

ГЕНЕРАЦИЯ СУПЕРОКСИДНЫХ РАДИКАЛОВ МИТОХОНДРИЯМИ СЕРДЦА И АНТИОКСИДАНТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ВОДОРАСТВОРИМОЙ ФОРМЫ УБИХИНОЛА-10

© 2019 г. А.Л. Дудылина* **, М.В. Иванова*, А.В. Калатанова***, Е.И. Каленикова****, В.Г. Макаров***, М.Н. Макарова*****, К.Б. Шумаев* *****, Э.К. Рууге* **

*Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии Минздрава России, 121552, Москва, 3-я Черепковская ул., 15а

**Физический факультет Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1/2

***ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации», 188663, Санкт-Петербург, Всеволожский р-н, пос. Кузьмоловский, 245

****Факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, корп. А

*****АО «НПО «Дом фармации», 188663, Санкт-Петербург, Всеволожский р-н, пос. Кузьмоловский, корп. 245
*****ФИЦ биотехнологии РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33/2

E-mail: ruuge@mail.ru

Поступила в редакцию 16.12.18 г.

После доработки 18.01.19 г.

Принята к публикации 25.01.19 г.

Изучено влияние водорастворимой формы убихинола-10 ($\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$) на процессы электронного транспорта и окислительного фосфорилирования в митохондриях, выделенных из сердец крыс линии Wistar, и образование в них активных форм кислорода. Показано, что предварительная инкубация изолированных митохондрий с убихинолом-10 при разных значениях концентрации препарата оказывает лишь незначительное влияние на скорость поглощения кислорода и дыхательный контроль. С помощью ЭПР-спектроскопии спиновых ловушек и ЭПР-оксиметрии исследовано взаимодействие убихинола-10 с образовавшимися в комплексе III (bc_1 -сегменте) митохондрий сердца супероксидными радикалами. Установлено, что убихинол-10 оказывает значительное антиоксидантное действие в физиологическом интервале температур, при этом величина и кинетические характеристики антирадикального эффекта зависят от концентрации препарата.

Ключевые слова: убихинол, супероксидные радикалы, антиоксиданты, сердце, митохондрии, электронный парамагнитный резонанс.

DOI: 10.1134/S0006302919020078

Коэнзим Q_{10} (CoQ_{10} , убихинон-10) может находиться в организме в трех редокс-формах: окисленной, полувосстановленной (семихиноновой) и восстановленной [1]. Хорошо известно, что коэнзим Q_{10} является важнейшим электронным переносчиком митохондрий, связывающим убихинон-редуктазы с bc_1 -фрагментом (комплексом III) дыхательной цепи [2–4]. В то же время CoQ_{10} участвует в образовании в митохондриях активных форм кислорода – супер-

оксидных анион-радикалов – посредством реакции своих свободнорадикальных интермедиатов (убисемихинонов) с молекулярным кислородом [5–7]. Парадоксально, но митохондриальный пул восстановленного коэнзима Q_{10} ($\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$) служит одновременно и ключевым антиоксидантом, предохраняющим компоненты мембран митохондрий от окислительной модификации [8,9]. Необходимо отметить, что функционирование коэнзима Q_{10} как антиоксиданта весьма осложнено и зависит от взаимоотношения всех его редокс-форм: убихинона-10, убисемихинона-10 и убихинола-10. Поэтому пред-

Сокращение: ЭПР – электронный парамагнитный резонанс.

ставляет существенный интерес выяснить конкретные механизмы, с помощью которых коэнзим Q_{10} осуществляет свое защитное действие от повреждений, сопровождающих патогенез заболеваний организма, связанных, в первую очередь, с возникновением окислительного стресса.

Из-за своей первостепенной биологической роли коэнзим Q_{10} в настоящее время широко используется в качестве диетической добавки для стимулирования функций организма, в первую очередь, при опасности сердечно-сосудистых и/или нейродегенеративных заболеваний [10–15]. При этом отношение $CoQ_{10}\text{-}H_2$ /общий CoQ_{10} в крови часто используется как биомаркер окислительного стресса. Как известно, CoQ_{10} в организме исходит из двух источников – клеточного биосинтеза, который достигает максимума в раннем и среднем возрасте и постепенно снижается с возрастом, и диетических добавок [16,17]. Поскольку коэнзим Q_{10} имеет высокую концентрацию именно в сердечной мышце, многие лабораторные, а также клинические исследования до сих пор связаны с поиском путей предотвращения и лечения сердечной недостаточности с помощью дополнительного введения в организм различных доз и лекарственных форм этого вещества.

Несмотря на существенные успехи в использовании различных по своему химическому составу препаратов с коэнзимом Q в терапевтической практике, почти непреодолимой преградой осталась его низкая биодоступность. Необходимо отметить, что долгое время практически все препараты содержали в своем составе окисленную форму CoQ_{10} , низкая биодоступность которой была связана с большой молекулярной массой, высокой липофильностью и плохой растворимостью в водной (полярной) среде. Проведенные в разных лабораториях исследования показали, что вариации в составе препарата, включая создание так называемой «водорастворимой формы коэнзима Q », заметно влияют на его биодоступность, однако не приводили к исчерпывающему решению проблемы.

В настоящее время большое внимание уделяется исследованиям физико-химических, биохимических и фармакологических характеристик вновь созданных композиций, содержащих в качестве активной компоненты восстановленный коэнзим Q – убихинол-10 ($CoQ_{10}\text{-}H_2$). Действительно, оказалось, что препараты, содержащие $CoQ_{10}\text{-}H_2$, обладают более подходящими для введения в организм характеристиками, в частности более высокой биодоступностью. Восстановленный $CoQ_{10}\text{-}H_2$ демонстрирует

большую эффективность при более низких дозах, чем окисленный CoQ_{10} , поскольку он уже находится в активной форме и не нуждается в преобразовании организмом. Был проведен ряд лабораторных и клинических исследований, весьма отчетливо демонстрирующих перспективность использования препаратов с $CoQ_{10}\text{-}H_2$ [19–24].

Таким образом, создание лекарственных средств на основе восстановленного коэнзима Q_{10} (в качестве активного вещества) позволяет достичь развития максимального проявления терапевтического эффекта. Актуальным является создание готовой лекарственной формы убихинола-10, подходящей для инъекционного введения с высоким уровнем высвобождения, малой токсичностью и доказанной эффективностью. Данное экспериментальное исследование было предпринято с целью изучения возможных механизмов кардиопротекторного действия созданного в Санкт-Петербурге препарата «Водорастворимая форма убихинола-10» [25].

В нашей работе с помощью спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) (метод спиновых ловушек) и ЭПР-оксиметрии проведено исследование взаимодействия водорастворимой формы убихинола-10 ($CoQ_{10}\text{-}H_2$) с супероксидными радикалами, генерируемыми в комплексе III изолированных митохондрий сердца крысы, а также изучено влияние препарата $CoQ_{10}\text{-}H_2$ на функциональные характеристики митохондрий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение изолированных митохондрий. Эксперименты проводили на нормотензивных крысах линии Wistar в соответствии с «Руководством по уходу и использованию лабораторных животных» и с предварительного одобрения Комитета по этике животных НИИ экспериментальной кардиологии НМИЦ кардиологии Минздрава России.

Все этапы выделения митохондрий проводили при температуре 0–4°C. Крыс наркотизировали уретаном (1,8 г/кг массы животного, внутривенно) или авертином (250 мг/кг массы животного, внутривенно). Сердце извлекали, промывали в охлажденной среде выделения (70 мМ сахарозы, 220 мМ маннитола, 50 мМ $HEPES$, 1 мМ ЭДТА, рН 7,4) и измельчали ножницами. Кусочки сердечной мышцы пропускали через сито из нержавеющей стали (диаметр отверстий 0,8 мм) и гомогенизировали в течение двух–трех минут при соотношении ткань/среда выделения 1 : 8. Гомогенат центрифугировали 10 мин при 700 г, супернатант,

содержавший митохондрии, фильтровали и центрифугировали 10 мин при 14000 g. Осадок митохондрий суспендировали в среде выделения с 3 мг/мл бычьего сывороточного альбумина. Полученную суспензию митохондрий (30–60 мг белка/мл) хранили во льду.

Введение препарата $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$. Препарат $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$ представлял собою 1%-й (масса/объем) раствор действующего вещества убихинола-10, содержащего также вспомогательные вещества – глицерилрицинолеат макрогола, полисорбат 20, аскорбиновую кислоту, эдетат натрия, хлорид натрия, воду для инъекций [25].

Дыхание митохондрий изучали после 30-минутной преинкубации митохондрий с $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$ в различных концентрациях: исследуемый препарат добавляли к 50–60 мкл густой суспензии митохондрий из расчета 0,05–10 мкг действующего вещества на 1 мг белка митохондрий.

При исследовании взаимодействия убихинола-10 со свободными радикалами кислорода различные концентрации препарата $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$ вносили в среду инкубации митохондрий непосредственно перед добавлением митохондрий.

Определение функциональной активности митохондрий. Скорость поглощения кислорода измеряли с помощью электрода Кларка и полярографа YSI 53 (Yellow Spring Instruments Inc., США). Среда инкубации содержала 225 мМ сахарозы, 10 мМ KCl, 20 мМ HEPES, 0,25 мМ ЭГТА, 200 мкМ ЭДТА, 3 мМ MgCl_2 , 4 мМ KH_2PO_4 , 2,5 мкМ ротенона; pH 7,4; температура 25°C; объем ячейки 1 мл, концентрация белка 0,3–0,7 мг/мл. В качестве субстрата дыхания использовали сукцинат в концентрации 4 мМ (состояние 4). Для определения скорости дыхания в состоянии 3 в инкубационную смесь добавляли 300 мкМ аденозиндифосфата. Величину дыхательного контроля определяли по отношению скоростей поглощения кислорода в состоянии 3 и 4. Полученный препарат митохондрий разделили на несколько частей, которые преинкубировали с различными концентрациями препарата $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$ и измеряли скорости дыхания митохондрий в каждой группе. Контрольными были интактные митохондрии. Измерение дыхания митохондрий каждой группы проводили трижды.

Проведение опытов по ЭПР-спектроскопии «перехватчика» супероксида TIRON и ЭПР-оксиметрии. Регистрацию и анализ спектров ЭПР проводили на малогабаритном автоматизированном спектрометре ESR 70-03 XD/2 УП («КБСТ» БГУ, Беларусь). Реакционную смесь вводили в газопроницаемую тefлоновую Sub-Lite-Wall капиллярную трубку с внутренним диаметром 0,635 мм и толщина стенки 0,051 мм

(Zeus Industrial Products, Inc., США). Эту капиллярную трубку дважды складывали и вставляли в кварцевую трубку диаметром ~4 мм, открытую с обоих концов, что обеспечивало достаточный поток воздуха вокруг образца в резонаторе спектрометра ЭПР во время регистрации спектра. Как известно, в ЭПР-оксиметрии используются различные парамагнитные зонды, параметры спектра которых зависят от спинового обмена Гейзенберга и магнитного диполь-дипольного взаимодействия с молекулярным кислородом. В наших экспериментах содержание O_2 в потоке газа контролировали путем измерения ширины сигнала ЭПР фталоцианина лития, внутри капиллярной трубки в реакционной смеси – путем измерения ширины компонентов спектра ЭПР TEMPONE- $^{15}\text{N-D}_{16}$ (4-оксо-2,2,6,6-тетраметил-пиперидин- D_{16} -1-оксила- ^{15}N) [26,27].

Генерацию супероксидных радикалов изолированными митохондриями изучали с помощью ЭПР-видимого «перехватчика» («scavenger») супероксида TIRON (4,5-диоксибензол-1,3-дисульфоната) [28,29]. Ранее нами было показано [30,31], что регистрация кинетики супероксид-зависимого окисления TIRON до o-семихинонов – свободнорадикальных интермедиатов – обеспечивает удобный метод измерения скорости образования супероксида как модельными ферментными системами, так и электронными переносчиками митохондрий сердца. При этом скорость генерации супероксида в реакционной смеси оказалась пропорциональной квадрату интенсивности сигнала ЭПР от семихинонов TIRON $^{\bullet-}$. При pH < 9,0 этот спектр представляет собой квартет, являющийся результатом взаимодействия неспаренного электрона с двумя неэквивалентными протонами с константами сверхтонкого взаимодействия $a(\text{H}_2) = 0,331$ мТл и $a(\text{H}_6) = 0,178$ мТл.

Среда инкубации для измерений на спектрометре ЭПР содержала 250 мМ сахарозы, 20 мМ HEPES, 1 мМ ЭГТА, 4 мМ KH_2PO_4 , 3 мМ MgCl_2 и 10 мМ TIRON; pH 7,4. Концентрация митохондрий в среде инкубации составляла 1–2 мг/мл. Условия записи спектров ЭПР: ослабление сверхвысокочастотной мощности 10 дБ, сверхвысокая частота ~9,32 ГГц, амплитуда высокочастотной модуляции 0,05 мТл. Спектры ЭПР фталоцианина лития и TEMPONE- $^{15}\text{N-D}_{16}$ регистрировали при сверхвысокочастотной мощности ≤ 1 мВт и амплитуде высокочастотной модуляции 0,005 мТл.

Реактивы. В работе использовали реактивы фирм Sigma (США), ICN (США), Serva (Германия), Aldrich (США) и других. Препарат $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$ (водорастворимая форма убихинола-

Скорость поглощения кислорода и дыхательный контроль митохондрий после 30-минутной инкубации с препаратом CoQ₁₀-H₂

Группы	Скорость поглощения кислорода, нмоль/мин мг белка		Дыхательный контроль
	Состояние 4	Состояние 3	
Контроль, интактные митохондрии, <i>n</i> = 5	16,2 ± 2,2	40,6 ± 4,4	2,52 ± 0,27
Митохондрии с CoQ ₁₀ -H ₂ , 0,05 мкг/мг белка, <i>n</i> = 3	15,7 ± 0,3	39,5 ± 2,0	2,52 ± 0,12
Митохондрии с CoQ ₁₀ -H ₂ , 0,1 мкг/мг белка, <i>n</i> = 3	15,9 ± 0,3	37,0 ± 2,1	2,32 ± 0,13
Митохондрии с CoQ ₁₀ -H ₂ , 1 мкг/мг белка, <i>n</i> = 3	16,2 ± 0,2	35,8 ± 3,3	2,21 ± 0,19
Митохондрии с CoQ ₁₀ -H ₂ , 10 мкг/мг белка, <i>n</i> = 3	20,1 ± 1,5 <i>p</i> = 0,027	32,0 ± 1,9* <i>p</i> = 0,009 <i>P</i> < 0,05	1,60 ± 0,21* <i>p</i> = 0,003 <i>P</i> < 0,05

Примечание. Условия описаны в разделе «Материалы и методы». Данные представлены как средние значения ± стандартное отклонение. Достоверность отличий определяли с использованием параметрического *t*-критерия Стьюдента (приведены значения *p*, если они были < 0,05) и непараметрического критерия Данна для множественных сравнений с контрольной группой (указаны значения *P* < 0,05). * – Различия считали достоверными при *P* < 0,05.

10) был изготовлен ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации» (Россия) [25].

Статистический анализ. Результаты представлены либо как среднее значение ± стандартная ошибка, либо как среднее значение ± стандартное отклонение. Статистическую обработку результатов проводили по *t*-тесту и тесту ANOVA, используя приложения программы Origin 7 (а также Origin 8) фирмы Origin Lab Corporation (США). Различия между экспериментальными данными считали достоверными при *P* ≤ 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Данные о влиянии водорастворимой формы убихинола-10 на параметры функционального состояния митохондрий сердца крысы представлены в таблице.

Полученные данные показывают, что предварительная инкубация митохондрий с препаратом CoQ₁₀-H₂ в концентрации 0,05–1,0 мкг действующего вещества/мг белка не приводила к значимому снижению эффективности окислительного фосфорилирования. Однако при увеличении концентрации препарата происходило достоверное снижение дыхательного контроля: инкубация митохондрий с CoQ₁₀-H₂ в концентрации 10 мкг/мг вызывала уменьшение дыхательного контроля на 34%. При этом под действием исследуемого препарата наблюдалось снижение скорости поглощения кислорода в присутствии АДФ (состояние 3) на 20% и уве-

личение скорости поглощения кислорода в состоянии 4 (без АДФ) на 32%.

Как известно, в щелочной среде в присутствии O₂ имеет место автоокисление убихинолов (CoQ-H₂). При этом образуются свободно-радикальные интермедиаты – семихиноны CoQ^{•-}, которые характеризуются многокомпонентными спектрами ЭПР с хорошо разрешенной сверхтонкой структурой (рис. 1а). Нами была сделана попытка получить в тех же экспериментальных условиях (щелочная среда инкубации, присутствие O₂) спектр ЭПР свободных радикалов CoQ-H₂ – действующего вещества препарата «водорастворимая форма убихинола-10». Нам не удалось зарегистрировать спектр ЭПР от CoQ₁₀^{•-}, однако при pH ≥ 8,5 появился дублетный спектр ЭПР (рис. 1б), по своим параметрам характерный для свободных радикалов аскорбиновой кислоты. Действительно, в разделе «Материалы и методы» было указано, что аскорбиновая кислота входит в состав препарата CoQ₁₀-H₂.

Регистрация супероксидных анион-радикалов в наших экспериментах была основана на реакции TIRON с O₂^{•-}, в результате которой образуются относительно стабильные *o*-семихиноны TIRON^{•-} [28,30]. Как известно, появление этих свободных радикалов является индикатором процесса генерации супероксидных радикалов из-за большей скорости окисления TIRON (как катехола) супероксидом по сравнению со скоростью образования самих O₂^{•-}.

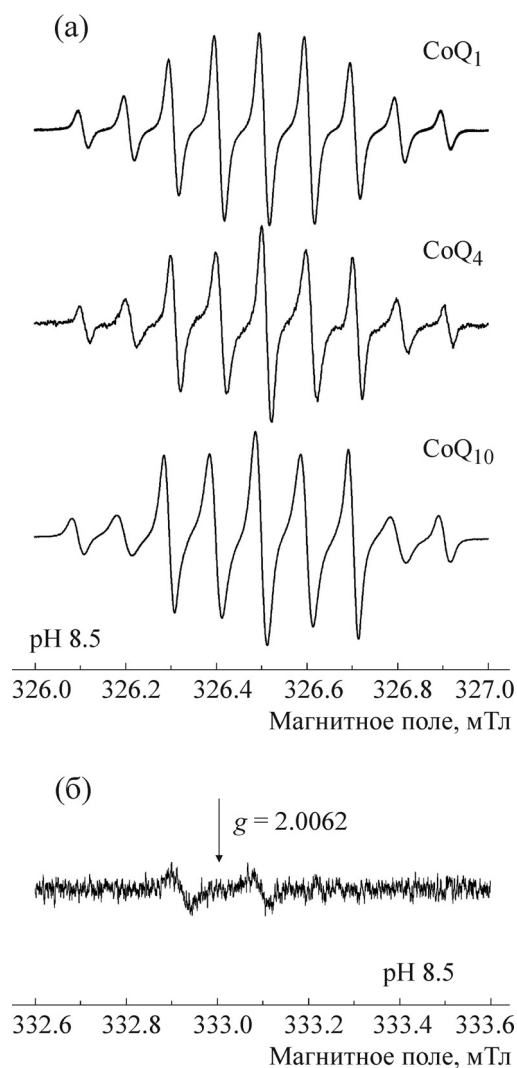


Рис. 1. (а) – Спектры ЭПР свободных радикалов коэнзимов Q с разной длиной изопреновой цепи (CoQ_1^\bullet , CoQ_4^\bullet и CoQ_{10}^\bullet) в изопропанол. Параметры спектров: $g = 2,0057$; $a(3\text{H}) = 0,19$ мТл; $a(2\text{H}) = 0,099$ мТл. (б) – Спектр ЭПР препарата $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$. Параметры дублетного сигнала: $g = 2,0062$; $a = 0,179$ мТл. Образцы находились при $\text{pH} \geq 8,5$ в газопроницаемых тefлоновых капиллярах Sub-Lite-Wall фирмы Zeus Industrial Products, Inc. (США), обдуваемых воздухом (21% O_2) при комнатной температуре.

Далее нами были проведены эксперименты с изолированными митохондриями, образующими супероксид в комплексе III (bc_1 -сегменте) дыхательной цепи [32,33]. Реакционная смесь (см. раздел «Материалы и методы») содержала, кроме митохондрий, водорастворимую форму убихинола-10 в варьруемой концентрации действующего компонента от 0,005 до 1 мМ. На рис. 2а представлены спектры ЭПР от $\text{TIRON}^{\bullet-}$ без $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$ в реакционной смеси (контроль) и в присутствии 1 мМ $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$. Видно, что

при добавлении $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$ в такой концентрации наблюдалось практически полное исчезновение сигнала ЭПР от TIRON , который не появлялся по крайней мере в течение 30 мин инкубации. Однако при этом даже в условиях отсутствия автоокисления (рис. 2а, при $\text{pH} 7,4$, в отличие от рис. 1б, при $\text{pH} \geq 8,5$) регистрировали небольшой дублетный сигнал ЭПР аскорбиновой кислоты. Необходимо отметить, что для TIRON как перехватчика радикалов характерна весьма высокая константа скорости взаимодействия с супероксидом [34]. Следовательно, $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$ в составе препарата «водорастворимая форма убихинола-10» должен иметь сравнимую или даже более высокую константу скорости взаимодействия с супероксидом, чем TIRON .

На рис. 2б представлены спектры ЭПР от $\text{TIRON}^{\bullet-}$ в присутствии 0,2 мМ $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$, запись которых началась после разных времен инкубации. Из этого рисунка видно, что регистрируемый спектр ЭПР от свободных радикалов TIRON появляется только после 14-минутной инкубации и достигает максимальной величины (сравнимой с контрольным образцом) после 28-минутной инкубации.

Подобную задержку появления регистрируемого спектра ЭПР наблюдали для всей серии соответствующих опытов ($n = 6$). Сигнал ЭПР от $\text{TIRON}^{\bullet-}$ появлялся с некоторой задержкой, четко зависящей от количества препарата $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$, введенного в среду инкубации. Необходимо отметить, что во всех образцах, содержащих $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$ в концентрации $\geq 0,02$ мМ, в начале инкубации регистрировали небольшой дублетный сигнал ЭПР, характерный для аскорбиновой кислоты.

На основе полученных данных была построена зависимость времени задержки появления спектра ЭПР от $\text{TIRON}^{\bullet-}$ от концентрации водорастворимой формы убихинола-10 ($\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$) в инкубационной смеси. Соответствующая зависимость представлена на рис. 3.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Следует отметить, что исследованный нами препарат «водорастворимая форма убихинола-10» является многокомпонентным, помимо восстановленного коэнзима Q_{10} в нем содержится аскорбиновая кислота, а также другие соединения, стабилизирующие $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$. Хорошо известно, что функционирование комплексов митохондриальной дыхательной цепи зависит от их липидного окружения. Можно предположить, что при 30-минутной преинкубации не-

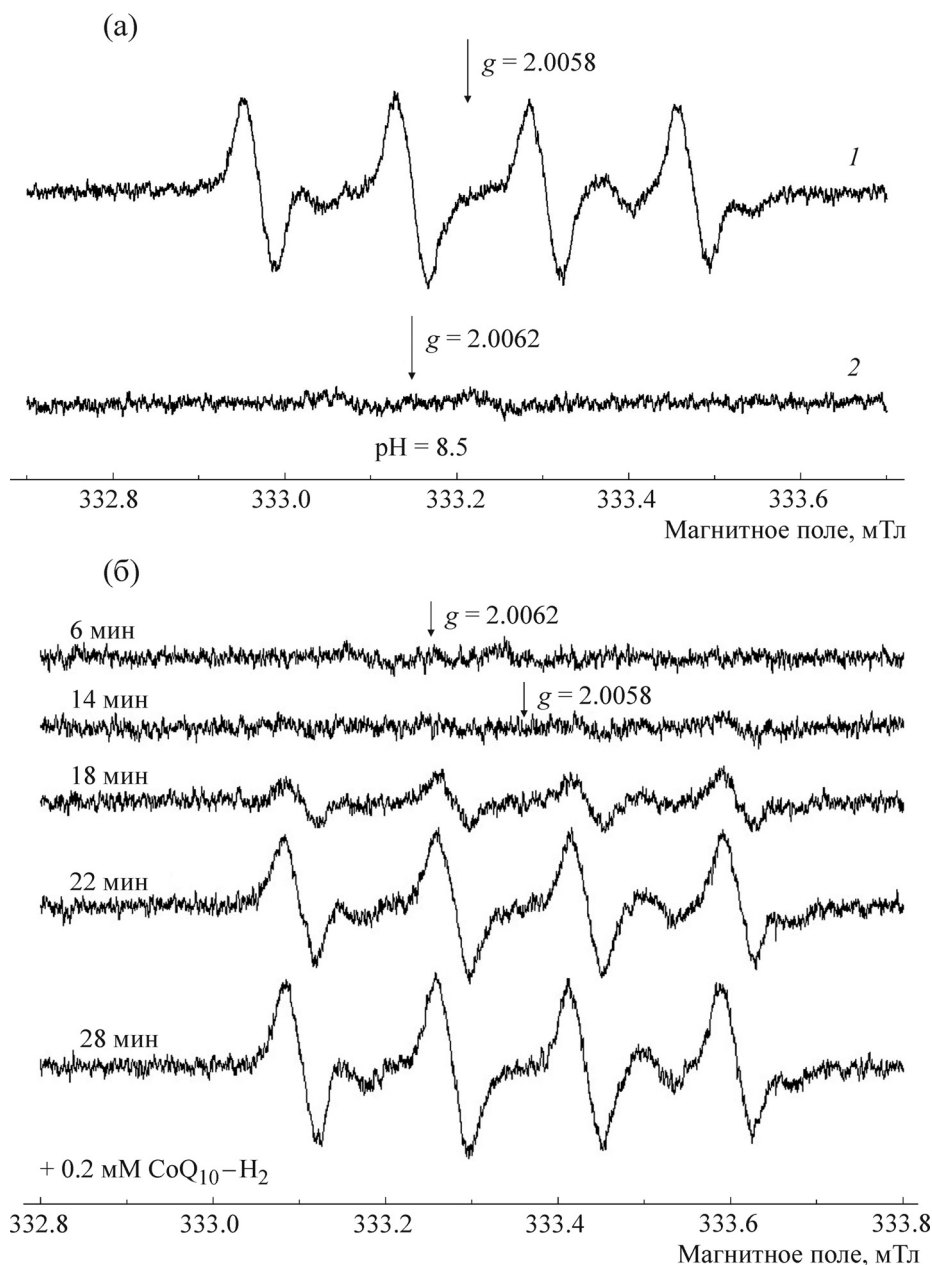


Рис. 2. (а) – Спектры ЭПР свободных радикалов TIRON в суспензии митохондрий: без $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$ (спектр 1) и перехватчиком в присутствии 1 мМ $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$ (спектр 2). Время инкубации до начала регистрации спектров 10 мин. (б) – Спектры ЭПР TIRON* в суспензии митохондрий в присутствии 0,2 мМ $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$. Время инкубации до начала регистрации спектров указано на рисунке. Инкубационная смесь содержала (кроме указанных в разделе «Материалы и методы» основных компонентов): митохондрии – 1–2 мг белка/мл, 4 мМ сукцината, антимицин А, 10 мМ TIRON и 0,2 мМ $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$. Образцы находились в газопроницаемых тefлоновых капиллярах Sub-Lite-Wall фирмы Zeus Industrial Products, Inc. (США), обдуваемых воздухом (21% O_2) при комнатной температуре.

которые компоненты исследуемого препарата, воздействуя на липидное окружение комплексов дыхательной цепи, могут влиять на их активность и снижать дыхательный контроль. Увеличение пула восстановленного коэнзима Q_{10} во внутренней мембране может влиять как на продукцию супероксидных радикалов комплек-

сами I и III, так и на антиоксидантное действие $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$.

В настоящее время значительный интерес вызывают супероксидные радикалы, образовавшиеся в комплексе III митохондриальной дыхательной цепи [33]. Показано, что именно эти свободные радикалы (и/или образовавшийся из

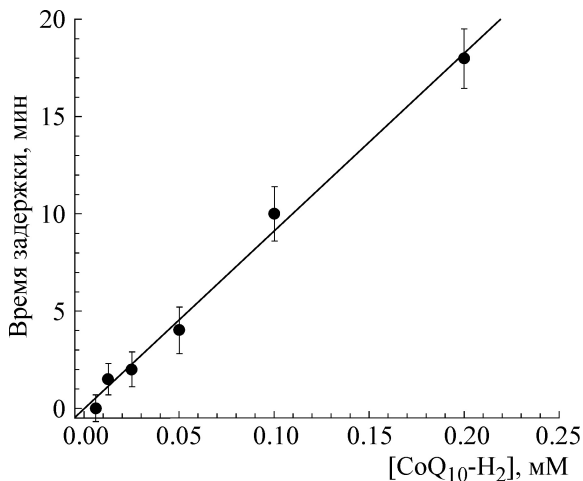


Рис. 3. Зависимость времени задержки появления спектра ЭПР свободных радикалов TIRON от концентрации CoQ₁₀-H₂ в инкубационной смеси.

них пероксид водорода) играют регуляторную и сигнальную роли во многих внутриклеточных процессах [35–37].

Имеется большое количество публикаций (см., например, работы [38,39]), авторы которых использовали TIRON в качестве эффективного антиоксиданта – проникающей в клетки «ловушки» для супероксидных радикалов. TIRON имеет высокую, почти сравнимую с супероксиддисмутазой, константу скорости взаимодействия с O₂^{•-} (10⁷–10⁸ M⁻¹c⁻¹ для TIRON и ~10⁹ M⁻¹c⁻¹ для Mn²⁺-SOD соответственно). Нами показано [30,31], что регистрация с помощью ЭПР-спектроскопии кинетики супероксид-зависимого окисления TIRON в свободно-радикальные интермедиаты – семихиноны TIRON^{•-} – является весьма чувствительным и удобным методом измерения скорости генерации супероксида как электронными переносчиками митохондрий сердца, так и изолированными ферментными системами.

Полученные нами результаты по подавлению сигнала ЭПР семихинонов TIRON^{•-} показывают, что в условиях опытов с изолированными митохондриями сердца водорастворимая форма убихинола-10 (CoQ₁₀-H₂) является эффективным антиоксидантом, успешно конкурирующим с перехватчиком супероксидных радикалов TIRON. При этом необходимо отметить, что действующее вещество препарата CoQ₁₀-H₂ надежно защищено от автоокисления, характерного для восстановленных форм различных хиноидных соединений в присутствии кислорода в щелочной среде (см. рис. 1а, 1б).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенных в последние годы исследований демонстрируют, что ответом митохондрий сердца на патологический стресс и нарушение равновесия между прооксидантными и антиоксидантными процессами в клетках может быть образование в кардиомиоцитах активных форм кислорода и физиологически значимых метаболитов оксида азота. Обнаружено, что даже при небольшом содержании кислорода в среде инкубации митохондрии сердца крысы продолжает генерировать супероксид. Это может быть одной из причин повреждения клеток миокарда в условиях ишемии, когда некоторое количество кислорода продолжает поступать в клетки в результате коллатерального кровотока. Нами получены новые данные о закономерностях взаимодействия активных форм кислорода с водорастворимой формой убихинола-10 (CoQ₁₀-H₂) и влияния его на функциональные характеристики митохондрий сердца. Установлено, что водорастворимая форма убихинола-10 в присутствии митохондрий проявляет антиоксидантные свойства и способна к прямому взаимодействию с супероксидными радикалами, генерируемыми комплексом III митохондриальной дыхательной цепи.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-015-00125), а также частично при поддержке Российского научного фонда (грант № 14-15-00-126; исследование влияния убихинола-10 на условия образования супероксидных радикалов).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. Sanz and P. Navas, *Front. Physiol.* **9**, 912 (2018).
2. M. D. Brand, C. Affouret, T. C. Esteves, et al., *Free Rad. Biol. Med.* **37**, 755 (2000).
3. G. Lenaz and M. L. Genova, *Biochim. Biophys. Acta* **1787**, 563 (2009).
4. Y. Wang and S. Hekimi, *Trends Cell. Biol.* **26** (5), 367 (2016).
5. M. P. Murphy, *Biochem. J.* **417** (1), 1 (2009).
6. M. D. Brand, *Exp. Gerontol.* **45** (7-8), 466 (2010).
7. S. Droese and U. Brandt, *Adv. Exp. Biol. Med.* **748**, 145 (2012).
8. P. Forsmak-Andree and L. Ernster, *Mol. Aspects Med.* **15**, s73, (1994).
9. A. M. James, R. A. J. Smith, and M. P. Murphy, *Arch. Biochem. Biophys.* **423**, 47 (2004).
10. G. P. Littarru and L. Tiano, *Mol. Biotechnol.* **37**, 31 (2007).
11. F. L. Crane, *J. Am. Coll. Nutr.* **20**, 591 (2001).

12. A. Kumar, H. Kaur, P. Devi, et al., *Pharmacol. Therapeut.* **124**, 259 (2009).
13. G. P. Littarru and L. Tiano, *Nutrition* **26**, 250 (2010).
14. Y. K. Yang, L. P. Wang, L. Chen, et al., *Clin. Chim. Acta* **450**, 83 (2015).
15. A. Varela-Lopez, F. Giampieri, M. Battino, et al., *Molecules* **21**, 373 (2016).
16. J. D. Hernández-Camacho, M. Bernier, G. López-Lluch, et al., *Front. Physiol.* **9**, 44 (2018).
17. S. Q. E. Lee, T. S. Tan, M. Kawamukai, et al., *Microb. Cell Fact.* **16**, 39 (2017).
18. J.A. Stefeli and D. J. Pagliarini, *Trends. Biochem. Sci.* **42** (10), 824 (2017).
19. K. Hosoe, M. Kitano, H. Kishida, et al., *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **47**, 19 (2007).
20. J. Ochoa, J. Díaz-Castro, and P. Lambrechts, *Agr. Food Ind. Hi Tech.* **24**, 31 (2013).
21. M. L. Failla, C. Chitchumroonchokchai, and F. Aoki, *J. Agr. Food Chem.* **62**, 7174 (2014).
22. P. H. Langsjoen and A. M. Langsjoen, *Clin. Pharmacol. Drug Dev.* **3** (1), 13 (2013).
23. K. Matsuo, K. Kasai, K. Hosoe, et al., *Biomed. Chromatogr.* **30**, 500 (2016).
24. G. Lopez-Lluch, J. del Pozo-Cruz, and A. Sanchez-Cuesta, *End. End. J.* (2018). DOI: 10.1016/j.nut.2018.05.020.
25. А. В. Калатанова, В. Г. Макаров, Н. М. Фаустова и др., *Биомед. химия* **64** (2), 188 (2018).
26. H. Hou, O. Y. Grinberg, S. Taie, et al., *Anesth. Analg.* **96**, 1467 (2003).
27. P. E. James, O. Y. Grinberg, and H. M. Swartz, *J. Leukocyte Biol.* **64**, 78 (1998).
28. C. L. Greenstock and R. W. Miller, *Biochim. Biophys. Acta* **396**, 11 (1975).
29. M. Otto, J. Stach, R. Kirmse, et al., *Talanta* **28**, 345 (1981).
30. A. N. Ledenev, A. A. Konstantinov, E. Yu. Popova, et al., *Biochem. Int.* **13**, 391 (1986).
31. О. В. Коркина и Э. К. Рууге, *Биофизика* **45** (4), 695 (2000).
32. M. Ksenzenko, A. Konstantinov, G. Khomutov, et al., *FEBS Lett.* **155**, 19 (1983).
33. L. Bleier and S. Drose, *Biochim. Biophys. Acta* **1827**, 1320 (2013).
34. W. Bors, M. Saran, and C. Michel, *Biochim. Biophys. Acta* **582**, 537 (1979).
35. J. Gutteriez, S. W. Ballinger, V. M. Darley-Usmar, et al., *Circ. Res.* **99**, 924 (2006).
36. R. B. Hamanaka and N. S. Chandel, *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**, 894 (2009).
37. T. Finkel, *J. Cell Biol.* **194**, 7 (2011).
38. F. McArdle, D. M. Pattwell, A. Vasilaki, et al., *Free Radic. Biol. Med.* **39** (5), 651 (2005).
39. Y. H. Han and W. H. Park, *Oncol. Rep.* **21** (1), 253 (2009).

Generation of Superoxide Radicals by Cardiac Mitochondria and the Antioxidant Effect of the Water Soluble Form of Ubiquinol-10

A.L. Dudylyna* **, M.V. Ivanova*, A.V. Kalatanova*, E.I. Kalenikova****, V.G. Makarov***, M.N. Makarova*****, K.B. Shumaev* *****, and E.K. Ruuge* ****

**National Medical Research Centre for Cardiology, Ministry of Health of the Russian Federation, 3-ya Cherepkovskaya ul. 15a, Moscow, 121552 Russia*

***Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1/2, Moscow, 119991 Russia*

****ZAO "St. Petersburg Institute of Pharmacy", Kuzmolovsky 245, Vsevolojk district, St. Petersburg, 188663 Russia*

*****Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1, bld. A, Moscow, 119991 Russia*

******AO "NPO "Pharmacy House", Kuzmolovsky 245, Vsevolojk district, St. Petersburg, 188663 Russia*

******Federal Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Leninskii prosp. 33/2, Moscow, 119071 Russia*

The effect of the water-soluble form of ubiquinol-10 (CoQ10-H2) on the processes of electron transport and oxidative phosphorylation in mitochondria isolated from the hearts of Wistar rats and the formation of reactive oxygen species in them was studied. It has been shown that pre-incubation of isolated mitochondria with ubiquinol-10 at different concentrations of the drug has only a minor effect on the rate of oxygen uptake and respiratory control. Using the EPR spin trapping with EPR oximetry method, the interaction of ubiquinol-10 with superoxide radicals formed in complex III (bc_1 segment) of cardiac mitochondria was studied. It has been established that ubiquinol-10 acts as an efficient antioxidant within the physiological range of lipid concentrations, while the magnitude and kinetic characteristics of the antiradical effect depend on the concentration of the drug.

Keywords: ubiquinol, superoxide radicals, antioxidants, heart, mitochondria, electron paramagnetic resonance