

ИССЛЕДОВАНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ КОРОТКОЖИВУЩИХ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В ГОМОГЕНАТЕ СЕРДЦА КРЫСЫ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОННОГО ПАРАМАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА

© 2023 г. А.А. Тимошин*, #, В.Л. Лакомкин*, А.А. Абрамов*, Э.К. Рууге*, **

*Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова Минздрава России, 3-я Черепковская ул., 15а, Москва, 121552, Россия

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

#E-mail: timoshin_a_a@mail.ru

Поступила в редакцию 30.09.2022 г.

После доработки 11.11.2022 г.

Принята к публикации 16.11.2022 г.

Работа посвящена исследованию защитного действия такого митохондриально-направленного препарата, как пластомитин, в условиях гиперпродукции короткоживущих активных форм кислорода в организме животных. Изучена интегральная скорость генерации высокотоксичных кислородных радикалов в условиях окислительного стресса, инициированного введением в организм животных доксорубина, и защитного эффекта, вызываемого действием пластомитина. Эксперименты проводились на гомогенатах сердец крыс с использованием метода ЭПР. Установлено, что в результате введения крысам доксорубина достоверно увеличивается на 26% скорость образования короткоживущих активных форм кислорода в гомогенате, а в случае совместного применения доксорубина и пластомитина этот эффект в значительной степени подавляется.

Ключевые слова: активные формы кислорода, антиоксидант, гидроксилламин, доксорубин, пластомитин, спиновая ловушка, электронный парамагнитный резонанс.

DOI: 10.31857/S0006302923010118, EDN: OAJYWX

Известно, что образование короткоживущих высокотоксичных активных форм кислорода (АФК) является одним из основных факторов, вызывающих существенные и необратимые повреждения органов и тканей [1]. Для защиты биологических структур от повреждающего действия АФК в лабораторной и клинической практике широко применяются препараты, способные эффективно перехватывать эти короткоживущие соединения, оказывая тем самым антиоксидантное действие.

В данной работе исследовалось защитное действие такого митохондриально-направленного препарата, как пластомитин (SkQ, ионы Скулачёва) [2, 3]. При этом важной задачей являлся анализ действия этого антиоксиданта в условиях гиперпродукции АФК, инициированной введением в организм доксорубина (антибиотик антрациклинового ряда, используемый для лечения злокачественных новообразований), обладающего дозозависимым кардиотоксическим дей-

ствием, способным стимулировать образование АФК в ткани миокарда [4–6].

В данной работе такие исследования проводились на гомогенатах сердец крыс с использованием метода электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Основной целью работы являлось изучение интегральной скорости генерации высокотоксичных кислородных радикалов в условиях окислительного стресса, инициированного введением в организм животных доксорубина и защитного эффекта, вызываемого действием пластомитина.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Эксперименты проводили на нормотензивных крысах линии Wistar (самцы массой 320–380 г). Животных содержали в биоклинике НМИЦ кардиологии им. ак. Е.И. Чазова Минздрава России в клетках по 5 особей со свободным доступом к сухим кормам и воде. Световой режим контролировали (12:12 ч — свет : темнота) при достаточной смене объемов воздуха и температуре 19–23°C.

Все животные были произвольным образом разделены на три группы. Животные первой

Сокращения: АФК — активные формы кислорода, SkQ — пластомитин (ионы Скулачёва), ЭПР — электронный парамагнитный резонанс.

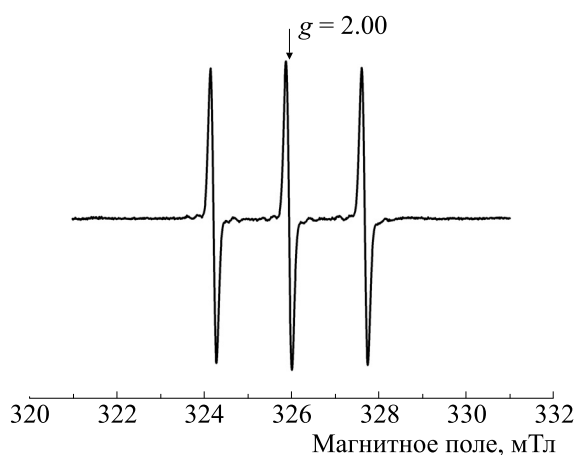


Рис. 1. Спектр ЭПР нитроксильных радикалов, образующихся при введении СРН в гомогенат сердца крысы.

группы (контроль) получали подкожно физиологический раствор. Вторая и третья группы животных получали доксорубин в дозе 2 мг/кг подкожно еженедельно в течение четырех недель. Животные из третьей группы в течение всего этого периода наряду с доксорубином получали также ежедневно подкожно пластомитин (в 50%-м водном пропиленгликоле) в дозе 0.32 мг/кг. При таком введении крысам доксорубина у них инициировалось развитие сердечной недостаточности [7], а пластомитин мог оказывать защитное действие как митохондриально направленный перехватчик короткоживущих кислородных радикалов.

Через четыре недели всех животных забивали передозировкой уретана, после чего у них вскрывали грудную клетку, изолировали сердце и промывали его в физиологическом растворе, после чего замораживали в жидком азоте. Далее полученные образцы миокарда животных всех трех экспериментальных групп хранили в жидком азоте и размораживали непосредственно перед их анализом методом ЭПР.

После размораживания образцы ткани сердечной мышцы гомогенизировали. При этом для каждого образца навеску ткани миокарда, отмытую от крови, измельчали ножницами, после чего продавливали через сито с отверстиями диаметром 0.8 мм, после этого перетирали в стеклянном гомогенизаторе с автоматическим приводом вместе со средой гомогенизации (из расчета 100 мг ткани на 300 мкл среды). Все манипуляции проводили при температуре 0–4°C. В качестве среды гомогенизации использовали раствор Кребса–Хенселейта. Полученный грубый гомогенат осаждали центрифугированием в течение 3 мин при 4000 об/мин, полученный супернатант сразу же исследовали методом ЭПР.

Для регистрации образования короткоживущих активных форм кислорода в образцы супернатанта, соответствующие всем экспериментальным группам, добавляли водный раствор спиновой ловушки, в качестве которой применяли гидроксиламин СРН ((3S)-1-гидрокси-2,2,5,5-тетраметилпирролидин-3-карбоксилатная кислота) [8, 9], конечная концентрация которого в образцах составляла 1 мМ. Полученные пробы вводили в газопроницаемые капилляры объемом 35 мкл, которые помещали в кварцевую трубку внутренним диаметром 4 мм, продуваемую воздушным потоком при комнатной температуре и расположенную в активной зоне резонатора ЭПР-спектрометра.

Регистрацию спектров ЭПР проводили на спектрометре X-диапазона модели E-109E (Varian, США). Амплитуда ВЧ-модуляции магнитного поля составляла 0.1 мТл при частоте 100 кГц. СВЧ-мощность спектрометра устанавливали на уровне 10 мВт, а частота СВЧ-излучения всегда составляла 9.14 ГГц. Запись серии сигналов ЭПР проводили в течение 30 мин после добавления СРН к образцам гомогената, за это время записывали 7 спектров. Для анализа содержания полученных парамагнитных аддуктов измеряли амплитуды высокопольной компоненты их спектров.

Статистическую обработку данных и построение графиков проводили с использованием пакета программ Origin 8 (OriginLab Corp., США). Все данные представлены как среднее значение $\pm$ ошибка среднего. Кратность повторения опытов составляла не менее пяти-шести экспериментов. Для проверки статистической достоверности эффектов использовали двусторонний *t*-критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе работы исследовали образование короткоживущих АФК в ткани сердечной мышцы с использованием в качестве спиновой ловушки гидроксиламина СРН [8, 9]. Как известно, короткоживущие кислородные радикалы присоединяются к молекуле данной спиновой ловушки с образованием ковалентной связи. Продуктом этой реакции являются стабильные нитроксильные радикалы (спиновые аддукты), имеющие характерный спектр ЭПР.

На рис. 1 представлен характерный спектр ЭПР нитроксильных радикалов, образующихся при добавлении СРН в гомогенат ткани миокарда. Из рисунка видно, что этот спектр представляет собой триплет узких линий. Такой сигнал, как известно, соответствует спектру нитроксильных радикалов, обладающих быстрым и изотропным молекулярным движением, образующихся в результате взаимодействия СРН с короткоживущими кислородными радикалами [8, 9].

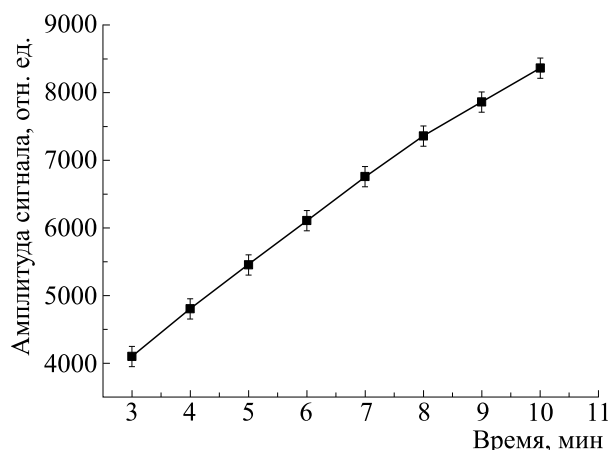


Рис. 2. Кинетика амплитуды высокопольной компоненты сигналов ЭПР нитроксильных радикалов, образующихся в модельной системе, содержащей СРН и ксантин—ксантиноксидазу. По оси абсцисс — время с момента введения СРН в реакционную среду.

Важно отметить, что реакция данной спиновой ловушки с различными окислителями приводит к образованию и накоплению практически одинаковых нитроксильных радикалов, поскольку такие ловушки на основе гидросиламина не демонстрируют специфической реакционной способности к определенному типу свободнорадикальных АФК и не допускают поэтому идентификации АФК по спектру ЭПР. Тем не менее, на специфичность обнаружения супероксида указывает ингибирование сигнала ЭПР при добавлении в реакционную среду супероксиддисмутазы [9].

Кроме того, способность СРН эффективно перехватывать супероксидные анион-радикалы была показана в данных экспериментальных условиях на модельной системе, содержащей ксантин и ксантиноксидазу в фосфатном буфере при pH 7.4. На рис. 2 представлена характерная кинетика изменения амплитуды высокопольной компоненты сигналов ЭПР образующихся в такой системе нитроксильных радикалов. Из этого рисунка видно, что их концентрация практически линейно увеличивается.

Следовательно, в данных экспериментальных условиях в результате взаимодействия СРН с супероксидными анион-радикалами, образующимися в системе «ксантин—ксантиноксидаза», происходит образование стабильных нитроксильных радикалов, регистрируемых методом ЭПР. При этом форма спектров радикалов, регистрируемых в такой модельной системе, не отличается от формы сигналов ЭПР этих парамагнитных соединений, образующихся в результате взаимодействия СРН с короткоживущими АФК в гомогенате ткани миокарда (данные не приведены).

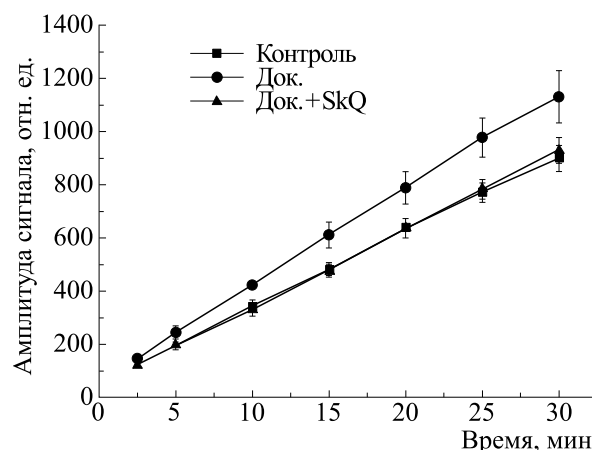


Рис. 3. Кинетики амплитуды высокопольной компоненты сигналов ЭПР нитроксильных радикалов, образующихся после добавления СРН в гомогенат ткани миокарда крыс, соответствующих трем экспериментальным группам. По оси абсцисс — время с момента введения СРН в образцы гомогената.

В другой части работы исследовали кинетики формирования и накопления стабильных нитроксильных радикалов при введении СРН в образцы гомогената ткани миокарда. Для всех экспериментальных групп животных рассчитывали усредненные кинетики образования этих парамагнитных соединений, полученные результаты представлены на рис. 3. Из этого рисунка видно, что во всех трех группах животных после введения СРН в образцы гомогената наблюдалось увеличение содержания в пробах парамагнитных нитроксильных радикалов, и во всех случаях кинетика этого роста могла быть хорошо аппроксимирована линейной зависимостью. Исходя из этих зависимостей, для всех экспериментальных групп оценивали скорость образования нитроксильных радикалов, результаты представлены на рис. 4.

Из этого рисунка видно, что при переходе от контрольной группы к животным, получавшим доксорубин, скорость образования парамагнитных аддуктов увеличивалась на 26%, а в случае совместного применения доксорубина и пластомицина она практически не отличалась от своего значения, полученного в контроле.

Таким образом, несмотря на то, что введение СРН осуществлялось не в интактный организм животных, а в гомогенат ткани сердечной мышцы после ее замораживания и оттаивания, в препаратах, соответствующих всем экспериментальным группам, происходит генерация короткоживущих кислородных радикалов с образованием спиновых аддуктов, регистрируемых методом ЭПР. При этом в результате введения крысам доксорубина достоверно увеличивается скорость образования короткоживущих АФК в гомогенате, а в

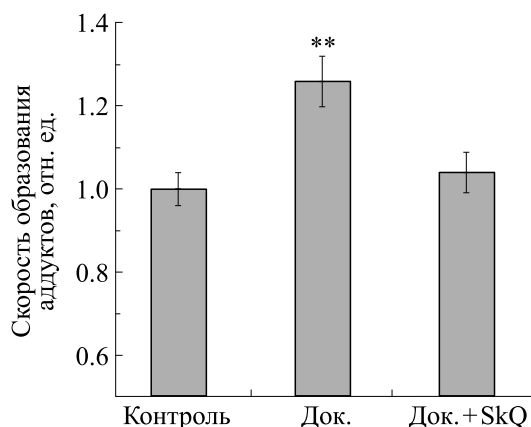


Рис. 4. Усредненные значения скорости образования нитроксильных радикалов, соответствующие трем экспериментальным группам; ** — $p < 0.05$ относительно контроля.

случае совместного применения доксорубина и пластомитина этот эффект в значительной степени подавляется.

Следует отметить также, что данный эффект, полученный нами на модели гомогената ткани сердца крысы, хорошо согласуется с данными других авторов, показывающих эффективное действие пластомитина как перехватчика короткоживущих АФК [7].

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Е.В. Щербаченко за помощь в эксперименте.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследование выполнялось в соответствии с директивой 2010/63/еу Европейского парламента и совета Европейского союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях, и принципами национального стандарта ГОСТ Р 53434-2009.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. R. Bolli, *Cardiovasc. Drugs Ther.*, **5**, 249 (1991)
2. V. P. Skulachev, V. N. Anisimov, Y. N. Antonenko, et al., *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics*, **1787** (5), 437 (2009).
3. В. Л. Лакомкин и В. И. Капелько, *Кардиология*, **49** (10), 55 (2009).
4. M. A. Mitry and J. G. Edwards, *IJC Heart & Vasculture*, **10**, 17 (2016).
5. H. Nohl, L. Gille, and K. Staniek, *Zeitschrift Fur Naturforschung. C*, **53** (3–4), 279 (1998).
6. P. K. Singal, N. Iliscovic, T. Li, et al., *FASEB J.*, **11** (12), 931 (1997).
7. А. А. Абрамов, В. Л. Лакомкин, А. В. Просвирнин и др., *Кардиология*, **59** (6), 35 (2019).
8. C. L. Hawkins and M. J. Davies, *Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects*, **1840** (2), 708 (2014).
9. S. I. Dikalov, Y. F. Polienko, and I. Kirilyuk, *Antioxidants & Redox Signaling*, **28** (15), 1433 (2018).

EPR Study of the Generation of Short-Lived Reactive Oxygen Species in Rat Heart Homogenate

A.A. Timoshin*, V.L. Lakomkin*, A.A. Abramov*, and E.K. Ruuge*, **

*Chazov National Medical Research Centre for Cardiology of the 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

The aim of the present study was to investigate the protective effects of a mitochondrial-targeted antioxidant such as plastomitin through ROS hypergeneration in animals. The average rate of the generation of highly reactive oxygen radicals during oxidative stress, induced by doxorubicin injection in rats and a protective impact of plastomitin use were investigated. The experiments were carried out with rat heart tissue homogenates using EPR spectroscopy. It was found that in case of doxorubicin injection in rats, there is a significant 26% increase in the rate of short-lived reactive oxygen species generation in the homogenate but when doxorubicin and plastomitin were used in combination, this effect was greatly suppressed.

Keywords: reactive oxygen species, antioxidant, hydroxylamine, doxorubicin, plastomitin, spin trap, electron paramagnetic resonance