

УДК 577.24

НОВЫЙ МИТОХОНДРИАЛЬНО-НАПРАВЛЕННЫЙ ПРОТОНОФОР И АНТИМИКРОБНЫЙ АГЕНТ НА ОСНОВЕ 7-НИТРОБЕНЗО-2-ОКСА-1,3-ДИАЗОЛА (NBD), КОВАЛЕНТНО СВЯЗАННОГО С ТРИФЕНИЛФОСФОНИЕВЫМ КАТИОНОМ

© 2020 И.Р. Яубасарова^{1,2}, Л.С. Хайлова¹, П.А. Назаров¹, Т.И. Рокицкая¹, Д.Н. Силачев¹, Т.И. Данилина¹, Е.Ю. Плотников¹, С.С. Денисов^{1,3}, Р.С. Кирсанов¹, Г.А. Коршунова¹, Е.А. Котова¹, Д.Б. Зоров¹, Ю.Н. Антоненко^{1*}

¹ НИИ физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия; электронная почта: antonen@genebee.msu.ru

² Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия

³ Department of Biochemistry, University of Maastricht, Cardiovascular Research Institute Maastricht, Universiteitssingel 50, 6229 ER, Maastricht, The Netherlands

Поступила в редакцию 07.06.2020

После доработки 22.07.2020

Принята к публикации 25.07.2020

Присоединение липофильных катионов к различным малым молекулам широко используется для получения митохондриально-направленных соединений, обладающих специфической активностью. В настоящей работе получена серия производных популярного флуоресцентного красителя 7-нитробензо-2-окса-1,3-диазола (NBD). Согласно ранее полученным данным (Denisov et al., Bioelectrochemistry, 2014), алкильные производные NBD способны разобщать изолированные митохондрии при концентрациях в десятки микромолей, несмотря на очень высокое значение pK_a (~11) диссоциирующей группы. Синтезировано ряд производных трифенилфосфония (TPP), связанных с NBD через углеводородные спейсеры различной длины: C5, C8, C10 и C12 (аналоги mitoNBD). Эти соединения энергозависимо накапливались в митохондриях. NBD-C10-TPP (C10-mitoNBD) проявлял протонофорную активность на искусственных липидных мембранах (липосомах) и разобщал изолированные митохондрии при микромолярных концентрациях, тогда как производное с коротким линкером, NBD-C5-TPP (C5-mitoNBD), практически не проявляло протонофорного и разобщающего действия. В согласии с этими данными, C10-mitoNBD был намного более эффективным, чем C5-mitoNBD, в подавлении роста бактерии *Bacillus subtilis*. Из изученных аналогов C10-mitoNBD и C12-mitoNBD проявляли наибольшую антибактериальную активность. Кроме того, C10-mitoNBD оказывал нейропротекторное действие на модели травмы головного мозга крысы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: разобщитель, протонофор, окислительное фосфорилирование, митохондрии, дыхание, мембранный потенциал.

DOI: 10.31857/S0320972520120106

ВВЕДЕНИЕ

Протонофорные разобщители окислительного фосфорилирования привлекают пристальное внимание как перспективные агенты для создания нейро-, кардио- и нефропротекторных препаратов, лекарств против рака, диабета,

ожирения и инфекционных заболеваний [1]. Недавно появились работы, указывающие на то, что низкие дозы разобщителей могут вызывать перестройку метаболизма клеток, оказывающую защитное действие на их жизнедеятельность [2]. При таком мягком разобщении синтез АТФ может не только не падать, но даже активи-

Принятые сокращения: МХ – митохондрии; $\Delta\psi$ – мембранный потенциал митохондрий; TPP⁺ – катион тетрафенилфосфония; Sn-TPP – алкилтрифенилфосфоний; NBD – 7-нитробензо-2-окса-1,3-диазол; NBD-Cl – 4-хлоро-7-нитро-2,1,3-бензоксадиазол; Sn-mitoNBD – ω -((7-нитро-2,1,3-бензоксадиазол-4-ил)амино)алкилтрифенилфосфоний; ФКФ – карбонилцианид-*l*-трифторметокси-фенилгидразон; никлозамид – 2',5-дихлоро-4'-нитросалициланилид; ВАМ15 – N5,N6-бис(2-фторфенил)[1,2,5]оксадиазоло[3,4-*b*]пирозин-5,6-диамин; КЦХФ – карбонилцианид-*m*-хлорфенилгидразон; ДНФ – 2,4-динитрофенол; БСА – бычий сывороточный альбумин; ТМРЕ – этиловый эфир тетраметилродамина; ФКС – флуоресцентная корреляционная спектроскопия; ЧМТ – черепно-мозговая травма; МИК – минимальная ингибирующая концентрация.

* Адресат для корреспонденции.

роваться [2, 3]. Такие данные были получены при использовании в качестве разобщителей 2,4-динитрофенола (ДНФ), карбонилцианид-*n*-трифторметокси-фенилгидразона (ФКФ), никлосазида и ВМ15. В последние годы идет поиск новых протонофоров, которые бы смогли заменить традиционные разобщители, снизив их цитотоксичность. В качестве одного из направлений такого поиска предлагается использовать катионные разобщители, которые способны накапливаться в митохондриях по мембранному потенциалу и тем самым должны в меньшей степени затрагивать другие мембранные системы клеток, в частности, плазматическую мембрану [4–10]. Следует отметить, что соединения, содержащие децил-трифенилфосфониевые фрагменты, такие как SkQ1 или mitoQ, также способны накапливаться в митохондриях, деполаризуя их мембрану и стимулируя дыхание [11], однако они делают это не напрямую, а посредством образования комплексов с жирными кислотами [12].

Одним из подходов к созданию митохондриально-направленных разобщителей является присоединение к известным разобщителям трифенилфосфониевого фрагмента. Так, в нашей лаборатории был синтезирован и исследован конъюгат на основе флуоресцеина, названный mitoFluo [5], который накапливался в митохондриях и вызывал их разобщение в субмикромольных концентрациях. На моделях патологий крыс mitoFluo проявлял нейро- и нефропротекторное действие [13]. Однако, наряду с выраженными положительными свойствами, mitoFluo обладал некоторыми недостатками, в частности, довольно низкой фотостабильностью, свойственной производным флуоресцеина [14], а также заметным фотодинамическим действием [15]. Поэтому мы предприняли попытку создания флуоресцирующего митохондриально-направленного разобщителя на основе другого, широко применяемого в биохимии и биофизике, флуорофора – 4-нитробензо-2-окса-1,3-диазола (NBD). Ранее нами было показано, что алкиламино-производные NBD разобщают выделенные митохондрии в концентрациях десятков микромолей [16], несмотря на очень высокое значение pK_a депротонируемой группы ($pK_a = 11$). В настоящей работе была синтезирована серия конъюгатов трифенилфосфония с алкиламиноNBD с различной длиной углеводородного линкера – C5, C8, C10 и C12. Было показано, что в отличие от алкиламиноNBD все соединения этой серии накапливаются в митохондриях, придавая им способность флуоресцировать в зеленой области спектра. C10-mitoNBD разобщал митохондрии в микромолярных кон-

центрациях, тогда как соединение с коротким линкером, C5-mitoNBD, практически не оказывало разобщающего действия. Таким образом, конъюгирование дециламиноNBD с TPP существенно снизило разобщающие концентрации этого производного NBD. C10-mitoNBD оказался сильным антимикробным агентом, подавляя рост бактерий в микромолярных концентрациях. Кроме того, C10-mitoNBD проявлял нейротекторное действие на модели травмы головного мозга крысы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали реагенты фирмы «Sigma-Aldrich» (если не указано особо).

Индукцию тока через плоские бислойные липидные мембраны (БЛМ) измеряли в тefлоновой ячейке с двумя отсеками, разделенными тefлоновой перегородкой с отверстием 0,6 мм в диаметре, на котором формировали мембрану по методу [17] из фосфолипида дифитанилфосфатидилхолина («Avanti Polar Lipids», США) в концентрации 20 мг на мл декана. Измерения тока через мембрану осуществляли двумя AgCl-электродами, погруженными в ячейку по обе стороны мембраны, используя усилитель OES-2 («Орус», Россия).

Проницаемость бислойных фосфолипидных мембран для ионов водорода измеряли на липосомах, нагруженных pH-чувствительным красителем пиранином, как описано в работе [16]. Для приготовления липосом использовали смесь липидов, состоящую из диолеилфосфатидилхолина (DOPC), диолеилфосфатидилглицерина (DOPG) и холестерина в пропорции 54 : 13 : 33 (по весу). Раствор липидов в хлороформе был тщательно высушен в токе азота, следовые остатки растворителя удалены под вакуумом. Затем липиды были ресуспендированы в буфере (100 мМ KCl, 20 мМ MES, 20 мМ MOPS, 20 мМ Tricine, pH 6,0), содержащем 0,5 мМ пиранина. Концентрация липида в растворе составила 10 мг/мл. Смесь интенсивно встряхивали и замораживали при -20°C . Операцию повторяли три раза. Моноламеллярные липосомы получали методом экструзии через поликарбонатный фильтр с диаметром пор 100 нм, используя миниэкструдер («Avanti Polar Lipids», США). Внелипосомальный пиранин отделяли пропусканием через колонку с Sephadex G-50, уравновешенную тремя объемами буфера. Измерения проводили на флуориметре Панорама Флюорат-02 («Люмэкс», Санкт-Петербург) в условиях термостатирования ($T = 15^{\circ}\text{C}$). Флуоресценцию регистрировали на длине волны 505 нм

при длине волны возбуждения 455 нм. В конце каждой записи добавляли K^+/H^+ -обменник X537A для полного рассеивания градиента протонов. Для предотвращения образования протонного диффузионного потенциала эксперименты проводили в присутствии 10 нМ валиномицина.

Митохондрии из печени крыс получали как описано ранее [18]. Полученные митохондрии суспендировали в среде, содержащей 250 мМ сахарозы, 5 мМ MOPS-КОН, pH 7,4, 1 мМ EGTA. Концентрацию белка измеряли биуретовым методом, используя БСА в качестве стандарта.

Мембранный потенциал митохондрий измеряли, используя в качестве индикатора сафранин О [19]. Среда измерения содержала 250 мМ сахарозу, 5 мМ MOPS-КОН pH 7,4, 1 мМ EGTA, 5 мМ сукцинат или 0,1 мМ АТФ, 2 мкМ ротенон и 15 мкМ сафранин О. Концентрация митохондрий составляла 0,6–0,7 мг белка/мл. Поглощение измеряли при длинах волн 555 нм и 523 нм на спектрофотометре Aminco DW-2000 в двуволновом режиме.

Дыхание митохондрий измеряли при 25°C полярографическим методом: по уменьшению концентрации кислорода в среде инкубации с помощью кислородного электрода типа Кларка («Strathkelvin Instruments», UK) с использованием системного программного обеспечения 782. Среда инкубации содержала 250 мМ сахарозы, 5 мМ MOPS, 1 мМ EGTA, pH 7,4. Концентрация митохондриального белка составляла 0,4 мг/мл.

Накопление гидрофобных катионов в митохондриях измеряли электродом, селективным по катиону тетрафенилфосфония (TPP^+) («НИКО-Аналит», Россия).

Прибор для флуоресцентной корреляционной спектроскопии (ФКС) был описан ранее [20, 21]. С помощью этого прибора изучали энергозависимое связывание катионного красителя этилового эфира тетраметилпроламида (ТМРЕ) с митохондриями. Анализировали зависимость сигнала флуоресценции суспензии окрашенных митохондрий от времени, которые представляли собой записи пиков сигнала разной интенсивности, отражающие случайное блуждание частиц в конфокальном объеме. Общепринятым способом количественной обработки флуктуирующего сигнала флуоресценции $F(t)$ при использовании метода ФКС является вычисление автокорреляционной функции, а именно:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2},$$

где $\langle F(t) \rangle$ – средняя интенсивность флуоресценции, а $\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle$ – отклонение от сред-

него значения. Как правило, измерение автокорреляционной функции применяется для нахождения коэффициентов диффузии веществ, которые оцениваются с применением аппроксимации кривой $G(\tau)$ теоретическим уравнением трехмерной диффузии [22, 23]. Однако в случае таких больших объектов, как митохондрии, статистически достоверное измерение $G(\tau)$ сталкивается со сложностью, связанной с необходимостью накопления сигнала за очень большой промежуток времени. В настоящей работе измерение $G(\tau)$ осуществляли в условиях перемешивания, когда зависимость G от τ определяется скоростью потока жидкости под действием работы мешалки. $G(\tau)$ в условиях перемешивания суспензии митохондрий отражает, помимо среднего времени нахождения флуоресцирующих частиц в конфокальном объеме, среднее количество частиц, которые там присутствуют. Под флуоресцирующими частицами в случае нашей системы следует понимать свободные молекулы флуорофоров, а также частицы митохондрий, несущие связанные с ними молекулы красителя. Для количественной оценки среднего числа флуоресцирующих частиц используют значение величины $G(\tau)$ в пределе малых τ . А именно, при условии суспензии одинаковых частиц, согласно [22, 23]:

$$G(\tau \rightarrow 0) = \frac{1}{N},$$

где N – среднее число флуоресцирующих частиц в конфокальном объеме. При связывании многих молекул красителя с частицами митохондрий происходит уменьшение эффективного числа частиц в системе [24]. Более подробное описание этого явления на примере связывания с липосомами дано в работе [25].

Подавление роста бактерий *Bacillus subtilis* под действием Cn-mitoNBD. В работе был использован стандартный лабораторный штамм BR151 (trpC2 lys-3 metB10) *Bacillus subtilis* subs. *subtilis* Cohn 1872. Бактериальные клетки выращивали при 30°C в среде LB или среде Мюллера–Хинтона при встряхивании 140 об/мин. Ночные культуры бактериальных клеток разводили в свежей среде LB. 200 мкл бактериальных клеточных культур (5×10^5 клеток/мл) инокулировали в 96-луночные планшеты («Eppendorf AG», Германия) и Cn-mitoNBD добавляли в концентрациях 0,125–20 мкМ. Клетки оставляли расти на 20 ч при 30°C. Оптические плотности при 620 нм были получены с использованием планшет-ридера Multiskan FC с инкубатором («Thermo Fisher Scientific», США). Все эксперименты проводили как минимум в трех повторах.

Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) для Cn-mitoNBD определяли с помощью метода двойных разведений бульона Мюллера–Хинтона, как рекомендовано Институтом клинических и лабораторных стандартов [26], с использованием готовых панелей. Соединения разводили в 96-луночном планшете для микротитрования до конечных концентраций в диапазоне от 0,125 до 20 мкМ в аликвоте по 250 мл бактериальной суспензии (5×10^5 КОЕ/мл) с последующей инкубацией при 30°C в течение 21 ч. МИК была определена как самая низкая концентрация, которая полностью ингибировала рост бактерий. Рост бактерий наблюдали визуально наряду с измерениями КОЕ и значений оптической плотности при 620 нм. Эксперименты проводили в трех повторах.

Эксперименты с клеточными культурами. Для изучения внутриклеточной локализации C10-mitoNBD использовали культуру мезенхимальных стромальных клеток. Клетки культивировали в DMEM/F-12 1 : 1, содержащем 10%-ную фетальную телячью сыворотку в инкубаторе CO₂ (5%). Раствор C10-mitoNBD добавляли к культивируемым клеткам до концентрации 1 мкМ и инкубировали в течение 30 мин при 37°C в среде DMEM/F-12, содержащей 10 мм Hepes-NaOH. Затем C10-mitoNBD отмывали, клетки инкубировали в течение 30 мин с зондом TMRE (200 нМ) при 37°C в среде DMEM/F-12, содержащей 10 мм Hepes-NaOH. После отмывки TMRE клетки визуализировали с помощью инвертированного конфокального микроскопа LSM700 («Carl Zeiss Inc.», Германия). Анализ колокализации TMRE и C10-mitoNBD проводили в чашках со стеклянным дном при облучении лазером с длиной волны 488 нм и 543 нм и эмиссией, собранной при 510–530 нм и 560–590 нм соответственно. Изображения обрабатывали с помощью программного обеспечения ImageJ («NIH», США).

Моделирование открытой черепно-мозговой травмы головного мозга. Крыс анестезировали внутрибрюшинной инъекцией 12%-ного раствора хлоралгидрата в дозе 300 мг/кг. Моделирование черепно-мозговой травмы (ЧМТ) проводили методом дозированного контузионного повреждения открытого мозга, описанным ранее [27]. Крысу размещали в стереотаксической раме, голову фиксировали и проводили разрез кожи вдоль сагитального шва. Высверливали отверстие в теменной и лобной кости черепа с помощью фрезы диаметром 5 мм над левым полушарием в области локализации сенсомоторной коры, по стереотаксическим координатам 2,5 мм латерально и 1,5 мм каудально относительно брегмы. Установку для нанесения травмы разме-

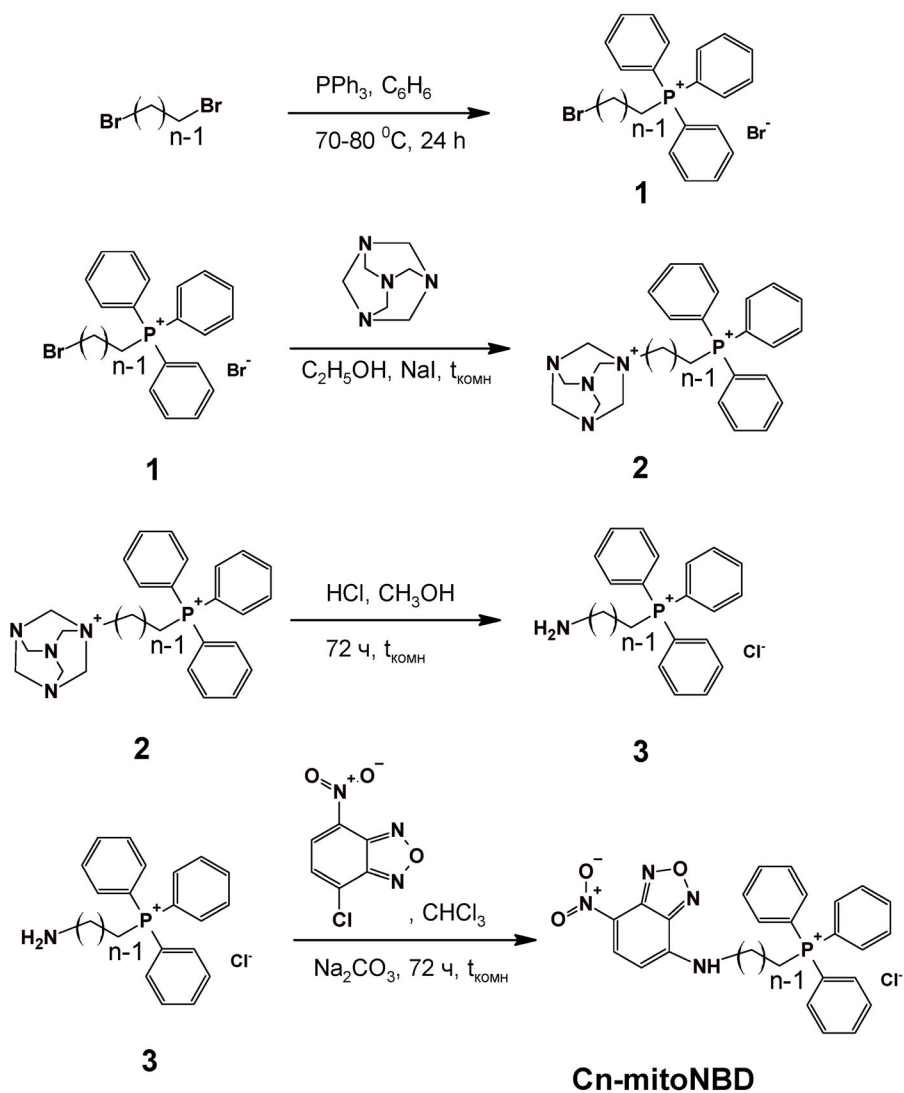
щали таким образом, чтобы боек находился над твердой мозговой оболочкой. Для нанесения травмы на боек сбрасывали по направляющим груз массой 50 г с высоты 10 см. Кожу ушивали викрилом № 4 и область операции обрабатывали 5%-ным раствором бриллиантового зеленого. Во время операции и до выхода животного из наркоза температуру тела поддерживали на уровне $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ с помощью подогреваемого мата и ректального датчика температуры тела, соединенного с термореле. Крысы были разделены на группы (1) ЧМТ ($n = 21$), (2) ЧМТ + C10-mitoNBD 0,5 мкмоль/кг ($n = 19$), (3) ЧМТ + C10-mitoNBD 1 мкмоль/кг ($n = 12$). Крысам интраназально (и/н) вводили mitoNBD или физиологический раствор (группа ЧМТ) сразу после нанесения ЧМТ. Препарат (40 мкл физиологического раствора, содержащего C10-mitoNBD) в дозе 0,5 или 1 мкмоль/кг, или физиологический раствор без препарата закапывали по 5 мкл в оба носовых канала с помощью микропипетки каждые 5 мин (общее время введения препарата составило 40 мин). Через 7 сут после ЧМТ проводили исследование головного мозга методом магнитно-резонансной томографии (МРТ) для оценки объема повреждения, как было описано ранее [28]. Выживаемость животных оценивали в течение 7 послеоперационных суток. Неврологический статус определяли в тесте «Постановка конечности на опору» до ЧМТ (базовая линия) и через 1, 4 и 7 сут после индукции ЧМТ. Тест состоял из 7 испытаний, оценивающих сенсомоторную интеграцию передних и задних конечностей в ответ на тактильную, проприоцептивную и зрительную стимуляцию. Тест оценивали следующим образом: крыса выполняла испытание – 2 балла; крыса выполняла испытание с промедлением (>2 с) и/или не полностью – 1 балл; крыса не выполняла испытание – 0 баллов [29].

Статистическую обработку данных проводили с использованием компьютерной программы Statistica 12.0 («StatSoft», США). Нормальность распределения признака в выборке оценивали по *W*-критерию Шапиро–Уилка. Для оценки статистической значимости различий в тесте «Постановка конечности на опору» использовали *U* критерий Манна–Уитни. Для оценки статистической значимости различий объемов травмы мозга и интенсивности флуоресценции кальция использовали *t*-критерий Стьюдента. Данные представлены в виде: среднее \pm ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Синтез Cn-mitoNBD. Для синтеза митохондриально-направленных разобщителей C8-mitoNBD,

а



б

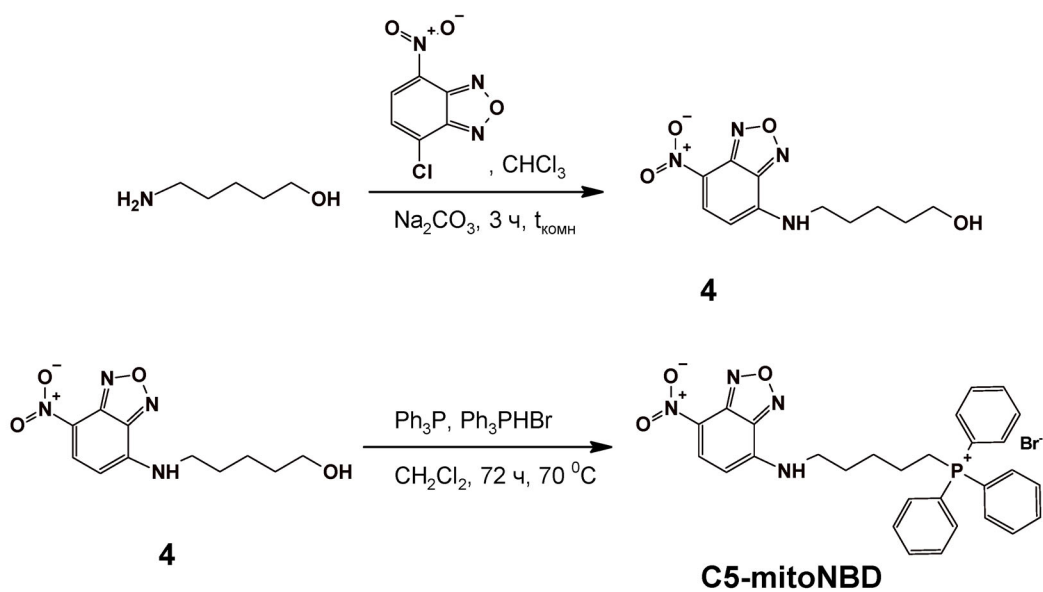


Рис. 1. а – Схема синтеза соединений **C_n-mitoNBD** ($n = 8, 10, 12$); б – схема синтеза **C5-mitoNBD**

C10-mitoNBD и C12-mitoNBD была разработана методика в четыре стадии. Схема синтеза представлена на рис. 1.

На первой стадии были получены производные ω -бромалкилтрифенилфосфония (1) реакцией соответствующего дибромалкана с трифенилфосфином. Реакцию проводили в двукратном мольном избытке дибромалкана для замещения только одного брома. Далее по методу Делепина были синтезированы гидрохлориды ω -аминоалкил(трифенил)фосфония (3). Для этого бромалкил-производные (1) обработали уротропином с последующим разложением соляной кислотой четвертичных солей аммония (2). Целевые соединения Cn-mitoNBD были получены по реакции ароматического нуклеофильного замещения хлорида в NBD-Cl действием ω -аминоалкил(трифенил)фосфония, образующегося *in situ* при обработке соответствующего гидрохлорида (3) содой (подробнее см. Дополнительные материалы).

Для синтеза соединения с коротким линкером C5-mitoNBD была опробована другая схема, представленная на рис. 1, б. На первой стадии обработкой NBD-Cl 5-аминопентанолом-1 было синтезировано гидроксипентиламинопроизводное 7-нитро-2,1,3-бензоксадиазола (4). Последующая трансформация гидроксигруппы в трифенилфосфониевую группу была осуществлена нагреванием (4) с бромидом трифенилфосфония в присутствии трифенилфосфина. Соединения Cn-mitoNBD охарактеризовали методами LC-MS и УФ-спектроскопии (Дополнительные материалы, рисунки S1–S4). УФ-спектры соединений имели характерные для NBD-производных максимумы поглощения при ~ 340 и ~ 473 нм.

Измерение pK_a . На рис. 2, а приведены спектры испускания флуоресценции C10-mitoNBD при различных pH в присутствии липосом, приготовленных из яичного лецитина. Спектры имеют максимум флуоресценции при 540 нм (возбуждение 470 нм). Как видно из рис. 2, а, при защелачивании происходит снижение сигнала флуоресценции без смещения максимума флуоресценции. На рис. 2, б приведена pH-зависимость интенсивности флуоресценции C10-mitoNBD при 540 нм. Полученные значения хорошо фиттируются уравнением Гендерсона–Гассельбаха с $pK_a = 11,3$ (черная кривая).

mitoNBD индуцирует ток протонов на плоской бислоиной липидной мембране (БЛМ). Добавление C10-mitoNBD или C8-mitoNBD к БЛМ в микромолярных концентрациях индуцировали флуктуации проводимости мембраны, которые серьезно мешали изучению индукции ими стационарного тока через БЛМ. Добавление боль-

ших концентраций указанных соединений приводило к нестабильности и разрыву мембраны. При этом величины наблюдаемых стационарных токов составляли всего несколько пА. Добавление жирной кислоты (пальмитата) существенно повышало величину стационарного тока, индуцированного C8-mitoNBD, который составлял уже несколько десятков пикоампер (рис. 3, а). На рис. 3, б приведены вольт-амперные характеристики тока БЛМ, индуцированного C8-mitoNBD в симметричных условиях (кривые 1 и 3) и условиях градиента pH на БЛМ (кривая 2). Смещение кривой 2 на 35 мВ влево от кривой 1 говорит о протонном характере тока, индуцированного C8-mitoNBD. Величина потенциала смещения была заметно меньше таковой (~ 60 мВ), соответствующей уравнению

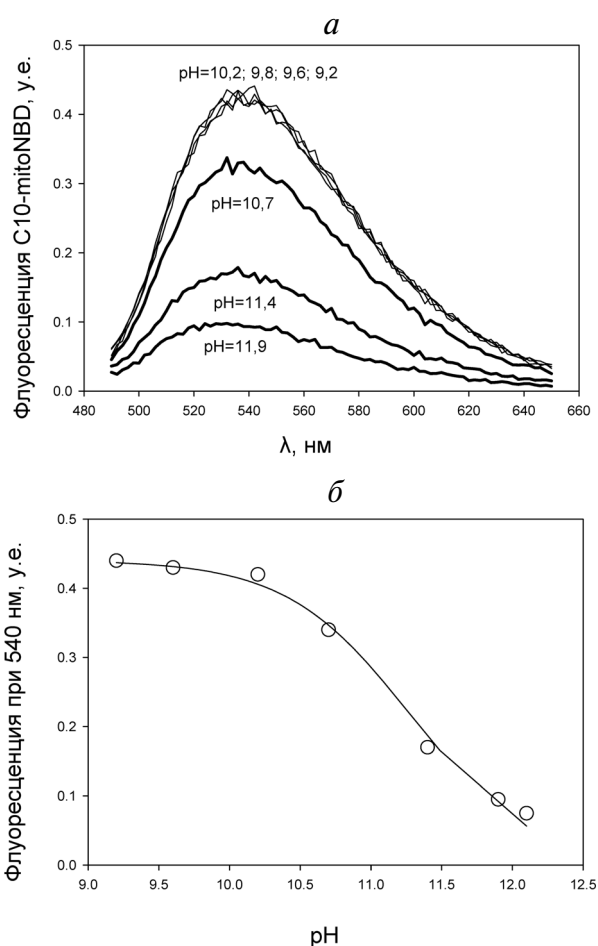


Рис. 2. а – Спектры испускания флуоресценции C10-mitoNBD в присутствии липосом из яичного лецитина при различных pH (возбуждение при 470 нм); б – pH-зависимость интенсивности флуоресценции при 540 нм и фиттирующая кривая для $pK_a = 11,3$. Буферный раствор содержал 10 мМ KCl, 10 мМ Tris, 10 мМ MES, 10 мМ β -аланин, 100 нМ C10-mitoNBD. Концентрация липида была 10 мкг/мл

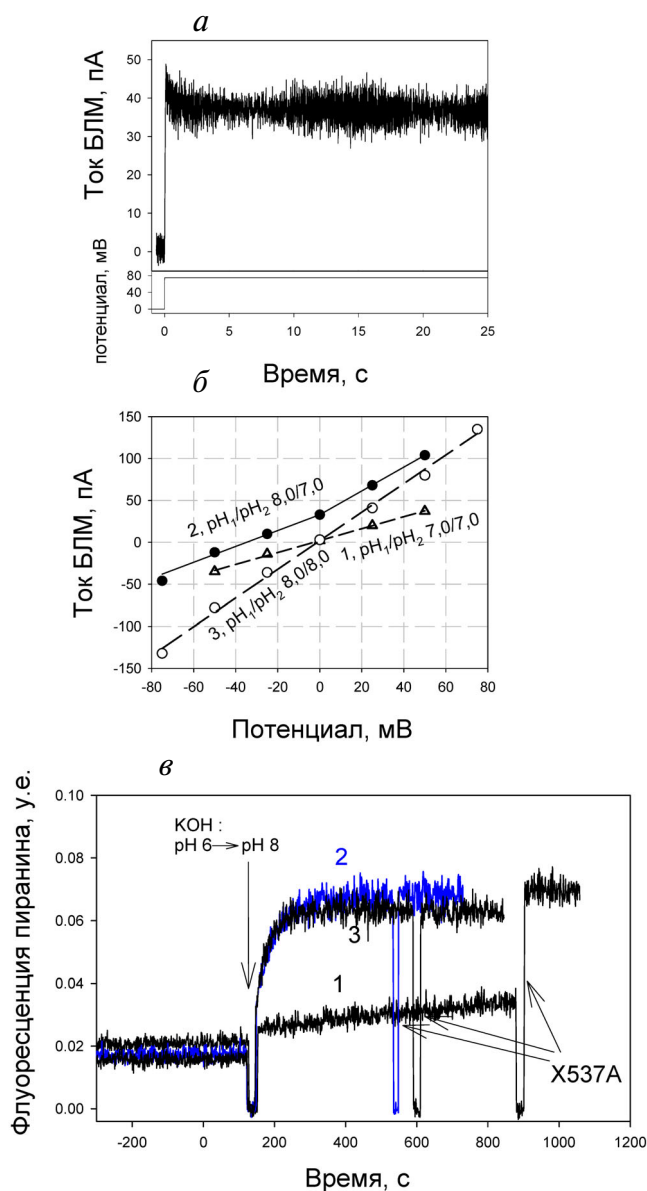


Рис. 3. *a* – Пример записи тока БЛМ в ответ на подачу потенциала 75 мВ в присутствии 4 мкМ C8-mitoNBD; *б* – зависимость стационарного тока БЛМ от приложенного потенциала в симметричных условиях измерения (рН 7, кривая 1; рН 8, кривая 3) и при наличии градиента рН на мембране (кривая 2, рН 8 с одной стороны и рН 7, с другой). БЛМ была сформирована из дифитанилфосфатидилхолина с добавлением 10%-ной пальмитиновой кислоты (% от веса липида). Буферный раствор содержал 100 мМ КСl, 10 мМ Tris, 10 мМ MES, 10 мМ β -аланин; *в* – индукция протонной проводимости липосом под действием C10-mitoNBD (кривая 3), C8-mitoNBD (кривая 2) и C5-mitoNBD (кривая 1, концентрация соединений была 200 нМ). Дана зависимость флуоресценции рН-зонда пиранина (возбуждение 455 нм, регистрация 505 нм), нагруженного в липосомы, от времени до и после добавления аликвоты КОН, которая сдвигает рН раствора от 6 до 8. В конце каждой пробы добавляли K^+/H^+ -обменник X537A для полного рассеивания градиента рН. $T = 15^\circ\text{C}$. (С цветными вариантами рис. 3, 4 и 6 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournal.ru/journal/biokhsm/>).

Нернста для градиента рН 1,0. Эти данные говорят о том, что C8-mitoNBD является слабым протонофором, однако его протонофорное действие заметно усиливается в присутствии жирных кислот. Ранее подобные свойства были описаны для SkQ1 [12].

Индукция протонной проницаемости на липосомах. Зависимость способности Cn-mitoNBD оказывать протонофорное действие в зависимости от длины углеводородного линкера была изучена на липосомах, нагруженных рН-чувствительным флуоресцентным красителем пиранином (рис. 3, *в*). В начале опыта рН в среде и в липосомах был равен 6, то есть градиент рН на мембране липосом отсутствовал. При рН 6 пиранин находится преимущественно в протонированной форме и флуоресцирует слабо. В момент времени, отмеченный стрелкой (~150 с), в раствор добавлялась аликвота КОН, так, чтобы рН раствора стал равным 8. При добавлении к суспензии липосом вещества, обладающего протонофорным действием, происходит повышение рН внутри липосом, что должно приводить к увеличению флуоресценции пиранина. Было показано, что C10-mitoNBD и C8-mitoNBD при концентрации 200 нМ вызывают выравнивание рН на липосомах за время около одной минуты (кривые 2 и 3 на рис. 3, *в*). Соединение C5-mitoNBD проявляло гораздо меньшую активность (кривая 1 на рис. 3, *в*). В конце опыта добавлялся ионофор X537A (K^+/H^+ -обменник), который быстро выравнивает рН с двух сторон мембраны. Контрольные опыты показали, что собственная флуоресценция производных NBD не вносила в наши измерения при использованных концентрациях. Кроме того, опыты на липосомах, а именно, отсутствие вытекания пиранина из липосом, показали, что изучаемые соединения не вызывают появления неспецифической проводимости мембраны. Таким образом, C10-mitoNBD и C8-mitoNBD обладали примерно одинаковой протонофорной активностью на липидных мембранах, тогда как активность C5-mitoNBD была намного меньше.

Накопление C10-mitoNBD, C8-mitoNBD и C5-mitoNBD в митохондриях. Производные NBD имеют яркую флуоресценцию, что позволяет достаточно просто исследовать их накопление в митохондриях в зависимости от энергизации, то есть в зависимости от наличия или отсутствия мембранного потенциала. В настоящей работе мы использовали метод ФКС, который ранее применялся нами для изучения накопления красителей TMRE [20] и сафранина O [30] в митохондриях. Метод ФКС основан на измерении флуоресценции от малого объема, составля-

ющего по порядку величины $\sim 10^{-15}$ литра. Аналитическим сигналом для идентификации связывания C10-mitoNBD являлось изменение амплитуды автокорреляционной функции ($G(\tau)$) флуоресценции производных NBD, регистрируемых в этом малом (конфокальном) объеме, аналогично тому, как это было исследовано для производных родамина 19 [24]. На рис. 4, а, кривая 1, представлены типичные записи $G(\tau)$ сигнала флуоресценции C10-mitoNBD, добавленного в суспензию митохондрий в отсутствие экзогенных субстратов дыхания (кривая 1), после добавления сукцината на фоне ротенона (кривая 2) и после добавления разобщителя КЦХФ (кривая 3). Видно, что в условиях энергизации митохондрий (кривая 2) амплитуда $G(\tau)$ существенно возрастает, что говорит о накоплении красителя в митохондриях, приводящем к резкому уменьшению в системе числа флуоресцирующих частиц. На рис. 4, б представлены значения амплитуды $G(\tau)$ для TMRE, C5-mitoNBD, C8-mitoNBD и C10-mitoNBD в зависимости от энергизации митохондрий. Эти данные говорят о способности всех изученных производных NBD накапливаться в митохондриях энергозависимым образом. Ранее нами было показано, что в случае алкиламино производного NBD, лишённого трифенилфосфониевого фрагмента, NBD-C10, энергизация митохондрий не влияет на его связывание с мембранами митохондрий [16].

Для измерения накопления C10-mitoNBD в митохондриях мы также воспользовались способностью C10-mitoNBD влиять на потенциал TPP^+ -селективного электрода, подобно самому тетрафенилфосфоню. На рис. 4, в дано сравнение записи потенциала на TPP^+ -электроде от времени для суспензии митохондрий при добавлении TPP^+ или C10-mitoNBD. Видно, что обе записи имеют одинаковые характерные черты, говорящие об энергозависимом накоплении внутри митохондрий обоих соединений. Так, добавление митохондрий приводит к падению концентрации катионов снаружи митохондрий вследствие образования $\Delta\psi$ за счет окисления эндогенных субстратов. Добавление ротенона приводит к выбросу катионов, поскольку ротенон подавляет комплекс I митохондрий, вызывая уменьшение $\Delta\psi$. Добавление субстрата комплекса II сукцината приводит к энергичному накоплению катионов. Последующее добавление разобщителя ДНФ, а также ингибитора комплекса III антимицина А вызывают выход катионов из митохондрий. Аналогичные данные были получены также для C5-mitoNBD и C8-mitoNBD (данные не приведены). Таким образом, все изученные катионные производные

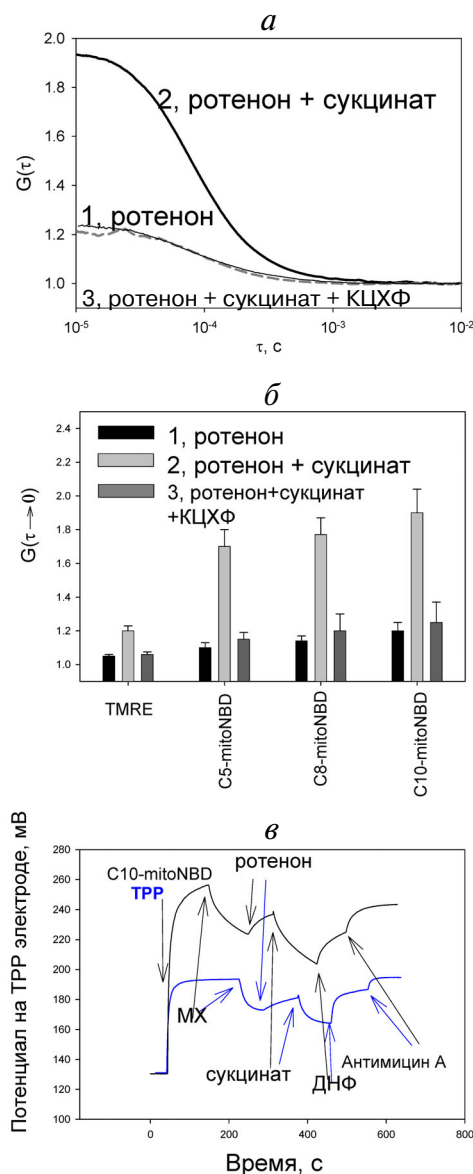


Рис. 4. а – Энергозависимое накопление C10-mitoNBD (100 нМ) в митохондриях печени крысы, измеренное методом флуоресцентной корреляционной спектроскопии (ФКС). Даны записи автокорреляционных функций ($G(\tau)$) флуоресценции C10-mitoNBD в присутствии суспензии митохондрий печени крысы и ротенона (5 мкМ, кривая 1), после добавления сукцината (5 мМ, кривая 2) и после добавления КЦХФ (1 мкМ, кривая 3); б – значения амплитуды $G(\tau)$ для TMRE, C5-mitoNBD, C8-mitoNBD и C10-mitoNBD в зависимости от энергизации митохондрий. Среда инкубации содержала 250 мМ сахарозы, 2 мМ MgCl_2 , 10 мМ KH_2PO_4 , 5 мМ MOPS-КОН, pH 7,4, 1 мМ EGTA, 1 мг/мл БСА. Концентрация митохондриального белка была 0,2 мг/мл. Точки данных представляют собой средние значения \pm стандартные отклонения, по меньшей мере, для трех экспериментов; в – энергозависимое накопление C10-mitoNBD в митохондриях печени крысы, измеренное TPP^+ -селективным электродом. Среда инкубации содержала 250 мМ сахарозы, 20 мМ MOPS, 0,2 мМ EGTA, 0,5 мг/мл БСА, pH 7,4. Добавки: 3 мкМ C10-mitoNBD или TPP^+ , митохондрии печени крысы (концентрация белка 1 мг/мл), 5 мкМ ротенона, 5 мМ сукцината, 40 мкМ ДНФ, 1 мкМ антимицина А. Т = 23°C

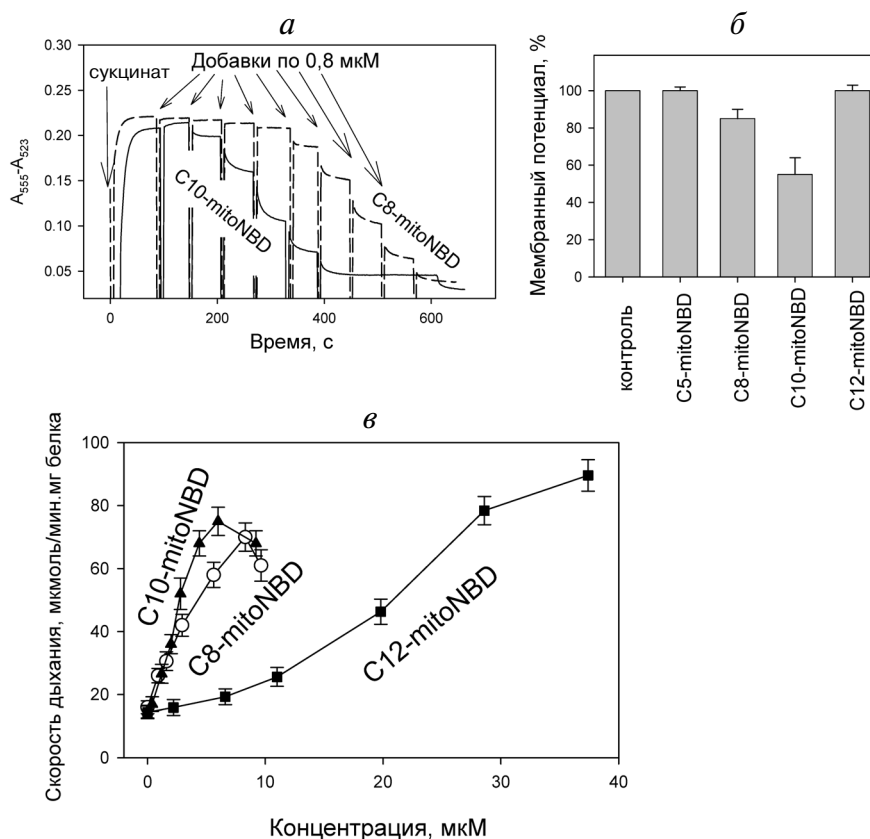


Рис. 5. а – Действие Cn-mitoNBD с $n = 8, 10$ на мембранный потенциал митохондрий печени крысы, измеренный по изменению поглощения сафранина O при 555 нм и 523 нм. Митохондрии энергизовали добавлением сукцината (5 мМ) в присутствии ротенона (5 мкМ); б – мембранный потенциал митохондрий в присутствии 4 мкМ Cn-mitoNBD (% по отношению к сигналу в контроле); в – зависимости скорости дыхания митохондрий печени крысы от концентрации C8-mitoNBD, C10-mitoNBD и C12-mitoNBD. Субстрат дыхания – сукцинат. Подробности см. Материалы и методы. Точки данных представляют собой средние значения \pm стандартные отклонения по меньшей мере для трех экспериментов

NBD накапливались в митохондриях энергозависимым образом.

Влияние Cn-mitoNBD на мембранный потенциал и скорость дыхания митохондрий. Мембранный потенциал энергизованных сукцинатом митохондрий измеряли с помощью потенциал-зависимого красителя сафранина O, спектр поглощения которого сдвигается вследствие образования его агрегатов при накоплении в митохондриях. При добавлении C10-mitoNBD наблюдалось изменение разности оптического поглощения сафранина O при двух выбранных длинах волн (555 нм и 523 нм), что говорит о том, что C10-mitoNBD снижает мембранный потенциал митохондрий в микромолярных концентрациях (рис. 5, а). На рис. 5, б представлены результаты опытов по влиянию одной и той же концентрации Cn-mitoNBD (4 мкМ) на мембранный потенциал митохондрий. Активность рассматриваемых соединений убывала в ряду: C10-mitoNBD > C8-mitoNBD > C12-mitoNBD \approx C5-mitoNBD (рис. 5, б), при этом C5-mitoNBD был практически неактивен. Контрольные опы-

ты показали, что поглощение исследованных производных NBD не вносило вклада в оптические измерения в условиях, выбранных на рис. 5.

Как известно, деполяризация митохондрий приводит к увеличению скорости дыхания за счет облегчения откачки протонов из митохондрий при снижении мембранного потенциала. На рис. 5, в представлены зависимости скорости дыхания митохондрий от концентрации ряда соединений Cn-mitoNBD. Как и в опытах по измерению мембранного потенциала митохондрий, наиболее сильным разобщающим действием обладало соединение C10-mitoNBD, хотя отличия от действия C8-mitoNBD были незначительные. Ряд активности совпадал с таковым, наблюдаемым при измерении мембранного потенциала.

Ранее было показано, что разобщающая способность алкиламино-производных NBD, таких как NBD-C8, на митохондриях подавляется 6-кетохолестанолом [16], подобно тому, как 6-кетохолестанол действовал на разобщающую активность ФКФ и КЦХФ [31]. Нами были проведены аналогичные опыты с C10-mitoNBD и C8-

mitoNBD по измерению мембранного потенциала митохондрий и оказалось, что 6-кетохолестанол не влиял на способность этих соединений сбрасывать мембранный потенциал (данные не приведены). Таким образом, присоединение алкилтрифенилфосфониевого катиона приводит к утрате чувствительности разобщающего действия алкиламино-производных NBD к 6-кетохолестанолу.

Внутриклеточная локализация C10-mitoNBD.

Конфокальная микроскопия культивируемых мезенхимальных стромальных клеток выявила полную колокализацию C10-mitoNBD с митохондриальным зондом TMRE, при этом окрашиваемые структуры морфологически полностью соответствовали вытянутым нитчатым митохондриям, характерным для данных клеток (рис. 6, а и б). Это говорит о том, что C10-mitoNBD накапливается практически исключительно в митохондриях, так как в других компартаментах клетки зелёная флуоресценция C10-mitoNBD не наблюдалась. Важно отметить, что в клетках с более высокой флуоресценцией C10-mitoNBD наблюдалась более низкая флуоресценция TMRE (рис. 6, в и г). Поскольку TMRE добавлялся после инкубации с C10-

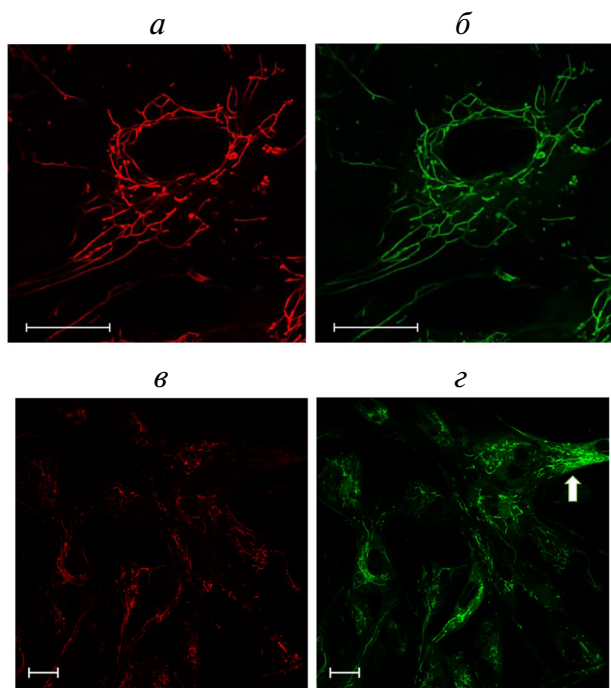


Рис. 6. Накопление C10-mitoNBD в митохондриях культивируемых стромальных клеток. Флуоресценция C10-mitoNBD (а) в значительной степени локализуется в митохондриях, что подтверждается колокализацией с митохондриальным красителем TMRE (б). Панели в и г иллюстрируют, что чем выше флуоресценция C10-mitoNBD в клетке, тем ниже накопление митохондриального потенциал-зависимого красителя TMRE. Конфокальная микроскопия. Масштаб 20 мкм

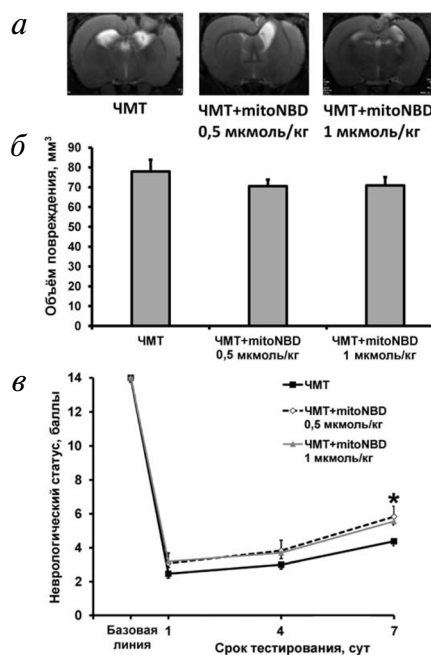


Рис. 7. Нейропротекторный эффект C10-mitoNBD при введении сразу после индукции травмы головного мозга у крыс. а – Репрезентативные T2-взвешенные МР-изображения были получены на 7-й день после травмы (толщина среза 0,8 мм). Области повышенного гиперинтенсивного сигнала соответствуют зоне повреждения/ишемии; б – объём повреждения оценивали с использованием магнитно-резонансной томографии с анализом изображений по T2-взвешенным МР-изображениям; в – неврологический статус оценивали с использованием теста «Постановка конечности на опору». * $p < 0,05$ по сравнению с группой «ЧМТ», критерий Манна–Уитни.

mitoNBD, обратная зависимость накопления TMRE от количества накопившегося C10-mitoNBD может быть признаком того, что C10-mitoNBD, накапливаясь в митохондриях, снижает их мембранный потенциал.

Нейропротекторные свойства C10-mitoNBD.

Известно, что разобщители дыхания и окислительного фосфорилирования могут иметь нейропротекторные свойства [32, 4, 33, 13]. С целью оценки нейропротекторных эффектов нами был выбран C10-mitoNBD, как вещество, обладающее наиболее выраженными разобщающими свойствами. Животным моделировали ЧМТ, с последующей интраназальной инстилляцией C10-mitoNBD в дозах 0,5 и 1 мкмоль/кг в течение 40 мин после индукции повреждения. Морфометрический анализ T2-взвешенных МР-изображений через 14 суток после моделирования ЧМТ показал, что в группе не получавших лечение животных объём повреждения в среднем составлял 78 ± 6 мм³, а у животных, получивших 0,5 или 1 мкмоль/кг C10-mitoNBD, отмечалась тенденция к снижению объёма повреждения головного мозга до $70 \pm 3,5$ мм³

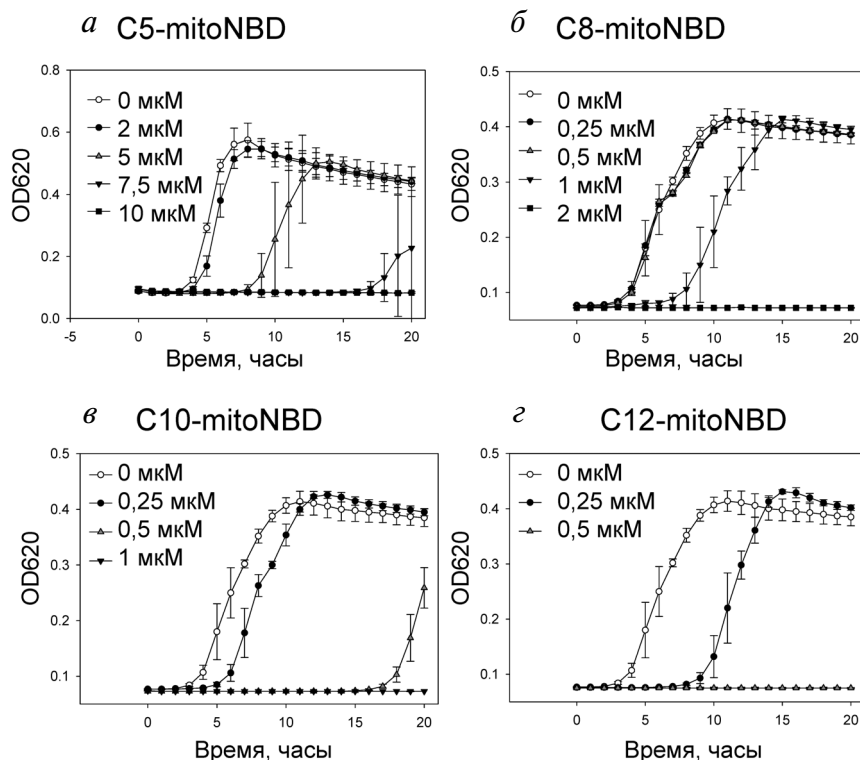


Рис. 8. Подавление роста бактерий *B. subtilis* под действием соединений Cn-mitoNBD. Производные NBD добавляли к бактериальной культуре (5×10^5 клеток в мл), помещенной в 96-луночные планшеты. Рост оценивали по ежечасно измеряемой во время инкубации оптической плотности при 620 нм с помощью планшетного спектрофотометра Multiskan FC («Thermo Fisher Scientific», США). Бактериям давали расти в течение 20 ч при 30°C. Точки данных представляют собой средние значения \pm стандартные отклонения по меньшей мере для трех экспериментов

(рис. 7, а, б). Оценка неврологического статуса в тесте «Постановка конечностей на опору» выявила ярко выраженные нарушения сенсомоторных функций в передних и задних конечностях крыс группы ЧМТ (рис. 7, в), тогда как до моделирования ЧМТ неврологический статус был равен 14 баллам, что свидетельствует об отсутствии сенсомоторных нарушений. В группе животных, получивших C10-mitoNBD, наблюдалось статистически значимое восстановление сенсомоторных функций на 7 сутки после индукции травмы (рис. 7, в). Известно, что ЧМТ вызывает дисфункцию не только головного мозга, но и приводит к системным эффектам на организм [34], поэтому одним из критериев тяжести ЧМТ может являться выживание животных в послеоперационном периоде, как интегративный показатель функционирования всех жизненно важных систем. Выживаемость животных оценивали в течение 7 суток после ЧМТ. В группе ЧМТ выживание составило 62%, тогда как в группах животных, получивших 0,5 или 1 мкмоль/кг C10-mitoNBD, — 74% и 85% ($p < 0,05$) соответственно.

Антимикробная активность производных NBD. Ранее было показано, что производные

алкилтрифенилфосфония обладают выраженной антибактериальной активностью, зависящей от длины алкильного хвоста [35, 36]. В настоящей работе нами было исследовано действие Cn-mitoNBD на рост грам-положительной бактерии *B. subtilis* при $n = 5, 8, 10$ и 12 (рис. 8). Оказалось, что все исследованные соединения подавляют рост бацилл в микромолярном диапазоне концентраций, при этом ингибирующие концентрации монотонно снижаются при удлинении углеводородного линкера. Так, в случае C8-mitoNBD полное подавление наблюдалось только при 2 мкм соединения, для C10-mitoNBD уже было достаточно 1 мкм, а для C12-mitoNBD — 0,5 мкм (рис. 8). Следует отметить, что наблюдаемые ингибирующие концентрации Cn-mitoNBD были примерно такими же, как для алкил-производных трифенилфосфония Cn-TPP, которые изучались ранее [35, 36].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Таким образом, на основании полученных данных можно утверждать, что C10-mitoNBD

накапливается в митохондриях и оказывает разобщающее действие в микромолярном диапазоне концентраций. Такие свойства позволяют рассматривать C10-mitoNBD как митохондриально-направленный разобщитель, обладающий способностью к транспорту протонов через липидные мембраны (протонофорное действие). Можно предположить, что, несмотря на высокое значение pK_a протонируемой группы ($pK_a = 11,3$, рис. 2), C10-mitoNBD способен депротонироваться в заметной степени при нейтральных pH, так что потока такой формы через мембраны достаточно для поддержания высокой скорости переноса протона через мембрану. С другой стороны, протонофорное действие C8-mitoNBD на БЛМ в большой степени усиливалось при добавлении жирной кислоты (рис. 2). Поскольку в природных мембранах, как правило, жирные кислоты присутствуют в достаточно большой концентрации, можно предположить, что разобщающее действие C10-mitoNBD связано с его способностью транспортировать анионы жирных кислот через липидные части мембран. Подобный механизм разобщающего действия был ранее предложен для других гидрофобных катионов [8, 12].

Наши исследования на плоской БЛМ показали также, что C10-mitoNBD дестабилизирует липидную мембрану, проявляя детергентно-подобное действие. Ранее было показано, что C12-TPP может индуцировать неспецифическую ионную проницаемость на внутренней мембране митохондрий в концентрациях ~ 10 мкМ [37]. Эти данные говорят о том, что действие высоких концентраций C10-mitoNBD на митохондрии или бактериях может также включать индукцию неспецифической проводимости на внутренней мембране митохондрий. Поскольку детергентное действие соединений обычно растет с ростом длины углеводородной цепочки, то сильное антибактериальное действие C12-mitoNBD можно отнести именно к этому механизму. При этом действие на митохондрии C12-mitoNBD было заметно слабее, по сравнению с C10-mitoNBD, на основании чего можно предположить, что в случае митохондрий основным эффектом mitoNBD была индукция именно протонной проводимости через липидную часть мембраны.

Известно, что разобщающие белки митохондрий (UCPs) обладают нейропротекторным действием [38–40]. Аналогичные эффекты были показаны для митохондриальных разобщителей, представляющих собой малые молекулы [4, 13, 33, 41–43]. В настоящей работе митохондриально-адресованный разобщитель C10-mitoNBD проявлял нейропротекторное действие, снижая

негативные последствия, вызванные ЧМТ, а именно: выраженность сенсомоторного дефицита и гибель животных. Однако следует отметить, что восстановление сенсомоторных функций было менее выражено по сравнению с ранее изученным нами митохондриально-адресованным разобщителем mitoFluo [13], что возможно связано с неоптимальной дозой C10-mitoNBD, и дальнейшая работа с другими дозами выявит более выраженное нейропротекторное действие C10-mitoNBD.

Сравнивая действие конъюгатов C10-TPP с NBD (C10-mitoNBD) и флуоресцеином (mitoFluo), можно заключить, что во всех исследованных системах mitoFluo действовал в более низких концентрациях. Это относится как к разобщающим концентрациям на митохондриях [5], так и к минимальным ингибирующим концентрациям на бациллах [44]. Кроме того, mitoFluo оказывал более выраженное нейропротекторное действие по сравнению с C10-mitoNBD [13]. Однако для некоторых приложений использование NBD-меченого C10-TPP может иметь свои преимущества перед флуоресцеиновым производным, поскольку NBD является существенно более фотостабильным флуорофором, по сравнению с флуоресцеином. Кроме того, NBD практически не обладает фотодинамическим действием, тогда как mitoFluo оказывал фотодинамический эффект на модели нейронов моллюсков [15]. Все это позволяет надеяться, что в будущем C10-mitoNBD также найдет свою нишу в ряду биохимических инструментов воздействия на клетки животных и бактерий, особенно в плане его способности накапливаться в митохондриях, придавать им свойства флуоресцировать и разобщать их в микромолярном диапазоне концентраций.

Финансирование. Синтез Cn-mitoNBD, измерение pK_a , изучение индукции протонной проницаемости на липосомах и плоских БЛМ, исследование влияния Cn-mitoNBD на мембранный потенциал и скорость дыхания митохондрий, изучение антимикробной активности производных NBD были осуществлены при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 16-14-10025). Измерение накопления Cn-mitoNBD в митохондриях было проведено при финансовой поддержке РФФ (грант 19-74-00015). Конфокальная микроскопия эукариотических клеток с C10-mitoNBD и изучение нейропротекторного действия C10-mitoNBD на модели фокальной ишемии головного мозга крысы были выполнены при поддержке Российского научного фонда (грант 19-14-00173).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических стандартов. Экспериментальные исследования с использованием лабораторных животных выполнены в соответствии с «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации», утвержденными приказом Министерства здравоохранения и социального развития № 708н от 23.08.2010, а также в соответствии с Международным соглашением о гуманном обращении с животными European

Community Council directives 2010/63/EU, и были одобрены комитетом по этике НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ.

Дополнительные материалы. Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) (<http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/>) и на сайте издательства Springer (<https://link.springer.com/journal/10541>), том 85, вып. 12, 2020.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Childress, E. S., Alexopoulos, S. J., Hoehn, K. L., and Santos, W. L. (2018) Small molecule mitochondrial uncouplers and their therapeutic potential, *J. Med. Chem.*, **61**, 4641-4655, doi: 10.1021/acs.jmedchem.7b01182.
- Gao, J.-L., Zhao, J., Zhu, H.-B., Peng, X., Zhu, J.-X., et al. (2018) Characterizations of mitochondrial uncoupling induced by chemical mitochondrial uncouplers in cardiomyocytes, *Free Radic. Biol. Med.*, **124**, 288-298, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.020.
- Desquiret, V., Loiseau, D., Jacques, C., Douay, O., Malthiery, Y., Ritz, P., and Roussel, D. (2006) Dinitrophenol-induced mitochondrial uncoupling *in vivo* triggers respiratory adaptation in HepG2 cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **1757**, 21-30, doi: 10.1016/j.bbabi.2005.11.005.
- Khailova, L. S., Silachev, D. N., Rokitskaya, T. I., Avetisyan, A. V., Lyamsaev, K. G., et al. (2014) A short-chain alkyl derivative of Rhodamine 19 acts as a mild uncoupler of mitochondria and a neuroprotector, *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **1837**, 1739-1747, doi: 10.1016/j.bbabi.2014.07.006.
- Denisov, S. S., Kotova, E. A., Plotnikov, E. Y., Tikhonov, A. A., Zorov, D. B., Korshunova, G. A., and Antonenko, Y. N. (2014) A mitochondria-targeted protonophoric uncoupler derived from fluorescein, *Chem. Commun.*, **50**, 15366-15369, doi: 10.1039/c4cc04996a.
- Biasutto, L., Sassi, N., Mattarei, A., Marotta, E., Cattelan, P., et al. (2010) Impact of mitochondriotropic quercetin derivatives on mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta*, **1797**, 189-196, doi: 10.1016/j.bbabi.2009.10.001.
- Wang, J., He, H., Xiang, C., Fan, X. Y., Yang, L. Y., Yuan, L., Jiang, F. L., and Liu, Y. (2018) Uncoupling effect of F16 is responsible for its mitochondrial toxicity and anticancer activity, *Toxicol. Sci.*, **161**, 431-442, doi: 10.1093/toxsci/kfx218.
- Rokitskaya, T. I., Terekhova, N. V., Khailova, L. S., Kotova, E. A., Plotnikov, E. Y., Zorov, D. B., Tatarinov, D. A., and Antonenko, Y. N. (2019) Zwitterionic protonophore derived from 2-(2-hydroxyaryl)alkenylphosphonium as an uncoupler of oxidative phosphorylation, *Bioconjug. Chem.*, **30**, 2435-2443, doi: 10.1021/acs.bioconjchem.9b00516.
- Schwaller, M. A., Allard, B., Lescot E., and Moreau, F. (1995) Protonophoric activity of ellipticine and isomers across the energy-transducing membrane of mitochondria, *J. Biol. Chem.*, **270**, 22709-22713, doi: 10.1074/jbc.270.39.22709.
- Nagamune, H., Fukushima, Y., Takada, J., Yoshida, K., Unami, A., Shimooka, T., and Terada, H. (1993) The lipophilic weak base (Z)-5-methyl-2-[2-(1-naphthyl)ethenyl]-4-piperidinopyridine (AU-1421) is a potent protonophore type cationic uncoupler of oxidative phosphorylation in mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta*, **1141**, 231-237, doi: 10.1016/0005-2728(93)90047-j.
- Ross, M. F., Kelso, G. F., Blaikie, F. H., James, A. M., Cochemé, H. M., et al. (2005) Lipophilic triphenylphosphonium cations as tools in mitochondrial bioenergetics and free radical biology, *Biochemistry (Moscow)*, **70**, 222-230, doi: 10.1007/s10541-005-0104-5.
- Severin, F. F., Severina, I. I., Antonenko, Y. N., Rokitskaya, T. I., Cherepanov, D. A., et al. (2010) Penetrating cation/fatty acid anion pair as a mitochondria-targeted protonophore, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 663-668, doi: 10.1073/pnas.0910216107.
- Antonenko, Y. N., Denisov, S. S., Silachev, D. N., Khailova, L. S., Jankauskas, S. S., et al. (2016) A long-linker conjugate of fluorescein and triphenylphosphonium as mitochondria-targeted uncoupler and fluorescent neuro- and nephroprotector, *Biochim. Biophys. Acta*, **1860**, 2463-2473, doi: 10.1016/j.bbagen.2016.07.014.
- Martynov, V. I., Pakhomov, A. A., Popova, N. V., Deev, I. E., and Petrenko, A. G. (2016) Synthetic fluorophores for visualizing biomolecules in living systems, *Acta Naturae*, **8**, 37-51, doi: 10.32607/20758251-2016-8-4-33-46.
- Popova, L. B., Kamysheva, A. L., Rokitskaya, T. I., Korshunova, G. A., Kirsanov, R. S., Kotova, E. A., and Antonenko, Yu. N. (2019) Protonophoric and photodynamic effects of fluorescein decyl(triphenyl)phosphonium ester on the electrical activity of pond snail neurons, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 1151-1165, doi: 10.1134/S0006297919100043.
- Denisov, S. S., Kotova, E. A., Khailova, L. S., Korshunova, G. A., and Antonenko, Y. N. (2014) Tuning the hydrophobicity overcomes unfavorable deprotonation making octylamino-substituted 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole (n-octylamino-NBD) a protonophore and uncoupler of oxidative phosphorylation in mitochondria, *Bioelectro-chemistry*, **98**, 30-38, doi: 10.1016/j.bioelechem.2014.02.002.
- Mueller, P., Rudin, D. O., Tien, H. T., and Wescott, W. C. (1963) Methods for the formation of single bimolecular lipid membranes in aqueous solution, *J. Phys. Chem.*, **67**, 534-535, doi: 10.1021/j100796a529.
- Johnson, D., and Lardy, H. (1967) Isolation of liver or kidney mitochondria, *Methods Enzymol.*, **10**, 94-96, doi: 10.1016/0076-6879(67)10018-9.
- Akerman, K. E., and Wikstrom, M. K. (1976) Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential, *FEBS Lett.*, **68**, 191-197, doi: 10.1016/0014-5793(76)80434-6.

20. Perevoshchikova, I. V., Zorov, D. B., and Antonenko, Y. N. (2008) Peak intensity analysis as a method for estimation of fluorescent probe binding to artificial and natural nanoparticles: tetramethylrhodamine uptake by isolated mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta*, **1778**, 2182-2190, doi: 10.1016/j.bbamem.2008.04.008.
21. Perevoshchikova, I. V., Kotova, E. A., and Antonenko, Yu. N. (2011) Fluorescence correlation spectroscopy in biology, chemistry, and medicine, *Biochemistry (Moscow)*, **76**, 497-516, doi: 10.1134/S0006297911050014.
22. Krichevsky, O., and Bonnet, G. (2002) Fluorescence correlation spectroscopy: the technique and its applications, *Rep. Prog. Phys.*, **65**, 251-297, doi: 10.1088/0034-4885/65/2/203.
23. Hess, S. T., Huang, S., Heikal, A. A., and Webb, W. W. (2002) Biological and chemical applications of fluorescence correlation spectroscopy: a review, *Biochemistry*, **41**, 697-705, doi: 10.1021/bi0118512.
24. Antonenko, Y. N., Perevoshchikova, I. V., Rokitskaya, T. I., Simonyan, R. A., Tashlitsky, V. V., and Skulachev, V. P. (2012) Effect of liposomes on energy-dependent uptake of the antioxidant SkQR1 by isolated mitochondria, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **44**, 453-460, doi: 10.1007/s10863-012-9449-9.
25. Firsov, A. M., Kotova, E. A., Korepanova, E. A., Osipov, A. N., and Antonenko, Y. N. (2015) Peroxidative permeabilization of liposomes induced by cytochrome *c*/cardiolipin complex, *Biochim. Biophys. Acta*, **1848**, 767-774, doi: 10.1016/j.bbamem.2014.11.027.
26. CLSI, methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, Approved Standard, 9th ed., CLSI document M07-A9; https://clsi.org/media/1928/m07ed11_sample.pdf.
27. Feeney, D. M., Boyeson, M. G., Linn, R. T., Murray, H. M., and Dail, W. G. (1981) Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat, *Brain Res.*, **211**, 67-77, doi: 10.1016/0006-8993(81)90067-6.
28. Silachev, D. N., Plotnikov, E. Y., Babenko, V. A., Danilina, T. I., Zorova, L. D., Pevzner, I. B., Zorov, D. B., and Sukhikh, G. T. (2015) Intra-arterial administration of multipotent mesenchymal stromal cells promotes functional recovery of the brain after traumatic brain injury, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **159**, 528-533, doi: 10.1007/s10517-015-3009-3.
29. De Ryck, M., Van Reempts, J., Borgers, M., Wauquier, A., and Janssen, P. A. (1989) Photochemical stroke model: flunarizine prevents sensorimotor deficits after neocortical infarcts in rats, *Stroke*, **20**, 1383-1390, doi: 10.1161/01.str.20.10.1383.
30. Perevoshchikova, I. V., Sorochkina, A. I., Zorov, D. B., and Antonenko, Y. N. (2009) Safranin O as a fluorescent probe for mitochondrial membrane potential studied on a single particle level and in suspension, *Biochemistry (Moscow)*, **74**, 663-671, doi: 10.1134/s000629790906011x.
31. Starkov, A. A., Dedukhova, V. I., and Skulachev, V. P. (1994) 6-Ketocholestanol abolishes the effect of the most potent uncouplers of oxidative phosphorylation in mitochondria, *FEBS Lett.*, **355**, 305-308, doi: 10.1016/0014-5793(94)01211-3.
32. Plotnikov, E. Yu., Silachev, D. N., Yankauskas, S. S., Rokitskaya, T. I., Chupyrkina, A. A., et al. (2012) Mild uncoupling of respiration and oxidative phosphorylation as a mechanism providing nephron- and neuroprotective effects of penetrating cations of the SkQ family, *Biochemistry (Moscow)*, **77**, 1029-1037, doi: 10.1134/S0006297912090106.
33. Silachev, D. N., Khailova, L. S., Babenko, V. A., Gulyaev, M. V., Kovalchuk, S. I., et al. (2014) Neuroprotective effect of glutamate-substituted analog of gramicidin A is mediated by the uncoupling of mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, **1840**, 3434-3442, doi: 10.1016/j.bbagen.2014.09.002.
34. Lim, H. B., and Smith, M. (2007) Systemic complications after head injury: a clinical review, *Anaesthesia*, **62**, 474-482, doi: 10.1111/j.1365-2044.2007.04998.x.
35. Khailova, L. S., Nazarov, P. A., Sumbatyan, N. V., Korshunova, G. A., Rokitskaya, T. I., et al. (2015) Uncoupling and toxic action of alkyltriphenylphosphonium cations on mitochondria and the bacterium *Bacillus subtilis* as a function of alkyl chain length, *Biochemistry (Moscow)*, **80**, 1589-1597, doi: 10.1134/S000629791512007X.
36. Nazarov, P. A., Osterman, I. A., Tokarchuk, A. V., Karakozova, M. V., Korshunova, G. A., et al. (2017) Mitochondria-targeted antioxidants as highly effective antibiotics, *Sci. Rep.*, **7**, 1394, doi: 10.1038/s41598-017-00802-8.
37. Belosludtsev, K. N., Tenkov, K. S., Vedernikov, A. A., Belosludtseva, N. V., and Dubinin, M. V. (2019) Dodecyltriphenylphosphonium as an inducer of potassium-dependent permeability of rat liver mitochondria, *Biochemistry (Moscow) Suppl. A Membr. Cell Biol.*, **13**, 310-318, doi: 10.1134/S1990747819040044.
38. Mattiasson, G., Shamloo, M., Gido, G., Mathi, K., Tomasevic, G., et al. (2003) Uncoupling protein-2 prevents neuronal death and diminishes brain dysfunction after stroke and brain trauma, *Nat. Med.*, **9**, 1062-1068, doi: 10.1038/nm903.
39. Andrews, Z. B., Diano, S., and Horvath, T. L. (2005) Mitochondrial uncoupling proteins in the CNS: in support of function and survival, *Nat. Rev. Neurosci.*, **6**, 829-840, doi: 10.1038/nrn1767.
40. Normoyle, K. P., Kim, M., Farahvar, A., Llano, D., Jackson, K., and Wang, H. (2015) The emerging neuroprotective role of mitochondrial uncoupling protein-2 in traumatic brain injury, *Transl. Neurosci.*, **6**, 179-186, doi: 10.1515/tnsci-2015-0019.
41. Pandya, J. D., Pauly, J. R., Nukala, V. N., Sebastian, A. H., Day, K. M., et al. (2007) Post-injury administration of mitochondrial uncouplers increases tissue sparing and improves behavioral outcome following traumatic brain injury in rodents, *J. Neurotrauma*, **24**, 798-811, doi: 10.1089/neu.2006.3673.
42. Geisler, J. G., Marosi, K., Halpern, J., and Mattson, M. P. (2017) DNP, Mitochondrial uncoupling and neuroprotection: a little dab'll do ya, *Alzheimers Dement.*, **13**, 582-591, doi: 10.1016/j.jalz.2016.08.001.
43. Geisler, J. G. (2019) 2,4 Dinitrophenol as medicine, *Cells*, **8**, 280, doi: 10.3390/cells8030280.
44. Nazarov, P. A., Kirsanov, R. S., Denisov, S. S., Khailova, L. S., Karakozova, M. V., et al. (2020) Fluorescein derivatives as antibacterial agents acting via membrane depolarization, *Biomolecules*, **10**, 309, doi: 10.3390/biom10020309.

**LINKING 7-NITROBENZ-2-OXA-1,3-DIAZOLE (NBD)
TO TRIPHENYLPHOSPHONIUM YIELDS MITOCHONDRIA-TARGETED
PROTONOPHORE AND ANTIBACTERIAL AGENT**

**I. R. Iaubasarova^{1,2}, L. S. Khailova¹, P. A. Nazarov¹, T. I. Rokitskaya¹, D. N. Silachev¹,
T. I. Danilina¹, E. Y. Plotnikov¹, S. S. Denisov^{1,3}, R. S. Kirsanov¹, G. A. Korshunova¹,
E. A. Kotova¹, D. B. Zorov¹, and Y. N. Antonenko^{1*}**

¹ *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
119991 Moscow, Russia; E-mail: antonen@belozersky.msu.ru*

² *Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia*

³ *Department of Biochemistry, University of Maastricht, Cardiovascular Research Institute Maastricht,
Universiteitssingel 50, 6229 ER, Maastricht, The Netherlands*

Received June 7, 2020

Revised July 22, 2020

Accepted July 25, 2020

Appending lipophilic cations to small molecules has been widely used to produce mitochondria-targeted compounds with specific activities. In this work, we obtained a series of derivatives of the well-known fluorescent dye 7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD). According to the previous data [Denisov et al. (2014) *Bioelectrochemistry*, **98**, 30-38], alkyl derivatives of NBD can uncouple isolated mitochondria at concentration of tens of micromoles despite a high pK_a value (~11) of the dissociating group. Here, a number of triphenylphosphonium (TPP) derivatives linked to NBD via hydrocarbon spacers of varying length (C5, C8, C10, and C12) were synthesized (mitoNBD analogues), which accumulated in the mitochondria in an energy-dependent manner. NBD-C10-TPP (C10-mitoNBD) acted as a protonophore in artificial lipid membranes (liposomes) and uncoupled isolated mitochondria at micromolar concentrations, while the derivative with a shorter linker (NBD-C5-TPP, or C5-mitoNBD) exhibited no such activities. In accordance with this data, C10-mitoNBD was significantly more efficient than C5-mitoNBD in suppressing the growth of *Bacillus subtilis*. C10-mitoNBD and C12-mitoNBD demonstrated the highest antibacterial activity among the investigated analogues. C10-mitoNBD also exhibited the neuroprotective effect in the rat model of traumatic brain injury.

Keywords: mitochondria, uncoupler, protonophore, membrane potential, respiration, oxidative phosphorylation