

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ М.В.ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

ДУДЫЛИНА АРИНА ЛЕОНИДОВНА

**АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА, ОКСИД АЗОТА И
АНТИОКСИДАНТЫ В МИТОХОНДРИЯХ СЕРДЦА И МОДЕЛЬНЫХ
СИСТЕМАХ**

Специальность 03.01.02 — «Биофизика»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата физико-математических наук

Москва — 2019

Работа выполнена на кафедре биофизики физического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

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

Официальные оппоненты **Проскуряков Иван Игоревич**,
доктор физико-математических наук,
заведующий лабораторией молекулярной спектроскопии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук»

Реутов Валентин Палладиевич,
доктор биологических наук, доцент,
ведущий научный сотрудник лаборатории функциональной нейрцитологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук»

Власова Ирина Ивановна,
кандидат физико-математических наук,
ведущий научный сотрудник лаборатории навигационной редокс-липидомики Института регенеративной медицины Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации»

Защита диссертации состоится 17 октября 2019 года в _____ часов на заседании диссертационного совета МГУ.01.04 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119991 Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 2, Физический факультет МГУ, ЦФА. E-mail: info@physics.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский пр-т, д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: https://istina.msu.ru/dissertation_councils/councils/28357490/

Автореферат разослан «__» _____ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета МГУ.01.04,
кандидат технических наук

Сидорова А.Э.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. Все многоклеточные организмы могут чувствовать уменьшение концентрации кислорода при гипоксии и формировать ответную реакцию. Концентрация O_2 и редокс-гомеостаз неразрывно связаны, изменения в оксигенации клеток и тканей неизбежно приводят к изменению уровня активных форм кислорода (АФК). Поэтому актуальным является исследование закономерностей генерации супероксидных радикалов митохондриями при разных парциальных давлениях кислорода.

Митохондрии являются одним из главных источников АФК в клетке, они нуждаются в постоянной защите от повреждений, вызванных окислительным стрессом. Такая защита обеспечивается низкомолекулярными антиоксидантами и различными ферментативными системами. Наиболее важными эндогенными антиоксидантами являются коэнзим Q_{10} (CoQ_{10}) и витамин E . Функционирование CoQ_{10} как антиоксиданта зависит от соотношения его редокс форм: убихинона, убисемихинона и убихинола. Представляет интерес выяснить конкретные механизмы, с помощью которых CoQ_{10} осуществляет защитное действие от повреждений, связанных с возникновением окислительного стресса.

Использование антиоксидантов в качестве пищевых добавок оказалось недостаточно эффективным, поскольку лишь незначительные их количества способны проникать через мембраны клеток и попадать внутрь митохондрий. Решением проблемы стало изобретение митохондриально-направленных антиоксидантов, легко проходящих через биологические мембраны и в 100-500 раз больше накапливающихся внутри, благодаря присоединению к молекуле антиоксиданта липофильного катиона трифенилфосфония (TRP). Однако, двукратное увеличение дозы митохондриально-направленного антиоксиданта на основе убихинона ($mitoQ$) приводит к прооксидантному действию, что становится ограничением его использования в фармакологии. Необходимость создания самовозобновляющегося антиоксиданта, который не обладал бы таким побочным действием, привела к идее замены убихинона в $mitoQ$ на пластохинон. Так получили $SkQ1$, у которого разница в концентрациях, вызывающих про- и антиоксидантные эффекты в одинаковых условиях, была до тридцати раз больше. Получение спектральных характеристик и распределения электронной плотности по хиноидному кольцу в молекулах исследуемых

митохондриально-направленных антиоксидантов представляет значительный интерес в целях объяснения активности этих веществ.

В течение нескольких последних лет в при активном участии проф. А.Ф. Ванина проводятся исследования с целью создания нового лекарственного препарата на основе *ДНКЖ* с глутатионом. Изучение процесса образования и деструкции *ДНКЖ* с различными лигандами в митохондриях сердца и модельных системах внесет существенный вклад в понимание механизмов их взаимодействия с активными формами кислорода и роли этих соединений в качестве депо оксида азота в клетках.

Степень разработанности темы. Анализ научно-исследовательских работ посвященные участию *АФК* и *АФА* в развитии патологии сердца и других органов показал, что конкретные механизмы действия этих веществ в здоровых клетках и при патологиях сердечно-сосудистой системы еще не полностью установлены. Многочисленные публикации о влиянии фенольных соединений на живые организмы демонстрируют широкий спектр действия этих соединений, однако исследование их анти- и прооксидантных свойств до сих пор является актуальной задачей. Механизмы взаимодействия *ДНКЖ* с различными лигандами с *АФК*, их роль в качестве депо оксида азота, несмотря на большое количество опубликованных статей, также требуют более подробного изучения.

Цель диссертационного исследования.

Выяснить физико-химические механизмы образования и распада активных форм кислорода и метаболитов оксида азота в системах, моделирующих окислительный стресс и гипоксию в клетках миокарда, а также изучить антиоксидантное и антирадикальное действия природных фенольных соединений, хинонов и динитрозильных комплексов железа.

Задачи работы.

1) Оценить влияние гипоксии различной степени тяжести и реоксигенации на генерацию супероксидных радикалов изолированными митохондриями сердца.

2) Изучить на моделях изолированных митохондрий сердца и ферментативной системы ксантин-ксантинооксидаза антиоксидантные свойства физиологически значимых метаболитов оксида азота – динитрозильных комплексов железа.

3) Выяснить биофизические механизмы взаимодействия нитрозильных комплексов железа со свободными радикалами кислорода.

4) Изучить процессы, лежащие в основе защитного действия такого важного эндогенного антиоксиданта, как убихинол – восстановленная форма коэнзима Q.

5) Изучить биофизические механизмы взаимодействия природных фенольных антиоксидантов различной структуры со свободными радикалами кислорода, образующимися в митохондриях сердца.

Объект и предмет исследования. Объектом исследования является образование активных форм кислорода и метаболитов оксида азота в митохондриях клеток сердечной мышцы и модельных ферментативных системах. Предметом исследования являются изменения концентрации супероксида в модельных системах и функциональных характеристик дыхательной цепи митохондрий сердца в ответ на изменения условий эксперимента и экзогенно вводимые антиоксиданты.

Научная новизна.

1. Установлена зависимость скорости генерации супероксидных радикалов дыхательной цепью изолированных митохондрий сердца от парциального давления кислорода.

2. На модели изолированных митохондрий сердца впервые проведено детальное исследование антиоксидантного действия динитрозильных комплексов железа с тиольными лигандами при разных значениях парциального давления кислорода.

3. Установлена закономерность антиоксидантного действия восстановленного коэнзима Q₁₀ (лекарственная «водорастворимая форма убихинола-10») в модели изолированных митохондрий сердца.

4. На моделях ферментативной системы ксантин-ксантинооксидаза и изолированных митохондрий сердца получены сравнительные характеристики антиоксидантного действия природных фенольных соединений с различной структурой – кофейной кислоты, куркумина, ресвератрола, кверцетина и рутина.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные в работе экспериментальные данные позволяют лучше понять механизмы процессов, развивающихся при патологии сердечно-сосудистой системы и влияющих на образование активных форм кислорода в кардиомиоцитах, сопряжение в этих клетках

митохондриального дыхания и фосфорилирования, а также на нарушение сократительной функции сердца. Результаты работы могут внести вклад в разработку новых лекарственных препаратов на основе производных убихинона и пластохинона, а также природных фенольных соединений.

Методология диссертационного исследования. В работе использованы методы ЭПР-спектроскопии и ЭПР-оксиметрии *in vitro*, метод полярографического анализа энергетической биохимической активности митохондрий. Для обработки результатов использовались современные статистические методы.

Положения, выносимые на защиту.

1. Методом ЭПР спектроскопии, путем регистрации спектров ЭПР свободнорадикальных интермедиатов (семихинонов) *TIRON* в условиях непрерывной оксигенации образца, установлена зависимость скорости генерации супероксидных радикалов дыхательной цепью изолированных митохондрий при варьируемых значениях парциального давления кислорода.

2. Динитрозильные комплексы железа оказывают антиоксидантное действие при разных значениях парциального давления кислорода в системах, моделирующих окислительный стресс в клетках сердечной мышцы.

3. Восстановленный коэнзим Q_{10} в составе препарата «водорастворимая форма убихинола-10» проявляет себя в качестве антиоксиданта в изолированных митохондриях сердца.

4. Природные фенольные соединения растительного происхождения различной структуры (кофейная кислота, куркумин, ресвератрол, кверцетин и рутин) эффективно взаимодействуют с супероксидными радикалами, генерируемыми изолированными митохондриями сердца или модельной системой.

Степень достоверности. Достоверность диссертационного исследования подтверждается всесторонним анализом выполненных ранее научно-исследовательских работ, использованием апробированных современных экспериментальных методов и адекватным статистическим анализом.

Личный вклад автора. Автор диссертации лично проводила поиск и анализ литературных данных, принимала непосредственное участие в планировании и проведении экспериментов, обработке и анализе полученных результатов,

формулировании выводов, а также в подготовке публикаций и докладов на научных конференциях.

Публикации. По теме диссертационной работы опубликовано 4 статьи, индексируемые в базах Web of Science, Scopus, RSCI и РИНЦ.

Апробация результатов. Результаты работы представлены на 7 международных и всероссийских научных конференциях (13 публикаций тезисов докладов).

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, 3 глав, содержащих обзор литературных данных, описание материалов и методов исследования, изложение и обсуждение полученных результатов, заключения, основных результатов и выводов, списка цитируемой литературы. Работа изложена на 160 страницах, включает 3 таблицы и 47 рисунков. Список литературы включает 212 наименований.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В *введении* рассмотрена актуальность темы исследования, сформулированы цели и задачи диссертационной работы, показана научная новизна и практическая значимость выполненной работы.

Первая глава содержит обзор литературы. Представлена классификация активных форм кислорода (*АФК*), особое внимание уделено супероксидному радикалу ($O_2^{\bullet-}$), для которого приведены реакции, определяющие токсическое действие этого соединения. Рассмотрены основные источники супероксида в клетках. Описаны важные метаболиты оксида азота, пути их синтеза и функции в клетках, а также про- и антиоксидантные свойства. Рассмотрено состояние окислительного стресса, его причины и последствия для организма, роль *АФК* и метаболитов оксида азота в регуляции этого процесса. Приведено подробное описание строения электрон-транспортной цепи (*ЭТЦ*) митохондрий, механизма окислительного фосфорилирования и возможных центров генерации супероксида. Отдельно рассмотрен переносчик *ЭТЦ* коэнзим *Q* (*CoQ*), его синтез в организме и связь с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Приведены схемы действия наиболее эффективной в качестве антиоксиданта восстановленной формы *CoQ* в реакциях ингибирования перекисного окисления липидов, регенерации α -токоферола, взаимодействия с супероксидом. Также описаны митохондриально-направленные антиоксиданты – соединения, способные избирательно накапливаться в наиболее

нуждающихся в защите от окислительного стресса органеллах. Изложены современные представления о динитрозильных комплексах железа (*ДНКЖ*) с разными лигандами, их образовании и функциях. Проведен анализ литературы о группе фенольных соединений растительного происхождения различной структуры, особенности структуры молекул, позволяющих им проявлять себя в качестве эффективных перехватчиков радикалов. Описано влияние гипоксии на ткани организма, приведены схемы физиологического ответа, а также регуляции клеточного метаболизма и экспрессии генов в этом состоянии.

Вторая глава содержит описание материалов и методов исследования. Эксперименты проводились на крысах линии *Wistar*. Митохондрии выделяли методом дифференциального центрифугирования.

С помощью полярографического метода сравнивали скорости потребления кислорода интактными митохондриями и митохондриями, прошедшими преинкубацию в присутствии исследуемых фенольных соединений, таких как флавонолов (кверцетина и рутина), фенилпропанола (кофейной кислоты), стильбена (ресвератрола) и *o*-метоксифенола (куркумина).

Метод ЭПР-оксиметрии использовали для определения содержания кислорода в образце. Для обеспечения постоянства газового состава реакционную смесь вводили в газопроницаемую *PTFE Sub-Lite-Wall* капиллярную трубку, которая дважды складывалась и вставлялась в кварцевую трубку, открытую с обоих концов. Это обеспечивало достаточный поток газа варьируемого состава вокруг образца в резонаторе спектрометра ЭПР во время регистрации спектра. В качестве парамагнитных зондов, параметры спектров которых зависят от спинового обмена Гейзенберга и магнитного диполь-дипольного взаимодействия с молекулярным кислородом, использовали фталоцианин лития *LiPc* в потоке газа и *TEMPONE-¹⁵N-D₁₆* в реакционной смеси.

ЭПР-спектроскопия перехватчика супероксида *TIRON* позволила оценить антиоксидантную активность *ДНКЖ*, водорастворимой формы убихинола-10 и исследуемых фенольных соединений. Следует отметить, что *TIRON* может реагировать с *ОН•* без образования заметного количества ЭПР-видимых семихинонов, что согласуется с результатами, полученными нами в системе Фентона. Также, как хинол, *TIRON* может взаимодействовать с алкилпероксильными и алкоксильными

радикалами, однако в наших экспериментах с изолированными митохондриями (10-минутная инкубация в присутствии сукцината и антимицина *A*) это не являлось ограничением для использования *TIRON* в качестве перехватчика $O_2^{\bullet-}$. С помощью ЭПР-спектроскопии были получены характеристики спектров семихинонных форм коэнзима *Q* и митохондриально-направленных антиоксидантов *mitoQ* и *SkQ*.

Статистическую обработку данных проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа (*ANOVA*) пакета программ *Origin 8* фирмы *OriginLab Corporation (USA)*. Достоверность отличий определяли с использованием непараметрического критерия Данна для множественных сравнений с контрольной группой. Различия считали достоверными при $P < 0,05$ – в тексте отмечено (*). Эксперименты с каждой концентрацией исследуемых веществ проводили в 3-6 повторах. Результаты представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего независимых экспериментов.

Третья глава включает результаты и их обсуждение.

В разделе **3.1.** показано, что сочетание методов ЭПР-спектроскопии спиновых ловушек и ЭПР-оксиметрии позволило исследовать кинетику образования $O_2^{\bullet-}$ изолированными митохондриями сердца в условиях строго контролируемой оксигенации образца. Скорость сукцинат-зависимого образования супероксидных радикалов в комплексе *III* митохондрий мала (около 0,01 нмоль $O_2^{\bullet-}$ /мин/мг белка), однако существенно возрастает (до 0,8-1,2 нмоль $O_2^{\bullet-}$ /мин/мг белка) в присутствии антимицина *A*, блокирующего перенос электронов от цитохромов *b* на окисленный *CoQ10*.

Переход к аноксии (полному отсутствию кислорода в среде инкубации) в результате замены воздуха в газовом потоке на азот N_2 приводил к постепенному исчезновению спектра ЭПР семихинонов *TIRON*, что свидетельствует о правомерности использования газопроницаемых *PTFE Sub-Lite-Wall* капиллярных трубок в экспериментах с вариацией парциального давления кислорода (Рис. 1). Равновесие между внешней газовой средой (азотом) и находящейся в капилляре содержащей митохондрии реакционной смесью устанавливалось за 4–5 мин. Спектр (4), полученный через 6 сек после замены азота на воздух, свидетельствуют о том, что в нашей системе достаточно небольшого количества кислорода в образце для начала

генерации $O_2^{\bullet-}$ комплексом III изолированных митохондрий в присутствии антимицина А.

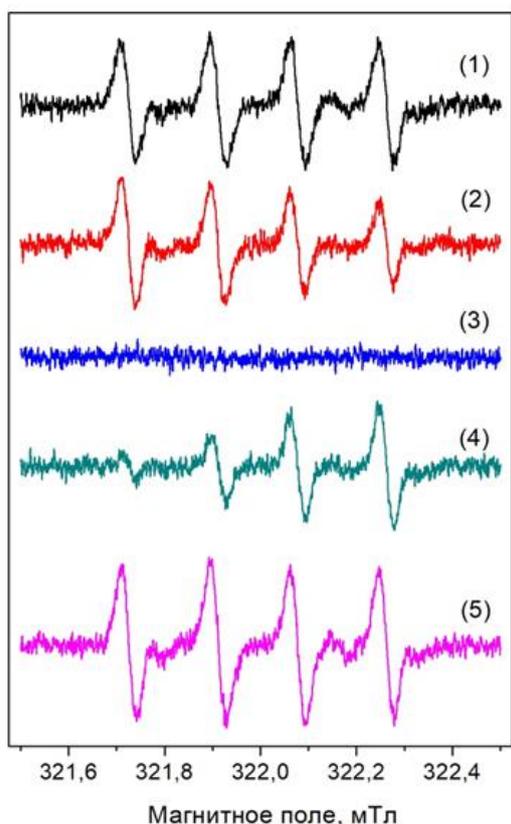


Рис. 1. Спектры ЭПР TIRON в инкубационной смеси, содержащей митохондрий сердца крысы, при изменении состава газовой среды: (1) 10 мин воздух, (2) 10 мин воздух, 2 мин N_2 , (3) 10 мин воздух, 5 мин N_2 , (4) 10 мин воздух, 5 мин N_2 , 6 сек воздух, (5) 10 мин воздух, 5 мин N_2 , 5 мин воздух.

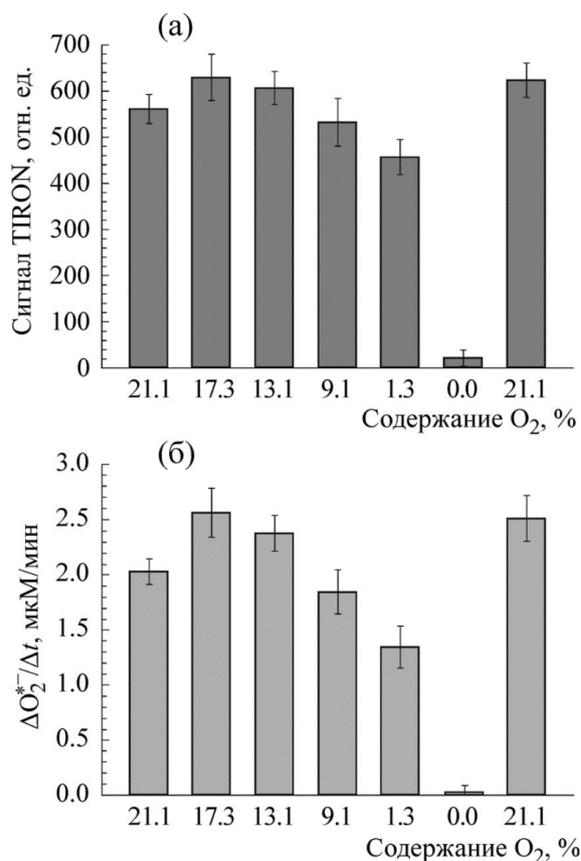


Рис. 2. Зависимость интенсивности сигнала ЭПР TIRON (а) и скорости образования супероксидных радикалов (б) в суспензии митохондрий сердца крысы от содержания кислорода в газовом потоке, продуваемом образце.

Из Рис. 2 видно, что, несмотря на некоторое падение интенсивности сигнала ЭПР TIRON при понижении содержания кислорода в газовом потоке, комплекс III митохондриальной дыхательной цепи продолжал образовывать супероксидные радикалы $O_2^{\bullet-}$, включая условия глубокой гипоксии (1,3% O_2). Генерация $O_2^{\bullet-}$ изолированными митохондриями сердца прекращалась только в условиях аноксии, т.е. после полного удаления кислорода из реакционной смеси при замене воздуха на азот. Реоксигенация (смена газовой среды с азота на воздух) приводила к быстрому росту

сигнала ЭПР *TIRON*. После 5-минутной реоксигенации, когда установилось равновесие между внешней газовой средой и суспензией митохондрий, скорость образования $O_2^{\bullet-}$ оказалась несколько выше, чем до аноксии.

Впервые проведено исследование влияния температуры на образование $O_2^{\bullet-}$ митохондриями сердца на малогабаритном автоматизированном спектрометре *ESR 70-03 XD/2*, позволяющем варьировать температуру газового потока, обдувающего газопроницаемый капилляр с суспензией митохондрий. Интенсивность сигнала ЭПР *TIRON* в суспензии митохондрий, окисляющих сукцинат в присутствии антимицина *A*, и, соответственно, скорость генерации $O_2^{\bullet-}$ в митохондриях сердца увеличивались с ростом температуры: при 28°C скорость составляла $4,75 \pm 0,75$ $\mu\text{M}/\text{мин}$, тогда как при 37°C скорость была $5,87 \pm 0,49$ $\mu\text{M}/\text{мин}$, однако основные закономерности процесса генерации $O_2^{\bullet-}$ митохондриями полностью сохранялись.

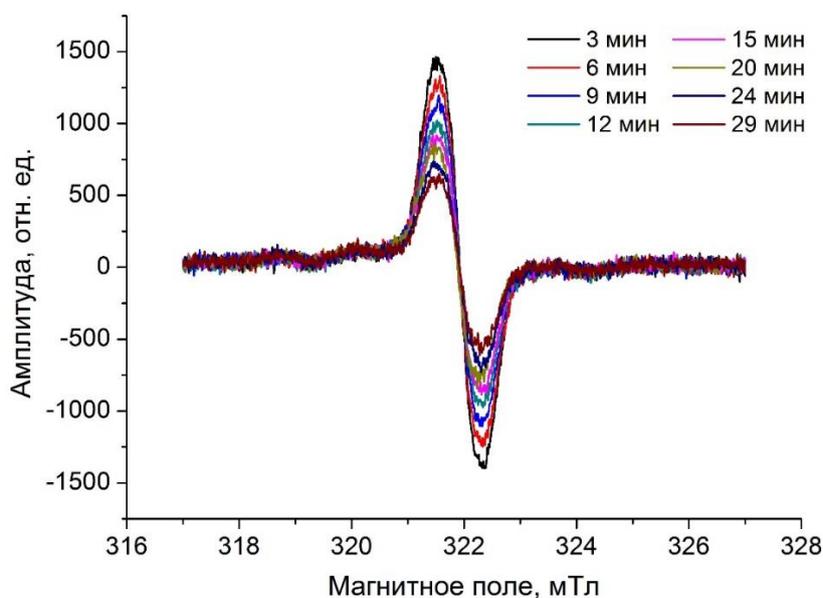


Рис. 3. Сигналы ЭПР ДНКЖ, добавленных к суспензии митохондрий сердца крысы. Имеют форму симметричного синглета с полушириной 0,7 мТл и центром при $g = 2,03$.

В разделе 3.2. представлены результаты исследования кинетики образования и разрушения ДНКЖ. Как известно, при комнатной температуре ДНКЖ дают синглетный сигнал ЭПР (Рис. 3). Мы изучали синтез ДНКЖ с помощью ЭПР в условиях симулированной гипоксии (газовая среда + азот) в изолированных митохондриях сердца крыс с использованием *S*-нитрозоцистеина в качестве донора *NO*. Смесь включала экзогенный *L*-цистеин, который стимулирует образование

преимущественно парамагнитного моноядерного ДНКЖ с тиолатными лигандами. На Рис. 5 показаны спектры ЭПР ДНКЖ (А) и кинетика образования ДНКЖ (Б). Переход от азота к кислороду сопровождался снижением концентрации парамагнитного ДНКЖ. После 8-минутного воздействия кислорода концентрация ДНКЖ снизилась до ~ 18% от исходного уровня. Тем не менее, скорость разрушения ДНКЖ не изменилась в случае стимулированной антимицином А генерации $O_2^{\bullet-}$ митохондриальным комплексом III (Рис. 4Б, кривая 2). Максимальная концентрация ДНКЖ, напротив, увеличилась. Парадоксальным результатом этого исследования было значительно более быстрое снижение концентрации ДНКЖ в аэробных условиях после добавления SOD и каталазы (Рис. 4Б, кривая 3).

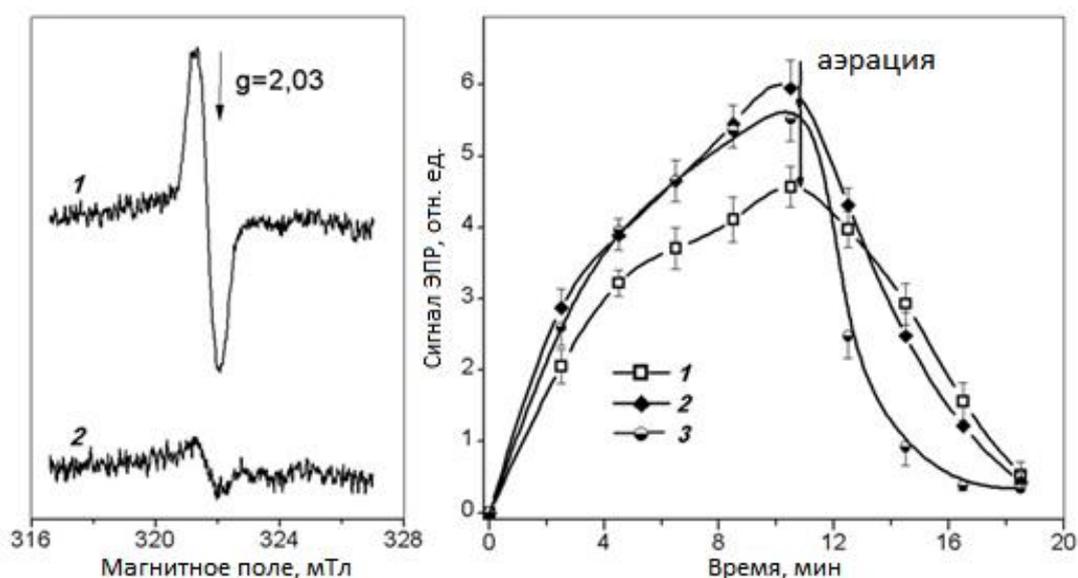


Рис. 4. Образование ДНКЖ в суспензиях изолированных митохондрий сердца крысы. (А) Спектры ЭПР тиолсодержащего ДНКЖ, записанные после 10,5-минутной инкубации в анаэробных условиях (1) и через 8 минут после перехода в аэробные условия (2). (Б) Кинетика образования ДНКЖ в инкубационной среде, содержащей митохондрии (22 мг/мл белка), 10 мМ цистеина и 12 мМ S-нитрозоцистеина в присутствии сукцината (1–3), антимицина А (2 и 3), 400 ед/мл SOD и 600 ед/мл каталазы (3). Переход от анаэробных к аэробным условиям обозначен стрелкой.

Поскольку комплекс III высвобождает $O_2^{\bullet-}$ в матрикс и межмембранное пространство, мы предположили, что этот эффект может быть следствием взаимодействия S-нитрозоцистеина с $O_2^{\bullet-}$. Известно, что реакция $O_2^{\bullet-}$ с GSNO, как правило, дает NO, тиол и молекулярный кислород. Другими гипотетическими продуктами взаимодействия GSNO с $O_2^{\bullet-}$ являются NO^- и $OONO^-$: При этом

образующиеся тиоловые радикалы GS^\bullet и $GSOO^\bullet$ также обладают способностью инициировать разложение $GSNO$ до NO .

С другой стороны, $O_2^{\bullet-}$ способен провоцировать выделение железа из аконитазы и ферритина. Митохондриальные формы этих белков продуцируют двухвалентное железо Fe^{2+} , необходимое для синтеза ДНКЖ. В наших исследованиях ферритин и $GSNO$, добавленные в реакционную среду, запускали синтез ДНКЖ; эта реакция усиливалась $O_2^{\bullet-}$, генерируемыми митохондриями (Рис. 5).

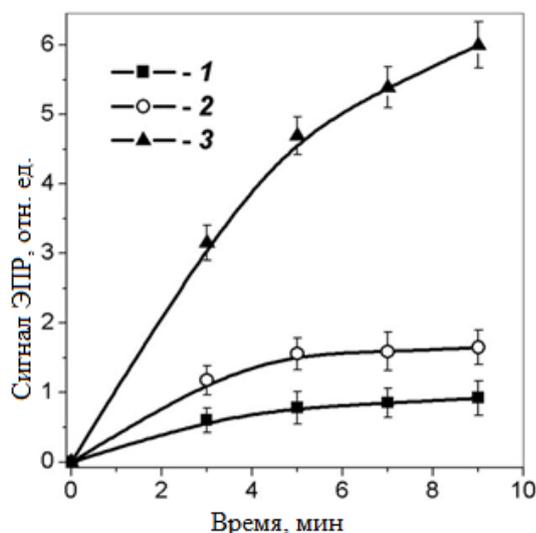


Рис. 5. Кинетика образования ДНКЖ с глутатионом в реакционной среде, содержащей: (1) 100 мМ К, Na-фосфатный буфер pH=7,4, 2 мМ GSH, 3 мМ GSNO и ферритин (0,2 мг/мл); (2) так же, как в (1) + митохондрии (5 мг белка/мл), 12 мМ сукцината; (3) то же, что и в (2) + 4 мМ антимицина А.

Таким образом, при определенных условиях $O_2^{\bullet-}$ может инициировать синтез ДНКЖ, увеличивая концентрацию NO и железа в инкубационной среде. Нельзя исключить, что в суспензии митохондрий возможна регенерация ДНКЖ из интермедиатов, образующихся при их взаимодействии с АФК и АФА.

В разделе 3.3. представлены результаты исследования влияния ДНКЖ на генерацию супероксидных радикалов при разном парциальном давлении кислорода. Молекулы ДНКЖ функционируют как триггеры антиоксидантных и прооксидантных процессов, а переключение свойств самих ДНКЖ зависит от парциального давления кислорода. Мы исследовали действие ДНКЖ с глутатионовыми лигандами на генерацию $O_2^{\bullet-}$ в модельной системе ксантин-ксантинооксидаза и в суспензии изолированных митохондрий из сердца крыс. При добавлении 100 мкМ ДНКЖ наблюдалось практически полное исчезновение сигнала ЭПР спиновой ловушки

TIRON, при использовании меньших концентраций эффект *ДНКЖ* был не столь значительным. При концентрации 10 мкМ *ДНКЖ* происходило постепенное возрастание сигнала ЭПР спиновой ловушки. Это свидетельствует о том, что *ДНКЖ* расходуется, вступая в реакцию с $O_2^{\bullet-}$, а образования или регенерации *ДНКЖ* в системе не происходит.

Из Рис. 6 видно, что при нормоксии (~21% O_2) скорость образования семихинонов *TIRON* зависит от концентрации *ДНКЖ* в суспензии митохондрий. При концентрациях 1-100 мкМ препарат не влиял на скорость поглощения кислорода митохондриями при добавлении сукцината как субстрата окисления. При более высоких концентрациях *ДНКЖ* (≥ 1 мМ) наблюдалось практически полное исчезновение сигнала ЭПР *TIRON* (не показано). Контрольный эксперимент с *GSH* без *ДНКЖ* дал результат на порядок меньше.

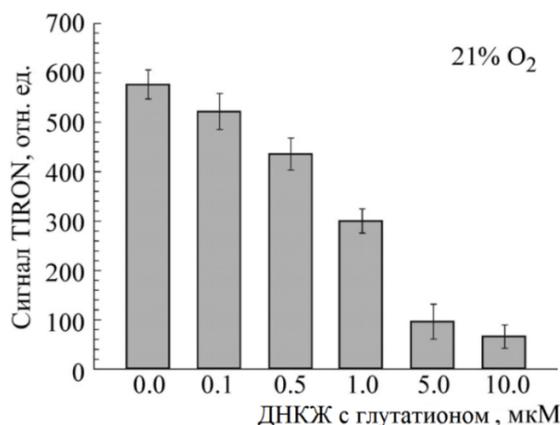


Рис. 6. Зависимость интенсивности сигнала ЭПР *TIRON* в суспензии митохондрий сердца крысы от концентрации *ДНКЖ* с глутатионом в среде инкубации. Содержание кислорода в газовом потоке 21%, температура ~25°C.

ДНКЖ с глутатионом эффективно взаимодействуют с супероксидными радикалами при разных значениях парциального давления кислорода, включая условия глубокой гипоксии (Рис. 7). В опытах по генерации $O_2^{\bullet-}$ комплексом III дыхательной цепи митохондрий в присутствии сукцината и антимицина А при физиологической температуре 37°C после добавления 100 мкМ *ДНКЖ* с глутатионом происходило исчезновение сигнала ЭПР *TIRON* (аналогично с моделью ксантин-ксантинооксидазы). Таким образом, *ДНКЖ* имеет сравнимую или более высокую константу скорости взаимодействия с $O_2^{\bullet-}$, чем *TIRON*. Поскольку константа скорости реакции *GSH* с $O_2^{\bullet-}$ составляет $10^2-10^3 M^{-1} c^{-1}$, захват супероксида глутатионовыми лигандами *ДНКЖ* не

вносит существенный вклад в антирадикальное действие этих комплексов. В опытах с митохондриями последующего возрастания сигнала ЭПР *TIRON* не происходило даже при концентрации 1 мкМ препарата ДНКЖ с глутатионом после 10 минут с начала эксперимента.

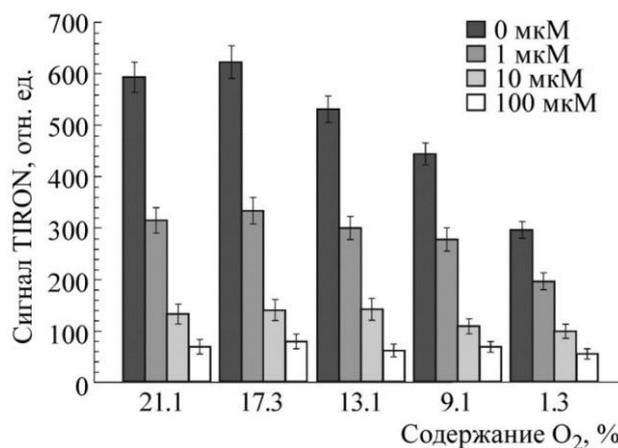


Рис. 7. Зависимость интенсивности сигнала ЭПР *TIRON* в суспензии митохондрий сердца крысы от содержания кислорода в газовом потоке и концентрации ДНКЖ с глутатионом в среде инкубации.

Можно предположить, что ДНКЖ в присутствии митохондрий, которые являются источником железа и *NO* для формирования этих комплексов, либо не разрушаются полностью, либо происходит их частичная регенерация.

В разделе 3.5. приведены результаты исследования влияния «водорастворимой формы убихинола-10» на параметры функционального состояния митохондрий сердца и генерацию ими супероксидных радикалов. Предварительная инкубация митохондрий с препаратом *CoQ10-H₂* в концентрации 0,05-1 мкг действующего вещества/мг белка не приводила к значимому снижению эффективности окислительного фосфорилирования (Таблица 1). Однако, при увеличении концентрации препарата происходило достоверное снижение дыхательного контроля: инкубация митохондрий с 10 мкг/мг *CoQ10-H₂* вызывала уменьшение на 34%.

Группы	Скорость поглощения кислорода, нмоль/мин мг белка		Дыхательный контроль
	Состояние 4	Состояние 3	
Контроль, интактные митохондрии, n=5	16,2 ± 2,2	40,6 ± 4,4	2,52 ± 0,27
Митохондрии с CoQ_{10-H_2} 0,05 мкг/мг белка, n=3	15,7 ± 0,3	39,5 ± 2,0	2,52 ± 0,12
Митохондрии с CoQ_{10-H_2} 0,1 мкг/мг белка, n=3	15,9 ± 0,3	37,0 ± 2,1	2,32 ± 0,13
Митохондрии с CoQ_{10-H_2} 1 мкг/мг белка, n=3	16,2 ± 0,2	35,8 ± 3,3	2,21 ± 0,19
Митохондрии с CoQ_{10-H_2} 10 мкг/мг белка n=3	20,1 ± 1,5 *	32,0 ± 1,9 *	1,60 ± 0,21 *

Таблица 1. Скорость поглощения кислорода и дыхательный контроль митохондрий после 30 мин инкубации с препаратом CoQ_{10-H_2} в концентрации 0,05, 0,1, 1 и 10 мкг/мг белка.

При этом под действием исследуемого препарата наблюдалось снижение скорости поглощения кислорода в присутствии ADP (состояние 3) на 20% и увеличение скорости поглощения кислорода в состоянии 4 (без ADP) на 32%.

В щелочной среде в присутствии O_2 имеет место автоокисление убихинолов: свободнорадикальные интермедиаты – семихиноны $CoQ^{\bullet-}$, характеризуются многокомпонентными спектрами ЭПР с разрешенной $СТС$ (Рис. 8). Нам не удалось зарегистрировать спектр ЭПР свободных радикалов действующего вещества препарата «водорастворимая форма убихинола-10» (щелочная среда инкубации, присутствие O_2). Однако, при $pH \geq 8,5$ появился дублетный спектр ЭПР, по параметрам характерный для свободных радикалов аскорбиновой кислоты, входящей в состав исследуемого препарата.

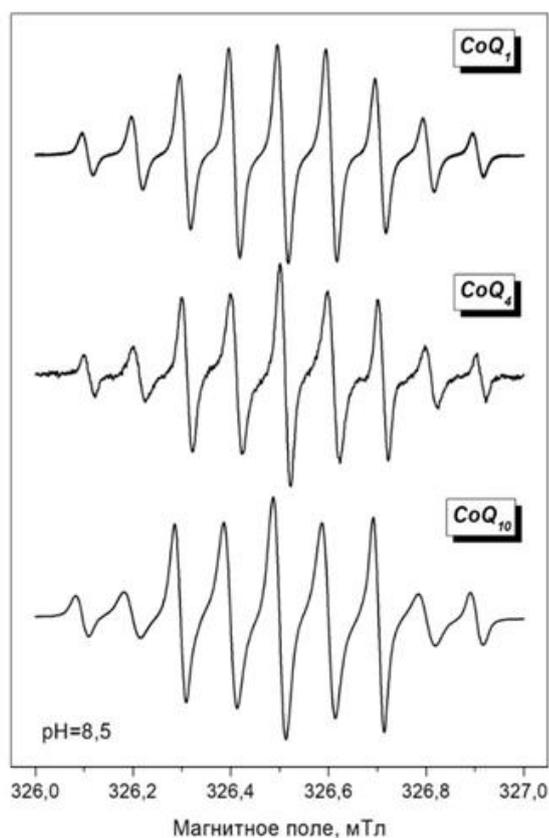


Рис. 8. Спектры ЭПР свободных радикалов коэнзимов Q с разной длиной изопреновой цепи ($CoQ_1^{\bullet-}$, $CoQ_4^{\bullet-}$ и $CoQ_{10}^{\bullet-}$) в изопропаноле.

При добавлении $CoQ_{10}-H_2$ в реакционную смесь с изолированными митохондриями наблюдалось практически полное исчезновение сигнала ЭПР $TIRON$ (Рис. 9А), который не появлялся в течение 30 мин инкубации. Однако, при этом даже в условиях отсутствия автоокисления ($pH=7.4$, автоокисление при $pH \geq 8,5$) регистрировался небольшой дублетный сигнал ЭПР аскорбиновой кислоты (спектр 2 на Рис. 9А). На Рис. 9Б представлены спектры ЭПР $TIRON$ в присутствии $0,2 \text{ мМ } CoQ_{10}-H_2$, запись которых началась после разных времен инкубации. Из этого рисунка видно, что регистрируемый спектр ЭПР свободных радикалов $TIRON$ появляется только после 14 минутной инкубации и достигает максимальной величины (сравнимой с контрольным образцом) после 28 мин.

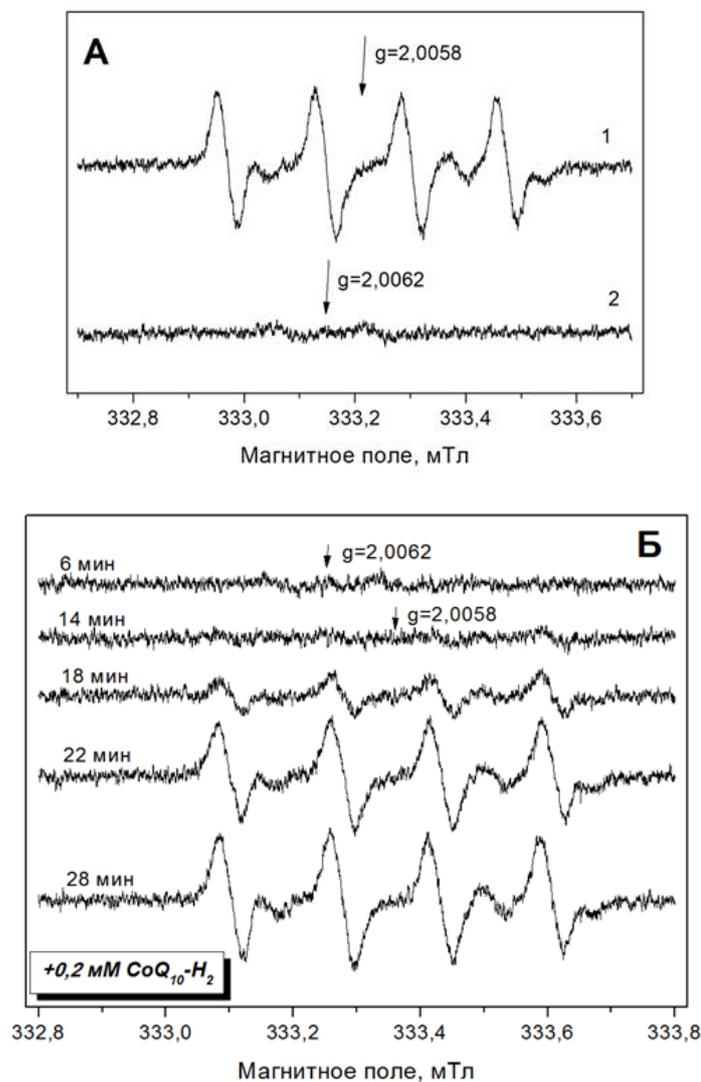


Рис. 9. Спектры ЭПР TIRON в суспензии митохондрий: (А) без $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$ (1), в присутствии 1 mM $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$ (2). Время инкубации до начала регистрации спектров 10 мин; (Б) в присутствии $0,2 \text{ mM}$ $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$. Времена инкубации до начала регистрации спектров указаны на рисунке.

Сигнал ЭПР TIRON появлялся с некоторой задержкой, четко зависящей от количества препарата $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$, введенного в среду инкубации. На Рис. 10 представлена зависимость времени задержки появления спектра ЭПР TIRON от концентрации «водорастворимой формы убихинола-10» ($\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$) в инкубационной смеси.

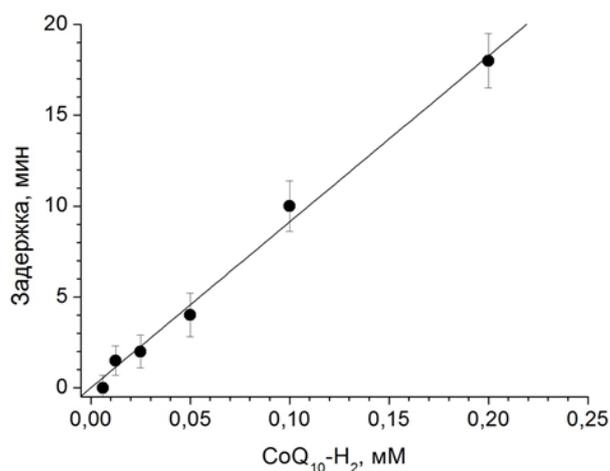


Рис. 10. Зависимость времени задержки появления спектра ЭПР свободных радикалов *TIRON* от концентрации $CoQ_{10}-H_2$ в инкубационной смеси.

Полученные нами результаты показали, что в условиях опытов с изолированными митохондриями сердца «водорастворимая форма убихинола-10» является эффективным антиоксидантом, успешно конкурирующим с перехватчиком супероксидных радикалов *TIRON*, при этом действующее вещество препарата надежно защищено от автоокисления, характерного для восстановленных форм различных хиноидных соединений в присутствии кислорода в щелочной среде.

Нами изучены спектральные характеристики свободнорадикальных (семихинонных) форм митохондриально-направленных антиоксидантов *mitoQ*, *decylQ*, *SkQ1*, *SkQ3* и *SkQT*, а также ряда форм коэнзима *Q*: CoQ_1 , CoQ_4 и CoQ_{10} ($pH \sim 7,8-8,5$ в изопропанол). Анион-радикалы коэнзимов CoQ и эффективно взаимодействующих с митохондриями производных убихинона и пластохинона четко показали, что распределение спиновой плотности неспаренного электрона по углеродным атомам хиноидного кольца определяется их боковыми группами.

В разделе 3.6. представлены данные о зависимости параметров митохондриального дыхания от концентрации фенольных соединений растительного происхождения (кверцетина *Qu*, рутина *Rut*, кофейной кислоты *Caf-OH*, куркумина *Cur* и ресвератрола *Rsv*) в инкубационной среде (Рис. 11, 12). Результаты показывают, что *Caf-OH*, *Rsv* и *Rut* при концентрациях до 1 мМ не влияли ни на скорость поглощения кислорода в состоянии 4, ни на сопряжение переноса электронов с синтезом *ATP*. *Qu* не влиял на параметры митохондриального дыхания в состоянии 4 во всем диапазоне концентраций, но добавление 1 мМ привело к снижению дыхательного контроля на

50%. При концентрациях до 100 μM *Cur* также не влиял на дыхание митохондрий в состоянии 4, но уменьшал его на 42% при 1 mM , при этом максимальное снижение дыхательного контроля (на 38%) наблюдалось при 100 μM *Cur*.

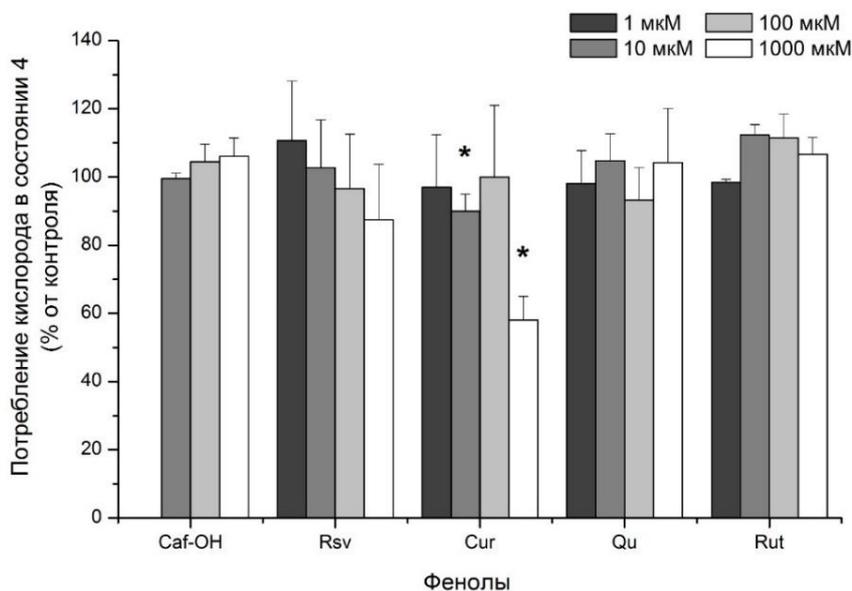


Рис. 11. Зависимость скорости потребления кислорода в состоянии 4 от концентрации фенольных соединений в суспензии митохондрий сердца крысы. Скорость потребления кислорода в состоянии 4 составляла $21,83 \pm 5,17$ нмоль/мин/мг белка.

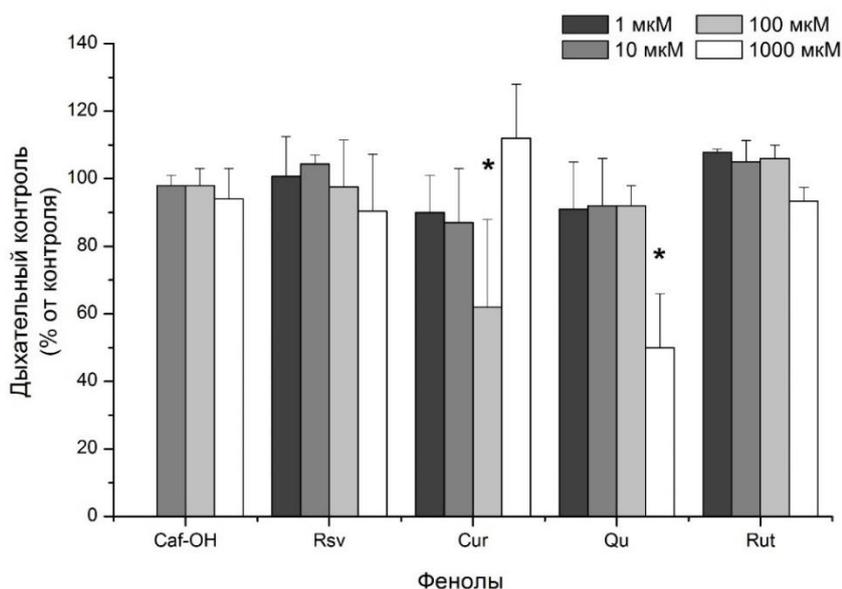
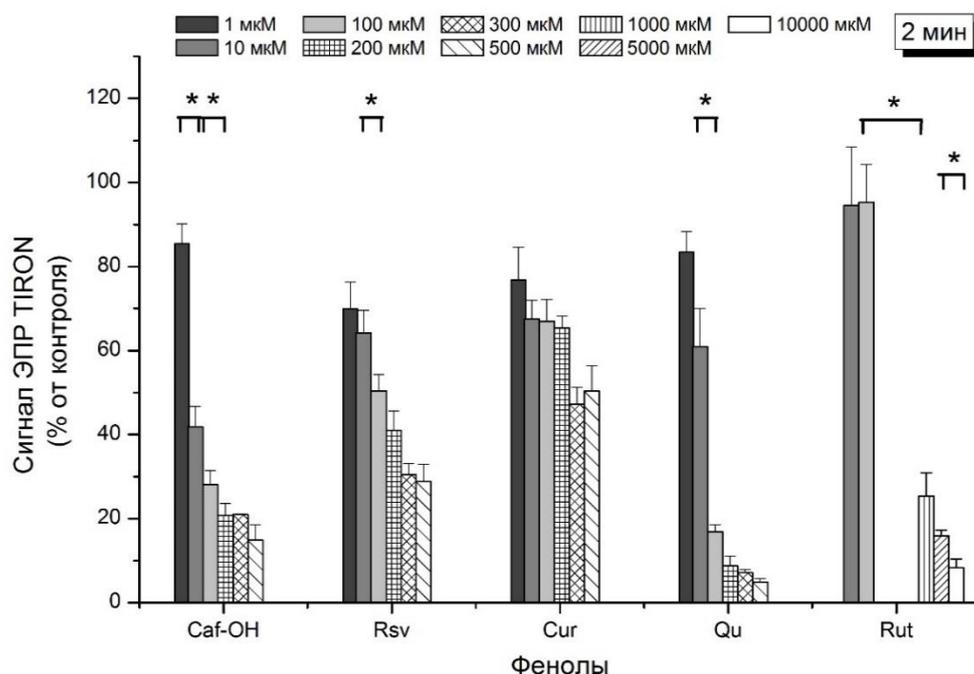


Рис. 12. Зависимость дыхательного контроля от концентрации фенольных соединений в суспензии митохондрий сердца крысы. Дыхательный контроль составил $3,05 \pm 0,24$.

Раздел 3.7. посвящен изучению закономерностей генерации супероксидных радикалов митохондриями сердца в присутствии исследуемых фенольных соединений.

Способность перехватывать $O_2^{\bullet-}$ указанных фенольных соединений исследовали методом ЭПР-спектроскопии с перехватчиком супероксида *TIRON* и ЭПР-оксиметрией на модели, в которой $O_2^{\bullet-}$ генерировался комплексом *III* изолированных митохондрии сердца крысы в присутствии сукцината и антимицина *A*. При добавлении 1 мМ *Qu*, *Caf-OH*, *Cur* или *Rsv*, а также 10 мМ *Rut* к изолированным митохондриям сердца наблюдается почти полное исчезновение сигнала ЭПР *TIRON*. В диапазоне концентраций 10 – 500 мкМ *Qu*, *Caf-OH*, *Cur* и *Rsv* и 1-10 мМ *Rut* перехватывали $O_2^{\bullet-}$ в зависимости от концентрации фенольных соединений (Рис. 13). В случае малых концентраций фенолов во время инкубации происходит постепенное увеличение сигнала ЭПР *TIRON*, по-видимому, связанное с необратимым окислением этих соединений в результате взаимодействия с $O_2^{\bullet-}$. При концентрациях 100–500 мкМ *Caf-OH* и *Rsv* 200–500 мкМ *Cur* и 1–10 мМ *Rut* активность перехвата супероксида остается неизменной в течение 10 мин. Для успешной конкуренции с *TIRON* фенолы также должны иметь высокую константу взаимодействия с $O_2^{\bullet-}$.



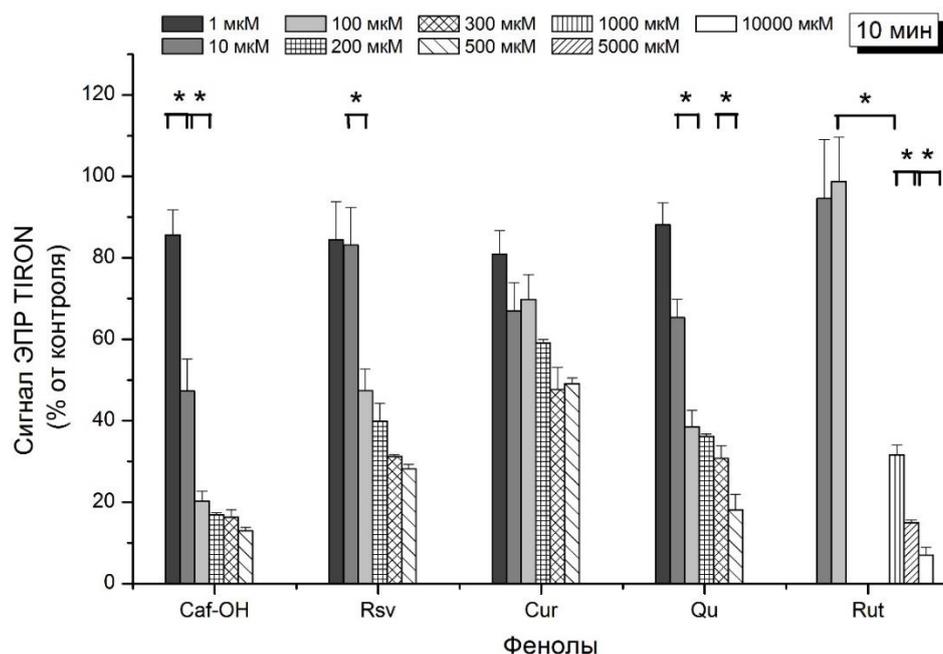


Рис. 13. Зависимость относительной интенсивности сигнала ЭПР TIRON от концентрации фенольных соединений в суспензии митохондрий сердца крысы. Спектры регистрировали через 2 мин (А), 10 мин (Б) инкубации в аэробных условиях.

Возможность прямого взаимодействия семихинонов TIRON с фенольными соединениями была проверена в экспериментах по влиянию Caf-OH на сигнал ЭПР свободных радикалов TIRON, возникающий при автоокислении. В инкубационной среде сигнал ЭПР TIRON появился только при $pH \geq 8,0$, причем его интенсивность была значительно ниже, чем в условиях образования $O_2^{\bullet-}$ митохондриями при $pH = 7,4$. При $pH=8,0-8,5$ Caf-OH в концентрациях, использованных в этом исследовании, не оказала значительного влияния на кинетику образования семихинонов TIRON.

Далее изучили зависимость антирадикального действия исследуемых фенолов от парциального давления кислорода в инкубационной смеси (Рис. 14). В концентрации 500 мкМ Caf-OH и 5 мМ Rut перехватывали 80–90% супероксидного радикала, тогда как 500 мкМ Rsv – 70-75%. Для этих веществ зависимость скорости перехватывания $O_2^{\bullet-}$ от парциального давления кислорода была слабо выражена. При нормальном парциальном давлении Qu в концентрации 500 мкМ перехватывал 93% $O_2^{\bullet-}$, тогда как Cur в той же концентрации – только около 60% супероксида. Антирадикальная активность по отношению к $O_2^{\bullet-}$ как у Cur, так и у Qu снижалась с уменьшением парциального давления кислорода.

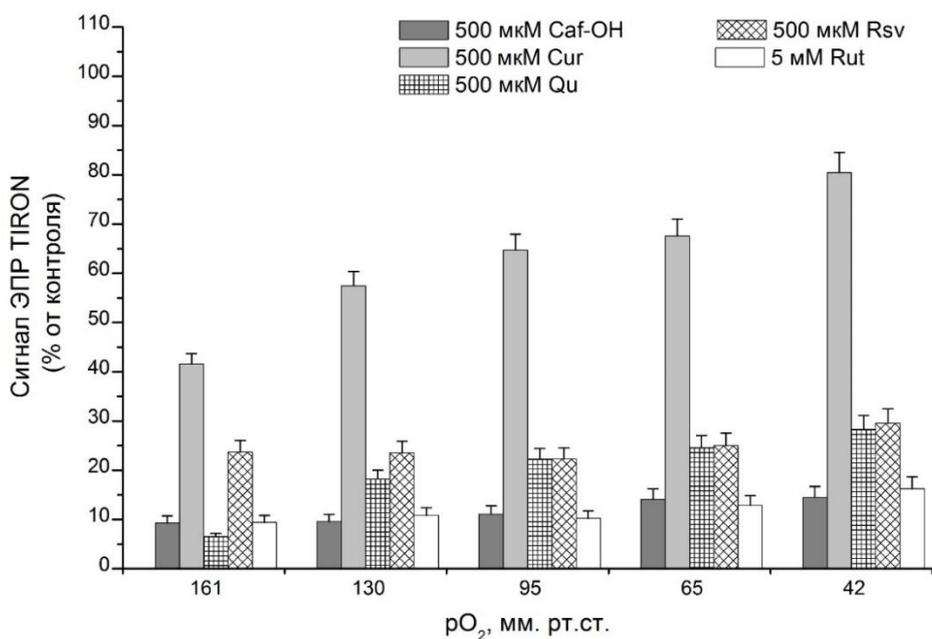


Рис. 14. Зависимость относительной интенсивности сигнала ЭПР TIRON в присутствии фенолов от парциального давления кислорода. Спектры регистрировали при 500 мкМ Caf-OH, Cur, Qu и Rsv и 5 мМ Rut в суспензии митохондрий сердца крысы. Относительные интенсивности сигнала ЭПР TIRON без фенолов: 100% (161 мм.рт.ст.), 95,2% (130 мм.рт.ст.), 85% (95 мм.рт.ст.), 68,7% (65 мм.рт.ст.) и 53,6% (42 мм.рт.ст.).

Таким образом, мы показали, что в изученном диапазоне концентраций фенольные соединения различной структуры и физико-химических свойств могут эффективно перехватывать супероксидные радикалы, образующиеся в комплексе III изолированных митохондрий сердца крысы в изученном диапазоне концентраций.

В главе **заключение** дано краткое подведение итогов обсуждения результатов.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ ДИССЕРТАЦИИ

1. Уменьшение парциального давления кислорода сопровождается падением скорости генерации супероксидных радикалов изолированными митохондриями сердца, при этом митохондрии продолжают образовывать супероксид в условиях глубокой гипоксии (≈ 15 мм.рт.ст.), характерной для острой сердечной патологии. Образование $O_2^{\bullet-}$ прекращается только в условиях полной аноксии. После реоксигенации до нормального парциального давления кислорода скорость образования $O_2^{\bullet-}$ несколько выше (на 25 %), чем до аноксии.

2. Увеличение температуры от комнатной ($\approx 25^\circ\text{C}$), использованной в большинстве экспериментов по ЭПР-спектроскопии с изолированными митохондриями сердца, до физиологической (37°C) сопровождается увеличением скорости генерации супероксида приблизительно на 24% при сохранении основных кинетических закономерностей процесса.

3. Динитрозильные комплексы железа с глутатионовыми лигандами эффективно перехватывают при различных значениях парциального давления кислорода свободные радикалы кислорода в системах, моделирующих окислительный стресс в клетках сердечной мышцы. При этом данные комплексы в концентрации 1-100 μM практически не влияют на поглощение кислорода изолированными митохондриями сердца.

4. Восстановленный коэнзим Q ($\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$) в составе препарата «водорастворимая форма убихинола-10» действует как эффективный антиоксидант в условиях генерации супероксида изолированными митохондриями сердца. В отличие от восстановленных коэнзимов Q ($\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$, $\text{CoQ}_4\text{-H}_2$ и $\text{CoQ}_1\text{-H}_2$) в изопропанол, в случае «водорастворимой формы убихинола-10» при повышении pH (≥ 8) не наблюдается автоокисления с образованием убисемихинонов – свободнорадикальных промежуточных продуктов.

5. Свободные анион-радикалы коэнзимов CoQ_{10} , а также производных убихинона и пластохинона mitoQ , decylQ , SkQ_1 , SkQ_3 , SkQT и SkQN (митохондриально направленных антиоксидантов), являющихся промежуточными продуктами в окислительно-восстановительных реакциях хиноидных соединений, существенным образом отличаются по распределению спиновой плотности неспаренного электрона по углеродным атомам хиноидного кольца.

6. Растительные фенольные соединения различной структуры являются эффективными перехватчиками свободных радикалов кислорода, образующихся в митохондриях сердца и модельной ферментативной системе. Наибольшей антирадикальной активностью обладают кофейная кислота и кверцетин, которые в концентрации 500 μM снижали уровень $\text{O}_2^{\bullet-}$ на 80-90% тогда как ресвератрол и куркумин в той же концентрации перехватывали 70-75% и 60% супероксида, соответственно.

ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

в журналах, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI, РИНЦ:

1. Дудылина А.Л., Иванова М.В., Калатанова А.В., Каленикова Е.И., Макаров В.Г., Макарова М.Н., Шумаев, К.Б., Рууге Э.К. Генерация супероксидных радикалов митохондриями сердца и антиоксидантное действие водорастворимой формы убихинола-10. // Биофизика, 2019, т. 64, с. 282–289. Scopus (0,216). RSCI, РИНЦ (0,904).
2. **Dudylyna A.L.**, Ivanova M.V., Shumaev K.B., Ruuge E.K. Superoxide formation in cardiac mitochondria and effect of phenolic antioxidants. // Cell Biochemistry and Biophysics, 2019. v. 77, № 1, pp. 99-107. First online September 14, 2018. WoS (2,323), Scopus (0,581).
3. Shumaev K.B., **Dudylyna A.L.**, Ivanova M.V., Pugachenko I.S., Ruuge E.K. Dinitrosyl iron complexes: Formation and antiradical action in heart mitochondria. // BioFactors, 2018, v. 44, pp. 237-244. WoS (3,598), Scopus (1,34).
4. Дудылина А.Л., Иванова М.В., Шумаев, К.Б., Рууге Э.К. Генерация супероксидных радикалов комплексом III митохондрий сердца и антиоксидантное действие динитрозильных комплексов железа при разном парциальном давлении кислорода. Биофизика, 2016, v. 61, pp. 304-309. Scopus (0,216). RSCI, РИНЦ (0,904).

ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ НА МЕЖДУНАРОДНЫХ И ВСЕРОССИЙСКИХ НАУЧНЫХ КОНФЕРЕНЦИЯХ:

1. Дудылина А.Л., Иванова М.В., Шумаев К.Б., Мохов А.А., Рууге Э.К. Защитное действие природных (поли)фенольных соединений при окислении мембран миокарда. Международная научная конференция «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем», Минск, 27-29 июня 2018.
2. Рууге Э.К., Грачев Д.И., Дудылина А.Л., Захарова Е.В., Титов В.Н. ЭПР-спектроскопия физико-химических характеристик сывороточного альбумина и мембран эритроцитов крови человека. Международная научная конференция «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем», Минск, 27-29 июня 2018.
3. Ruuge E.K., **Dudylyna A.L.**, Shumaev K.B. Semiquinone free radicals of ubiquinone and plastoquinone – electron carriers, prooxidants, and antioxidants. Second Adriatic Symposium on Biophysical Approaches in Biomedical Studies. Split, September 24-28, 2017.
4. **Dudylyna A.L.**, Ivanova M.V., Shumaev K.B., Ruuge E.K. Reactive oxygen and nitrogen species: effect of antioxidants. Second Adriatic Symposium on Biophysical Approaches in Biomedical Studies. Split, September 24-28, 2017.
5. Рууге Э.К., Дудылина А.Л., Иванова М.В., Шумаев К.Б. Природные антиоксиданты и сердце. Научная конференция МГУ «Ломоносовские чтения», секция физики. Москва, 15-25 апреля 2017.

6. Дудылина А.Л., Иванова М.В., Шумаев К.Б., Рууге Э.К. Функциональные характеристики митохондрий сердца и генерация ими супероксидных радикалов: влияние водорастворимой формы коэнзима Q10-H2. Международная научная конференция «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем», Минск, 28-30 июня 2016.
7. Шумаев К.Б., Дудылина А.Л., Пугаченко И.С., Гречникова М.А., Космачевская О.В., Топунов А.Ф., Ванин А.Ф., Рууге Э.К. Антиоксидантное и антирадикальное действие динитрозильных комплексов железа. Сборник статей Международная научная конференция «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем», Минск, 28-30 июня 2016.
8. Ruuge E.K., **Dudyliina A.L.**, Ivanova M.V., Shumaev K.B. Free radical species and antioxidants in cardiovascular system: effect of hypoxia. Xth International Workshop on EPR in Biology and Medicine. Krakow, October 2-6, 2016.
9. **Dudyliina A.L.**, Ivanova M.V., Shumaev K.B., Ruuge E.K. Superoxide formation in cardiac mitochondria and polyphenols as natural antioxidants: an EPR study. Xth International Workshop on EPR in Biology and Medicine. Krakow, October 2-6, 2016.
10. Shumaev K.B., Ruuge E.K., **Dudyliina A.L.**, Pugachenko I.S., Kosmachevskaya O.V., Topunov A.F. Nitroxyl anion as a trigger of antioxidant and prooxidant processes. Xth International Workshop on EPR in Biology and Medicine. Krakow, October 2-6, 2016.
11. Шумаев К.Б., Тимошин А.А., Дудылина А.Л., Пугаченко И.С., Космачевская О.В., Топунов А.Ф., Рууге Э.К. Использование спектроскопии электронного парамагнитного резонанса для изучения антиоксидантных свойств метаболитов оксида азота. XXV съезд по спектроскопии. Москва-Троицк, 3-7 октября 2016.
12. Дудылина А.Л., Рууге Э.К., Иванова М.В., Гречникова М.А., Шумаев К.Б. Супероксидные радикалы в митохондриях сердца и антиоксидантное действие фармакологических соединений. V съезд биофизиков России. Ростов-на-Дону, 4-10 октября 2015.
13. Рууге Э.К., Дудылина А.Л., Иванова М.В., Михеева Ю.Ю., Свиряева И.В., Шумаев К.Б. Супероксид в биологических системах при разном парциальном давлении кислорода. V съезд биофизиков России. Ростов-на-Дону, 4-10 октября 2015.