

УДК 577.23

ВЛИЯНИЕ 20-ГИДРОКСИЭКДИЗОНА НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ МИТОХОНДРИЙ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ МЫШЕЙ

© 2024 г. А. А. Семенова^{а, *}, А. Д. Игошкина^а, Н. В. Микина^а, Р. Г. Савченко^б,

Л. В. Парфенова^б, М. В. Дубинин^а

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

^бИнститут нефтехимии и катализа УФИЦ РАН, Уфа, 450075 Россия

Поступила в редакцию 16.03.2024

После доработки 01.04.2024

Принята к публикации 02.04.2024

В работе исследовано влияние фитоэкдистероида 20-гидроксиэкдизона (20Е) на функционирование митохондрий скелетных мышц мышей. Показано, что 20Е в концентрации 100 мкМ и более подавляет дыхание митохондрий, энергизованных глутаматом и малатом (субстраты комплекса I дыхательной цепи) или сукцинатом (субстрат комплекса II дыхательной цепи). Такое действие 20Е сопровождается снижением мембранного потенциала органелл и связано с ингибированием активности комплекса III, а также суммарной активности комплексов I+III и II+III дыхательной цепи митохондрий. Нами отмечен проокислительный эффект 20Е, который проявляется в увеличении продукции перекиси водорода митохондриями скелетных мышц. Кроме того, 20Е снижает способность митохондрий поглощать и накапливать ионы кальция в матриксе. В работе обсуждаются механизмы возможного токсического действия 20Е на функционирование митохондрий скелетных мышц.

Ключевые слова: митохондрии, 20-гидроксиэкдизон, окислительное фосфорилирование, дыхательная цепь, кальций, активные формы кислорода

DOI: 10.31857/S0233475524030067, **EDN:** csbitx

ВВЕДЕНИЕ

Экдистероиды представляют собой большое семейство полигидроксилированных стероидных гормонов беспозвоночных, которые регулируют линьку, метаморфозы и размножение членистоногих [1]. Эти вещества также синтезируются у 5–6% видов растений (фитоэкдистероиды), возможно, в качестве защиты от насекомых-фитофагов [2]. В природе было идентифицировано более 570 различных экдистероидов [3], однако наиболее изученным является 20-гидроксиэкдизон (20Е, рис. 1). Исследования *in vivo* и *in vitro* выявили благотворное влияние 20Е на млекопитающих: анаболическое, гиполипидемическое, антидиабетическое, противовоспалительное, гепатопротекторное и др. [3, 4].

Хотя экдистероиды не связываются со стероидными рецепторами позвоночных и механизм их действия до сих пор неизвестен, им приписывают многие полезные фармакологические свойства [5–7]. Сообщалось об увеличении массы тела, органов и мышечной массы, а также синтеза белка

при пероральном или внутрибрюшинном введении экдистероидов нескольким видам животных: японским перепелам [8], мышам [9], крысам [10] и свиньям [11]. Недавние исследования [12] показали, что 20Е также обладает противоопухолевой активностью в культуре клеток немелкоклеточного рака легкого. Кроме того, экдистерон может ингибировать рост клеток рака молочной железы

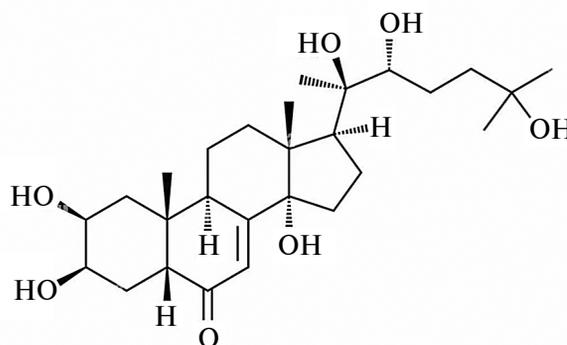


Рис. 1. Структурная формула 20Е

Таблица 1. Влияние 20-гидроксиэкдизона на дыхание митохондрий скелетных мышц мышей в разных функциональных состояниях в присутствии глутамата/малата или сукцината

20E, мкМ	Состояние 2	Состояние 3	Состояние 4	Состояние 3U _{ДНФ}	ДК	ADP /O
	нмоль O ₂ /мин на 1 мг белка				отн. ед.	
2.5 мМ глутамат+2.5 мМ малат						
0	23.78±0.65	132.56±4.56	28.52±0.14	163.0±10.37	4.65±0.15	2.71±0.06
20	23.64±0.49	133.78±4.75	29.54±0.43	178.92±0.82	4.53±0.08	2.88±0.04
30	24.68±0.73	127.84±0.13	28.18±0.52	177.68±0.06	4.54±0.11	2.63±0.09
50	24.88±0.18	123.94±3.1	28.90±0.19	177.72±7.13	4.29±0.11	2.67±0.01
100	24.62±0.25	111.40±0.10*	27.84±0.07	156.92±0.36	4.01±0.08*	2.58±0.08
150	25.34±0.49	108.47±0.88*	28.40±0.20	158.87±2.34	3.89±0.16*	2.59±0.55
200	26.28±0.65	103.05±1.35*	26.92±0.54	159.92±3.21	3.83±0.21*	2.47±0.37*
250	23.42±0.98	102.97±0.71*	30.07±0.29	151.13±1.01*	3.48±0.15*	2.46±0.11*
5 мМ сукцинат						
0	43.36±0.39	121.14±4.23	46.28±0.86	110.4±4.36	2.62±0.06	1.60±0.04
20	44.06±1.27	117.88±1.14	42.78±1.97	111.84±2.41	2.76±0.14	1.54±0.03
50	45.02±1.76	116.92±3.18	46.26±1.8	104.88±3.84	2.53±0.04	1.50±0.01
100	44.76±0.97	109.84±1.11*	47.18±0.62	98.68±2.15	2.33±0.08*	1.53±0.09
150	47.46±0.29	100.95±2.25*	45.56±0.43	90.14±0.12*	2.26±0.24*	1.52±0.17
200	46.66±0.52	96.14±1.42*	47.35±1.25	91.50±1.21*	2.23±0.15*	1.50±0.20
250	47.72±1.06	97.69±3.31*	46.74±1.11	88.6±2.33*	2.09±0.21*	1.51±0.34

Примечание. Дыхание митохондрий в состоянии 3 индуцировали добавлением 200 мкМ ADP. Скорость разоб-щенного дыхания измеряли в присутствии 50 мкМ ДНФ (состояние 3U_{ДНФ}). Дыхательный контроль (ДК) рас-считан как отношение скорости дыхания в состоянии 3 к скорости дыхания в состоянии 4. Приведены средние значения ± стандартная ошибка среднего ($n = 4$). * $p < 0.05$ против контроля (отсутствие 20E).

путем подавления гликолиза и митохондриальной биоэнергетики и индукции клеточной аутофагии и апоптоза раковых клеток, без влияния на здо-ровые клетки [13].

Ряд исследований свидетельствует о том, что мишенью 20E могут быть митохондрии млекопита-ющих. Было показано, что экдистерон оказывает терапевтическое действие при патологиях, связан-ных с митохондриальной дисфункцией и окисли-тельным стрессом [14–16]. Более того, положи-тельные эффекты 20E часто связаны с модуляцией

функций митохондрий посредством изменения различных клеточных процессов, однако неяс-но, являются ли его митохондриальные эффекты прямыми или опосредованы активацией других клеточных процессов. Можно предположить, что 20E способен влиять и на клеточную биоэнергетику и функционирование митохондрий, что могло бы оказать влияние и на работу клеток и организма в целом. В 2015 г. Парр и др. показали, что 20E проявляет свое действие в клетках млекопитаю-щих посредством взаимодействия с рецептором

эстрогена бета (ER- β) [17]. Хорошо известно, что активация эстрогенных рецепторов положительно влияет на функцию митохондрий. Так, активация эстрогенных рецепторов 17 β -эстрадиолом может защитить клетки нейробластомы человека от истощения АТФ, снижения мембранного потенциала митохондрий и образования активных форм кислорода [18]. Нильсен и др. показали, что применение 17 β -эстрадиола защищает первичные нейроны гиппокампа от эксайтотоксичности глутамата, стимулируя экспрессию Bcl-2 и способствуя толерантности митохондрий к кальциевой перегрузке [19]. Бурштейн и др. в 2018 г. показали, что ER- β также может модулировать открытие митохондриальной поры (MPT-поры), что оказывает важное влияние на способность этих органелл аккумулировать ионы кальция [20].

Ранее в нашей лаборатории было исследовано действие широкого круга природных полициклических соединений и, в частности, схожих с фитостероидами тритерпеноидов лупанового, фузиданового и олеананового ряда на функционирование изолированных митохондрий [21–23]. Установлено, что в зависимости от структуры и степени гидрофобности эти соединения с различной эффективностью подавляют дыхание и окислительное фосфорилирование митохондрий, ингибируя активность комплексов дыхательной цепи, обладают протонофорным и прооксидантным эффектом [21–23]. Эти митохондриально-направленные эффекты, по-видимому, лежат в основе цитотоксичности этих соединений.

Можно предположить, что 20E, будучи гидрофобным, также способен взаимодействовать с мембранами митохондрий и влиять на функциональную активность органелл. Поэтому в настоящей работе нами изучено влияние 20E на функционирование изолированных митохондрий скелетных мышц мышей линии C57BL/10. Установлено, что 20E дозозависимо снижает параметры окислительного фосфорилирования митохондрий и мембранный потенциал органелл, что обусловлено ингибированием активности комплексов дыхательной цепи органелл. Это сопровождается увеличением продукции перекиси водорода митохондриями, а также подавлением способности органелл поглощать и аккумулировать ионы кальция в матриксе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение митохондрий скелетных мышц мышей. Митохондрии из скелетных мышц мышей линии C57BL/10 (масса животных 25–28 г) выделяли методом дифференциального центрифугирования [24]. Мышцы (четырёхглавые мышцы обеих

задних конечностей) быстро извлекали и погружали в 5 мл ледяного фосфатно-солевого буфера (2.7 мМ KCl, 1.5 мМ KH_2PO_4 , 136.9 мМ NaCl, 8.9 мМ Na_2HPO_4 , pH 7.4) с добавлением 10 мМ EDTA. Затем мышцы разрезали на мелкие кусочки с удалением видимой жировой ткани, связок и соединительной ткани. Рассеченные мышцы ресуспендировали в 5 мл ледяного фосфатно-солевого буфера с добавлением 10 мМ EDTA и 0.05% трипсина в течение 30 мин, затем центрифугировали в течение 5 мин при 200g. Суспензию гомогенизировали в среде, содержащей 67 мМ сахарозы, 50 мМ KCl, 10 мМ EDTA, 0.2% бычьего сывороточного альбумина (БСА) и 50 мМ буфера Трис–HCl (pH 7.4), используя ротационный гомогенизатор Ultra-Turrax T 10 basic (IKA, Япония) и переносили в гомогенизатор Поттера (соотношение массы ткани к среднему объему 1 : 8). Гомогенат центрифугировали в течение 10 мин при 700g. Митохондрии из надосадочной жидкости осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 8000g, ресуспендировали в 5 мл среды, содержащей 250 мМ сахарозы и 10 мМ буфера Трис–HCl (pH 7.4) и снова центрифугировали в течение 10 мин при 8000g. Концентрацию белка митохондрий определяли методом Бредфорд. Во время проведения эксперимента суспензию митохондрий (20–30 мг митохондриального белка в 1 мл) хранили на льду.

Оценка дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий. Дыхание митохондрий регистрировали полярографическим методом с помощью кислородного электрода типа Кларк и установки Oxygraph+ (Hansatech Instruments, Великобритания) при 25°C и непрерывном перемешивании [25]. Среда инкубации содержала 200 мМ сахарозы, 20 мМ KCl, 0.5 мМ EGTA, 5 мМ KH_2PO_4 и 10 мМ HEPES–KOH, pH 7.4. Применяли следующие концентрации субстратов и других реагентов: 2.5 мМ малата калия, 2.5 мМ глутамата калия, 5 мМ янтарной кислоты, 0.2 мМ ADP, 50 мкМ 2,4-динитрофенола (ДНФ) и 1 мкМ ротенона. Скорости окисления субстрата выражали в нмоль O_2 /мин/мг митохондриального белка. Оценивали дыхание митохондрий в основном метаболическом состоянии (т.е. в присутствии экзогенных субстратов или состояние 2), в состоянии 3 – дыхание, стимулированное ADP; состояние 4 – состояние митохондрий после того, как весь добавленный ADP был израсходован в процессе синтеза АТФ; скорость дыхания митохондрий в состоянии 3U_{ДНФ} – дыхание митохондрий в присутствии разбавителя 2,4-динитрофенола в концентрации 50 мкМ, вызывающей максимальную стимуляцию дыхания. Дыхательный контроль (ДК = состояние 3/состояние 4) и отношение ADP/O определяли в соответствии

с [26]. Концентрация митохондриального белка в ячейке составляла 0.5 мг/мл.

Оценка активности комплексов дыхательной цепи митохондрий мышц. Влияние 20Е на активность комплексов электрон-транспортной цепи митохондрий скелетных мышц оценивали с помощью специфических окислительно-восстановительных реакций по протоколу [27] с использованием планшетного спектрофотометра “Multiskan GO” (Thermo Fisher Scientific, США). Измерения проводили на разрушенных митохондриях, подвергнутых трем циклам замораживания/оттаивания при температуре $-20/+30^{\circ}\text{C}$ в гипотоническом буфере, содержащем 10 мМ Трис–HCl, pH 7.6. Влияние 20Е на активность комплексов дыхательной цепи выражали в процентах от средней активности, регистрируемой в серии контрольных экспериментов. Концентрация митохондриального белка составляла 20 мкг/мл.

Измерение мембранного потенциала митохондрий ($\Delta\psi$). Разность электрических потенциалов ($\Delta\psi$) на внутренней мембране митохондрий оценивали по распределению флуоресцентного зонда сафранина О через внутреннюю мембрану ($\lambda_{\text{ex}} = 520$ нм; $\lambda_{\text{em}} = 580$ нм) с использованием планшетного спектрофлуориметра Varioskan LUX (Thermo Fisher Scientific) [28]. Митохондрии (0.5 мг/мл) инкубировали в среде, содержащей 210 мМ маннитола, 70 мМ сахарозы, 1 мМ KH_2PO_4 , 10 мкМ сафранина О, 10 мкМ EGTA и 10 мМ HEPES–KOH, pH 7.4. Применяли следующие концентрации субстратов и других реагентов: 2.5 мМ глутамата калия, 2.5 мМ малата калия, 5 мМ янтарной кислоты, 1 мкМ ротенона. Концентрация митохондриального белка в ячейке составляла 0.5 мг/мл.

Оценка кальциевой емкости митохондрий скелетных мышц. 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) при 675–685 нм с помощью планшетного спектрофотометра Multiskan GO (Thermo, США) при 25°C и постоянном перемешивании [29]. 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 малата калия, 2.5 мМ глутамата калия, 5 мМ янтарной кислоты, 1 мкМ ротенона. Концентрация митохондриального белка в ячейке составляла ~ 0.25 мг/мл. Для определения способности митохондрий удерживать Ca^{2+} , 20 мкМ CaCl_2 последовательно добавлялись в реакционную

среду. После нескольких добавлений происходило увеличение внешней $[\text{Ca}^{2+}]$, 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.

Определение скорости образования перекиси водорода митохондриями скелетных мышц мышцей. Скорость образования H_2O_2 в митохондриях измеряли с помощью тест-системы, включающей в себя флуоресцентный индикатор Amplex Red и пероксидазу хрена на планшетном флуориметре Varioskan LUX (Thermo Fisher Scientific) при длинах волн возбуждения и флуоресценции 560 и 590 нм соответственно [23]. Среда инкубации содержала 210 мМ маннитол, 70 мМ сахарозу, 1 мМ KH_2PO_4 , 10 мкМ EGTA и 10 мМ HEPES–KOH (pH 7.4), 10 мкМ Amplex Red и пероксидазу хрена (акт. 1 ед/мл). Концентрация митохондриального белка составляла 0.1 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 $\epsilon_{240} = 43.6 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

Статистическая обработка результатов. Данные были проанализированы с использованием программ Graph Pad Prizm 5 и Microsoft Excel и представлены как среднее \pm стандартная ошибка средней. Полученные данные были обработаны статистически с помощью U-критерия Манна–Уитни (достоверность различий принималась при $p < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее было показано, что длительная (в течение часа) инкубация изолированных митохондрий печени крыс с 20Е приводит к угнетению дыхания и окислительного фосфорилирования изолированных митохондрий печени крыс, энергизованных глутаматом и малатом [16]. Из данных табл. 1 можно видеть, что в наших условиях 20Е также дозозависимо снижает скорости дыхания митохондрий скелетных мышц мышцей в состоянии 3, однако достоверный эффект наблюдается лишь при концентрации этого агента 100 мкМ. В этом случае нами отмечено снижение скорости дыхания в состоянии 3 в 1.2 раза при энергизации органелл глутаматом и малатом (субстраты комплекса I дыхательной цепи) и в 1.1 раза при энергизации

митохондрий сукцинатом (субстрат комплекса II дыхательной цепи) в присутствии ротенона. Это сопровождается снижением дыхательного контроля митохондрий, отражающим эффективность сопряжения дыхания и фосфорилирования в органеллах, в 1.1 раза при энергизации органелл как субстратами комплекса I, так и комплекса II. Также можно отметить тенденцию к снижению скорости дыхания в присутствии протонофорного разобщителя ДНФ и параметра ADP/O, отражающего эффективность синтеза АТФ. Дальнейшее увеличение концентрации 20E не приводит к существенным изменениям определяемых параметров. Наблюдается тенденция к последующему снижению скорости дыхания митохондрий в состоянии 3 и уменьшению коэффициента дыхательного контроля, однако при добавке 200 мкМ агента, по-видимому, наступает “фаза насыщения”, при которой дальнейшее увеличение концентрации не приводит к усилению эффекта.

Известно, что подавление дыхания и окислительного фосфорилирования в митохондриях сопровождается снижением мембранного потенциала ($\Delta\psi$) органелл. Из рис. 2 можно видеть, что в концентрации 10 мкМ 20E не оказывает влияния на $\Delta\psi$ органелл как при использовании глутамата и малата, так и сукцината в качестве субстратов дыхания. Однако увеличение его концентрации суммарно до 20 мкМ и далее сопровождается дозозависимым выходом потенциал-зависимого флуоресцентного зонда сафранина O из митохондрий,

что свидетельствует о снижении мембранного потенциала органелл. Полученные результаты отличаются от данных, полученных Баевым и соавторами [16], где показано, что длительная преинкубация изолированных митохондрий печени крыс с 20E увеличивает мембранный потенциал органелл на 6–12% в зависимости от концентрации и условий эксперимента. Однако важно отметить, что такой вывод сделан на основе расчетов, учитывающих последующую деполяризацию органелл разобщителем СССР. При этом внесение 20E непосредственно к изолированным митохондриям не оказывало существенного влияния на флуоресценцию родамина 123, использованного для измерения $\Delta\psi$, что свидетельствует об отсутствии действия 20E на мембранный потенциал митохондрий печени.

Одной из причин снижения эффективности окислительного фосфорилирования и мембранного потенциала митохондрий под действием 20E может быть подавление активности комплексов дыхательной цепи органелл и ее мобильных компонентов (кофермента Q и цитохрома c), что характерно для широкого круга стероидных соединений. Поэтому в следующей части работы мы изучили влияние 20E на активность индивидуальных комплексов дыхательной цепи митохондрий скелетных мышц мышей, а также суммарную активность комплексов I+III и II+III, позволяющую оценить мобильность кофермента Q между указанными индивидуальными комплексами. Из данных рис. 3 видно, что 20E не оказывает влияния на активность

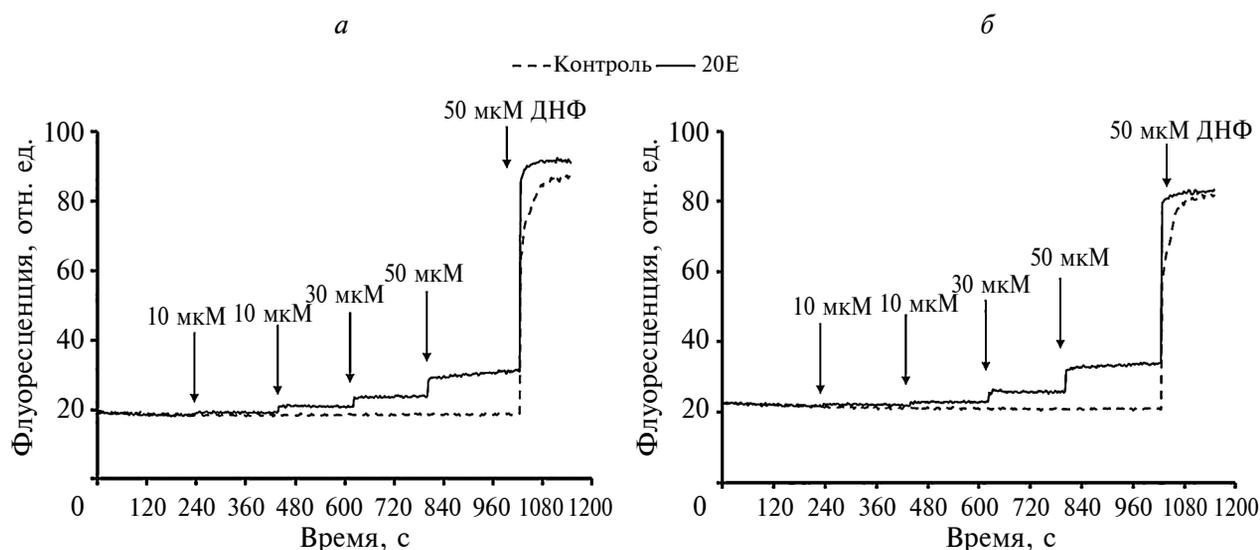


Рис. 2. Влияние 20E на мембранный потенциал митохондрий скелетных мышц мышей, энергизованных глутамат/малатом (а) или сукцинатом (б). Субстраты и реагенты: 2.5 мМ малат калия, 2.5 мМ глутамат калия (а), 5 мМ янтарная кислота, 1 мкМ ротенон (б). На каждом из рисунков представлены данные типичного эксперимента, полученные на одном препарате митохондрий. В каждом случае аналогичные результаты были получены еще в двух независимых экспериментах.

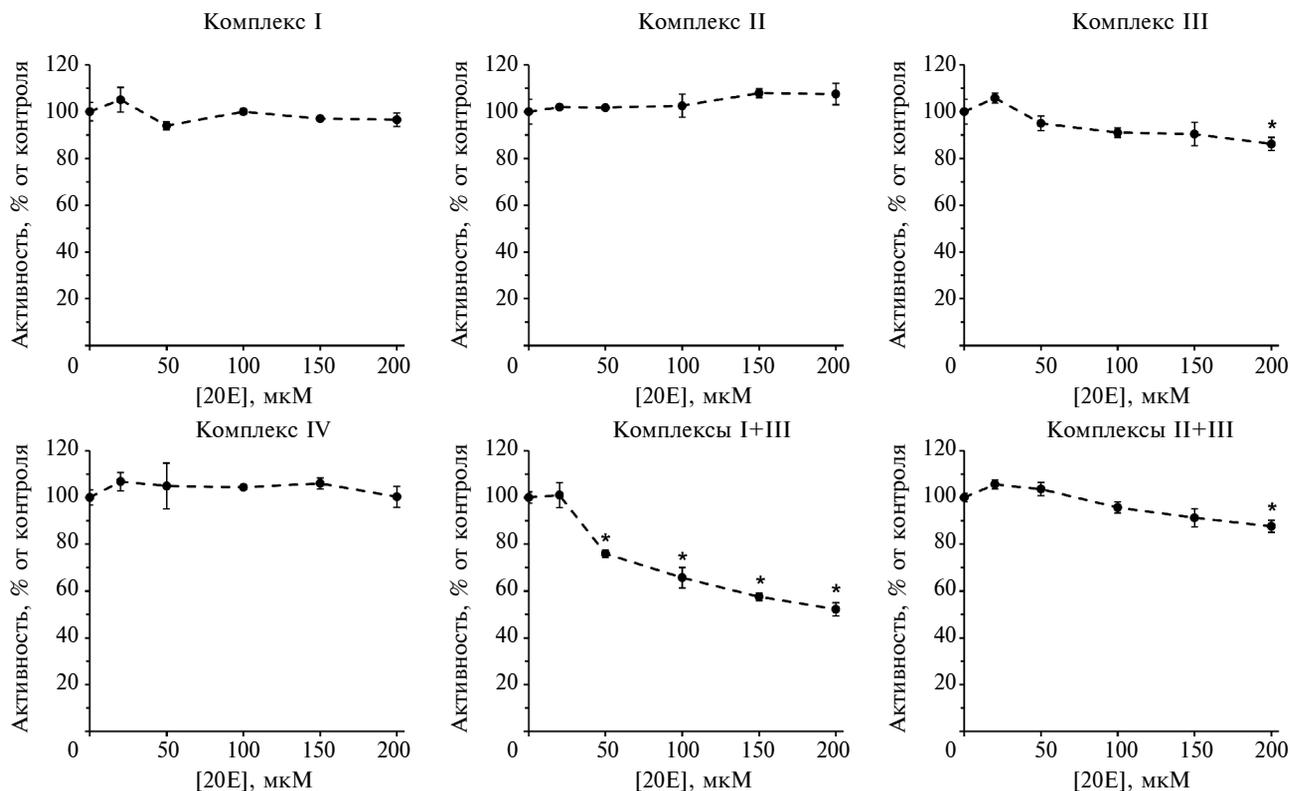


Рис. 3. Активность комплексов дыхательной цепи митохондрий в отсутствие и в присутствии различных концентраций 20-гидроксиэктона (значения в% активности по сравнению с контролем). Активность комплексов в отсутствие 20E принята за 100%. Приведены средние значения \pm стандартная ошибка среднего ($n = 4$). * $p < 0.05$ против контроля (отсутствие 20E).

I, II и IV комплексов дыхательной цепи, но дозозависимо снижает активность комплекса III и II+III комплексов дыхательной цепи митохондрий (на 14 и 13% соответственно в максимальной концентрации 200 мкМ). Наибольшая эффективность 20E отмечена по отношению к суммарной активности комплексов I+III, уже 50 мкМ этого агента вызвало снижение активности на 24%. В этом случае полумаксимальное ингибирование активности комплексов I+III достигалось при концентрации 20E, равной 200 мкМ. Наблюдаемый эффект может свидетельствовать о том, что 20E способен снижать подвижность кофермента Q между комплексами I и III дыхательной цепи, а также менее эффективно между комплексами II и III. Кроме того, эктистерон также оказывает ингибирующее действие на активность комплекса III дыхательной цепи митохондрий, тем самым снижая эффективность переноса электронов от кофермента Q на цитохром c. Эктистероиды являются липофильными молекулами и, по некоторым данным [30], могут включаться в мембранный бислой и таким образом оказывать влияние на функцию мембранных белков. Вероятно, добавление 20E напрямую

к митохондриям позволяет этим молекулам воздействовать на их внутреннюю мембрану и подавлять активность локализованных в ней комплексов дыхательной цепи митохондрий.

Митохондрии являются одними из основных продуцентов АФК в клетках [31]. При этом ингибирование комплексов дыхательной цепи, реализуемое посредством различных механизмов, значительно влияет на интенсивность генерации АФК. В настоящей работе мы также оценили влияние 20E на скорость продукции H_2O_2 митохондриями скелетных мышц мышей. Можно видеть, что в случае энергизации органелл глутаматом и малатом 20E в максимальной концентрации 100 мкМ вызывает увеличение продукции перекиси водорода (рис. 4а), в то время как в условиях сукцинат-зависимого дыхания такого эффекта не наблюдалось (рис. 4б). Можно предположить, что прооксидантный эффект 20E связан как со снижением подвижности кофермента Q между комплексами I и III, II и III, так и ингибированием активности комплекса III дыхательной цепи. Известно, что эти участки дыхательной цепи митохондрий задействованы в генерации АФК, и ингибирование их активности

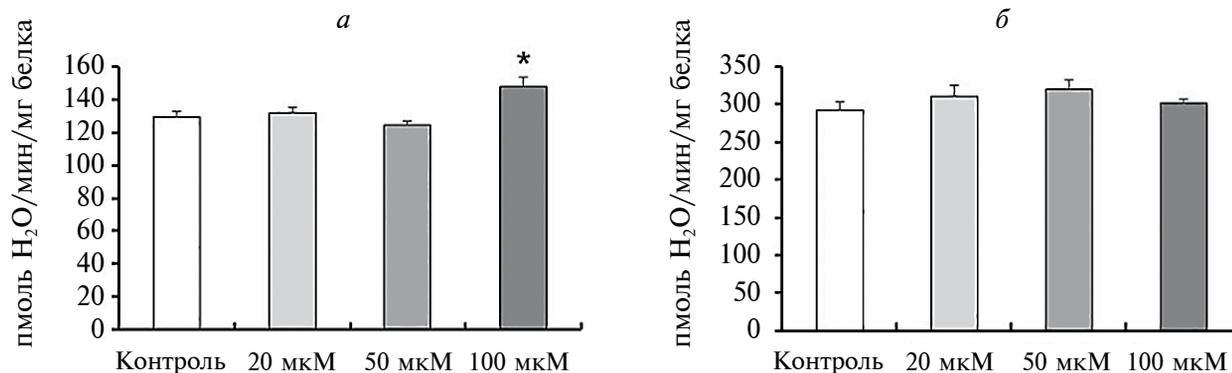


Рис. 4. Скорость образования H₂O₂ митохондриями скелетных мышц мышей, энергизованными глутаматом/малатом (а) или сукцинатом (б) в присутствии различных концентраций 20Е. Приведены средние значения ± ошибка среднего ($n = 4$). * $p < 0.05$ (по сравнению с контролем).

способствует усилению их продукции. Это согласуется с данными, свидетельствующими о генерации супероксидного радикала в условиях *in vitro* в присутствии фитоэкдистероидов [32]. С другой стороны, важно отметить, что во многих работах, напротив, описаны антиоксидантные свойства экдистероидов [33–36]. В частности, исследовано антиоксидантное действие 20Е в нескольких системах *in vitro* [33]: показано уменьшение интенсивности перекисного окисления липидов в митохондриях печени крыс под действием этого агента. Наши результаты позволяют полагать, что антиоксидантное действие 20Е не связано с его прямым влиянием на митохондриальные мишени.

20Е известен как модулятор гомеостаза Ca²⁺ в клетках насекомых [37]. Митохондрии млекопитающих играют важную роль в регуляции внутриклеточного кальция [38, 39], и изменение их функциональной активности оказывает существенное влияние на митохондриальный Ca²⁺-гомеостаз. В настоящей работе мы оценили влияние 20Е на способность митохондрий скелетных мышц поглощать и удерживать ионы кальция в матриксе. На рис. 5 представлены результаты сравнительного изучения кинетики поглощения Ca²⁺ митохондриями скелетных мышц мышей, энергизованными глутамат/малатом (рис. 5а) или сукцинатом (рис. 5б), инкубируемых в отсутствие и в присутствии 20-гидроксиэкдизона. Можно видеть, что митохондрии скелетных мышц мышей, энергизованные глутамат/малатом, полностью поглощают Ca²⁺ при условии добавления CaCl₂ 4 раза по 20 мкМ (рис. 5а). В этом случае только после пятой добавки CaCl₂ наблюдается выход Ca²⁺ из митохондрий (рис. 5а), свидетельствующий об индукции кальций-зависимой МРТ-поры во внутренней мембране органелл. Предварительная инкубация митохондрий в присутствии 20Е в концентрациях 20, 50 и 100 мкМ не оказывает существенного

влияния на способность митохондрий поглощать ионы кальция (рис. 5а). В митохондриях, энергизованных сукцинатом, предварительная инкубация органелл со 100 мкМ 20Е приводит к снижению способности митохондрий поглощать ионы кальция, тогда как 20 и 50 мкМ 20Е не имеют подобного эффекта (рис. 5б). Способность Ca²⁺ индуцировать открытие поры в митохондриях можно выразить, используя параметр кальциевой емкости митохондрий, т.е. то максимальное количество Ca²⁺, которое может быть аккумулировано в матриксе без последующего открытия поры [40]. Как показано на рис. 5в, 20Е не оказывает влияния на этот параметр митохондрий при энергизации органелл глутаматом и малатом во всех изученных концентрациях. В то же время при сукцинат-зависимом дыхании 100 мкМ 20Е вызывают достоверное снижение кальциевой емкости митохондрий скелетных мышц мышей по сравнению с контролем (рис. 5г). Полученные результаты свидетельствуют о том, что подавление функциональной активности митохондрий под действием 20Е также способствует снижению способности митохондрий эффективно аккумулировать ионы кальция в матриксе.

Таким образом, результаты исследования позволяют полагать, что потенциальные терапевтические эффекты фитоэкдистероидов и, в частности, 20Е скорее осуществляются через специфические рецепторы стероидов, в то время как цитотоксические эффекты могут проявляться при более высоких концентрациях 20Е, в том числе путем прямого воздействия на функциональную активность митохондрий. 20Е способен подавлять функционирование комплексов дыхательной цепи митохондрий и способствовать уменьшению эффективности окислительного фосфорилирования. Кроме того, это сопровождается снижением мембранного потенциала митохондрий, увеличением продукции АФК, а также угнетением способности органелл

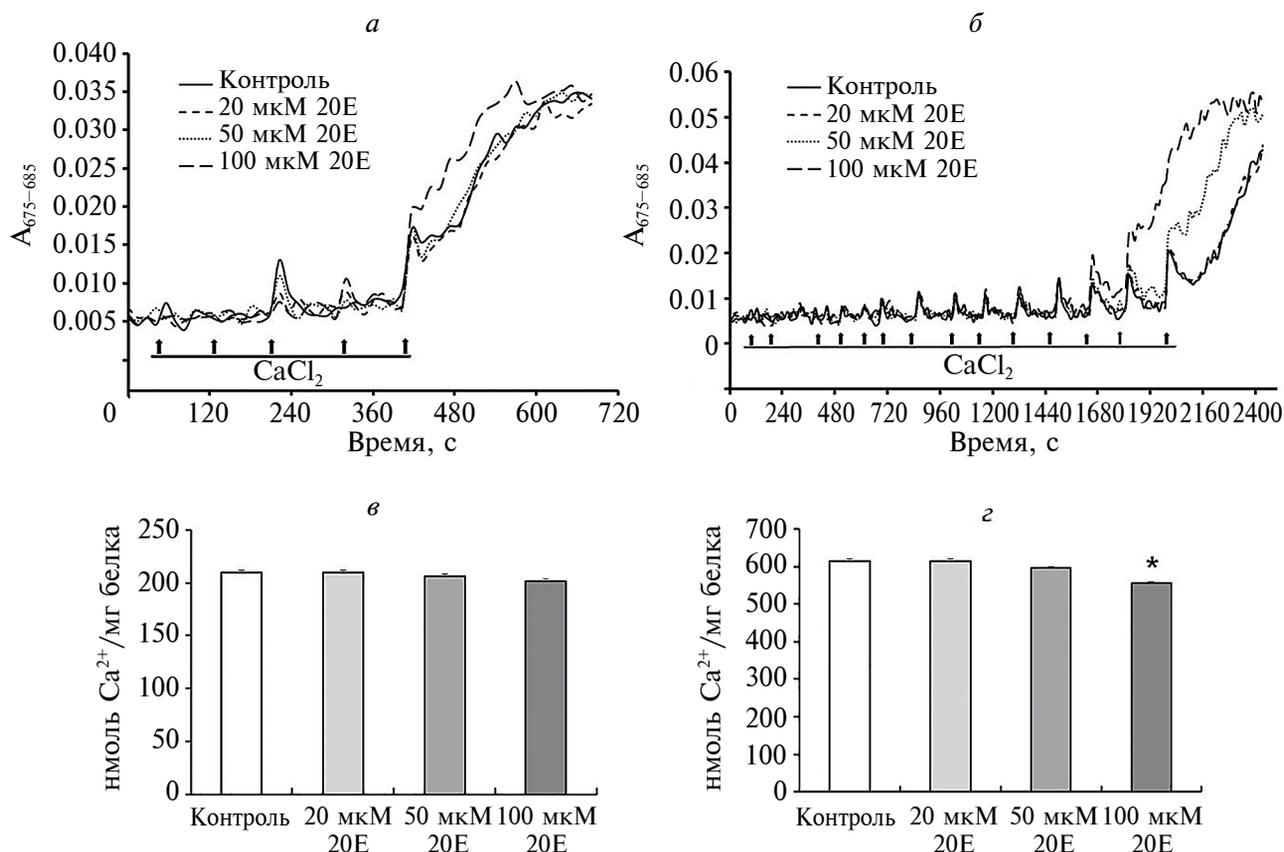


Рис. 5. Влияние 20Е на транспорт кальция в митохондриях скелетных мышц мышей. Поглощение добавок Ca^{2+} (пульсы по 20 мкМ) митохондриями скелетных мышц, энергизованными глутамат/малатом (а) и сукцинатом (б) в отсутствие (контроль) и в присутствии добавок. Кальциевая емкость митохондрий скелетных мышц мышей в отсутствие (контроль) и в присутствии различных концентраций 20Е, энергизованных глутамат/малатом (в) и сукцинатом (г). * $p < 0.05$ (по сравнению с контролем).

аккумулировать ионы кальция. В условиях *in vivo* такие эффекты 20Е на митохондрии скелетных мышц могут повлиять на способность органелл синтезировать АТФ, необходимый, прежде всего, для сокращения скелетной мускулатуры, а также на кальциевый гомеостаз, играющий важную роль в корректной регуляции циклов сокращения и расслабления мышечных волокон. Полученные данные следует учитывать при интерпретации результатов *in vivo* экспериментов.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 23-75-01061.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Koolman J. 1989. *Ecdysone: From chemistry of mode of action*. Stuttgart: Thieme Verlag, 482 p.
2. Toth N., Szabo A., Kacsala P., Heger J., Zador E. 2008. 20-Hydroxyecdysone increases fiber size in a muscle-specific fashion in rat. *Phytomedicine*. **15** (9), 691–698.
3. Lafont R., Harmatha J., Marion-Poll F., Dinan L., Wilson I.D. 2002. *The ecdysone handbook*. 3rd ed. Prague: Cybersales.
4. Savchenko R.G., Veskina N.A., Odinkov V.N., Benkovskaya G.V., Parfenova L.V. 2022. Ecdysteroids: Isolation, chemical transformations, and biological activity. *Phytochem. Rev.* **21**, 1445–1486. doi 10.1007/s11101-021-09792-y.
5. Bathori M., Toth N., Hunyadi A., Marki A., Zador E. 2008. Phytoecdysteroids and anabolic-androgenic steroids – structure and effects on humans. *Curr. Med. Chem.* **15**, 75–91.
6. Slama K., Lafont R. 1995. Insect hormones – ecdysteroids: Their presence and actions in vertebrates. *Eur. J. Entomol.* **92**, 355–377.

7. Dinan L., Lafont R. 2006. Effects and applications of arthropod steroid hormones (ecdysteroids) in mammals. *J. Endocrinol.* **191** (1), 1–8. doi 10.1677/joe.1.06900.
8. Slama K., Koudela K., Tenora J., Mathova A. 1996. Insect hormones in vertebrates: Anabolic effects of 20-hydroxyecdysone in Japanese quails. *Experientia.* **52**, 702–706.
9. Stopka P., Stancl J., Slama K. 1999. Effect of insect hormone, 20-hydroxyecdysone on growth and reproduction in mice. *Acta Soc. Zool. Bohemicae.* **63**, 367–378.
10. Syrov V.N. 2000. Comparative experimental investigations of the anabolic activity of phytoecdysteroids and steranabols. *Pharm. Chem. J.* **34**, 193–197.
11. Kratky F., Opletal L., Hejhalek J., Kucharova S. 1997. Effect of 20-hydroxyecdysone on the protein synthesis of pigs. *Zivocisna Vyroba.* **42**, 445–451.
12. Shuvalov O., Kirdeeva Y., Fefilova E., Netsvetay S., Zorin M., Vlasova Y., Fedorova O., Daks A., Parfenyev S., Barlev N. 2023. 20-Hydroxyecdysone Confers antioxidant and antineoplastic properties in human non-small cell lung cancer cells. *Metabolites.* **13**, 656. <https://doi.org/10.3390/metabo13050656>
13. Romaniuk-Drapała A., Lisiak N., Toton E., Matysiak A., Nawrot J., Nowak G., Kaczmarek M., Rybczyńska M., Rubiś B. 2021. Proapoptotic and proautophagic activity of 20-hydroxyecdysone in breast cancer cells in vitro. *Chem. Biol. Interact.* **342**, 109479. doi 10.1016/j.cbi.2021.109479.
14. Xia X., Zhang Q., Liu R., Wang Z., Tang N., Liu F., Huang G., Jiang X., Gui G., Wang L., Sun X. 2014. Effects of 20-hydroxyecdysone on improving memory deficits in streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus in rat. *Eur. J. Pharmacol.* **5**, 740, 45–52. doi 10.1016/j.ejphar.2014.06.026.
15. Mallek A., Movassat J., Ameddah S., Liu J., Semiane N., Khalkhal A., Dahmani Y. 2018. Experimental diabetes induced by streptozotocin in the desert gerbil, *Gerbillus gerbillus*, and the effects of short-term 20-hydroxyecdysone administration. *Biomed. Pharmacother.* **102**, 354–361. doi 10.1016/j.biopha.2018.03.070.
16. Baev A.Y., Charishnikova O.S., Khasanov F.A., Nebesnaya K.S., Makhmudov A.R., Rakhmedova M.T., Khushbaktova Z.A., Syrov V.N., Levitskaya Y.V. 2022. Ecdysterone prevents negative effect of acute immobilization stress on energy metabolism of rat liver mitochondria. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **219**, 106066. doi 10.1016/j.jsbmb.2022.106066.
17. Parr M.K., Botre F., Nass A., Hengevoss J., Diel P., Wolber G. 2015. Ecdysteroids: A novel class of anabolic agents? *Biol. Sport.* **32**, 169–173.
18. Wang J., Green P.S., Simpkins J.W. 2001. Estradiol protects against ATP depletion, mitochondrial membrane potential decline and the generation of reactive oxygen species induced by 3-nitropropionic acid in SK-N-SH human neuroblastoma cells. *J. Neurochem.* **77** (3), 804–811. doi 10.1046/j.1471-4159.2001.00271.x.
19. Nilsen J., Diaz Brinton R. 2003. Mechanism of estrogen-mediated neuroprotection: Regulation of mitochondrial calcium and Bcl-2 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100** (5), 2842–2847. doi 10.1073/pnas.0438041100.
20. Burstein S.R., Kim H.J., Fels J.A., Qian L., Zhang S., Zhou P., Starkov A.A., Iadecola C., Manfredi G. 2018. Estrogen receptor beta modulates permeability transition in brain mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta. Bioenerg.* **1859** (6), 423–433. doi 10.1016/j.bbmbio.2018.03.006.
21. Dubinin M.V., Ilzorkina A.I., Salimova E.V., Landage M.S., Khoroshavina E.I., Gudkov S.V., Belosludtsev K.N., Parfenova L.V. 2023. Effect of fusidic acid and some nitrogen-containing derivatives on liposomal and mitochondrial membranes. *Membranes (Basel).* **13** (10), 835. doi 10.3390/membranes13100835.
22. 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.Y., Akatov V.S., Belosludtseva N.V., Liu J., Belosludtsev K.N. 2023. Conjugation of triterpenic acids of ursane and oleanane types with mitochondria-targeting cation F16 synergistically enhanced their cytotoxicity against tumor cells. *Membranes (Basel).* **13** (6), 563. doi 10.3390/membranes13060563.
23. Dubinin M.V., Semenova A.A., Ilzorkina A.I., Mikheeva I.B., Yashin V.A., Penkov N.V., Vydrina V.A., Ishmuratov G.Y., Sharapov V.A., Khoroshavina E.I., Gudkov S.V., Belosludtsev K.N. 2020. Effect of betulin and betulonic acid on isolated rat liver mitochondria and liposomes. *Biochim. Biophys. Acta. Biomembr.* **1862** (10), 183383. doi 10.1016/j.bbmem.2020.183383.
24. Dubinin 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. doi 10.1016/j.bbadis.2020.165674.
25. Dubinin 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.
26. Chance B., Williams G.R. 1955. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization. *J. Biol. Chem.* **217** (1), 383–393.
27. 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. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.058>.

28. Dubinin M.V., Sharapov V.A., Izorkina A.I., Efimov S.V., Klochkov 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.* **864** (9), 183972.
29. Dubinin M.V., Talanov E.Y., Tenkov K.S., Starinets V.S., Mikheeva I.B., Belosludtsev K.N. 2020. Transport of Ca²⁺ and Ca²⁺-dependent permeability transition in heart mitochondria in the early stages of Duchenne muscular dystrophy. *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics.* **1861** (10), 148250.
30. Lafont R., Dinan L. 2003. Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: An update. *J. Insect. Sci.* **3**, 7. doi 10.1093/jis/3.1.7.
31. Андреев А.Ю., Кушнарева Ю.Е., Мерфи Э.Н., Старков А.А. 2015 Митохондриальный метаболизм активных форм кислорода: десять лет спустя (обзор). *Биохимия.* **80** (5), 612–630.
32. Шулькин А.В., Якушева Е.Н., Давыдов В.В., Дармограй В.Н. 2012. Исследование прямой антиоксидантной активности фитоэксдистерона *in vitro*. *Рос. мед.-биол. вестн. им. акад. И.П. Павлова.* **1**, 51–57.
33. Kuzmenko A.I., Niki E., Noguchi H. 2001. New functions of 20-hydroxyecdysone in lipid peroxidation. *J. Oleo Sci.* **50** (6), 497–506.
34. Cai Y.J., Dai J.Q., Fang J.G., Ma L.P., Hou L.F., Yang L., Liu Z.L. 2002. Antioxidative and free radical scavenging effects of ecdysteroids from *Serratula stragulata*. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **80** (12), 1187–1194. doi 10.1139/y02–152.
35. Sahach V.F., Korkach Iu.P., Kotsiuruba A.V., Rudyk O.V., Vavilova H.L. 2008. Mitochondrial permeability transition pore opening inhibition by ecdysterone in heart mitochondria of aging rats. *J. Phys.* **54** (4), 3–10.
36. Das N., Mishra S.K., Bishayee A., Ali E.S., Bishayee A. 2021. The phytochemical, biological, and medicinal attributes of phytoecdysteroids: An updated review. *Acta. Pharm. Sin. B.* **11** (7), 1740–1766. doi 10.1016/j.apsb.2020.10.012.
37. Li Y.B., Li X.R., Yang T., Wang J.X., Zhao X.F. 2016. The steroid hormone 20-hydroxyecdysone promotes switching from autophagy to apoptosis by increasing intracellular calcium levels. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* **79**, 73–86. doi 10.1016/j.ibmb.2016.10.004.
38. Дубинин М.В., Белослудцев К.Н. 2019. Таксономические особенности механизмов специфического транспорта Ca²⁺ в митохондриях. *Биол. мембраны.* **36** (4), 231–241. doi 10.1134/S0233475519040030.
39. Белослудцев К.Н., Дубинин М.В., Белослудцева Н.В., Миронова Г.Д. 2019. Транспорт ионов Ca²⁺ митохондриями: механизмы, молекулярные структуры и значение для клетки. *Биохимия.* **84** (6), 759–775.
40. Rasola A., Bernardi P. 2011. Mitochondrial permeability transition in Ca²⁺-dependent apoptosis and necrosis. *Cell Calcium.* **50**, 222–233.

The Effect of 20-Hydroxyecdysone on the Functioning of Isolated Mouse Skeletal Muscle Mitochondria

© 2024 г. А. А. Semenova^{1,*}, А. Д. Igoshkina¹, N. V. Mikina¹, R. G. Savchenko²,

L. V. Parfenova², M. V. Dubinin¹

¹Mari State University, Yoshkar-Ola, 424001 Russia

²Institute of Petrochemistry and Catalysis, Russian Academy of Sciences, Ufa, 450075 Russia

*e-mail: sem_al.ru@mail.ru

This work shows the effect of the phytoecdysteroid 20-hydroxyecdysone (20E) on the functioning of mouse skeletal muscle mitochondria. It has been shown that 20E at a concentration of 100 μM or more suppresses mitochondrial respiration fueled by glutamate and malate (substrates of complex I of the respiratory chain) or succinate (substrate of complex II of the respiratory chain). This effect of 20E is accompanied by a decrease in the membrane potential of organelles and is associated with inhibition of the activity of complex III, the total activity of complexes I+III and II+III of the mitochondrial respiratory chain. We have noted the prooxidant effect of 20E, which manifests itself in an increase in the production of hydrogen peroxide by skeletal muscle mitochondria. In addition, 20E reduces the ability of mitochondria to accumulate calcium ions in the matrix. The paper discusses the mechanisms of the possible toxic effect of 20E on the functioning of skeletal muscle mitochondria.

Keywords: mitochondria, 20-hydroxyecdysone, oxidative phosphorylation, respiratory chain, calcium, reactive oxygen species