

ПРОИЗВОДНОЕ ПЛАСТОХИНОНА, АДРЕСОВАННОЕ В МИТОХОНДРИИ, КАК СРЕДСТВО, ПРЕРЫВАЮЩЕЕ ПРОГРАММУ СТАРЕНИЯ

1. КАТИОННЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ПЛАСТОХИНОНА: СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ *in vitro*^{*,**}

© 2008 г. Ю.Н. Антоненко¹, А.В. Аветисян¹, Л.Е. Бакеева¹, Б.В. Черняк¹,
В.А. Чертков², Л.В. Домнина¹, О.Ю. Иванова¹, Д.С. Изюмов¹, Л.С. Хайлова¹,
С.С. Клишин¹, Г.А. Коршунова¹, К.Г. Лямзаев¹, М.С. Мунтян¹, О.К. Непряхина¹,
А.А. Пашковская¹, О.Ю. Плетюшкина¹, А.В. Пустовидко¹, В.А. Рогинский³,
Т.И. Рокицкая¹, Э.К. Рууге⁴, В.Б. Сапрунова¹, И.И. Северина⁵, Р.А. Симонян¹,
И.В. Скулачев⁶, М. В. Скулачев⁶, Н.В. Сумбатян², И.В. Свириева⁴,
В.Н. Ташлицкий², Ю. М. Васильев¹, М.Ю. Высоких¹, Л.С. Ягужинский¹,
А.А. Замятнин (мл.)⁶, В.П. Скулачев^{1, 6, 7***}

¹ НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва; факс: (495)939-0338, электронная почта skulach@belozersky.msu.ru

² Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва

³ Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, 117977 Москва, ул. Косыгина, 4

⁴ Институт экспериментальной кардиологии, Российский кардиологический научно-производственный комплекс, 121552 Москва ул. 3-я Черепковская, 15А

⁵ Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва

⁶ Центр митоинженерии МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва

⁷ Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва

Поступила в редакцию 29.12.07

Осуществлен синтез катионных производных пластохинона (SkQ), содержащих положительно заряженные остатки ацилтрифенилфосфония или родамина, соединенные с пластохиноном посредством деканового или пентанового линкера. Показано, что различные формы SkQ:

– легко проникают через плоскую бислойную фосфолипидную мембрану, через мембраны митохондрий и внешнюю клеточную мембрану, электрофоретически накапливаются в изолированных митохондриях и в митохондриях живых клеток;

– в низких (наномолярных) концентрациях проявляют высокую антиоксидантную активность в водных растворах, в липидных мицеллах, в изолированных митохондриях и в клетках, предотвращают окисление митохондриального кардиолипина под действием радикала OH[•];

Принятые сокращения: Δψ – трансмембранная разность электрических потенциалов, ААРН – 2, 2'-азобис (2-амидинопропан) дигидрохлорид, АФК – активные формы кислорода, БЛМ – плоская бислойная фосфолипидная мембрана, СССР – м-хлоркарбонилцианидфенилгидразон, CM-DCF-DA – 5-(-6) хлорметил-2,7-дихлордигидрофлуоресцеиндиацетат, C₁₂TRP – додецилтрифенилфосфоний, DMQ – производное MitoQ, лишённое одной из метоксигрупп, DPQ – децилпластохинон, FCCP – *n*-трифторметоксикарбонилцианидфенилгидразон, МДА – малоновый диальдегид, MitoQ – 10-(6'-убихинонил) децилтрифенилфосфоний, NAC – N-ацетилцистеин, NAO – N-нонилакридиновый оранжевый, PQ – пластохинон, SF6846 – 3,5-ди(*трет*)бутил-4-гидроксibenзиденмалонитрил, SkQ – катионные производные пластохинона или метилпластохинона, SkQ1 – 10-(6'-пластохинонил) децилтрифенилфосфоний, SkQ2 – 10-(6'-пластохинонил) децилкарнитин, SkQ2M – 10-(6'-пластохинонил) децилметилкарнитин, SkQ3 – 10-(6'-метилпластохинонил) децилтрифенилфосфоний, SkQ4 – 10-(6'-пластохинонил) децилтрибутиламмоний, SkQ5 – 5-(6'-пластохинонил) амилтрифенилфосфоний, SkQR1 – 10-(6'-пластохинонил) децилродамин 19, TMRE – этиловый эфир тетраметилродамина, TPB – тетрафенилборат, TRP – тетрафенилфосфоний.

* Эта и следующие четыре статьи написаны по заказу редколлегии журнала «Биохимия».

** Английский вариант рукописи будет опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow), Papers in Press BM 08-264.

*** Адресат для корреспонденции и запросов отпечатков.

- проявляют прооксидантную активность в области значительно более высоких (микромольных) концентраций, что обуславливает наличие очень широкого «окна» между про- и антиоксидантными концентрациями (у катионного производного убихинона MitoQ такое «окно» оказывается гораздо меньше благодаря значительно более низкой антиоксидантной и более высокой прооксидантной активности);
- восстанавливаются дыхательной цепью митохондрий до SkQH₂, причем скорость восстановления значительно выше, чем скорость окисления SkQH₂.

В клетках HeLa и в фибробластах человека различные формы SkQ эффективно ингибируют апоптоз и некроз, вызванные активными формами кислорода. Для двух наиболее активных форм SkQ, а именно SkQ1 и SkQR1, значения C_{1/2} для подавления апоптоза, вызванного перекисью водорода в фибробластах человека, составляют соответственно 1 · 10⁻¹¹ и 8 · 10⁻¹³ М. Такая высокая эффективность этих соединений объясняется их накоплением в клетках и энергизованных митохондриях с разностью потенциалов на клеточной мембране и внутренней мембране митохондрий, соответственно, 60 и 180 мВ, а также высоким коэффициентом распределения между липидом и водой (около 13 000 : 1). По расчетам, концентрация SkQ во внутреннем монослое внутренней мембраны митохондрий превышает его концентрацию во внеклеточной среде в 1,3 · 10⁸ раз. Таким образом показано, что соединения группы SkQ являются митохондриально-направленными возобновляемыми исключительно высокоэффективными антиоксидантами. Можно надеяться, что эти соединения станут эффективными фармакологическими препаратами при терапии патологий, связанных с окислительным стрессом и перекисным окислением липидов и белков во внутренней мембране митохондрий.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: SkQ1, проникающие катионы, производные пластохинона, антиоксиданты, митохондрии, апоптоз.

Хорошо известно, что АФК — серьезная угроза для клеток и организмов. В митохондриях АФК образуются в гидрофобной области внутренней мембраны этих органелл и инициируют цепные реакции перекисного окисления липидов, что представляет для живых систем большую опасность. В частности, снижается электрическое сопротивление внутренней митохондриальной мембраны (которое в норме чрезвычайно велико) и происходит разобщение дыхания и синтеза АТФ. Кроме того, митохондриальные АФК способны также вызывать окислительное повреждение митохондриальной ДНК, локализованной вблизи внутренней мембраны [1]. Антиоксиданты, конъюгированные с катионами и способные проникать через мембраны, могут эффективно нейтрализовать АФК в митохондриях. Впервые проникающие катионы были описаны в нашей группе более 40 лет назад [2]. В этих ионах заряд ионизованного атома распределен по большой гидрофобной молекуле, что препятствует ориентации диполей воды вокруг ионизированного атома и позволяет ионам проникать через мембраны, используя энергию трансмембранной разности потенциалов ($\Delta\psi$) [2–8]. Вскоре после открытия проникающих катионов мы предположили, что они могут служить «молекулами-электровозами», обеспечивая накопление в митохондриях незаряженных молекул, связанных с катионами [7, 9, 10]. Поскольку матрикс митохондрий является единственным отрицательно заряженным отсеком внутри клетки, вещество, соединенное с положительно заряженным проникающим ионом, будет избирательно накапливаться в митохондриях с коэффициентом накопления 1000 при $\Delta\psi$ равном 180 мВ согласно уравнению Нернста [6,

7]. Соединив антиоксидант с проникающим катионом, можно попытаться очистить «самое грязное место в клетке», т.е. внутреннее пространство митохондрий, где образуется наибольшее количество АФК.

Принцип «молекул-электровозов» был недавно применен Мэрфи и Смитом для накопления в митохондриях различных антиоксидантов. Они синтезировали соединения, состоящие из тиобутила [11] или α -токоферола [12], соединенных с катионом трифенилфосфония. Позже эти антиоксиданты были заменены на убихинол, что позволило получить возобновляемый антиоксидант (окисленные формы убихинона, возникающие в результате его антиоксидантной активности, могут восстанавливаться до исходного состояния с помощью дыхательной цепи митохондрий) [13]. Было обнаружено, что такое соединение, названное MitoQ:

- накапливается в энергизованных митохондриях, используя энергию $\Delta\psi$;
- предотвращает окисление митохондриальных липидов радикалами OH[•] *in vitro*;
- увеличивает выживаемость клеток гиперчувствительных к АФК при концентрациях намного более низких, чем CoQ или α -токоферол;
- увеличивает продолжительность жизни фибробластов в культуре при повышенном содержании кислорода [13–18].

К сожалению, при увеличении концентрации MitoQ проявились его прооксидантные свойства [14, 19, 20], что ограничивает практическую применимость данного вещества для терапии таких заболеваний как ретинопатии у мышей [21] или атаксия Фридриха у людей [22].

Целью настоящей работы был поиск возобновляемых митохондриально-адресованных ан-

тиоксидантов с большим «окном» между анти- и прооксидантной активностью, применимых для практической терапии. Мы решили использовать для этого пластохинон вместо убихинона, сохранив катионную часть молекулы. Пластохинон — это природный компонент электрон-транспортной цепи хлоропластов, в то время как убихинон функционирует в дыхательной цепи митохондрий. Почему в одной и той же растительной клетке в двух органеллах используются два разных типа хинонов? Возможно, это связано с тем, что пластохинон — более эффективный антиоксидант, чем убихинон [23–25]. Это свойство более важно для хлоропластов, продуцирующих кислород и поглощающих свет с образованием синглетного кислорода. Кислая среда тилакоидов также способствует окислительному стрессу, так как протонирование супероксид-аниона (с образованием радикала HO_2^{\cdot}) значительно повышает его агрессивность.

Нами были синтезированы различные производные пластохинона, конъюгированные с несколькими проникающими катионами. Эти соединения были названы SkQ, где «Sk» — проникающий катион («Скулачев-ион», по терминологии, введенной Дэвидом Грином [8]), а Q — хинон. Их свойства были исследованы в искусственных бислойных мембранах, изолированных митохондриях, культурах клеток и организмах. В настоящей работе мы показали, что ряд соединений группы SkQ (в частности SkQ1) способны проникать через плоские бислойные мембраны, электрофоретически накапливаться в митохондриях с высокой избирательностью и восстанавливаться дыхательной цепью. В изолированных митохондриях SkQ1 в наномолярных концентрациях чрезвычайно эффективно предотвращает окисление кардиолипина, опосредованное радикалом OH^{\cdot} . В микромолярных концентрациях SkQ1, подобно MitoQ, оказывает сильный прооксидантный эффект. Для митохондрий *in vitro* «окно» между анти- и прооксидантными концентрациями SkQ1 (наиболее подробно исследованного производного пластохинона) составило около 1000, в то время как для MitoQ оно оказалось меньше 2. В культурах клеток SkQ1 в чрезвычайно низких (пикомолярных) концентрациях ингибировал H_2O_2 -зависимый апоптоз. В тех же условиях SkQ1 предотвращал вызванную перекисью водорода фрагментацию протяженных митохондриальных филаментов (переход «нить→зерно»). Под действием SkQ1 усиливалось слияние отдельных митохондриальных филаментов в разветвленную сеть (митохондриальный ретикулум), имеющую общий электрический потенциал. На основании результатов, представленных в нас-

тоящей работе, можно заключить, что адресованные в митохондрии соединения группы SkQ являются высокоэффективными и возобновляемыми антиоксидантами. (Некоторые предварительные данные работы были опубликованы ранее [26]).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Синтез проникающих катионов описан в «Сопроводительных материалах», представленных в электронной версии (<http://www.protein.bio.msu.ru/biokhimiya>) (раздел 1). Принцип синтеза показан на рис. 1.

Все реагенты для культивирования клеток фирмы «Gibco» (США). Все прочие реагенты, если не указано особо, фирмы «Sigma» (США).

Проницаемость плоских бислойных мембран (БЛМ) измеряли в тefлоновой ячейке, разделенной на два отсека перегородкой с отверстием (диаметр 0,6 мм), на котором формировали БЛМ. Мембрана состояла из дифитаноилфосфатидилхолина из *E. coli* (57% фосфатидилэтаноламина, 15% фосфатидилглицерола, 10% кардиолипина, 18% других липидов), растворенных в декане (2% раствор). Оба отсека первоначально содержали исследуемый катион в равных концентрациях. Затем в один из отсеков вносилось его дополнительное количество. Если катион проникал через БЛМ, то он диффундировал из отсека с более высокой концентрацией в отсек с более низкой и создавал $\Delta\psi$, так что отсек с более низкой концентрацией приобретал положительный заряд. Согласно уравнению Нернста для моновалентного катиона, свободно проникающего через БЛМ, создание 10-кратного градиента приводит к образованию $\Delta\psi$ равного 60 мВ (при комнатной температуре). Электрические параметры измеряли с помощью AgCl-электродов, соединенных с электрометром VA-J-5 [27].

Митохондрии из сердца и печени крыс получали, как описано ранее [28, 29]. Полученные митохондрии суспендировали в среде, содержащей 250 мМ сахарозы, 10 мМ Mops-КОН, pH 7,4, 1 мМ ЕГТА, а также 0,1% БСА (для митохондрий сердца) или 0,3% БСА (для митохондрий печени). Концентрацию белка измеряли с бицинхониновой кислотой согласно инструкции производителя («Pierce», США), используя БСА (2 мг/мл) в качестве стандарта.

Уровень перекисного окисления липидов в митохондриальных мембранах определяли по накоплению соединений, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТВА) по методу Яги [30], как описано в [31]. Поглощение при 535 нм и 725 нм измеряли, используя спектрофотометр

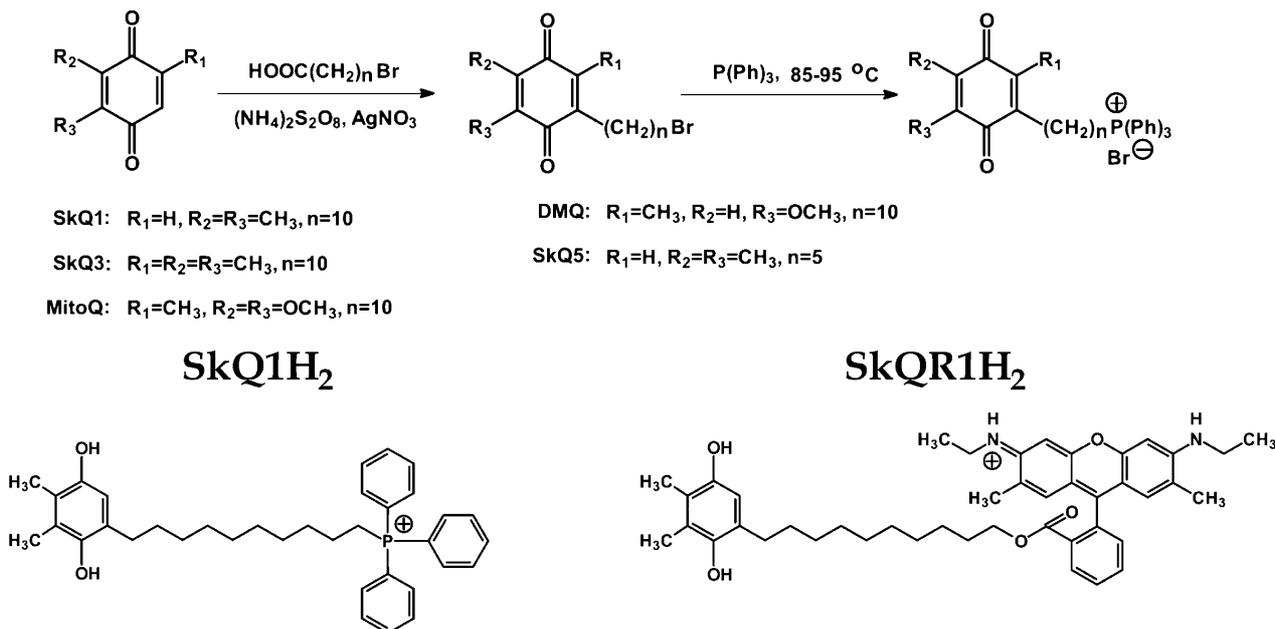


Рис. 1. Принцип синтеза производных хинона с алкилтрифосфонием в качестве катионной группы

Aminco DW2000. Содержание TBARS (аддукта МДА и ТВА) выражали в нмолях МДА/мг белка.

Образование H_2O_2 в суспензии митохондрий определяли флуориметрически по окислению Amplex Red (10-ацетил-3,7-дигидроксибензоксазина, «Invitrogen», США). Митохондрии (0,25 мг белка/мл) в среде выделения без БСА помещали в пластиковую кювету флуориметра (объем 0,5 мл), добавляли пероксидазу хрена (конечное содержание 1 IU/мл) и 4 мкл 10 мМ раствора Amplex Red в диметилсульфоксиде. Флуоресценцию измеряли при длине волны возбуждения 550 нм и испускания 595 нм с помощью спектрофлуориметра MPF4 Hitachi.

Мембранный потенциал митохондрий измеряли, используя в качестве индикатора сафранин О [32]. Среда измерения содержала 250 мМ сахарозу, 10 мМ MOPS-KOH pH 7,4, 0,1 мМ EGTA, 5 мМ сукцинат, 2 мкМ ротенон и 15 мкМ сафранин О. Концентрация митохондрий составляла 0,7 мг белка/мл. Поглощение света измеряли при длинах волн 555 нм и 523 нм на спектрофотометре Aminco DW-2000 в двухволновом режиме.

Клетки HeLa и подкожные фибробласты человека культивировали в модифицированной по Дюльбекко среде Игла (DMEM), содержащей 10% эмбриональной сыворотки теленка, стрептомицин (100 Е/мл) и пенициллин (100 Е/мл). Там, где указано, клетки HeLa трансфицировали плазмидой Mito-YFP («Clontech», США), содержащей ген желтого флуоресцентного белка

(YFP), слитый с последовательностью митохондриального адресного пептида из субъединицы VIII цитохром *c*-оксидазы. Трансфекцию проводили с помощью липофектамина 2000 согласно протоколу производителя («Invitrogen»). Трансфицированные клетки культивировали в среде DMEM, содержащей генитацин (500 мкг/мл, «Invitrogen»).

Митохондрии в клетках окрашивали с помощью 200 нМ митотрекера красного или 200 нМ митотрекера зеленого («Molecular Probes», США) в течение 15 мин при 37°. Для иммунохимического окрашивания клетки, выращенные на покровных стеклах, фиксировали 3,7% раствором формальдегида в фосфатном буфере 15 мин при комнатной температуре и окрашивали моноклональными антителами на цитохром *c* (6H2.B4, «BD Pharmingen», США) или поликлональными антителами на BAX (13666E, «BD Pharmingen»). Образцы анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Axiovert («Carl Zeiss», Германия) или конфокального микроскопа LSM 510 («Carl Zeiss»). В экспериментах по фрагментации митохондрий в каждом образце подсчитывалось не менее 300 клеток.

Фотодинамическую обработку клеток HeLa проводили после нагрузки 200 нМ митотрекером красным 15 мин при 37°. Клетки в пластиковых чашках Петри освещали ртутной лампой микроскопа Axiovert («Carl Zeiss») через объектив Neofluar 20x с зеленым фильтром (545/25 нм).

Свет включали на 1–1,5 мин (освещенность – 34,8 Дж/см²). Некроз клеток измеряли через 5 ч после освещения.

Накопление АФК в клетках HeLa измеряли, нагружая клетки 5 мкМ CM-DCF-DA («Molecular Probes») 15 мин при 37°. Флуоресценцию анализировали с помощью проточного цитофлуориметра Partec PAS-III («Partec», Германия), используя аргоновый лазер (488 нм).

Апоптоз выявляли, окрашивая ядра клеток посредством Hoechst 33342 (1 мкг/мл, 40 мин), как описано ранее [33]. В каждом образце подсчитывали не менее 500 ядер. Клетки с конденсированным и фрагментированным хроматином имели все признаки апоптоза, что подтверждалось окрашиванием флуоресцентными конъюгатами аннексина V (тест на экстернализацию фосфатидилсерина). В то же время эти клетки не окрашивались иодистым пропидием, что указывало на интактность внешней мембраны (отсутствие некроза). При высоких концентрациях H₂O₂ значительная часть клеток окрашивалась одновременно и аннексином V, и иодистым пропидием, что указывало на вторичный некроз. Некротические клетки в экспериментах по фотодинамической обработке подсчитывали после окрашивания иодистым пропидием (1 мкг/мл, 5 мин).

Электронная микроскопия. Клетки HeLa фиксировали 4%-ным раствором глутарового альдегида в 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4) при 4° в течение 2 ч, а затем обрабатывали 1%-ным раствором четырехоксида осмия в течение 1,5 ч. Образцы последовательно дегидратировали в растворах этанола (50%-ный этанол 30 мин; 60%-ный этанол 30 мин, дважды; 70%-ный этанол с 1,5% уранилацетатом 11 ч; 100%-ный этанол 30 мин; ацетон 30 мин). Образцы заключали в эпоксидную смолу Epon-812 и готовили срезы толщиной 700–800 Å посредством ультрамикротомата Ultracat («Leica», Германия). Срезы окрашивали свинцом. Полученные препараты исследовали и фотографировали с помощью электронных микроскопов HU-12 или H-700 («Hitachi», Япония).

Небелковые тиолы (в основном представленные восстановленным глутатионом) измеряли после разрушения клеток HeLa в PBS, содержащей 5% HClO₄, 2,5% Triton X-100 и 2,5 мМ EDTA. Денатурированные белки отделяли центрифугированием. Тиолы определяли по восстановлению 6 мМ 5,5'-дитио-бис(2-нитробензойной) кислоты (DTNB) в 250 мМ Na⁺-фосфатном буфере, рН 7,5, содержащем 6 мМ EDTA. Поглощение при 412 нм измеряли на спектрофотометре Hitachi 557. Белок определяли с помощью реактива Лоури.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Синтез SkQ. Нами синтезированы и охарактеризованы следующие новые соединения, состоящие из пластохинона или его метилированного производного, конъюгированных с катионами фосфония, аммония, родамина 19 или метилкарнитина через декановый или пентановый линкер: 10-(6'-пластохинонил) децилтрифенилфосфоний (SkQ1), метилированный 10-(6'-пластохинонил) децилкарнитин (SkQ2M), 10-(6'-метилпластохинонил) децилтрифенилфосфоний (SkQ3), 10-(6'-пластохинонил) децилтрибутиламмоний (SkQ4), 5-(6'-пластохинонил) амилтрифенилфосфоний (SkQ5) и 10-(пластохинонил) децилродамин 19 (SkQR1). Кроме того, были синтезированы два катионных производных убихинона: 10-(6'-убихинонил) децилтрифенилфосфоний (MitoQ) и его деметоксипроизводное, лишенное одной из двух метокси-групп (DMQ). В качестве контрольного соединения был синтезирован додецилтрифенилфосфоний (C₁₂TPP), в котором хиноновый остаток был заменен на этил. Формулы соединений приведены в «Сопроводительных материалах» на рис. S1 и S2*, а также в [26]; пути синтеза показаны на рис. 1 и S3–6; измерение константы мицеллообразования SkQ1 дано на рис. S7; спектры поглощения и ЭПР приведены на рис. S8.

Проницаемость БЛМ для катионных производных хинонов. Прежде всего, новые соединения были испытаны на их способность проникать через БЛМ. Измерения электрического диффузионного потенциала показали, что градиент SkQR1 в диапазоне концентраций 10⁻⁶–10⁻⁵ М приводил к образованию потенциала, близкого к расчетному по уравнению Нернста (10-кратному градиенту соответствовал потенциал 60 мВ со знаком «плюс» в отсеке с меньшей концентрацией катиона). При тех же концентрациях SkQ1, SkQ3 and MitoQ вызывали образование потенциала того же знака, но несколько меньшей величины, чем следовало из уравнения Нернста (рис. 2). В случае SkQ2M, SkQ4 и SkQ5 потенциал был значительно ниже. Эти соотношения можно объяснить различной проницаемостью БЛМ для исследованных катионов. Прямые измерения скорости переноса этих соединений из одного липидного монослоя БЛМ в другой показали, эта скорость падает в ряду SkQR1>SkQ1>SkQ3>MitoQ [50]. При исследовании катионов с низкой проницаемостью существует опасность, что диффузионный потен-

* Здесь и далее рис. S – см. «Сопроводительные материалы», в электронной версии статьи по адресу <http://www.protein.bio.msu.ru/biokhimiya>

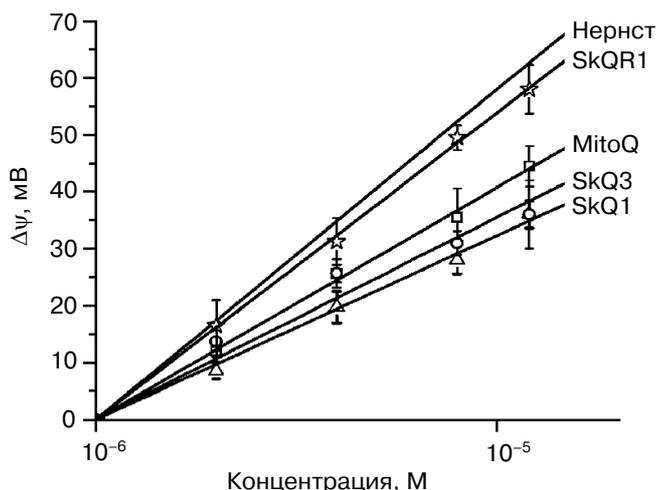


Рис. 2. Образование диффузионного электрического потенциала на плоской бислоистой фосфолипидной мембране при создании градиента концентрации SkQ1 и сходных соединений. В одном отсеке ячейки концентрация изучаемого соединения составляла 10^{-6} М. Концентрация в другом отсеке указана на оси абсцисс. Среда инкубации содержала 10 мМ Tris-HCl, 10 мМ MES, 10 мМ KCl, pH 4,0

циал будет шунтирован потоками других катионов и в результате упадет ниже теоретической величины. В принципе можно было бы повысить концентрацию исследуемого катиона, однако при этом все они проявляют детергентные свойства и повреждают БЛМ. Проблему удастся преодолеть, заменив БЛМ на толстую плоскую фосфолипидную мембрану. В этом случае концентрацию SkQ1 удастся повысить до $5 \cdot 10^{-4}$ М без повреждения мембраны. В области концентраций $5 \cdot 10^{-5}$ – $5 \cdot 10^{-4}$ М SkQ1 создавал диффузионный потенциал в полном соответствии с уравнением Нернста (см. рис. S9 в сопроводительных материалах). Таким образом, SkQ1, SkQ3 и SkQR1 имели наивысшую проникающую способность среди всех синтезированных нами новых соединений. Они и были выбраны для дальнейших экспериментов.

Антиоксидантные свойства SkQ в различных модельных системах. Анти- и прооксидантные свойства SkQ были исследованы в водных растворах, мицеллах, липосомах и БЛМ. Способность SkQ1 нейтрализовать радикалы OH^\cdot в водных растворах измерялась по снижению уровня люминесценции люминола, индуцированной азо-инициатором 2, 2'-азобис(2-амидинопропан) дигидрохлоридом (AAPH) [34, 35]. В этой системе 0,5 мкМ SkQ1H₂ (восстановленная форма SkQ1) существенно снижает люминесценцию, в то время как окисленный SkQ1 гораздо менее эффективен. MitoQH₂ обладал значи-

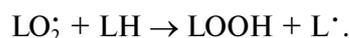
тельно меньшей эффективностью, чем SkQ1H₂, а MitoQ был совершенно не активен (рис. 3, а, б).

Прооксидантная активность SkQ1 и MitoQ в водных растворах измерялась по скорости окисления соответствующих гидрохинонов до хинонов или по скорости восстановления O_2 до O_2^- , для чего использовалась оптическая или ЭПР-спектроскопия (рис. 3, в, г). Оба метода ясно показали, что прооксидантная активность MitoQ значительно выше, чем SkQ1.

Антиоксидантную активность тех же соединений в липидных мицеллах определяли по торможению перекисного окисления метилового эфира линолевой кислоты (МЛ) в мицеллах, содержащих Triton X-100, измеряя скорость поглощения O_2 . Характеристикой антиоксидантной способности SkQ1H₂ и MitoQH₂ служила константа скорости (k_1) реакции между пероксидным радикалом оксигенированного остатка линолевой кислоты (LO_2^\cdot) с хинолом (QH_2):



которая конкурировала с развитием цепной реакции (константа скорости k_2):



Соотношение k_1/k_2 определяли из кинетической кривой поглощения O_2 . Абсолютные значения k_1 рассчитывали из k_1/k_2 , полагая $k_2 = 60 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$. Детали методики описаны в [24, 25].

Рассчитанные значения k_1 для SkQ1H₂ и MitoQH₂ составляли соответственно $2,2 \cdot 10^5$ и $0,58 \cdot 10^5 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$. Таким образом, реакционная способность SkQ1H₂ по отношению к LO_2^\cdot оказалась почти в 4 раза выше, чем у MitoQH₂. Эти данные согласуются с результатами, полученными для более простых аналогов SkQ1H₂ и MitoQH₂: триметил-1,4-гидрохинона и 2,3-диметокси-5-метил-1,4-гидрохинона [24, 25]. Важно отметить, что окисленные формы SkQ1 и MitoQ были неактивны в этой системе.

В следующей серии экспериментов мы исследовали антиоксидантную активность SkQ1 и MitoQ в липосомах. Во-первых, мы использовали наиболее распространенный метод измерения перекисного окисления липидов – определение накопления веществ, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (TBARS). Перекисное окисление липидов в липосомах из азолектина индуцировали смесью 100 мкМ FeSO_4 , 1 мМ аскорбата и 30 мкМ *трет*-бутилгидропероксида (tBOOH). При этих условиях образование TBARS в основном происходит благодаря образованию аддукта малонового диальдегида (МДА) с 2-тиобарбитуровой кислотой. Этот процесс заметно

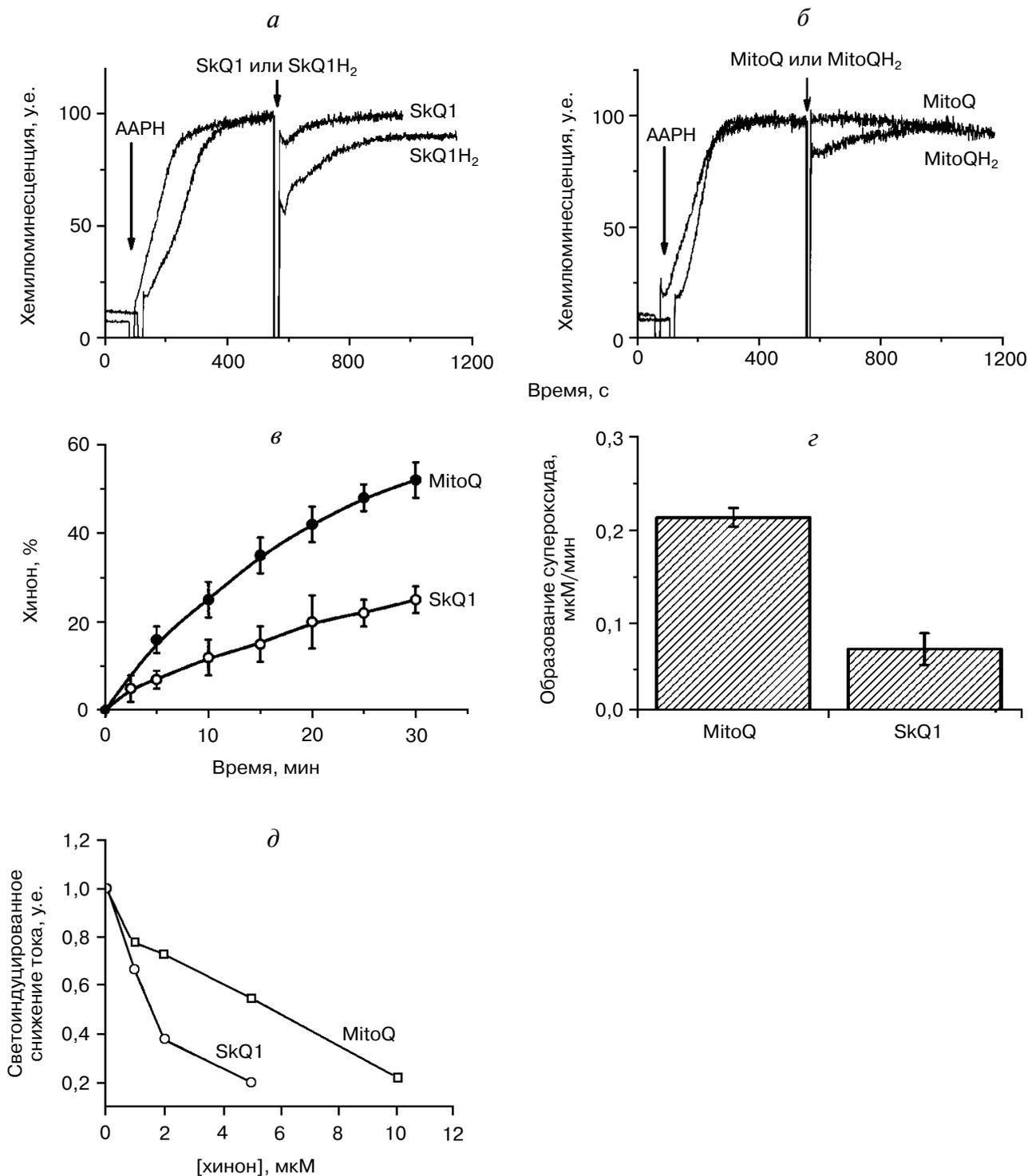


Рис. 3. Антиоксидантная (*а, б, д*) и прооксидантная (*в, г*) активности окисленных и восстановленных форм SkQ1 и MitoQ в водных растворах (*а-г*) и БЛМ (*д*). *а, б* – Тушение хемилюминесценции люминола, индуцированной ААРН. *в* – Кинетика аутоокисления SkQ1H₂ и MitoQH₂. SkQ1 и MitoQ растворяли в этаноле и восстанавливали NaBH₄. *г* – Скорость образования радикала O₂⁻. Измерения проводили в смеси фосфатного буфера (рН 8,0) и 50% этанола с помощью ЭПР-спектрометра, используя в качестве спиновой ловушки TIRON (4,5-дигидробензен-1,3-дисульфат натрия). Конечная концентрация хионов в пробах 5 мкМ. *д* – SkQ1 и MitoQ защищают грамицидиновые каналы в БЛМ от фотоинактивации в присутствии метиленового синего. БЛМ была образована из деканового раствора дифитаноилфосфатидилсерина. Инкубационная смесь: 100 мМ КСl, 10 мМ Tris, 10 мМ Mes (рН 7,0), 0,5 мкМ метиленового синего

замедлялся в присутствии 10 мкМ SkQ1H₂, а окисленная форма SkQ1 была значительно менее эффективна (не показано на рисунках).

Ранние этапы перекисного окисления липидов измеряли с помощью флуоресцентного зонда C11-BODIPY [36, 37]. Было показано, что добавка 5 мкМ Fe²⁺ сильно снижает флуоресценцию C11-BODIPY в азолектиновых липосомах. Это снижение практически полностью предотвращалось в присутствии 0,5 мкМ SkQ1H₂. Окисленный SkQ1 не оказывал никакого эффекта (не показано на рисунках).

Для изучения АФК-зависимого повреждения белков в мембранах была использована разработанная нами модель, где измерялась электрическая проводимость, создаваемая в БЛМ пептидным каналоформером, грамицидином Д [38]. Остатки триптофана в этом пептиде могут служить мишенью для атаки АФК, что приводит к инактивации канала. Для генерации АФК использовали смесь аскорбата, FeSO₄ и tBOOH. Было показано, что инактивация грамицидиновых каналов предотвращается SkQ1 и MitoQ, причем SkQ1 был более эффективен (рис. S10). Другой вариант того же опыта показан на рис. 3, д. В данном случае генерацию АФК осуществляли под действием света. В качестве фотосенсибилизатора мы использовали метиленовый синий. Видно, что SkQ1 лучше защищал грамицидиновые каналы от инактивации под действием АФК, чем MitoQ (величины C_{1/2} были соответственно 1,8 и 4,5 мкМ).

Взаимодействие SkQ с изолированными митохондриями. Накопление SkQ1 в митохондриях измеряли с помощью электрода, чувствительно к гидрофобным катионам. Добавка разбавителя, рассеивающего Δψ, вызывала частичный выход SkQ1 в среду. В случае SkQ5 выходило больше вещества чем при использовании SkQ1 (рис. S11). Это соответствовало их коэффициентам распределения в системе октан/вода, равным 13 000 : 1 для SkQ1 и 500 : 1 для SkQ5 (для MitoQ этот коэффициент составляет 3000 : 1 [14]).

Далее мы исследовали вопрос о том, могут ли SkQ1 и другие производные пластохинона восстанавливаться дыхательной цепью митохондрий животных. Было показано, что, как NAD-зависимые субстраты, так и сукцинат могут служить донорами электронов для восстановления SkQ1 (рис. 4, а и S12). Восстановление полностью блокировалось антимицином А, но не миксотиазолом (не показано). Этот эффект можно объяснить тем, что SkQ1 восстанавливается эндогенным CoQH₂ связанным в центре *i* комплекса III, так же, как это происходит с пластохиноном [39–42]. Окисление SkQ1H₂ происходит как энзиматически (при помощи

комплекса III, с участием сайта связывания миксотиазола), так и неэнзиматически в реакциях с липидными радикалами или кислородом. Измеренная общая скорость окисления SkQ1H₂ оказалась ниже, чем скорость восстановления SkQ1 дыхательной цепью (рис. S12). Это означает, что в дышащих митохондриях SkQ1 в основном находится в восстановленной форме, которая обладает высокой антиоксидантной активностью.

Каково же соотношение анти- и прооксидантной активности SkQ1 и подобных соединений в митохондриях? Для ответа на этот вопрос нами было изучено действие соединений данного ряда на накопление малонового диальдегида (МДА) в митохондриях сердца крысы, обработанных смесью Fe²⁺ и аскорбата. Из данных, представленных на рис. 4, б, видно, что антиоксидантное действие SkQ1 проявляется при гораздо более низких концентрациях, чем действие MitoQ. Сравнение эффективности различных соединений, ингибирующих накопления МДА, приведено в табл. 1. По результатам этого теста можно видеть, что SkQ1 и SkQR1 были наиболее эффективны, а MitoQ — наименее эффективен среди испытанных хинонсодержащих соединений, имеющих катионные остатки. Децилпластохинон, не имеющий катионной части, оказался менее эффективен, чем даже MitoQ, а C₁₂TRP, не имеющий хиноновой группы, был практически неактивен при использованных концентрациях. Дальнейший анализ показал, что генерация радикалов OH• в системе Fe²⁺ + аскорбат приводит прежде всего к избирательному окислению кардиолипина в митохондриях сердца, а 100 нМ SkQ1 резко уменьшает этот эффект (рис. 4, в). В других опытах было показано, что SkQ1 и прочие гидрофобные катионы вытесняют N-нонилакридиновый орган-

Таблица 1. Концентрации соединений, снижающие в два раза скорость образования МДА в митохондриях сердца крысы, обработанных Fe²⁺ и аскорбатом

Соединение	C _{1/2} , нМ
SkQ1	25
SkQR1	25
SkQ3	400
DMQ	110
MitoQ	1000
Децилпластохинон	2000
C ₁₂ TRP	нет эффекта при 2 000

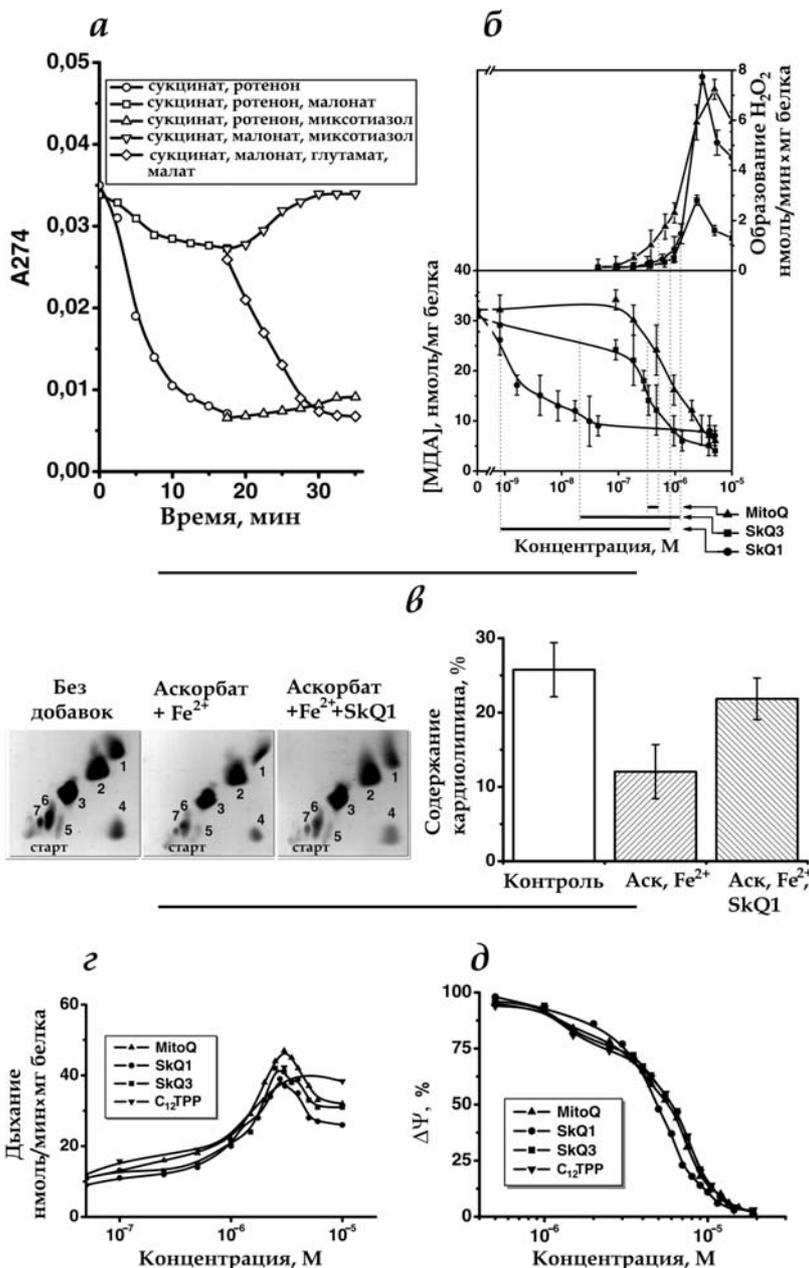


Рис. 4. Взаимодействие SkQ с изолированными митохондриями сердца крысы. *а* – Восстановление SkQ1H₂ в изолированных митохондриях сердца крысы. Как восстановление, так и окисление SkQ измеряли по изменению поглощения при 274 нм. Опыт начинали, добавляя в среду измерения 2,5 мМ сукцинат и либо 2 мкМ ротенон, либо 2,5 мМ малонат. Через 18 мин добавляли 1 мкМ миксотиазол или 4 мМ глутамат и 1 мМ малат. Среда измерения содержала 250 мМ сахарозы, 10 мМ Mops-KOH, 0,1 мМ EGTA, pH 7,4, и митохондрии (0,05 мг белка/мл). *б* – Антиоксидантную активность SkQ1, SkQ3 и MitoQ измеряли по торможению накопления МДА в митохондриях, окислявших глутамат и малат в присутствии 10 мМ аскорбата и 100 мкМ FeSO₄ (состав среды, как в *а*). Проксидантную активность измеряли по ускорению образования H₂O₂ в той же среде с глутаматом и малатом, но без аскорбата и FeSO₄. Отрезки прямых под осью абсцисс показывают размер «окна» между концентрациями, при которых соответствующие производные хинонов вызывают 20% анти- и 20% прооксидантный эффекты. *в* – SkQ1 защищает кардиолипин от окисления, вызванного OH[•]. Митохондрии инкубировали с аскорбатом и FeSO₄, как описано выше в *б*. В указанных пробах был добавлен 100 нМ SkQ1. Хроматографию митохондриальных липидов на пластинках силикагеля-60 проводили смесью хлороформ : метанол : вода в соотношении 65 : 25 : 4 (в горизонтальном направлении), и смесью хлороформ : ацетон : метанол : уксусная кислота : вода в соотношении 6 : 8 : 2 : 2 : 1 (в вертикальном направлении). Обозначения пятен липидов: 1, кардиолипин; 2, фосфатидилэтаноламин; 3, фосфатидилхолин; 4, фосфатидная кислота; 5, фосфатидилсерин; 6, фосфатидинозит; 7, лизофосфатидинозит. *г*, *д* – Влияние SkQ1, SkQ3, MitoQ и C₁₂TPP на дыхание в состоянии 4 (*г*) и мембранный потенциал (*д*) митохондрий. Среда измерения содержала сукцинат и ротенон, как указано в *а*

жевый (NAO) из комплекса с фосфолипидами (предположительно с кардиолипином) митохондрий сердца крысы, причем MitoQ оказывается менее эффективным, чем SkQ1 и особенно чем SkQR1 (табл. 2).

Для оценки прооксидантной активности хинонов мы измеряли стимуляцию образования H_2O_2 в митохондриях, окисляющих глутамат и малат в отсутствие ADP (состояние 4 по Чансу). Образование H_2O_2 , вызванное микромолярными концентрациями катионных хинонов, подавлялось ингибиторами дыхательной цепи (ротеноном, миксотиазолом или цианидом) и разобщителями, а C_{12} TPP проявлял гораздо меньшую прооксидантную активность (рис. S13 В, С). В этих условиях прооксидантное действие SkQ1 наблюдалось при более высоких концентрациях, чем в случае MitoQ. В результате диапазон концентраций, при которых проявляется исключительно антиоксидантный эффект для SkQ1 оказался существенно шире (0,9–850 нМ), чем для MitoQ (350–550 нМ), а SkQ3 занял промежуточное положение (25–1600 нМ).

При концентрации SkQ1, SkQ3 или MitoQ выше 10^{-6} М проявлялся разобщающий эффект этих соединений. В частности, наблюдались стимуляция дыхания в состоянии 4 и необратимое снижение мембранного потенциала (рис. 4, з и д). При концентрациях выше $5 \cdot 10^{-6}$ М все производные хинонов ингибировали дыхание в состоянии 4 (рис. 4, з), что объясняет некоторое снижение скорости образования H_2O_2 (рис. 4, б). Разобщенное дыхание также тормозилось под действием MitoQ, SkQ1, SkQ3 и C_{12} TPP (возможно, благодаря повреждению ферментов дыхательной цепи). Полумаксимальное подавление дыхания достигалось при 2–15 мкМ (данные не представлены на рисунках). Концентрации, при которых проявлялся разобщающий эффект SkQ, более чем в 1000 раз превышали концентрации, при которых проявлялось их ан-

тиоксидантное действие. Для MitoQ это «окно» было значительно меньше.

Таким образом, данные, полученные на липидных мицеллах, липосомах, БЛМ и изолированных митохондриях, показали, что SkQ являются чрезвычайно эффективными антиоксидантами. Их прооксидантная активность, разобщающее действие и способность ингибировать дыхательные ферменты проявлялись при значительно более высоких концентрациях.

SkQ защищают человеческие клетки в культуре от апоптоза и некроза, вызванных АФК. В клетках HeLa (карцинома шейки матки человека), выращенных в культуре, SkQR1 (флуоресцентное производное SkQ) селективно накапливается в митохондриях. Распределение его флуоресценции в клетках совпадает с локализацией YFP, флуоресцентного белка медузы, снабженного митохондриальным адресом (рис. 5, см. цветную вклейку) и с окраской митотреккером зеленым (не показано). Как следует из рис. 6, а, накопление SkQR1 в митохондриях живой клетки происходит в течение примерно 1 ч, а дальнейшая инкубация в отсутствие SkQR1 приводит к его медленному выходу из клетки ($t_{1/2} = 2,5$ ч). Разобщитель FCCP предотвращает накопление SkQR1 в клетках и ускоряет его выход.

Мы исследовали защитное действие производных SkQ при апоптозе и некрозе, вызванных АФК. Эксперименты показали, что инкубация фибробластов человека с SkQ1 и SkQR1 в чрезвычайно низких концентрациях в течение семи дней защищает клетки от апоптоза, индуцированного небольшими количествами H_2O_2 (этот протокол соответствует описанному в работе [16] для MitoQ). Апоптоз фибробластов человека, вызванный 400 мкМ H_2O_2 , полностью предотвращался 0,2 нМ SkQ1. SkQR1 был еще более эффективен, а MitoQ значительно менее эффективен, чем SkQ1 (рис. 6, в). Рассеивание $\Delta\psi$ с помощью разобщителя FCCP предотвращало защитное действие SkQ1 в столь низких концентрациях (рис. 6, б). Защитный эффект SkQ1 не проявлялся при повышении концентрации H_2O_2 до 500 мкМ (рис. S14А). SkQ1 в низких концентрациях блокировал развитие основных этапов апоптоза, вызванного H_2O_2 : транслокацию проапоптозного белка BAX в митохондрии и выход цитохрома *c* из митохондрий в цитозоль (рис. S14В). Ни децилпластохинон, ни C_{12} TPP в наномолярных концентрациях не вызывали подобного действию SkQ1 защитного эффекта (рис. S14 С). Токсическое действие SkQ1 проявлялось при микромолярных концентрациях и усиливалось в присутствии малых концентраций H_2O_2 , которые без SkQ1 были нетоксичны (не показано). Это эффект, возможно, связан с

Таблица 2. Гидрофобные катионы конкурируют с N-нони-лакридиноранжем за кардиолипин в митохондриях сердца крысы

Катион	K_a, M^{-1}
NAO	$1,2 \cdot 10^6$
SkQ3	$5,5 \cdot 10^6$
MitoQ	$1,0 \cdot 10^5$
SkQ1	$2,5 \cdot 10^5$
C_{12} TPP	$1,0 \cdot 10^4$
SkQR1	$8,0 \cdot 10^4$

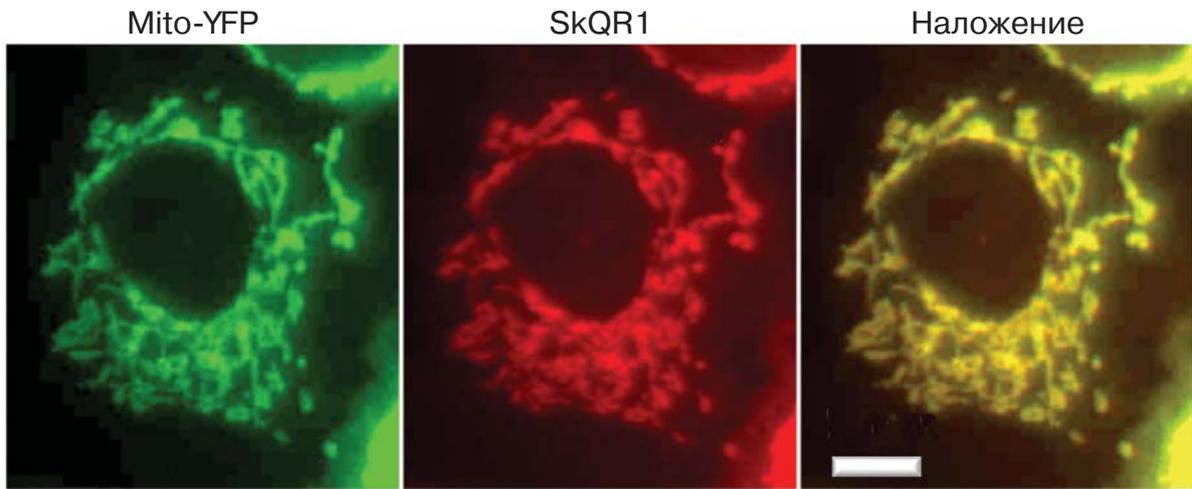


Рис. 5. Совпадение локализации SkQR1 (флуоресцентное производное SkQ) и флуоресцирующего белка медузы YFP, содержащего пептид с митохондриальным адресом 8-й субъединицы цитохромоксидазы. Клетки HeLa трансфицировали плазмидой Mito-YFP «Clontech» и инкубировали с 100 нМ SkQR1 в течение 15 мин. Шкала 15 мкм

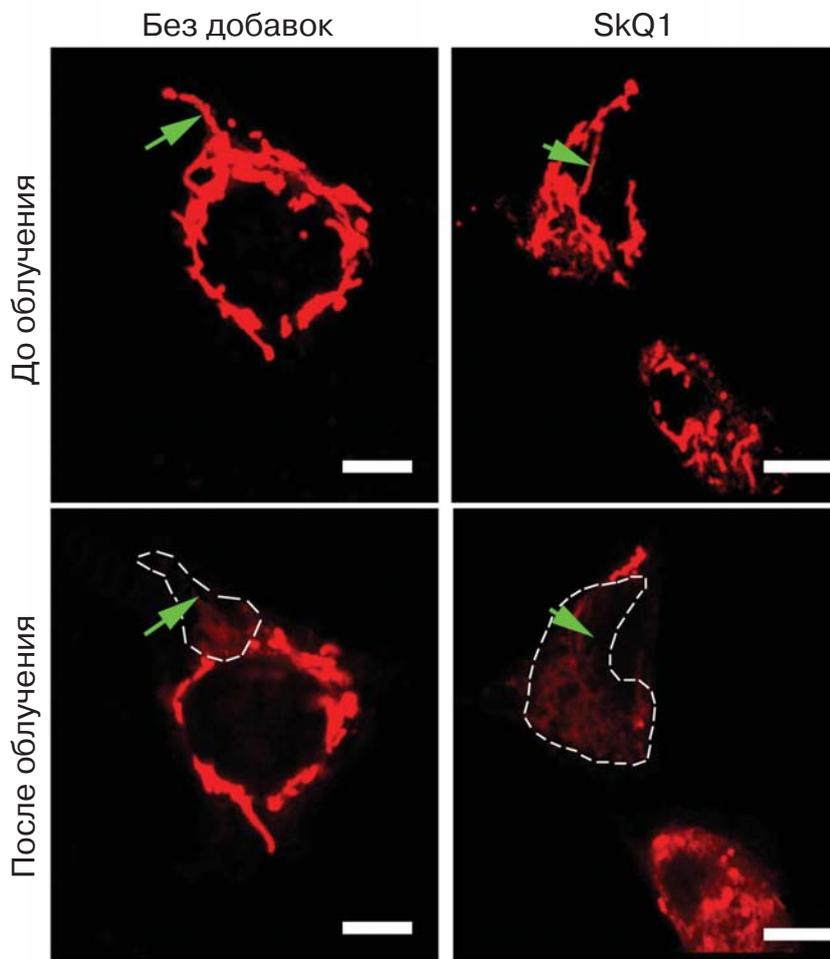


Рис. 9. SkQ1 вызывает образование единой электрической митохондриальной сети в клетках HeLa. Клетки инкубировали в среде DMEM с сывороткой (но без антибиотиков) в присутствии TMRM (100 нМ, 15 мин), а затем переносили на нагретый термостолмик микроскопа. Стрелкой указан участок, освещенный аргоновым лазером в конфокальном микроскопе Zeiss LSN 510 (488 нм; 50 сек; размер светового пятна 6×60 пикселей). Клетки анализировали через 15 мин после освещения. Там, где указано, клетки преинкубировали с 20 нМ SkQ1 в течение 7 дней. Шкала 15 мкм

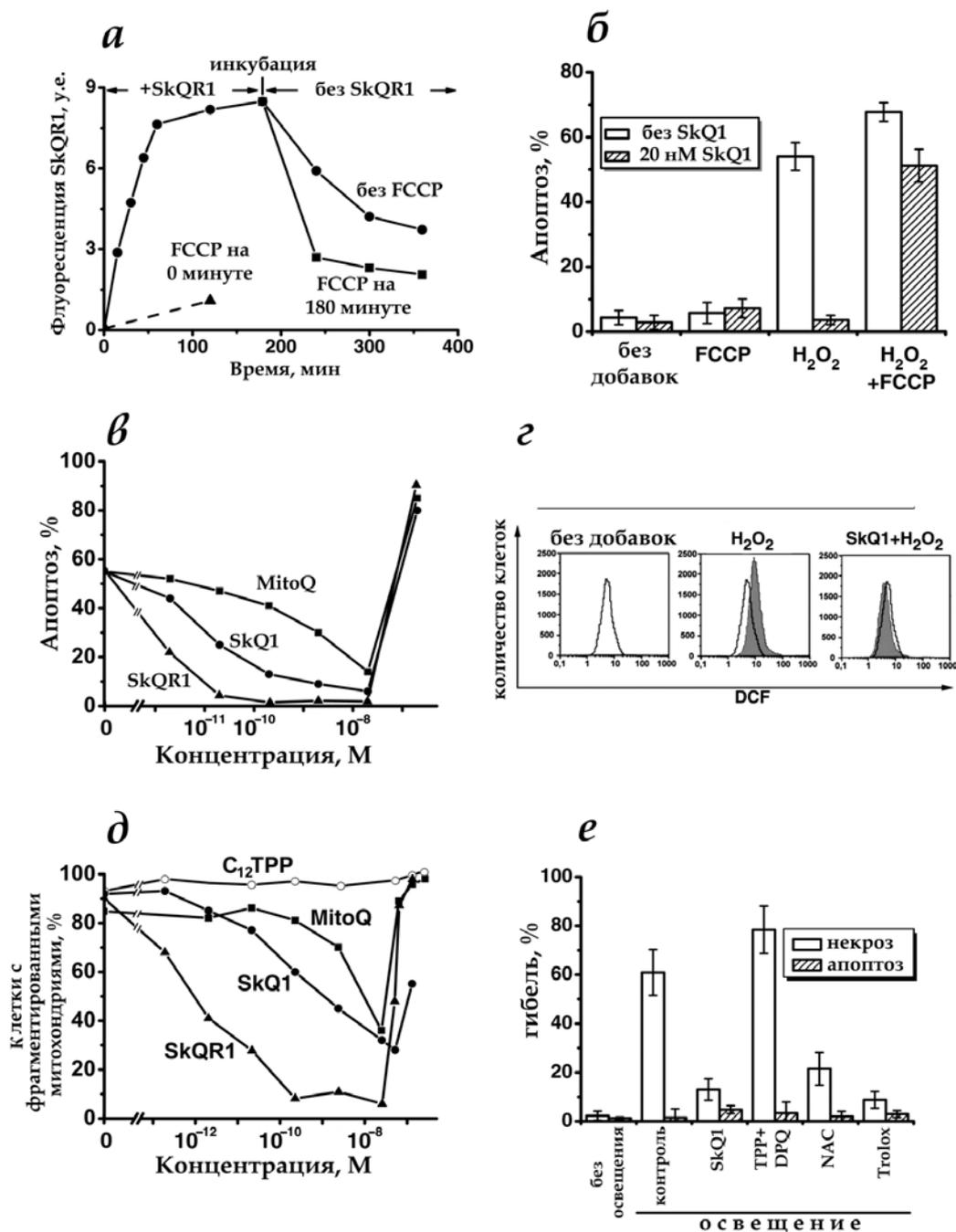


Рис. 6. Взаимодействие SkQ1, SkQR1 и MitoQ с человеческими клетками в культуре. *а* – Кинетика накопления SkQR1 в клетках HeLa и его выхода из клеток. В начальный момент времени к клеткам добавляли 50 нМ SkQR1. Там, где указано, добавлен 10 мкМ FCCP. Накопление и выход SkQR1 измеряли флуориметрически с помощью проточного цитометра Beckman FC500 (США). *б* – Преинкубация фибробластов человека в течение 7 дней с 20 нМ SkQ1 предотвращает апоптоз, вызванный H₂O₂. Апоптозные клетки подсчитывали через 24 ч после добавки H₂O₂. Добавки: 1 мкМ FCCP, 400 мкМ H₂O₂. *в* – SkQ1 и SkQR1 предотвращают H₂O₂-зависимый апоптоз человеческих фибробластов более эффективно, чем MitoQ. Условия как в *б*. *г* – SkQ1 (20 нМ, 7 дней) предотвращает накопление H₂O₂ в клетках HeLa, обработанных внешним H₂O₂ (200 мкМ, 45 мин). Клетки окрашивали 4 мкМ 5-(6-) хлорметил-2,7-дихлордигидрофлуоресцеинацетатом (DCF) в течение 15 мин и анализировали с помощью проточного цитометра. *д* – SkQR1, SkQ1 и MitoQ предотвращают фрагментацию митохондрий, вызванную H₂O₂. Фибробласты человека преинкубировали с SkQR1, SkQ1 или MitoQ в течение 2 ч и затем обрабатывали 400 мкМ H₂O₂ в течение 3 ч. *е* – SkQ1 предотвращает некроз, вызванный фотодинамической обработкой клеток HeLa, окрашенных митотрекером красным. Клетки освещали 1,5 мин зеленым светом (545 нм) так, что освещенность составляла 34,8 Дж/см². Некроз измеряли через 5 ч после освещения. Клетки обрабатывали 1 мкМ SkQ1, смесью 1 мкМ TPP и 1 мкМ DPQ, 20 мМ NAC или 1 мМ Тролокс за 1 ч до освещения

прооксидантным действием SkQ1 в микромолярных концентрациях.

Добавка небольшого количества H_2O_2 к клеткам HeLa вызывала увеличение продукции эндогенных АФК. Ранее мы показали, что образование АФК в этих условиях определяется активностью дыхательной цепи и стимулируется ингибиторами дыхания ротеноном (комплекс I) и миксотиазолом (комплекс III) [44]. Аналогичный феномен фотоиндуцированной генерации АФК в митохондриях был описан ранее в нашей группе как «АФК-зависимая продукция АФК» [45]. Из рис. 6, *г* видно, что H_2O_2 -зависимое образование АФК полностью блокировалось 20 нМ SkQ1.

H_2O_2 снижает уровень восстановленного глутатиона в клетках HeLa (рис. 7), что указывает на развитие окислительного стресса [46]. SkQ1 предотвращал окисление глутатиона, причем полумаксимальный эффект хинона достигался при $2 \cdot 10^{-12}$ М SkQ1. FCCP препятствовал действию SkQ1 (рис. 7). Эти данные подтверждают вывод о митохондриальной природе эндогенных АФК и указывают на то, что именно их продукция приводит к окислительному стрессу и апоптозу.

Инкубация клеток с SkQ1 и SkQR1 в чрезвычайно низких концентрациях предотвращала вызванную перекисью водорода фрагментацию митохондриальных филаментов с образованием мелких округлых митохондрий (подобный переход «нить–зерно» характерен для ранних стадий апоптоза [47]) (рис. 8). Защитное действие катионных хинонов проявлялось уже через 2 ч преинкубации и эффективность их действия возрастала в ряду: MitoQ < SkQ1 < SkQR1. Заметный эффект SkQR1 наблюдался уже при концентрации, равной $2 \cdot 10^{-13}$ М. C_{12} TPP оказался неэффективен (рис. 6, *д*). Различия в эффективности хинонов могли быть связаны с различной проницаемостью мембран для этих соединений, различной величиной «антиоксидантного окна» или их разным сродством к кардиолипину. Повышение концентрации хинонов приводило к утрате их защитного действия (рис. 6, *д*), что, по-видимому, было связано с их прооксидантной активностью. Это вывод подтвердили эксперименты на клетках HeLa (рис. S15), которые показали, что фрагментация митохондрий при совместном действии H_2O_2 и высоких концентраций SkQ1 предотвращалась таким антиоксидантом, как тролокс, а фрагментация в отсутствие H_2O_2 наблюдалась лишь при микромолярных концентрациях SkQ1.

В отсутствие H_2O_2 низкие концентрации SkQ1 стимулировали образование митохондриальной сети (рис. 9, см. цветную вклейку). Ло-

кальное повреждение этой сети с помощью узкого лазерного луча приводило к коллапсу $\Delta\psi$ во всем митохондриальном ретикулуме. В тех же условиях, но в отсутствие SkQ1, локальное повреждение приводило к снижению $\Delta\psi$ лишь в небольшой части митохондриальной популяции клетки. Можно полагать, что в культуре клеток снижение уровня эндогенных АФК под действием SkQ1 приводит к слиянию большинства митохондрий в единую электрическую сеть, подобную той, что была описана нами в ткани *ex vivo* [48].

В последней серии экспериментов было показано, что SkQ1 эффективно защищает клетки HeLa от некроза, вызванного АФК, которые образуются под действием света (рис. 6, *е*). В качестве фотосенсибилизатора был использован адресованный в митохондрии флуоресцентный краситель митотрекер красный. Полная защита от некроза наблюдалась при 0,5–1 мкМ SkQ1 и времени преинкубации 1 ч, а полумаксимальный эффект достигался примерно при 200 нМ (рис. S16). В тех же условиях, применение смеси 1 мкМ TPP и 1 мкМ децилпластохинона не имело защитного эффекта, а N-ацетилцистеин и тролокс оказывали защитное действие лишь при значительно более высоких концентрациях (соответственно 20 и 1 мМ, рис. 6, *е*).

Данные, представленные в этом разделе, указывают на то, что эффективное антиоксидантное действие SkQ проявляется на уровне целой клетки и приводит к защите от апоптоза и некроза, вызванных АФК.

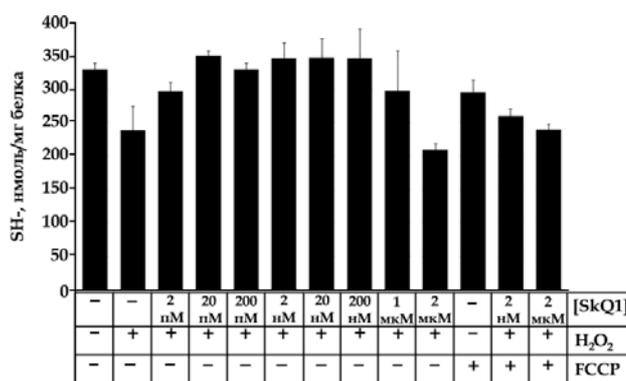


Рис. 7. Воздействие SkQ1 на содержание SH-соединений (главным образом восстановленного глутатиона) в клетках HeLa. Клетки преинкубировали с SkQ1 или без него в течение 4 ч, а затем обрабатывали H_2O_2 (1 мМ, 2 ч). Там, где указано, 5 мкМ FCCP был добавлен в среду для преинкубации

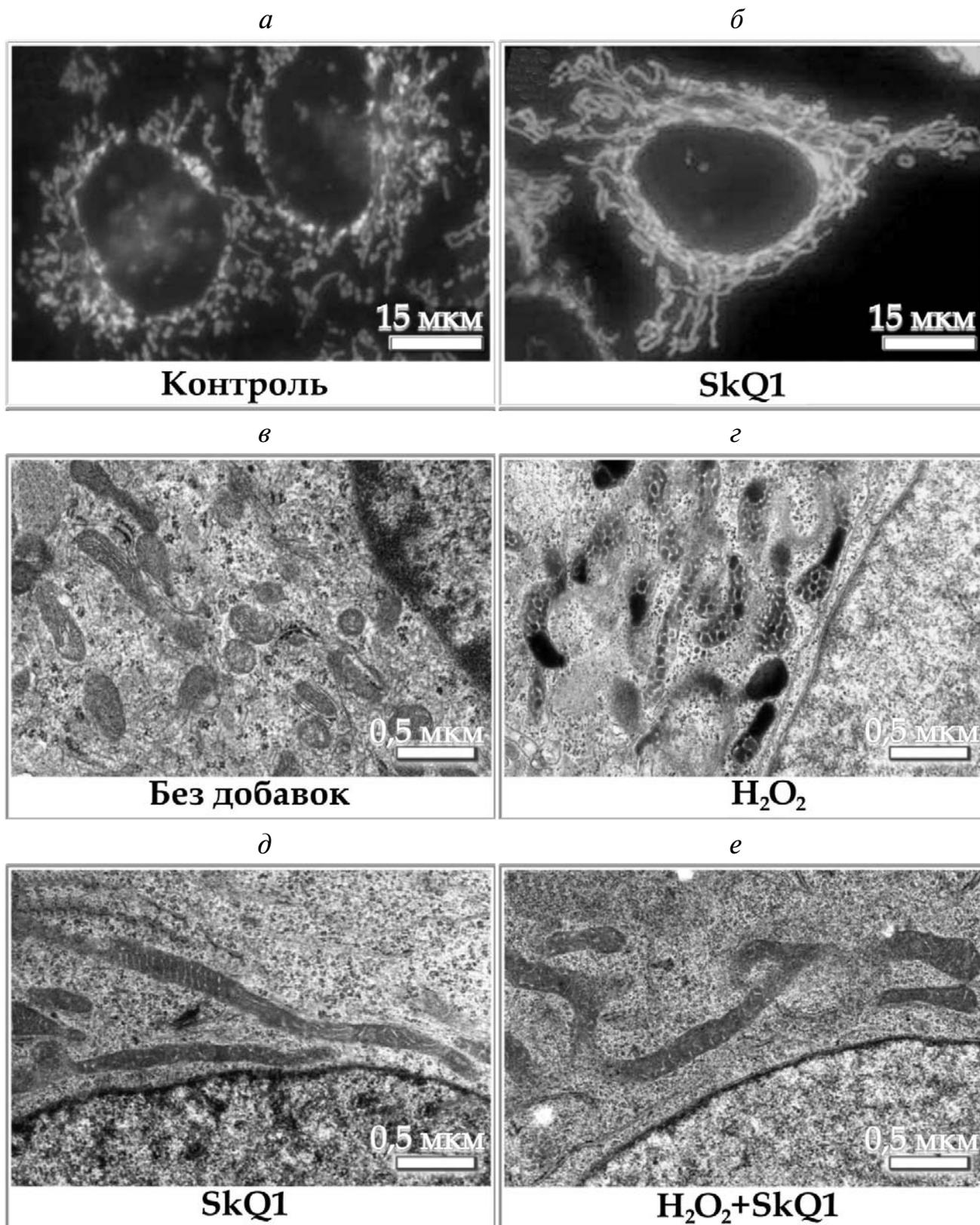


Рис. 8. Влияние SkQ1 на морфологию митохондрий в клетках HeLa. *а, б и в–е* – Данные соответственно конфокальной и электронной микроскопии. *а, в, з* – Без SkQ1; *б, д, е* – после 7 дней инкубации с 20 нМ SkQ1. После 7 дней преинкубации клетки обрабатывали 24 ч 100 мкМ H₂O₂ (*з, е*) или продолжали инкубацию без H₂O₂ (*а–в, д*). При конфокальной микроскопии митохондрии окрашивали митотрекером зеленым

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Наши результаты подтвердили первоначальное предположение о том, что катионные производные пластохинона (SkQ) обладают высокой антиоксидантной активностью. Эта гипотеза, исходно основанная на некоторых общебиологических соображениях, получила подтверждение в экспериментах на искусственных модельных мембранах, на изолированных митохондриях и на человеческих клетках в культуре. Эксперименты показали высокую проницаемость липидного бислоя (в модели БЛМ) для SkQ1, SkQ3 и SkQR1, а так же для MitoQ, предложенного ранее Мэрфи и сотрудниками [13] (рис. 2). В то же время, БЛМ были значительно менее проницаемы для SkQ4, SkQ5 и SkQ2M, в связи с чем в дальнейших исследованиях использовали SkQ1, SkQ3 и SkQR1. Показано, что SkQ1 защищает грамицидин D в БЛМ от инактивации, вызванной АФК. В водном растворе и во всех исследованных модельных системах (мицеллы метиллинолевой кислоты, липосомы, БЛМ) антиоксидантная активность SkQ1 была значительно выше, чем у MitoQ (рис. 3, рис. S10).

Эксперименты с митохондриями показали, что SkQ1, как и MitoQ, может быть восстановлен дыхательной цепью митохондрий (рис. 4, а). Скорость окисления SkQ1H₂ в митохондриях была значительно ниже, чем скорость восстановления SkQ1 (рис. S12). Эти данные указывают на то, что в митохондриях SkQ1 находится в основном в восстановленной форме и является возобновляемым антиоксидантом. Заметный антиоксидантный эффект SkQ1 наблюдался уже при концентрации 1 нМ. Повышение концентрации SkQ1 до 1 мкМ приводило к проявлению его прооксидантных свойств (рис. 4, б). Антиоксидантный эффект MitoQ наблюдался при значительно более высокой концентрации (0,3 мкМ), которая не намного отличалась от концентрации, при которой проявлялись его прооксидантные свойства (0,5 мкМ).

Необходимо отметить, что прооксидантная активность катионных хинонов в микромолярных концентрациях была очень велика. MitoQ и SkQ1 стимулировали образование H₂O₂ в митохондриях со значительно большей скоростью, чем в состоянии 4 или в присутствии разбавителя и антимицина А, т. е. в условиях, считающихся оптимальными для образования АФК (рис. 4, а и рис. S13 В, С). В условиях окислительного стресса именно прооксидантная активность катионных хинонов определяла их токсическое действие на клетки в области микромолярных концентраций. Таким образом, наши эксперименты позволили сформулировать

важнейшее требование к катионным производным хинонов, которые предполагается использовать как адресованные в митохондрии антиоксиданты. Оно состоит в том, что «окно» между концентрациями хинона, вызывающими анти- и прооксидантные эффекты, должно быть достаточно велико, чтобы минимизировать риск усиления образования АФК в митохондриях. Этот риск значительно меньше в случае SkQ1, чем в случае MitoQ, для которого это соотношение не превышает двух. Это обстоятельство должно быть принято во внимание при попытках использования катионных хинонов в медицине и биотехнологии. (О роли прооксидантного действия хинонов в их токсичности см. [49].)

Антиоксидантное действие SkQ1 проявлялось в защите от перекисного окисления кардиолипина, фосфолипида характерного для внутренней мембраны митохондрий (рис 4, в). В условиях окислительного стресса именно кардиолипин прежде всего подвергается перекисному окислению, в то время, как другие митохондриальные липиды остаются более или менее интактными. Такая селективность связана с тем, что кардиолипин содержит значительно больше остатков полиненасыщенных жирных кислот, чем прочие митохондриальные фосфолипиды. Полиненасыщенные жирные кислоты чрезвычайно чувствительны к окислению, легко образуют пероксидные радикалы (LO₂) в результате оксигенации метиленовой группы, расположенной между двумя двойными связями в углеводородной цепи (—СН=СН—СН₂—СН=СН—). SkQ1H₂, вероятно, прерывает цепные реакции перекисного окисления липидов, реагируя с LO₂ [50], и потому столь эффективно защищает кардиолипин от окисления. В этом явлении может играть роль комплексообразование гидрофобных катионных форм хинонов с кардиолипином, которое оказалось более прочным для SkQ1 и особенно SkQR1, чем для MitoQ.

Перекисное окисление кардиолипина является ключевым событием при окислительном стрессе в митохондриях. Во-первых, этот фосфолипид наиболее чувствителен к перекисному окислению, вызванному АФК, и служит «запалом» для цепных реакций окисления других компонентов мембраны. Во-вторых, окисленный кардиолипин перестает удерживать цитохром с на мембране митохондрий [51]. Свободный цитохром с в межмембранном пространстве митохондрий приобретает кардиолипин-пероксидазную активность и запускает «порочный круг» дальнейшего окисления кардиолипина [52]. В-третьих, потеря кардиолипина ведет к инактивации всех комплексов дыхательной це-

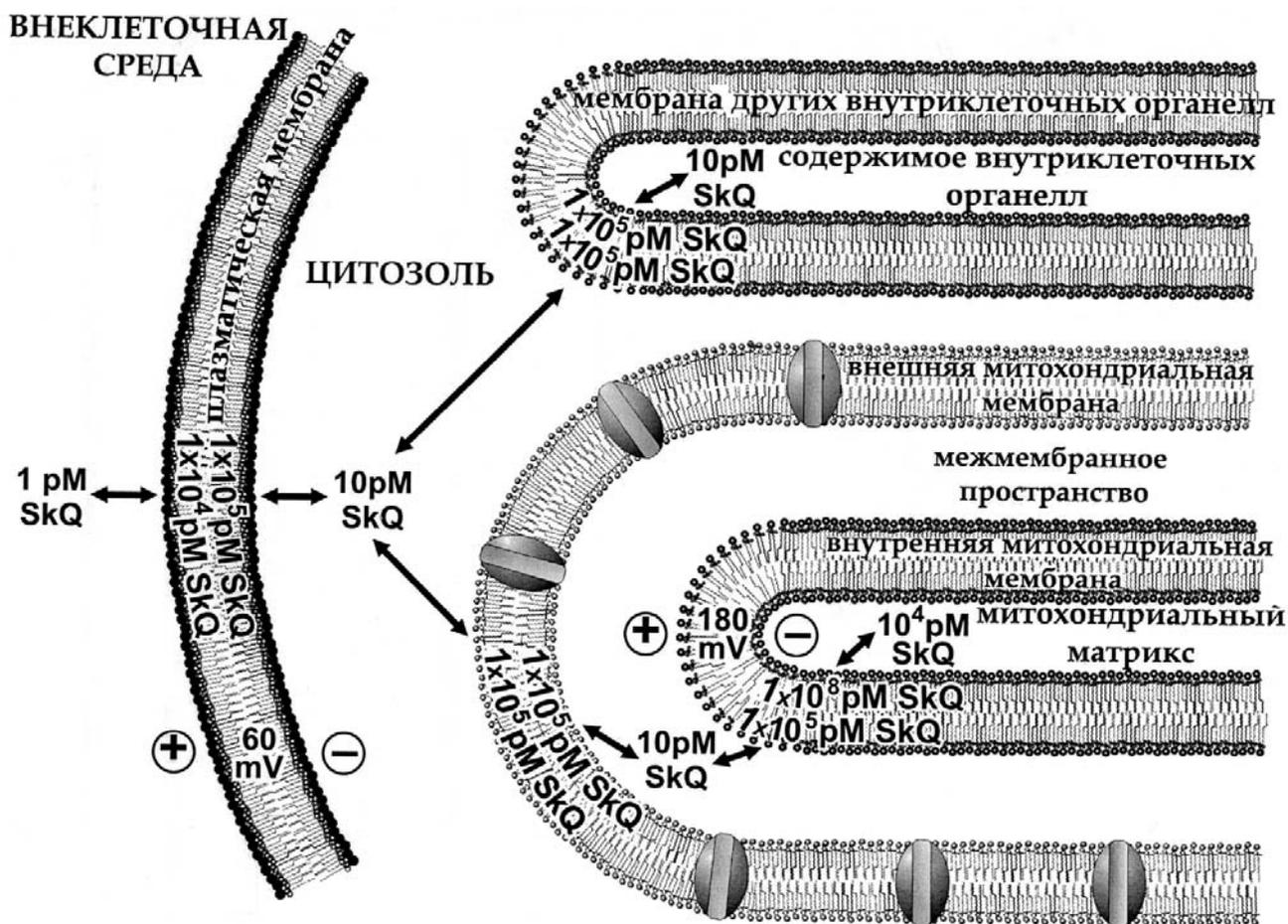


Рис. 10. Схема, иллюстрирующая накопление SkQ во внутреннем монослое внутренней мембраны митохондрий. Величины $\Delta\psi$ на внешней мембране клетки и на внутренней мембране митохондрий приняты соответственно за 60 и 180 мВ, а коэффициент распределения SkQ в системе мембрана/вода за $10\,000 : 1$

пи, H^+ -АТФ-синтазы, АТФ/АДР-антипортера и т.д., а также к повышению проницаемости внутренней мембраны митохондрий и, как следствие, к набуханию матрикса, разрушению внешней мембраны и выходу цитохрома *c* и других проапоптотических белков из межмембранного пространства в цитоплазму. Таким образом, окисление кардиолипина инициирует апоптоз [53] и, блокируя это окисление, SkQ1 может предотвратить гибель клеток.

В культуре человеческих клеток SkQ в чрезвычайно низких (наномолярных и даже пикомолярных) концентрациях предотвращают апоптоз, вызванный АФК. Еще более эффективно производные пластохинона блокируют такой ранний этап апоптоза, как фрагментация митохондрий. В этом случае защитный эффект проявлялся при $8 \cdot 10^{-13}$ М SkQR1 и $1 \cdot 10^{-11}$ М SkQ1 (рис. 6, д и рис. S15). Чтобы объяснить

столь высокую эффективность SkQ, необходимо учитывать, что они, во-первых, являются возобновляемыми антиоксидантами, и, во-вторых, специфически накапливаются в митохондриях. Коэффициент накопления можно оценить, учитывая величину $\Delta\psi$ на внешней мембране клетки (около 60 мВ, минус в цитоплазме) и на мембране митохондрий (около 180 мВ, минус в матриксе), что в сумме соответствует 10^4 -кратному градиенту SkQ между внеклеточной средой и матриксом митохондрий. Далее, необходимо учесть коэффициент распределения мембрана/вода, который составляет в случае SkQ примерно $1 \cdot 10^4$. Таким образом, концентрация SkQ во внутреннем липидном монослое внутренней мембраны митохондрий может превышать его концентрацию во внеклеточной среде в 10^8 раз, т.е. составлять около $1 \cdot 10^{-4}$ М при $1 \cdot 10^{-12}$ М SkQ1 во внеклеточной среде (рис. 10).

Не вполне ясно, почему замена катионной группы фосфония на родамин в составе SkQ приводит к повышению эффективности действия SkQ в клетках (рис. 6, в, д), тогда как в изолированных митохондриях значения $C_{1/2}$ для антиоксидантного действия SkQ1 и SkQR1 мало различаются (табл. 1). Наши эксперименты показали, что SkQR1 является субстратом неселективной помпы во внешней мембране клетки, откачивающей из клетки гидрофобные катионы и некоторые незаряженные гидрофобные молекулы. Эта помпа принадлежит к семейству «ABC-АТРАЗ» и определяет феномен множественной лекарственной устойчивости. Весьма вероятно, что SkQ1 также выбрасывается из клеток и, возможно, с большей эффективностью, чем SkQR1. Если это предположение верно, то ингибирование помпы повысит эффективность SkQ1 до уровня SkQR1. Эта возможность исследуется в настоящее время в рамках нашего проекта.

Эффективное накопление катионных хинонов в митохондриях приводит к тому, что уже в микромолярных концентрациях они проявляют прооксидантную активность и стимулируют апоптоз в условиях окислительного стресса. В случае MitoQ защитный эффект практически немедленно сменяется на противоположный при небольшом повышении концентрации хинона. Эксперименты показали, что SkQ являют-

ся значительно более эффективными антиоксидантами. Апоптоз, вызванный окислительным стрессом, по-видимому, играет ключевую роль в старении клеток [54] и организмов [55, 56]. Полученные нами результаты позволяют надеяться, что SkQ могут послужить эффективными средствами для лечения старческих патологий и продления здоровой жизни.

Результаты исследования действия SkQ *in vivo* и *ex vivo* будут представлены в следующих статьях этой серии [57–60].

Работа выполнена при финансовой поддержке компании «Митотехнология», МГУ им. М.В. Ломоносова, фонда «Вольное дело» (грант № 99F-06), РФФИ (гранты 07-04-01545, 07-04-00335) и Министерства науки и образования РФ (грант «Ведущие научные школы» № 5762.2008.4). Мы благодарны академику В.А. Садовничему, ректору МГУ, за внимание к проекту и всестороннюю поддержку. Благодарим М.Л. Домнинскую, Е.А. Литвинович, А.А. Заспу и Е.М. Зубина, принявших участие в некоторых экспериментах. Мы выражаем искреннюю признательность профессорам Г. Блобелю, М.П. Мерфи и А.Д. Виноградову за полезные советы и замечания. Особую благодарность мы приносим О.В. Дерипаске, без щедрой поддержки которого эти исследования были бы невозможны.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Skulachev, V.P. (2005) *IUBMB-Life*, **57**, 305–310.
- Lieberman, E.A., Topali, V.P., Tsofina, L.M., Jasaitis, A.A., and Skulachev, V.P. (1969) *Nature*, **222**, 1076–1078.
- Grinius, L.L., Jasaitis, A.A., Kadziauskas, Yu.L., Liberman, E.A., Skulachev, V.P., Topali, V.P., Tsofina, L.M., and Vladimirova, M.A. (1970) *Biochim. Biophys. Acta*, **216**, 1–12.
- Bakeeva, L.E., Grinius, L.L., Jasaitis, A.A., Kuliene, V.V., Levitsky, D.O., Liberman, E.A., Severina, I.I., and Skulachev, V.P. (1970) *Biochim. Biophys. Acta*, **216**, 12–21.
- Isaev, I.I., Liberman, E.A., Samuilov, V.D., Skulachev, V.P., and Tsofina, L.M. (1970) *Biochim. Biophys. Acta*, **216**, 22–29.
- Lieberman, E.A., and Skulachev, V.P. (1970) *Biochim. Biophys. Acta*, **216**, 30–42.
- Skulachev, V.P. (1988) *Membrane Bioenergetics*, Springer-Verlag, Berlin–Heidelberg.
- Green, D. (1974) *Biochim. Biophys. Acta*, **346**, 27–78.
- Северин С.Е., Скулачев В.П., Ягужинский Л.С. (1970) *Биохимия*, **35**, 1250–1257.
- Levitsky, D.O., and Skulachev, V.P. (1972) *Biochim. Biophys. Acta*, **275**, 33–50.
- Burns, R.J., Smith, R.A.J., and Murphy, M.P. (1995) *Arch. Biochem. Biophys.*, **322**, 60–68.
- Smith, R.A., Porteous, C.M., Coulter, C.V., and Murphy, M.P. (1999) *Eur. J. Biochem.*, **263**, 709–716.
- Kelso, G.F., Porteous, C.M., Coulter, C.V., Hughes, G., Porteous, W.K., Ledgerwood, E.C., Smith, R.A., and Murphy, M.P. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 4588–4596.
- James, A.M., Cocheme, H.M., Smith, R.A., and Murphy, M.P. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 21295–21312.
- Kelso, G.F., Porteous, C.M., Hughes, G., Ledgerwood, E.C., Gane, A.M., Smith, R.A., and Murphy, M.P. (2002) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **959**, 263–274.
- Saretzki, G., Murphy, M.P., and von Zglinicki, T. (2003) *Aging Cell*, **2**, 141–143.
- Jauslin, M.L., Meier, T., Smith, R.A., and Murphy, M.P. (2003) *FASEB J.*, **17**, 1972–1974.
- Murphy, M.P., and Smith, R.A. (2007) *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **47**, 629–656.
- O'Malley, Y., Fink, B.D., Ross, N.C., Prisinzano, T.E., and Sivitz, W.I. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 39766–39775.
- Doughan, A.K., and Dikalov, S.I. (2007) *Antioxid. Redox Signal*, **9**, 1825–1836.
- Vlachantoni, D., Tulloch, B., Taylor, R.W., Turnbull, D.M., Murphy, M.O., and Wright, A.F. (2006) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, E-5773.
- Tauskela, J.S. (2007) *IDrugs*, **10**, 399–412.
- Kruk, J., Jemiola-Rzeminska, M., and Strzalka, K. (1997) *Chem. and Phys. Lipids*, **87**, 73–80.
- Loshadkin, D., Roginsky, V., and Pliss, E. (2002) *Int. J. Chem. Kinetics*, **34**, 162–171.

25. Roginsky, V., Barsukova, T., Loshadkin, D., and Pliss, E. (2003) *Chem. Phys. Lipids*, **125**, 49–58.
26. Скулачев В.П. (2007) *Биохимия*, **72**, 1700–1714.
27. Severina, I.I. (1982) *Biochim. Biophys. Acta*, **681**, 311–317.
28. Palmer, J.W., Tandler, B., and Hoppel, C.L. (1977) *J. Biol. Chem.*, **252**, 8731–8739.
29. Grieff, D., and Meyer, S. (1961) *Biochim. Biophys. Acta*, **50**, 232–242.
30. Yagi, K., Nishigaki, I., and Ohama, H. (1968) *Vitamins*, **37**, 105–112.
31. Jentzsch, A.M., Bachmann, H., Furst, P., and Biesalski, H.K. (1996) *Free Radic. Biol. Med.*, **20**, 251–256.
32. Akerman, K.E.O., and Wikstrom, M.K.F. (1976) *FEBS Lett.*, **68**, 191–197.
33. Shchepina, L.A., Pletjushkina, O.Yu., Avetisyan, A.V., Bakeeva, L.E., Fetisova, E.K., Izyumov, D.S., Saprunova, V.B., Vyssokikh, M.Yu., Chernyak, B.V., and Skulachev, V.P. (2002) *Oncogene*, **21**, 8149–8157.
34. Lissi, E., Pascual, C., and Del Castillo, M.D. (1992) *Free Radic. Res. Commun.*, **17**, 299–311.
35. Krasowska, A., Rosiak, D., Szkapiak, K., and Lukaszewicz, M. (2000) *Curr. Top. Biophys.*, **24**, 89–95.
36. Naguib, Y.M. (1998) *Anal. Biochem.*, **265**, 290–298.
37. Drummen, G.P., van Liebergen, L.C., Op den Kamp, J.A., and Post, J.A. (2002) *Free Radic. Biol. Med.*, **33**, 473–490.
38. Sobko, A.A., Vigasina, M.A., Rokitskaya, T.I., Kotova, E.A., Zakharov, S.D., Cramer, W.A., and Antonenko, Y.M. (2004) *J. Membr. Biol.*, **199**, 51–62.
39. Von Jagow, G., and Bohrer, C. (1975) *Biochim. Biophys. Acta*, **387**, 409–424.
40. Weiss, H., and Wingfield, P. (1979) *Eur. J. Biochem.*, **99**, 151–160.
41. Chen, M., Liu, B.-L., Gu, L.-Q., and Zhu, Q.-S. (1986) *Biochim. Biophys. Acta*, **851**, 469–474.
42. Gu, L.-Q., Yu, L., and Yu, C.-A. (1990) *Biochim. Biophys. Acta*, **1015**, 482–492.
43. Gohil, V.M., Gvozdenovic-Jeremic, J., Schlame, M., and Greenberg, M.L. (2005) *Anal. Biochem.*, **343**, 350–352.
44. Chernyak, B.V., Izyumov, D.S., Lyamzaev, K.G., Pashkovskaya, A.A., Pletjushkina, O.Y., Antonenko, Y.N., Sakharov, D.V., Wirtz, K.W., and Skulachev, V.P. (2006) *Biochim. Biophys. Acta*, **1757**, 525–534.
45. Zorov, D.B., Filburn, C.R., Klotz, L.O., Zweier, J.L., and Sollott, S.J. (2000) *J. Exp. Med.*, **192**, 1001–1014.
46. Schulz, J.B., Lindenau, J., Seyfried, J., and Dichgans, J. (2000) *Eur. J. Biochem.*, **267**, 4904–4911.
47. Skulachev, V.P., Bakeeva, L.E., Chernyak, B.V., Domnina, L.V., Minin, A.A., Pletjushkina, O.Yu., Saprunova, V.B., Skulachev, I.V., Tsyplenkova, V.G., Vasiliev, J.M., Yaguzhinsky, L.S., and Zorov, D.B. (2004) *Mol. Cell. Biochem.*, **256/257**, 341–358.
48. Amchenkova, A.A., Bakeeva, L.E., Chentsov, Yu.S., Skulachev, V.P., and Zorov, D.B. (1988) *J. Cell Biol.*, **107**, 481–495.
49. Bolton, J.L., Trush, M.A., Penning, T.M., Dryhurst, G., and Monks, T.J. (2000) *Chem. Res. Toxicol.*, **13**, 135–160.
50. Antonenko, Y.N., Roginsky, V.A., Pashkovskaya, A.A., Rokitskaya, T.I., Kotova, E.A., Zasp, A.A., Chernyak, B.V., and Skulachev, V.P. (2008) *J. Membr. Biol.*, **222**, 141–149.
51. Tyurin, V.A., Tyurina, Y.Y., Osipov, A.N., Belikova, N.A., Basova, L.V., Kapralov, A.A., Bayir, H., and Kagan, V.E. (2007) *Cell Death Differ.*, **14**, 872–875.
52. Basova, L.V., Kurnikov, I.V., Wang, L., Ritov, V.B., Belikova, N.A., Vlasova, I.I., Pacheco, A.A., Winnica, D.E., Peterson, J., Bayir, H., Waldeck, D.H., and Kagan, V.E. (2007) *Biochemistry*, **46**, 3423–3434.
53. Choi, S.Y., Gonzalez, F., Jenkins, G.M., Slomianny, C., Chretien, D., Arnoult, D., Petit, P.X., and Frohman, M.A. (2007) *Cell Death Differ.*, **14**, 597–606.
54. Lee, S., Jeong, S.Y., Lim, W.C., Kim, S., Park, Y.Y., Sun, X., Youle, R.J., and Cho, H. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 22977–22983.
55. Chen, H., McCaffery, J.M., and Chan, D.C. (2007) *Cell*, **130**, 548–562.
56. Scheckhuber, C.Q., Erjavec, N., Tinazli, A., Hamann, A., Nystrom, T., and Osiewacz, H.D. (2007) *Nat. Cell Biol.*, **9**, 99–105.
57. Бакеева Л.Е., Барсков И.В., Егоров М.В., Исаев Н.К., Капелько В.И., Казаченко А.В., Кирпатовский В.И., Левина С.В., Козловский С.В., Лакомкин В.Л., Писаренко О.И., Плотников Е.Ю., Сапрунова В.Б., Серебрякова Л.И., Скулачев М.В., Стальмашук Е.В., Студнева И.М., Цкитишвили О.В., Васильева А.К., Викторов И.В., Зоров Д.Б., Скулачев В.П. (2008) *Биохимия*, **73**, 1607–1321.
58. Агапова Л.С., Черняк Б.В., Домнина Л.В., Дугина В.Б., Ефименко А.Ю., Фетисова Е.К., Иванова О.Ю., Калинина Н.И., Хромова Н.В., Копнин, Б.П., Копнин П.Б., Коротецкая, М.В., Личенницер М.Р., Лукашев А.Н., Плетюшкина, О.Ю., Попова Е.Н., Скулачев М.В., Шагиева Г.С., Степанова Е.В., Титова Е.В., Ткачук В.А., Васильев Ю.М., Скулачев В.П. (2008) *Биохимия*, **73**, 1622–1640.
59. Нероев В.В., Архипова М.М., Бакеев Л.Е., Фурсова А.Ж., Григорян Э.Н., Гришанова А.Ю., Иомдина Е.Н., Иващенко Ж.Н., Катаргина Л.А., Хорошилова-Маслова И.П., Килина О.В., Колосова Н.Г., Копенкин Е.П., Коршунов С.С., Ковалева Н.А., Новикова Ю.П., Филиппов П.П., Пилипенко Д.И., Робустова О.В., Сапрунова В.Б., Сенин И.И., Скулачев М.В., Сотникова Л.Ф., Стефанова Н.А., Тихомирова Н.К., Цепенко И.В., Щипанова А.И., Зиновкин Р.А., Скулачев В.П. (2008) *Биохимия*, **73**, 1641–1654.
60. Анисимов В.Н., Бакеева Л.Е., Егорин П.А., Филенко О.Ф., Исакова А.А., Манских В.Н., Михельсон В.М., Пантелеева А.А., Пасюкова Е.Г., Пилипенко Д.И., Пискунова Т.С., Попович И.Г., Рошина Н.В., Рыбина О.Ю., Сапрунова В.Б., Самойлова Т.А., Семенченко А.В., Скулачев М.В., Спивак И.М., Цыбулько Е.А., Тындик М.Л., Высоких М.Ю., Юрова М.Н., Забежинский М.А., Скулачев В.П. (2008) *Биохимия*, **73**, 1655–1670.

MITOCHONDRIA-TARGETED PLASTOQUINONE DERIVATIVES AS TOOLS TO INTERRUPT EXECUTION OF THE AGING PROGRAM

1. CATIONIC PLASTOQUINONE DERIVATIVES: SYNTHESIS AND *in vitro* STUDIES

Y. N. Antonenko¹, A. V. Avetisyan¹, L. E. Bakeeva¹, B. V. Chernyak¹,
V. A. Chertkov², L. V. Domnina¹, O. Yu. Ivanova¹, D. S. Izyumov¹,
L. S. Khailova¹, S. S. Klishin¹, G. A. Korshunova¹, K. G. Lyamzaev¹,
M. S. Muntyan¹, O. K. Nepryakhina¹, A. A. Pashkovskaya¹,
O. Yu. Pletjushkina¹, A. V. Pustovidko¹, V. A. Roginsky³, T. I. Rokitskaya¹,
E. K. Ruuge⁴, V. B. Saprunova¹, I. I. Severina⁵, R. A. Simonyan¹,
I. V. Skulachev⁶, M. V. Skulachev⁶, N. V. Sumbatyan², I. V. Sviryaeva⁴,
V. N. Tashlitsky², Y. M. Vassiliev¹, M. Yu. Vyssokikh¹, L. S. Yaguzhinsky¹,
A. A. Zamyatnin (Jr.)⁶, V. P. Skulachev^{1,6,7}

¹ A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, M. V. Lomonosov
Moscow State University, Vorobyevy Gory, Moscow 119991, Russia; fax: (495)9390338,
E-mail: bchernyak@yahoo.com

² Chemical Department, M. V. Lomonosov Moscow State University,
Moscow 119991, Russia

³ N. N. Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences,
ul. Kosygina 4, Moscow 119977, Russia

⁴ Institute of Experimental Cardiology, Cardiology Research Center,
ul. 3rd Cherepkovskaya 15A, Moscow 121552, Russia

⁵ Biological Department, M. V. Lomonosov Moscow State University,
Moscow 119991, Russia

⁶ Center for Mitoengineering, M. V. Lomonosov Moscow
State University, Moscow 119991, Russia

⁷ Department of Bioengineering and Bioinformatics, M. V. Lomonosov
Moscow State University, Moscow 119991, Russia

Received December 29, 2007

Synthesis of cationic plastoquinone derivatives (SkQs) containing positively charged phosphonium or rhodamine moieties connected to plastoquinone by decane or pentane linkers is described. SkQs (i) easily penetrate through planar, mitochondrial, and outer cell membranes, (ii) at low (nanomolar) concentrations possess strong antioxidant activity in aqueous solution, lipid micelles, liposomes, isolated mitochondria, and cells, (iii), show pronounced prooxidant activity at much higher (micromolar) concentrations, so the window between anti- and prooxidant concentrations is very large, (iv) are reduced by the respiratory chain to SkQH₂, the rate of oxidation of SkQH₂ being much lower than the rate of SkQ reduction, and (v) protect against oxidation by OH[•] of mitochondrial cardiolipin. In HeLa cells and human fibroblasts, SkQs operate as powerful inhibitors of the ROS-induced apoptosis and necrosis. For the two most active SkQs, i.e. SkQ1 and SkQR1, C_{1/2} values for inhibition of H₂O₂-induced apoptosis in fibroblasts appear to be as low as 1 · 10⁻¹¹ and 8 · 10⁻¹³ M, respectively. SkQR1, a fluorescent representative of the SkQ family, specifically stains energized mitochondria in living cells. Such specificity is explained by the fact that the mitochondrial matrix is the only negatively charged compartment inside the cell. Assuming that the Δψ values on the outer cell and inner mitochondrial membranes are about 60 and 180 mV, respectively, and taking into account distribution coefficient of SkQ1 between lipid and water (about 13 000 : 1), the SkQ1 concentration in the inner leaflet of the inner mitochondrial membrane should be 1.3 · 10⁸ times higher than in the extracellular space. This explains the very high efficiency of such compounds in experiments on cell cultures. It is concluded that SkQs are rechargeable, mitochondrially targeted antioxidants of very high efficiency and specificity. Therefore, they might be used to effectively prevent ROS-induced oxidation of lipids and proteins in the inner mitochondrial membrane *in vivo*.

Key words: SkQ1, penetrating cations, plastoquinone, antioxidants, mitochondria, apoptosis