

Вещество, продлевающее молодость: производное растительного антиоксиданта, адресованное в митохондрии (SkQ).

Результаты одного из "мегапроектов" МГУ

В.П. Скулачев^{1,2*}, В.Н. Анисимов³, Ю.Н. Антоненко¹,
Л.Е. Бакеева¹, Ю.М. Васильев^{1,8}, М.В. Высоких¹, В.П. Еричев⁴,
Д.Б. Зоров¹, Н.И. Калинина⁵, В.И. Капелько⁶, Н.Г. Колосова⁷,
Б.П. Копнин⁸, Г.А. Коршунова¹, М.Р. Личиницер⁸, Л.А. Обухова⁹,
Е.Г. Пасюкова¹⁰, О.И. Писаренко⁶, В.А. Рогинский¹¹, Э.К. Рууге⁶,
И.И. Сенин¹, И.И. Северина¹², М.В. Скулачев¹³, И.М. Спивак¹⁴,
И.Н. Ташлицкий¹⁵, В.А. Ткачук^{5,6}, О.Ф. Филенко¹²,
Б.В. Черняк¹, Л.С. Ягужинский¹

¹ НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ;

² Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ;

³ Институт Онкологии им. Н.Н. Петрова, Санкт-Петербург;

⁴ Институт глазных болезней РАМН, Москва;

⁵ Факультет фундаментальной медицины МГУ;

⁶ Кардиологический научный центр РАМН, Москва;

⁷ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск;

⁸ Онкологический научный центр им. Н.М. Блохина, РАМН, Москва;

⁹ Новосибирский Государственный Университет;

¹⁰ Институт молекулярной генетики РАН, Москва;

¹¹ Институт химической физики РАН, Москва;

¹² Биологический факультет МГУ;

¹³ Центр Митоинженерии МГУ;

¹⁴ Институт цитологии РАН, Санкт Петербург;

¹⁵ Химический факультет МГУ;

Аннотация

Исследована возможность применения антиоксидантов, адресованных в митохондрии, для замедления старения организмов. С этой целью Московским университетом был организован проект с участием нескольких исследовательских групп из Института физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, других подразделений МГУ, нескольких Российских исследовательских центров, а так же двух групп в Швеции и США. В данной статье суммированы первые результаты работ по проекту. Был синтезирован новый класс соединений (SkQ) состоящих из

пластохинона (растительный антиоксидант), проникающего катиона и соединяющего их деканового (или пентанового) линкера. В экспериментах с искусственными бислойными липидными мембранами (БЛМ) были отобраны варианты SkQ с наилучшей проникающей способностью: пластохинонил-децил-трифенилфосфоний (SkQ1), пластохинонил-децил-родамин 19 (SkQR1) и метилпластохинонил-децил-трифенилфосфоний (SkQ3). Анти- и прооксидантные свойства этих соединений, а так же убихинонил-децил-трифенилфосфония (MitoQ) были исследованы в водных растворах, мицеллах жирных кислот, липосомах, БЛМ, изолированных митохондриях и культурах клеток. Обнаружилось, что микромолярные концентрации катионных производных хинонов обладают прооксидантным действием на митохондрии. Однако при значительно более низких концентрациях они проявляют мощную антиоксидантную активность, которая возрастает в ряду MitoQ < SkQ3 < SkQ1 = SkQR1. Показано также, что SkQ1 восстанавливался в центре i комплекса III дыхательной цепи и благодаря этому функционирует как возобновляемый антиоксидант. В наномолярных концентрациях SkQ1 специфически предотвращает окисление кардиолипина в мембране митохондрий. В культурах клеток SkQR1 (флуоресцирующий вариант SkQ) окрашивает лишь один тип внутриклеточных органелл, а именно митохондрии. Чрезвычайно низкие концентрации SkQ1 и SkQR1 предотвращают самоубийство клеток (апоптоз), вызванное перекисью водорода (опыты на человеческих фибробластах и раковых клетках HeLa). При более высоких концентрациях SkQ блокируют некроз, вызванный активными формами кислорода (АФК). В экспериментах с мицеллиевым грибом *Podospira anserina*, ракообразным *Ceriodaphnia affinis*, плодовой мушкой *Drosophila melanogaster* и мышами было показано, что SkQ1 увеличивает продолжительность жизни, особенно эффективно снижая смертность на ранних и средних стадиях старения. У млекопитающих замедление старения под действием SkQ сопровождается подавлением развития таких возрастных изменений и заболеваний как катаракта, ретинопатия, глаукома, облысение, остеопороз, инволюция тимуса, гипотермия, перекисное окисление липидов и белков и т.д. Наблюдается выраженное терапевтическое действие SkQ1 при целом ряде развившихся ретинопатий. Использование глазных капель, содержащих 250 нМ SkQ1, позволило восстановить зрение у 67 из 89 животных (собак, кошек и лошадей) ослепших в результате развития ретинопатий. Те же капли предотвращают развитие слепоты и восстанавливают зрение ослепших животных при экспериментальном увеите у кроликов. Положительный эффект получен при лечении экспериментальной глаукомы (кролики). Кроме того, показано, что SkQ1 подавляет развитие аритмии, вызванное H_2O_2 или ишемией в изолированном сердце крысы. Введение крысам SkQ сокращает зоны поражения при инфаркте миокарда и инсульте, а также предотвращает гибель крыс при инфаркте почки. У мышей, мутантных по белку p53, SkQ1 в дозе 5 нмол/кг в день снижает уровень АФК в тканях и тормозит развитие лимфом, т.е. обладает качественно таким же эффектом, как традиционный антиоксидант N-ацетилцистеин (NAC), но в случае NAC его приходится давать в миллион раз больше, чем в случае SkQ1. Таким образом, SkQ представляются чрезвычайно перспективными препаратами для продления молодости и лечения старения, а также связанных с ним заболеваний.

Ключевые слова: $\Delta\psi$, трансмембранная разность электрических потенциалов; АФК, активные формы кислорода; БЛМ, бислойная плоская фосфолипидная мембрана; DCF, 5-(-6) хлорметил-2,7-дихлордигидрофлуоресцеиндиацетат; C12TPP, додецилтрифенилфосфоний; MitoQ, 10-(6'-убихинонил) децилтрифенилфосфоний; NAC, N-ацетилцистеин; SkQ, катионные производные пластохинона или метилпластохинона; SkQ1, 10-(6'-пластохинонил) децилтрифенилфосфоний; SkQR1, 10-(6'-пластохинонил) децилродамин 19.

1 Предисловие

Виктор Антонович Садовничий стоял у самых истоков этого проекта. Им было предложено сделать его межфакультетским, а затем привлечь другие исследовательские коллективы, не связанные с МГУ, у нас в стране и за рубежом. Виктор Антонович провел первое собрание участников проекта и предложил создать специальный регулярный семинар, посвященный обсуждению текущей работы. С его легкой руки такой семинар собирается уже более трех лет по четвергам раз в две недели. Виктор Антонович взял на себя «математическое обеспечение» проекта, а возглавляемая им группа молодых математиков с мехмата уже получила первые интересные результаты. Он возглавил Наблюдательный совет проекта. Само существование этого совета, в который вошли деканы четырех ведущих факультетов МГУ, резко подняло престиж нового начинания и явилось гарантом его «непотопляемости». Виктор Антонович неоднократно выступал в поддержку проекта в печати и на самых широких форумах. Его ценнейшие советы как по существу дела, так и по оптимизации управления проектом сыграли огромную позитивную роль. Вот почему мы, авторы этой статьи, счастливы посвятить ее юбилею Виктора Антоновича Садовничего. Мы надеемся, что наш «мегапроект» сможет стать еще одной иллюстрацией «мегадел» этого замечательного человека – талантливого ученого и великого организатора образования и науки в России.

2 Введение: гипотеза о геропротекторном действии митохондриально-адресованных антиоксидантов

Свободно-радикальная гипотеза, предложенная Харманом полвека тому назад [1], остается наиболее популярной концепцией механизма старения. Харман предположил, что кислородные радикалы, образующиеся в клетках живых существ, окисляют их биополимеры, играя тем самым ведущую роль в ослаблении жизненных функций организма с возрастом. В подтверждение этой гипотезы было установлено, что при старении действительно заметно повышается степень окисленности ДНК, белков и липидов. Что же является основным источником АФК, участвующих в процессах старения? В клетке имеется целый ряд ферментов, которые превращают O_2 в первичные формы АФК, а именно в супероксид-анион (O_2^-) и пероксид водорода (H_2O_2). Наибольшая продукция АФК происходит при участии дыхательной цепи митохондрий. Митохондрии в теле взрослого человека потребляют ежедневно около 400 литров O_2 , осуществляя его четырех-электронное восстановление с образованием воды. Если всего лишь 0.1% этого количества O_2 будет восстановлено более простым одно-электронным способом, то это приведет к образованию 0,4 литров O_2^- , что многократно превышает возможности всех остальных АФК-образующих систем вместе взятых.

В дыхательной цепи основная масса O_2^- образуется в комплексах I и III. Наивысший уровень генерации наблюдается при т. наз. обратном переносе электронов от $CoQH_2$ на NAD^+ в комплексе I при максимальных значениях мембранного потенциала. Скорость генерации достигает 1 нмол O_2^- /мин на мг белка, что примерно в пять раз выше чем уровень образования O_2^- в комплексе III в тех же условиях. Эта величина составляет 10 % от скорости дыхания в отсутствие субстратов фосфорилирования в таком количестве O_2^- чрезвычайно опасен, если учесть, что он способен превращаться в радикалы $OH\bullet$, $HO_2\bullet$ и $ONOO^-$, обладающие очень высокой токсичностью. Таким образом, в наших митохондриях находится генератор сильнейших ядов, способных убить не только

одиночную клетку, но и весь организм. Такая катастрофа может произойти не только благодаря прямому токсическому действию АФК, но и как следствие их способности запускать программы апоптоза или некроза [2].

Недавно Ламберт и др. [3] показали, что продолжительность жизни различных видов животных и птиц оказывается тем больше, чем меньше скорость образования H_2O_2 в митохондриях сердца в условиях обратного переноса электронов комплексом I (были исследованы 12 видов чрезвычайно далеких по систематическому положению: от мыши до коровы и бабуина, от перепела до голубя). Эти наблюдения подтвердили более ранние результаты, полученные на меньшем числе видов теплокровных (ниже мы обсудим одно интересное исключение из этого правила). Основываясь на этих данных можно предположить, что, защитив клетки от АФК, можно остановить или хотя бы затормозить старение. Однако литература, посвященная действию антиоксидантов на старение чрезвычайно противоречива: от утверждения Эймса и коллег [4] о том, что лекарство против старости уже найдено, до заключений о полной бесплодности этих подходов и, следовательно, ошибочности гипотезы Хармана.

Мы полагаем, что у исследований эффекта антиоксидантов при старении есть очень существенные недостатки. Во-первых, если необходимо нейтрализовать АФК, которые образуются в митохондриях, то и антиоксиданты должны быть направлены именно в эти органеллы. Традиционные антиоксиданты накапливаются в различных компартментах и мембранах клетки, где могут давать нежелательные побочные эффекты. Во-вторых, используемые антиоксиданты, как правило, являются природными соединениями и их избыток может эффективно уничтожаться клеточными системами, призванными поддерживать АФК на уровне необходимом для реализации программы старения. Так, при использовании витамина Е в качестве пищевой добавки, в печени происходит индукция цитохрома P450, который специфически уничтожает избыток витамина. Наконец, идеальный антиоксидант с геропротекторной функцией должен убирать не все АФК, а лишь их избыток, возникающий в митохондриях при обратном переносе электронов в дыхательной цепи стареющего организма.

Создание митохондриально-направленных антиоксидантов основано на открытии, сделанном нами совместно с группой Е.А. Либермана еще в 1969-1970 [5]–[9], [10]. В этих работах были описаны, т. наз. проникающие ионы, т.е. гидрофобные соединения способные эффективно проникать через мембрану митохондрий несмотря на наличие ионизованного атома в их молекуле. Типичным представителем таких ионов служит алкилтрифенилфосфоний, где положительный заряд на атоме фосфора экранирован тремя гидрофобными фенильными остатками. Внутреннее пространство митохондрий – это единственный отсек в клетке, заряженный отрицательно относительно цитозоля, так что, попадая в клетку, проникающие катионы будут избирательно накапливаться именно в митохондриях. Это накопление согласно уравнению Нернста составляет 10-кратный градиент на каждые 60 мВ мембранного потенциала (для однозарядных ионов). Учитывая, что мембранный потенциал митохондрий составляет приблизительно 180 мВ, концентрация проникающего катиона в митохондриальном матриксе будет в 1000 раз выше, чем в цитозоле.

Эти соображения привели нас к предположению о том, что проникающие катионы могут быть использованы как «молекулы-электровозы», способствуя накоплению в митохондриях незаряженных веществ, соединенных с катионами [10]. Такую мысль

мы применили для объяснения роли катионных групп карнитина в транспорте остатков жирных кислот в митохондриях [10]. Благодаря электрофоретическому накоплению во внутреннем монослое внутренней мембраны митохондрий жирные ацилы карнитина могут служить как антиоксидантами, прерывая цепные реакции перекисного окисления липидов и реакции окисления белков в данной области мембраны. Это предположение было подтверждено в опытах, которые провели Ю.А. Антоненко и А.А. Пашковская в нашей группе. Они показали, что пальмитоилкарнитин предотвращает инактивацию грамицидина в БЛМ, вызванную АФК (не опубликовано).

На границе двух столетий принцип «молекулы-электровоза» был успешно использован М.П. Мерфи для доставки в митохондрии антиоксидантов тиобутила [11], витамина Е [12] и убихинона [13]. Наиболее перспективным оказался убихинон, соединенный с децилтрифенилфосфоем (т. наз. MitoQ). MitoQ, по-видимому, имеет преимущество перед пальмитоилкарнитином или катионным производным витамина Е, так как его окисленная форма, возникающая при реакции с АФК, может быть восстановлена дыхательной цепью. Таким образом, MitoQ оказывается возобновляемым антиоксидантом [14]. Эксперименты Мерфи и его группы ясно показали, что MitoQ действительно накапливается в митохондриях, восстанавливается в них и защищает как митохондрии, так и клетки от окислительного стресса [12]–[18].

В наших исследованиях мы подтвердили данные Мерфи и др., но обнаружили, что антиоксидантное действие MitoQ сменяется на прооксидантное при сравнительно небольшом повышении концентрации [19] (другие наблюдения относительно прооксидантного действия MitoQ см. [20, 21]). Так например, в митохондриях сердца крысы значения $C_{1/2}$ для антиоксидантного и прооксидантного действия MitoQ оказались равны соответственно 0,3 и 0,5 мкМ. Эти наблюдения означают, что применение MitoQ как антиоксиданта на практике может быть сопряжено с большим риском. Вот почему мы решили начать поиск митохондриально-направленных антиоксидантов более эффективных, чем MitoQ и с более широким терапевтическим окном между анти- и прооксидантными эффектами.

3 SkQ: синтез и исследования in vitro

Проект, направленный на применение проникающих ионов в медицинской, практике стартовал в 2003 году. Первоначально он был поддержан грантами благотворительного фонда «Паритет» (в настоящее время «Вольное дело»), созданным О.В. Дерипаской. О.В. Дерипаска окончил физический факультет МГУ, а в настоящее время является одним из наиболее состоятельных российских бизнесменов. Он член Попечительского совета МГУ и оказывает большую помощь своей Alma Mater. В начале 2003 г. я поделился с ним своим планом создания «суперантиоксиданта» способного останавливать старение. Я не обещал личного бессмертия основателю фонда, но отметил, что даже если мы не победим старость, то, по крайней мере, сможем вылечить заусенцы. Олег Владимирович загорелся идеей о том, что старение является вредным атавизмом и может быть отменено. Деньги на исследования были выделены.

Разрабатывая новые антиоксиданты, мы обратили внимание на пластохинон, переносчик электронов, который присутствует в электрон-транспортной цепи хлоропластов растений и цианобактерий. Эволюция растений привела к тому, что убихинон, который используется в дыхательной цепи митохондрий (в том числе и растительных), был заменен на пластохинон. Возможно, это связано с лучшими антиоксидантными свойствами пластохинона, которые подтверждаются химическими экспериментами в модельных системах. Действительно, хлоропласты, образующие кислород, находятся в условиях

гораздо более сильного окислительного стресса, чем митохондрии, которые кислород потребляют. Мы синтезировали соединение, где пластохинон был соединен с децилтрифенилфосфонием. Это новое соединение было названо SkQ1, где Sk обозначает проникающий катион («Скулачев-ион» по терминологии, введенной Дэвидом Грином [22]), а Q обозначает пластохинон. Если в случае MitoQ различие между анти- и прооксидантными концентрациями составляло менее двух (300 и 500 нМ), то для SkQ1 это отношение было повышено до 32 (25 и 800 нМ) [19] (см. ниже Рис. 1Д).

Эти результаты показали, что созданный нами митохондриально-адресованный антиоксидант чрезвычайно эффективен и не имеет опасного прооксидантного действия при концентрациях, необходимых для практического применения. В связи с этим я предложил О.В. Дерипаске организовать инвестиционный проект, направленный на создание нового типа лекарств и биотехнологических продуктов на основе SkQ. Это предложение было немедленно принято, и весной 2005 г. инвестиционный проект стартовал. Была основана компания «Митотехнология» с учредителями в лице «РАИнКо» (компания О.В. Дерипаски) и МГУ. В МГУ был создан Наблюдательный совет во главе с ректором, академиком В.А. Садовничим. Большую помощь в выборе оптимальной стратегии организации работ нам оказала консультационная компания «Иконтри» (генеральный директор В.В. Перехватов). Была разработана уникальная компьютерная программа управления проектом.

Вскоре проект вышел далеко за пределы Института им. А.Н. Белозерского МГУ, где были проведены начальные этапы работы. В настоящее время в проекте участвуют группы из факультетов биоинженерии и биоинформатики, биологии, химии, физики, механики и математики, фундаментальной медицины МГУ, институты Российской Академии Наук: Биоорганической химии, Молекулярной генетики, Биологии развития (все Москва), Онкологии и Цитологии (Санкт-Петербург), Цитологии и Генетики (Новосибирск), Онкологический центр, Кардиологический центр, Институт глазных болезней им. Гельмгольца, Институт полиомиелита, Ветеринарная академия им. Скрябина (Москва), Venner-Gren Institute (Стокгольм, Швеция); Johnson Medical Institute (Принстон, США).

Ряд катионных производных хинонов были синтезированы нашими химиками Г.А. Коршуновой, Н.В. Сумбатян и Л.С. Ягужинским в поисках наилучшего антиоксиданта. В большинстве случаев в качестве хинона были использованы пластохинон (SkQ1, SkQ2M, SkQ4, SkQ5, SkQR1) или метилпластохинон (SkQ3). Катионную часть составили производные алкил-трифенилфосфония с децилом (SkQ1, SkQ3; SkQ4) или амиллом (SkQ5) в качестве алкильного остатка. В некоторых случаях вместо фосфония были использованы метилкарнитин (SkQ2M), трибутиламмоний (SkQ4) или родамин-19 (SkQR1). Кроме того, мы синтезировали додецилтрифенилфосфоний (C12TRP), где пластохинон был заменен на две метиленовые группы [19].

Новые соединения были, прежде всего, протестированы на способность проникать через модельные мембраны. В опытах с БЛМ и толстыми липидными мембранами было показано, что SkQR1, SkQ1, SkQ3, и MitoQ обладают высокой проникающей способностью (Рис. 1Б). SkQ2M, SkQ4, и SkQ5 проникали через мембраны значительно хуже [19]. Прямые измерения переноса катионов из одного полумембранного слоя БЛМ в другой показали, что скорость переноса падает в ряду SkQR1 > SkQ1 > SkQ3 > MitoQ [23]. Основываясь на полученных данных, в большинстве дальнейших исследований были использованы SkQR1 и SkQ1.

В различных модельных системах, таких как водные растворы, мицеллы, липосомы и плоские мембраны, были исследованы анти- и прооксидантные свойства большинства катионных производных хинонов. С использованием хемилюминисцентной системы [24]

было показано, что в водных растворах SkQ1 значительно более эффективно реагирует с $\text{OH}\bullet$, чем MitoQ. В то же время, SkQ1 медленнее самоокислялся и его прооксидантная активность, измеренная по скорости восстановления O_2 до O_2^- , была значительно ниже, чем в случае MitoQ (Рис.1Б,В). Антиоксидантную активность этих соединений изучали также в смешанных мицеллах детергента и жирной кислоты. Измерения константы скорости реакции между пероксильным радикалом жирной кислоты и хинолом показали, что SkQ1 реагирует в 4 раза быстрее, чем MitoQ. В модельных липидных мембранах (липосомах) SkQ1 существенно замедлял образование конечных продуктов перекисного окисления липидов и в частности малонового диальдегида (МДА). В тех же условиях SkQ1 предотвращал окислительное разрушение липидов, измеренное с помощью специфического зонда C11-BODIPY(581/591) [24].

Для изучения повреждающего действия АФК на мембранные белки был разработан новый метод, где в качестве мишени использовался пептидный каналоформер грамицидин Д встроенный в БЛМ [25]. АФК, атакуя триптофановые остатки в этом пептиде, инактивируют его каналную активность. SkQ1 эффективно защищал грамицидин от инактивации, вызванной фотодинамическим воздействием или при химической генерации радикалов $\text{OH}\bullet$ [19, 24].

Эксперименты с использованием ион-селективного электрода показали, что SkQ1 эффективно накапливается в изолированных митохондриях. Добавление разобщителя, рассеивающего $\Delta\psi$, вызывало частичный выход SkQ1 во внешнюю среду, что доказывает электрофоретический механизм накопления этого соединения. SkQ1 восстанавливался дыхательной цепью митохондрий, причем донорами электрона могли служить как NAD-зависимые субстраты, так и сукцинат. По-видимому, SkQ1 восстанавливается эндогенным CoQH_2 , связанным в центре i комплекса III. Окисление SkQ1H2 может происходить как энзиматически (с помощью комплекса III), так и неэнзиматически (липидными радикалами или O_2). Суммарная скорость окисления SkQ1 была ниже, чем скорость его восстановления дыхательной цепью, а значит, в дышащих митохондриях SkQ1 находится в основном в восстановленной форме, обладающей антиоксидантной активностью [19].

Каково же соотношение анти- и прооксидантных эффектов SkQ1 и подобных соединений в митохондриях? Антиоксидантную активность мы определяли, измеряя накопление МДА, вызванное Fe^{2+} и аскорбатом в митохондриях сердца. Прооксидантное действие оценивали по стимуляции продукции H_2O_2 в митохондриях, окисляющих глутамат и малат в состоянии 4. Из рис. 1Д видно, что антиоксидантная активность SkQ1 проявлялась в значительно более низких концентрациях, чем для MitoQ. В то же время прооксидантная активность SkQ1 наблюдалась при несколько более высоких концентрациях, чем в случае MitoQ. В результате окно для чистого антиоксидантного действия, не связанного с прооксидантным эффектом, оказывается значительно больше для SkQ1, чем для MitoQ. SkQR1 был столь же активен, как SkQ1. Децилпластохинон, лишенный катионной части, был даже менее активен, чем MitoQ, а C12TPP, в котором отсутствовал остаток хинона, был неактивен при использованных концентрациях [19].

Дальнейший анализ показал, что в условиях образования радикалов $\text{OH}\bullet$ в митохондриях сердца в первую очередь окисляется кардиолипид. Этот эффект удавалось практически полностью предотвратить с помощью 100 нМ SkQ1 (Рис. 1Ж, 3). Это наблюдение требует особого внимания, поскольку окисление кардиолипидов является ключевым событием в развитии окислительного стресса в митохондриях. Во-первых, он наиболее чувствителен к перекисному окислению, вызванному АФК. Другими словами, его окисление может служить «запалом» для цепных реакций окисления других мембранных компонентов. Во-вторых, кардиолипид служит якорем для цитохрома c в ми-

тохондриальной мембране, а окисленный кардиолипин не выполняет эту функцию [26]. Освобождаясь в межмембранное пространство, цитохром с приобретает кардиолипинпероксидазную активность и вызывает дальнейшее окисление кардиолипина [27]. В-третьих, потеря кардиолипина ведет к инактивации комплексов дыхательной цепи, H^+ -АТФ-синтазы, АТФ/АТФ-антипортера и т.д., а также вызывает повышение проницаемости митохондриальной мембраны. В результате падает мембранный потенциал, набухает матрикс, разрушается внешняя мембрана митохондрий и в цитоплазму выходит цитохром с и другие белки межмембранного пространства. Таким образом инициируется апоптоз [26]. Не удивительно, что предотвращение окисления кардиолипина с помощью SkQ1 вызывает сильный защитный эффект в условиях, когда окислительный стресс индуцирует апоптоз или некроз (см. ниже).

В экспериментах на изолированных митохондриях было обнаружено, что гидрофобные катионы (SkQ1, SkQ3, MitoQ и C12TPP) проявляют разобщающую активность. В концентрациях 5×10^{-7} – 5×10^{-6} М они стимулируют дыхание в состоянии 4 и (в несколько больших концентрациях) снижают $\Delta\psi$. Механизм разобщения связан с увеличением специфической проводимости мембраны митохондрий для H^+ , возникающей при участии свободных жирных кислот. Разобщающая активность SkQ может вносить вклад в их антиоксидантное действие. В том случае, если АФК образуются в центре комплекса III дыхательной цепи на внешней поверхности мембраны, они (в отличие от тех, что продуцируются комплексом I внутри митохондрий) не могут реагировать с SkQ1, который сконцентрирован во внутреннем полумембранном слое. Однако генерация АФК в комплексе III резко падает даже при небольшом снижении $\Delta\psi$ («мягкое разобщение»). Можно предполагать, что разобщающее действие гидрофобных катионов сходно с мягким разобщением при участии разобщающих белков (UCP), а также АТФ/АДФ антипортера, которые также опосредованы действием жирных кислот [28, 29].

В этой связи необходимо упомянуть другую возможную функцию минорных UCP (UCP2, 3 и тд), постулированную Ф.Гольей и одним из нас (ВПС) [30]. Мы предположили, что эти белки облегчают транслокацию перекиси жирных кислот из внутреннего во внешний полумембранный слой внутренней мембраны митохондрий, где происходит их дальнейшее превращение под действием цитохрома с и некоторых других ферментов. Таким способом, митохондриальная ДНК и другие внутримитохондриальные системы могут быть защищены в условиях, когда АФК образуются комплексом I. В нашей группе было обнаружено, что пероксиды жирных кислот обладают гораздо меньшей разобщающей активностью по сравнению с обычными жирными кислотами, вероятно благодаря меньшей проникающей способности их протонированных форм. Это предположение объясняет, почему пероксиды жирных кислот не могут образовывать протонофорный цикл хотя их анионные формы могут переноситься UCP. Если SkQ и C12TPP способны к переносу анионов пероксидов жирных кислот, это может приводить к необратимому выбрасыванию таких анионов из митохондрий.

Исследования были продолжены на клетках в культуре. Было показано, что SkQR1, флуоресцирующее производное SkQ, селективно накапливается в митохондриях клеток. Так, в клетках HeLa (карцинома шейки матки человека) распределение флуоресценции SkQR1 совпадает с локализацией флуоресцентного белка (YFP), имеющего митохондриальный адрес, а также с окраской митотрекером зеленым. Накопление SkQR1 в митохондриях клетки происходит в течение примерно 1 ч, а дальнейшая инкубация в отсутствие SkQR1 приводит к его медленному выходу из клетки ($t_{1/2} = 2,5$ ч). Разобщитель FCCP предотвращает накопление SkQR1 в клетках и ускоряет его выход после отмывки клеток от вещества [19].

Далее мы исследовали защитное действие производных SkQ при апоптозе и некро-

зе, вызванных АФК. Эксперименты показали, что инкубация фибробластов человека с SkQ1 или SkQR1 в чрезвычайно низких концентрациях в течение семи дней защищает клетки от апоптоза, индуцированного небольшими количествами H_2O_2 (этот протокол соответствует описанному ранее для MitoQ [17]). Апоптоз фибробластов человека, вызванный 400 мкМ H_2O_2 , полностью предотвращался 0,2 нМ SkQ1. SkQR1 был еще более эффективен, а MitoQ значительно менее эффективен, чем SkQ1 (Рис. 2А). Рассеивание $\Delta\psi$ с помощью разобщителя FCCP предотвращало защитное действие SkQ1 в столь низких концентрациях. SkQ1 блокировал развитие основных этапов апоптоза, вызванного H_2O_2 : транслокацию проапоптозного белка BAX в митохондрии и выход цитохрома с из митохондрий в цитозоль. Ни децилпластохинон, ни C12TPP в наномолярных концентрациях не вызывали подобного защитного эффекта [19]. Токсическое действие SkQ1 проявлялось при микромолярных концентрациях и усиливалось в присутствии малых концентраций H_2O_2 , которые без SkQ1 были нетоксичны (не показано). Это эффект, возможно, связан с прооксидантным действием SkQ1 в микромолярных концентрациях.

В данной связи надо отметить, что впервые защитное действие катионных антиоксидантов при окислительном стрессе в культуре клеток было описано Мерфи и сотр. на фибробластах, взятых у больных атаксией Фридриха [18]. Это заболевание связано с нарушением продукции митохондриального белка фратаксина, что приводит к повышению содержания ионов железа в матриксе и, как следствие, к окислительному стрессу. Такие фибробласты выживают в культуре лишь в присутствии антиоксидантов, например, децилбихинона ($C_{1/2} = 3 \times 10^{-8}$ М). Эффективность действия MitoQ была намного выше ($C_{1/2} = 5 \times 10^{-10}$ М; для сравнения SkQ1 в наших опытах защищал нормальные фибробласты от апоптоза вызванного H_2O_2 с $C_{1/2} = 8 \times 10^{-12}$ М).

Добавка небольшого количества H_2O_2 к клеткам HeLa вызывала увеличение продукции эндогенных АФК. Этот феномен, описанный ранее одним из нас (ДБЗ) как «АФК-зависимая продукция АФК» [31], полностью блокировалось 20 нМ SkQ1 [19]. Одним из следствий развития окислительного стресса, вызванного H_2O_2 , явилось снижение уровня восстановленного глутатиона. SkQ1 предотвращал окисление глутатиона [19].

Инкубация клеток с SkQ1 или SkQR1 в чрезвычайно низких концентрациях предотвращала вызванную перекисью водорода фрагментацию митохондриальных филаментов с образованием мелких округлых митохондрий (подобный переход «нить-зерно» характерен для ранних стадий апоптоза [32]). Защитное действие катионных хинонов проявлялось уже через 2 ч предынкубации фибробластов и эффективность их действия возрастала в ряду: MitoQ < SkQ1 < SkQR1. Заметный эффект SkQR1 наблюдался уже при концентрации, равной 2×10^{-13} М. При повышении концентрации антиоксидантов до 3×10^{-8} М MitoQ, 4×10^{-8} М SkQR1 или 1×10^{-7} М SkQ1 их защитное действие исчезало. C12TPP оказался неэффективен (Рис. 2Б).

В отсутствие H_2O_2 низкие концентрации SkQ1 стимулировали образование митохондриальной сети (Рис. 2 В-Ж). Локальное повреждение этой сети с помощью тонкого лазерного луча приводило к коллапсу $\Delta\psi$ во всем митохондриальном ретикулуме. В тех же условиях, но в отсутствие SkQ1, локальное повреждение вызывало снижение $\Delta\psi$ лишь в небольшой части митохондриальной популяции клетки [19]. Можно полагать, что в культуре клеток снижение уровня эндогенных АФК под действием SkQ1 приводит к слиянию большинства митохондрий в единую электрическую сеть [32].

В следующей серии экспериментов было показано, что 1 мкМ SkQ1 эффективно защищает клетки HeLa от некроза, вызванного АФК, которые образуются под действием света. В качестве фотосенсибилизатора был использован адресованный в митохон-

дрии флуоресцентный краситель митотрекер красный. Полумаксимальный защитный эффект достигался примерно при 200 нМ SkQ1. В тех же условиях смесь 1 мкМ ТРР и 1 мкМ децилпластохинона не давала защитного эффекта, а N-ацетилцистеин и тролокс оказывали защитное действие лишь при значительно более высоких концентрациях (соответственно 20 мМ и 1 мМ).

Эффективность чрезвычайно низких концентраций SkQ1 и SkQR1 в качестве антиоксидантов и антиапоптозных агентов в культурах клеток объясняется, по-видимому, сочетанием двух факторов. Во-первых, коэффициент распределения этих веществ в системе с гидрофобной и водной фазами очень велик. Так, для SkQ1 он составляет 13000:1 в системе октан/вода. Во-вторых, накопление катионов происходит благодаря разности электрических потенциалов ($\Delta\psi$) на внешней мембране клетки (около 60 мВ, что соответствует 10-кратному накоплению) и на мембране митохондрий (около 180 мВ, что соответствует 1000-кратному накоплению). Суммируя эти факторы, мы получим коэффициент накопления SkQ1 равный $13000 \times 1000 \times 10 = 1,3 \times 10^8$. Это означает, что при концентрации SkQ1 в среде равной 1×10^{-12} М, его концентрация во внутреннем полумембранном слое внутренней мембраны митохондрий составит $1 \times 10^{-12} \times 1,3 \times 10^8 = 1,3 \times 10^{-4}$ М [33].

Эксперименты в модельных системах выявили ряд преимуществ, которые SkQ как антиоксидант имеет перед MitoQ. Особенно сильно эти преимущества проявились в опытах на изолированных митохондриях и клетках в культуре. Это связано с тем, что ряд факторов определяющих преимущество SkQ, усиливают друг друга. К таким факторам относятся:

- (1) В водных растворах SkQ реагирует с ОН \cdot в несколько раз быстрее, чем MitoQ.
- (2) В водных растворах SkQ1H2 окисляется O_2 с образованием $O_2^{\cdot-}$ в три раза медленнее, чем MitoQ.
- (3) SkQ1 ингибирует перекисное окисление жирных кислот в мицеллах в четыре раза сильнее, чем MitoQ.
- (4) В БЛМ SkQ1 защищает грамицидин от атаки АФК в концентрации в три раза более низкой, чем MitoQ.
- (5) Сродство митохондриального кардиолипина к SkQ1 в два раза выше, чем для MitoQ.
- (6) SkQ1 в три раза более гидрофобное соединение, чем MitoQ.
- (7) SkQR1 и SkQ1 пересекают липидный бислой соответственно в десять и в два раза быстрее, чем MitoQ.

4 SkQ оказывает благоприятные эффекты при сердечной аритмии, сердечном и почечном инфаркте и при инсульте

В дальнейших экспериментах *in vivo* было исследовано действие SkQ на некоторые возраст-зависимые патологии сердца, мозга и почек. При развитии всех исследуемых

патологий наблюдается повышенная генерация АФК. Сначала эффекты SkQ тестировались на модели изолированного сердца крысы, подвергнутого воздействию H_2O_2 или ишемии/реперфузии. Было показано, что аритмия и фибрилляция сердца были значительно менее выражены, если крысы предварительно на протяжении двух недель получали с пищей 2×10^{-11} моль SkQ1/кг в день. Если аритмия вызывалась ишемией, то благоприятные эффекты SkQ1 проявлялись в концентрациях $1 \times 10^{-10} - 5 \times 10^{-8}$ моль/кг в день. Повышение концентрации до $2,5 \times 10^{-7}$ М снижало эффективность SkQ1 (Рис. 3А). В модели инфаркта миокарда *in vivo* SkQ1 в дозе $2,5 \times 10^{-7}$ моль/кг в день на 40

В другой серии экспериментов было исследовано действие SkQ на инфаркт почки. В начале работы в качестве модельной системы была использована культура почечного эпителия. Было обнаружено, что преинкубация с SkQ1 повышает выживаемость этих клеток после 24 часовой аноксии и последующей 24 часовой реоксигенации. Оптимальная концентрация SkQ1 составляла 10-250 нМ. Также было показано, что SkQ1 предотвращает дробление митохондриального ретикулума, индуцированное аноксией/реоксигенацией [36, 37]. Далее мы исследовали распределение в почке SkQR1, после его внутривенного или внутрибрюшинного введения крысам. Спустя 60 мин после введения SkQR1 в нижнюю полую вену наблюдалась его флуоресценция в почках, причем особенно интенсивно светились почечные клубочки. После двух часов в этой области флуоресценция уменьшалась с параллельным возрастанием флуоресценции в эпителиальных клетках почечных канальцев. Через 3 дня наблюдалось дальнейшее накопление SkQR1 в эпителии и полная потеря флуоресценции в клубочках. Анализ срезов почки, взятой из крыс через 120 мин после внутрибрюшинной инъекции SkQR1, подтвердил локализацию SkQR1 в митохондриях почечных клеток.

В экспериментах на изолированной почке было показано, что 40 мин ишемии с последующей реоксигенацией стимулируют продукцию АФК, причем они имеют митохондриальное происхождение [37]. Однократная внутрибрюшинная инъекция животным SkQR1 (1 мкмоль/кг) за сутки до ишемии вызывала частичную нормализацию уровня АФК (Рис. 3В). Инъекция того же количества MitoQ (Рис. 3Г) или SkQ1 не оказывала статистически значимого эффекта. Были измерены биохимические последствия нарушения функции почек в результате ишемии/реперфузии. Эти опыты были проведены на животных, имеющих единственную почку (другая была удалена перед ишемией). Такая модель, являющаяся общепринятой, была выбрана для обеспечения большей нагрузки на функцию почек. Было обнаружено явное терапевтическое действие SkQR1, выражавшееся в нормализации функционального состояния почки. В частности, снижались диурез и концентрация креатинина в крови, повышенные после ишемии/реперфузии, восстанавливалась нарушенная реабсорбция Ca^{2+} [34]. Эти наблюдения указывали на то, что SkQR1 по крайней мере частично защищает почечную ткань от повреждения, вызванного ишемией/реперфузией. Ишемия единственной оставшейся почки, с последующей реоксигенацией, приводила к гибели большей части крыс за первые 6 дней после процедуры. Предварительная инъекция SkQR1 или SkQ1 до ишемии практически полностью предотвращала гибель экспериментальных животных (Рис. 3Д). Крысы оставались в живых более полугода после ишемии [34].

Для моделирования ишемии головного мозга мы использовали компрессионную модель инсульта, вызванного приложением давления на определенные отделы мозга. Эта модель имитирует ситуацию в мозгу, когда вытекающая кровь освобождается в мозг в результате геморрагического инсульта, вызывая сдавливание жизненно важных областей мозга и, как следствие, ишемию. Анализ серийных (100 мкм) срезов мозга выявил тяжелое повреждение ткани, которое могло быть уменьшено внутрибрюшинным введением SkQR1 (0,5–1 мкмоль/кг) за 1 день до компрессионной ишемии (Рис. 3Е).

SkQ1 (0,5 мкмоль/кг) не был способен заменить по действию SkQR1. Можно предположить, что SkQR1, обладающий более высокой проникающей способностью, гораздо эффективней накапливается в головной мозг по сравнению с SkQ1. Терапевтический эффект SkQR1 на нейрональные клетки головного мозга мог быть связан с блокированием АФК-зависимого апоптоза под действием этого антиоксиданта. Было показано, что SkQR1 защищает первичную культуру кортикальных нейронов от апоптоза, вызванного H_2O_2 . Оптимальная концентрация SkQR1 составляла 100 нМ [34].

5 SkQ1 подавляет развитие опухолей

Наряду с участием в процессах старения, АФК, как известно, играют важную роль в развитии опухолей (обзор см. [38]). Накопление окислительных повреждений с возрастом по крайней мере отчасти определяет повышение вероятности раковых заболеваний. Известно, что умеренное накопление АФК, не приводящее к гибели клетки, вызывает окисление ДНК и развитие генетической нестабильности. Накопление онкогенных мутаций в протоонкогенах, генах раковых супрессоров и некоторых других генах вызывает неопластическую трансформацию и усиливает прогрессию опухолей. Кроме того, повышение уровня АФК, которые играют роль вторичных мессенджеров во многих сигнальных путях, воздействует на клеточную пролиферацию, миграцию и выживаемость клеток, а так же на ангиогенез. Известно, что снижение уровня АФК с помощью антиоксидантов (НАС и некоторых других) существенно замедляет развитие опухолей [39]–[41].

В этой части работы мы исследовали действие митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 на развитие опухолей. Для этой цели мы использовали два подхода: анализ действия SkQ1 на спонтанное развитие опухолей (профилактический эффект) и действие на прогрессию уже сформированных опухолей (терапевтический эффект) [42]. В первом случае мы использовали мышей с гомозиготным нокаутом гена $p53$, для которых характерен повышенный уровень АФК и предрасположенность к спонтанному развитию различных неопластических новообразований, начиная с 3-х месячного возраста. При этом преобладающим типом опухолей являются Т- и В-клеточные лимфомы (70-90%). Добавка в питьевую воду 5 нмоль SkQ1/кг в день вызывала уменьшение внутриклеточного уровня АФК в тканях (в частности, в клетках селезенки) и замедляла развитие опухолей, а продолжительность жизни мышей увеличивалась приблизительно на 30-40% (Рис. 4А). Пятидесятипроцентная смертность у $p53^{-/-}$ мышей, не получавших и получавших SkQ1, наступала соответственно на 180-й или 250-й день. Влияние SkQ1 на раннюю смертность было особенно демонстративно. На 185-й день, около 60% $p53^{-/-}$ мышей без SkQ1 погибало, в то время, как ни одно животное не умерло в группе, получавшей SkQ1. Такое действие крайне низких доз SkQ1 (5 нмоль/кг в день) было сравнимо с эффектом гораздо более высоких (более чем в миллион раз!) доз антиоксиданта НАС (6 ммоль/кг в день), обнаруженным в наших предыдущих исследованиях и подтвержденных в эксперименте, показанном на Рис. 4А. Более низкие (0,5 нмоль/кг в день) и более высокие (50 нмоль/кг в день) дозы SkQ1 были менее эффективны.

Далее мы исследовали рост ксенографтов опухолей человека с различным статусом опухолевого супрессора $p53$ в иммунодефицитных бестимусных мышах. Дисфункция $p53$ представляет собой наиболее универсальное молекулярное изменение в различных опухолях человека. Во всех сублиниях НСТ116 с нарушенной экспрессией или функцией $p53$ наблюдалось некоторое повышение уровня АФК по сравнению с исходной линией клеток НСТ116, продуцирующих $p53$ дикого типа. Добавление в рацион 5 нмоль SkQ1/кг в день вызывало выраженное и статистически значимое угнетение роста опу-

холей НСТ116/p53^{-/-} (Рис. 4Б). Эффект SkQ1 на рост опухолей, содержащих нормальную или мутантные формы белка p53, не был статистически значимым. Возможно, это связано с повышенной активностью системы множественной лекарственной устойчивости, способной откачивать из клеток различные химиопрепараты. Эксперименты с SkQR1 подтвердили, что он в меньшей степени накапливается в клетках с мутантным p53, чем в клетках p53^{-/-} [42].

Кроме того, мы обнаружили, что продолжительность жизни получающих SkQ1 иммунодефицитных мышей с опухолями увеличивалась по сравнению с контрольными животными, не получающими SkQ1 даже в тех случаях, когда обработка SkQ1 практически не меняла скорость роста опухолевых ксенографтов. Например, применение 50 нмоль SkQ1/кг в день не ингибировало увеличение объема ксенографтов карциномы шейки матки человека SiHa, но значительно отсрочивало гибель таких животных (Рис.4В).

Как было обнаружено ранее нашей группой, антиоксидант NAC тормозит рост ксенографтов НСТ116, главным образом, путем ингибирования опухолевого ангиогенеза [43]. SkQ1 также ингибирует ангиогенез *in vivo* на моделях подкожных имплантатов матригеля. При внутрибрюшинной инъекции SkQ1 значительно уменьшал как насыщенность имплантатов сосудами, так и содержание мелких сосудов в матригеле [42]. Рост сосудов в опухоли зависит от инвазии эндотелиальных клеток или их предшественников и дальнейшего развития кровеносных сосудов - процесса, строго контролируемого транскрипционным фактором HIF-1 α , который активируется (стабилизируется) в условиях гипоксии [44]. Недавно было продемонстрировано, что стабилизация HIF-1 α опосредована митохондриальными АФК [45]. Эти результаты хорошо согласуются с нашими наблюдениями о том, что SkQ1 задерживает созревание сосудов *in vivo* [42].

Механизмы подавления опухолевого роста под действием SkQ1 мы изучали на клеточных культурах *in vitro*. Было обнаружено, что SkQ1 (5-50 нМ в течение 5-7 дней) тормозит скорость пролиферации клеток НСТ116/p53^{-/-} в культуре. Похожий эффект наблюдался и на других тестируемых культурах, в частности, на клетках SiHa [42].

В клетках НСТ116/p53^{-/-} организация нормального эпителиального цитоскелета в значительной степени нарушена. Инкубация этих клеток с SkQ1 вызывала восстановление нормальных эпителиальных характеристик (Рис.4Г, Д). Актиновый цитоскелет становился более организованным с более выраженными периферическими пучками и концентрированием в зоне межклеточных контактов. Иммунофлуоресцентное окрашивание на Е-кадгерин выявило протяженные Е-кадгерин-позитивные межклеточные контакты, увеличивалось общее количество Е-кадгерина (Рис.4Д). В результате обработанные SkQ1 клетки формировали типичные эпителиальные островки, отсутствующие в контрольной культуре. Сходные результаты были получены и на других линиях рака шейки матки человека (CaSki, SiHa, C4I, HeLa). Морфология нетрансформированных кератиноцитов линии HaCaT под действием SkQ1 менялась лишь незначительно.

Действие SkQ1 на трансформированные фибробласты изучали на линии мышинных фибробластов 10(3) с делецией p53. Эти клетки можно считать минимально трансформированными. Они не вызывают опухолей и сохраняют основные морфологические свойства нормальных фибробластов. При трансформации онкогеном N-RasAsp13 клетки существенно изменяли форму, разрушались актиновые стресс-фибриллы и соответствующие винкулин-позитивных фокальные контакты, что сопровождалось значительным уменьшением площади клеток. Действие Ras, по-видимому, связано с инактивацией Rho-ROCK-LIMK-киназного сигнального пути, ответственного за фосфорилирование кофилина и образование стресс-фибрилл [46]. Недавно мы показали, что увеличение уровня АФК является определяющим для Ras- индуцируемой модуляции активности ко-

филина, который отвечает за реорганизацию актинового цитоскелета и всей клеточной архитектуры [39]. Инкубация Ras-трансформированных клеток с SkQ1 вызывала повышение степени фосфорилирования кофилина, восстановление стресс-фибрилл и фокальных контактов, а также увеличение площади, занимаемой клетками на подложке (Рис. 4Д). Похожую фенотипическую реверсию под действием SkQ1 мы наблюдали у человеческих фибробластов, трансформированных вирусом SV40 (линия MRC5-V2) [42]. Можно полагать, что морфологическая нормализация опухолевых клеток под действием SkQ1 вносит свой вклад в его антираковое действие.

Завершая этот раздел, надо подчеркнуть, что SkQ не проявляет какой-либо канцерогенной активности. Более того, SkQ1 обладает антираковым действием, по крайней мере в случае опухолей дефицитных по p53, что типично для многих онкологических заболеваний человека. Мы показали, что SkQ1 подавляет спонтанное развитие опухолей у p53^{-/-} мышей и тормозит рост клеток рака человека HCT116/p53^{-/-} в бестимусных мышцах. Эти данные указывают на то, что АФК-зависимый апоптоз, который специфически подавляется под действием SkQ, не участвует в защите организма от рака. Более того, митохондриальные АФК имеют канцерогенную активность, так что их нейтрализация с помощью SkQ1 снижает вероятность появления опухолей.

6 Лечение заболеваний глаз с помощью SkQ. SkQ1 возвращает зрение ослепшим животным

Известно, что сетчатка глаза является одной из тканей, подверженных наибольшему риску повреждения под действием АФК. Во-первых, она содержит значительное количество полиненасыщенных жирных кислот, которые являются основной мишенью для окисления под действием АФК; во-вторых, она подвергается действию света, который вызывает образование такой АФК, как синглетный кислород; в-третьих, содержание кислорода в сетчатке близко к артериальному, т. е. значительно превышает этот показатель в большинстве других тканей, и это притом, что сетчатка относится к наиболее интенсивно дышащим тканям. Существуют многочисленные указания на ведущую роль АФК в развитие основных заболеваний глаз, связанных с возрастом. Это относится к различным ретинопатиям (таким как макулодистрофия), пигментный ретинит (retinitis pigmentosa), наследственная зрительная нейропатия, а так же глаукома, катаракта и аутоиммунный увеит. Основной мишенью повреждающего действия АФК служат остатки полиненасыщенных жирных кислот, прежде всего в митохондриальном кардиолипине. Эти наблюдения привлекли наше внимание к заболеваниям глаз как к возможной области терапевтического применения SkQ [47].

В качестве модели для изучения антиоксидантного действия SkQ *in vivo* мы использовали крыс линии OXYS, для которых характерен постоянный окислительный стресс. Развитие катаракты и ретинопатии у этих крыс проявляется уже в возрасте 3 мес. [48, 49]. В первой серии экспериментов было показано, что уровень перекисного окисления липидов (определяемый по накоплению малонового диальдегида) и окисления (карбонилирования) белков в скелетных мышцах крыс линии OXYS увеличивается с возрастом гораздо быстрее, чем у крыс линии Вистар. Добавление в рацион экспериментальных животных SkQ1 (50 нмоль/кг в день) приводило к снижению уровня окисления липидов и белков. Связанная с окислительным стрессом прогерия крыс OXYS приводила к остеопорозу и снижению минерализации позвоночника и костей конечностей по сравнению с крысами линии Вистар. Добавление в рацион экспериментальных животных SkQ1 повышало уровень минерализации костей крыс OXYS [47]. Эти дан-

ные указывают на возможность предотвращения некоторых последствий окислительного стресса у крыс линии OXYS. В той же линии крыс было показано, что кормление SkQ1 предотвращает возраст-зависимое подавление иммунной системы, а именно инволюцию тимуса и уменьшение области первичных фолликулов в селезенке (Обухова и др., в печати).

Далее были предприняты попытки лечения с помощью SkQ1 болезней глаз у крыс линии OXYS. Эксперименты показали, что добавка SkQ1 в рацион экспериментальных животных полностью предотвращает развитие катаракты и ретинопатии у крыс линии OXYS вплоть до возраста двух лет (Рис. 5А-В). Превентивное действие SkQ1 на ретинопатию у крыс линии OXYS в возрасте 24 мес. было подтверждено гистологическими исследованиями срезов сетчатки (Рис. 5Г-Е). Видно, что у крыс линии OXYS, не получавших SkQ1, фоторецепторный слой практически отсутствует, тогда как у крыс, получавших SkQ1, он сохраняется. У крыс линии Вистар в старости фоторецепторный слой сохраняется и в отсутствие SkQ1. Эти результаты хорошо согласуются с потерей электрофизиологического ответа сетчатки у большинства двухлетних крыс линии OXYS без SkQ1 и его сохранением у представителей линий OXYS с SkQ1 (рис. 5В), а также Вистар. Витамин Е был гораздо менее эффективен, чем SkQ1. Кормление крыс 500 мкмоль витамина Е /кг в день (т.е. в концентрации в 10 000 раз более высокой, чем SkQ1) оказывало гораздо менее выраженное терапевтическое действие на катаракту и ретинопатию по сравнению с SkQ1. Стоит отметить, что, в отличие от витамина Е, эффекты SkQ1 не сопровождались какой-либо индукцией цитохрома р450 в печени [47].

Введение глазных капель с наномолярными концентрациями SkQ1 в значительной степени обращало развитие патологий у крыс линии OXYS среднего возраста (Рис. 5Ж,З). Этот эффект наблюдался также на крысах линии Вистар, страдающих катарактой. Следует отметить, что у животных в возрасте свыше 24 мес. SkQ1 не обращал развитие катаракты и ретинопатии, хотя по-прежнему эффективно предотвращал развитие этих заболеваний. Лечение ранее развившейся ретинопатии с помощью капель с SkQ1 было подтверждено данными электронной микроскопии. Было показано, что ретинопатия у крыс линии OXYS в возрасте 11 мес. приводит к облитерации хориокапилляров. Этот параметр, по крайней мере частично, восстанавливался после введения капель с 250 нМ SkQ1 (одна капля в день) в течение полутора месяцев. Восстанавливались и некоторые другие морфологические характеристики, в частности, распределение липофусциновых гранул в клетках пигментного эпителия сетчатки и целостность мембраны Бруха (исчезновение выпячиваний, возникающих при разрывах) [47].

Терапевтическое действие SkQ1 может исчезать при чрезмерном повышении его концентрации. Глазные капли с 10 нМ–1 мкМ SkQ1 оказывали лечебный эффект на развитие катаракты и ретинопатии у крыс OXYS, но капли с 5 мкМ SkQ1 были неэффективны. Исчезновение терапевтического эффекта SkQ1 при высоких концентрациях может быть связано с его прооксидантным действием (см. выше), которое проявляется в крысах линии OXYS, страдающих от окислительного стресса.

В другой серии экспериментов, был исследован увеит, который вызывали иммунизацией кроликов специфическим белком фоторецепторов аррестином, что приводило к слепоте. Было показано, что развитие увеита может быть предотвращено при введении глазных капель с SkQ1 (250 нМ SkQ1, четыре капли в день).

Экспериментальная глаукома также исследовалась на кроликах. Заболевание вызывали серией инъекций препарата Целофталь в передний сектор глаза. В результате возникали типичные признаки глаукомы. Анализ фотографий, сделанных фундус-камерой, выявил экскавацию диска зрительного нерва. Все эти параметры нормализовались, если одновременно с индуктором глаукомы вносили глазные капли 5 мкМ SkQ1.

При повышении концентрации SkQ1 (25 мкМ) эффективность капель снижалась.

В заключение мы предприняли попытку использовать SkQ1 в ветеринарной практике для лечения заболеваний глаз в тех случаях, когда традиционные методы не давали эффекта. В целом ежедневное лечение глазными каплями с 250 нМ SkQ1 получали 135 животных (собак, кошек и лошадей) с различными формами ретинопатии. В 89 случае животные были полностью слепы до начала лечения. Лечение привело к восстановлению зрения у 67 из них (Табл. 1). Не было зарегистрировано ни одного случая, когда SkQ1 вызвал бы нежелательные эффекты или его лечебное действие падало бы процессе лечения.

Электроретинограммы собаки, чье зрение было восстановлено в результате инстилляций капель 250 нМ SkQ1, показаны на Рис. 5И. Эта собака ослепла в результате развития наследственной дисплазии сетчатки. Как видно из рисунка, до лечения SkQ1 не отмечалось практически никакого электрофизиологического ответа сетчатки на свет. Через 27 дней лечения каплями с SkQ1 зрительная функция частично восстановилась, и появился заметный электрофизиологический ответ. Еще более выраженный ответ был зарегистрирован спустя 42 дня лечения, и это сопровождалось дальнейшим улучшением зрения [47].

Среди собак, кошек и лошадей, страдающих ретинопатией, некоторые имели наследственную дисплазию (дегенерацию) сетчатки, прогрессирующую дегенерацию сетчатки или вторичную дегенерацию сетчатки. Наилучшие результаты лечения SkQ1 дало в случае наследственной дисплазии (положительный эффект в 67% случаев) и при вторичной дегенерации (54% случаев). В случае прогрессирующей дегенерации положительный эффект SkQ1 проявился в 29% случаев. Кроме того, SkQ1 оказался эффективен в ряде случаев синдрома сухого глаза, при лечении увеита и некоторых других аутоиммунных заболеваний глаз, конъюнктивита и определенных заболеваний роговицы (Табл. 2). SkQ1 был неэффективен при лечении нейроофтальмологических заболеваний.

Следует отметить, что попытка лечения врожденных ретинопатий у мышей антиоксидантом, адресованным в митохондрии, была предпринята ранее Райтом и сотрудниками [50]. Авторы, использовавшие для этой цели MitoQ, получили отрицательный результат. Причиной тому мог бы быть малый размер «окна» между анти- и прооксидантными концентрациями MitoQ [19].

7 SkQ1 продлевает жизнь и замедляет старение

В заключительной серии опытов мы исследовали возможность замедления старения различных организмов под действием SkQ1. Мы начали с короткоживущих видов, в частности мицелиев гриба *Podospora anserina*, ракообразного *Ceriodaphnia affinis* и насекомого *Drosophila melanogaster* [51].

В последнее десятилетие гриб *P. anserina* стал объектом интереснейших экспериментов по регуляции продолжительности жизни. В частности, было обнаружено, что продолжительность жизни этого короткоживущего организма может значительно меняться при воздействии на митохондрии внутри клетки. При этом важную роль играли не только функциональное состояние этих органелл, но и их морфология [52, 53]. Основываясь на этих данных, мы начали геронтологическую часть проекта с экспериментов на *P. anserina*. Как показано на Рис. 6А, добавка 100 нМ SkQ1 в среду роста повышает продолжительность жизни *P. anserina*. При этом, SkQ1 был особенно эффективен на ранних этапах старения гриба. Так, к 21 дню культивации в контроле умерло 70% культур, тогда как в присутствии SkQ1 эта величина составила лишь 25%. Медианная продолжительность жизни увеличилась под действием SkQ1 на 50%. Действие SkQ1 со-

проводилось замедлением развития таких характерных признаков старения мицелия, как появление коричневой окраски и исчезновение выростов в воздушную фазу [51].

Ракообразное *Ceriodaphnia affinis* служит удобным объектом для изучения биологии продолжительности жизни, так как жизненный цикл взрослой особи не превышает 15–20 дней, а их культивация в лабораторных условиях не представляет проблемы. Еще одно преимущество этого организма состоит в том, что действующую концентрацию SkQ1 в этом случае легко определить, так как животное может жить в водном растворе испытуемого вещества. В то же время, недостатком данного организма является генетическая гетерогенность его популяции. Как видно из Рис. 6Б, SkQ1 в концентрации 5,5 нМ и 0,55 нМ повышал продолжительность жизни *C. affinis*, а в концентрации 55 нМ вызывал обратный эффект. При оптимальной концентрации SkQ1 (0,55 нМ) медианная продолжительность жизни *C. affinis* увеличивалась вдвое [51].

D. melanogaster представляет собой удобную модель для геронтологических исследований благодаря возможности использования линий с хорошо охарактеризованным генотипом, в том числе мутантных. Важно также, что у мух продолжительность жизни гораздо короче, чем у позвоночных. Наши эксперименты показали, что SkQ1 увеличивает продолжительность жизни дрозоды, хотя эффект был не так велик, как в случае *C. affinis*. Добавление в пищу SkQ1 (три капли 20 пМ раствора в неделю) было эффективно как для самок, так и для самцов. Максимальный эффект SkQ1 наблюдался при концентрациях от 20 пМ (или 2×10^{-11} М) до 20 нМ.

На Рис. 7А–В показано, что 20 пМ SkQ1 увеличивает продолжительность жизни как самок, так и самцов дрозоды. Различия кривых без SkQ1 и с SkQ1 были достоверны ($p < 0,0001$). Детальный анализ действия SkQ1 на самок показал, что его эффективность значительно выше на ранних этапах старения. Как видно из Рис. 7А,Б, смертность в первые 10 дней жизни практически полностью предотвращается под действием SkQ1. Смертность за первые 20 дней жизни уменьшается на 30%. При увеличении возраста защитное действие SkQ1 снижается еще сильнее. Смесь ТРР и РQ, двух составляющих компонентов SkQ1 была совершенно неэффективна (по крайней мере, при столь низких концентрациях, в которых был эффективен SkQ1).

На Рис. 7В–Е суммированы данные экспериментов, в которых воздействие SkQ1 ограничивалось отдельными периодами жизни или захватывало весь жизненный цикл. Видно, что если SkQ1 вносился лишь в течение первой недели жизни мух, то характеристика смертности не отличалась от той, что была определена при внесении SkQ1 в течение всей жизни и обе они достоверно отличались от контрольной ($p = 0.0004$ и $p < 0.0001$). Подобное кратковременное воздействие SkQ1 было неэффективным, если начиналось на 30-ый день жизни. Однако, если, начиная с 30-го дня, мухи получали SkQ1 постоянно, то кривая выживания достоверно отличалась от контрольной ($p = 0.0025$).

Соединение C12ТРР, содержащее две дополнительные метиленовые группы вместо остатка пластохинона, при концентрации 20 пМ увеличивало продолжительность жизни *D. melanogaster*. Однако наблюдалась существенная разница в действии SkQ1 и C12ТРР. SkQ1, как уже отмечалось, в основном был эффективен для молодых мух, а C12ТРР на ранних сроках был практически неэффективен, но замедлял старение на поздних этапах. В результате кривые выживаемости в присутствии C12ТРР практически совпадали с контрольными кривыми в течение первых 20 дней и с кривыми, полученными в присутствии SkQ1, в последние 40 дней (Рис. 7Е). Как было недавно показано в нашей группе (см. выше), гидрофобные катионы (такие, как SkQ и C12ТРР) могут облегчать перенос анионов жирных кислот через мембрану митохондрий, способствуя тем самым разобщению окислительного фосфорилирования под действием этих кислот. В свою очередь, это должно приводить к уменьшению продукции АФК как в комплексе I, так и в

комплексе III дыхательной цепи.

Данные, представленные на Рис. 7Ж-И, иллюстрируют действие SkQ1 на ультраструктуру митохондрий летательной мышцы *D. melanogaster* различного возраста. В согласии с данными Уокера и др. [54], старение мух сопровождается появлением органелл с сильно измененной структурой (многослойные мембраны в них напоминают структуру миелина), получивших название «митохондриальных вихрей» [54]. Подобные структуры отсутствуют у очень молодых мух (1,5 дня), но появляются уже на 10-ый день жизни. «Митохондриальные вихри» обычно включены в цепи митохондрий, расположенные между пучками актомиозиновых волокон. У мух, получавших SkQ1, измененных митохондрий очень немного даже к 65-му дню (Рис. 7Ж-И).

Надо отметить, что идея использовать митохондриально-направленные антиоксиданты в качестве геропротекторов была предложена одновременно Мерфи и др. [55] и одним из нас (ВПС) [56]. Мерфи предпринял попытку продлить жизнь *D. melanogaster*, но у дикого штамма мух эффект не наблюдался. MitoQ оказался эффективен лишь на самках мух короткоживущей мутантной линии с дефектом в митохондриальной супероксиддисмутазе, для которых были характерны некоторые признаки прогерии [57]. Мы также испытали действие MitoQ и обнаружили некоторый геропротекторный эффект на диком типе мух. Проблема состояла в том, что это действие проявлялось лишь на ранних сроках. Средняя и медианная продолжительность жизни мух при этом возрастали очень мало, так что эффект становился достоверен лишь на очень больших выборках. Возможно, для такого пост-митотического организма, как муха, средняя продолжительность жизни не является достаточно чувствительной характеристикой при испытании геропротекторов. В наших экспериментах геропротекторный эффект SkQ1 был выражен значительно сильнее, если анализировалось повреждение митохондрий в летательных мышцах [51].

Для выяснения действия SkQ на продолжительность жизни аутбредных мышей было поставлено два эксперимента. Первый был начат в декабре 2004 г, а второй в июне 2005 г. В каждом опыте были взяты четыре группы самок (по 25 животных в группе): одна контрольная (не получала SkQ1) и три другие, получавшие с питьевой водой 0,5, 5 и 50 нмолей SkQ1/кг в день. Результаты этих двух экспериментов суммированы на Рис. 8А. Видно, что все использованные дозы SkQ1 существенно увеличивали продолжительность жизни мышей. Оптимальной оказалась средняя доза (5 нмолей SkQ1/кг в день). Как и в описанных ранее опытах с грибами и беспозвоночными, эффект был наиболее сильно выражен на ранних и средних этапах старения, а максимальная продолжительность жизни увеличивалась лишь в малой степени (ректангулизация кривых выживания). Важно отметить, что медианная продолжительность жизни удваивалась под действием оптимальной дозы SkQ1. Такой значительный сдвиг кривой выживания вправо для млекопитающих наблюдается крайне редко. К 300-му дню более 50% мышей в контрольной группе умерли, тогда как в группе, получавшей 5 нмолей SkQ1/кг в день, почти все животные были живы [51].

Анализ причин смерти мышей показал, что SkQ1 продлевает их жизнь в основном благодаря снижению уровня смертности от болезней, не относящихся к онкологической группе (рис. 8Б). Большинство заболеваний носило инфекционный характер (пневмония, гепатит, нефрит, колит и т. п.), что явилось следствием жизни мышей в нестерильных условиях. Можно предполагать, что SkQ1 частично предотвращал угасание функции иммунной системы с возрастом (о предотвращении инволюции тимуса и селезенки у крыс OXYs под действием SkQ1, см. выше). Предотвращение угасания иммунной системы оказалось далеко не единственным проявлением геропротекторного действия SkQ1 у грызунов. В частности, мы нашли, что у мышей SkQ1 предотвращает

нарушения эстрального цикла, нарастающие с возрастом (Рис. 8В). На Рис. 8Г представлены фотографии двух самок мышей в возрасте 630 дней, одна из которых получала минимальную дозу SkQ1 (0,5 нмоль/кг в день), а другая нет. Совершенно очевидно, что состояние мыши, не получавшей SkQ1 значительно хуже. Она потеряла вибриссы и имеет выраженные признаки облысения и горбатости (кифоза). Контрольные мыши в последние недели жизни впадали в ступор и имели пониженную температуру тела. Все эти признаки старения отсутствовали у мышей, получавших SkQ1. Надо отметить, что потребление пищи и воды, а так же вес тела не отличались сколько-нибудь заметно у мышей во всех экспериментальных группах, так что эффект SkQ1 нельзя было объяснить снижением калорийности питания.

В последней серии экспериментов изучались фибробласты, полученные из хвостов мышей различного возраста. Было показано, что спонтанный апоптоз фибробластов старых мышей, не получавших SkQ1, происходит в 3 раза чаще, чем у фибробластов из молодых мышей. Эти различия исчезали, если мыши получали SkQ1 в дозах 0,5, 5 и 50 нмоль SkQ1/кг в день. Фибробласты, полученные из старых мышей с SkQ1, сохраняли способность инициировать апоптоз в ответ на воздействие H_2O_2 , но эффект был менее выражен, чем у фибробластов из контрольных мышей того же возраста (Рис. 8Д). Было показано также, что воздействие SkQ1 *in vivo* предотвращало развитие у фибробластов таких типичных признаков клеточного старения, как появление β -галактозидазной активности и фосфорилированного гистона H2AX (Рис.8Е,Ж).

8 Обсуждение результатов

Эксперименты в модельных системах *in vitro*, на выделенных митохондриях и живых клетках подтвердили предположение, что катионные соединения на основе пластохинона (SkQ) обладают значительно более выраженными антиоксидантными свойствами по сравнению с производным на основе убихинона (MitoQ) [19]. Особенно важно, что интервал концентраций, разделяющий анти- и прооксидантные эффекты SkQ, оказался гораздо больше, чем в случае MitoQ. Эксперименты на крысах *in vivo* показали, что SkQ значительно снижает область повреждения сердца после инфаркта и мозга после инсульта, предотвращает гибель крыс после инфаркта почки [34]. SkQ1 и NAC увеличивают продолжительность жизни $p53^{-/-}$ мышей, причем SkQ1 действует в концентрациях в 106 раз меньших, чем NAC [42]. В экспериментах на крысах, собаках, кошках и лошадях показано, что глазные капли на основе SkQ1 способны оказывать благоприятные эффекты при ретинопатиях, катаракте, глаукоме и увеите [47]. Нано- и даже пикомолярные концентрации SkQ1 достоверно увеличивали продолжительность жизни мицелиев грибов *P. anserina*, ракообразных *C. affinis*, насекомых *D. melanogaster* и мышей [51]. В последнем случае 5 нмоль SkQ/кг в день удваивал медиану продолжительности жизни животных. При этом исчезали или развивались с большой задержкой различные признаки старения, в том числе нарушения эстрального цикла, облысение, возрастное снижение температуры тела, кататония, искривление позвоночника и остеопороз. Не происходило возраст-зависимого угнетения функций иммунной системы. Кроме того, предварительные эксперименты показали, что SkQ1 способствует сохранению сексуальной мотивации самцов, долговременной памяти, ускоряет заживление ран и нормализует кровяное давление (Колосова и др., в печати). SkQ1 предотвращает поседение черных мышей, характерное для прогерии, вызванной рентгеновским облучением (А. Рязанов, неопубл.). На биохимическом уровне было показано, что SkQ1 предотвращает такие возраст-зависимые процессы, как увеличение перекисного окисления липидов и белков, апоптоза, появления β -галактозидазной активности и фосфорилирования

гистона H2AX [51].

Геропротекторное действие SkQ1 можно рассматривать в рамках альтернативных концепций, постулирующих, что старение есть результат либо накопления случайных повреждений, либо осуществления особой генетически детерминированной программы медленного самоубийства организма (обзоры см. [58]–[62]). В первом случае SkQ1 просто «очищает самое грязное место в клетке», убирая АФК из внутреннего пространства митохондрий, где они (АФК) вызывают ключевые возрастные повреждения [56]. В рамках второй концепции предполагается, что SkQ1 предотвращает выполнение программы старения, которая медленно убивает организм с помощью АФК, чье содержание в митохондриях повышается с возрастом в результате осуществления программы. В настоящее время мы не можем сделать окончательный выбор между этими двумя возможностями. Однако существует ряд косвенных, но независимых указаний в пользу концепции запрограммированного старения.

В экспериментах с *D. melanogaster* мы показали, что воздействие SkQ1 в первую неделю жизни дает такой же геропротекторный эффект, как и воздействие в течение всей жизни (Рис. 7). Этот результат хорошо согласуется с данными о том, что (а) двухдневное ограничение калорийности продлевает жизнь плодовой мушки столь же эффективно, как и голодание в течение всей жизни [63], и (б) один лишь запах пищи снижает эффект ограничения калорийности на продолжительность жизни *D. melanogaster* [64]. Эти наблюдения значительно проще объяснить, если допустить возможность перенастройки «онтогенетических часов», вместо того, чтобы предполагать уменьшение накопления АФК-зависимых (или любых иных) случайных повреждений под действием SkQ1 или ограничения калорийности на протяжении всей жизни. В этой связи можно предположить, что работа контролирующих старение «онтогенетических часов» зависит от митохондриальных АФК. Мишенью для геропротекторного действия SkQ1 в таком случае могут служить митохондрии клеток, образующих «часы», или любых клеток необходимых для передачи сигнала, поступающего от «часов» в ткани.

Известно, что повреждения, вызываемые АФК, накапливаются в особенно значительных количествах в позднем возрасте. В таком случае, казалось бы, эффективность действия SkQ1 должна была бы возрастать к концу жизни. Однако, в наших экспериментах наблюдалась противоположная закономерность. SkQ1 эффективно предотвращал возрастную смертность на ранних и средних этапах старения и лишь в небольшой степени увеличивал максимальную продолжительность жизни (Рис. 6-8). Эти наблюдения хорошо согласуются с гипотезой о том, что программа старения служит механизмом для ускорения эволюции. Предполагается, что старение необходимо для облегчения отбора небольших, но полезных изменений, которые не важны для молодого, сильного организма, но становятся существенными, когда функциональные возможности с возрастом снижаются [2, 58, 59]. Очень старые организмы составляют лишь малую часть популяции и имеют сниженный репродуктивный потенциал, так что их вклад в эволюционный процесс весьма ограничен. Это означает, что программа старения становится ненужной для таких организмов и потому не участвует в процессе их дальнейшего старения.

В рамках концепции старения как механизма ускорения эволюции становится ясно, почему многие жизненно важные функции организма с возрастом ослабевают. Это означает, что эволюция всех этих функций может быть ускорена благодаря старению. Именно поэтому старческие изменения сразу многих систем ведут к смерти организма. Что касается нестареющих организмов, то они, как правило, умирают по какой-то одной причине и на протяжении всей жизни сохраняют большинство физиологических функций неизменными.

В 2007 г Ламберт и др. [3] обнаружили, что продолжительность жизни млекопитаю-

щих и птиц тем больше, чем ниже скорость образования H_2O_2 в их сердечных митохондриях при обратном переносе электронов от сукцината через комплекс I. Голый землекоп, долгоживущий африканский грызун, оказался единственным исключением из этого правила. Это существо размером с мышь знаменито тем, что имеет продолжительность жизни около 28 лет при том, что мышь живет 2,5–4 года. Многие заболевания, такие как рак, атеросклероз, иммунодефициты у этих животных не обнаружены. Живут землекопы большими сообществами, состоящими из 200–300 «солдат», одной-единственной «царицы» и нескольких ее партнеров. Только «царица» и ее «мужья» принимают участие в размножении. Они живут в центре обширного подземного лабиринта и, будучи надежно защищены своими «солдатами», не имеют врагов. В лабораторных условиях голые землекопы умирают в возрасте 25–28 лет по неизвестным причинам. Уровень их смертности не зависит от возраста [65] так, как будто программа старения у этих животных отсутствует. Отключение программы происходит, по-видимому, на этапах, следующих за образованием АФК, так как уровень образования АФК при обратном переносе электронов [3] и степень окисленности биополимеров [66, 67] у этих животных выше, чем у мышей. Приведенные наблюдения не удивительны, если учесть, что активности супероксиддисмутазы и каталазы у этих двух видов одного порядка величины, а активность третьего антиоксидантного фермента, глутатионпероксидазы у голого землекопа в 70 раз ниже, чем у мыши [68]. Ключ к пониманию этой парадоксальной ситуации дает наблюдение, показавшее, что клетки голого землекопа чрезвычайно устойчивы к апоптозу, вызванному H_2O_2 [69]. В этой связи, голый землекоп напоминает долгоживущих мышей с мутациями в генах, кодирующих белок p66shc [70], фермент, участвующий в синтезе CoQ (mClk1) [71], или киназу фактора элонгации-2 (Рязанов и др., в печати). Их клетки так же резистентны к апоптозу, вызванному пероксидом водорода или другим прооксидантом, менадионам.

Возможный механизм исчезновения функции, ставшей ненужной в процессе эволюции голого землекопа, был недавно описан Парк и др. [72]. Было установлено, что у этих грызунов отсутствует небольшой 11-членный пептид, который называется субстанцией Р и участвует у других животных в передаче некоторых видов болевых сигналов (в частности, болевого ответа на капсаицин). Капсаицин, как и некоторые другие индукторы боли, не вызывает поведенческого ответа на боль у голого землекопа. Чувствительность к капсаицину можно восстановить, если ввести ДНК, кодирующую субстанцию Р, в ногу животного. Такая процедура не сказывается на чувствительности к боли других ног. Вполне возможно, что «царица» голых землекопов и ее «мужья» в природе не сталкиваются с внешними источниками боли. В таком случае мутация, нарушающая процесс передачи сигнала от болевых рецепторов кожи, будет нейтральной и избежит элиминации в процессе естественного отбора. Аналогичным образом могла быть отключена и программа старения, которая, согласно нашей гипотезе, дает преимущество ускоренной эволюции давлению естественного отбора лишь при наличии врагов.

Важно отметить, что те концентрации SkQ1, которые повышают продолжительность жизни, предотвращают усиление апоптоза с возрастом, но не останавливают полностью АФК-зависимый апоптоз (Рис. 8Д). Благодаря этому использованные нами дозы SkQ1 не ослабляют антираковую защиту организма, для которой необходим апоптоз. Более того, мы показали, что SkQ1, как и другой антиоксидант, NAC, увеличивает продолжительность жизни линии мышей, склонных к образованию лимфом [42].

Необходимо подчеркнуть, что SkQ1 значительно снижает риск смерти от причин, не связанных с раком (Рис. 8Б). К таким причинам относятся инфекционные процессы неизбежные в условиях нестерильного вивария, где проводились наши эксперименты. Эти наблюдения позволяют предположить, что SkQ1 предотвращает такой типичный

признак старения, как ослабление иммунной защиты организма. Это ослабление связано с многочисленными факторами, включая уменьшение числа антигенпрезентирующих дендритных клеток (ДК), ослабление способности к хемотаксису и фагоцитозу у этих клеток и у нейтрофилов, нарушение стимуляции наивных CD^{4+} -Т-клеток при участии ДК, функциональные нарушения моноцитов, снижение продукции и пролиферации природных клеток-киллеров, и т.д. (обзор см. [73]). Важно, что ослабление иммунной системы является одним из наиболее ранних признаков старения и у людей начинается в возрасте 10–15 лет [74].

Одним из факторов, определяющих снижение иммунитета при старении, является возрастная инволюция тимуса, органа, производящего Т-лимфоциты. Как показали Обухова и сотрудники (в печати), прогерия у крыс OXYS сопровождается более быстрым, чем в норме, снижением массы и объема тимуса, но особенно – количества клеток в этом органе. Так, к 3,5 месяцу жизни количество клеток в правой доле тимуса крыс OXYS оказывается вдвое меньше, чем у крыс Вистар. 250 нмоль SkQ1/кг в день увеличивало это количество у OXYS в 2,5 раза, а у Вистар – всего на 25%, так что обе линии животных уравнивались по этому параметру. Аналогичный эффект SkQ1 обнаруживался при определении общей площади, занимаемой первичными лимфоидными фолликулами селезенки, где образуются В-лимфоциты.

Выше мы отметили ряд важнейших признаков старения, которые замедляются, предотвращаются, а в некоторых случаях даже обращаются под действием SkQ1. Возникает вопрос, почему же организмы, получающие SkQ1, умирают не на много позже, чем контрольные, несмотря на явное замедление программы старения. Простейший ответ может состоять в том, что SkQ1 не способен остановить ослабление с возрастом по крайней мере какой-то одной жизненно важной функции. Другая возможность связана с тем, что программа старения не работает у очень старых животных, которые умирают благодаря накоплению случайных повреждений (как уже отмечалось, очень старые организмы не представляют интереса для эволюции, поскольку они слишком малочисленны и их репродуктивная система с возрастом ослабевает). Для того, чтобы жить намного дольше, чем обычно, необходимы какие-то особые «навыки». В противном случае можно стать жертвой, например, простых, но неизбежных диспропорций в строении стареющего организма. В этой связи интересным примером служит *Podospora anserina*. Это гриб, по-видимому, имеет два жизненных сценария, один короткий (несколько недель), а другой длинный (годы). Простейшим способом переключения с короткоживущего на долгоживущий *modus vivendi* может быть перенос *P. anserina* с твердой в жидкую среду роста [75]. Сходное переключение можно наблюдать и на твердой среде при мутациях в дыхательной цепи или в системе, обеспечивающей структурную динамику митохондрий [52, 53]. Эффект SkQ1 на продолжительность жизни короткоживущих грибов был вполне достоверным, но гораздо более слабым, чем в случае переключения на сценарий долгожительства. Ответ *P. anserina* на SkQ1, как и в случае трех других исследованных видов (*C. affinis*, *D. melanogaster* и мышь), состоял в увеличении в 1,5–2 раза медианной продолжительности жизни и в ректангулизации кривой выживания. Эти соотношения можно объяснить, если SkQ1 ингибирует осуществление программы старения *P. anserina*, но не переключает жизнь гриба на *modus vivendi* долгожительства.

Нечто сходное было недавно обнаружено в группе Б. Кэннон, где в рамках нашего проекта изучалось действие SkQ1 на мышей с прогерией, полученных в лаборатории Н.-Г. Ларшона [76]. Эти так называемые «мутаторные» мыши имели мутацию D257A в редактирующем домене митохондриальной ДНК-полимеразы γ . ДНК-полимераза с этой мутацией сохраняла способность синтезировать ДНК, но не распознавала и не исправляла свои случайные ошибки, которые неизбежны при синтезе. В результате частота

мутаций в митохондриальной ДНК повышалась, что приводило к сильному уменьшению продолжительности жизни и преждевременному развитию многих признаков старения [76, 77]. Было показано, что SkQ1 предотвращает и замедляет развитие таких признаков старения, как кифоз, облысение, снижение температуры тела, кататонию, остановку эстрального цикла и т.д., а также увеличивает продолжительность жизни, но не настолько, что бы вернуть ее к нормальной величине. Вновь, как и в описанных экспериментах с нормальными мышами, животные, получавшие SkQ1, умирали без заметных признаков старения. По-видимому, основной причиной смерти «мутаторных» мышей, получавших SkQ1, были патологические изменения в эпителии толстой кишки, что типично для мышей с митохондриальными мутациями [78]. Надо отметить, что в экспериментах группы Б. Кэннон животные находились в стерильном виварии. В целом эффект SkQ1 в этих условиях был весьма схож с тем, что наблюдался в нестерильных условиях и описан в данной статье. Единственное отличие состояло в том, что среди причин смерти «мутаторных» мышей практически отсутствовали инфекции (Шабалина и др., в печати).

Таким образом, основными результатами данной работы стало создание серии высокоэффективных, адресованных в митохондрии, возобновляемых антиоксидантов, состоящих из пластохинона, деканового линкера и проникающего катиона (SkQ). Они были синтезированы и испытаны в экспериментах на модельных мембранах, изолированных митохондриях, культурах клеток, органах *ex vivo* и живых организмах. В опытах с грибами (*Podospora*), беспозвоночными (*Ceriodaphnia* и *Drosophila*), млекопитающими (мышами) SkQ1 увеличивал продолжительность жизни в концентрациях, которые были намного ниже таковых для всех известных геропротекторов. Эффект SkQ1 сопровождался ректангуляризацией кривых выживания и (у мышей) исчезновением или замедлением развития многих основных признаков старения. Предполагается, что SkQ1 способен заингибировать или даже отключить вовсе программу старения, ответственную за согласованное снижение основных физиологических функций с возрастом. Полученные результаты испытаний действия этой небольшой молекулы представляются многообещающими для разработки лекарств, продлевающих молодость.

9 Благодарности

Наша работа была поддержана компанией «Митотехнология», Московским Государственным Университетом им. М.В. Ломоносова (МГУ), Фондом «Вольное дело» (грант № 99F-06), грантами РФФИ 07-04-01545, 07-04-00335 и Министерством науки и образования РФ (грантом «Ведущие научные школы» № 5762.2008.4). Мы благодарим всех участников проекта, принявших участие в экспериментах.

Таблица 1. Терапевтический эффект инстилляций глазных капель «Ветомитин» при ретинопатиях (из Архипова и др. [47])

Вид животного	Число животных					
	до лечения			после лечения		
	слепые	частичная потеря зрения	Общее число	возвращение зрения слепым животным	улучшение зрения	зрение не улучшилось
Собаки	58	19	77	46	19	12
Кошки	27	9	36	17	5	14
Лошади	4	18	22	4	18	0
Суммарно	89	48	135	67	42	26

Таблица 2. Терапевтическое действие глазных капель «Ветомитин» (содержание SkQ1, 250 нМ) при увеите, конъюнктивите и заболеваниях роговицы (из Архипова и др. [47]).

Список литературы

- [1] Harman D., Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry // J. Gerontol. 11, 1956, 298-300.
- [2] Skulachev V.P., Mitochondrial physiology and pathology; concepts of programmed death of organelles, cells and organisms // Mol. Asp. Med. 20, 1999, 139-184.
- [3] Lambert A.J., Boysen H.M., Buckingham J.A., Yang T., Podlutzky A., Austad S.N., Kunz T.H., Buffenstein R., Brand M.D. Low rates of hydrogen peroxide production by isolated heart mitochondria associate with long maximum lifespan in vertebrate homeotherms // Aging Cell 6, 2007, 607-618.
- [4] Hagen T.M., Liu J., Lykkesfeldt J., Wehr C.M., Ingersoll R.T., Vinarsky V., Bartholomew J.C., Ames B.N., Feeding acetyl-L-carnitine and lipoic acid to old rats significantly improves metabolic function while decreasing oxidative stress // Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 2002, 1870-1875.
- [5] Liberman E.A., Topali V.P., Tsofina L.M., Jasaitis A.A., Skulachev V.P. Mechanism of coupling of oxidative phosphorylation and the membrane potential of mitochondria // Nature, 222, 1969, 1076-1078.
- [6] Grinius L.L., Jasaitis A.A., Kadziauskas Yu.L., Liberman E.A., Skulachev V.P., Topali V.P., Tsofina L.M., Vladimirova M.A., Conversion of biomembrane-produced energy into electric form. I. Submitochondrial particles. // Biochim. Biophys. Acta 216, 1970, 1-12.
- [7] Bakeeva L.E., Grinius L.L., Jasaitis A.A., Kuliene V.V., Levitsky D.O., Liberman E.A., Severina I.I., Skulachev V.P. Conversion of biomembrane-produced energy into electric form. II. Intact mitochondria // Biochim. Biophys. Acta 216, 1970, 12-21.

Вид животных	Суммарное количество	Положительный эффект	Нет изменений
Увент			
Собаки	26	23	3
Кошки	8	8	0
Лошади	19	19	0
Общее число животных	53	50	3
Конъюнктивит			
Собаки	32	32	0
Кошки	15	15	0
Лошади	5	5	0
Общее число животных	52	52	0
Заболевания роговицы			
Собаки	31	31	0

- [8] Liberman E.A., Skulachev V.P. Conversion of biomembrane-produced energy into electric form. IV. General discussion // Biochim. Biophys. Acta 216, 1970, 30-42.
- [9] Skulachev V.P. Membrane Bioenergetics // Springer-Verlag, Berlin, 1988, 442.
- [10] Северин С.Е., Скулачев В.П., Ягужинский Л.С. Возможная роль карнитина в транспорте жирных кислот через мембрану митохондрий // Биохимия 35,1970, 1250-1257.
- [11] Burns R.J., Smith R.A.J., Murphy M.P. Synthesis and characterization of thiobutyltriphenylphosphonium bromide, a novel thiol reagent targeted to the mitochondrial matrix // Arch. Biochem. Biophys. 322, 1995, 60-68.
- [12] Smith R.A., Porteous C.M., Coulter C.V., Murphy M.P. Identification of residues in dendrotoxin K responsible for its discrimination between neuronal K⁺ channels containing Kv1.1 and 1.2 alpha subunits // Eur. J. Biochem. 263,1999, 709-716.
- [13] Kelso G.F., Porteous C.M., Coulter C.V., Hughes G., Porteous W.K., Ledgerwood E.C., Smith R.A., Murphy M.P. Selective targeting of a redox-active ubiquinone to mitochondria within cells: antioxidant and antiapoptotic properties // J. Biol. Chem. 276,2001, 4588-4596.
- [14] Murphy M.P., Smith R.A. Targeting antioxidants to mitochondria by conjugation to lipophilic cations // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 47, 2007, 629-656.
- [15] James A. M., Cocheme H.M., Smith R.A., Murphy M.P. Interactions of mitochondria-targeted and untargeted ubiquinones with the mitochondrial respiratory chain and

reactive oxygen species. Implications for the use of exogenous ubiquinones as therapies and experimental tools // J. Biol. Chem. 280, 2005, 21295-21312.

- [16] Kelso G.F., Porteous C. M., Hughes G., Ledgerwood E.C., Gane A.M., Smith R.A., Murphy M.P., Prevention of mitochondrial oxidative damage using targeted antioxidants // Ann. N. Y. Acad. Sci. 959, 2002, 263-274.
- [17] Saretzki G., Murphy M.P., Zglinicki T.Von. MitoQ counteracts telomere shortening and elongates lifespan of fibroblasts under mild oxidative stress // Aging Cell 2 , 2003, 141-143.
- [18] Jauslin M.L., Meier T., Smith R.A., Murphy M.P. Mitochondria-targeted antioxidants protect Friedreich Ataxia fibroblasts from endogenous oxidative stress more effectively than untargeted antioxidants // FASEB J. 17, 2003, 1972-1974.
- [19] Антоненко Ю. Н., Аветисян А. В., Бакеева Л. Е., Васильев Ю. М., Высоких М. Ю., Домнина Л. В., Замятнин А.А., Иванова О. Ю., Изюмов Д. С., Коршунова Г. А., Лямзаев К. Г., Мунтян М.С., Непряхина О. К., Пашковская А. А., Плетюшкина О.Ю., Пустовидко А. В., Рогинский В.А., Рокицкая Т. И., Рууге Э. К., Сапрунова В. Б., Северина И. И., Симонян Р. А., Скулачев И. В., Скулачев М. В., Сумбатян Н. В., Свириева И. В., Ташлицкий В. Н., Черняк Б.В., Чертков В. А., Ягужинский Л. С., Скулачев В. П. Производное пластохинона, адресованное в митохондрии, как средство, прерывающее программу старения.1. Катионные производные пластохинона: синтез и исследование in vitro. // Биохимия (Москва) 73 , 2008, (в печати).
- [20] Malley Y.O., Fink B.D., Ross N.C., Prinszano T.E., Sivitz W.I., Reactive oxygen and targeted antioxidant administration in endothelial cell mitochondria. // J. Biol. Chem. 281, 2006, 39766-39775.
- [21] Doughan A.K., Dikalov S.I. Mitochondrial redox cycling of mitoquinone leads to superoxide production and cellular apoptosis. // Antioxid. Redox Signal 9, 2007, 1825-1836.
- [22] Green D.E. The electromechanochemical model for energy coupling in mitochondria. // Biochim. Biophys. Acta 346, 1974, 27-78.
- [23] Rokitskaya T.I., Klishin S.S., Severina I.I., Skulachev V.P., Antonenko Yu.N. Kinetic analysis of permeation of mitochondria-targeted antioxidants across bilayer lipid membranes. // J. Membr. Biol. 2008 (in press) DOI 10.1007/s00232-008-9124-6.
- [24] Antonenko Y.N., Roginsky V.A., Pashkovskaya A.A., Rokitskaya T.I., Kotova E.A., Zasp A.A., Chernyak B.V., Skulachev V.P., Protective effects of mitochondria-targeted antioxidant SkQ in aqueous and lipid membrane environments. // J Membr. Biol. 222, 2008, 141-149.
- [25] Sobko A.A., Vigasina M.A., Rokitskaya, T.I., Kotova E.A., Zakharov S.D., Cramer W.A., Antonenko Y.M. // J. Membr. Biol. 199, 2004, 51-62.
- [26] Tyurin V.A., Tyurina Y.Y., Osipov A.N., Belikova N.A., Basova L.V., Kapralov A.A., Bayir H., Kagan V.E. Interactions of cardiolipin and lyso-cardiolipins with cytochrome c and tBid: conflict or assistance in apoptosis // Cell Death Differ. 14, 2007, 872-875.

- [27] Basova L.V., Kurnikov I.V., Wang L., Ritov V.B., Belikova N.A., Vlasova I.I., Pacheco A.A., Winnica D.E., Peterson J., Bayir H., Waldeck D.H., Kagan V.E., Cardiolipin switch in mitochondria: shutting off the reduction of cytochrome c and turning on the peroxidase activity. // *Biochemistry* 46, 2007, 3423-3434.
- [28] Skulachev V.P. Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants. // *Quart. Rev. Biophys* 29, 1996, 169-202.
- [29] Skulachev V.P. Fatty acid circuit as a physiological mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation. // *FEBS Lett.* 294, 1991, 158-162.
- [30] Goglia F., Skulachev V.P. A function for novel uncoupling proteins: antioxidant defense of mitochondrial matrix by translocating fatty acid peroxides from the inner to the outer membrane leaflet. // *FASEB J.* 17, 2003, 1585-1591.
- [31] Zorov D.B., Filburn C.R., Klotz L.O., Zweier J.L., Sollott S.J. Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes. // *J. Exp. Med.* 192, 2000, 1001-1014.
- [32] Skulachev V.P., Bakeeva L.E., Chernyak B.V., Domnina L.V., Minin A.A., O. Pletjushkina Yu., Saprunova V.B., Skulachev I.V., Tsyplenkova V.G., Vasiliev J.M., Yaguzhinsky L.S., Zorov D.B. Thread-grain transition of mitochondrial reticulum as a step of mitoptosis and apoptosis. // *Mol. Cell. Biochem.* 256/257, 2004, 341-358.
- [33] Skulachev V.P. A biochemical approach to the problem of aging: "megaproject" on membrane-penetrating ions. The first results and prospects. // *Biochemistry (Moscow)* 72, 2007, 1385-1396.
- [34] Бакеева Л.Е., Барсков И.В., Васильева А.К., Викторов И.В., Егоров М.В., Зоров Д.Б., Исаев Н.К., Капелько В.И., Казаченко А.В., Кирпатовский В.И., Козловский С.В., Лакомкин В.Л., Левина С. В., Писаренко О.И., Плотников Е.Ю., Сапрунова В.Б., Серебрякова Л.И., Скулачев М.В., Стельмашук Е.В., Студнева И.М., Цкитишвили О.В., Скулачев В.П. Производное пластохинона, адресованное в митохондрии, как средство, прерывающее программу старения. 2. Терапия некоторых старческих патологий, опосредованных АФК (сердечной аритмии, инфарктов сердца и почки и инсульта головного мозга). // *Биохимия (Москва)* 73, 2008, (в печати).
- [35] Adlam V.J., Harrison J.C., Porteous C.M., James A.M., Smith R.A.J., Murphy M.P., Sammut I.A. Targeting an antioxidant to mitochondria decreases cardiac ischemia-reperfusion injury. // *FASEB J.* 19, 2005, 1088-1095.
- [36] . Plotnikov E.Y., Vasileva A.K., Arkhangelskaya A.A., Pevzner I.B., Skulachev V.P., Zorov D.B. Interrelations of mitochondrial fragmentation and cell death under ischemia/reoxygenation and UV-irradiation: Protective effects of SkQ1, lithium ions and insulin. // *FEBS Lett.* 582, 2008, 3117-3124.
- [37] Plotnikov E.Y., Kazachenko A.V., Vyssokikh M.Yu, Vasileva A.K., Tcvirkun D.V., Isaev N.K., Kirpatovsky V.I., Zorov D.B. The role of mitochondria in oxidative and nitrosative stress during ischemia/reperfusion in the rat kidney. // *Kidney Int.* 72, 2007, 1493-502.

- [38] Wu W.S. The signaling mechanism of ROS in tumor progression. // *Cancer Metastasis Rev.* 25, 2006, 695-705.
- [39] Alexandrova A.Y., Kopnin P.B., Vasiliev J.M., Kopnin B.P. ROS up-regulation mediates Ras-induced changes of cell morphology and motility. // *Exp. Cell Res.* 312, 2006, 2066-2073.
- [40] Sablina A.A., Budanov A.V., Ilyinskaya G.V., Agapova L.S., Kravchenko J.E., Chumakov P.M. The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. // *Nat Med.* 11, 2005, 1306-1313.
- [41] Kopnin P.B., Agapova L.S., Kopnin B.P., Chumakov P.M. Repression of sestrin family genes contributes to oncogenic Ras-induced reactive oxygen species up-regulation and genetic instability. // *Cancer Res.* 67, 2007, 4571-4578.
- [42] Агапова Л.С., Васильев Ю.М., Домнина Л.В., Дугина В.Б., Ефименко А.Ю., Иванова О.Ю., Калинина Н.И., Копнин Б.П., Копнин П.Б., Коротецкая М.В., Личиницер М. Р., Лукашев А.Л., Плетюшкина О.Ю., Попова Е.Н., Скулачев М.В., Степанова Е.В., Титова Е.В., Ткачук В.А., Фетисова Е.К., Хромова Н.В., Черняк Б.В., Шагиева Г.С., Скулачев В.П. Производное пластохинона адресованное, в митохондрии, как средство прерывающее программу старения. 3. SkQ1 подавляет развитие опухолей из р53-дефицитных клеток. // *Биохимия (Москва)* 73, 2008, (в печати).
- [43] Khromova N.V., Kopnin P.B., Stepanova E.V., Agapova L.S., Kopnin B.P. p53 hot-spot mutants increase tumor vascularization via ROS-mediated activation of the HIF-1/VEGF-A pathway. // *Cancer Lett.*, 2008, (accepted).
- [44] Hirota K., Semenza G.L. Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1. // *Crit Rev Oncol Hematol* 59, 2006, 15-26
- [45] Bell E. L., Klimova T.A., Eisenbart J., Moraes C.T., Murphy M.P., Budinger G.R., Chandel N.S. The Qo site of the mitochondrial complex III is required for the transduction of hypoxic signaling via reactive oxygen species production. // *J. Cell Biol.* 177, 2007, 1029-1036.
- [46] Lee S., Helfman D.M. Cytoplasmic p21Cip1 is involved in Ras-induced inhibition of the ROCK/LIMK/cofilin pathway. // *J. Biol. Chem.* 279, 2004, 1885-1891.
- [47] Архипова Л.Т., Архипова М.М., Бакеева Л.Е., Фурсова А.Ж., Григорян Э.Н., Гришанова А.Ю., Иомдина Е.Н., Иващенко Ж.Н., Килина О.В., Колосова Н.Г., Копенкин Е.П., Ковалева Н.А., Нероев В.В., Новикова Ю.П., Пилипенко Д.И., Филиппов П.П., Робустова О.В., Сапрунова В.Б., Сенин И.И., Скулачев М.В., Сотникова Л.Ф., Тихомирова Н.К., Трофимова Н.А., Скулачев В.П. Производное пластохинона, адресованное в митохондрии, как средство, прерывающее программу старения. 4. Связанные с возрастом заболевания глаз. SkQ возвращает зрение слепым животным. // *Биохимия (Москва)* 73, 2008, (в печати).
- [48] Sergeeva S., Bagryanskaya E., Korbolina E., Kolosova N. Development of behavioural dysfunctions in accelerated-senescence OXYS rats is associated with early postnatal alterations in brain phosphate metabolism. // *Exp. Gerontol.* 41, 2006, 141-150.
- [49] Kolosova N.G., Shcheglova T.V., Sergeeva S.V., Loskutova L.V. Long-term antioxidant supplementation attenuates oxidative stress markers and cognitive deficits in senescent-accelerated OXYS rats. // *Neurobiol. Aging* 27, 2006, 1289-1297.

- [50] Vlachantoni D., Tulloch B., Taylor R.W., Turnbull D.M., Murphy M.P., Wright A.F. Effects of MitoQ and Sod2 on Rates of Retinal Degeneration in Rd1, Atrd1, Rho-/- and Rds Mutant Mice. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 2006, E-5773.
- [51] Анисимов В.Н., Бакеева Л.Е., Высоких М.Ю., Егормин П.А., Забежинский М.А., Исакова Е.Ф., Манских В.Н., Михельсон В.М., Пантелеева А.А., Пасюкова Е. Г., Пискунова Т.С., Попович И.Г., Рощина Н.В., Рыбина О.Ю., Сапрунова В.Б., Самойлова Т.А., Семенченко А.В., Скулачев М.В., Скулачев В.П., Спивак И.М., Тын-дик М.Л., Филенко О.Ф., Цыбулько Е.А., Юрова М.Н. Производное пластохинона, адресованное в митохондрии, как средство, прерывающее программу старения. 5. SkQ1 увеличивает продолжительность жизни и предотвращает развитие признаков старения. // *Биохимия (Москва)* 73, 2008, (в печати).
- [52] Dufour E., Boulay J., Rincheval V., Sainsard-Chanet A. A causal link between respiration and senescence in *Podospora anserine*. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 2000, 4138-4143.
- [53] Scheckhuber C.Q., Erjavec N., Tinazli A., Hammann A., Nyström T., Osiewacz H.D. Reducing mitochondrial fission results in increased life span and fitness of two fungal ageing models. // *Nat. Cell Biol.* 9, 2007, 99-105.
- [54] Walker D.W., Benzer S. Mitochondrial "swirls" induced by oxygen stress and in the *Drosophila* mutant hyperswirl. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 2004, 10290-10295.
- [55] James A.M., Cocheme H.M., Murphy M.P. Mitochondria-targeted redox probes as tools in the study of oxidative damage and ageing. // *Mech. Ageing Dev.* 126, 2005, 982-986.
- [56] Skulachev V.P. How to clean the dirtiest place in the cell: cationic antioxidants as intramitochondrial ROS scavengers, // *IUBMB-Life* 57, 2005, 305-310.
- [57] Magwere T., West M., Riyahi K., Murphy M.P., Smith R.A.J., Partridge L. The effects of exogenous antioxidants on lifespan and oxidative stress resistance in *Drosophila melanogaster*. // *Mech. Ageing Dev.* 127, 2006, 356-370.
- [58] Skulachev V.P. Phenoptosis: programmed death of an organism. // *Biochemistry (Moscow)* 64, 1999, 1418-1426.
- [59] Skulachev V.P. Aging and the programmed death phenomena. // In: *Topics in Current Genetics*, (T. Nystrom and H.D. Osiewacz, Eds.) Model systems in ageing. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg 3, 2003, 191-238.
- [60] Skulachev V. P. Mitochondria in the programmed death phenomena; a principle of biology: "It is better to die than to be wrong". // *IUBMB Life* 49, 2000, 365-373.
- [61] Skulachev V.P., Longo V.D. Aging as mitochondria-mediated atavistic program. Can aging be switched off? // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1057, 2005, 145-164.
- [62] Longo V.D., Mitteldorf J., Skulachev V.P. Programmed and altruistic ageing. // *Nature Rev. Genet.* 6, 2005, 866-872.
- [63] Mair W., Goymer P., Pletcher S.D., Partridge L. Demography of dietary restriction and death in *Drosophila*. // *Science* 301, 2003, 1731-1733.

- [64] Libert S., Zwiener J., Chu X., Voorhies W. Van, Roman G., Pletcher S.D. Regulation of *Drosophila* life span by olfaction and food-derived odors. // *Science* 315, 2007, 1133-1137.
- [65] Buffenstein R. The naked mole-rat: a new long-living model for human aging research. // *J. Gerontol. Biol. Sci.* 60, 2005, 1369–1377.
- [66] Andziak B., Buffenstein R. Disparate patterns of age-related changes in lipid peroxidation in long-lived naked mole-rats and shorter-lived mice. // *Aging Cell* 5, 2006, 525–532.
- [67] Andziak B., O'Connor T.P., Qi W., DeWaal E.M., Pierce A., Chaudhuri A.R., van Remmen H., Buffenstein R. High oxidative damage levels in the longest-living rodent, the naked mole-rat. // *Aging Cell* 5, 2006, 463–471.
- [68] Andziak B., O'Connor T.P., Buffenstein R. Antioxidants do not explain the disparate longevity between mice and the longest-living rodent, the naked mole-rat. // *Mech. Ageing Dev.* 126, 2005, 1206–1212.
- [69] Labinsky N., Csiszar A., Orosz Z., Smith K., Rivera A., Buffenstein R., Ungvari Z. Comparison of endothelial function, O_2^- and H_2O_2 production, and vascular oxidative stress resistance between the longest-living rodent, the naked mole rat, and mice. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 291, 2006, H2698–H2704.
- [70] Migliaccio E., Giorgio M., Mele S., Pelicci G., Revoldi P., Pandolfi P.P., Lanfranccone L., Pelicci P.G. The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals. // *Nature* 402, 1999, 309–313.
- [71] Liu X., Jiang N., Hughes B., Bigras E., Shoubridge E., Hekimi S. Evolutionary conservation of the clk-1-dependent mechanism of longevity: loss of mclk1 increases cellular fitness and lifespan in mice. // *Genes Dev.* 19, 2006, 2424–2434.
- [72] Park T.J., Lu Y., Juttner R., Smith E., Hu J., Brand A., Wetzel C., Milenkovic N., Erdmann B., Heppernstall P.A., Laurito C.E., Wilson S.P., Lewin G.R. Selective inflammatory pain insensitivity in the African naked mole-rat (*Heterocephalus glaber*). // *PLoS Biology* 6, 2008, 156-170.
- [73] Saule P., Trauet J., Dutriez V., Lekeux V., Dessaint J.P., Labalette M. Accumulation of memory T cells from childhood to old age: central and effector memory cells in CD4(+) versus effector memory and terminally differentiated memory cells in CD8(+) compartment. // *Mech. Ageing Dev.* 127, 2005, 274-281.
- [74] Pawelec G., Larbi A. Immunity and ageing in man. // *Annual Review 2006/2007, Exp Gerontol.* 43, 2008, 34-38.
- [75] Turker M.S., Cummings D.J. *Podospora anserina* does not senesce when serially passaged in liquid culture. // *J. Bacteriol.* 169, 1987, 454-460.
- [76] Trifunovic A., Wreeenberg A., Falkenberg M., Spelbrink J.N., Rovio A.T., Bruder C.E., Bohlooly Y.M., Gidlof S., Oldfors A., Wilbom R., Tornell J., Jacobs H.T., Larsson N.-G. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. // *Nature* 429, 2004, 417-423.

- [77] Kujoth G.C., Hiona A., Pugh T.D., Someya S., Panzer K., Wohlgemuth S.E., Hofer T., Seo A.Y., Sullivan R., Jobling W.A., Morrow J.D., Van Remmen H., Sedivy J.M., Yamasoba T., Tanokura M., Weindruch R., Leeuwenburgh C., Prolla T.A. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. // *Science* 309, 2005, 481-484.
- [78] Greaves L.C., Preston S.L., Tadrous P.J., Taylor R.W., Barron M.J., Oukrif D., Leedham S.J., Deheragoda M., Sasieni P., Novelli M.R., Jankowski J.A., Turnbull D.M., Wright N.A., McDonald S.A. Mitochondrial DNA mutations are established in human colonic stem cells, and mutated clones expand by crypt fission. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 2006, 714-719

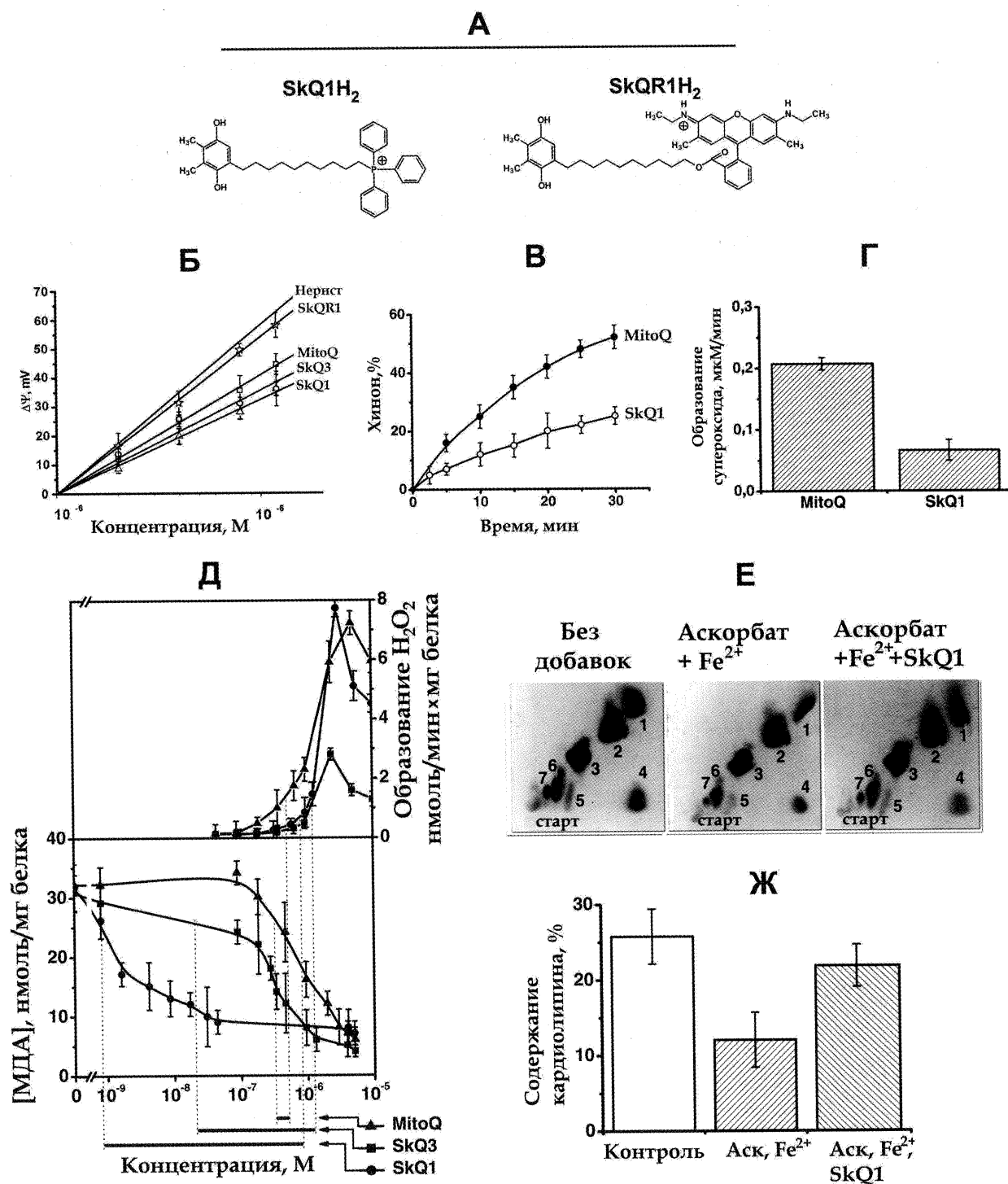


Рис. 1: Анти- и прооксидантные свойства SkQ и MitoQ в модельных системах и в изолированных митохондриях. **А**, восстановленные формы SkQ1 и SkQR1; **Б**, образование диффузионного потенциала на БЛМ за счет градиента концентраций SkQ или MitoQ; **В**, окисление SkQ1H₂ и MitoQH₂ кислородом и образование O₂⁻ (**Г**) в водных растворах; **Д**, анти- и прооксидантное действие SkQ1, SkQ3 и MitoQ в изолированных митохондриях сердца крысы, измеренные по накоплению МДА; **Е, Ж**, SkQ1 защищает кардиолипиды в митохондриях от разрушения под действием ОН•. (из Антоненко и др. [19]).

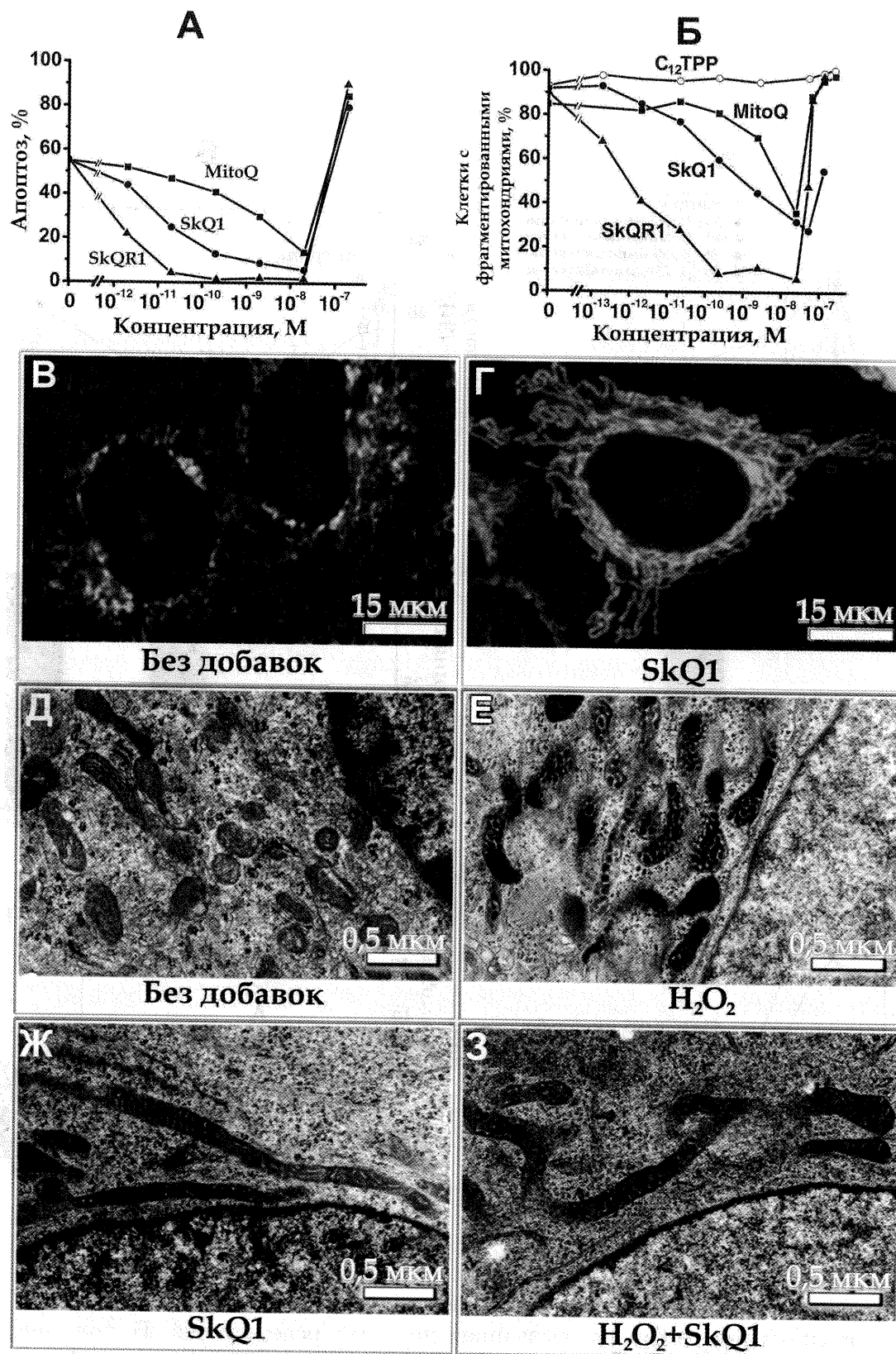


Рис. 2: Действие SkQ1, SkQR1 и MitoQ на клетки человека в культуре. **А**, защита фибробластов от апоптоза, вызванного H_2O_2 ; **Б**, защита митохондрий фибробластов от дробления под действием H_2O_2 ; влияние SkQ1 на морфологию митохондрий в клетках HeLa по данным флуоресцентной (**В,Г**) и электронной (**Д-З**) микроскопии (из Антоненко и др. [19])

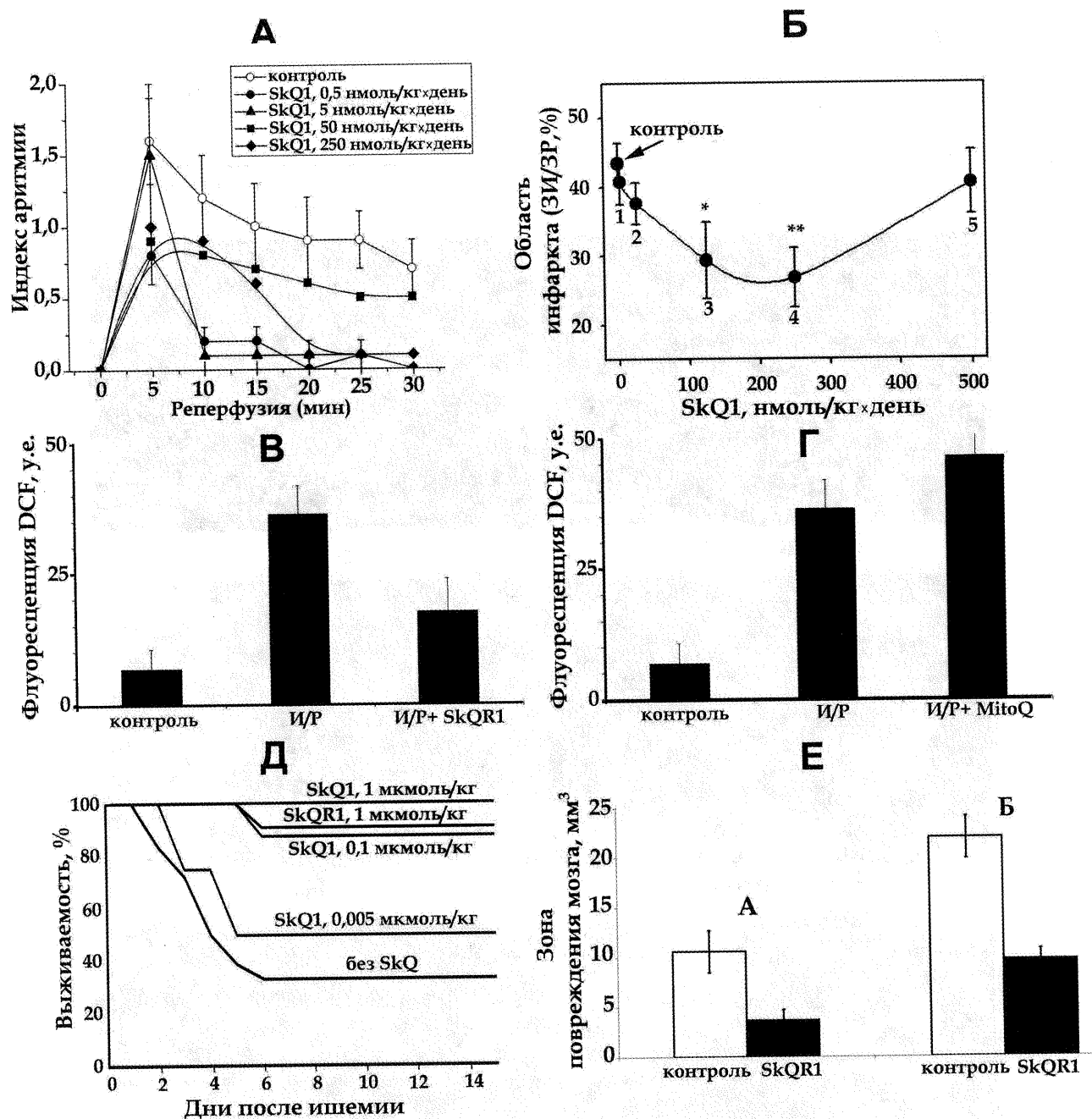


Рис. 3: Защитное действие SkQ при ишемическом поражении сердца, почек и мозга. А, аритмия изолированного сердца, вызванная ишемией/реперфузией; Б, зона инфаркта миокарда у крыс *in vivo*; В, защита от гибели после инфаркта почки крысы; Г, защитное действие SkQR1 при компрессионной ишемии мозга крысы (из Бакеевой и др. [34]).

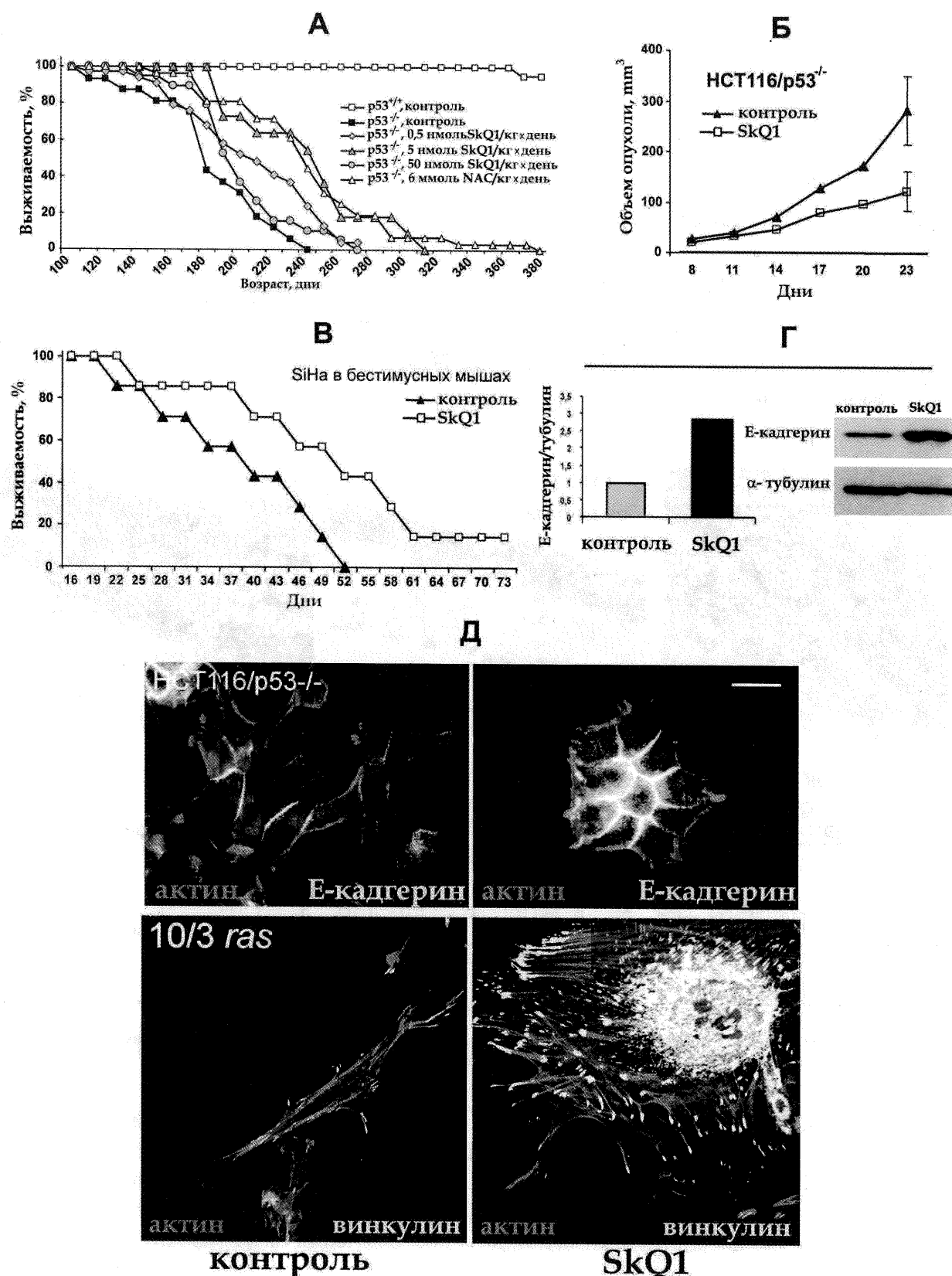


Рис. 4: Действие SkQ1 на развитие опухолей. А, выживаемость мышей $p53^{-/-}$; Б, рост опухоли человека HCT116/ $p53^{-/-}$ в бестимусных мышах; В, выживаемость бестимусных мышей с привитой опухолью человека (SiHa); Г, морфологическая нормализация опухолевых клеток HCT116/ $p53^{-/-}$ и 10/3-ras в культуре (из Агаповой и др. [42])

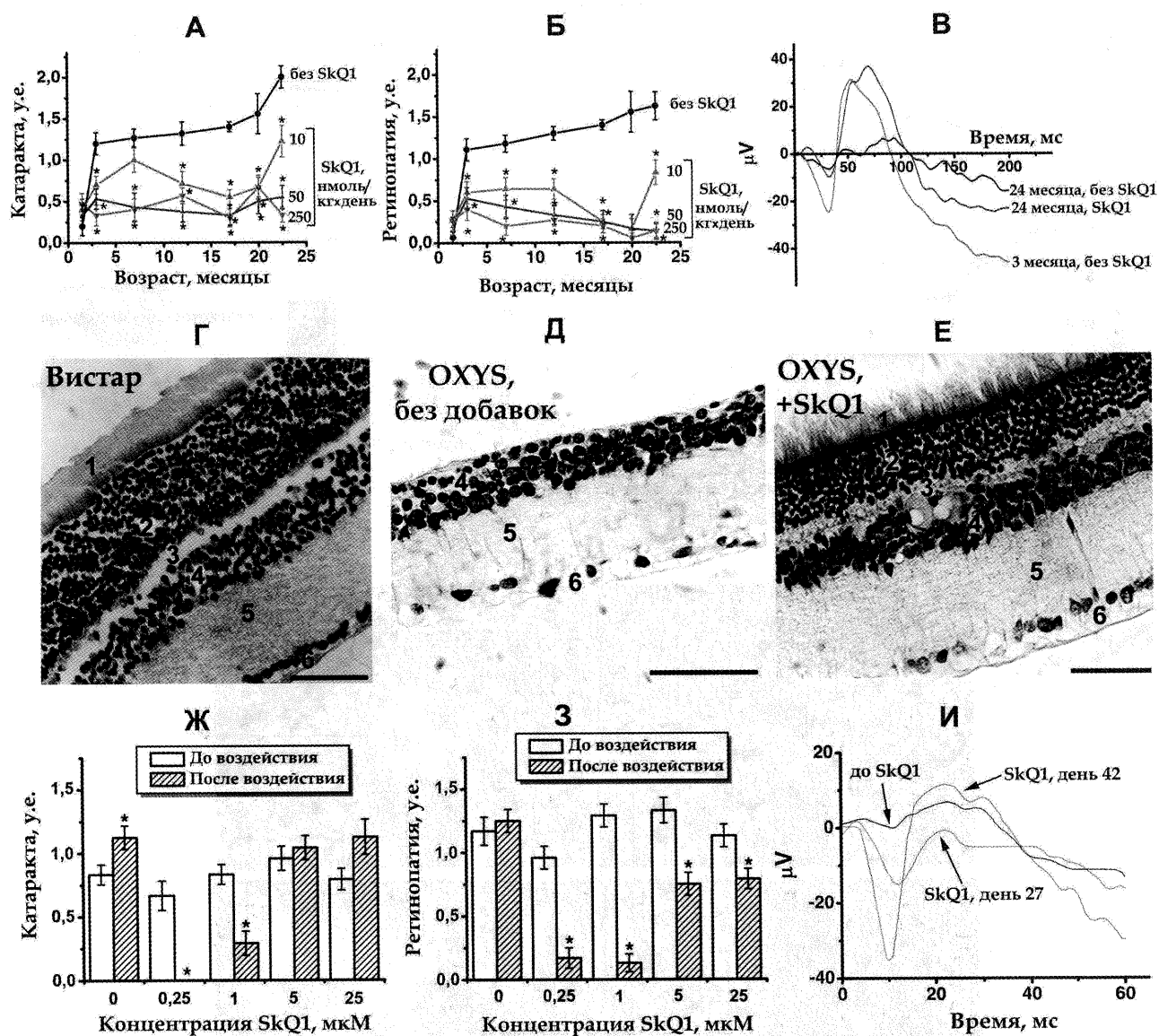


Рис. 5: Действие SkQ1 на глазные болезни животных. Катаракта (А) и ретинопатии (Б) у крыс OXYS; В, электроретинограммы крыс OXYS; гистологические срезы сетчатки крыс Вистар (Г) и OXYS (Д, Е) в возрасте 24 мес.; терапевтическое действие SkQ1 на развившуюся катаракту (Ж) и ретинопатию (З) у крыс OXYS; И, электроретинограмма собаки, страдавшей дисплазией сетчатки, до и после лечения SkQ1 (из Архиповой и др. [47]).

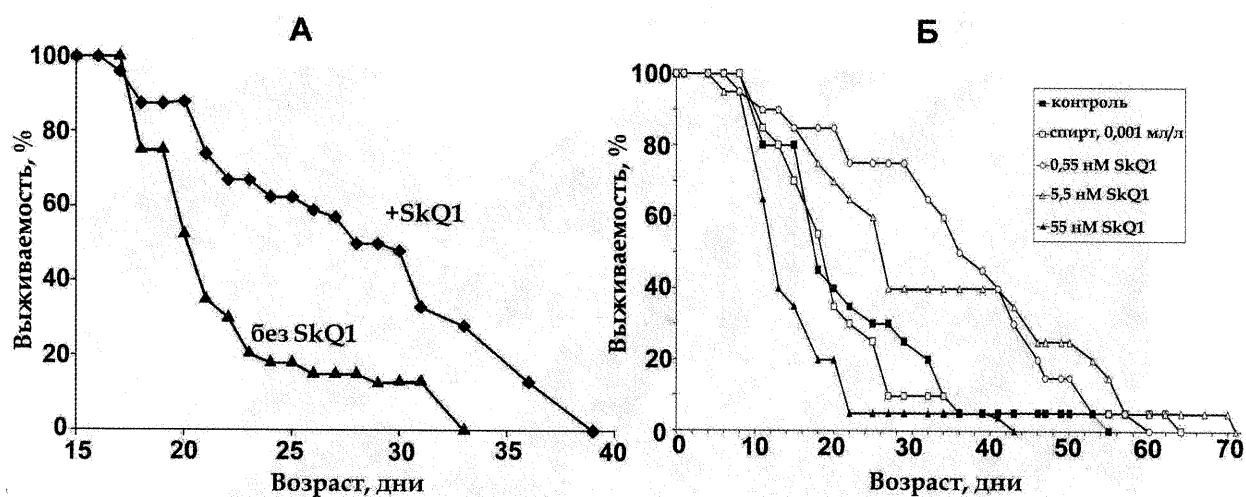


Рис. 6: Действие SkQ1 на продолжительность жизни гриба *Podospira anserina* (А) и ракообразного *Ceriodaphnia affinis* (Б). (из Анисимова и др. [51])

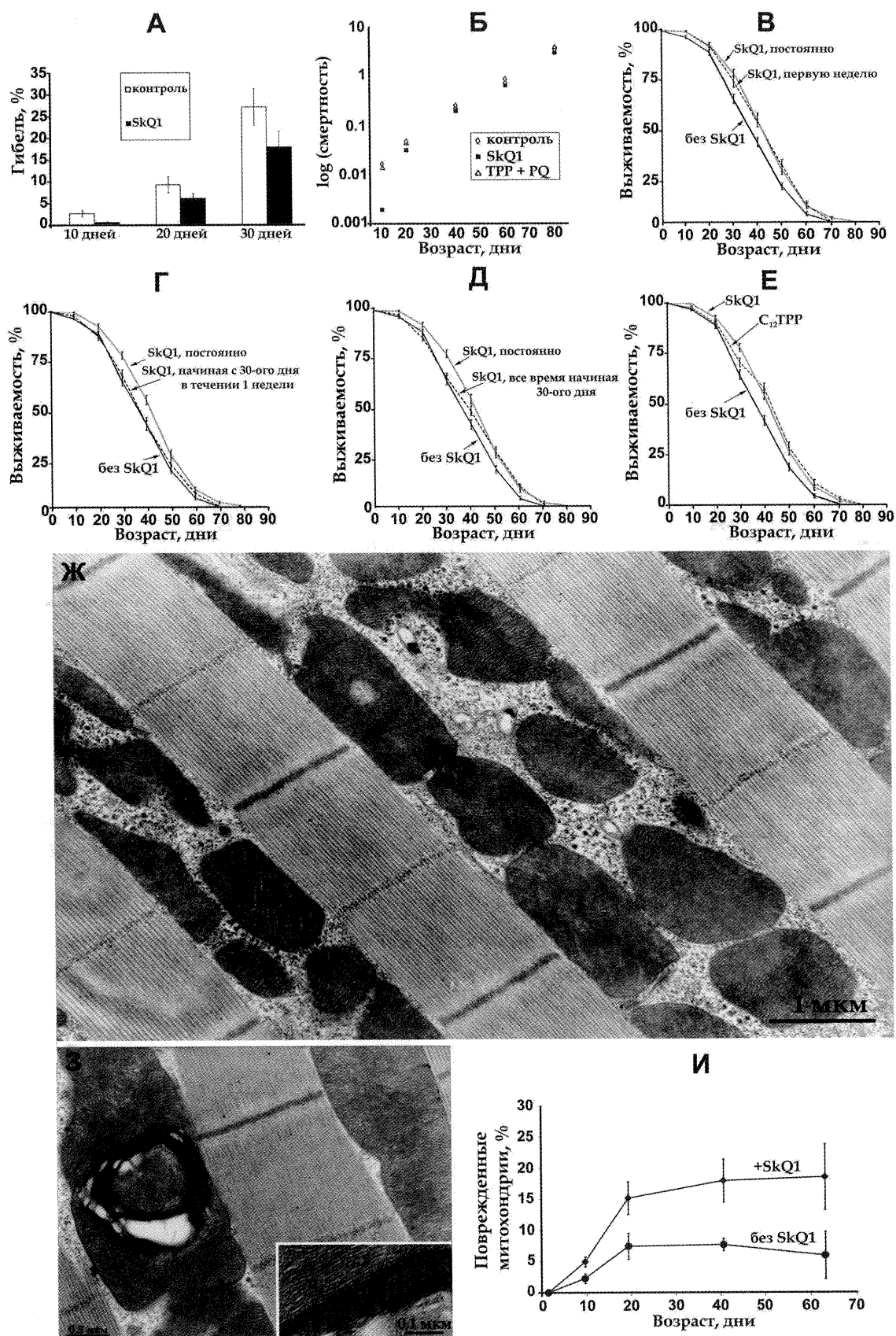


Рис. 7: SkQ1 замедляет старение *Drosophila melanogaster*. А, Б, действие SkQ1 на смертность; SkQ1 скормливали в течение первой недели (В) или в течение недели начиная с 30-го дня (Г), или постоянно, начиная с 30-го дня (Д); Е, действие C₁₂TPP на выживаемость; Ж-И, действие SkQ1 на возраст-зависимые изменения митохондрий летательной мышцы. (из Анисимова и др. [51])

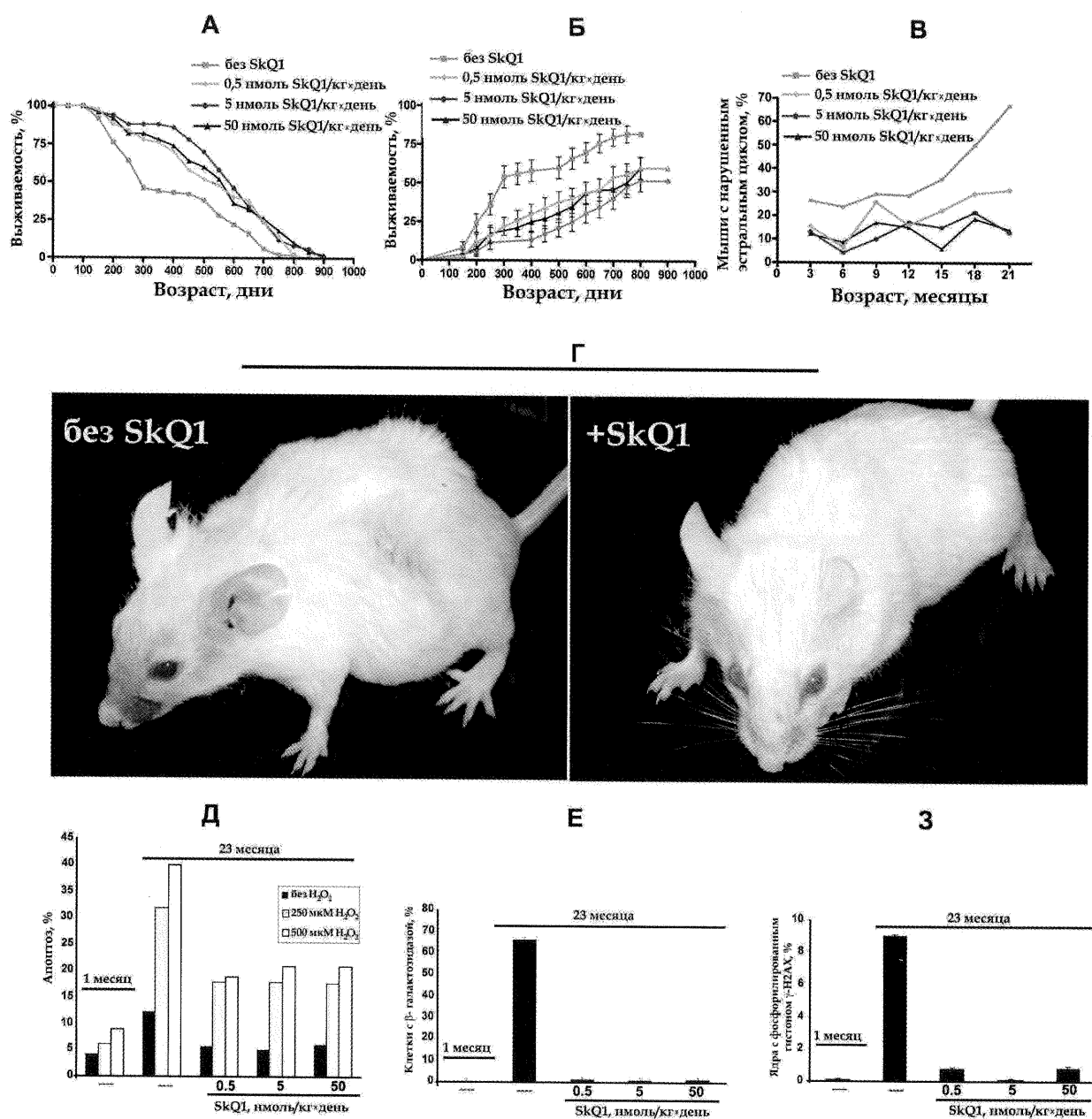


Рис. 8: SkQ1 продлевает жизнь и предотвращает развитие признаков старения у мышей. **А**, суммарные данные двух экспериментаов (200 самок); **Б**, смертность от причин, не связанных с раком, **В**, SkQ1 предотвращает нарушение эстрального цикла; **Г**, две мыши в возрасте 630 дней. Одна из них (справа) получила, а другая не получала SkQ1; **Д-Е**, некоторые свойства фибробластов, выделенных из мышей, получавших и не получавших SkQ1 (из Анисимова и др. [51])

