

На правах рукописи

**Ромодин Леонид Александрович**

**КОРРЕКТНОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ХИНОЛИЗИДИНОВЫХ  
ПРОИЗВОДНЫХ КУМАРИНА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ КОМПЛЕКСА  
ЦИТОХРОМА C C КАРДИОЛИПИНОМ**

**1.5.2. Биофизика**

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Пушино – 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина»

**Научный руководитель:** доктор биологических наук, профессор  
**Лысенко Николай Петрович**

**Официальные оппоненты:** доктор биологических наук, профессор  
**Пальмина Надежда Павловна**  
(гл. н. с. лаборатории физико-химических основ регуляции биологических систем ФГБУН Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН)

доктор медицинских наук, профессор  
**Узбеков Марат Галиевич**  
(зав. лаб. патологии мозга Московского НИИ психиатрии – филиала ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Минздрава России)

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки **Институт проблем химической физики Российской академии наук**

Защита состоится «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 г. в \_\_\_\_\_ на заседании диссертационного совета **24.1.127.01**, созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, по адресу: ул. Институтская, 3, г. Пущино, 142290, Московская область.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной библиотеке ПНЦ РАН по адресу: ул. Институтская, 3, г. Пущино, 142290, Московская область, и на сайте ИТЭБ РАН: <https://iteb.ru/>.

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 г.

Учёный секретарь  
диссертационного совета,  
канд. физ.-мат. наук

Н.Ф. Ланина

## 1. Общая характеристика работы

### 1.1 Актуальность работы

Многие патологии сопряжены с процессами перекисного окисления липидов (ПОЛ). Они могут вызывать гибель клеток по механизмам ферроптоза – посредством реакции Фентона и активности ферментов-липоксигеназ<sup>1</sup> – и апоптоза по митохондриальному (внутреннему) пути<sup>2</sup>. При последнем ключевую роль играет комплекс цитохрома *c* с кардиолипином (ЦитС-КЛ), за счёт липопероксидазной<sup>3</sup> и квазилипоксигеназной (окисляющим субстратом фермента выступают липидные гидроперекиси вместо H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) активности, которую приобретает цитохром *c* (ЦитС) при изменении конформации под действием кардиолипина (КЛ) и которая приводит к разрушению митохондриальных мембран и выходу проапоптотических факторов в цитозоль. Катализируемое ЦитС-КЛ ПОЛ целесообразно изучать методом регистрации активированной (усиленной люминесцентными добавками – т.н. активаторами) хемилюминесценции (ХЛ).

Активаторы ХЛ перехватывают энергию электронного возбуждения от продуктов липидной пероксидации. Затем они выделяют её в виде фотонов. При этом квантовый выход люминесценции возбуждённых молекул активаторов значительно выше, чем у возбуждённых молекул продуктов ПОЛ.

Для получения адекватных сведений об интенсивности протекания реакций ПОЛ предпочтительно использовать активаторы ХЛ, сохраняющие свою концентрацию неизменной в течение времени реакции.

Хинолизидиновые производные кумарина на системе, в которой идёт Fe<sup>2+</sup>-индуцированное ПОЛ, были ранее показаны как специфические физические активаторы ХЛ для реакций ПОЛ, не реагирующие с компонентами реакционной

---

<sup>1</sup> Mao H., Zhao Y., Li H., Lei L. Ferroptosis as an emerging target in inflammatory diseases // *Prog Biophys Mol Biol.* – 2020. – 155. – P.: 20–28.

<sup>2</sup> Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В., Алексеев А.В. Молекулярные механизмы апоптоза. Структура комплекса цитохрома *c* с кардиолипином. Обзор // *Биохимия.* – 2013. – 78, 10. – С.: 1391–1404.

<sup>3</sup> Реакции пероксидазного каталитического цикла подробно описаны в работах: Furtmuller P.G., Jantschko W., Zederbauer M., Jakopitsch C., Arnhold J., Obinger C. Kinetics of interconversion of redox intermediates of lactoperoxidase, eosinophil peroxidase and myeloperoxidase // *Jpn J Infect Dis.* – 2004. – 57, 5. – P.: 830–831 и Rodriguez-Lopez J.N., Lowe D.J., Hernandez-Ruiz J., Hiner A.N., Garcia-Canovas F., Thorneley R.N. Mechanism of reaction of hydrogen peroxide with horseradish peroxidase: identification of intermediates in the catalytic cycle // *J Am Chem Soc.* – 2001. – 123, 48. – P.: 11838–11847.

смеси<sup>4</sup>. Далее это свойство переносилось и на системы, где ПОЛ катализируется ферментом-пероксидазой. Однако мы недавно обнаружили значительное снижение оптической плотности в области максимума поглощения хинолизидиновых производных кумарина: хинолизидин[5,6,7-*gh*]3-этоксикарбонилкумарина, хинолизидин[5,6,7-*gh*]3-ацетилкумарина и хинолизидин[5,6,7-*gh*]3,2'-бензимидазолилкумарина, – известных в англоязычной литературе как coumarin-314 (С-314), coumarin-334 (С-334) и coumarin-525 (С-525) соответственно, при их обработке смесью ЦитС-КЛ и перекиси водорода<sup>5</sup>.

Это поставило нас перед необходимостью изучить кинетику участия С-314, С-334 и С-525 в реакциях, катализируемых ЦитС-КЛ, и на основании полученных данных предложить способ корректировки ХЛ-кривых, зарегистрированных с использованием производных кумарина, концентрация которых может снижаться в процессе реакции. Это снижение приводит к уменьшению интенсивности ХЛ, регистрируемой хемилюминометром. А падение интенсивности ХЛ в этом случае может быть ложно оттраковано как результат снижения интенсивности липидной пероксидации в образце.

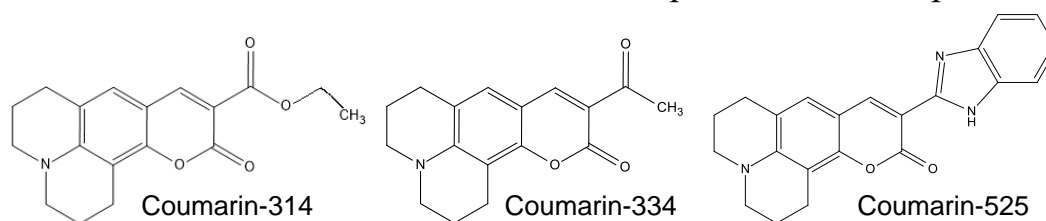


Рисунок 1. Формулы изучаемых хинолизидиновых производных кумарина

## 1.2 Цель исследования:

Разработка корректного метода применения хинолизидиновых производных кумарина: хинолизидин[5,6,7-*gh*]3-этоксикарбонилкумарина, хинолизидин[5,6,7-*gh*]3-ацетилкумарина и хинолизидин[5,6,7-*gh*]3,2'-бензимидазолилкумарина – при изучении кинетики процесса ПОЛ, катализируемого факультативной пероксидазой на примере комплекса ЦитС-КЛ.

<sup>4</sup> Vladimirov Yu.A., Sharov V.S., Driomina E.S., Reznitchenko A.V., Gashev S.B. Coumarin derivatives enhance the chemiluminescence accompanying lipid peroxidation // *Free Radic Biol Med.* – 1995. – 18, 4. – P.: 739–745.

<sup>5</sup> Ромодин Л.А., Владимиров Ю.А., Зарудная Е.Н. Особенности использования кумаринов как активаторов хемилюминесценции при изучении комплекса цитохрома с с кардиолипином. Всероссийская молодёжная конференция «Экспериментальная и теоретическая биофизика'17». 1 ноября 2017 г., Пущино. Сборник тезисов. С. 16.

### **1.3 Задачи исследования:**

- 1) Провести спектрофотометрический анализ кинетики реакций, катализируемых ЦитС-КЛ, в присутствии производных кумарина при сопоставлении с интенсивностью ХЛ.
- 2) Вывести функции поправочных коэффициентов, учитывающие разрушение кумариновых активаторов в ходе указанной реакции, для корректировки хемиллюминограмм.
- 3) Изучить кинетику процесса разрушения ЦитС, являющегося следствием проявления им пероксидазной активности в составе комплекса с кардиолипином.
- 4) Методом регистрации усиленной хинолизидиновым производным кумарина ХЛ провести сравнительное исследование ингибирующего действия антиоксидантов (АО) – дигидрокверцетина (таксифолина) и тролокса – на липидную пероксидацию, запускаемую комплексом ЦитС-КЛ.
- 5) Методом регистрации усиленной coumarin-334 ХЛ исследовать угнетение хлорофиллином ПОЛ как предполагаемой части механизма радиозащитного действия препаратов на основе хлорофилла.

### **1.4 Научная новизна работы:**

Показано разрушение хинолизидиновых производных кумарина в катализируемой ЦитС-КЛ липопероксидазной реакции, и впервые определены константы скорости данного процесса. На их основе выведены функции вычисления поправочных коэффициентов для обработки ХЛ-кривых. Впервые вычислены константы скорости разрушения железопорфириновой группировки в составе молекулы ЦитС в процессе катализа пероксидазной реакции. Установлен механизм участия хинолизидиновых производных кумарина в каталитическом пероксидажном цикле: они являются восстанавливающими субстратами ферриформы ЦитС с двумя окисленными эквивалентами, т.н. компаунда 1. Показано, что квазилипоксигеназная реакция происходит преимущественно посредством механизма одноэлектронного окисления фермента-пероксидазы, т.е. с образованием сразу ферриформы ЦитС с одним окисленным эквивалентом (компаунда 2). Предположен возможный молекулярный механизм радиопротекторного действия производных хлорофилла, заключающийся в ингибировании ПОЛ. Разработан алгоритм проведения спектрофотометрического исследования участия вещества в

ферментативной пероксидазной реакции; его новизна и оригинальность подтверждены патентом Российской Федерации № 2720807.

### **1.5 Теоретическая и практическая значимость работы:**

Новые сведения о механизмах протекания квазилипоксигеназной реакции, катализируемой ЦитС-КЛ, и сведения о механизме взаимодействия кумариновых активаторов с ферментом-пероксидазой, а также о свойствах ЦитС при выполнении пероксидазной функции могут быть использованы в курсах биофизики, биохимии и физиологии, преподаваемым обучающимся по программам бакалавриата, специалитета, магистратуры и аспирантуры. Разработанная и запатентованная методика определения участия активатора ХЛ в ферментативных пероксидазных реакциях позволяет исследовать различные вещества на предмет возможности их применения в качестве активаторов ХЛ для оценки течения реакции образования свободных радикалов. Выведенные нами функции для корректировки ХЛ-кривых, полученных при использовании хинолизидиновых производных кумарина, позволяют адекватно оценивать изменение динамики образования свободных радикалов при введении в систему ЦитС-КЛ–Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>–липидный субстрат различных АО и прочих факторов. Данные о подавлении АО липопероксидазной реакции, катализируемой ЦитС-КЛ, и механизме радиопротекторного действия производных хлорофилла актуализируют дальнейшие исследования по разработке средств терапии и профилактики патологий, вызванных окислительным стрессом.

### **1.6 Положения, выносимые на защиту:**

- 1) Хинолизидиновые производные кумарина являются восстанавливающими субстратами ЦитС, проявляющего свойства фермента-пероксидазы. Их участие в каталитическом пероксидажном цикле сводится к реакции с ферриформой пероксидазы с двумя окисленными эквивалентами. В результате в процессе ферментативной липопероксидазной реакции происходит значительное уменьшение их концентрации, что ведёт к снижению интенсивности хемилюминесценции. Во избежание ложной трактовки данного феномена как результата снижения интенсивности ПОЛ, экспериментальные ХЛ-кривые необходимо корректировать с помощью математических функций, учитывающих уменьшение концентрации активатора в процессе реакции.
- 2) Цитохром с разрушается при катализе пероксидазной реакции и не разрушается при катализе квазилипоксигеназной реакции.

- 3) Квазилипоксигеназный каталитический цикл проходит посредством одноэлектронного окисления пероксидазы с последующим восстановлением.
- 4) Применение общей поправочной функции на расходование хинолизидиновых производных кумарина в процессе липопероксидазной реакции при проведении исследования действия АО методом регистрации ХЛ ограничено теми АО, которые не вызывают полной задержки в развитии люминесценции (латентного периода) в сравнении с контрольной пробой.
- 5) Подавление перекисного окисления липидов является компонентом радиозащитного действия препаратов на основе хлорофилла.

### **1.7 Апробация работы:**

Результаты исследования апробированы автором в устных выступлениях на Международной научной конференции по биоорганической химии «XII чтения памяти академика Ю.А. Овчинникова» и VII российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Москва, 18–22 сентября 2017 г.); на Всероссийской молодёжной конференции «Экспериментальная и теоретическая биофизика'17» (Пушино, 1 ноября 2017 г.); на Конференции-школе молодых учёных «Достижения и перспективы супрамолекулярной и биологической химии в биомедицине и сельском хозяйстве» (Москва, 4–10 декабря 2017 г.); на Международной научно-практической конференции, посвящённой 90-летию со дня рождения академика РАСХН А.Д. Белова, первого президента МААО, «Современные проблемы радиобиологии, агроэкологии, клинической и экспериментальной ветеринарной хирургии» (Москва, 18–20 октября 2018 г.), доклад удостоен Диплома I степени «За лучшую научную работу, представленную на конкурс молодых учёных»; на Национальной научно-практической конференции «Актуальные вопросы биологии, биотехнологии, ветеринарии, зоотехнии, товароведения и переработки сырья животного и растительного происхождения» (Москва, 6–7 февраля 2019 г.); на Международной учебно-методической и научно-практической конференции, посвящённой 100-летию ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина, «Актуальные проблемы ветеринарной медицины, зоотехнии и биотехнологии» (Москва, 20–22 ноября 2019 г.); на 21–24-й Международных Пушкинских школах-конференциях молодых учёных «Биология – наука XXI века» (17–21.04.2017 г., 23–27.04.2018 г., 15–19.04.2019 г., 5–7.10.2020 г.), выступление от 06.10.2020 г. отмечено Дипломом «За лучший устный доклад на секции

“Биофизика и биоинформатика”»); на Национальной научно-практической конференции «Актуальные вопросы биологии, биотехнологии, ветеринарии, зоотехнии, товароведения и переработки сырья животного и растительного происхождения» (Москва, 1 апреля 2021 г.); на Всероссийском конкурсе на лучшую научную работу среди студентов, аспирантов и молодых учёных ВУЗов Министерства сельского хозяйства РФ в 2020 г., работа заняла второе место на федеральном этапе в номинации «Биологические науки» среди аспирантов и молодых учёных; на межкафедральном заседании в ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина 05.11.2020 г.

Публикации. По материалам диссертации опубликована 31 работа, среди них 5 статей в журналах из перечня ВАК по специальности 1.5.2. Биофизика, 2 статьи в журнале, включённом в МБЦ Scopus, 1 патент на изобретение и 20 тезисов докладов в сборниках материалов научных конференций.

### **1.8 Структура и объём диссертации**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методик, изложения результатов экспериментов, их обсуждения, заключения и списка цитируемой литературы, включающего 459 источников.

## **2. Методология и методы исследования**

В ходе настоящей работы были использованы общенаучные (анализ, обобщение и сравнение) и экспериментальные методы познания. Схема проведения исследования приведена на рисунке 2.

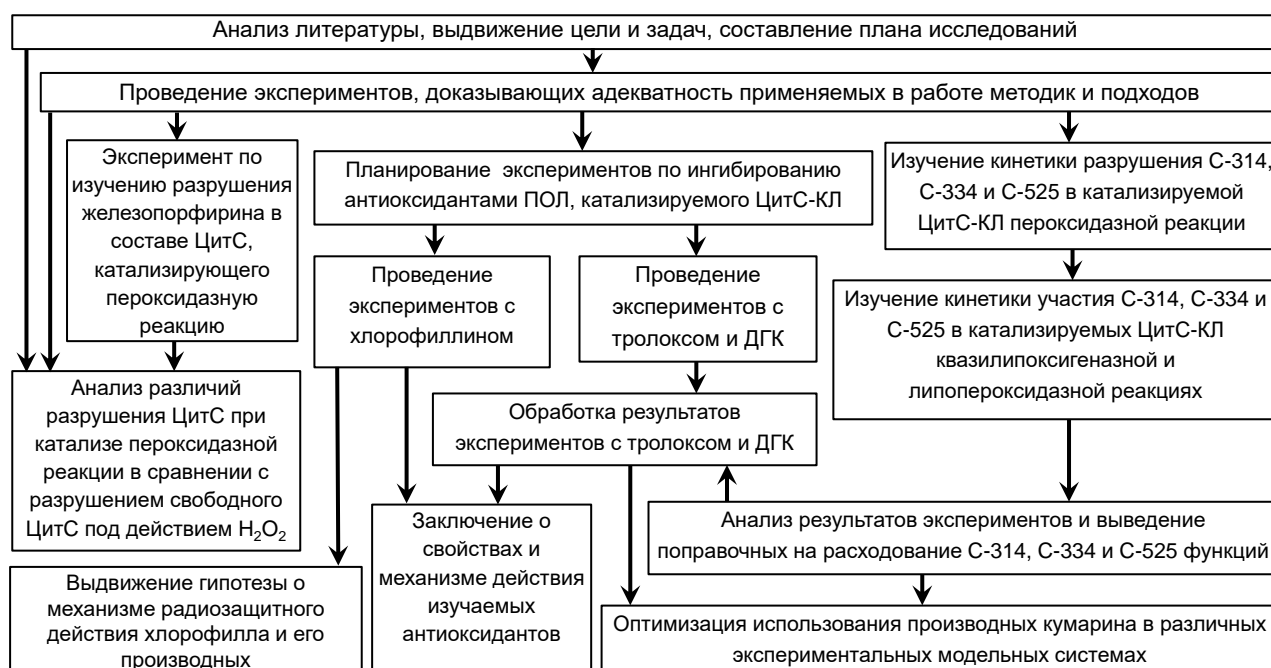


Рисунок 2. Схема проведения исследования



Основные экспериментальные модельные системы представляли собой растворённые в среде 20 мМ фосфатного буфера (рН = 7,4) 10 мкМ ЦитС (Sigma-Aldrich, США), производное кумарина (Sigma-Aldrich, США) начальной концентрацией 25–50 мкМ (при изучении разрушения ЦитС в систему не добавлялись), 300 мкМ тетраолеилкардоилипин (сокр. ТОКЛ, Avanti Polar Lipids, США) в экспериментах по изучению кинетики разрушения производных кумарина и ингибированию ПОЛ хлорофиллином или 600 мкМ кардиолипин из сердца быка (сокр. БКЛ, Avanti Polar Lipids, США) в экспериментах с ДГК и тролоксом. В экспериментах по изучению кинетики участия производных кумарина в квазилипоксигнальной и липопероксидазной реакциях в системе присутствовала 600 мкМ фосфатидная кислота (сокр. ФК, Avanti Polar Lipids, США). Реакция запускалась внесением в систему 215 мкМ  $H_2O_2$  (Sigma-Aldrich, США), в экспериментах с хлорофиллином вместо неё в систему вносился препарат липидных гидроперекисей, полученный путём медленного окисления БКЛ, начальная концентрация препарата в пересчёте на БКЛ равнялась 150 мкМ. В качестве ингибиторов ПОЛ в соответствующих экспериментах использовались ДГК (Merck, США) и тролокс (Millipore, США) в диапазоне концентраций 0,7–3,6 мкМ, а также натрий-медный хлорофиллин (NSP, США) в диапазоне концентраций 0,3–200 мкМ.

Концентрации веществ вычислялись на основании серий спектров поглощения реакционной смеси при использовании математического выражения закона Бугера–Ламберта–Бера, зарегистрированных с помощью двулучевого спектрофотометра «Sperord 200» фирмы «Analytik Jena» (Германия) или аппаратно-программного комплекса на основе двулучевого спектрофотометра СФ-10 производства Ленинградского оптико-механического объединения (Россия). Интенсивность ХЛ измерялась при помощи хемилюминометров «Lum-5773» или «Lum-100» фирмы ООО «ДИСофт» (Россия), перед началом каждой серии опытов хемилюминометры калибровались по ураниловому стеклу.

Подробно алгоритмы проведения экспериментов описаны в тексте диссертации. Статистически результаты обрабатывались средствами «MS Excel» с использованием t-критерия Стьюдента,  $n=5$ ,  $P=0,95$ , если в описании эксперимента не указано иное. Данные представлены в виде: среднее арифметическое результатов  $\pm$  предельная ошибка среднего.

### 3. Результаты и их обсуждение

#### **3.1 Участие хинолизидиновых производных кумарина в каталитическом цикле цитохрома с, связанного с кардиолипином**

На основании ряда спектрофотометрических измерений мы доказали, что производные кумарина не реагируют ни со свободным ЦитС, в том числе в присутствии  $H_2O_2$ , ни с фосфолипидами. Следовательно, уменьшение концентрации производных кумарина в присутствии ЦитС-КЛ и  $H_2O_2$  может быть обусловлено лишь их участием в катализируемых ЦитС-КЛ реакциях.

Разрушение производных кумарина под действием ЦитС-КЛ мы изучили на системе, содержащей ЦитС-ТОКЛ и легкоокисляемую фосфатидную кислоту (ФК), наличие которой позволило изучить возможность участия производных кумарина в квазилипоксигеназной (в случае отсутствия в системе  $H_2O_2$ ) и липопероксидазной (при внесении в систему  $H_2O_2$ ) реакциях, так как наличие в системе 600 мкМ ФК обеспечивало присутствие 1200 мкМ ацилов. Эти ацилы могут выступать в роли восстанавливающих субстратов окисленных форм ЦитС в ходе каталитического пероксидазного цикла. За счёт этого экспериментальная модельная система становится в требуемом аспекте полностью соответствующей межмембранному пространству митохондрий. Аналогичная экспериментальная система, но без внесения производных кумарина, применялась нами в экспериментах по изучению разрушения гемовой группировки ЦитС в процессе катализа липопероксидазной реакции, описанных в следующей главе.

Результаты экспериментов по изучению участия производных кумарина в катализируемых ЦитС-КЛ реакциях оказались аналогичны для всех трёх изучаемых веществ, поэтому в автореферате мы даём только графики сопоставления динамики изменения концентрации и интенсивности ХЛ в первые минуты реакции (рис. 4, с. 12), подробно приводя данные лишь для С-314 (рис. 3, с. 11).

На основании анализа полученных данных мы выдвинули гипотезу о механизме участия хинолизидиновых производных кумарина в пероксидажном каталитическом цикле, заключающемся в реакции только с ферриформой пероксидазы с двумя окисленными эквивалентами, называемой в литературе компаундом 1 (рис. 5А, с. 13).

Наша гипотеза вытекает из анализа двух теоретических предположений касательно механизма квазилипоксигеназного каталитического цикла.

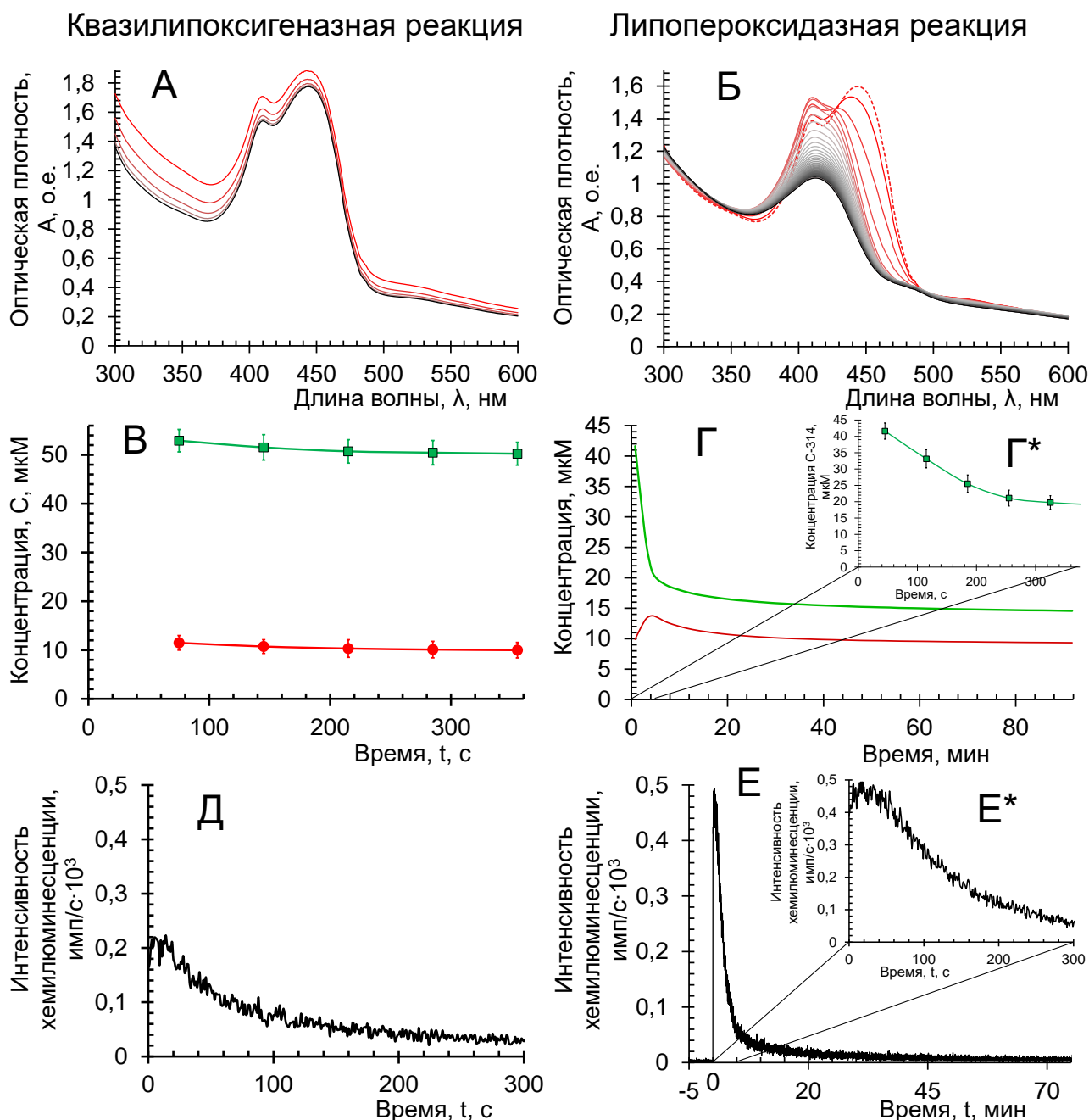


Рисунок 3. Квазилипоксигеназная (А, В, Д) и липопероксидазная (Б, Г, Е) реакции, катализируемые ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС:ТОКЛ 1:30 в присутствии С-314.

А. Серия спектров поглощения смеси с добавлением ФК начальной концентрацией 600 мкМ.

Б. Серия спектров поглощения смеси (указанной в А.) в присутствии  $H_2O_2$  начальной концентрацией 215 мкМ. Пунктирная красная кривая – спектр смеси без  $H_2O_2$ . Сплошные кривые – опытные измерения: красная кривая – первое измерение, чёрная – последнее, промежуточные цвета (через серый) – промежуточные измерения.

В. Уменьшение концентрации железопорфириновой группировки в составе ЦитС (красная кривая) и С-314 (зелёная кривая) в процессе квазилипоксигеназной реакции.

Г. Уменьшение концентрации железопорфириновой группировки в составе ЦитС (красная кривая) и С-314 (зелёная кривая) в процессе липопероксидазной реакции. Врезка Г\*.

Уменьшение концентрации С-314 в течение первых 6 минут реакции.

Д. ХЛ смеси ЦитС-ТОКЛ, ФК и С-314. Нулевое значение времени – момент добавления ФК.

Е. ХЛ смеси ЦитС-ТОКЛ, ФК, С-314 и  $H_2O_2$ . Нулевое значение времени – момент добавления  $H_2O_2$ . Врезка Е\*. ХЛ указанной смеси в течение первых 5 минут реакции.

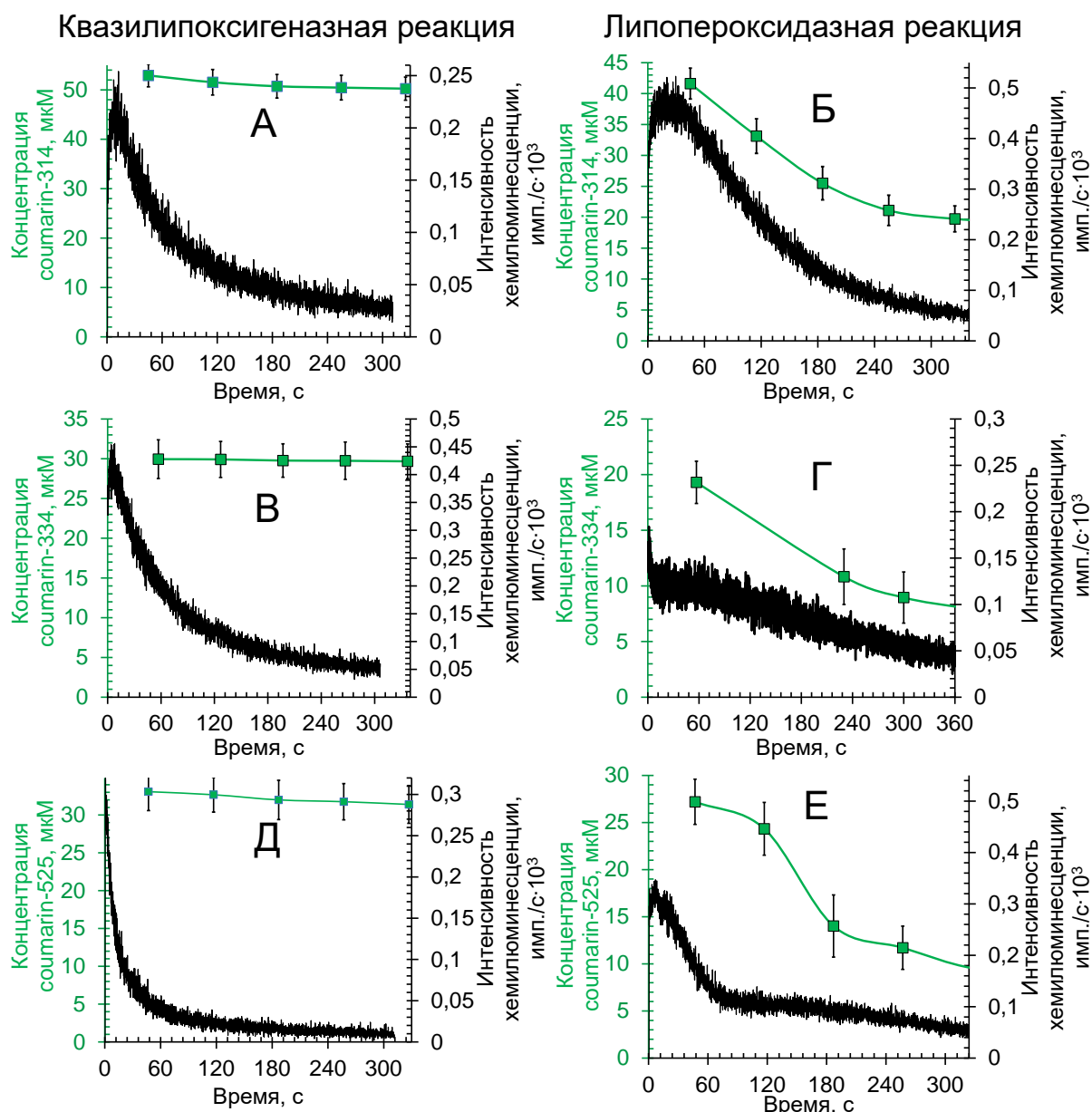


Рисунок 4. Сопоставление уменьшения концентрации производных кумарина (А, Б – С-314, В, Г – С-334, Д, Е – С-525) и спада интенсивности хемилюминесценции, сопровождающей катализируемую ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС:ТОКЛ 1:30 квазилipoксигеназную (А, В, Д) (начальная концентрация добавленной ФК равна 600 мкМ) и липопероксидазную (Б, Г, Е) реакцию (начальная концентрация  $H_2O_2$  равна 215 мкМ).

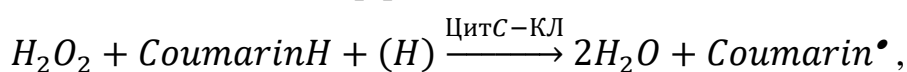
Согласно первому предположению, реакция с участием липидной гидроперекиси аналогична реакции с  $H_2O_2$ : феррипероксидаза окисляется липопероксидом до компаунда 1. Согласно второму – липидная гидроперекись вызывает одноэлектронное окисление пероксидазы: образуется сразу ферриформа с одним окисленным эквивалентом, называемая компаундом 2. Мы считаем истинным именно второе предположение.

Наша гипотеза об участии производных кумарина в пероксидазном цикле (рис. 5А) в свете экспериментальных данных (рис. 3, 4) соотносится именно со вторым предположением: прореагировать они могут только с

феррицитохромом *c* с двумя окисленными эквивалентами (компаундом 1), который отсутствует в квазилипоксигеназном каталитическом цикле.

Поэтому уменьшение концентрации производных кумарина наблюдается лишь во время липопероксидазной реакции, для изучения которой необходимо применять корректирующие функции, выведенные нами на основании констант скорости реакции разрушения С-314, С-334 и С-525.

Взаимодействие хинолизидиновых производных кумарина с ЦитС является реакцией второго порядка, однако в данной работе мы упрощённо рассматривали эту реакцию как их окисление под действием  $H_2O_2$ , «ставя ЦитС-КЛ над стрелкой», как катализатор реакции:



где (H) – восстанавливающий субстрат компаунда 2 (феррицитохрома *c* с одним окисленным эквивалентом) – молекула липида. Но так как концентрация производных кумарина на порядок ниже, чем липидов и  $H_2O_2$ , то их окисление правомочно рассматривать как реакцию псевдопервого порядка.

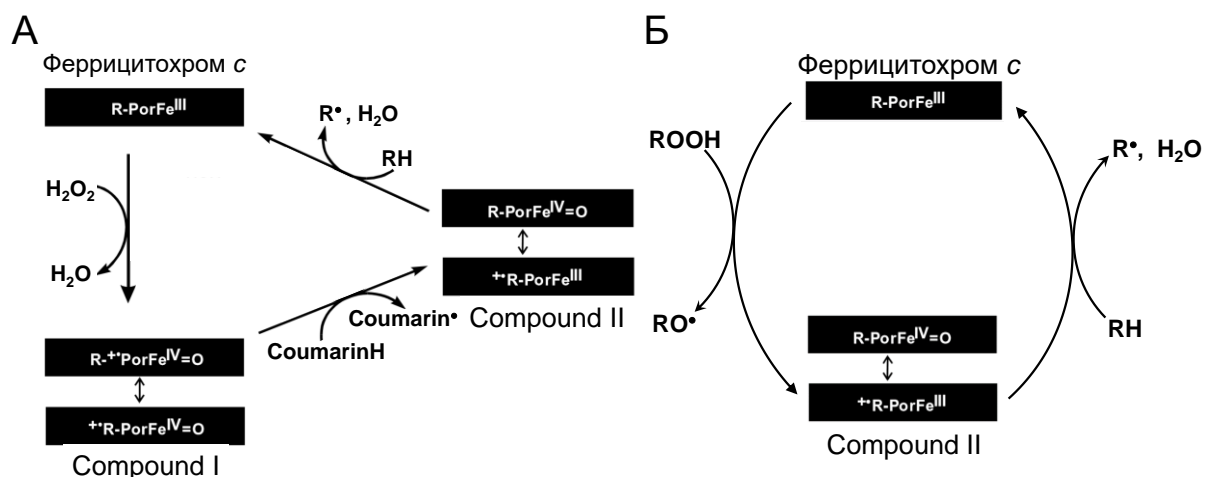


Рисунок 5. А. Предполагаемая схема участия хинолизидиновых производных кумарина в каталитическом пероксидазном цикле. Б. Предполагаемый преимущественный механизм каталитического квазилипоксигеназного цикла – через одноэлектронное окисление пероксидазы с последующим восстановлением.

В силу того что вычисленные константы носят технический характер, нам приходилось их вычислять не для одной системы в целом, а для разных временных отрезков в ходе реакции в данной системе. Таким образом, в общем виде корректирующую функцию можно представить так:

$$J_{\Pi} = A J_{\text{запер.}} e^{kt} \quad \text{при } t \in (t_1; t_2],$$

где  $J_{\Pi}$  – значение интенсивности ХЛ в момент времени  $t$ , какое бы было, если бы производные кумарина не расходовались в процессе реакции,

$J_{\text{зарег.}}$  – интенсивность ХЛ, зарегистрированная на хемиллюминометре,  $k$  – константа скорости реакции разрушения усилителя ХЛ,  $\text{с}^{-1}$ ,  $e$  – основание натурального логарифма,  $(t_1; t_2]$  – границы временного диапазона,  $A$  – эффективная константа для временного диапазона  $(t_1; t_2]$ : при  $t_1 = 0$   $A = 1$ , а при  $t_1 > 0$   $A > 1$ .

В приведённой ниже таблице представлены описываемые функции и данные по расходованию С-314, С-334 и С-525 в ходе липопероксидазной реакции, катализируемой ЦитС-ТОКЛ, за 5 и 10 минут. Данные приведены в виде: среднее арифметическое  $\pm$  предельная ошибка среднего. В тексте диссертации также приведена информация и для систем без ФК.

Производное кумарина	Снижение концентрации в ходе катализируемой ЦитС-КЛ реакции, %, $n=5, P=0,99$		Эффективная константа скорости разрушения производного кумарина, $\text{с}^{-1}$ , $n=5, P=0,99$	Функция для корректирования ХЛ-кривых	Время от начала реакции
	За 5 минут	За 10 минут			
С-314	54,8 $\pm$ 8,1	60,2 $\pm$ 0,5	0,0027 $\pm$ 0,0006	$J_{\text{П}}=J_{\text{зарег.}}e^{0,0027t}$	$t \in (0; 300] \text{ с}$
			0,00039 $\pm$ 0,00012	$J_{\text{П}}=2,01J_{\text{зарег.}}e^{0,00039t}$	$t \in (300; 570] \text{ с}$
			0,00014 $\pm$ 0,00002	$J_{\text{П}}=2,31J_{\text{зарег.}}e^{0,00014t}$	$t \in (570; 1200] \text{ с}$
С-334	66,8 $\pm$ 2,0	77,0 $\pm$ 1,2	0,00439 $\pm$ 0,00268	$J_{\text{П}}=J_{\text{зарег.}}e^{0,0044t}$	$t \in (0; 230] \text{ с}$
			0,00132 $\pm$ 0,00020	$J_{\text{П}}=2J_{\text{зарег.}}e^{0,0013t}$	$t \in (230; 580] \text{ с}$
			0,00063 $\pm$ 0,00009	$J_{\text{П}}=2,93J_{\text{зарег.}}e^{0,0006t}$	$t \in (580; 930] \text{ с}$
С-525	46,2 $\pm$ 13,3	64,8 $\pm$ 14,25	0,0025 $\pm$ 0,0017	$J_{\text{П}}=J_{\text{зарег.}}e^{0,0025t}$	$t \in (0; 450] \text{ с}$

### **3.2 Разрушение цитохрома с, находящегося в комплексе с кардиолипином, при осуществлении катализа липопероксидазной реакции**

В опытах с кумариновыми производными мы показали быстрое разрушение ЦитС в ходе катализируемой ЦитС-КЛ липопероксидазной реакции (рис. 3Г, с. 11) и его отсутствие при квазилипоксигеназной (рис. 3В, с. 11). Под словосочетанием «разрушение ЦитС» в настоящей работе следует понимать разрушение железопорфирина в его составе, т.к. константы скорости этого разрушения мы вычисляли на основании значений концентраций, полученных с использованием значений оптической плотности в области 409 нм, соответствующей максимуму поглощения этой группировки. Она выступает в роли активного центра ЦитС, катализирующего пероксидазную реакцию.

Однако в тексте диссертации мы также приводим данные и об уменьшении оптической плотности в области 515–530 нм. С учётом этих данных можно говорить о деструкции молекулы ЦитС в целом.

Для более корректных выводов относительно кинетики разрушения ЦитС мы провели эксперименты на модельных системах, не содержащих производных кумарина, а потому полностью соответствующих митохондриям живых клеток (рис. 6).

Перед вычислением констант скорости разрушения железопорфирина ЦитС, связанного с ТОКЛ, мы определили константу для разрушения железопорфирина свободного ЦитС под действием  $H_2O_2$ . Эта система – контрольная, в ней ЦитС не катализирует пероксидазную реакцию (рис. 6А). На основании результата применения дифференциального метода Вант-Гоффа эту реакцию мы рассматривали как реакцию нулевого порядка, её константа скорости равна  $(52,3 \pm 0,4) \cdot 10^{-11}$  моль/л·с.

В других системах (рис. 6Б–Г) снижение концентрации железопорфирина ЦитС вызвано разрушением этого белка при катализе пероксидазной реакции и носит экспоненциальный характер. Его мы рассматривали как реакцию псевдопервого порядка (т.к. концентрация ЦитС более чем на порядок ниже концентрации  $H_2O_2$  и липидов).

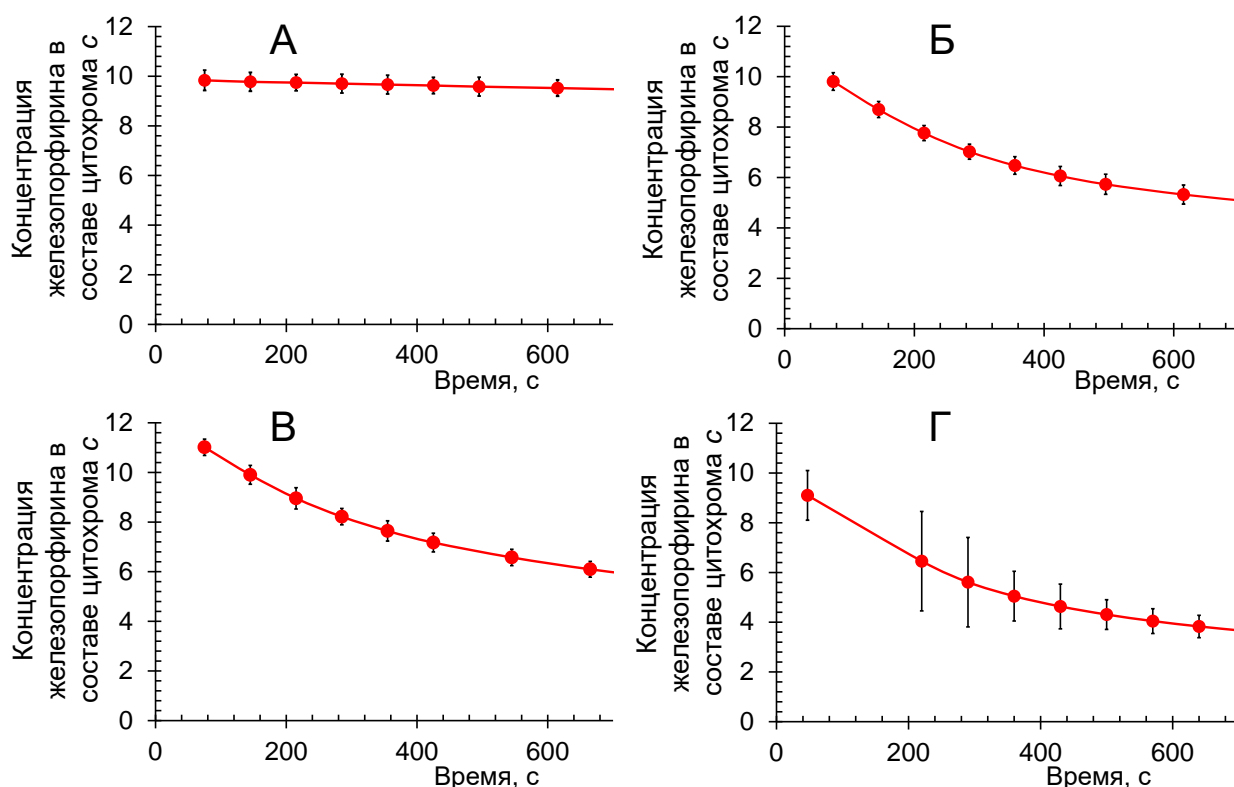


Рисунок 6. Уменьшение концентрации железопорфирина в составе ЦитС за первые 700 секунд реакции в смеси: А. 10 мкМ ЦитС, 215 мкМ  $H_2O_2$ ; Б. ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС:ТОКЛ 1:30 в присутствии 215 мкМ  $H_2O_2$ ; В. ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС:ТОКЛ 1:60 в присутствии 215 мкМ  $H_2O_2$ ; Г. ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС:ТОКЛ 1:30 в присутствии 600 мкМ ФК и 215 мкМ  $H_2O_2$ .

При этом мы получили следующие значения констант скорости для различных систем: ЦитС-ТОКЛ при соотношении белок:липид 1:30 при внесении 215 мкМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  –  $(0,00159 \pm 0,00007) \text{ c}^{-1}$  при  $t \in (0; 285] \text{ c}$  и  $(0,00101 \pm 0,00022) \text{ c}^{-1}$  при  $t \in (285; 615] \text{ c}$ ; при соотношении 1:60 –  $(0,00139 \pm 0,00007) \text{ c}^{-1}$  при  $t \in (0; 285] \text{ c}$  и  $(0,00091 \pm 0,00018) \text{ c}^{-1}$  при  $t \in (285; 665] \text{ c}$ ; для системы ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС:ТОКЛ 1:30 при внесении 600 мкМ легкоокисляемой ФК и 215 мкМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  –  $(0,00262 \pm 0,00162) \text{ c}^{-1}$  при  $t \in (0; 220] \text{ c}$ ,  $(0,00138 \pm 0,00031) \text{ c}^{-1}$  при  $t \in (220; 500] \text{ c}$  и  $(0,00084 \pm 0,00013) \text{ c}^{-1}$  при  $t \in (500; 710] \text{ c}$ .

В случае отсутствия ФК в системе, скорее всего, восстановительная часть пероксидазного каталитического цикла протекает через реакции со второй молекулой  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Митохондриям же высших животных больше соответствует система, в которой присутствуют полиненасыщенные фосфолипидные ацилы (содержащиеся в составе ФК) и в полной мере происходит липопероксидазная реакция. При этом железопорфирин в составе ЦитС разрушается интенсивнее, чем в системах без ФК. Мы считаем, что быстрое разрушение целостности холофермента ЦитС при катализе липопероксидазной реакции – это ещё один эволюционно выработавшийся механизм блокирования апоптоза.

### **3.3 Ингибирование антиоксидантами индуцированной комплексом цитохрома с с кардиолипином липидной пероксидации**

Нами было изучено подавление дигидрокверцетином (ДГК), взятым в качестве примера растительного АО, и синтетическим тролоксом липопероксидазной реакции, катализируемой ЦитС-БКЛ, методом регистрации усиленной С-334 ХЛ в присутствии  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

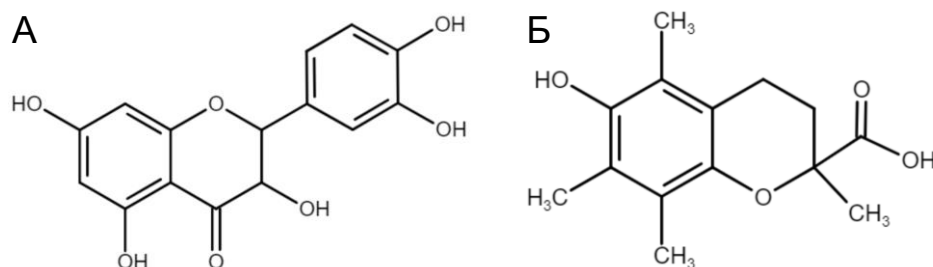


Рисунок 7. Структурные формулы дигидрокверцетина (А) и тролокса (Б)

Реакция запускалась внесением  $\text{H}_2\text{O}_2$  в систему, содержащую АО (ДГК (таксифолин) или тролокс), С-334 и ЦитС-БКЛ. Начальное соотношение ЦитС:БКЛ равнялось 1:60. БКЛ – это КЛ, содержащий полиненасыщенные ацилы, т.е. он выступал и в роли КЛ-кофактора, обеспечивающего проявление



ЦитС пероксидазной активности, и в роли его липидного субстрата. ТОКЛ не использовался в данном случае, т.к. строгого постоянства значения активности ЦитС в эксперименте не требовалось. Действие ДГК (рис. 8) и тролокса (рис. 9, с. 18) на ХЛ оказалось различным.

ДГК дозозависимо подавлял ПОЛ на протяжении всего измерения. На рисунке 8 представлены непосредственно зарегистрированные и откорректированные с учётом расходования С-334 ХЛ-кривые: при игнорировании факта уменьшения концентрации С-334 получаются заниженные данные об интенсивности радикальных реакций.

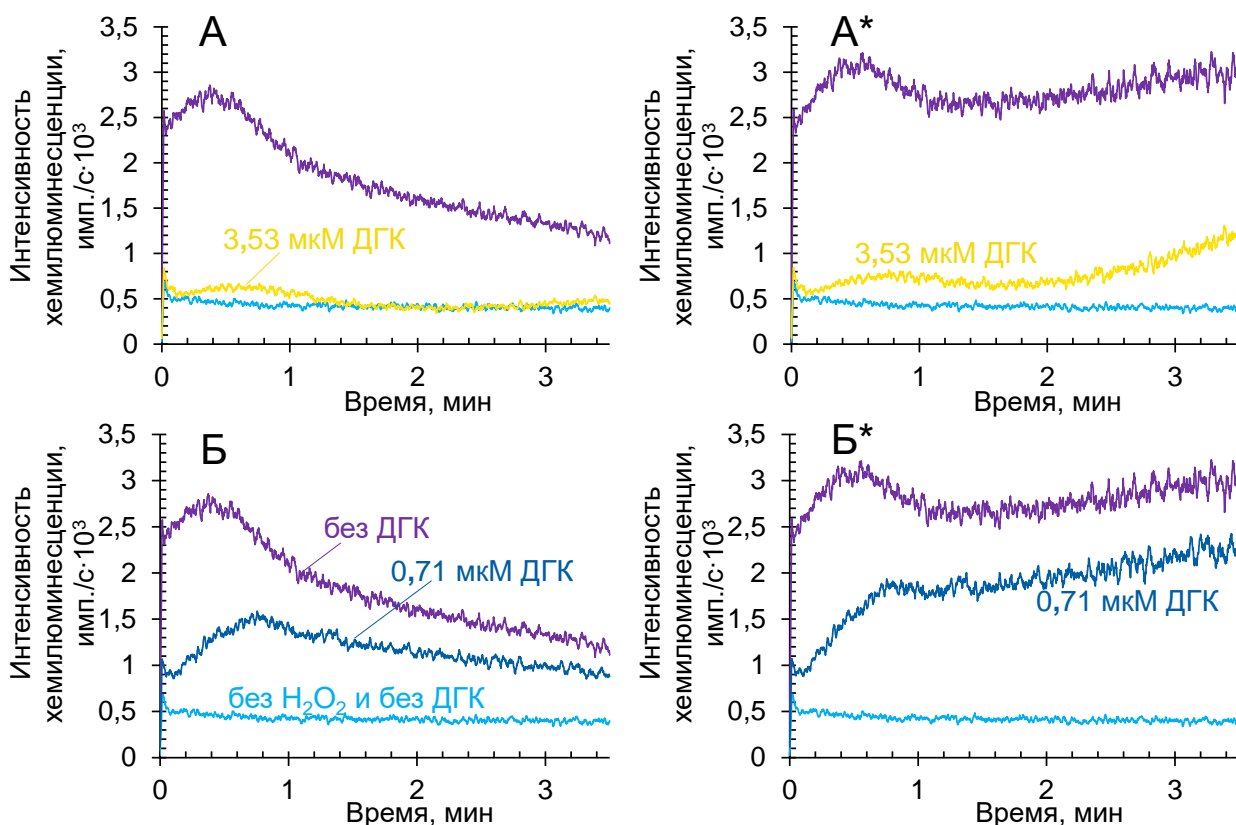


Рисунок 8. Подавление липопероксидазной активности ЦитС-БКЛ дигидрокверцетином. Концентрации: ЦитС – 10 мкМ, БКЛ – 600 мкМ, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – 500 мкМ, С-334 – 25 мкМ. Светлоголубые кривые – контроль без перекиси водорода, фиолетовые кривые – без дигидрокверцетина. Остальные кривые – ХЛ при различных концентрациях ДГК: 3,53 мкМ (А), 0,71 мкМ (Б), соответствующие графики А\*, Б\* – хемилюминограммы после коррективы поправочной функцией на уменьшение концентрации С-334.

Тролокс же, не снижая амплитуды (максимальной интенсивности) ХЛ-вспышек, вызывает полное угнетение в развитии ХЛ (т.н. латентный период), после чего ХЛ-кривая практически повторяет таковую для пробы, не содержащей тролокса, и время затухания вспышки также сдвигается во времени. Мы считаем, что это связано с тем, что тролокс реагирует с ЦитС, который вступает в реакцию с ацилами только тогда, когда в системе заканчивается АО.

Следовательно, в данном случае тролокс нельзя считать ингибитором самого процесса ПОЛ, т.к. он не реагирует с непосредственными его участниками.

В развитии ХЛ в присутствии тролокса можно выделить две вспышки (рис. 9) – низкую и высокую, – время задержки которых укладывается в линейную зависимость от концентрации тролокса (рис. 12В1, 12В2, с. 20).

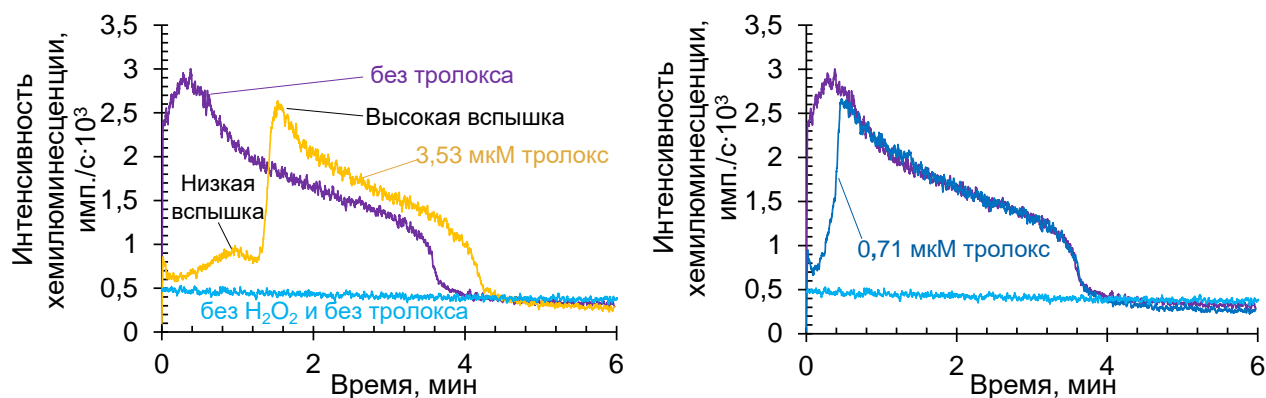


Рисунок 9. Влияние тролокса на липопероксидазную активность ЦитС-БКЛ. Концентрации: ЦитС – 10 мкМ, БКЛ – 600 мкМ, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – 500 мкМ, С-334 – 25 мкМ. Светло-голубые кривые – контроль без перекиси водорода, фиолетовые кривые – контроль без тролокса. Остальные кривые – ХЛ при различных концентрациях тролокса (указаны на рисунке) в системе.

Поправочную на расходование С-334 функцию, представленную выше, в данных экспериментах с тролоксом применять некорректно, т.к. она выведена для систем, в которых ХЛ-вспышка развивается уже с первых секунд реакции.

Методом регистрации усиленной С-334 ХЛ мы также изучили действие водорастворимого производного хлорофилла – хлорофиллина – на интенсивность процесса ПОЛ (рис. 11, с. 19).

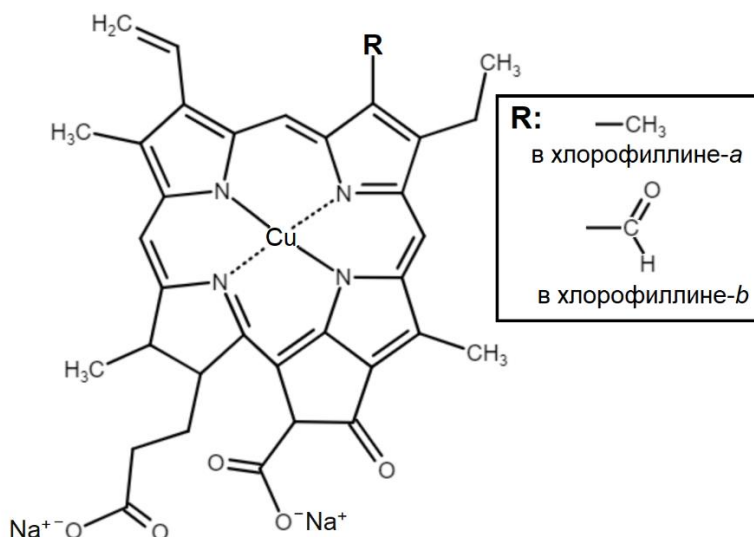


Рисунок 10. Формула натрий-медного хлорофиллина, используемого в настоящей работе. Препарат представлял собой смесь хлорофиллинов -a и -b.

ПОЛ в данном эксперименте запускалось катализированной ЦитС-ТОКЛ квазилипоксигеназной реакцией, в ходе которой разрушению подвергались

липидные гидроперекиси в окисленном препарате БКЛ. Такая модельная система отражает реакции образования липидных радиотоксинов.

Производные хлорофилла были ранее показаны А.В. Поздеевым как эффективные радиопротекторы<sup>6</sup>. Однако в его работе не был объяснён молекулярный механизм их действия. Мы же предположили, что в основе радиопротекторного действия препаратов на основе хлорофилла может лежать подавление ПОЛ; и это подтверждается результатами проведённого нами эксперимента с хлорофиллином.

На рисунке 11 приведены ХЛ-кривые для реакции, запускаемой внесением в смесь, содержащую раствор хлорофиллина, ЦитС-ТОКЛ и С-334, окисленного препарата БКЛ, и значения светосуммы (площади на графике, ограниченной координатными осями, ХЛ-кривой и перпендикуляром из неё на ось абсцисс в соответствующем значении времени) за первые 5 минут этой реакции. Достоверно ПОЛ подавляет хлорофиллин в концентрациях от 1,56 мкМ. При этом, на основании значений светосуммы (рис. 12Г, с. 20), 3,7 мкМ хлорофиллин подавляет её наполовину.

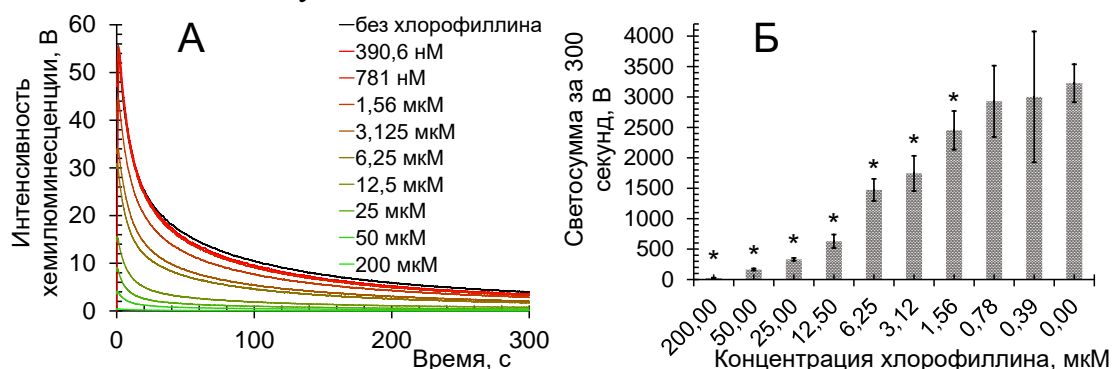
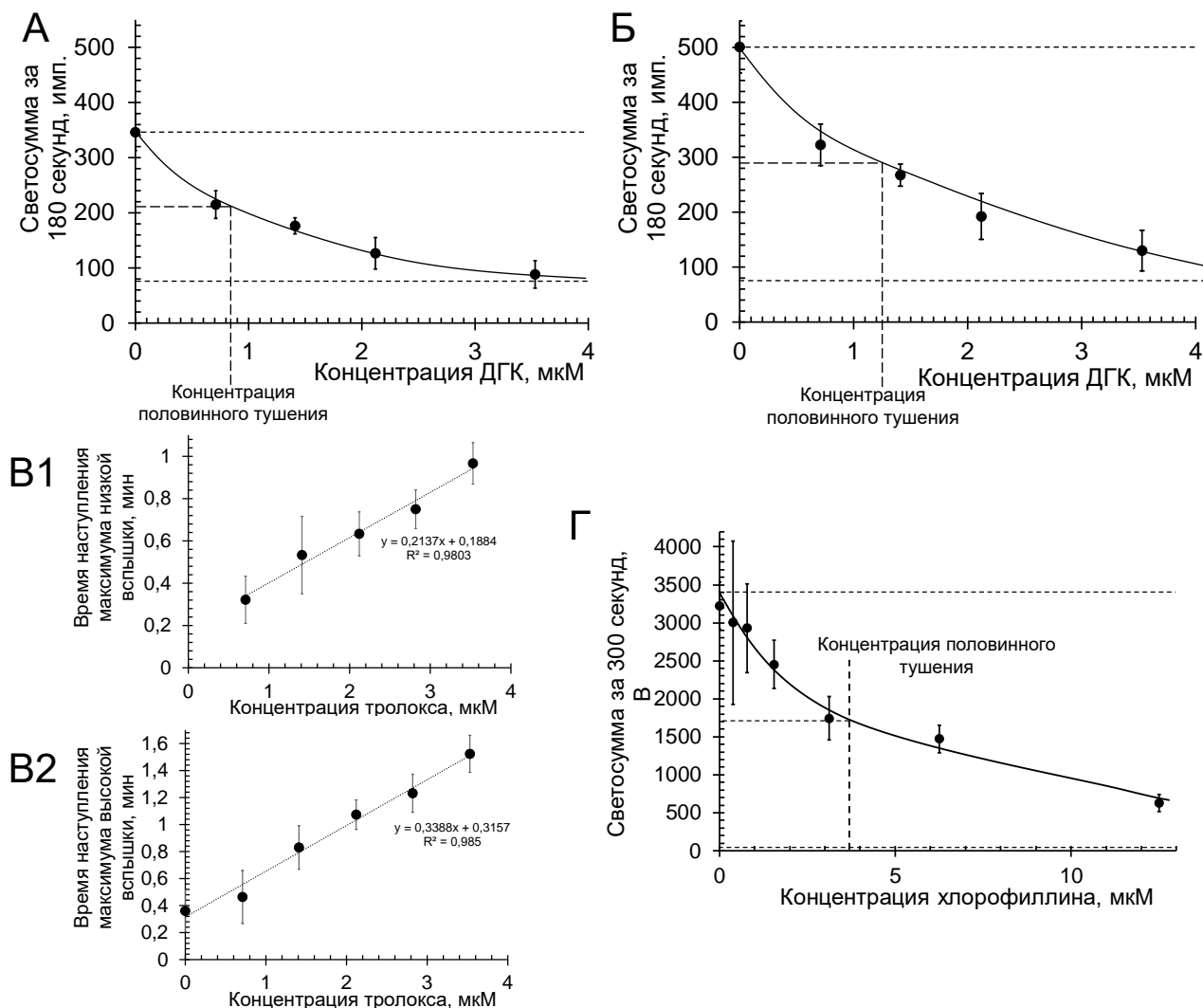


Рисунок 11. А. Интенсивность ХЛ системы 10 мкМ ЦитС, 300 мкМ тетраолеилкардиолипид, 25 мкМ С-334, 150 мкМ (в пересчёте на окисленный БКЛ) липопероксиды в присутствии указанных в легенде концентраций хлорофиллина. Б. Светосумма для указанной системы за первые 5 минут реакции, \*достоверное отличие от значения контроля при  $P=99\%$ .

Если говорить о влиянии ДГК на ПОЛ, вызванное липопероксидазной активностью ЦитС-КЛ, то его концентрация половинного тушения ХЛ равна  $\approx 1,26$  мкМ (рис. 12Б, с. 20). Данное значение получено при использовании функции, корректирующей расход активатора ХЛ (С-334), и именно оно соответствует истине, будучи выше выведенного без её использования (рис. 12А, с. 20) и равного  $\approx 0,84$  мкМ. Последнее мы приводим

<sup>6</sup> Поздеев А.В. Разработка радиозащитных средств на основе веществ растительного и минерального происхождения. Диссертация на соискание учёной степени доктора биологических наук по специальности 03.01.01 Радиобиология. Кострома, 2015, 313 с.

для возможности сравнения наших данных с данными авторов, не использовавших поправочную функцию, но применявших С-334 при исследовании действия АО на ПОЛ, вызванное активностью ЦитС-ТОКЛ.



**Рисунок 12.** А. Графическое определение концентрации ДГК, вызывающей половинное тушение ХЛ (оценка по значению светосуммы за 3 минуты реакции), индуцированной липопероксидазной активностью ЦитС-БКЛ, без использования поправочной функции на уменьшение концентрации С-334, концентрация определена равной 0,84 мкМ. Б. То же при использовании поправочной функции, указанная концентрация ДГК определена равной 1,26 мкМ. Нижняя горизонтальная пунктирная линия соответствует значению ХЛ для пробы, не содержащей  $H_2O_2$ . В. Зависимость времени наступления максимумов низкой (В1) и высокой (В2) вспышек ХЛ, сопровождающей катализируемую ЦитС-БКЛ липопероксидазную реакцию, от концентрации тролокса. Г. Графическое определение концентрации хлорофиллина, вызывающей половинное тушение ХЛ (оценка по значению светосуммы за 5 минут реакции), индуцированной ЦитС-ТОКЛ, составившей 3,7 мкМ. Нижняя пунктирная линия – значение светосуммы для пробы, не содержащей ЦитС (контроль на пероксидазу).

Помимо данных о концентрациях хлорофиллина и ДГК, вызывающих половинное тушение ХЛ, на рисунок 12 мы также выносим график зависимости продолжения временной задержки в развитии ХЛ от концентрации

тролокса (рис. 12B1, 12B2), выведенный на основании результатов соответствующего эксперимента.

### 3.4 Хлорофилл и его производные как перспективные радиозащитные средства

Описанное выше ингибирующее действие хлорофиллина по отношению к ПОЛ мы считаем одним из механизмов его радиозащитного действия. При этом не исключено, что он также может непосредственно нейтрализовать и продукты радиолитиза воды, и продукты прямого радиолитиза биомолекул. Но данные предположения ещё нуждаются в экспериментальной проверке. На рисунке 13 представлены все предполагаемые механизмы радиопротекторного действия препаратов на основе хлорофилла. В будущих исследованиях необходимо разработать клинические формы применения хлорофилла и его производных для профилактики и терапии лучевой болезни, в частности, и патологий, вызванных свободнорадикальным окислением липидов, в целом.

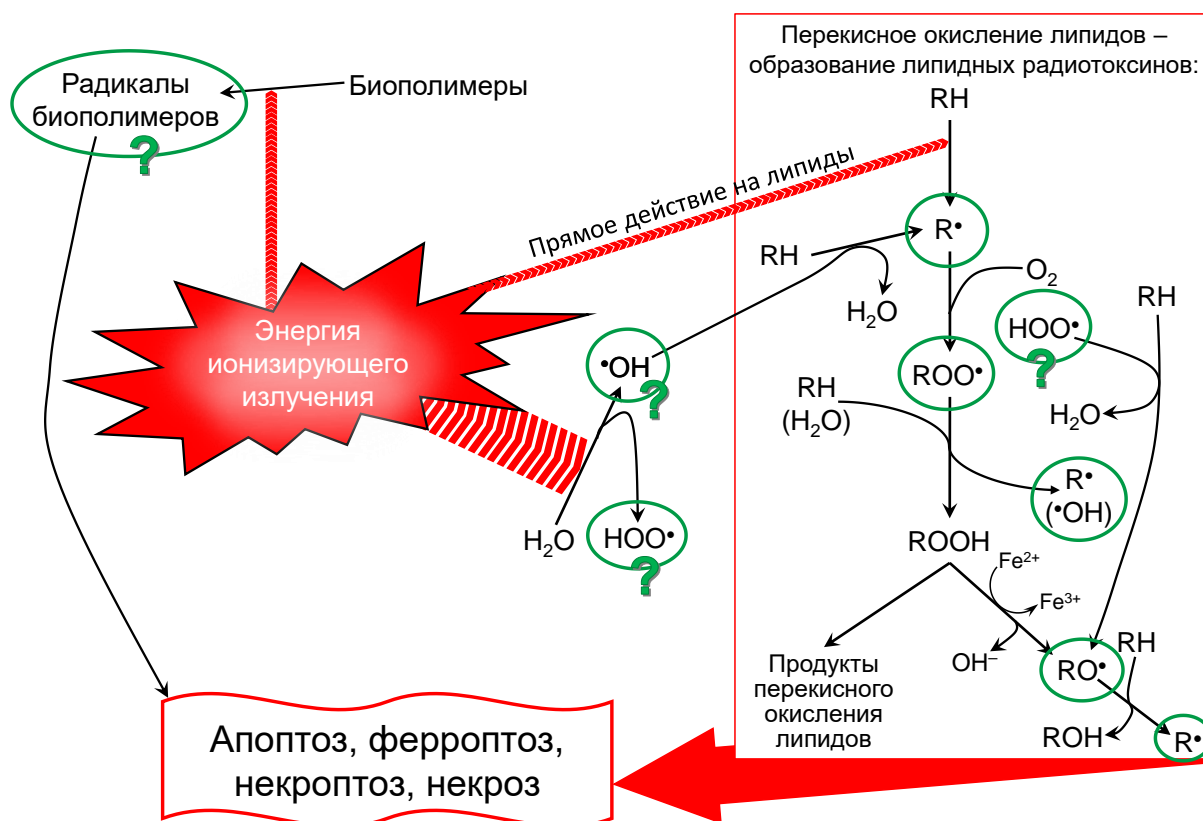


Рисунок 13. Предполагаемый механизм радиопротекторного действия препаратов на основе хлорофилла. Зелёным овалом отмечены радикалы, нейтрализуемые производными хлорофилла. Нейтрализация радикала приводит к блокировке каскада реакций на соответствующей стадии.

Вопросительный знак означает не проверенное эмпирически на молекулярной модели предположение о нейтрализации хлорофилловым препаратом соответствующего радикала.

#### 4. Заключение

Таким образом, мы показали, что при обработке экспериментальных данных, полученных с использованием хинолизидиновых производных кумарина в качестве активаторов ХЛ, сопровождающей катализируемую ферментом-пероксидазой липопероксидазную реакцию, необходимо учитывать быстрое снижение их концентрации в системе. В случае экспериментов на молекулярных моделях мы предлагаем для корректировки хемиллюминограмм использовать представленные в настоящей работе поправочные функции, но только в том случае, если участие производных кумарина в реакции предполагается непосредственно с начала регистрации ХЛ. При их применении можно будет изучать, к примеру, ингибирование процесса ферментативной липидной пероксидации АО, что позволит разработать средства подавления окислительного стресса, а также изобрести методики идентификации микробных токсинов, механизм действия которых заключается в разрушении мембран посредством их радикального окисления, и т.п. Однако в случае, скажем, изучения АО, вызывающих полную задержку в развитии ХЛ по причине первоочередной реакции с пероксидазой, целесообразно либо использовать выведенные аналогично с представленными в работе собственные поправочные функции, либо применять другие способы обработки данных, которые нивелируют погрешность, связанную со снижением концентрации активатора в системе.

Особо отмечаем установленный в ходе данной работы факт, что подавление ПОЛ играет весомую роль в механизме радиозащитного действия хлорофилла. Эти результаты нашей работы актуализируют будущие, более детальные исследования возможности применения хлорофилла и его производных в качестве как радиопротекторов, так и средств профилактики и терапии различных патологий, вызванных окислительным стрессом. Для бóльшей эффективности применения препаратов на основе хлорофилла и других АО необходимо детально изучить их фармакокинетику, а затем, на основании концентраций половинного угнетения интенсивности ПОЛ и коэффициентов их миграции в ткани-мишени и митохондрии, разработать конкретные алгоритмы их применения.

## 5. Выводы

1) Предложена схема участия хинолизидиновых производных кумарина в пероксидазном каталитическом цикле: эти вещества являются восстанавливающими субстратами феррипероксидазы с двумя окисленными эквивалентами. Определены константы скорости реакции псевдопервого порядка для разрушения С-314, С-334 и С-525, которое вызывает необходимость корректировки экспериментальных данных во время их обработки. В процессе же квазилипоксигеназной реакции интенсивного разрушения производных кумарина не обнаружено.

2) Выведены функции вычисления поправочных коэффициентов для корректировки хемиллюминограмм, полученных с использованием С-314, С-334 и С-525, при изучении липопероксидазной реакции, катализируемой ЦитС-КЛ, на молекулярной модели.

3) Впервые определены константы скорости разрушения железопорфириновой группировки в составе ЦитС, катализирующего пероксидазную реакцию. В процессе катализа квазилипоксигеназной реакции ЦитС не разрушается. Квазилипоксигеназный каталитический цикл проходит посредством не дву-, а одноэлектронного окисления пероксидазы с последующим восстановлением.

4) Действие ДГК (таксифолина) и тролокса на процесс ПОЛ, запускаемый ЦитС-КЛ, различно. Концентрация ДГК, вызывающая половинное угнетение ПОЛ, равна  $\approx 1,26$  мкМ.

5) В механизме радиозащитного действия препаратов на основе хлорофилла важную роль играет подавление реакций ПОЛ. Хлорофиллин угнетает липидную пероксидацию на 50% в концентрации  $\approx 3,7$  мкМ.

## 6. Список публикаций по теме диссертации

### 6.1 Статьи в изданиях, включённых в перечень ВАК для публикации

#### материалов диссертаций по специальности 1.5.2. Биофизика:

1. Ромодин Л.А., Владимиров Ю.А., Шангин С.В., Владимиров Г.К., Лысенко Н.П., Демихов Е.И. Изохинолизиновые производные кумарина в качестве активаторов хемилюминесценции в реакциях липидной пероксидации // *Биофизика*. – 2020. – Т. 65, № 4. С.: 680–690. (**переводная версия включена в МБЦ Scopus: Romodin L.A. et al. Isoquinoline Coumarin Derivatives as Chemiluminescence Activators in Reactions of Lipid Peroxidation // *Biophysics*. – 2020. – 65(4). P.: 577–586.**)
2. Ромодин Л.А., Владимиров Ю.А. Цитохром *c* как факультативный фермент-липопероксидаза митохондрий // *Вестник новых медицинских технологий*. – 2020 – Т. 27, № 4. С.: 102–105.
3. Ромодин Л.А. Угнетение хлорофиллином хемилюминесценции, сопровождающей катализируемую комплексом цитохрома *c* с кардиолипином квазилипоксигеназную реакцию // *Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология*. – 2020 – Т. 20, № 4. С.: 427–432.
4. Ромодин Л.А., Владимиров Ю.А., Лысенко Н.П. Разрушение цитохрома *c*, находящегося в комплексе с кардиолипином, при осуществлении катализа липопероксидазной реакции // *Биофизика*. – 2021 – Т. 66, № 1. С.: 71–77. (**переводная версия включена в МБЦ Scopus: Romodin L.A. et al. The Destruction of Cytochrome *c* in a Complex with Cardiolipin during Catalysis of Lipid Peroxidation // *Biophysics*. – 2021. – 66(1). P.: 59–64.**)
5. Ромодин Л.А., Владимиров Ю.А. Дигидрокверцетин и тролокс как ингибиторы липопероксидазной активности комплекса цитохрома *c* с кардиолипином // *Вестник новых медицинских технологий*. – 2021 – Т. 28, № 1. С.: 69–71.

#### 6.2 Патент:

Ромодин Л.А., Трифонова М.Ф., Лысенко Н.П., Бекузарова С.А. Способ определения химического участия активатора хемилюминесценции в липопероксидазной реакции. Патент РФ № 2720807. Заявлен 04.06.2019, опубликован 13.05.2020. Патентообладатель: Международная академия аграрного образования, Россия.



### **6.3. Прочие статьи в рецензируемых периодических изданиях:**

1. *Ромодин Л.А., Владимиров Ю.А., Лысенко Н.П., Зарудная Е.Н.* Принципиальная возможность использования метанольных растворов кумаринов С-314, С-334 и С-525 при изучении свойств комплекса цитохрома с с кардиолипином // *Известия Международной академии аграрного образования.* – 2018. – №42, том 1. С.: 102–106.
2. *Ромодин Л.А., Владимиров Ю.А., Лысенко Н.П., Зарудная Е.Н.* Обусловленность хемилюминесценции комплекса цитохрома с с кардиолипином его липопероксидазными свойствами // *Известия Международной академии аграрного образования.* – 2018. – №42, том 1. С.: 107–111.
3. *Ромодин Л.А., Владимиров Ю.А., Лысенко Н.П., Зарудная Е.Н.* Способность тролокса и дигидрокверцетина подавлять липопероксидазную активность комплекса цитохрома с с бычьим кардиолипином // *Известия Международной академии аграрного образования.* – 2018. – №42, том 1. С.: 112–117.
4. *Ромодин Л.А., Шангин С.В., Владимиров Ю.А., Лысенко Н.П., Храмов А.П.* Кинетические исследования участия кумаринов в пероксидазной реакции, катализируемой комплексом цитохрома с с кардиолипином, методом спектрофотометрии // *Известия Международной академии аграрного образования.* – 2018. – №42, том 1. С.: 118–123.
5. *Ромодин Л.А., Владимиров Ю.А., Лысенко Н.П., Трифонова М.Ф., Шангин С.В., Мартынова А.В.* Спектрофотометрические кинетические исследования участия кумарина С-334 в пероксидазной реакции, катализируемой комплексом цитохрома с с производными фосфатидной кислоты // *Научно-производственный журнал Наука (Казахстан).* – 2019. – №3, сентябрь 2019. С.: 18–22.

### **6.4 Публикации в сборниках материалов конференций**

1. *Ромодин Л.А., Зарудная Е.Н., Владимиров Ю.А.* Проапоптотическая активность комплекса цитохрома с с кардиолипином и возможности её подавления антиоксидантами // *Биология – наука XXI века: 21-я Международная Пущинская школа-конференция молодых учёных (Пущино, 17–21 апреля 2017 г.).* С. 73.

2. Ромодин Л.А., Зарудная Е.Н., Владимиров Ю.А. Комплекс цитохрома *c* с кардиолипином: биологическая роль и ингибирование антиоксидантами // Международная научная конференция по биоорганической химии «XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» и VII российский симпозиум «Белки и пептиды» (Москва, ИБХ РАН, 18–22 сентября 2017 – М.: Изд-во «Перо», 2017. – с. 43.
3. Ромодин Л.А., Владимиров Ю.А., Зарудная Е.Н. Особенности использования кумаринов как активаторов хемилюминесценции при изучении комплекса цитохрома *c* с кардиолипином // Всероссийская молодёжная конференция «Экспериментальная и теоретическая биофизика'17». 1 ноября 2017 г., Пущино. Сборник тезисов. – 2017. С.: 16–17.
4. Ромодин Л.А., Владимиров Ю.А., Зарудная Е.Н. Изучение комплекса цитохрома *c* с кардиолипином как липопероксидазы методом активированной хемилюминесценции // Конференция-школа молодых учёных «Достижения и перспективы супрамолекулярной и биологической химии в биомедицине и сельском хозяйстве». г. Москва. 4–10 декабря 2017 г. М.: ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина, 2017. – 174 с. С. 16.
5. Ромодин Л.А., Владимиров Ю.А., Зарудная Е.Н., Лысенко Н.П. Кумарин-активированная хемилюминесценция как инструмент в исследовании липопероксидазной активности комплекса цитохрома *c* с кардиолипином // БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА: 22-я Международная Пущинская школа-конференция молодых учёных. 23–27 апреля 2018 г, Пущино. Сборник тезисов, 2018. – 444 с. С. 434.
6. Ромодин Л.А., Зарудная Е.Н., Владимиров Ю.А., Лысенко Н.П. Влияние тролокса и дигидрокверцетина на липопероксидазную активность цитохрома *c* в комплексе с кардиолипином // Сборник по итогам конференции «Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны», СПб, 2018
7. Ромодин Л.А., Владимиров Ю.А., Лысенко Н.П., Зарудная Е.Н. Спектрофотометрическое доказательство обратимости действия метанола на структуру цитохрома *c* // Материалы национальной научно-практической конференции «Актуальные вопросы биологии, биотехнологии, ветеринарии, зоотехнии, товароведения и переработки сырья животного и растительного происхождения», часть II: сб. ст., 2019. – 204 с. С: 67–68.

8. *Шангин С.В., Ромодин Л.А., Владимиров Ю.А., Лысенко Н.П., Храмов А.П.* Спектрофотометрическое исследование участия кумарина С-314 в пероксидазной реакции, катализируемой комплексом цитохрома с с кардиолипином // Материалы национальной научно-практической конференции «Актуальные вопросы биологии, биотехнологии, ветеринарии, зоотехнии, товароведения и переработки сырья животного и растительного происхождения», часть II: сб. ст., 2019. – 204 с. С: 78–80.
9. *Ромодин Л.А., Владимиров Ю.А., Лысенко Н.П.* Качественная оценка взаимодействия между различными компонентами реакционной смеси, используемой для изучения липопероксидазной активности комплекса цитохрома с с кардиолипином // Материалы XI Международной научно-практической конференции – «Трансформация опыта менеджмента агробизнеса Европейского Союза в Казахстан и страны Центральной Азии», «Дулатовские чтения – 2019», 238 с. С.: 61–68.
10. *Ромодин Л.А., Владимиров Ю.А., Лысенко Н.П., Зарудная Е.Н.* Кумарин С-334 как субстрат липопероксидазной реакции, катализируемой комплексом цитохрома с с кардиолипином // БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА: 23-я Международная Пущинская школа-конференция молодых учёных. 15–19 апреля 2019 г., Пущино. Сборник тезисов, 2019. – 433 с. С.: 421–422.
11. *Шангин С.В., Ромодин Л.А., Владимиров Ю.А., Лысенко Н.П., Храмов А.П.* Кумарин С-525 как субстрат липопероксидазной реакции, катализируемой комплексом цитохрома с с кардиолипином // БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА: 23-я Международная Пущинская школа-конференция молодых учёных. 15–19 апреля 2019 г., Пущино. Сборник тезисов, 2019. – 433 с. С. 432.
12. *Ромодин Л.А., Зарудная Е.Н., Владимиров Ю.А., Лысенко Н.П.* Хемилюминесценция комплекса цитохрома с с кардиолипином как результат его липоксигеназной и липопероксидазной активности // Актуальные проблемы ветеринарной медицины, зоотехнии и биотехнологии: Сборник научных трудов. – М.: ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина, 2019. – 562 с. С.: 367–369.

13. Ромодин Л.А., Мартынова А.В., Владимиров Ю.А., Трифонова М.Ф., Лысенко Н.П. Оптические свойства кумарина С-525 // Актуальные проблемы ветеринарной медицины, зоотехнии и биотехнологии: Сборник научных трудов. – М.: ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина, 2019. – 562 с. С.: 503–504.
14. Шангин С.В., Ромодин Л.А., Владимиров Ю.А., Лысенко Н.П., Храмов А.П. Спектрофотометрическое исследование участия кумарина С-525 в пероксидазной реакции, катализируемой комплексом цитохрома с с кардиолипином // Актуальные проблемы ветеринарной медицины, зоотехнии и биотехнологии: Сборник научных трудов. – М.: ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина, 2019. – 562 с. С.: 513–514.
15. Прокофьева А.А., Ромодин Л.А., Зарудная Е.Н., Лысенко Н.П. Антиоксидантные свойства водорастворимой формы хлорофилла // БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА: 24-я Международная Пущинская школа-конференция молодых учёных. 2020, Пущино. Сборник тезисов, 2020. – 445 с. С.: 122–123.
16. Мартынова А.В., Ромодин Л.А., Владимиров Ю.А., Лысенко Н.П. Изучение оптических свойств coumarin-525 в среде фосфатного буфера // БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА: 24-я Международная Пущинская школа-конференция молодых учёных. 2020, Пущино. Сборник тезисов, 2020. – 445 с. С. 337.
17. Ромодин Л.А., Владимиров Ю.А., Лысенко Н.П. Участие изохинолизинового производного кумарина, С-314, в квазилипоксигеназной и липопероксидазной реакциях, катализируемых комплексом цитохрома с с кардиолипином // БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА: 24-я Международная Пущинская школа-конференция молодых учёных. 2020, Пущино. Сборник тезисов, 2020. – 445 с. С. 343.
18. Шангин С.В., Ромодин Л.А., Байматов В.Н., Храмов А.П. Разрушение цитохрома с в ходе катализируемой им реакции пероксидации фосфатидной кислоты // БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА: 24-я Международная Пущинская школа-конференция молодых учёных. 2020, Пущино. Сборник тезисов, 2020. – 445 с. С.: 357.

19. Ромодин Л.А. Кумариновые производные как активаторы хемилюминесценции при катализируемой цитохромом *c* липопероксидазной реакции // Сборник научных работ победителей и призёров Всероссийского конкурса на лучшую научную работу среди студентов, аспирантов и молодых учёных высших учебных заведений Минсельхоза России. Москва: ФГБНУ «Росинформагротех», 2020. – 284 с. С.: 200–205.
20. Ромодин Л.А., Лысенко Н.П. Корректировка результатов хемилюминесцентных исследований липопероксидазной активности комплекса цитохрома *c* с кардиолипином, проведённых с использованием *coumarin-525* на молекулярной модели // Материалы национальной научно-практической конференции «Актуальные вопросы биологии, биотехнологии, ветеринарии, зоотехнии, товароведения и переработки сырья животного и растительного происхождения», часть II: сб. ст., 2021. – 126 с. С.: 48–50.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

**АО** – антиоксидант(ы); **ДГК** – дигидрокверцетин (таксифолин);  
**БКЛ** – кардиолипин, выделенный из сердца быка;  
**КЛ** – кардиолипин; **МБЦ** – международная база цитирования;  
**ПОЛ** – перекисное окисление липидов; **ТОКЛ** – 1,1',2,2'-тетраолеилкардиолипин; **ФК** – фосфатидная кислота;  
**ХЛ** – хемилюминесценция; **ЦитС** – цитохром *c*; **ЦитС-БКЛ** – комплекс цитохрома *c* с кардиолипином, выделенным из сердца быка;  
**ЦитС-КЛ** – комплекс цитохрома *c* с кардиолипином;  
**ЦитС-ТОКЛ** – комплекс цитохрома *c* с 1,1',2,2'-тетраолеилкардиолипином;  
**С-314** – coumarin-314 – хинолизидин[5,6,7-*gh*]3-этоксикарбонилкумарин;  
**С-334** – coumarin-334 – хинолизидин[5,6,7-*gh*]3-ацетилкумарин;  
**С-525** – coumarin-525 – хинолизидин[5,6,7-*gh*]3,2'-бензимидазолилкумарин.