

УДК 577.24;29

СУПЕРОКСИДУСТРАНЯЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНОГО ПЛАСТОХИНОНА – 10-(6'-ПЛАСТОХИНОНИЛ)ДЕЦИЛ- ТРИФЕНИЛФОСФОНИЯ (SkQ1)

© 2012 г. В.А. Чистяков^{1,2*}, Е.В. Празднова²,
Л.В. Гутникова², М.А. Сазыкина², И.С. Сазыкин²

¹ Ростовский государственный медицинский университет
Минздравоохранения России, 344022 Ростов-на-Дону,
пер. Нахичеванский, 29; электронная почта: vladimirchi@yandex.ru

² НИИ биологии Южного федерального университета,
344090 Ростов-на-Дону, просп. Стачки, 194/1;
факс: (863)299-5661

Поступила в редакцию 01.04.12

Производное пластохинона – 10-(6'-пластохинонил)децилтрифенилфосфоний (SkQ1) – обладает способностью перехватывать супероксид-анион-радикал. Данная способность проявляется как *in vitro*, так и *in vivo* в опытах на бактериях *Escherichia coli*. Протекторная активность SkQ1 *in vivo* существенно превышает такую для аскорбиновой кислоты.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ионы Скулачева, SkQ1, супероксид-анион-радикал, супероксидустраняющая активность, *E. coli*.

Липофильный катион 10-(6'-пластохинонил)децилтрифенилфосфоний (SkQ1) – самый эффективный на сегодня геропротектор [1]. В основе этой активности лежит способность SkQ1 снижать интенсивность патологических процессов, связанных с генерацией активных форм кислорода. Такая активность регистрируется в десятках моделей разной степени сложности, как *in vitro*, так и *in vivo*. Тем не менее биохимические механизмы, лежащие в основе антиоксидантной активности этого вещества, изучены далеко не полностью. В частности, данные по способности SkQ1 «перехватывать» супероксид-анион-радикал (O_2^-) в достаточной степени фрагментарны. Между тем O_2^- является первичным свободнорадикальным продуктом, генерируемым при работе дыхательной цепи. Именно его образование делает митохондрии «грязным местом клетки» и запускает процессы, ведущие к фенотипу [2]. Цель данной работы – исследование способности SkQ1 «перехватывать» O_2^- .

Принятые сокращения: SkQ1 – производное пластохинона – 10-(6'-пластохинонил)децилтрифенилфосфоний, O_2^- – супероксид-анион-радикал, SOD – супероксиддисмутаза, ГБО – гипербароксигенация.

* Адресат для корреспонденции.

Супероксидустраняющую активность SkQ1 определяли *in vitro* с помощью стандартной тест-системы (SOD determination kit 19160, «Sigma», США). Измерения оптической плотности проводили на планшетном ридере автоматического анализатора Alisei («Radim», Италия). Для калибровки использовали супероксиддисмутазу (SOD) в концентрациях 1–200 ед/мл («Sigma»). Супероксидустраняющую активность рассчитывали методом Фридовича [3].

In vivo супероксидустраняющую активность оценивали по снижению индукции Sox-оперона *Escherichia coli*, вызванной обработкой бактерий чистым кислородом при 0,3 МПа в течение 1 ч. Объектом исследования был штамм *E. coli* MG1655 (pSoxS-lux), предоставленный И.В. Мануховым (ГосНИИгенетика, Москва). Клетки данного штамма – lux-биосенсора – сигнализируют об индукции Sox-оперона усилением свечения [4]. Для измерений люминесценции использовался автоматический микропланшетный люминометр ЛМ-01А («Immunotech», Чехия). Измерения начинали через 10 мин после извлечения проб из барокамеры, затем проводили каждые 10 мин в течение 120 мин. Для оценки влияния изучаемых факторов на экспрессию Sox-оперона вычисляли фактор индукции (F) по формуле

$$I^S = (L_e/L_k) - 1, \quad (1)$$

где L_k и L_e – интенсивности люминесценции контрольной и опытной проб соответственно.

Признаком значимости эффекта индукции считали статистически значимое превышение L_e над L_k , оцениваемое по t -критерию.

Протекторную активность (P , %) вычисляли с учетом индукции в присутствии соответствующих концентраций протектора:

$$P = (1 - (I_a/I_p)) \times 100\%, \quad (2)$$

где I_a и I_p – факторы индукции SOS-ответа исследуемым воздействием в присутствии протектора и в контроле соответственно.

В качестве характеристики протекторной активности исследуемой концентрации вещества использовали среднее значение P за все время измерений.

Как видно на рис. 1, SkQ1 в концентрациях 10^{-5} и 10^{-4} М проявляет супероксидустраниющую активность (0,29, 0,46 усл. ед). Необходимо отметить, что используемый в тест-системе метод определения основан на регистрации «перехвата» супероксид-анион-радикала, генерируемого в системе ксантиноксидаза–ксантин. Данная система генерации – одна из самых надежных по воспроизводимости результатов и поэтому широко используется. Однако она рассчитана на детекцию высокой активности, характерной для фермента SOD. Чувствительности теста оказалось недостаточно для детекции супероксидустраниющей активности аскорбиновой кислоты (данные не приводятся), которая надежно регистрируется более чувствительны-

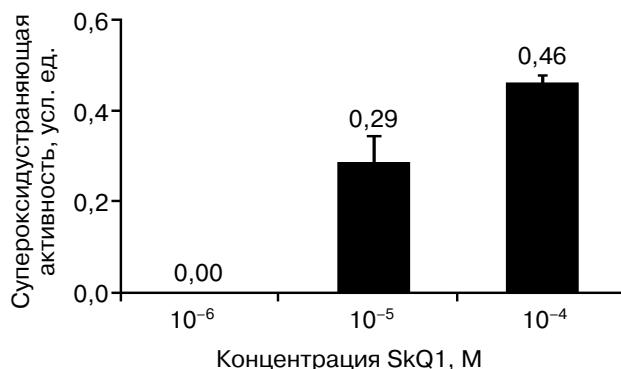


Рис. 1. Супероксидустраниющая активность SkQ1 *in vitro* в концентрациях 10^{-6} – 10^{-4} М

ми, резонансными методами [5]. Таким образом, супероксидустраниющую активность SkQ1 по данным теста *in vitro* можно охарактеризовать как высокую.

Обработка бактерий кислородом под давлением вызывает сильную индукцию Sox-оперона (рис. 2), что считается следствием роста внутриклеточного уровня супероксид-анион-радикала [4]. Введение SkQ1 в концентрации 10^{-5} М существенно (в среднем на 61,3%) снижает Sox-индукцию (рис. 2, а). Статистически значимые эффекты отмечаются и для меньших концентраций, вплоть до 10^{-14} М (рис. 2, б). Сравнительные данные по способности разных концентраций аскорбиновой кислоты и SkQ1 супрессировать генерацию O_2^- , вызванную гипербароксигенацией (ГБО), представлены на рис. 3. На рисунке видно, что и *in vivo* для SkQ1 характерна

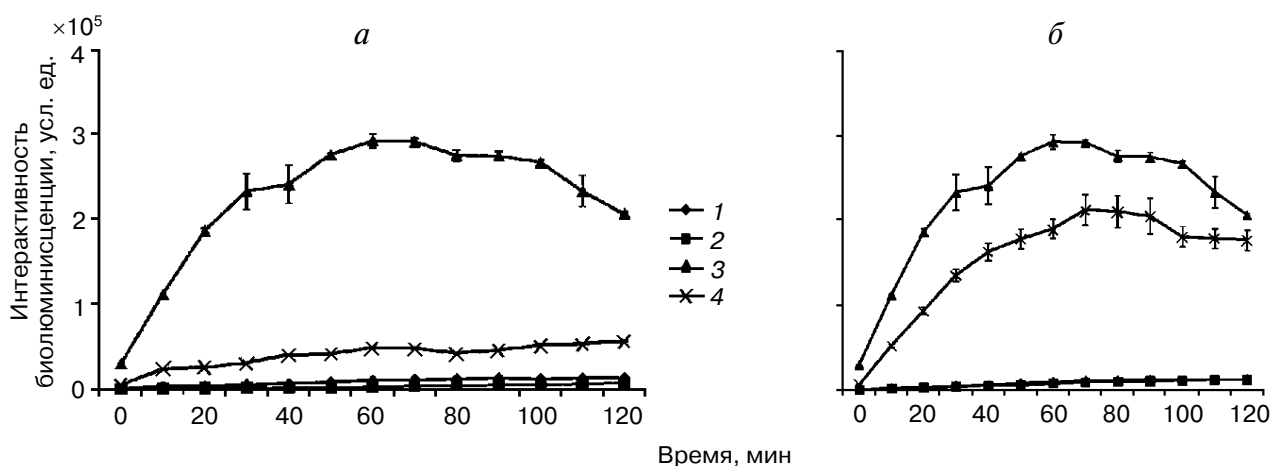


Рис. 2. Билюминесценция штамма *E. coli* MG1655 (pSoxS-lux) после действия ГБО 0,3 МПа в течение 1 ч в присутствии SkQ1 в концентрации 10^{-5} М (а) и 10^{-14} М (б). 1 – Контроль, 2 – SkQ1, 3 – ГБО, 4 – ГБО + SkQ1

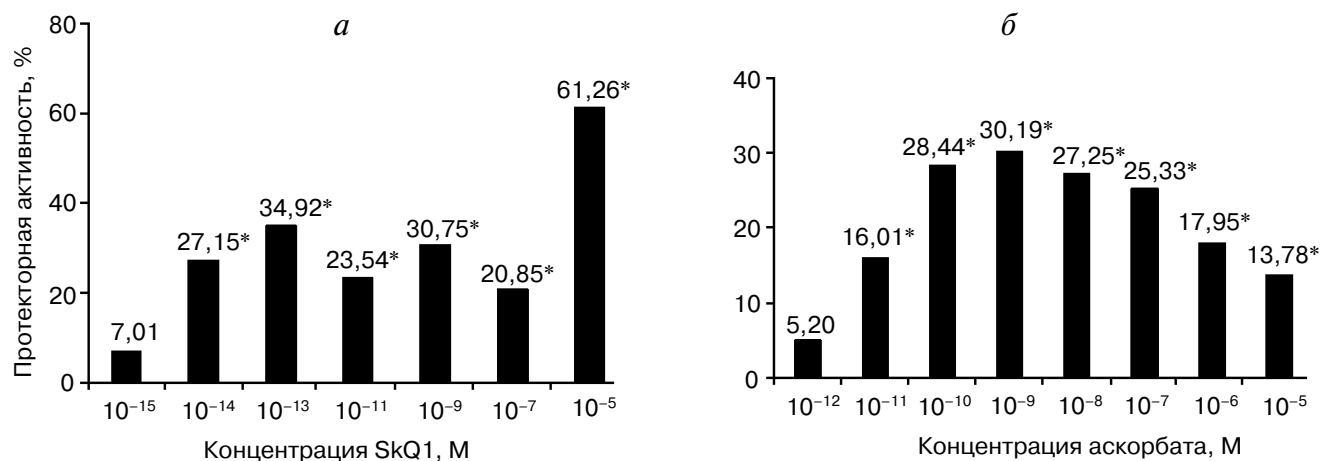


Рис. 3. Протекторная активность SkQ1 (а) и аскорбата (б) при действии ГБО 0,3 МПа в течение 1 ч. * – Статистически значимые эффекты ($p < 0,05$)

более высокая супероксидустраняющая активность. Минимальные действующие концентрации SkQ1 и аскорбата – 10^{-14} и 10^{-11} М соответственно. Максимальный протекторный эффект, достигаемый с помощью SkQ1 и аскорбата, – 61,26 и 30,19% соответственно. Супероксидустраняющая активность SkQ1 проявляется *in vitro* в концентрациях на несколько порядков больше таковых *in vivo*. По-видимому, это, с одной стороны, связано с накоплением вещества в клетках бактерий за счет подробно описанного электрохимического механизма, с другой – с формированием циклов окисления–восстановления, сопряженных с ферментами дыхательной цепи. В результате баланс окисленной и восстановленной форм остается постоянным без жесткой зависимости от концентрации [1].

Таким образом, SkQ1 обладает способностью перехватывать супероксид-анион-радикал. Данная способность проявляется как *in vitro*, так и *in*

in vivo в опытах на аэробных бактериях. Аналогичные процессы происходят, по-видимому, и в митохондриях. Косвенно об этом свидетельствуют многочисленные данные по снижению генерации митохондриями перекиси водорода, которая является в основном продуктом дисмутации супероксидных радикалов в присутствии SkQ1 [1]. Модель бактерии – ГБО – может быть перспективной для экспресс-скрининга новых ионов Скулачева с антиоксидантной нагрузкой.

Авторы выражают искреннюю благодарность В.П. Скулачеву за помощь в организации исследований и интерпретации результатов экспериментов.

Работа выполнена при финансовой поддержке НИИ митоинженерии МГУ им. М.В. Ломоносова, Министерства науки и образования РФ и Минздравсоцразвития РФ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Skulachev, M.V., Antonenko, Y.N., Anisimov, V.N., Chernyak, B.V., Cherepanov, D.A., Chistyakov, V.A., Egorov, M.V., Kolosova, N.G., Korshunova, G.A., Lyamzaev, K.G., Plotnikov, E.Y., Roginsky, V.A., Savchenko, A.Y., Severina, I.I., Severin, F.F., Shkurat, T.P., Tashlitsky, V.N., Shidlovsky, K.M., Vyssokikh, M.Y., Zamyatnin, A.A., Jr., Zorov, D.B., and Skulachev, V.P. (2011) *Curr. Drug Targets*, **12**, 800–826.
2. Skulachev, V.P. (2005) *IUBMB Life*, **57**, 305–310.
3. Фридович И. (1979) В кн. *Свободные радикалы в биологии*, Мир, Москва, с. 190–226
4. Zavgelsky, G.B., Kotova, V.Yu., and Manukhov, I.V. (2007) *Mutation Res.*, **634**, 172–176.
5. Wagner, A.E., Huebbe, P., Konishi, T., Rahman, M.M., Nakahara, N., Matsugo, S., and Rimbach, G. (2008) *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 11694–11699.

**SUPEROXIDE SCAVENGING ACTIVITY
OF PLASTOQUINONE DERIVATIVE,
10-(6'-PLASTOQUINONYL)DECYLTRIPHENYLPHOSPHONIUM
(SkQ1)**

**V. A. Chistyakov^{1,2*}, E. V. Prazdnova²,
L. V. Gutnikova², M. A. Sazykina², I. S. Sazykin²**

¹ Rostov State Medical University, Central Research Laboratory,
per. Nahichevansky 29, Rostov-on-Don 344022, Russia;
E-mail: vladimirchi@yandex.ru

² Research Institute of Biology, Southern Federal University,
prosp. Stachky 194/1, Rostov-on-Don 344090,
Russia; fax: (863)299-5661

Received April 1, 2012

Plastoquinone derivative 10-(6'-plastoquinonyl)decyltriphenylphosphonium (SkQ1) has the ability to scavenge superoxide anion radical. This ability is manifested as *in vitro* and *in vivo* in experiments on the bacterium *Escherichia coli*. Protective activity of SkQ1 *in vivo* significantly exceeds that of ascorbic acid.

Key words: Skulachev ions, SkQ1, superoxide anion radical, superoxide scavenging activity, *E. coli*