

СООТНОШЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО И АНТИМИКРОБНОГО ДЕЙСТВИЯ КОНЬЮГАТОВ ТРИФЕНИЛФОСФОНИЯ С РАЗЛИЧНЫМИ ПРОИЗВОДНЫМИ ХИНОНА

© 2024 П.А. Назаров^{1*}, Л.А. Зиновкина², А.А. Брезгунова^{1,2}, К.Г. Лямзаев^{1,3},
А.В. Головин², М.В. Каракозова¹, Е.А. Котова¹, Е.Ю. Плотников¹, Р.А. Зиновкин^{1,3},
М.В. Скулачев^{1,4}, Ю.Н. Антоненко¹

¹ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119991 Москва, Россия; электронная почта: nazarovpa@gmail.com

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991 Москва, Россия

³ ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России,
Российский геронтологический научно-клинический центр, 129226 Москва, Россия

⁴ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
НИИ Митоинженерии, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 04.12.2023

После доработки 30.01.2024

Принята к публикации 21.02.2024

Хиноновые производные трифенилфосфония зарекомендовали себя как эффективные геропротекторы и антиоксиданты, предотвращающие окисление компонентов клетки с участием активных свободных радикалов – пероксидных (RO²·), алкоксильных (RO·), алкильных (R·), а также активных форм кислорода (супероксид-анион, синглетный кислород). Наиболее изученными представителями являются производные пластохинона (SkQ1) и убихинона (MitoQ), которые, помимо антиоксидантных свойств, обладают также сильным антибактериальным действием. В настоящей работе мы исследовали антибактериальные свойства других хиноновых производных на основе децил-трифенилфосфония (SkQ3, SkQT и SkQThy). Нами показано, что, подобно SkQ1, эти соединения в микромолярных концентрациях подавляют рост различных грамположительных бактерий, тогда как в отношении грамотрицательных бактерий они не настолько эффективны, что обусловлено распознаванием производных трифенилфосфония основной помпой множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) грамотрицательных бактерий AcrAB-TolC. Обнаружена зависимость антибактериального действия SkQ1 от количества бактериальных клеток. Важно, что цитотоксическое действие SkQ1 на клетки млекопитающих наблюдается при значительно более высоких концентрациях, чем антибактериальное, что может объясняться: (1) наличием большого количества мембранных органелл, (2) более низким мембранным потенциалом, (3) пространственным разделением процессов генерации энергии и транспорта, (4) разницей в составе помп МЛУ. Различия в цитотоксическом действии у разных типов эукариотических клеток, возможно, связаны со степенью развитости мембранных органелл, энергетическим статусом клетки и уровнем экспрессии помп МЛУ.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: антиоксиданты, SkQ1, помпы МЛУ, AcrAB-TolC, бактерии, культуры клеток млекопитающих, цитотоксичность, антибиотик, митохондрии.

DOI: 10.31857/S0320972524020033 EDN: XNDQBN

ВВЕДЕНИЕ

Бактерии и митохондрии имеют много общего, митохондрии – это клеточные электростанции, генерирующие клеточную энергию в форме

аденозинтрифосфата (АТФ). Митохондрии, как и бактериальные клетки, имеют отрицательный мембранный потенциал (–180 мВ) на внутренней мембране [1], поэтому положительно заряженные соединения накапливаются в митохондриальном матриксе и в бактериальных клетках против градиента их концентрации.

* Адресат для корреспонденции.

В 70-х гг. прошлого века группа Владимира Петровича Скулачева [2–4] предложила использовать производные трифенилфосфония (TRP) как нацеленные на митохондрии вещества, у которых TRP служит «локомотивом» для транспортировки в митохондрии. Два десятилетия спустя группа Майкла Мерфи [5–7] применила этот подход к доставке антиоксидантного фрагмента в митохондрии, что послужило толчком к созданию разнообразных молекул на основе производных трифенилфосфония [8], в том числе серии «ионов Скулачева» – митохондриально-направленных антиоксидантов (МНА), созданных в рамках «мегапроекта» по проникающим ионам для борьбы со старением [9].

МНА на основе производных хинона получили широкое распространение как в исследованиях роли митохондрий в различных физиологических процессах, так и в качестве терапевтических средств [10, 11]. Было показано, что, помимо антиоксидантного действия, эти соединения проявляют разобщающее действие на митохондриях, которое проявляется в стимуляции дыхания и падении мембранного потенциала митохондрий. Причем такое разобщающее действие не обязательно является токсичным для организма, поскольку было показано, что в случае патологий, связанных с окислительным стрессом, частичное разобщение митохондрий обладает защитным действием [12–15], что может быть связано с зависимостью генерации активных форм кислорода (АФК) от мембранного потенциала митохондрий [16]. Предполагаемый механизм разобщающего действия SkQ1 (10-(6'-пластохинонил) децил-трифенилфосфоний) на митохондриальной мембране основан на его способности взаимодействовать с эндогенными жирными кислотами и облегчать диффузию жирных кислот через мембрану за счет электростатического взаимодействия анионов жирных кислот и катионов SkQ1 [17]. Протонированные формы жирных кислот хорошо проникают через мембрану, что обеспечивает циклический трансмембранный перенос протонов, подобно работе обычных протонаторов, таких как 2,4-динитрофенол.

Несмотря на относительное сходство митохондрий и бактерий, долгое время считалось, что МНА, такие как SkQ1, лишены антибактериальных свойств [18], однако впоследствии было показано, что катионы алкил-трифенилфосфония (СпTRP) и SkQ1 оказывают сильное антибактериальное действие на грамположительные и грамотрица-

тельные бактерии [19–20]. Оказалось, что наблюдаемое отсутствие антибактериального действия связано с работой основной помпы множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) AcrAB-TolC у бактерии *Escherichia coli* [20, 21], единственной известной помпы МЛУ бактерий, способной откачивать SkQ1 [22].

Бактерицидное действие SkQ1 делает его перспективным для использования в клинической практике, в частности, для борьбы с инфекциями, вызванными грамположительными бактериями, например, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* или *Mycobacterium tuberculosis* [22–24].

Другие вещества на основе трифенилфосфония также обладали антибактериальным действием: например, сложный эфир флуоресцеина MitoFluo (10-[2-(3-гидрокси-6-оксо-ксантен-9-ил)бензоил] оксидецил-трифенилфосфоний) [25] или конъюгат хлорамфеникола и трифенилфосфония SAM-C10-TRP (N-[[[(1R,2R)-1,3-дигидрокси-1-(4-нитрофенил)пропан-2-ил]амино]-11-оксоундецил-трифенилфосфоний) [26]. При этом химерные молекулы сохраняли свойства своих компонентов. Так, например, молекула SAM-C10-TRP унаследовала от хлорамфеникола способность ингибирования синтеза белка на рибосомах, а от алкил-трифенилфосфония – способность снижать мембранный потенциал на бактериальной мембране. Конъюгаты на основе хинонов, подобные SkQ1 [20], могут проявлять как антиоксидантные, так и антибактериальные свойства, что делает их перспективными объектами исследований.

В настоящей работе была поставлена задача сравнить действие некоторых производных хинона на эукариотические и прокариотические клетки. Было показано, в частности, что почти все производные проявляют антибактериальное действие на грамположительные бактерии, тогда как грамотрицательные бактерии *E. coli* являются устойчивыми, что является результатом работы помпы МЛУ AcrAB-TolC. По своему токсическому действию на клетки млекопитающих такие производные хинонов, как SkQ3 (10-(6'-метилпластохинонил) децил-трифенилфосфоний), SkQT (смесь SkQT-para (10-(6-толукинонил) децил-трифенилфосфоний) и 10-(5-толукинонил) децил-трифенилфосфония) и SkQThy (10-(2-изопропил-5-метил-1,4-бензокинонил-6) децил-трифенилфосфоний), незначительно отличаются от SkQ1, при этом токсическое действие зависит от типа клеток, что может являться следствием разного уровня экспрессии помп МЛУ.

Принятые сокращения: КОЕ – колониеобразующие единицы; МИК – минимальная ингибирующая концентрация; МЛУ – множественная лекарственная устойчивость; МНА – митохондриально-направленные антиоксиданты; SkQs – используемые в работе «ионы Скулачева»; SkQ1 – 10-(6'-пластохинонил) децил-трифенилфосфоний; SkQ3 – 10-(6'-метилпластохинонил) децил-трифенилфосфоний; SkQThy – 10-(2-изопропил-5-метил-1,4-бензокинонил-6) децил-трифенилфосфоний; SkQT-para – 10-(6-толукинонил) децил-трифенилфосфоний; SkQT – смесь SkQT-para и 10-(5-толукинонил) децил-трифенилфосфония; TRP – трифенилфосфоний.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Проникающие катионы (рис. 1) были любезно предоставлены компанией НИИ Митоинженерии МГУ, а их синтез проводился согласно ранее опубликованным методикам [27, 28]. Все прочие реагенты, если не указано особо, – фирмы «Sigma-Aldrich», США.

Бактериальные штаммы. Стандартные лабораторные штаммы *Bacillus subtilis* subs. *subtilis* Cohn 1872, штамм BR151 (*trpC2 lys-3 metB10*) и *E. coli* Castellani and Chalmers 1919, штамм MG1655 (F- λ -*ilvG- rfb-50 rph-1*) были использованы в работе. *S. aureus* Rosenbach 1884 (№ 144) и *Mycobacterium smegmatis* Lehmann and Neumann 1899 (№ 377) были получены из коллекции микроорганизмов МГУ.

Делеционные штаммы ЕСК3026 (Δ *tolC*), ЕСК0456 (Δ *acrB*), ЕСК2465 (Δ *acrD*), ЕСК3253 (Δ *acrF*), ЕСК2071 (Δ *mdtB*), ЕСК3498 (Δ *mdtF*), ЕСК0870 (Δ *macB*), ЕСК2680 (Δ *emrB*) и ЕСК2363 (Δ *emrY*) были любезно предоставлены доктором Х. Ники (Национальный институт генетики, Япония) [29].

Культивирование микроорганизмов. Бактерии растили в среде LB в течение ночи при 30 или 37 °С на шейкере при 200 об./мин до достижения оптической плотности 1,5 при 600 нм. Измерение оптической плотности при 600 нм проводили на спектрофотометре «Ultraspec 1100 pro» («Amersham Biosciences», Великобритания).

Измерение минимальных ингибирующих концентраций. Минимальные ингибирующие концентрации измеряли методом двойных разведений, согласно протоколу [30], рекомендованному Институтом клинических и лабораторных стандартов (CLSI), в жидкой среде Миллера–Хинтона.

TolC – скрининг. Скрининг панели делеционных мутантов TolC-содержащих транспортеров проводили согласно ранее опубликованным работам [20, 21, 31] в среде LB в 96-луночных планшетах («Citotest», Китай). Предварительно выбранные концентрации используемых в работе «ионов Скулачева» (SkQs) (5, 30 и 50 мкМ) добавляли к каждому мутанту, оставляли расти в течение 21 ч при 37 °С, и затем измеряли оптическую плотность при 620 нм с использованием планшетного

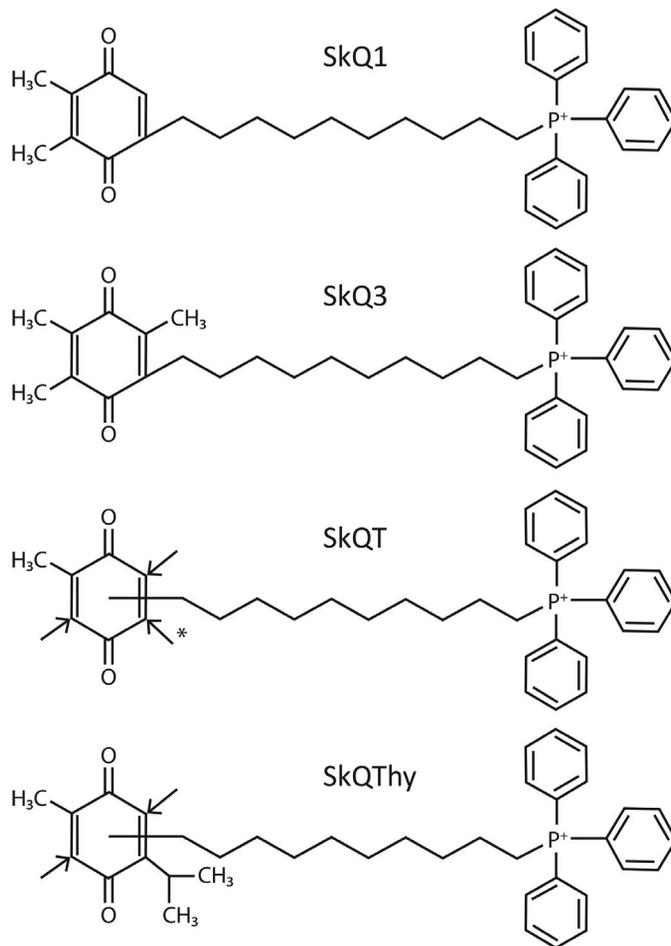


Рис. 1. Структурные формулы катионов используемых в работе «ионов Скулачева» (SkQs). Структуры со стрелками означают смесь изомеров, а стрелки указывают положение децил-трифенилфосфония. Звездочкой (*) указано положение децил-трифенилфосфония для соединения SkQT-para

спектрофотометра Multiskan FC («Thermo Fisher Scientific», США).

Изучение зависимости антибактериального действия от количества клеток. Различные объемы культуры *B. subtilis* добавляли в свежую среду LB, содержащую 1 мкМ SkQ1, и инкубировали 3 ч при 37 °С и 220 об./мин. Измерение оптической плотности при 600 нм проводили на спектрофотометре «Ultrospec 1100 pro».

Изучение влияния объема инкубируемой среды с SkQ1 на выживаемость. Ночную культуру бактерий *S. aureus* разводили до ~15 000 колониеобразующих единиц (КОЕ) на мл и инкубировали 3 ч при 37 °С и 220 об./мин в различных объемах физраствора с глюкозой (0,9% NaCl, 5 мМ D-глюкозы) с 1 мкМ SkQ1, после чего высаживали бактерии на LB-агар для определения КОЕ.

Изучение защитного эффекта мертвых клеток. Убитые клетки *S. aureus* получали прогреванием в течение 90 мин при 65 °С, потерю жизнеспособности бактерий подтверждали высевом на LB-агар. Смесь живых и мертвых клеток *S. aureus* в разных пропорциях инкубировали 3 ч при 37 °С и 220 об./мин с 0,25 мкМ SkQ1 в физрастворе с глюкозой, после чего определяли КОЕ для выживших бактерий.

Моделирование и докинг. Молекулярный докинг проводили с помощью программы QuickVina 2 [32] в составе программных модулей ODDT [33] для Python. Отсутствие информации о сайте связывания и размер белка лишают возможности эффективного сканирования сразу всего объема в одном эксперименте. Для решения этой задачи весь объем был разбит на 10 пересекающихся ячеек для докинга размером 40 × 40 × 40 Å с центром, который смещается на 15 Å с каждым шагом. Докинг был проведен с избыточным сканированием пространства с параметром exhaustiveness = 128 для двух состояний TolC: закрытом (PDB ID: 1ek9) и открытом (PDB ID: 2xmn). Независимые расчеты были сделаны по всем трем осям для полного покрытия объема TolC. Результаты докинга были визуализированы в программе PyMol [34].

Эксперименты с линиями клеток человека RKO и MRC5-SV40. Линии клеток карциномы толстой кишки человека RKO (ATCC CRL-2577) и фибробластов MRC5-SV40 (EACC Cat. No. 84100401) культивировали в модифицированной среде DMEM с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки (FBS), стрептомицина (100 ЕД./мл) и пенициллина (100 ЕД./мл). Жизнеспособность клеток анализировали с использованием реагента CellTiter-Blue («Promega», США). Клетки высевали в 96-луночные планшеты по 10 000 клеток на лунку и культивировали в течение 24 ч при 37 °С. Клетки обрабатывали SkQ1 в течение 17 ч, затем добавляли Cell Titer-Blue (20 мкл на лунку), после чего клетки

инкубировали в течение 1 ч перед регистрацией флуоресценции (ex = 560 нм; em = 590 нм) с помощью флуориметра Fluoroskan Ascent Microplate Fluorometer («Thermo Fisher Scientific»).

Эксперименты с культурами клеток эпителия почечных канальцев. Первичные культуры клеток почечных канальцев получали из почек 5–7-дневных самцов крыс линии Wistar. Почки стерильно выделяли, разрезали на мелкие кусочки и инкубировали с 0,125% коллагеназой II типа («Gibco», «Thermo Fisher Scientific», США) в среде DMEM/F12 без бикарбоната при 37 °С в течение 15 мин.

После инкубации кусочки почек в растворе коллагеназы пипетировали в течение нескольких минут, и полученную суспензию центрифугировали в течение 5 мин при 400 g для осаждения фракции канальцев. Полученный осадок ресуспендировали в полной питательной среде, состоящей из DMEM/F-12 (1/1), содержащей 10% FBS, 2% аминокислот, 1% витаминов и 1% L-глутамин, и высевали в 96-луночный планшет. Клетки культивировали в инкубаторе в атмосфере 5% CO₂. Через 24 ч после посева клеток проводили смену культуральной среды для удаления клеточного дебриса. Через 24 ч добавляли SkQT, SkQ3 и SkQ1 в концентрации 0,125, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16 и 32 мкМ и инкубировали клетки эпителия почечных канальцев с этими веществами в течение 24 ч в полной питательной среде. Контрольные клетки инкубировали в той же среде без добавления SkQT, SkQ3 и SkQ1. Жизнеспособность клеток была оценена с помощью стандартного МТТ-теста, для чего культуральную среду заменяли на DMEM/F-12 без бикарбоната с 5 мг/мл реагента МТТ и инкубировали в течение 1 ч. Затем среду удаляли и в каждую лунку добавляли по 50 мкл ДМСО. Поглощение формазана измеряли при 540 нм с использованием планшетного спектрофлуориметра Zenyth 3100 («Anthos Labtec», Австрия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Антибактериальное действие SkQs. Ранее было показано, что добавление микромолярных концентраций SkQ1 или C₁₂TPP к бактериям приводит к угнетению их роста и бактерицидному действию [20, 24]. В табл. 1 показаны измеренные нами минимальные ингибирующие концентрации (МИК) для трех грамположительных (*B. subtilis*, *S. aureus*, *M. smegmatis*) и одной грамотрицательной бактерии (*E. coli*). Для всех исследованных нами SkQs были получены сравнимые с SkQ1 значения МИК в отношении как грамположительных бактерий, так и грамотрицательной *E. coli*. Так же, как и в случае с SkQ1, все исследованные

Таблица 1. Минимальные ингибирующие концентрации (мкМ)

SkQs	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>E. coli</i>	$\Delta tolC$	$\Delta acrB$	Другие*
SkQ1	1	1	1	35	1	1	35
SkQ3	1	1	1	35	1	1	35
SkQT	2	2	2	35	2	2	35
SkQT-para	1	1	1	35	1	1	35
SkQThy	1	1	1	35	1	1	35

Примечание. Звездочкой (*) обозначены делеционные мутанты по другим белкам TolC-содержащих помп (*AcrD*, *AcrF*, *MdtB*, *MdtF*, *MacB*, *EmrB* и *EmrY*).

нами SkQs продемонстрировали антибактериальное действие только в отношении делеционных мутантов по генам *tolC* и *acrB*, тогда как в отношении других делеционных мутантов по генам *acrD*, *acrF*, *mdtB*, *mdtF*, *macB*, *emrB* и *emrY* антибактериальная активность была сравнима с активностью в отношении дикого типа *E. coli*. Значения МИК для всех делеционных мутантов (за исключением $\Delta tolC$ и $\Delta acrB$) были близки в отношении всех SkQs, указывая на то, что, как и в случае с SkQ1, все остальные SkQs также откачиваются только помпой МЛЮ AcrAB-TolC.

Докинг SkQ1 в TolC. Полученные нами данные говорят о важной роли помпы МЛЮ AcrAB-TolC в бактериальной резистентности для SkQ1 [20–22]. Нами была начата работа по моделированию процесса взаимодействия SkQ1 с данной помпой. На первом этапе были выполнены расчеты молекулярного докинга с компонентом помпы TolC. Результаты докинга (рис. 2) позволяют заключить,

что в целом на внутренней поверхности TolC в обоих состояниях (закрытом и открытом) нет явно выраженных карманов связывания для SkQ1, тем не менее интересная кластеризация состояний возникает на входе в помпу в закрытом состоянии, где фосфониевая группа взаимодействует с обильно представленными остатками Glu и Asp, ароматические кольца образуют стэкинг с тремя остатками тирозина, а Asp371 образует водородные связи с хиноном. К сожалению, оценочные функции для ранжирования в результатах докинга не позволяют даже примерно оценить аффинность такого связывания. Можно заключить, что самым специфическим местом связывания SkQ1 в TolC является вход в помпу в закрытом состоянии.

Антибактериальная активность зависит от количества клеток. Несмотря на то что SkQ1 может рассматриваться как антибактериальный агент или антибиотик, его свойства все же отличаются от традиционных антибиотиков.

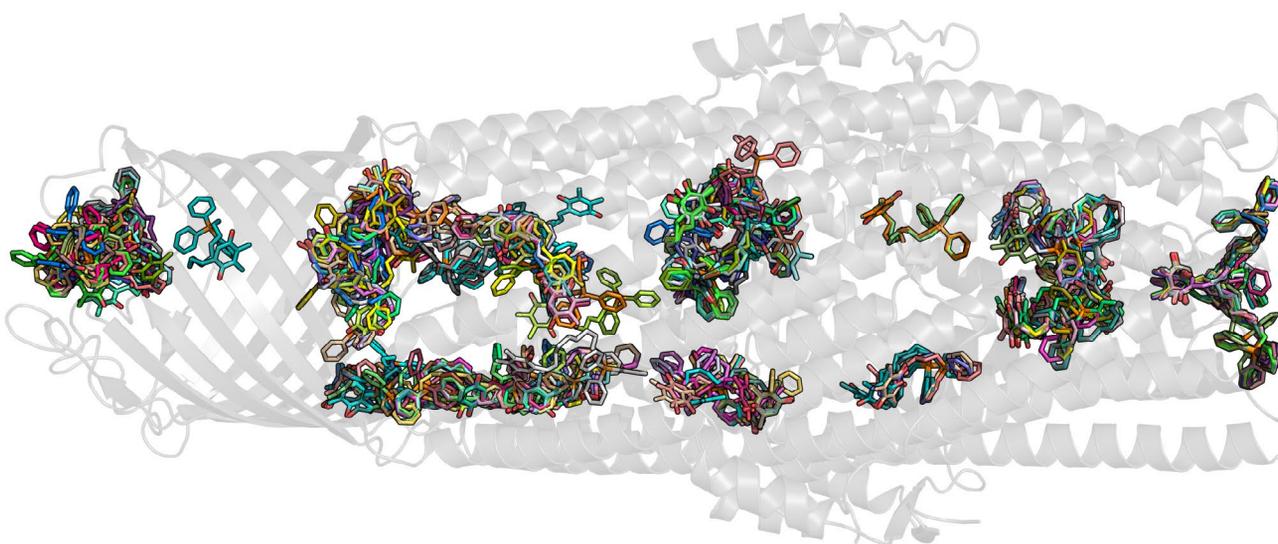


Рис. 2. Результаты моделирования докинга SkQ1 во внутреннюю полость TolC в закрытом состоянии. Серым представлена структура TolC с отображением элементов вторичной структуры. В виде отображения ковалентных связей разными цветами показаны позы SkQ1

Таблица 2. Повышение минимальной ингибирующей концентрации SkQ1 при добавлении экзогенных жирных кислот (мкМ)

Кислота	Формула	Жирная кислота, мкМ	МИК SkQ1, мкМ
Миристиновая кислота	$C_{14}H_{28}O_2$	0,5	2–4
Пальмитиновая кислота	$C_{16}H_{32}O_2$	0,5	2–4
Стеариновая кислота	$C_{18}H_{36}O_2$	0,5	2–4
Линолевая кислота	$C_{18}H_{32}O_2$	0,5	2–4
Без добавок		0	1

Примечание. Добавление жирных кислот не влияло на скорость роста популяции *B. subtilis*.

В отличие от других антибиотиков, активность SkQ1 зависит от количества клеток, что объясняется его липофильностью и протонфороподобными свойствами, позволяющими ему снижать мембранный потенциал бактерий. На рис. 3, а показаны кривые роста в течение 6 ч при добавлении разного количества клеток ночной культуры *B. subtilis* в среду с одинаковой концентрацией SkQ1. Полученные результаты свидетельствуют о том, что антибактериальное действие липофильного катиона SkQ1 снижается при увеличении количества клеток, а, следовательно, и мембран/липидов в них. Таким образом, несмотря на то что протонфороподобное действие SkQ1 опосредовано свободными жирными кислотами, добавление экзогенных жирных кислот может приводить не к усилению протонфорного действия, а к защитному действию вследствие конкуренции за SkQ1

мицелл жирных кислот с бактериальными клетками [35]. Ранее такой защитный механизм был описан для *S. aureus*, который был устойчив к даптомицину за счет снижения активности антибиотика посредством выделения во внешнюю среду мембранных фосфолипидов, в мицеллы которых он встраивается [36]. В случае добавления экзогенных жирных кислот мы наблюдали защитный эффект (табл. 2): МИК увеличивался в 2–4 раза, что дополнительно подтверждает зависимость антибактериального действия от количества мембран/липидов или мицелл. При этом необходимо отметить, что добавление экзогенных жирных кислот не оказывало негативного влияния на рост бактериальных клеток без добавления SkQ1.

Защитный эффект популяции мертвых клеток от действия SkQ1. Добавление убитых нагреванием бактерий к живым *S. aureus* предотвращало

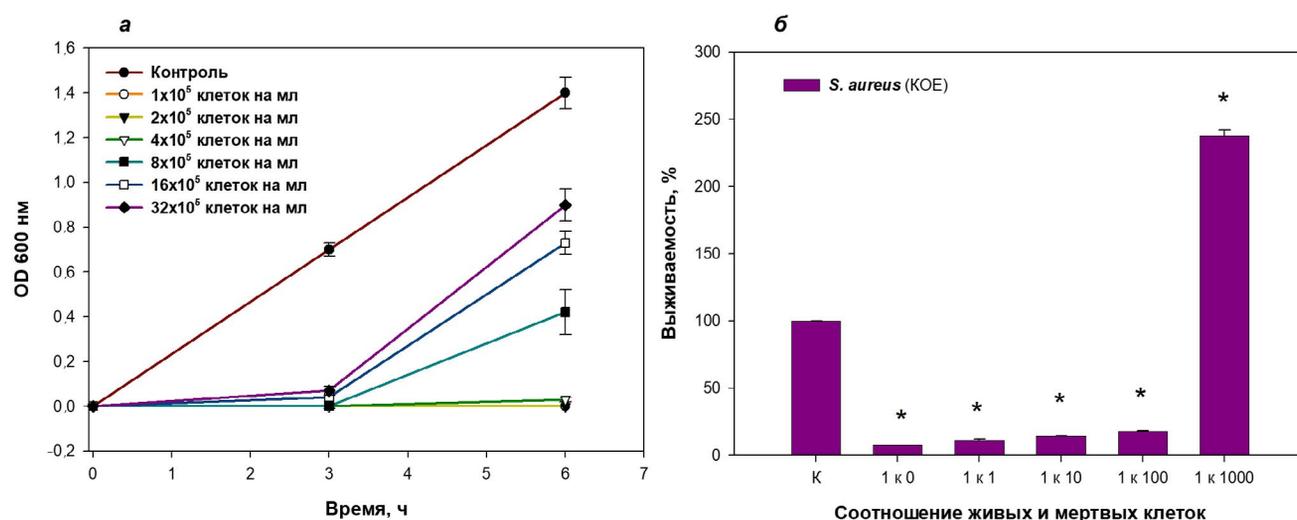


Рис 3. Антибактериальное действие зависит от числа клеток. а – Зависимость антибактериального действия 0,5 мкМ SkQ1 от количества клеток *B. subtilis*. б – Влияние мертвых клеток *S. aureus* на выживаемость бактерий под действием SkQ1. Бактерии в концентрации ~60 000 КОЕ на мл инкубировали 3 ч при 37 °С в физрастворе с глюкозой (0,9% NaCl, 5 мМ D-глюкозы, 1 мкМ SkQ1). Контрольные клетки (К) инкубировали без SkQ1. Приведены относительные результаты выживаемости бактерий (КОЕ) при инкубации с 0,5 мкМ SkQ1 в присутствии кратных количеств мертвых бактерий (1 к 1; 1 к 10; 1 к 100; 1 к 1000). Указано среднее значение ± SEM, n = 4. * p < 0,01 при сравнении с контролем (К) по непарному t-тесту Стьюдента

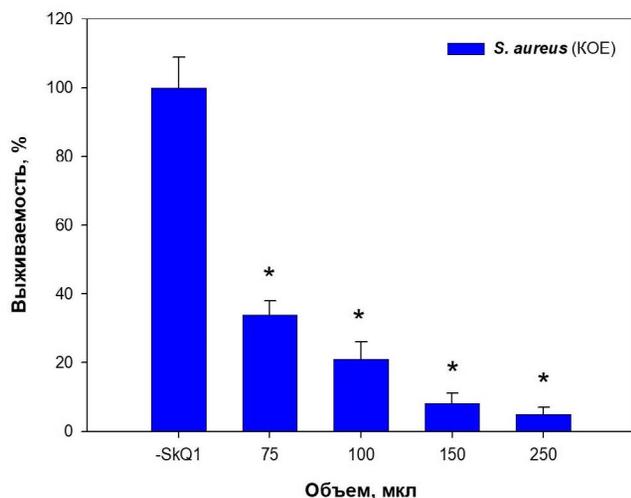


Рис. 4. Выживаемость *S. aureus* в различных объемах среды инкубации с 1 мкМ SkQ1. Бактерии в концентрации ~15 000 КОЕ на мл инкубировали 3 ч при 37 °С в различных объемах смеси (0,9% NaCl, 5 мМ Д-глюкозы, 1 мкМ SkQ1). Приведены результаты выживаемости бактерий (КОЕ). Указано среднее значение ± SEM, $n = 4$. * $p < 0,01$ при сравнении с контролем (-SkQ1) по непарному t -тесту Стьюдента

гибель живых *S. aureus* от SkQ1, причем чем больше присутствовало убитых бактерий, тем сильнее был выражен защитный эффект (рис. 3, б). Интересно, что при 1000-кратном избытке мертвых бактерий происходила даже стимуляция их роста относительно контроля примерно в 2 раза, что может объясняться не только сорбцией SkQ1 на мертвых клетках и предотвращением его токсического действия, но и наличием в среде инкубации метаболитов из мертвых клеток, используемых

живыми бактериями для роста и размножения (некротрофический рост) [37].

Объем среды инкубации влияет на выживаемость бактерий под действием SkQ1. При инкубации *S. aureus* с 1 мкМ SkQ1 было обнаружено, что увеличение объема среды инкубации приводит к значительному снижению выживаемости бактерий (рис. 4), что свидетельствует, по всей видимости, о способности бактерий аккумулировать SkQ1 из среды инкубации.

Действие SkQs на эукариотические клетки. Хотя, согласно теории [27], митохондрии эукариотических клеток должны накапливать на порядок больше SkQs, чем прокариотические клетки, эксперименты на различных культурах клеток показывают, что цитотоксическое действие наступает при более высоких концентрациях, чем у прокариотических клеток.

SkQT, SkQ3 и SkQ1 оказывали выраженное цитотоксическое действие на клетки первичной культуры почечных канальцев крыс лишь в концентрации 32 мкМ (рис. 5, а), которая более чем на 2 порядка превосходит МИК для грамположительных бактерий и сравнима с МИК для *E. coli*.

Клетки первичной культуры почечных канальцев, обработанные SkQT в концентрациях 0,125–16 мкМ, не показали снижения жизнеспособности по сравнению с контрольной группой. Более того, в концентрации 1 мкМ, которая является МИК для грамположительных бактерий, SkQT увеличивал выживаемость клеток. При инкубации с SkQ3 наблюдалась тенденция к увеличению жизнеспособности клеток вплоть до концентрации 2 мкМ. Однако в концентрации 4 мкМ и более SkQ3 уже приводил к некоторому снижению

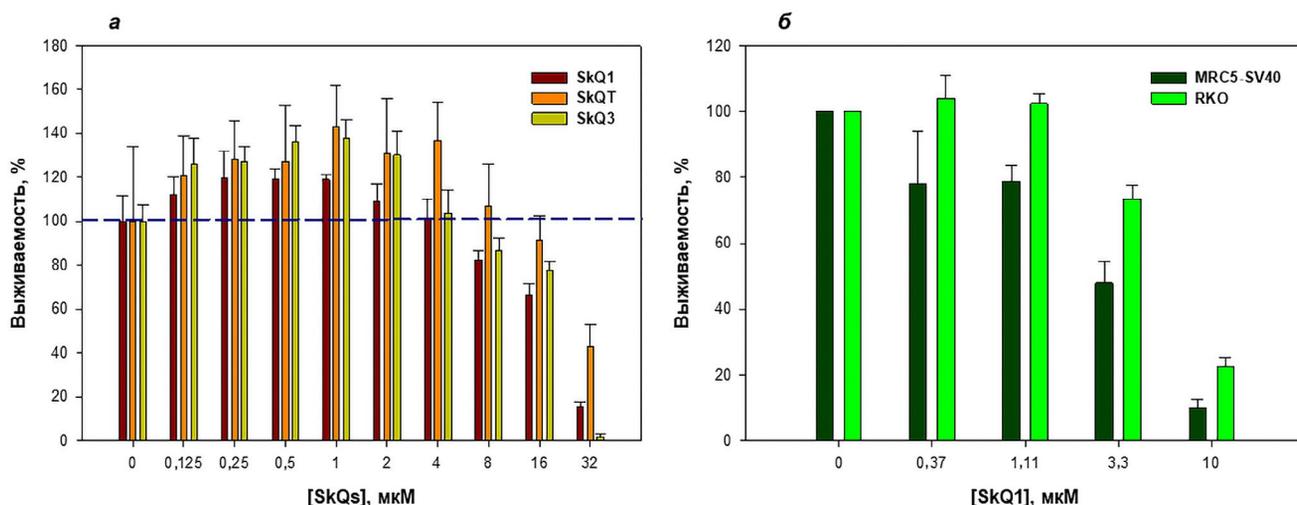


Рис. 5. Оценка жизнеспособности клеток млекопитающих при добавлении SkQs. а – Жизнеспособность клеток первичной культуры почечных канальцев крыс после добавления SkQs. Клетки инкубировали в течение 24 ч. Жизнеспособность клеток определяли с помощью МТТ-теста. б – Жизнеспособность клеток карциномы толстой кишки человека RKO и фибробластов MRC5-SV40 после добавления SkQ1. Клетки инкубировали в течение 17 ч. Жизнеспособность клеток определяли с помощью CellTiter-Blue Reagent («Promega», США)

жизнеспособности. SkQ1 в концентрации 0,125–4 мкМ не снижал жизнеспособность клеток первичной культуры почечных канальцев, а концентрации 0,5 и 1 мкМ улучшали выживаемость клеток. Увеличение концентрации выше 8 мкМ приводило к снижению жизнеспособности клеток. Таким образом, токсичность для клеток первичной культуры была сравнима с наблюдаемой нами ранее в отношении иммортализованных раковых клеток HeLa [20].

Совсем другая ситуация наблюдалась с клеточными линиями карциномы толстой кишки человека RKO и фибробластов MRC5-SV40 (рис. 5, б). Клетки легочных фибробластов человека MRC5-SV40 также не демонстрировали цитотоксичности при концентрации 1 мкМ SkQ1, однако уже к 10 мкМ наблюдалось значительное снижение жизнеспособности. Для клеток карциномы RKO уже концентрация 1 мкМ SkQ1 вызывала заметную цитотоксичность. При концентрации 10 мкМ выживаемость сохранялась на уровне лишь 10%. Таким образом, токсичность была значительно выше наблюдаемой нами ранее в отношении клеток HeLa [20], что говорит, по-видимому, о разнице в метаболизме и в экспрессии генов у этих иммортализованных клеток.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Несмотря на существенный прогресс в изучении МНА, механизмы их действия на прокариотические и эукариотические клетки остаются не до конца изученными. Так же, как хорошо изученный МНА – SkQ1, другие хиноновые производные, такие как SkQT [38, 39], SkQThy [40, 41], SkQ3 [9, 42], обладали ярко выраженными антиоксидантными свойствами, однако ни для одного из них антибактериальное действие не было продемонстрировано экспериментально.

Все без исключения живые клеточные организмы имеют в своем составе помпы МЛУ, локализованные на клеточной мембране. У бактерий имеется 6 классов помп, которые подразделяются на две большие группы: АТФ-зависимые помпы и H^+/Na^+ градиент-зависимые помпы [43], поэтому было очень вероятно, что какая-то из них может распознать SkQs и начать их откачивать, тем самым повышая резистентность бактерий. Тем удивительней тот факт, что мы наблюдаем – все исследованные нами SkQs откачиваются единственной помпой, AcrAB-TolC.

Таким образом, если только помпа AcrAB-TolC может откачивать SkQs, то многие грамположительные бактерии будут чувствительны к SkQs, так как у них подобных помп просто не может быть (за исключением, возможно, Negativicutes).

В случае грамотрицательных бактерий, у которых существование подобной помпы возможно, резистентность будет зависеть от наличия помпы AcrAB-TolC или схожей помпы, структура которой близка к структуре помпы AcrAB-TolC из *E. coli* [22]. В случае эукариот, например дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, откачка SkQ1 происходит за счет работы как минимум нескольких АТФ-зависимых помп, включая Pdr5 [44].

При этом у эукариот основными помпами МЛУ являются АТФ-зависимые помпы, так как процесс генерации энергии разобщен с процессом транспорта веществ и происходит в митохондриях, а не на плазматической мембране. Таким образом, снижение мембранного потенциала за счет протонифороподобного цикла SkQ1 приводит к остановке работы H^+/Na^+ градиент-зависимых помп (таких, как AcrAB-TolC, например) у прокариот, но не приводит к остановке АТФ-зависимых помп у эукариот.

В отличие от прокариот, где есть достаточная ясность в механизме цитотоксического действия SkQ1 и защиты от него, в случае эукариот, такой ясности нет. Действительно, теоретически митохондрии эукариот должны закачивать на порядок больше SkQs, чем бактериальные клетки. Разность электрических потенциалов между внеклеточной средой и матриксом митохондрий у эукариот составляет примерно –240 мВ (~ –60 мВ на плазматической мембране и –180 мВ на внутренней мембране митохондрий), тогда как потенциал на бактериальной мембране всего –180 мВ. Поскольку на плазматической мембране эукариот имеется меньший электрический потенциал, чем на клеточной мембране бактерий, накопление SkQs в цитоплазме эукариотических клеток должно быть менее эффективно, чем в бактериальных клетках. Необходимо отметить, что работа помпы AcrAB-TolC грамотрицательных бактерий также всего лишь снижает скорость накопления SkQs на внутренней мембране бактерий, что дает шанс грамотрицательным бактериям увеличить биомассу и за счет клеточного деления уменьшить тем самым соотношение SkQs и мембранных фракций. Наши эксперименты по изучению зависимости антибактериального действия SkQ1 от количества клеток и наличия мертвых клеток являются подтверждением этого вывода.

Другим механизмом, защищающим эукариотические клетки от токсического действия SkQs, является наличие мембранных органелл (внутриклеточные вакуоли, аппарат Гольджи, эндоплазматический ретикулум, лизосомы, эндосомы и др.), в которых липофильные молекулы SkQs могут временно депонироваться, что также снижает скорость накопления SkQs уже на внутренней мембране митохондрий. Наши эксперименты по влиянию добавления экзогенных жирных кислот

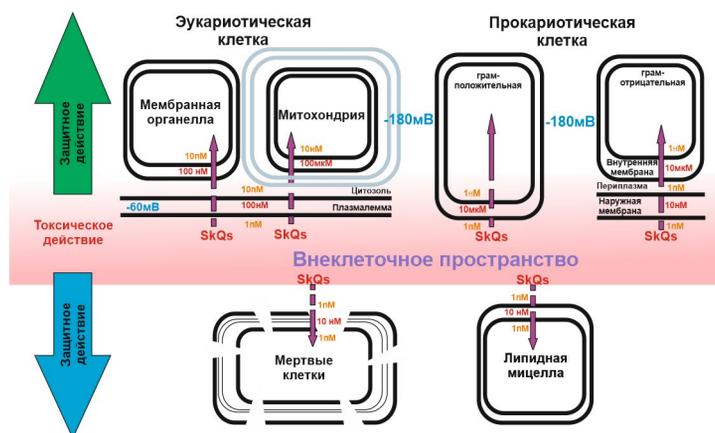


Рис. 6. Схема, иллюстрирующая накопление SkQs в эукариотических и прокариотических клетках, и защитный эффект мембранных внутриклеточных органелл, липидных/мембранных мицелл, мертвых клеток из-за депонирования SkQs в них и живых клеток за счет уменьшения соотношения SkQs/мембраны ([27], с изменениями)

на антибактериальное действие SkQ1 являются подтверждением этого вывода. На рис. 6 представлена схема распределения проникающего катиона SkQ вне и внутри клеток эукариот (слева) и прокариот (справа). Для определенности мы предполагаем на этой схеме, что вне клеток концентрация SkQ составляет 1 пМ, причем внешнее пространство представляет бесконечный источник соединения. Тогда в результате накопления по потенциалу в цитоплазме эукариотических клеток концентрация составляет 10 пМ, а внутри плазматической мембраны – ~100 нМ из-за высокого коэффициента распределения мембрана–вода. В случае прокариотических клеток концентрация в цитоплазме должна быть 1000 пМ = 1 нМ. При этом в матриксе митохондрий внутри эукариотических клеток должно накопиться ~10 нМ SkQ. При ограниченном источнике SkQ вне клеток, что должно быть в реальной ситуации, концентрация SkQ внутри митохондрий должна быть ниже 10 нМ из-за наличия в клетках других мембранных органелл, которые должны эффективно накапливать гидрофобный SkQ. Аналогично, мертвые клетки и липидные мицеллы вне клетки в реальной ситуации будут эффективно накапливать гидрофобный SkQ и также снижать концентрацию SkQ внутри живых клеток.

Значения $\Delta\psi$ на плазматической мембране и внутренней мембране митохондрий принимаются равными –60 и –180 мВ соответственно. Коэффициент распределения мембрана/вода для SkQ принимается равным 10 000 : 1 [27].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами результаты позволяют заключить, что антибактериальная активность SkQs зависит от количества липидных компонен-

тов мембран или мицелл (рис. 6). Это позволяет нам сформулировать несколько основных причин, определяющих повышенную резистентность эукариотических клеток, а именно: (1) наличие у эукариотических клеток большого количества мембранных органелл (эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи и др.), которые депонируют в себе некоторое количество SkQs; (2) разница в потенциале на клеточной мембране у прокариот (~180 мВ) и у эукариот (~60 мВ), что обуславливает не такое быстрое проникновение SkQs в эукариотическую клетку; (3) пространственное разделение у эукариот процессов генерации энергии (митохондрии) и транспорта (клеточная мембрана) в отличие от совмещения этих процессов на клеточной мембране прокариот; (4) разница в составе помп МЛУ на мембране эукариот (в основном АТФ-зависимые помпы) и прокариот (в основном H^+/Na^+ градиент-зависимые помпы). Совместно все эти основные четыре фактора и определяют ту повышенную устойчивость эукариотических клеток в сравнении с теоретически ожидаемой чувствительностью. Разница в чувствительности различных типов эукариотических клеток определяется, по-видимому: (1) степенью развитости мембранных органелл (системы эндосом, аппарата Гольджи и др.); (2) энергетическим статусом клеток [45]; (3) уровнем экспрессии помп МЛУ в них.

Вклад авторов. П.А. Назаров, Ю.Н. Антоненко, М.В. Скулачев, Р.А. Зиновкин, Е.Ю. Плотников – концепция и руководство работой; П.А. Назаров, Л.А. Зиновкина, А.А. Брезгунова, К.Г. Лямзаев, А.В. Головин – проведение экспериментов; П.А. Назаров, Ю.Н. Антоненко, М.В. Скулачев, Р.А. Зиновкин, Е.Ю. Плотников, М.В. Каракозова, А.В. Головин, К.Г. Лямзаев – обсуждение результатов исследования; П.А. Назаров, М.В. Скулачев, А.В. Головин, Е.А. Котова, Р.А. Зиновкин, Е.Ю. Плотников,

М.В. Каракозова, Ю.Н. Антоненко – написание текста; П.А. Назаров, Е.А. Котова, Е.Ю. Плотников, М.В. Каракозова – редактирование текста статьи.

Благодарности. Авторы выражают благодарность Н.В. Сумбатян за помощь в работе и плодотворное обсуждение результатов.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-15-00099 (Назаров П.А.)). Эксперименты на клеточных линиях человека выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-14-00061 (Лямзаев К.Г.)). Молекулярный докинг выполнен при поддержке Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Мозг, ког-

нитивные системы, искусственный интеллект» (Головин А.В.).

Конфликт интересов. Скулачев М.В. является директором компании «Митотех», разрабатывающей и коммерциализирующей лекарственные препараты на основе МНА класса SkQ. Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Протоколы работы с животными были одобрены Этическим комитетом по работе с животными НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова (Протокол № 3/19 от 18 марта 2019 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Zorova, L. D., Popkov, V. A., Plotnikov, E. Y., Silachev, D. N., Pevzner, I. B., Jankauskas, S. S., Babenko, V. A., Zorov, S. D., Balakireva, A. V., Juhaszova, M., Sollott, S. J., and Zorov, D. B. (2018) Mitochondrial membrane potential, *Anal. Biochem.*, **552**, 50-59, <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.07.009>.
- Liberman, E. A., Topaly, V. P., Tsofina, L. M., Jasaitis, A. A., and Skulachev, V. P. (1969) Mechanism of coupling of oxidative phosphorylation and the membrane potential of mitochondria, *Nature*, **222**, 1076-1078, <https://doi.org/10.1038/2221076a0>.
- Grinius, L. L., Jasaitis, A. A., Kadziauskas, Y. P., Liberman, E. A., Skulachev, V. P., Topali, V. P., Tsofina, L. M., and Vladimirova, M. A. (1970) Conversion of biomembrane-produced energy into electric form. I. Submitochondrial particles, *Biochim. Biophys. Acta*, **216**, 1-12, [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(70\)90153-2](https://doi.org/10.1016/0005-2728(70)90153-2).
- Liberman, E. A., and Skulachev, V. P. (1970) Conversion of biomembrane-produced energy into electric form. IV. General discussion, *Biochim. Biophys. Acta*, **216**, 30-42, [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(70\)90156-8](https://doi.org/10.1016/0005-2728(70)90156-8).
- Burns, R. J., Smith, R. A., and Murphy, M. P. (1995) Synthesis and characterization of thiobutyltriphenylphosphonium bromide, a novel thiol reagent targeted to the mitochondrial matrix, *Arch. Biochem. Biophys.*, **322**, 60-68, <https://doi.org/10.1006/abbi.1995>.
- Murphy, M. P. (1997) Selective targeting of bioactive compounds to mitochondria, *Trends Biotechnol.*, **15**, 326-330, [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(97\)01068-8](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(97)01068-8).
- Smith, R. A., Porteous, C. M., Coulter, C. V., and Murphy, M. P. (1999) Selective targeting of an antioxidant to mitochondria, *Eur. J. Biochem.*, **263**, 709-716, <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00543.x>.
- Zielonka, J., Joseph, J., Sikora, A., Hardy, M., Ouari, O., Vasquez-Vivar, J., Cheng, G., Lopez, M., and Kalyanaram, B. (2017) Mitochondria-targeted triphenylphosphonium-based compounds: syntheses, mechanisms of action, and therapeutic and diagnostic applications, *Chem. Rev.*, **117**, 10043-10120, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00042>.
- Skulachev, V. P. (2007) A biochemical approach to the problem of aging: “megaproject” on membrane-penetrating ions. The first results and prospects, *Biochemistry (Moscow)*, **72**, 1385-1396, <https://doi.org/10.1134/s0006297907120139>.
- Skulachev, V. P., Antonenko, Y. N., Cherepanov, D. A., Chernyak, B. V., Izyumov, D. S., Khailova, L. S., Klishin, S. S., Korshunova, G. A., Lyamzaev, K. G., Pletjushkina, O. Y., Roginsky, V. A., Rokitskaya, T. I., Severin, F. F., Severina, I. I., Simonyan, R. A., Skulachev, M. V., Sumbatyan, N. V., Sukhanova, E. I., Tashlitsky, V. N., Trendeleva, T. A., Vyssokikh, M. Y., and Zvyagilskaya, R. A. (2010) Prevention of cardiolipin oxidation and fatty acid cycling as two antioxidant mechanisms of cationic derivatives of plastoquinone (SkQs), *Biochim. Biophys. Acta*, **1797**, 878-889, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.03.015>.
- Murphy, M. P., and Smith, R. J. A. (2007) Targeting antioxidants to mitochondria by conjugation to lipophilic cations, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **47**, 629-656, <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.47.120505>.
- Cunha, F. M., Caldeira da Silva, C. C., Cerqueira, F. M., and Kowaltowski, A. J. (2011) Mild mitochondrial uncoupling as a therapeutic strategy, *Curr. Drug Targets*, **12**, 783-789, <https://doi.org/10.2174/138945011795528778>.
- Zorov, D. B., Andrianova, N. V., Babenko, V. A., Pevzner, I. B., Popkov, V. A., Zorov, S. D., Zorova, L. D., Plotnikov, E. Y., Sukhikh, G. T., and Silachev, D. N. (2021) Neuroprotective potential of mild uncoupling in mitochondria. Pros and cons, *Brain Sci.*, **11**, 1050, <https://doi.org/10.3390/brainsci11081050>.

14. Shabalina, I. G., and Nedergaard, J. (2011) Mitochondrial ('mild') uncoupling and ROS production: physiologically relevant or not? *Biochem Soc Trans.*, **39**, 1305-1309, <https://doi.org/10.1042/BST0391305>.
15. Starkov, A. A. (1997) "Mild" uncoupling of mitochondria, *Biosci. Rep.*, **17**, 273-279, <https://doi.org/10.1023/a:1027380527769>.
16. Korshunov, S. S., Skulachev, V. P., and Starkov, A. A. (1997) High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria, *FEBS Lett.*, **416**, 15-18, [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(97\)01159-9](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(97)01159-9).
17. Severin, F. F., Severina, I. I., Antonenko, Y. N., Rokitskaya, T. I., Cherepanov, D. A., Mokhova, E. N., Vyssokikh, M. Y., Pustovidko, A. V., Markova, O. V., Yaguzhinsky, L. S., Korshunova, G. A., Sumbatyan, N. V., Skulachev, M. V., and Skulachev, V. P. (2010) Penetrating cation/fatty acid anion pair as a mitochondria-targeted protonophore, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 663-668, <https://doi.org/10.1073/pnas.0910216107>.
18. Anisimov, V. N., Egorov, M. V., Krasilshchikova, M. S., Lyamzaev, K. G., Manskikh, V. N., Moshkin, M. P., Novikov, E. A., Popovich, I. G., Rogovin, K. A., Shabalina, I. G., Shekarova, O. N., Skulachev, M. V., Titova, T. V., Vygodin, V. A., Vyssokikh, M. Y., Yurova, M. N., Zabezinsky, M. A., and Skulachev, V. P. (2011) Effects of the mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 on lifespan of rodents, *Aging*, **3**, 1110-1119.
19. Khailova, L. S., Nazarov, P. A., Sumbatyan, N. V., Korshunova, G. A., Rokitskaya, T. I., Dedukhova, V. I., Antonenko, Y. N., and Skulachev, V. P. (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, <https://doi.org/10.1134/S000629791512007X>.
20. Nazarov, P. A., Osterman, I. A., Tokarchuk, A. V., Karakozova, M. V., Korshunova, G. A., Lyamzaev, K. G., Skulachev, M. V., Kotova, E. A., Skulachev, V. P., and Antonenko, Y. N. (2017) Mitochondria-targeted antioxidants as highly effective antibiotics, *Sci. Rep.*, **7**, 1394, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00802-8>.
21. Nazarov, P. A., Kotova, E. A., Skulachev, V. P., and Antonenko, Y. N. (2019) Genetic variability of the Acr-AB-TolC multidrug efflux pump underlies SkQ1 resistance in gram-negative bacteria, *Acta Naturae*, **11**, 93-98, <https://doi.org/10.32607/20758251-2019-11-4-93-98>.
22. Nazarov, P. A., Sorochkina, A. I., and Karakozova, M. V. (2020) New functional criterion for evaluation of homologous MDR pumps, *Front. Microbiol.*, **11**, 592283, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.592283>.
23. Churilov, M. N., Denisenko, Y. V., Batyushin, M. M., Bren, A. B., and Chistyakov, V. A. (2018) Prospects of SkQ1 (10-(6'-plastoquinoyl) decyltriphenylphosphonium) application for prevention of oral cavity diseases, *Rasayan J. Chem.*, **11**, 1594-1603.
24. Nazarov, P. A., Majorov, K. B., Apt, A. S., and Skulachev, M. V. (2023) Penetration of triphenylphosphonium derivatives through the cell envelope of bacteria of *Mycobacteriales* order, *Pharmaceuticals (Basel)*, **16**, 688, <https://doi.org/10.3390/ph16050688>.
25. Nazarov, P. A., Kirsanov, R. S., Denisov, S. S., Khailova, L. S., Karakozova, M. V., Lyamzaev, K. G., Korshunova, G. A., Lukyanov, K. A., Kotova, E. A., and Antonenko, Y. N. (2020) Fluorescein derivatives as antibacterial agents acting via membrane depolarization, *Biomolecules*, **10**, 309, <https://doi.org/10.3390/biom10020309>.
26. Pavlova, J. A., Khairullina, Z. Z., Tereshchenkov, A. G., Nazarov, P. A., Lukianov, D. A., Volynkina, I. A., Skvortsov, D. A., Makarov, G. I., Abad, E., Murayama, S. Y., Kajiwarra, S., Paleskava, A., Konevega, A. L., Antonenko, Y. N., Lyakhovich, A., Osterman, I. A., Bogdanov, A. A., and Sumbatyan, N. V. (2021) Triphenylphosphonium analogs of chloramphenicol as dual-acting antimicrobial and antiproliferating agents, *Antibiotics (Basel)*, **10**, 489, <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050489>.
27. Antonenko, Y. N., Avetisyan, A. V., Bakeeva, L. E., Chernyak, B. V., Chertkov, V. A., Domnina, L. V., Ivanova, O. Y., Izyumov, D. S., Khailova, L. S., Klishin, S. S., Korshunova, G. A., Lyamzaev, K. G., Muntyan, M. S., Nepryakhina, O. K., Pashkovskaya, A. A., Pletjushkina, O. Y., Pustovidko, A. V., Roginsky, V. A., Rokitskaya, T. I., Ruuge, E. K., Saprunova, V. B., Severina, I. I., Simonyan, R. A., Skulachev, I. V., Skulachev, M. V., Sumbatyan, N. V., Sviryaeva, I. V., Tashlitsky, V. N., Vassiliev, J. M., Vyssokikh, M. Y., Yaguzhinsky, L. S., Zamyatnin, A. A. Jr., and Skulachev, V. P. (2008) Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 1. Cationic plastoquinone derivatives: synthesis and *in vitro* studies, *Biochemistry (Moscow)*, **73**, 1273-1287, <https://doi.org/10.1134/s0006297908120018>.
28. Korshunova, G. A., Shishkina, A. V., and Skulachev, M. V. (2017) Design, synthesis, and some aspects of the biological activity of mitochondria-targeted antioxidants, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 760-777, <https://doi.org/10.1134/S0006297917070021>.
29. Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., et al. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection, *Mol. Syst. Biol.*, **2**, 2006.0008, <https://doi.org/10.1038/msb4100050>.
30. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2012) Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, 9th ed.; CLSI Document M07-A9, Approved Standard; CLSI: Wayne, PA, USA; Vol. 32, URL: https://clsi.org/media/1928/m07ed11_sample.pdf.

31. Eshboev, F., Karakozova, M., Abdurakhmanov, J., Bobakulov, K., Dolimov, K., Abdurashidov, A., Baymirzaev, A., Makhnyov, A., Terenteva, E., Sasmakov, S., Piyakina, G., Egamberdieva, D., Nazarov, P. A., and Azimova, S. (2023) Antimicrobial and cytotoxic activities of the secondary metabolites of endophytic fungi isolated from the medicinal plant *Hyssopus officinalis*, *Antibiotics (Basel)*, **12**, 1201, <https://doi.org/10.3390/antibiotics12071201>.
32. Alhossary, A., Handoko, S.D., Mu, Y., and Kwoh, C.K. (2015) Fast, accurate, and reliable molecular docking with QuickVina 2, *Bioinformatics*, **31**, 2214-2216, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv082>.
33. Wójcikowski, M., Zielenkiewicz, P., and Siedlecki, P. (2015) Open Drug Discovery Toolkit (ODDT): a new open-source player in the drug discovery field, *J. Cheminform.*, **7**:26, <https://doi.org/10.1186/s13321-015-0078-2>.
34. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC, URL: <https://pymol.org/2/>.
35. Nazarov, P. A. (2018) Alternatives to antibiotics: phage lytic enzymes and phage therapy, *Bull. Russ. State Med. Univ.*, **1**, 5-15 doi: 10.24075/brsmu.2018.002.
36. Pader, V., Hakim, S., Painter, K. L., Wigneshweraraj, S., Clarke, T. B., and Edwards, A. M. (2016) *Staphylococcus aureus* inactivates daptomycin by releasing membrane phospholipids, *Nat. Microbiol.*, **2**, 16194, <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.194>.
37. Temmerman, R., Vervaeren, H., Nosedá, B., Boon, N., and Verstraete, W. (2006) Necrotrophic growth of *Legionella pneumophila*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 4323-4328, <https://doi.org/10.1128/AEM.00070-06>.
38. Genrikhs, E. E., Stelmashook, E. V., Popova, O. V., Kapay, N. A., Korshunova, G. A., Sumbatyan, N. V., Skrebitsky, V. G., Skulachev, V. P., and Isaev, N. K. (2015) Mitochondria-targeted antioxidant SkQT1 decreases trauma-induced neurological deficit in rat and prevents amyloid- β -induced impairment of long-term potentiation in rat hippocampal slices, *J. Drug Target*, **23**, 347-352, <https://doi.org/10.3109/1061186X.2014.997736>.
39. Rogov, A. G., Goleva, T. N., Trendeleva, T. A., Ovchenkova, A. P., Aliverdieva, D. A., and Zvyagil'skaya, R. A. (2018) New data on effects of SkQ1 and SkQT1 on rat liver mitochondria and yeast cells, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 552-561, <https://doi.org/10.1134/S0006297918050085>.
40. Goleva, T. N., Rogov, A. G., Korshunova, G. A., Trendeleva, T. A., Mamaev, D. V., Aliverdieva, D. A., and Zvyagil'skaya, R. A. (2019) SkQThy, a novel and promising mitochondria-targeted antioxidant, *Mitochondrion*, **49**, 206-216, <https://doi.org/10.1016/j.mito.2019.09.001>.
41. Epremyan, K. K., Rogov, A.G., Goleva, T. N., Lavrushkina, S. V., Zinovkin, R. A., and Zvyagil'skaya, R. A. (2023) Altered mitochondrial morphology and Bioenergetics in a new yeast model expressing A β 42, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 900, <https://doi.org/10.3390/ijms24020900>.
42. Ereemeev, S. A., Motovilov, K. A., Volkov, E. M., and Yaguzhinsky, L. S. (2011) SkQ3: The new member of the class of membranotropic uncouplers, *Biochem. Moscow Suppl. Ser. A*, **5**, 310-315, <https://doi.org/10.1134/S1990747811050047>.
43. Nazarov, P. A. (2022) MDR pumps as crossroads of resistance: antibiotics and bacteriophages, *Antibiotics (Basel)*, **11**, 734, <https://doi.org/10.3390/antibiotics11060734>.
44. Knorre, D. A., Markova, O. V., Smirnova, E. A., Karavaeva, I. E., Sokolov, S. S., and Severin, F. F. (2014) Dodecyltriphenylphosphonium inhibits multiple drug resistance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **450**, 1481-1484, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.07.017>.
45. Nazarov, P. A., Khrulnova, S. A., Kessenikh, A. G., Novoyatlova, U. S., Kuznetsova, S. B., Bazhenov, S. V., Sorochkina, A. I., Karakozova, M. V., and Manukhov, I. V. (2023) Observation of cytotoxicity of phosphonium derivatives is explained: metabolism inhibition and adhesion alteration, *Antibiotics (Basel)*, **12**, 720, <https://doi.org/10.3390/antibiotics12040720>.

RELATIONSHIP OF CYTOTOXIC AND ANTIMICROBIAL EFFECTS OF TRIPHENYLPHOSPHONIUM CONJUGATES WITH VARIOUS QUINONE DERIVATIVES

P. A. Nazarov^{1*}, L. A. Zinovkina², A. A. Brezgunova^{1,2}, K. G. Lyamzaev^{1,3}, A. V. Golovin², M. V. Karakozova¹, E. A. Kotova¹, E. Yu. Plotnikov¹, R. A. Zinovkin^{1,3}, M. V. Skulachev^{1,4}, and Yu. N. Antonenko¹

¹ Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; e-mail: nazarovpa@gmail.com

² Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

³ *Russian Gerontological Research and Clinical Center,
Federal State Autonomous Educational Institution of Russian National Research Medical University
named after N. I. Pirogov Ministry of Health of Russia, 129226 Moscow, Russia*

⁴ *Research Institute of Mitoengineering, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia*

Quinone derivatives of triphenylphosphonium have proven themselves to be effective geroprotectors and antioxidants that prevent the oxidation of cell components with the participation of active free radicals – peroxide (RO₂·), alkoxy (RO·), alkyl (R·), as well as reactive oxygen species (superoxide anion, singlet oxygen). The most studied representatives are derivatives of plastoquinone (SkQ1) and ubiquinone (MitoQ), which in addition to antioxidant properties also had a strong antibacterial effect. Other quinone derivatives based on decyltriphenylphosphonium (SkQ3, SkQT, and SkQThy) have been less studied and their antibacterial activity remains undiscovered. In this work, we investigated the antibacterial properties of quinone derivatives based on decyltriphenylphosphonium. We have shown that, as in the case of SkQ1, they are effective against various gram-positive bacteria, while they are not so effective against gram-negative bacteria. This is associated with their recognition by the main multidrug resistance pump of gram-negative bacteria AcrAB-TolC. Moreover, in the case of SkQ1 itself, there is a dependence of its action on the number of bacterial cells and the molar amount of the antibiotic itself, which distinguishes it from conventional antibiotics. At the same time, the cytotoxic effect on mammalian cells is observed in higher concentrations, which suggests the presence of a protective effect caused by the separation of the process of energy generation and transport on the cell membrane. Another possible explanation could be the different composition of multidrug-resistant (MDR) pumps. The difference in cytotoxic effects on mammalian cells may be due to different expression profiles of MDR pumps in different cell types.

Keywords: antioxidants, SkQ1, MDR pumps, AcrAB-TolC, mammalian cell cultures bacteria, cytotoxicity, antibiotic, mitochondria