

УДК 57.085.23

## ВЛИЯНИЕ КОМПОЗИЦИИ ХОЛИНА, СУКЦИНАТА И НИКОТИНАМИДА НА СОСТОЯНИЕ КЛЕТОК ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЫ МИОЦИТОВ

**Погонялова М.Ю.** (Лаборатория клеточной физиологии и патологии НТЦ биомедицинской фотоники Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева, Орел, Россия),  
**Серёгина Е.С.** (Лаборатория клеточной физиологии и патологии НТЦ биомедицинской фотоники Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева, Орел, Россия)

**Научный руководитель – кандидат технических наук Винокуров А.Ю.**

(Лаборатория клеточной физиологии и патологии НТЦ биомедицинской фотоники Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева, Орел, Россия)

**Введение.** Митохондрии являются основными продуцентами внутриклеточного АТФ посредством окислительного фосфорилирования [1]. Дисфункция митохондрий является составляющим элементом различных патологий, особенно в случае клеток с высоким потреблением энергии, к которым относят клетки мозга, скелетных мышц и миокарда [2]. Известно, что на параметры биоэнергетики клеток, в частности на производство АТФ, положительное влияние оказывают такие вещества как холин, сукцинат и никотинамид (НАМ) [3-5]. Данные доклинических исследований показывают, что старение различных тканей сопровождается снижением АТФ и концентрации НАД, который играет центральную роль в энергетическом гомеостазе [3]. Недостаток холина в клетках может способствовать образованию активных форм кислорода (АФК) и приводить к дисфункции комплекса I электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) митохондрий, что вызывает митохондриальную дисфункцию и апоптоз [4]. Сукцинат может быть потенциальным источником энергии для поврежденных митохондрий, увеличивая выработку АТФ и улучшая поддержание митохондриального мембранного потенциала ( $\Delta\Psi_m$ ) [5]. Целью настоящей работы являлось изучение влияния композиции, содержащей холин, сукцинат и НАД, на биоэнергетику клеток.

**Основная часть.** Исследования проводили на первичной смешанной культуре миоцитов и фибробластов, полученной от новорожденных крысят линии Wistar. Все манипуляции с животными и клеточными культурами были одобрены Институциональным этическим комитетом Орловского государственного университета (протокол № 18 от 21.02.2020) в соответствии с законодательством Российской Федерации. Выделение клеток из тканей осуществляли путем ферментативной дезагрегации с использованием коллагеназы с последующим культивированием в ростой среде на основе DMEM с добавлением пирувата, глутамина, пенициллина и стрептомицина. Величину  $\Delta\Psi_m$ , отношение ФАД/ФАДН<sub>2</sub>, а также оценку колокализации митохондрий и лизосом проводили при помощи конфокального микроскопа ZEISS LSM 900 с системой Airyscan 2. Исследование отношения НАДН/НАД и определение времени до полного расходования АТФ клетками проводили на широкопольном флуоресцентном микроскопе с флюоритовым иммерсионным объективом x20.

Одним из основных параметров позволяющих оценить митохондриальную функцию клеток, является  $\Delta\Psi_m$ . Для его оценки клетки инкубировали в 30 нМ растворе TMRM. Изучение способности к поддержанию  $\Delta\Psi_m$  проводили с записью базового сигнала с последующим добавлением композиции веществ (НАМ 80 мкМ, холин 60 мкМ, сукцинат 30 мкМ) и FCCP (3 мкМ). Анализ полученных данных показал, что в клетках первичной культуры наблюдается рост  $\Delta\Psi_m$  после добавления композиции исследуемых веществ. Наблюдаемый эффект, вероятно, происходит за счет увеличения субстратов I и II комплекса, НАДН и сукцината. Дальнейшие исследования были направлены на то, чтобы проверить как данная композиция оказывает влияние на состояние коферментов цикла Кребса – НАДН и ФАДН<sub>2</sub>. Для этого при измерении связанной с данными соединениями автофлуоресценции вносили FCCP и цианид, которые приводят соответственно к минимизации и максимизации содержания восстановленных форм коферментов. Используемые в эксперименте клетки с добавлением исследуемых веществ демонстрируют увеличение отношения НАДН/НАД практически в 2 раза по сравнению с контролем, что может говорить об увеличении количества митохондриальных субстратов. Также комбинация исследуемых веществ снижает отношение

ФАД/ФАДН<sub>2</sub> в 3 раза по сравнению с величиной этого параметра в контрольной культуре. Увеличение содержания восстановленной формы обоих коферментов может говорить об увеличении содержания митохондриальных субстратов, происходящих под влиянием исследуемых соединений. Значимым параметром характеризующем состояние митохондрий является уровень митофагии, так как удаление дисфункциональных митохондрий является важным процессом для обеспечения выживания клеток. При этом накопление нефункциональных митохондрий происходит при развитии различных патологий, а также в стареющих клетках, поэтому стимулирование митофагии может являться способом улучшения клеточного метаболизма. Для визуализации митохондрий и лизосом культуры клеток и регистрации их пространственного перекрытия использовали двойное окрашивание флуоресцирующими зондами MitoTracker Green FM (200 нМ) и LysoTracker Red DND-99 (50 нМ). Можно отметить, что исследуемая комбинация увеличивает интенсивность митофагии в клетках миоцитов почти на 30%. Потребность мышечных клеток в больших количествах АТФ сделала необходимым оценку влияния композиции на их выживаемость в условиях блокирования синтеза макроэрга. Для этого использовали флуоресцентный зонд Mag-Fura-2 AM, резкое изменение сигнала которого происходит при потере клеткой способности поддерживать градиент концентрации ионов кальция относительно цитоплазматической мембраны. Энергетическую емкость клетки определяли как время между применением ингибиторов гликолиза (йодоуксусной кислоты) и АТФ-синтазы (олигомицин А) до момента лизиса клетки. В клетках, не обработанных композицией веществ, время полного расходования АТФ было в среднем на 100 минут меньше, чем у клеток с предварительной инкубацией веществами, что может свидетельствовать о том, что исследуемые соединения оказывают положительное влияние на энергетическую емкость клеток.

**Выводы.** Полученные результаты демонстрируют, что исследуемая комбинация оказывает положительное влияние на биоэнергетические параметры клеток. Мы обнаружили, что за счет окисления сукцината и НАДН, наблюдается рост ΔΨ<sub>m</sub>, а также происходит увеличение содержания коферментов цикла трикарбоновых кислот. При этом исследуемые вещества стимулируют утилизацию нефункциональных митохондрий, что особенно важно для клеток с патологией. Эксперимент по исследованию времени потребления АТФ демонстрирует, что исследуемая композиция оказывает влияние на энергетическую емкость клеток, тем самым улучшая их состояние.

Работа выполнена при поддержке гранта Правительства Российской Федерации №075-15-2022-1095.

#### **Список использованных источников:**

1. Fontana F., Limonta P. The multifaceted roles of mitochondria at the crossroads of cell life and death in cancer // *Free Radical Biology and Medicine*. – V. 176. – 2021. – P. 203-221.
2. Wüst S. et al. Metabolic maturation during muscle stem cell differentiation is achieved by miR-1/133a-mediated inhibition of the Dlk1-Dio3 mega gene cluster // *Cell metabolism*. – 2018. – V. 27. – №. 5. – P. 1026-1039.
3. Chubanava S, Jonas T, Treebak J.T. Regular exercise effectively protects against the aging-associated decline in skeletal muscle NAD content // *Experimental Gerontology*. V. 173. – 2023.
4. Guo W.X., Pye Q.N., Williamson K.S., Stewart C.A., Hensley K.L., Kotake Y., Floyd R.A., Broyles R.H. Mitochondrial dysfunction in choline deficiency-induced apoptosis in cultured rat hepatocytes // *Free Radic Biol Med*. V. 39. – 2005. – P. 641-650.
5. Giorgi-Coll S. et al. Succinate supplementation improves metabolic performance of mixed glial cell cultures with mitochondrial dysfunction // *Scientific reports*. – 2017. – V. 7. – №. 1. – P. 1003.