

ГЕРОПРОТЕКТОРНЫЙ ЭФФЕКТ МИТОХОНДРИАЛЬНО-НАПРАВЛЕННОГО АНТИОКСИДАНТА SKQBERB В МОДЕЛИ ХРОНОЛОГИЧЕСКОГО СТАРЕНИЯ МИОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА MB135

DOI: 10.37586/2949-4745-1-2023-25-30

УДК: 576.366

Челомбитько М.А.¹, Моргунова Г.В.², Строчкова Н.Ю.³, Лямзаев К.Г.¹

¹ ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Российский геронтологический научно-клинический центр, Институт изучения старения, Москва, Россия.

² МГУ им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия.

³ МГУ им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия.

Резюме

Обоснование. Поиск потенциальных сенолитиков и сеноморфов, способных влиять на количество и активность сенесцентных клеток в организме, является актуальной задачей в области геронтологии. Ранее было показано, что митохондриально-направленные соединения на основе пластохинона, а также берберин обладают геропротекторными свойствами в различных моделях *in vitro* и *in vivo*. Из этого следует, что митохондриально-направленное соединение на основе берберина и пластохинона — SkQVerb может обладать более высоким геропротекторным потенциалом по сравнению с ранее исследуемыми соединениями.

Цель. Изучить геропротекторную активность SkQVerb в модели хронологического старения миобластов MB135.

Материалы и методы. Мы исследовали влияние SkQVerb на различные признаки старения миобластов человека MB135. Для определения клеточного старения проводили гистохимическое окрашивание на β -галактозидазу с помощью коммерческого набора, определяли уровень провоспалительных цитокинов ИЛ-6 и ИЛ-8 с использованием готовых наборов для иммуноферментного анализа, а также оценивали содержание белков p21, pRb (Ser807/811), LC3B с помощью вестерн-блоттинга.

Результаты. Анализ полученных результатов показал, что SkQVerb в концентрации 20–100 нМ эффективно подавляет накопление сенесцентных клеток при хронологическом старении MB135, а также достоверно снижает уровень основных факторов секреторного фенотипа ИЛ-6 и 8.

Заключение. Результаты нашей работы указывают на потенциальный геропротекторный и сеноморфный эффект SkQVerb. Это открывает перспективы применения данного митохондриально-направленного соединения в качестве геропротектора.

Ключевые слова: клеточное старение; антиоксиданты; сенотерапевтические средства.

Для цитирования: Челомбитько М.А., Моргунова Г.В., Строчкова Н.Ю., Лямзаев К.Г. Геропротекторный эффект митохондриально-направленного

антиоксиданта SkQVerb в модели хронологического старения миобластов человека MB135. *Проблемы геронауки*. 2023; 1: 25–30. DOI: 10.37586/2949-4745-1-2023-25-30

GEROPROTECTIVE EFFECT OF THE MITOCHONDRIAL-TARGETED ANTIOXIDANT SKQBERB IN A MODEL OF CHRONOLOGICAL AGING OF HUMAN MB135 MYOBLASTS

Chelombitko M.A.¹, Morgunova G.V.², Strochkova N.Y.³, Lyamzaev K.G.¹

¹ Pirogov Russian National Research Medical University, Russian Gerontology Research and Clinical Centre, The Institute for Aging Research, Moscow, Russia

² Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Moscow, Russia

³ Lomonosov Moscow State University, Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Moscow, Russia

Abstract

Background. The field of gerontology is actively seeking senolytics and senomorphs that can influence the quantity and activity of senescent cells in the body. Previous studies have demonstrated the geroprotective properties of mitochondrial-directed compounds based on plastoquinone and berberine in various in vitro and in vivo models. Thus, it is plausible that SkQVerb, a mitochondrial-targeted compound combining berberine and plastoquinone, may exhibit higher geroprotective potential compared to previously studied compounds.

Objective. The aim of this study is to investigate the geroprotective activity of SkQVerb in a chronological aging model using MB135 myoblasts.

Materials and Methods. The effect of SkQVerb on various aging characteristics of human MB135 myoblasts was assessed. Histochemical staining for β -galactosidase was performed using a commercially available kit. The levels of proinflammatory cytokines IL-6 and IL-8 were determined using pre-made immunoassay kits. Additionally, Western blotting was employed to evaluate the levels of p21, pRb (Ser807/811), and LC3B proteins.

Results. Analysis of the results revealed that SkQVerb, at concentrations ranging from 20–100 nM, effectively suppressed the accumulation of senescent cells in MB135 cells subjected to chronological aging. Furthermore, it significantly reduced the levels of IL-6 and IL-8, key factors associated with the secretory phenotype.

Conclusion. The findings of this study suggest a potential geroprotective and senomorphic effect of SkQVerb. These results open up possibilities for utilizing this mitochondrial-targeted compound as a geroprotector in future applications.

Keywords: cellular senescence; antioxidants; senotherapeutics.

For citation: Chelombitko Maria, Morgunova Galina, Strochkova Natalia, Lyamzaev Konstantin. Geroprotective effect of the mitochondrial-targeted antioxidant SkQVerb in a model of chronological aging of human MB135 myoblasts. *Problems of Geroscience*. 2023; 1: 25–30. DOI: 10.37586/2949-4745-1-2023-25-30

ОБОСНОВАНИЕ

Молекула SkQVerb представляет собой конъюгат пластохинона, обладающего антиоксидантными свойствами, и катиона берберина, за счет которого происходит адресная доставка молекулы в митохондрии. Ранее было показано, что митохондриально-направленные соединения на основе пластохинона проявляют геропротекторные свойства. В частности, было продемонстрировано замедление клеточного старения и уменьшение вероятности ассоциированных со старением заболеваний в нескольких моделях *in vitro* и *in vivo* [1]. В то же время берберин, входящий в состав молекулы, в настоящее время рассматривается как перспективный геропротектор, замедляющий признаки старения сердца, в том числе за счет подавления образования в тканях сенесцентных клеток [2]. Молекула SkQVerb на основе берберина и пластохинона может обладать более высоким геропротекторным потенциалом по сравнению с ранее исследуемыми митохондриально-направленными соединениями. В данной работе в модели старения миообластов человека MB135 мы изучили сенолитические свойства SkQVerb.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучить геропротекторные свойства SkQVerb в модели хронологического старения миообластов MB135.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Общая информация

Исследование проводили на нормальных им-мортиализованных миообластах MB135, полученных из биопсии мышц здорового человека. SkQVerb был синтезирован Г.А. Коршуновой и Н.В. Сумбатян в Научно-исследовательском институте физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского.

2. Клеточные культуры

Клетки культивировали при 37°C, 5% CO₂ в ростовой среде, содержащей 60% DMEM (ПанЭко, Россия), 25% среды 199 (ПанЭко, Россия) и 15% эмбриональной телячьей сыворотки (fetal bovine serum, FBS) (HyClone, США), с добавлением 0,5 нг/мл bFGF (ПанЭко, Россия), 0,2 мкг/мл дексаметазона (Эллара, Россия). Для дифференцировки клетки культивировали на дифференциальной среде, содержащей 98% DMEM (ПанЭко, Россия) и 2% лошадиной сыворотки (Biosera, France), с добавлением 10 мкг/мл инсулина, 5,5 мкг/мл трансферрина и 6,7 нг/мл селенита натрия (Insulin-Transferrin-Selenium Supplement 50x, ПанЭко, Россия).

3. Методы

Выявление β-галактозидазы (β-гал) в клетках осуществляли гистохимическим методом с помощью коммерческого набора (Abcam, США) согласно

инструкции производителя. Подсчет клеток проводили на фотографиях, полученных с помощью флуоресцентного микроскопа Axiovert 200 M (Carl Zeiss, Германия), оснащенного камерой AxioCAM HRM, при увеличении ×20.

Концентрацию провоспалительных цитокинов ИЛ-6 и ИЛ-8 в среде культивирования определяли с помощью готовых наборов для иммуноферментного анализа (Вектор-бест, Россия) согласно инструкции производителя.

Содержание белков p21, pRb, LC3B в клетках определяли методом вестерн-блоттинга. Лизис клеток, разделение белков и перенос на мембраны из поливинилидендифторида (ПВДФ; polyvinylidene difluoride (PVDF) проводили, как описано ранее (3). Мембраны инкубировались со следующими первичными моноклональными антителами: анти-p21 (Roche, Швейцария), анти-pRb (Ser807/811) (Cell signaling, США), анти-LC3B (Abcam, США), за которыми следовала инкубация с вторичными антителами анти-кроличьими IgG и анти-мышинными IgG. Активность HRP была определена с помощью системы ChemiDoc™ XR+ (BioRad, Hercules, CA, USA) с использованием люминола усиленной хемилюминесценции (ECL) HRP-субстрата Super-Signal West Dura (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Денситометрический анализ проводился с использованием программного обеспечения обработки изображений Image Lab версии 5.2.1.

4. Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы GraphpadPrism 6.0 с применением однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с тестом Даннета. Статистически значимыми считали различия, для которых $p < 0,05$.

5. Этическая экспертиза

Исследования проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Хронологическое старение миообластов MB135 ранее не изучалось. По этой причине на первом этапе нашего исследования мы проверили способность клеток данной линии стареть в процессе культивирования и измеряли уровни типичных маркеров старения: накопление β-гал, содержание белков p21, pRb, уровень аутофагии и секрецию провоспалительных цитокинов ИЛ-6 и ИЛ-8. Было показано, что культивирование в течение четырех недель приводило к появлению 60% β-гал-положительных клеток, в то время как среди миообластов, культивируемых в течение одной недели, таковых не наблюдалось ($p < 0,0001$) (рисунок 1А). Кроме того, мы обнаружили статистически значимое увеличение концентрации провоспалительных цитокинов ИЛ-6 ($p < 0,0001$) и ИЛ-8 ($p = 0,001$) в среде культивирования от 4-недельных

MB135 по сравнению с 1-недельными (рисунок 1Б). Помимо этого, методом вестерн-блоттинга были обнаружены другие признаки старения в 4-недельных MB135. Так, наблюдалось увеличение содержания p21 ($p = 0,029$) и снижение pRb (Ser807/Ser811) ($p = 0,036$) (рисунок 1В). Наряду с этим снижалась активность аутофагии, о чем можно судить по изменению соотношения LC3II/LC3I ($p = 0,007$) (рисунок 1В), что является одним из типичных признаков старения мышечных клеток. Полученные данные свидетельствуют о том, что культивирование клеток MB135 в течение четырех недель можно рассматривать как одну из моделей для изучения старения клеток *in vitro*.

На следующем этапе мы изучили влияние SkQVerb в концентрациях 4 нМ, 20 нМ и 100 нМ на признаки клеточного старения. Обработка клеток SkQVerb в концентрации 20 нМ приводила к статистически значимому двукратному снижению процента β -гал-положительных клеток, в то время как препарат в других концентрациях не влиял на этот параметр (рисунок 2А). Анализ результатов определения содержания в среде культивирования цитокинов ИЛ-6 и ИЛ-8 показал, что SkQVerb в концентрациях 4 и 20 нМ снижает их содержание, а в концентрации 100 нМ не оказывает такого эффекта (рисунок 2Б).

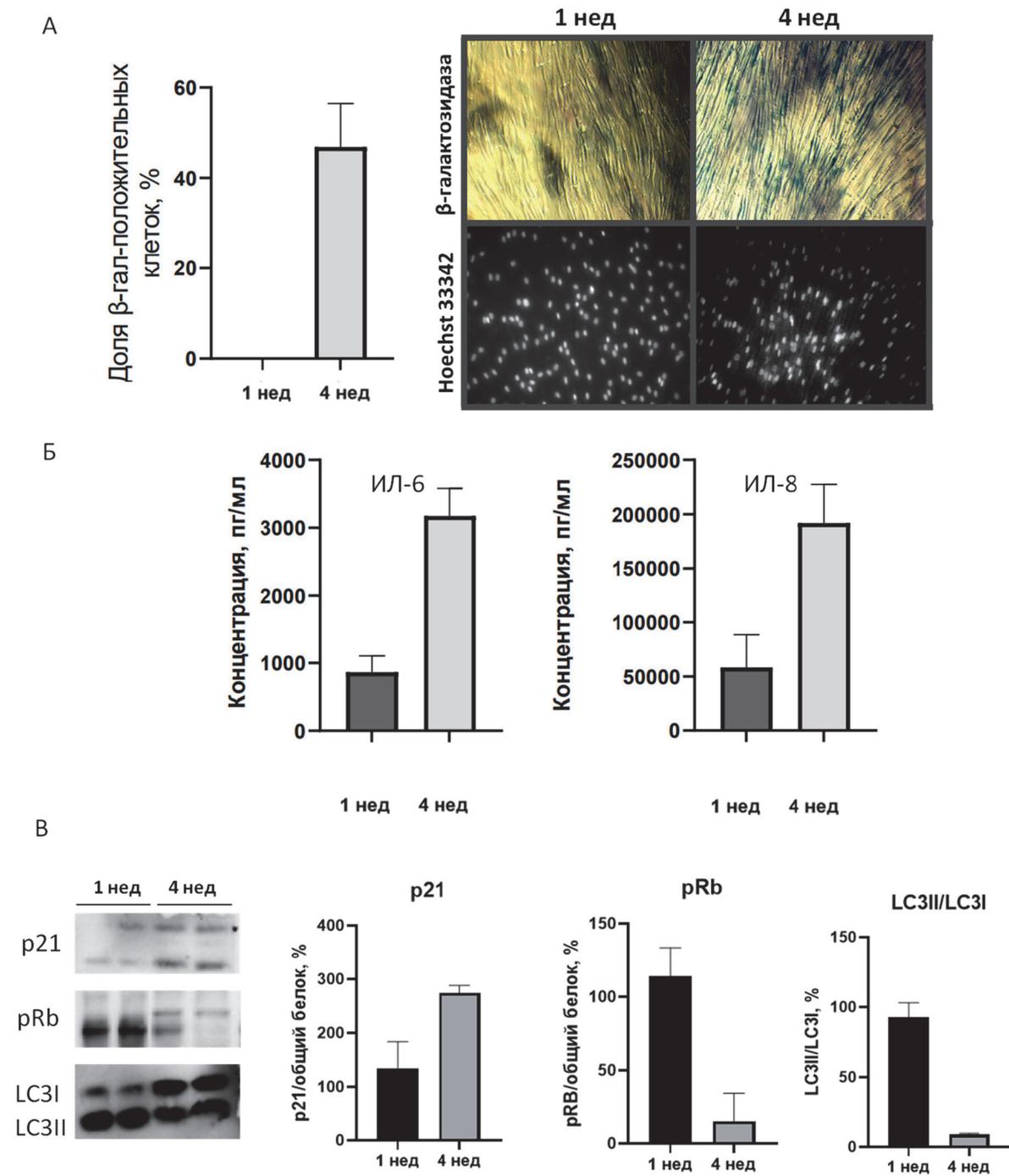


Рисунок 1. Определение маркеров старения в 1-недельных и 4-недельных клетках MB135. (А) Число β -гал-положительных клеток. (Б) Уровень цитокинов ИЛ-6 и ИЛ-8 в среде культивирования. (В) Содержание белков p21, pRb, LC3I и LC3II в лизате клеток.

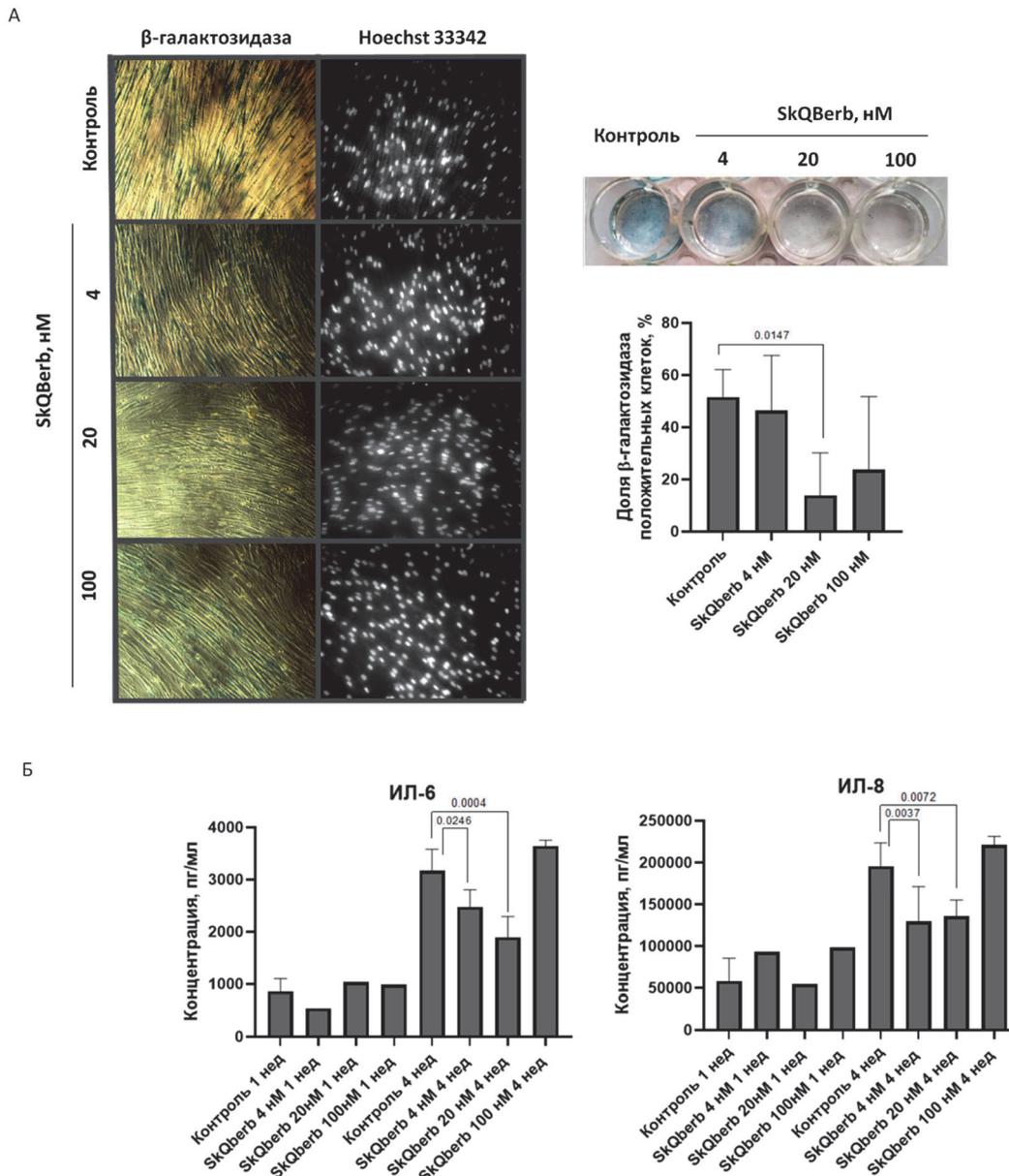


Рисунок 2. Влияние SkQVerb на маркеры старения клеток МВ135. (А) Число β-гал-положительных клеток в 4-недельной культуре клеток. (Б) Уровень цитокинов ИЛ-6 и ИЛ-8 в среде культивирования клеток после 1 и 4 недель инкубации.

ОБСУЖДЕНИЕ

Старение клеток (cell senescence) вносит свой вклад в старение организма. В частности, оно способствует развитию ассоциированного со старением секреторного фенотипа (SASP; senescence-associated secretory phenotype) — устойчивого патологического состояния, которое вызывает хроническое воспаление в тканях и нарушает их функционирование, что в конечном итоге приводит к возникновению возрастных заболеваний. Для устранения клеточного старения в настоящее время предлагается использовать препараты, специфически воздействующие на состаренные клетки организма, — сенолитики (вещества, устраняющие старые клетки) и сеноморфы (вещества, модулирующие развитие SASP, но не влияющие на жизнеспособность старых клеток). Сенолитики считаются более перспективными средствами для исследований

на лабораторных животных и испытаний в клинике, однако изучены далеко не все возможные негативные эффекты такой терапии [4]. Так, одной из основных проблем применения сенолитиков во взрослом возрасте является атрофия тканей, возникающая в результате массового удаления сенесцентных клеток. При нормальном старении накопление сенесцентных клеток варьируется в разных тканях, составляя в среднем от 2% до 5%. Сенесцентные клетки играют важную роль в поддержании структуры тканей, особенно в позднем возрасте, и поэтому их резкое удаление может привести к атрофии разной степени, в зависимости от количества сенесцентных клеток, находящихся в ткани [5]. Кроме того, уничтожение сенесцентных клеток не только препятствует развитию негативных эффектов клеточного старения, но и снижает их полезные эффекты. К примеру, клеточная сенесценция

способствует заживлению ран [6], клеточному перепрограммированию [7] и регенерации тканей [8]. В связи с этим по-прежнему является актуальным поиск препаратов, не только проявляющих сенолитические свойства, но и препаратов, нацеленных на подавление SASP (сеноморфов), так как в ряде случаев, применение сеноморфов в составе комбинаторной терапии возраст-зависимых патологий является более оправданным.

Существует большое количество способов стимуляции клеточного старения, наиболее распространенными индукторами являются репликативное старение путем длительного культивирования, ионизирующая и неионизирующая радиация, генотоксические препараты, окислительный стресс, а также деметилирующие и ацетилирующие агенты (9). В нашем исследовании мы впервые показали, что миобласты MB135 подвержены хронологическому старению. Как и в случае с индукцией старения клеток под воздействием повреждающих факторов, культивирование клеток MB135 в течение четырех недель приводит к появлению типичных биомаркеров старения, таких как накопление β -гал, увеличение секреции провоспалительных цитокинов ИЛ-6 и ИЛ-8, повышение содержания белка p21 и уменьшение белка pRb, снижение уровня аутофагии. Полученные данные свидетельствуют о том, что культивирование клеток MB135 в течение четырех недель можно рассматривать как одну из моделей для изучения старения клеток *in vitro*. Далее мы показали, что SkQVerb обладает геропротекторными свойствами на разработанной нами модели. Анализ результатов определения уровня β -гал продемонстрировал, что SkQVerb в концентрациях от 20 до 100 нМ снижает количество β -гал-положительных клеток, что свидетельствует о сенолитическом потенциале данного соединения. При этом данные иммуноферментного анализа показали, что обработка клеток SkQVerb в диапазоне концентраций от 4 до 20 нМ приводит к снижению уровня цитокинов ИЛ-6 и ИЛ-8, что свидетельствует о сеностатическом действии SkQVerb. Исходя из полученных данных можно сделать вывод о том, что SkQVerb в низкой концентрации (4 нМ) обладает сеностатическими, но не сенолитическими свойствами, поскольку, несмотря на подавление секреции цитокинов, не наблюдается снижения числа β -гал-положительных клеток. В то же время 20 нМ SkQVerb является оптимальной концентрацией, проявляющей как сеностатические, так и сенолитические свойства.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, результаты нашей работы указывают на потенциальный геропротекторный и сеноморфический эффекты SkQVerb. Это открывает

перспективы применения данного митохондриально-направленного соединения в качестве геропротектора и сеноморфа.

Источник финансирования. Исследование выполнено за счет средств программы «Приоритет-2030».

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

Участие авторов. Челомбитько М.А. — экспериментальная работа, планирование экспериментов, написание статьи, Моргунова Г.В. — экспериментальная работа, написание статьи, Строчкова Н.Ю. — экспериментальная работа, Лямзаев К.Г. — планирование экспериментов, написание статьи.

Все авторы одобрили финальную версию статьи перед публикацией.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lyamzaev K.G., Pustovidko A.V., Simonyan R.A., et al. Novel Mitochondria-Targeted Antioxidants: Plastoquinone Conjugated with Cationic Plant Alkaloids Berberine and Palmatine. *Pharm Res.* 2011;28(11):2883-2895. DOI: 10.1007/s11095-011-0504-8
2. Skulachev M.V., Antonenko Y.N., Anisimov V.N., et al. Mitochondrial-targeted plastoquinone derivatives. Effect on senescence and acute age-related pathologies. *Curr. Drug Targets.* 2011;12(6):800-826. DOI: 10.2174/138945011795528859
3. Zinovkin R.A., Romaschenko V.P., Galkin I.I., Zakharova V.V., Pletjushkina O.Y., Chernyak B.V., et al. Role of mitochondrial reactive oxygen species in age-related inflammatory activation of endothelium. *Aging.* 2014;6(8):661-74. DOI: 10.18632/aging.100685.
4. Zhang L., Pitcher L.E., Prahalad V., Niedernhofer L.J., Robbins P.D. Targeting cellular senescence with senotherapeutics: senolytics and senomorphics. *The FEBS Journal.* 2022;290(5):1362-1383. DOI: 10.1111/febs.16350
5. He S., Sharpless N.E. Senescence in Health and Disease. *Cell.* 2017;169(6):1000-1011. DOI: 10.1016/j.cell.2017.05.015. PMID: 28575665; PMCID: PMC5643029
6. Demaria M., Ohtani N., Youssef S.A., Rodier F., Toussaint W., Mitchell J.R., Laberge R.M., Vijg J., Van Steeg H., Dollé M.E., Hoeijmakers J.H., de Bruin A., Hara E., Campisi J. An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev Cell.* 2014;31(6):722-733. DOI: 10.1016/j.devcel.2014.11.012. Epub 2014 Dec 11. PMID: 25499914; PMCID: PMC4349629
7. Mosteiro L., Pantoja C., Alcazar N., Marión R.M., Chondronasiou D., Rovira M., Fernandez-Marcos P.J., Muñoz-Martin M., Blanco-Aparicio C., Pastor J., Gómez-López G., De Martino A., Blasco M.A., Abad M., Serrano M. Tissue damage and senescence provide critical signals for cellular reprogramming *in vivo*. *Science.* 2016;354(6315):aaf4445. DOI: 10.1126/science.aaf4445. PMID: 27884981
8. Ritschka B., Storer M., Mas A., Heinzmann F., Ortells M.C., Morton J.P., Sansom O.J., Zender L., Keyes W.M. The senescence-associated secretory phenotype induces cellular plasticity and tissue regeneration. *Genes Dev.* 2017;31(2):172-183. DOI: 10.1101/gad.290635.116. Epub 2017 Jan 31. PMID: 28143833; PMCID: PMC5322731
9. Hernandez-Segura A., Brandenburg S., Demaria M. Induction and validation of cellular senescence in primary human cells. *J. Vis. Exp.* 2018;(136):57782.