

18. Fischer K., Hoffmann P., Voelkl S., Meidenbauer N., Ammer J., Edinger M., Gottfried E., Schwarz S., Rothe G., Hoves S. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood*, 2007, vol. 109, pp. 3812-3819.

19. Martinez-Outschoorn U.E., Lin Z., Trimmer C., Flomenberg N. Cancer cells metabolically 'fertilize' the tumor microenvironment with hydrogen peroxide, driving the Warburg effect: Implications for PET imaging of human tumors. *Cell Cycle*, 2011, vol. 10, pp. 2504-2520.

20. Swietach P., Vaughan-Jones R.D., Harris A.L. Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase. *Cancer Metastasis Rev*, 2007, vol. 26, pp. 299-310.

21. Zakhvataev V.E., Khlebopros R.G. The Kupershtokh-Medvedev electrostrictive instability as possible mechanism of initiation of phase transitions, domains and pores in lipid membranes and influence of microwave irradiation on cell. *Biophysics*, 2012, vol. 57, no. 1, pp. 61-67.

ВЛИЯНИЕ ПРОТИВОМИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС

Белослудцев К.Н.^{1,2}, Белослудцева Н.В.¹, Теньков К.С.², Косарева Е.А.², Таланов Е.Ю.¹, Дубинин М.В.²

¹ Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук

Институтская, 3, г. Пуцино, Московская обл., 142290, РФ

e-mail: bekonik@gmail.com;

²Марийский государственный университет

пл. Ленина, 1, г. Йошкар-Ола, Марий Эл, 424001, РФ

Аннотация. В работе исследуется влияние ряда противомикробных препаратов различной структуры (триклозан, деквалиний, бедаквиллин и итаконовая кислота) на изолированные митохондрии печени крыс. Показано, что эти соединения оказывают значительное воздействие на параметры дыхания митохондрий и/или проницаемость их мембран. Установлено, что триклозан способен ингибировать комплекс II дыхательной цепи и пермеабиллизировать внутреннюю митохондриальную мембрану. Механизм пермеабиллизации внутренней мембраны связан, вероятно, с индукцией липидной поры. Итаконовая кислота ингибирует комплекс II дыхательной цепи митохондрий. Деквалиний подавляет работу комплекса III дыхательной цепи и индуцирует неспецифическую проницаемость внутренней мембраны. В отличие от триклозана, деквалиний-индуцированная пермеабиллизация связана с открытием в митохондриях циклоспорин А-чувствительной МРТ поры. Бедаквиллин вызывает резкое снижение скорости митохондриального дыхания во всех функциональных состояниях органелл, а также ингибирование Ca²⁺-зависимой циклоспорин А-чувствительной МРТ поры в мембране митохондрий. Обсуждаются механизмы токсического действия противомикробных препаратов на клетки эукариот.

Ключевые слова: митохондрии, триклозан, итаконовая кислота, деквалиний, бедаквиллин.

EFFECTS OF ANTIMICROBIAL DRUGS ON RAT LIVER MITOCHONDRIA

Belosludtsev K.N.^{1,2}, Belosludtseva N.V.¹, Tenkov K.S.², Kosareva E.A.², Talanov E.Yu.¹, Dubinin M.V.²

¹Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences

Institutskaya 3, Pushchino, Moscow region, 142290, Russia

e-mail: bekonik@gmail.com

²Mari State University,

pl. Lenina 1, Yoshkar-Ola, Mari El, 424001, Russia

Abstract. The work examines the effects of a number of antimicrobial agents (triclosan, dequalinium, bedaquiline and itaconic acid) on isolated rat liver mitochondria. It has been shown that these compounds dramatically affect mitochondrial respiration and/or permeability of the inner mitochondrial membrane. Triclosan inhibits complex II of the mitochondrial respiratory chain and permeabilizes the inner mitochondrial membrane. The permeabilization of the mitochondrial membrane is associated with the formation of lipid pores in lipid bilayer. Itaconic acid inhibits succinate dehydrogenase, but does not permeabilize the mitochondrial membrane. Dequalinium is a potent inhibitor of the complex III of the mitochondrial respiratory chain and induces a nonspecific permeability of the inner mitochondrial membrane. Unlike triclosan, the dequalinium-induced mitochondrial permeabilization is associated with the opening of cyclosporin A-sensitive MPT pore. Bedaquiline inhibits the respiration rates at all functional states of mitochondria. In addition, it is able to inhibit the opening of Ca²⁺-dependent cyclosporin A-sensitive MPT pores in the mitochondrial membrane. The mechanisms of the toxic effect of antimicrobial agents on eukaryotic cells are discussed.

Key words: mitochondria, triclosan, itaconic acid, dequalinium, bedaquiline

Известно, что механизм действия большинства противомикробных лекарственных препаратов связан с подавлением функционирования специфических метаболических путей или ключевых ферментов бактериальной клетки. Как правило, ферментами-мишенями являются бактериальные белки, ответственные за синтез клеточной стенки или генерацию энергии [1-4]. В связи с тем, такие ферментные системы отсутствуют в клетках эукариот, долгое время предполагалось, что противомикробные препараты непосредственно не влияют на эукариотические

организмы, в том числе и организм человека. Однако исследования последних лет показали, что эти соединения влияют на активность мембранных рецепторов и внутриклеточных ферментов, изменяют ионный гомеостаз, индуцируют развитие окислительного стресса и апоптотическую гибель эукариотических клеток [5,6]. В связи с этим, изучение молекулярных механизмов взаимодействия противомикробных препаратов с клетками эукариот является важной задачей современной биомедицины.

Митохондрии являются одной из главных мишеней, на которую могут оказывать свое действие лекарственные соединения и ксенобиотики различной природы. Это связано с важной ролью митохондрий в клеточной патофизиологии. Как известно, основной функцией митохондрий в здоровой клетке является снабжение ее энергией в форме АТФ. Синтез АТФ из АДФ и неорганического фосфата при потреблении кислорода митохондриями (процесс окислительного фосфорилирования) связан с работой переносчиков дыхательной цепи [7]. Нарушение функции белковых комплексов дыхательной цепи митохондрий будет приводить к снижению внутриклеточного уровня АТФ. С другой стороны, митохондрии являются активными участниками программы индукции клеточной гибели. Выход цитохрома с и других проапоптотических белков из митохондрий запускает каскад реакций, приводящих к апоптотической гибели клетки. Предполагается, что высвобождение проапоптотических белков может происходить при увеличении неспецифической проницаемости (пермеабилзации) внутренней мембраны митохондрий. В основе такой пермеабилзации может лежать как открытие митохондриальной Ca^{2+} -зависимой циклоспорин А-чувствительной поры ((Mitochondrial Permeability Transition) MPT поры), так и нарушение упаковки фосфолипидного бислоя и появление липидных пор [8,9]. Очевидно, что взаимодействие противомикробных препаратов с митохондриями может привести к негативным последствиям для жизнедеятельности клетки.

В настоящей работе исследовалось действие ряда противомикробных препаратов различной структуры на функционирование изолированных митохондрий печени крыс. В качестве исследуемых препаратов были выбраны как известные синтетические (триклозан, деквалиний, бедаквилин), так и природные соединения (итаконовая кислота) (см. рис. 1). Как известно, триклозан и деквалиний относят к антибиотикам широкого спектра действия [6,10]. В то же время, бедаквилин является препаратом нового поколения против возбудителя туберкулеза (бактерии рода *Mycobacterium*) [2]. Важно отметить, что все эти препараты потенциально могут взаимодействовать с мембранами митохондрий. Так, деквалиний – это проникающий катион, который будет накапливаться в клетке именно в митохондриях, несущих высокий отрицательный мембранный потенциал на матриксной стороне внутренней мембраны [11]. Триклозан и бедаквилин являются гидрофобными соединениями, которые также будут взаимодействовать с биологическими мембранами (в том числе, и мембранами митохондрий) [2,6]. Более того, бедаквилин является ингибитором бактериальной АТФ-синтазы, что позволяет сделать предположение о возможном взаимодействии этого соединения с АТФ-синтазой митохондрий. Что касается итаконовой кислоты, то она является гидрофильным низкомолекулярным соединением, которое синтезируется в макрофагах. В то же время, метаболизм итаконовой кислоты может быть связан с ферментными системами митохондрий [12].

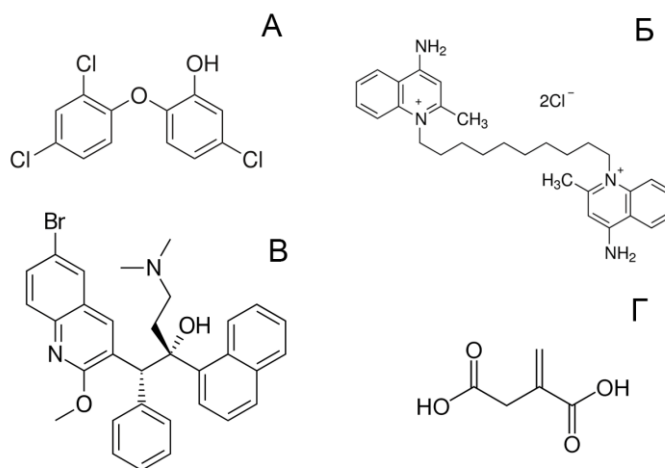


Рисунок 1 – Структура триклозана (А), деквалиниума (Б), бедаквилина (В) и итаконовой кислоты (Г)

Первой задачей нашей работы было изучение влияния исследуемых соединений на активность комплексов дыхательной цепи митохондрий. Как видно из таблицы 1, ни одно из представленных соединений не влияет на активность комплекса I дыхательной цепи митохондрий печени крысы. В то же время, триклозан и итаконовая кислота подавляют активность комплекса II дыхательной цепи. Деквалиний является мощным ингибитором комплекса III дыхательной цепи митохондрий. Бедаквилин практически не влияет на активность дыхательных комплексов митохондрий печени крысы.

Таблица 1 – Влияние противомикробных препаратов на активность дыхательных комплексов митохондрий печени крыс (в % от контроля)

Соединение	Комплекс I	Комплекс II	Комплекс III	Комплекс IV
Триклозан (35 мкМ)	89±4	15±5*	93±4	77±2*
Деквалиниум (50 мкМ)	125±13	98±7	23±3*	99±3
Бедаквилин (20 мкМ)	107±1	83±2*	87±3	102±1
Итаконовая к-та (20 мМ)	104±2	66±4*	96±1	89±2

Активность комплексов в отсутствие соединений принята за 100%. Приведены средние значения ± ошибка среднего ($n = 3$). *Различия между контролем (без соединений) и опытом достоверны $p < 0.05$.

Следующей задачей являлось изучение функционального состояния митохондрий печени крыс, которое оценивали по скорости митохондриального дыхания в присутствии субстрата комплекса II дыхательной цепи – сукцината. Поскольку три из четырёх агентов ингибировали активность дыхательных комплексов, можно было ожидать, что они будут подавлять митохондриальное дыхание в различных функциональных состояниях. Как видно из таблицы 2, итаконовая кислота, как ингибитор II комплекса дыхательной цепи, подавляла дыхание митохондрий во всех функциональных состояниях. Стоит отметить, что итаконовая кислота практически не влияла на дыхание митохондрий, окисляющих субстраты комплекса I – глутамат и малат (данные не приведены). Неожиданно, но бедаквилин, не оказывающий влияние на активность дыхательных комплексов, также подавлял митохондриальное дыхание во всех состояниях. В то же время, триклозан и деквалиниум стимулировали дыхание митохондрий в состоянии 2 (V_2), однако значительно подавляли скорость дыхания митохондрий в АДФ-стимулированном (V_3) и ДНФ-стимулированном (разобщенное дыхание) состояниях.

Таблица 2. Влияние противомикробных препаратов на дыхание митохондрий печени крыс в разных функциональных состояниях

Соединение	<i>V</i> дыхания, % от контроля в соответствующих состояниях			
	V_2	V_3	V_4	$V_{\text{ДНФ}}$
Триклозан (5 мкМ)	233±11*	47±5*	-	41±2*
Деквалиниум (20 мкМ)	176±11*	16±1*	-	14±1*
Бедаквилин (50 мкМ)	71±12*	60±6*	76±8*	56±2*
Итаконовая к-та (4 мМ)	88±4*	34±2*	83±1*	41±3*

Скорость дыхания в каждом состоянии в отсутствие соединений была принята за 100%. Дыхание митохондрий в состоянии 3 индуцировалось добавлением 200 мкМ АДФ. Скорость разобщенного дыхания измерялась в присутствии 50 мкМ ДНФ ($V_{\text{ДНФ}}$). Приведены средние значения ± ошибка среднего ($n = 3$). *Различия между контролем (без соединений) и опытом достоверны $p < 0.05$.

Стимуляция дыхания в состоянии 2 и ингибирование дыхания во всех остальных состояниях, наблюдаемые в экспериментах с триклозаном и бедаквилином, могут быть опосредованы открыванием митохондриальной поры во внутренней мембраны органелл. В связи с этим, следующей задачей нашего исследования являлось определить, способны ли данные препараты индуцировать неспецифическую проницаемость внутренней митохондриальной мембраны. Как показано на рис. 2, добавление к митохондриям печени крыс триклозана и деквалиниума приводит к значительному снижению оптической плотности митохондриальной суспензии, что свидетельствует о высокоамплитудном набухании органелл. Важно отметить разную кинетику набухания митохондрий, индуцируемого триклозаном и деквалиниумом: триклозан вызывает набухание сразу же после добавки препарата, тогда как в случае деквалиниума, оно развивается только после небольшого лаг-периода. Это позволяет предположить разный механизм повышения проницаемости митохондриальной мембраны в этих двух случаях. Циклоспорин А – специфический ингибитор митохондриальной белковой МРТ поры подавляет набухание митохондрий, индуцированное деквалиниумом. В случае с триклозаном он не эффективен. По-видимому, триклозан индуцирует набухание митохондрий, связанное с открытием циклоспорин А-нечувствительной липидной поры. Как показали наши исследования, триклозан также индуцировал пермеабиллизацию искусственных мембран – однослойных липосом. В основе этой пермеабиллизации может лежать фазовая сепарация мембраны, индуцированная триклозаном (данные не приведены). В то же время, деквалиниум был не способен пермеабиллизировать мембрану липосом.

Параллельно с индукцией митохондриального набухания, триклозан и деквалиниум способны также вызывать увеличенную продукцию активных форм кислорода в митохондриях (данные не приведены). Как известно, коллапс мембранного потенциала, увеличение продукции активных форм кислорода и набухание митохондрий являются важными драматическими событиями, ведущими к индукции клеточной гибели. Действительно, было показано, что триклозан и деквалиниум индуцируют гибель клеток эукариот [6,13].

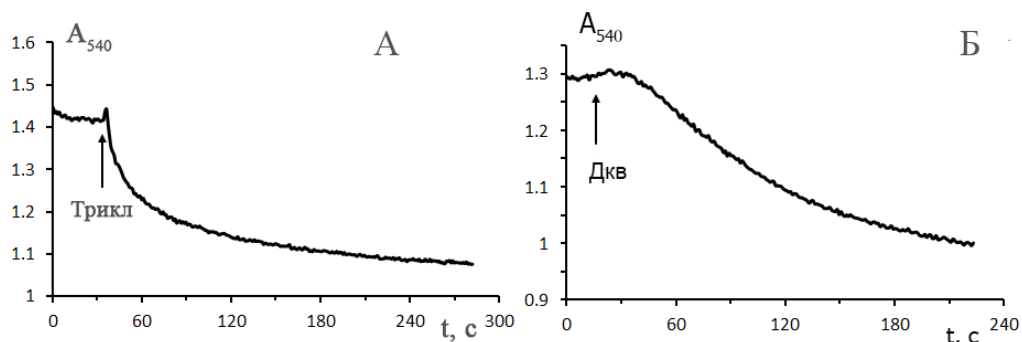


Рисунок 2 – Набухание митохондрий печени крыс, индуцируемое 35 мкМ триклозаном (Трикл) (А) и 10 мкМ деквалиниумом (Дкв) (Б)

Как показали наши исследования, другие противомикробные соединения – итаконовая кислота и бедаквиллин, были не способны индуцировать митохондриальное набухание. Однако, они эффективно подавляли открытие Ca^{2+} -зависимой белковой МРТ поры в митохондриях (данные не приведены). Возможно, что это связано с тем, что они существенно подавляют митохондриальное дыхание и таким образом препятствуют энергозависимой аккумуляции свободных ионов кальция в митохондриальной матриксе, необходимой для индукции поры.

Как следует из полученных в работе результатов, исследуемые нами противомикробные препараты проявляют разнообразные эффекты на функционирование митохондрий. Так, триклозан и деквалиниум вызывают резкую дисфункцию митохондрий печени крысы (ингибирование синтеза АТФ, митохондриальное набухание, стимуляцию образования активных форм кислорода), что может являться причиной токсического действия этих соединений на клетки эукариот. Действительно, было показано, что триклозан индуцирует гибель эукариотических клеток по апоптоз-зависимому механизму, а деквалиниум обладает противоопухолевой активностью в отношении злокачественных клеток разного типа [14,15]. Что касается бедаквиллина и итаконовой кислоты, то можно заключить, что они предотвращают открытие митохондриальной поры, приводящей к выходу проапоптотических белков из органелл, однако механизм этого ингибирования требует дальнейшего изучения.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (15-04-03081-а, 17-44-500584-р_а), и Министерства образования и науки РФ (в рамках государственного задания № 6.5170.2017/8.9).

Список литературы / References:

- Gualano G., Capone S., Matteelli A., Palmieri F. New Antituberculosis Drugs: From Clinical Trial to Programmatic Use. *Infect Dis Rep.*, 2016, vol. 8, no. 2, p. 6569.
- Lakshmanan M., Xavier A.S. Bedaquiline – The first ATP synthase inhibitor against multi drug resistant tuberculosis. *J. Young Pharm.*, 2013, vol. 5, no. 4, pp. 112-115.
- Heath R.J., Rubin J.R., Holland D.R., Zhang E., Snow M.E., Rock C.O. Mechanism of triclosan inhibition of bacterial fatty acid synthesis. *J. Biol. Chem.*, 1999, vol. 274, pp. 11110-11114.
- Erand R.M., Erand R.F. Domains in bacterial membranes and the action of antimicrobial agents. *Mol Biosyst.*, 2009, vol. 5, no. 6, pp. 580-587.
- Bodden W.L., Palayoor S.T., Hait W.N. Selective antimitochondrial agents inhibit calmodulin. *Biochem Biophys Res Commun.*, 1986, vol. 135, no. 2, pp. 574-582.
- Zuckerbraun H.L., Babich H., May R., Sinensky M.C. Triclosan: cytotoxicity, mode of action, and induction of apoptosis in human gingival cells in vitro. *Eur. J. Oral Sci.*, 1998, vol. 106, pp. 628-636.
- Скулачев В.П. Богачев А.В., Каспаринский Ф.О. *Мембранная биоэнергетика*. М.: Изд-во Московского ун-та, 2010, 368 с. [Skulachev V.P., Bogachev A.V., Kasparinsky F.O. *Membrane bioenergetics*. М.: Moscow University Press, 2010, 368 p. (In Russ.)]
- Halestrap A.P., Richardson A.P. The mitochondrial permeability transition: a current perspective on its identity and role in ischaemia/reperfusion injury. *J. Mol. Cell Cardiol.*, 2015, vol. 78, pp. 129-141.
- Belosludtsev K.N., Belosludtseva N.V., Agafonov A.V., Astashev M.E., Kazakov A.S., Saris N.-E.L., Mironova G.D. Ca^{2+} -dependent permeabilization of mitochondria and liposomes by palmitic and oleic acids: a comparative study. *Biochim. Biophys. Acta*, 2014, vol. 1838, no. 10, pp. 2600-2606.
- Babbs M., Collier H.O., Austin W.C., Potter M.D., Taylor E.P. Salts of decamethylene-bis-4-aminoquinaldinium (dequadin); a new antimicrobial agent. *J Pharm Pharmacol.*, 1956, vol. 8, no. 2, pp. 110-119.
- Chen Z.P., Li M., Zhang L.J., He J.Y., Wu L., Xiao Y.Y., Duan J.A., Cai T., Li W.D. Mitochondria-targeted drug delivery system for cancer treatment. *J. Drug Target.*, 2016, vol. 24, no. 6, pp. 492-502.
- Adler J. Wang S.F., Lardy H.A. The metabolism of itaconic acid by liver mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 1957, vol. 229, no. 2, pp. 865-79.
- Gamboa-Vujcic G., Emma D.A., Liao S.Y., Fuchtnner C., Manetta A. Toxicity of the mitochondrial poison dequalinium chloride in a murine model system. *J Pharm Sci.*, 1993, vol. 82, no. 3, pp. 231-235.

14. Weiss M.J., Wong J.R., Ha C.S., Bleday R., Salem R.R., Steele G.D. Jr., Chen L.B. Dequalinium, a topical antimicrobial agent, displays anticarcinoma activity based on selective mitochondrial accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 1987, vol. 84, no. 15, pp. 5444-5448.

15. Ajao C., Andersson M.A., Teplova V.V., Nagy S., Gahmberg C.G., Andersson L.C., Hautaniemi M., Kakasi B., Roivainen M., Salkinoja-Salonen M. Mitochondrial toxicity of triclosan on mammalian cells. *Toxicology Report*, 2015, vol. 2, pp. 624-637.

ИССЛЕДОВАНИЕ АГРЕГАЦИОННЫХ СОСТОЯНИЙ ТЕТРАФЕНИЛПОРФИРИНА В ПЛЕНКАХ

Клименко И.В.¹, Лобанов А.В.²

¹ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН

ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119334, РФ

e-mail: inna@deom.chph.ras.ru

²ФГБУН Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН

ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119334, РФ

e-mail: avlobanov@mail.ru

Аннотация. С целью разработки и изучения агрегированных форм порфиринов в стабилизированном состоянии исследованы оптические свойства (оптическое поглощение и флуоресценция) пленок мономера и H- и J-агрегатов 5,10,15,20-тетрафенилпорфирина, а также их вольтамперные характеристики. Получены различные спектральные и электрические характеристики тетрафенилпорфирина с разным типом агрегации. По своим характеристикам J-агрегаты близки к мономеру тетрафенилпорфирина. Для пленок с J-агрегатами зарегистрированы флуоресценция и электрический отклик, которые не наблюдаются в случае пленок с H-агрегатами. Эти данные, а также наличие поглощения в красной области спектра делают J-агрегаты тетрафенилпорфирина перспективными материалами при создании пленочных систем для фотовольтаики, фотокатализа и фотодинамических процессов. Возможность изменять состав таких пленок позволяет получать тонкие пленки органических материалов с заранее заданными свойствами и широким спектром возможностей.

Ключевые слова: тетрафенилпорфирин, мономер, H-агрегаты, J-агрегаты, спектральные характеристики, оптическое поглощение, флуоресценция, вольтамперные характеристики.

INVESTIGATION OF TETRAPHENYLPORPHYRIN AGGREGATION STATES IN FILMS

Klimenko I.V.¹, Lobanov A.V.²

¹N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics of Russian Academy of Sciences,

Kosygin str, 4, 119334 Moscow, 119334 Russia

e-mail: inna@deom.chph.ras.ru

²Semenov Institute of Chemical Physics of Russian Academy of Sciences,

Kosygin str, 4, 119334 Moscow, 119334 Russia

e-mail: avlobanov@mail.ru

Abstract. For the purpose of development and studying of the porphyrines aggregated forms in the stabilized state optical properties (optical absorption and fluorescence) of the films of 5,10,15,20-tetraphenylporphyrin monomer and H- and J-aggregates and also their current voltage characteristics are investigated. Various spectral and electric characteristics of tetraphenylporphyrin with different type of aggregation are received. According to their characteristics J- aggregates are close to monomer of tetraphenylporphyrin. For the films with J-aggregates fluorescence and an electric response which aren't observed in the case of films with H-aggregates are registered. These data and also the existence of absorption in red region of spectrum do J- aggregates of tetraphenylporphyrin perspective materials during creation of film systems for photovoltaics, photocatalysis and photodynamic processes. An opportunity to change structure of such films allows receiving thin films of organic materials with predetermined properties and a wide range of possibilities.

Key words: tetraphenylporphyrin, monomer, H-aggregates, J-aggregates spectral characteristics, optical absorption, fluorescence. current voltage characteristics.

Последние достижения супрамолекулярной химии порфиринов в области процессов самосборки и образования агрегатов привлекают все большее внимание исследователей в связи с перспективами использования новых систем в качестве функциональных материалов с ценными электронно-оптическими свойствами в молекулярных и других устройствах. Порфириновые молекулы, благодаря своей «жесткой» структуре, являются перспективными объектами при создании супрамолекул в качестве основных структурных единиц [1]. Самосборка порфиринов происходит за счет межмолекулярных взаимодействий, таких как силы Ван-дер-Ваальса, водородные связи или (π - π)-стэкинг [2], в дальнейшем приводящих к образованию агрегатов. Расширенная сопряженная π -система порфиринов позволяет использовать спектральные методы для получения полезной информации о межмолекулярных взаимодействиях [1] и понимания процессов агрегации. Однако недостаточность информации о фотофизических свойствах порфириновых комплексов и агрегатов ТФП в тонких пленках ограничивает их широкое использование [3].