

Исследование геропротекторных свойств уrolитина А и его производного с повышенной мембранофильностью *in vitro*

Павлюченкова А.Н.^{1, 2}, Челомбитько М.А.^{1, 2}, Моргунова Г.В.³, Строчкова Н.Ю.⁴, Лямзаев К.Г.^{1, 2*}

¹ Российский клинический и научный центр геронтологии, Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

² Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет, Москва, Россия

³ Биологический факультет, Московский государственный университет, Москва, Россия

⁴ Факультет биоинженерии и биоинформатики, Московский государственный университет, Москва, Россия

* Lyamzaev@gmail.com

Ключевые слова: уrolитин А; сенесцентные клетки; геропротекторы

Цели: Митохондриальная дисфункция и клеточный сенесценс являются отличительными признаками старения и тесно взаимосвязаны. Митохондриальная дисфункция, обычно сопровождающееся повышенной продукцией свободных радикалов кислорода, является причиной и следствием клеточного старения и играет важную роль в поддержании фенотипа старения. Одним из основных механизмов утилизации нефункциональных митохондрий в клетке является митофагия и ее активаторы рассматриваются в настоящее время как перспективные средства для борьбы с рядом возраст-зависимых заболеваний [1]. Уrolитин А является метаболитом эллаговой кислоты, и проявляет геропротекторные и антиоксидантные свойства в различных модельных системах [2, 3]. Известно, что Уrolитин А, обладает небольшой разобщающей активностью [4], но при этом способен индуцировать митофагию, способом, вероятно, не связанным с разобщением окислительного фосфорелирования [5]. Поскольку разобщение окислительного фосфорилирования, является сильным стимулятором митофагии, мы предположили, что модификация уrolитина А, усиливающая его разобщающие свойства, должна усиливать его способность вызывать митофагию, а, значит, и повысить его биологическую активность. Ранее было показано, что добавление линейного алкила, содержащего 6 атомов углерода, в структуру молекулы способно усиливать ее разобщающие свойства [6]. Основываясь на этом факте, нами было синтезировано производное уrolитина А с мембранофильной группой C₆H₁₃ (KIRS152). Данное соединения обладает более сильным разобщающей активностью и лучше накапливается в клетках по сравнению с исходным Уrolитином А. Целью нашей работы было сравнение геропротекторного эффекта Уrolитина А и KIRS152 в модели цисплатин-индуцированного старения фибробластов кожи человека.

Методы: Исследование проводилось на нормальных первичных фибробластах от здоровых доноров. С помощью резазуринового теста было проведено сравнение цитотоксичности уrolитина А и KIRS152 для первичных фибробластов. Далее изучали влияние нетоксичных концентраций исследуемых соединений на маркеры сенесценса, индуцированного цисплатином. Для индукции старения

фибробласты в течение 24 ч инкубировали с 10 мкМ цисплатина. После отмывки к клеткам добавляли уrolитин А и KIRS152 в диапазоне концентраций от 0.5 до 100 мкМ. И инкубировали в течение 6 сут. На 7-е сут проводили анализ признаков сенесцентного фенотипа.

В качестве основного маркера старения был использован метод оценки индекса старения (ИС) с помощью проточного цитометра с системой визуализации Amnis Flowsight. ИС рассчитывали по следующей формуле: $ИС = ((nAF - 1) + 5 \times (nD - 1))/2$, где nAF – нормализованная автофлуоресценция липофусцина, а nD – нормализованный диаметр клетки. С возрастом клетки накапливают липофусцин и увеличиваются в размере. Таким образом, чем старше клетка, тем выше ИС. Помимо этого, для оценки проявления сенесцентного фенотипа были использованы следующие методики: гистохимическая оценка проявления ассоциированной со старением β -галактозидазы (SA- β -gal) и определение содержания цитокина GDF15 (характеризует секреторный фенотип, ассоциированный со старением) с помощью иммуноферментного анализа.

Результаты: Анализ результатов резазуринового теста показал, что инкубация фибробластов с уrolитином А в течение 24 часов снижает жизнеспособность фибробластов, начиная с концентрации 20 мкМ. В то время как KIRS152 нетоксичен вплоть до 100 мкМ. Анализ результатов оценки ИС на проточном цитофлуориметре показал, что как KIRS152, так и уrolитин А дозозависимо снижают значение ИС в диапазоне концентраций от 2 до 25 мкМ. При этом геропротекторный эффект для KIRS152 выражен сильнее, чем для уrolитина А. Поскольку считается, что геропротекторный эффект уrolитина А связан с его способностью индуцировать митофагию, то подавление митофагии должно отменять этот эффект. Для того чтобы проверить это предположение, мы использовали SBI-0206965 – ингибитор киназы ULK1, играющей критическую роль в аутофагии. Предобработка фибробластов SBI-0206965 отменяло геропротекторный эффект KIRS152 и уrolитина А. Что свидетельствует в пользу предположения о том, что механизм клеточного действия исследуемых веществ может быть связан с индукцией митофагии, являющейся типом селективной аутофагией. Для оценки влияния геропротекторов KIRS152 и уrolитина А на проявление сенесцентного фенотипа, была измерена доля SA- β -gal-положительных клеток после гистохимического окрашивания. SA- β -gal является биомаркером активации лизосомального пути старения, для которого было показано значительное повышение экспрессии с увеличением возраста клеток. Анализ полученных данных продемонстрировал дозозависимое уменьшение доли SA- β -gal-положительных клеток как для KIRS152, так и для уrolитина А в исследуемых диапазонах концентраций. Так как KIRS152 заметно снижает ИС, но оказывает меньший эффект на долю SA- β -gal-положительных клеток, можно предположить, что он мешает накоплению в клетке липофусцина. Оценка содержания в инкубационной среде фактора роста и дифференцировки GDF15, повышение уровня которого также является признаком сенесценции, показала, что KIRS152 в концентрации 2 мкМ предотвращает цисплатин-индуцированное увеличение секреции GDF15, в то время как уrolитин А не оказывает подобного эффекта.

Выводы: Таким образом, мы показали, что оба соединения – KIRS152 и уrolитин А – дозозависимо снижают долю SA- β -положительных клеток, а также ИС в модели цисплатин-индуцированного старения фибробластов кожи человека. В то

же время эффект KIRS152 на ИС выше, чем для уролитина А в тех же концентрациях. Предобработка фибробластов ингибитором киназы ULK1 препятствует геропротекторным свойствам обоих соединений, что свидетельствует о вкладе митофагии/аутофагии в защитный эффект уролитина А и его производного. При этом только KIRS152 предотвращает усиление секреции GDF15. Кроме того KIRS152 является менее токсичным соединением для фибробластов человека, чем уролитин А. Все вышеперечисленное указывает на то, что геропротекторные свойства KIRS152 превосходят свойства уролитина А по ряду параметров.

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

Study of geroprotective properties of urolithin A and its derivative with increased membranophilicity *in vitro*

Pavlyuchenkova A.N.^{1,2}, Chelombitko M.A.^{1,2}, Morgunova G.V.³, Strochkova N.Yu.⁴, Lyamzaev K.G.^{1,2*}

¹ Russian Clinical and Research Center for Gerontology, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

² Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University, Moscow, Russia

³ School of Biology, Moscow State University, Moscow, Russia

⁴ Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Moscow State University, Moscow, Russia

* Lyamzaev@gmail.com

Key words: urolithin A; senescence; geroprotectors

Aims: Mitochondrial dysfunction and cellular senescence are key features of aging and are closely intertwined. Mitochondrial dysfunction, often accompanied by heightened production of free radicals, both leads to and results from cellular senescence, playing a pivotal role in maintaining the aging phenotype. Mitophagy, the cellular process responsible for disposing of dysfunctional mitochondria, and its activators are currently being investigated as potential tools to combat various age-related diseases [1].

Urolithin A, a metabolite of ellagic acid, demonstrates geroprotective and antioxidant properties across various model systems [2, 3]. Although it exhibits minimal uncoupling activity [4], it can induce mitophagy, likely through mechanisms unrelated to oxidative phosphorylation uncoupling [5]. We hypothesized that enhancing the uncoupling properties of urolithin A could augment its mitophagy induction and consequently boost its biological efficacy. Previous research has indicated that appending linear alkyl groups containing six carbon atoms to the molecule can enhance its uncoupling properties [6]. Building upon this, we synthesized a derivative of urolithin A with a C₆H₁₃ membranophilic group (designated as KIRS152). This compound exhibits stronger uncoupling activity and better cellular accumulation compared to the original urolithin A. Our aim was to compare the geroprotective effects of Urolithin A and KIRS152 in a model of cisplatin-induced aging in human skin fibroblasts.

Methods: The study involved normal primary fibroblasts from healthy donors. Cytotoxicity of urolithin A and KIRS152 on primary fibroblasts was assessed using the resazurin test. Subsequently, the impact of non-toxic concentrations of the compounds on cisplatin-induced senescence markers was evaluated. Fibroblasts were exposed to

10 μ M cisplatin for 24 hours to induce senescence, followed by treatment with urolithin A and KIRS152 at concentrations ranging from 0.5 to 100 μ M for six days. Senescent phenotype markers were analyzed on the seventh day.

The senescence index (SI) was determined as the main aging marker using a flow cytometer Amnis Flowsight with a visualization system. SI was calculated using the formula: $SI = ((nAF - 1) + 5 \times (nD - 1))/2$, where nAF represents normalized lipofuscin autofluorescence and nD represents normalized cell diameter. Lipofuscin accumulation and cell size increase with aging, hence higher SI values indicate older cells. Additionally, other methods used to assess senescence phenotype manifestation included histochemical assessment of senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal) and determination of GDF15 cytokine content (a marker of senescence-associated secretory phenotype) using enzyme immunoassay.

Results: Analysis of the resazurin test results showed that incubation of fibroblasts with urolithin A for 24 hours reduced fibroblast viability starting at a concentration of 20 μ M. While KIRS152 is nontoxic up to 100 μ M. Analysis of the results of SI evaluation on flow cytofluorimeter showed that both KIRS152 and urolithin A dose-dependently reduced SI value in the concentration range from 2 to 25 μ M. Moreover, the geroprotective effect was more pronounced for KIRS152 than for urolithin A. Since the geroprotective effect of urolithin A is thought to be related to its ability to induce mitophagy, suppression of mitophagy should abolish this effect. To test this assumption, we used SBI-0206965, an inhibitor of ULK1 kinase, which plays a critical role in autophagy. Pretreatment of fibroblasts with SBI-0206965 abolished the geroprotective effect of KIRS152 and urolithin A. Which is in favor of the assumption that the mechanism of cellular action of the investigated substances may be related to the induction of mitophagy, which is a type of selective autophagy. To evaluate the effect of the geroprotectors KIRS152 and urolithin A on the manifestation of the senescence phenotype, the proportion of SA- β -gal-positive cells after histochemical staining was measured. SA- β -gal is a biomarker of activation of the lysosomal senescence pathway, for which a significant increase in expression with increasing cell age has been shown. Analysis of the data demonstrated a dose-dependent decrease in the proportion of SA- β -gal-positive cells for both KIRS152 and urolithin A over the concentration ranges investigated. Since KIRS152 markedly reduced SI but had a smaller effect on the proportion of SA- β -gal-positive cells, it can be assumed that it interferes with the accumulation of lipofuscin in the cell. Evaluation of the content of the growth and differentiation factor GDF15 in the incubation medium, the increase in the level of which is also a sign of senescence, showed that KIRS152 at a concentration of 2 μ M prevents the cisplatin-induced increase in GDF15 secretion, while urolithin A has no such effect.

Conclusion: Both KIRS152 and urolithin A demonstrated dose-dependent reduction in SA- β -positive cells and SI in the cisplatin-induced aging model of human skin fibroblasts. KIRS152 exhibited a superior effect on SI compared to urolithin A at similar concentrations. Pretreatment with ULK1 kinase inhibitor abolished the geroprotective properties of both compounds, implicating mitophagy/autophagy in their protective mechanisms. Furthermore, only KIRS152 prevented enhanced GDF15 secretion and displayed lower toxicity to human fibroblasts compared to urolithin A, suggesting its superior geroprotective properties.

Funding: The study is supported by RNF (No. 23-14-00061).

Список литературы/References

1. Guilbaud E., Sarosiek K.A., Galluzzi L. Inflammation and mitophagy are mitochondrial checkpoints to aging. *Nat Commun.* 2024;15:3375. doi 10.1038/s41467-024-47840-1
2. Liu C.F., Li X.L., Zhang Z.L. et al. Antiaging Effects of Urolithin A on Replicative Senescent Human Skin Fibroblasts. *Rejuvenation Res.* 2019;22(3):191-200. doi 10.1089/rej.2018.2066
3. Jimenez-Loygorri J.I. et al. Mitophagy curtails cytosolic mtDNA-dependent activation of cGAS/STING inflammation during aging. *Nat Commun.* 2024;15:830
4. Esselun C., Theyssen E., Eckert G.P. Effects of Urolithin A on Mitochondrial Parameters in a Cellular Model of Early Alzheimer Disease. *Int J Mol Sci.* 2021;22:8333. doi 10.3390/ijms22158333
5. D'Amico D., Andreux P.A., Valdés P., Singh A., Rinsch C., Auwerx J. Impact of the Natural Compound Urolithin A on Health, Disease, and Aging. *Trends Mol Med.* 2021;27(7):687-699
6. Krasnov V.S., Kirsanov R.S., Khailova L.S. et al. 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. doi 10.1016/j.abb.2022.109366