

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «МОСКОВСКАЯ  
ГОСУДАРСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ И  
БИОТЕХНОЛОГИИ – МВА ИМЕНИ К.И. СКРЯБИНА»

На правах рукописи

**РОМОДИН ЛЕОНИД АЛЕКСАНДРОВИЧ**

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

1.5.2. Биофизика

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

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

Москва – 2021

## СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	6
Актуальность темы исследования и степень её разработанности к началу выполнения работы .....	6
Цель исследования .....	7
Задачи исследования.....	8
Научная новизна.....	8
Теоретическая и практическая значимость работы.....	9
Методология и методы исследования.....	10
Положения, выносимые на защиту .....	10
Личный вклад автора .....	11
Степень достоверности данных, изложенных в диссертации .....	11
Апробация результатов, представляемых в настоящей диссертации .....	11
Публикации.....	13
Структура и объём диссертации.....	13
Список встречающихся сокращений .....	14
1. Обзор литературы.....	15
1.1 Окислительный стресс и свободнорадикальное окисление в организме.....	15
1.2 Апоптоз и другие формы гибели клеток .....	16
1.3 Комплекс цитохрома <i>c</i> с кардиолипином.....	18
1.3.1 Цитохром <i>c</i> .....	18
1.3.2 Кардиолипин .....	20
1.3.3 Описание комплекса цитохрома <i>c</i> с кардиолипином.....	21
1.4 Явление хемилюминесценции и механизм его возникновения .....	27

1.4.1 Обнаружение свободных радикалов в биологических системах, собственная хемилюминесценция.....	28
1.4.2 Активированная хемилюминесценция .....	35
1.4.3 Производные кумарина и их применение в хемилюминесцентных исследованиях.....	41
1.5 Антиоксиданты как ингибиторы окислительного стресса .....	46
2. Материалы и методы.....	49
2.1 Реагенты .....	49
2.2 Основная аппаратура для проведения экспериментов.....	50
2.3 Методики .....	51
2.3.1 Спектрофотометрические методики.....	51
2.3.2 Спектрофлуориметрическое исследование разрушения цитохрома <i>c</i> , катализирующего липопероксидазную реакцию .....	53
2.3.3 Измерения хемилюминесценции.....	53
2.3.4 Вычисление концентраций на основании серий спектров поглощения.....	56
2.3.5 Статистическая обработка результатов.....	58
3 Результаты.....	59
3.1 Оптические свойства хинолизидиновых производных кумарина в среде 20 мМ фосфатного буфера .....	59
3.2 Спектрофотометрический анализ обратимости изменения конформации (развёртывания) цитохрома <i>c</i> под действием метанола .....	60
3.3 Подтверждение обусловленности хемилюминесценции системы цитохром <i>c</i> –кардиолипид ферментативной активностью цитохрома <i>c</i> .....	62

3.4 Анализ течения квазилипоксигеназной и липопероксидазной реакций, катализируемых комплексом цитохрома <i>c</i> с кардиолипином в присутствии хинолизидинового производного кумарина.....	64
3.4.1 Спектрофотометрический анализ участия хинолизидиновых производных кумарина в пероксидазной реакции, катализируемой комплексом цитохрома <i>c</i> с тетраолеилкардиолипином.....	65
3.4.2 Спектрофотометрический анализ участия хинолизидиновых производных кумарина в квазилипоксигеназной и липопероксидазной реакциях, катализируемых комплексом цитохрома <i>c</i> с кардиолипином.....	73
3.5 Анализ хемилюминесценции, сопровождающей катализируемые комплексом цитохрома <i>c</i> с кардиолипином реакции.....	78
3.6 Разрушение цитохрома <i>c</i> , находящегося в комплексе с кардиолипином, при осуществлении катализа липопероксидазной реакции.....	81
3.7 Влияние дигидрокверцетина и тролокса на липопероксидазную активность комплекса цитохрома <i>c</i> с к кардиолипином.....	87
3.8 Угнетение хлорофиллином хемилюминесценции, сопровождающей катализируемую комплексом цитохрома <i>c</i> с кардиолипином квазилипоксигеназную реакцию.....	94
4 Обсуждение результатов.....	97
4.1 Использование обратимости изменения конформации цитохрома <i>c</i> под действием метанола применительно к настоящей работе.....	97
4.2 Обусловленность хемилюминесценции системы цитохром <i>c</i> –кардиолипин ферментативной активностью цитохрома <i>c</i> .....	98
4.3 Хинолизидиновые производные кумарина как активаторы хемилюминесценции в процессе квазилипоксигеназной и липопероксидазной реакций, катализируемых комплексом цитохрома <i>c</i> с кардиолипином.....	99

4.4 Предполагаемый механизм участия хинолизидиновых производных кумарина в катализируемой комплексом цитохрома <i>c</i> с кардиолипином липопероксидазной реакции. ....	102
4.5 Поправочные функции, учитывающие разрушение кумариновых активаторов в ходе ферментативной липидной пероксидации.....	107
4.6 Цитохром <i>c</i> как факультативная пероксидаза.....	112
4.6.1 Разрушение цитохрома <i>c</i> , находящегося в комплексе с кардиолипином, при осуществлении катализа липопероксидазной реакции .....	114
4.6.2 Предполагаемый механизм катализа квазилипоксигеназной реакции ..	118
4.7 Дигидрокверцетин и тролокс как ингибиторы катализируемой комплексом цитохрома <i>c</i> с к кардиолипином липопероксидазной реакции .....	121
4.8 Хлорофиллин как ингибитор процессов липидной пероксидации .....	128
4.9 Перспективы использования и возможные механизмы радиопротекторного действия хлорофилла и его производных .....	131
5. Заключение .....	135
6. Выводы .....	136
Благодарности.....	137
Список использованной литературы.....	138

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования и степень её разработанности к началу выполнения работы

Многие патологии сопряжены с процессами перекисного окисления липидов. Они могут вызывать гибель клеток по механизмам ферроптоза, посредством реакции Фентона и активности ферментов-липоксигеназ [188, 210], и апоптоза по митохондриальному (внутреннему) пути [36]. При последнем ключевую роль играет комплекс цитохрома *c* с кардиолипином, за счёт липопероксидазной [36, 41] и квазилипоксигеназной (окисляющим субстратом фермента выступают липидные гидроперекиси вместо  $H_2O_2$ ) активности, которую приобретает цитохром *c* при изменении конформации под действием кардиолипина и которая приводит к разрушению митохондриальных мембран и выходу проапоптотических факторов в цитозоль. Катализируемую комплексом цитохрома *c* с кардиолипином липидную пероксидацию целесообразно изучать методом регистрации активированной (усиленной люминесцентными добавками – т.н. активаторами) хемилюминесценции [35].

Активаторы 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 липидной пероксидации.

Для получения адекватных сведений об интенсивности протекания реакций перекисного окисления липидов предпочтительно использовать активаторы хемилюминесценции, сохраняющие свою концентрацию неизменной в течение времени реакции.

Хинолизидиновые производные кумарина на системе, в которой идёт  $Fe^{2+}$ -индуцированное перекисное окисление липидов, были ранее показаны как специфические физические активаторы хемилюминесценции для реакций липидной пероксидации, не реагирующие с компонентами реакционной смеси

[422]. Далее это свойство переносилось и на системы, где липидная пероксидация катализируется ферментом-пероксидазой [35, 53]. 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'-бензимидазоллилкумарина – известных в англоязычной литературе как coumarin-314, coumarin-334 и coumarin-525 соответственно, при их обработке смесью комплекса цитохрома *c* с кардиолипином и перекиси водорода [106, 107].

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

### **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'-бензимидазоллилкумарина – при изучении кинетики процесса перекисного окисления липидов, катализируемого факультативной пероксидазой на примере комплекса цитохрома *c* с кардиолипином.

### Задачи исследования

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

### Научная новизна

Показано разрушение хинолизидиновых производных кумарина в катализируемой комплексом цитохрома *c* с кардиолипином липопероксидазной реакции и впервые определены константы скорости данного процесса. На их основе выведены функции вычисления поправочных коэффициентов для обработки хемилюминограмм. Впервые вычислены константы скорости разрушения железопорфириновой группировки в составе молекулы цитохрома *c* в процессе катализа пероксидазной реакции. Установлен механизм участия хинолизидиновых производных кумарина в каталитическом пероксидажном цикле: они являются восстанавливающими субстратами ферриформы цитохрома *c* 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 цитохрома *c* с одним окисленным эквивалентом (компаунда 2). Предположен возможный молекулярный механизм радиопротекторного действия производных хлорофилла, заключающийся в ингибировании липидной перекисидации. Разработан алгоритм проведения спектрофотометрического исследования участия вещества в ферментативной пероксидазной реакции; его новизна и оригинальность подтверждены патентом Российской Федерации № 2720807.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Новые сведения о механизмах протекания квазилипидоксигеназной реакции, катализируемой комплексом цитохрома *c* с кардиолипином, и сведения о механизме взаимодействия кумариновых активаторов с ферментом-пероксидазой, а также о свойствах цитохрома *c* 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 хемилюминесценции в ферментативных пероксидазных реакциях позволяет исследовать различные вещества на предмет возможности их применения в качестве активаторов хемилюминесценции для оценки течения реакции образования свободных радикалов. Выведенные нами функции для корректировки хемилюминограмм, полученных при использовании хинолизидиновых производных кумарина, позволяют адекватно оценивать изменение динамики образования свободных радикалов при введении в систему комплекс цитохрома *c* с кардиолипином– $H_2O_2$ –липидный субстрат различных антиоксидантов и прочих факторов. Данные о подавлении антиоксидантами липопероксидазной реакции, катализируемой комплексом цитохрома *c* с кардиолипином, и механизме радиопротекторного действия производных хлорофилла актуализируют дальнейшие исследования по разработке в медицине и ветеринарии средств терапии и профилактики патологий, вызванных окислительным стрессом.

## Методология и методы исследования

В ходе выполнения настоящего диссертационного исследования основными экспериментальными методами были метод регистрации хемилюминесценции, спектрофотометрический метод и метод регистрации оптической плотности на одной длине волны. Концентрации веществ в системе в процессе липопероксидазной реакции вычислялись по формулам, выведенным из уравнения закона Бугера–Ламберта–Бера. Опытным измерениям соответствуют контрольные эксперименты, данные которых позволяют достоверно и адекватно интерпретировать результаты исследования. Подробно экспериментальные методики изложены в разделе «2.3 Методики» настоящей диссертации. Статистически результаты обрабатывались средствами программного обеспечения «MS Excel» с использованием t-критерия Стьюдента.

### Положения, выносимые на защиту

- 1) Хинолизидиновые производные кумарина являются восстанавливающими субстратами цитохрома *c*, проявляющего свойства фермента-пероксидазы. Их участие в каталитическом пероксидазном 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 перекисного окисления липидов, экспериментальные хемилюминесцентные кривые необходимо корректировать с помощью математических функций, учитывающих уменьшение концентрации активатора в процессе реакции.
- 2) Цитохром *c* разрушается при катализе пероксидазной реакции и не разрушается при катализе квазилипосигеназной реакции.
- 3) Квазилипосигеназный 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 антиоксидантов методом регистрации хемилюминесценции ограничено теми антиоксидантами, 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.

### **Личный вклад автора**

Все эксперименты, представленные в разделе «Результаты» настоящей работы, а также их планирование, обработка и интерпретация экспериментальных данных проведены лично автором. Эксперимент по изучению действия метанола на железосерные связи в цитохроме *c* был выполнен совместно с аспирантом кафедры медицинской биофизики факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова Георгием Константиновичем Владимировым, проводившим вычитание базовой линии из спектра поглощения средствами программного обеспечения «Fityk0.9.8.».

### **Степень достоверности данных, изложенных в диссертации**

Достоверность изложенных в настоящей диссертации данных подтверждается воспроизводимостью результатов экспериментальных измерений и их статистической обработкой. При работе использовались методы исследования, адекватные поставленным цели и задачам, качественные расходные материалы и лабораторное оборудование.

### **Апробация результатов, представляемых в настоящей диссертации**

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 Дипломом 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 Пущинских 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 заседании кафедры радиобиологии и вирусологии имени академиков А.Д. Белова и В.Н. Сюрица 28.09.2020 г. и межкафедральном заседании в ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина 05.11.2020 г.

### ***Публикации***

На основании материалов, представленных в настоящей диссертации, опубликована 31 работа, среди которых 1 патент на изобретение, 5 статей в рецензируемых отечественных журналах, рекомендованных ВАК для публикации научных результатов диссертаций на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. Биофизика, 2 статьи в издании, включённом в международную базу цитирования Scopus.

### **Структура и объём диссертации**

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

### Список встречающихся сокращений

**АТФ** – аденозинтрифосфат

**АФК** – активные формы кислорода

**ДГК** – дигидрокверцетин (таксифолин)

**БКЛ** – кардиолипин, выделенный из сердца быка

**МДА** – малоновый диальдегид

**ПОЛ** – перекисное окисление липидов

**СОД** – супероксиддисмутаза

**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-ТОКЛ** – комплекс цитохрома *c* с 1,1',2,2'-тетраолеилкардиолипином

**ЭВС** – электронные возбуждённые состояния

**ЭДТА** – этилендиаминтетраацетат

**ЭПР** – электронный парамагнитный резонанс

**Araf-1** – apoptotic protease activating factor-1 – фактор 1, активирующий апоптотические протеазы

**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

**GSH** – свободный восстановленный глутатион

**J** – интенсивность хемилюминесценции

**NADPH** – восстановленный никотинамидадениндинуклеотидфосфат

**Q** – квантовый выход

**$\epsilon$**  – эффективный коэффициент молярного поглощения в среде 20 мМ фосфатного буфера

## 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Настоящая работа входит в обширную область исследований, в конечном счёте посвящённых изучению путей воздействия на процессы свободнорадикального окисления, ведущего к апоптозу и другим способам клеточной гибели. Нескомпенсированная пролиферацией гибель клеток рассматривается рядом авторов как причина старения высших животных [123, 227, 424] и так называемой медленной смерти растений [3-6]. По этой причине, на наш взгляд, было бы правильно посвятить указанным процессам несколько абзацев.

### 1.1 Окислительный стресс и свободнорадикальное окисление в организме

Термин «окислительный (оксидативный, оксидантный) стресс» выдвинул Г. Зис, обозначив его как «дисбаланс между оксидантами и антиоксидантами в пользу оксидантов, что потенциально может привести к повреждению» [388]. Данный процесс напрямую связан со свободнорадикальными реакциями. На рисунке 1 в общих чертах показан метаболизм свободных радикалов в клетках.

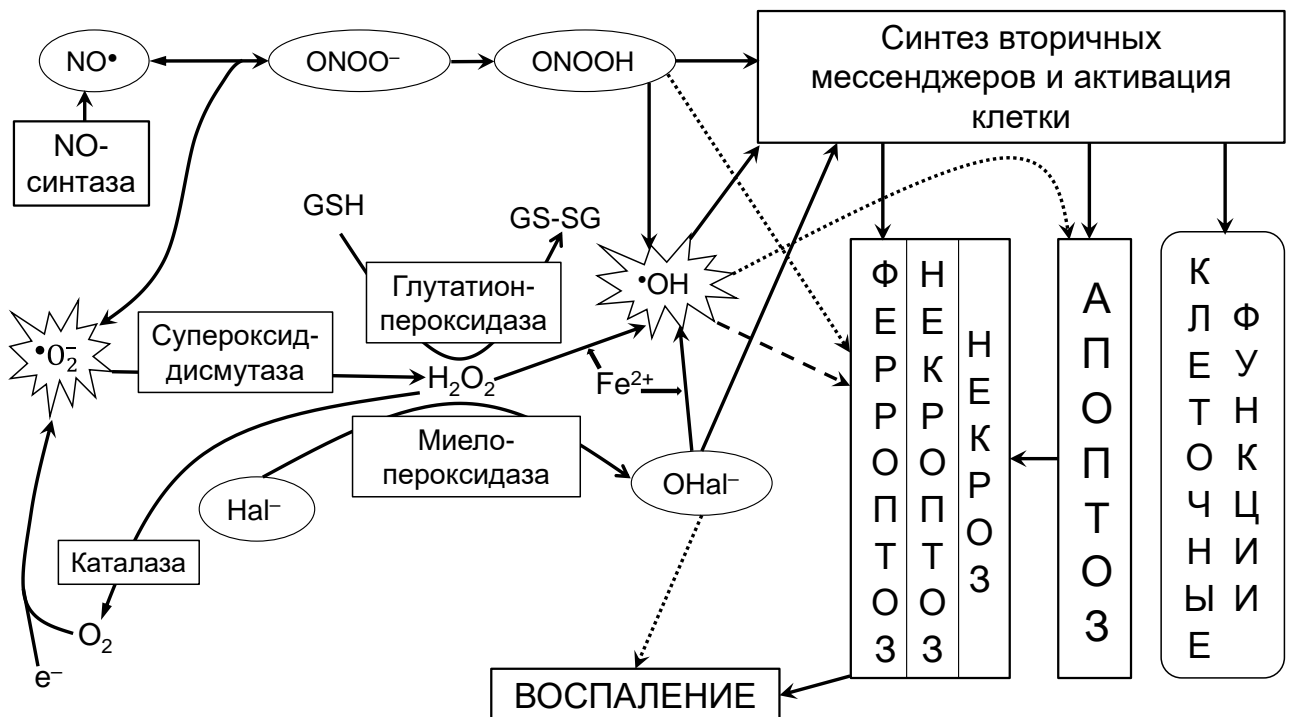


Рисунок 1. Метаболические пути и роль свободных радикалов в клетке [12, 35, 79, 93, 130, 154, 170, 340], GSH – восстановленный глутатион, GS-SG – димер глутатиона

Свободный радикал – это частица, имеющая свободную валентность вследствие наличия неспаренного электрона, что обуславливает высокую

реакционную способность и короткое время жизни. Впервые описанные М. Гомбергом [236-238], радикалы могут возникать как в химических реакциях, так и в результате ряда воздействий на молекулы физических факторов [2, 13, 62, 80]. При этом, помимо деструктивной роли, приводящей к гибели клеток [93, 130, 223, 240, 318], и участия в иммунном ответе [164, 405, 442], свободные радикалы и активные формы кислорода (АФК) могут оказывать на организм стимулирующее действие путём активации системы антиоксидантной защиты [60, 110, 117], а также играть роль в регуляторных процессах [58, 75-77, 325].

## 1.2 Апоптоз и другие формы гибели клеток

Явление апоптоза впервые описали Дж. Керр, А. Вили и А. Кьюрри в 1972 году в работе [275], а сам термин «апоптоз» в переводе с греческого языка означает «опадание листьев, листопад» [4]. Также, особенно в 1970–1980-х гг., наряду с этим термином использовался и термин «cell suicide», «самоубийство клеток» [320, 355, 410]. Иногда для обозначения апоптоза вследствие нарушения адгезии клетки ткани с соседними или с внеклеточным матриксом используют термин «аноиксис» [402]. Определить апоптоз можно как способ гибели клеток, при котором генетически заложенная программа клеточной смерти реализуется целиком и полностью за счёт ресурсов самой клетки: с использованием её же ферментов и с затратой её же энергии, синтезированной ранее для нужд этой клетки, причём данный процесс не сопровождается развитием тканевого воспаления вследствие «самоупаковки» частей погибшей клетки в везикулы.

Именно последнее является главным классификационным отличием апоптоза от различных некротических вариантов гибели клетки [14, 328, 440]. Среди них, помимо классического некроза, развивающегося вследствие неспецифического воздействия разного рода деструктивных факторов [85, 133, 157, 196, 217, 232, 359, 367, 399, 450, 456], можно выделить и несколько вариантов некрозоподобной запрограммированной клеточной гибели: некроптоз [234], пироптоз [266, 411] и ферроптоз – форму запрограммированной гибели клетки, открытую уже во втором десятилетии XXI века [210], в развитии которой большую роль играет перекисное окисление липидов (ПОЛ), развивающееся, в отличие от



апоптоза по митохондриальному пути, без участия компонентов дыхательной цепи митохондрий [411]. При этом в случае ферроптоза, в отличие от других способов некротической гибели клеток, механизм запуска воспалительных реакций до конца пока не ясен [362]. При этом установлено, что гибель клетки по механизму ферроптоза может запустить процесс гибели по механизму некроптоза близрасположенных клеток [197].

Помимо вышеуказанных, в литературе описаны и другие формы запрограммированной гибели клеток, занимающие промежуточное положение между некрозоподобными и истинным апоптозом: нетоз [286], энтоз [158, 305] и стоящая несколько особняком от них аутофагия [171, 206].

Если вернуться к апоптозу, то его тема по сравнению с изучением других вариантов гибели клеток остаётся наиболее актуальной. Так, база данных научных публикаций «PubMed» на запрос найти работы, в названии которых есть слово «apoptosis» (поиск был проведён 31.10.2020 г.), показала 110957 публикаций. А рост интереса к данной тематике наблюдается с начала последнего десятилетия прошлого века: 1991-м годом датируется всего 94 публикации, 2000-м – уже 3921, 2010-м – 4797, 2018-м – 6767, а за неполный 2020 год найдено 6112 публикаций.

Поиск средств ингибирования апоптоза может помочь при терапии ряда патологий, например: дегенерации сетчатки [242, 431, 434], различных нейродегенеративных заболеваний – бокового амиотрофического склероза, болезни Хантингтона, атаксии Фридрейха [254], болезни Альцгеймера [182, 248, 254] и болезни Паркинсона, [24, 221, 231, 254, 439], – а также инфарктов [342] и других кардиодегенеративных патологий [319]. А изыскание механизмов запуска апоптоза необходимо для лечения онкологических заболеваний – в этом направлении также проводится большое количество исследований [150, 163, 189, 248, 307, 391, 436].

Программа апоптоза запускается в клетке двумя путями: внутренним, или митохондриальным, и внешним, или рецепторно-опосредованным (рецепторным).

Рецепторный путь активации апоптоза во взрослом организме реализуется в основном при различных иммунологических реакциях [191, 228, 295, 335, 363, 397].

Он обусловлен взаимодействием лигандов с DR (Death receptors – рецепторы смерти), делящихся в зависимости от особенностей процесса передачи сигнала на несколько групп: FasR [372], TNFR [179], рецепторы системы TRAIL (DR4 и DR5) [179, 326, 372, 433] и менее изученные DR3 [300] и DR6 [394].

При митохондриальном механизме развития апоптоза вследствие нарушения целостности мембран митохондрий в цитозоль клетки попадает цитохром *c* [392], в обычных условиях выполняющий роль переносчика электронов между III и IV комплексами дыхательной цепи митохондрий [271]. В цитоплазме цитохром *c* посредством Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1 — фактор 1, активирующий апоптотические протеазы) [181, 383, 448], инициаторной каспазы-9 и эффекторной каспазы-3 [172, 347] запускает каскад апоптотических реакций [330]. Параллельно протекает некаспазный каскад реакций апоптоза [413], реализующийся за счёт вышедших из митохондрии эндонуклеазы G (EndoG) [169] и схожего с ней по функциям флавопротеина AIF (от Apoptosis-inducing factor, фактор индукции апоптоза) [310, 401, 443].

В литературе приводится много данных о том, что до высвобождения цитохрома *c* в цитозоль происходит образование его комплекса с кардиолипином, обладающего липопероксидазной активностью, приводящей к разрушению мембран митохондрий [24, 27, 30, 36, 37, 40, 41, 52-54, 92, 166, 270, 327].

### **1.3 Комплекс цитохрома *c* с кардиолипином**

Для полного понимания изучаемого в настоящей работе аспекта необходимо подробнее рассмотреть комплекс цитохрома *c* с кардиолипином: описать его строение и пероксидазную активность, предварительно проанализировав общие сведения по составляющим его веществам.

#### ***1.3.1 Цитохром *c****

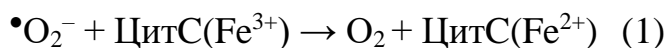
Цитохром *c* является шаровидным гемопротеином, массой немного большей, чем 12 кДа; в его состав у разных видов входит 94–114 аминокислотных остатков [247]. Роль этого белка в осуществлении процесса клеточного дыхания была установлена в первой трети XX века в работах [272, 273].

Апопротеин цитохрома *c* кодируется геном *CYCS* (у млекопитающих), локализованном в ядерной ДНК. По данным базы HGNC (HGNC-индекс 19986, на web-странице приведена ссылка на статью [403]) у человека указанный ген локализован в 3-й полосе 15-го участка короткого плеча 7-й хромосомы.

На момент начала 3-го десятилетия XXI века установлены 4 канонические функции цитохрома *c* в клетках высших животных:

1) перенос электронов в митохондриальной дыхательной цепи с комплекса III на комплекс IV за счёт изменения степени окисления гемового железа с +3 на +2 на III комплексе и с +2 на +3 на IV комплексе [250];

2) окисление супероксидного радикала до молекулярного кислорода:



Таким образом окисленная форма цитохрома *c* выступает в качестве антиоксиданта, предотвращающего воздействие супероксида на клетку [36];

3) катализ реакций ПОЛ, осуществляемый цитохромом *c*, находящимся в комплексе с митохондриальным фосфолипидом кардиолипином [36]. Данная функция будет рассмотрена подробнее в следующих разделах работы;

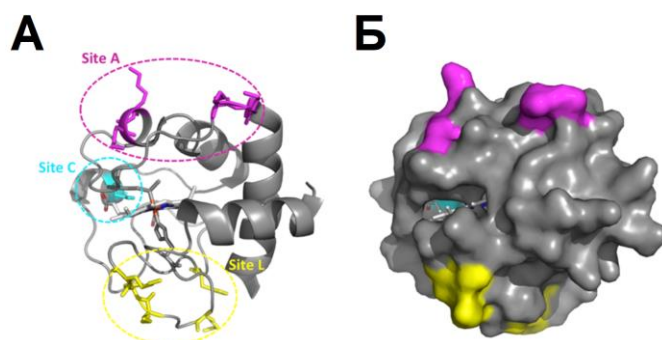
4) участие в развитии апоптоза через активацию инициаторной каспазы-9 в цитоплазме в результате формирования апоптосомы при связывании цитохрома *c* с Аraf-1 [308]; это связывание в наибольшей степени обусловлено аминокислотными остатками Gly56, Lys72, Pro76, Ile81 [458].

Гем нативного свободного цитохрома *c* почти полностью находится внутри белковой глобулы [247]. А его часть, доступная для растворителя, окружена заряженными остатками аргинина и лизина для создания вокруг неё гидрофильного микроокружения [247, 360]. Видимо, это способствует такому положению

*Рисунок 2.* Сайты связывания фосфолипидов в цитохроме *c* лошади [247].

А. Молекула цитохрома *c* лошади с изображением сайтов связывания фосфолипидов: сайт А (розовый), сайт С (бирюзовый), сайт L (жёлтый).

Б. Рельеф поверхности цитохрома *c*.



каталитического центра, которое наиболее эффективно для переноса электронов между III и IV комплексами дыхательной цепи [360]. Авторы [247] подробно описали строение пептидного окружения гема цитохрома *c*. В работах [247, 301, 331] описаны возможные первичные сайты связывания с кардиолипином на поверхности молекулы цитохрома *c* (см. рис. 2).

Поскольку цитохром *c* находится в межмембранном пространстве, то вполне логично, что он имеет высокое сродство к фосфолипидам мембран. При физиологических значениях pH цитохром *c* обладает общим зарядом, равным +8, при том, что значение изоэлектрической точки у данного белка лежит в диапазоне между 10,2 и 10,5 [282], такой заряд белковой глобулы способствует её электростатическому связыванию с отрицательно заряженными головками молекул кардиолипина [247].

### 1.3.2 Кардиолипин

Глицерофосфолипид кардиолипин (1,3-бис(*sn*-3'-фосфатидил)-*sn*-глицерин) встречается у эукариот и бактерий [379], но не обнаружен у архей (вместо него у них имеются его аналоги [198]).

Кардиолипин находится практически исключительно в составе внутренней мембраны митохондрий [277]. Благодаря своему строению, представленному на рисунке 3, он способен формировать в мембране локальные микродомены, что необходимо для формирования изогнутых крист митохондрий [148, 438].

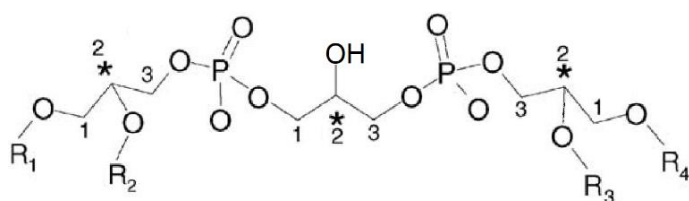


Рисунок 3. Обобщённая формула кардиолипина, где  $R_1, R_2, R_3, R_4$  – радикалы жирных кислот, \* – углеродный атом, который может выступать в роли хирального центра, цифры обозначают номера атомов углерода согласно *sn*-номенклатуре [380].

В кардиолипине эукариот, в сравнении с прокариотическим, ацильные цепи длиннее и более ненасыщенны [283, 379, 380]. У млекопитающих ацильный состав кардиолипина в разных тканях существенно различается, и ярко выражена молекулярная асимметрия ацилов (различное местоположение заместителей) [379]. А содержание кардиолипина среди других фосфолипидов в тканях пропорционально их катаболической активности [209, 220, 428].

Кардиолипин выполняет такие важнейшие функции, как белковый транспорт и обеспечение условий для проникновения ионов через мембрану [261, 285], клеточный сигналинг [351], поддержание функционирования дыхательной цепи [239] и АТФ-синтазы [215, 334], поддержание рН в межмембранном пространстве за счёт выполнения роли протонной ловушки [243]. Установлено, что при полном отсутствии кардиолипина в клетках нарушаются синтез глутатиона [352] и работа белков, содержащих Fe-S-кластеры [350].

Кардиолипин сам по себе может влиять на развитие апоптоза: был обнаружен такой фермент как кардиолипин-специфичная оксигеназа. Он катализирует образование гидроперекиси кардиолипина, что приводит к перемещению кардиолипина во внешнюю митохондриальную мембрану и образованию в ней пор [269], через которые свободные молекулы цитохрома *c* могут выходить в цитоплазму. Но при этом в клетках с дефицитом цитохрома *c* кардиолипин не окисляется, а апоптоз не запускается [37].

### 1.3.3 Описание комплекса цитохрома *c* с кардиолипином

#### 1.3.3.1 Структура комплекса цитохрома *c* с кардиолипином

Авторы [268] отмечают на поверхности цитохрома *c* два сайта, где может происходить связывание с кардиолипином, – Lys99 и Lys100. При этом кардиолипин, имеющий полиненасыщенные ацилы, связывается легче, чем содержащий мононенасыщенные [301]. Авторы [247] предполагают две конформации цитохрома *c* в составе комплекса с кардиолипином: одна напоминает его нативную конформацию, а вторая – частично развёрнутую (см. Рис 4).

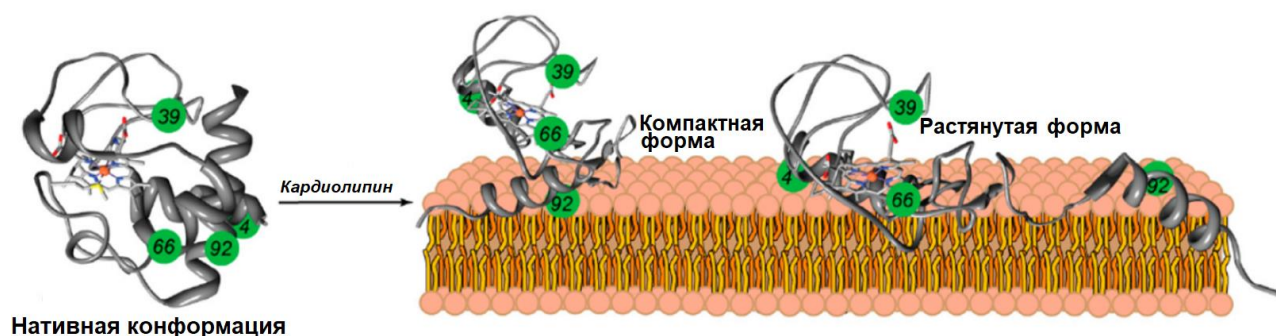


Рисунок 4. Варианты конформации цитохрома *c* в составе его комплекса с кардиолипином по версии [247]. Цифры отражают наиболее гибкие участки, помеченные при исследовании флуорофорами.

Обе эти версии является логическим продолжением концепции о «мембрано-связанном» кардиолипине (Рис. 5а). Однако на кривых малоуглового рассеяния рентгеновских лучей наблюдались пики, соответствующие рефлексам первого, второго и третьего порядков, характерные для кубической кристаллической ячейки, в которую может быть вписана сфера диаметром 11,2 нм [33]. Авторы работы [290] назвали её наносферой. Скорее всего, она состоит из монослоя кардиолипина, окружающего глобулу цитохрома *c* (Рис. 5б) [33].

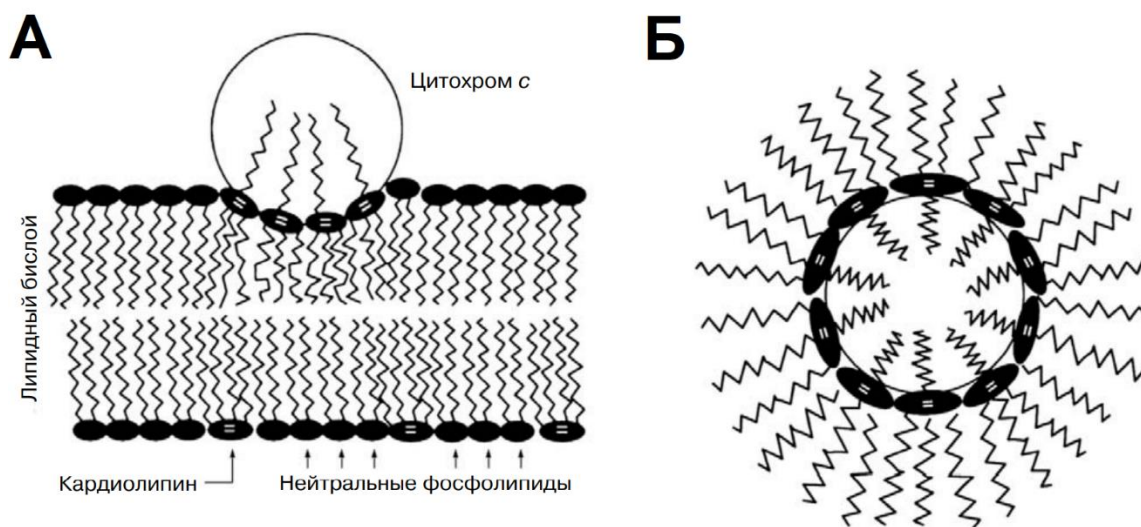


Рисунок 5. Две альтернативные модели структуры комплекса цитохрома *c* с кардиолипином [36].

А. Цитохром *c* прикреплен к мембране за счёт электростатического взаимодействия с кардиолипином; Б. Наносфера комплекса цитохрома *c* с кардиолипином. Молекула цитохрома *c* в состоянии «частично расплавленной» глобулы окружена монослоем из молекул кардиолипина.

Монослой кардиолипина имеет среднюю толщину 2,8 нм [253]. Учитывая размер двух монослоёв (5,4–5,8 нм) и диаметр всей рассматриваемой супрамолекулярной структуры (11,2 нм), диаметр цитохрома *c* в составе этого комплекса оказывается равным 5,6 нм, что заметно больше диаметра свободной нативной его молекулы *c* в водной среде ( $\approx 4$  нм). Таким образом, глобулу внутри наносферы можно назвать «частично расплавленной» (в англоязычной литературе – термин «molten globule» [357]) [36].

Теперь в компактном виде представим основные признаки изменения конформации цитохрома *c* при образовании его комплекса с кардиолипином:

1. Появляется флуоресценция остатков тирозина (303 нм) и триптофана (330 нм), которая в нативном цитохроме *c* тушится в результате резонансного

переноса энергии электронного возбуждения из-за близкого расположения этих остатков к гему [166, 265, 432].

2. Исчезает полоса поглощения на спектре цитохрома *c* при 695–700 нм вследствие разрыва координационной связи между атомом железа в составе гема и атомом серы в составе остатка Met80 [41, 166].
3. Появляется пероксидазная активность, которую нативный цитохром *c* не проявляет [41, 166].
4. Уменьшается количество  $\alpha$ -спиралей и повышается количество  $\beta$ -структур. Это показано для комплексов цитохрома *c* с различными анионными липидами и в большей степени проявляется в окисленной форме (содержащей в геме  $\text{Fe}^{3+}$ ) белка, чем в восстановленной [36].

Образование вокруг молекулы цитохрома *c* в оболочки из молекул кардиолипина даёт возможность образовавшейся супрамолекулярной наночастице, проникать в толщу липидного бислоя и осуществлять катализ липопероксидазной реакции, а также проходить сквозь мембраны [24], в том числе и в цитоплазму.

Однако заметим, что изменение конформации цитохрома *c*, приводящее к появлению у него пероксидазной активности, происходит не только при его связывании с фосфолипидами, но также при изменении pH, возрастании ионной силы раствора [247] и при нитровании остатка Tyr74 [147]. Различные мутации могут как приводить к появлению пероксидазной активности цитохрома *c* [247, 267], так и ослаблять потенцию её приобретения [312].

Формирование комплекса цитохрома *c* с кардиолипином является обратимым процессом, и данная структура чувствительна к высокой ионной силе среды и окислению кардиолипина [247]. Авторами [256] установлено, что окисленный в том числе и цитохромом *c* кардиолипин теряет способность к связыванию с ним, что может приводить к распаду комплекса и росту количества свободного цитохрома *c*, который после разрушения митохондриальных мембран, оказавшись в цитоплазме, начинает легко связываться с Araf-1.

### 1.3.3.2 Пероксидазная функция комплекса цитохрома *c* с кардиолипином

Под термином «липопероксидазная активность» следует понимать способность белка, разлагая  $\text{H}_2\text{O}_2$ , окислять органические соединения [41]. Цитохром *c* нельзя считать классической пероксидазой по типу пероксидазы хрена, миелопероксидазы и т.п. Цитохрому *c* больше подойдёт термин «факультативная пероксидаза», обозначающий то, что данный белок в нативном состоянии не обладает пероксидазной активностью, а приобретает её лишь при определённых условиях.

Активный центр классических пероксидаз очень схож с гемом цитохрома *c*, однако имеется одно весьма важное отличие: у классических пероксидаз отсутствует одна координационная связь между гемовым железом и апопротеином, благодаря чему у железа остаётся одна свободная валентность, что и обуславливает их пероксидазную активность. У нативного цитохрома *c* гемовое железо не имеет свободных валентностей, поэтому свободный цитохром *c* в физиологических условиях не имеет пероксидазной активности [36]. Однако само по себе разрушение железо-серной связи  $\text{Fe}\cdots\text{S}(\text{Met}80)$  в молекуле цитохрома *c* не обеспечивает проявления пероксидазной активности в той степени, которая присуща комплексу цитохрома *c* с кардиолипином [41]. А наибольшая пероксидазная активность комплекса цитохрома *c* с кардиолипином наблюдалась при молярных соотношениях липид:белок в интервале от 20 : 1 до 100 : 1 [36].

В целом, механизм специфического усиления пероксидазной активности цитохрома *c* под действием кардиолипина можно описать следующим образом: связывание кардиолипина  $\rightarrow$  изменение конформации глобулы (не только разрыв связи  $\text{Fe}-\text{S}(\text{Met}80)$ , но изменение расположения полипептидной цепи)[301]  $\rightarrow$  повышение доступности активного центра и появление на нём места для связывания  $\text{H}_2\text{O}_2$   $\rightarrow$  значительное ускорение скорости окисления органических субстратов пероксидом водорода [40]. При этом необходимо заметить, что, по сообщению авторов [92], под действием оксида азота (II) происходит существенное снижение пероксидазной активности цитохрома *c*, находящегося в комплексе с кардиолипином.



Теперь рассмотрим сам механизм ферментативной пероксидазной реакции. Впервые он был показан Б. Чансом на пероксидазе хрена в третьей четверти XX века [185-187]. На рисунке 6 приведена схема реакций, характерных для пероксидаз млекопитающих. После взаимодействия пероксидазы с первым собратом –  $H_2O_2$  (реакция 1 на рисунке 6), феррифермент переходит в форму с двумя окисленными эквивалентами, называемой «компаунд 1», в нём появляются два неспаренных электрона, один из которых относится к атому гемового железа, приобретающего нехарактерную для данного металла степень окисления –  $Fe^{4+}$ , а второй обуславливает проявление радикала: либо порфирина, либо одной из аминокислот апопротеина [230]. В статье [370] подробно описываются эти два возможных варианта строения компаунда 1. Далее в классическом пероксидазном цикле компаунд 1 подвергается одноэлектронному восстановлению, окисляя липидный субстрат, и переходит в форму, называемую компаунд 2 (реакция 3 рис. 6), который либо содержит  $Fe^{4+}$  и не содержит радикала, либо имеет железо уже снова в трёхвалентной форме, но содержит радикал (чаще всего уже именно в аминокислоте апопротеина, а не в порфириновом кольце). Стоит заметить, что компаунд 1 может реагировать с некоторыми восстановителями (например, галогенидами или тиоционатом), забирая у них не один, а сразу два электрона и переходя таким образом в форму исходного фермента (реакция 2 рис. 6). Классический пероксидазный цикл замыкается, когда компаунд 2 приобретает ещё один электрон, окисляя вторую молекулу липида по механизму, аналогичному восстановлению компаунда 2 до компаунда 1, и тем самым возвращается в состояние исходной пероксидазы (реакция 4 рис. 6) [230]. А образовавшиеся по реакциям 3а и 4а липидные радикалы запускают каскад реакций перекисного окисления липидов, интенсивность которого тем выше, чем больше в среде кислорода, а с учётом того, что митохондрия – это органелла богатая кислородом, то и липидная пероксидация в ней развивается практически мгновенно [421]. Необходимо указать, что пероксидазный цикл, в принципе, теоретически может замыкаться и без окисления липидов: компаунд 1 может перейти в компаунд 2, окислив  $H_2O_2$  до супероксида (реакция 3b рис. 6), который может быть окислен

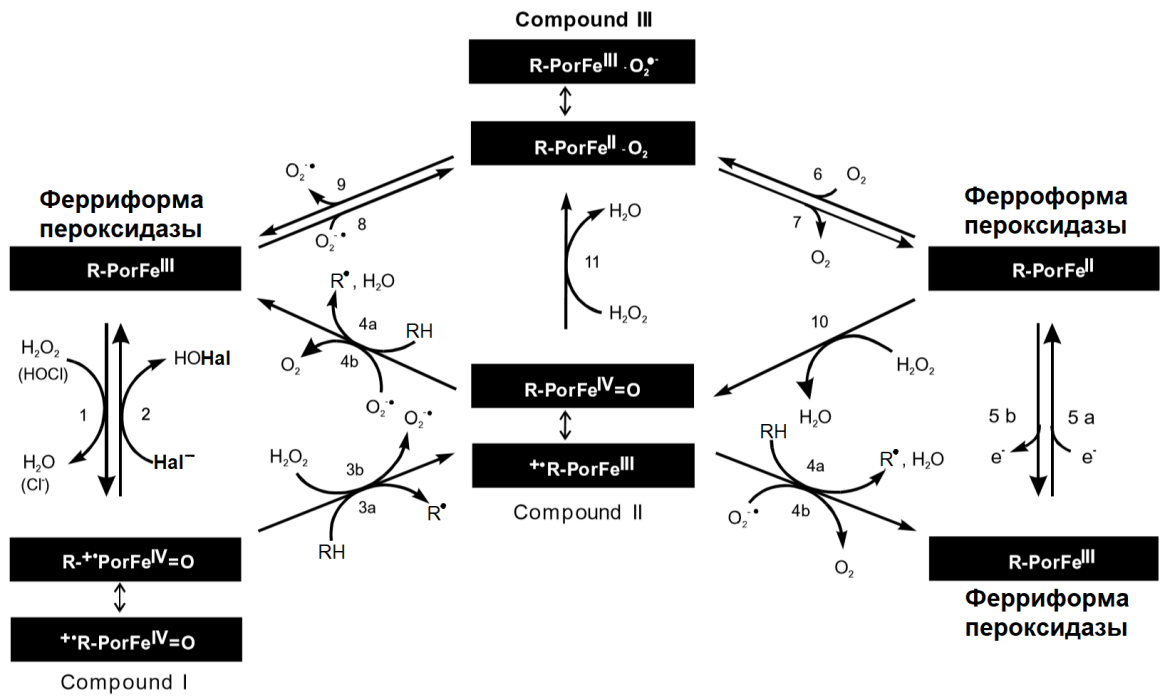
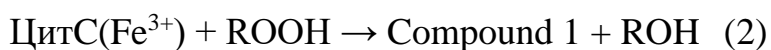


Рисунок 6. Обобщённая схема реакций ферментов-пероксидаз – каталитический пероксидазный цикл [230]. RH – липид, R• – радикал липида, Hal – атом галогена.

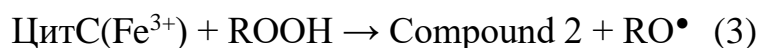
компаундом 2, переходящим в ферриформу фермента, до молекулярного кислорода (реакция 4b рис. 6). Необходимо заметить, что по реакции 6 в пероксидазный цикл может включиться и молекула цитохрома *c*, содержащая  $\text{Fe}^{2+}$ , перейдя в компаунд 2. Помимо этого стоит указать, что  $\text{O}_2^{\bullet-}$  может присоединяться в исходной форме фермента, обратимо давая компаунд 3 (реакции 8 и 9 на рис.6), который может образовываться и при разложении перекиси водорода компаундом 2 [230]. Несмотря на такое разнообразие реакций пероксидаз, основными считаются реакции 1, 3a 4a с рисунка 6, однако при анализе результатов экспериментальной части настоящей работы также следует учитывать, что взаимодействия с липидами может и не происходить: вместо этого, цикл замкнётся по реакциям 3b и 4b с затратой дополнительной молекулы  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Авторы [52] сообщают, что комплекс цитохрома *c* с кардиолипином при недостатке перекиси водорода может катализировать ещё одну реакцию – восстановления гидроперекиси липида, заменяющую собой реакцию восстановления перекиси водорода:



В работе [52] эта реакция названа липоксигеназной. Однако заметим, что, вообще говоря, липоксигеназные реакции – это как раз реакции окисления полиненасыщенных жирных кислот с образованием их пероксидов, катализируемые содержащими железо, но не имеющими порфиринового кольца ферментами-липоксигеназами [341]. В нашем же случае происходит реакция разложения уже имеющейся липидной гидроперекиси. Поэтому называть эту реакцию липоксигеназной некорректно. Описывая окисление линоиловых ацилов кардиолипина и свободных молекул линолевой кислоты комплексом цитохрома с с кардиолипином, при котором образуется целый ряд продуктов липопероксидации, но наличия перекиси водорода в системе не требуется, авторы [30], называют этот процесс квазилипоксигеназной реакцией. Такая терминология более корректна, так как показывает лишь внешнюю схожесть двух процессов (оба, к примеру, легко определяются методом хемилюминесценции) при различии в молекулярном механизме.

На наш взгляд, помимо предложенного выше механизма квазилипоксигеназной реакции, вполне может иметь место и такой:



В этом случае происходит не дву-, а одноэлектронное восстановление субстрата – гидроперекиси липида. В ходе настоящей работы нам удалось получить экспериментальные данные, свидетельствующие в пользу схемы (3).

#### **1.4 Явление хемилюминесценции и механизм его возникновения**

Хемилюминесценция (ХЛ) – это свечение, являющееся результатом перехода различных веществ-метаболитов свободнорадикальных реакций из электронного возбуждённого состояния (ЭВС) в основное [26, 29, 35].

Испускание биообъектами света слабой интенсивности было впервые замечено в конце первой трети прошлого века: В.В. Лепешкин обнаружил засветку лежащих на биопрепаратах фотопластинок, посчитав это излучение ультрафиолетом, испускаемым при коагуляции протопласта при гибели клеток, и назвав его некробиотическим [297, 298]. А.Г. Гурвич, зарегистрировавший

свечение суспензии делящихся дрожжей, выдвинул предположение о сигнальной роли люминесценции биопрепаратов в ультрафиолетовой области спектра, названного им термином «митогенетическое излучение» [51].

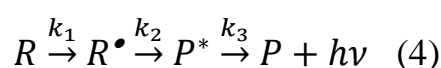
При использовании фотоэлектронных умножителей в третьей четверти XX века достоверно было обнаружено световое излучение чрезвычайно низкой интенсивности в видимой области спектра (обозначенное в англоязычной литературе термином *ultraweak chemiluminescence* [176]), испускаемое биообъектами растительного [195] происхождения и животными тканями [128], открыта ХЛ интактных митохондрий [31, 32, 81] и хлоропластов [322]. В начале 1970-х годов Р. Эллан открыл ХЛ лейкоцитов из крови человека, осуществляющих фагоцитоз бактерий [155, 395]; данное явление легло в основу клинического метода определения иммунореактивности. К слову, ХЛ-методики применяются и при идентификации возбудителей инфекционных заболеваний. Так, к примеру, авторы [175] предлагают методику для обнаружения ДНК вируса гепатита В.

#### ***1.4.1 Обнаружение свободных радикалов в биологических системах, собственная хемилюминесценция***

Хемилюминесцентная методика признана наиболее оптимальным способом изучения свободнорадикальных процессов в биологических системах. При помощи этого метода возможна оценка скорости реакции образования свободных радикалов [29, 63]. Широкое применение именно этого метода обусловлено тем, что в силу большой реакционной способности свободных радикалов, а следовательно – низкой их стационарной концентрации, прямых биохимических методов оценки содержания радикалов в образце нет. Выделить и очистить радикалы подобно молекулам просто невозможно. Химическим путём можно лишь определить продукты реакций с участием свободных радикалов [35]: малоновый диальдегид (МДА) [15, 16, 110, 126, 373, 390, 418], основания Шиффа [11, 73, 309], диеновые [73, 126, 387, 389] и триеновые [11, 73] конъюгаты. Другие методы основаны на использовании перехватчиков радикалов: каталазы  $H_2O_2$  [87], супероксиддисмутазы (СОД) [126], фенольных антиоксидантов [35, 87].

Авторы [61] для изучения ПОЛ применяли флуоресцентную методику. Прямым методом анализа радикалов является метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), в целом, позволяющий обнаруживать и идентифицировать многие радикалы [193, 252, 345]. Однако по причине короткой продолжительности жизни свободных радикалов ЭПР-метод тоже не способен дать адекватную оценку количества свободных радикалов в исследуемом образце в силу низкой их стационарной концентрации [35, 63], использование же спиновых ловушек [1, 78] может влиять на биохимические реакции, протекающие в системе.

Авторы [35] представили обобщённые сведения о кинетике реакций, сопровождающихся хемилюминесценцией. В ходе этих реакций исходные вещества R образуют свободные радикалы R•, которые в последующих реакциях приводят к появлению электронно-возбуждённых продуктов P\*, которые, переходя в основное состояние P, могут высветить фотон (hv). Вероятность возникновения продукта в ЭВС весьма высока, если активированный комплекс реагентов и продукты реакции имеют состояния с разной мультиплетностью [143] (величиной, равной сумме единицы и удвоенной суммы квантовых спиновых чисел электронов в составе молекулы [317]). Для удобства дальнейшего описания рассматриваемых процессов напомним общую схему цепной реакции с образованием и участием свободных радикалов с последующим высвечиванием фотона:



При этом в большинстве случаев спектр хемилюминесценции не соответствует спектру флуоресценции продукта P\*, но соответствует его спектру фосфоресценции [28].

Интенсивность хемилюминесценции (J) пропорциональна скорости третьей реакции с приведённой схемы (4):  $J \propto k_3[P^*]$ .

Из-за большой скорости реакции превращения свободных радикалов в продукты реакции в системе быстро устанавливается стационарное состояние, при котором скорости всех реакций данной реакционной цепи равны. Следовательно, интенсивность свечения пропорциональна скорости  $v_1$  образования свободных радикалов [35]:

$$J \propto v_1 = k_2[R^\bullet] \quad (5)$$

$$[R^\bullet] = \frac{v_1}{k_2} \quad (6)$$

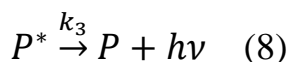
#### 1.4.1.1 Понятие квантового выхода собственной хемилюминесценции

В общей фотохимии в понятие квантового выхода вкладывают число превращённых молекул, отнесённое к числу поглощённых фотонов света [430]. С точки зрения физики фотолюминесцентных процессов, квантовый выход – это отношение количества излучённых люминофором квантов света к количеству поглощённых квантов [125]. Применительно к явлению хемилюминесценции необходимо рассматривать два понятия квантового выхода: квантовый выход возбуждения ( $Q_{ex}$ ) – отношение электронно-возбуждённых молекул продуктов радикальной реакции к общему числу молекул продуктов реакции; и квантовый выход люминесценции ( $Q_{lum}$ ) – отношение электронно-возбуждённых молекул, испустивших фотон к общему количеству электронно-возбуждённым молекул. А общий выход свечения, или хемилюминесценции ( $Q_{ChLum}$ ), равен их произведению [26, 29, 35, 63, 143], и обычно он не превышает  $10^{-10}$ – $10^{-8}$ , именно поэтому биохемилюминесценцию называют сверхслабым свечением [26, 35, 63].

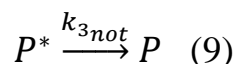
Рассмотрим более подробно реакции с приведённой выше цепной схемы (4) с константами скоростей  $k_2$  и  $k_3$ :



Это хемилюминесцентная реакция [35, 143].



Это люминесценция [35, 143].



Это безызлучательный переход [143].

Величину квантовых выходов, а значит, и итоговой интенсивности хемилюминесценции, можно вычислить по формулам [143]:

$$Q_{lum} = \frac{k_3}{k_3 + k_{3not}} \quad (10)$$

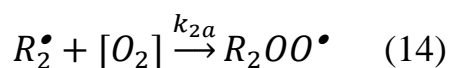
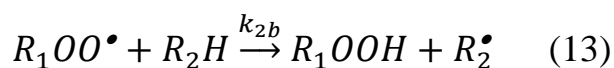
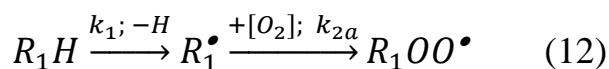
$$J = k_3[P^*] = Q_{ex} \frac{k_3}{k_3 + k_{3not}} k_2[A][B] \quad (11)$$

Очевидно, что не каждый квант света, попадающий на хемилюминометр, способен выбить электрон с фотокатода фотоэлектронного умножителя [63], поэтому прибор может показать заниженные значения свечения. Однако программное обеспечение современных хемилюминометров при выводе значения интенсивности хемилюминесценции уже учитывает коэффициент светосбора хемилюминометра (доля квантов, попавших на фотокатод, от общего числа высвеченных изучаемой системой квантов [83]) и квантовый выход фотокатода (отношение выбитых с катода электронов к числу упавших на катод квантов).

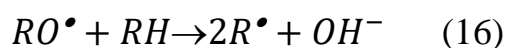
#### *1.4.1.2 Механизм хемилюминесценции при реакциях липидной пероксидации*

Реакции ПОЛ является одним из основных процессов, способствующих развитию ферроптоза [210, 296, 362] и апоптоза по митохондриальному пути [35, 36, 40]. Поэтому наибольшее внимание в работах по изучению этих процессов уделяется именно радикальным реакциям с участием липидов. Однако, в целом, схема, приводимая для описания липидных радикальных реакций, сопровождающихся хемилюминесценцией, справедлива и может быть применена к хемилюминесцентным реакциям белков (что было показано И.И. Сапежинским и Е.А. Лисси в работах [118, 160, 161, 304]), а также нуклеиновых кислот [91, 129].

Естественно, что липидная пероксидация, в ходе которой в наибольшей степени подвержены полиненасыщенные жирные кислоты или ацилы, представлена в виде не одной, а нескольких реакций, причём этот процесс носит характер каскада разветвляющихся цепных реакций [24, 102, 421, 441]:

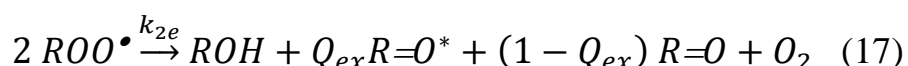


Гидроперекиси липидов ROOH очень легко становятся источниками новых цепей окисления липидов, что ведёт к росту скорости ПОЛ [35, 121, 122]:

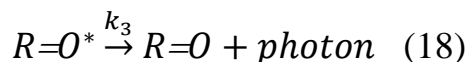


Образование кислородсодержащих радикалов – ключевой этап развития каскада реакций, приводящих в конечном счёте к ХЛ. Несмотря на известный факт, что молекулярный кислород является тушителем люминесценции [361], в ходе многочисленных работ, проводимых в середине XX века, установлено, что присутствие кислорода в системе с белками и углеводородами приводит к более интенсивной ХЛ нежели в его отсутствии [70, 118, 143, 168, 414, 417].

ХЛ, сопровождающая реакции ПОЛ, обусловлена диспропорционированием липопероксильных радикалов  $ROO\cdot$  [167, 168]:



Впервые механизм диспропорционирования пероксильных радикалов с образованием карбонильного соединения, спирта и молекулы кислорода описан в работе [374], по фамилии автора которой его называют механизмом Расселла. Высвечивание фотона происходит при переходе кетона, образовавшегося в ходе реакции (17), из триплетного ЭВС в основное:



При этом выделяется свет с максимумом интенсивности на 450–550 нм [404].

Реакция диспропорционирования липопероксильных радикалов протекает через образование тетраоксида с последующим его распадом вследствие механического напряжения в скелете молекулы на спирт и бирадикал – это момент разделения электронов в молекуле. После этого происходит выделение молекулы  $O_2$ , и образуется кетон в триплетном ЭВС [414]. Однако тетраоксид с высокой долей вероятности может вновь распасться на два липопероксильных радикала. В пользу этого говорит тот факт, что константа скорости диффузии этих радикалов на порядки выше, чем константа скорости реакции их диспропорционирования [167]. Графически механизм Расселла представлен на рисунке 7 под буквой А. Отметим, что образовавшийся кислород может находиться в синглетном ЭВС, по данным авторов [343], квантовый выход возбуждения для молекулы  $O_2$  в данном случае составляет  $\approx 11\%$ . При переходе кислорода в основное состояние наблюдается люминесценция с максимум в области 634 и 703 нм [180, 404].



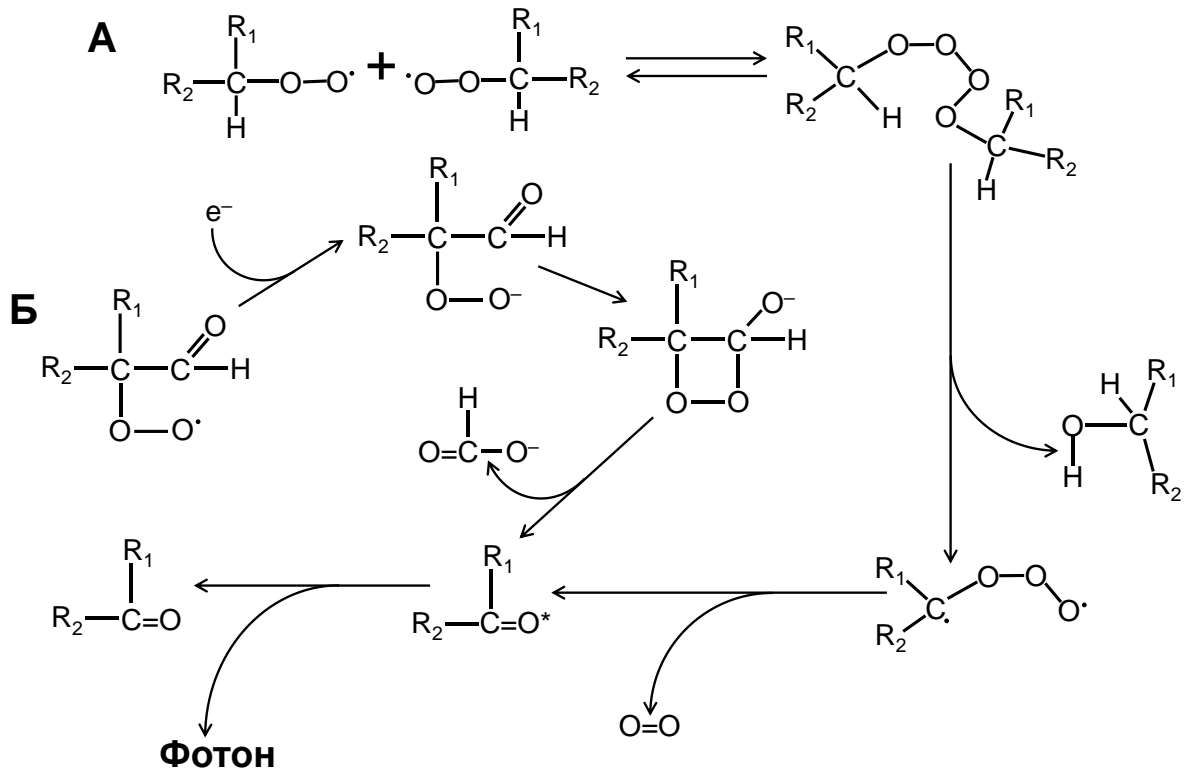


Рисунок 7. Основные механизмы высвечивания фотонов в результате окисления липидов [194, 374, 404, 414].

А. Реакция диспропорционирования пероксильных радикалов.

Б. Образование и распад диоксетановой группировки (на схеме – диоксетанон).

В силу крайне низких значений квантовых выходов образования возбуждённых молекул кетона и их люминесценции (в данном случае – фосфоресценции) общий квантовый выход хемилюминесценции составляет всего порядка  $10^{-8}$  [35, 414].

Связь между концентрацией липопероксильных радикалов и интенсивностью свечения  $J$  следует из уравнения [143]:

$$J = Q_{ChLum} k_{2e} [ROO^\bullet]^2 \quad (19)$$

, где  $J$  – общий световой поток при всех длинах волн и во всех направлениях, эйнштейн/с;  $Q_{ChLum}$  – квантовый выход хемилюминесценции.

Однако помимо механизма Расселла имеет место ещё один путь образования карбонильных соединений в триплетном ЭВС – это распад диоксетановой группировки, образовавшейся в ходе циклизации перекисной структуры. Графически этот процесс представлен на рисунке 7 под буквой Б.

Научным коллективом под руководством Е. Бечары проведено обширное исследование механизмов реакций образования и распада диоксетановой

структуры. Результаты работы детальным образом изложены в статье [404]. А в обзоре Г. Чиленто и В. Адама [194] приводятся различные механизмы образования диоксетеновых группировок с последующим их распадом с образованием возбуждённого продукта.

Скорость пероксидного окисления – это скорость образования продуктов окисления липогидропероксидов в реакции (13) с константой скорости  $k_{2b}$ , поэтому:

$$\frac{d[ROOH]}{dt} = k_{2b}[RH][ROO\bullet] = k_{2b}[RH]\sqrt{\frac{J}{Q_{ChLum}k_{2e}}} \quad (20)$$

Описанная выше связь между интенсивностью собственной ХЛ, сопровождающей ПОЛ, и скоростью этого окисления была подтверждена при изучении последовательных стадий ХЛ модельных систем, содержащих липиды (липосомы и митохондрии), при добавлении в них солей, диссоциирующих с образованием ионов  $Fe^{2+}$  [35, 43, 386]. Исследование кинетики такой хемилюминесценции [29, 421]. Также стало возможным изучение влияния различных антиоксидантов на интенсивность ПОЛ. В качестве примера подобных работ можно привести статьи представителей научной школы Р.Ф. Васильева [18, 20, 223-226, 393], Ю.А. Владимирова [42, 53, 74, 116], А.И. Журавлёва, обобщённые в монографии [63], а также других авторов [7, 235, 281, 284, 314, 323, 375, 400, 408, 437].

При помощи регистрации собственной ХЛ проведено большое количество исследований, о результатах некоторых из них изложено в работах [35, 39, 47, 165, 358, 429].

Однако интенсивность собственной ХЛ в абсолютном большинстве случаев крайне мала [35, 63], что сильно усложняет её регистрацию. К тому же зачастую перед исследователями стоит задача изучить не свободнорадикальные процессы в исследуемом образце в общем и целом, а исследовать вполне конкретные радикалы, к примеру, реакции липидной пероксидации, т.е. оценку наличия в исследуемой системе именно радикалов липидов, но данный метод регистрации абсолютно неспецифичен [35].

### *1.4.2 Активированная хемилюминесценция*

Вещества, внесение которых в систему увеличивает интенсивность ХЛ, обычно называют активаторами ХЛ (в англоязычной литературе – chemiluminescence enhancers, хотя можно встретить и слово «activators»), определённую (об этом чуть ниже) их группу называют хемилюминесцентными зондами, однако эти термины зачастую встречаются в литературе бессистемно. Пожалуй, наиболее верными с химической точки зрения терминами были бы «хемилюминесцентный реагент» или «люминесцентная добавка». Неудачность термина «активатор» с точки зрения химии обусловлена тем, что термин «активность» трактуется в широком смысле как проявление общей способности того или иного соединения к химическим взаимодействиям, а в узком – как действующая часть концентрации. Авторы монографии [63] приводят небольшой список терминов, относящихся к теме ХЛ. Среди них есть понятие, пожалуй, подходящее под термин «активатор» с точки зрения химии: «химически активное вещество, создающее первичные активные центры и тем увеличивающее скорость реакции, поставляющей активные продукты и изменяющей квантовый выход возбуждения», – но под это определение в монографии [63] приведён термин «инициатор». Отметим, что в биологических системах люминесцирующие добавки находятся в водной среде с рН около 7, где они могут иметь слабую растворимость, что ведёт к их агрегации. А у фагоцитов взаимодействие с микрочастицами активирует процесс выработки активных форм кислорода [324, 356]. Поэтому в описанном случае с точки зрения биологии эти вещества, с одной стороны, можно назвать активаторами, но, с другой, оказывается, что они изменяют свойства исследуемой системы. А это при определённых целях эксперимента может снижать степень достоверности получаемых данных.

С точки зрения химии, термин «активатор» допустимо использовать при описании систем с химически инициированной электронообменной люминесценцией, например хемилюминесценцией эфиров оксалата [177]. В этом случае введение в систему флуорофора с низким потенциалом ионизации приводит к переносу электрона с этого соединения на интермедиат с последующим обратным

переносом электрона, приводящим к возбуждению данного флуорофора, который становится эмиттером хемилюминесценции. Однако в биологии чаще всего используют именно термин «активатор» для обозначения люминесцирующей добавки, определяя его как вещество, имеющее высокий квантовый выход излучения и усиливающее свечение за счёт физической миграции энергии электронного возбуждения, не изменяя квантовых выходов возбуждения продуктов радикальной реакции и её скорость [8, 35, 63].

Усиление свечения в присутствии указанных веществ происходит в результате миграции энергии электронного возбуждения с продуктов реакции на добавку, которая является (или продукт химического взаимодействия которой с продуктом радикальной реакции – донором возбуждения) более эффективным эмиттером света, чем возбуждённое вещество-донор (квантовый выход  $Q_{lum}$  свечения молекулы активатора на порядки выше, чем при свечении продукта радикальной реакции [39]). В 1963 году Р.Ф. Васильев в работе [416] описал механизм усиления хемилюминесценции при добавлении к продуктам свободнорадикального окисления углеводородных субстратов – кетонов, находящихся в триплетном ЭВС, производных антрацена. Образующиеся возбуждёнными молекулы производных антрацена находились не в триплетном, а в синглетном ЭВС. Таким образом, в статье [416] детально исследован процесс физического усиления хемилюминесценции в результате триплет-синглетного переноса энергии в жидкой фазе. Заметим, что само по себе усиление ХЛ в присутствии производных антрацена показано на год раньше тем же автором в работе [415], однако механизма этого усиления в той работе ещё не приводилось. При анализе действия антрацена и его производных отмечается, что сам антрацен менее эффективен, нежели его галогензамещённые производные, в особенности – 9,10-дибромантрацен [19, 167, 415], рассчитанный для него «коэффициент запрета» триплет-синглетного перехода, равный отношению константы скорости этого процесса к константе скорости диффузии, составляет  $10^{-2}$  [167].

Обращаясь к введённой выше схеме (5), процесс усиления хемилюминесценции можно схематично представить следующим образом:

$P^* \xrightarrow{k_3} P + h\nu$  (Это неактивированная хемилюминесценция, квантовый выход  $Q_{lum1}$ )  
 $P^* + \text{активатор} \rightarrow P + \text{активатор}^* \xrightarrow{k_{3enh}} P + \text{активатор} + h\nu$  (Это активированная хемилюминесценция, квантовый выход  $Q_{lum2}$ ), при этом  $Q_{lum1} \ll Q_{lum2}$ .

При этом можно заметить, что по сообщению авторов [84], при выборе активатора ХЛ стоит обращать внимание не только на само значение квантового выхода, сколько на его произведение с коэффициентом молярной экстинкции: именно эта величина прямо пропорциональна яркости свечения, учитывая количество поглощённого света и эффективность эмиссии активатора.

Р.Ф. Васильев и В.Я. Беляков в работе [167] заложили основы использования триплет-триплетного и триплет-синглетного переноса энергии электронного возбуждения для количественного исследования хемилюминесцентных процессов: приводятся математические выражения, раскрывающие взаимосвязь между скоростями процессов миграции электронного возбуждения с продукта радикальной реакции – донора ЭВС, концентрацией акцептора (обозначим её буквой А) электронного возбуждения – активатора ХЛ, и интенсивностью ХЛ в отсутствии акцептора возбуждения  $J_0$  и в его присутствии  $J$ :

$$\frac{1}{\frac{J}{J_0} - 1} = \frac{1}{\frac{Q_{LumEnh} \cdot k_{TS}}{Q_{LumPr} \cdot (k_{TT} + k_{TS})} - 1} + \frac{1}{\frac{Q_{LumEnh} \cdot k_{TS}}{Q_{LumPr} \cdot (k_{TT} + k_{TS})} - 1} \cdot \frac{1}{(k_{TT} + k_{TS}) \cdot t_{p^*} \cdot A} \quad (21)$$

, где  $Q_{LumEnh}$  – квантовый выход люминесценции chemiluminescence enhancer – акцептора электронного возбуждения,  $Q_{LumPr}$  – квантовый выход возбуждённого продукта радикальной реакции – донора электронного возбуждения,  $t_{p^*}$  – среднее время жизни возбуждения донора в отсутствии акцептора,  $k_{TT}$  – константа скорости триплет-триплетного переноса энергии – тушения ХЛ,  $k_{TS}$  – константа скорости триплет-синглетного переноса электронного возбуждения на молекулу акцептора. Константа скорости триплет-триплетного переноса, не ведущего к последующей люминесценции, выше, чем триплет-синглетного [167].

Однако у разных активаторов механизм перехвата ЭВС у продуктов радикальных реакций различен. Имеется два отличных друг от друга способа, которые легли в основу классификации веществ, усиливающих квантовый выход

ХЛ. При этом необходимо указать, что в их терминологии имеется ряд проблем. Люминесцирующие добавки первой группы химически реагируют с участниками или продуктами свободнорадикальной реакции, переходя при этом в ЭВС, квантовый выход которого гораздо выше, нежели у собственной ХЛ; по терминологии, предложенной А.И. Журавлёвым в монографии [63], эти вещества обозначены термином «хемилюминесцентные зонды», в работах Ю.А. Владимирова эти вещества наряду с вышеуказанным термином обозначаются также термином «химические активаторы» ХЛ [35]. С точки зрения химии, этим веществам больше подошёл бы термин «хемилюминесцирующий реагент» так как они лишь заменяют реакционные маршруты АФК, которые в естественных условиях ведут к сверхслабой ХЛ, на другие пути, которые приводят к более сильной ХЛ. Вещества из второй группы люминесцирующих добавок перехватывает ЭВС без химического взаимодействия с компонентами системы. Представители научной школы Ю.А. Владимирова [34, 35, 39, 47] называют эти вещества физическими активаторами ХЛ, распространяя термин «активатор» на обе группы хемилюминесцирующих реагентов, в то время как авторы [63] под термином «активатор» обозначают лишь строго физические активаторы ХЛ.

#### *1.4.2.1 Химические активаторы хемилюминесценции*

В настоящее время в научных и клинических исследованиях в подавляющем большинстве случаев используют химические активаторы ХЛ [7, 8, 35, 56, 63, 89, 101]. Наиболее часто в качестве такового применяют люминол (5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндион) [37, 53, 132, 134, 190, 203, 299, 321, 332, 378, 407, 451, 453, 455] впервые применённый в биологической системе группой под руководством Р. Эллана в 1972 году при изучении иммунной реакции полиморфноядерных лейкоцитов [155]. Механизм свечения, возникающего при окислении люминола, для разных окислителей различен, подробно ознакомится с ним можно в работах [35, 38, 88, 115, 120, 333]. Наряду с люминолом иногда, правда гораздо реже, применяется обладающий схожим механизмом активации свечения изолуминол [103, 203, 263]. Широкое применение люминола обусловлено большим квантовым выходом его люминесценции, однако люминол-

активированная ХЛ не специфична: достоверно определить, какие именно свободнорадикальные реакции и в каких соотношениях протекают в исследуемом образце, используя люминол, невозможно [35].

Среди других химических активаторов ХЛ можно назвать люцигенин, применяемый для детекции супероксидного радикала [56, 173, 241, 259, 365, 396], в последнее время разработаны методики с использованием люцигенина для обнаружения дофамина [292] и глутатиона [244], люциферин-люциферазную систему [63, 212, 294], применяемую для определения АТФ, люцифераза же является компонентом многих тест-систем, находя широкое применение [152, 280, 366, 426]. Также в роли химических активаторов ХЛ использовались флуоресцин [207], акридиниевый эфира [338], бромистый этидий [46].

Несмотря на то, что зачастую химические активаторы ХЛ дают большее усиление свечения, в силу их химического участия в происходящих в изучаемой системе процессах они не годятся для проведения фундаментальных исследований, к которым относится и изучение ПОЛ, в том числе – и функций комплекса цитохрома *c* с кардиолипином. В данном случае желательно использовать физические активаторы хемилюминесценции, обеспечивающие увеличение квантового выхода свечения за счёт резонансного переноса энергии ЭВС продуктов реакции без химического взаимодействия с участниками и продуктами этой реакции [44, 139, 422].

#### *1.4.2.2 Поиск физических активаторов хемилюминесценции, сопровождающей реакции липидной пероксидации*

При поиске оптимального усилителя ХЛ нужно обращать внимание на вещества, молекулы которых с высокой долей вероятности смогут происходить триплет-синглетные переходы ЭВС с продуктов ПОЛ. Впервые явление усиления хемилюминесценции было показано при использовании именно физических активаторов – производных антрацена [19, 415, 416].

Большой вклад в исследование активаторов ХЛ, специфичных для свободнорадикальных процессов с участием липидов, внёс В.С. Шаров. В 1980-х годах было проведено изучение различных лантаноидов на предмет усиления ХЛ с

их помощью. По итогу этой работы было выдвинуто предположение, что в основе этого процесса лежит межмолекулярный перенос энергии от продуктов, образующихся в ходе свободнорадикальных реакций липопероксидов, на 4f-оболочку иона лантаноида [138]. Для усиления ХЛ использовали ионы тербия  $Tb^{3+}$  [137], комплексы европия с тетрациклином [140] и другими веществами [67, 119], ионы неодима  $Nd^{3+}$  и иттербия  $Yb^{3+}$  [119]. Однако для проведения исследований в биологических системах ионы лантаноидов не подходят в силу того, что они могут легко образовывать комплексные соединения с веществами буферной среды, а в результате этого связывания зачастую пропадает их способность усиливать ХЛ [140].

В качестве физических активаторов ХЛ при ПОЛ в биологических системах возможно использовать низкомолекулярные органические вещества, имеющие в составе сопряжённые циклические группировки. В качестве примеров таковых можно привести гистологический краситель нильский синий, используемый авторами [141], и родамин 6G [49].

К подобным веществам относятся и производные кумарина, использующиеся также в качестве лазерных красителей. Именно их изучение в качестве активаторов ХЛ, сопровождающей ферментативное ПОЛ (катализируемое комплексом цитохрома *c* с кардиолипином), является предметом настоящей работы. Ниже приведён небольшой обзор, посвящённый непосредственно изучаемым нами хинолизидиновым производным кумарина, известным в англоязычной литературе как coumarin-314 (C-314), coumarin-334 (C-334) и coumarin-525 (C-525), а также нескольким сходным веществам из группы кумаринов, используемым в качестве люминофоров.



### 1.4.3 Производные кумарина и их применение в хемилюминесцентных исследованиях

Кумарины – это группа органических соединений, включающая ненасыщенные ароматические лактоны – производные 5,6-бензо- $\alpha$ -пирона (кумарина, или 5,6-бензо-пиран-2-она) – лактона *цис*-орто-оксикоричной кислоты [48]. Среди них немало ядовитых веществ, как например, охратоксин А [153, 311], для идентификации которого авторами [279] разработана хемилюминесцентная методика. Некоторые производные кумарина способны вызывать гибель раковых клеток [265, 276], другие показаны сильными антиоксидантами [233], многие представители этой группы веществ используются как лазерные красители [385, 432]. Структурная формула кумарина – базового вещества обсуждаемой группы – показана на рисунке 8.

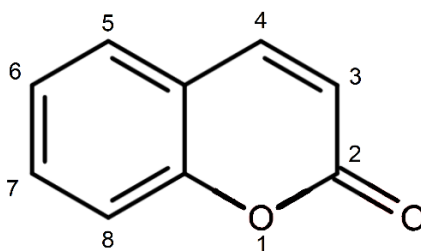


Рисунок 8. Формула кумарина – базового вещества одноимённой группы, к которому присоединяются различные циклические атомарные группировки и/или заместители

Если говорить об особенностях строения молекул производных кумарина, способных выполнять роль люминофоров, то можно привести сообщение авторов [84] о том, что эффективными флуорофорами с эмиссией в видимой области спектра являются производные кумарина, имеющие заместитель в 7-й позиции. В литературе встречается информация об использовании некоторых производных кумарина в различных индикаторных системах, основанных на явлении ХЛ. В качестве примеров можно привести системы для обнаружения анионов цианида [90, 278], катионов  $\text{Cu}^{2+}$  [90], перекиси водорода [313], глюкозы [184], формальдегида [302, 303].

В настоящей работе исследовались хинолизидиновые производные кумарина, известные в англоязычной литературе как coumarin-314 (хинолизидин[5,6,7-*gh*]3-этоксикарбонилкумарин), coumarin-334

(хинолизидин[5,6,7-*gh*]3-ацетилкумарин) и coumarin-525 (хинолизидин[5,6,7-*gh*]3,2'-бензимидазолилкумарин), которые до настоящего исследования считались физическими активаторами, усиливающими вызванную липидной пероксидацией ХЛ, исключительно перехватывая энергию ЭВС у продуктов свободнорадикальной реакции без реакции с ними [30, 44, 47, 139, 422]. Формулы указанных трёх веществ представлены на рисунке 9.

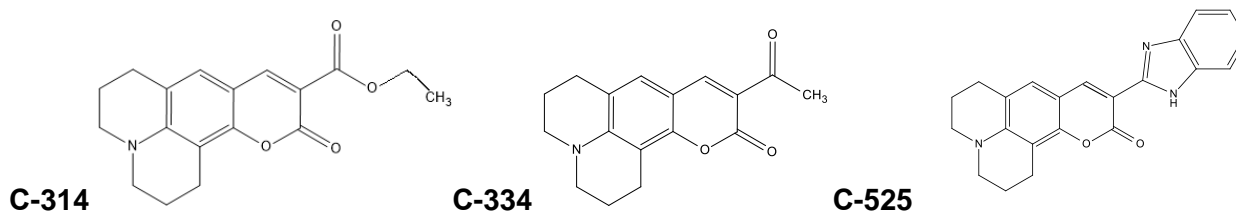


Рисунок 9. Структурные формулы изучаемых производных кумарина: хинолизидин[5,6,7-*gh*]3-этоксикарбонилкумарина (С-314), хинолизидин[5,6,7-*gh*]3-ацетилкумарина (С-334) и хинолизидин[5,6,7-*gh*]3,2'-бензимидазолилкумарина (С-525)

В исследовании [422], проведённом в 1995 году, было изучено влияние различных активаторов на интенсивность ХЛ, сопровождающей железо-индуцированное перекисное окисление фосфолипидов в составе липосом, полученных из яичного желтка. Наибольший эффект показал С-525, который в концентрации 4 мкМ более чем в 2000 раз увеличивал интенсивность ХЛ, не влияя при этом на её кинетику [422]. Механизм усиления свечения в данном случае – это, судя по всему, перенос энергии с молекулы кетона, находящегося в ЭВС, на флуоресцентный уровень С-525 [139].

С-525 оказался более эффективным активатором сопровождающей ПОЛ ХЛ, чем хлорофилл-*a* [385], хинолизидин[5,6,7-*gh*]3-(2,2-динитрилвинил)-кумарин и гидразид хинолизидин[5,6,7-*gh*]кумарин-3-овой кислоты [55]. С-525 был использован с целью определения гидропероксидов липидов в системе липидный субстрат– $\text{Fe}^{2+}$  [47], для изучения окисления в этой системе липопротеинов низкой плотности плазмы крови [44] и для изучения действия антиоксидантов на  $\text{Fe}^{2+}$ -индуцированное ПОЛ [412]. С-525 и С-334 были использованы и при изучении ПОЛ с использованием культуры клеток [420]. Методом регистрации усиленной С-525 ХЛ авторы [37, 53] изучили действие антиоксидантов на ПОЛ, запускаемое комплексом цитохрома *c* с кардиолипином, но при этом до нашей работы

исследование по возможному расходованию активатора ХЛ в этой системе не проводилось. А показанный нами факт уменьшения концентрации С-314, С-334 и С-525 под действием этой супрамолекулярной структуры делает часть результатов [37, 53] недействительными. То же самое можно сказать и про работу авторов [30] по изучению свободнорадикального окисления кардиолипина в составе его комплекса с цитохромом *c* при использовании С-525.

При описании С-525 нельзя не учесть тот факт, что данное вещество имеет в своей структуре бензимидазольную группировку: в определённых условиях она может обуславливать антиоксидантные свойства этого вещества, а также то, что С-525, по данным [86], теряет способность к люминесценции в сыворотке крови, предположительно по причине его связывания с сывороточными альбуминами.

Также в литературе уделяется внимание С-314. Авторы [159] изучали фотогенерирование радикалов катиона С-314 с использованием наносекундного лазерного возбуждения; авторами [364] был изучен ряд оптических и флуоресцентных свойств поликарбонатной смолы, легированной С-314. Статья [349] описывает исследования по растворению кумарина С-314 в водной среде с добавлением поверхностно-активного вещества. В результате наших экспериментов было установлено, что С-314, С-334 и С-525 в концентрациях выше 50 мкМ в воде не растворяются, а наилучшей растворимостью обладает С-334.

Однако в свете нашей работы наиболее интересен вывод, полученный В.С. Шаровым и соавторами в 1996 году, о том, что С-525 не подходит для изучения липидной пероксидации, катализируемой пероксидазой хрена, в силу его нестабильности в данной системе [385]. Это натолкнуло нас на мысль, что в системе, в которой фермент-пероксидаза (чем является и цитохром *c* в комплексе с кардиолипином [27, 30, 37, 166, 264, 268-270, 315]) катализирует липопероксидазную реакцию, С-525 может расходоваться по причине того, что он является субстратом этой реакции. Поэтому автором настоящей диссертации в 2017 году было проведено спектрофотометрическое исследование возможности участия С-314, С-334 и С-525 в липопероксидазной реакции, катализируемой комплексом цитохрома *c* с кардиолипином, о результатах которого было изложено

в работах [106, 107]. В них указывается на уменьшение оптической плотности на длинах волн, соответствующих максимумам поглощения кумариновых производных. Позднее данный факт был изложен нами в статье [114], а также в выпускной квалификационной работе [105]. Тот же феномен описан в кандидатской диссертации Г.К. Владимирова [25]. Однако уже в более ранних наших работах [105, 114] был сделан вывод о необходимости проведения полноценного анализа кинетики реакции разрушения производных кумарина под действием комплекса цитохрома *c* с кардиолипином, по результатам которого необходимо вывести математические функции для корректировки ХЛ-кривых и придания им такого вида, какой бы они имели, если бы производные кумарина не расходовались в процессе ферментативной липопероксидазной реакции.

Хотя Г.К. Владимирова и пишет о том, что «кумариновые активаторы хемилюминесценции являются субстратами пероксидазной реакции», он не формулирует необходимость корректировки полученных при их использовании ХЛ-кривых, а вместо этого ограничивается фразой, что «сами активаторы <...> разрушаются лишь частично» и «поэтому могут служить в качестве активаторов хемилюминесценции». При этом Г.К. Владимирова приводит данные о доле разрушения кумариновых производных в первые минуты реакции, которая, к слову, выведена лишь на основании снижения оптической плотности в максимуме поглощения кумаринового красителя, а не на вычисленном значении концентрации вещества. Эти доли всегда получаются больше четверти [25]. Такое снижение концентрации активатора в системе приводит к значительному снижению интенсивности ХЛ, а потому экспериментатор сделает ложный вывод о снижении интенсивности свободнорадикального процесса в системе. А при исследовании таким способом, например, действия антиоксидантов могут быть получены ложные данные об эффективности изучаемых антиоксидантов. На это, а также на то, что количественный вывод о снижении концентрации вещества в смеси можно делать лишь на основании непосредственно значения концентрации, а никак не просто значения оптической плотности, в диссертации [25] не обращается внимания. Вместо этого, Г.К. Владимирова пишет, что «выводы о концентрации

свободных радикалов и о механизме свободнорадикальных реакций, полученные при анализе кинетики сопровождающей эти реакции ХЛ, могут быть сделаны даже без пересчётов».

Кроме того, в работах [25, 105-107, 114] в систему не вносился легкоокисляемый липидный субстрат, а из липидов присутствовал лишь тетраолеилкардиолипид (ТОКЛ), ацилы в котором имеют лишь одну двойную связь, и ту – расположенную в его центре. Поэтому в данном случае пероксидазный каталитический цикл мог протекать и без участия липида [230], а потому данную реакцию с полной уверенностью называть липопероксидазной нельзя. А поскольку митохондриальные мембраны высших животных содержат высокую долю полиненасыщенных фосфолипидов [142, 301], то в природе имеет место именно липопероксидазная реакция [36]. Для её моделирования в системе должен присутствовать легкоокисляемый липидный субстрат. Им может выступать, например, полиненасыщенный кардиолипид, а в случае использования ТОКЛ в роли кардиолипид-кофактора ЦитС в систему нужно вносить легкоокисляемый фосфолипид.

В рамках работы над настоящей диссертацией мы, помимо прочего, провели исследование расходования С-314, С-334 и С-525 в процессе катализируемой комплексом цитохрома *c* с ТОКЛ (ЦитС-ТОКЛ) липопероксидазной реакции, липидным субстратом в которой выступала полиненасыщенная фосфатидная кислота (ФК). То есть той реакции, которая имеет место и в человеческом организме. При этом выводы о кинетике расходования производных кумарина мы делали строго на основании непосредственно значений их концентрации. И при использовании вычисленных констант скорости их разрушения мы вывели функции для корректировки полученных с их помощью ХЛ-кривых в экспериментах на молекулярных моделях, чего до нас никто не производил.

## 1.5 Антиоксиданты как ингибиторы окислительного стресса

Антиоксидантами называют вещества, нивелирующие последствия окислительного стресса и/или блокирующие его как таковой. В новых обзорах [154, 340], а также монографии [63] и работах коллектива под руководством Е.Б. Бурлаковой [16, 61] подробным образом с приведением примеров описан как механизм действия различных антиоксидантов, так и возможные способы их применения поэтому не будем на них останавливаться. В целом, механизм действия антиоксиданта является реакцией со свободным радикалом, в ходе которой свободная валентность переходит на молекулу антиоксиданта, а менее активный радикал антиоксиданта либо образует неактивный димер с другим радикалом или же выводится из организма.

В литературе приводятся различные классификации антиоксидантов, составленные в соответствии с целями авторов на основании различий по тем или иным критериям в их строении, свойствах и т.п. Антиоксиданты можно разделить на высоко- и низкомолекулярные [135, 377], на водо- и жирорастворимые [45, 131]. В свете настоящей диссертационной работы небезынтересно заметить, что антиоксидантами являются и некоторые производные кумарина, о чём сообщается в статьях [45, 135] на вещества прямого и косвенно действия [45], через призму метаболизма конкретных видов животных их можно разделить на экзогенные и эндогенные [340], а с точки зрения встречаемости в природе – на естественные и синтетические [45]. К слову, в настоящей работе методом регистрации усиленной С-334 ХЛ нами проведено исследование подавления ПОЛ, вызванного липопероксидазной активностью комплекса цитохрома *c* с кардиолипином, под действием естественного растительного антиоксиданта дигидрокверцетина и синтетического водорастворимого аналога витамина Е – тролокса.

Если продолжить разговор о классификации антиоксидантов, то нельзя не упомянуть физиологическую классификацию авторов обзора [340], а также различные их классификации по молекулярному механизму действия [63, 131]. В таблице 1 приведены примеры самых распространённых антиоксидантов с указанием их механизма и преимущественного места действия.

Таблица 1. Некоторые примеры веществ, проявляющих антиоксидантные свойства

Антиоксиданты	Преимущественное место действия	Ингибируемые индукторы окислительного стресса	Примеры работ
Лактоферрин	Внеклеточная среда	$Fe^{2+}$ , действует как хелатирующий агент	[218, 222]
Трансферрин	Внеклеточная среда	$Fe^{2+}$ , действует как хелатирующий агент	[214, 449]
Феритин и его аналоги	Цитоплазма	$Fe^{2+}$ , действует как хелатирующий агент	[204, 216, 454]
Альбумин	Внеклеточная среда	$\cdot OH$ , $ROO\cdot$ , $HOCl$ , хелатор $Cu^{2+}$	[95, 213, 255, 371, 457]
Церулоплазмин	Внеклеточная среда	$\cdot O_2^-$ , окисляет $Fe^{2+}$ , хелатор $Cu^{2+}$	[213, 384, 449]
Внеклеточная СОД	Плазма крови, стенки сосудов	$\cdot O_2^-$	[17, 382, 444]
СОД(Cu-Zn)	Эритроциты, цитоплазма	$\cdot O_2^-$	[17, 260, 445]
СОД(Mn)	Митохондрии	$\cdot O_2^-$	[17, 201, 288]
Каталаза	Пероксисомы, кровь	$H_2O_2$	[17, 66, 149, 287, 353, 444]
Глутатионпероксидаза	Цитоплазма, митохондрии	$H_2O_2$ и гидроперекиси липидов	[170, 188, 344, 381]
Глутатионтрансфераза	Наружная мембрана митохондрии, эндоплазматический ретикулум	$H_2O_2$ и гидроперекиси липидов	[174, 211, 293, 368, 447]
Глутатион	Цитоплазма, митохондрии	$\cdot OH$ , $\cdot O_2^-$	[66, 219, 306]
Цистеин	Цитоплазма, митохондрии, биомембраны	Предотвращает ПОЛ	[245, 348]
Аскорбат	Цитоплазма	$\cdot OH$ , $\cdot O_2^-$ , $HOCl$ и др.	[131, 258, 316]
Токоферол	Биомембраны	Предотвращает ПОЛ	[199, 329, 340]
Каротиноиды и их производные, витамин А	Биомембраны	Предотвращает ПОЛ, гасят синглетный $O_2$ , $HOCl$ , $\cdot OH$ , $ROO\cdot$ и другие кислородсодержащие радикалы	[131, 136, 229, 354, 435, 446]
Кверцетин	Митохондрии	Предотвращает ПОЛ	[10, 37, 124, 346, 425]
Дигидрокверцетин (таксифолин)	Митохондрии	Предотвращает ПОЛ	[37, 53, 346, 406, 409, 427, 459]
Тролокс	Митохондрии	Предотвращает ПОЛ	[37, 393]
Мексидол	Цитоплазма, митохондрии	$\cdot OH$ , $\cdot O_2^-$	[63, 144]

Куркумин	Биомембраны	Предотвращает ПОЛ	[151, 162, 274, 340, 393]
Карнозин	Цитоплазма	$\cdot\text{OH}$ , $\cdot\text{O}_2^-$ , $\text{HOCl}$	[71, 146]
Таурин	Цитоплазма	$\text{HOCl}$	[9, 257]
Мочевая кислота	Кровь	Предотвращает ПОЛ	[183, 339, 457]
Билирубин	Кровь	Предотвращает ПОЛ	[59, 457]
Убихинон	Биомембраны	$\cdot\text{OH}$ , $\text{ROO}\cdot$ , $\text{HOCl}$ и др.	[68, 199, 340]
Убихиноил-децилтрифенил-фосфоний	Митохондриальные мембраны	Предотвращает ПОЛ (?)	[123]
Пластохиноил-децилтрифенил-фосфоний	Митохондриальные мембраны	Предотвращает ПОЛ (?)	[123]
Рутин	Митохондрии	Предотвращает ПОЛ	[37, 53]
Ионол	Митохондрии	Предотвращает ПОЛ	[37, 69]
Глюкоза	Внутренняя среда организма, цитоплазма	$\cdot\text{OH}$	[192, 446]
Хлорофилл и его производные	Мембраны (?)	Предотвращает ПОЛ	[98-100]

В заключение хотелось бы обратить внимание читателя на предположенные нами антиоксидантные свойства у производных хлорофилла. Данный вывод сделан на основании того, что препарат на основе хлорофилла был показан как эффективный радиопротектор [98-100]. При этом единственным возможным механизмом его радиопротекторного действия может быть подавление ПОЛ, во многом определяющего лучевое поражение [72, 127] и вызывающего гибель клеток. В работах коллектива под руководством Е.Б. Бурлаковой в качестве главного её механизма при действии ионизирующего излучения указывается апоптоз по митохондриальному пути [15]. Но недавно также было показано, что при действии  $\gamma$ -излучения гибель клеток может проходить и по механизму ферроптоза [452]. Но, в любом случае одним из механизмов действия радиопротекторов может служить ингибирование ПОЛ.

В настоящей работе методом регистрации активированной С-334 ХЛ также было изучено воздействие хлорофиллина (водорастворимого производного хлорофилла), радиозащитное действие которого было показано авторами [289], на ПОЛ, вызванное квазилипоксигеназной реакцией, катализируемой ЦитС-ТОКЛ. Липидным субстратом в исследовании выступал бычий кардиолипид, подвергнутый медленному окислению для появления в его структуре гидропероксидных группировок – субстрата квазилипоксигеназной реакции.



## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Реагенты

- 20 мМ фосфатный буферный раствор (pH 7,4);
- пероксид водорода, 8,6 М водный раствор (Sigma-Aldrich, США);
- Coumarin-314, 500 мкМ метанольный раствор, приготовленный из навески необходимой массы (Sigma-Aldrich, США);
- Coumarin-334, 1 мМ метанольный раствор, приготовленный из навески необходимой массы (Sigma-Aldrich, США);
- Coumarin-525, 500 мкМ или 250 мкМ метанольный раствор, приготовленный из навески необходимой массы (Sigma-Aldrich, США);
- цитохром *c*, 1 мМ раствор, приготовленный из навески необходимой массы (Sigma-Aldrich, США);
- кардиолипин из сердца быка, 6 мМ метанольный раствор, приготовленный из навески необходимой массы (Avanti Polar Lipids, США);
- препарат липопероксидов, полученные путём окисления воздухом кардиолипина из сердца быка (Avanti Polar Lipids, США);
- 1,1',2,2'-тетраолеилкардиолипин, 6 мМ метанольный раствор, приготовленный из навески необходимой массы (Avanti Polar Lipids, США);
- пероксидаза из корней хрена (активность 112 ед/мг, M=44173,9), 1 мМ водный раствор, приготовленный из навески необходимой массы;
- дигидрокверцетин (Merck, США), растворы различных концентраций;
- тролокс (Millipore, США), растворы различных концентраций;
- пищевая добавка «Хлорофилл жидкий» («Nature's Sunshine Products Inc.», США), содержащая медный хлорофиллин натрия концентрацией 4335,8 мкМ;
- растворы ЭДТА, приготовленные из навески необходимой массы (Sigma-Aldrich, США)
- растворы орто-фенантролина (о-фенантролина), приготовленные из навески необходимой массы (РЕАХИМ, Россия)

- 5 мМ раствор железного купороса, приготовленных из навески  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  необходимой массы (РЕАХИМ, Россия)
- Соевый лецитин, раствор концентрацией 10 мг/мл, приготовленный из навески необходимой массы.
- 2 мМ водный раствор азиды натрия (Sigma-Aldrich, США), приготовленный из навески необходимой массы.
- Кислотный и щелочной раствор для калибровки рН-метра.

Растворы указанных выше веществ более низких концентраций готовились методом последовательных разведений, кратность одного разведения не превышала 10.

## 2.2 Основная аппаратура для проведения экспериментов

- Двухлучевой спектрофотометр «Specord 200» фирмы «Analytik Jena» (Германия), подключённый к персональному компьютеру с программным обеспечением «WinASPECT»;
  - Аппаратно-программный комплекс на основе двухлучевого спектрофотометра СФ-10 (Россия);
  - Спектрофлуориметр «Shimadzu RF-5301PC» (Япония), подключённый к персональному компьютеру с программным обеспечением «Panorama Fluorescence»;
  - Хемилюминометр «Lum-5773» фирмы ООО «ДИСофт» (Россия), подключённый к персональному компьютеру с программным обеспечением «PowerGraph»;
  - Хемилюминометр «Lum-100» фирмы ООО «ДИСофт» (Россия), подключённый к компьютеру с программным обеспечением «PowerGraph».
- Перед началом каждой серии опытов хемилюминометры калибровались по ураниловому стеклу.

## 2.3 Методики

### 2.3.1 Спектрофотометрические методики

#### 2.3.1.1 Изучение оптических свойств производных кумарина в среде фосфатного буфера

Из метанольного 1 мМ раствора кумарина С-334 или из 500 мкМ раствора кумарина С-314 или С-525 нами был приготовлен 30 мкМ раствор, который использовался в спектрофотометрических измерениях, проводимых по следующей схеме: после измерения раствора изначальной концентрации методом последовательных разведений готовились растворы меньших концентраций, поглощение 30 мкМ раствора измерялось 25 раз, других концентраций – 300 раз. Схема разбавлений приведена в таблице 2.

Таблица 2. Схема последовательных разбавлений растворов кумаринов С-314, С-334 и С-525 в экспериментах по выведению концентрационной зависимости поглощения

Концентрация изначального раствора, мкМ	Объём изначального раствора, мкл	Объём 20 мМ фосфатного буфера, мкл	Концентрация получаемого раствора, мкМ
30	2500	500	25
25	2400	600	20
20	2250	750	15
15	2000	1000	10
10	2250	750	7,5
7,5	2000	1000	5
5	1500	1500	2,5

#### 2.3.1.2 Изучение обратимости действия метанола на железосерную связь в молекуле цитохрома с

В настоящем исследовании изучение обратимости действия метанола на цитохром с (ЦитС) осуществлялось путём регистрации спектра поглощения со скоростью 5 нм/с при ширине оптической щели 2 нм и в диапазоне длин волн 350 – 750 нм.

Для определения обратимости действия метанола на ЦитС было приготовлено два раствора: в одном ЦитС был растворён в 100 мМ фосфатном буфере (ФБ), а в другом – в смеси (1:1 по объёму) метанол : 100 мМ фосфатный буфер. Для обоих растворов был зарегистрирован спектр поглощения в диапазоне длин волн 350–750 нм. Затем оба раствора были разбавлены в 5 раз 100 мМ

фосфатным буфером. Таким образом, в растворе, содержащем метанол, объёмная доля метанола упала с 50% до 10%.

После измерения исходные спектры загружались в программу «Fityk0.9.8.» для вычета составляющей спектра, обусловленной светорассеянием.

### *2.3.1.3 Регистрация серии спектров поглощения смеси, в которой протекает катализируемая комплексом цитохрома с с кардиолипином липопероксидазная реакция*

В кювету для спектрофотометра мы добавляли растворы в следующем порядке: 300 мкл раствора цитохрома с концентрацией 100 мкМ, 150 мкл метанольного раствора тетраолеилкардиолипина (ТОКЛ) концентрацией 6 мМ, 75 мкл метанольного раствора С-334 концентрацией 1 мМ или 150 мкл метанольного раствора С-314 или С-525 концентрациями 500 мкМ, а также – 300 мкл раствора перекиси водорода концентрацией 2150 мкМ (в контрольных измерениях  $\text{H}_2\text{O}_2$  заменялась равным объёмом фосфатного буферного раствора). В некоторые пробы в качестве дополнительного легкоокисляемого липидного субстрата также вносилось 150 мкл метанольного раствора фосфатидной кислоты (ФК) концентрацией 12 мМ. Общий объём пробы составлял 3000 мкл, который достигался добавлением необходимого объёма 20 мМ фосфатного буферного. С помощью секундомера мы измеряли время от момента добавления перекиси водорода до начала измерения первого спектра поглощения при параметрах регистрации: диапазон длин волн – 300–600 нм, скорость измерения – 5 нм/с, дискрета (шаг измерения) – 0,5 нм, ширина щели монохроматора – 5 нм. Время регистрации одного спектра составляло примерно 60 секунд. Далее мы регистрировали спектр ещё 55 раз. Первые 6 из этих измерений проводились с 10-секундными, следующие 23 – с минутными, а последние 26 – с 2-минутными интервалами. Данный алгоритм, разработанный автором настоящей диссертации, изначально был использован в рамках работ [105, 107, 114], а впоследствии был запатентован [113].

Последовательность добавления, объёмы и концентрации маточных растворов были подобраны нами на основании подготовительных экспериментов. Концентрации и объёмы растворов цитохрома с и тетраолеилкардиолипина

выбраны таким образом, чтобы обеспечить соотношение 1:30, которое, по данным работы [36], является оптимальным; указанные интервалы между измерениями были оценены нами как оптимальные также по результатам предварительных экспериментов.

### ***2.3.2 Спектрофлуориметрическое исследование разрушения цитохрома с, катализирующего липопероксидазную реакцию***

В кювету спектрофлуориметра мы добавляли 300 мкл 100 мкМ ЦитС, 150 мкл 6 мМ ТОКЛ и 2100 мкл 20 мМ фосфатного буфера, после чего регистрировали спектр флуоресценции. Далее мы вносили в кювету 150 мкл раствора липопероксидов, полученных медленным окислением БКЛ, концентрацией 6 мМ в пересчёте на БКЛ, и 300 мкл 86 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$ , после чего регистрировали второй спектр флуоресценции. Также мы регистрировали спектр флуоресценции 10 мкМ ЦитС, растворённого в 20 мМ фосфатном буфере.

Спектры флуоресценции регистрировались при следующих параметрах: длине волны возбуждающего света равной 265 нм, диапазоне длин волн регистрации эмиссионного света 295–600 нм и скорости регистрации «slow» (в программном обеспечении «Panorama Fluorescence»), ширине щелей возбуждающего и эмиссионного света равной 1,5 нм и 3 нм соответственно.

### ***2.3.3 Измерения хемилюминесценции***

#### ***2.3.3.1 Доказательство обусловленности хемилюминесценции комплекса цитохрома с с кардиолипином его ферментативной активностью***

##### **2.3.3.1.1 Влияние *o*-фенантролина и ЭДТА на ХЛ в системе ионы $\text{Fe}^{2+}$ – соевый лецитин**

В пустую кювету хемилюминометра мы добавляли 50 мкл 2 мМ железного купороса ( $\text{FeSO}_4$ ) и 50 мкл растворов *o*-фенантролина или ЭДТА различных концентраций, устанавливали её в кюветное отделение хемилюминометра и начинали регистрацию ХЛ. Через 30 секунд в кювету для ХЛ добавляли 800 мкл раствора, содержащего 25 мкл 1 мМ метанольного раствора С-334 и 775 мкл фосфатного буфера. На 60-й секунде регистрации ХЛ добавляли 200 мкл раствора соевого лецитина концентрацией 10 мг/мл, после чего регистрировали ХЛ в течение 250 секунд, после чего в кюветное отделение помещали кювету со 100 мкл

1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и на 360-й секунде после начала измерения переносили в эту кювету 950 мкл содержимого первой кюветы. Далее регистрировали свечение в течение необходимого времени.

#### 2.3.3.1.2 Влияние *o*-фенантролина и ЭДТА на ХЛ в системе пероксидаза из корней хрена (ПХ) – соевый лецитин

В пустую кювету мы добавляли 50 мкл 210 мкМ ПХ (активность 112 ед./мг) и 50 мкл растворов *o*-фенантролина или ЭДТА различных концентраций, устанавливали её в кюветное отделение хемиллюминометра и начинали регистрацию ХЛ. Через 30 секунд в кювету для ХЛ добавляли 800 мкл раствора, содержащего 25 мкл 1 mM метанольного раствора кумарина С-334 и 775 мкл фосфатного буфера. На 60-й секунде регистрации ХЛ добавляли 200 мкл раствора соевого лецитина концентрацией 10 мг/мл, после чего регистрировали ХЛ в течение 250 секунд, затем в кюветное отделение помещали кювету со 100 мкл 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и на 360-й секунде после начала измерения переносили в эту кювету 950 мкл содержимого первой кюветы. Далее регистрировали свечение в течение необходимого времени.

#### 2.3.3.1.3 Влияние *o*-фенантролина и ЭДТА на ХЛ в системе ЦитС – БКЛ

В пустую кювету хемиллюминометра мы добавляли 50 мкл 210 мкМ ЦитС и 50 мкл растворов *o*-фенантролина или ЭДТА различных концентраций, устанавливали её в кюветное отделение хемиллюминометра и начинали регистрацию ХЛ. Через 30 секунд в кювету для ХЛ добавляли 800 мкл раствора, содержащего 25 мкл 1 mM метанольного раствора кумарина С-334 и 775 мкл фосфатного буфера. На 60-й секунде регистрации ХЛ добавляли 100 мкл 6,6 mM БКЛ. Далее регистрировали свечение в течение необходимого времени.

#### *2.3.3.2 Регистрация хемиллюминесценции во время липопероксидазной реакции*

Кювету, содержащую следующие вещества: 100 мкл 100 мкМ цитохрома *c*, 50 мкл 6 mM метанольного раствора ТОКЛ, 25 мкл 1 mM метанольного раствора кумарина С-334 или 50 мкл 500 мкМ метанольного раствора С-525 или С-314, помещали в кюветное отделение хемиллюминометра и запускали регистрацию хемиллюминесцентного сигнала. После регистрации фонового сигнала в качестве

дополнительного легкоокисляемого липидного субстрата в некоторые пробы также вносилось 50 мкл метанольного раствора фосфатидной кислоты концентрацией 12 мМ, после чего в течение 300–500 секунд регистрировалась ХЛ, сопровождающая квазилипоксигеназную реакцию. Также вместо фосфатидной кислоты в пробы могло вноситься 50 мкл метанольного раствора липопероксидов, полученных медленным окислением кардиолипина, выделенного из сердца быка (БКЛ), концентрацией 600 мкМ в пересчёте на БКЛ. Липопероксидазная реакция запускалась внесением 100 мкл 2150 мкМ перекиси водорода. ХЛ, сопровождающую липопероксидазную реакцию, мы регистрировали до возвращения интенсивности ХЛ к фоновым значениям. Общий объём пробы после внесения последнего реактива составлял 1 мл. В качестве растворителя нами был использован 20 мМ фосфатный буфер; необходимый его объём вносился в кювету после добавления в неё ЦитС. В некоторых случаях мы дополнительно регистрировали ХЛ смеси, общим объёмом 3 мл, в этом случае вносимые объёмы всех растворов увеличивались в три раза, становясь идентичными использованным при проведении соответствующих спектрофотометрических измерений.

На момент начала липопероксидазной реакции система имела следующий количественный состав: 10 мкМ цитС, 300 мкл ТОКЛ, 215 мкМ  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 25 мкМ хинолизидиновое производное кумарина, в некоторых пробах также присутствовала 600 мкМ ФК или липопероксиды, соответствующие 30 мкМ БКЛ.

Алгоритм добавления и объёмы растворов и данные концентрации липопероксидов и перекиси водорода были подобраны нами по результатам подготовительных экспериментов, а концентрации ЦитС и ТОКЛ взяты с расчётом на оптимальное соотношение ЦитС:ТОКЛ=1:30, указанное в работе [36].

#### *2.3.3.3 Влияние дигидрокверцетина и тролокса на липопероксидазную функцию комплекса цитохрома с к кардиолипином*

В пустую кювету хемилюминометра мы добавляли 100 мкл 100 мкМ цитохрома с и 50 мкл растворов тролокса или дигидрокверцетина (ДГК) различных концентраций, устанавливали её в кюветное отделение хемилюминометра и начинали регистрацию ХЛ. Через 30 секунд в кювету для ХЛ мы добавляли 800 мкл

раствора, содержащего 25 мкл 1 мМ метанольного раствора С-334 и 775 мкл 100 мкМ 20 мМ фосфатного буфера. На 60-ой секунде регистрации ХЛ мы добавляли 100 мкл 6 мМ БКЛ, после чего регистрировали ХЛ в течение 250 секунд, после чего в кюветное отделение помещали кювету со 100 мкл 1 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  и на 360-й секунде после начала измерения переносили в эту кювету 800 мкл содержимого первой кюветы. Далее регистрировали свечение в течение необходимого времени.

#### *2.3.3.4 Влияние хлорофиллина на хемилюминесценцию, сопровождающую катализируемую комплексом цитохрома с с кардиолипином квазилипоксигеназную реакцию*

При измерении ХЛ опытных проб в кюветное отделение хемилюминометра мы помещали кювету, содержащую 100 мкл 100 мкМ ЦитС, 50 мкл 6 мМ метанольного раствора ТОКЛ, 25 мкл 1 мМ С-334, 100 мкл раствора препарата хлорофиллина (препарат фирмы «Nature's Sunshine Products Inc.» (США), содержащий медный хлорофиллин натрия, под торговым названием «Хлорофилл жидкий» (“Liquid Chlorophyll”)) различных концентраций, после чего регистрировали фоновый ХЛ-сигнал в течение 30 секунд. Началом реакции считается момент внесения в систему 25 мкл 6 мМ раствора окисленного БКЛ. Реакция протекала в среде 20 мМ фосфатного буфера. Регистрация ХЛ, сопровождающей квазилипоксигеназную реакцию, продолжалась в течение 300 секунд. При обработке результатов измерений нами были вычислены значения светосуммы для каждой измеренной пробы.

Алгоритм добавления и объёмы растворов и данные концентрации веществ были подобраны по результатам подготовительных экспериментов, а концентрации СytС и ТОСL взяты с расчётом на оптимальное соотношение СytС:ТОСL =1:30, указанное в работе [36].

#### *2.3.4 Вычисление концентраций на основании серий спектров поглощения*

Концентрации цитохрома с и кумариновых производных, изменяющиеся в процессе липопероксидазной реакции, катализируемой комплексом цитохрома с с кардиолипином, вычислялись из каждого зарегистрированного спектра. Концентрации мы вычисляли на основании математического выражения закона



Бугера–Ламберта–Бера для смеси веществ [34] посредством решения системы уравнений:

$$\begin{cases} A_1 = \varepsilon_{1;P}C_P l + \varepsilon_{1;C}C_C l \\ A_2 = \varepsilon_{2;P}C_P l + \varepsilon_{2;C}C_C l \end{cases} \quad (22)$$

, где  $C_C$  – концентрация производного кумарина, моль/л;  $A_1$  – значение оптической плотности (поглощения) на длине волны, равной 409 нм (полоса  $S_{ore}$  – пик поглощения порфириновой группы цитохрома  $c$ ;  $A_2$  – значение оптической плотности (поглощения) на длине волны, соответствующей максимуму поглощения производных кумарина (447,5 нм для С-314 и 460 нм для С-334 и С-525);  $\varepsilon_{1;P}$  – коэффициент молярного поглощения цитохрома  $c$  на длине волны 409 нм;  $\varepsilon_{2;P}$  – коэффициент молярного поглощения цитохрома  $c$  на длине волны, соответствующей максимуму поглощения производных кумарина;  $\varepsilon_{1;C}$  – коэффициент молярного поглощения исследуемого производного кумарина на длине волны 409 нм;  $\varepsilon_{2;C}$  – коэффициент молярного поглощения производного кумарина на длине волны, соответствующей максимуму поглощения производных кумарина;  $l$  – толщина кюветы (длина оптического пути), см, в нашем случае она равнялась 1 см;  $C_P$  – концентрация цитохрома  $c$ , моль/л.

Используемое нами для определения концентраций цитохрома  $c$  и производных кумарина решение системы уравнений (22) имеет вид:

$$\begin{cases} C_P = \frac{A_1 - \varepsilon_{1;C}C_C l}{\varepsilon_{1;P}l} \\ C_C = \frac{A_2 \varepsilon_{1;P} - A_1 \varepsilon_{2;P}}{\varepsilon_{1;P} \varepsilon_{2;C} l - \varepsilon_{2;P} \varepsilon_{1;C} l} \end{cases} \quad (23)$$

Несмотря на то, что в реакционной смеси, концентрации веществ в которой вычислялись, помимо цитохрома  $c$  и производного кумарина находились и другие соединения (ТОКЛ,  $H_2O_2$ , иногда фосфатидная кислота), для определения концентраций мы использовали формулу (23), предполагающую наличие в системе только двух веществ. Это связано с тем, что в диапазоне длин волн 400–600 нм основной вклад в общую оптическую плотность смеси вносят только производное кумарина и цитохром  $c$ , а вкладом, вносимом фосфолипидами и  $H_2O_2$ , можно пренебречь в силу его незначительности.

### 2.3.5 Статистическая обработка результатов

При изучении кинетики образования свободных радикалов методом регистрации хемиллюминесценции для учёта ошибки экспериментатора и ошибок измерения приборов при анализе результатов регистрации спектров поглощения и флуоресценции, мы проводили статистическую обработку данных, используя доверительные интервалы по методике Стьюдента и применяя следующие формулы:

$$X_{\text{ср.}} = \frac{\sum_i^n x_i}{n} \quad (24)$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum_i^n (x_i - x_{\text{ср.}})^2}{F}} \quad (25)$$

$$S_{\bar{x}} = \frac{S}{\sqrt{n}} \quad (26)$$

$$x \pm \Delta x = x \pm t_{n;P} S_{\bar{x}} \quad (27)$$

, где  $n$  – количество аналогичных измерений;

$x_i$  – значение измеряемой величины в каждом измерении;

$x_{\text{ср.}}$  – среднее значение измеряемой величины;

$F$  – число степеней свободы, равное  $(n-1)$ ;

$S$  – среднеквадратичное отклонение;

$S_{\bar{x}}$  – стандартная ошибка среднего;

$P$  – доверительная вероятность;

$t_{n;P}$  – критерий Стьюдента при  $n$  измерениях и доверительной вероятности  $P$ ; в большинстве экспериментов, представленных в диссертации, проводилось 5 измерений, при обработке данных использовалась доверительная вероятность равная 95%, если в описании эксперимента не указано иное;

$x \pm \Delta x$  – граничные значения доверительного интервала.

### 3 РЕЗУЛЬТАТЫ

#### 3.1 Оптические свойства хинолизидиновых производных кумарина в среде 20 мМ фосфатного буфера

Результаты экспериментов по исследованию оптических свойств изучаемых производных кумарина в среде фосфатного буфера приведены на рисунке 10.

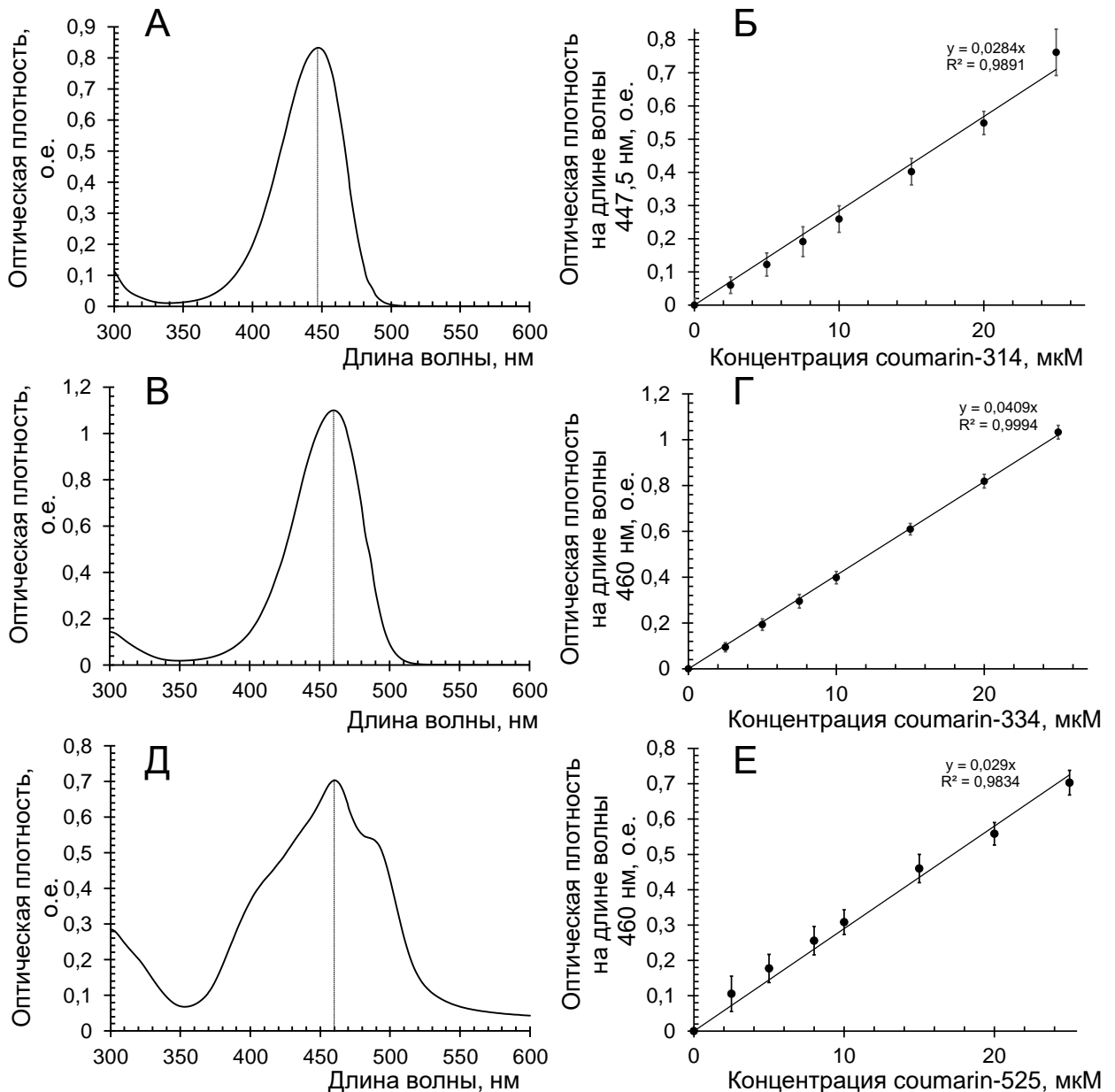


Рисунок 10. Оптическая плотность растворов хинолизидиновых производных кумарина.

А. Спектр поглощения 25 мкМ С-314, перпендикуляр на ось абсцисс – из максимума поглощения (447,5 нм). Б. Концентрационная зависимость поглощения раствора С-314 в максимуме. В. Спектр поглощения 25 мкМ С-334, перпендикуляр на ось абсцисс – из максимума поглощения (460 нм). Г. Концентрационная зависимость поглощения раствора С-334 в максимуме. Д. Спектр поглощения 25 мкМ С-525, перпендикуляр на ось абсцисс – из максимума поглощения (460 нм). Е. Концентрационная зависимость поглощения раствора С-525 в максимуме.

На рисунке 10 приведены данные касательно положения максимумов поглощения хинолизидиновых производных кумарина, С-314, С-334 и С-525, в среде 20 мМ фосфатного буфера и приведены концентрационные зависимости оптической плотности на этих длинах волн. Из результатов, представленных на рисунке 10, видна несимметричность пиков, растянутых в сторону коротковолновой области. На спектре поглощения С-525 (рис. 10Д) наряду с основным максимумом поглощения на длине волны 460 нм наблюдается также второй пик на длине волны 490 нм, не характерный для С-314 и С-334.

С использованием математического выражения закона Бугера–Ламберта–Бера нами были показаны значения эффективных коэффициентов молярного поглощения ( $\epsilon$ ) исследуемых производных кумарина, а также цитохрома *c* в среде 20 мМ фосфатного буфера (рН=7,4). Максимум поглощения С-314 приходится на длину волны 447,5 нм ( $\epsilon=32360,4$  л/моль·см), С-334 – на 460 нм ( $\epsilon=44012$  л/моль·см), С-525 – на 460 нм ( $\epsilon=32703,56$  л/моль·см). Значение  $\epsilon$  С-314, С-334 и С-525 на длине волны 409 нм, соответствующей пику поглощения цитохрома *c*, составляет 12562,4, 9240 и 14987,26 л/моль·см соответственно. Значение  $\epsilon$  для цитохрома *c* на длинах волн 409, 447,5 и 460 нм составляет 90740, 13890 и 8620 л/моль·см соответственно.

Также необходимо сказать несколько слов о растворимости изучаемых производных кумарина. С-334 в сравнении с двумя другими кумариновыми красителями показал более высокую растворимость и в метаноле (получалось приготовить даже 4 мМ растворы), и в среде фосфатного буфера.

### **3.2 Спектрофотометрический анализ обратимости изменения конформации (развёртывания) цитохрома *c* под действием метанола**

В силу того что при изучении свойств комплекса ЦитС-КЛ зачастую используются растворы, растворителем в которых является метанол (это и стоковый раствор кардиолипина, и стоковые растворы исследуемых в настоящей работе активаторов ХЛ – производных кумарина, и на определённых этапах эксперимента концентрация спирта в образце может быть весьма существенной), встаёт необходимость изучить особенности действия метанола на структуру ЦитС.

Для анализа обратимости изменения конформации ЦитС под действием метанола нами совместно с коллегами из МГУ было проведено спектрофотометрическое исследование, результаты которого представлены в одном из разделов статьи [109]. Первоначально мы зарегистрировали спектры поглощения чистого раствора ЦитС, показанные на рисунке 11. Максимум поглощения в области 409 нм соответствует гемовой группе белка (рис. 11А); небольшой максимум в области 695–700 нм – связи между гемовым железом и атомом серы в остатке метионина в положении 80 (рис. 11Б) [24, 40, 41]; на спектре поглощения ЦитС также имеет место и максимум в области 530 нм [40], не выделенный на рисунке 11.

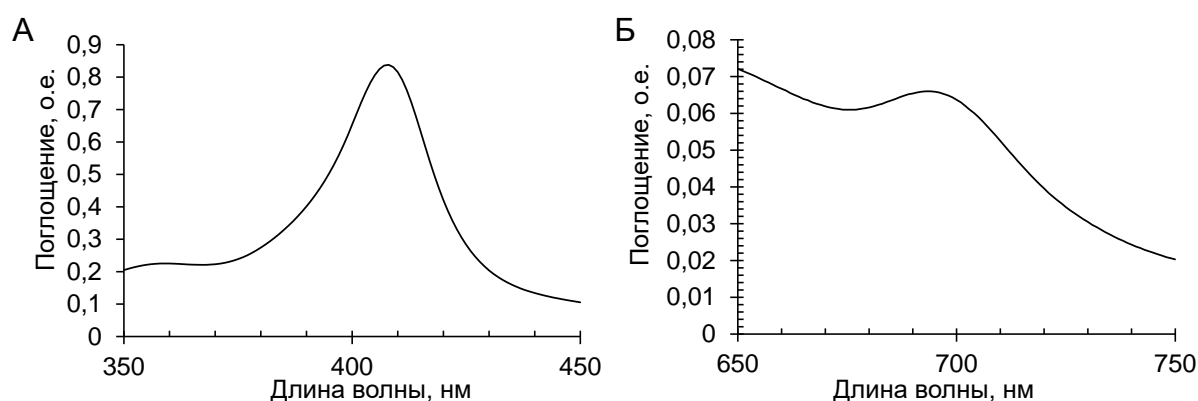


Рисунок 11. А. Спектр поглощения 10 мкМ цитохрома *c* в диапазоне длин волн 350–450 нм. Б. Спектр поглощения цитохрома *c* концентрацией 100 мкМ в диапазоне 650–750 нм.

Влияние метанола на структуру ЦитС оценивалось путём анализа изменения поглощения в максимуме в области 695–700 нм, графики – на рисунке 12.

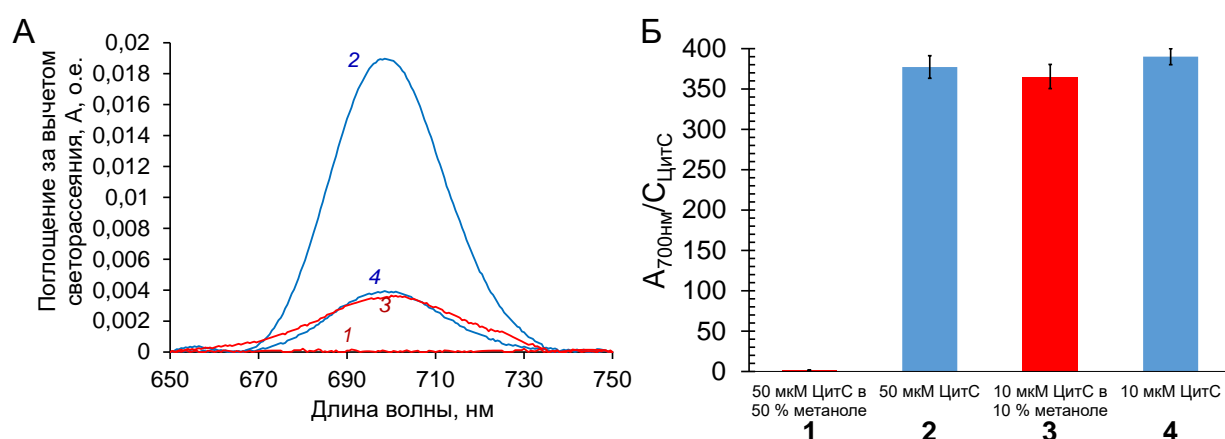


Рисунок 12. Обратимость действия метанола на состояние Fe-S связей в молекуле цитохрома *c*.

А. Спектры поглощения в диапазоне длин волн 650–750 нм, подвергнутые компьютерной обработке. **Кривая 1** – 50 мкМ цитохром *c* в 50% метаноле, **кривая 2** – 50 мкМ цитохром *c*, **кривая 3** – 10 мкМ цитохром *c* в 10% метаноле (разбавленная в 5 раз предыдущая проба 1), **кривая 4** – 10 мкМ цитохром *c*.

Б. Диаграмма, отражающая восстановление Fe-S связей в молекуле цитохрома *c*.

**Красные столбики** – опытная проба, **синие столбики** – контрольная.

На рисунке 12А показаны спектры поглощения в диапазоне 650–750 нм, обработанные с использованием программного обеспечения «Fityk0.9.8.». Эксперимент заключался в регистрации спектров двух проб: 50 мкМ цитохрома *c* в чистом фосфатном буфере и в 50% метаноле, с последующим 5-кратным разбавлением этих проб и регистрацией их спектров поглощения. Из спектров на рисунке 12 (базовая линия поглощения вычтена в «Fityk0.9.8.») видно, что 50%-й метанол подавляет поглощение цитохрома *c* в пике 695–700 нм (кривая 1), однако при 5-кратном разбавлении раствора спектр поглощения этого раствора (кривая 3) практически совпадает с таковой для чистого, без метанола, 10 мкМ раствора цитохрома *c* (кривая 4). Вывод об обратимости действия метанола позволяет сделать и рисунок 12Б, иллюстрирующий значения отношения поглощения в области 695–700 нм к концентрации белка, моль/л.

### **3.3 Подтверждение обусловленности хемилюминесценции системы цитохром *c*–кардиолипид ферментативной активностью цитохрома *c***

Метод регистрации хемилюминесценции (ХЛ), как уже отмечалось выше, является весьма подходящим способом изучения свободнорадикальных процессов. Квазилипоксигенгазная и липопероксидазная активность комплекса цитохрома *c* с кардиолипином не является исключением. В этом случае регистрируется ХЛ, сопровождающая липидную пероксидацию, запущенную образовавшимися под действием цитохрома *c* липидными радикалами. Однако липидная пероксидация может быть запущена и без участия фермента-пероксидазы; более того, подобные системы зачастую выступают в роли экспериментальных моделей [44, 141]. При этом надо отметить: до наших исследований не были получены доказательства того, что ХЛ в присутствии комплекса цитохрома *c* с кардиолипином обусловлена именно его липопероксидазной и квазилипооксигенгазной активностью, а не взаимодействием ионов  $Fe^{2+}$ , образующихся, к примеру, путём разрушения гема, с липидами посредством реакции Фентона. Поэтому нами был проведён соответствующий эксперимент, заключающийся в регистрации активированной 25 мкМ С-334 ХЛ трёх систем: 1) соевый лецитин– $Fe^{2+}$ , 2) соевый лецитин–пероксидаза хрена (ПХ), 3) цитохром *c*–кардиолипид (использовался бычий

кардиолипин, который также является субстратом квазилипоксигеназной и липопероксидазной реакций), – в присутствии комплексонов, связывающих ионы железа: *орто*-фенантролина и ЭДТА различных концентраций. Результаты эксперимента приведены на рис. 13.

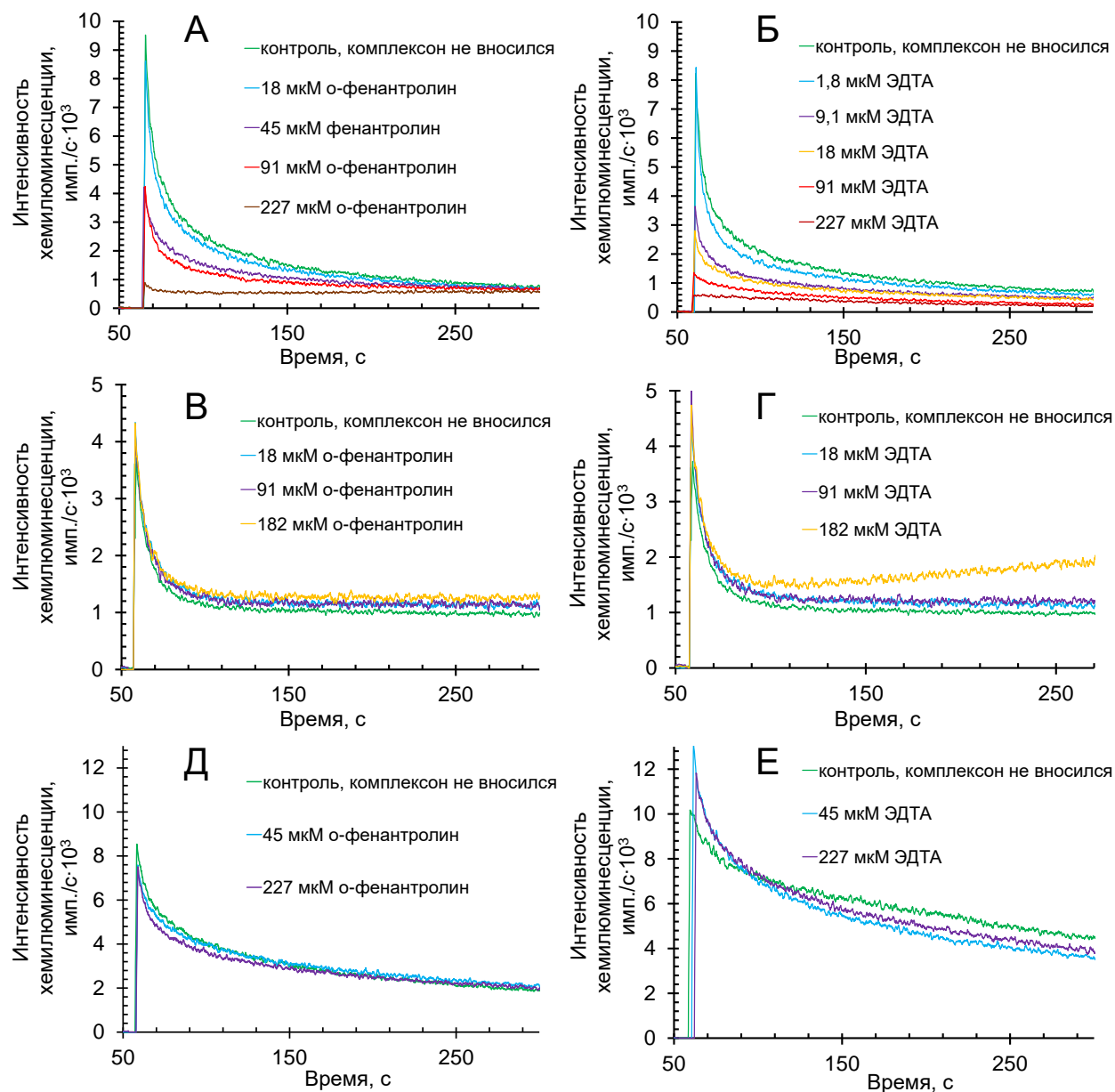


Рисунок 13. Действие *o*-фенантролина (А) и ЭДТА (Б) на кинетику индуцированной катионами  $\text{Fe}^{2+}$  ХЛ в присутствии соевого лецитина, концентрации:  $\text{FeSO}_4$  – 91 мкМ, лецитин – 2 мг/мл. Действие *o*-фенантролина (В) и ЭДТА (Г) на кинетику ХЛ в присутствии ПХ и соевого лецитина, концентрации: ПХ – 10 мкМ, соевый лецитин – 2 мг/мл. Действие *o*-фенантролина (Д) и ЭДТА (Е) на кинетику ХЛ в присутствии ЦитС и БКЛ, концентрации: ЦитС – 10 мкМ, БКЛ – 600 мкМ. Концентрации комплексонов указаны на рисунке.

Как видно из представленных на рисунке 13 данных, в системе соевый лецитин –  $\text{Fe}^{2+}$  как ЭДТА, так и *o*-фенантролин подавляли ХЛ; причём подавление проявлялось тем больше, чем выше была концентрация комплексонов. Но при этом

данные комплексоны тех же концентраций не подавляли ХЛ, индуцированную как ПХ, так и комплексом ЦитС-БКЛ. Эти данные показывают, что комплексоны действуют на ХЛ в системе цитохром *c*-кардиолипид так же, как и на ХЛ в присутствии классической пероксидазы, которой является ПХ. Следовательно, ХЛ системы цитохром *c*-кардиолипид обусловлена работой ЦитС, выступающего в роли фермента-пероксидазы, а не свободными ионами  $Fe^{2+}$ , которые могли бы появиться в системе, в том числе, и в результате разрушения препарата ЦитС, например, во время хранения.

### **3.4 Анализ течения квазилипоксигеназной и липопероксидазной реакций, катализируемых комплексом цитохрома *c* с кардиолипидом в присутствии хинолизидинового производного кумарина**

Представленное в настоящей диссертационной работе исследование механизма участия производных кумарина в катализируемых комплексом цитохрома *c* с кардиолипидом квазилипоксигеназной и липопероксидазной реакциях представляет собой анализ спектрофотометрических измерений, проведённых параллельно с регистрацией хемилюминесценции. Впервые нестабильность производных кумарина в системах, в которых присутствовал комплекс цитохрома *c* с кардиолипидом, была обнаружена автором настоящей диссертации в 2017 году [106]. В 2018 году мы доказали, что производные кумарина сами по себе не взаимодействуют ни со свободным ЦитС, ни с  $H_2O_2$  [105, 108]. Отсюда неопровержимо следует, что снижение концентрации производных кумарина при ферментативной липопероксидазной реакции вызвано именно их взаимодействием с ферментом-пероксидазой, переходящим в различные формы при прохождении каталитического цикла. В качестве дополнительно аргумента в пользу этого тезиса на рисунке 14 мы приводим серию спектров поглощения, зарегистрированных в различные моменты времени после внесения в систему  $H_2O_2$ , смеси, содержащей фосфолипиды (фосфатидную кислоту и ТОКЛ),  $H_2O_2$  и С-334, иными словами – полной базовой реакционной смеси с дополнительным легкоокисляемым липидным субстратом, в роли которого выступает фосфатидная кислота, без внесения в неё ЦитС, который и должен катализировать



пероксидазную реакцию вследствие образования комплекса с ТОКЛ.

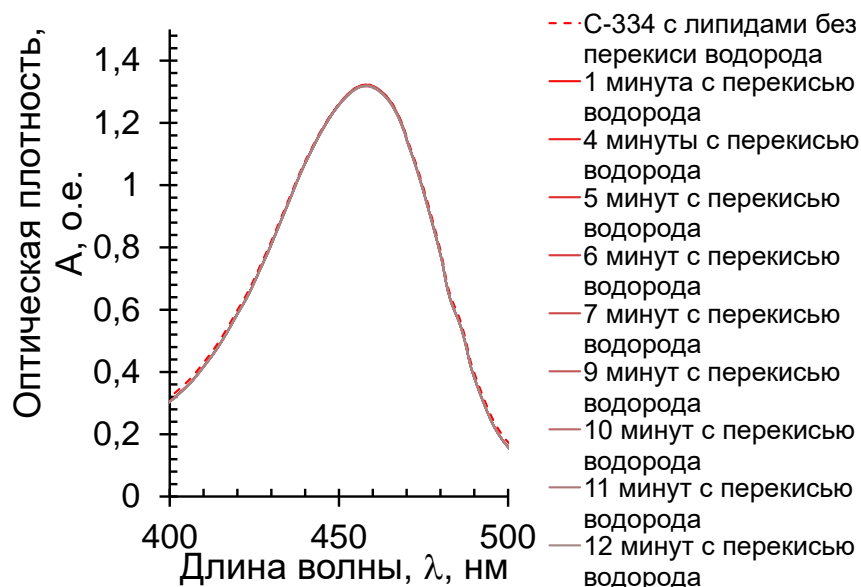


Рисунок 14. Серия спектров поглощения, доказывающая отсутствие химической реакции между производным кумарина и липидами в присутствии  $\text{H}_2\text{O}_2$  в отсутствие пероксидазы (ЦитС). В легенде указано время, прошедшее с момента добавления 215 мкМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  к смеси 300 мкМ ТОКЛ, 600 мкМ ФК и 25 мкМ С-334.

Из данных, представленных на рисунке 14, следует, что в отсутствие пероксидазы никакого разрушения производных кумарина не происходит, а показанное нами в работах [105-107, 114] их разрушение – результат того, что эти вещества являются субстратом катализирующей пероксидазную реакцию ЦитС, связанного с кардиолипином.

Придя к этому выводу, мы смогли провести кинетическое исследование разрушения производных кумарина в процессе катализируемой комплексом цитохрома *c* с кардиолипином липопероксидазной реакции.

#### **3.4.1 Спектрофотометрический анализ участия хинолизидиновых производных кумарина в пероксидазной реакции, катализируемой комплексом цитохрома *c* с тетраолеилкардиолипином**

При параллельной регистрации хемилюминесценции нами были получены серии спектров поглощения смеси, в которой в присутствии производных кумарина протекает катализируемая комплексом ЦитС-ТОКЛ пероксидазная реакция. На рисунках 15 и 18 представлены результаты эксперимента для смеси, состоящей из комплекса ЦитС-ТОКЛ при начальном соотношении ЦитС:ТОКЛ 1:30 и 215 мкМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  в присутствии С-314 и С-525 соответственно, на рисунках 16 и 17 – в присутствии С-334 при соотношениях ЦитС:ТОКЛ 1:30 и 1:60 соответственно.

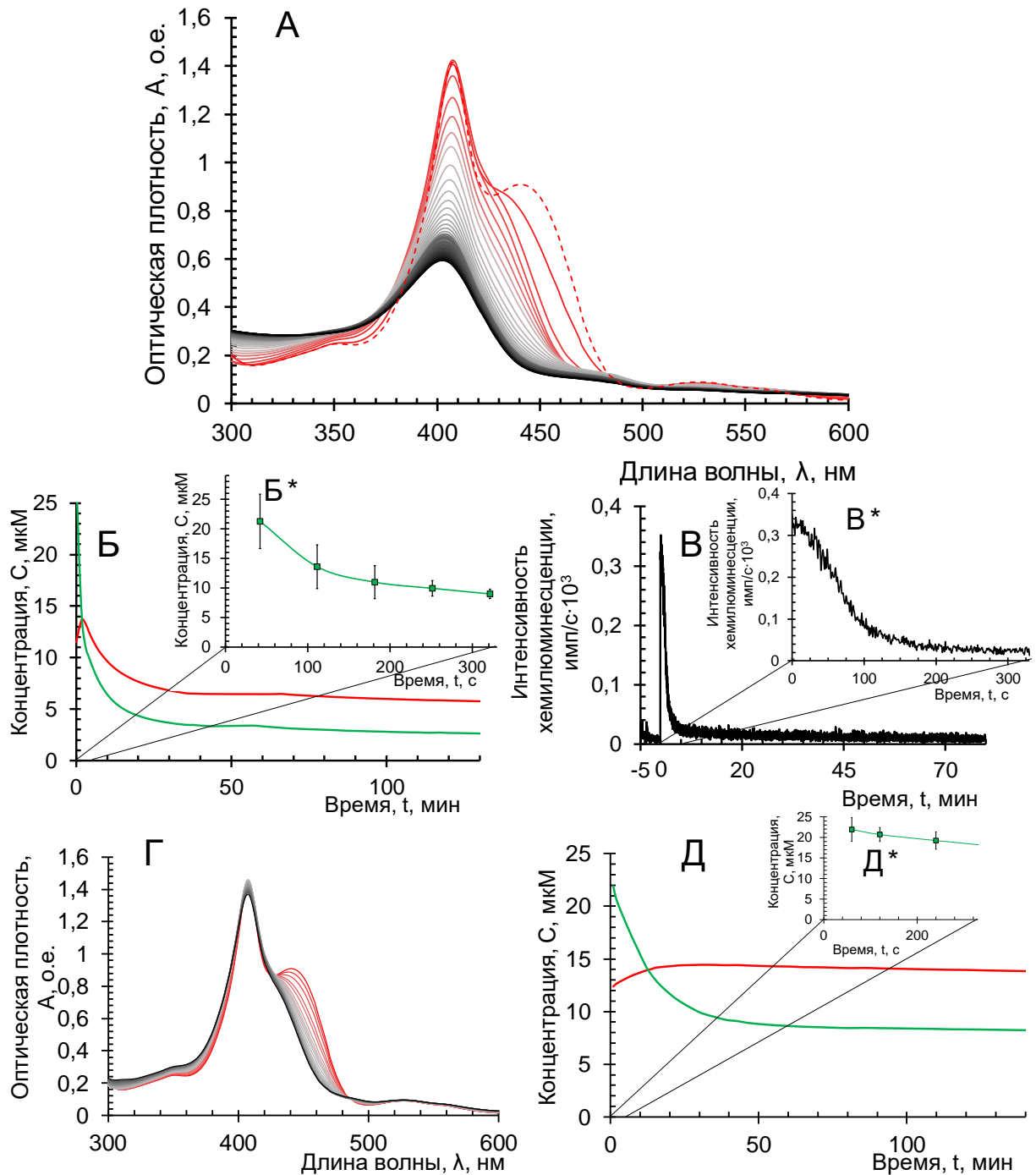


Рисунок 15. А. Серия спектров поглощения смеси ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС:ТОКЛ 1:30, 215 мкМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  и С-314. Пунктирная красная кривая – спектр смеси без  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Сплошные кривые – опытные измерения: красная кривая – первое измерение, чёрная – последнее, промежуточные цвета (через серый) – промежуточные измерения.

Б. Уменьшение концентрации железопорфирина в составе ЦитС (красная кривая) и С-314 (зелёная кривая) в процессе реакции. Врезка Б\*. Уменьшение концентрации С-314 в течение первых 5,5 минут реакции.

В. Хемилюминесценция указанной смеси. Нулевое значение времени – момент добавления  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Врезка В\*. Хемилюминесценция указанной смеси в течение первых 5,5 минут реакции.

Г. Серия спектров поглощения смеси в отсутствии  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Д. Уменьшение концентрации железопорфирина в составе ЦитС (красная кривая) и С-314 (зелёная кривая) в процессе реакции в отсутствии  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Врезка Д\*. Уменьшение концентрации С-314 в течение первых 5 минут реакции.

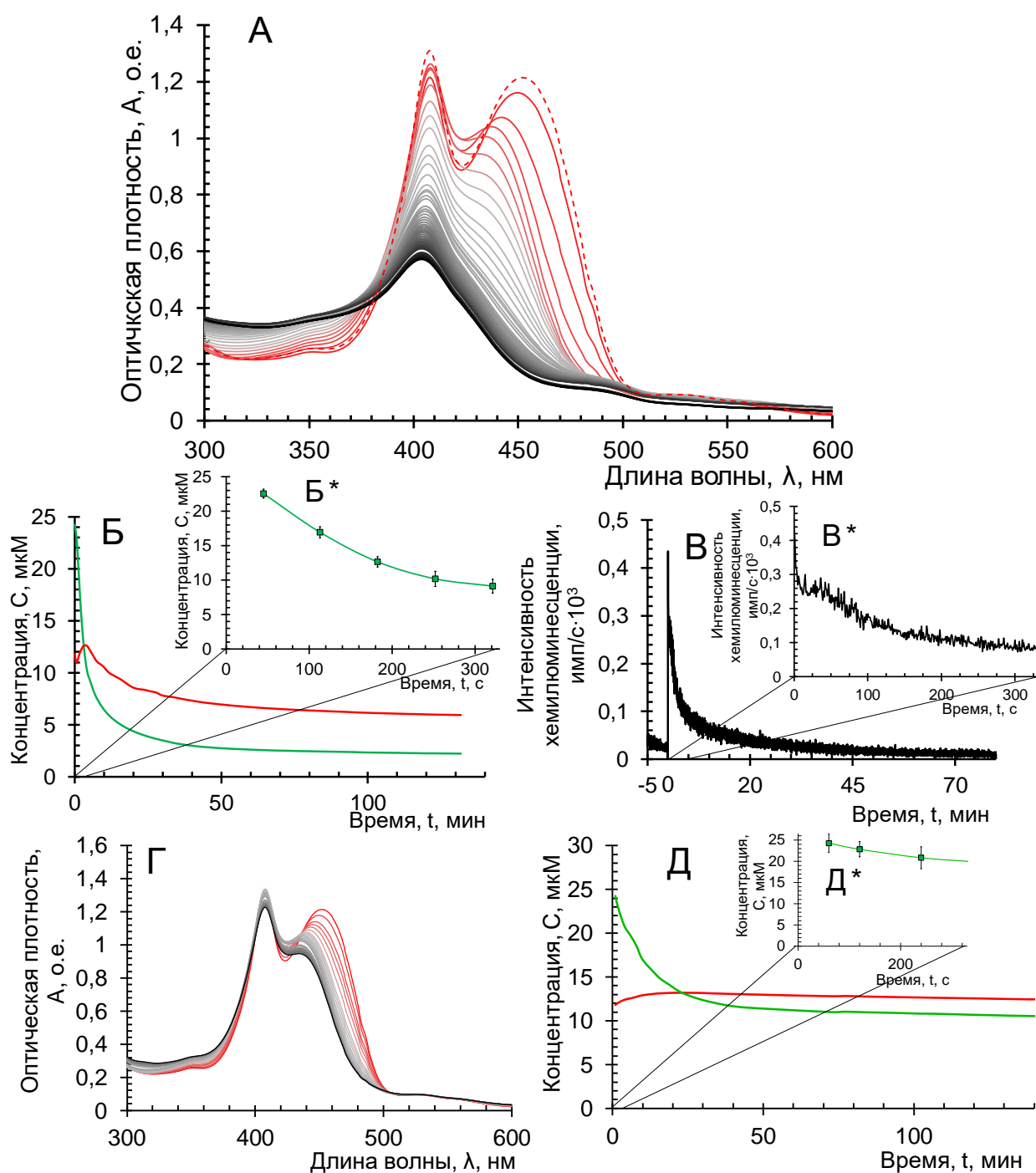


Рисунок 16. А. Серия спектров поглощения смеси ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС:ТОКЛ 1:30, 215 мкМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  и С-334. Пунктирная красная кривая – спектр смеси без  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Сплошные кривые – опытные измерения: красная кривая – первое измерение, чёрная – последнее, промежуточные цвета (через серый) – промежуточные измерения.

Б. Уменьшение концентрации железопорфирина в составе ЦитС (красная кривая) и С-334 (зелёная кривая) в процессе реакции. Врезка Б\*. Уменьшение концентрации С-334 в течение первых 5,5 минут реакции.

В. Хемилюминесценция указанной смеси. Нулевое значение времени – момент добавления  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Врезка В\*. Хемилюминесценция указанной смеси в течение первых 5,5 минут реакции.

Г. Серия спектров поглощения указанной смеси в отсутствии  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Д. Уменьшение концентрации железопорфирина в составе ЦитС (красная кривая) и С-334 (зелёная кривая) в процессе реакции в отсутствии  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Врезка Д\*. Уменьшение концентрации С-334 в течение первых 5 минут реакции.

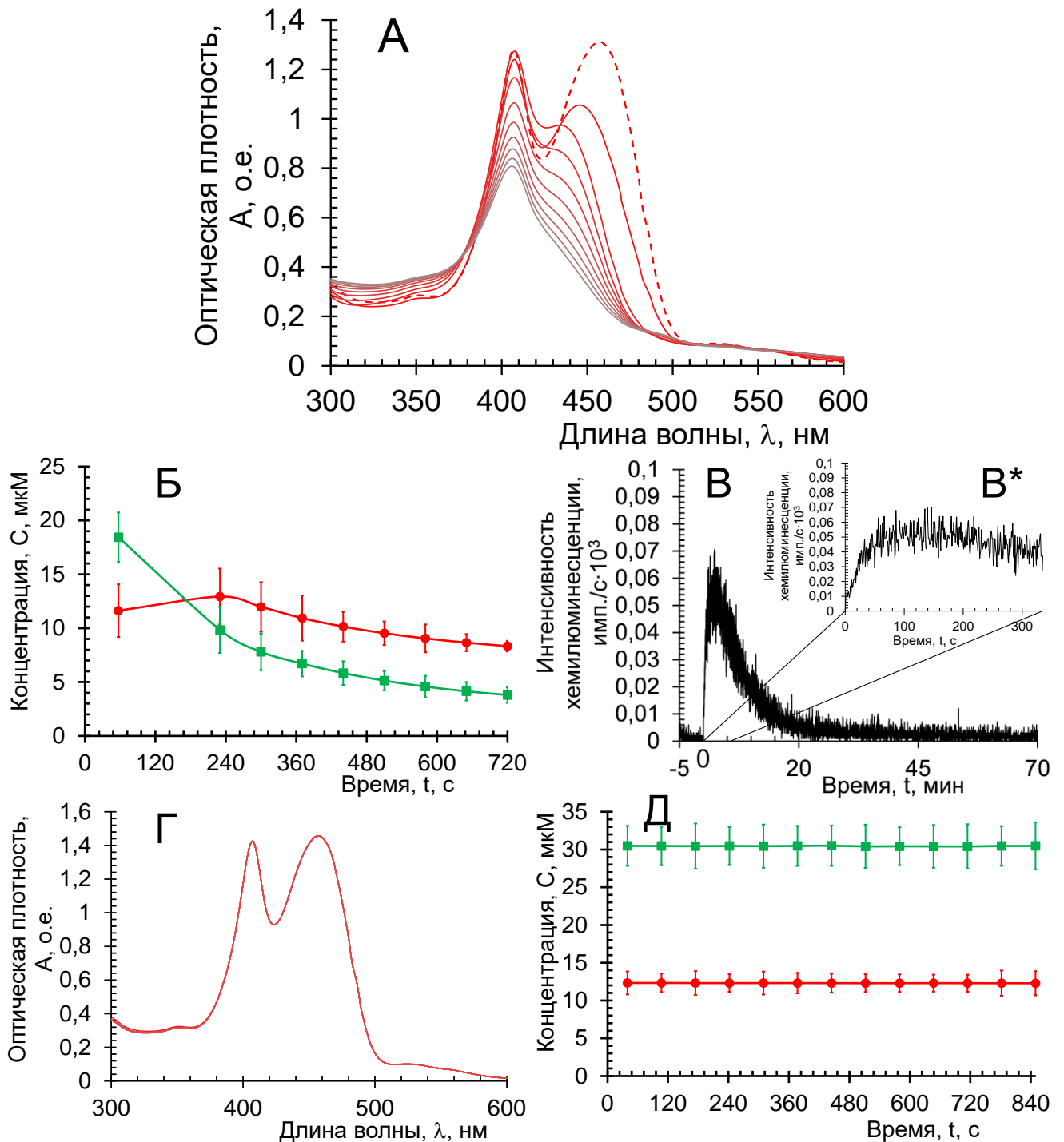


Рисунок 17. А. Серия спектров поглощения смеси ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС:ТОКЛ 1:60, 215 мкМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  и С-334. Пунктирная красная кривая – спектр смеси без  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Сплошные кривые – опытные измерения: красная кривая – первое измерение, серая – последнее, промежуточные цвета – промежуточные измерения.

- Б. Уменьшение концентрации железопорфирина в составе ЦитС (красная кривая) и С-334 (зелёная кривая) в течение первых 12 минут реакции.
- В. Хемилюминесценция указанной смеси. Нулевое значение времени – момент добавления  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Врезка В\*. Хемилюминесценция указанной смеси в течение первых 5,5 минут реакции.
- Г. Серия спектров поглощения указанной смеси в отсутствии  $\text{H}_2\text{O}_2$ .
- Д. Уменьшение концентрации железопорфирина в составе ЦитС (красная кривая) и С-334 (зелёная кривая) в процессе реакции в отсутствии  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Врезка Д\*. Уменьшение концентрации С-334 в течение первых 5 минут реакции.

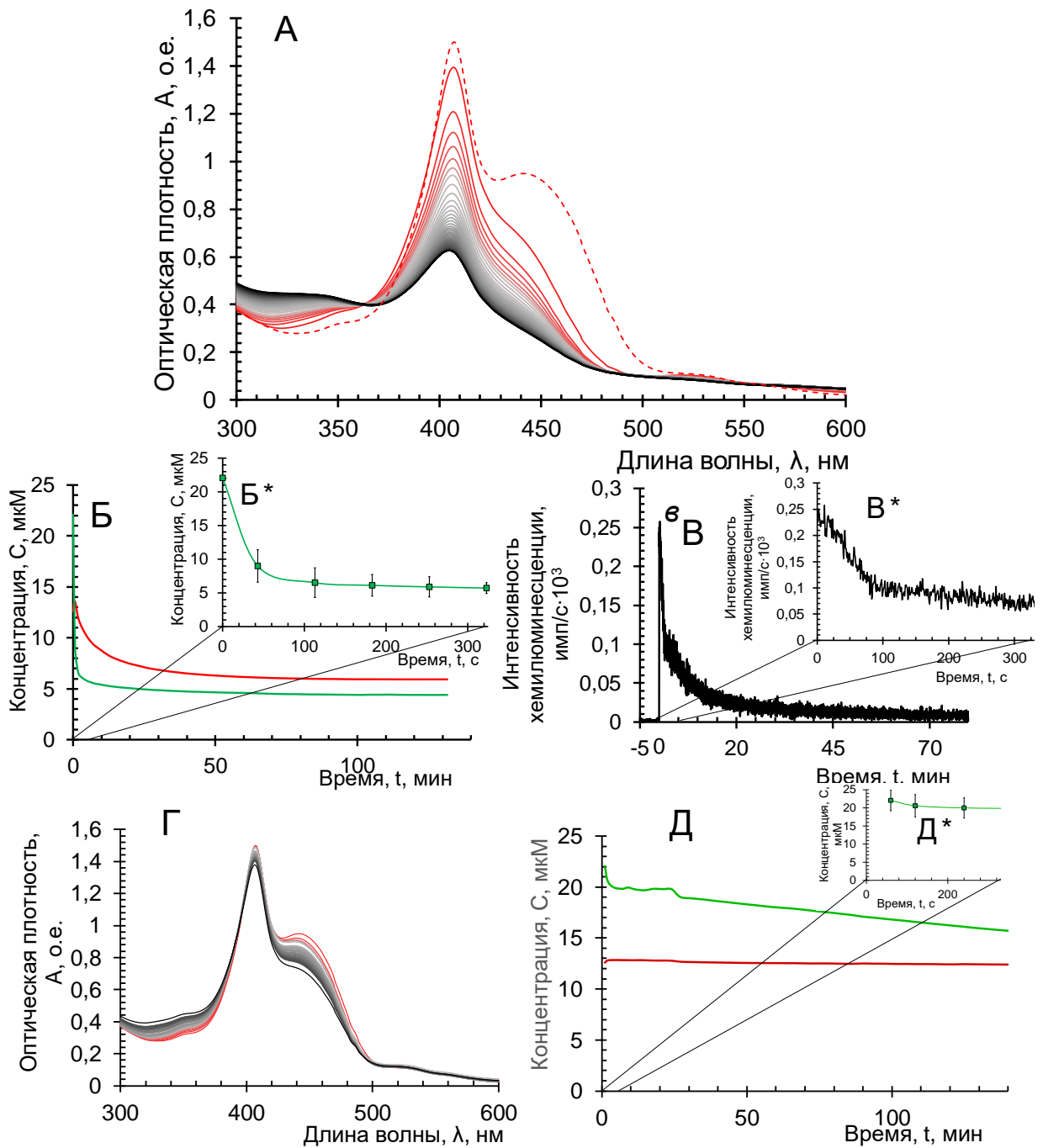


Рисунок 18. А. Серия спектров поглощения смеси ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС:ТОКЛ 1:30, 215 мкМ Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> и С-525. Пунктирная красная кривая – спектр смеси без Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>. Сплошные кривые – опытные измерения: красная кривая – первое измерение, чёрная – последнее, промежуточные цвета (через серый) – промежуточные измерения.

Б. Уменьшение концентрации железопорфирина в составе ЦитС (красная кривая) и С-525 (зелёная кривая) в процессе реакции. Врезка Б\*. Уменьшение концентрации С-525 в течение первых 5,5 минут реакции.

В. Хемилюминесценция указанной смеси. Нулевое значение времени – момент добавления Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>. Врезка В\*. Хемилюминесценция указанной смеси в течение первых 5,5 минут реакции.

Г. Серия спектров поглощения указанной смеси в отсутствии Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>.

Д. Уменьшение концентрации железопорфирина в составе ЦитС (красная кривая) и С-525 (зелёная кривая) в процессе реакции в отсутствии Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>. Врезка Д\*. Уменьшение концентрации С-525 в течение первых 5 минут реакции.

Алгоритм регистрации спектров поглощения представлен в параграфе «2.3.1.4 Регистрация серии спектров поглощения смеси, в которой протекает катализируемая комплексом цитохрома *c* с кардиолипином липопероксидазная реакция». Анализ полученных спектров заключался в вычислении значений концентраций хинолизидинового производного кумарина и ЦитС по формуле (23) с использованием представленных в параграфе «3.1 Оптические свойства хинолизидиновых производных кумарина в среде 20 мМ фосфатного буфера» эффективных коэффициентов молярного поглощения  $\epsilon$ . При этом концентрации мы вычисляли так, будто смесь состояла только из двух веществ. Но это упрощение не вносит искажения в результат вычисления, так как на рассматриваемых длинах волн кардиолипиды и  $\text{H}_2\text{O}_2$  имеют низкие значения оптической плотности, и практически весь вклад в общее поглощение смеси в диапазоне длин волн 405–465 нм вносят ЦитС и производное кумарина.

Из данных, представленных на рисунках 15–18, следует, что хинолизидиновые производные кумарина расходуются в процессе катализируемой комплексом ЦитС с кардиолипином пероксидазной реакции. А значит, недопустимо экстраполировать вывод о неучастии этих веществ в реакции липидной пероксидации, полученный авторами [44, 139, 422] в эксперименте с системой, в которой этот процесс запускался свободными катионами  $\text{Fe}^{2+}$ , на системы, в которых эти реакции катализируются пероксидазой. Заметим, что при начальном соотношении ЦитС:ТОКЛ равном 1:30 уменьшение концентрации производного кумарина наблюдалось и без добавления в систему  $\text{H}_2\text{O}_2$  (15Д, 16Д, 18Д), хотя и не столь значительное, чем в случае её присутствия в системе.

Поскольку во всех исследованиях с использованием хинолизидиновых производных кумарина в качестве активаторов ХЛ, сопровождающей липопероксидазную реакцию, катализируемую комплексом ЦитС с кардиолипином, экспериментаторы считали, что эти активаторы в ходе данной реакции не расходуются [37, 53]. А это неверный вывод, как видно из наших данных. В первую очередь перед нами встаёт задача вычислить долю производного кумарина, расходующуюся в течение среднестатистического опыта по измерению

ХЛ. Обычно он длится от 3 до 10 минут. Мы вычислили расход изучаемых хинолизидиновых производных кумарина за первые 5 и 10 минут реакции. За время, равное 5 минутам, в системе, в которой пероксидазная реакция (начальная концентрация  $\text{H}_2\text{O}_2$  равна 215 мкМ) катализируется ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС:ТОКЛ, равном 1:30, расходуется  $(62,8 \pm 0,8)\%$  С-314,  $(64,2 \pm 2,2)\%$  С-334 и  $(69,3 \pm 1,1)\%$  С-525. А за время, равное 10 минутам, в вышеуказанной системе расходуется  $(75,4 \pm 1,0)\%$  С-314,  $(77,0 \pm 2,7)\%$  С-334 и  $(73,0 \pm 1,9)\%$  С-525. Также мы вычислили процент расхода С-334 в системе, в которой пероксидазная реакция катализовалась ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС:ТОКЛ, равном 1:60: за первые 5 минут реакции он равен  $(70,1 \pm 1,5)\%$ , а за 10 минут –  $(83,2 \pm 1,8)\%$ .

Обращаем внимание читателя на то, что серии спектров поглощения с рисунков 15А,Г, 16А,Г и 18А,Г ранее уже были представлены в написанной автором выпускной квалификационной работе магистра [105], а серии спектров с рисунков 15А, 16А и 18А несколько позже ещё и фигурировали в кандидатской диссертации Г.К. Владимирова [25], где он пытался вычислить «степень разрушения кумариновых сенсбилизаторов за 8 минут» реакции. Однако он проводил это вычисление не на основании значения концентраций веществ, а на основании снижения оптической плотности в области максимума их поглощения, игнорируя тот факт, что весомый вклад в это значение вносит также и ЦитС, концентрация которого в системе снижалась независимо от снижения концентрации производных кумарина. Поэтому Г.К. Владимиров получил заниженные примерно в 2 раза против истины значения «разрушения кумаринов». Также укажем на то, что Г.К. Владимиров не приводит данные о сопровождающей обсуждаемые реакции ХЛ [25], хотя эти ХЛ-кривые к тому моменту уже были представлены автором настоящей диссертации в работе [105].

В разделе «4.5 Поправочные функции, учитывающие разрушение кумариновых активаторов в ходе ферментативной липидной пероксидации» представлены вычисленные нами значения констант скорости разрушения производных кумарина и функции для вычисления поправочных коэффициентов на снижение их концентрации.

Обращаем внимание, что на серии спектров поглощения (рис. 15А,Г, 16А,Г, 18А,Г) может показаться, что максимум поглощения кумаринового производного сдвигается в более коротковолновую область. Но настоящего сдвига максимума поглощения в исследуемой системе, скорее всего, не происходит. А этот эффект обусловлен тем, что оптическая плотность на длинах волн между 409 и 460 нм является суммой оптических плотностей, которые наблюдаются в чистых растворах цитохрома *c* и производных кумарина таких концентраций, которые равны концентрациям этих веществ в соответствующие моменты времени изучаемой реакции [34].

Однако заметим, что наряду с разрушением производных кумарина может происходить их превращение в какое-то окрашенное вещество, также впоследствии разрушающееся под действием пероксидазы, с максимумом поглощения в более коротковолновой области, чем у производного кумарина, например между 409 и 450 нм. В пользу этой гипотезы может свидетельствовать повышение величины оптической плотности в максимуме поглощения ЦитС (409 нм) – особенно хорошо это заметно в контрольных пробах (рис. 15Г, 16Г, 18Г). Очевидно, что концентрация ЦитС никоим образом в процессе реакции не могла увеличиться, значит, увеличение значения поглощения при 409 нм может быть обусловлено образованием в процессе данной реакции нового вещества, максимум поглощения которого находится близко к 409 нм (скорее всего, в районе 415–435 нм), или же которое неспецифически повышает значение поглощения на протяжении всего спектра данной смеси, особенно – в коротковолновой области.

Эксперименты, результаты которых представлены на рисунках 15–18, нельзя в полной мере относить именно к теме применения производных кумарина для изучения липопероксидазной активности комплекса ЦитС с кардиолипином, так как в системе отсутствовал правильный липидный субстрат: ТОКЛ, используемый в указанных экспериментах, конечно, может выступать и в роли липидного субстрата, однако по сравнению с кардиолипинами, содержащими более ненасыщенные ацилы, окисляется он крайне плохо. А поскольку у млекопитающих митохондриальные мембраны состоят из более ненасыщенных, нежели ТОКЛ,



фосфолипидов [142], мы также изучили динамику расходования производных кумарина в системе, в которой наряду с комплексом ЦитС-ТОКЛ и  $H_2O_2$  присутствует дополнительный фосфолипидный субстрат, содержащий в своём составе полиненасыщенные ацилы, что описано в следующем параграфе.

### ***3.4.2 Спектрофотометрический анализ участия хинолизидиновых производных кумарина в квазилипоксигеназной и липопероксидазной реакциях, катализируемых комплексом цитохрома с с кардиолипином***

В экспериментах, результаты которых описаны в предыдущем параграфе, чётко показано, что хинолизидиновые производные кумарина являются субстратами катализируемой ЦитС-ТОКЛ пероксидазной реакции. Но называть ту реакцию липопероксидазной может быть некорректным по причине ограниченной способности ТОКЛ к окислению: олеилы только одну двойную связь. Поэтому пероксидазный каталитический цикл в этом случае с высокой долей вероятности проходит не через реакции 3а и 4а с рисунка 6, а через реакции, субстратом которых является дополнительная молекула  $H_2O_2$ , например – реакции 3b и 4b.

Поэтому мы изучили участие производных кумарина в катализируемой ЦитС-ТОКЛ липопероксидазной реакции в присутствии в системе фосфатидной кислоты (ФК), содержащей полиненасыщенные ацилы. Начальная концентрация её в системе составляла 600 мкМ. Использование данного субстрата также позволяет провести исследование участия производных кумарина в катализируемой ЦитС-ТОКЛ квазилипоксигеназной реакции (в случае отсутствия в системе  $H_2O_2$ ): препарат ФК в силу легкоокисляемости содержит ограниченное число липидных гидроперекисей, которые являются окисляющим субстратом квазилипоксигеназной реакции; восстанавливающим её субстратом являются ацилы в реакции, аналогичной реакциям 3а и 4а с рисунка 6.

Также использование трудноокисляемого ТОКЛ в качестве кардиолипина-кофактора ЦитС, обуславливающего проявление им пероксидазных свойств, способствует необходимому для обеспечения хорошего связывания с ЦитС состоянию кардиолипина, и, следовательно, – большей достоверности результатов эксперимента, представленных на рисунках 19–21.

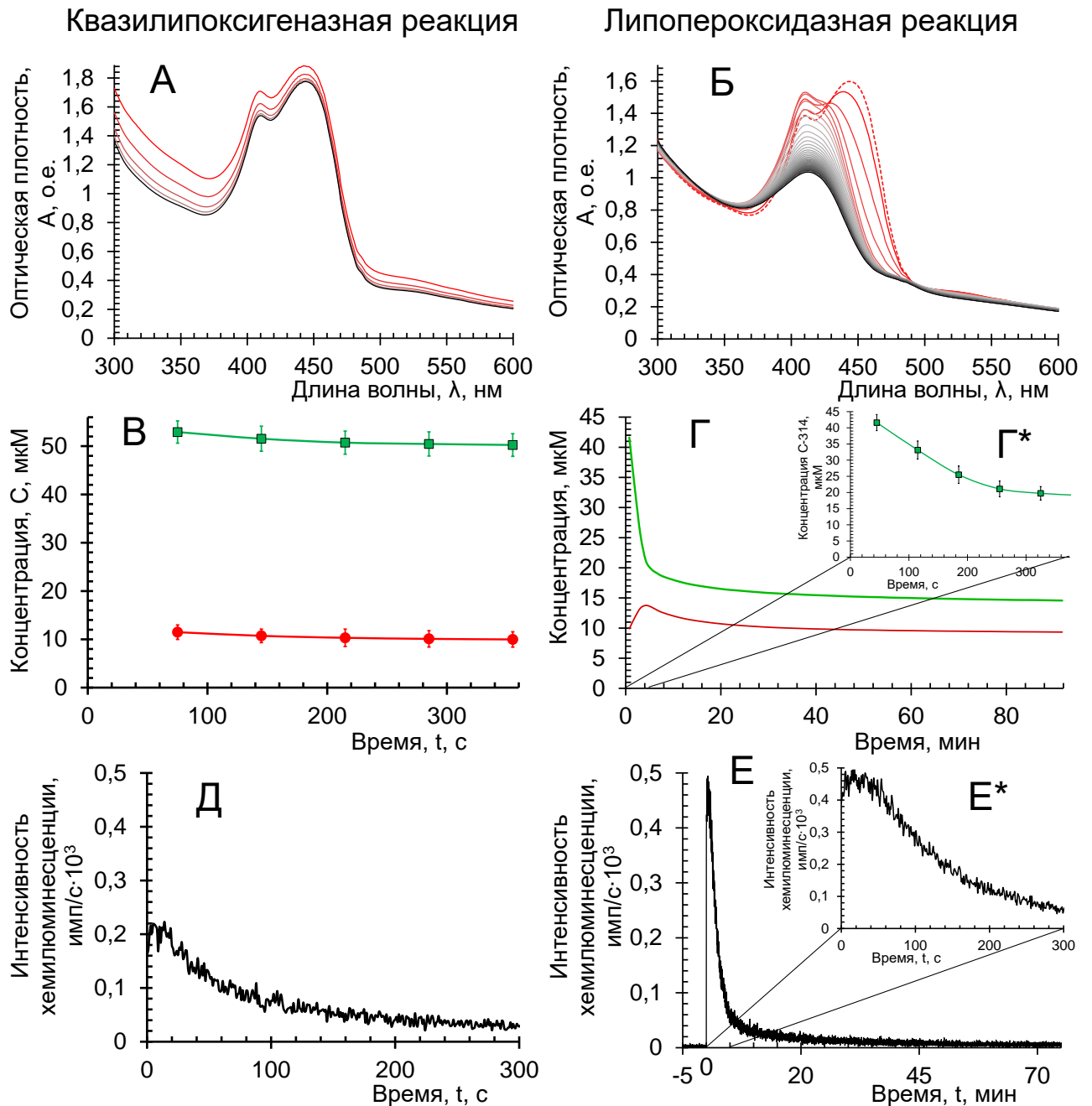


Рисунок 19. Квазилипоксигеназная (А, В, Д) и липопероксидазная (Б, Г, Е) реакции, катализируемые ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС:ТОКЛ 1:30 в присутствии С-314.

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

Б. Серия спектров поглощения смеси (указанной в А.) в присутствии  $\text{H}_2\text{O}_2$  начальной концентрацией 215 мкМ. Пунктирная красная кривая – спектр смеси без  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Сплошные кривые – опытные измерения: красная кривая – первое измерение, чёрная – последнее, промежуточные цвета (через серый) – промежуточные измерения.

В. Значения концентрации железопорфирина в составе ЦитС (красная кривая) и С-314 (зелёная кривая) в процессе квазилипоксигеназной реакции.

Г. Уменьшение концентрации железопорфирина 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  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Нулевое значение времени – момент добавления  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Врезка Е\*. ХЛ указанной смеси в течение первых 5 минут реакции.

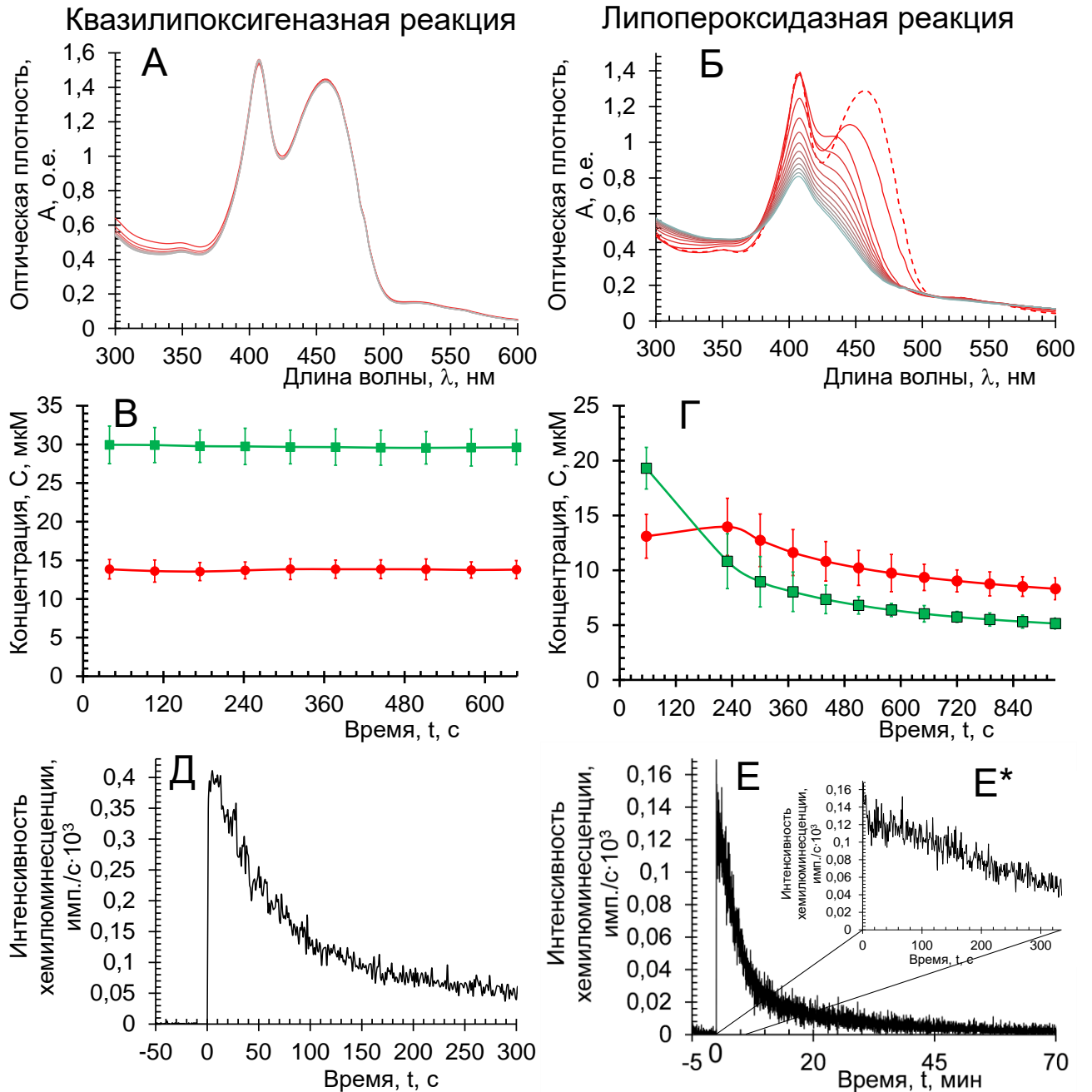


Рисунок 20. Квазилипоксигеназная (А, В, Д) и липопероксидазная (Б, Г, Е) реакции, катализируемые ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС:ТОКЛ 1:30 в присутствии С-334.

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

Б. Серия спектров поглощения смеси (указанной в А.) в присутствии  $\text{H}_2\text{O}_2$  начальной концентрацией 215 мкМ. Пунктирная красная кривая – спектр смеси без  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Сплошные кривые – опытные измерения: красная кривая – первое измерение, серая – последнее, промежуточные цвета – промежуточные измерения.

В. Значение концентрации железопорфирина в составе ЦитС (красная кривая) и С-334 (зелёная кривая) в процессе квазилипоксигеназной реакции.

Г. Уменьшение концентрации железопорфирина в составе ЦитС (красная кривая) и С-334 (зелёная кривая) в процессе липопероксидазной реакции.

Д. ХЛ смеси ЦитС-ТОКЛ, ФК и С-334. Нулевое значение времени – момент добавления ФК.

Е. ХЛ смеси ЦитС-ТОКЛ, ФК, С-334 и  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Нулевое значение времени – момент добавления  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Врезка Е\*. ХЛ указанной смеси в течение первых 6 минут реакции.

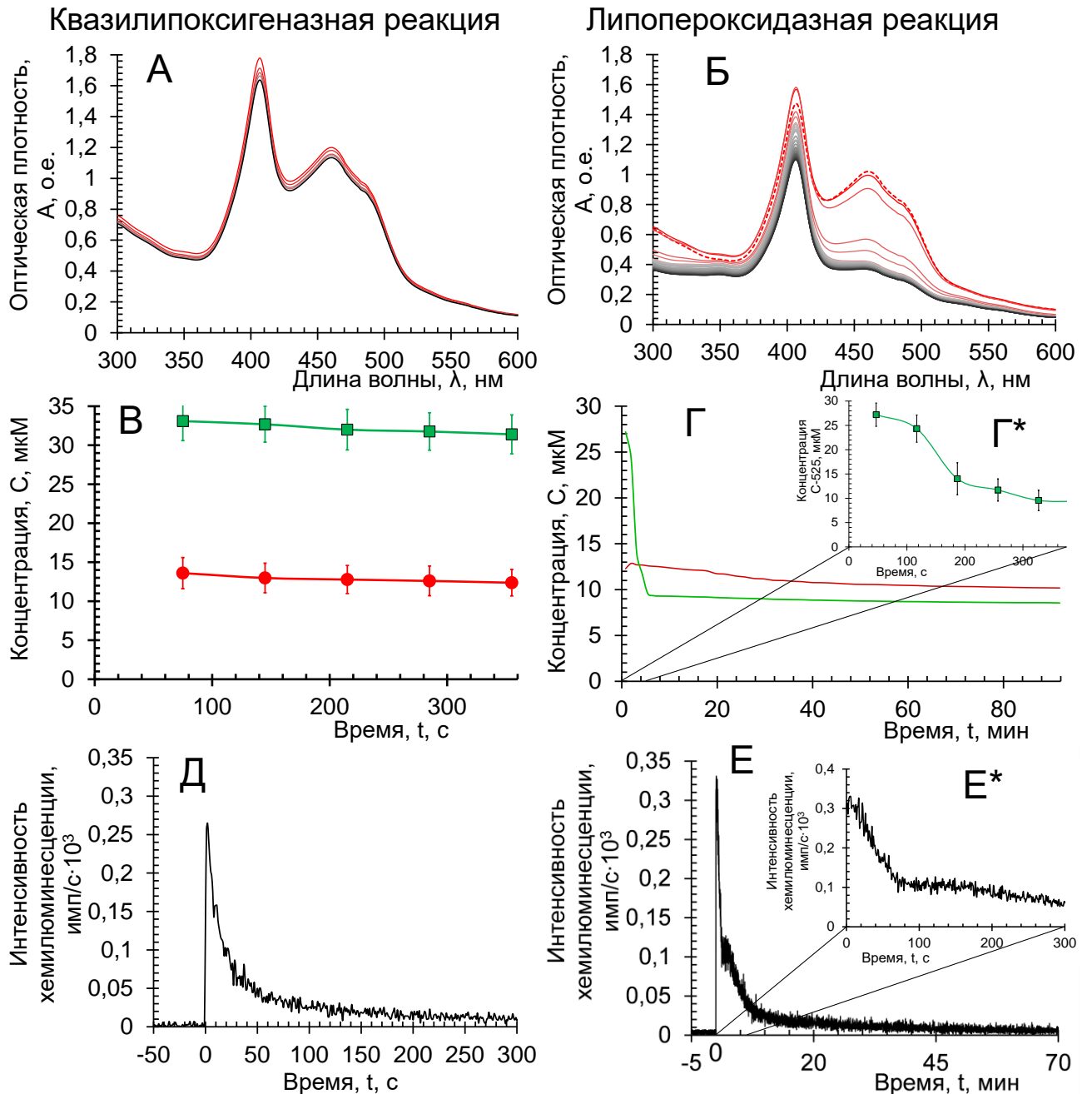


Рисунок 21. Квазилипоксигеназная (А, В, Д) и липопероксидазная (Б, Г, Е) реакции, катализируемые ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС:ТОКЛ 1:30 в присутствии С-525.

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

Б. Серия спектров поглощения смеси (указанной в А.) в присутствии Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> начальной концентрацией 215 мкМ. Пунктирная красная кривая – спектр смеси без Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>. Сплошные кривые – опытные измерения: красная кривая – первое измерение, чёрная – последнее, промежуточные цвета (через серый) – промежуточные измерения.

В. Значение концентрации железопорфирина в составе ЦитС (красная кривая) и С-525 (зелёная кривая) в процессе квазилипоксигеназной реакции.

Г. Уменьшение концентрации железопорфирина в составе ЦитС (красная кривая) и С-525 (зелёная кривая) в процессе липопероксидазной реакции. Врезка Г\*. Уменьшение концентрации С-525 в течение первых 6 минут реакции.

Д. ХЛ смеси ЦитС-ТОКЛ, ФК и С-525. Нулевое значение времени – момент добавления ФК.

Е. ХЛ смеси ЦитС-ТОКЛ, ФК, С-525 и Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>. Нулевое значение времени – момент добавления Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>. Врезка Е\*. ХЛ указанной смеси в течение первых 5 минут реакции.

Из данных, представленных на рисунках 19–21, следует, что производные кумарина практически не расходуются в процессе катализируемой ЦитС-ТОКЛ квазилипоксигеназной реакции. При этом квазилипоксигеназная реакция сопровождается хемилюминесценцией, как и липопероксидазная реакция, в ходе которой изучаемые хинолизидиновые производные кумарина расходуются весьма значительно (рис. 19–21Г).

Согласно результатам нашего вычисления, в первые 5 минут катализируемой ЦитС-ТОКЛ липопероксидазной реакции расходуется  $(54,8 \pm 8,1)\%$  С-314,  $(66,8 \pm 2,0)\%$  С-334 и  $(46,2 \pm 13,3)\%$  С-525. А за первые 10 минут этой реакции расходуется  $(60,2 \pm 0,5)\%$  С-314,  $(77,0 \pm 1,2)\%$  С-334 и  $(64,8 \pm 14,25)\%$  С-525. Как видно из этих данных, основная доля кумариновых производных расходуется в начале липопероксидазной реакции. Нами были вычислены константы скорости реакции разрушения изучаемых кумариновых производных, представленные в разделе «4.5 Поправочные функции, учитывающие разрушение кумариновых активаторов в ходе ферментативной липидной пероксидации» и использованные для выведения функции для вычисления поправочных коэффициентов на расходование активатора хемилюминесценции для корректировки хемилюминограмм. Использование этих функций позволит получать значения интенсивности хемилюминесценции, равные тем, что получились бы, если бы производные кумарина не расходовались в ходе ферментативной липидной пероксидации.

В процессе липопероксидазной реакции также выявлено уменьшение концентрации цитохрома *c*. Естественно, что кажущееся «повышение» концентрации белка в начале реакции на рисунках 15Б, 16Б, 17Б, 19Г, 20Г, 21Г – артефакт, обусловленный временным увеличением оптической плотности на длине волны 409 нм. Повышением оптической плотности на данной длине волны обусловлен и аналогичный артефакт на рисунках 15Д и 16Д. В последующих разделах настоящей диссертационной работы также приводится анализ разрушения цитохрома *c* в процессе катализируемой им пероксидазной реакций.

### 3.5 Анализ хемилюминесценции, сопровождающей катализируемые комплексом цитохрома с с кардиолипином реакции

Как уже указывалось в разделе «1.4.3 Производные кумарина и их применение в хемилюминесцентных исследованиях», до настоящего исследования хинолизидиновые производные кумарина считались физическими активаторами ХЛ, не вступающими в химическое взаимодействие с компонентами реакционной смеси [37, 39, 139, 385, 412, 420, 422]. В ходе описанных выше экспериментов установлено, что эти вещества являются субстратами липопероксидазной реакции, катализируемой комплексом ЦитС с кардиолипином. Но остаётся нерешённым вопрос, являются ли они в указанной системе физическими или химическими активаторами ХЛ. На рисунке 22 друг с другом сопоставлены кривые уменьшения концентрации кумариновых производных и интенсивности ХЛ в первые минуты пероксидазной реакции, описываемой на рисунках 15–18.

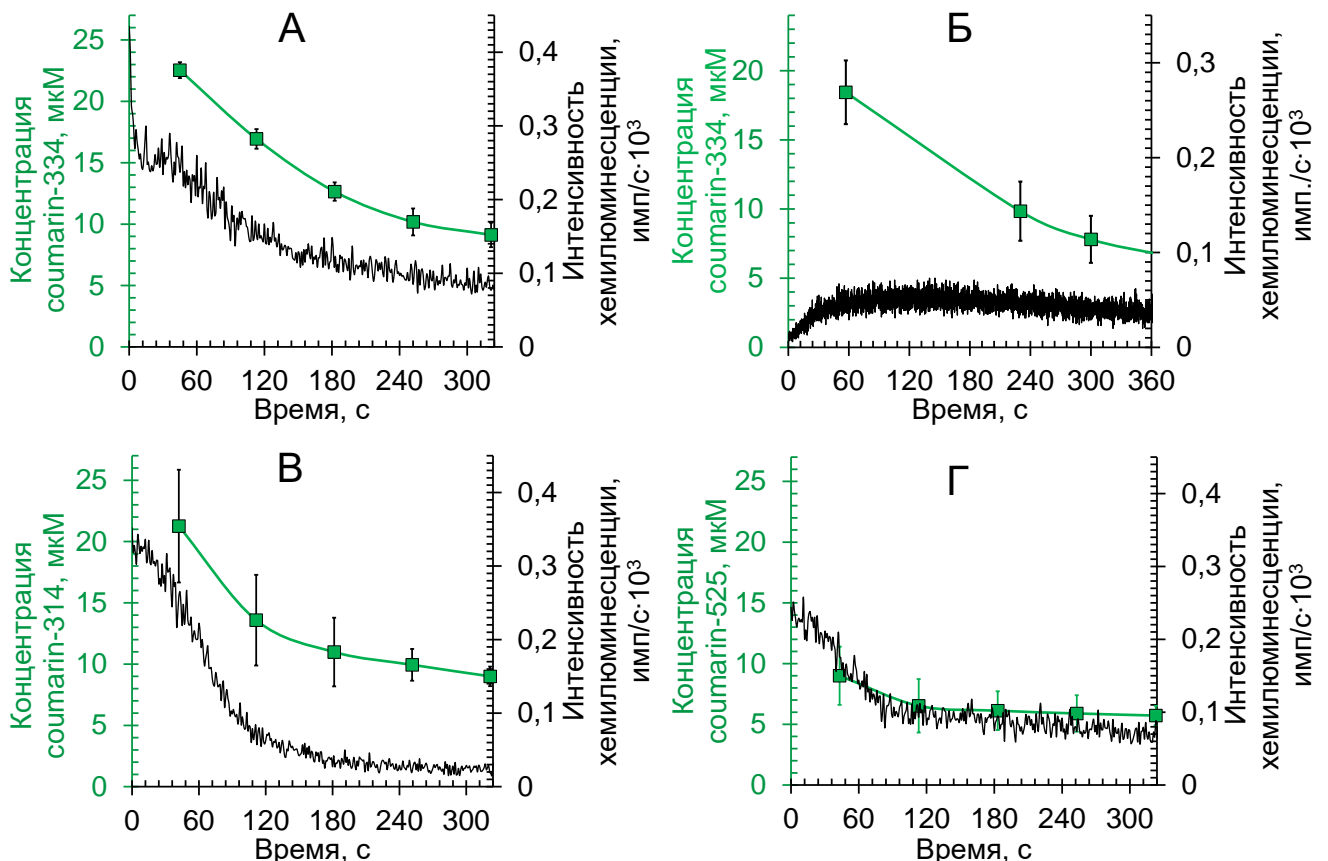


Рисунок 22. Сопоставление уменьшения концентрации производных кумарина и спада интенсивности хемилюминесценции, сопровождающей катализируемую ЦитС-ТОКЛ пероксидазную реакцию (начальная концентрация  $\text{H}_2\text{O}_2$  равна 215 мкМ). А. При наличии в системе С-334 и соотношении ЦитС:ТОКЛ 1:30. Б. При наличии в системе С-334 и соотношении ЦитС:ТОКЛ 1:60. В. При наличии в системе С-314 и соотношении ЦитС:ТОКЛ 1:30. Г. При наличии в системе С-525 и соотношении ЦитС:ТОКЛ 1:30.

Изучение хемилюминограмм позволяет пролить свет на механизм усиления ХЛ, сопровождающей липопероксидазную активность комплекса цитохрома с с кардиолипином, хинолизидиновыми производными кумарина. По представленным на рисунке 22 данным можно сказать, что в случае, когда пероксидазная реакция катализируется ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС:ТОКЛ 1:30 (рис. 22А,В,Г) в отсутствии дополнительного липидного субстрата в виде фосфатидной кислоты спад концентрации производных кумарина сопровождается снижением интенсивности ХЛ, но при этом, если соотношение ЦитС:ТОКЛ составляет 1:60 (рис. 22Б), резкий спад концентрации кумаронового производного не вызывает такого же резкого спада интенсивности ХЛ. Следует также заметить, что при соотношении ЦитС:ТОКЛ равном 1:60, интенсивность ХЛ гораздо ниже (рис. 23, рис. 22Б), чем когда оно составляет 1:30 (рис. 22А,В,Г). Скорее всего, это следствие стерического блокирования олеилов ТОКЛ друг другом, препятствующее их окислению. А это ведёт к низкой интенсивности их пероксидации и следовательно – к низкой интенсивности ХЛ.

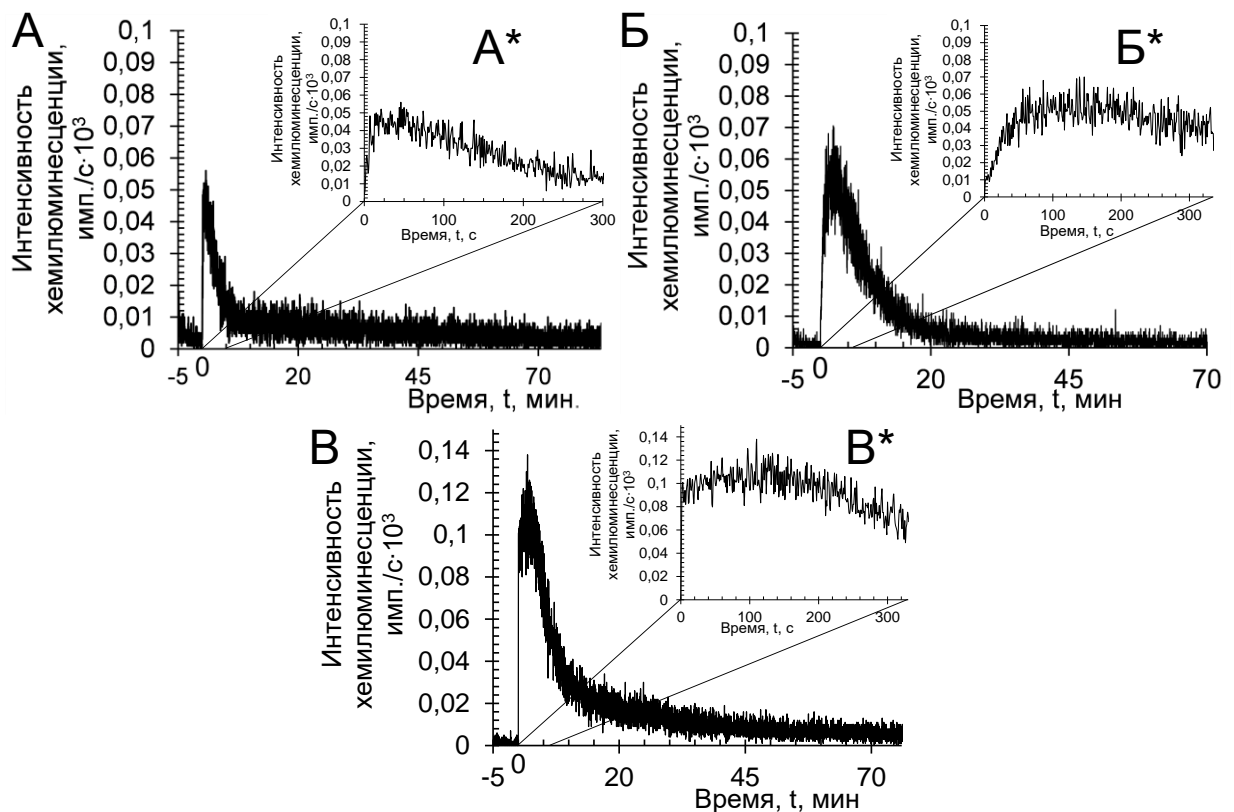


Рисунок 23. Активированная С-314 (А), С-334 (Б) или С-525 (В) начальной концентрацией 25 мкМ ХЛ, сопровождающая пероксидазную реакцию (начальная концентрация  $\text{H}_2\text{O}_2$  равна 215 мкМ), катализируемую ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС:ТОКЛ 1:60.

В работе [25] было предположено, что взаимодействие производного кумарина с проявляющим пероксидазную активность ЦитС не сопровождается ХЛ. Поэтому можно предположить, что всё наблюдаемое свечение вызвано возвращением производного кумарина в основное состояние из возбуждённого, в которое оно перешло в результате миграции энергии ЭВС с продукта ПОЛ на него. То есть производные кумарина в этой системе можно считать по механизму действия физическими активаторами ХЛ. Этот же вывод можно сделать и по данным, представленным на рисунке 24.

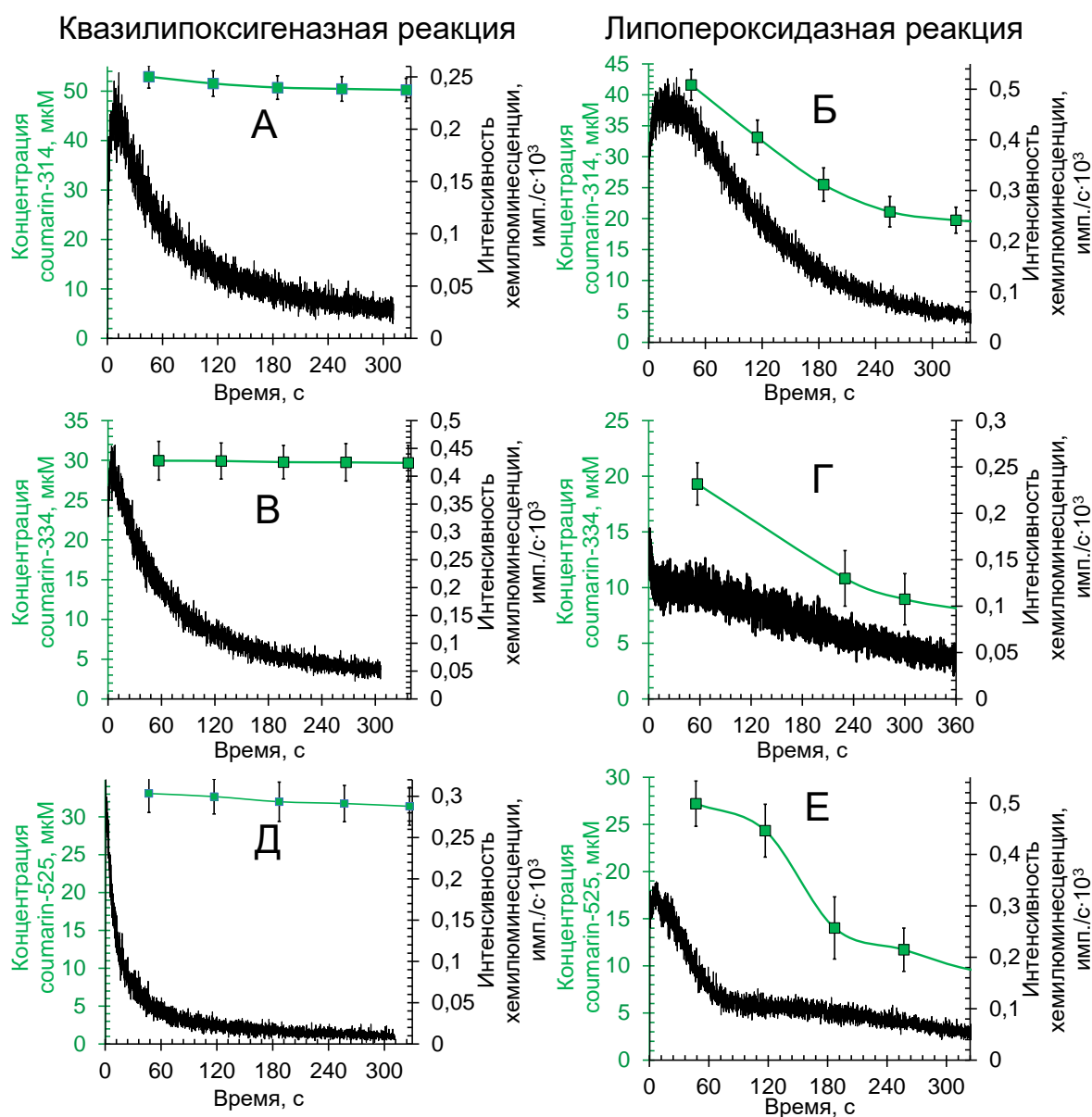


Рисунок 24. Сопоставление уменьшения концентрации производных кумарина (А, Б – С-314, В, Г – С-334, Д, Е – С-525) и спада интенсивности хемилюминесценции, сопровождающей катализируемую ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС:ТОКЛ 1:30 квазилипоксигеназную (А, В, Д) (начальная концентрация добавленной ФК равна 600 мкМ) и липопероксидазную (Б, Г, Е) реакцию (начальная концентрация  $H_2O_2$  равна 215 мкМ).



На рисунке 24 сопоставлена кривая уменьшения концентрации кумариновых производных и интенсивности ХЛ в первые минуты квазилипоксигеназной и липопероксидазной реакций, описанных на рисунках 19–21. Катализируемая ЦитС-ТОКЛ квазилипоксигеназная реакция сопровождается ХЛ, при которой уменьшения концентрации производных кумарина не происходит (рис. 24А,В,Д). Отсюда мы делаем вывод о том, что производные кумарина являются физическими активаторами ХЛ также и в системе, в которой липидная пероксидация запускается ферментом-пероксидазой, в данной случае это связанный с кардиолипином цитохром *c*. В ходе липопероксидазной реакции наблюдается уменьшение концентрации производных кумарина (рис. 24Б,Г,Е), что говорит об их участии в реакции. Однако на основании вышеуказанного и мы считаем, что их взаимодействие с пероксидазой не сопровождается ХЛ (также об отсутствии ХЛ в этой реакции говорится в [25]), а наблюдаемое свечение обусловлено только запущенным ЦитС-ТОКЛ перекисным окислением фосфатидной кислоты.

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

Как уже указывалось выше, при изучении участия производных кумарина в ферментативной липопероксидазной реакции нами было обнаружено уменьшение концентрации ЦитС в процессе катализа им липопероксидазной реакции. Данный параграф мы решили посвятить непосредственно указанному белку. Вначале рассмотрим представленный на рисунке 25 результат предварительного спектрофлуориметрического измерения.

Графики на рисунке 25 отражают флуоресценцию ЦитС: на *красной кривой* чётко виден широкий флуоресценции, складывающийся из флуоресценции тирозина (303 нм) и триптофана (330 нм), входящих в состав апопротеина, появляющийся в результате изменения конформации белка при связывании с кардиолипином и отсутствующий у нативного свободного ЦитС [36]. Это подтверждается нашим измерением спектра флуоресценции свободного ЦитС (*тёмно-красная кривая*), на котором данного максимума нет.

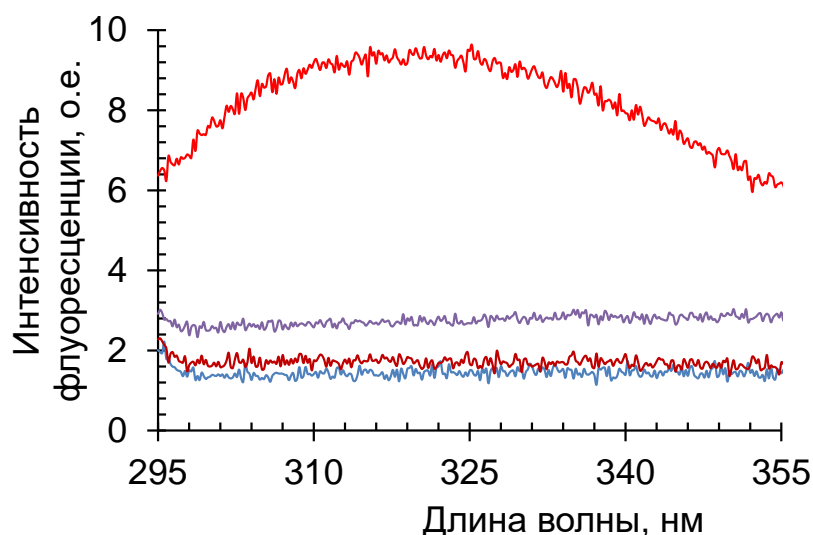


Рисунок 25. Изменение флуоресценции ЦитС при образовании комплекса с ТОКЛ и разрушение ЦитС в ходе катализируемой им липопероксидазной реакции, иллюстрируемое спектром флуоресценции при возбуждении светом на длине волны 265 нм.

*Синяя кривая* – 20 мМ фосфатный буфер (среда); *тёмно-красная кривая* – 10 мкМ ЦитС; *красная кривая* – 12 мкМ ЦитС, 353 мкМ ТОКЛ; *фиолетовая кривая* – 10 мкМ ЦитС, 300 мкМ ТОКЛ, 300 мкМ липопероксидазы (концентрация – в пересчёте на окисленный БКЛ), 8,6 мМ Н<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

При добавлении к смеси, содержащей комплекс ЦитС-ТОКЛ, липопероксидов и перекиси водорода (*фиолетовая кривая*) описанный выше максимум флуоресценции практически исчезает. Можно заметить плохо отличимый от шумов максимум флуоресценции на 335 нм; но он незначителен, поэтому есть подозрение, что это «шумы». Максимум флуоресценции тирозина (303 нм) при этом не выражен.

На основании исчезновения тирозиновой и триптофановой флуоресценции при добавлении к смеси комплекса ЦитС-ТОКЛ Н<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и липопероксидов мы можем сделать два противоположных вывода. Либо происходит восстановление нативной формы ЦитС в результате разрушения его комплекса с кардиолипином, либо перекись водорода приводит к разрушению молекулы ЦитС, проявляющей при этом пероксидазную активность вследствие связывания с кардиолипином. И при этом исчезают максимумы флуоресценции тирозина (303 нм) и триптофана (330 нм). Но тут отметим, что при полном разрушении белка на свободные аминокислоты флуоресценция смеси как раз-таки должна появляться, так как исчезает эффект её тушения соседними аминокислотными остатками в составе белка. Если, конечно, не происходит деструкции непосредственно самих этих

аминокислот.

Таким образом, мы подошли к необходимости более детального спектрофотометрического исследования, подобного таковому для разрушения хинолизидиновых производных кумарина, разрушения непосредственно ЦитС в процессе проявления им липопероксидазной ферментативной активности.

Оценка концентрации ЦитС велась нами на основании значений оптической плотности на длине волны 409 нм, соответствующей максимуму поглощения железопорфирина, гема, в составе молекулы ЦитС. Данный максимум гораздо более выражен, чем максимум, характеризующий апопротеин ( $\approx 520\text{--}530$  нм). Поэтому, строго говоря, в настоящей работе определялось снижение концентрации именно железопорфирина. И именно его разрушение чаще всего обозначается словосочетанием «разрушение цитохрома *c*». При этом концентрация апоцитохрома *c* может отличаться от таковой для железопорфирина. Однако апоцитохром *c* сам по себе не может катализировать липопероксидазную реакцию. Именно поэтому выражение «разрушение цитохрома *c* в процессе катализа липопероксидазной реакции» более подходит для разрушения гемовой группировки в составе данного белка, нежели для разрушения апопротеина.

Так как, согласно представленным на рисунках 19–21В данным, ЦитС, а точнее – железопорфирин в его составе, не разрушается в процессе проявления квазилипоксигеназной активности, мы сделали упор на проведении экспериментов на молекулярных моделях, в которых происходит реакция именно с  $\text{H}_2\text{O}_2$ , а не липидными гидропероксидами. Необходимость проведения отдельного эксперимента с ЦитС при отсутствии в смеси производных кумарина обусловлена тем, что они и, возможно, продукты их окисления также создают поглощение в области максимума, характерного для ЦитС (409 нм), что может дать искажение при расчётах его концентрации.

Нами были зарегистрированы серии спектров оптической плотности реакционных смесей следующего состава: 1) 10 мкМ ЦитС, 215 мкМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  – эта проба позволяет оценить непосредственное разрушение цитохрома *c* под действием перекиси водорода, другие три пробы отражают разрушение этого

белка, являющееся следствием проявления им пероксидазной активности; 2) ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС:ТОКЛ 1:30 в присутствии 215 мкМ  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; 3) ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС:ТОКЛ 1:60 в присутствии 215 мкМ  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; 4) ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС:ТОКЛ 1:30 в присутствии 600 мкМ ФК и 215 мкМ  $\text{H}_2\text{O}_2$ . На рисунке 26 показаны спектры поглощения в диапазоне длин волн 300–600 нм.

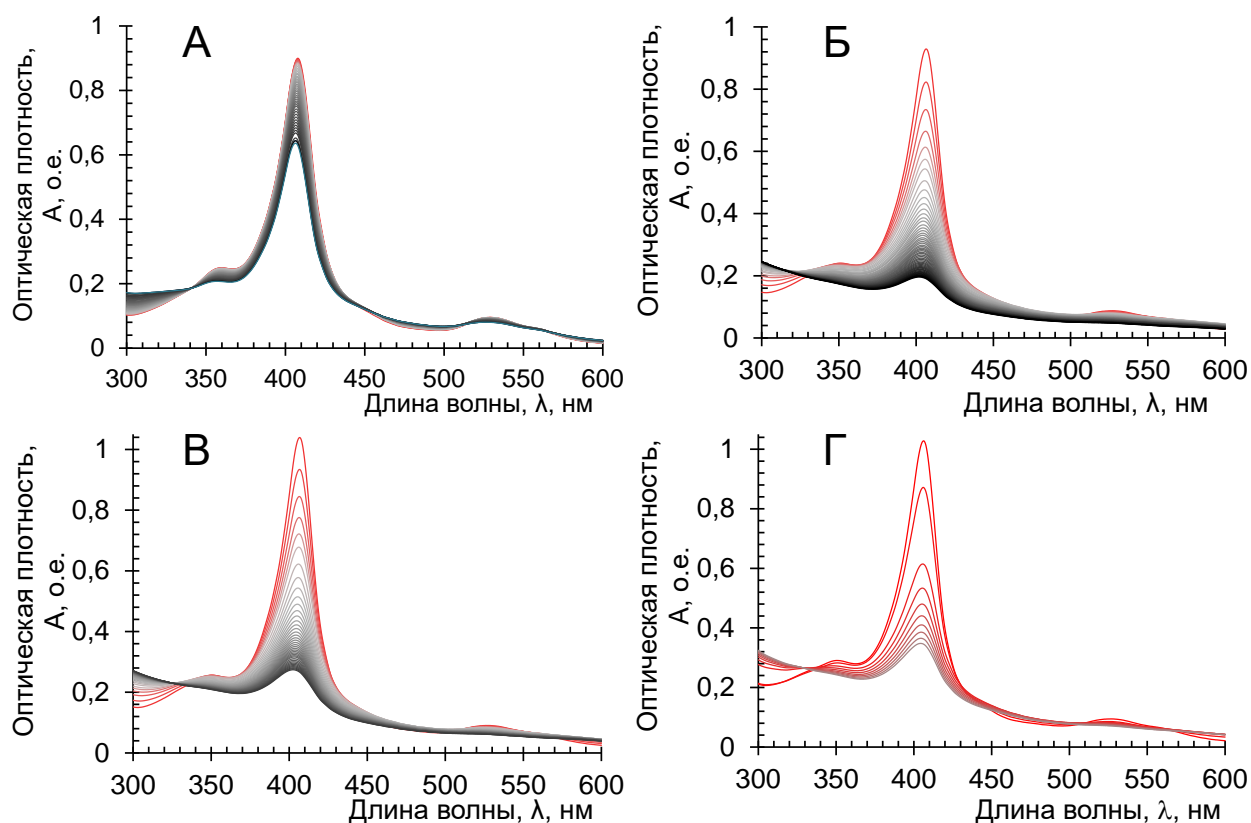


Рисунок 26. Спектры поглощения в диапазоне 300–600 нм реакционной смеси: А. 10 мкМ ЦитС, 215 мкМ  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; Б. ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС:ТОКЛ 1:30 в присутствии 215 мкМ  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; В. ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС:ТОКЛ 1:60 в присутствии 215 мкМ  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; Г. ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС:ТОКЛ 1:30 в присутствии 600 мкМ ФК и 215 мкМ  $\text{H}_2\text{O}_2$ . В последнем случае временные промежутки между измерениями не соответствуют основной методике: первое измерение начато через 25 секунд после добавления  $\text{H}_2\text{O}_2$ , последующие измерения проведены через 3, 4,5, 5,5, 6,8, 8, 9, 10, 11,5, 12,5 минут после внесения  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

На рисунке 27 показана область спектра в диапазоне длин волн 500–580 нм, содержащая второй максимум поглощения цитохрома *c*, значение оптической плотности в котором значительно меньше, чем в полосе *Soret*. Но тем не менее по этому максимуму тоже можно судить о разрушении цитохрома *c* в процессе реакции.

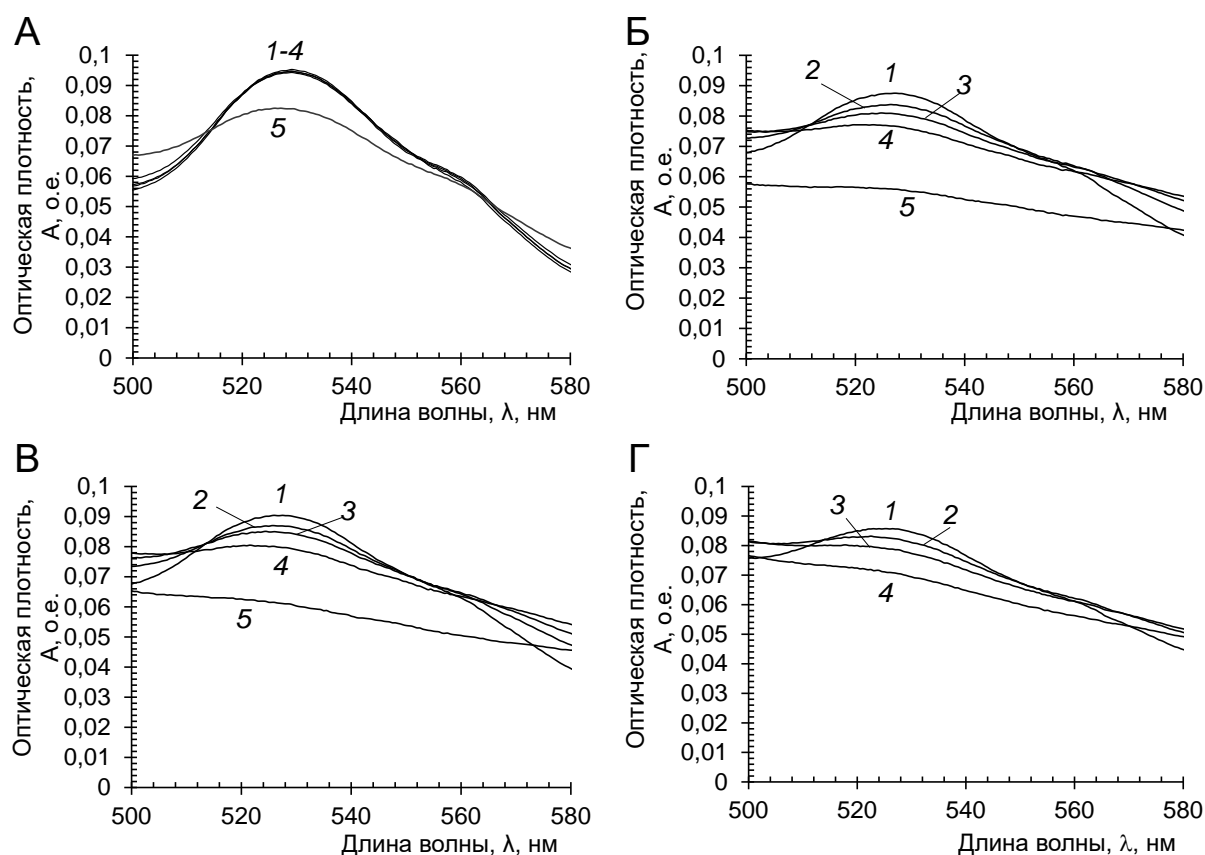


Рисунок 27. Спектры поглощения в диапазоне 500–580 нм реакционной смеси: А. 10 мкМ ЦитС, 215 мкМ  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; Б. ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС:ТОКЛ 1:30 в присутствии 215 мкМ  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; В. ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС:ТОКЛ 1:60 в присутствии 215 мкМ  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; Г. ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС:ТОКЛ 1:30 в присутствии 600 мкМ ФК и 215 мкМ  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Спектры зарегистрированы на определённых моментах с начала реакции: 1 – через 1 минуту; 2 – через 3,5 минуты; 3 – через 6 минут; 4 – через 12 минут для А., Б., Г, через 13 минут для В; 5 – через 86 минут.

Из данных, представленных на рисунках 26–27, следует, что ЦитС разрушается в присутствии  $\text{H}_2\text{O}_2$ , о чём свидетельствует уменьшение оптической плотности в максимумах поглощения, но это разрушение гораздо сильнее в том случае, когда в смеси присутствует кардиолипин, связывание с которым придаёт ЦитС пероксидазную активность. Сам по себе этот факт был установлен ранее [40], однако в указанном исследовании соотношение ЦитС:кардиолипин отличалось от оптимального, способствующего максимальной пероксидазной активности ЦитС.

Далее с использованием уравнения закона Бугера–Ламберта–Бера нами были определены концентрации железопорфирина в составе ЦитС в различные моменты времени от начала реакции. Так как в изучаемом диапазоне длин волн (300–600 нм) можно пренебречь вкладом, вносимом ТОКЛ, фосфатидной кислотой и  $\text{H}_2\text{O}_2$  в общую оптическую плотность смеси, то при вычислении концентрации ЦитС

можно использовать непосредственно значения оптической плотности смеси. При определении концентрации ЦитС мы использовали значение оптической плотности на длине волны, равной 409 нм. Поглощение на этой длине волны обусловлено, как уже указывалось, содержанием в молекуле ЦитС порфириновой группировки гема [205]. Вычисленные значения концентрации ЦитС для указанных выше проб представлены на рисунке 28.

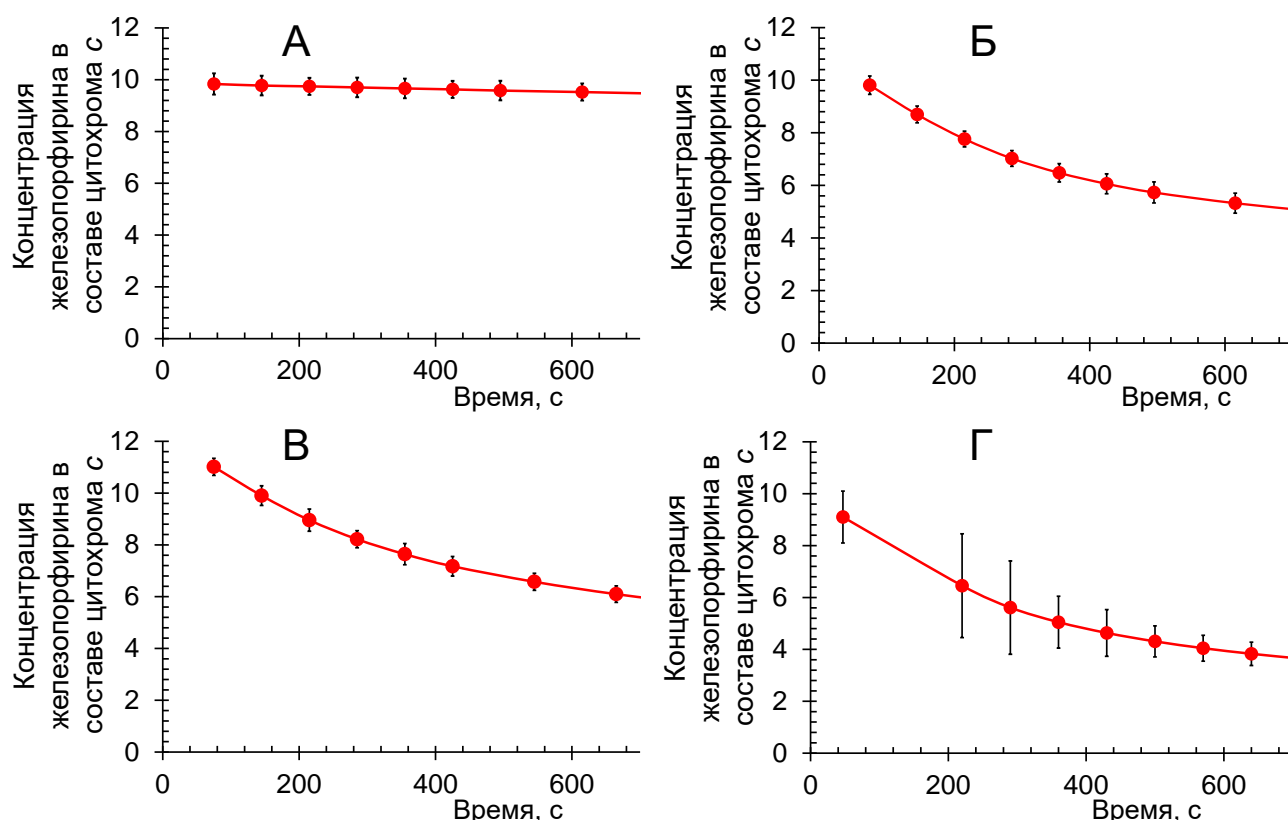


Рисунок 28. Уменьшение концентрации железопорфирина в составе цитохрома *c* за первые 700 секунд реакции в смеси:

А. 10 мкМ ЦитС, 215 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; Б. ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС:ТОКЛ 1:30 в присутствии 215 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; В. ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС:ТОКЛ 1:60 в присутствии 215 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; Г. ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС:ТОКЛ 1:30 в присутствии 600 мкМ ФК и 215 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Как видно из графиков, представленных на рисунке 28, разрушение железопорфирина в составе цитохрома *c*, находящегося в составе комплекса ЦитС-ТОКЛ и, следовательно, проявляющего пероксидазную активность, носит характер экспоненциальной функции (Рис. 28Б–Г), в то время как функция разрушения цитохрома *c* в присутствии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и в отсутствии липида, в целом, носит линейный характер, а уменьшение его концентрации при этом с течением времени относительно незначительно.

### **3.7 Влияние дигидрокверцетина и тролокса на липопероксидазную активность комплекса цитохрома *c* с к кардиолипином**

Изучение возможностей подавления процессов ПОЛ митохондриальных мембран входит в число основных направлений научных работ, связанных с окислительным стрессом и вызванной им клеточной гибелью. Одним из наиболее подходящих способов изучения данного процесса *in vitro* является метод регистрации ХЛ, позволяющий оценивать механизм действия антиоксиданта «в реальном времени»: проанализировать скорость свободнорадикальных реакций по интенсивности ХЛ-сигнала (чем выше интенсивность сигнала, тем выше скорость образования свободных радикалов в системе в данный момент времени), – то есть оценить кинетические особенности течения свободнорадикального процесса в исследуемой пробе. Под кинетическими особенностями подразумевается наличие или отсутствие латентного периода – полной задержки в развитии ХЛ-вспышки – и возможное уменьшение интенсивности ХЛ под действием антиоксиданта на протяжении всего измерения или на определённых его этапах.

В качестве модельной экспериментальной системы нами была использована смесь, содержащая комплекс цитохрома *c* с бычьим кардиолипином (БКЛ) при соотношении белок:липид 1:60 и  $H_2O_2$  в присутствии С-334 в качестве активатора хемилюминесценции. БКЛ, в отличие от ТОКЛ, является легкоокисляемым фосфолипидом, поэтому он выступает и в роли кофактора для обеспечения пероксидазной активности ЦитС, и в роли его липидного субстрата. В качестве изучаемых антиоксидантов нами были выбраны дигидрокверцетин, или таксифолин (ДГК), как представитель естественных растительных антиоксидантов и тролокс как представитель искусственных химически синтезированных антиоксидантов.

Результаты эксперимента с ДГК представлены на рисунке 29. Из графиков чётко видно дозозависимое влияние дигидрокверцетина на липопероксидазную реакцию: наблюдается резкое подавление хемилюминесценции, а значит, и образования свободных радикалов по сравнению с контрольной пробой. Причём это подавление тем сильнее, чем выше концентрация дигидрокверцетина.

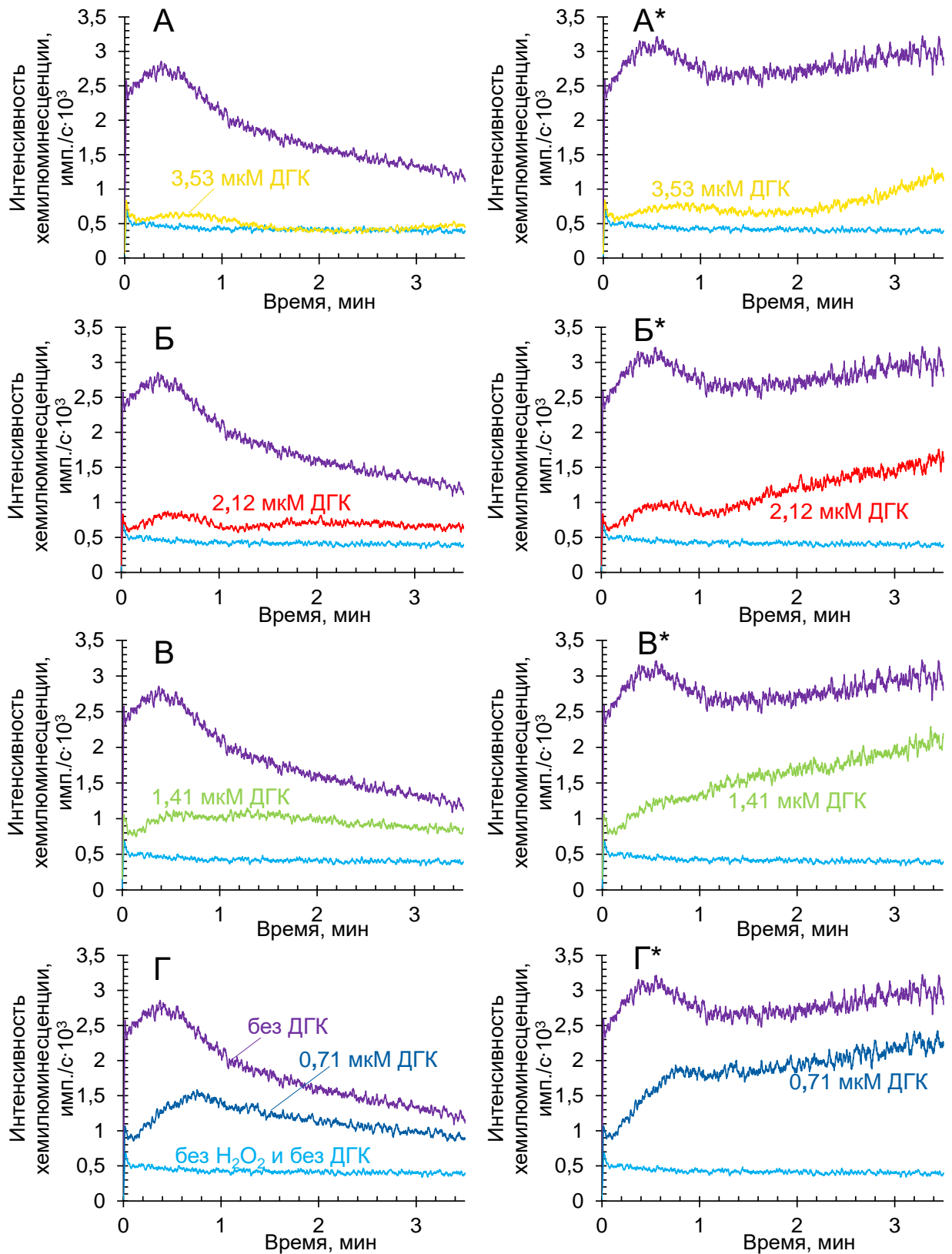


Рисунок 29. Подавление липопероксидазной активности ЦитС-БКЛ дигидрохверцетином. Концентрации: ЦитС – 10 мкМ, БКЛ – 600 мкМ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  – 500 мкМ, С-334 – 25 мкМ. Светлоголубые кривые – контроль без перекиси водорода, фиолетовые кривые – без дигидрохверцетина. Остальные кривые – ХЛ при различных концентрациях ДГК: 3,53 мкМ (А), 2,12 мкМ (Б), 1,41 мкМ (В), 0,71 мкМ (Г), соответствующие графики А\*, Б\*, В\*, Г\* – хемилуминограммы после корректировки поправочной функцией на уменьшение концентрации С-334.

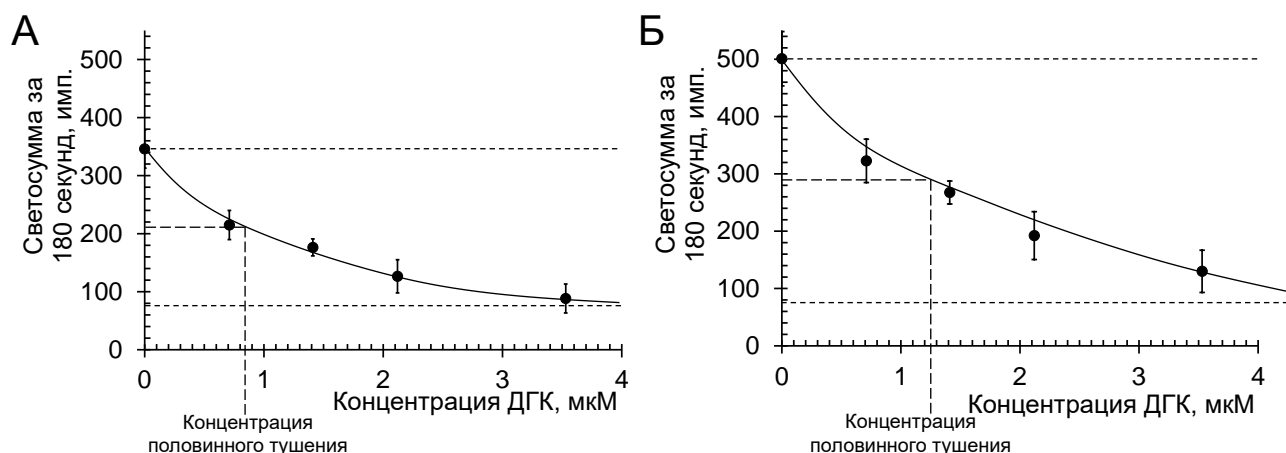


В данных экспериментальных пробах протекала катализируемая комплексом ЦитС-БКЛ липопероксидазная реакция (БКЛ выступал и в роли липидного субстрата), в ходе которой снижается концентрация С-334, являющегося активатором ХЛ. Поэтому мы откорректировали значения интенсивности ХЛ, используя поправочную функцию на уменьшение концентрации С-334. Эта функция подробно описана в параграфе «4.5 Поправочные функции, учитывающие разрушение кумариновых активаторов в ходе ферментативной липидной пероксидации». Для удобства читателя напишем формулу данной функции и здесь:  $J_{II} = J_{зарег.} \cdot e^{0,0044t}$ .  $J_{II}$  обозначает откорректированное значение интенсивности ХЛ в момент времени  $t$  от начала липопероксидазной реакции (от момента внесения в систему перекиси водорода), а  $J_{зарег.}$  – значение интенсивности ХЛ, показанное в этот момент хемиллюминометром. Откорректированные хемиллюминограммы представлены на рисунке 29 и помечены как иллюстрации А\*, Б\*, В\* и Г\*.

Отметим явную разницу между откорректированными и неоткорректированными ХЛ-кривыми: на основании неоткорректированных ХЛ-кривых можно сделать вывод, что ДГК, особенно в концентрациях 2,12 и 3,53 мкМ, равномерно подавляет липидную пероксидацию в течение всего времени. Однако, применив поправочную функцию и получив такие ХЛ-кривые, какими бы они были, если бы С-334 не расходовался в ходе реакции, мы видим, что после первоначального подавления ДГК свободнорадикальный процесс развивается с растущей интенсивностью. И это весьма логично: концентрация антиоксиданта в системе падает, и он более не может сдерживать ПОЛ в прежней мере. Надо заметить, что её интенсивность всё равно ниже той, что наблюдается в контрольной пробе, в которую ДГК не вносился.

Для каждой концентрации ДГК измерение проводилось 5 раз. На основании этих измерений нами были рассчитаны средние значения светосуммы ХЛ за первые 3 минуты реакции. На рисунке 30 представлена её зависимость от концентрации антиоксиданта. Под светосуммой мы понимаем площадь криволинейной трапеции, ограниченной координатными осями, ХЛ-кривой и перпендикуляром, опущенным

из неё на ось абсцисс при определённом её значении. При исследовании ДГК это значение равнялось 180 секундам.



*Рисунок 30.* Влияние ДГК на светосумму ХЛ, сопровождающей липопероксидазную реакцию, катализируемую ЦитС-БКЛ, в первые 3 минуты. Нижняя горизонтальная пунктирная линия соответствует значению светосуммы в первые 3 минуты реакции, наблюдаемому в пробе, не содержащей перекись водорода. А. Значения светосуммы ХЛ без использования поправочной функции на уменьшение концентрации С-334. Б. Значения светосуммы ХЛ, откорректированной поправочной функцией на уменьшение концентрации С-334.

Графики, представленные на рисунке 30, характеризуют дозозависимое угнетение процессов ПОЛ, вызванных пероксидазной активностью комплекса ЦитС с кардиолипином, под действием ДГК. На основании значения светосуммы ХЛ за первые 3 минуты в образце, не содержащем ни антиоксиданта, ни  $\text{H}_2\text{O}_2$  (нижняя пунктирная линия на графиках) и выполняющем роль пробы, в которой липопероксидазная активность как будто полностью подавлена, и значения интенсивности ХЛ в образце, не содержащем только ДГК (верхняя пунктирная линия на графиках) и выполняющем роль контроля на антиоксидант, – то есть в пробе, где липидная пероксидация происходит в полной мере, – мы графически определили концентрацию ДГК, вызывающую 50%-ное подавление ХЛ. Если хемиллюминограммы не обрабатывать поправочной на расходование С-334 функцией (рис. 30А), то получается, что она равна  $\approx 0,84$  мкМ. В том же случае, когда для построения графика зависимости светосуммы ХЛ от концентрации ДГК использовались значения свечения, откорректированные поправочной на расходование С-334 функцией (рис. 30Б), концентрация ДГК, вызывающая половинное тушение ХЛ, оказалась равной  $\approx 1,26$  мкМ.

Далее нами был проведён аналогичный эксперимент с тролоксом – широко используемым синтетическим антиоксидантом; результаты – на рисунке 31.

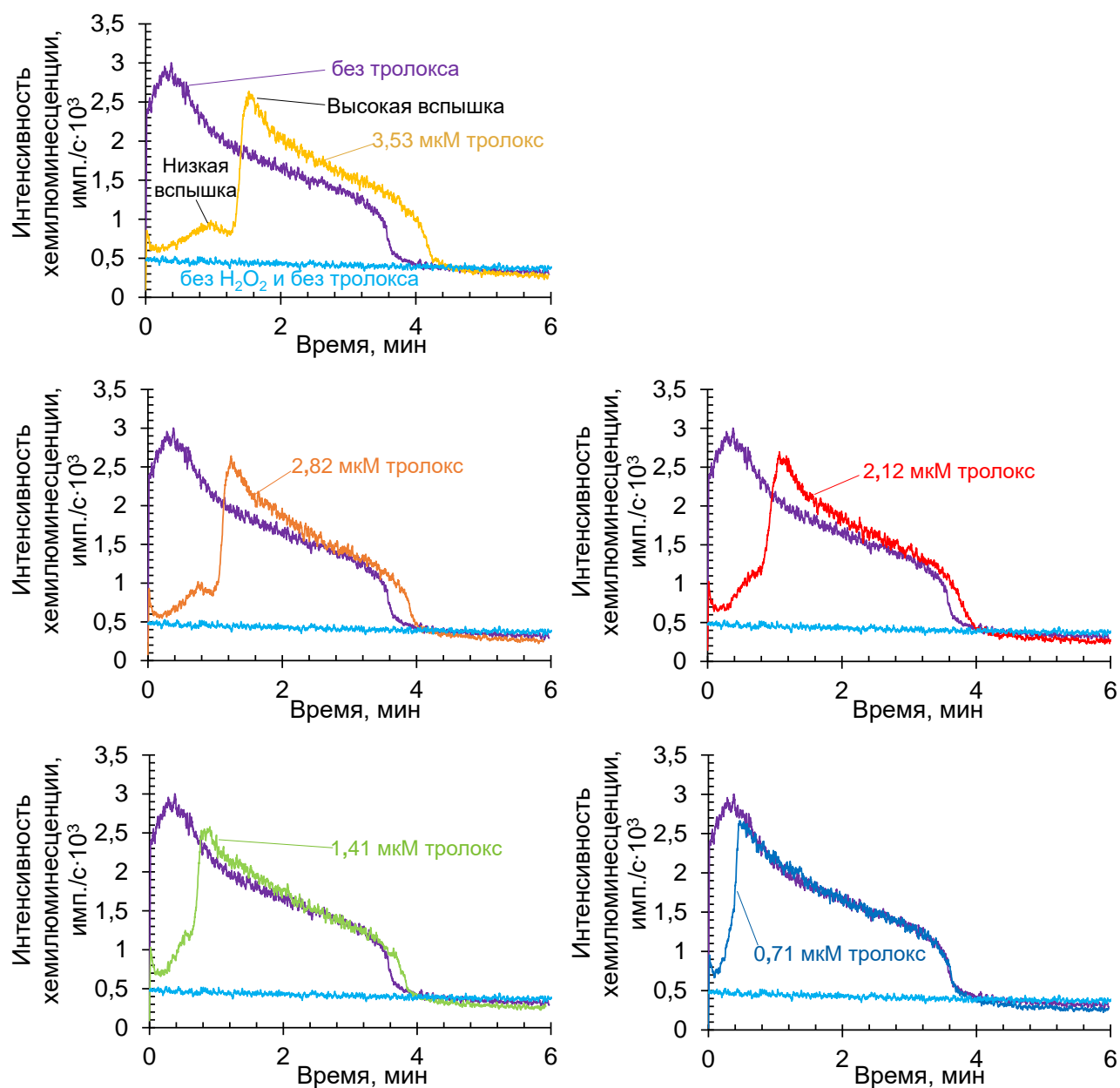


Рисунок 31. Влияние тролокса на липопероксидазную активность ЦитС-БКЛ. Концентрации: ЦитС – 10 мкМ, БКЛ – 600 мкМ,  $H_2O_2$  – 500 мкМ, С-334 – 25 мкМ. Светло-голубые кривые – контроль без перекиси водорода, фиолетовые кривые – контроль без тролокса. Остальные кривые – ХЛ при различных концентрациях тролокса (указаны на рисунке) в системе.

Из данных, проиллюстрированных графиками на рисунке 31, видно, что действие тролокса отлично от такового для ДГК: снижения амплитуды ХЛ практически нет, зато имеет место задержка во времени наступления медленной вспышки ХЛ (латентный период). А сама ХЛ-вспышка развивается как бы в два этапа: вначале развивается вспышка небольшой интенсивности (назовём её низкой

вспышкой), после чего наступает развитие уже второй, высокоамплитудной вспышки (назовём её высокой вспышкой), причём продолжительность времени, проходящего от начала реакции (внесения перекиси водорода) до наступления этих вспышек, прямо пропорционально концентрации тролокса, о чём свидетельствуют графики, представленные на рисунке 32.

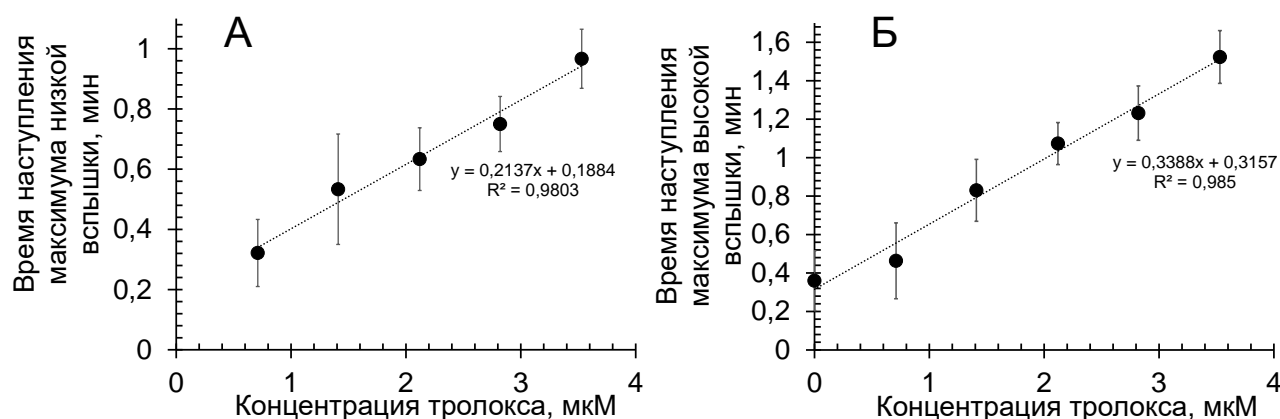


Рисунок 32. Зависимость времени наступления максимумов низкой (А) и высокой (Б) вспышек ХЛ, сопровождающей катализируемую ЦитС-ТОКЛ липопероксидазную реакцию, от концентрации тролокса в системе.

Глядя на графики на рисунке 31, можно увидеть следующую особенность: по сравнению с контрольной, не содержащей антиоксиданта пробой, в содержащих тролокс пробах наблюдается не только задержка ХЛ-вспышки во времени наступления, но и аналогичная ей задержка спада интенсивности ХЛ. То есть тролокс, по сути, на время задерживает усиление ХЛ при внесении в систему  $H_2O_2$ , но кроме этого никак не влияет на её кинетику: высокая ХЛ-вспышка для содержащих тролокс проб имеет ту же форму и ту же продолжительность, что и для контроля. Мы обнаружили, что примерно через 20 минут после внесения  $H_2O_2$  в систему, содержащую комплекс ЦитС-БКЛ, наблюдается вторая, небольшая по интенсивности вспышка ХЛ. Причём интересно, что в присутствии тролокса происходит и сдвиг во времени этой второй вспышки, причём без достоверной потери её интенсивности. Указанное свойство экспериментальной системы проиллюстрировано рисунком 33, на котором показаны описанные вспышки для контрольной пробы и пробы, начальная концентрация тролокса в которой составляла 0,3 мкМ.

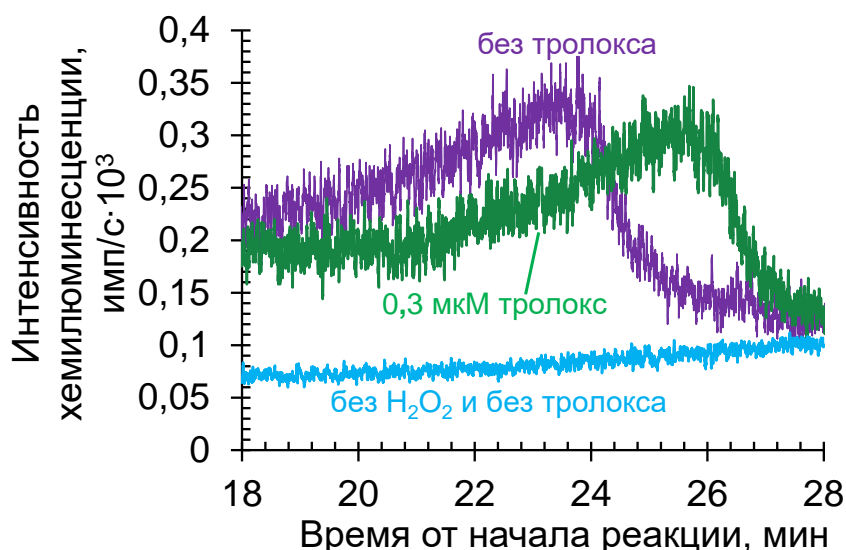


Рисунок 33. Сдвиг во времени второй вспышки ХЛ, сопровождающей катализируемую ЦитС-ТОКЛ липопероксидазную реакцию, под воздействием тролокса.

То есть можно сделать вывод, что тролокс препятствует всякому образованию свободных радикалов непосредственно сразу при добавлении перекиси. При этом он целиком или почти целиком расходуется, скорее всего, в первые несколько минут, а потом кинетика образования свободных радикалов происходит практически идентично той, что имеет место в контрольных образцах. Причём ХЛ-вспышки имеют такую же продолжительность, как и в контрольной пробе; отсюда делаем заключение, что общее время реакции с момента внесения перекиси водорода под действием тролокса дозозависимо увеличивается.

Ввиду того что, в отличие от экспериментов с ДГК, мы не можем с уверенностью говорить о процессах, происходящих в экспериментальной пробе в начале реакции, ХЛ-кривые, полученные в эксперименте с тролоксом, мы не подвергали математической обработке с использованием выведенных функций на расхождение С-334. Это обусловлено тем, что невозможно с уверенностью сказать, как в это время С-334 взаимодействовал с другими компонентами реакционной смеси; подробнее об этом – в параграфе раздела «Обсуждение результатов», соответствующем данному параграфу.

### **3.8 Угнетение хлорофиллином хемилюминесценции, сопровождающей катализируемую комплексом цитохрома с с кардиолипином квазилипоксигеназную реакцию**

Наряду с изучением ДГК и тролокса как ингибиторов свободнорадикального окисления липидов, катализируемого комплексом цитохрома с с кардиолипином, мы провели схожее исследование с производным хлорофилла.

Наше желание провести эксперимент с производным хлорофилла обусловлено тем, что препараты на основе хлорофилла, как уже указывалось в обзоре литературы, обладают радиопротекторным действием [98-100]. А поскольку лучевое поражение во многом обусловлено процессами перекисного окисления липидов [127, 246, 452], то мы поставили задачу методом регистрации хемилюминесценции с использованием хинолизидинового производного кумарина изучить подавление производным хлорофилла ПОЛ.

Данный эксперимент заключался в исследовании на молекулярной модели методом регистрации усиленной С-334 хемилюминесценции воздействия хлорофиллина (водорастворимого продукта омыления хлорофилла) на окисление липидов, вызванное квазилипоксигеназной реакцией, катализируемой комплексом ЦитС-ТОКЛ. Липидным субстратом в настоящем исследовании выступал бычий кардиолипин, подвергнутый медленному окислению для появления в его структуре гидропероксидных группировок, являющихся субстратом квазилипоксигеназной реакции.

Таким образом, в ходе описываемого исследования была зарегистрирована хемилюминесценция реакционной смеси, содержащей ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС:ТОКЛ 1:30, препарат липопероксидов, полученный путём медленного окисления бычьего кардиолипина, и препарат хлорофиллина различных концентраций. На основании полученных хемилюминограмм была вычислена светосумма за первые 300 секунд реакции. Также была зарегистрирована ХЛ пробы, содержащей только ТОКЛ, препарат липопероксидов и С-334, но не содержащей ЦитС. Эта проба выполняет роль контроля на пероксидазу. В этой пробе максимальное значение интенсивности ХЛ составило

0,227 В, а светосуммы за 300 секунд – 31,89 В. Эти значения меньше соответствующих значений, полученные в других пробах. Помимо всего прочего это показывает то, что ХЛ в применяемой модельной системе обусловлена квазилипоксигеназной активностью ЦитС-ТОКЛ, а не просто реакцией диспропорционирования липопероксильных радикалов, имеющих место в образце окисленного БКЛ.

Статистическую обработку мы проводили с использованием t-критерия Стьюдента при доверительной вероятности 0,99. Для проведения вычислений использовался пакет «Анализ данных» в составе программного обеспечения «MS Excel 2016» с применением инструмента анализа «Описательная статистика» при уровне надёжности 99%, для каждого состава проб было проведено 8 измерений. Проверка гипотезы о нормальном распределении полученных данных для каждой концентрации хлорофиллина была проведена по общепринятой методике с использованием критерия согласия Пирсона с использованием программного обеспечения «MS Excel 2016».

Результаты эксперимента по изучению влияния хлорофиллина на хемилюминесценцию, сопровождающую катализируемую ЦитС-ТОКЛ квазилипоксигеназную реакцию, показаны на рисунке 34.

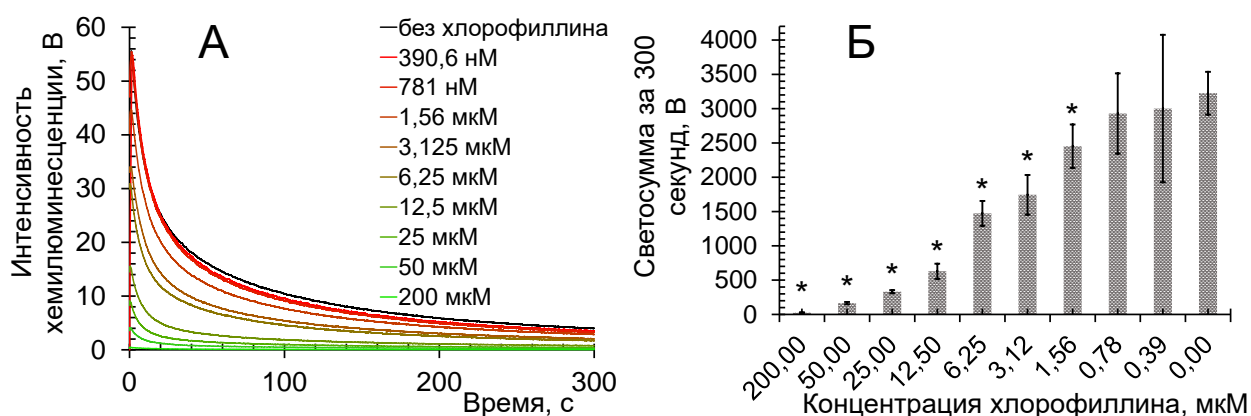


Рисунок 34. А. Интенсивность хемилюминесценции системы 10 мкМ ЦитС, 300 мкМ тетраолеилкардиолипидов, 25 мкМ С-334, 150 мкМ (в пересчёте на окисленный БКЛ) липопероксиды в присутствии указанных в легенде концентраций хлорофиллина  
 Б. Светосумма для указанной системы за первые 5 минут реакции, \* достоверное отличие от значения контроля при  $P=99\%$ .

На основании представленных на рисунке 34 данных можно сказать, что хлорофиллин в концентрациях, равных и превышающих 1,56 мкМ с

достоверностью 99% угнетает хемилюминесценцию, сопровождающую квазилипоксигеназную реакцию, катализируемую ЦитС-ТОКЛ. Это подавление хемилюминесценции может свидетельствовать о достоверном ингибировании хлорофиллином каскада реакций перекисного окисления липидов. Полученный вывод вполне согласуется с литературными данными. Так авторы [98], проводившие химическую оценку интенсивности протекания процесса перекисного окисления липидов у мышей, подвергнутых воздействию  $\gamma$ -излучения, путём определения концентрации малонового диальдегида, наблюдали сниженное содержание этого маркера у мышей, которые получали препарат хлорофилла, в сравнении с мышами, которые его не получали.

На рисунке 35 показан график зависимости светосуммы от начальной концентрации хлорофиллина в пробе. Нижняя прямая линия соответствует значению светосуммы, полученному для пробы, не содержащей ЦитС (принята за значение, соответствующее полному подавлению ферментативно-запущенного свободнорадикального окисления липидов). Согласно представленному на рисунке 35 графику, концентрация хлорофиллина, вызывающая половинное тушение хемилюминесценции, составляет примерно 3,7 мкМ.

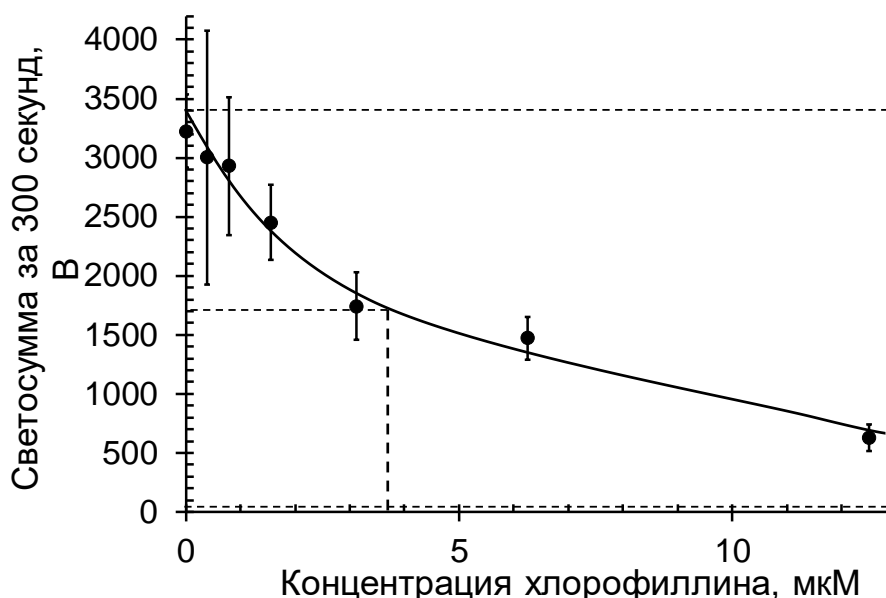


Рисунок 35. Графическое определение концентрации хлорофиллина, вызывающей половинное тушение ХЛ, индуцированной ЦитС-ТОКЛ, составившей 3,7 мкМ. Нижняя пунктирная линия – значение светосуммы для пробы, не содержащей ЦитС (контроль на пероксидазу).



## 4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

### 4.1 Использование обратимости изменения конформации цитохрома с под действием метанола применительно к настоящей работе

Исследование обратимости действия метанола на структуру цитохрома с проведено потому, что на определённых этапах выполнения некоторых экспериментов, результаты которых изложены в настоящей диссертационной работе, имела место достаточно высокая концентрация этого спирта. При этом низкомолекулярные спирты вызывают изменение структуры белков, заключающееся в частичном развёртывании глобул вследствие дегидратации белков [208]. Очевидно, что ЦитС в вышеупомянутых случаях меняет свою конформацию, что может повлиять на адекватность полученных экспериментальных данных. Заметим, к слову, что координационная связь между гемовым железом и атомом серы Met80 за счёт изменения конформации молекулы ЦитС имеет место и при образовании комплекса с кардиолипином [24, 40, 41].

Нами с помощью пакета «MS Excel 2016» была проведена обработка представленных на рисунке 12 данных, полученных в ходе эксперимента, проведённого на базе факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова совместно с Г.К. Владимировым и представленных в соответствующем разделе статьи [109]. В результате обработки данных установлено, что при разбавлении раствора ЦитС с объёмной долей метанола 50% в 5 раз восстановилось, судя по значению поглощения,  $(93,69 \pm 1,04)\%_{n=5;p=0,95}$  железо-серных связей. При этом необходимо указать, что за 100% нами было взято значение поглощения 10 мкМ раствора ЦитС, в котором полностью отсутствует метанол, а в опытной пробе его объёмная концентрация составляет 10%. Это свидетельствует о допустимости использования метанольных растворов без риска искажения результатов вследствие нарушения метанолом молекулярной структуры ЦитС. Следует отметить, что при проведении всех экспериментов мы старались придерживаться такого алгоритма, при котором концентрация метанола в пробе на всех этапах опыта была бы минимальной.

## 4.2 Обусловленность хемилюминесценции системы цитохром *c*–кардиолипин ферментативной активностью цитохрома *c*

Подозрение на то, что наблюдаемая нами хемилюминесценция в системе цитохром *c*–кардиолипин может быть обусловлена ионами  $Fe^{2+}$ , появилось вследствие того, что полученная нами кинетика ХЛ в присутствии комплекса цитохрома *c* с кардиолипином оказалась схожей с кинетикой, полученной ранее в системе, где хемилюминесценция запускалась ионами  $Fe^{2+}$  [21]. Кроме того, в пользу возможности участия ионов  $Fe^{2+}$  в наблюдаемой ХЛ выступают работы, в которых показано, что цитохром *c* разрушается под действием перекиси водорода [40] и гидроперекисей липидов [23] и что действие некоторых гемопротеинов обусловлено именно выходом ионов  $Fe^{2+}$  из гема [262].

Возможность вклада свободного железа в хемилюминесценцию, наблюдаемую в системе цитохром *c*–кардиолипин в настоящей работе определялась путём сопоставления влияния комплексонов на железо (*o*-фенантролин и ЭДТА) на хемилюминесценцию в присутствии липидного субстрата (соевого лецитина), запускаемую ионами  $Fe^{2+}$  или пероксидазой хрена, и влияния тех же комплексонов на ХЛ, наблюдаемую в данной системе. Предполагалось, что комплексоны будут подавлять ХЛ, запускаемую ионами  $Fe^{2+}$ , и не будут подавлять ХЛ, запускаемую пероксидазой хрена.

Стоит отметить, что концентрации ПХ и ЦитС были одинаковыми (10 мкМ), а концентрация  $Fe^{2+}$  составляла 91 мкМ. Выбор такой концентрации железа был обусловлен тем, что ионы железа такой концентрации давали амплитуду ХЛ такую же, как упомянутые белки в концентрации 10 мкМ. Отсюда следует, что квазилипоксигеназный эффект от свободных ионов  $Fe^{2+}$  почти в 10 раз меньше, чем от пероксидаз. А поскольку ПХ является классической пероксидазой, то сходство ХЛ в системах ЦитС–кардиолипин и соевый лецитин–ПХ (то, что ХЛ, сопровождающая ПОЛ, не подавляется *o*-фенантролином и ЭДТА, связывающими ионы железа) можно вполне считать доказательством того, что комплекс цитохрома *c* с кардиолипином функционально является ферментом-пероксидазой, активность которой можно оценивать на основании анализа ХЛ.

### **4.3 Хинолизидиновые производные кумарина как активаторы хемилюминесценции в процессе квазилипоксигеназной и липопероксидазной реакций, катализируемых комплексом цитохрома с с кардиолипином**

Перед непосредственным обсуждением полученных данных, на наш взгляд, необходимо сказать несколько слов о применяемой нами методике регистрации спектров оптической плотности для изучения участия хинолизидиновых производных кумарина в липопероксидазной реакции. Регистрируя серию спектров, можно мониторить изменения оптической плотности на многих длинах волн, оценивая возможность образования новых окрашенных продуктов. В этом заключается преимущество регистрации спектров по сравнению с регистрацией значения оптической плотности на одной длине волны, хотя при этом и резко сокращается количество измерений для конкретной длины волны. Также заметим, что, анализируя две длины волны из одного спектра, можно получить более достоверные значения концентраций веществ, чем при регистрации значений поглощения на двух длинах волн при двух измерениях аналогичных проб, так как возможная ошибка экспериментатора при приготовлении этих проб будет вносить искажения. А при анализе спектра поглощения экспериментатор имеет дело с одной и той же пробой. Однако при регистрации серии спектров одной пробы встаёт задача выбора оптимальных значений временных промежутков между измерениями: с одной стороны, необходимо получить достаточное количество измерений оптической плотности на конкретных длинах волн, а значит – и значений концентраций вещества, а с другой – важно не «утонуть» в данных. Поэтому при регистрации большинства серий спектров поглощения мы выбирали разные промежутки времени между измерениями на разных этапах реакции (продолжительность регистрации спектра всегда равнялась 1 минуте): первые семь измерений, когда уменьшение концентрации веществ было максимальным, мы проводили с 10-секундными интервалами, следующие 23 – с минутными, далее – ещё 26 измерений, когда кривая уменьшения концентрации практически становится параллельной оси абсцисс, – с двухминутными интервалами. Указанная спектрофотометрическая методика для оценки химического участия активатора

хемилюминесценции в липопероксидазной реакции была запатентована в России с присвоением номера 2720807 С1 [113].

По описанной выше методике мы регистрировали все серии спектров, представленные в параграфах «3.4.2 Спектрофотометрический анализ участия хинолизидиновых производных кумарина в пероксидазной реакции, катализируемой комплексом цитохрома *c* с тетраолеилкардиолипином», «3.4.3 Спектрофотометрический анализ участия хинолизидиновых производных кумарина в квазилипоксигеназной и липопероксидазной реакциях, катализируемых комплексом цитохрома *c* с кардиолипином» и «3.6 Разрушение цитохрома *c*, находящегося в комплексе с кардиолипином, при осуществлении катализа липопероксидазной реакции» за исключением серии спектров поглощения смеси, в которой протекает пероксидазная реакция, катализируемая ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС:ТОКЛ 1:60 в присутствии С-334, и липопероксидазная реакция, катализируемая ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС:ТОКЛ 1:30 в присутствии фосфатидной кислоты без добавления кумаринового производного и с добавлением С-334.

Теперь перейдём непосредственно к обсуждению свойств производных кумарина как активаторов ХЛ, сопровождающей ферментативное ПОЛ.

Как уже отмечалось в разделе «3.5 Анализ хемилюминесценции, сопровождающей катализируемые комплексом цитохрома *c* с кардиолипином реакции», в системе, состоящей из 215 мкМ перекиси водорода, производного кумарина и ЦитС-ТОКЛ, хинолизидиновые производные кумарина расходуются. При этом ХЛ наблюдается лишь в том случае, когда соотношение ЦитС:ТОКЛ равно 1:30, а когда оно равно 1:60, свечения практически нет. Этот факт, наряду с тем, что в случае квазилипоксигеназной реакции наблюдается ХЛ, а концентрация кумаринового производного почти не снижается (рис. 19–21В,Д, рис. 24А,В,Д), мы рассматриваем как доказательство того, что и в случае ферментативного запуска ПОЛ производные кумарина являются физическими активаторами ХЛ, подобно тому, как они усиливают свечение и в системах, в которых этот процесс запускают свободные ионы  $Fe^{2+}$  – при переходе в основное состояние из синглетного

возбуждённого, в которое они перешли в следствие триплет-синглетного переноса энергии ЭВС с кетоновых молекул, образовавшихся вследствие дипропорционирования липопероксильных радикалов по механизму Расселла [374]. А их взаимодействие с цитохромом *c*, выступающим в роли фермента-пероксидазы, не сопровождается ХЛ в присутствии перекиси водорода, в отличие, скажем, от люминола [200], являющегося химическим активатором ХЛ.

Заметим, что на графиках, представленных на рисунке 22А,В,Г, иллюстрирующих корреляцию между концентрацией производного кумарина и интенсивностью ХЛ, сопровождающей катализируемую ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС:ТОКЛ 1:30 пероксидазную реакцию в отсутствии фосфатидной кислоты (ФК), интенсивность ХЛ падает вместе со снижением концентрации производного кумарина; никаких дополнительных всплесков, которые могли бы быть связаны с испусканием фотонов продуктами взаимодействия кумаринового производного с ЦитС, нет. А данная ХЛ является, по нашему мнению, результатом окисления ТОКЛ, которое, хоть и в крайне незначительной степени, но всё-таки имеет место.

Считаем нужным отметить, что при отсутствии ФК и  $H_2O_2$  в этой системе ХЛ не была зарегистрирована вовсе, но концентрация производных кумарина, хоть и крайне медленно, но снижалась при соотношении ЦитС:ТОКЛ 1:30 (рис. 15Д, 16Д, 22Д), не снижаясь при этом в случае соотношения, равного 1:60 (рис. 17Д). При этом в случае соотношения ЦитС:ТОКЛ, равного 1:60, ХЛ, сопровождающая пероксидазную реакцию, имела более низкую интенсивность в сравнении с той, что сопровождает эту реакцию, катализируемую ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС:ТОКЛ 1:30 (рис. 22, 23). Это говорит, во-первых, о том, что ТОКЛ во втором случае окисляется интенсивнее, чем в первом, и, во-вторых, о том, что кумариновое производное не может прореагировать с ЦитС, связанным с бóльшим числом молекул кардиолипина. Видимо, большое количество молекул кардиолипина, связанных с ЦитС, создаёт стерическое препятствие для окисления друг друга и для взаимодействия с кумариновым производным. Хотя при добавлении в систему  $H_2O_2$  концентрация кумаринового производного начинает резко

понижаться (рис. 22Б), то есть олеиловые «хвосты», торчащие в стороны от белковой глобулы, для молекулы производного кумарина уже не являются препятствием. Но при этом, если судить по хемилюминесценции, ТОКЛ всё равно не окисляется, хотя соотношение ЦитС:кардиолипин, равное 1:60, входит в диапазон, способствующий максимальному проявлению ЦитС липопероксидазной активности [36]. Однако, видимо, большое количество олеилов делают недоступными для окисления свои двойные связи, расположенные в центре ацила, вдали от  $\omega$ -атома. Это можно считать дополнительным аргументом в пользу целесообразности использования ТОКЛ в качестве кардиолипина-кофактора ЦитС, который в условиях конкретной задачи должен быть трудноокисляемым.

#### **4.4 Предполагаемый механизм участия хинолизидиновых производных кумарина в катализируемой комплексом цитохрома *c* с кардиолипином липопероксидазной реакции.**

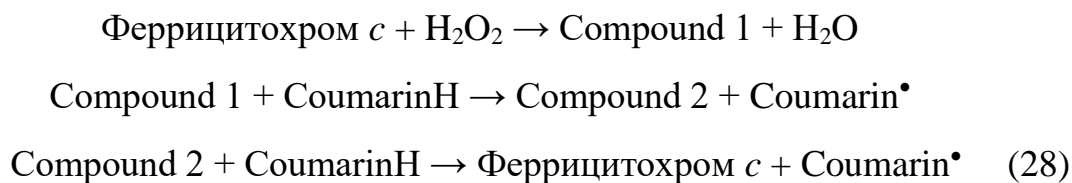
Хотя тезис о том, что «производные кумарина являются субстратами в липопероксидазной реакции, катализируемой комплексом ЦитС с кардиолипином», ранее уже встречался в литературе [25, 105-107, 114], до настоящей работы не было получено ответа на вопрос, каков же молекулярный механизм участия производных кумарина в каталитическом пероксидажном цикле и принимают ли они участие в квазилипоксигенажном каталитическом цикле.

Из данных, представленных на рисунках 15–24, следует, что хинолизидиновые производные кумарина являются субстратами катализируемой комплексом ЦитС с кардиолипином пероксидазной реакции. Очевидно, что механизм их участия в ней сводится к роли субстрата одной из форм фермента-пероксидазы, которым является цитохром *c*, связанный с кардиолипином, в ходе определённых реакций пероксидажного цикла, описанного в параграфе «1.3.3.2 Пероксидазная функция комплекса цитохрома *c* с кардиолипином» и представленного в графическом виде на рисунке 6.

Производные кумарина не могут быть субстратами реакции 1 с рисунка 6 в силу того, что именно в присутствии перекиси водорода их расход идёт наиболее интенсивно, следовательно, перекись водорода способствует появлению форм

пероксидазы, реагирующих с кумариновым производным. Таким образом, хинолизидиновые производные кумарина являются субстратом реакции, субстратом которой также являются и липидные молекулы.

Первоначально мы предположили, что с производными кумарина взаимодействуют компаунд 1 и компаунд 2, и схема участия производных кумарина в пероксидазном цикле имеет вид (CoumarinH и Coumarin<sup>•</sup> – исходная (восстановленная) и окисленная формы производного кумарина):

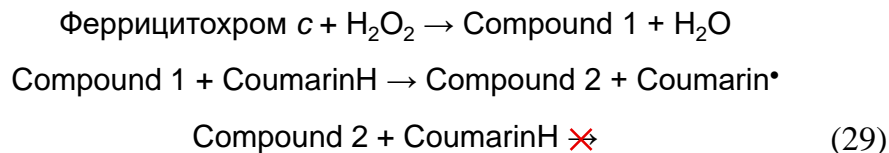


Данный механизм мы представили в совместной с нашими коллегами из МГУ имени М.В. Ломоносова публикации [109]. В пользу схемы (28) выступает исследование участия в пероксидазном цикле люминола, проведённое авторами [200], в работе которых указывается на возможность окисления люминола и под действием компаунда 1, и под действием компаунда 2. То есть схема (28) – это аналогия с люминолом, приведённая для кумаринового производного.

Однако впоследствии, в ходе актуального исследования, лёгшего в основу данной работы, мы были вынуждены кардинальным образом изменить своё мнение. Это стало результатом проведённых нами экспериментов с добавлением в реакционную смесь, помимо комплекса ЦитС-ТОКЛ, производного кумарина и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ещё и фосфатидной кислоты как легкоокисляемого липидного субстрата (рис. 19–21, 24).

Проанализировав изменение концентрации хинолизидиновых производных кумарина в ходе квазилипоксигеназной реакции (рис. 19–21В) и в ходе липопероксидазной реакции (рис. 19–21Г), нетрудно заметить, что значительное уменьшение концентрации кумариновых производных наблюдается лишь в случае липопероксидазной реакции. Это позволяет (помимо того, что хинолизидиновые производные кумарина не принимают участия в квазилипоксигеназном каталитическом цикле) также сделать ещё два важных вывода. Во-первых,

полученные результаты проливают свет на механизм катализа квазилипоксигеназной реакции: в ходе неё из ферриформы пероксидазы образуется сразу компаунд 2, а не компаунд 1. Подробно это изложено в параграфе «4.6.2 Предполагаемый механизм катализа квазилипоксигеназной реакции» с графическим представлением этого механизма на рисунке 37Б. В данном параграфе на этом останавливаться не будем, а уделим внимание только механизму участия кумариновых производных в каталитическом пероксидазном цикле. Во-вторых, мы предположили, что основным механизмом участия хинолизидиновых производных кумарина в пероксидазном цикле является их взаимодействие только с компаундом 1, без взаимодействия с компаундом 2. Собственно, хинолизидиновые производные кумарина не расходуются в ходе квазилипоксигеназной реакции именно потому, что в этом случае в системе отсутствует компаунд 1, который может провзаимодействовать с кумариновым производным во время превращения в компаунд 2. Таким образом, механизм, представленный на схеме (28), на наш взгляд, не соответствует истине, и схему следует привести в следующий вид:



Если говорить о дальнейших реакциях, в которые может вступить компаунд 2, то он может лишь провзаимодействовать либо по реакции 4а с рисунка 6 с ацилом, способствуя образованию липидного радикала, запускающего каскад реакций ПОЛ, сопровождающийся в конечном итоге в том числе и высвечиванием фотонов, регистрируемых хемилюминометром, либо же – с молекулой перекиси водорода по реакции 11 с рисунка 6 или по реакции 4b – с супероксидным анион-радикалом  $\bullet\text{O}_2^-$ . К слову, в экспериментах без добавления ФК в систему, скорее всего, пероксидазный цикл осуществляется именно таким образом, поэтому расход производных кумарина отмечается и в случае, когда дополнительный легкоокисляемый субстрат в системе отсутствует.

Вызывает интерес снижение концентрации С-314, С-334 и С-525 в отсутствии и  $\text{H}_2\text{O}_2$  и ФК (в случае присутствия последней расхода почти нет



(рис. 19–21В)), проиллюстрированное на рисунках 15Д, 16Д и 18Д, в присутствии ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС:ТОКЛ, равном 1:30. В случае соотношения 1:60 расхода нет (рис. 17Д). Мы считаем, что это вызвано стерическим препятствием со стороны олеилов из состава ТОКЛ. К сожалению, чёткого ответа на этот вопрос мы пока не нашли. Весьма сомнительно, что хинолизидиновые производные кумарина могут взаимодействовать с феррицитохромом *c*. Конечно, можно, к примеру, предположить, что препарат ТОКЛ содержал какую-то долю липидных гидроперекисей и в системе шла квазилипоксигеназная реакция. Однако, во-первых, производные кумарина, как уже указывалось, почти не расходуются в ходе неё (рис. 19–21В), а во-вторых, эта реакция абсолютно не сопровождалась ХЛ, которая обязательно имеет место при ПОЛ, запущенном в процессе квазилипоксигеназной реакции. Да и препарат ТОКЛ, до экспериментов хранящийся в надлежащих условиях (в запаянной ампуле при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ ), в силу своей трудноокисляемости вряд ли мог содержать в своём составе липопероксиды. Таким образом, поднятый вопрос остаётся открытым. Однако, если говорить не о возможных реакциях хинолизидиновых производных кумарина с ЦитС, а в контексте изыскания корректировки полученных с их использованием ХЛ-кривых в процессе изучения липопероксидазной активности комплекса ЦитС с кардиолипином, то этот вопрос вполне можно оставить и без внимания: ведь при изучении данного явления в реакционной смеси всегда будет присутствовать липидный субстрат, подходящий для катализируемой ЦитС реакции.

А в случае катализируемой цитохромом *c* ферментативной липопероксидазной реакции, по нашему мнению, хинолизидиновые производные кумарина взаимодействуют с компаундом 1, а образовавшийся при этом компаунд 2 реагирует с ацилом, переходя при этом в феррицитохром *c*, с образованием липидного радикала. Графически этот процесс представлен на рисунке 36. Реакцию взаимодействия компаунда 1 с производным кумарина мы обозначили как реакцию 3с, альтернативную реакциям 3а и 3б с рисунка 6, в которые может вступать данная форма фермента-пероксидазы.

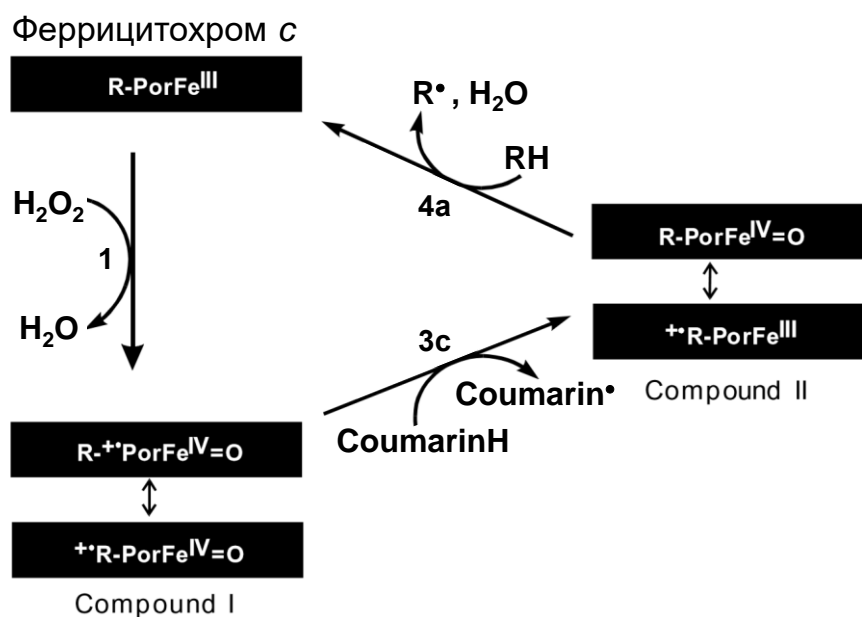


Рисунок 36. Предполагаемая схема участия хинолизидиновых производных кумарина в пероксидазном каталитическом цикле. Номера реакций соответствуют рисунку 6.

Ввиду того что целью настоящей работы является изыскание корректного способа использования хинолизидиновых производных кумарина при изучении функций комплекса ЦитС с кардиолипином, у читателя может возникнуть вопрос: насколько корректно использование этих веществ, даже с учётом того, что их взаимодействие с пероксидазой не сопровождается люминесценцией, ведь производное кумарина в пероксидазном цикле занимает место субстрата, которым в живой клетке является молекула липида? Отвечая на данный вопрос, заметим, что вряд ли план какого-либо будущего эксперимента будет содержать сравнение усиленной производными кумарина и собственной ХЛ системы. К примеру, если целью экспериментатора является установление влияния какого-нибудь антиоксиданта на запускаемую комплексом ЦитС с кардиолипином липидную пероксидацию, и, допустим, экспериментатор регистрирует у контрольной пробы собственную ХЛ, а у проб с добавлением антиоксидантов – усиленную кумариновыми производными, то подобный эксперимент сам по себе уже содержит методологическую ошибку: сравниваемые пробы должны отличаться лишь концентрацией антиоксиданта (в контрольной пробе она равна нулю). А поскольку производное кумарина присутствует во всех пробах, то оно если и притормаживает образование триггерных для липидной пероксидации радикалов

липидов, то везде одинаково. И этот эффект влияния сократится при вычислении значения подавления ХЛ антиоксидантом.

Применение функций поправочных на уменьшение концентрации активатора хемилюминесценции коэффициентов необходимо в случае проведения анализа скорости интенсивности свободнорадикальных реакций в различные моменты времени. Эта необходимость объясняется снижением интенсивности регистрируемой ХЛ в системе, в связи со снижением концентрации кумариновых производных. Однако при этом свободнорадикальные реакции могут идти в системе с той же, а может быть, и с большей скоростью. Но, видя снижение интенсивности ХЛ по сравнению с той, что была в начале регистрации, экспериментатор может прийти к ложному выводу, что скорость свободнорадикальной реакции упала. Подобного артефакта снижения интенсивности ХЛ во времени не наблюдалось бы, если бы производные кумарина не являлись бы субстратами ферментативной липопероксидазной реакции. И, собственно, исходя из того, что при использовании производных кумарина при изучении свойств комплекса ЦитС с кардиолипином исследователи руководствовались ложным постулатом об их химической инертности, результаты анализа кинетики катализируемой им липопероксидазной реакции, проведённого авторами [30, 37, 52, 53], нельзя считать полностью адекватными.

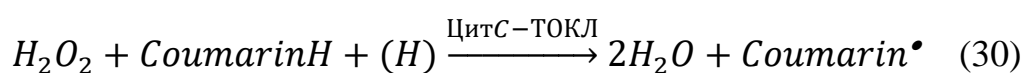
#### **4.5 Поправочные функции, учитывающие разрушение кумариновых активаторов в ходе ферментативной липидной пероксидации**

Для выведения корректирующей функции учёта уменьшения концентрации хинолизидиновых производных кумарина в процессе катализируемых комплексом ЦитС с кардиолипином реакций необходимо в первую очередь определить константы скорости реакции разрушения этих веществ. Непосредственный механизм участия производных кумарина в указанных реакциях, на наш взгляд, что описано в предыдущем параграфе (рис. 36). Реакция кумаринового производного с компаундом 1 является реакцией второго порядка. Однако определение константы скорости реакции второго порядка сопряжено с трудностью проведения методологически правильного эксперимента: легко вычислить значение этой

константы можно лишь в том случае, когда концентрации реагентов равны друг другу, то есть необходимо добиться в модельной системе равенства концентрацией производного кумарина и компаунда 1 (не цитохрома *c* в целом, а именно цитохрома *c* в форме компаунда 1). Выполнение данного требования (подразумевающего помимо всего прочего проведения дополнительного обширного исследования с затратой большого числа дефицитных реактивов) с учётом наличной технической базы не представляется возможным.

Однако, как уже указывалось в предыдущем разделе, главной нашей задачей является разработка корректной методики использования кумариновых производных при изучении ферментативной пероксидазной реакции. В виду этого мы считаем возможным пойти на ряд допущений.

Несмотря на то, что непосредственного взаимодействия производных кумарина с  $H_2O_2$  нет, доказательства чего приведены в наших работах [105, 108], рассматриваемую реакцию разрушения кумариновых производных можно в упрощённом виде представить как их окисление перекисью водорода, которое катализирует ЦитС-ТОКЛ. При этом сам ЦитС-ТОКЛ можно как бы «вынести за скобки», представив его как катализатор. Для этого напишем брутто-реакцию, которая происходит при одном полном прохождении пероксидазного цикла с участием хинолизидинового производного кумарина:



Если речь идёт о липопероксидазной реакции, то под (H) следует понимать липид, дающий в качестве продукта липидный радикал, а если рассматривать наши эксперименты без внесения ФК, то атом водорода поступает от второй молекулы  $H_2O_2$ , дающей в качестве продукта супероксидный радикал  $\bullet O_2^-$ . Реакцию (30) следует рассматривать как реакцию третьего порядка, однако в наших опытах концентрация хинолизидинового производного кумарина не менее, чем на порядок ниже, чем и концентрация перекиси водорода, и концентрация липидов. В связи с этим получается, что на фоне большой доли снижения концентрации С-314, С-334 или С-525 доля снижения концентрации перекиси водорода и липидного субстрата в случае его наличия в системе ничтожна. Поэтому мы рассматривали реакцию (30)

для разрушения кумаринового производного как реакцию псевдопервого порядка. В связи с этим константу скорости окисления производного кумарина можно вычислять как константу скорости реакции первого порядка.

Используя вычисленную константу скорости реакции первого порядка для разрушения хинолизидинового производного кумарина  $k$ , можно вывести зависимость значения их концентрации  $C$  от времени  $t$  при помощи общеизвестного уравнения для необратимой химической реакции первого порядка:

$$C = C_0 e^{-kt} \quad (31)$$

,  $C_0$  – начальная концентрация,  $e$  – основание натурального логарифма. Размерность константы скорости первого порядка  $k$  равна обратным единицам времени.

Принимая значение  $C_0$  в формуле (31) за единицу, мы получим функцию, характеризующую долю активатора хемилюминесценции, остающуюся в системе в момент времени  $t$ . А разделив единицу на эту функцию, мы получаем функцию поправочного коэффициента  $K_{cor}$  на расход кумаринового производного:

$$K_{cor} = \frac{1}{e^{-kt}} = e^{kt} \quad (32)$$

Умножая на данные поправочные коэффициенты для соответствующих моментов времени зарегистрированные на хемилюминометре значения интенсивности люминесценции  $J_{зарег.}$ , экспериментатор получит значения  $J_{п.}$ , какие бы были в эти моменты времени у интенсивности хемилюминесценции, если бы хинолизидиновые производные кумарина не расходовались в процессе реакции. Поправочная функция в общем виде выглядит следующим образом:

$$J_{п.} = J_{зарег.} e^{kt} = K_{cor} J_{зарег.} \quad (33)$$

В силу того, что приведённый способ выведения поправочной функции включает в себя ряд допущений, мы считаем целесообразным в некоторых системах выводить различные функции для различных временных отрезков от начала реакции. И если временной диапазон начинается не с момента запуска реакции, то в формуле (33) появляется дополнительный коэффициент  $A$ , который равен частному единицы и доли активатора ХЛ, остающейся в системе на момент

времени, равный первому значению временного диапазона. Поправочная функция для интенсивности ХЛ на уменьшение концентрации хинолизидинового производного кумарина с учётом этого приобретает вид:

$$J_{\Pi} = AJ_{\text{зарег.}} e^{kt} \quad \text{при } t \in (t_1; t_2] \quad (34)$$

, где при  $t_1 = 0$   $A = 1$ , а при  $t_1 > 0$   $A > 1$ .

Вначале представим вычисленные значения констант скорости и выведенные корректирующие функции для систем, в которых протекает пероксидазная реакция, катализируемая комплексом ЦитС-ТОКЛ, без внесения дополнительного липидного субстрата в виде легкоокисляемой фосфатидной кислоты. Данные экспериментов на этих моделях проиллюстрированы на рисунках 15–18, 22 и 23.

Константа скорости реакции разрушения С-314 в ходе катализируемой ЦитС-ТОКЛ пероксидазной реакции при начальном соотношении ЦитС:ТОКЛ 1:30 равна  $(0,00455 \pm 0,00211) \text{ с}^{-1}$  при  $t \in (0; 181,4] \text{ с}$  и  $(0,00139 \pm 0,00007) \text{ с}^{-1}$  при  $t \in (181,4; 581,4] \text{ с}$ , а поправочная функция на разрушение С-314 имеет вид:

$$\begin{aligned} J_{\Pi} &= J_{\text{зарег.}} e^{0,00455t} \quad \text{при } t \in (0; 181,4] \text{ с} \\ J_{\Pi} &= 1,7604 J_{\text{зарег.}} e^{0,0014t} \quad \text{при } t \in (181,4; 581,4] \text{ с} \quad (35) \end{aligned}$$

Константа скорости реакции разрушения С-334 в ходе катализируемой ЦитС-ТОКЛ пероксидазной реакции при начальном соотношении ЦитС:ТОКЛ 1:30 равна  $(0,0039 \pm 0,0003) \text{ с}^{-1}$  при  $t \in (0; 252] \text{ с}$  и  $(0,0015 \pm 0,0002) \text{ с}^{-1}$  при  $t \in (252; 581,4] \text{ с}$ , а поправочная функция на разрушение С-334 в этой системе имеет вид:

$$\begin{aligned} J_{\Pi} &= J_{\text{зарег.}} e^{0,0039t} \quad \text{при } t \in (0; 252] \text{ с} \\ J_{\Pi} &= 1,7862 J_{\text{зарег.}} e^{0,0015t} \quad \text{при } t \in (252; 581,4] \text{ с} \quad (36) \end{aligned}$$

Константа скорости реакции разрушения С-334 в ходе катализируемой ЦитС-ТОКЛ пероксидазной реакции при начальном соотношении ЦитС:ТОКЛ 1:60 равна  $(0,00519 \pm 0,00377) \text{ с}^{-1}$  при  $t \in (0; 205] \text{ с}$  и  $(0,00194 \pm 0,00017) \text{ с}^{-1}$  при  $t \in (205; 720] \text{ с}$ , а поправочная функция на разрушение С-334 в этой системе имеет вид:

$$\begin{aligned} J_{\Pi} &= J_{\text{зарег.}} e^{0,0052t} \quad \text{при } t \in (0; 205] \text{ с} \\ J_{\Pi} &= 1,9574 J_{\text{зарег.}} e^{0,0019t} \quad \text{при } t \in (205; 720] \text{ с} \quad (37) \end{aligned}$$

Константа скорости реакции разрушения С-525 в ходе катализируемой ЦитС-ТОКЛ пероксидазной реакции при начальном соотношении ЦитС:ТОКЛ 1:30 равна  $(0,00339 \pm 0,00155) \text{ с}^{-1}$  при  $t \in (0; 150] \text{ с}$  и  $(0,00043 \pm 0,00012) \text{ с}^{-1}$  при  $t \in (150; 583] \text{ с}$ , а поправочная функция на разрушение С-525 в этой системе имеет вид:

$$\begin{aligned} J_{\Pi} &= J_{\text{зарег.}} e^{0,0034t} \quad \text{при } t \in (0; 150] \text{ с} \\ J_{\Pi} &= 1,5597 J_{\text{зарег.}} e^{0,0004t} \quad \text{при } t \in (150; 583] \text{ с} \quad (38) \end{aligned}$$

Теперь представим константы скорости реакции разрушения хинолизидиновых производных кумарина и функции для корректировки ХЛ-кривых, полученные путём обработки данных с экспериментальных моделей квазилипоксигеназной и липопероксидазных реакций, свойственных живым системам. Таковыми моделями в нашей работе явились системы, в которых присутствовала ФК в качестве окисляемого фосфолипидного субстрата. Данные экспериментов на этих моделях проиллюстрированы рисунками 19–21 и 24.

Константа скорости реакции разрушения С-314 в ходе катализируемой ЦитС-ТОКЛ липопероксидазной реакции при начальном соотношении ЦитС:ТОКЛ 1:30 равна  $(0,0027 \pm 0,0006) \text{ с}^{-1}$  при  $t \in (0; 325] \text{ с}$ ,  $(0,00039 \pm 0,00012) \text{ с}^{-1}$  при  $t \in (300; 570] \text{ с}$ ,  $(0,00014 \pm 0,00002) \text{ с}^{-1}$  при  $t \in (570; 1200] \text{ с}$ ,  $(0,000065 \pm 0,000006) \text{ с}^{-1}$  при  $t \in (1200; 1905] \text{ с}$ ,  $(0,000031 \pm 0,000003) \text{ с}^{-1}$  при  $t \in (1905; 3600] \text{ с}$ , а поправочная функция на разрушение С-314 в данной системе имеет вид:

$$\begin{aligned} J_{\Pi} &= J_{\text{зарег.}} e^{0,0027t} \quad \text{при } t \in (0; 300] \text{ с} \\ J_{\Pi} &= 2,0081 J_{\text{зарег.}} e^{0,00039t} \quad \text{при } t \in (300; 570] \text{ с} \\ J_{\Pi} &= 2,3115 J_{\text{зарег.}} e^{0,00014t} \quad \text{при } t \in (570; 1200] \text{ с} \\ J_{\Pi} &= 2,5311 J_{\text{зарег.}} e^{0,00007t} \quad \text{при } t \in (1200; 1905] \text{ с} \\ J_{\Pi} &= 2,6932 J_{\text{зарег.}} e^{0,00003t} \quad \text{при } t \in (1905; 3600] \text{ с} \quad (39) \end{aligned}$$

Константа скорости реакции разрушения С-334 в ходе катализируемой ЦитС-ТОКЛ липопероксидазной реакции при начальном соотношении ЦитС:ТОКЛ 1:30 равна  $(0,00439 \pm 0,00268) \text{ с}^{-1}$  при  $t \in (0; 230] \text{ с}$ ,  $(0,00132 \pm 0,00020) \text{ с}^{-1}$  при  $t \in (230; 580] \text{ с}$ ,  $(0,00063 \pm 0,00009) \text{ с}^{-1}$  при  $t \in (580; 930] \text{ с}$ , а поправочная функция на разрушение С-334 в данной системе имеет вид:

$$\begin{aligned}
 J_{\Pi} &= J_{\text{заперг.}} \cdot e^{0,0044t} \quad \text{при } t \in (0; 230] \text{ с} \\
 J_{\Pi} &= 1,9983 J_{\text{заперг.}} \cdot e^{0,0013t} \quad \text{при } t \in (230; 580] \text{ с} \\
 J_{\Pi} &= 2,9327 J_{\text{заперг.}} \cdot e^{0,0006t} \quad \text{при } t \in (580; 930] \text{ с} \quad (40)
 \end{aligned}$$

Константа скорости реакции разрушения С-525 в ходе катализируемой ЦитС-ТОКЛ липопероксидазной реакции при начальном соотношении ЦитС:ТОКЛ 1:30 равна  $(0,0025 \pm 0,0017) \text{ с}^{-1}$  при  $t \in (0; 327] \text{ с}$ , а поправочная функция на разрушение С-314 в данной системе имеет вид:

$$J_{\Pi} = J_{\text{заперг.}} \cdot e^{0,0025t} \quad (41)$$

Обращаем внимание читателя на то, что представленные математические формулы рассчитывают поправку только на уменьшение концентрации производных кумарина, но не учитывают возможное свечение при реакции производного кумарина с пероксидазой. Однако в работе [25] приводится тезис об отсутствии этой люминесценции, который косвенно можно подтвердить и нашими данными (рис. 24), поэтому мы и предлагаем приведённые выше функции.

#### 4.6 Цитохром с как факультативная пероксидаза

В силу того что ЦитС проявляет пероксидазную активность только в определённых условиях (в живых клетках таковым является его связывание с кардиолипином) называть его классической пероксидазой нельзя. В обзоре [423] по отношению к нему наряду с гемоглобином, цитоглобином, миоглобином и другим белкам со схожими свойствами применяется термин «псевдопероксидаза». Однако, на наш взгляд, данный термин не совсем уместен, так как механизм пероксидазной активности указанных выше белков, в целом, схож с таковым для классических ферментов-пероксидаз, а образующиеся продукты реакции взаимодействия фермента с пероксидазой идентичны как для этих белков, так и для классических пероксидаз [166, 315]. А приставка «псевдо-» означает скорее что-то внешне похожее, лишь кажущееся, но не являющееся таковым. Поэтому по отношению к ЦитС и другим похожим белкам, на наш взгляд, больше подходит термин «факультативная пероксидаза». На рисунке 6 приведена схема механизма проявления белком пероксидазной активности, целиком и полностью



заимствованная из статьи [230]; приведённые на ней реакции справедливы как для классических, так и для факультативных пероксидаз, в том числе и для комплекса цитохрома *c* с кардиолипином.

Механизмы этих реакций подробно изложены в работах [230, 370, 423] и описаны нами в обзоре литературы, поэтому не будем здесь на них останавливаться. В обзоре [423] приводятся частные отличия между реакциями классических и факультативных пероксидаз, называемых автором [423] псевдопероксидазами. В частности, приводятся сведения касательно того, что факультативные пероксидазы разрушаются в ходе проявления пероксидазной активности. Приводится мнение, что переход радикала с порфирина на апопротеин в составе компаунда 1 выводит пероксидазу из каталитического цикла, в то время как авторы [230] приводят схему (она изображена на рисунке б), согласно которой данный процесс является обратимым и, кроме того, радикальная форма компаунда 2 скорее будет содержать радикал не на порфирине, а в апопротеине. К слову, именно схематические изображения форм фермента-пероксидазы авторов [230] мы используем в настоящей работе при создании схем для иллюстрирования наших гипотез, выдвинутых по итогам экспериментов. В литературе в подавляющем большинстве случаев воздействие перекиси водорода на ЦитС оценивается по разрушению гемовой группировки [40, 291, 419], которое явно наблюдается при совместной инкубации ЦитС и  $H_2O_2$ .

В настоящей диссертационной работе мы изучили разрушение железопорфирина в составе ЦитС в процессе катализа им пероксидазной реакции, определив константы скорости этого разрушения. Разрушение ЦитС, в целом, и гемовой группировки в его составе мы отождествляем потому, что именно она обуславливает проявление этим белком пероксидазной активности, являясь активным центром пероксидазы. Также нами была выдвинута гипотеза относительно механизма катализа квазилипоксигеназной реакции.

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

Перекись водорода оказывает деструктивное действие на белковые молекулы. Так,  $H_2O_2$  ингибирует внеклеточную супероксиддисмутазу [240] и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу [145]. Что же касается непосредственно гемовых белков, то в литературе отмечается их особая чувствительность к воздействию перекисью водорода [251, 291, 336, 376, 398]. Если говорить о ЦитС в этом аспекте, то все эксперименты по действию на него перекиси водорода можно разделить на две группы: те, в которых действию  $H_2O_2$  подвергался свободный ЦитС, не обладающий пероксидазной активностью, и те, в которых ЦитС проявлял свойства фермента-пероксидазы посредством как его связывания с кардиолипином, так и посредством использования мутантных вариантов ЦитС, которые в свободном виде также обладают пероксидазной активностью. Естественно, адекватным будет лишь такой эксперимент, в котором в одинаковых условиях оценивается действие перекиси водорода и на свободный нативный ЦитС, и на ЦитС, проявляющий ферментативные пероксидазные свойства.

Разрушение ЦитС при катализе пероксидазной реакции внимательным образом исследовалось авторами [40], однако в том исследовании соотношение ЦитС:кардиолипин при максимальном количестве кардиолипина составило 1:10, в то время как, согласно данным [36], для проявления пероксидазной активности ЦитС в полной мере, необходимо, чтобы на одну его молекулу приходилось более 20 молекул кардиолипина. В одном из экспериментов, результаты которого представлены авторами [40], количество молекул фосфолипидов на одну молекулу ЦитС всё-таки было равно 20, однако половина из них – это молекулы 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина, которые, по данным самих авторов [40], сами по себе даже в соотношении 20 на 1 молекулу ЦитС, не вызывали увеличения скорости окисления белка в сравнении с пробой, содержащей только ЦитС и  $H_2O_2$ . А это в свете данных касательно факультативных пероксидаз, представленных в обзоре [423], означает, что в том случае активации пероксидазных свойств ЦитС не происходило вовсе.

Авторы [291] методом регистрации оптической плотности изучали разрушение в присутствии  $\text{H}_2\text{O}_2$  мутантной формы ЦитС Y67H (замена тирозина в положении 67 на гистидин), обладающей пероксидазной активностью, предположив, что разрушение гемовой группировки ЦитС происходит главным образом при взаимодействии формы компаунда 1 с перекисью водорода. Однако отметим, что концентрация  $\text{H}_2\text{O}_2$  в указанном эксперименте составляла 1 мМ, что превосходит значения, возможные в живой митохондрии. Наряду с этим в описываемой работе показано разрушение дикой формы ЦитС под воздействием  $\text{H}_2\text{O}_2$ , однако в том эксперименте концентрация перекиси составила 10 мМ. Следовательно, ввиду того, что дикий и мутантный вариант ЦитС, проявляющий пероксидазные свойства, авторами [291] подвергались действию перекиси водорода в концентрациях, отличающихся на порядок, оценивать различия в кинетике разрушения ЦитС в процессе появления им пероксидазной активности и при простой деструкции под действием перекиси водорода затруднительно.

В настоящей работе мы провели это сравнение при использовании  $\text{H}_2\text{O}_2$  с начальной концентрацией в системе, равной 215 мкМ. Во всех измерениях применялся дикий нативный вариант ЦитС, пероксидазная активность которого запускалась путём образования им комплекса с кардиолипином, подобно тому, как это происходит в митохондриях живых клеток. В опытных пробах ЦитС находился с указанным фосфолипидом в соотношениях, равных 1:60 и 1:30, в некоторые пробы с последним соотношением в качестве дополнительного липидного субстрата была внесена фосфатидная кислота (ФК), её начальная концентрация в системе равнялась 600 мкМ.

Используя данные об уменьшении концентраций железопорфирина в составе молекулы ЦитС (рис. 28) мы определили константы скорости реакции первого порядка для его разрушения. Рассматривать это разрушение в качестве реакции первого порядка в данном случае уместно, так как концентрация ЦитС более, чем на порядок меньше концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Разрушение цитохрома *c* в системе, где к нему добавлена только перекись водорода (Рис. 26–28А) является результатом просто действия  $\text{H}_2\text{O}_2$  на белок, вернее – на содержащуюся в нём порфириновую

группировку гема. Разрушение же ЦитС в других рассматриваемых случаях – следствие проявления им пероксидазной активности. Мы предполагаем, что быстрое разрушение цитохрома *c* в этом случае, в сравнении с классическими пероксидазами [423], – это механизм защиты клеток от запуска программы апоптоза.

Однако перед вычислением констант скорости разрушения железопорфирина ЦитС, находящегося в составе комплекса с ТОКЛ, мы определили её для разрушения в свободном ЦитС под действием  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Эту реакцию мы рассмотрели двумя способами: 1) как реакцию первого порядка; 2) как реакцию нулевого порядка – в пользу этого свидетельствует визуальная близость функции уменьшения концентрации (Рис. 28А) к линейной, а также результат применения дифференциального метода Вант-Гоффа: результат округления до единиц углового коэффициента прямой, построенной в координатной плоскости зависимости натурального логарифма скорости реакции от натурального логарифма концентрации ЦитС для соответствующих моментов времени, равен нулю. Таким образом, мы получили значение константы скорости реакции первого порядка для разрушения железопорфирина в свободном ЦитС при действии 215 мкМ  $\text{H}_2\text{O}_2$ , равное  $(0,000057 \pm 0,000001) \text{ с}^{-1}$ , и значение константы скорости реакции нулевого порядка, которое является применительно к данной реакции наиболее верным, равное  $(52,3 \pm 0,4) \cdot 10^{-11} \text{ моль/л}\cdot\text{с}$ . Относительная ошибка аппроксимации функции уменьшения концентрации ЦитС в ходе реакции, определённой как реакция нулевого порядка, составляет всего 0,3%.

Далее мы определили константы скорости разрушения железопорфирина в составе ЦитС, находящегося в составе комплекса с ТОКЛ. Константы скорости реакции разрушения железопорфирина в составе ЦитС, определённые нами для первых минут реакции, составляют: для системы ЦитС-ТОКЛ при соотношении белок:липид 1:30 при внесении 215 мкМ  $\text{H}_2\text{O}_2$   $(0,00159 \pm 0,00007) \text{ с}^{-1}$  при  $t \in (0; 285]$  с и  $(0,00101 \pm 0,00022) \text{ с}^{-1}$  при  $t \in (285; 615]$  с; при соотношении 1:60 –  $(0,00139 \pm 0,00007) \text{ с}^{-1}$  при  $t \in (0; 285]$  с и  $(0,00091 \pm 0,00018) \text{ с}^{-1}$  при  $t \in (285; 665]$  с; для системы ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС:ТОКЛ 1:30 при внесении 600 мкМ

легкоокисляемой ФК и 215 мкМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  константа скорости реакции первого порядка для разрушения железопорфирина в составе ЦитС составляет  $(0,00262 \pm 0,00162) \text{ c}^{-1}$  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  $t \in (500; 710] \text{ c}$ .

То, что значения констант скорости первого порядка для разрушения железопорфирина в составе ЦитС при соотношениях ЦитС:ТОКЛ 1:30 и 1:60 схожи, позволяет сделать вывод, что, достигнув оптимальных значений для активации пероксидазных свойств у ЦитС, соотношение ЦитС:кардиолипиды внутри этих значений не особо влияет на скорость катализируемой ЦитС пероксидазной реакции, о чём можно судить по скорости разрушения самого ЦитС в ходе неё для первых двух систем. Отметим, что в случае, когда в систему не добавлена ФК, по нашему мнению, скорее всего, пероксидазный цикл протекает через реакции 3b, 11, 10, 4b с рисунка 6, а не через 3a и 4a, так как остатки олеиновой кислоты, имеющее место в ТОКЛ, должны давать липидные радикалы с большим трудом. Значение же константы скорости первого реакции разрушения железопорфирина в составе ЦитС, находящегося в комплексе с ТОКЛ в присутствии ФК выше. В данном случае как раз происходит липопероксидазная реакция, имеющая место в живых митохондриях.

Читатель может обратить внимание на то, что разрушение ЦитС может привести к появлению в модельной системе свободного железа, катализирующего реакцию Фентона, запускающую в итоге неферментативное ПОЛ, которое будет добавлять интенсивность ХЛ в дополнение к той, которую обеспечивает липопероксидазная активность комплекса ЦитС с кардиолипином. На это ответим, что, во-первых, непосредственной количественной оценки, ХЛ, сопровождающей липопероксидазную реакцию, катализируемую комплексом цитохрома c с кардиолипином, длящейся более минуты в настоящей работе не проводилось, поэтому указанное возможное искажение ХЛ ни коем образом не влияет ни на один из наших выводов. А во-вторых, реакцию Фентона катализирует  $\text{Fe}^{2+}$  [58, 130], а при разрушении ЦитС в обсуждаемом случае в систему может выйти лишь  $\text{Fe}^{3+}$

#### 4.6.2 Предполагаемый механизм катализа квазилипоксигеназной реакции

Квазилипоксигеназная реакция – это реакция разложения липидной гидроперекиси. Данную реакцию может катализировать фермент-пероксидаза. Липоксигеназной реакцией же называют реакцию окисления жирной кислоты или её ацила по двойной связи до липидной гидроперекиси [178], то есть, по сути, реакцию образования потенциального субстрата квазилипоксигеназной реакции. Общие сведения на эту тему приведены в параграфе «1.3.3.2 Пероксидазная функция комплекса ЦитС с кардиолипином».

Как уже указывалось в упомянутом параграфе, ранее были предложены два варианта механизма прохождения каталитического цикла при квазилипоксигеназной реакции [25]. Во-первых, посредством двухэлектронного окисления ферриформы пероксидазы с последующим её восстановлением посредством. Во-вторых, посредством одноэлектронного окисления ферриформы пероксидазы с последующим её восстановлением. Однако доказательств в пользу какого-нибудь определённого механизма в литературе не приводилось до настоящей работы. Описанные варианты квазилипоксигеназного каталитического цикла проиллюстрированы рисунком 37.

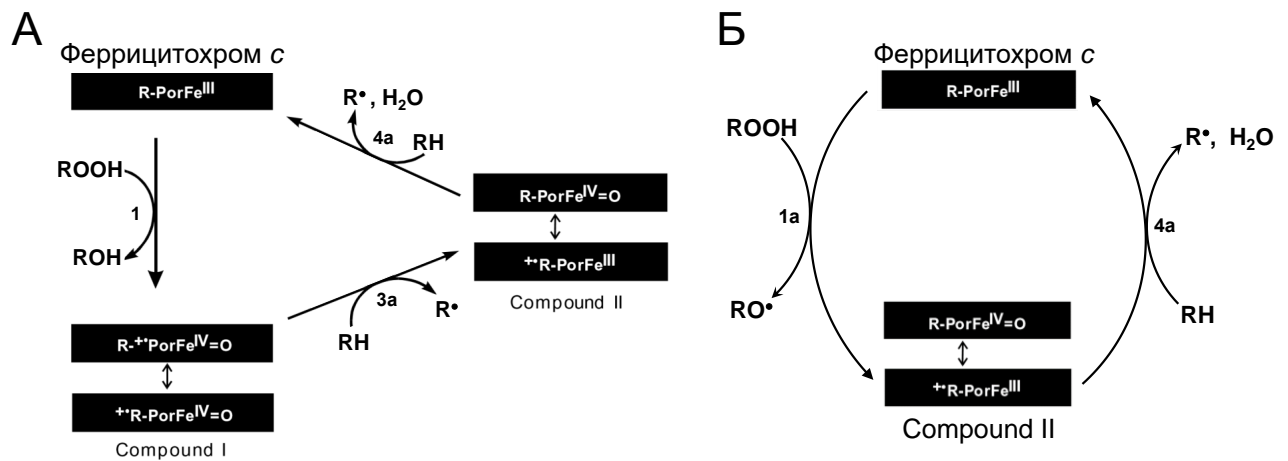


Рисунок 37. Возможные механизмы квазилипоксигеназной реакции, катализируемой ЦитС.

Номера реакций соответствуют таковым на рисунке 6.

- А. Механизм через двухэлектронное окисление пероксидазы с последующим восстановлением.  
 Б. Механизм через одноэлектронное окисление пероксидазы с последующим восстановлением; мы считаем, что реакция протекает по данному механизму.

Согласно нашим выводам, сделанным на основании данных о расходовании хинолизиновых производных в ходе катализируемых комплексом ЦитС-ТОКЛ

квасилипоксигеназной и липопероксидазной реакций, представленных на рисунках 19–21, квасилипоксигеназная реакция протекает преимущественно по второму механизму (Рис. 37Б). Данный вывод сделан на основании того, что хинолизидиновые производные кумарина расходовались только в ходе липопероксидазной реакции и почти не расходовались в процессе квасилипоксигеназной реакции. Имея описанные выше две гипотезы относительно механизма катализа квасилипоксигеназной реакции, мы выдвинули предположение, изложенное в параграфе «4.4 Предполагаемый механизм участия хинолизидиновых производных кумарина в катализируемой комплексом цитохрома *c* с кардиолипином липопероксидазной реакции», о том, что кумариновые производные взаимодействуют только с компаундом 1, не реагируя с компаундом 2 (схема представлена на рис. 36). Ввиду этого отсутствие уменьшения концентраций С-314, С-334 и С-525 во время квасилипоксигеназной реакции означает, что во время её каталитического цикла стадия компаунда 1 отсутствует, из чего следует, что квасилипоксигеназная реакция катализируется ферментом-пероксидазой посредством не двуэлектронного, а одноэлектронного окисления ферриформы с последующим восстановлением путём радикального окисления липидной молекулы.

Образовавшиеся в ходе указанной реакции липидный и липоксильный радикалы способны запустить каскад реакций ПОЛ, в результате которого в случае недостаточной работы антиоксидантных систем происходит разрушение митохондриальных мембран. Примечательно, что ЦитС, явно разрушаясь в ходе катализа пероксидазной реакции, практически не разрушается при катализе квасилипоксигеназной реакции (рис. 19–21В). Поэтому, на наш взгляд, вследствие этого процесса (конечно, при наличии достаточного числа липидных гидроперекисей) будет наблюдаться постоянный рост концентрации различных радикалов липидной природы. Причём образующиеся липидные радикалы могут превращаться в новые молекулы липогидропероксидов, которые запустят новое прохождение цитохромом *c* квасилипоксигеназного каталитического цикла,

которое не приведёт к инактивации ферментативных свойств этого белка, которое могло бы иметь место в случае реакции с перекисью водорода.

То есть квазилипоксигеназная активность ЦитС может эффективно реализовать задачу разрыва митохондриальных мембран для последующего запуска апоптоза при условии, если митохондриальные фосфолипиды уже частично окислены до гидроперекисей. Таким образом, фразу, высказываемую многими авторами [57, 58, 82], что «апоптоз по митохондриальному пути запускается в результате нарушений в митохондриях, связанных с происходящими в них процессами окислительного стресса», можно пояснить следующим образом. В результате, к примеру, ошибок в работе III комплекса митохондриальной дыхательной цепи образуется супероксидный анионный радикал, дающий перекись водорода [58], которая может быть субстратом комплекса ЦитС с кардиолипином. В результате образуются липидные радикалы, окисляющиеся с образованием в том числе и липогидроперексидов, которые могут выступать в роли субстрата квазилипоксигеназной реакции. Причём липидные гидроперекиси не вызывают разрушения ЦитС, но обеспечивают образование под его действием новых липидных радикалов, которые также могут образовываться и при восстановлении ЦитС  $H_2O_2$ , которая, правда, способствует постепенной инактивации ферментативных свойств комплекса ЦитС с кардиолипином. То есть количественное содержание липидных гидроперексидов в составе мембран в данном случае мы можем считать основополагающим фактором, ответственным за развитие процесса деструкции митохондриальных мембран. Последние «работают», образно говоря, параллельно с ЦитС и запущенным им каскадом реакций ПОЛ, который постоянно обеспечивает его субстратом для квазилипоксигеназной реакции.

Естественно, конечный суммарный исход этого процесса деградации мембран митохондрий зависит от того, успеют ли системы антиоксидантной защиты остановить его раньше, чем он примет необратимый характер, и сумеют ли в дальнейшем антиоксиданты обеспечить целостное состояние мембран. В связи с этим изучение действия антиоксидантов на запущенное комплексом ЦитС с



кардиолипином окисление липидов является перспективным направлением в разработке методов борьбы с патологическим апоптозом. Анализ данных наших экспериментов с антиоксидантами приведён в следующих параграфах. А изыскание способов ускорения упомянутых выше процессов деградации мембран с сравнением с работой антиоксидантных систем позволит разработать способ уничтожения опасных для организма клеток, что крайне необходимо при терапии онкологических заболеваний.

#### **4.7 Дигидрокверцетин и тролокс как ингибиторы катализируемой комплексом цитохрома *c* с к кардиолипином липопероксидазной реакции**

Исследования по воздействию антиоксидантами на липидную пероксидацию, запускаемую комплексом ЦитС с кардиолипином, уже проводились на базе кафедры Медицинской биофизики факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, причём исследовались в том числе и выбранные нами тролокс и дигидрокверцетин (ДГК) [25, 37, 52-54, 104, 111, 112]. Однако используемая в указанных работах модельная экспериментальная система, или способы обработки данных, или и то, и другое, на наш взгляд, дают не вполне корректные результаты. Поэтому мы провели повторное исследование с указанными антиоксидантами. Если говорить об экспериментальных моделях, то увеличение квантового выхода ХЛ в указанных выше работах осуществлялась за счёт использования либо люминола [37, 53], вступающего различным образом в непосредственное химическое взаимодействие с компонентами исследуемой системы с высвечиванием фотонов, либо С-525 [53], который, во-первых, может проявлять антиоксидантное действие [264] за счёт наличия в своей структуре (рис. 9) бензимидазольной группировки, и это могло исказить результаты. А, во-вторых, С-525 был использован авторами [53] в концентрации, равной 120 мкМ, в то время как в используемой в указанной работе среде фосфатного буфера данное вещество не растворяется в концентрациях, превышающих 50 мкМ (среди трёх изучаемых нами кумариновых производных именно С-525 имеет наименьшую растворимость), поэтому адекватность результатов подобных измерений ХЛ при такой большой концентрации С-525 в

системе вызывает большие сомнения. В нашем исследовании в качестве усилителя ХЛ был использован С-334, в своей структуре не содержащий бензимидазольной группы, да и к тому же обладающий наилучшей растворимостью среди кумариновых производных, эксперименты с которыми проводились в ходе выполнения нашей работы, и взятый в концентрации 25 мкМ.

Кроме того, используемая нами молекулярная модель хорошо отражает процессы, имеющие место в митохондриях живых клеток в силу того, что мы использовали природный кардиолипид, выделенный из сердца быка. Соотношение ЦитС:БКЛ в нашей системе составляло 1:60. Это соотношение само по себе входит в диапазон значений, обеспечивающих оптимальное проявление ЦитС свойств фермента-пероксидазы [36]. В нём заложено достаточно кардиолипидина для того, чтобы он и выступал в роли липидного субстрата ЦитС, и при этом оставался в нужном количестве для того, чтобы выступать в роли кофактора, обеспечивающего проявление ЦитС пероксидазных свойств (напомним, что окисленный кардиолипид теряет сродство к ЦитС [256]): кардиолипид может долгое время расходоваться без риска ослабления пероксидазных свойств ЦитС, ведь даже при соотношении ЦитС:БКЛ, равном 1:30, указанный белок в полной мере сохраняет свойства фермента-пероксидазы [36]. К слову, в опытах с ТОКЛ, описанных выше, соотношение ЦитС:ТОКЛ было равно 1:30. Кроме того, соотношение ЦитС:БКЛ уменьшается медленнее, чем падает концентрация неокисленного БКЛ, так как ЦитС во время проявления пероксидазной активности может с достаточной долей вероятности разрушиться, потеряв, естественно, и пероксидазные свойства, о чём мы писали в предыдущих параграфах. При этом в качестве среды в нашем исследовании выступает фосфатный буфер, гораздо более валидный внутриклеточной среде, чем, скажем, гидрофобный растворитель, используемый в относительно похожем эксперименте Г.К. Владимировым [25].

Учитывая вышеизложенное, систему, в которой присутствуют ЦитС и легкоокисляемый кардиолипид (сердечный кардиолипид содержит ацилы, легко подвергаемые окислению [369]) в соотношении 1:60, можно оценивать как хорошо отражающую живые митохондрии млекопитающих, так и аналогичную той, на

которой изучались механизмы участия хинолизидиновых производных кумарина в катализируемой комплексом ЦитС с кардиолипином липопероксидазной реакции: комплекс ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС:ТОКЛ 1:30 в присутствии ФК как легкоокисляемого субстрата. Поэтому хемиллюминограммы, полученные на такой системе, при определённой кинетике развития ХЛ-вспышек теоретически можно подвергать коррекции с помощью поправочной функции на расход С-334. Под «определённой кинетикой» подразумевается отсутствие латентного периода (полного подавления ХЛ) в развитии ХЛ-вспышек при действии антиоксиданта.

Как уже указывалось выше, для изучения влияния на липидную пероксидацию, вызванную активностью комплекса ЦитС с кардиолипином, мы использовали природный растительный антиоксидант дигидрокверцетин (ДГК) и синтетический тролокс. Их структурные формулы представлены на рисунке 38.

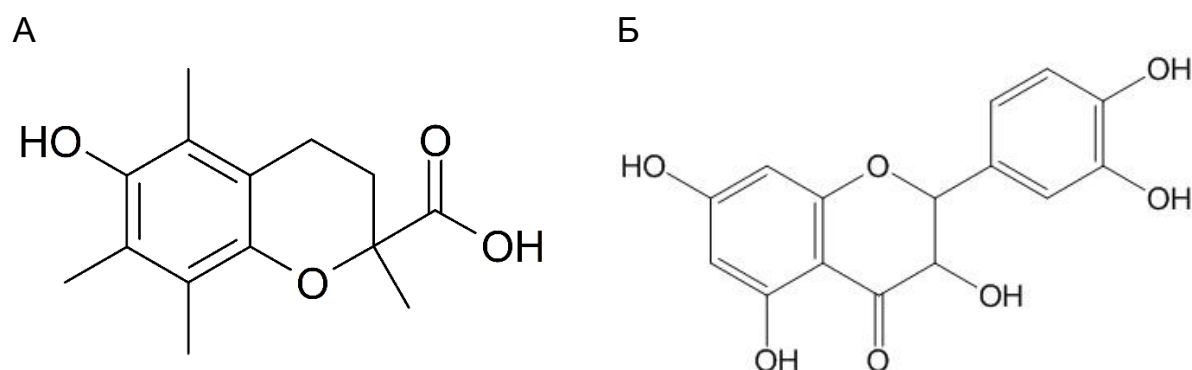


Рисунок 38. Структурные формулы тролокса (А) и ДГК (Б).

В монографии [63] указывается, что антиоксидантные свойства могут быть обусловлены в том числе и наличием в молекуле гидроксильных групп, являющихся донорами атомов водорода во время реакции антиоксиданта со свободным радикалом. ДГК и тролокс относятся именно к антиоксидантам с таким механизмом действия.

ДГК содержит пять фенольных гидроксильных групп, проявляющих антиоксидантное действие. Однако чётко описать на субмолекулярном уровне происходящие в системе процессы с участием ДГК не представляется возможным, – вероятно, из-за одновременного действия этих гидроксильных групп. Полученные ХЛ-кривые (рис. 29) без латентного периода в развитии ХЛ-вспышек позволили нам применить по отношению к ним поправочную на расходование в

процессе ферментативной липопероксидазной реакции С-334, выступающего в роли активатора хемилюминесценции, функцию, представленную в параграфе «4.5 Поправочные функции, учитывающие разрушение кумариновых активаторов в ходе ферментативной липидной пероксидации». Рисунки 29 и 30 содержат графики как без обработки этой функцией, так и обработанные с её помощью.

Наши данные о дозозависимом подавлении ДГК ХЛ, а значит – и свободнорадикального процесса липидной пероксидации, запущенной комплексом ЦитС с кардиолипином, в целом, согласуются с литературными данными. Так, подавление в похожей системе описано в работах Е.М. Дёмина, выполненных под руководством Ю.А. Владимирова: в исследовании [53] – ещё в 2008 году; зависимость подавления ХЛ от концентрации ДГК описано в [37, 52]. Однако необходимо проанализировать отличия наших данных от данных, представленных в указанных работах и разобраться, во-первых, в причинах этих различий, а во-вторых, сравнить между собой наши данные, полученные с применением поправочной на расходование С-334 функции, и без него.

Из графика на рисунке 30 чётко видно дозозависимое подавление ДГК ХЛ, сопровождающей катализируемую комплексом ЦитС с кардиолипином липопероксидазную реакцию. Нами была определена концентрация ДГК, вызывающая половинное тушение ХЛ. Данный параметр является основополагающим при сравнении силы действия антиоксидантов между собой, и на его основе рассчитываются профилактические и терапевтические дозы антиоксидантов в медицинской и ветеринарной практике. Если руководствоваться данными, полученными без использования корректирующих снижение концентрации усилителя ХЛ функций (рис. 30А), как это делали авторы [37, 52, 53], то для ДГК значение этой концентрации равно  $\approx 0,84$  мкМ; если же воспользоваться поправочной на расходование С-334 функцией (рис. 30Б), то –  $\approx 1,26$  мкМ. Последнее значение, на наш взгляд, характеризует реальную концентрацию ДГК, наполовину угнетающую вызванный липопероксидазной активностью комплекса ЦитС процесс ПОЛ. Однако для сравнения с результатами работ Е.М. Дёмина, не использовавшего этой функции, пригодится и первое значение. Напомним, что в

нашей системе начальное соотношение ЦитС:БКЛ составляло 1:60. Авторы [53] в аналогичном нашему опыте при соотношении ЦитС:БКЛ, равном 1:32, получили концентрацию половинного ослабления для ДГК, равную 10 мкМ. Однако в той работе заявленная для экспериментальной модели концентрация используемого в качестве усилителя ХЛ С-525 составляла 120 мкМ, при том, что, как показали наши предварительные эксперименты, в концентрациях, превышающих 50 мкМ, он в среде фосфатного буфера не растворяется вовсе. Поэтому уже на основании этого показанное в [53] значение концентрации половинного угнетения для ДГК липидной пероксидации, катализируемой комплексом ЦитС с кардиолипином, считать адекватным нельзя. Кроме того, соотношение ЦитС:БКЛ, используемое в [53] и равное 1:32, лишь относительно ненамного превышает 1:20, являющееся нижней границей предела, в котором ЦитС оптимальным образом проявляет активность фермента-пероксидазы [36]. Это необходимо учитывать в силу того, что в применяемой авторами [36] экспериментальной модели из липидов в системе присутствовал лишь БКЛ, при этом являясь также субстратом для липопероксидазной реакции, катализируемой ЦитС. Поэтому можно предполагать вероятность того, что на определённом этапе эксперимента БКЛ в системе стало недостаточно для полноценного обеспечения пероксидазных свойств ЦитС. Однако второе замечание несущественно, и если бы оно было единственным, а концентрация активатора ХЛ в эксперименте авторов [53] была адекватной его растворимости, то к их методологии не было бы особых претензий. Заканчивая анализ статьи [53], скажем, что ошибочное значение концентрации половинного тушения для ДГК, показанное в ней, обусловлено именно ошибочным количеством С-525 в экспериментальной системе.

В статье [37] приводятся результаты исследования влияния антиоксидантов на пероксидазную активность комплекса цитохрома с с 1,1',2,2'-тетраолеилкардиолипином (ТОКЛ); для ДГК и тролокса были установлены концентрации половинного тушения ХЛ, равные 0,7 и 3,7 мкМ соответственно. Заметим, что значение для ДГК в упомянутой работе близко к нашему, полученному без использования поправочной на расходование активатора

ХЛ функции и равному 0,84 мкМ, в то время как это значение отлично от полученного при использовании корректирующей функции и равного 1,26 мкМ.

То есть при игнорировании факта снижения концентрации активатора ХЛ в процессе реакции данные об антиокислительных свойствах антиоксидантов оказываются завышенными. То есть ложными. А это может привести к серьёзным ошибкам при разработке конкретных способов их клинического применения.

Также обратим внимание читателя на то, что авторы [37] использовали для усиления ХЛ люминол, являющийся химическим усилителем ХЛ, реагирующим с различными компонентами системы по-разному и во всех этих случаях испускающим фотоны [35], что затрудняет детальную интерпретацию данных, полученных методом регистрации усиленной им ХЛ.

Помимо ДГК, мы также провели аналогичный эксперимент с тролоксом – достаточно распространённым синтетическим антиоксидантом (формула – на рис. 38А). К слову, растворы тролокса различных концентраций используются в качестве эталонов антиоксидантной активности при исследовании таковой, – к примеру, для различных биологических жидкостей [64].

Наблюдаемое влияние тролокса на кинетику образования свободных радикалов в результате липопероксидазной активности комплекса ЦитС с кардиолипином (рис. 31), определённое методом регистрации усиленной С-334 ХЛ, разительным образом отличается от такового для ДГК (рис. 29): вместо дозозависимого снижения интенсивности ХЛ, наблюдается полное её угнетение в течение определённого времени (латентный период), после чего происходит ХЛ, почти идентичная и по амплитуде, и по форме, и по продолжительности той, что наблюдалась в пробе, не содержащей антиоксидант, сразу при внесении в систему перекиси водорода.

Тролокс в концентрациях от 2,12 мкМ до 3,53 мкМ отодвигает во времени развитие ХЛ-вспышки, причём зависимость времени этой задержки от концентрации тролокса укладывается в линейную (рис. 32).

На основании этих данных можно сделать вывод, что тролокс полностью препятствует всякому образованию свободных радикалов непосредственно сразу

после добавления  $\text{H}_2\text{O}_2$  в систему. В первые несколько десятков секунд он расходуется целиком или почти целиком, после чего кинетика образования свободных радикалов происходит так же, как она бы происходила без тролокса с самого момента добавления в систему перекиси водорода. Если говорить о феномене появления предварительной ХЛ-вспышки низкой интенсивности, то можно предположить, что подобная многостадийность в кинетике ХЛ в присутствии тролокса может быть следствием наличия у него двух гидроксильных групп, которые могут играть роль различных антиоксидантов: на первой стадии реакции работает один гидроксил, а впоследствии, возможно, – другой.

В силу того что мы не можем назвать точные причины упомянутого латентного периода в развитии ХЛ-вспышки в присутствии тролокса, применение корректирующей функции на уменьшение концентрации С-334, вычисленной для системы, в которой с самого начала реакции происходит взаимодействие пероксидазы с С-334 и липидами, как это было в случае с ДГК, не является адекватным для наших экспериментов с тролоксом. Подобный тезис обусловлен подозрением на то, что, когда в системе присутствует тролокс, динамика уменьшения концентрации С-334 отличается от той, что наблюдается в системах без антиоксиданта и в присутствии ДГК – в начале реакции может не происходить интенсивного снижения концентрации С-334. Это предположение основано на ХЛ-кривых с рисунка 31. В присутствии различных концентраций тролокса происходит задержка в развитии ХЛ-вспышки, прямо пропорциональная этой концентрации, но при этом амплитуда этих вспышек примерно одинакова. В то же время, если бы уменьшение концентрации С-334 происходило так, как заложено в поправочной функции (эта функция для С-334 выведена на основании данных, проиллюстрированных рисунком 20Г), то интенсивность ХЛ для вспышек, наступающих позднее, ожидалась ниже, чем у тех, которые наступали раньше, так как в системе было бы меньше С-334, и вследствие этого ХЛ усиливалась бы в меньшей степени. Уменьшение же концентрации С-334 в эксперименте с ДГК соответствует таковому для системы без антиоксиданта, и, следовательно, в этом случае стало возможным применение корректирующей функции. А для

исследования антиоксидантов, имеющих действие, подобное действию тролокса, необходимо выводить собственные корректирующие функции или же применять иные способы обработки данных.

К слову, антиоксидант с механизмом действия, аналогичным тролоксу, вызывает сомнения в плане его клинического применения: несмотря на первоначальное полное подавление свободнорадикального процесса, в скором времени он развивается так же, как и в случае, когда антиоксиданта в систему не вносили. В то время как при изучении действия ДГК на протяжении всего эксперимента мы наблюдаем угнетение ПОЛ по сравнению с контрольной пробой. Это позволяет сделать вывод, что ДГК и в организме будет проявлять подобные свойства – явно снижать интенсивность процессов окислительного стресса, что в итоге может привести к сохранению клеток, которые в противном случае могли бы погибнуть. А это в свою очередь может лечь в основу профилактики и терапии заболеваний, вызванных патологическим апоптозом и ферроптозом (антиоксидант сможет инактивировать липидные радикалы, появляющиеся и по отличиям от активности комплекса ЦитС с кардиолипином причинам) – различных нейродегенеративных и кардиодегенеративных состояний, последствий эмоционального стресса, а также поражений организма, вызванных действием ионизирующего и неионизирующего излучения.

#### **4.8 Хлорофиллин как ингибитор процессов липидной пероксидации**

Перед обсуждением результатов эксперимента по подавлению липидной пероксидации хлорофиллином необходимо сказать несколько слов об используемой экспериментальной модельной системе, состоящей из комплекса ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС:ТОКЛ, равном 1:30, липопероксидов, полученным путём медленного окисления БКЛ, концентрацией в расчёте на него, равной 150 мкМ, 25 мкМ С-334, растворённых в среде 20 мМ фосфатного буфера в присутствии хлорофиллина различных концентраций. В данной системе ферментативная наработка липидных радикалов, впоследствии вступающих в каскад реакций ПОЛ, осуществляется путём квазилипоксигеназной реакции.



Усиление ХЛ осуществлялось за счёт наличия в системе С-334. В экспериментах с хлорофиллином поправочная на его расход функция не применялась. Это связано с небольшим расходом хинолизидиновых производных кумарина в процессе квазилипосигенной реакции.

В качестве главного критерия оценки действия хлорофиллина мы использовали значения светосуммы  $S$  за первые 5 минут реакции – площади криволинейной трапеции на графике интенсивности ХЛ, ограниченной осью ординат, параллельной ей линией, пересекающей ось абсцисс в значении «300 секунд», осью абсцисс и ХЛ-кривой, вычисляемой по формуле:

$$S = d \cdot \sum J_i \quad (42)$$

, где  $J_i$  – значения интенсивности ХЛ, полученные в течение временного диапазона, для которого вычисляется светосумма (в нашем опыте – в течение первых 300 секунд реакции),  $d$  – время, проходящее между моментами регистрации мгновенных значений интенсивности ХЛ (временная дискрета), с. Так как интенсивность ХЛ-сигнала в данных опытах измерялась в вольтах, то и полученные значения светосуммы также измеряются в вольтах.

Генерация липидных радикалов посредством квазилипосигенной реакции, в сравнении с липопероксидазной, обеспечивает более устойчивую интенсивность их образования в системе, так как ЦитС не разрушается при её катализе, что было показано в предыдущих разделах настоящей работы. Постоянность темпов образования липидных радикалов позволяет получить модель, лучше отражающую постоянное образование липидных радиотоксинов, которое имеет место при облучении организма ионизирующим излучением [72, 127], вызывающим гибель клеток. В описываемом случае её широко представленным механизмом является ферроптоз [296, 452]. А так как данный эксперимент проводится в дополнение к исследованию радиопротекторных свойств хлорофилла, выполненному А.В. Поздеевым под руководством Н.П. Лысенко [96, 98-100], то в нашем исследовании мы использовали именно эту модель, а не модель липопероксидазной реакции, которая была применена в экспериментах с ДГК и тролоксом, которая в большей степени отражает ранние

этапы запуска апоптоза по митохондриальному пути. Подытоживая вышеизложенное, мы можем сказать, что указанная экспериментальная модельная система, применённая нами при изучении хлорофиллина вполне подходит для исследования ингибирования радикальных реакций с участием липидов.

Что же касается результатов, изложенных в работах [96, 98-100], то тезис о радиопротекторном действии препаратов на основе хлорофилла в них основан на резком увеличении выживаемости облучённых лабораторных животных, которым данные препараты вводились [96, 99, 100]. И, хотя в [96, 98] приведены данные о снижении содержания МДА в тканях животных, принимавших препарат хлорофилла, ясного вывода о молекулярном механизме радиопротекторного действия исследуемых препаратов не приводится ввиду того, что в описываемых исследованиях целенаправленно подавление ПОЛ не изучалось. И формально можно было предположить, что механизм действия препаратов хлорофилла может быть иным. Допустим, если они каким-то другим образом (например, перехватыванием не липидных радикалов, а продуктов радиолиза воды, что тоже может иметь место в дополнение к реакциям с липидными радикалами) предотвращают развитие лучевого поражения, то у подвергнутых воздействию ими облучённых животных каскад реакций ПОЛ также не запускается по причине отсутствия продуктов радиолиза воды, способных выступить его индуктором [72].

Теперь проанализируем, собственно, результаты наших экспериментов. На основании представленных на рисунке 34 данных можно сделать вывод, что хлорофиллин в концентрации 200 мкМ полностью подавляет липидную пероксидацию. Явное ингибирование этого процесса наблюдается в концентрациях, превышающих 12 мкМ. Достоверное ингибирование ПОЛ наблюдается при концентрациях хлорофиллина от 1,56 мкМ. Если говорить о значении концентрации хлорофиллина, вызывающей половинное тушение ХЛ, то, согласно графику зависимости светосуммы от концентрации хлорофиллина, представленному на рисунке 35, она равна 3,7 мкМ. Такая концентрация соответствует примерно 1172-кратному разбавлению используемой в нашем

исследовании пищевой добавки. Таким образом, можно говорить о подавлении хлорофиллом и его производными процесса ПОЛ.

#### **4.9 Перспективы использования и возможные механизмы радиопротекторного действия хлорофилла и его производных**

Обсуждённое в предыдущем параграфе ингибирующее действие хлорофиллина на процесс ПОЛ, несомненно, является если не единственным, то по крайней мере одним из (и точно уже доказанным нами) механизмов радиозащитного действия хлорофилла и его производных, эмпирически показанного в работах [96, 98-100, 289]. Однако не стоит забывать о том, что первичное биологическое действие радиации сводится, в основном, к радиолизу воды (хотя имеет место и непосредственный радиолиз биомолекул) с последующей атакой на биологические молекулы его продуктов [72], которые также могут нейтрализоваться препаратом хлорофилла.

Рисунком 39, на котором представлен комплекс возможных механизмов радиопротекторного действия хлорофилла и его производных, мы проиллюстрировали тот факт, что показанная нами нейтрализация липидных радикалов хлорофиллином не отменяет возможную способность этих препаратов также нейтрализовать и гидроксильные, и пероксильные радикалы, а также радикальные продукты радиолиза белков и нуклеиновых кислот.

Данный аспект их действия необходимо проверить в будущих исследованиях. Блокировка вызванного действием радиации ПОЛ путём как нейтрализации запускающих его продуктов радиолиза воды, так и непосредственно через нейтрализацию липидных радикалов позволит предотвратить гибель клеток по механизму апоптоза [15], некротическую гибель по механизму ферроптоза [452] и запускаемый ею некроптоз соседних клеток [197]. Это должно значительно облегчить течение лучевой болезни.

В пользу актуальности применения хлорофилла и его производных в качестве противолучевого средства считаем нужным отметить ещё и показанное авторами [99] очень высокое значение фактора изменения дозы (отношения дозы излучения, вызывающей гибель половины получивших препарат особей, к дозе,

смертельной для половины особей, не получивших его)  $\gamma$ -излучения, находящееся в диапазоне от 2 до 4 для различных доз излучения. Для сравнения – авторы [50], изучавшие другие радиозащитные препараты, назвали высокими значения фактора изменения дозы в диапазоне 1,4–1,7.

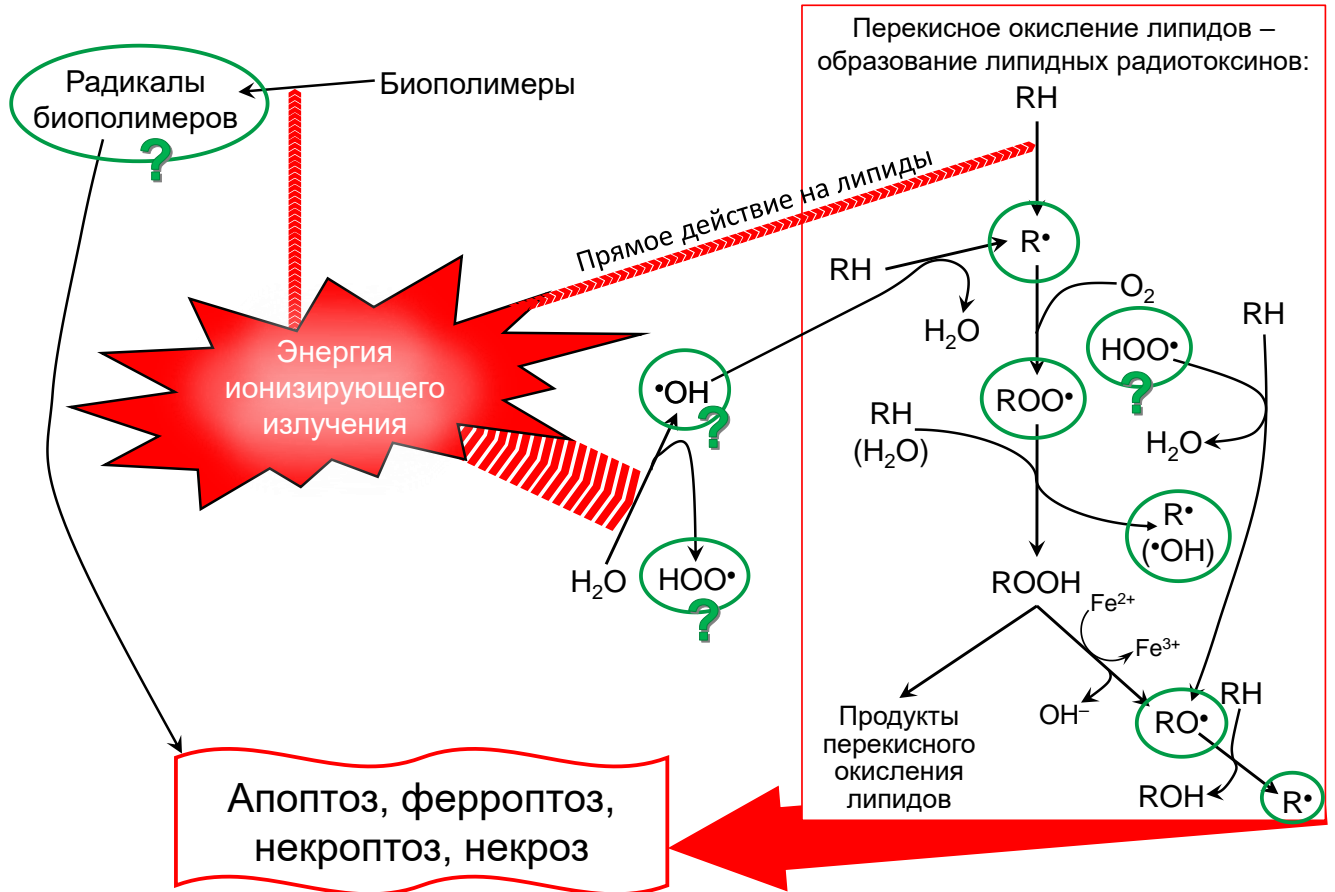


Рисунок 39. Предполагаемый механизм радиопротекторного действия препаратов на основе хлорофилла. Зелёным овалом отмечены радикалы, нейтрализуемые производными хлорофилла. Нейтрализация радикала приводит к блокировке каскада реакций на соответствующей стадии.

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

Представленный на рисунке 39 механизм радиозащитного действия хлорофилла, согласно классификации, предложенной М.В. Васиным в обзоре [22], можно назвать собственно радиопротекторным, т.е. заключающимся в нейтрализации радиометаболитов при непосредственном действии ионизирующего излучения; однако не исключено и проявление этими веществами свойств радиомодуляторов, к которым М.В. Васин относит антиоксиданты, противовоспалительные препараты и т.п. [22].

Для наибольшей эффективности клинического применения препаратов на основе хлорофилла необходимо, во-первых, определиться, что будет использоваться: жирорастворимый хлорофилл или водорастворимый хлорофиллин, и, во-вторых, подобрать оптимальный способ применения препарата в клинической практике. Водорастворимые вещества гораздо проще всасываются в кишечнике и транспортируются кровью, однако при отсутствии специальных переносчиков их прохождение сквозь клеточные мембраны затруднено. При этом в цитоплазме клеток водорастворимые соединения также действуют эффективнее. В работах [96-100] подопытным животным внутримышечно вводился непосредственно хлорофилл. Авторы [289] изучали действие водорастворимого хлорофиллина. Форма применения препарата и способ его введения также чрезвычайно важны. Отметим, что сейчас, наряду с классическими пероральным и внутривенным введением, также разрабатываются и ингаляционные методы доставки радиозащитных препаратов [65].

Для увеличения эффективности перорального применения лекарственных средств ряд исследователей предлагает использовать липосомы с определёнными свойствами [156, 202, 249, 337]. На наш взгляд, следует применять водорастворимый хлорофиллин в составе липосом, которые будут доставлять его в клетки организма и способствовать эффективному проникновению в них. Необходимо в будущем провести многоплановое исследование радиозащитного действия различных клинических форм хлорофилла и хлорофиллина: в виде растворов или суспензий свободных молекул, в составе липосом, способных адресно доставлять агент в клетки-мишени за счёт взаимодействия лиганда на их поверхности со специфическими клеточными рецепторами, а также «больших» липосом, содержащих внутри себя липосомы с хлорофиллином или хлорофиллом.

На роль клеток-мишеней для доставки радиозащитного препарата вполне могут подойти клетки наиболее радиочувствительных тканей. Например, костного мозга, доставка препаратов на основе хлорофилла в которые может помочь в облегчении протекания панцитопенического, геморрагического и иммунобиологического синдромов лучевой болезни. А адресная доставка

радиопротектора в клетки кишечного эпителия, возможно, способствует снижению тяжести желудочно-кишечного синдрома и, в некоторой степени, – иммунобиологического синдрома лучевой болезни.

Однако, по состоянию на 2021 год, подобные исследования с препаратами на основе хлорофилла не проводились. А описанные в предыдущем абзаце эффекты – это умозрительные представления, нуждающиеся в экспериментальной проверке.

В заключение также отметим, что для большей эффективности возможно комбинированное применение препаратов на основе хлорофилла с другими радиопротекторами и радиомодуляторами. Так, в работе [97] исследовалось влияние на содержание кортизола в крови облучённых животных комбинированного средства, в состав которого включены хлорофилл, куркумин и ДНК–препарат из молок рыб. А авторы [94] сообщают о радиозащитном действии мёда в комбинации с препаратом хлорофилла; к слову, о радиомодуляторных свойствах продуктов пчеловодства говорится и в обзоре [22].

## 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в настоящей работе мы показали, что при обработке экспериментальных данных, полученных с использованием хинолизидиновых производных кумарина в качестве активаторов хемиллюминесценции, сопровождающей катализируемую ферментом-пероксидазой липопероксидазную реакцию, обязательно 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 случае, если участие производных кумарина в реакции предполагается непосредственно с начала регистрации люминесценции. При их применении можно будет изучать, к примеру, ингибирование процесса ферментативной липидной пероксидации антиоксидантами, 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 антиоксидантов, вызывающих полную задержку в развитии хемиллюминесценции 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 перекисного окисления липидов 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 антиоксидантов необходимо детально изучить их фармакокинетику, а затем, на

основании концентраций половинного угнетения интенсивности липидной пероксидации и коэффициентов их миграции в ткани-мишени и митохондрии, разработать конкретные алгоритмы их применения.

## 6. 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 хемилуминограмм, полученных с использованием С-314, С-334 и С-525, при изучении липопероксидазной реакции, катализируемой комплексом цитохрома *c* с кардиолипином, на молекулярной модели.

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

4) Действие дигидрокверцетина (таксифолина) и тролокса на процесс липидной пероксидации, запускаемый комплексом цитохрома *c* с кардиолипином, различно. Концентрация дигидрокверцетина, вызывающая половинное угнетение липидной пероксидации, равна  $\approx 1,26$  мкМ.

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



## БЛАГОДАРНОСТИ

Автор настоящего диссертационного исследования выражает благодарность и признательность коллегам, оказавших методологическую помощь в выполнении работы и освещении её результатов в научной печати:

Научному руководителю: Лысенко Николаю Петровичу, профессору кафедры Радиобиологии и вирусологии имени академиков А.Д. Белова и В.Н. Сюрин ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина;

Владимирову Юрию Андреевичу, заведующему кафедрой Медицинской биофизики факультета Фундаментальной медицины ФГБОУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова;

Пашовкину Тимофею Николаевичу, ведущему научному сотруднику Федерального исследовательского центра «Пушинский научный центр биологических исследований Российской Академии наук», профессору кафедры Радиобиологии и вирусологии имени академиков А.Д. Белова и В.Н. Сюрин ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина;

Трифоновой Марии Федотовне, Президенту Международной академии аграрного образования;

Байматову Валерию Нурмухаметовичу, профессору кафедры Общей патологии имени В.М. Коропова ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина;

Бекузаровой Сарре Абрамовне, профессору кафедры Земледелия, растениеводства, селекции и семеноводства ФГБОУ ВО Горского ГАУ.

**СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Азизова О.А., Осипов А.Н., Савов В.М., Яхъяев А.В., Зубарев В.Е., Каган В.Е., Владимиров Ю.А. Инициирование неферментативного перекисного окисления липидов в системе  $Fe^{2+}$ -аскорбат-линоленат // *Биофизика*. – 1985. – 30(1). – С.: 36–39.
2. Акоюн Б.В., Ершов Ю.А. Основы взаимодействия ультразвука с биологическими объектами: ультразвук в медицине, ветеринарии и экспериментальной биологии: Учебное пособие / Под Ред. С.И. Щукина. – М.: Изд-во МГТУ им. Н.Э. Баумана, 2005. – 224 с.
3. Александрюшкина Н.И., Ванюшин Б.Ф. Эндонуклеазы и их участие в апоптозе растений // *Физиология растений*. – 2009. – Т.56, № 3. – С.: 323–339.
4. Александрюшкина Н.И., Коф Э.М., Середина А.В., Борзов А.А., Ванюшин Б.Ф. Связанные со старением деградация ДНК и эндонуклеазная активность в листьях гороха нормального и афильного генотипов // *Физиология растений*. – 2008. – Т. 55, № 1. – С.: 27–36.
5. Александрюшкина Н.И., Середина А.В., Ванюшин Б.Ф. Активность эндонуклеаз в колеоптиле и первом листе развивающихся этиолированных проростков пшеницы // *Физиология растений*. – 2009. – Т.56, № 2. – С. 170.
6. Ашапкин В.В., Кутуева Л.И., Ванюшин Б.Ф. Эпигенетическая изменчивость у растений: наследуемость, адаптивность, эволюционное значение // *Физиология растений*. – 2016. – Т.63, № 2. – С.: 189–190.
7. Байматов В.Н., Багаутдинов А.М., Байматов Н.В. Механизмы коррекции свободнорадикального окисления антиоксидантами / – Уфа: РИЦ БашГАУ, 2008. – 312 с.
8. Байматов В.Н., Фархутдинов Р.Р., Багаутдинов А.М. Хемилюминесцентные методы исследования свободнорадикального окисления в сельском хозяйстве, ветеринарной медицине и животноводстве / – Уфа: Издательство "Здравоохранение Башкортостана", 2009. – 104 с.
9. Басалай О.Н., Михальчук Е.Ч., Зиматкин С.М., Бушма М.И., Борисенок О.А. Нефрозащитное действие комбинации таурина с цинка диаспартатом при гентамициновой нефропатии у крыс // *Токсикологический вестник*. – 2015. – 5 (134). – С.: 21–24.

10. *Белая Н.И., Белый А.В., Шалюто К.П.* Синергическое действие композиций кверцетина с аминокислотами алифатического ряда // *Вестник Тверского государственного университета Серия: Химия.* – 2016. – 4. – С.: 111–120.
11. *Бельская Л.В., Косенок В.К., Массард Ж., Завьялов А.А.* Состояние показателей липопероксидации и эндогенной интоксикации у больных раком лёгкого // *Вестник РАМН.* – 2016. – 71(4). – С.: 313–322.
12. *Болдырев А.А., Ещенко Н.Д., Илюха В.А., Кяйвярайнен Е.И.* Нейрохимия: Учебное пособие для ВУЗов / Научный редактор – Ю.А.Владимиров. – М.: Дрофа, 2010. – С.: 338–351.
13. *Бударков В.А., Зенкин А.С., Боченков В.Ф., др. и.* Радиобиология. Радиационная безопасность сельскохозяйственных животных / Под Ред. В.А. Бударкова, А.С. Зенкина. – М.: КолосС, 2008. – 351с.
14. *Булудова М.В., Полутов В.Э.* Апоптоз: молекулярно-клеточные механизмы развития, значение в обеспечении клеточного гомеостаза // *Бюллетень медицинских Интернет-конференций.* – 2017. – 7, 6. – С.: 1043–1045.
15. *Бурлакова Е.Б., Аткарская М.В., Фаткуллина Л.Д., Андреев С.Г.* Радиационно-индуцированные изменения структурного состояния мембран клеток крови человека // *Радиационная биология Радиоэкология.* – 2014. – 54, 2. – С.: 162–168.
16. *Бурлакова Е.Б., Ерохин В.Н., Мишарина Т.А., Фаткуллина Л.Д., Кременцова А.В., Семенов В.А., Теренина М.Б., Воробьева А.К., Голощанов А.Н.* Влияние летучих антиоксидантов растительного происхождения на развитие спонтанного лейкоза у мышей // *Известия российской академии наук. Серия биологическая.* – 2010. – №6. – С.: 711–718.
17. *Ваваев А.В., Максименко А.В.* Ферментные антиоксиданты на пути к практической медицине // *Кардиологический вестник.* – 2009. – 4, 2(16). – С.: 66–70.
18. *Васильев Р.Ф., Вепринцев Т.Л., Долматова Л.С., Наумов В.В., Трофимов А.В., Цаплев Ю.Б.* Кинетика окси-хемилюминесценции этилбензола в присутствии антиоксидантов из тканей морского беспозвоночного *Eupentacta fraudatrix*. Оценка содержания и реакционной способности природных антиоксидантов // *Кинетика и катализ.* – 2014. – 55, №2. – С.: 157–162.

19. *Васильев Р.Ф., Вичутинский А.А., Черкасов А.С.* Хемилюминесценция, активированная производными антрацена // *Доклады Академии наук СССР.* – 1963. – 149, 1. – С.: 124–127.
20. *Васильев Р.Ф., Кънчева В.Д., Федорова Г.Ф., Бътовска Д.И., Трофимов А.В.* Антиоксидантная активность халконов. Хемилюминесцентное определение реакционной способности и квантово-химический расчёт энергий и строения реагентов и интермедиатов // *Кинетика и катализ.* – 2010. – 51, №4. – С.: 533–541.
21. *Васильева О.В., Любицкий О.Б., Клебанов Г.И., Владимиров Ю.А.* Совместное действие флавоноидов, аскорбата и альфа-токоферола на  $Fe^{2+}$ -индуцированное окисление фосфолипидных липосом // *Биологические мембраны.* – 2000. – 17, 1. – С.: 42–49.
22. *Васин М.В.* Классификация противолучевых средств как отражение современного состояния и перспективы развития радиационной фармакологии // *Радиационная биология. Радиоэкология.* – 2013. – 53, 5. – С.: 459–467.
23. *Викулина А.С.* Пероксидация липидов под действием цитохрома *c* и его комплекса с анионными липидами и её роль в апоптозе. Диссертация на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 Биофизика. Москва, год защиты – 2015, 182 с.
24. *Викулина А.С., Алексеев А.В., Проскурнина Е.В., Владимиров Ю.А.* Комплекс цитохрома *c* с кардиолипином в неполярном окружении // *Биохимия.* – 2015. – 80, 10. – С.: 1573–1578.
25. *Владимиров Г.К.* Структура и пероксидазная функция комплекса цитохрома *c* с кардиолипином в водной среде и в неполярном окружении. Диссертация на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 Биофизика. Москва, год защиты – 2018, 125 с.
26. *Владимиров Ю.А.* Сверхслабые свечения при биохимических реакциях / – Москва: Наука, 1966. – 126 с.
27. *Владимиров Ю.А.* Современные представления о первичных механизмах апоптоза и его роли в патологии. XXXX Международная научно-практическая конференция «Применение лазеров в медицине и биологии» 2–5 октября 2013 г.; Ялта: Сборник тезисов; 2013. С. 174.

28. *Владимиров Ю.А., Аксенцев С.Л., Оленев В.И.* Индуцированная теплом и светом фосфоресценция белков и ароматических аминокислот, облучённых ультрафиолетовой радиацией // *Биофизика*. – 1965. – 10, 4. – С.: 614–618.
29. *Владимиров Ю.А., Арчаков А.И.* Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / – Москва: Наука, 1972. – 252 с.
30. *Владимиров Ю.А., Дёмин Е.М., Проскурнина Е.В., Осипов А.Н.* Образование липо-пероксидных радикалов при окислении кардиопипина в комплексе с цитохромом *c* // *Биологические Мембраны*. – 2009. – 26, 6. – С.: 493–504.
31. *Владимиров Ю.А., Львова О.Ф.* Сверхслабое свечение и окислительное фосфорилирование в митохондриях // *Биофизика*. – 1964. – 9(4). – С.: 506–507.
32. *Владимиров Ю.А., Львова О.Ф., Черемисина З.П.* Сверхслабое свечение митохондрий и его связь с ферментативным окислением липидов // *Биохимия*. – 1966. – 31(3). – С.: 507–514.
33. *Владимиров Ю.А., Ноль Ю.Ц., Волков В.В.* Белково-липидные наночастицы, от которых зависит “быть или не быть” живой клетке // *Кристаллография*. – 2011. – 56, 4. – С.: 712–719.
34. *Владимиров Ю.А., Потапенко А.Я.* Физико-химические основы фотобиологических процессов: учебное пособие для медицинских и биологических спец. вузов / – Москва: Высшая школа, 1989. – 199 с.
35. *Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В.* Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция // *Успехи биологической химии*. – 2009. – 49. – С.: 341–388.
36. *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.
37. *Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В., Дёмин Е.М., Матвеева Н.С., Любичкий О.Б., Новиков А.А. и др.* Дигидрокверцетин (таксифолин) и другие флавоноиды как ингибиторы образования свободных радикалов на ключевых стадиях апоптоза // *Биохимия*. – 2009. – 74, 3. – С.: 372–379.
38. *Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В., Измайлов Д.Ю.* Кинетическая хемилюминесценция как метод изучения реакций свободных радикалов // *Биофизика*. – 2011. – 56, 6. – С.: 1081–1090.

39. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В., Измайлов Д.Ю. Хемилюминесценция как метод обнаружения и исследования свободных радикалов в биологических системах // *БЭБиМ.* – 2007. – 144, 3. – С.: 390–396.
40. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В., Измайлов Д.Ю., Новиков А.А., Брусничкин А.В., Осипов А.Н., Каган В.Е. Кардиолипид активирует пероксидазную активность цитохрома с, потому что увеличивает доступность гема для  $H_2O_2$  // *Биохимия.* – 2006. – 71, 9. – С.: 1225–1234.
41. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В., Измайлов Д.Ю., Новиков А.А., Брусничкин А.В., Осипов А.Н., Каган В.Е. Механизм активации пероксидазной активности цитохрома с кардиолипином // *Биохимия.* – 2006. – 71, 9. – С.: 1215–1224.
42. Владимиров Ю.А., Сергеев П.В., Сейфулла Р.Д., Руднев Ю.Н. Влияние стероидов на перекисное окисление липидов мембран митохондрий печени // *Молекулярная биология.* – 1973. – 7, 2. – С.: 247–253.
43. Владимиров Ю.А., Сулова Т.Б., Оленев В.И. Хемилюминесценция, сопряжённая с образованием липидных перекисей в биологических мембранах. II. Роль  $Fe^{2+}$  в развитии цепного окисления липидов и сверхслабого свечения // *Биофизика.* – 1969. – 14, 5. – С.: 836–845.
44. Владимиров Ю.А., Шерстнёв М.П., Азимбаев Т.К. Активированная кумарином хемилюминесценция липопротеидов низкой плотности в присутствии ионов двухвалентного железа // *Биофизика.* – 1995. – 40, 2. – С.: 323–327.
45. Водолагина Е.Ю. Антиоксиданты и их значение в питании человека // *Технологии производства и переработки сельскохозяйственной продукции Сборник научных трудов Благовещенск.* – 2017. – С.: 11–18.
46. Воейков В.Л., Баскаков И.В. Изучение кинетики хемилюминесценции в водных растворах аминокислот в присутствии перекиси водорода и бромистого этидия // *Биофизика.* – 1995. – Том 40, Выпуск 6. – С.: 1150–1157.
47. Волкова П.О., Алексеев А.В., Джатдоева А.А., Проскурнина Е.В., Владимиров Ю.А. Определение гидропероксидов липидов методом активированной хемилюминесценции // *Вестник МГУ, Серия 2: Химия.* – 2016. – 57, 1. – С.: 41–52.

48. Выделение и анализ природных биологически активных веществ / – Томск: Изд-во Томского университета, 1987. – 184.
49. Галимов Д.И., Назыров Т.И., Билалова С.Р., Газеева Д.Р., Булгаков Р.Г. Хемилюминесценция при каталитическом разложении дипероксида трифторацетона под действием ферроцена // *Вестник Башкирского университета.* – 2015. – Вып. 3, Том 20. – С.: 841–844.
50. Гребенюк А.Н., Башарин В.А., Тарумов Р.А., Ковтун В.Ю., Антушевич А.А. Сравнительное изучение эффективности генистеина, мексидола, литана и цитохрома с как средств профилактики и ранней терапии радиационных поражений // *Вестник Российской Военно-медицинской академии.* – 2013. – 1(41). – С.: 102–106.
51. Гурвич А.Г. Митогенетическое излучение / – М.: Госмедиздат, 1934.
52. Дёмин Е.М., Измайлов Д.Ю., Проскурнина Е.В., Владимиров Ю.А. Регуляция радикал-зависимой стадии апоптоза с помощью антиоксидантов. Научный Симпозиум с международным участием Проблемы медицинской биофизики; 2012; Москва, факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова. 14–15 сентября 2012г.: ООО "МАКС Пресс".
53. Дёмин Е.М., Проскурнина Е.В., Владимиров Ю.А. Антиоксидантное действие дигидрокверцетина и рутина в пероксидазных реакциях, катализируемых цитохромом с // *Вестник Московского Университета Серия 2: Химия.* – 2008. – 49, 5. – С.: 354–360.
54. Дёмин Е.М., Проскурнина Е.В., Владимиров Ю.А. Хемилюминесцентное определение активности некоторых антиоксидантов при их действии на радикал-зависимую стадию апоптоза. Второй Съезд аналитиков России, Москва, 23–27 сентября 2013 года: Тезисы докладов; 2013. С. 275.
55. Джатдоева А.А. Источники супероксидного анион-радикала в тромбоцитах и тканях. Диссертация на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 Биофизика. Москва, год защиты – 2017
56. Джатдоева А.А., Полимова А.М., Проскурнина Е.В., Владимиров Ю.А. Тканевая хемилюминесценция как метод оценки супероксид радикал-продуцирующей способности митохондрий // *Вестник РГМУ.* – 2016. – №1. – С.: 54–60.

57. Дизрегуляционная патология нервной системы / Под. ред. Г.Н. Крыжановского, Е.И. Гусева. – М.: ООО «Медицинское информационное агенство», 2009. – 455 с.
58. Дизрегуляционная патология: Руководство для врачей и биологов / Под. ред. Г.Н. Крыжановского. – М.: Медицина, 2002. – С.: 140 – 151
59. Дудник Л.Б., Цюпко А.Н., Хренов А.В., Алесенко А.В. Влияние билирубина на интенсивность пероксидного окисления липидов, активность сфингомиелиназы, и апоптоз, индуцированный сфингозином и УФ-облучением // *Биохимия*. – 2001. – Т. 66, №9. – С.: 1252–1262.
60. Евдокимов В.В., Туровецкий В.Б., Шмальгаузен Е.В., Муронец В.И. Подвижность сперматозоидов при воздействии перекиси водорода // *Андрология и генитальная хирургия*. – 2015. – Т. 1. – С.: 69–72.
61. Жигачева И.В., Бурлакова Е.Б., Генерозова И.П., Шугаев А.Г. Роль адаптогенов в регуляции биоэнергетических функций митохондрий в условиях стресса // *Биологические мембраны*. – 2013. – 30, 4. – С.: 313–321.
62. Журавлёв А.И. Квантовая биофизика животных и человека: учебное пособие / 3-е издание. – М.: МГАВМиБ, 2009. – 474 с.
63. Журавлёв А.И., Зубкова С.М. Антиоксиданты. Свободнорадикальная патология, старение. Второе издание, исправленное и дополненное. / – Москва: Белые альвы, 2014. – 304 с.
64. Зерний Е.Ю., Головастова М.О., Бакшеева В.Е., Кабанова Е.И., Ишутина И.Е., Ганчарова О.С. и др. Изменения биохимических свойств слёзной жидкости при развитии хронической формы синдрома сухого глаза в посленаркозный период // *Биохимия*. – 2017. – 82, 1. – С.: 137–148.
65. Иванов И.М., Никифоров А.С., Юдин М.А., Чепур С.В., Прошина Ю.А., Свентицкая А.М. Перспективы ингаляционной доставки медицинских средств защиты при радиационных поражениях // *Радиационная биология Радиоэкология*. – 2020. – 60, 2. – С.: 175–188.
66. Истомина А.А., Челомин В.П., Довженко Н.В., Куриленко В.В., Федорец Ю.В., Бельчева Н.Н. Активность антиоксидантных ферментов и содержание глутатиона в пищеварительных органах морских беспозвоночных из залива Посъета Японского моря // *Биология моря*. – 2018. – 44, 4. – С.: 290–296.



67. Казаков Д.В., Казаков В.П., Сафаров Ф.Э., Остахов С.С., Ахмадеева Г.Х. Исследование температурного изменения времени жизни люминесценции ионов европия (III) в процессе протекания твердофазной хемилюминесцентной реакции в системе:  $\text{KHSO}_5 - (\text{CH}_3)_2\text{CO} - \text{Eu}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  // *Башкирский химический журнал*. – 2007. – Т. 14, Вып. 1. – С.: 69–70.
68. Ключников С.О., Гнетнева Е.С. Убихинон (коэнзим Q10): теория и клиническая практика // *Педиатрия Журнал имени ГН Сперанского*. – 2008. – Том 87, №3. – С.: 103–110.
69. Колесников А.В. Экспериментальное исследование антикатарактальной эффективности прямого антиоксиданта ионола // *Кубанский научный медицинский вестник*. – 2011. – 1(124). – С.: 174–179.
70. Конев С.В. Электронно-возбуждённые состояния биополимеров / – Минск: Наука и техника, 1965. – 186 с.
71. Коновалова Е.В., Фёдорова Т.Н., Маклецова М.Г., Берёзов Т.Т. Влияние карнозина на гибель клеток РС-12, индуцированную токсическим действием акролеина // *Вопросы биологической, медицинской и фармакологической химии*. – 2013. – № 6. – С.: 43–48.
72. Кузин А.М. Структурно-метаболическая теория в радиобиологии / – Москва: Наука, 1986. – 282 с.
73. Кузин В.Б., Ловцова Л.В., Барсук А.Л., Возова А.М., Малюк Е.В., Шакерова Д.А. Динамика показателей перекисного окисления липидов у пациентов, находящихся на программном гемодиализе // *Медицинский альманах*. – 2013. – №3(27). – С.: 131–132.
74. Ли Х.И., Владимиров Ю.А., Деев А.И. Сравнительное изучение действия карнозина и других антиоксидантов на хемилюминесценцию суспензии однослойных липосом в присутствии ионов железа // *Биофизика*. – 1990. – 35, № 1. – С.: 82–85.
75. Листов М.В., Мамыкин А.И. Анион-радикал кислорода как фактор деполяризации и возбуждения клеточной мембраны // *Клиническая патофизиология*. – 2014. – 3. – С.: 34–39.

76. *Листов М.В., Мамыкин А.И.* Роль анион-радикала кислорода в механизмах возбуждения миокарда и его патогенетическое значение в несбалансированных биологических системах // *Клиническая патофизиология.* – 2015. – №2. – С.: 54–58.
77. *Листов М.В., Мамыкин А.И.* Экспериментальная модель оксидативного стресса при хроническом нарушении баланса радикалов в биосистеме: полимиозит формы Вагнера-Унферрихта // *Вестник Российской Военно-Медицинской Академии.* – 2018. – 4(64). – С.: 117–122.
78. *Листов М.В., Мамыкин А.И., Рассадина А.А.* Спектроскопия особенностей переноса электрона свободными радикалами в норме и патологии // *Вестник новых медицинских технологий Электронное издание.* – 2017. – 2. – С.: 259–266.
79. *Лобачев В.Л., Рудаков Е.С.* Химия пероксинитрита. Кинетика и механизмы реакций // *Успехи химии.* – 2006. – 75, 5. – С.: 422–444.
80. *Лысенко Н.П., Пак В.В., Рогожина Л.В., Кусурова З.Г.* Радиобиология: учебник, под редакцией Н.П. Лысенко и В.В. Пака. – 5-е изд., стер. / – Санкт-Петербург: Лань, 2019. – 572 с.
81. *Львова О.Ф., Владимиров Ю.А.* Хемилюминесценция митохондрий и её связь с биохимическими процессами // *Труды МОИП Л1 – МОИП.* – 1966. – 16. – С.: 214–217.
82. *Манько В.М., Девришов Д.А.* Ветеринарная иммунология. Фундаментальные основы: Учебник. – Москва: «Агровет», 2011. – С.: 353–364.
83. *Маргулис Г.В.* Расчёт светосбора от цилиндрического источника экспериментальной установки с ФЭУ-42 в качестве детектора // *Сверхслабые свечения в биологии / Под редакцией Журавлёва А.И.* – М: Наука. – 1972. – С.: 72–75.
84. *Мартынов В.И., Пахомов А.А., Попова Н.В., Деев И.Е., Петренко А.Г.* Синтетические флуорофоры для визуализации биомолекул в живых системах // *ActaNaturae.* – 2016. – 8, 4(31). – С.: 37–51.
85. *Матвеев Р.П., Брагина С.В.* Аvascularный некроз головки бедренной кости (обзор литературы) // *Экология человека.* – 2018. – 3. – С.: 58–64.
86. *Матвеева Н.С.* Активированная хемилюминесценция как метод изучения свободнорадикальных реакций в клетках и тканях. Диссертация на соискание

учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 Биофизика. Москва, год защиты – 2012

87. *Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З.* Окислительный стресс. Патологические состояния и заболевания. / – Новосибирск: АРТА, 2008. – 284 с.

88. *Мурина М.А., Белакина Н.С., Рошупкин Д.И.* Хемилюминесценция системы полиморфноядерные лейкоциты – люминол в присутствии биогенных хлораминов // *Биофизика.* – 2004. – Т. 49, № 6. – С.: 1099–1105.

89. *Мустафина М.К.* Влияние фитопрепаратов на процессы свободно-радикального окисления в организме экспериментальных животных в норме и в условиях стресса. Автореферат диссертации на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 16.00.02 Патология, онкология и морфология животных. Уфа, год защиты – 2002

90. *Николаева О.Г., Ревинский Ю.В., Тихомирова К.С., Дмитриева О.И., Дубоносов А.Д., Брень В.А.* Хемосенсорные бензоилгидразоны кумариновых альдегидов // *Наука Юга России.* – 2018. – Том 14, Выпуск №2. – С.: 14–19.

91. *Новиков В.В., Пономарев В.О., Новиков Г.В., Кувичкин В.В., Яблокова Е.В., Фесенк Е.Е.* Эффекты и молекулярные механизмы биологического действия слабых и сверхслабых магнитных полей // *Биофизика.* – 2010. – 55, 4. – С.: 631–639.

92. *Осипов А.Н., Степанов Г.О., Владимиров Ю.А., Козлов А.В., Каган В.Е.* Регуляция пероксидазной активности цитохрома *c* с помощью оксида азота и лазерного излучения // *Биохимия.* – 2006. – 71, 10. – С.: 1392–1398.

93. *Панасенко О.М., Горудко И.В., Соколов А.В.* Хлорноватистая кислота как предшественник свободных радикалов в живых системах // *Успехи биологической химии.* – 2013. – 53. – С.:195–244.

94. *Пашкова Л.П., Цыганов А.В., Пономаренко Н.П.* Повышение антибактериальных и радиозащитных свойств мёда // *Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии.* – 2016. – №4. – С.: 186–189.

95. *Пискарёв И.М., Иванова И.П.* Оценка окислительной и антиоксидантной способности биологических субстратов по хемилюминесценции, индуцированной реакцией Фентона // *Современные технологии в медицине.* – 2016. – 8, 3. – С.: 16–26.

96. *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, год защиты – 2015
97. *Поздеев А.В.* Экспериментальное исследование содержание кортизола в крови при радиационном облучении // *Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии.* – 2013. – №7. – С.: 53–54.
98. *Поздеев А.В., Гугало В.П.* Влияние препарата хлорофилла на содержание малонового диальдегида при радиационной патологии // *Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии.* – 2012. – №2. – С.: 107–109.
99. *Поздеев А.В., Лысенко Н.П.* Повышение радиационной устойчивости организма млекопитающих при применении препаратов хлорофилла в условиях радиоактивного загрязнения окружающей среды // *Известия Международной академии аграрного образования.* – 2018. – Выпуск 42, Т. 2. – С.: 60–62.
100. *Поздеев А.В., Промоненков В.К., Лысенко Н.П.* Применение растительного пигмента в качестве ингибитора электронно-возбуждённых состояний // *Ветеринарная медицина.* – 2010. – №2010-1. – С.: 42–43.
101. *Полимова А.М., Владимирова Г.А., Проскурнина Е.В., Владимиров Ю.А.* Продукты окисления ароматических аминокислот – антиоксиданты // *Биофизика.* – 2011. – 56, 4. – С.: 581–586.
102. *Проскурнина Е.В., Владимиров Ю.А.* Свободные радикалы как участники регуляторных и патологических процессов. *Фундаментальные науки – медицине* Биофизические медицинские технологии. Москва: МаксПресс; 2015. – С.: 38–71.
103. *Проскурнина Е.В., Джатдоева А.А., Лобиченко Е.Н., Шалина Р.И., Владимиров Ю.А.* Хемилюминесцентное определение гидропероксидов липидов в биологических жидкостях // *Журнал аналитической химии.* – 2017. – 72, 7. – С.: 639–644.
104. *Ромодин Л.А.* Комплекс цитохрома с с кардиолипином как липопероксидаза. Выпускная квалификационная работа бакалавра по направлению подготовки 06.03.01 Биология. Москва, год защиты – 2016, 108 с.
105. *Ромодин Л.А.* Кумарины С-314, С-334 и С-525 как активаторы хемилюминесценции при изучении свойств комплекса цитохрома с с

кардиолипином. Выпускная квалификационная магистерская работа по направлению подготовки 06.04.01 Биология. Москва, год защиты – 2018, 94 с.

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

107. 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 ученых 23–27 апреля 2018 г., г. Пущино. Сборник тезисов. С. 434.

108. Ромодин Л.А., Владимиров Ю.А., Лысенко Н.П. Качественная оценка взаимодействия между различными компонентами реакционной смеси, используемой для изучения липопероксидазной активности комплекса цитохрома *c* с кардиолипином // Материалы XI Международной научно-практической конференции – «Трансформация опыта менеджмента агробизнеса Европейского Союза в Казахстан и страны Центральной Азии», «Дулатовские чтения – 2019». – С.: 61–68.

109. 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. – 65, 4. – С.: 680–690.

110. Ромодин Л.А., Зарудная Е.Н. Индукция окислительного стресса пероксидом водорода у *Brachidanio rerio* // *Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины: Материалы VI Междунар научно-практической конференции; Южный федеральный университет – Ростов-на-Дону: Издательство Южного федерального университета*. – 2015. – С. 270.

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

112. Ромодин Л.А., Зарудная Е.Н., Владимиров Ю.А. Комплекс цитохрома с 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. – 192 с. С. 43.
113. Ромодин Л.А., Трифонова М.Ф., Лысенко Н.П., Бекузарова С.А. Способ определения химического участия активатора хемилюминесценции в липопероксидазной реакции. Патент РФ № 2720807. Патентообладатель: Международная академия аграрного образования. Заявл. 04.06.2019, опубл. 13.05.2020.
114. 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.
115. Роцупкин Д.И., Белакина Н.С., Мурина М.А. Усиленная люминолом хемилюминесценция полиморфноядерных лейкоцитов кролика: природа оксидантов, непосредственно вызывающих окисление люминола // *Биофизика*. – 2006. – Т. 51, № 1. – С.: 99–107.
116. Рубене Д.Я., Шаров В.С., Оленев В.И., Тирзит Г.Д., Дубур Г.Я., Владимиров Ю.А. Использование хемилюминесцентного метода для оценки антиоксидантной активности некоторых производных 1,4-дигидропиридина // *Журнал физической химии*. – 1981. – 55(2). – С.: 511–512.
117. Самохвалов В.А., Сметанина М.Д., Мусейкина Н.Ю., Мельников Г.В., Федотова О.В., Игнатов В.В. Влияние низкой концентрации перекиси водорода на метаболизм клеток крови // *Биомедицинская химия*. – 2003. – Т. 49, № 2. – С.: 122–127.
118. Сапежинский И.И., Эмануэль Н.М. О механизме рекомбинации радикалов облученных белков в присутствии кислорода // *Доклады Академии наук СССР*. – 1965. – 165, №4. – С.: 845–847.
119. Сафаров Ф.Э. Хемилюминесценция комплексов лантаноидов в реакциях с органическими пероксидами. Автореферат диссертации на соискание учёной

степени кандидата химических наук по специальности 02.00.04 Физическая химия. Уфа, год защиты – 2011, 25 с.

120. Селиверстова Е.Ю., Сазыкин И.С., Хмелевцова Л.Е., Майоров Е.Л. Специфические методики детекции АФК в биологических системах // *Валеология*. – 2014. – №4. – С.: 26–34.

121. Семёнов Н.Н. Газовые взрывы и теория цепных реакций // *Успехи физических наук*. – 1931. – 11, 2. – С.: 250–275.

122. Семёнов Н.Н. Самовоспламенение и цепные реакции // *Успехи химии*. – 1976. – 36, 1. – С.: 3–33.

123. Скулачёв В.П. Что такое «феноптоз» и как с ним бороться? // *Биохимия*. – 2012. – том 77, вып. 7. – С.: 863–868.

124. Соколова И.И., Хлистуна Н.Л. Лечебное действие оральных гелей с гиалуроновой кислотой и кверцетином на состояние полости рта у больных гингивитом // *Наука и здравоохранение*. – 2015. – 6. – С.: 110–123.

125. Столяров К.П., Григорьев Н.Н. Введение в люминесцентный анализ неорганических веществ / – Ленинград: Издательство "Химия", Ленинградское отделение, 1967. – 364 с.

126. Тарасов С.С., Корякин А.С. Содержание продуктов перекисного окисления липидов и антиоксидантных ферментов в плазме крови сукрольных и лактирующих самок кролика // *Вестник Пермского университета Серия: Биология*. – 2016. – Вып. 3. – С.: 292–296.

127. Тарусов Б.Н. Первичные реакции в биолипидах при действии ионизирующих излучений // *Радиобиология и радиационная медицина*. – 1959. – Том V Под общ. ред. чл.-корр. АМН СССР А. В. Лебединского. — М.: Атомиздат. – С.: 105–109.

128. Тарусов Б.Н., Поливода А.И., Журавлёв А.И. Изучение сверхслабой спонтанной люминесценции животных клеток // *Биофизика*. – 1961. – Т. 6, № 4. – С.: 490–492.

129. Текуцкая Е.Е., Барышев М.Г., Ильченко Г.П. Влияние низкочастотного электромагнитного поля на хемилюминесценцию водных растворов ДНК // *Биофизика*. – 2015. – 60, №6. – С.: 1099–1103.

130. *Узбеков М.Г.* Перекисное окисление липидов и антиоксидантные системы при психических заболеваниях. Сообщение I // *Социальная и клиническая психиатрия.* – 2014. – 24, 4. – С.: 97–103.
131. *Узбеков М.Г.* Перекисное окисление липидов и антиоксидантные системы при психических заболеваниях. Сообщение IV // *Социальная и клиническая психиатрия.* – 2016. – 26, 3. – С.: 65–71.
132. *Хабибуллин Р.Р., Федосов А.В.* Теоретические и практические аспекты процесса люминол-зависимой хемилюминесценции в живых организмах // *Башкирский химический журнал.* – 2006. – Вып. 2, Том 13. – С.: 106–107.
133. *Хлып Д.Н.* Клостридиозы (гангренозный дерматит, некротический и язвенный энтерит) // *Био.* – 2018. – №7(214). – С.: 14–19.
134. *Цаплев Ю.Б.* Хемилюминесцентное определение пероксида водорода // *Журнал аналитической химии.* – 2012. – 67, 6. – С.: 564–572.
135. *Чеснокова Н.П., Понукалина Е.В., Бизенкова М.Н.* Общая характеристика источников образования свободных радикалов и антиоксидантных систем // *Успехи современного естествознания.* – 2006. – 7. – С.: 37–41.
136. *Шаповалов Ю.А., Гладышев П.П., Тулеуханов С.Т., Швецова Е.В., Абдрасулова Ж.Т.* Радикалы в структурах клетки // *Биофизика.* – 2020. – 65, 4. – С.: 691–704.
137. *Шаров В.С., Владимиров Ю.А.* Активация хемилюминесценции липосом при перекисном окислении липидов ионами  $Tb^{3+}$  // *Биофизика.* – 1984. – 29, 3. – С.: 394–397.
138. *Шаров В.С., Владимиров Ю.А.* Хемилюминесценция липосом, активированная редкоземельными ионами // *Биофизика.* – 1982. – № 27. – С.: 327–329.
139. *Шаров В.С., Дремина Е.С., Владимиров Ю.А.* Активация  $Fe^{2+}$ -индуцированной хемилюминесценции в липопротеинах низкой плотности крови человека флуоресцентным красителем C-525 // *Биофизика.* – 1995. – 40, 2. – С.: 428–433.
140. *Шаров В.С., Сулова Т.Б., Деев А.И., Владимиров Ю.А.* Активация хемилюминесценции при перекисном окислении липидов комплексом европий-тетрациклин // *Биофизика.* – 1980. – № 25. – С.: 923–924.



141. *Шерстнёв М.П., Азимбаев Т.К., Владимиров Ю.А.* Активированная нильским синим железоиницированная хемилюминесценция желточных липопротеидов // *Биофизика*. – 1995. – № 40. – С.: 531–535.
142. *Шиловский Г.А., Пуяткина Т.С., Ашапкин В.В., Ямскова О.В., Любецкий В.А., Сорокина Е.В., Шрам С.И., Марков А.В., Высоких М.Ю.* Биологическое разнообразие кардиолипина и его ремоделирование при окислительном стрессе и возрастных патологиях // *Биохимия*. – 2019. – 84, 12. – С.: 1815–1831.
143. *Шляпнитох В.Я., Карпунин О.Н., Постников Л.М., Захаров И.В., Вичутинский А.А., Цепалов В.Ф.* Хемилюминесцентные методы исследования медленных химических процессов / – Москва: Наука, 1966. – 300 с.
144. *Щулькин А.В.* Современные представления об антигипоксическом и антиоксидантном эффектах мексидола // *Журнал неврологии и психиатрии имени С.С. Корсакова*. – 2018. – 118, 12. Вып. 2. – С.: 87–93.
145. *Элькина Ю.Л., Атрощенко М.М., Брагина Е.Е., Муронец В.И., Шмальгаузен Е.В.* Окисление глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы приводит к снижению подвижности сперматозоидов // *Биохимия*. – 2011. – Т. 76, №2. – С.: 326–332.
146. *Abdelkader H., Longman M., Alany R.G., Pierscionek B.* On the Anticataractogenic Effects of L-Carnosine: Is It Best Described as an Antioxidant, Metal-Chelating Agent or Glycation Inhibitor? // *Oxid Med Cell Longev*. – 2016. – 2016. – P. 3240261.
147. *Abriata L.A., Cassina A., Tortora V., Marin M., Souza J.M., Castro L., Vila A.J., Radi R.* Nitration of solvent-exposed tyrosine 74 on cytochrome *c* triggers heme iron-methionine 80 bond disruption. Nuclear magnetic resonance and optical spectroscopy studies // *J Biol Chem*. – 2009. – 284, 1. – P.: 17–26.
148. *Acehan D., Khuchua Z., Houtkooper R.H., Malhotra A., Kaufman J. et al.* Distinct effects of tafazzin deletion in differentiated and undifferentiated mitochondria // *Mitochondrion*. – 2009. – 9, 2. – P.: 86–95.
149. *Agarwal P., Bagewadi A., Keluskar V., Vinuth D.P.* Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase antioxidant enzymes in chronic tobacco smokers and chewers: A case-control study // *Indian J Dent Res*. – 2019. – 30, 2. – P.: 219–225.

150. Akter R., Uddin S.J., Tiralongo J., Grice I.D., Tiralongo E. A new cytotoxic diterpenoid glycoside from the leaves of *Blumea lacera* and its effects on apoptosis and cell cycle // *Nat Prod Res.* – 2016. – P.: 1–6.
151. Al-Kahtani M., Abdel-Daim M.M., Sayed A.A., El-Kott A., Morsy K. Curcumin phytosome modulates aluminum-induced hepatotoxicity via regulation of antioxidant, Bcl-2, and caspase-3 in rats // *Environ Sci Pollut Res Int.* – 2020. – 27, 17. – P.: 21977–21985.
152. Alanazi J.S., Latimer J.J. Host Cell Reactivation: Assay for Actively Transcribed DNA (Nucleotide Excision) Repair Using Luciferase Family Expression Vectors // *Methods Mol Biol.* – 2020. – 2102. – P.: 509–528.
153. Ali N. Co-occurrence of citrinin and ochratoxin A in rice in Asia and its implications for human health // *J Sci Food Agric.* – 2018. – 98, 6. – P.: 2055–2059.
154. Alkadi H. A Review on Free Radicals and Antioxidants // *Infect Disord Drug Targets.* – 2020. – 20, 1. – P.: 16–26.
155. Allen R.C., Stjernholm R.L., Steele R.H. Evidence for the generation of an electronic excitation state(s) in human polymorphonuclear leukocytes and its participation in bactericidal activity // *Biochem Biophys Res Commun.* – 1972. – 47, 4. – P.: 679–684.
156. Arafat M., Kirchhoefer C., Mikov M., Sarfraz M., Lobenberg R. Nanosized Liposomes Containing Bile Salt: A Vesicular Nanocarrier for Enhancing Oral Bioavailability of BCS Class III Drug // *J. Pharm Pharm Sci.* – 2017. – 20(0). – P.: 305–318.
157. Araya J., Kawabata Y., Tomichi N., Kaneko K., Hayashi K., Iwabuchi K., Terasaki Y., Kawashima T., Watanabe M. Allergic inflammatory reaction is involved in necrosis of human pulmonary dirofilariasis // *Histopathology.* – 2007. – 51, 4. – P.: 484–490.
158. Armistead J., Hatzold J., van Roye A., Fahle E., Hammerschmidt M. Entosis and apical cell extrusion constitute a tumor-suppressive mechanism downstream of Matriptase // *J Cell Biol.* – 2020. – 219, 2. – P. e201905190
159. Aspee A., Alarcon E., Pino E., Gorelsky S.I., Scaiano J.C. Coumarin 314 free radical cation: formation, properties, and reactivity toward phenolic antioxidants // *J Phys Chem A.* – 2012. – 116, 1. – P.: 199–206.

160. *Aspee A., Lissi E.A.* Kinetics and mechanism of the chemiluminescence associated with the free radical-mediated oxidation of amino acids // *Luminescence*. – 2000. – 15, 5. – P.: 273–282.
161. *Aspee A., Lissi E.A.* Kinetics of the chemiluminescence associated to the reaction between peroxy radicals and proteins // *J Protein Chem*. – 2001. – 20, 6. – P.: 479–485.
162. *Azami S.H., Nazarian H., Abdollahifar M.A., Eini F., Farsani M.A., Novin M.G.* The antioxidant curcumin postpones ovarian aging in young and middle-aged mice // *Reprod Fertil Dev*. – 2020. – 32, 3. – P.: 292–303.
163. *Balachandran C., Emi N., Arun Y., Yamamoto N., Duraipandiyar V., Inaguma Y., Okamoto A., Ignacimuthu S., et al.* In vitro antiproliferative activity of 2,3-dihydroxy-9,10-anthraquinone induced apoptosis against COLO320 cells through cytochrome *c* release caspase mediated pathway with PI3K/AKT and COX-2 inhibition // *Chem Biol Interact*. – 2016. – 249. – P.: 23–35.
164. *Banerjee S., Ghosh S., Mandal A., Ghosh N., Sil P.C.* ROS-associated immune response and metabolism: a mechanistic approach with implication of various diseases // *Arch Toxicol*. – 2020. – 94, 7. – P.: 2293–2317.
165. *Barnard M.L., Robertson B., Watts B.P., Turrens J.F.* Role of nitric oxide and superoxide anion in spontaneous lung chemiluminescence // *Am J Physiol*. – 1997. – 272, 2 Pt 1. – P.: L262–L267.
166. *Belikova N.A., Vladimirov Y.A., Osipov A.N., Kapralov A.A., Tyurin V.A., Potapovich M.V., Basova L.V., Peterson J., et al.* Peroxidase activity and structural transitions of cytochrome *c* bound to cardiolipin-containing membranes // *Biochemistry*. – 2006. – 45, 15. – P.: 4998–5009.
167. *Belyakov V.A., Vassil'ev R.F.* Chemiluminescence in hydrocarbon oxidation in solution. A quantitative study of the excitation and emission steps // *Photochem Photobiol*. – 1970. – 11, 3. – P.: 179–192.
168. *Belyakov V.A., Vassil'ev R.F.* On some problems concerning investigation of liquid-phase chemiluminescence // *Photochem Photobiol*. – 1967. – 6, №1. – P.: 35–40.
169. *Bemani P., Mohammadi M., Hakakian A.* Anti-ROR1 scFv-EndoG as a Novel Anti-Cancer Therapeutic Drug // *Asian Pac J Cancer Prev*. – 2018. – 19, 1. – P.: 97–102.

170. *Benhar M.* Roles of mammalian glutathione peroxidase and thioredoxin reductase enzymes in the cellular response to nitrosative stress // *Free Radic Biol Med.* – 2018. – 127. – P.: 160–164.
171. *Bernard M., Yang B., Migneault F., Turgeon J., Dieude M., Olivier M.A., Cardin G.B., El-Diwany M., et al.* Autophagy drives fibroblast senescence through MTORC2 regulation // *Autophagy.* – 2020. – P.: 1–13.
172. *Bhujade A., Gupta G., Talmale S., Das S.K., Patil M.B.* Induction of apoptosis in A431 skin cancer cells by *Cissus quadrangularis* Linn stem extract by altering Bax-Bcl-2 ratio, release of cytochrome c from mitochondria and PARP cleavage // *Food Funct.* – 2013. – 4, 2. – P.: 338–346.
173. *Bhunja A.K., Han H., Snowden A., Chatterjee S.* Redox-regulated signaling by lactosylceramide in the proliferation of human aortic smooth muscle cells // *J Biol Chem.* – 1997. – 272, 25. – P.: 15642–15649.
174. *Blackburn A.C., Matthaei K.I., Lim C., Taylor M.C., Cappello J.Y., Hayes J.D., Anders M.W., Board P.G.* Deficiency of glutathione transferase zeta causes oxidative stress and activation of antioxidant response pathways // *Mol Pharmacol.* – 2006. – 69, 2. – P.: 650–657.
175. *Bodulev O.L., Gribas A.V., Sakharov I.Y.* Microplate chemiluminescent assay for HBV DNA detection using 3-(10'-phenothiazinyl)propionic acid/N-morpholinopyridine pair as enhancer of HRP-catalyzed chemiluminescence // *Anal Biochem.* – 2018. – 543. – P.: 33–36.
176. *Boveris A., Cadenas E., Chance B.* Ultraweak chemiluminescence: a sensitive assay for oxidative radical reactions // *Fed Proc.* – 1981. – 40, 2. – P.: 195–198.
177. *Bryan P.D., Capomacchia A.C.* Use of stop-flow oxalate ester chemiluminescence as a means to determine conditions for high-performance liquid chromatography chemiluminescence detection of retinoids using normal-phase chromatography // *J. Pharm Biomed Anal.* – 1991. – 9, P.: 10–12. – P.: 855–860.
178. *Butovich I.A., Luk'yanova S.M., Reddy C.C.* Oxidation of linoleyl alcohol by potato tuber lipoxygenase: kinetics and positional, stereo, and geometrical (cis, trans) specificity of the reaction // *Arch Biochem Biophys.* – 2000. – 378, 1. – P.: 65–77.
179. *Cabeca T.K., de Mello Abreu A., Andrette R., de Souza Lino V., Morale M.G., Aguayo F. et al.* HPV-Mediated Resistance to TNF and TRAIL Is Characterized by

Global Alterations in Apoptosis Regulatory Factors, Dysregulation of Death Receptors, and Induction of ROS/RNS // *Int J Mol Sci.* – 2019. – 20, 1. – P. 198

180. *Cadenas E.* Biochemistry of oxygen toxicity // *Annu Rev Biochem.* – 1989. – 58. – P.: 79–110.

181. *Cain K., Bratton S.B., Langlais C., Walker G., Brown D.G., Sun X.M., Cohen G.M.* Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes // *J Biol Chem.* – 2000. – 275, 9. – P.: 6067–6070.

182. *Caldeira G.L., Ferreira I.L., Rego A.C.* Impaired transcription in Alzheimer's disease: key role in mitochondrial dysfunction and oxidative stress // *J Alzheimers Dis.* – 2013. – 34, 1. – P.: 115–131.

183. *Campos C., Guzman R., Lopez-Fernandez E., Casado A.* Urinary uric acid and antioxidant capacity in children and adults with Down syndrome // *Clin Biochem.* – 2010. – 43, 3. – P.: 228–233.

184. *Chaichi M.J., Alijanpour S.O., Asghari S., Shadlou S.* Evaluation of luminol chemiluminescence based on simultaneous introducing of coumarin derivatives as green fluorophores and chitosan-induced Au/Ag alloy nanoparticle as catalyst for the sensitive determination of glucose // *J Fluoresc.* – 2015. – 25, 2. – P.: 263–275.

185. *Chance B.* The Properties of the Enzyme-Substrate Compounds of Horse-Radish and Lacto-Peroxidase // *Science.* – 1949. – 109, 2826. – P.: 204–208.

186. *Chance B.* The transition from the primary to the secondary peroxidase-peroxide complex // *Arch Biochem Biophys.* – 1952. – 37, 1. – P.: 235–237.

187. *Chance B., Higgins J.* Peroxidase kinetics in coupled oxidation; an experimental and theoretical study // *Arch Biochem Biophys.* – 1952. – 41, 2. – P.: 432–441.

188. *Chen G., Guo G., Zhou X., Chen H.* Potential mechanism of ferroptosis in pancreatic cancer // *Oncol Lett.* – 2020. – 19, 1. – P.: 579–587.

189. *Chen M.C., Huang H.H., Lai C.Y., Lin Y.J., Liou J.P., Lai M.J., Li Y.H., Teng C.M., Yang C.R.* Novel histone deacetylase inhibitor MPT0G009 induces cell apoptosis and synergistic anticancer activity with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand against human hepatocellular carcinoma // *Oncotarget.* – 2016. – 7, 1. – P.: 402–417.

190. *Chen M.S., Lu P.K., Lin W.C., Shin H.C., Sie S.R., Sheu S.M.* Lipofundin Mediates the Major Inhibition of Intravenous Propofol in IL-1 $\beta$  Secretion and Phagocytosis of Staphylococcus aureus-Infected Macrophages // *Lipids*. – 2020. – 55, 1. – P.: 45–52.
191. *Chen X., Zhang X.L., Zhang G.H., Gao Y.F.* Artesunate promotes Th1 differentiation from CD4<sup>+</sup> T cells to enhance cell apoptosis in ovarian cancer via miR-142 // *Braz J Med Biol Res*. – 2019. – 52, 5. – P. e7992.
192. *Cherkas A., Holota S., Mdzinarashvili T., Gabbianelli R., Zarkovic N.* Glucose as a Major Antioxidant: When, What for and Why It Fails? // *Antioxidants (Basel)*. – 2020. – 9, 2. – P. 140.
193. *Chiesa M., Giamello E., Livraghi S., Paganini M.C., Polliotto V., Salvadori E.* Electron magnetic resonance in heterogeneous photocatalysis research // *J Phys Condens Matter*. – 2019. – 31, 44. – 444001.
194. *Cilento G., Adam W.* From free radicals to electronically excited species // *Free Radic Biol Med*. – 1995. – 19, 1. – P.: 103–114.
195. *Colli L., Facchini U.* Light emission by germinating plants // *Nuovo cimento*. – 1954. – 12, 1. – P.: 150–153.
196. *Connor S., Alexakis N., Neal T., Raraty M., Ghaneh P., Evans J., Hughes M., Rowlands P., et al.* Fungal infection but not type of bacterial infection is associated with a high mortality in primary and secondary infected pancreatic necrosis // *Dig Surg*. – 2004. – 21, 4. – P.: 297–304.
197. *Conrad M., Proneth B.* Broken hearts: Iron overload, ferroptosis and cardiomyopathy // *Cell Res*. – 2019. – 29, 4. – P.: 263–264.
198. *Corcelli A.* The cardiolipin analogues of Archaea // *Biochim Biophys Acta*. – 2009. – 1788, 10. – P.: 2101–2106.
199. *Cordero M.D., Moreno-Fernandez A.M., Gomez-Skarmeta J.L., de Miguel M., Garrido-Maraver J., Oropesa-Avila M., Rodriguez-Hernandez A., Navas P., Sanchez-Alcazar J.A.* Coenzyme Q10 and alpha-tocopherol protect against amitriptyline toxicity // *Toxicol Appl Pharmacol*. – 2009. – 235, 3. – P.: 329–337.
200. *Cormier M.J., Prichard P.M.* An investigation of the mechanism of the luminescent peroxidation of luminol by stopped flow techniques // *J Biol Chem*. – 1968. – 243, 18. – P.: 4706–4714.

201. Corniola R., Zou Y., Leu D., Fike J.R., Huang T.T. Paradoxical relationship between Mn superoxide dismutase deficiency and radiation-induced cognitive defects // *PLoS One*. – 2012. – 7, 11. – P. e49367.
202. Daeihamed M., Dadashzadeh S., Haeri A., Akhlaghi M.F. Potential of Liposomes for Enhancement of Oral Drug Absorption // *Curr Drug Deliv*. – 2017. – 14, 2. – P.: 289–303.
203. Dahlgren C., Bjornsdottir H., Sundqvist M., Christenson K., Bylund J. Measurement of Respiratory Burst Products, Released or Retained, During Activation of Professional Phagocytes // *Methods Mol Biol*. – 2020. – 2087. – P.: 301–324.
204. Dai G., Li R., Chen H., Jiang C., You X., Wu Y. A ferritin-like protein with antioxidant activity in *Ureaplasma urealyticum* // *BMC Microbiol*. – 2015. – 15. – P. 145.
205. Dallacosta C., Monzani E., Casella L. Reactivity study on microperoxidase-8 // *J Biol Inorg Chem*. – 2003. – 8, 7. – P.: 770–776.
206. de la Ballina L.R., Munson M.J., Simonsen A. Lipids and Lipid-Binding Proteins in Selective Autophagy // *J Mol Biol*. – 2020. – 432, 1. – P.: 135–159.
207. Demissie A.A., Dickson R.M. Triplet Shelving in Fluorescein and Its Derivatives Provides Delayed, Background-Free Fluorescence Detection // *J Phys Chem A*. – 2020. – 124, 7. – P.: 1437–1443.
208. Deshpande A., Nimsadkar S., Mande S.C. Effect of alcohols on protein hydration: crystallographic analysis of hen egg-white lysozyme in the presence of alcohols // *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. – 2005. – 61, Pt 7. – P.: 1005–1008.
209. Diagne A., Fauvel J., Record M., Chap H., Douste-Blazy L. Studies on ether phospholipids. II. Comparative composition of various tissues from human, rat and guinea pig // *Biochim Biophys Acta*. – 1984. – 793, 2. – P.: 221–231.
210. Dixon S.J., Lemberg K.M., Lamprecht M.R., Skouta R., Zaitsev E.M. et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death // *Cell*. – 2012. – 149, 5. – P.: 1060–1072.
211. Dubey A.K., Kumar N., Sahu N., Verma P.K., Chakrabarty D., Behera S.K., Mallick S. Response of two rice cultivars differing in their sensitivity towards arsenic, differs in their expression of glutaredoxin and glutathione S transferase genes and antioxidant usage // *Ecotoxicol Environ Saf*. – 2016. – 124. – P.: 393–405.

212. *Dubyak G.R.* Luciferase-assisted detection of extracellular ATP and ATP metabolites during immunogenic death of cancer cells // *Methods Enzymol.* – 2019. – 629. – P.: 81–102.
213. *Dumoulin M.J., Chahine R., Atanasiu R., Nadeau R., Mateescu M.A.* Comparative antioxidant and cardioprotective effects of ceruloplasmin, superoxide dismutase and albumin // *Arzneimittelforschung.* – 1996. – 46, 9. – P.: 855–861.
214. *Dutta A., Dandapat J., Mohanty N.* First report on transferrin in the silkworm, *Antheraea mylitta*, with a putative role in antioxidant defense: Insights from proteomic analysis and immunodetection // *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* – 2019. – 233. – P.: 23–34.
215. *Eble K.S., Coleman W.B., Hantgan R.R., Cunningham C.C.* Tightly associated cardiolipin in the bovine heart mitochondrial ATP synthase as analyzed by <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance spectroscopy // *J Biol Chem.* – 1990. – 265, 32. – P.: 19434–19440.
216. *Elvitigala D.A., Priyathilaka T.T., Lim B.S., Whang I., Yeo S.Y., Choi C.Y., Lee J.* Molecular profile and functional characterization of the ferritin H subunit from rock bream (*Oplegnathus fasciatus*), revealing its putative role in host antioxidant and immune defense // *Dev Comp Immunol.* – 2014. – 47, 1. – P.: 104–114.
217. *Eski M., Ozer F., Firat C., Alhan D., Arslan N., Senturk T., Isik S.* Cerium nitrate treatment prevents progressive tissue necrosis in the zone of stasis following burn // *Burns.* – 2012. – 38, 2. – P.: 283–289.
218. *Esmaeili A., Sotoudeh E., Morshedi V., Bagheri D., Dorafshan S.* Effects of dietary supplementation of bovine lactoferrin on antioxidant status, immune response and disease resistance of yellowfin sea bream (*Acanthopagrus latus*) against *Vibrio harveyi* // *Fish Shellfish Immunol.* – 2019. – 93. – P.: 917–923.
219. *Eteshola E.O.U., Haupt D.A., Koos S.I., Siemer L.A., Morris D.L.* The role of metal ion binding in the antioxidant mechanisms of reduced and oxidized glutathione in metal-mediated oxidative DNA damage // *Metallomics.* – 2020. – 12, 1. – P.: 79–91.
220. *Fajardo V.A., Mikhaeil J.S., Leveille C.F., Saint C., LeBlanc P.J.* Cardiolipin content, linoleic acid composition, and tafazzin expression in response to skeletal muscle overload and unload stimuli // *Sci Rep.* – 2017. – 7, 1. – P. 2060.



221. Fan L., Jiang L., Du Z. Myeloid cell leukemia 1 (Mcl(-1)) protects against 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+) induced apoptosis in Parkinson's disease // *Metab Brain Dis.* – 2015. – 30, 5. – P.: 1269–1274.
222. Faridvand Y., Nozari S., Asoudeh-Fard A., Karimi M.A., Pezeshkian M., Safaie N., Nouri M. Bovine lactoferrin ameliorates antioxidant esterase activity and 8-isoprostane levels in high-cholesterol-diet fed rats // *Int J Vitam Nutr Res.* – 2017. – 87, 3-4. – P.: 201–206.
223. Fedorova G.F., Kancheva V.D., Menshov V.A., Naumov V.V., Vasil'ev R.F., Veprintsev T.L., Trofimov A.V., Tsaplev Y.B., Yablonskaya O.I. Chapter 11 – Exogenous and Endogenous Mediators of Oxygen Metabolism: Alternatives for Chemical and Biological Activity // *Studies in natural products chemistry.* – 2016. – 47. – P.: 357–385.
224. Fedorova G.F., Lapina V.A., Menshov V.A., Naumov V.V., Trofimov A.V., Tsaplev Y.B., Vasil'ev R.F., Yablonskaya O.I. Updating the Chemiluminescence Oxygen-Aftereffect Method for Determining the Rate Constant of the Peroxy-Radical Self-Reaction: Oxidation of Cyclohexene // *Photochem Photobiol.* – 2019. – 95, 3. – P.: 780–786.
225. Fedorova G.F., Menshov V.A., Trofimov A.V., Tsaplev Y.B., Vasil'ev R.F., Yablonskaya O.I. Chemiluminescence of Cigarette Smoke: Salient Features of the Phenomenon // *Photochem Photobiol.* – 2017. – 93, 2. – P.: 579–589.
226. Fedorova G.F., Menshov V.A., Trofimov A.V., Vasil'ev R.F. Facile chemiluminescence assay for antioxidative properties of vegetable lipids: fundamentals and illustrative examples // *Analyst.* – 2009. – 134, 10. – P.: 2128–2134.
227. Feniouk B.A., Skulachev V.P. Cellular and Molecular Mechanisms of Action of Mitochondria-Targeted Antioxidants // *Curr Aging Sci.* – 2017. – 10, 1. – P.: 41–48.
228. Fiala M. Curcumin and omega-3 fatty acids enhance NK cell-induced apoptosis of pancreatic cancer cells but curcumin inhibits interferon-gamma production: benefits of omega-3 with curcumin against cancer // *Molecules.* – 2015. – 20, 2. – P.: 3020–3026.
229. Fiedor J., Burda K. Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease // *Nutrients.* – 2014. – 6, 2. – P.: 466–488.
230. 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.

231. *Gaballah H.H., Zakaria S.S., Elbatsh M.M., Tahoon N.M.* Modulatory effects of resveratrol on endoplasmic reticulum stress-associated apoptosis and oxido-inflammatory markers in a rat model of rotenone-induced Parkinson's disease // *Chem Biol Interact.* – 2016. – 251. – P.: 10–16.

232. *Geffrotin C., Tricaud Y., Crechet F., Castelli M., Lefaix J.L., Vaiman M.* Unlike tenascin-X, tenascin-C is highly up-regulated in pig cutaneous and underlying muscle tissue developing fibrosis after necrosis induced by very high-dose gamma radiation // *Radiat Res.* – 1998. – 149, 5. – P.: 472–481.

233. *Ghosh M., Manna P., Sil P.C.* Protective role of a coumarin-derived schiff base scaffold against tertiary butyl hydroperoxide (TBHP)-induced oxidative impairment and cell death via MAPKs, NF-kappaB and mitochondria-dependent pathways // *Free Radic Res.* – 2011. – 45, 5. – P.: 620–637.

234. *Giampietri C., Starace D., Petrungaro S., Filippini A., Ziparo E.* Necroptosis: molecular signalling and translational implications // *Int J Cell Biol.* – 2014. – 2014. – P. 490275.

235. *Ginsburg I., Kohen R., Shalish M., Varon D., Shai E., Koren E.* The oxidant-scavenging abilities in the oral cavity may be regulated by a collaboration among antioxidants in saliva, microorganisms, blood cells and polyphenols: a chemiluminescence-based study // *PLoS One.* – 2013. – 8, 5. – P. e63062.

236. *Gomberg M.* On the possible existence of a class of bodies analogous to triphenylmethyl // *J Am Chem Soc.* – 1903. – 25, 12. – P.: 1274–1277.

237. *Gomberg M.* On trivalent carbon // *J Am Chem Soc.* – 1901. – 23, 7. – P.: 496–502.

238. *Gomberg M.* A survey of the chemistry of free radicals // *Journal of Chemical Education.* – 1932. – 9, 3. – P.: 439–451.

239. *Gomez B., Jr., Robinson N.C.* Phospholipase digestion of bound cardiolipin reversibly inactivates bovine cytochrome bc1 // *Biochemistry.* – 1999. – 38, 28. – P.: 9031–9038.

240. *Gottfredsen R.H., Larsen U.G., Enghild J.J., Petersen S.V.* Hydrogen peroxide induce modifications of human extracellular superoxide dismutase that results in enzyme inhibition // *Redox Biol.* – 2013. – 1. – P.: 24–31.

241. *Greenlee L., Fridovich I., Handler P.* Chemiluminescence induced by operation of iron-flavoproteins // *Biochemistry*. – 1962. – 1. – P.: 779–783.
242. *Gu R., Tang W., Lei B., Jiang C., Song F., Xu G.* Synthesized glucocorticoid-induced leucine zipper peptide inhibits photoreceptor apoptosis and protects retinal function in light-induced retinal degeneration model // *Clin Exp Ophthalmol*. – 2019. – 47, 5. – P.: 646–657.
243. *Haines T.H., Dencher N.A.* Cardiolipin: a proton trap for oxidative phosphorylation // *FEBS Lett*. – 2002. – 528, 1-3. – P.: 35–39.
244. *Halawa M.I., Wu F., Zafar M.N., Mostafa I.M., Abdussalam A., Han S., Xu G.* Turn-on fluorescent glutathione detection based on lucigenin and MnO<sub>2</sub> nanosheets // *J Mater Chem B*. – 2019. – 8(16). – P.: 3542–3549.
245. *Hamza R.Z., El-Shenawy N.S.* The beneficial effects of l-cysteine on brain antioxidants of rats affected by sodium valproate // *Hum Exp Toxicol*. – 2017. – 36, 11. – P.: 1212–1221.
246. *Hannan R.S., Boag J.W.* Effects of electronic irradiation on fats // *Nature*. – 1952. – 169, 4291. – P.: 152–153.
247. *Hannibal L., Tomasina F., Capdevila D.A., Demicheli V., Tó rtor V., Alvarez-Paggi D., Jemmerson R., Murgida D.H., Radi R.* Alternative Conformations of Cytochrome *c*: Structure, Function, and Detection // *Biochemistry*. – 2016. – 55. – P.: 407–428.
248. *He B., Chen W., Zeng J., Tong W., Zheng P.* MicroRNA-326 decreases tau phosphorylation and neuron apoptosis through inhibition of the JNK signaling pathway by targeting VAV1 in Alzheimer's disease // *J Cell Physiol*. – 2020. – 235, 1. – P.: 480–493.
249. *He H., Lu Y., Qi J., Zhu Q., Chen Z., Wu W.* Adapting liposomes for oral drug delivery // *Acta Pharm Sin B*. – 2019. – 9, 1. – P.: 36–48.
250. *Heineman W.R., Norris B.J., Goelz J.F.* Measurement of enzyme E'values by optically transparent thin layer electrochemical cells // *Anal Chem*. – 1975. – 47, 1. – P.: 79–84.
251. *Hofbauer S., Mlynek G., Milazzo L., Puhlinger D., Maresch D., Schaffner I., Furtmuller P.G., Smulevich G., et al.* Hydrogen peroxide-mediated conversion of

- coproheme to heme b by HemQ-lessons from the first crystal structure and kinetic studies // *Febs J.* – 2016. – 283, 23. – P.: 4386–4401.
252. *Hole E.O., Sagstuen E., Nelson W.H., Close D.M.* Free radical formation in X-irradiated crystals of 2'-deoxycytidine hydrochloride. Electron magnetic resonance studies at 10 K // *Radiat Res.* – 2000. – 153, 6. – P.: 823–834.
253. *Houle A., Techy F., Aghion J., Leblanc R.M.* Purification of cardiolipin for surface pressure studies // *J Lipid Res.* – 1982. – 23, 3. – P.: 496–502.
254. *Huang M.L., Chiang S., Kalinowski D.S., Bae D.H., Sahni S., Richardson D.R.* The Role of the Antioxidant Response in Mitochondrial Dysfunction in Degenerative Diseases: Cross-Talk between Antioxidant Defense, Autophagy, and Apoptosis // *Oxid Med Cell Longev.* – 2019. – P. 6392763.
255. *Huo X.Z., Wang X., Yang R., Qu L.B., Zeng H.J.* Studies on the effect of a Fupenzi glycoprotein on the fibrillation of bovine serum albumin and its antioxidant activity // *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* – 2020. – 237. – P. 118387.
256. *Hüttemann M., Pecina P., Rainbolt M., Sanderson T.H., Kagan V.E., Samavati L., Doan J.W., Lee I.* The multiple functions of cytochrome *c* and their regulation in life and death decisions of the mammalian cell: From respiration to apoptosis // *Mitochondrion.* – 2011. – 11, 3. – P.: 369–381.
257. *Ibrahim M.A., Eraqi M.M., Alfaiz F.A.* Therapeutic role of taurine as antioxidant in reducing hypertension risks in rats // *Heliyon.* – 2020. – 6, 1. – P. e03209.
258. *Ibuki F.K., Bergamaschi C.T., da Silva Pedrosa M., Nogueira F.N.* Effect of vitamin C and E on oxidative stress and antioxidant system in the salivary glands of STZ-induced diabetic rats // *Arch Oral Biol.* – 2020. – 116. – P. 104765.
259. *Irani K., Xia Y., Zweier J.L., Sollott S.J., Der C.J., Fearon E.R., Sundaresan M., Finkel T., Goldschmidt-Clermont P.J.* Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts // *Science.* – 1997. – 275, 5306. – P.: 1649–1652.
260. *Ivanova E., Angelova M., Slokoska L., Pashova S., Toshkova R., Dolashka-Angelova P., Dimitrova P., Voelter W.* Effect of Cu/Zn-superoxide dismutase from the fungal strain *Humicola lutea* 103 on antioxidant defense of Graffi tumor-bearing hamsters // *Z Naturforsch C J Biosci.* – 2002. – 57, 1-2. – P.: 197–204.

261. *Iverson S.L., Orrenius S.* The cardiolipin-cytochrome c interaction and the mitochondrial regulation of apoptosis // *Arch Biochem Biophys.* – 2004. – 423, 1. – P.: 37–46.
262. *Iwase H., Takatori T., Nagao M., Nijima H., Iwadate K., Matsuda Y., Kobayashi M.* Formation of keto and hydroxy compounds of linoleic acid in submitochondrial particles of bovine heart // *Free Radic Biol Med.* – 1998. – 24, 9. – P.: 1492–1503.
263. *Ji X., Wang W., Li X., Chen Y., Ding C.* Enhanced chemiluminescence detection of glutathione based on isoluminol-PSM nanoparticles probe // *Talanta.* – 2016. – 150. – P.: 666–670.
264. *Jiang J., Bakan A., Kapralov A.A., Silva K.I., Huang Z., Amoscato A.A., Peterson J., Garapati V.K., et al.* Designing inhibitors of cytochrome c/cardiolipin peroxidase complexes: mitochondria-targeted imidazole-substituted fatty acids // *Free Radic Biol Med.* – 2014. – 71. – P.: 221–230.
265. *Jiang J., Wang B., Li J., Ye B., Lin S., Qian W., Shan L., Efferth T.* Total coumarins of *Hedyotis diffusa* induces apoptosis of myelodysplastic syndrome SKM-1 cells by activation of caspases and inhibition of PI3K/Akt pathway proteins // *J Ethnopharmacol.* – 2017. – 196. – P.: 253–260.
266. *Jorgensen I., Miao E.A.* Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens // *Immunol Rev.* – 2015. – 265, 1. – P.: 130–142.
267. *Josephs T.M., Morison I.M., Day C.L., Wilbanks S.M., Ledgerwood E.C.* Enhancing the peroxidase activity of cytochrome c by mutation of residue 41: implications for the peroxidase mechanism and cytochrome c release // *Biochem J.* – 2014. – 458, 2. – P.: 259–265.
268. *Kagan V.E., Bayir A., Bayir H., Stoyanovsky D., Borisenko G.G., Tyurina Y.Y., Wipf P., Atkinson J., et al.* Mitochondria-targeted disruptors and inhibitors of cytochrome c/cardiolipin peroxidase complexes: a new strategy in anti-apoptotic drug discovery // *Mol Nutr Food Res.* – 2009. – 53, 1. – P.: 104–114.
269. *Kagan V.E., Borisenko G.G., Tyurina Y.Y., Tyurin V.A., Jiang J., Potapovich A.I., Kini V., Amoscato A.A., Fujii Y.* Oxidative lipidomics of apoptosis: redox catalytic interactions of cytochrome c with cardiolipin and phosphatidylserine // *Free Radic Biol Med.* – 2004. – 37, 12. – P.: 1963–1985.

270. Kagan V.E., Tyurin V.A., Jiang J., Tyurina Y.Y., Ritov V.B., Amoscato A.A., Osipov A.N., Belikova N.A., et al. Cytochrome *c* acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors // *Nature Chem Biol.* – 2005. – 1. – P.: 223–232.
271. Kalpage H.A., Bazyljanska V., Recanati M.A., Fite A., Liu J., Wan J. et al. Tissue-specific regulation of cytochrome *c* by post-translational modifications: respiration, the mitochondrial membrane potential, ROS, and apoptosis // *Faseb J.* – 2019. – 33, 2. – P.: 1540–1553.
272. Keilin D. Cytochrome and intracellular oxidase // *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Containing Papers of a Biological Character.* – 1930. – 106, 746. – P.: 418–444.
273. Keilin D. On Cytochrome, a Respiratory Pigment, Common to Animals, Yeast, and Higher Plants // *Proc R Soc Lond B.* – 1925. – 98. – P.: 312–339.
274. Ken C.F., Lin C.T., Shaw J.F., Wu J.L. Characterization of fish Cu/Zn-superoxide dismutase and its protection from oxidative stress // *Mar Biotechnol (NY).* – 2003. – 5, 2. – P.: 1671–1673.
275. Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics // *Br J Cancer.* – 1972. – 26, 4. – P.: 239–257.
276. Khosravifar F., Dehghan G., Bidoki S.K., Mahdavi M. DNA-binding activity and cytotoxic and cell-cycle arrest properties of some new coumarin derivatives: a multispectral and computational investigation // *Luminescence.* – 2020. – 35, 1. – P.: 98–106.
277. Kiebish M.A., Han X., Cheng H., Chuang J.H., Seyfried T.N. Cardiolipin and electron transport chain abnormalities in mouse brain tumor mitochondria: lipidomic evidence supporting the Warburg theory of cancer // *J Lipid Res.* – 2008. – 49, 12. – P.: 2545–2556.
278. Kim G.J., Kim H.J. Doubly activated coumarin as a colorimetric and fluorescent chemodosimeter for cyanide // *Tetrahedron Letters.* – 2010. – 51, 10. – P.: 185–187.
279. Kim S., Lim H.B. Chemiluminescence immunoassay using magnetic nanoparticles with targeted inhibition for the determination of ochratoxin A // *Talanta.* – 2015. – 140. – P.: 183–188.

280. Kim Y.J., Somers D.E. Luciferase-Based Screen for Post-translational Control Factors in the Regulation of the Pseudo-Response Regulator PRR7 // *Front Plant Sci.* – 2019. – 10. – P. 667.
281. Kishikawa N., El-Maghrabey M., Nagamune Y., Nagai K., Ohyama K., Kuroda N. A Smart Advanced Chemiluminescence-Sensing Platform for Determination and Imaging of the Tissue Distribution of Natural Antioxidants // *Anal Chem.* – 2020.
282. Koppenol W.H., Margoliash E. The asymmetric distribution of charges on the surface of horse cytochrome *c*. Functional implications // *J Biol Chem.* – 1982. – 257, 8. – P.: 4426–4437.
283. Kraffe E., Soudant P., Marty Y., Kervarec N. Docosaehaenoic acid- and eicosapentaenoic acid-enriched cardiolipin in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* // *Lipids.* – 2005. – 40, 6. – P.: 619–625.
284. Krasowska A., Piasecki A., Murzyn A., Sigler K. Assaying the antioxidant and radical scavenging properties of aliphatic mono- and di-N-oxides in superoxide dismutase-deficient yeast and in a chemiluminescence test // *Folia Microbiol (Praha).* – 2007. – 52, 1. – P.: 45–51.
285. Krishna U.M., Ahmad M.U., Ali S.M., Ahmad I. A short, concise route to diphosphatidylglycerol (cardiolipin) and its variants // *Lipids.* – 2004. – 39, 6. – P.: 595–600.
286. Krishnamurthy K., Febres-Aldana C.A., Imperatore K., Sriganeshan V., Poppiti R. Neutrophil extracellular traps and NETosis: a report of two autopsies and review of literature // *Blood Coagul Fibrinolysis.* – 2020. – 31, 1. – P.: 92–96.
287. Kumar D., Budachetri K., Meyers V.C., Karim S. Assessment of tick antioxidant responses to exogenous oxidative stressors and insight into the role of catalase in the reproductive fitness of the Gulf Coast tick, *Amblyomma maculatum* // *Insect Mol Biol.* – 2016. – 25, 3. – P.: 283–294.
288. Kumar R.R., Dubey K., Goswami S., Hasija S., Pandey R., Singh P.K. et al. Heterologous expression and characterization of novel manganese superoxide dismutase (Mn-SOD) – A potential biochemical marker for heat stress-tolerance in wheat (*Triticum aestivum*) // *Int J Biol Macromol.* – 2020.

289. Kumar S.S., Shankar B., Sainis K.B. Effect of chlorophyllin against oxidative stress in splenic lymphocytes in vitro and in vivo // *Biochim Biophys Acta.* – 2004. – 1672, 2. – P.: 100–111.
290. Lagoa R., Samhan-Arias A.K., Gutierrez-Merino C. Correlation between the potency of flavonoids for cytochrome *c* reduction and inhibition of cardiolipin-induced peroxidase activity // *Biofactors.* – 2017. – 43, 3. – P.: 451–468.
291. Lan W., Wang Z., Yang Z., Ying T., Zhang X., Tan X., Liu M., Cao C., Huang Z.X. Structural basis for cytochrome *c* Y67H mutant to function as a peroxidase // *PLoS One.* – 2014. – 9, 9. – P. e107305.
292. Lan Y., Yuan F., Fereja T.H., Wang C., Lou B., Li J., Xu G. Chemiluminescence of Lucigenin/Riboflavin and Its Application for Selective and Sensitive Dopamine Detection // *Anal Chem.* – 2019. – 91, 3. – P.: 2135–2139.
293. Lee H.J., Han J.H., Park Y.K., Kang M.H. Effects of glutathione s-transferase (GST) M1 and T1 polymorphisms on antioxidant vitamins and oxidative stress-related parameters in Korean subclinical hypertensive subjects after kale juice (*Brassica oleracea acephala*) supplementation // *Nutr Res Pract.* – 2018. – 12, 2. – P.: 118–128.
294. Lee J., Muller F., Visser A. The Sensitized Bioluminescence Mechanism of Bacterial Luciferase // *Photochem Photobiol.* – 2019. – 95, 3. – P.: 679–704.
295. Lehoux M., Jacques A., Lusignan S., Lamontagne L. Murine viral hepatitis involves NK cell depletion associated with virus-induced apoptosis // *Clin Exp Immunol.* – 2004. – 137, 1. – P.: 41–51.
296. Lei G., Zhang Y., Koppula P., Liu X., Zhang J., Lin S.H., Ajani J.A., Xiao Q., et al. The role of ferroptosis in ionizing radiation-induced cell death and tumor suppression // *Cell Res.* – 2020. – 30. – P.: 146–162.
297. Lepeschkin W.W. Necrobiotic Rays // *Science.* – 1932. – 76, 1964. – P. 168.
298. Lepeschkin W.W. Supplement to the Note on Necrobiotic Rays // *Science.* – 1932. – 76, 1975. – P. 409.
299. Li F., Ma W., Liu J., Wu X., Wang Y., He J. Luminol, horseradish peroxidase, and glucose oxidase ternary functionalized graphene oxide for ultrasensitive glucose sensing // *Anal Bioanal Chem.* – 2018. – 410, 2. – P.: 543–552.



300. Li J., Shi W., Sun H., Ji Y., Chen Y., Guo X., Sheng H., Shu J., et al. Activation of DR3 signaling causes loss of ILC3s and exacerbates intestinal inflammation // *Nat Commun.* – 2019. – 10, 1. – P. 3371.
301. Li M., Mandal A., Tyurin V.A., DeLucia M., Ahn J., Kagan V.E., van der Wel P.C.A. Surface-Binding to Cardiolipin Nanodomains Triggers Cytochrome *c* Pro-apoptotic Peroxidase Activity via Localized Dynamics // *Structure.* – 2019. – 27, 5. – P.: 806–815.
302. Liang X.G., Chen B., Shao L.X., Cheng J., Huang M.Z., Chen Y., Hu Y.Z., Han Y.F., et al. A Fluorogenic Probe for Ultrafast and Reversible Detection of Formaldehyde in Neurovascular Tissues // *Theranostics.* – 2017. – 7, 8. – P.: 2305–2313.
303. Liang X.G., Cheng J., Qin S., Shao L.X., Huang M.Z., Wang G., Han Y., Han F., Li X. Conformational restraint as a strategy for navigating towards lysosomes // *Chem Commun (Camb).* – 2018. – 54, 85. – P.: 12010–12013.
304. Lissi E.A., Caceres T., Videla L.A. Visible chemiluminescence from rat brain homogenates undergoing autoxidation. II. Kinetics of the luminescence decay // *Free Radic Biol Med.* – 1988. – 4, 2. – P.: 93–97.
305. Liu J., Wang L., Zhang Y., Li S., Sun F., Wang G., Yang T., Wei D., et al. Induction of entosis in prostate cancer cells by nintedanib and its therapeutic implications // *Oncol Lett.* – 2019. – 17, 3. – P.: 3151–3162.
306. Liu J.D., Liu W.B., Zhang C.Y., Xu C.Y., Zheng X.C., Zhang D.D., Chi C. Dietary glutathione supplementation enhances antioxidant activity and protects against lipopolysaccharide-induced acute hepatopancreatic injury and cell apoptosis in Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* // *Fish Shellfish Immunol.* – 2020. – 97. – P.: 440–454.
307. Liu K., Qin Y.H., Yu J.Y., Ma H., Song X.L. 3-beta-Epsilonrythrodiol isolated from *Conyza canadensis* inhibits MKN45 human gastric cancer cell proliferation by inducing apoptosis, cell cycle arrest, DNA fragmentation, ROS generation and reduces tumor weight and volume in mouse xenograft model // *Oncol Rep.* – 2016. – 35, 4. – P.: 2328–2338.
308. Liu X., Kim C.N., Yang J., Jemmerson R., Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome *c* // *Cell.* – 1996. – 86, 1. – P.: 147–157.
309. Login C.C., Baldea I., Tipericiuc B., Benedec D., Vodnar D.C., Decea N., Suciuc S. A Novel Thiazolyl Schiff Base: Antibacterial and Antifungal Effects and In Vitro

- Oxidative Stress Modulation on Human Endothelial Cells // *Oxid Med Cell Longev.* – 2019. – 2019. – P. 1607903.
310. *Lorenzo H.K., Susin S.A.* Mitochondrial effectors in caspase-independent cell death // *FEBS Lett.* – 2004. – 557, 1-3. – P.: 14–20.
311. *Luci G., Intorre L., Ferruzzi G., Mani D., Giuliotti L., Pretti C., Tognetti R., Bertini S., Meucci V.* Determination of ochratoxin A in tissues of wild boar (*Sus scrofa L.*) by enzymatic digestion (ED) coupled to high-performance liquid chromatography with a fluorescence detector (HPLC-FLD) // *Mycotoxin Res.* – 2018. – 34, 1. – P.: 1–8.
312. *Luntz T.L., Schejter A., Garber E.A., Margoliash E.* Structural significance of an internal water molecule studied by site-directed mutagenesis of tyrosine-67 in rat cytochrome *c* // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1989. – 86, 10. – P.: 3524–3528.
313. *Ma Q., Ma H., Wang Z., Su M., Xiao H., Liang S.* Synthesis of a novel chemiluminescent reagent for the determination of hydrogen peroxide in snow waters // *Talanta.* – 2001. – 53, 5. – P.: 983–990.
314. *Malejko J., Nalewajko-Sieliwoniuk E., Szabunko J., Nazaruk J.* Ultra-high Performance Liquid Chromatography with Photodiode Array and Chemiluminescence Detection for the Determination of Polyphenolic Antioxidants in *Erigeron acris L.* Extracts // *Phytochem Anal.* – 2016. – 27, 5. – P.: 277–283.
315. *Mandal A., Hoop C.L., DeLucia M., Kodali R., Kagan V.E., Ahn J., van der Wel P.C.* Structural Changes and Proapoptotic Peroxidase Activity of Cardiolipin-Bound Mitochondrial Cytochrome *c* // *Biophys J.* – 2015. – 109, 9. – P.: 1873–1884.
316. *Mandl J., Szarka A., Banhegyi G.* Vitamin C: update on physiology and pharmacology // *Br J Pharmacol.* – 2009. – 157, 7. – P.: 1097–1110.
317. *Mangham B., Hanson-Heine M.W.D., Davies E.S., Wriglesworth A., George M.W., Lewis W., Kays D.L., McMaster J., et al.* Influence of molecular design on radical spin multiplicity: characterisation of BODIPY dyad and triad radical anions // *Phys Chem Chem Phys.* – 2020. – 22, 8. – P.: 4429–4438.
318. *Mano J.* Reactive carbonyl species: their production from lipid peroxides, action in environmental stress, and the detoxification mechanism // *Plant Physiol Biochem.* – 2012. – 59. – P.: 90–97.
319. *Martin-Fernandez B., Gredilla R.* Mitochondrial oxidative stress and cardiac ageing // *Clin Investig Arterioscler.* – 2018. – 30, 2. – P.: 74–83.

320. Maxwell I.H., Maxwell F., Glode L.M. Regulated expression of a diphtheria toxin A-chain gene transfected into human cells: possible strategy for inducing cancer cell suicide // *Cancer Res.* – 1986. – 46, 9. – P.: 4660–4664.
321. Mayer M., Takegami S., Neumeier M., Rink S., Jacobi von Wangelin A., Schulte S., Vollmer M., Griesbeck A.G., et al. Electrochemiluminescence Bioassays with a Water-Soluble Luminol Derivative Can Outperform Fluorescence Assays // *Angew Chem Int Ed Engl.* – 2018. – 57, 2. – P.: 408–411.
322. Mayne B.C. Chemiluminescence of chloroplasts // *Brookhaven Symp Biol.* – 1966. – 19. – P.: 460–466.
323. McDermott G.P., Conlan X.A., Noonan L.K., Costin J.W., Mnatsakanyan M., Shalliker R.A., Barnett N.W., Francis P.S. Screening for antioxidants in complex matrices using high performance liquid chromatography with acidic potassium permanganate chemiluminescence detection // *Anal Chim Acta.* – 2011. – 684, 1-2. – P.: 134–141.
324. Meier B., Radeke H.H., Selle S., Habermehl G.G., Resch K., Sies H. Human fibroblasts release low amounts of reactive oxygen species in response to the potent phagocyte stimulants, serum-treated zymosan, N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine, leukotriene B4 or 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate // *Biol Chem Hoppe Seyler.* – 1990. – 371, 10. – P.: 1021–1025.
325. Meng S., Chanda P., Thandavarayan R.A., Cooke J.P. Transflammation: How Innate Immune Activation and Free Radicals Drive Nuclear Reprogramming // *Antioxid Redox Signal.* – 2018. – 29, 2. – P.: 205–218.
326. Mert U., Adawy A., Scharff E., Teichmann P., Willms A., Haselmann V., Colmorgen C., Lemke J., et al. TRAIL Induces Nuclear Translocation and Chromatin Localization of TRAIL Death Receptors // *Cancers (Basel).* – 2019. – 11, 8. – P. 1167.
327. Milazzo L., Tognaccini L., Howes B.D., Sinibaldi F., Piro M.C., Fittipaldi M., Baratto M.C., Pogni R., et al. Unravelling the Non-Native Low-Spin State of the Cytochrome *c*-Cardiolipin Complex: Evidence of the Formation of a His-Ligated Species Only // *Biochemistry.* – 2017. – 56, 13. – P.: 1887–1898.
328. Miller D.L., Li P., Dou C., Armstrong W.F., Gordon D. Evans blue staining of cardiomyocytes induced by myocardial contrast echocardiography in rats: evidence for necrosis instead of apoptosis // *Ultrasound Med Biol.* – 2007. – 33, 12. – P.: 1988–1996.

329. Miller G.W., Labut E.M., Lebold K.M., Floeter A., Tanguay R.L., Traber M.G. Zebrafish (*Danio rerio*) fed vitamin E-deficient diets produce embryos with increased morphologic abnormalities and mortality // *J Nutr Biochem.* – 2012. – 23, 5. – P.: 478–486.
330. Mognol G.P., Carneiro F.R., Robbs B.K., Faget D.V., Viola J.P. Cell cycle and apoptosis regulation by NFAT transcription factors: new roles for an old player // *Cell Death Dis.* – 2016. – 7. – P. e2199.
331. Mohammadyani D., Yanamala N., Samhan-Arias A.K., Kapralov A.A., Stepanov G., Nuar N., Planas-Iglesias J., Sanghera N., et al. Structural characterization of cardiolipin-driven activation of cytochrome *c* into a peroxidase and membrane perturbation // *Biochim Biophys Acta Biomembr.* – 2018. – 1860, 5. – P.: 1057–1068.
332. Mostafa I.M., Halawa M.I., Chen Y., Abdussalam A., Guan Y., Xu G. Silicotungstic acid as a highly efficient coreactant for luminol chemiluminescence for sensitive detection of uric acid // *Analyst.* – 2020.
333. Mueller S., Arnhold J. Fast and sensitive chemiluminescence determination of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration in stimulated human neutrophils // *J Biolumin Chemilumin.* – 1995. – 10, 4. – P.: 229–237.
334. Muhleip A., McComas S.E., Amunts A. Structure of a mitochondrial ATP synthase with bound native cardiolipin // *Elife.* – 2019. – 8.
335. Munoz M., Rosso M., Covenas R. The NK-1 receptor antagonist L-732,138 induces apoptosis in human gastrointestinal cancer cell lines // *Pharmacol Rep.* – 2017. – 69, 4. – P.: 696–701.
336. Nagababu E., Rifkind J.M. Formation of fluorescent heme degradation products during the oxidation of hemoglobin by hydrogen peroxide // *Biochem Biophys Res Commun.* – 1998. – 247, 3. – P.: 592–596.
337. Naik G.H., Priyadarsini K.I., Naik D.B., Gangabthagirathi R., Mohan H. Studies on the aqueous extract of Terminalia chebula as a potent antioxidant and a probable radioprotector // *Phytomedicine.* – 2004. – 11, 6. – P.: 530–538.
338. Nakazono M., Oshikawa Y., Nakamura M., Kubota H., Nanbu S. Strongly Chemiluminescent Acridinium Esters under Neutral Conditions: Synthesis, Properties, Determination, and Theoretical Study // *J Org Chem.* – 2017. – 82, 5. – P.: 2450–2461.

339. Nalsen C., Ohrvall M., Kamal-Eldin A., Vessby B. Plasma antioxidant capacity among middle-aged men: the contribution of uric acid // *Scand J Clin Lab Invest.* – 2006. – 66, 3. – P.: 239–248.
340. Neha K., Haider M.R., Pathak A., Yar M.S. Medicinal prospects of antioxidants: A review // *Eur J Med Chem.* – 2019. – 178. – P.: 687–704.
341. Nelson M.J., Seitz S.P. The structure and function of lipoxygenase // *Curr Opin Struct Biol.* – 1994. – 4, 6. – P.: 878–884.
342. Nishikido T., Oyama J., Shiraki A., Komoda H., Node K. Deletion of Apoptosis Inhibitor of Macrophage (AIM)/CD5L Attenuates the Inflammatory Response and Infarct Size in Acute Myocardial Infarction // *J Am Heart Assoc.* – 2016. – 5, 4.
343. Niu Q., Mendenhall G.D. Structural effects on the yields of singlet molecular oxygen ( $^1\Delta_g\text{O}_2$ ) from alkylperoxyl radical recombination // *J Am Chem Soc.* – 1990. – 112, 4. – P.: 1656–1657.
344. Ogawa Y. Glutathione peroxidase 4, a unique antioxidant enzyme, plays a role in protecting ocular surface mucosal epithelia // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2015. – 56, 3. – P. 1657.
345. Ohman K.T., Sagstuen E. Free radical conformations and conversions in X-irradiated single crystals of L-cysteic acid by electron magnetic resonance and density functional theory studies // *J Phys Chem A.* – 2008. – 112, 18. – P.: 4284–4293.
346. Osorio E., Perez E.G., Areche C., Ruiz L.M., Cassels B.K., Florez E., Tiznado W. Why is quercetin a better antioxidant than taxifolin? Theoretical study of mechanisms involving activated forms // *J Mol Model.* – 2013. – 19, 5. – P.: 2165–2172.
347. Ouyang F., Yu T., Gu C., Wang G., Shi R., Lv R., Wu E., Ma C., et al. Sensitive detection of caspase-3 enzymatic activities and inhibitor screening by mass spectrometry with dual maleimide labelling quantitation // *Analyst.* – 2019. – 144. – P.: 6751–6759.
348. Ozgur E., Guler G., Seyhan N. Mobile phone radiation-induced free radical damage in the liver is inhibited by the antioxidants N-acetyl cysteine and epigallocatechin-gallate // *Int J Radiat Biol.* – 2010. – 86, 11. – P.: 935–945.
349. Pantano D.A., Sonoda M.T., Skaf M.S., Laria D. Solvation of coumarin 314 at water/air interfaces containing anionic surfactants. I. Low coverage // *J Phys Chem B.* – 2005. – 109, 15. – P.: 7365–7372.

350. Patil V.A., Fox J.L., Gohil V.M., Winge D.R., Greenberg M.L. Loss of cardiolipin leads to perturbation of mitochondrial and cellular iron homeostasis // *J Biol Chem.* – 2013. – 288, 3. – P.: 1696–1705.
351. Patil V.A., Greenberg M.L. Cardiolipin-mediated cellular signaling // *Adv Exp Med Biol.* – 2013. – 991. – P.: 195–213.
352. Patil V.A., Li Y., Ji J., Greenberg M.L. Loss of the mitochondrial lipid cardiolipin leads to decreased glutathione synthesis // *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* – 2019. – 1865, 2. – P. 158542.
353. Pebrianti, Idris I., Arifuddin S. The difference of enzymatic antioxidant serum content of catalase on placental blood of low born body weight babies and normal born weight babies // *Enferm Clin.* – 2020. – 30 Suppl 2. – P.: 361–365.
354. Perez-Galvez A., Viera I., Roca M. Carotenoids and Chlorophylls as Antioxidants // *Antioxidants (Basel).* – 2020. – 9, 6. – P. 505.
355. Piguet P.F., Vassalli P. Rejection of allo-or xenografts of lymphoid cells by nude mice: T cell suicide as a result of cooperation between histoincompatible T and B cells // *J. Immunol.* – 1978. – 120, 1. – P.: 79–85.
356. Piryazev A.P., Azizova O.A., Aseichev A.V., Dudnik L.B., Sergienko V.I. Effect of gold nanoparticles on production of reactive oxygen species by human peripheral blood leukocytes stimulated with opsonized zymosan // *Bull Exp Biol Med.* – 2013. – 156, 1. – P.: 101–103.
357. Pletneva E.V., Gray H.B., Winkler J.R. Nature of the cytochrome *c* molten globule // *J Am Chem Soc.* – 2005. – 127, 44. – P.: 15370–15371.
358. Pollet E., Martinez J.A., Metha B., Watts B.P., Jr., Turrens J.F. Role of tryptophan oxidation in peroxynitrite-dependent protein chemiluminescence // *Arch Biochem Biophys.* – 1998. – 349, 1. – P.: 74–80.
359. Posthaus H., Kittl S., Tarek B., Bruggisser J. *Clostridium perfringens* type C necrotic enteritis in pigs: diagnosis, pathogenesis, and prevention // *J Vet Diagn Invest.* – 2020. – P. 1040638719900180.
360. Poulos T.L., Kraut J. A hypothetical model of the cytochrome *c* peroxidase . cytochrome *c* electron transfer complex // *J Biol Chem.* – 1980. – 255, 21. – P.: 10322–10330.

361. *Pringsheim P.* Fluorescence and Phosphorescence / – New York and London: Interscience Publ., 1949. – 794 p.
362. *Proneth B., Conrad M.* Ferroptosis and necroinflammation, a yet poorly explored link // *Cell Death Differ.* – 2019. – 26, 1. – P.: 14–24.
363. *Quaresma J.A., Barros V.L., Pagliari C., Fernandes E.R., Guedes F., Takakura C.F., Andrade H.F., Jr., Vasconcelos P.F., Duarte M.I.* Revisiting the liver in human yellow fever: virus-induced apoptosis in hepatocytes associated with TGF-beta, TNF-alpha and NK cells activity // *Virology.* – 2006. – 345, 1. – P.: 22–30.
364. *Reddy B.R., Venkateswarlu P.* Optical phase conjugation in polycarbonate resin doped with Coumarin 314 dye // *Appl Opt.* – 1993. – 32, 21. – P.: 3966–3968.
365. *Rembish S.J., Trush M.A.* Further evidence that lucigenin-derived chemiluminescence monitors mitochondrial superoxide generation in rat alveolar macrophages // *Free Radic Biol Med.* – 1994. – 17, 2. – P.: 117–126.
366. *Ren Z., Chen S., Guo L.* Methods for Establishing and Using a Stable Cell Line Expressing Both Gaussia Luciferase and Firefly Luciferase to Screen for Endoplasmic Reticulum Stress // *Methods Mol Biol.* – 2020. – 2102. – P.: 531–555.
367. *Riaz S.M., Aksel Bjune G., Wiker H.G., Sviland L., Mustafa T.* Mycobacterial antigens accumulation in foamy macrophages in murine pulmonary tuberculosis lesions: association with necrosis and making of cavities // *Scand J Immunol.* – 2020. – P. e12866.
368. *Riso P., Del Bo C., Vendrame S., Brusamolino A., Martini D., Bonacina G., Porrini M.* Modulation of plasma antioxidant levels, glutathione S-transferase activity and DNA damage in smokers following a single portion of broccoli: a pilot study // *J. Sci Food Agric.* – 2014. – 94, 3. – P.: 522–528.
369. *Rocquelin G., Guenot L., Astorg P.O., David M.* Phospholipid content and fatty acid composition of human heart // *Lipids.* – 1989. – 24, 9. – P.: 775–780.
370. *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.
371. *Rosas-Diaz M., Camarillo-Cadena M., Hernandez-Arana A., Ramon-Gallegos E., Medina-Navarro R.* Antioxidant capacity and structural changes of human serum albumin

- from patients in advanced stages of diabetic nephropathy and the effect of the dialysis // *Mol Cell Biochem.* – 2015. – 404, 1-2. – P.: 193–201.
372. Roux S., Lambert-Comeau P., Saint-Pierre C., Lepine M., Sawan B., Parent J.L. Death receptors, Fas and TRAIL receptors, are involved in human osteoclast apoptosis // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2005. – 333, 1. – P.: 42–50.
373. Ruottinen M., Kuosmanen V., Saimanen I., Kaaronen V., Rahkola D., Holopainen A., Selander T., Kokki H., et al. The Rectus Sheath Block (RSB) Analgesia Following Laparotomy Could Affect Malonaldehyde (MDA) Concentrations in Benign Disease and Cancer // *Anticancer Res.* – 2020. – 40, 1. – P.: 253–259.
374. Russell G.A. Deuterium-isotope Effects in the Autoxidation of Alkyl Hydrocarbons. Mechanism of the Interaction of Peroxy Radicals // *J Am Chem Soc.* – 1957. – 79(14). – P.: 3871–3877.
375. Saleh L., Plieth C. Total low-molecular-weight antioxidants as a summary parameter, quantified in biological samples by a chemiluminescence inhibition assay // *Nat Protoc.* – 2010. – 5, 10. – P.: 1627–1634.
376. Salehi N., Moosavi-Movahedi A.A., Fotouhi L., Yousefinejad S., Shourian M., Hosseinzadeh R., Sheibani N., Habibi-Rezaei M. Heme degradation upon production of endogenous hydrogen peroxide via interaction of hemoglobin with sodium dodecyl sulfate // *J Photochem Photobiol B.* – 2014. – 133. – P.: 11–17.
377. Santos-Sánchez N.F., Salas-Coronado R., Villanueva-Cañongo C., Hernández-Carlos B. Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism. Antioxidants (Basel): IntechOpen; 2019. P.: 74–81.
378. Saqib M., Qi L., Hui P., Nsabimana A., Halawa M.I., Zhang W., Xu G. Development of luminol-N-hydroxyphthalimide chemiluminescence system for highly selective and sensitive detection of superoxide dismutase, uric acid and Co(2) // *Biosens Bioelectron.* – 2018. – 99. – P.: 519–524.
379. Schlame M. Cardiolipin synthesis for the assembly of bacterial and mitochondrial membranes // *J Lipid Res.* – 2008. – 49, 8. – P.: 1607–1620.
380. Schlame M., Ren M., Xu Y., Greenberg M.L., Haller I. Molecular symmetry in mitochondrial cardiolipins // *Chem Phys Lipids.* – 2005. – 138, 1-2. – P.: 38–49.
381. Seibt T.M., Proneth B., Conrad M. Role of GPX4 in ferroptosis and its pharmacological implication // *Free Radic Biol Med.* – 2019. – 133. – P.: 144–152.



382. Serra V., von Zglinicki T., Lorenz M., Saretzki G. Extracellular superoxide dismutase is a major antioxidant in human fibroblasts and slows telomere shortening // *J Biol Chem.* – 2003. – 278, 9. – P.: 6824–6830.
383. Shakeri R., Kheirollahi A., Davoodi J. Apaf-1: Regulation and function in cell death // *Biochimie.* – 2017. – 135. – P.: 111–125.
384. Shakour-Shahabi L., Abbasali-Zadeh S., Rashtchi-Zadeh N. Serum level and antioxidant activity of ceruloplasmin in preeclampsia // *Pak J Biol Sci.* – 2010. – 13, 13. – P.: 621–627.
385. Sharov V.S., Briviba K., Sies H. Assessment of the C-525 laser dye as a chemiluminescence sensitizer for lipid peroxidation in biological membranes: a comparison with chlorophyll-*a* // *Free Radic Biol Med.* – 1996. – 21, 6. – P.: 833–843.
386. Sharov V.S., Driomina E.S., Vladimirov Y.A. Two processes responsible for chemiluminescence development in the course of iron-mediated lipid peroxidation // *J. Biolumin Chemilumin.* – 1996. – 11, 2. – P.: 91–98.
387. Shaw S., Rubin K.P., Lieber C.S. Depressed hepatic glutathione and increased diene conjugates in alcoholic liver disease. Evidence of lipid peroxidation // *Dig Dis Sci.* – 1983. – 28, 7. – P.: 585–589.
398. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants // *Exp Physiol.* – 1997. – 82, 2. – P.: 291–295.
389. Sinclair A.J. Diene conjugates // *J Am Geriatr Soc.* – 1991. – 39, 12. – P. 1242.
390. Singh H., Pritchard E.T. Factors affecting the thiobarbituric acid (TBA) test for lipid peroxidation in rat tissue homogenates // *Can J Biochem Physiol.* – 1962. – 40. – P.: 317–318.
391. Sitarek P., Skala E., Toma M., Wielanek M., Szemraj J., Nieborowska-Skorska M., Kolasa M., Skorski T., et al. A preliminary study of apoptosis induction in glioma cells via alteration of the Bax/Bcl-2-p53 axis by transformed and non-transformed root extracts of *Leonurus sibiricus* L // *Tumour Biol.* – 2016. – 37(7). – P.: 8753–8764.
392. Skulachev V.P. Why are mitochondria involved in apoptosis? Permeability transition pores and apoptosis as selective mechanisms to eliminate superoxide-producing mitochondria and cell // *FEBS Lett.* – 1996. – 397, 1. – P.: 7–10.

393. Slavova-Kazakova A.K., Angelova S.E., Veprintsev T.L., Denev P., Fabbri D., Dettori M.A., Kratchanova M., Naumov V.V., et al. Antioxidant potential of curcumin-related compounds studied by chemiluminescence kinetics, chain-breaking efficiencies, scavenging activity (ORAC) and DFT calculations // *Beilstein Journal of Organic Chemistry*. – 2015. – 11. – P.: 1398–1411.
394. Stegmann S., Werner J.M., Kuhl S., Rohn G., Krischek B., Stavrinou P., Goldbrunner R., Timmer M. Death Receptor 6 (DR6) Is Overexpressed in Astrocytomas // *Anticancer Res.* – 2019. – 39, 5. – P.: 2299–2306.
395. Stjernholm R.L., Allen R.C., Steele R.H., Waring W.W., Harris J.A. Impaired chemiluminescence during phagocytosis of opsonized bacteria // *Infect Immun.* – 1973. – 7, 2. – P.: 313–314.
396. Storch J., Ferber E. Detergent-amplified chemiluminescence of lucigenin for determination of superoxide anion production by NADPH oxidase and xanthine oxidase // *Anal Biochem.* – 1988. – 169, 2. – P.: 262–267.
397. Strasser A., Grumont R.J., Stanley M.L., Gerondakis S. The transcriptional regulator Rel is essential for antigen receptor-mediated stimulation of mature T cells but dispensable for positive and negative selection of thymocytes and T cell apoptosis // *Eur J Immunol.* – 1999. – 29, 3. – P.: 928–935.
398. Sugiyama K., Highet R.J., Woods A., Cotter R.J., Osawa Y. Hydrogen peroxide-mediated alteration of the heme prosthetic group of metmyoglobin to an iron chlorin product: evidence for a novel oxidative pathway // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1997. – 94, 3. – P.: 796–801.
399. Sumner J.P., Pucheu-Haston C.M., Fowlkes N., Merchant S. Dorsal skin necrosis secondary to a solar-induced thermal burn in a brown-coated dachshund // *Can Vet J.* – 2016. – 57, 3. – P.: 305–308.
400. Sun S., Xu S., Xu Y., Guo L., Liu H., Yang L., Wang Z. Chemiluminescence quenching microarrays for high throughput screening of antioxidants and its application in evaluating herbal extracts and pure compounds // *Anal Chim Acta.* – 2019. – 1046. – P.: 148–153.
401. Susin S.A., Daugas E., Ravagnan L., Samejima K., Zamzami N., Loeffler M., Costantini P., Ferri K.F., et al. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis // *J Exp Med.* – 2000. – 192, 4. – P.: 571–580.

402. Taddei M.L., Giannoni E., Fiaschi T., Chiarugi P. Anoikis: an emerging hallmark in health and diseases // *J Pathol.* – 2012. – 226, 2. – P.: 380–393.
403. Tafani M., Karpinich N.O., Hurster K.A., Pastorino J.G., Schneider T., Russo M.A., Farber J.L. Cytochrome *c* release upon Fas receptor activation depends on translocation of full-length bid and the induction of the mitochondrial permeability transition // *J Biol Chem.* – 2002. – 277, 12. – P.: 10073–10082.
404. Timmins G.S., dos Santos R.E., Whitwood A.C., Catalani L.H., Di Mascio P., Gilbert B.C., Bechara E.J. Lipid peroxidation-dependent chemiluminescence from the cyclization of alkylperoxyl radicals to dioxetane radical intermediates // *Chem Res Toxicol.* – 1997. – 10, 10. – P.: 1090–1096.
405. To E.E., O'Leary J.J., O'Neill L.A.J., Vlahos R., Bozinovski S., Porter C.J.H., Brooks R.D., Brooks D.A., Selemidis S. Spatial Properties of Reactive Oxygen Species Govern Pathogen-Specific Immune System Responses // *Antioxid Redox Signal.* – 2020. – 32, 13. – P.: 982–992.
406. Topal F., Nar M., Gocer H., Kalin P., Kocyigit U.M., Gulcin I., Alwasel S.H. Antioxidant activity of taxifolin: an activity-structure relationship // *J Enzyme Inhib Med Chem.* – 2016. – 31, 4. – P.: 674–683.
407. Torabi R., Ghourchian H. Ultrasensitive nano-aptasensor for monitoring retinol binding protein 4 as a biomarker for diabetes prognosis at early stages // *Sci Rep.* – 2020. – 10, 1. – P. 594.
408. Tsukagoshi K., Taniguchi T., Nakajima R. Analysis of antioxidants using a capillary electrophoresis with chemiluminescence detection system // *Anal Chim Acta.* – 2007. – 589, 1. – P.: 66–70.
409. Turovskaya M.V., Gaidin S.G., Mal'tseva V.N., Zinchenko V.P., Turovsky E.A. Taxifolin protects neurons against ischemic injury in vitro via the activation of antioxidant systems and signal transduction pathways of GABAergic neurons // *Mol Cell Neurosci.* – 2019. – 96. – P.: 10–24.
410. Van Zant G., Eldridge P.W., Behringer R.R., Dewey M.J. Genetic control of hematopoietic kinetics revealed by analyses of allophenic mice and stem cell suicide // *Cell.* – 1983. – 35, 3 Pt 2. – P.: 639–645.

411. Vanden Berghe T., Linkermann A., Jouan-Lanhouet S., Walczak H., Vandenabeele P. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2014. – 15, 2. – P.: 135–147.
412. Vasiljeva O.V., Lyubitsky O.B., Klebanov G.I., Vladimirov Yu A. Effect of antioxidants on the kinetics of chain lipid peroxidation in liposomes // *Membr Cell Biol.* – 1998. – 12, 2. – P.: 223–231.
413. Vasina D.A., Zhdanov D.D., Orlova E.V., Orlova V.S., Pokrovskaya M.V., Aleksandrova S.S., Sokolov N.N. Apoptotic Endonuclease EndoG Inhibits Telomerase Activity and Induces Malignant Transformation of Human CD4+ T Cells // *Biochemistry (Moscow).* – 2017. – 82, 1. – P.: 24–37.
414. Vassil'ev R.F. Chemiluminescence in liquid-phase reactions // *Progress in Reaction Kinetics.* – 1967. – 4. – P.: 305–352.
415. Vassil'ev R.F. Secondary Processes in Chemiluminescent Solutions // *Nature.* – 1962. – 196, 4855. – P.: 668–669.
416. Vassil'ev R.F. Spin-orbit coupling and intermolecular energy transfer // *Nature.* – 1963. – 200, №4908. – P.: 773–774.
417. Vassil'ev R.F., Vichutinskii A.A. Chemiluminescence and Oxidation // *Nature.* – 1962. – 194, 4835. – P.: 1276–1277.
418. Verma M.K., Jaiswal A., Sharma P., Kumar P., Singh A.N. Oxidative stress and biomarker of TNF-alpha, MDA and FRAP in hypertension // *J Med Life.* – 2019. – 12, 3. – P.: 253–259.
419. Villegas J.A., Mauk A.G., Vazquez-Duhalt R. A cytochrome *c* variant resistant to heme degradation by hydrogen peroxide // *Chem Biol.* – 2000. – 7, 4. – P.: 237–244.
420. Vladimirov Yu.A., Arroyo A., Taylor J.M., Tyurina Y.Y., Matsura T., Tyurin V.A., Kagan V.E. Quinolizin-coumarins as physical enhancers of chemiluminescence during lipid peroxidation in live HL-60 cells // *Arch Biochem Biophys.* – 2000. – 384, 1. – P.: 154–162.
421. Vladimirov Yu.A., Olenev V.I., Suslova T.B., Cheremisina Z.P. Lipid peroxidation in mitochondrial membrane // *AdvLipid Res J1 - ALR.* – 1980. – 17. – P.: 173–249.

422. 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.
423. Vlasova I.I. Peroxidase Activity of Human Hemoproteins: Keeping the Fire under Control // *Molecules.* – 2018. – 23(10). – P. 2561.
424. Walker R.F. On the Cause and Mechanism of Phenoptosis // *Biochemistry (Mosc).* – 2017. – 82, 12. – P.: 1462–1479.
425. Wang J., Zhang C., Zhang J., Xie J., Yang L., Xing Y., Li Z. The effects of quercetin on immunity, antioxidant indices, and disease resistance in zebrafish (*Danio rerio*) // *Fish Physiol Biochem.* – 2020. – 46, 2. – P.: 759–770.
426. Wang T., Zhan Y., Wu, Chen Z., Wu W., Deng Y., Wang W., Tan W., Tang S. Development and Evaluation of a Universal and Supersensitive NS1-Based Luciferase Immunosorbent Assay to Detect Zika Virus-Specific IgG // *Virol Sin.* – 2020. – 35, 1. – P.: 93–102.
427. Wang Y.H., Wang W.Y., Chang C.C., Liou K.T., Sung Y.J., Liao J.F., Chen C.F., Chang S., et al. Taxifolin ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury in rats through its anti-oxidative effect and modulation of NF-kappa B activation // *J Biomed Sci.* – 2006. – 13, 1. – P.: 127–141.
428. Wang Z., Ying Z., Bosy-Westphal A., Zhang J., Schautz B., Later W., Heymsfield S.B., Muller M.J. Specific metabolic rates of major organs and tissues across adulthood: evaluation by mechanistic model of resting energy expenditure // *Am J Clin Nutr.* – 2010. – 92, 6. – P.: 1369–1377.
429. Watts Jr B.P., Barnard M., Turrens J.F. Peroxynitrite-dependent chemiluminescence of amino acids, proteins, and intact cells // *Arch Biochem Biophys.* – 1995. – 317, 2. – P.: 324–330.
430. Wayne R.P. Principles and applications of photochemistry – Oxford: Oxford University Press, Incorporated, 1988. – 268 p.
431. Wenzel A., Grimm C., Samardzija M., Reme C.E. Molecular mechanisms of light-induced photoreceptor apoptosis and neuroprotection for retinal degeneration // *Prog Retin Eye Res.* – 2005. – 24, 2. – P.: 275–306.

432. Wickrama Arachchilage A.P., Wang F., Feyer V., Plekan O., Acres R.G., Prince K.C. X-ray Photoemission Spectra and Electronic Structure of Coumarin and its Derivatives // *J Phys Chem A*. – 2016. – 120, 36. – P.: 7080–7087.
433. Willms A., Schitteck H., Rahn S., Sosna J., Mert U., Adam D., Trauzold A. Impact of p53 status on TRAIL-mediated apoptotic and non-apoptotic signaling in cancer cells // *PLoS One*. – 2019. – 14, 4. – P. e0214847.
434. Wu H., Xu J., Du X., Cui J., Zhang T., Chen Y. Shihu Yeguang Pill protects against bright light-induced photoreceptor degeneration in part through suppressing photoreceptor apoptosis // *Biomed Pharmacother*. – 2020. – 126. – P. 110050.
435. Xavier A.A., Perez-Galvez A. Carotenoids as a Source of Antioxidants in the Diet // *Subcell Biochem*. – 2016. – 79. – P.: 359–375.
436. Xiang J., Guo S., Jiang S., Xu Y., Li J., Li L. Silencing of Long Non-Coding RNA MALAT1 Promotes Apoptosis of Glioma Cells // *J Korean Med Sci*. – 2016. – 31, 5. – P.: 688–694.
437. Xie G.Y., Zhu Y., Shu P., Qin X.Y., Wu G., Wang Q., Qin M.J. Phenolic metabolite profiles and antioxidants assay of three Iridaceae medicinal plants for traditional Chinese medicine "She-gan" by on-line HPLC-DAD coupled with chemiluminescence (CL) and ESI-Q-TOF-MS/MS // *J Pharm Biomed Anal*. – 2014. – 98. – P.: 40–51.
438. Xu Y., Sutachan J.J., Plesken H., Kelley R.I., Schlame M. Characterization of lymphoblast mitochondria from patients with Barth syndrome // *Lab Invest*. – 2005. – 85, 6. – P.: 823–830.
439. Yalcinkaya N., Haytural H., Bilgic B., Ozdemir O., Hanagasi H., Kucukali C.I., Ozbek Z., Akcan U., et al. Expression changes of genes associated with apoptosis and survival processes in Parkinson's disease // *Neurosci Lett*. – 2016. – 615. – P.: 72–77.
440. Yang H., Rivera Z., Jube S., Nasu M., Bertino P., Goparaju C., Franzoso G., Lotze M.T., et al. Programmed necrosis induced by asbestos in human mesothelial cells causes high-mobility group box 1 protein release and resultant inflammation // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2010. – 107, 28. – P.: 12611–12616.
441. Yang W.S., Stockwell B.R. Ferroptosis: Death by Lipid Peroxidation // *Trends Cell Biol*. – 2016. – 26, 3. – P.: 165–176.
442. Yang Z., Min Z., Yu B. Reactive oxygen species and immune regulation // *Int Rev Immunol*. – 2020. – P.: 1–7.

443. Ye H., Cande C., Stephanou N.C., Jiang S., Gurbuxani S., Larochette N., Daugas E., Garrido C., et al. DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor // *Nat Struct Biol.* – 2002. – 9, 9. – P.: 680–684.
444. Yoo D.G., Song Y.J., Cho E.J., Lee S.K., Park J.B., Yu J.H., Lim S.P., Kim J.M., Jeon B.H. Alteration of APE1/ref-1 expression in non-small cell lung cancer: the implications of impaired extracellular superoxide dismutase and catalase antioxidant systems // *Lung Cancer.* – 2008. – 60, 2. – P.: 277–284.
445. Yoo D.Y., Kim D.W., Chung J.Y., Jung H.Y., Kim J.W., Yoon Y.S., Hwang I.K., Choi J.H., et al. Cu, Zn-Superoxide Dismutase Increases the Therapeutic Potential of Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells by Maintaining Antioxidant Enzyme Levels // *Neurochem Res.* – 2016. – 41, 12. – P.: 3300–3307.
446. Yu B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species // *Physiol Rev.* – 1994. – 74, 1. – P.: 139–162.
447. Yuan L.H., Meng L.P., Ma W.W., Li S., Feng J.F., Yu H.L., Xiao R. The role of glutathione S-transferase M1 and T1 gene polymorphisms and fruit and vegetable consumption in antioxidant parameters in healthy subjects // *Br J Nutr.* – 2012. – 107, 6. – P.: 928–933.
448. Yuan S., Topf M., Reubold T.F., Eschenburg S., Akey C.W. Changes in Apaf-1 conformation that drive apoptosome assembly // *Biochemistry.* – 2013. – 52, 13. – P.: 2319–2327.
449. Yui K., Imataka G., Sasaki H., Kawasaki Y., Yoshihara S. Contribution of Transferrin and Ceruloplasmin Neurotransmission and Oxidant/Antioxidant Status to the Effects of Everolimus: A Case Series // *Cureus.* – 2020. – 12, 2. – P. e6920.
450. Zha H., Jeffs A., Dong Y., Lewis G. Potential virulence factors of bacteria associated with tail fan necrosis in the spiny lobster, *Jasus edwardsii* // *J Fish Dis.* – 2018. – 41, 5. – P.: 817–828.
451. Zhang A., Guo W., Ke H., Zhang X., Zhang H., Huang C., Yang D., Jia N., Cui D. Sandwich-format ECL immunosensor based on Au star@BSA-Luminol nanocomposites for determination of human chorionic gonadotropin // *Biosens Bioelectron.* – 2018. – 101. – P.: 219–226.

452. Zhang X., Xing X., Liu H., Feng J., Tian M., Chang S., Liu P., Zhang H. Ionizing radiation induces ferroptosis in granulocyte-macrophage hematopoietic progenitor cells of murine bone marrow // *Int J Radiat Biol.* – 2020. – 96(5). – P.: 584–595.
453. Zhang X., Zhang H., Xu S., Sun Y. A highly sensitive LED-induced chemiluminescence platform for aptasensing of platelet-derived growth factor // *Analyst.* – 2014. – 139, 1. – P.: 133–137.
454. Zhang Y., Dong Y., Li X., Wang F. Proanthocyanidin Encapsulated in Ferritin Enhances Its Cellular Absorption and Antioxidant Activity // *J Agric Food Chem.* – 2019. – 67, 41. – P.: 11498–11507.
455. Zhao C., Cui H., Duan J., Zhang S., Lv J. Self-Catalyzing Chemiluminescence of Luminol-Diazonium Ion and Its Application for Catalyst-Free Hydrogen Peroxide Detection and Rat Arthritis Imaging // *Anal Chem.* – 2018. – 90, 3. – P.: 2201–2209.
456. Zhao Z., Zhang B., Liu Y., Zhang R., Liang Q., Hu Y., Xu L., Wang X. Repair of bedsore over greater trochanter in paraplegic patients with rectus femoris island myocutaneous flap // *Zhonghua Shao Shang Za Zhi.* – 2014. – 30, 3. – P.: 227–230.
457. Zheng B., Fan J., He R., Yin R., Wang J., Zhong Y. Antioxidant status of uric acid, bilirubin, albumin and creatinine during the acute phase after traumatic brain injury: sex-specific features // *Int J Neurosci.* – 2020. – P.: 1–10.
458. Zhou M., Li Y., Hu Q., Bai X.C., Huang W., Yan C., Scheres S.H., Shi Y. Atomic structure of the apoptosome: mechanism of cytochrome *c*- and dATP-mediated activation of Apaf-1 // *Genes Dev.* – 2015. – 29, 22. – P.: 2349–2361.
459. Zu Y., Wu W., Zhao X., Li Y., Wang W., Zhong C., Zhang Y. Enhancement of solubility, antioxidant ability and bioavailability of taxifolin nanoparticles by liquid antisolvent precipitation technique // *Int J Pharm.* – 2014. – 471, 1-2. – P.: 366–376.