

## ГЕНЕРАЦИЯ СУПЕРОКСИДНЫХ РАДИКАЛОВ КОМПЛЕКСОМ III МИТОХОНДРИЙ СЕРДЦА И АНТИОКСИДАНТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА ПРИ РАЗНОМ ПАРЦИАЛЬНОМ ДАВЛЕНИИ КИСЛОРОДА

© 2016 г. А.Л. Дудылина\*, М.В. Иванова\*\*, К.Б. Шумаев\*\* \*\*\*, Э.К. Рууге\* \*\*

\*Физический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, 1/2;

\*\*Российский кардиологический научно-производственный комплекс МЗ РФ, 121552, Москва, 3-я Черепковская ул., 15а;

\*\*\*ФИЦ биотехнологии РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33/2

E-mail: ruuge@mail.ru

Поступила в редакцию 20.12.15 г.

С помощью ЭПР-спектроскопии спиновых ловушек и ЭПР-оксиметрии исследовано образование супероксидных радикалов в изолированных митохондриях сердец крыс линии Wistar в условиях варьлируемой оксигенации образца. Фталоцианин лития и TEMPONE-<sup>15</sup>N-D<sub>16</sub> служили для определения содержания кислорода в газопроницаемом капилляре, содержащем митохондрии. В качестве спиновой ловушки использовали TIRON. Варьируя концентрацию кислорода в инкубационной смеси, мы показали, что митохондрии сердца могут генерировать супероксид в комплексе III при разном парциальном давлении кислорода, включая условия глубокой гипоксии (< 5% O<sub>2</sub>). Динитрозильные комплексы железа с глутатионовыми лигандами (лекарственный препарат «Оксаком») оказывали антиоксидантное действие независимо от значения парциального давления кислорода, при этом величина и кинетические характеристики эффекта зависели от концентрации препарата.

*Ключевые слова:* супероксидные радикалы, динитрозильные комплексы железа, сердце, митохондрии, антиоксиданты, электронный парамагнитный резонанс.

Можно считать доказанным, что вклад митохондрий в функции клеток сердечно-сосудистой системы значительно шире, чем только их роль в энергетическом метаболизме в качестве главного поставщика АТФ [1–3]. Митохондрии играют первостепенную роль в сигнальных и регуляторных событиях, являющихся ответом на многообразные физиологические и биохимические воздействия на клетки [4–6]. В настоящее время значительный интерес вызывают супероксидные анион-радикалы, образующиеся в о-центре Q-цикла комплекса III и способные выходить как в межмембранное пространство, так и цитозоль [7–10]. Установлено, что эти супероксидные радикалы и/или образовавшийся впоследствии пероксид водорода играют регуляторную роль во внутриклеточных процессах, связанных с возникновением условий гипоксии [11–13]. Показано, что образование супероксида в митохондриях происходит не только в условиях нормального парциального

давления кислорода, но и в условиях гипоксии [14,15]. Однако однозначно не выяснено, как меняется кинетика образования супероксидных радикалов при гипоксии различной степени тяжести и до какой величины можно снижать парциальное давление кислорода, чтобы митохондрии сердца продолжали образовывать супероксид.

В экспериментах на животных было обнаружено [16], что водные растворы динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) с глутатионовыми лигандами оказывают при введении в организм длительное гипотензивное действие. На основе таких ДНКЖ в Российском кардиологическом научно-производственном комплексе МЗ РФ создан лекарственный препарат «Оксаком», предназначенный для использования в качестве гипотензивного средства [17]. Нами показано [18,19], что ДНКЖ с тиольными лигандами проявляют антиоксидантный эффект, разрушаясь под действием супероксидных анион-радикалов, образуемых в реакционной смеси

Сокращения: ДНКЖ – динитрозильные комплексы железа.

митохондриями или модельными ферментными системами.

В данной работе с помощью ЭПР-спектроскопии спиновых ловушек и ЭПР-оксиметрии проведено исследование влияния гипоксии различной степени, аноксии и реоксигенации на скорость генерации супероксида изолированными митохондриями сердца крысы, а также изучено при разных значениях парциального давления кислорода взаимодействие между супероксидными радикалами и ДНКЖ с глутатионовыми лигандами (препарат «Оксаком»).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Получение изолированных митохондрий.** Все этапы выделения митохондрий проводили при температуре 0–4°C. Крыс линии Wistar (массой 250–300 г) наркотизировали внутрибрюшинно уретаном (1,8 г/кг массы) или авертином (250 мг/кг массы). Сердце извлекали, промывали в охлажденной среде выделения (70 мМ сахарозы, 220 мМ маннитола, 50 мМ HEPES, 1 мМ ЭДТА, pH 7,4), измельчали ножницами. Кусочки сердечной мышцы пропускали через сито из нержавеющей стали (диаметр отверстий 0,8 мм) и гомогенизировали в течение 2–3 мин при соотношении ткань/среда выделения, равном 1:8. Гомогенат центрифугировали 10 мин при 700 g, супернатант, содержащий митохондрии, фильтровали и центрифугировали 10 мин при 14000 g на центрифуге K-24 (ГДР). Осадок митохондрий суспендировали в среде выделения, содержащей бычий сывороточный альбумин (3 мг/мл). Полученную суспензию митохондрий (30–70 мг белка/мл) хранили во льду.

**Определение функциональной активности митохондрий.** Скорость поглощения кислорода измеряли с помощью электрода Кларка и полярографа YSI 53 фирмы Yellow Spring Instruments, Inc. (США). Среда инкубации имела следующий состав: 225 мМ сахарозы, 10 мМ KCl, 20 мМ HEPES, 1 мМ ЭГТА, 3 мМ MgCl<sub>2</sub>, 4 мМ KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,5 мкМ ротенона, pH 7,4; температура 25°C; концентрация белка 0,3–0,7 мг/мл. В качестве субстрата дыхания использовали 4 мМ сукцината или 3 мМ глутамата и 4 мМ малата (состояние 4). Для определения скорости дыхания в состоянии 3 добавляли 300 мкМ АДФ.

**Регистрация спектров ЭПР.** Регистрацию и анализ спектров ЭПР проводили на спектрометре E-109E фирмы «Varian» (США) и малогабаритном спектрометре ESR 70-03 XD/2 УП «КБСТ» БГУ (Беларусь). Во время регистрации спектров реакционная смесь находилась в газопроницаемом капилляре из PTFE 22 (внут-

ренний диаметр 0,635 мм, толщина стенок 0,051 мм) фирмы «Zeus Industrial Products, Inc.» (США) в условиях варьируемого парциального давления кислорода. Содержание кислорода в газовом потоке, которым продували образец, определяли по ширине сигнала ЭПР фталоцианина лития, концентрацию кислорода в реакционной смеси – по ширине компонент спектра TEMPONE-<sup>15</sup>N-D<sub>16</sub> (4-оксо-2,2,6,6-тетраметилпиперидин-D<sub>16</sub>-1-оксил-<sup>15</sup>N) [20,21].

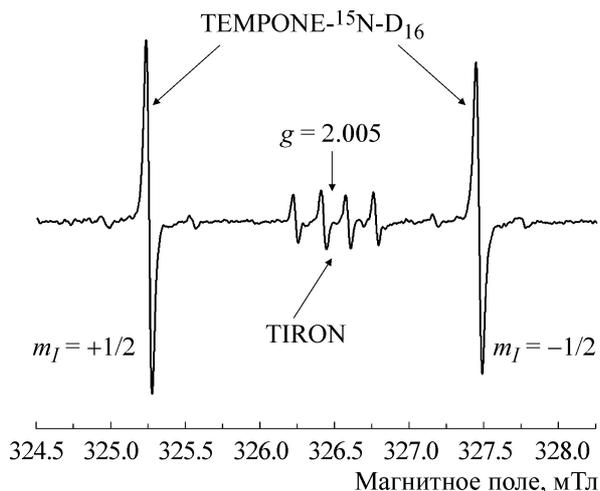
Образование супероксидных радикалов в комплексе III изолированных митохондрий регистрировали с помощью спиновой ловушки TIRON (4,5-диоксибензол-1,3-дисульфонат натрия). Нами показано [22,23], что скорость генерации супероксида в реакционной смеси пропорциональна квадрату величины сигнала ЭПР от свободных радикалов (семихинонов) TIRON<sup>•-</sup>. Среда инкубации для измерений на спектрометре ЭПР содержала 250 мМ сахарозы, 20 мМ HEPES, 1 мМ EGTA, 4 мМ KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3 мМ MgCl<sub>2</sub> и 10 мМ TIRON, pH 7,4. Концентрация митохондрий в среде инкубации составляла 1–2 мг/мл. Условия записи спектров ЭПР от TIRON на спектрометре E-109E: СВЧ-мощность 5 мВт, СВ-частота ~9,15 ГГц; на спектрометре ESR 70-03 XD/2: ослабление СВЧ-мощности 10 дБ, СВ-частота ~9,32 ГГц, амплитуда ВЧ-модуляции 0,05 мТл. Спектры ЭПР фталоцианина лития и TEMPONE-<sup>15</sup>N-D<sub>16</sub> регистрировали при СВЧ-мощности ≤ 1 мВт и амплитуде ВЧ-модуляции 0,005 мТл.

В работе использовали реактивы производства Sigma-Aldrich (США), ICN (США), Serva (Германия) и других фирм. Лекарственный препарат «Оксаком» изготовлен на ЭП МБП ФГБУ «РКНПК» Минздрава России.

**Обработка результатов.** Статистическую обработку результатов проводили по *t*-тесту и тесту ANOVA, используя приложения программы Origin 7 фирмы OriginLab Corporation (США). Результаты представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего ( $M \pm m$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сочетание методов ЭПР-спектроскопии спиновых ловушек и ЭПР-оксиметрии позволило нам исследовать кинетику образования короткоживущих свободных радикалов кислорода изолированными митохондриями сердца в условиях строго контролируемой оксигенации образца. На рис. 1 представлен суммарный спектр ЭПР нитроксильных радикалов TEMPONE-<sup>15</sup>N-D<sub>16</sub> и семихинонов TIRON<sup>•-</sup> в суспензии митохондрий, генерирующих супероксид в комплексе III в присутствии сукцината и антими-



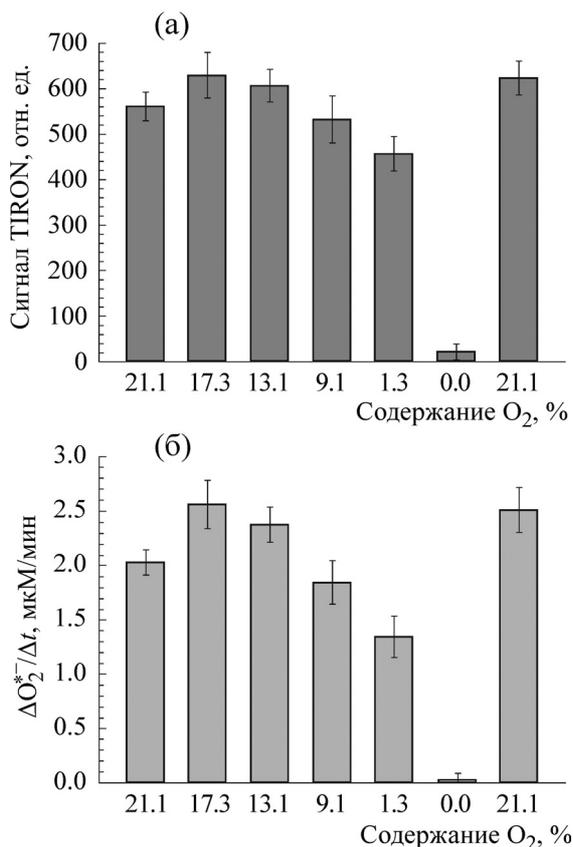
**Рис. 1.** Суммарный спектр ЭПР нитроксильных радикалов TEMPONE- $^{15}\text{N-D}_{16}$  и спиновой ловушки TIRON в суспензии митохондрий сердца крысы, генерирующих супероксид в комплексе III в присутствии сукцината и антимидина А. Образец находился в газопроницаемом капилляре при постоянной продувке воздухом (21%  $\text{O}_2$ ), спектры ЭПР регистрировали при температуре  $\sim 25^\circ\text{C}$ .

цина А. Реакционная смесь находилась в газопроницаемом капилляре при  $25^\circ\text{C}$ , а парциальное давление кислорода в газовом потоке поддерживалось во время регистрации спектров ЭПР на постоянном уровне. В ЭПР-оксиметрии используются различные парамагнитные зонды, параметры спектров ЭПР которых зависят от магнитного диполь-дипольного взаимодействия с молекулярным кислородом. Показано [15,20,21], что ширина синглетного сигнала ЭПР фталоцианина лития и ширины компонентов дублетного спектра ЭПР полностью дейтерированного нитроксильного радикала TEMPONE, в котором  $^{14}\text{N}$  заменен изотопом  $^{15}\text{N}$ , линейно зависят от концентрации кислорода в окружающей среде. В случае продувки образца воздухом (21%  $\text{O}_2$ , парциальное давление 157,4 мм рт. ст., температура  $\sim 25^\circ\text{C}$ ) ширина низкочастотной компоненты ( $m_I = +1/2$ ) спектра ЭПР TEMPONE- $^{15}\text{N-D}_{16}$  была равна 26,8 мкТл, что соответствовало равновесной концентрации кислорода в среде инкубации митохондрий 238 мкМ.

TIRON использован в работах многих авторов в качестве эффективного антиоксиданта – проникающей в клетки ловушки («scavenger») для супероксидных радикалов (см., например, [24,25]). Нами было обнаружено [22,23], что регистрация кинетики супероксид-зависимого окисления TIRON в свободнорадикальные интермедиаты – семихиноны TIRON $^{\bullet-}$  – является удобным методом измерения скорости генера-

ции супероксида как модельными ферментными системами, так и изолированными митохондриями. Показано [23,26], что скорость сукцинат-зависимого образования супероксидных радикалов в комплексе III митохондрий мала (около 0,01 нмоль  $\text{O}_2^{\bullet-}$ /мин/мг белка), однако существенно возрастает (до 0,4 нмоль  $\text{O}_2^{\bullet-}$ /мин/мг белка) в присутствии антимидина А, блокирующего перенос электронов от цитохромов *b* на окисленный коэнзим Q. Генерация супероксида в комплексе III полностью подавлялась ингибиторами Q-цикла (миксотиазолом и стигмателлином), блокирующими перенос электронов от убихинола на Fe-S-центр Риске. Переход к аноксии (полному отсутствию кислорода в среде инкубации) в результате замены воздуха в газовом потоке на азот приводил к постепенному исчезновению спектра ЭПР семихинонов TIRON $^{\bullet-}$ . Равновесие между внешней газовой средой (азотом) и находящейся в капилляре суспензией митохондрий устанавливалось за 4–5 мин, при этом ширина низкочастотной компоненты спектра ЭПР TEMPONE- $^{15}\text{N-D}_{16}$  уменьшалась до 18,6 мкТл.

На рис. 2а представлена зависимость интенсивности сигнала ЭПР семихинонов TIRON $^{\bullet-}$ , образовавшихся в суспензии митохондрий в результате окисления спиновой ловушки супероксидными радикалами, от содержания кислорода в газовом потоке (т.е. от значения парциального давления кислорода). На рис. 2б показана соответствующая зависимость скорости образования супероксида в митохондриях сердца, вычисленная с помощью супероксид-генерирующей модельной системы ксантиноксидаза–ксантин [22]. Из рис. 2 видно, что, несмотря на некоторое падение интенсивности сигнала ЭПР от TIRON при понижении содержания  $\text{O}_2$  в газовом потоке, комплекс III митохондриальной дыхательной цепи продолжал образовывать супероксидные радикалы, включая условия глубокой гипоксии (1,3%  $\text{O}_2$ ). Генерация супероксида 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 возрастанию сигнала ЭПР от TIRON. После 5-минутной реоксигенации, когда установилось равновесие между внешней газовой средой и суспензией митохондрий, скорость образования супероксидных радикалов оказалась несколько выше, чем до аноксии. Можно думать (см. также [26]), что глубокая гипоксия, последующие аноксия и реоксигенация сопровождаются определенными изменениями в мембранах изо-

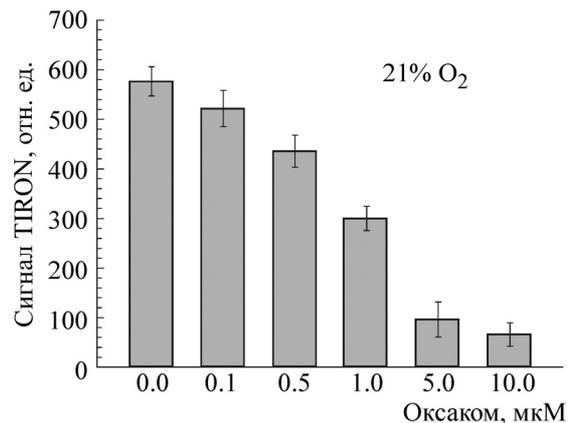


**Рис. 2.** Зависимость интенсивности сигнала ЭПР от TIRON (а) и скорости образования супероксидных радикалов (б) в суспензии митохондрий сердца крысы от содержания кислорода в газовом потоке, продуваемом образцом. Добавки в инкубационную смесь: сукцинат и антимицин А, температура ~25°C.

лированных митохондрий сердца, вызывающими увеличение скорости образования супероксидных радикалов электронными переносчиками (семихинонами коэнзима Q) комплекса III дыхательной цепи.

Кроме сукцината – субстрата комплекса II, мы использовали также глутамат и малат – субстраты комплекса I. Кинетика изменения сигнала ЭПР от TIRON в случае субстратов комплекса I была похожа на предыдущие опыты с сукцинатом (данные не приведены), однако в этом случае генерация супероксида в комплексе III прекратилась после добавления ротенона – ингибитора комплекса I.

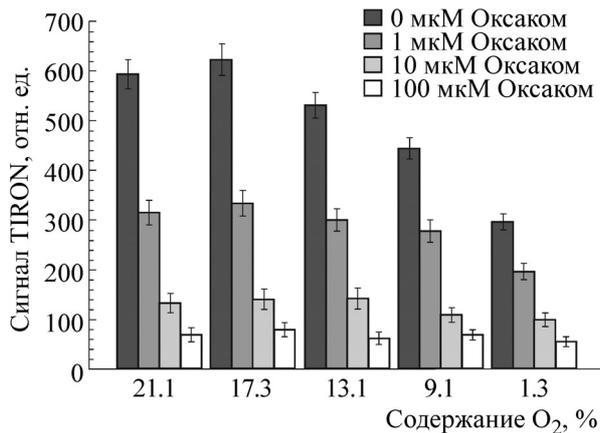
На рис. 3 показана зависимость величины сигнала ЭПР TIRON<sup>•-</sup> от содержания в инкубационной смеси ДНКЖ с глутатионовыми лигандами (препарата «Оксаком»). Из этого рисунка видно, что скорость образования при нормоксии (~21% O<sub>2</sub>) свободных радикалов спиновой ловушки TIRON существенно образом зависит от концентрации ДНКЖ в су-



**Рис. 3.** Зависимость интенсивности сигнала ЭПР от TIRON в суспензии митохондрий сердца крысы от концентрации ДНКЖ с глутатионом (препарат «Оксаком») в среде инкубации. Содержание кислорода в газовом потоке 21%, добавки в инкубационную смесь: сукцинат и антимицин А, температура ~25°C.

пензии митохондрий. В концентрациях 1–100  $\mu\text{M}$  препарат не влиял на скорость поглощения кислорода митохондриями при добавлении сукцината как субстрата окисления. При добавлении ДНКЖ в концентрации  $\geq 1 \text{ mM}$  (не показано) наблюдалось практически полное исчезновение сигнала ЭПР от TIRON. Необходимо отметить, что для спиновой ловушки TIRON характерна высокая константа скорости взаимодействия с супероксидными радикалами [22,23]. Следовательно, ДНКЖ в составе препарата «Оксаком» должны иметь сравнимую или даже более высокую константу скорости взаимодействия с супероксидом, чем TIRON.

На рис. 4 представлена зависимость интенсивности сигнала ЭПР от TIRON в суспензии митохондрий сердца крысы от содержания кислорода в газовом потоке и концентрации ДНКЖ с глутатионом (препарата «Оксаком») в среде инкубации. Как видно из этого рисунка, динитрозильные комплексы железа с глутатионом эффективно взаимодействуют с супероксидными радикалами при разных значениях парциального давления кислорода, включая условия глубокой гипоксии. При концентрациях «Оксакома» 0,1–1  $\mu\text{M}$  в течение более длительной инкубации (20–30 мин) происходило постепенное увеличение сигнала ЭПР семихинона TIRON. Этот эффект, по-видимому, связан с тем, что при указанных концентрациях происходит более полное разрушение ДНКЖ в реакции с супероксидом по сравнению с условиями, при которых может происходить регенерация этих комплексов в суспензии митохондрий. Нами обнаружено [19], что после максимального ингибирующего действия ДНКЖ в



**Рис. 4.** Зависимость интенсивности сигнала ЭПР от TIRON в суспензии митохондрий сердца крысы от содержания кислорода в газовом потоке и концентрации ДНКЖ с глутатионом (препарат «Оксаком») в среде инкубации. Добавки в среду: сукцинат, антимицин А и «Оксаком» (концентрации «Оксакома» указаны в легенде).

системе с митохондриями величина сигнала ЭПР от TIRON растет более медленно, чем в модельной супероксидгенерирующей системе ксантин-ксантиоксидаза. Это свидетельствует о том, что ДНКЖ в присутствии митохондрий либо не разрушаются полностью, либо происходит их частичная регенерация.

## ВЫВОДЫ

Таким образом, появление регистрируемого спиновыми ловушками количества супероксидных радикалов на границе внутренней мембраны митохондрий с межмембранным пространством возможно при разных значениях парциального давления кислорода. Полученные результаты и приведенные в литературе данные других авторов (см. работы [2,14,20]) позволяют заключить, что митохондрии сердца характеризуются способностью образовывать активные формы кислорода даже при малом содержании кислорода в среде вокруг митохондрий, т.е. в условиях, характерных для ишемии сердечной мышцы. Проведенные нами эксперименты также показали, что динитрозильные комплексы железа с глутатионовыми лигандами эффективно взаимодействуют с супероксидными радикалами при разных значениях парциального давления кислорода, включая условия глубокой гипоксии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 15-04-05211.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. D. Brand, C. Affourtit, T. C. Esteves, et al., *Free Rad. Biol. Med.* **37**, 755 (2000).
2. S. Orrenius, V. Gogvadze, and V. Zhivotovsky, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **47**, 143 (2007).
3. C. X. C. Santos, N. Anilkumar, M. Zhang, et al., *Free Rad. Biol. Med.* **50**, 777 (2011).
4. J. Gutierrez, S. W. Ballinger, V. M. Darley-Usmar, et al., *Circ. Res.* **99**, 924 (2006).
5. R. B. Hamanaka and N. S. Chandel, *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**, 894 (2009).
6. T. Finkel, *J. Cell Biol.* **194**, 7 (2011).
7. M. Ksenzenko, A. Konstantinov, G. Khomutov, et al., *FEBS Lett.* **155**, 19 (1983).
8. F. L. Muller, Y. Liu and H. van Remmen, *J. Biol. Chem.* **279**, 49064 (2004).
9. P. Lanciano, B. Khalfaoui-Hassani, N. Selamoglu, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1827**, 1332 (2013).
10. Y.-R. Chen and J. L. Zweier, *Circ. Res.* **114**, 524 (2014).
11. W. Droge, *Physiol. Rev.* **82**, 47 (2002).
12. F. J. Giordano, *J. Clin. Invest.* (2005) **115**, 500.
13. T. Klimova and N. S. Chandel, *Cell Death Differ.* **15**, 660 (2008).
14. N. S. Chandel, D. S. McClintock, S. E. Feliciano, et al., *J. Biol. Chem.* **275**, 25130 (2000).
15. И. В. Свириева, А. Мерцалова и Э. К. Рууге, *Биофизика* **55**, 271 (2010).
16. V. L. Lakomkin, A. F. Vanin, A. A. Timoshin, et al., *Nitric Oxide* **16**, 413 (2007).
17. E. I. Chazov, O. V. Rodnenkov, A. V. Zorin, et al., *Nitric Oxide* **26**, 148 (2012).
18. К. Б. Шумаев, А. А. Губкин, С. А. Губкина и др., *Биофизика* **51**, 472 (2006).
19. К. Б. Шумаев, И. В. Свириева, С. А. Губкина и др., *Биофизика* **55**, 460 (2010).
20. H. Hou, O. Y. Grinberg, S. Taie, et al., *Anest. Analg.* **96**, 1467 (2003).
21. P. E. James, O. Y. Grinberg, and H. M. Swartz, *J. Leukocyte Biol.* **64**, 78 (1998).
22. A. N. Ledenev, A. A. Konstantinov, E. Y. Popova, et al., *Biochem. Int.* **13**, 391 (1986).
23. О. В. Коркина и Э. К. Рууге, *Биофизика* **45**, 695 (2000).
24. Y. H. Han and W. H. Park, *Oncol. Rep.* **21**, 253 (2009).
25. A. O. Oyewole and M. A. Birch-Machin, *FASEB J.* **29**, 4766 (2015).
26. И. В. Свириева и Э. К. Рууге, *Биофизика* **51**, 478 (2006).

## **Generation of Superoxide Radicals by Complex III in Heart Mitochondria and Antioxidant Effect of Dinitrosyl Iron Complexes at Different Partial Pressure of Oxygen**

**A.L. Dudylna\***, **M.V. Ivanova\*\***, **K.B. Shumaev\*\* \*\*\***, and **E.K. Ruuge\* \*\***

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

*\*\*Russian Cardiology Research and Production Complex, Ministry of Health of the Russian Federation,  
ul. 3-ya Cherepkovskaya 15a, Moscow, 121552 Russia*

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

The EPR spin-trapping technique and EPR-oximetry were used to study generation of superoxide radicals in heart mitochondria isolated from Wistar rats under conditions of variable oxygen concentration. Lithium phthalocyanine and TEMPONE-<sup>15</sup>N-D<sub>16</sub> were chosen to determine oxygen content in a gas-permeable capillary tube containing mitochondria. TIRON was used as a spin trap. We investigated the influence of different oxygen concentrations in incubation mixture and demonstrated that heart mitochondria can generate superoxide in complex III at different partial pressure of oxygen as well as under the conditions of deep hypoxia (< 5% O<sub>2</sub>). Dinitrosyl iron complexes with glutathione (the pharmaceutical drug «Oxacom») exerted an antioxidant effect, regardless of the value of the partial pressure of oxygen, but the magnitude and kinetic characteristics of the effect depended on the concentration of the drug.

*Key words: superoxide radicals, dinitrosyl iron complexes, heart, mitochondria, antioxidants, electron paramagnetic resonance*