индикатора Amplex Red. Агрегацию органелл оценивали с помощью метода конфокальной микроскопии.

Влияние бетулина и бетулоновой кислоты на функциональное состояние митохондрий печени крыс оценивали по скорости митохондриального дыхания в присутствии глутамат/малата (субстраты комплекса I дыхательной цепи) или сукцината (субстрат комплекса II) в присутствии ротенона. Как видно из таблиц 1 и 2, 10 и 50 мкМ бетулина оказывали незначительное влияние (изменение менее чем на 10-15%) как на сукцинат-, так и на глутамат/малат-зависимое дыхание органелл во всех функциональных состояниях, не влияя на параметр дыхательного контроля и эффективность синтеза АТФ. В то же время 5 мкМ бетулоновой кислоты уже было достаточно для активации сукцинат-зависимого дыхания органелл в состояниях 2 и 4 (на 57 и 52% соответственно) и для подавления дыхания в состояниях 3 и $3U_{\text{днф}}$ (на 16 и 8% соответственно) (не показано). При этом показатель дыхательного контроля снизился на 46%. Отношение ADP/O также обнаружило тенденцию к снижению. При использовании НАД-зависимых субстратов (2,5 мМ глутамата и 2,5 мМ малата) эффекты бетулоновой кислоты демонстрируют одинаковый тренд (табл. 2). Однако в этом случае они немного менее выражены – 20 мкМ бетулоновой кислоты вызывает снижение RC и ADP/O на 43 и 16% соответственно.

Таблица 1. Влияние бетулина и бетулоновой кислоты на сукцинат-зависимое дыхание митохондрий печени крысы

| Добавки | Состояние 2 | Состояние 3 | Состояние 4 | Состояние $3U_{\text{днф}}$ | RC | ADP/O |
|---------------------|--|-------------|-------------|-----------------------------|------------|------------|
| | нмоль O_2 * мин ⁻¹ * мг ⁻¹ белка | | | | отн. ед. | |
| Контроль | 12,28±0,27 | 67,37±0,43 | 15,40±0,42 | 72,7±0,54 | 4,41±0,19 | 1,93±0,05 |
| Бетулин | | | | | | |
| 10 мкМ | 12,53±0,21 | 68,96±0,41 | 15,54±0,19 | 73,11±0,18 | 4,45±0,10 | 1,95±0,01 |
| 50 мкМ | 13,73±0,14* | 70,30±0,05* | 17,01±0,04* | 69,12±0,09* | 4,13±0,09 | 1,87±0,02 |
| Бетулоновая кислота | | | | | | |
| 10 мкМ | 23,89±0,75* | 55,07±0,01* | 27,71±0,52* | 63,67±0,52* | 1,99±0,15* | 1,39±0,11* |
| 20 мкМ | 26,73±0,02* | 44,94±0,07* | 35,56±1,00* | 49,10±1,10* | 1,28±0,21* | 1,15±0,06* |

Примечание. Приведены средние значения ± стандартная ошибка среднего (n=3). *Разница между контролем (без добавок) и экспериментом (в присутствии бетулина или бетулоновой кислоты) является статистически значимой (p < 0.05, t-тест).

Таблица 2. Влияние бетулина и бетулоновой кислоты на глутамат/малат-зависимое дыхание митохондрий печени крысы

| Добавки | Состояние 2 | Состояние 3 | Состояние 4 | Состояние $3U_{\text{днф}}$ | RC | ADP/O |
|---------------------|--|-------------|-------------|-----------------------------|------------|------------|
| | нмоль O_2 * мин ⁻¹ * мг ⁻¹ белка | | | | отн. ед. | |
| Контроль | 5,46±0,15 | 32,82±0,98 | 8,73±0,21 | 32,96±1,71 | 3,77±0,08 | 2,68±0,03 |
| Бетулин | | | | | | |
| 10 мкМ | 4,95±0,16 | 32,15±0,86 | 8,54±0,28 | 30,60±0,45 | 3,78±0,05 | 2,70±0,05 |
| 50 мкМ | 5,66±0,11 | 31,28±0,82 | 9,14±0,03 | 27,36±0,83* | 3,35±0,18 | 2,60±0,08 |
| Бетулоновая кислота | | | | | | |
| 10 мкМ | 5,40±0,18 | 26,33±0,43* | 9,92±0,08* | 26,34±0,71* | 2,66±0,04* | 2,42±0,06* |
| 20 мкМ | 6,36±0,11* | 23,52±0,40* | 10,98±0,09* | 23,70±0,22* | 2,15±0,08* | 2,24±0,06* |

Примечание. Приведены средние значения ± стандартная ошибка среднего (n=3). *Разница между контролем (без добавок) и экспериментом (в присутствии бетулина или бетулоновой кислоты) является статистически значимой (p < 0.05, t-тест).

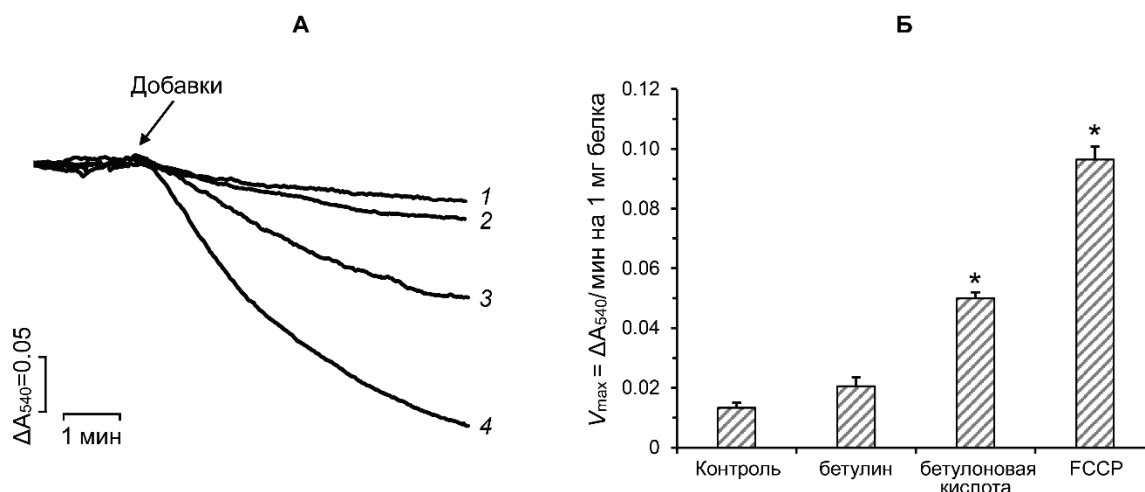


Рисунок 1. Кинетика (А) и скорость (В) набухания митохондрий печени крыс в NH_4NO_3 среде, индуцированного 20 мкМ бетулина (кривая 2), 20 мкМ бетулоновой кислотой (кривая 3) и 25 нМ FCCP (кривая 4). Кривая 1 – контроль (без добавок). На диаграммах приведены средние значения \pm стандартная ошибка среднего ($n = 3$). *Разница между контролем (без добавок) и экспериментом (с тестируемыми агентами) является статистически значимой ($p < 0,05$, t-тест)

Наблюдаемое увеличение скорости дыхания митохондрий в состояниях 2 и 4 в присутствии тритерпеноидов может свидетельствовать о возможном протонофорном эффекте изучаемых соединений. Этот эффект может быть связан с повышенной проницаемостью митохондриальной мембраны для H^+ , индуцированной этими соединениями. Действительно, можно видеть, что бетулоновая кислота, подобно классическому протонофорному разобщителю FCCP, вызывает набухание митохондрий в изоосмотическом растворе NH_4NO_3 , что может указывать на способность этого агента увеличивать протонную проводимость митохондриальной мембраны. В то же время бетулин практически неэффективен (рис. 2).

Эти данные также подтверждены при измерении мембранного потенциала органелл в присутствии этих агентов. Установлено, что бетулоновая кислота (но не бетулин) дозозависимо индуцирует падение мембранного потенциала органелл (не показано). При этом эффект бетулоновой кислоты более выражен на митохондриях, окисляющих сукцинат.

Для дальнейшего выяснения того, что лежит в основе влияния исследуемых соединений на митохондриальное дыхание, мы исследовали их влияние на активность комплексов дыхательной цепи органелл (таблица 3). Видно, что 20 мкМ бетулина не влияет на активность комплексов I, II, III и IV. В то же время бетулин ингибировал совокупную активность комплексов II+III на 10%. 20 мкМ Бетулоновая кислота также не влияла на активность комплекса I и комплекса II, но значительно ингибировала активность комплексов III и IV (на 25 и 22% соответственно). Ингибирующий эффект бетулоновой кислоты был особенно очевиден при оценке совокупной активности комплексов II+III (ингибирование на 86%).

Ранее было показано, что бетулин и бетулоновая кислота вызывают развитие окислительного стресса в раковых клетках и в то же время не влияют на генерацию АФК в нормальных клетках [5,15]. В настоящей работе мы также исследовали влияние различных концентраций бетулина и бетулоновой кислоты на скорость образования H_2O_2 митохондриями печени крыс (рис. 2). Установлено, что при концентрациях 10–20 мкМ бетулин и бетулоновая кислота одинаково увеличивают скорость генерации H_2O_2 митохондриями, окисляющими сукцинат (рис. 2А). В случае НАД-зависимых субстратов бетулин не влиял на образование перекиси водорода (рис. 2Б). В этом случае бетулоновая кислота проявляла слабый антиоксидантный эффект, снижая образование H_2O_2 митохондриями печени крыс.

Таблица 3. Активность комплексов дыхательной цепи митохондрий печени крыс в присутствии 20 мкМ бетулина или бетулоновой кислоты (в % от контроля)

| Комплекс I | Комплекс II | Комплекс III | Комплекс IV | Комплекс I+III | Комплекс II+III |
|---------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Бетулин | | | | | |
| 98,1 \pm 3,2 | 102,6 \pm 2,0 | 95,2 \pm 3,1 | 98,1 \pm 0,6* | 100,5 \pm 1,8 | 90,1 \pm 0,6* |
| Бетулоновая кислота | | | | | |
| 103,7 \pm 4,8 | 106,8 \pm 8,6 | 75,2 \pm 5,0* | 78,7 \pm 0,5* | 103,0 \pm 2,3 | 14,0 \pm 1,7* |

Примечание. Активность комплексов в отсутствие добавок принята за 100%. Приведены средние значения \pm ошибка среднего ($n=3$). *Разница между контролем (без добавок) и экспериментом (в присутствии бетулина или бетулоновой кислоты) является статистически значимой ($p < 0,05$, t-тест).

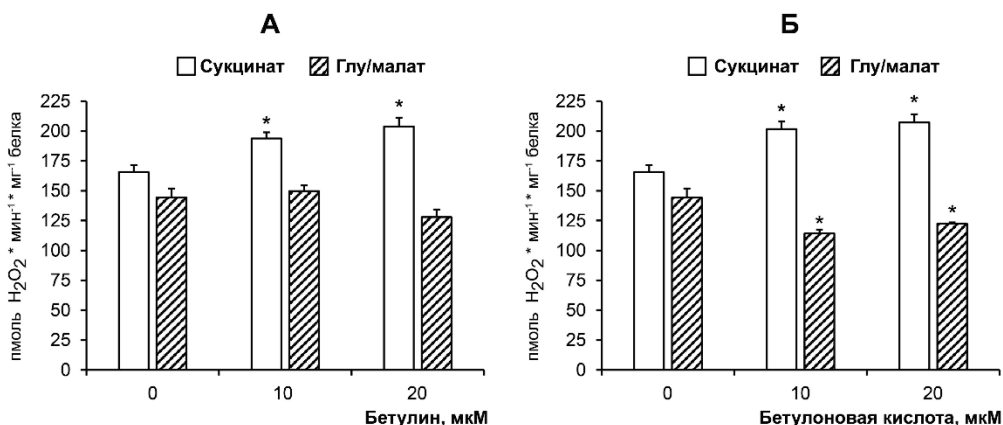


Рисунок 2. Влияние бетулина (А) и бетулоновой кислоты (Б) на скорость генерации H₂O₂ митохондриями печени крыс. В качестве субстратов для дыхания использовали 2,5 мМ глутамат + 2,5 мМ малат (А) или 5 мМ сукцинат + 1 мкМ ротенон (Б). Приведены средние значения ± ошибка среднего (n = 4). * *Разница между контролем (без добавок) и экспериментом (в присутствии бетулина или бетулоновой кислоты) является статистически значимой (p < 0,05, t-тест)

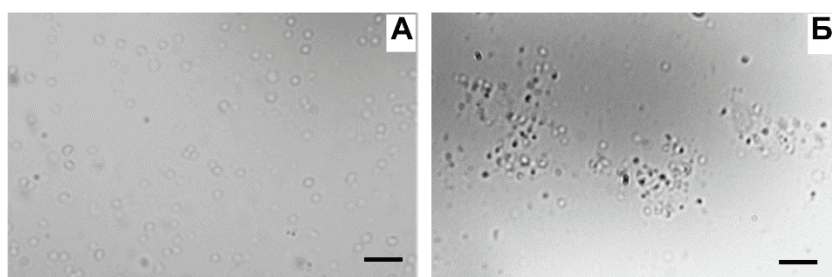


Рисунок 3. Митохондрии печени крыс в отсутствии (А) и в присутствии 50 мкМ бетулина (Б). Шкала – 10 мкм

Кроме того, нами установлено, что бетулин способен активно влиять на поверхностные свойства мембран митохондрий. Показано, что внесение бетулина к суспензии органелл приводит к их агрегации и может сопровождаться пермеабиллизацией их мембран (рис. 3). В этом случае бетулоновая кислота была гораздо менее эффективна (не показано).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что бетулин и бетулоновая кислота способны оказывать существенное влияние на функционирование митохондрий. В основе эффектов этих тритерпеноидов может лежать ингибирование активности комплексов дыхательной цепи митохондрий, а также протонофорное действие. Кроме того, бетулин способен активно индуцировать агрегацию мембран органелл. Это стоит учитывать при разработке новых высокоэффективных лекарственных агентов на основе природных тритерпеноидов лупанового ряда.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№20-015-00124) и гранта президента РФ для поддержки молодых ученых (МК-61.2019.4).

Список литературы / References:

1. Connolly J.D., Hill R.A. Triterpenoids. *Nat. Prod. Rep.*, 2017, no. 27, pp. 79-132. DOI: 10.1039/b808530g.
2. Kreiter J., Rupprecht A., Zimmermann L., Moschinger M., Rokitskaya T.I., Antonenko Y.N., Gille L., Fedorova M., Pohl E.E. Molecular mechanisms responsible for pharmacological effects of genipin on mitochondrial proteins. *Biophys. J.*, 2019, vol. 117, no. 10, pp. 1845-1857. DOI: 10.1016/j.bpj.2019.10.021.
3. Matsuda H., Ishikado A., Nishida N., Ninomiya K., Fujiwara H., Kobayashi Y., Yoshikawa M. Hepatoprotective, superoxide scavenging, and antioxidative activities of aromatic constituents from the bark of *Betula platyphylla* var. *japonica*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, vol. 8, no. 21, pp. 2939-2944. DOI: 10.1016/S0960-894X(98)00528-9.
4. Tolstikova T.G., Sorokina I.V., Tolstikov G.A., Tolstikov A.G., Flekhter O.B. Biological activity and pharmacological prospects of lupane terpenoids: I. natural lupane derivatives. *Russ. J. Bioorg. Chem.*, 2006, no. 32, pp. 37-49. DOI: 10.1134/S1068162006010031.
5. Król S.K., Kielbus M., Rivero-Müller A., Stepulak A. Comprehensive review on betulin as a potent anticancer agent. *Biomed. Res. Int.*, 2015, 584189. DOI: 10.1155/2015/584189
6. Yang S., Zhao Q., Xiang H., Liu M., Zhang Q., Xue W., Song B., Yang S. Antiproliferative activity and apoptosis-inducing mechanism of constituents from *Toona sinensis* on human cancer cells. *Cancer. Cell Int.*, 2013, vol. 13, no. 1, p. 12. DOI: 10.1186/1475-2867-13-12.
7. Cháirez-Ramírez M.H., Moreno-Jiménez M.R., González-Laredo R.F., Gallegos-Infante J.A., Rocha-Guzmán N.E. Lupane-type triterpenes and their anti-cancer activities against most common malignant tumors: A review. *EXCLI J.*, 2016, no. 15, pp. 758-771. DOI: 10.17179/excli2016-642.

8. Leong K.H., Mahdzir M.A., Din M.F., Awang K., Tanaka Y., Kulkeaw K., Ishitani T., Sugiyama D. Induction of intrinsic apoptosis in leukaemia stem cells and in vivo zebrafish model by betulonic acid isolated from *Walsura pinnata* Hassk (Meliaceae). *Phytomedicine*, 2017, no. 26, pp. 11-21. DOI: 10.1016/j.phymed.2016.12.018.
9. Belosludtsev K.N., Dubinin M.V., Belosludtseva N.V., Mironova G.D. Mitochondrial Ca²⁺ transport: mechanisms, molecular structures, and role in cells. *Biochemistry*, 2019, vol. 84, no. 6, pp. 593-607. DOI: 10.1134/S0006297919060026.
10. Dubinin M.V., Samartsev V.N., Stepanova A.E., Khoroshavina E.I., Penkov N.V., Yashin V.A., Starinets V.S., Mikheeva I.B., Gudkov S.V., Belosludtsev K.N. Membranotropic effects of ω -hydroxypalmitic acid and Ca²⁺ on rat liver mitochondria and lecithin liposomes. Aggregation and membrane permeabilization. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 2018, vol. 50, no. 5, pp. 391-401. DOI: 10.1007/s10863-018-9771-y.
11. Fulda S. Betulinic acid: a natural product with anticancer activity. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2019, vol. 53, no. 1, pp. 140-146. DOI: 10.1002/mnfr.200700491.
12. Li Y., He K., Huang Y., Zheng D., Gao C., Cui L., Jin Y.H. Betulin induces mitochondrial cytochrome c release associated apoptosis in human cancer cells. *Mol. Carcinog.*, 2010, vol. 49, no. 7, pp. 630-640. DOI: 10.1002/mc.20638.
13. Belosludtsev K.N., Belosludtseva N.V., Agafonov A.V., Pavlik L.L., Tenkov K.S., Samartsev V.N., Dubinin M.V., Penkov N.V., Yashin V.A. Study of the mechanism of permeabilization of lecithin liposomes and rat liver mitochondria by the antimicrobial drug triclosan. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 2018, vol. 1860, no. 2, pp. 246-271. DOI: 10.1016/j.bbamem.2017.09.018.
14. Chance B., Williams G.R. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization. *J. Biol. Chem.*, 1955, vol. 217, no. 1, pp. 383-393.
15. Hwang B.Y., Chai H.B., Kardono L.B., Riswan S., Farnsworth N.R., Cordell G.A., Pezzuto J.M., Kinghorn A.D. Cytotoxic triterpenes from the twigs of *Celtis philippinensis*, *Phytochemistry*, 2003, vol. 62, no. 2, pp. 197-201. DOI: 10.1016/s0031-9422(02)00520-4.

LUPANE TRITERPENOIDS AS MODULATORS OF FUNCTIONAL ACTIVITY OF RAT LIVER MITOCHONDRIA

Dubinin M.V.¹, Semenova A.A.¹, Vydrina V.A.², Sharapov V.A.¹, Stepanova A.E.¹, Tenkov K.S.¹, Khoroshavina E.I.¹, Belosludtsev K.N.^{1,3}

¹Mari State University

pl. Lenina, 1, Yoshkar-Ola, 424001, Russia; e-mail: dubinin1989@gmail.com

²Ufa Institute of Chemistry

Ufa, Russia

³Institute of Theoretical and Experimental Biophysics

Pushchino, Russia

Abstract. The effect of plant triterpenoid betulin and its derivative betulonic acid on rat mitochondria is considered. It was found that betulonic acid and, to a lesser extent, betulin activate mitochondrial respiration in states 2 and 4 and inhibit respiration stimulated by ADP and DNP. In this case, the effect of betulonic acid leads to a significant decrease in respiratory control and the ADP/O coefficient, as well as to a decrease in membrane potential. The effects of both compounds were most pronounced when succinate was used as a respiratory substrate. It was established that the effect of these agents on the functional parameters of organelles is due to both the protonophore effect of betulonic acid and the inhibition of respiratory chain complexes by both compounds. Both agents also significantly enhanced the generation of H₂O₂ in succinate oxidizing mitochondria, while betulonic acid exerted an antioxidant effect in the presence of NAD-dependent substrates. It was also found that betulin induces mitochondrial aggregation. Betulonic acid was much less effective in this case. Possible mechanisms of the effect of betulin and betulonic acid on the functioning of rat liver mitochondria are discussed.

Key words: betulin, betulonic acid, mitochondria, inhibition, aggregation.