

УДК 577.352.4

ПРОИЗВОДНОЕ БЕНЗИМИДАЗОЛА NS1619 ПОДАВЛЯЕТ ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ МИТОХОНДРИЙ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ МЫШЕЙ

© 2023 г. М. В. Дубинин^{a, *}, А. Д. Игошкина^a, А. А. Семенова^a,
Н. В. Микина^a, Е. И. Хорошавина^a, К. Н. Белослудцев^{a, b}

^aМарийский государственный университет,
Йошкар-Ола, Республика Марий Эл, 424000 Россия

^bИнститут теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
Пущино, Московская обл., 142290 Россия

*e-mail: dubinin1989@gmail.com

Поступила в редакцию 16.01.2023 г.

После доработки 25.01.2023 г.

Принята к публикации 27.01.2023 г.

Известно, что активатор Ca^{2+} -чувствительного калиевого канала большой проводимости (BK_{Ca}) NS1619 обладает плеiotропным действием и способен также оказывать влияние на функционирование других транспортных систем клетки и ее органелл. В настоящей работе нами изучено влияние этого производного бензимидазола на функционирование изолированных митохондрий скелетных мышц мышей. Показано, что NS1619 дозозависимо подавляет дыхание и окислительное фосфорилирование митохондрий скелетных мышц мышей, энергизованных как в присутствии глутамат/малата (субстраты комплекса I дыхательной цепи), так и сукцината (субстрат комплекса II дыхательной цепи). Такое действие NS1619 обусловлено ингибированием активности комплексов I, III и IV дыхательной цепи органелл, а также АТФ-синтазы и сопровождается дозозависимым снижением мембранного потенциала органелл, энергизованных субстратами или АТФ. Кроме того, NS1619 существенно снижает способность митохондрий поглощать и аккумулировать ионы кальция в матриксе. В то же время, мы отметили антиоксидантный эффект NS1619, который проявляется в снижении продукции перекиси водорода митохондриями скелетных мышц, энергизованными глутаматом и малатом. В работе обсуждаются механизмы возможного токсического действия NS1619 на функционирование митохондрий скелетных мышц и его вклад в побочные эффекты, наблюдаемые при *in vivo* терапии мышечных патологий.

Ключевые слова: митохондрии скелетных мышц, NS1619, окислительное фосфорилирование, дыхательная цепь, кальций, активные формы кислорода

DOI: 10.31857/S0233475523030064, **EDN:** FBJKVF

ВВЕДЕНИЕ

Модуляторы специфических ионных каналов являются важными фармакологическими инструментами, позволяющими характеризовать функциональные свойства ионных каналов и их влияние на функцию клеток и их органелл. Одним из актуальных направлений современной биологии и фармакологии является поиск модуляторов Ca^{2+} -чувствительного калиевого канала большой проводимости (BK_{Ca}), обнаруженного в плазматической мембране разных типов клеток, наружной мембране ядра, а также внутренней митохондриальной мембране (мито BK_{Ca}). Активность этого канала регулируется внутриклеточной концентрацией ионов кальция и мембранным потенциалом [1].

Известно, что BK_{Ca} -канал кодируется геном *Kcnma1*, который при транскрибировании подвергается альтернативному сплайсингу, что приводит к появлению нескольких изоформ BK_{Ca} и в том числе митохондриального варианта [2]. Митохондриальный BK_{Ca} , наряду с АТФ-зависимым калиевым каналом, также локализованным во внутренней мембране органелл, обеспечивает транспорт ионов калия в матрикс митохондрий [3, 4]. Известно, что активность транспорта калия в митохондриях, в том числе опосредованного BK_{Ca} , тесно связана с регуляцией активности дыхательной цепи митохондрий, продукцией ими активных форм кислорода (АФК) и индукцией клеточной гибели [1]. Предполагается, что это может быть обусловлено мягким разобщающим

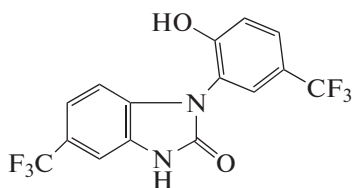


Рис. 1. Структура NS1619.

влиянием транспорта калия, приводящим к снижению мембранного потенциала органелл, и как следствие, к снижению продукции АФК митохондриями [5–7]. Действительно, показано, что VK_{Ca} играет важную цитопротекторную роль при ишемии сердца и мозга [8, 9]. При этом защитный эффект достигается путем фармакологической активации VK_{Ca} и, напротив, снимается в присутствии ингибиторов этого канала. Одним из активаторов VK_{Ca} , оказывающих цитопротекторное влияние, является производное бензимидазола NS1619 (1,3-дигидро-1-[2-гидрокси-5-(трифторметил)фенил]-5-(трифторметил)-2Н-бензимидазол-2-он) (рис. 1). Ранее было показано, что NS1619 защищает клетки сердца при ишемии/реперфузии, а также обладает нейропротекторным действием [8, 9]. Наряду с этим уже в ранних работах была выявлена плеiotропность действия NS1619, которая проявлялась в его способности в высоких концентрациях подавлять функционирование комплексов дыхательной цепи митохондрий [10–12], Ca^{2+} -АТФ-азы сарко/эндоплазматического ретикулаума [12], а также кальциевых каналов L-типа плазматических мембран [13].

Недавно нами показано, что в условиях *in vivo* NS1619 нормализует размер и функциональную активность митохондрий скелетных мышц и смягчать развитие деструктивных процессов в мышцах дистрофин-дефицитных *mdx* мышей, моделирующих тяжелую генетическую патологию — мышечную дистрофию Дюшенна [14]. Применение NS1619 обнаружило классическую для этого агента картину и, наряду с активацией транспорта ионов калия через внутреннюю мембрану митохондрий скелетных мышц, сопровождалось снижением продукции АФК митохондриями, увеличением кальциевой емкости органелл, а также нормализацией их размера. С другой стороны, в этих экспериментах нами было выявлено снижение параметров дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий скелетных мышц животных, получавших NS1619. При этом такой эффект NS1619 был более выражен в случае контрольных животных дикого типа, демонстрирующих высокие показатели функциональной активности органелл, и в этом случае также сопровождался увеличением периметра органелл [14].

С целью выяснения механизмов, лежащих в основе выявленных ранее побочных эффектов NS1619, в настоящей работе нами оценено влияние этого агента на функционирование изолированных митохондрий скелетных мышц мышей линии C57BL/10. Установлено, что в условиях *in vitro* этот агент дозозависимо снижает параметр дыхательного контроля митохондрий и соотношение ADP/O , что обусловлено как возможным разобщающим влиянием транспорта ионов калия, так и ингибированием активности комплексов дыхательной цепи органелл и АТФ-синтазы. Это сопровождается снижением мембранного потенциала органелл, а также подавлением способности митохондрий поглощать и аккумулировать ионы кальция в матриксе. С другой стороны, нами отмечено снижение продукции перекиси водорода митохондриями скелетных мышц в присутствии NS1619.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение митохондрий из скелетных мышц мышей. Митохондрии из скелетных мышц мышей линии C57BL/10 (вес животных 25–28 г) выделяли методом дифференциального центрифугирования в соответствии с описанной ранее методикой [15], за исключением этапа трипсинизации ткани. Концентрацию белка митохондрий определяли методом Бредфорд, в качестве стандарта использовали раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА). Во время проведения эксперимента суспензию митохондрий (20–30 мг митохондриального белка в 1 мл) хранили на льду.

Оценка дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий скелетных мышц мышей. Дыхание митохондрий регистрировали полярографическим методом при 25°C в ячейке объемом 0.3 мл с помощью электрода Кларка и установки Oxygraph Plus (Hansatech Instruments, Великобритания) [16]. Среда инкубации содержала 200 мМ сахарозу, 20 мМ KCl, 5 мМ KH_2PO_4 , 0.5 мМ EGTA, 10 мМ HEPES – KOH, pH 7.4. Применяли следующие концентрации субстратов и других реагентов: 2.5 мМ малат калия, 2.5 мМ глутамат калия, 5 мМ янтарная кислота, 0.2 мМ ADP, 50 мкМ 2,4-динитрофенол и 1 мкМ ротенон. Оценивали дыхание митохондрий в основном метаболическом состоянии (т.е. в присутствии экзогенных субстратов или состояние 2), в состоянии 3 (в присутствии экзогенных субстратов и ADP), в состоянии 4 (после того, как весь добавленный ADP был израсходован в процессе синтеза АТФ), скорость дыхания митохондрий в состоянии 3 $\text{U}_{\text{ДФ}}$ (в присутствии протонофорного разобщителя 2,4-динитрофенола в концентрации 50 мкМ, вызывающей максимальную стимуляцию дыхания). Скорость окисления субстратов выражена в нмоль O_2 мин⁻¹ мг⁻¹ белка митохондрий. Коэф-

фициент дыхательного контроля (ДК = состояние 3/состояние 4). ADP/O — стехиометрический коэффициент, показывающий эффективность окислительного фосфорилирования. Значение коэффициента ADP/O определяли пульсовым методом [17]. Концентрация митохондриального белка в ячейке составляла 0.5 мг/мл.

Оценка активности комплексов дыхательной цепи митохондрий скелетных мышц мышей. Влияние NS1619 на активность комплексов дыхательной цепи митохондрий скелетных мышц мышей оценивали спектрофотометрически согласно общепринятым протоколам [18–20] с использованием планшетного спектрофотометра Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific, США). Для разрушения митохондрий, освобождения индивидуальных комплексов дыхательной цепи и достижения их максимальной ферментативной активности изолированные митохондрии (10 мг/мл митохондриального белка) предварительно подвергали трехкратной процедуре замораживания/оттаивания при $-20/+30^{\circ}\text{C}$ в гипотоническом буфере, содержащем 10 мМ Tris—HCl, pH 7.6. Состав буферов, использованных для анализа активности индивидуальных комплексов дыхательной цепи, приведен в работах [18–20]. Активность комплекса I оценивалась при 25°C по эффективности восстановления 2,6-дихлорфенолиндофенола разрушенными митохондриями (50 мкг митохондриального белка/мл), которое оценивалось по скорости уменьшения оптической плотности при 600 нм после внесения 100 мкМ NADH [18]. Активность комплекса II дыхательной цепи оценивали при 37°C по эффективности восстановления 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия суспензией разрушенных митохондрий (50 мкг митохондриального белка/мл) в присутствии субстрата окисления сукцината, которое определялось по снижению светопоглощения суспензии при длине волны 600 нм после внесения 50 мкМ дециллубихинона. Активность комплекса III дыхательной цепи оценивали при 25°C по эффективности восстановления добавленного цитохрома *c* суспензией разрушенных митохондрий (25 мкг митохондриального белка/мл), которое определялось по снижению оптической плотности суспензии при длине волны 550 нм после внесения 100 мкМ дециллубихинола. Активность комплекса IV дыхательной цепи оценивали при 25°C по эффективности окисления добавленного цитохрома *c* (восстановленного в соответствии с [19]) суспензией разрушенных митохондрий (50 мкг митохондриального белка/мл), которое определялось по снижению оптической плотности суспензии при длине волны 550 нм после внесения суспензии разрушенных органелл. Анализ активности комплекса V был основан на связи его АТФ-азной активности и окисления NADH посредством реакций превращения фосфоенолпирувата в пируват под действием пиру-

ваткиназы, а затем пирувата в лактат под действием лактатдегидрогеназы [20]. В этом случае реакцию проводили при 25°C и запускали путем внесения суспензии разрушенных митохондрий (50 мкг митохондриального белка/мл), после чего оценивали снижение оптической плотности при длине волны 340 нм, отражающее окисление NADH. Активность комплексов дыхательной цепи оценивали в течение первых 2–3 мин с начала редокс-реакции (нмоль/мин на 1 мг белка). Влияние NS1619 на активность комплексов дыхательной цепи выражали в процентах от средней активности, регистрируемой в серии контрольных экспериментов.

Оценка разности электрических потенциалов ($\Delta\psi$) на внутренней мембране митохондрий. Разность электрических потенциалов ($\Delta\psi$) на внутренней мембране митохондрий оценивали по распределению флуоресцентного зонда сафранина О через внутреннюю мембрану с помощью планшетного спектрофлуориметра Varioskan LUX (Thermo Fisher Scientific, США) [21]. Среда инкубации содержала 210 мМ маннитол, 70 мМ сахарозу, 1 мМ KH_2PO_4 , 10 мкМ EGTA, 10 мМ HEPES—KOH, pH 7.4. Применяли следующие концентрации субстратов и других реагентов: 2.5 мМ малат калия, 2.5 мМ глутамат калия, 5 мМ янтарная кислота, 1 мкМ FCCP и 1 мкМ ротенон. Концентрация митохондриального белка в ячейке составляла 0.5 мг/мл.

Оценка кальциевой емкости митохондрий скелетных мышц мышей. Транспорт Ca^{2+} через внутреннюю митохондриальную мембрану оценивали спектрофотометрически с помощью индикатора арсеназо III (3,6-бис-[(2-арсонофенил)азо]-4,5-дигидрокси-2,7-нафталиндисульфокислота) индикатора при 675–685 нм с помощью планшетного спектрофотометра Multiskan GO (Thermo) при 25°C и постоянном перемешивании [22]. Среда инкубации содержала 210 мМ маннитол, 70 мМ сахарозу, 1 мМ KH_2PO_4 , 50 мкМ арсеназо III, 10 мкМ EGTA, 10 мМ HEPES—KOH, pH 7.4. Применяли следующие концентрации субстратов и других реагентов: 2.5 мМ малат калия, 2.5 мМ глутамат калия, 5 мМ янтарная кислота, 1 мкМ ротенон. Концентрация митохондриального белка в ячейке составляла 0.3 мг/мл. Для определения способности митохондрий удерживать Ca^{2+} , 20 мкМ CaCl_2 последовательно добавлялись в реакционную среду. После нескольких добавлений происходило увеличение внешнего $[\text{Ca}^{2+}]$, что указывало на массивное высвобождение иона из органелл вследствие открытия кальций-зависимой МРТ-поры. Способность Ca^{2+} индуцировать открытие поры в митохондриях выражалась количественно как кальциевая емкость (КЕ) митохондрий, т.е. то максимальное количество Ca^{2+} ,

которое может быть аккумулировано в матриксе без последующего открытия поры.

Оценка скорости образования H_2O_2 митохондриями скелетных мышц мышей. Скорость образования H_2O_2 измеряли с помощью тест-системы, включающей в себя флуоресцентный индикатор Amplex Red и пероксидазу хрена на планшетном флуориметре Varioskan LUX (Thermo Fisher Scientific) при длине волны возбуждения 560 нм и длине волны излучения 590 нм [21]. Среда инкубации содержала 210 мМ маннитол, 70 мМ сахарозу, 1 мМ KH_2PO_4 , 10 мМ EGTA, 10 мМ HEPES—KOH (pH 7.4), 10 мМ Amplex Red и пероксидазу хрена (акт. 1 ед/мл). Концентрации субстратов и других реагентов: 2.5 мМ малат калия, 2.5 мМ глутамат калия, 5 мМ янтарная кислота, 1 мМ ротенон. Концентрация митохондриального белка составляла 0.15 мг/мл. Измерения проводились при 37°C и постоянном перемешивании. Количество образованной перекиси водорода рассчитывалось по калибровочной кривой. Стандартный раствор H_2O_2 был приготовлен непосредственно в день проведения эксперимента; его концентрацию определяли с использованием коэффициента молярной экстинкции $E_{240} = 43.6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Статистическая обработка результатов. Данные были проанализированы с использованием программ Graph Pad Prism 8 и Microsoft Excel и представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка средней. Полученные данные были обработаны статистически с использованием *t*-критерия. Для оценки значимости различий использовался уровень вероятности $p < 0.05$.

Материалы. NS1619 и другие реактивы, используемые в работе, были приобретены в Sigma-Aldrich (США). NS1619 растворяли в ДМСО (2 мМ сток-раствор). В контрольных пробах к митохондриям добавляли ДМСО в том же объеме, как в добавках NS1619. Во всех случаях ДМСО не влиял на исследуемые параметры митохондрий.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Недавно мы продемонстрировали, что в условиях *in vivo* производное бензимидазола NS1619, наряду с улучшением активности транспорта ионов калия в митохондриях скелетных мышц дистрофин-дефицитных *mdx* мышей, подавляет параметры окислительного фосфорилирования органелл [14]. Для выяснения механизмов, лежащих в основе такого побочного действия NS1619, мы оценили влияние этого агента на параметры дыхания и окислительного фосфорилирования изолированных митохондрий скелетных мышц мышей. В табл. 1 представлены результаты, описывающие эффект NS1619 на дыхание митохондрий скелетных мышц мышей в разных функциональных состояниях в присутствии глутамата и

малата (субстраты комплекса I дыхательной цепи) или сукцината (субстрат комплекса II дыхательной цепи) в присутствии ротенона. Можно видеть, что NS1619 в концентрациях 10 и 20 мкМ дозозависимо повышает скорость дыхания митохондрий в состоянии 2 и состоянии 4 и, напротив, снижает скорость дыхания органелл в состояниях 3 и 3U_{днф}. Такое действие NS1619 сопровождается снижением параметра дыхательного контроля (ДК) и эффективности синтеза АТР, что оценивалось по коэффициенту *ADP/O*. Подобные результаты получены и при энергизации органелл сукцинатом. В этом случае можно отметить, что увеличение скорости дыхания в состоянии 4 выражено лишь при 10 мкМ NS1619 и эффект снижается в случае добавления 20 мкМ этого агента. При этом можно видеть, что действие NS1619 сопровождается снижением параметра дыхательного контроля, отражающего степень сопряжения окислительного фосфорилирования, при концентрации NS1619 20 мкМ мы отметили снижение параметра в среднем в 1.67 раза в условиях энергизации органелл глутамат/малатом, тогда как при энергизации органелл сукцинатом мы отметили снижение этого параметра лишь в 1.39 раза. В то же время снижение параметра *ADP/O*, характеризующего эффективность окислительного синтеза АТР, было более выражено в случае энергизации митохондрий сукцинатом — параметр снижался в среднем в 1.67 раза, при использовании глутамат/малата снижение составило в среднем 1.37 раза. Это может отражать вклад различных систем в снижение эффективности окислительного фосфорилирования, индуцированное NS1619 в условиях энергизации митохондрий субстратами комплекса I или комплекса II дыхательной цепи органелл.

Необходимо также отметить, что снижение дыхательного контроля митохондрий скелетных мышц, индуцированное NS1619, было обусловлено различными факторами и зависело от используемого субстрата. Из табл. 1 видно, что NS1619-индуцированное увеличение скорости дыхания митохондрий скелетных мышц в состояниях 2 и 4 более выражено при энергизации митохондрий субстратами комплекса I дыхательной цепи. В этом случае эффект NS1619 можно было бы объяснить его возможным протонофорным действием. Однако ранее было установлено, что NS1619, несмотря на наличие гидроксильной группы в ароматическом кольце (рис. 1), не оказывает влияния на протонную проницаемость бислойных липидных мембран [10], что исключает этот механизм влияния на митохондрии. Ранее активация дыхания в состояниях 2 и 4, индуцированная NS1619, была выявлена на митохондриях сердца морской свинки и устранялась ингибитором митохондриальных калиевых каналов паксиллином [23]. Это позволяет предположить, что в этом

Таблица 1. Влияние NS1619 на дыхание митохондрий скелетных мышц в разных функциональных состояниях в присутствии глутамат/малата или сукцината

NS1619, мкМ	Состояние 2	Состояние 3	Состояние 4	Состояние 3U _{днф}	ДК	ADP/O
	V дыхания, нмоль O ₂ /мин/мг белка митохондрий				отн. ед.	
2.5 мМ глутамат + 2.5 мМ малат						
0	6.48 ± 0.05	53.58 ± 1.90	18.62 ± 0.08	55.69 ± 0.29	2.88 ± 0.11	2.63 ± 0.07
10	9.31 ± 0.25*	47.90 ± 1.06*	19.74 ± 0.10*	51.47 ± 1.20*	2.43 ± 0.07*	2.23 ± 0.02*
20	14.93 ± 0.32* [#]	41.04 ± 1.62* [#]	23.83 ± 0.58* [#]	46.62 ± 1.84* [#]	1.72 ± 0.09* [#]	1.92 ± 0.03* [#]
+ Олиго			17.91 ± 0.34 ^γ			
5 мМ сукцинат						
0	19.17 ± 0.55	61.41 ± 0.89	37.31 ± 0.26	53.47 ± 0.81	1.65 ± 0.02	1.44 ± 0.01
10	26.73 ± 0.36*	57.48 ± 0.81*	40.77 ± 0.28*	47.05 ± 0.67*	1.41 ± 0.01*	1.12 ± 0.05*
20	29.25 ± 0.46* [#]	45.67 ± 0.91* [#]	38.35 ± 0.60 [#]	37.13 ± 0.97* [#]	1.19 ± 0.02* [#]	0.86 ± 0.05* [#]

Примечание. Дыхание митохондрий в состоянии 3 индуцировали добавлением 200 мкМ ADP. Скорость разобшенного дыхания измеряли в присутствии 50 мкМ ДНФ (состояние 3U_{днф}). Дыхательный контроль (ДК) рассчитан как отношение скорости дыхания в состоянии 3 к скорости дыхания в состоянии 4. Приведены средние значения ± стандартная ошибка среднего (n = 4). 1 мкг/мл олигомицина (Олиго) добавлено к митохондриям в состоянии 4. * p < 0.05 против контроля (отсутствие NS1619), # p < 0.05 против 10 мкМ NS1619, ^γ p < 0.05 против скорости дыхания в отсутствие олигомицина.

Таблица 2. Активность комплексов дыхательной цепи митохондрий скелетных мышц мыши в присутствии NS1619 (в % от контроля)

Добавки NS1619	Комплекс I	Комплекс II	Комплекс III	Комплекс IV	АТФ-синтаза
10 мкМ	97.0 ± 3.2	105.7 ± 1.1	96.3 ± 0.2	98.5 ± 4.1	97.2 ± 2.1
20 мкМ	83.2 ± 3.1*	103.7 ± 1.0	90.3 ± 1.3*	89.0 ± 1.2*	88.0 ± 1.2*

Примечание. Активность комплексов в отсутствие NS1619 принята за 100%. Приведены средние значения ± стандартная ошибка среднего (n = 4). * p < 0.05 против контроля (отсутствие NS1619).

случае разобщающий эффект NS1619 может быть также обусловлен активацией транспорта ионов калия в митохондрии, и этот эффект более выражен при энергизации органелл глутамат/малатом. Наряду с этим, можно видеть, что в условиях энергизации органелл глутамат/малатом увеличение скорости дыхания митохондрий скелетных мышц в состоянии 4 частично устраняется внесением ингибитора F1Fo-АТФ-азы олигомицина (табл. 1). Это может свидетельствовать о способности NS1619 нарушать процесс фосфорилирования ADP за счет снижения активности комплексов дыхательной цепи и/или обращения активности АТФ-синтазы. В этом случае ADP, остающийся в системе, может некоторое время поддерживать достаточно высокую скорость дыхания органелл в состоянии 4 [24]. Об ингибировании активности комплексов дыхательной цепи митохондрий скелетных мышц мышцей под действием NS1619 также может свидетельствовать наблюдаемое снижение потребления кислорода митохондриями в ADP-стимулированном состоянии и состоянии 3U_{днф} в условиях максимальной стимуляции дыхания протонофорным разоб-

щителем 2,4-динитрофенолом. Необходимо отметить, что в последнем случае снижение скорости потребления кислорода было более выражено при энергизации органелл сукцинатом, чем глутамат/малатом — скорость дыхания в состоянии 3U_{днф} снижалась в присутствии 20 мкМ NS1619 в 1.44 и 1.19 раза соответственно. Это может свидетельствовать о способности NS1619 более активно подавлять работу комплексов дыхательной цепи (без учета работы АТФ-синтазы и транспорта ADP) в режиме энергизации митохондрий через комплекс II.

В следующей части работы мы оценили влияние NS1619 на активность индивидуальных комплексов дыхательной цепи митохондрий скелетных мышц мышцей, а также АТФ-синтазы. Из данных табл. 2 видно, что NS1619 в концентрации 20 мкМ вызывает достоверное снижение активности комплекса I на 17%. Ингибирование комплекса I митохондрий, вызванное NS1619, отмечено и в целом ряде других литературных источников и обнаруживалось на изолированных митохондриях сердца крысы [11], а также клетках глиомы человека линии LN229 [10] и эндотели-

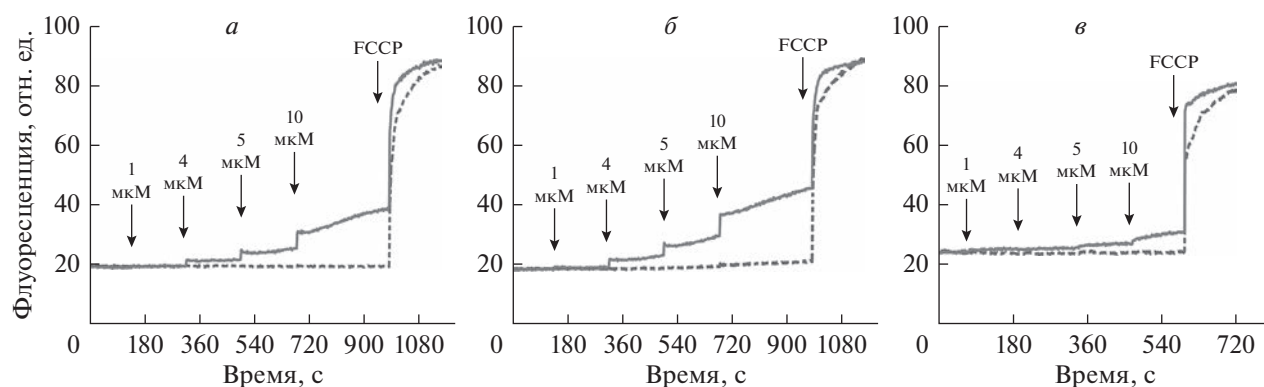


Рис. 2. Дозозависимое влияние NS1619 на мембранный потенциал митохондрий скелетных мышц мыши, энергизованных глутамат/малатом (а), сукцинатом (б) и АТФ (в). Субстраты и реагенты: 2,5 мМ малат калия, 2,5 мМ глутамат калия (а), 5 мМ янтарная кислота, 1 мМ ротенон (б), 2 мМ АТФ (в), 1 мМ FCCP (а, б, в). На каждом из рисунков представлены данные типичного эксперимента, полученные на одном препарате митохондрий. В каждом случае аналогичные результаты были получены еще в двух независимых экспериментах.

альных клетках линии EA.hy926 [12]. Наряду с этим мы также обнаружили, что NS1619 подавляет активность комплексов III и IV дыхательной цепи митохондрий скелетных мышц мышей. В этом случае эффект был менее выражен по сравнению с влиянием на активность комплекса I — 20 мМ NS1619 снижал активность комплекса III в среднем на 10% и комплекса IV на 11% (табл. 2). Как и предполагалось выше, NS1619 также снижал активность АТФ-синтазы митохондрий, 20 мМ этого агента вызывало 12% ингибирование активности этого комплекса. Ранее подобный эффект NS1619 был показан и на субмитохондриальных частицах сердца быка и было предположено, что этот агент влияет на Fo-субъединицу АТФ-синтазы [12].

Можно предполагать, что выявленное нами ингибирующее влияние NS1619 на активность комплексов дыхательной цепи, наряду с возможным разобщающим влиянием калиевого транспорта, препятствует синтезу АТФ митохондриями скелетных мышц, который необходим для поддержания нормального мышечного сокращения и функциональной активности мускулатуры. Действительно, ранее в эксперименте *in vivo*, не смотря на общее положительное влияние NS1619 на состояние митохондрий и снижение деструктивных процессов в ткани скелетной мускулатуры *mdx* мышей, мы не отметили влияния этого агента на мышечную силу и выносливость дистрофичных животных. Более того, нами была отмечена тенденция к снижению мышечной силы здоровых мышей дикого типа, получавших NS1619 [14].

Известно, что разобщение окислительного фосфорилирования в митохондриях зачастую сопровождается снижением мембранного потенциала ($\Delta\psi$) органелл. Из рис. 2 можно видеть, что в кон-

центрации 1 мМ NS1619 не оказывает существенного влияния на $\Delta\psi$ митохондрий, однако увеличение его концентрации суммарно до 5 мМ сопровождается выходом потенциал-зависимого флуоресцентного зонда сафранина О из митохондрий, что свидетельствует о снижении мембранного потенциала органелл, и этот эффект усиливается с увеличением концентрации NS1619. Данный эффект проявляется как в случае энергизации митохондрий глутамат/малатом (рис. 2а), так и сукцинатом (рис. 2б), а также в условиях гидролиза добавленного АТФ (рис. 2в). В последнем случае можно полагать, что дозозависимое снижение $\Delta\psi$ обусловлено показанным выше ингибированием NS1619 активности АТФ-синтазы. Полученные результаты во многом соответствуют известным данным, свидетельствующим о снижении мембранного потенциала митохондрий под действием ингибирующего влияния NS1619 [10–12].

Митохондрии являются одними из основных продуцентов АФК в клетках [25, 26]. При этом ингибирование комплексов дыхательной цепи, равно как и разобщение окислительного фосфорилирования, реализуемое посредством различных механизмов, оказывает существенное влияние на интенсивность генерации АФК. Известно, что NS1619-индуцированная активация митохондриального VK_{Ca} -канала сопровождается снижением продукции АФК в клетке и в том числе в митохондриях [5–7]. В нашей недавней работе было показано, что терапевтический эффект NS1619 в скелетных мышцах дистрофин-дефицитных *mdx* мышей также может быть обусловлен снижением продукции АФК и смягчением интенсивности окислительного стресса [14]. Можно видеть, что в условиях *in vitro* NS1619 также дозозависимо снижает продукцию перекиси водорода изолированными митохондриями скелетных мышц, хотя

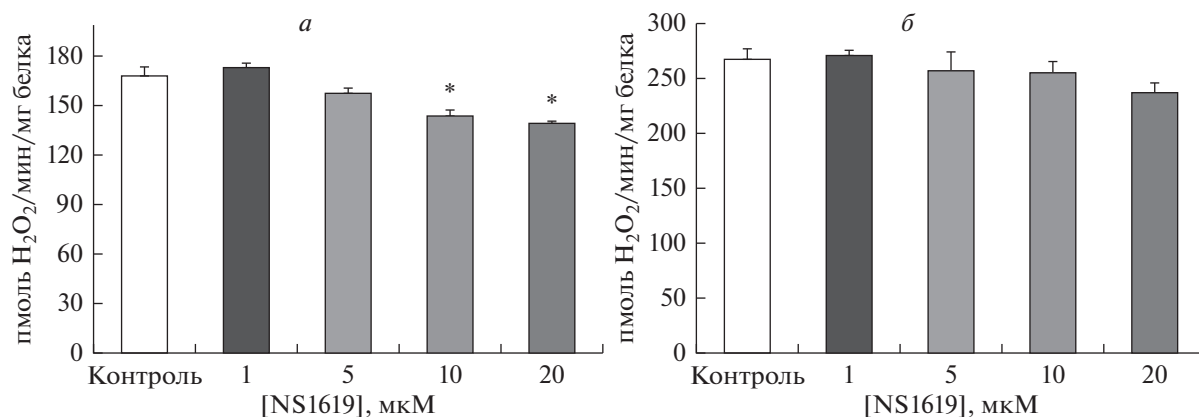


Рис. 3. Влияние NS1619 в различных дозах на продукцию H_2O_2 митохондриями скелетных мышц мыши, энергизованными глутамат/малатом (а) или сукцинатом (б). Приведены средние $\pm$ ошибка среднего ($n = 4$). * — различия между данными опытов (присутствие NS1619 в указанных концентрациях) и контролем (отсутствие NS1619) статистически значимы, $p < 0.05$.

достоверный эффект нами выявлен только в условиях энергизации органелл субстратами комплекса I дыхательной цепи (рис. 3а), что, возможно, обусловлено более выраженной активацией дыхания в состоянии 2 и 4, индуцированной NS1619 (табл. 1). Это, как известно, способствует снижению продукции АФК митохондриями [25].

Общепризнано, что митохондрии не только обеспечивают клетку АТФ и теплом, но играют ведущую роль в процессах регуляции ее функций при участии свободного Ca^{2+} [27–29]. Известно, что изолированные митохондрии из различных органов и тканей животных в энергизованном состоянии обладают способностью аккумулировать и удерживать Ca^{2+} в матриксе [29]. Однако при критической перегрузке матрикса органелл ионами кальция наблюдается индукция неспецифической проницаемости внутренней мембраны для ионов и растворимых в воде веществ с молекулярной массой до 1500 Да по их градиенту концентрации (или открытие митохондриальной поры) [29]. Образование такой поры приводит к нарушению энергетических функций митохондрий, прежде всего синтеза АТФ, а также может вызвать набухание матрикса митохондрий, разрыв внешней мембраны и, как следствие, выход находящихся в межмембранном пространстве цитохрома *c* и других, так называемых апоптогенных белков [29]. В связи с этим индукция поры во внутренней мембране митохондрий рассматривается как один из факторов гибели клеток при различных патологических состояниях [29].

Известно, что регуляция митохондриального VK_{Ca} -канала тесно связана с индукцией МРТ-поры. Действительно, ранее было показано, что фармакологическая активация канала с помощью NS1619 увеличивает количество добавок Ca^{2+} , не-

обходимых для индукции МРТ-поры в митохондриях сердца в условиях ишемии/реперфузии, что также рассматривалось в качестве кардиопротекторного эффекта этого агента [2]. Подобное действие NS1619 показано и в нашей предыдущей работе и сопровождалось увеличением кальцевой емкости митохондрий скелетных мышц дистрофин-дефицитных мышей. С другой стороны, мы, напротив, отметили снижение способности аккумулировать ионы кальция митохондриями скелетных мышц здоровых мышей дикого типа, получавших NS1619 [14]. В настоящей работе мы также оценили *in vitro* влияние NS1619 на способность митохондрий скелетных мышц мышей поглощать и удерживать ионы кальция в матриксе органелл. На рис. 4 представлены результаты сравнительного изучения кинетики поглощения Ca^{2+} митохондриями скелетных мышц мыши, энергизованными глутамат/малатом или сукцинатом и инкубируемых в отсутствие и в присутствии NS1619. Можно видеть, что предварительная инкубация митохондрий с NS1619 приводит к существенному снижению количества поглощаемых ими добавок кальция (рис. 4а, 4б), что количественно выражается в снижении кальцевой емкости органелл и свидетельствует о более эффективной индукции МРТ-поры.

Суммируя полученные данные, можно полагать, что действие NS1619 в скелетных мышцах, с одной стороны, может быть реализовано через активацию VK_{Ca} -канала, в том числе и его митохондриальной изоформы. С другой стороны, это производное бензимидазола подавляет функционирование комплексов дыхательной цепи митохондрий и АТФ-синтазы, что оказывает существенное влияние на способность органелл синтезировать АТФ, необходимого прежде всего для

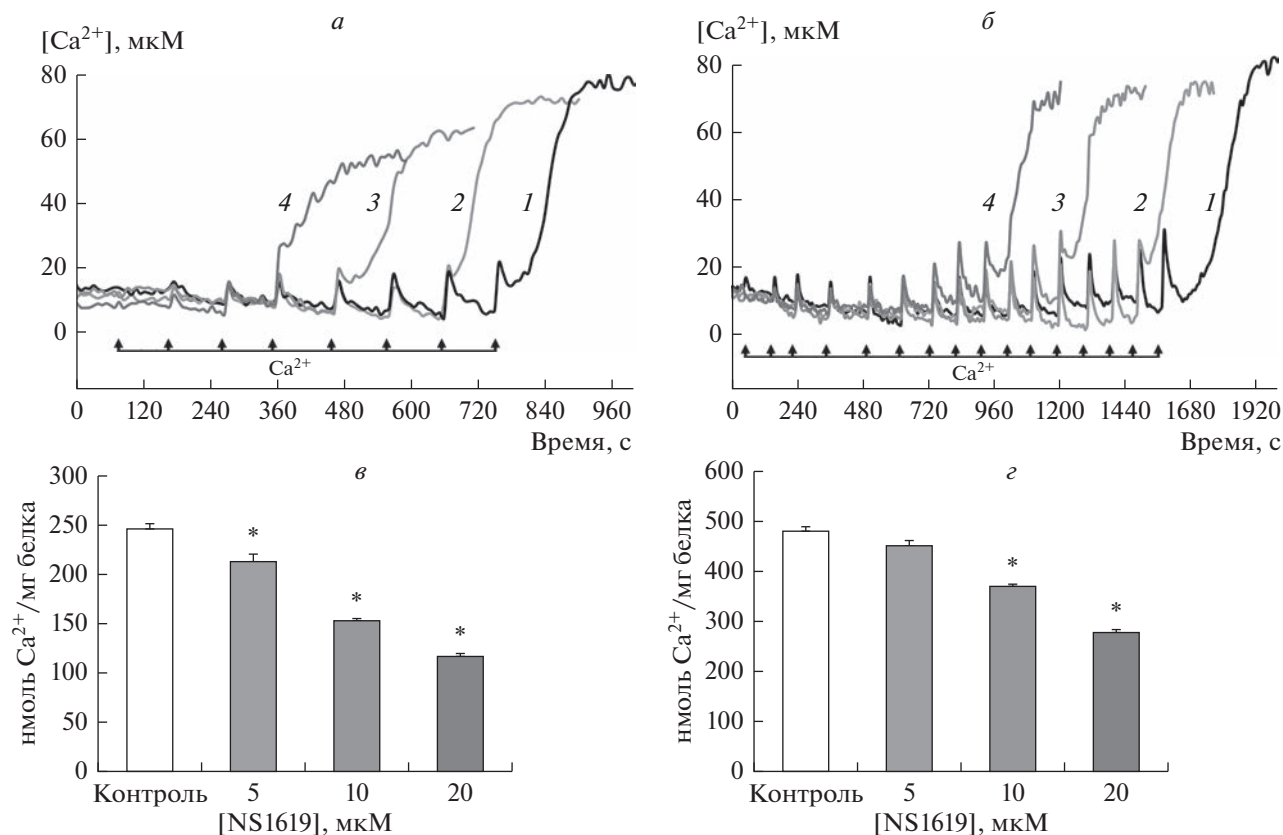


Рис. 4. Влияние NS1619 на транспорт кальция в митохондриях скелетных мышц мыши. *а* – Поглощение добавок Ca^{2+} (пульсы по 20 мкМ) митохондриями скелетных мышц, энергизованными глутамат/малатом, в отсутствие добавок (1) и в присутствии 5 (2), 10 (3) и 20 мкМ (4) NS1619. *б* – Поглощение добавок Ca^{2+} (пульсы по 20 мкМ) митохондриями скелетных мышц, энергизованными сукцинатом, в отсутствие добавок (1) и в присутствии 5 (2), 10 (3) и 20 мкМ (4) NS1619. *в* – Кальциевая емкость митохондрий скелетных мышц, энергизованных глутамат/малатом, в отсутствие (контроль) и в присутствии различных концентраций NS1619. *з* – Кальциевая емкость митохондрий скелетных мышц мышей, энергизованных сукцинатом, в отсутствие (контроль) и в присутствии различных концентраций NS1619. Субстраты и реагенты: 2.5 мМ малат калия, 2.5 мМ глутамат калия (*а*), 5 мМ янтарная кислота, 1 мкМ ротенон (*б*). Концентрация митохондриального белка в кювете – 0.3 мг/мл. На панелях *а* и *б* представлены данные типичного эксперимента, полученные на одном препарате митохондрий. В каждом случае аналогичные результаты были получены еще в трех независимых экспериментах. Панели *в* и *з* – приведены средние значения $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n = 4$). * – различия между данными опытов (присутствие NS1619 в указанных концентрациях) и контролем (отсутствие NS1619) статистически значимы, $p < 0.05$.

сокращения скелетной мускулатуры. Кроме того, это сопровождается снижением мембранного потенциала митохондрий, изменением продукции АФК, а также угнетением способности органелл аккумулировать ионы кальция, что также необходимо для корректной регуляции циклов сокращения и расслабления мышц. При этом важно отметить, что полумаксимальная эффективная концентрация (EC_{50}) NS1619 как активатора $ВК_{Ca}$ -каналов составляет порядка 3 мкМ [30], в то время как способность подавлять функцию митохондрий проявляется при более высоких концентрациях, в частности, в нашем случае концентрация полумаксимального ингибирования (IC_{50}) при оценке влияния NS1619 на параметр кальциевой емкости органелл, энергизованных глутамат/малатом, составила около 20 мкМ (рис. 4*а*, 4*в*).

Как можно видеть из нашей предыдущей работы, NS1619 ослабляет развитие митохондриальной дисфункции скелетных мышц при дистрофии Дюшенна. В то же время этот агент оказывает скорее негативное влияние на функцию митохондрий здоровых скелетных мышц. Исходя из результатов этой работы, наших предыдущих и литературных данных, можно сделать вывод, что *in vivo* эффект NS1619 обусловлен суммарным действием этого агента на различные митохондриальные и клеточные системы и во многом зависит от особенностей функционирования этих систем в норме и патологии. Это требует тщательного подбора терапевтических концентраций NS1619 и условий его введения в организм.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов ин-

тересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда, № 20-75-10006.

Соответствие принципам этики. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- González-Sanabria N., Echeverría F., Segura I., Alvarado-Sánchez R., Latorre R. 2021. BK in double-membrane organelles: A biophysical, pharmacological, and functional survey. *Front. Physiol.* **12**, 761474.
- Singh H., Rong L., Bopassa J., Meredith A., Stefani E., Toro L. 2013. MitoBK-Ca is encoded by the KCNMA1 gene, and a splicing sequence defines its mitochondrial location. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 10836–10841.
- Wrzosek A., Augustynek B., Żochowska M., Szewczyk A. 2021. mitochondrial potassium channels as druggable targets. *Biomolecules.* **10** (8), 1200.
- Checchetto V., Leanza L., De Stefani D., Rizzuto R., Gulbins E., Szabo I. 2021. Mitochondrial K⁺ channels and their implications for disease mechanisms. *Pharmacol. Ther.* **227**, 107874.
- Xu W., Liu Y., Wang S., McDonald T., Van Eyk J.E., Sidor A., O'Rourke B. 2002. Cytoprotective role of Ca²⁺-activated K⁺ channels in the cardiac inner mitochondrial membrane. *Science.* **298**, 1029–1033.
- Kulawiak B., Kudin A.P., Szewczyk A., Kunz W.S. 2008. BK channel openers inhibit ROS production of isolated rat brain mitochondria. *Exp. Neurol.* **212**, 543–547.
- Heinen A., Aldakkak M., Stowe D.F., Rhodes S.S., Riess M.L., Varadarajan S.G., Camara A.K. 2007. Reverse electron flow-induced ROS production is attenuated by activation of mitochondrial Ca²⁺-sensitive K⁺ channels. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **293**, H1400–H1407.
- Wang X., Yin C., Xi L., Kukreja R.C. 2004. Opening of Ca²⁺-activated K⁺ channels triggers early and delayed preconditioning against I/R injury independent of NOS in mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **287**, H2070–H2077.
- Du X., Carvalho-De-Souza J.L., Wei C., Carrasquel-Ursulaez W., Lorenzo Y., Gonzalez N., Kubota T., Staisch J., Hain T., Petrossian N., Xu M., Latorre R., Bezanilla F., Gomez C.M. 2020. Loss-of-function BK channel mutation causes impaired mitochondria and progressive cerebellar ataxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **117**, 6023–6034.
- Debska G., Kicinska A., Dobrucki J., Dworakowska B., Nurowska E., Skalska J., Dolowy K., Szewczyk A. 2003. Large-conductance K⁺ channel openers NS1619 and NS004 as inhibitors of mitochondrial function in glioma cells. *Biochem. Pharmacol.* **65** (11), 1827–1834.
- Kicinska A., Szewczyk A. 2004. Large-conductance potassium cation channel opener NS1619 inhibits cardiac mitochondria respiratory chain. *Toxicol. Mech. Methods*, **14** (1–2), 59–61.
- Łukasiak A., Skup A., Chlopicki S., Łomnicka M., Kaczara P., Proniewski B., Szewczyk A., Wrzosek A. 2016. SERCA, complex I of the respiratory chain and ATP-synthase inhibition are involved in pleiotropic effects of NS1619 on endothelial cells. *Eur. J. Pharmacol.* **786**, 137–147.
- Park W.S., Kang S.H., Son Y.K., Kim N., Ko J.H., Kim H.K., Ko E.A., Kim C.D., Han J. 2007. The mitochondrial Ca²⁺-activated K⁺ channel activator, NS 1619 inhibits L-type Ca²⁺ channels in rat ventricular myocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **362** (1), 31–36.
- Dubinina M.V., Starinets V.S., Belosludtseva N.V., Mikheeva I.B., Chelyadnikova Y.A., Igoshkina A.D., Vafina A.B., Vedernikov A.A., Belosludtsev K.N. 2022. BK_{Ca} activator ns1619 improves the structure and function of skeletal muscle mitochondria in duchenne dystrophy. *Pharmaceutics.* **14**, 2336.
- Dubinina M.V., Talanov E.Y., Tenkov K.S., Starinets V.S., Mikheeva I.B., Sharapov M.G., Belosludtsev K.N. 2020. Duchenne muscular dystrophy is associated with the inhibition of calcium uniport in mitochondria and an increased sensitivity of the organelles to the calcium-induced permeability transition. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Basis Dis.* **1866** (5), 165674.
- Dubinina M.V., Svinin A.O., Vedernikov A.A., Starinets V.S., Tenkov K.S., Belosludtsev K.N., Samartsev V.N. 2019. Effect of hypothermia on the functional activity of liver mitochondria of grass snake (*Natrix natrix*): Inhibition of succinate-fueled respiration and K⁺ transport, ROS-induced activation of mitochondrial permeability transition. *J. Bioenerg. Biomembr.* **51** (3), 219–229.
- Chance B., Williams G.R. 1955. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization. *J. Biol. Chem.* **217** (1), 383–393.
- Pollard A.K., Craig E.L., Chakrabarti L. 2016. Mitochondrial complex I activity measured by spectrophotometry is reduced across all brain regions in ageing and more specifically in neurodegeneration. *PLoS One.* **11**(6), e0157405.
- Spinazzi M., Casarin A., Pertegato V., Salviati L., Angelini C. 2012. Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells. *Nat. Protoc.* **7** (6), 1235–1246.
- Venediktova N., Solomadin I., Nikiforova A., Starinets V., Mironova G. 2021. functional state of rat heart mitochondria in experimental hyperthyroidism. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 11744.
- Dubinina M.V., Sharapov V.A., Ilzorkina A.I., Efimov S.V., Klochov V.V., Gudkov S.V., Belosludtsev K.N. 2022. Comparison of structural properties of cyclosporin A and its analogue alisporivir and their effects on mitochondrial bioenergetics and membrane behavior. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1864** (9), 183972.

22. Dubinin M.V., Starinets V.S., Talanov E.Y., Mikheeva I.B., Belosludtseva N.V., Belosludtsev K.N. 2021. Alisporivir improves mitochondrial function in skeletal muscle of *mdx* mice but suppresses mitochondrial dynamics and biogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 9780.
23. Heinen A., Camara A.K., Aldakkak M., Rhodes S.S., Riess M.L., Stowe D.F. 2007. Mitochondrial Ca^{2+} -induced K^+ influx increases respiration and enhances ROS production while maintaining membrane potential. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **292** (1), C148–C156.
24. Bosetti F., Baracca A., Lenaz G., Solaini, G. 2004. Increased state 4 mitochondrial respiration and swelling in early post-ischemic reperfusion of rat heart. *FEBS Lett.* **563** (1–3), 161–164.
25. Zorov D.B., Juhaszova M., Sollott S. J. 2014. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol. Rev.* **94** (3), 909–950.
26. Андреев А.Ю., Кушнарева Ю.Е., Мерфи Э.Н., Старков А.А. 2015 Митохондриальный метаболизм активных форм кислорода: десять лет спустя. *Биохимия.* **5** (80), 612–630.
27. Rasola A., Bernardi P. 2011. Mitochondrial permeability transition in Ca^{2+} -dependent apoptosis and necrosis. *Cell Calcium.* **50**, 222–233.
28. Дубинин М.В., Белослудцев К.Н. 2019. Таксономические особенности механизмов специфического транспорта Ca^{2+} в митохондриях. *Биол. мембраны.* **36** (4), 231–241.
29. Белослудцев К.Н., Дубинин М.В., Белослудцева Н.В., Миронова Г.Д. 2019. Транспорт ионов Ca^{2+} митохондриями: механизмы, молекулярные структуры и значение для клетки. *Биохимия.* **6** (84), 759–775.
30. Olesen S. P., Munch E., Moldt P., Drejer J. 1994. Selective activation of Ca^{2+} -dependent K^+ channels by novel benzimidazolone. *Eur. J. Pharmacol.* **251** (1), 53–59.

Benzimidazole Derivative NS1619 Inhibits Functioning of Mitochondria Isolated from Mouse Skeletal Muscle

M. V. Dubinin^{1,*}, A. D. Igoshkina¹, A. A. Semenova¹, N. V. Mikina¹,
E. I. Khoroshavina¹, K. N. Belosludtsev^{1,2}

¹Mari State University, Yoshkar-Ola, 424000 Russia

²Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, RAS, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia

*e-mail: dubinin1989@gmail.com

The activator of the large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel (BK_{Ca}) NS1619 is known to have a pleiotropic action and is able to affect the functioning of other transport systems of the cell and its organelles. In this work, we have studied the effect of this benzimidazole derivative on the functioning of isolated mouse skeletal muscle mitochondria. NS1619 has been shown to dose-dependently inhibit respiration and oxidative phosphorylation of mouse skeletal muscle mitochondria fueled by glutamate/malate (complex I substrates) or succinate (complex II substrate). This action of NS1619 is based on the inhibition of the activity of complexes I, III, and IV of the respiratory chain of organelles, as well as ATP synthase and is accompanied by a dose-dependent decrease in the membrane potential of organelles fueled by the above substrates or ATP. In addition, NS1619 significantly reduces the ability of mitochondria to uptake and retain calcium ions in the matrix. At the same time, we noted the antioxidant effect of NS1619 expressed in a decrease in the production of hydrogen peroxide by skeletal muscle mitochondria fueled by glutamate and malate. The mechanisms of the possible toxic effects of NS1619 on skeletal muscle mitochondrial function and its contribution to the side effects observed in the treatment of muscle pathologies *in vivo* are discussed.

Keywords: skeletal muscle mitochondria, NS1619, oxidative phosphorylation, respiratory chain, calcium, reactive oxygen species