

Исследование влияния производного 7-гидроксикумарина UB3-C₁₀ на хронологическое старение миобластов человека MB135 *in vitro*

Моргунова Г.В.^{1*}, Челомбитько М.А.², Лямзаев К.Г.²

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Российский геронтологический научно-клинический центр, Москва, Россия

* morgunova@mail.bio.msu.ru

Ключевые слова: геропротекторы; мышечные клетки; биомаркеры старения; митофагия

Цель: Поиск потенциальных геропротекторных препаратов, в том числе на клеточных культурах является актуальной задачей в геронтологии. Важную роль в развитии возрастных патологий играют дисфункции митохондрий [1]. Активация митофагии является одним из способов удаления дисфункциональных митохондрий [2], он особенно важен для долгоживущих клеток — таких как нейроны и миоциты [3]. Активацию митофагии можно вызывать разобщением окислительного фосфорилирования и дыхания. Производное 7-гидроксикумарина UB3-C₁₀ является относительно сильным разобщителем и наряду с этим показывает низкую токсичность, в том числе в отношении нейронов [4]. Целью настоящей работы стало исследование геропротекторных свойств UB3-C₁₀ в модели хронологического старения мышечных клеток человека.

Методы: Исследование проводили на нормальных иммортализованных миобластах MB135, полученных из биопсии мышц здорового человека. Клетки MB135 культивировали в течение 1 и 4 недель с добавлением UB3-C₁₀ в концентрациях 2, 10 и 50 мкМ. Для определения сенесцентного состояния клеток были использованы следующие методы: гистохимическое выявление ассоциированной со старением β-галактозидазы (SA-β-гал), иммуноферментная оценка уровня провоспалительных цитокинов ИЛ-6 и ИЛ-8, а также определение белков p21 и pRb (Ser807/811) с помощью вестерн-блоттинга. Помимо этого, изучали влияние UB3-C₁₀ на количество митохондрий в клетках, для этого определяли содержание митохондриальных белков COX-IV и TOM20 с помощью вестерн-блоттинга через 24, 48 и 72 ч инкубации клеток с UB3-C₁₀ в концентрациях 2, 10 и 50 мкМ.

Результаты: Ранее нами было показано, что культивирование клеток MB135 в течение 4 недель можно рассматривать как одну из моделей для изучения старения *in vitro* [4]. Добавление UB3-C₁₀ в культуральную среду в концентрации 50 мкМ приводило к снижению доли SA-β-гал-положительных клеток и уровня белка p21, а также увеличению уровня фосфорилированного pRb (Ser807/811) в клетках. Полученные данные свидетельствуют о геропротекторных свойствах UB3-C₁₀, в то же время не было обнаружено влияние UB3-C₁₀ на секрецию провоспалительных цитокинов. Поскольку известно, что накопление дисфункциональных митохондрий усугубляет клеточное старение, в основе геропротекторного эффекта UB3-C₁₀ может лежать обновление пула митохондрий

под его воздействием. В связи с этим мы оценили способность UB3-C₁₀ индуцировать митофагию в мышечных клетках. Для этого мы определяли содержание митохондриальных белков COX-IV и TOM20. Инкубация клеток с UB3-C₁₀ в течение 24 ч приводит к дозозависимому снижению количества митохондрий, а спустя 72 ч – количество митохондрий возвращается к уровню контрольных значений. С помощью флуоресцентной микроскопии также была детектирована митофагия в клетках, инкубированных UB3-C₁₀ в концентрации 50 мкМ в течение 24 ч. Полученные данные указывают на то, что UB3-C₁₀ действительно может вызвать митофагию, однако механизмы этого эффекта требуют дальнейшего изучения.

Выводы: На основании полученных данных можно предположить, что производное 7-гидроксикумарина UB3-C₁₀ проявляет геропротекторные свойства в модели хронологического старения мышечных клеток человека линии MB135, при этом защитный эффект может быть связан с его влиянием на пул митохондрий.

Финансирование: Исследование поддержано РНФ (№ 23-14-00061).

Investigation of the effect of the 7-hydroxycoumarin derivative UB3-C₁₀ on chronological aging of human myoblasts MB135 *in vitro*

Morgunova G.V.^{1*}, Chelombitko M.A.², Lyamzaev K.G.²

¹ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² Russian Clinical and Research Center for Gerontology, Ministry of Healthcare

of the Russian Federation, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

* morgunova@mail.bio.msu.ru

Key words: geroprotectors; muscle cells; biomarkers of aging; mitophagy

Aim: The search for potential geroprotectors, including on cell cultures, is an urgent area of gerontological researches. Mitochondrial dysfunction plays an important role in the development of age-related pathologies [1]. Mitophagy activation is one of the ways to remove dysfunctional mitochondria [2], it is crucial for long-lived cells, such as neurons and myocytes [3]. Activation of mitophagy can be induced by uncoupling oxidative phosphorylation and respiration. The 7-hydroxycoumarin derivative UB3-C₁₀ is a relatively strong uncoupler and along with this it shows low toxicity including against neurons [4]. The aim of the present work was to study the geroprotective properties of UB3-C₁₀ in the model of chronological aging of human muscle cells.

Methods: The study was performed on normal immortalized MB135 myoblasts obtained from muscle biopsies of healthy humans. MB135 cells were cultured for 1 and 4 weeks with the addition of UB3-C₁₀ at concentrations of 2, 10 and 50 μM. The following methods were used to determine the senescent state of the cells: histochemical detection of senescence-associated β-galactosidase (SA-β-gal), immunoassessment of pro-inflammatory cytokines IL-6 and IL-8, and determination of p21 and pRB (Ser807/811) proteins by Western blotting. In addition, we studied the effect of UB3-C₁₀ on the number of mitochondria in cells, for this purpose we determined the content of

mitochondrial proteins COX-IV and TOM20 by Western blotting after 24, 48 and 72 h of incubation of cells with UB3-C₁₀ at concentrations of 2, 10 and 50 μ M.

Results: We have previously shown that culturing MB135 cells for 4 weeks can be considered as one of the models for studying aging *in vitro* [4]. The addition of UB3-C₁₀ to the culture medium at a concentration of 50 μ M resulted in a decrease in the proportion of SA- β -gal-positive cells and the level of p21 protein, as well as an increase in the level of phosphorylated pRb (Ser807/811) in cells. These findings suggest geroprotective properties of UB3-C₁₀, while no effect of UB3-C₁₀ on the secretion of pro-inflammatory cytokines was detected. Since the accumulation of dysfunctional mitochondria is known to exacerbate cellular senescence, the geroprotective effect of UB3-C₁₀ may be based on the renewal of the mitochondrial pool under its influence. In this regard, we evaluated the ability of UB3-C₁₀ to induce mitophagy in muscle cells. For this purpose, we determined the content of mitochondrial proteins COX-IV and TOM20. Incubation of cells with UB3-C₁₀ for 24 h leads to a dose-dependent decrease in the number of mitochondria, and after 72 h the number of mitochondria returns to the level of control values. Fluorescence microscopy was also used to detect mitophagy in cells incubated with UB3-C₁₀ at a concentration of 50 μ M for 24 hr. The data obtained indicate that UB3-C₁₀ can indeed induce mitophagy, but the mechanisms of this effect require further investigation.

Conclusion: Based on the obtained data, it can be assumed that the 7-hydroxycoumarin derivative UB3-C₁₀ exhibits geroprotective properties in the model of chronological aging of human muscle cell line MB135, and the protective effect may be related to its influence on the mitochondrial pool.

Funding: The study is supported by Russian Science Foundation (No. 23-14-00061).

Список литературы/References

1. Lane R.K., Hilsabeck T., Rea S.L. The role of mitochondrial dysfunction in age-related diseases. *Biochim Biophys. Acta Bioenerg.* 2015;1847(11):1387-1400
2. Ashrafi G., Schwarz T.L. The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell Death Differ.* 2013;20(1):31-42
3. Morgunova G.V., Shilovsky G.A., Khokhlov A.N. Effect of caloric restriction on aging: Fixing the problems of nutrient sensing in postmitotic cells? *Biochemistry (Mosc.)*. 2021;86:1352-1367
4. Krasnov V.S., Kirsanov R.S., Khailova L.S., Popova L.B., Lyamzaev K.G., Firsov A.M., Korshunova G.A., Kotova E.A., Antonenko Y.N. Alkyl esters of 7-hydroxycoumarin-3-carboxylic acid as potent tissue-specific uncouplers of oxidative phosphorylation: Involvement of ATP/ADP translocase in mitochondrial uncoupling. *Arch Biochem Biophys.* 2022;728:109366
5. Chelombitko M.A., Morgunova G.V., Storchkova N.Y., Lyamzaev K.G. Geroprotective effect of the mitochondrial-targeted antioxidant SkQBerb in a model of the chronological aging of MB135 human myoblasts. *Adv Gerontol.* 2023;13(2):94-98