

УДК 577.24

АНТИБИОТИК ПИРРОЛОМИЦИН ЯВЛЯЕТСЯ ЭФФЕКТИВНЫМ РАЗОБЩИТЕЛЕМ МИТОХОНДРИЙ

© 2022 А.М. Фирсов, Л.С. Хайлова, Т.И. Рокицкая,
Е.А. Котова, Ю.Н. Антоненко*

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

Поступила в редакцию 14.04.2022

После доработки 08.06.2022

Принята к публикации 08.06.2022

Пирроломицины С (Pyr_C) и D (Pyr_D) – антибиотики, продуцируемые *Actinosporangium* и *Streptomyces*, механизмом антимикробного действия которых является деполяризация мембраны бактерий и подавление их биоэнергетики через разобщение окислительного фосфорилирования. В основе данного явления лежит протонотворная активность пирроломицинов [Valderrama et al. (2019) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **63**, e01450-19]. В настоящей работе исследовано действие пирроломицинов на выделенные митохондрии печени крысы. Оказалось, что Pyr_C обладает большей активностью, чем Pyr_D, и разобщает митохондрии в субмикромольном диапазоне концентраций, что проявляется в деполяризации мембраны митохондрий и стимуляции их дыхания. В случае препаратов митохондрий с нарушенной целостностью внешней мембраны различия в действии этих антибиотиков существенно уменьшаются. В случае «вывернутых» субмитохондриальных частиц (СМЧ) более активным разобщителем, напротив, является Pyr_D, при этом СМЧ разобщаются уже при наномольных концентрациях антибиотика. Протонотворное действие Pyr_D на плоской бислойной липидной мембране (БЛМ) имеет максимум при рН около 9, что близко к pK_a этого соединения. Pyr_D работает как типичный анионный протонотвор, активность которого снижается при добавлении дипольного модификатора флоретина. Такое же соотношение протонотворной активности Pyr_D и Pyr_C получено нами на липосомах, нагруженных рН-индикатором пиранином. Высказано предположение о том, что различие между протонотворным действием этих антибиотиков на митохондриях и на БЛМ можно отнести за счёт большей способности Pyr_C проникать через внешнюю мембрану митохондрий.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: пирроломицин, митохондрии, разобщитель, протонотвор, дыхание, мембранный потенциал.

DOI: 10.31857/S032097252207003X, **EDN:** AVMAKK

ВВЕДЕНИЕ

Пирроломицины – антибиотики, продуцируемые актиномицетами и стрептомицетами [1–3]. Как следует из их названия, эти соединения содержат в своей структуре пиррольную группу. Пирроломицины С (Pyr_C) и D (Pyr_D), представляющие собой пиррол,

соединённый через карбонильную группу с бензольным кольцом, различаются только количеством атомов хлора в обоих кольцах: в Pyr_C их четыре, а в Pyr_D – пять [4] (рис. 1). Pyr_C более активен против грамположительных бактерий по сравнению с Pyr_D. В основе антибактериального действия этих соединений лежит их протонотворная активность, которая была показана на искусственных липидных бислоях [5], где оба соединения оказались более активными, чем очень сильный классический разобщитель окислительного фосфорилирования митохондрий, карбонилцианид-*m*-хлорфенилгидразон (КЦХФ), причём Pyr_D на бислойной липидной мембране (БЛМ) был заметно

Принятые сокращения: БЛМ – бислойная липидная мембрана; КЦХФ – карбонилцианид-*m*-хлорфенилгидразон; СМЧ – субмитохондриальные частицы; АСМА – 9-амино-6-хлор-2-метоксиакридин; DNP – 2,4-динитрофенол; Pyr_C – пирроломицин С; Pyr_D – пирроломицин D.

* Адресат для корреспонденции.

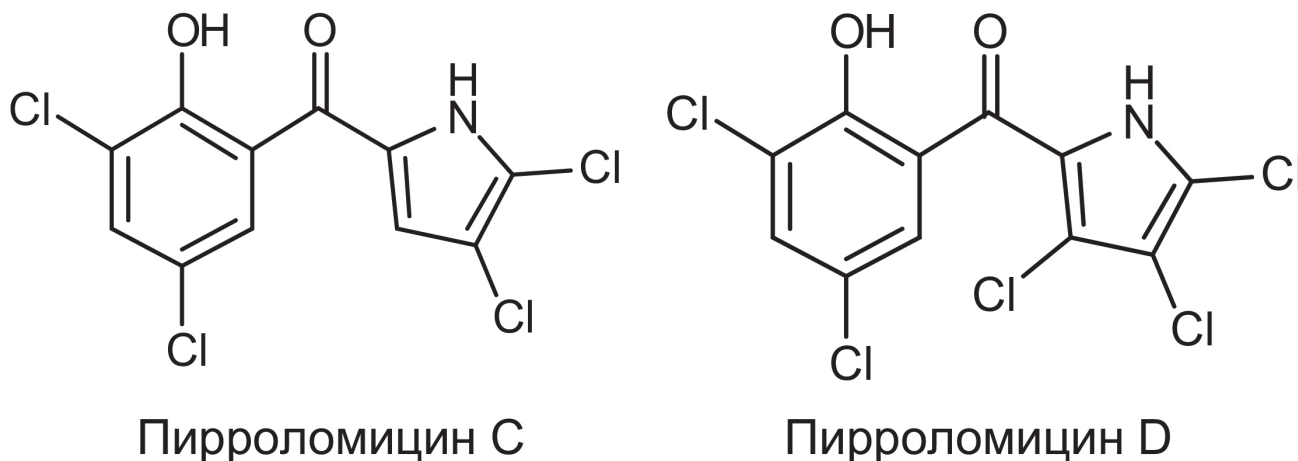


Рис. 1. Химическая структура P_{yr}_C и P_{yr}_D

сильнее, чем P_{yr}_C. Целью настоящей работы было сравнение разобщающего действия P_{yr}_C и P_{yr}_D на препаратах выделенных митохондрий. В ходе подробного исследования действия P_{yr}_C и P_{yr}_D на выделенных митохондриях печени крысы мы показали, что P_{yr}_C вызывает их разобщение в субмикромольном диапазоне концентраций. Причём, как и в случае бактерий, действие P_{yr}_C на митохондрии, а именно: деполяризация мембраны и стимуляция дыхания митохондрий, проявляется при более низких концентрациях по сравнению с P_{yr}_D. Было показано также, что действие пирроломицинов на препаратах митохондрий, частично лишённых внешней мембраны, существенно усиливается, причём усиление более ярко выражено в случае P_{yr}_D. Высказано предположение о том, что эффективность действия пирроломицинов на митохондрии во многом определяется их проницаемостью через внешнюю митохондриальную мембрану.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовались реагенты фирмы «Sigma-Aldrich» США, если не указано особо. Пирроломицины С (P_{yr}_C) и D (P_{yr}_D) были любезно предоставлены Рубеном Харткоопом из университета Лилля, Франция.

Митохондрии из печени крыс получали, как описано ранее [6]. Полученные митохондрии суспендировали в среде, содержащей 250 мМ сахарозы, 5 мМ MOPS (pH 7,4) и 1 мМ EGTA. Концентрацию белка измеряли биуретовым методом, используя БСА в качестве стандарта.

Дыхание митохондрий измеряли при 25 °С полярографическим методом: по уменьшению концентрации кислорода в среде инкубации

при помощи кислородного электрода Кларка («Strathkelvin Instruments», Великобритания) с использованием системного программного обеспечения 782. Среда инкубации содержала 250 мМ сахарозы, 5 мМ MOPS (pH 7,4) и 1 мМ EGTA. Концентрация митохондриального белка составляла 0,4 мг/мл.

Митопласты (препараты митохондрий, частично лишённых внешней мембраны) получали в процессе инкубирования митохондрий печени крысы в течение 10 мин в буфере, содержащем 10 мМ MOPS, 1 мМ EDTA, 10 мМ Tris-HCl (pH 7,4) с добавлением 25 мМ KCl. После инкубирования суспензию центрифугировали при 4200 g в течение 5 мин, удаляли супернатант, а осадок суспендировали в вышеописанном буфере, содержащем сахарозу.

Мембранный потенциал митохондрий и митопластов измеряли, используя в качестве индикатора сафранин О [7]. Среда измерения содержала 250 мМ сахарозы, 5 мМ MOPS (pH 7,4), 1 мМ EGTA, 5 мМ сукцинат, 2 мкМ ротенон, олигомицин (2 мкг/мг белка) и 15 мкМ сафранин О. Концентрация белка митохондрий и митопластов составляла 0,6–0,7 мг/мл. Мембранный потенциал измеряли по разности оптического поглощения при длинах волн 555 и 523 нм на спектрофотометре Aminco DW-2000 (Aminco, США) в двуволновом режиме.

Мембранный потенциал субмитохондриальных частиц сердца быка. Субмитохондриальные частицы (СМЧ), выделенные из сердца быка по методу, описанному в работе Grivennikova et al. [8], были любезно предоставлены Гривенниковой В.Г. (кафедра биохимии биологического факультета МГУ). Измерения градиента рН в ответ на добавление NADH регистрировали по изменению флуоресценции 9-амино-6-хлор-2-метоксиакридина (АСМА)

с помощью спектрофлуориметра Панорама Флюорат-02 («Люмэкс», Россия) при длине волны возбуждения 410 нм и эмиссии – 480 нм, как описано в работе Deleage et al. [9]. Среда инкубации содержала 10 мМ HEPES (pH 7,4), 100 мМ KCl, 5 мМ MgCl₂ и 0,5 мкг/мл АСМА.

Проницаемость плоских бислоевых фосфолипидных мембран для ионов водорода измеряли в тefлоновой ячейке с двумя отсеками, разделёнными тefлоновой перегородкой с отверстием 0,6 мм в диаметре, на котором формировали мембрану из фосфолипида дифита-

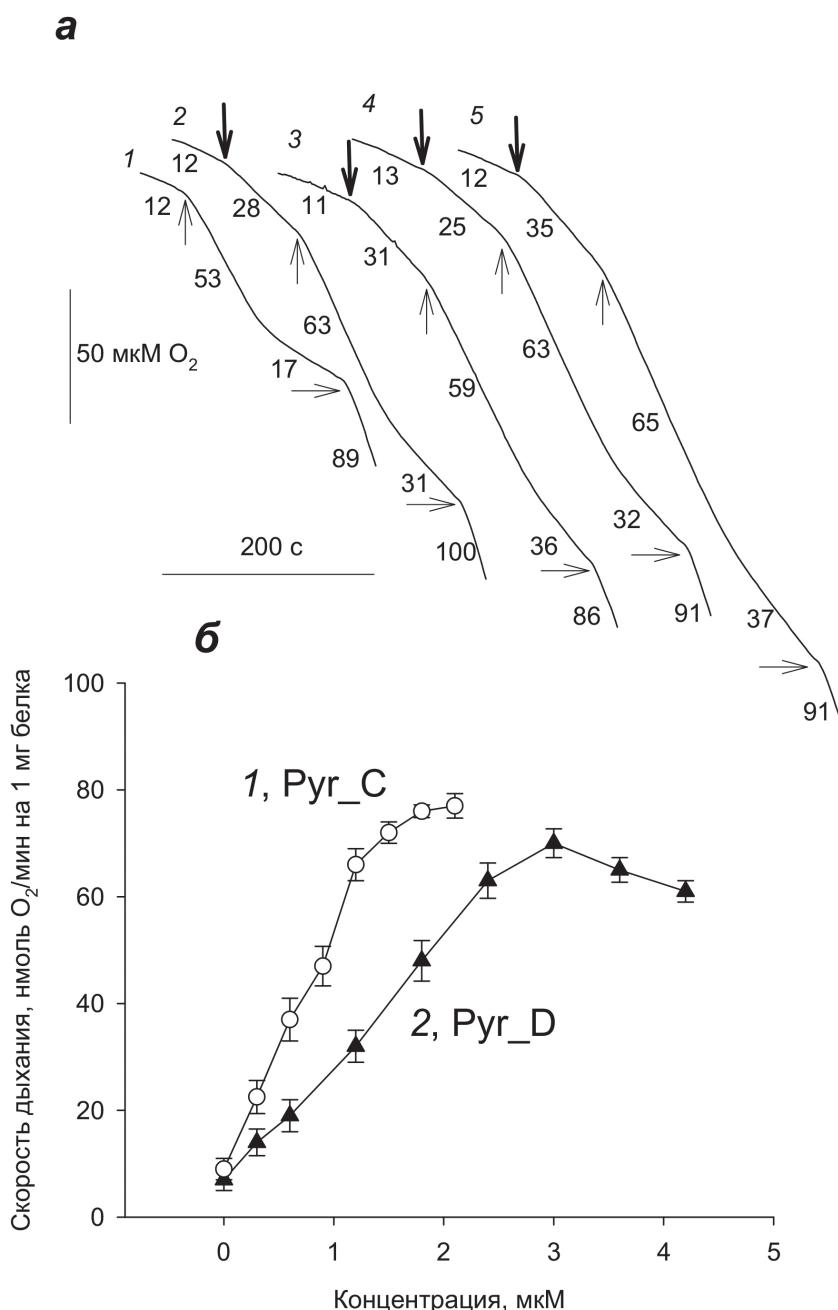


Рис. 2. Действие пирроломидинов С (Pyr_C) и D (Pyr_D) на дыхание выделенных митохондрий. *а* – Действие Pyr_C и Pyr_D (стрелки вниз) на скорость дыхания выделенных митохондрий печени крыс до добавки ADP (стрелки вверх), после добавки 100 мкМ ADP и после истощения ADP в реакционной среде. Субстратом дыхания был сукцинат (5 мМ). Цифрами на кривых даны скорости дыхания в различных состояниях (нмоль O₂/мин на 1 мг митохондриального белка). Концентрация Pyr_C была 1,2 мкМ (кривая 2) и 2 мкМ (кривая 3). Концентрация Pyr_D была 2 мкМ (кривая 4) и 3 мкМ (кривая 5). Кривая 1 – контроль без добавления пирроломидина. В конце каждой записи добавляли 40 мкМ DNP (стрелки вправо) для достижения максимального дыхания. В среде измерения присутствовал БСА (0,5 мг/мл). *б* – Зависимости скорости дыхания митохондрий от концентрации Pyr_C (кривая 1) и Pyr_D (кривая 2) в отсутствие БСА. Подробности см. в разделе «Материалы и методы». Точки данных представляют собой средние значения ± стандартные отклонения по меньшей мере для трёх независимых экспериментов

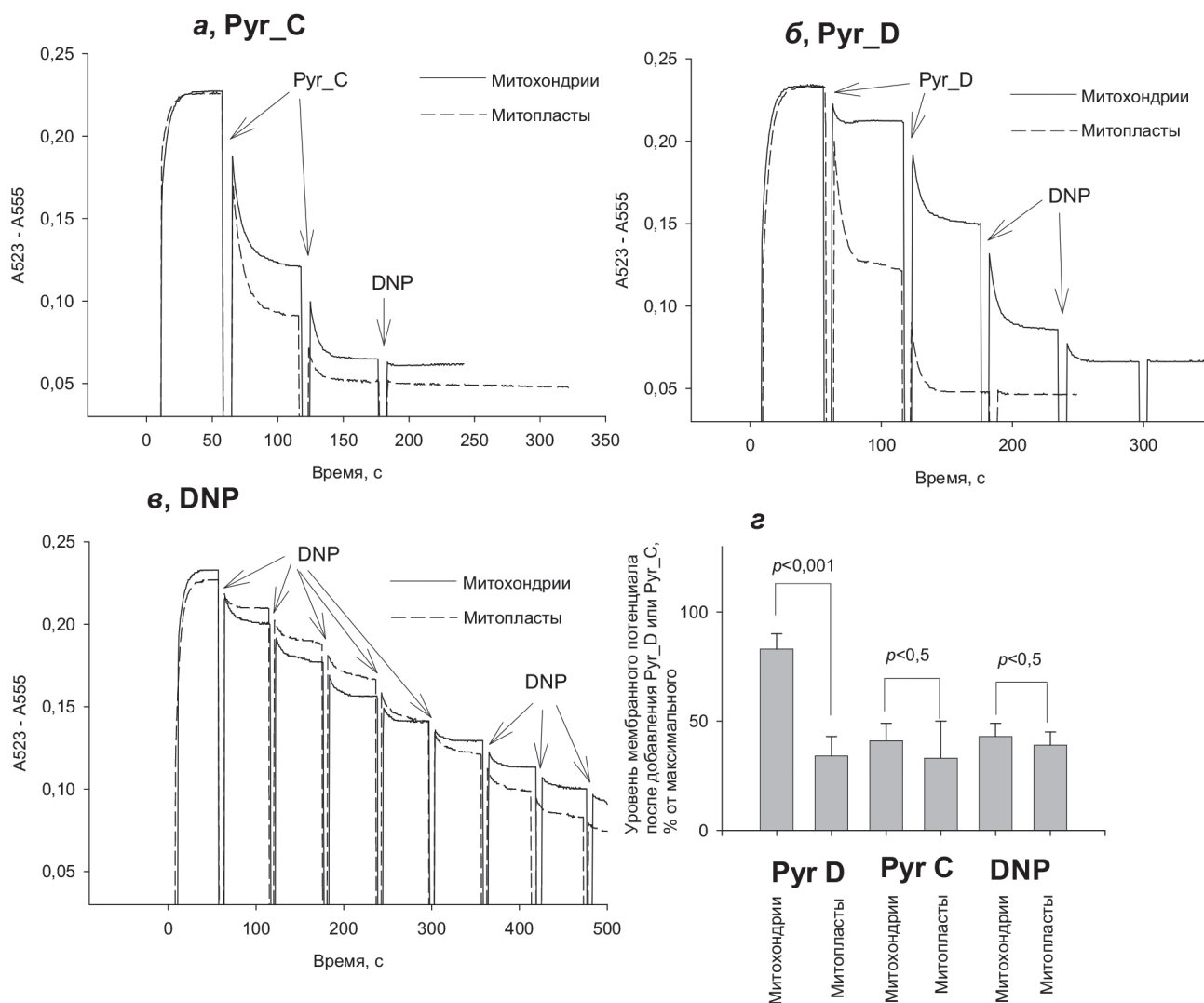


Рис. 3. Действие пирроломидина С (Pyr_C, две добавки по 0,3 мкМ, панель а) и пирроломидина D (Pyr_D, две добавки по 0,3 мкМ, панель б) и DNP (5 добавок по 10 мкМ и 3 добавки по 20 мкМ, панель в) на мембранный потенциал митохондрий (сплошные кривые) и препаратов митохондрий, частично лишённых внешней мембраны (митопласты, пунктирные кривые), измеренный по изменению разности поглощения сафранина О при 555 и 523 нм. Митохондрии энергизовали добавлением сукцината (5 мМ) в присутствии ротенона (5 мкМ) и олигомицина. з – Статистическая обработка значений мембранного потенциала митохондрий и митопластов в присутствии 0,3 мкМ Pyr_C и Pyr_D, а также 50 мкМ DNP (% по отношению к сигналу в контроле). Подробности см. в разделе «Материалы и методы». Точки данных представляют собой средние значения \pm стандартные отклонения по меньшей мере для трёх независимых экспериментов

ноилфосфатидилхолина («Avanti Polar Lipids», США) в концентрации 20 мг на мл декана. Измерения тока через мембрану осуществляли двумя AgCl-электродами, погружёнными в ячейку по обе стороны мембраны, используя усилитель OES-2 («Opus», Россия).

Проницаемость мембран липосом для ионов водорода измеряли с помощью рН-чувствительного красителя пиранина, как описано в работе Denisov et al. [10] по несколько модифицированной методике [11]. Липосомы готовили из диолеилфосфатидилхолина (DOPC), диолеилфосфатидилглицерина (DOPG) и холестерина в

пропорции 54/13/33. Раствор липидов в хлороформе (10 мг в 1 мл) был тщательно высушен в токе азота, следовые остатки растворителя удалены под вакуумом. Затем липиды были ресуспендированы в буфере, содержащем 100 мМ KCl, 20 мМ MES, 20 мМ MOPS, 20 мМ Tricine (рН 6,0), с добавлением 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»).

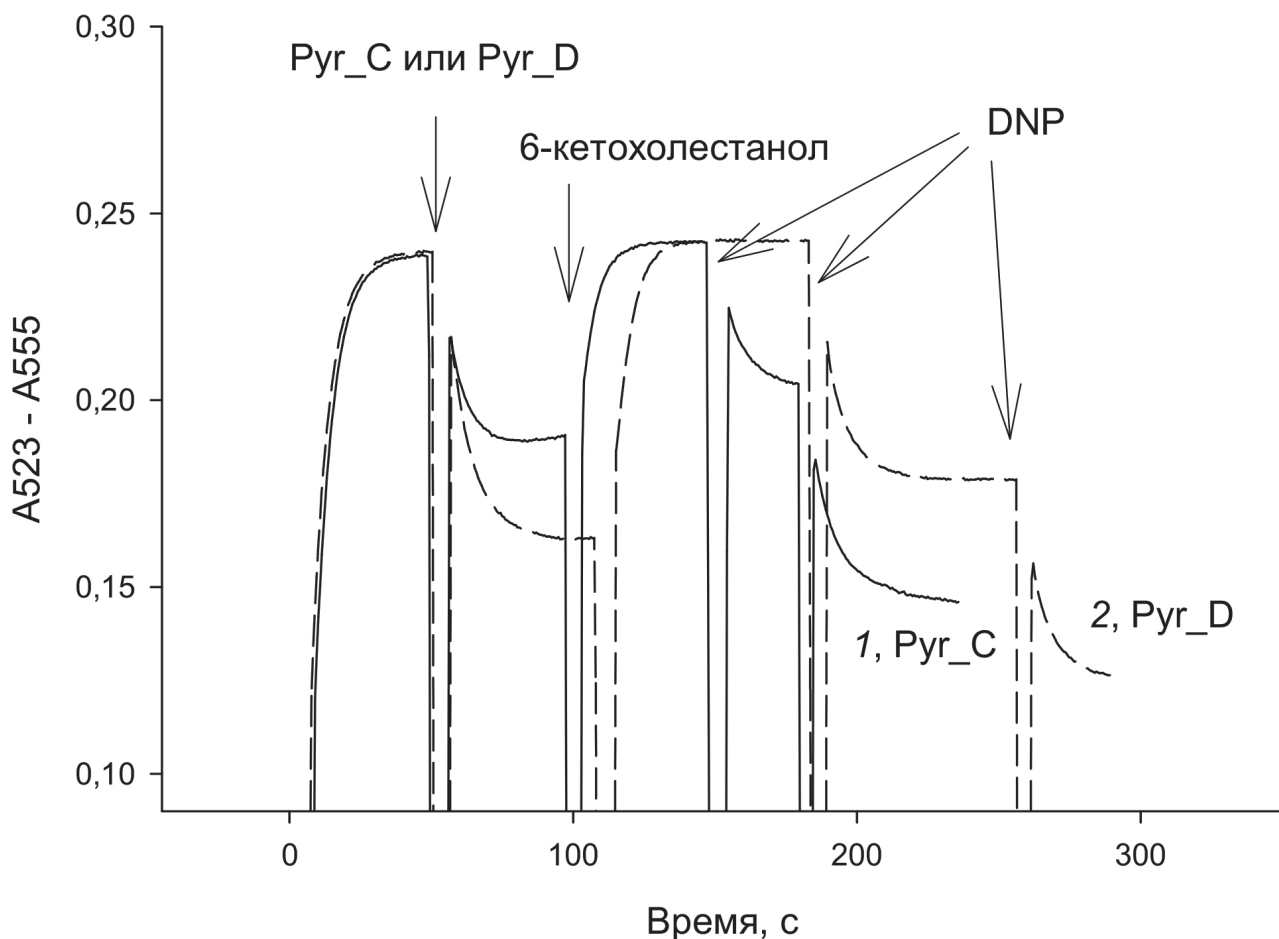


Рис. 4. Ресопрягающее действие 6-кетохолестанола (50 мкМ) при разобщении митохондрий пирроломицином С (Pyrg_C, 100 нМ, кривая 1) и пирроломицином D (Pyrg_D, 0,3 мкМ, кривая 2). Показана запись измерения мембранного потенциала митохондрий по изменению разности поглощения сафранина O при 555 и 523 нм. Митохондрии энергизовали добавлением сукцината (5 мМ) в присутствии ротенона (5 мкМ) и олигомицина. В конце опыта вводили две добавки по 100 мкМ DNP. Подробности см. в разделе «Материалы и методы»

Внелипосомальный пиранин отделяли пропуская через колонку с Sephadex G-50, уравновешенную тремя объемами вышеописанного буфера. Измерения проводили на спектрофлуориметре Панорама Флюорат-02 в условиях термостатирования (15 °С). Флуоресценцию регистрировали на длине волны 505 нм при длине волны возбуждения 455 нм. В конце каждой записи добавляли K^+/H^+ -обменник, ласалоцид А, для полного рассеивания градиента протонов. Для предотвращения образования протонного диффузионного потенциала эксперименты проводили в присутствии 10 нМ валиномицина.

Статистический анализ проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разобщители окислительного фосфорилирования стимулируют дыхание изолирован-

ных митохондрий и одновременно снижают их мембранный потенциал, поскольку являются протонофорами, а дыхательная цепь митохондрий состоит из протонных помп. Стимуляция дыхания митохондрий под действием разобщителей не сопровождается увеличением скорости синтеза АТФ, то есть в этих условиях происходит рассеивание высвобождающейся при окислении химической энергии в тепло. Ранее было показано, что Pyrg_C и Pyrg_D сбрасывают мембранный потенциал бактерий и стимулируют дыхание митохондрий [5]. В настоящей работе мы сравнили между собой стимулирующее действие Pyrg_C и Pyrg_D на изолированных митохондриях печени крысы, а также измерили их действие на мембранный потенциал.

На рис. 2, а показаны примеры увеличения скорости дыхания митохондрий под действием Pyrg_C (кривые 2 и 3) и Pyrg_D (кривые 4 и 5) с последующим добавлением 100 мкМ ADP. Субстратом дыхания был сукцинат. При добавлении как Pyrg_C, так и Pyrg_D происходит

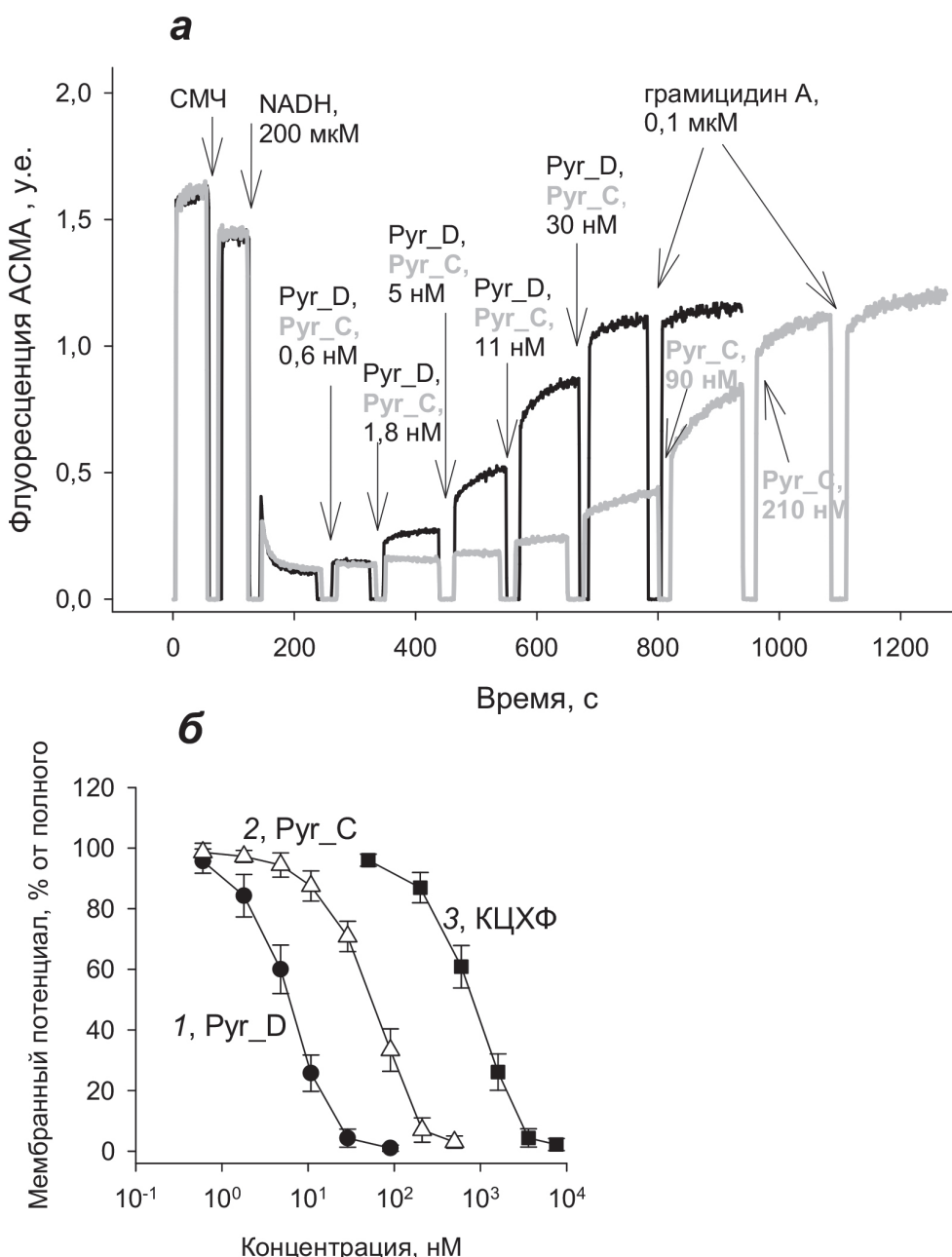


Рис. 5. Действие Pyr_C и Pyr_D на субмитохондриальные частицы. *а* – Действие пирроломитицинов С (Pyr_C, серая кривая) и D (Pyr_D, чёрная кривая) на мембранный потенциал субмитохондриальных частиц (СМЧ), измеренный по флуоресценции АСМА (0,5 мкг/мл, возбуждение – 410 нм, эмиссия – 480 нм). СМЧ энергизовали добавлением NADH (200 мкМ). В конце записей добавляли грамицидин А (0,1 мкг/мл), чтобы полностью сбросить мембранный потенциал СМЧ. *б* – Зависимости мембранного потенциала СМЧ от концентрации Pyr_C (кривая 2), Pyr_D (кривая 1) и КЦХФ (кривая 3). Точки данных представляют собой средние значения \pm стандартные отклонения по меньшей мере для трёх независимых экспериментов. Среда содержала 100 мМ KCl, 10 мМ HEPES (pH 7,4), 5 мМ MgCl₂, 0,5 мМ EGTA. Концентрация белка – 25 мкг/мл. Подробности см. в разделе «Материалы и методы»

удлинение времени фосфорилирующего дыхания, что выражается в снижении коэффициента ADP/O с 1,95 до 1,48 и далее до 1,32 для 1,2 мкМ и 2 мкМ Pyr_C, и до 1,16 и далее до 0,97 при 2 мкМ и 3 мкМ Pyr_D соответственно. На рис. 2, б приведена зависимость скорости дыхания митохондрий от концентрации Pyr_C (кривая 2) и Pyr_D (кривая 1) в отсутствие до-

бавленного ADP. Обращает на себя внимание то, что действующие концентрации Pyr_C были ниже по сравнению с Pyr_D. В этой серии опытов в среде отсутствовал БСА, который, как было показано ранее [5], снижает действующую концентрацию пирроломитицинов.

На рис. 3 приведены измерения мембранного потенциала митохондрий (сплошные чер-

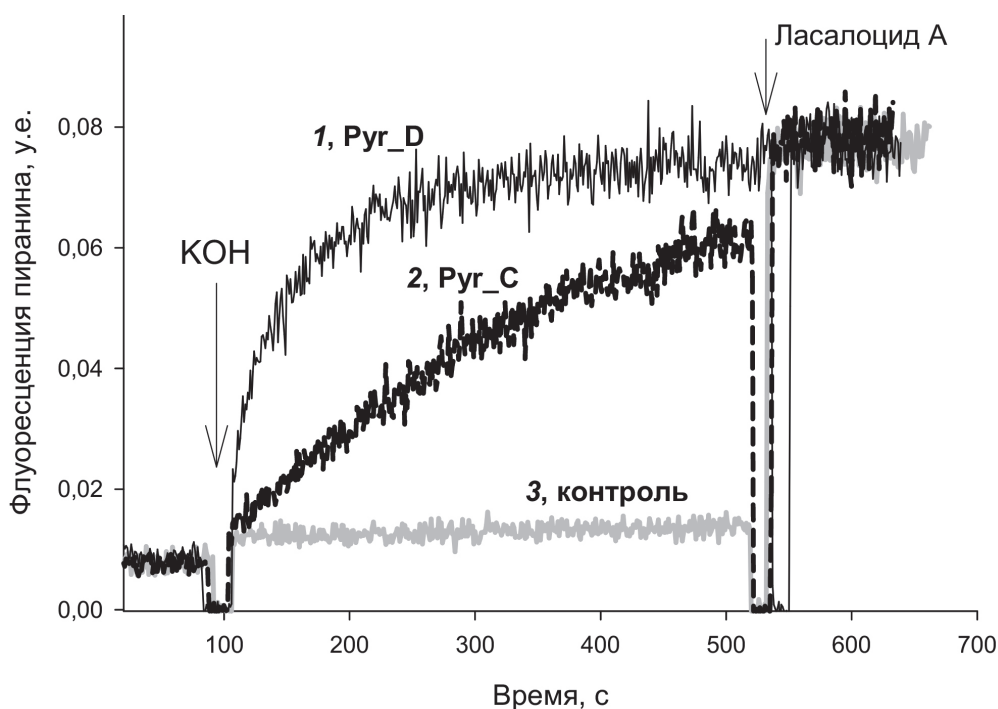


Рис. 6. Индукция протонной проводимости липосом под действием пирроломицинов С (Pyr_C, 0,3 нМ, кривая 1) и D (Pyr_D, 0,3 нМ, кривая 2). Дана зависимость флуоресценции рН-зонда пиранина (возбуждение — 455 нм, регистрация — 505 нм), нагруженного в липосомы, от времени до и после добавления аликвоты KOH, которая сдвигает рН раствора от 6 до 8. В конце каждой пробы добавляли K^+/H^+ -обменник ласалоцид А (1 мкМ) для полного рассеивания градиента рН на мембране

ные кривые) при добавлении одинаковых концентраций Pyr_C (рис 3, а) и Pyr_D (рис 3, б). В соответствии с данными по дыханию митохондрий, показанными на рис. 2, Pyr_C более глубоко снижает мембранный потенциал митохондрий по сравнению с Pyr_D. Пунктирные кривые на рис. 3 показывают аналогичные данные, полученные на препаратах митохондрий, частично лишённых внешней мембраны (митопласты). Видно, что на этих препаратах Pyr_C (а) и Pyr_D (б) сильнее снижают мембранный потенциал по сравнению с митохондриями. На рис. 3, в приведены аналогичные данные для другого разобщителя, DNP, где различия между митохондриями и препаратами, частично лишёнными внешней мембраны, резко уменьшаются. На рис. 3, г приведены величины мембранного потенциала при концентрации Pyr_C и Pyr_D — 0,3 мкМ для митохондрий и препаратов, частично лишённых внешней мембраны. Видно, что в случае Pyr_D различия между митохондриями и митопластами достоверные ($p < 0,001$), тогда как в случае Pyr_C различия статистически не значимы.

Известно, что разобщающее действие на митохондрии для большинства изученных соединений чувствительно к 6-кетохолестанолу или к ингибитору ADP/ATP-антипортера карбоксатрактилозиду (КАТР) [12, 13]. Например,

эффект классических сильных разобщителей КЦХФ и SF6847 подавляется 6-кетохолестанолом [14], а действие таких разобщителей, как DNP и BAM15, частично снимается карбоксатрактилозидом [15–17]. Оказалось, что действие как Pyr_C, так и Pyr_D на мембранный потенциал митохондрий почти полностью снимается при добавлении 6-кетохолестанола (рис. 4), тогда как КАТР в обоих случаях практически не оказывает влияния на снижение мембранного потенциала (данные не показаны). Таким образом, Pyr_C и Pyr_D можно отнести к разряду сильных разобщителей, чувствительных к 6-кетохолестанолу.

Обнаруженные нами существенные различия в относительной эффективности Pyr_C и Pyr_D на митохондриях и препаратах, частично лишённых внешней мембраны, указывают на возможную роль внешней мембраны митохондрий как фактора, определяющего эти различия. Для проверки этой гипотезы мы провели эксперименты на СМЧ, которые представляют собой внутреннюю мембрану митохондрий, но в инвертированной ориентации, так что протонные помпы в этой системе качают протоны внутрь таких замкнутых частиц. На рис. 5, а приведён пример влияния Pyr_C и Pyr_D на мембранный потенциал СМЧ, оценённый с помощью флуоресцентного индикатора АСМА. В этой системе, в отличие от митохондрий,

Руг_D действует существенно активнее, чем Руг_С, снижая мембранный потенциал сильнее при одинаковых концентрациях. В конце опыта добавляли грамицидин А, который полностью сбрасывает мембранный потенциал на СМЧ. Обращает на себя внимание тот факт, что для сброса потенциала в этой системе требуются очень низкие концентрации Руг_D. Так, $[I]_{50}$ для Руг_D составляет около 10 нМ (рис. 5, б), что существенно ниже, чем у КЦХФ (500 нМ) [18]. Насколько мы знаем, такие низкие разобщающие концентрации Руг_D являются рекордными для СМЧ. Более мощное протонифицирующее действие, Руг_D, перекликается с данными, полученными на искусственных БЛМ, где также Руг_D был активнее Руг_С и оба они были намного сильнее КЦХФ [5]. Мы решили проверить этот результат на другой искусственной мембранной системе – липосомах, нагруженных рН-индикатором, пиранином.

Рис. 6 показывает, что добавление 0,3 нМ Руг_D приводит к выравниванию рН на липосомах примерно за 3 мин после сдвига рН с 6 до 8 (кривая 1). Выравнивание рН при добавлении той же концентрации Руг_С происходит медленнее (кривая 2) и требует около 10 мин для завершения процесса. В контрольных опытах без добавления пирроломидина за 10 мин после сдвига внешнего рН внутренний рН изменяется слабо (кривая 3). В этой системе требуется добавлять десятки наномолей КЦХФ, чтобы заметно ускорить кинетику выравнивания рН [19]. Таким образом, ряд протонифицирующей активности изученных разобщителей на липосомах совпадает с рядом протонифицирующей активности на плоских БЛМ [5] и с рядом разобщающей активности на СМЧ (рис. 5).

Важной информацией о механизме работы протонифицирующей активности является рН-зависимость его активности, измеренная на плоской БЛМ. Для типичного протонифицирующего агента, такого как DNP или КЦХФ, рН-зависимость представляет собой колокол с максимумом при рН в районе pK_a [20]. На рис. 7, а представлена рН-зависимость тока БЛМ, индуцированного Руг_D. Экспериментальная рН-зависимость хорошо аппроксимируется теоретическим уравнением (серая линия), которое ранее было получено для случая переноса протона переносчиком [20–22]:

$$I_{H^+} = A * \frac{1}{2k_n / k_i + 2K[H^+]} \cdot \frac{K[H^+]}{1 + K[H^+]}, \quad (1)$$

где K – константа протонирования протонифицирующей формы, k_i и k_n – кинетические константы транслокации для заряженной и нейтральной формы протонифицирующей формы.

Важным положением о том, что величина k_n больше, чем k_i , максимум рН-зависимости сдвинут вправо от точки $pK_a = 7,8$, которая была определена путём фиттирования экспериментальных данных уравнением (1). Оцененная величина pK_a близка к таковой у 2,4-дихлорфенола с $pK_a = 7,9$. Известно, что ток БЛМ, который индуцируют анионные протонифицирующие агенты (включая КЦХФ), снижается под действием флоретина, тогда как ток катионных протонифицирующих агентов, напротив, растёт при добавлении флоретина [23, 24]. Это происходит потому, что флоретин снижает дипольный потенциал фосфолипидных мембран [23]. На рис. 7, б показано действие флоретина на ток БЛМ, индуцированный Руг_D. Поскольку флоретин снижает ток, можно сделать вывод, что Руг_D является анионным протонифицирующим агентом.

На рис. 7, в показаны записи тока, индуцированного на БЛМ Руг_D при приложении скачка потенциала в 25 мВ при щелочных значениях рН среды инкубации. В этих условиях стационарный ток близок к нулю, однако в начальный момент времени наблюдается существенно больший ток, который спадает в течение десятков миллисекунд. По аналогии с работой по изучению свойств протонифицирующего агента КЦХФ [21] можно предположить, что этот процесс связан с транслокацией анионной формы Руг_D с одной стороны мембраны на другую сторону. Низкая величина стационарного тока говорит тут о том, что процесс связывания Руг_D с поверхностью мембраны довольно медленный, что приводит к истощению связанной формы Руг_D с одной стороны мембраны через некоторое время после приложения напряжения. Кинетики релаксации тока хорошо аппроксимируются моноэкспоненциальными кривыми (серые кривые на рис. 7, в). На вставке к рис. 7, в дана зависимость характерного времени релаксации τ от рН среды. Видно, что с ростом рН время релаксации тока увеличивается. Это означает, что в кинетику транслокации вносит вклад процесс протонирования/депротонирования Руг_D и транспорт протонифицированной формы через мембрану.

Суммируя, можно заключить, что в случае чисто липидных мембран – липосом (рис. 6) или БЛМ [5] – Руг_D действительно является более сильным анионным протонифицирующим агентом по сравнению с Руг_С. Можно предположить, что более эффективное действие Руг_С на митохондриях связано с низкой проницаемостью внешней мембраны митохондрий для Руг_D. Действительно, Руг_D более активен на системе СМЧ, которая представляет собой препарат внутренней мембраны митохондрий. Ранее

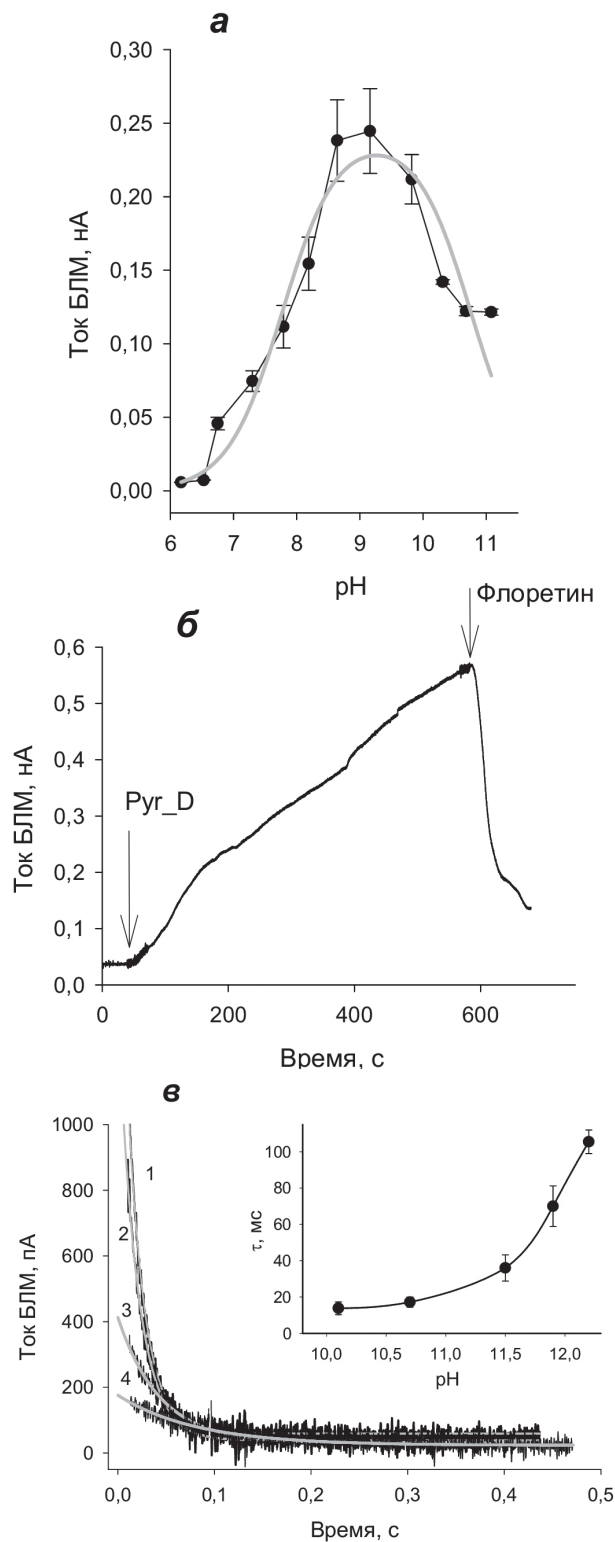


Рис. 7. Действие Pyr_D на плоские БЛМ. *а* – pH-зависимость тока на бислоистой липидной мембране (БЛМ), индуцированного пирроломицином D (30 нМ). БЛМ была сформирована из деканового раствора дифитаноилфосфатидилхолина. Потенциал на БЛМ был 50 мВ. Среда, омывающая мембрану, содержала 10 мМ Tris, 10 мМ MES, 10 мМ бета-аланин, 10 мМ KCl. Точки данных представляют собой средние значения \pm стандартные отклонения по меньшей мере для трёх независимых экспериментов. Серая кривая является аппроксимацией экспериментальных точек уравнением (1) со следующими параметрами: $pK_a = 7,8$, отношение проницаемости нейтральной и анионной формы – 970. *б* – Действие флоретина (5 мкМ) на ток БЛМ, индуцированный Pyr_D (100 нМ). Опыт ставили в вышеописанных условиях при pH 7,0. *в* – Запись тока БЛМ в присутствии 30 нМ Pyr_D при приложении к мембране +25 мВ в момент времени $t = 0$ с. Серые линии – моноэкспоненциальные кривые с показателем времени 18 мс (кривая 1, pH 10,1), 20 мс (кривая 2, pH 10,7), 43 мс (кривая 3, pH 11,5) и 82 мс (кривая 4, pH 11,9). Вставка: pH-зависимость времени релаксации тока τ . Состав среды: 50 мМ KCl, 5 мМ Na₂B₄O₇.

было показано, что действие пептидного каналоформера грамицидина А на митохондрии также сильно затрудняется наличием у них внешней мембраны [25]. Грамицидин А является очень гидрофобным соединением, и его выход в водную фазу из мембраны практически не происходит. Проницаемость веществ через мембраны сильно зависит от гидрофобности и для гидрофильных соединений растёт с ростом гидрофобности (так называемое правило Овертона), однако при увеличении гидрофобности выше какого-то порога происходит снижение проницаемости [26] из-за «застывания» в мембране. Руг_Д должен быть более гидрофобным по сравнению с Руг_С, поскольку у него на один хлорный заместитель больше. Как известно, введение хлора в скелет молекулы приводит к увеличению коэффициента распределения октанол–вода примерно в 3–5 раз. Сам перенос протонов по челночному механизму работы гидрофобного протонофора может не требовать выхода в водную фазу, как это было показано в случае КЦХФ [27].

Ранее было показано, что один из природных пирроломицинов, диоксипирроломицин, который работает в наномолярном диапазоне концентраций, является сильным разобщителем окислительного фосфорилирования на митохондриях [28]. Следует сказать, что в отличие от Руг_С и Руг_Д, диоксипирроломицин не является фенолом и его протон-транспортные свойства, по всей видимости, определяются протоном при атоме азота в пиррольном фрагменте. Было показано, что введение эпоксиметильной группы в это положение приводит к потере разобщающей активности на изолированных митохондриях, однако полученные производные сохраняют сильное инсектицидное действие, что связывается со способностью неспецифических оксидаз насекомых к ферментативному отщеплению эпоксиметильной группы [29]. В то же время эти соединения оказывают лишь слабое токсическое действие на клетки млекопитающих и растений. Такие свойства позволили широко использовать препарат хлорфенапир (chlorfenapyr) в качестве эффективного инсектицидного средства в сельском хозяйстве.

В заключение обсудим возможность использования пирроломицинов не в качестве антибиотиков или инсектицидов, а в качестве потенциальных препаратов для борьбы с ожирением. Важным преимуществом пирроломицинов является то, что они представляют собой природные соединения. Другой природный разобщитель, усниновая кислота, широко используется как «сжигатель жира», при этом использование синтетического протонофора DNP было запрещено. Для того чтобы подойти к использованию пирроломицинов для борьбы с ожирением необходимо найти те дозы, которые уже стимулируют окислительный метаболизм в организме животных, но ещё не вызывают токсического действия или выраженных побочных эффектов. В качестве первого шага такой работы можно рассматривать опубликованные данные для Руг_С и Руг_Д по цитотоксичности для клеток НЕК-293 [5]. Дальнейшая работа на крысах *in vivo* покажет, насколько пирроломицины подходят для таких целей.

Вклад авторов. Ю.Н. Антоненко — концепция и руководство работой; А.М. Фирсов, Л.С. Хайлова, Т.И. Рокицкая — проведение экспериментов; Т.И. Рокицкая, Е.А. Котова, Ю.Н. Антоненко — обсуждение результатов исследования; Е.А. Котова, Ю.Н. Антоненко — написание текста и его редактирование.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-14-00062).

Благодарности. Авторы выражают благодарность Рубену Харткоопу за предоставление пирроломицинов, И.К. Гореловой (факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ) за помощь в проведении экспериментов на БЛМ и В.Г. Гривенниковой (кафедра биохимии биологического факультета МГУ) за предоставление препарата СМЧ.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Koyama, M., Kodama, Y., Tsuruoka, T., Ezaki, N., Niwa, T., et al. (1981) Structure and synthesis of pyrrolomycin A, a chlorinated nitro-pyrrole antibiotic, *J. Antibiotics*, **34**, 1569–1576, doi: 10.7164/antibiotics.34.1569.
2. Kaneda, M., Nakamura, S., Ezaki, N., and Litaka, Y. (1981) Structure of pyrrolomycin B, a chlorinated nitro-pyrrole antibiotic, *J. Antibiotics*, **34**, 1366–1368, doi: 10.7164/antibiotics.34.1366.

3. Cascioferro, S., Raimondi, M. V., Cusimano, M. G., Raffa, D., Maggio, B., et al. (2015) Pharmaceutical potential of synthetic and natural pyrrolomycins, *Molecules*, **20**, 21658-21671, doi: 10.3390/molecules201219797.
4. Koyama, M., Ezaki, N., Tsuruoka, T., and Inouye, S. (1983) Structural studies on pyrrolomycins C, D and E, *J. Antibiotics*, **36**, 1483-1489, doi: 10.7164/antibiotics.36.1483.
5. Valderrama, K., Pradel, E., Firsov, A. M., Drobecq, H., Bauderlique-le Roy, H., et al. (2019) Pyrrolomycins are potent natural protonophores, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **63**, e01450-19, doi: 10.1128/AAC.01450-19.
6. 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.
7. 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.
8. Grivennikova, V. G., Gladyshev, G. V., and Vinogradov, A. D. (2020) Deactivation of mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (respiratory complex I): Extrinsic affecting factors, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1861**, 148207, doi: 10.1016/j.bbabi.2020.148207.
9. Deleage, G., Penin, F., Godinot, C., and Gautheron, D. C. (1983) Correlations between ATP hydrolysis, ATP synthesis, generation and utilization of delta pH in mitochondrial ATPase-ATP synthase, *Biochim. Biophys. Acta*, **725**, 464-471, doi: 10.1016/0005-2728(83)90187-1.
10. 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, *Bioelectrochemistry*, **98**, 30-38, doi: 10.1016/j.bioelechem.2014.02.002.
11. Chen, Y., Schindler, M., and Simon, S. M. (1999) A mechanism for tamoxifen-mediated inhibition of acidification, *J. Biol. Chem.*, **274**, 18364-18373, doi: 10.1074/jbc.274.26.18364.
12. Skulachev, V. P. (1998) Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics, *Biochim. Biophys. Acta*, **1363**, 100-124, doi: 10.1016/s0005-2728(97)00091-1.
13. Kotova, E. A., and Antonenko, Y. N. (2022) Fifty years of research on protonophores: mitochondrial uncoupling as a basis for therapeutic action, *Acta Naturae*, **14**, 4-13.
14. 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.
15. Andreyev, A. Y., Bondareva, T. O., Dedukhova, V. I., Mokhova, E. N., Skulachev, V. P., et al. (1988) Carboxyatractylate inhibits the uncoupling effect of free fatty acids, *FEBS Lett.*, **226**, 265-269, doi: 10.1016/0014-5793(88)81436-4.
16. Zuna, K., Jovanovic, O., Khailova, L. S., Skulj, S., Brkljako, Z., et al. (2021) Mitochondrial uncoupling proteins (UCP1-UCP3) and adenine nucleotide translocase (ANT1) enhance the protonophoric action of 2,4-dinitrophenol in mitochondria and planar bilayer membranes, *Biomolecules*, **11**, 1178, doi: 10.3390/biom11081178.
17. Firsov, A. M., Popova, L. B., Khailova, L. S., Nazarov, P. A., Kotova, E. A., et al. (2021) Protonophoric action of BAM15 on planar bilayers, liposomes, mitochondria, bacteria and neurons, *Bioelectrochemistry*, **137**, 107673, doi: 10.1016/j.bioelechem.2020.107673.
18. Iaubasarova, I. R., Khailova, L. S., Firsov, A. M., Grivennikova, V. G., Kirsanov, R. S., et al. (2020) The mitochondria-targeted derivative of the classical uncoupler of oxidative phosphorylation carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone is an effective mitochondrial recoupler, *PLoS One*, **15**, e0244499, doi: 10.1371/journal.pone.0244499.
19. Khailova, L. S., Vygodina, T. V., Lomakina, G. Y., Kotova, E. A., and Antonenko, Y. N. (2020) Bicarbonate suppresses mitochondrial membrane depolarization induced by conventional uncouplers, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **530**, 29-34, doi: 10.1016/j.bbrc.2020.06.131.
20. McLaughlin, S., and Dilger, J. P. (1980) Transport of protons across membranes by weak acids, *Physiol. Rev.*, **60**, 825-863, doi: 10.1152/physrev.1980.60.3.825.
21. O'Shaughnessy, K., and Hladky, S. B. (1983) Transient currents carried by the uncoupler, carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone, *Biochim. Biophys. Acta*, **724**, 381-387, doi: 10.1016/0005-2728(83)90097-x.
22. Popova, L. B., Nosikova, E. S., Kotova, E. A., Tarasova, E. O., Nazarov, P. A., et al. (2018) Protonophoric action of triclosan causes calcium efflux from mitochondria, plasma membrane depolarization and bursts of miniature end-plate potentials, *Biochim. Biophys. Acta*, **1860**, 1000-1007, doi: 10.1016/j.bbamem.2018.01.008.
23. Andersen, O. S., Finkelstein, A., Katz, I., and Cass, A. (1976) Effect of phloretin on permeability of thin lipid membranes, *J. Gen. Physiol.*, **67**, 749-771, doi: 10.1085/jgp.67.6.749.
24. Rokitskaya, T. I., Ilyasova, T. M., Severina, I. I., Antonenko, Y. N., and Skulachev, V. P. (2013) Electro-genic proton transport across lipid bilayer membranes mediated by cationic derivatives of rhodamine 19: comparison with anionic protonophores, *Eur. Biophys. J.*, **42**, 477-485, doi: 10.1007/s00249-013-0898-9.
25. Khailova, L. S., Rokitskaya, T. I., Kovalchuk, S. I., Kotova, E. A., Sorochkina, A. I., et al. (2018) Role of mitochondrial outer membrane in the uncoupling activity of N-terminally glutamate-substituted gramicidin A, *Biochim. Biophys. Acta*, **1861**, 281-287, doi: 10.1016/j.bbamem.2018.06.013.
26. Dickson, C. J., Hornak, V., Pearlstein, R. A., and Duca, J. S. (2017) Structure kinetic relationships of passive membrane permeation from multiscale modeling, *J. Am. Chem. Soc.*, **139**, 442-452, doi: 10.1021/jacs.6b11215.
27. Kasianowicz, J., Benz, R., and McLaughlin, S. (1984) The kinetic mechanism by which CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone) transports pro-

- tons across membranes, *J. Membr. Biol.*, **82**, 179-190, doi: 10.1007/BF01868942.
28. Treacy, M., Miller, T., Black, B., Gard, I., Hunt, D., et al. (1994) Uncoupling activity and pesticidal properties of pyrroles, *Biochem. Soc. Trans.*, **22**, 244-247, doi: 10.1042/bst0220244.
29. Black, B. C., Hollingworth, R. M., Ahammadsahib, K. I., Kukel, D. C., and Donovan, S. (1994) Insecticidal action and mitochondrial uncoupling activity of AC-303,630 and related halogenated pyrroles, *Pestic. Biochem. Physiol.*, **50**, 115-128, doi: 10.1006/pest.1994.1064.

THE ANTIBIOTIC PYRROLOMYCIN AS AN EFFECTIVE MITOCHONDRIAL UNCOUPLER

A. M. Firsov, L. S. Khailova, T. I. Rokitskaya, E. A. Kotova, and Y. N. Antonenko*

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

Pyrrolomycins C (Pyr_C) and D (Pyr_D) are antibiotics produced by *Actinosporangium* and *Streptomyces*. Their antimicrobial action consists in depolarization of the bacterial membrane, leading to suppression of bacterial bioenergetics through uncoupling of oxidative phosphorylation. This phenomenon is based on the protonophoric action of pyrrolomycins [Valderrama et al., *Antimicrob Agents Chemother.* (2019) **63**, e01450]. Here, we studied the effect of pyrrolomycins on isolated rat liver mitochondria. Pyr_C appeared to be more active than Pyr_D and uncoupled mitochondria in the submicromolar concentration range, which manifested itself in depolarization of the mitochondrial membrane and stimulation of mitochondrial respiration. In the case of mitoplasts, i.e., mitochondria with impaired integrity of the outer membrane, the difference in the action of these antibiotics was significantly reduced. In the case of “inverted” submitochondrial particles (SMPs), on the contrary, Pyr_D appeared to be a more active uncoupler, which caused collapse of membrane potential in SMPs at nanomolar concentrations. The protonophoric activity of Pyr_D on a planar bilayer lipid membrane (BLM) had a maximum at pH around 9, i.e., close to the pKa of this compound. Pyr_D behaved as a typical anionic protonophore, with the activity on BLM being decreased by the dipole modifier phloretin. The difference between the protonophoric effects of pyrrolomycins C and D on mitochondria and on lipid membranes were attributed to a higher ability of Pyr_C to penetrate through the outer mitochondrial membrane.

Keywords: pyrrolomycin, mitochondria, uncoupler, protonophore, respiration, membrane potential