

На правах рукописи

Свириева Ирина Владимировна

**СВОБОДНЫЕ РАДИКАЛЫ КИСЛОРОДА И АНТИОКСИДАНТЫ В  
МИТОХОНДРИЯХ СЕРДЦА И МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМАХ**

Специальность 03.00.02 – биофизика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата физико-математических наук

Москва – 2008

Работа выполнена на кафедре биофизики физического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова и в НИИ экспериментальной кардиологии ФГУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс Федерального агентства по высокотехнологичной медицинской помощи»

**Научный руководитель:** доктор физико-математических наук,  
профессор Рууге Энно Куставич

**Официальные оппоненты:** доктор физико-математических наук,  
профессор Петрусевич Юрий Михайлович  
доктор биологических наук,  
профессор Панасенко Олег Михайлович

**Ведущая организация:** Институт химической физики  
им. Н.Н.Семенова РАН

Защита состоится «17» апреля 2008 г. в 16:00 ч.

на заседании диссертационного совета Д 501.002.11 при Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова по адресу: 119992, Москва, Ленинские горы, МГУ им. М.В.Ломоносова, физический факультет, аудитория 5-19.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке физического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова.

Автореферат разослан «14» марта 2008 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета Д 501.002.11  
доктор физико-математических наук

Г.Б. Хомутов

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы

В настоящее время можно считать доказанным, что вклад митохондрий в функции клеток сердечной мышцы значительно шире, чем только роль в энергетическом метаболизме кардиомиоцитов в качестве основного поставщика АТФ. Митохондрии сердца имеют ключевое значение в регуляторных и сигнальных процессах, являющихся ответом на физиологические стрессы, такие как гипоксия и реоксигенация, нарушение баланса между прооксидантными и антиоксидантными процессами в клетках, действие различных гормонов и фармакологических препаратов. В связи с крайне важной ролью митохондрий в жизнедеятельности клеток, в последнее десятилетие огромное внимание уделяется исследованию т.н. митохондриальных болезней, которые включают нарушения, тем или иным образом влияющие на митохондриальные функции и/или вызваны повреждениями митохондриальной ДНК. В случае митохондриальных болезней, клетки подвержены окислительному дисбалансу. Основное воздействие при этом испытывают органы с интенсивным окислительным метаболизмом и высокой энергетической потребностью: сердце, скелетные мышцы, почки и печень.

Необратимые повреждения компонентов клеток миокарда, являющиеся, в конечном счете, причиной их гибели в результате апоптоза и/или некроза, в первую очередь, обусловлены избыточным образованием активных форм кислорода и токсичных метаболитов оксида азота в условиях окислительного стресса. Образование свободных радикалов кислорода в биологических системах происходит постоянно и является как прямым результатом функционирования специальных ферментативных систем, так и следствием побочного процесса множества окислительно-восстановительных реакций. Значительный интерес в отношении короткоживущих свободных радикалов кислорода (время жизни супероксида  $\sim 10^{-6}$  с, гидроксильного радикала  $\sim 10^{-9}$  с) обусловлен, прежде всего, их высокой химической активностью. Наличие неспаренного электрона на  $\pi^*2p$ -орбитали кислорода приводит к тому, что окисление практически любого

клеточного компонента (мембранных липидов, белков и нуклеиновых кислот) становится термодинамически выгодным процессом. В обычных условиях, когда скорость образования активных форм кислорода и азота относительно невысока, антиоксидантные системы клетки в состоянии не допускать возникновения окислительного стресса. Однако, в условиях пониженного энергетического метаболизма клеток миокарда, при существенном увеличении внутриклеточной концентрации кислорода, могут происходить значительные сдвиги в редокс-потенциалах переносчиков дыхательной цепи, способствующие резкому возрастанию скорости генерации митохондриями свободных радикалов кислорода. Применение ингибиторов электронного транспорта, обладающих специфичностью по отношению к различным участкам дыхательной цепи, позволяет установить расположение центров, наиболее активно генерирующих супероксидные радикалы, а также оценить относительный вклад каждого из этих центров в суммарную величину скорости образования активных форм кислорода в митохондриях.

Хорошо известно, что активные формы кислорода и азота участвуют в развитии патологических состояний сердечной мышцы, возникающих после длительной ишемии. Ишемия характеризуется недостаточным снабжением ткани кислородом и необходимыми метаболитами и обусловлена нарушениями в системе кровообращения. Вследствие энергетической недостаточности во время ишемии происходит активация анаэробного гликолиза, направленного на синтез *АТФ*, тем не менее, гликолиза оказывается недостаточно для обеспечения потребностей клеток миокарда. Как результат, в клетках возникают множественные нарушения ионного гомеостаза, следствием которых является невозможность нормального функционирования сердечной мышцы. Следующая за длительной ишемией реоксигенация миокарда сопровождается значительными тканевыми повреждениями и нарушениями сократительной функции – появлением аритмий и временной механической дисфункции. Это явление, получившее название “кислородный парадокс”, обусловлено резким увеличением образования активных форм кислорода при восстановлении нормального уровня внутриклеточного кислорода.

Адриамицин (доксорубицин) – антибиотик, являющийся одним из наиболее часто применяемых лекарственных препаратов при химиотерапии злокачественных опухолей человека. В то же время хорошо известно, что адриамицин характеризуется рядом нежелательных побочных эффектов, в первую очередь, значительной кардиотоксичностью. Опубликовано множество работ, авторами которых были предложены разнообразные молекулярные механизмы, объясняющие вызываемую адриамицином кардиотоксичность. В настоящее время считается, что терапевтическое и кардиотоксическое действия адриамицина представляют собою единый мультифакторный процесс, инициированный окислительным стрессом и приводящий в конечном счете к апоптозу – процессу запрограммированной гибели клеток. Важным фактором, который может опосредовать токсическое действие адриамицина на клетки сердечной мышцы, является высокое сродство адриамицина к кардиолипину – анионному фосфолипиду, специфичному для внутренней мембраны митохондрий. Кардиолипин важен не только для структуры и функций митохондрий, но также для общего энергетического метаболизма и выживания клетки. Связывание адриамицина с митохондриальной мембраной ведет к изменению ее свойств, при этом изменяется функционирование электронных переносчиков в мембране. Таким образом, накопление редокс активного адриамицина в митохондриях сердца должно усиливать генерацию активных форм кислорода и азота этими органеллами.

В связи с тем, что митохондрии являются главным источником активных форм кислорода в клетке, эти органеллы нуждаются в постоянной защите от повреждений, вызываемых окислительным стрессом. Такая защита обеспечивается ферментативными системами, а также различными низкомолекулярными антиоксидантами. Наиболее важными среди антиоксидантов оказались коэнзим *Q* и витамин *E*. Однако, их использование недостаточно эффективно. Одной из причин этого, возможно, является то, что только очень малые количества таких антиоксидантов могут проникнуть сквозь клеточные мембраны и достигнуть митохондрий. Поэтому решением этой проблемы было изобретение антиоксидантов, избирательно накапливающихся в митохондриях.

Такие митохондриально-направленные антиоксиданты получили, присоединив трифенилфосфоний – липофильный катион к убихинону (*mitoQ*) или  $\alpha$ -токоферолу (*mitoVitE*). Полученные антиоксиданты легко проходят через биологические мембраны и в несколько сот раз лучше накапливаются внутри митохондрий, обеспечивая эффективную защиту от окислительного стресса. Оказалось, что при незначительном увеличении дозы *mitoQ* он может вести себя как прооксидант, что ограничивает его применение в медицине. Поэтому были предприняты попытки создать другой возобновляющийся антиоксидант, не обладающий подобным побочным действием. Этого удалось добиться, заменив убихинон на пластохинон (*SkQ1*). В одинаковых условиях для *mitoQ* концентрации, вызывающие анти- и прооксидантное действие, различались меньше, чем в два раза, а для *SkQ1* это различие возросло до тридцати раз.

### **Цель работы**

Целью работы являлось выяснение закономерностей регуляции процессов образования и гибели активных форм кислорода и азота в клетках сердечной мышцы и модельных системах в условиях, моделирующих окислительный стресс и защитное действие антиоксидантных систем клетки.

### **Задачи работы**

Исходя из поставленной цели, в диссертации решались следующие задачи:

1. Изучение влияния длительности гипоксии и реоксигенации на генерацию активных форм кислорода митохондриями сердца и функциональные характеристики дыхательной цепи митохондрий.
2. Изучение воздействия адриамицина – противоопухолевого препарата широкого спектра действия – на генерацию супероксидных радикалов митохондриями сердца.
3. Выяснение взаимосвязи между генерацией активных форм кислорода митохондриями сердца и образованием и деструкцией динитрозильных комплексов железа.
4. Определение спектральных и кинетических характеристик семихинонов митохондриально-направленных антиоксидантов – производных убихинона и пластохинона – и их аналогов.

## Научная новизна

Основными новыми результатами и положениями, которые составляют предмет диссертации, являются:

1. С помощью спектроскопии ЭПР спиновых ловушек впервые изучена кинетика образования и гибели активных форм кислорода в изолированных митохондриях сердца в условиях небольшого парциального давления кислорода в среде инкубации.
2. Впервые показано, что гипоксия и последующая реоксигенация изолированных митохондрий сердца приводят к увеличению скорости генерации супероксидных радикалов, однако, в отличие от митохондрий, выделенных после ишемии-реперфузии миокарда, эффект не зависит от длительности периода гипоксии.
3. Впервые продемонстрировано, что адриамицин – противоопухолевый препарат широкого спектра действия – вызывает изменения в митохондриях сердца, приводящие к значительному увеличению скорости генерации супероксидных радикалов, обусловленному взаимодействием с молекулярным кислородом электронных переносчиков комплекса III и свободнорадикальных интермедиатов редокс-цикла адриамицина.
4. Впервые обнаружено, что динитрозильные комплексы железа могут являться перехватчиками активных форм кислорода в системах, моделирующих окислительный стресс в клетках сердечной мышцы.
5. Проведено исследование спектральных и кинетических характеристик семихинонных свободных радикалов митохондриально-направленных антиоксидантов – производных убихинона и пластохинона – и их аналогов. Впервые показано, что анион-радикалы *mitoQ*, *SkQ1*, *SkQ3* и их коротко-цепочечные аналоги отличаются существенным образом распределением плотности неспаренного электрона по атомам хиноидного кольца.
6. Впервые установлено, что митохондриально-направленные антиоксиданты *mitoQ* и *SkQ1* могут действовать также как прооксиданты и образовывать в модельных системах супероксидные радикалы в процессе одноэлектронного окисления молекулярным кислородом.

## **Научно-практическая ценность диссертации**

Представленные в диссертации экспериментальные данные могут быть использованы для выяснения молекулярных механизмов процессов, влияющих на энергетический метаболизм сердечной мышцы в условиях ишемии миокарда, а также для разработки методов лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы с помощью митохондриально-направленных антиоксидантов.

## **Апробация работы**

Основные результаты диссертационной работы были представлены на 9 всероссийских и международных конференциях, в том числе, на Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых по фундаментальным наукам «Ломоносов 2004» (Москва, 2004), III съезде биофизиков России (Воронеж, 2004), 6th Workshop on EPR Applications in Biology and Medicine (Krakow, 2004), 4-ой национальной научно-практической конференции с международным участием «Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека» (Смоленск, 2005), II Евразийском конгрессе по медицинской физике «Медицинская физика – 2005» (Москва, 2005), Международной научной конференции «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем» (Минск, 2006), Научной конференции МГУ «Ломоносовские чтения», секция физики (Москва, 2006), 5-ой национальной научно-практической конференции с международным участием «Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека» (Смоленск, 2007), VIIth International Workshop on EPR (ESR) in Biology and Medicine (Krakow, 2007).

## **Публикации**

По материалам диссертационной работы опубликовано 17 печатных работ, в числе которых 4 статьи в реферируемых журналах.

## **Структура и объём работы**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы (глава 1), методической части (глава 2), описания собственных экспериментальных результатов и их обсуждения (глава 3), заключения, выводов и списка



цитированной литературы. Объем работы составляет 117 страниц, включая 32 рисунка и библиографию из 163 наименований.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Во введении** дана общая характеристика диссертационной работы. Обоснована актуальность темы, сформулированы цели и задачи исследования, изложены научная новизна и практическая ценность полученных результатов.

**Первая глава** содержит литературный обзор, посвященный физико-химическим характеристикам активных форм кислорода и азота, их источникам в организме и роли в процессах жизнедеятельности. Существенное внимание уделено вопросам участия свободных радикалов кислорода и токсичных метаболитов оксида азота в возникновении и развитии повреждений клеток сердечной мышцы при патологическом стрессе, обусловленным нарушениями кислородного обмена в условиях гипоксии и ишемии. Изложены современные представления о механизмах действия адриамицина (доксорубицина) – одного из наиболее часто применяемых лекарственных препаратов при химиотерапии злокачественных опухолей человека. Показано, что терапевтическое и кардиотоксическое воздействия адриамицина представляют собою единый мультифакторный процесс, обусловленный окислительным стрессом. Проведен анализ современных тенденций способов защиты организма от последствий окислительного стресса, обоснована целесообразность поиска и исследования характеристик митохондриально-направленных антиоксидантов, в молекулах которых сочетались бы положительно заряженные гидрофобные группы и редокс-активные хиноны, такие как убихинон или пластохинон.

**Во второй главе** представлены методы и материалы исследования. В **разделе 2.1.** описано получение изолированных митохондрий из сердец крыс линии Wistar по (Hogeboom, 1955), в **разделе 2.2.** – измерение их дыхательной активности с помощью электрода Кларка на полярографе YSI 53 фирмы Yellow Spring Instruments, Inc. (США), а также с помощью нитроксильного радикала *TEMPONE-D-<sup>15</sup>N* (4-оксо-2,2,6,6-тетраметилпиперидин-*D*16-1-оксил-<sup>15</sup>N) на спектрометре ЭПР. Для этого суспензию митохондрий помещали в герметично

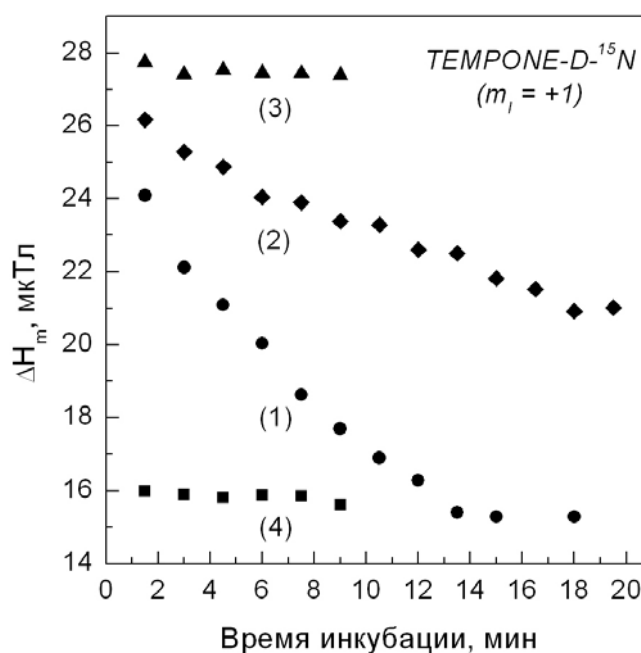
закрытый стеклянный капилляр при температуре образца  $\sim 25^{\circ}\text{C}$ . В **разделах 2.3. и 2.4.** описываются методики регистрации и обработки спектров ЭПР. Спектры ЭПР регистрировали на спектрометре E-109E фирмы Varian (США) при комнатной температуре ( $\sim 25^{\circ}\text{C}$ ). Образцы помещали в газопроницаемые капилляры PTFE 22 (внутренний диаметр 0.635 мм, толщина стенок 0.051 мм) фирмы Zeus Industrial Products, Inc. (США), а запись спектров проводили либо при непрерывной аэрации образца (газовая среда – воздух), либо в условиях варьируемого парциального давления кислорода. Содержание кислорода в инкубационной смеси определяли по ширине компонент спектра ЭПР *TEMPONE-D-<sup>15</sup>N*, а также по ширине синглетного сигнала ЭПР фталоцианина лития (*LiPc*). Для измерения скорости генерации супероксидных радикалов в митохондриях или в модельных системах в реакционную смесь вводили спиновую ловушку *TIRON* (4,5-диоксибензол-1,3-дисульфат натрия). Абсолютные значения скорости образования  $\text{O}_2^{\cdot-}$  вычисляли с помощью супероксид-генерирующей системы ксантиноксидаза-ксантин, кинетические характеристики которой определяли по скорости восстановления цитохрома *c* супероксидными радикалами. **Раздел 2.5** посвящен описанию методов получения препаратов динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ), используемых в экспериментах по изучению метаболизма оксида азота и баланса прооксидантных и антиоксидантных процессов в клетках миокарда. Концентрацию ДНКЖ в образцах также определяли с помощью спектроскопии ЭПР. Для этого используемую димерную форму ДНКЖ, не обнаруживаемую методом ЭПР, переводили в мономерную ЭПР-детектируемую форму. В **разделе 2.6.** описаны методики получения и изучения характеристик семихинонных свободных радикалов – промежуточных продуктов в окислительно-восстановительных реакциях биологически значимых хиноидных соединений – производных убихинона или пластохинона. Семихиноны *mitoQ* (2,3-диметокси-5-метил-6-децилтрифенилфосфоний-1,4-бензохинон), *SkQ1* (2,3-диметил-6-децилтрифенилфосфоний-1,4-бензохинон), *SkQ3* (2,3,5-триметил-6-децилтрифенилфосфоний-1,4-бензохинон) и их аналогов образовались в процессе автоокисления соответствующих хинолов в этаноле или в смеси этанол-водный

буфер (рН 7,8-8,5). Все экспериментальные спектры свободнорадикальных интермедиатов были симулированы с помощью программы WinEPR SimFonia фирмы Bruker (ФРГ).

Статистическую обработку полученных результатов производили по t-тесту и тесту ANOVA. Результаты представлены как среднее значение  $\pm$  средняя ошибка ( $M \pm m$ ). Различия между экспериментальными данными считали достоверными, если  $P < 0,05$ .

**В третьей главе** представлены полученные результаты и их обсуждение. В **разделе 3.1.** представлены результаты определения функциональной активности митохондрий. Для этого измеряли скорости потребления кислорода в третьем и четвертом состояниях дыхательной цепи с помощью электрода Кларка, а также с помощью нитроксильного радикала *TEMPONE-D-<sup>15</sup>N* на спектрометре ЭПР, ширина линий дублетного спектра которого определяется концентрацией кислорода в реакционной смеси (рис. 1). В наших опытах изолированные митохондрии сердца крысы характеризовались в состояниях 3 и 4 скоростями дыхания  $77 \pm 9$  и  $26 \pm 5$  нмоль  $O_2$ /мин/мг белка, соответственно (при  $25^\circ\text{C}$ ), т.е. имели дыхательный контроль по *ADP*, равный по значению четырем.

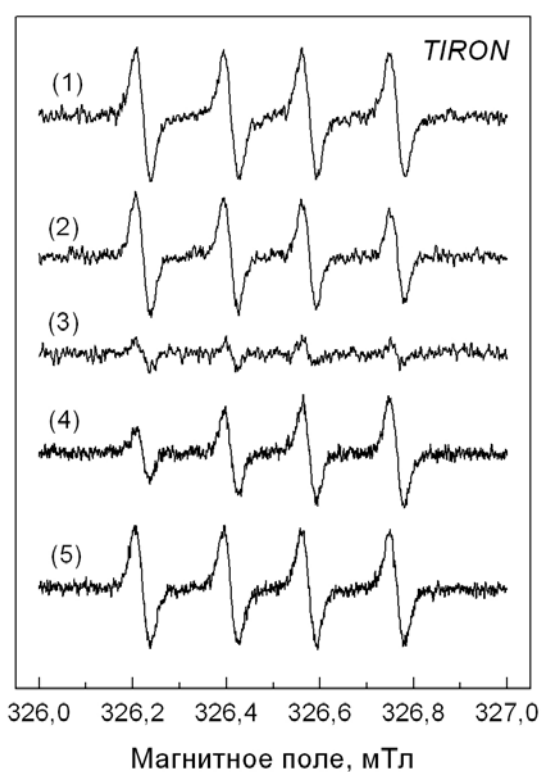
В **разделе 3.2.** представлены результаты по измерению скоростей генерации супероксидных радикалов изолированными митохондриями



**Рис. 1.** Зависимость ширины низкопольной компоненты спектра ЭПР нитроксильного радикала *TEMPONE-D-<sup>15</sup>N* в суспензии митохондрий сердца крысы от времени инкубации. Суспензия митохондрий находилась в закупоренном стеклянном капилляре при температуре образца  $\sim 25^\circ\text{C}$ . Добавки в инкубационную смесь: сукцинат, ротенон и *ADP* (1, 4), сукцинат и ротенон (2), без добавок (3). Концентрация белка: 0.5 мг/мл (1-3); 5 мг/мл (4).

сердца. Было показано, что регистрация с помощью спектроскопии ЭПР кинетики супероксид-зависимого окисления *TIRON* в свободные радикалы (семихиноны)  $TIRON^{\bullet-}$  является удобным и достаточно чувствительным методом измерения скорости образования супероксида электронными переносчиками митохондрий в условиях контролируемой оксигенации образца. В отсутствие ингибиторов скорость сукцинат-зависимого образования супероксидных радикалов в комплексе III (*bc<sub>1</sub>* сегменте) была мала ( $\sim 0.01$  нмоль  $O_2^{\bullet-}$ /мин/мг белка при 25°C), однако, в присутствии антимицина *A*, блокирующего перенос электронов от цитохромов *b* на окисленный коэнзим *Q*, сильно возросла (до 0.8-1.2 нмоль  $O_2^{\bullet-}$ /мин/мг белка). В то же время, генерация  $O_2^{\bullet-}$  в комплексе III полностью подавлялась миксотиазолом и стигмателлином – ингибиторами *Q*-цикла, блокирующими перенос электронов на *Fe-S* центр Риске. При использовании глутамата и малата (субстратов комплекса I) добавление антимицина *A* в среду инкубации также сопровождалось усиленной генерацией  $O_2^{\bullet-}$  в комплексе III дыхательной цепи. В то же время, добавление ротенона, блокирующего в комплексе I как обратный, так и прямой перенос электронов, не приводило при использовании глутамата и малата к возникновению сигнала ЭПР семихинона *TIRON*.

**Раздел 3.3.** посвящен исследованию влияния гипоксии разной длительности и последующей реоксигенации на скорость образования супероксидных радикалов в

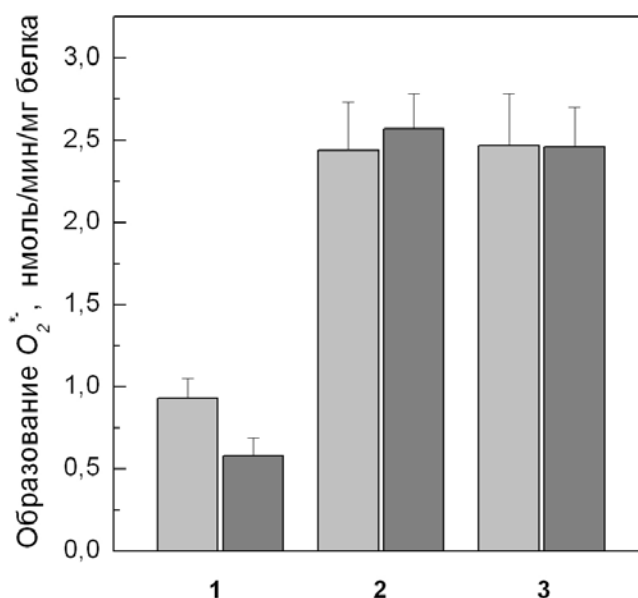


**Рис. 2.** Спектры ЭПР спиновой ловушки *TIRON* в суспензии митохондрий сердца крысы. Добавки в инкубационную смесь: сукцинат и антимицин *A*. Газовая среда в резонаторе: воздух (1, 4, 5), азот (2, 3). Спектры записаны в следующих условиях: 8 мин в воздухе (1); 10 мин в воздухе, 10 с (2) и 4 мин (3) в азоте; 10 мин в воздухе, 10 мин в азоте, 10 с (4) и 4 мин (4) в воздухе.

изолированных митохондриях сердца. Представлены спектры ЭПР *TIRON* в суспензии митохондрий, генерирующих супероксид в присутствии субстратов для комплексов I или II (малат-глутамат или сукцинат) и антимицина *A*. Переход из аэробных условий в условия гипоксии (смена газовой среды с воздуха на азот) сопровождался падением интенсивности сигнала семихинонов *TIRON*, образовавшихся в результате окисления спиновой ловушки *TIRON* супероксидными радикалами. Реоксигенация, в свою очередь, приводит к быстрому возрастанию сигнала  $TIRON^{\bullet-}$ , причем скорость образования супероксидных радикалов окажется больше, чем до гипоксии (рис. 2).

На рис. 3 показана зависимость скорости генерации супероксидных радикалов изолированными митохондриями от длительности гипоксии при использовании субстратов дыхания комплексов I и II. Длительность гипоксии была в обоих случаях 10 мин и 30 мин. Скорость образования  $O_2^{\bullet-}$  возрастала, по сравнению с контрольным уровнем, уже после 10-минутной гипоксии, однако, увеличение длительности гипоксии не приводило к существенным изменениям. Интенсивность сигнала ЭПР от *TIRON* после 30 или 45 мин гипоксии была практически такой же, как и после 10-минутной гипоксии.

Таким образом, гипоксия и последующая реоксигенация сопровождается определенными изменениями в мембранах изолированных митохондрий сердца, вызывающими увеличение

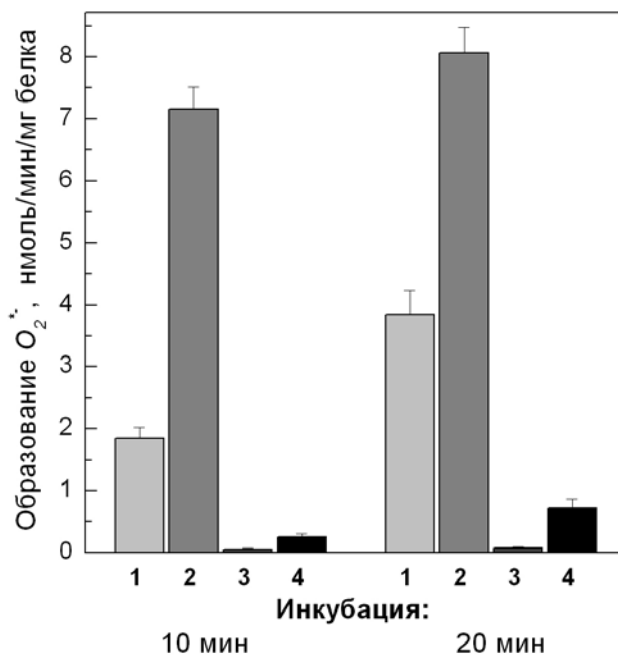


**Рис. 3.** Зависимость скорости образования супероксида в суспензии митохондрий сердца крысы от субстратов окисления и длительности гипоксии. Добавки в инкубационную смесь: сукцинат и антимицин *A* (светлосерые столбики); глутамат, малат, и антимицин *A* (темносерые столбики). Условия инкубации: 10 мин в воздухе (1); 10 мин в воздухе, 10 мин в азоте, 10 мин в воздухе (2); 10 мин в воздухе, 30 мин в азоте, 10 мин в воздухе (3). Температура образца:  $\sim 25^\circ C$ .

скорости образования  $O_2^{\bullet-}$  электронными переносчиками (семихинонами коэнзима Q) комплекса III дыхательной цепи. Однако, в отличие от митохондрий, выделенных из сердец после ишемии-реперфузии, величина эффекта не зависела от длительности гипоксии. Полученные данные позволяют заключить, что изолированные митохондрии сердца, находящиеся в среде инкубации, характеризуются большей невосприимчивостью к гипоксии, чем митохондрии в клетках сердечной мышцы, подвергнутой ишемии.

В разделе 3.4. приведены результаты исследования зависимости скорости генерации супероксидных радикалов изолированными митохондриями сердца крысы от присутствия в среде инкубации адриамицина (доксорубицина) – эффективного противоопухолевого препарата, обладающего, однако, значительной кардиотоксичностью.

Добавление адриамицина в среду инкубации приводило к увеличению интенсивности сигнала ЭПР от *TIRON*, т.е. к заметному росту скорости образования супероксидных радикалов. Рост скорости образования  $O_2^{\bullet-}$  наблюдался во всем исследованном нами интервале концентрации адриамицина (10-150 мкМ). В то же время, генерация доступных спиновым ловушкам супероксидных радикалов вблизи границы внутренней мембраны с межмембранным пространством в митохондриях, модифицированных адриамицином, почти полностью подавлялась стигмателлином –



**Рис. 4.** Зависимость скорости образования супероксида в митохондриях сердца крысы от добавок в реакцию смесь. Добавки в среду инкубации: сукцинат и антимицин А (1), сукцинат, антимицин А и адриамицин (2), сукцинат, антимицин А, адриамицин и стигмателлин (3), сукцинат и адриамицин (4). Условия инкубации: 10 мин или 20 мин, температура  $\sim 25^\circ\text{C}$ , концентрация адриамицина 50 мкМ. Кроме 3-4 (при 10-минутной инкубации), различия между образцами статистически достоверны ( $P < 0.05$ ).

ингибитором  $Q$ -цикла, блокирующим перенос электронов на  $Fe-S$  центр Риске. В отличие от стигмателлина, ротенон, блокирующий в комплексе I как обратный, так и прямой перенос электронов, не приводил в присутствии субстратов этого комплекса (глутамата и малата) и адриамицина к полному исчезновению сигнала ЭПР от *TIRON*.

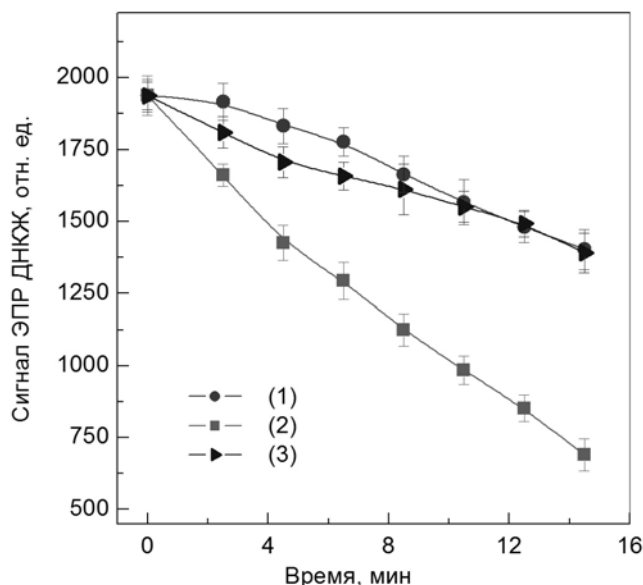
Показаны зависимости скорости генерации супероксидных радикалов в изолированных митохондриях сердца от присутствия адриамицина и ингибиторов дыхательной цепи в среде инкубации при использовании сукцината (субстрата окисления для комплекса II) (рис. 4) или при использовании глутамата и малата (субстратов окисления для комплекса I). Длительность инкубации митохондрий в условиях непрерывной аэрации была в обоих случаях равна 10 мин и 20 мин. Скорость образования  $O_2^{\bullet-}$  возрастала, по сравнению с исходным уровнем, уже после десятиминутной инкубации в присутствии адриамицина. Увеличение длительности инкубации до 20 мин вызывало некоторый рост скорости образования супероксида во всех образцах, однако, не приводило к изменению общих закономерностей действия адриамицина. В митохондриях, модифицированных адриамицином, скорость генерации супероксидных радикалов всегда была выше, чем в митохондриях, в среде инкубации которых отсутствовал адриамицин. Эффект адриамицина наблюдался также в опытах с митохондриями, выделенными либо после серии уколов адриамицина животным, либо после перфузии изолированного сердца в присутствии адриамицина в среде для перфузии.

В наших опытах *in vitro* на изолированных митохондриях сердца адриамицин находился в среде инкубации и, благодаря специфическому взаимодействию с кардиолипином, включался во внутренние мембраны этих органелл. Находясь в митохондриях, редокс-активный адриамицин способен либо непосредственно принимать электроны с переносчиков электрон-транспортной цепи и передавать их молекулярному кислороду с образованием супероксидных радикалов, либо вызывать наблюдаемый в наших опытах значительный рост скорости образования  $O_2^{\bullet-}$  за счет изменения физико-

химических характеристик липидного окружения компонентов дыхательной цепи.

В разделе 3.5. представлены данные изучения взаимодействия цистеиновых ДНКЖ с супероксидом, генерируемым митохондриями сердца крысы. Представлены кинетики деструкции цистеиновых ДНКЖ (в мономерной парамагнитной форме) в условиях образования супероксида комплексом III дыхательной цепи митохондрий (рис. 5). Деструкция ДНКЖ в присутствии митохондрий, субстрата комплекса II сукцината и ингибитора антимицина А происходит существенно быстрее, чем в контроле.

При добавление супероксиддисмутазы (СОД) скорость распада ДНКЖ практически совпадает со скоростью в контроле. Этот факт доказывает, что супероксидный радикал влияет на распад ДНКЖ. Следует отметить, что зависимость от супероксида деструкция ДНКЖ наблюдалась в присутствии избытка цистеина, также являющегося антиоксидантом. Таким образом, ДНКЖ были более эффективным «скавенджером» супероксида, чем цистеин. Можно предположить, что ДНКЖ является достаточно эффективным протектором, защищающим клетку от пероксидных радикалов, источником которого являются митохондрии.



**Рис. 5.** Деструкция цистеиновых ДНКЖ в условиях генерации супероксида. (1) митохондрии сердца крысы, цистеиновые ДНКЖ; (2) митохондрии сердца крысы, цистеиновые ДНКЖ, сукцинат, антимицин А; (3) митохондрии сердца крысы, цистеиновые ДНКЖ, сукцинат, антимицин А, СОД. Инкубационная смесь в фосфатном буфере (pH=7,5), температура ~25°C.

Также приведены данные экспериментов, где в присутствии цистеина, донора нитроксильного аниона соли Ангели и ферритина происходит образование ДНКЖ. В присутствии митохондрий и

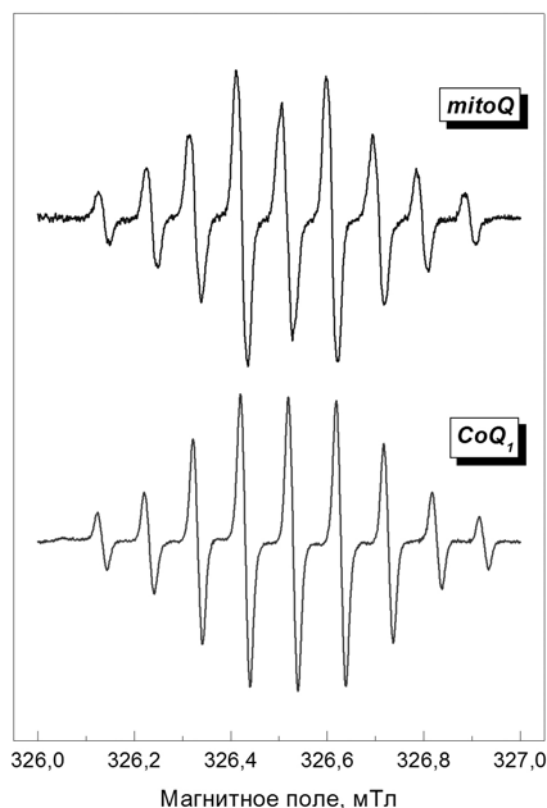


сукцината, выход ДНКЖ, образующихся под действием нитроксильного аниона, существенно возростал.

**Раздел 3.6.** посвящен изучению характеристик семихинонных свободных радикалов – промежуточных продуктов в окислительно-восстановительных реакциях митохондриально-направленных антиоксидантов *mitoQ*, *SkQ1* и *SkQ3*, а также ряда их короткоцепочечных аналогов: *CoQ<sub>1</sub>* (2,3-диметокси-5-метил-6-(3-метил-2-бутенил)-1,4-бензохинона), *CoQ<sub>0</sub>* (2,3-диметокси-5-метил-1,4-бензохинона), *decyl PQ* (2,3-диметил-6-децил-1,4-бензохинона), *PQ<sub>0</sub>* (2,3-диметил-1,4-бензохинона) и *TMQ* (2,3,5-триметил-1,4-бензохинона). Свободнорадикальные интермедиаты образовались в процессе автоокисления соответствующих хинолов в слабо-щелочной среде (рН 7,8-8,5), спектры ЭПР регистрировали в условиях варьируемой оксигенации образца.

Спектры ЭПР *mitoQ* и *CoQ<sub>1</sub>* (рис. 6) имеют 9 компонент сверхтонкой структуры и практически идентичны, в обоих случаях неспаренный электрон взаимодействует с тремя протонами метильной группы при *C5* и двумя протонами метиленовой группы при *C6* хиноидного кольца. Однако, протоны  $-CH_3$  группы при *C5* вызывают почти в два раза большее расщепление в спектре, чем протоны  $-CH_2-$  группы при *C6*:  $a(3H) \approx 0,19$  мТл,  $a(2H) \approx 0,099$  мТл. Это означает, что плотность неспаренного электрона у атомов *C5* и *C6* также отличается в два раза. Переход к *CoQ<sub>0</sub>*, т.е. замена

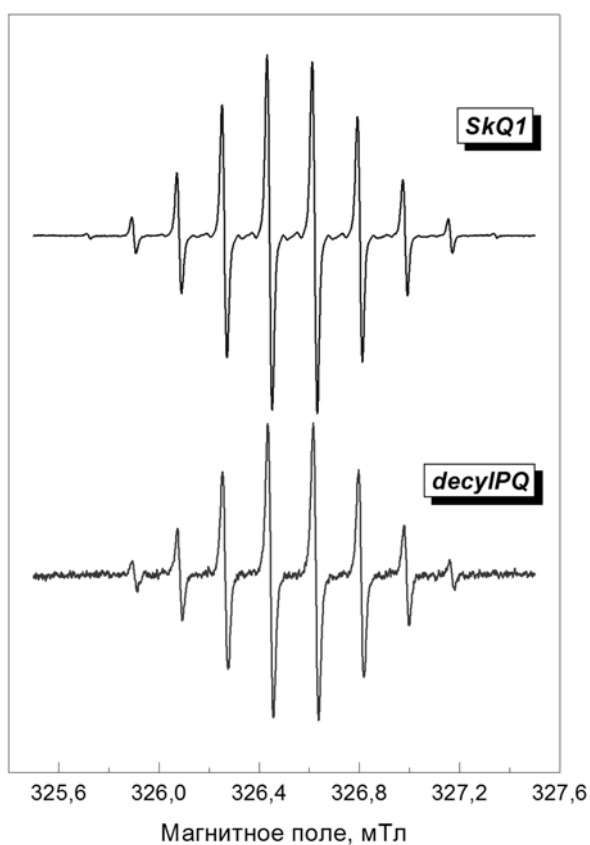
$-CH_2-$  фрагмента на  $-H$  приводит к значительному перераспределению электронной плотности у атомов



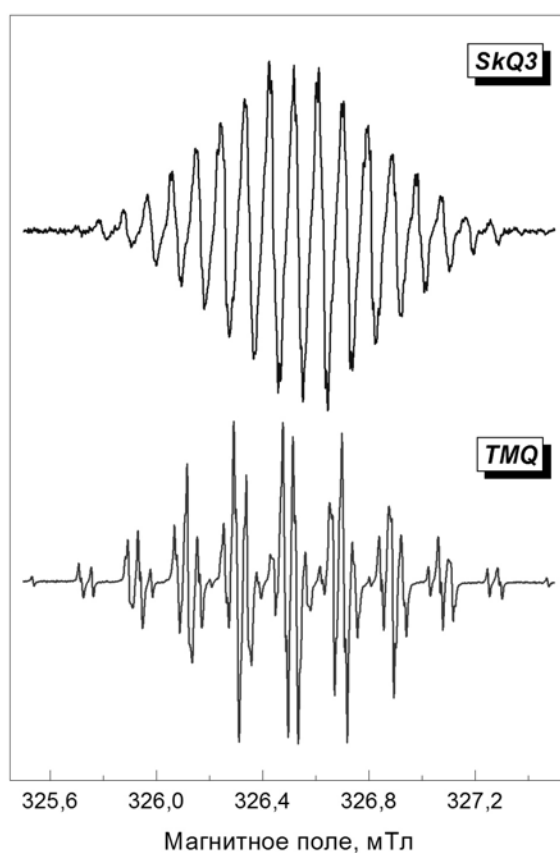
**Рис. 6.** Экспериментальные спектры *mitoQ* и *CoQ<sub>1</sub>*. Условия регистрации спектров ЭПР: СВЧ мощность 0,5 мВт, амплитуда ВЧ модуляции 0,05 мТл.

хиноидного кольца: в спектре ЭПР теперь 8 компонент, при этом  $a(3H) \approx 0,236$  мТл,  $a(1H) \approx 0,197$  мТл.

Спектры ЭПР *SkQ1* и *decyl PQ* (рис. 7) характеризуются взаимодействием неспаренного электрона с девятью магнитно практически эквивалентными протонами ( $-CH_3$  группы при *C2* и *C3*,  $-CH_2-$  группа при *C6* и  $-H$  группа при *C5*) хиноидного кольца. В спектрах ЭПР семихинонов обоих соединений 10 компонент,  $a(9H) \approx 0,18$  мТл. Таким образом, в молекулах *SkQ1* и *decyl PQ* электронная плотность одинакова у атомов углерода *C1-C6* хиноидного кольца. Однако, переход к *PQ<sub>0</sub>*, т.е. замена  $-CH_2-$  фрагмента алифатической цепи на  $-H$



**Рис. 7.** Экспериментальные спектры *SkQ1* и *decylPQ*. Условия регистрации спектров ЭПР: СВЧ мощность 0,5 мВт, амплитуда ВЧ модуляции 0,05 мТл.



**Рис. 8.** Экспериментальные спектры *SkQ3* и *TMQ*. Условия регистрации спектров ЭПР: СВЧ мощность 0,5 мВт, амплитуда ВЧ модуляции 0,05 мТл.

приводит к значительному перераспределению электронной плотности у атомов хиноидного кольца: в спектре ЭПР теперь 17 компонент, при этом  $a(6H) \approx 0,18$  мТл,  $a(1H) \approx 0,27$  мТл.

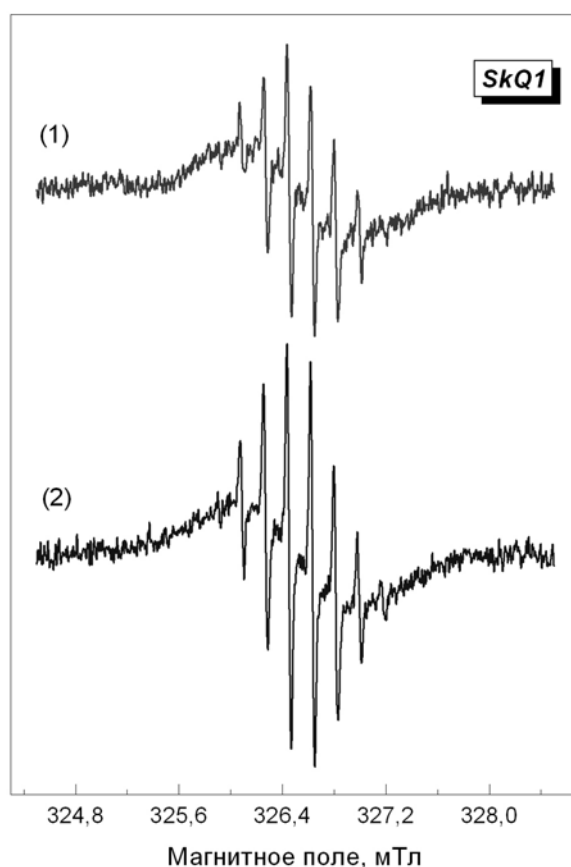
Спектр ЭПР анион-радикала  $SkQ3$  (рис. 8) (в хиноидном кольце протон у  $C5$  заменен на метильную группу) значительно сложнее, чем анион-радикала  $SkQ1$ . В отличие от  $SkQ1$ , неспаренный электрон в  $SkQ3$  распределен неоднородно по углеродам хиноидного кольца. Протоны  $-CH_3$  групп при  $C2$ ,  $C3$  и  $C5$  вызывают в два раза большее расщепление в спектре, чем протоны  $-CH_2-$  группы при  $C6$ . В случае  $SkQ3$  в спектре ЭПР 21 линия (из них 4 крайние очень малой интенсивности),  $a(9H) \approx 0,18$  мТл,  $a(2H) \approx 0,9$  мТл. Таким образом, параметры сверхтонкой структуры спектров ЭПР  $mitoQ$ ,  $SkQ1$ ,  $SkQ3$  и их короткоцепочечных аналогов ( $Q_0$  и  $PQ_0$ ) четко показывают, что семихиноны всех указанных соединений существуют преимущественно в форме анион-радикалов, которые могут быть стабилизированы при наличии подходящего окружения благодаря образованию водородных связей.

Проведено исследование влияния среды инкубации с другой полярностью –  $DMSO$  (диметилсульфоксида) – на спектры ЭПР семихинонов, возникающих при окислении  $SkQ1$ ,  $mitoQ$ ,  $PQ_0$  и  $Q_0$ . Общие характеристики спектров ЭПР анион-радикалов всех исследованных соединений в  $DMSO$  сохраняются, при этом происходит небольшое изменение среднего значения g-фактора. Несколько изменяется и распределение электронной плотности по углеродным атомам ( $C2$ ,  $C3$ ,  $C5$  и  $C6$ ) хиноидного кольца, что приводит к дополнительному расщеплению линий сверхтонкой структуры спектров ЭПР. Следует отметить, что использование  $DMSO$  в качестве растворителя приводит к стабилизации свободнорадикальных интермедиатов  $SkQ1$  и  $mitoQ$ , однако практически не влияет на кинетику образования и гибели свободных радикалов их аналогов  $PQ_0$  и  $Q_0$ .

Приведены результаты исследования зависимости кинетики образования и гибели свободнорадикальных форм  $SkQ1$ ,  $mitoQ$  и  $Q_0$ , образовавшихся при автоокислении их восстановленных форм, от парциального давления кислорода в среде инкубации (этанол-вода). В этих опытах реакционная смесь находилась в резонаторе спектрометра ЭПР в газопроницаемых капиллярах, а содержание кислорода в газовой среде варьировалась от 2% до 21% (атмосферный воздух). Семихиноны  $SkQ1$ ,  $mitoQ$  и  $Q_0$  образовывались при всех использованных

концентрациях кислорода в среде инкубации, однако квазистационарная концентрация их свободнорадикальных форм зависела существенным образом от содержания кислорода в среде. При 21% содержании кислорода свободные радикалы *SkQ1* и *mitoQ* исчезли после 4-5 мин инкубации. В случае  $Q_0$  – короткоцепочечного аналога *mitoQ* – сигнал ЭПР анион-радикалов  $Q_0^{\cdot-}$  исчез полностью через 4 мин уже при 14% содержании кислорода.

Проведено исследование кинетики образования и стабильности семихинонных форм *SkQ1* и *mitoQ*, образовавшихся в присутствии в среде инкубации липосом из кардиолипина и фосфатидилхолина. В случае липосом из кардиолипина и фосфатидилхолина с арахидоновой кислотой суммарный спектр ЭПР *SkQ1* состоял из двух спектров – спектра анион-радикала  $SkQ1^{\cdot-}$  в среде инкубации с хорошо разрешенной сверхтонкой структурой и синглетного сигнала с шириной 0,8 мТл анион-радикала  $SkQ1^{\cdot-}$ , локализованного в липосомах (рис. 9). При использовании фосфатидилхолина с линолевой кислотой такой картины не наблюдалось. Так же, в случае *mitoQ*, синглетного сигнала ЭПР от анион-радикалов в липосомах не удалось зарегистрировать. Таким образом, только в случае *SkQ1* и липосом из кардиолипина и фосфатидилхолина с арахидоновой кислотой наблюдается накопление и стабилизация семихинонов в липосомах.



**Рис. 9.** Спектр ЭПР *SkQ1* в присутствии липосом, состоящих из кардиолипина и фосфатидилхолина с арахидоновой кислотой. Условия регистрации спектров ЭПР: СВЧ мощность 0,5 мВт(1) и 5 мВт (2), амплитуда ВЧ модуляции 0,05 мТл. Температура ~25°C

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что квантово-химические характеристики свободных радикалов митохондриально-направленных производных убихинона и пластохинона могут существенно влиять на их участие в антиоксидантных и прооксидантных процессах в кардиомиоцитах.

**В заключении** подведены основные итоги диссертационной работы и сформулированы выводы.

## ВЫВОДЫ

1. Гипоксия и последующая реоксигенация приводит к увеличению скорости генерации супероксидных радикалов изолированными митохондриями сердца. В отличие от митохондрий, выделенных после ишемии-реперфузии миокарда, эффект не зависит от длительности гипоксии.
2. Адриамицин (доксорубицин) - противоопухолевый препарат широкого спектра действия – вызывает изменения в митохондриях сердца, приводящие к значительному увеличению скорости генерации супероксидных радикалов, что частично может быть связано с образованием свободных радикалов (семихинонов) адриамицина и их взаимодействием с молекулярным кислородом.
3. Нитрозильные комплексы железа являются перехватчиками активных форм кислорода в системах, моделирующих окислительный стресс в клетках сердечной мышцы.
4. Свободные анион-радикалы *mitoQ*, *SkQ1* и их аналогов, являющиеся промежуточными продуктами в окислительно-восстановительных реакциях хиноидных соединений, существенным образом отличаются по распределению плотности неспаренного электрона по углеродным атомам хиноидного кольца.
5. Митохондриально-направленные антиоксиданты *mitoQ* и *SkQ1* могут действовать как прооксиданты – образовывать супероксидные радикалы при одноэлектронном окислении молекулярным кислородом.

**Результаты диссертационной работы изложены в следующих публикациях:**

1. Ruuge E.K., Zabbarova I.V., Sviryaeva I.V., Shumaev K.B. Redox status of cardiac cells. Ferritin, reactive oxygen and nitrogen species. // Current Topics in Biophysics 2005. V. 29 (2-1). P. 37-45.
2. Сви́ряева И.В., Рууге Э.К. Генерация свободных радикалов кислорода в митохондриях сердца: эффект гипоксии-реоксигенации. // Биофизика 2006. Т. 51 (3). С. 478-484.
3. Шумаев К.Б., Губкин А.А., Губкина С.А., Гудков Л.Л., Сви́ряева И.В., Тимошин А.А., Топунов А.Ф., Ванин А.Ф., Рууге Э.К. Взаимодействие динитрозильных комплексов железа с интермедиатами окислительного стресса. // Биофизика 2006. Т. 51 (3). С. 472-477.
4. Сви́ряева И.В., Рууге Э.К., Шумаев К.Б. Образование супероксидных радикалов в изолированных в митохондриях сердца: эффект адриамицина. // Биофизика 2007. Т. 52 (6). С. 1054-1059.
5. Сви́ряева И.В. Генерация свободных радикалов кислорода в митохондриях сердца: эффект гипоксии-реоксигенации. Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых по фундаментальным наукам «Ломоносов 2004» (МГУ, апрель 2004). Сборник тезисов. С. 217.
6. Рууге Э.К., Заббарова И.В., Сви́ряева И.В., Шумаев К.Б. Редокс-состояние клеток миокарда и гомеостаз железа. Ферритин, активные формы кислорода и азота. III съезд биофизиков России (Воронеж, 24-29 июня 2004). Тезисы докладов. Т. II. С. 568-569.
7. Ruuge E.K., Zabbarova I.V., Sviryaeva I.V., Shumaev K.B. Redox status of cardiac cells. Ferritin, reactive oxygen and nitrogen species. 6th Workshop on EPR Applications in Biology and Medicine (Krakow, 5-10 October 2004). Abstracts. P. 58-59.
8. Сви́ряева И.В., Рууге Э.К. Влияние гипоксии-реоксигенации на генерацию свободных радикалов кислорода митохондриями сердца. 4-я национальная научно-практическая конференция с международным участием «Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека» (Смоленск, 26-30 сентября 2005). Сборник трудов. С. 153-155.

9. Рууге Э.К., Свириева И.В., Губкина С.А., Шумаев К.Б. Митохондриальные болезни: современные концепции. 4-я национальная научно-практическая конференция с международным участием «Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека» (Смоленск, 26-30 сентября 2005). Сборник трудов. С. 150-151.
10. Свириева И.В., Рууге Э.К. Действие гипоксии-реоксигенации на образование активных форм кислорода митохондриями сердца. II Евразийский конгресс по медицинской физике «Медицинская физика – 2005» (Москва, 21-24 июня 2005). Сборник материалов. С. 292-293.
11. Свириева И.В., Рууге Э.К., Губкина С.А., Шумаев К.Б. Ответ митохондрий сердца на патологический стресс. Международная научная конференция «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем» (Минск, 21-23 июня 2006). Сборник статей. Т. II. С. 239-241.
12. Рууге Э.К., Шумаев К.Б., Губкин А.А., Губкина С.А., Гудков Л.Л., Свириева И.В., Топунов А.Ф. Влияние ионов железа и железосодержащих белков на взаимодействие метаболитов оксида азота с активными формами кислорода. Международная научная конференция «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем» (Минск, 21-23 июня 2006). Сборник статей. Т. II. С. 236-238.
13. Рууге Э.К., Свириева И.В. Митохондриальные болезни и окислительный стресс. Международная научная конференция «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем» (Минск, 21-23 июня 2006). Сборник статей. Т. I. С. 19.
14. Рууге Э.К., Свириева И.В., Губкина С.А., Шумаев К.Б. Митохондрии сердца: ответ на патологический стресс. Научная конференция МГУ «Ломоносовские чтения», секция физики (Москва, 17-27 апреля 2006). С. 107-108.
15. Шумаев К.Б., Свириева И.В., Кривова Т.С., Рууге Э.К., Гудков Л.Л., Ланкин В.З., Топунов А.Ф. Действие оксида азота на дыхательную цепь митохондрий сердца. 5-я национальная научно-практическая конференция с международным участием «Активные формы кислорода, оксид азота,



антиоксиданты и здоровье человека» (Смоленск, 18-22 сентября 2007).  
Сборник трудов. С. 197-199.

16. Sviryaeva I.V., Ruuge E.K. Cardiac mitochondria and pathological stress: a spin trapping study. VIIth International Workshop on EPR (ESR) in Biology and Medicine (Krakow, 3-6 October 2007). Abstracts. P. 56.
17. Ruuge E.K., Sviryaeva I.V., Shumaev K.B. Semiquinone free radicals of mitochondria-targeted antioxidants – ubiquinone and plastoquinone derivatives. VIIth International Workshop on EPR (ESR) in Biology and Medicine (Krakow, 3-6 October 2007). Abstracts. P. 54.