

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова
Физический факультет

На правах рукописи

Дудылина Арина Леонидовна

**Активные формы кислорода, оксид азота и антиоксиданты в
митохондриях сердца и модельных системах**

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

03.01.02 – биофизика

Научный руководитель:
доктор физико-математических наук,
профессор Э.К.Рууге

Москва – 2019 г.

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ.....	6
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1.Активные формы кислорода и некоторые их свойства.	14
1.2.Активные формы азота и некоторые их свойства.	16
1.3.Генерация АФК и АФА и их роль в окислительном стрессе.	18
1.4.Дыхательная цепь и образование АФК митохондриями.	27
1.5.СоQ и его восстановленная форма.	32
1.6.Митохондриально-направленные антиоксиданты.	38
1.7.Образование динитрозильных комплексов железа в митохондриях.....	46
1.8.Фенольные соединения с антиоксидантными свойствами.....	50
1.9.Влияние гипоксии на организм.	59
1.9.1.Физиологический ответ на гипоксию.	60
1.9.2.Регуляция клеточного метаболизма при адаптации к гипоксии.	64
1.9.3.Гипоксия - индуцируемый фактор HIF, его свойства и регуляция.....	66
1.9.4.Регуляция экспрессии генов.....	70
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	73
2.1.Получение изолированных митохондрий.	73
2.2.Определение функциональной активности митохондрий.....	73
2.3.ЭПР-оксиметрия.....	74
2.4.ЭПР-спектроскопия спиновой ловушки TIRON.....	78
2.5.Получение динитрозильных комплексов железа и запись спектров ЭПР....	81
2.6.Определение скорости генерации супероксидных радикалов в системе ксантин-ксантинооксидаза.	81
2.7.Исследование свободнорадикальных форм производных убихинона и пластохинона.	84
2.8.Реактивы и статистическая обработка.	85

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	86
3.1.Закономерности генерации супероксидных радикалов комплексом III митохондрий сердца при разном парциальном давлении кислорода и разной температуре.....	86
3.2.Кинетика образования и разрушения ДНКЖ при разных условиях.	98
3.3.Влияние ДНКЖ с глутатионом на генерацию супероксидных радикалов в модельной системе ксантин-ксантинооксидаза и митохондриями сердца при разном парциальном давлении кислорода.....	104
3.4.ДНКЖ: возможные механизмы образования и антирадикальной активности в митохондриях сердца.	110
3.5.Влияние «водорастворимой формы убихинола-10» на генерацию супероксидных радикалов в комплексе III дыхательной цепи. Свободнорадикальные интермедиаты (семихиноны) митохондриально-направленных антиоксидантов.	114
3.6.Влияние фенольных соединений растительного происхождения на дыхательную активность митохондрий.....	124
3.7.Закономерности генерации супероксидных радикалов комплексом III митохондрий сердца в присутствии различных фенольных соединений.	126
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	137
ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ.....	139
СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	141

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АФК* – активные формы кислорода,
АФА – активные формы азота,
O₂ – молекулярный кислород,
O₂^{•-} – супероксид,
H₂O₂ – пероксид водорода,
OH[•] – гидроксильный радикал,
¹O₂ – синглетный кислород,
NO – оксид азота,
NO⁺ – нитрозильный катион, нитрозоний,
NO⁻ – нитроксильный анион,
NO₂⁻ – нитрит,
ONOO⁻ – пероксинитрит,
HNO – нитроксил,
DNA – ДНК, дезоксирибонуклеиновая кислота,
mtDNA –митохондриальная ДНК,
ATP – аденозинтрифосфат,
ADP – аденозиндифосфат,
NAD(P)H – никотинамидаденин динуклеотид (фосфат),
SOD – супероксиддисмутаза,
Mn-SOD – митохондриальная марганцевая супероксиддисмутаза,
CTC – сверхтонкая структура,
GSH-пероксидаза – глутатионпероксидаза,
GSH – восстановленный глутатион,
GSNO – S-нитрозоглутатион,
XO – ксантинооксидаза,
CoQ₁₀ – коэнзим *Q₁₀*, убихинон,
CoQ₁₀-H₂ – восстановленная форма коэнзима *Q₁₀*, убихинол,
ЭТЦ – электрон-транспортная, дыхательная цепь митохондрий,

HRE – нуклеотидная последовательность на 5'-конце гена, важная для инициации и эффективной транскрипции гена,

P_i – неорганический фосфат,

HIF – гипоксия-индуцируемый фактор,

cGMP – циклический гуанозин 5'-монофосфат,

MMP- металлопротеиназы,

AMPK – *ATP*-зависимая протеинкиназа,

$\Delta\psi$ ($\Delta\psi_m$) – электрохимический потенциал мембраны (митохондрий),

NOS - *NO*-синтаза,

Nox - *NADPH*-оксидаза,

pVHL - белок гена опухолевого супрессора фон Хиппеля-Линдау,

TRP – трифенилфосфоний,

ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания,

ИБС – ишемическая болезнь сердца,

ЛПНП – липопротеины низкой плотности,

BSA – бычий сывороточный альбумин,

TIRON – 4,5-дигидроксибензол-1,3-дисульфонат натрия,

TEMPONE-¹⁵N-D₁₆ – 4-оксо-2,2,6,6-тетраметил-пиперидин-D₁₆-1-оксил-¹⁵N,

LiPc – фталоцианин лития,

ДНКЖ – динитрозильные комплексы железа,

(*c*)*AMP* – (циклический) аденозинмонофосфат,

CoQ₀ – 2,3-диметокси-5-метил-1,4-бензохинон,

CoQ₁ – 2,3-диметокси-5-метил-6-(3-метил-2-бутенил)-1,4-бензохинон,

CoQ₄ – 2,3-диметокси-5-метил-6-(геранилгеранил)-1,4-бензохинон,

CoQ₁₀ – 2,3-диметокси-5-метил-6-декапренилбензохинон,

mitoQ – 10- (6'-убихинонил)-децилтрифенилфосфоний,

SkQ1 – 10-(6'-пластохинонил)-децилтрифенилфосфоний,

SkQ3 – 6'-метилпластохинонил)-децилтрифенилфосфоний,

SkQT – 10- (6'-толухинонил)-децилтрифенилфосфоний.

ВВЕДЕНИЕ

История жизни на Земле – это история появления кислорода и его использования. Около 3 млрд. лет назад, у примитивных одноклеточных организмов развилась способность к фотосинтезу, биохимическому процессу, в котором фотоны солнечной энергии поглощаются хлорофиллом, и их энергия используется в реакции H_2O и CO_2 образования глюкозы и кислорода. Последующее увеличение концентрации O_2 в атмосфере в течение следующего 1 млрд. лет создало условие для господства организмов со способностью к дыханию, процессу, в котором затрачивается глюкоза и O_2 , генерируя CO_2 , H_2O и энергию в форме ATP . Некоторые из этих одноклеточных организмов (α -протеобактерии) в конце концов поселились в цитоплазме других клеток (предшественники современных эукариотических клеток) и посвятили себя целиком выработке энергии в качестве митохондрий [1].

По сравнению с преобразованием глюкозы в лактат при гликолизе, полное окисление глюкозы при дыхании обеспечило производство такого количества энергии, что стала возможной эволюция многоклеточных организмов. Среди многоклеточных, резкое возрастание размеров тела сопровождалось преобразованием в анатомических структурах, чьи функции заключались в доставке O_2 всем клеткам. Это привело к образованию сложной кровеносной и дыхательной системы у позвоночных [1].

Митохондрии не только участвуют в клеточном метаболизме миокарда как основные поставщики ATP , а также играют ключевую роль в регуляторных и сигнальных процессах, являющихся реакцией клеток на различные стрессы, такие как гипоксия и реоксигенация, нарушение между антиоксидантными и прооксидантными процессами, влияние разных лекарственных препаратов. В течение последних десятилетий значительное внимание направлено на изучение митохондриальных болезней: отклонений, вызванных повреждениями $ДНК$ митохондрий ($mtDNA$) и влияющих на работу митохондрий. Основными мишенями этих болезней являются органы с интенсивным метаболизмом и

высоким энергетическим потреблением: скелетные мышцы, почки, печень и сердце. В таком случае клетки тканей этих органов испытывают состояние окислительного стресса.

Повреждения органелл кардиомиоцитов, которые в итоге станут причиной их гибели из-за апоптоза или некроза, в первую очередь, вызваны чрезмерным образованием активных форм кислорода (*АФК*) и вредных метаболитов оксида азота (*АФА*) в состоянии окислительного стресса. Продукция *АФК* в живых организмах происходит постоянно в результате побочных процессов окислительно-восстановительных реакций, а также в результате функционирования ферментных систем. Повышенное внимание к свободным короткоживущим радикалам кислорода, гидроксильному OH^\bullet с временем жизни $\sim 10^{-9}$ с и супероксидному $O_2^{\bullet-}$ ($\sim 10^{-6}$ с), связано с высокой реакционной способностью этих веществ. Присутствие двух неспаренных электронов на π^*2p -орбитали O_2 делает процесс окисления почти любого компонента клетки (липидов мембран, нуклеиновых кислот и белков) термодинамически выгодным. При нормальном функционировании клетки, когда скорость генерации свободных радикалов кислорода и оксида азота относительно невелика, эндогенные антиоксиданты клеток способны предотвратить окислительный стресс. Но при увеличении внутриклеточной концентрации кислорода и снижении энергетического метаболизма кардиомиоцитов могут происходить значительные изменения редокс-потенциалов переносчиков электрон-транспортной цепи митохондрий (*ЭТЦ*), что приводит к резкому возрастанию скорости продукции *АФК*.

Хорошо известно, что *АФК* и *АФА* участвуют в развитии патологических состояний сердечной мышцы, возникающих после длительной ишемии. Ишемия характеризуется недостаточным снабжением ткани кислородом O_2 и необходимыми метаболитами и обусловлена нарушениями в системе кровообращения. Во время ишемии происходит активация анаэробного гликолиза, направленного на восстановление синтеза *АТФ*, однако, гликолиза

оказывается недостаточно для энергетического обеспечения клеток миокарда. Вследствие чего в клетках возникают множественные нарушения ионного гомеостаза и дальнейшая невозможность нормального функционирования сердца. Следующая за длительной ишемией реоксигенация сердечной мышцы сопровождается сильными повреждениями тканей и нарушениями сократительной функции – появлением аритмий и временной механической дисфункции. Это явление, обусловленное резким увеличением образования АФК при восстановлении нормального уровня внутриклеточного O_2 , получило название «кислородный парадокс».

Актуальность. Все многоклеточные организмы могут чувствовать уменьшение концентрации кислорода при гипоксии и формировать ответную реакцию. Последние сведения подтверждают, что концентрация O_2 и редокс-гомеостаз неразрывно связаны, изменения в оксигенации клеток и тканей неизбежно приводят к изменению уровня АФК [1]. Поэтому актуальным является исследование закономерностей генерации супероксидных радикалов митохондриями при разных парциальных давлениях кислорода.

Поскольку митохондрии являются одним из главных источников АФК в клетке, они нуждаются в постоянной защите от повреждений, вызванных окислительным стрессом. Такая защита обеспечивается низкомолекулярными антиоксидантами и различными ферментативными системами. Наиболее важными эндогенными антиоксидантами являются коэнзим Q_{10} (CoQ_{10}) и витамин E . Функционирование переносчика ЭТЦ митохондрий CoQ_{10} как антиоксиданта зависит от соотношения его редокс форм: убихинона, убисемихинона и убихинола. Представляет интерес выяснить конкретные механизмы, с помощью которых CoQ_{10} осуществляет защитное действие от повреждений, сопровождающих патогенез заболеваний организма, связанных, в первую очередь, с возникновением окислительного стресса.

Использование антиоксидантов в качестве пищевых добавок, однако, оказалось недостаточно эффективным, поскольку лишь незначительные их

количества способны проникать через мембраны клеток и попадать внутрь митохондрий. Решением проблемы стало изобретение избирательно накапливающихся в митохондриях соединений – митохондриально-направленных антиоксидантов, которые легко проходят через биологические мембраны и значительно лучше (в 100-500 раз) накапливаются внутри, обеспечивая защиту от окислительного стресса, благодаря присоединению к молекуле антиоксиданта липофильного катиона трифенилфосфония (*TRP*). Однако было получено, что небольшое увеличение дозы митохондриально-направленного антиоксиданта на основе убихинона (*mitoQ*) приводит к прооксидантному действию, что становится ограничением его использования в фармакологии. Необходимость создания самовозобновляющегося антиоксиданта, который не обладал бы таким побочным действием, привела к идее замены убихинона в *mitoQ* на пластохинон. Так получили *SkQ1*, у которого разница в концентрациях, вызывающих про- и антиоксидантное эффекты в одинаковых условиях, была до тридцати раз больше, тогда как у *mitoQ* различие было менее, чем в два раза. Получение спектральных характеристик и распределения электронной плотности по хиноидному кольцу в молекулах исследуемых митохондриально-направленных антиоксидантов представляет значительный интерес в целях объяснения активности этих веществ.

В течение нескольких последних лет при активном участии проф. А.Ф. Ванина проводятся исследования по созданию нового лекарственного препарата на основе *ДНКЖ* с глутатионом. Было показано, что такие *ДНКЖ* при взаимодействии с *АФК*, образованными в митохондриях, проявляли ярко выраженные антиоксидантные свойства [2]. Изучение процесса образования и деструкции *ДНКЖ* с различными лигандами в митохондриях сердца и модельных системах внесет существенный вклад в понимание механизмов их взаимодействия с активными формами кислорода и роли этих соединений в качестве депо оксида азота в клетках.

Степень разработанности темы. Анализ научно-исследовательских работ, посвященные участию АФК и АФА в развитии патологии сердца и других органов показал, что конкретные механизмы действия этих веществ в здоровых клетках и при патологиях сердечно-сосудистой системы еще не полностью установлены. Многочисленные публикации о влиянии фенольных соединений на живые организмы демонстрируют широкий спектр действия этих соединений, однако исследование их анти- и прооксидантных свойств до сих пор является актуальной задачей. Механизмы взаимодействия ДНКЖ с различными лигандами с АФК, их роль в качестве депо оксида азота, несмотря на большое количество опубликованных статей, также требуют более подробного объяснения.

Цель диссертационного исследования.

Выяснить физико-химические механизмы образования и распада активных форм кислорода и метаболитов оксида азота в системах, моделирующих окислительный стресс и гипоксию в клетках миокарда, а также изучить антиоксидантное и антирадикальное действия природных фенольных соединений, хинонов и динитрозильных комплексов железа.

Задачи работы.

1) Оценить влияние гипоксии различной степени тяжести и реоксигенации на генерацию супероксидных радикалов изолированными митохондриями сердца.

2) Изучить на моделях изолированных митохондрий сердца и ферментативной системы ксантин-ксантинооксидаза антиоксидантные свойства физиологически значимых метаболитов оксида азота – динитрозильных комплексов железа.

3) Выяснить биофизические механизмы взаимодействия нитрозильных комплексов железа со свободными радикалами кислорода.

4) Изучить биофизические процессы, лежащие в основе защитного действия такого важного эндогенного антиоксиданта, как убихинол – восстановленная форма коэнзима Q .

5) Изучить биофизические механизмы взаимодействия природных фенольных антиоксидантов различной структуры со свободными радикалами кислорода, образующимися в митохондриях сердца.

Объект и предмет исследования. Объектом исследования является образование активных форм кислорода и метаболитов оксида азота в митохондриях клеток сердечной мышцы и модельных ферментативных системах. Предметом исследования являются изменения концентрации супероксида в модельных системах и функциональных характеристик дыхательной цепи митохондрий сердца в ответ на изменения условий эксперимента и экзогенно вводимые антиоксиданты.

Научная новизна.

1. Установлена зависимость скорости генерации супероксидных радикалов дыхательной цепью изолированных митохондрий сердца от парциального давления кислорода.

2. На модели изолированных митохондрий сердца впервые проведено детальное исследование антиоксидантного действия динитрозильных комплексов железа с тиольными лигандами при разных значениях парциального давления кислорода.

3. Установлена закономерность антиоксидантного действия восстановленного коэнзима Q_{10} (лекарственная «водорастворимая форма убихинола-10») в модели изолированных митохондрий сердца.

4. На моделях ферментативной системы ксантин-ксантинооксидаза и изолированных митохондрий сердца получены сравнительные характеристики антиоксидантного действия природных фенольных соединений с различной структурой – кофейной кислоты, куркумина, ресвератрола, кверцетина и рутина.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные в работе экспериментальные данные позволяют лучше понять механизмы процессов, развивающихся при патологии сердечно-сосудистой системы и влияющих на образование активных форм кислорода в кардиомиоцитах, сопряжение в этих клетках митохондриального дыхания и фосфорилирования, а также на нарушение сократительной функции сердца. Результаты работы могут внести вклад в разработку новых лекарственных препаратов на основе производных убихинона и пластохинона, а также природных фенольных соединений.

Методология диссертационного исследования. В работе использованы методы ЭПР-спектроскопии и ЭПР-оксиметрии *in vitro*, метод полярографического анализа энергетической биохимической активности митохондрий. Для обработки результатов использовались современные статистические методы.

Положения, выносимые на защиту.

1. Методом ЭПР спектроскопии, путем регистрации спектров ЭПР свободнорадикальных интермедиатов (семихинонов) *TIRON* в условиях непрерывной оксигенации образца, установлена зависимость скорости генерации супероксидных радикалов дыхательной цепью изолированных митохондрий при варьируемых значениях парциального давления кислорода.

2. Динитрозильные комплексы железа оказывают антиоксидантное действие при разных значениях парциального давления кислорода в системах, моделирующих окислительный стресс в клетках сердечной мышцы.

3. Восстановленный коэнзим Q_{10} в составе препарата «водорастворимая форма убихинола-10» проявляет себя в качестве антиоксиданта в изолированных митохондриях сердца.

4. Природные фенольные соединения растительного происхождения различной структуры (кофейная кислота, куркумин, ресвератрол, кверцетин и рутин) эффективно взаимодействуют с супероксидными радикалами,

генерируемыми изолированными митохондриями сердца или модельной системой.

Степень достоверности. Достоверность диссертационного исследования подтверждается всесторонним анализом выполненных ранее научно-исследовательских работ, использованием апробированных современных экспериментальных методов и адекватным статистическим анализом.

Личный вклад автора. Автор диссертации лично проводила поиск и анализ литературных данных, принимала непосредственное участие в планировании и проведении экспериментов, обработке и анализе полученных результатов, формулировании выводов, а также в подготовке публикаций и докладов на научных конференциях.

Публикации. По теме диссертационной работы опубликовано 4 статьи, индексируемые в базах Web of Science, Scopus, RSCI и РИНЦ.

Апробация результатов. Результаты работы представлены на 7 международных и всероссийских научных конференциях (13 публикаций тезисов докладов).

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Активные формы кислорода и некоторые их свойства.

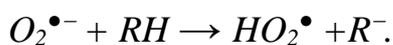
Понятие «активные формы кислорода» (*АФК*) используется для обозначения молекул и свободных радикалов производных кислорода. Молекулярный кислород O_2 в основном триплетном состоянии представляет собой радикал с двумя неспаренными электронами на внешней оболочке.

АФК имеют двоякую функцию в клетке, помимо разрушающего действия, они работают как вторичные мессенджеры, включающие сложные сигнальные пути [3,4]. В сердце *АФК* стимулирует сердечный рост, ремодуляцию и дисфункцию, активируют транскрипцию факторов и сигнальный каскад развития гипертрофии, а также влияют на соединительную ткань, стимулируя фибробласты миокарда, регулируя синтез коллагена и активируя матриксные металлопротеиназы (*ММР*). *АФК* активируют *ММР* следующими способами: во-первых, напрямую, посттрансляционной модификацией, во-вторых, активируя факторы транскрипции *ММР*. *АФК* стимулирует апоптоз в клетках мышц, эндотелиальных клетках и фибробластах. При низких концентрациях *АФК* ингибируют апоптоз, тогда как при высоких концентрациях происходит обратное [4].

Основными *АФК* являются супероксидный радикал ($O_2^{\bullet-}$), гидроксильный радикал (OH^{\bullet}), пероксид водорода (H_2O_2), и синглетный кислород (1O_2).

Предшественником почти всех *АФК* считается супероксид $O_2^{\bullet-}$, образующийся в одноэлектронном восстановлении молекулы кислорода. Основными источниками $O_2^{\bullet-}$ в биологических системах являются: комплекс ксантин-ксантинооксидаза, в котором метаболит распада пуринов, ксантин, окисляется O_2 до мочевой кислоты, образовывая супероксид, клетки фагоцитоза, при активации которых после взаимодействия с инородным агентом ферментативно образуется $O_2^{\bullet-}$, и митохондриальная ЭТЦ, которая восстанавливает кислород до воды в результате переноса электронов от

субстратов окисления. Около 2% кислорода восстанавливается до $O_2^{\bullet-}$ ЭТЦ в результате взаимодействия O_2 с переносчиками дыхательной цепи. Основной реакцией, определяющей свойства супероксида как окислителя биологически значимых молекул, является реакция его протонирования:



Время жизни молекулы $O_2^{\bullet-}$ составляет всего около 10^{-6} с [5].

Неспаренный электрон в этом свободном радикале появляется в результате одноэлектронного восстановления молекулярного кислорода. $O_2^{\bullet-}$ быстро превращается в H_2O_2 в реакции спонтанной дисмутации:

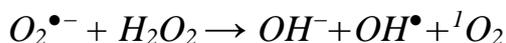


Реакция дисмутации может катализироваться супероксиддисмутазой (*SOD*), в этом случае синглетного кислорода 1O_2 не образуется [6].

Молекула H_2O_2 является наиболее стабильной АФК, электрически нейтральна, преодолевает относительно большие расстояния, легко проникает сквозь мембрану, способна достигать важные участки клетки и оказывать разрушающее действие[7]. Токсичность H_2O_2 определяется способностью превращаться в гидроксильный радикал OH^{\bullet} и 1O_2 в присутствии атомов железа в реакции Фентона:



и Хабера-Вайса:



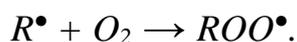
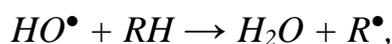
Донорами электронов в реакции Фентона, кроме железа, могут также служить атомы *Си*. В основном атомы Fe^{2+} и Fe^{3+} ассоциированы с *DNA*, мембранами, некоторыми белками – анионными переносчиками, вследствие чего OH^{\bullet} появляются рядом с ними [8].

По литературным данным H_2O_2 перемещается в клетке как в свободном состоянии, так и в виде комплексов с различными соединениями, включая пептиды, amino- и дикарбоновые кислоты, основания нуклеиновых кислот и нуклеотиды.

Подобные комплексы быстро появляются и значительно увеличивают расстояние переноса пероксида водорода за счёт его недоступности в составе комплекса для преобразующих H_2O_2 молекул: глутатионпероксидазы, каталазы и др. [9].

Время жизни молекулы H_2O_2 может продлевать предшественник – супероксидный радикал. $O_2^{\bullet-}$, инактивируя глутатионпероксидазу (*GSH*-пероксидаза) и каталазу, которые являются гасителями H_2O_2 [8].

Наиболее токсичной формой активного кислорода считается гидроксильный радикал OH^{\bullet} . Эта молекула способна окислить любую молекулу, в том числе и *DNA*. Высокая химическая реактивность OH^{\bullet} не дает ему перемещаться на большие расстояния от места появления, поскольку практически моментально вступает во взаимодействие с молекулой ближайшего окружения. Взаимодействие OH^{\bullet} с молекулами ненасыщенных жирных кислот играет основную роль в инициации цепной реакции перекисного окисления липидов биологических мембран:



1.2. Активные формы азота и некоторые их свойства.

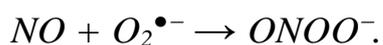
Неспаренный электрон оксида азота (*NO*) позволяет легко вступать в реакцию с O_2 , $O_2^{\bullet-}$, переходными металлами и тиолами [4]. Интересно, что $O_2^{\bullet-}$ и пероксинитрит ($ONOO^-$) способны влиять на активность/стабилизацию белков, когда только *NO* не даёт такого эффекта.

NO может регулировать экспрессию митохондриальных генов и образование таких сигнальных молекул как изопростаноиды (производные арахидоновой кислоты). Известно, что *NO* способен обратимо ингибировать цитохром *c*-оксидазу (комплекс *IV*), тем самым замедляя дыхание и синтез *ATP*, взаимодействовать со свободнорадикальными интермедиатами убисемихинонами CoQ_{10} [10]. В низких концентрациях *NO* ингибирует выход

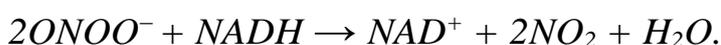
цитохрома *c* из митохондрий, предотвращая апоптоз, а при высоких концентрациях при участии *S*-нитрозотиолов вызывает Ca^{2+} -зависимое повышение проницаемости митохондриальных мембран и высвобождение цитохрома *c*.

Образующиеся в митохондриях $ONOO^-$ и нитроксильный анион (NO^-) также реагируют с цитохром *c*-оксидазой и другими компонентами ЭТЦ этих органелл. Показано [10,11], что $ONOO^-$ и низкомолекулярные *S*- нитрозотиолы обратимо ингибируют *NADH*-редуктазу (комплекс *I*), что играет важную роль в защите миокарда при ишемии/реперфузии. Так же $ONOO^-$ ингибирует комплексы *I* и *III*, нитрируя остатки тирозина.

$ONOO^-$ возникает при реакции *NO* с $O_2^{\bullet-}$:

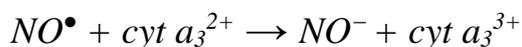
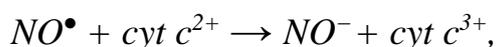


Пероксинитрит вызывает окисление макромолекулярных и низкомолекулярных элементов митохондрий: коэнзим Q_{10} и *NADH*:



Известно также, что $ONOO^-$ вызывает перекисное окисление липидов и специфическое, NAD^+ -зависимое, высвобождение Ca^{2+} из митохондрий [12]. Таким образом, $ONOO^-$ может быть ответственным за проапоптотическое действие оксида азота [13].

Нитроксильный анион NO^- , также обладающий прооксидантными свойствами, образуется в митохондриях при взаимодействии *NO* с восстановленными формами CoQ_{10} , цитохрома *c* и цитохром *c*-оксидазы в следующих реакциях:



Образование убисемихинона ($CoQ_{10}-H^{\bullet}$) при окислении восстановленного CoQ_{10} оксидом азота может стимулировать образование $O_2^{\bullet-}$ и H_2O_2 [14]. Необходимо отметить, что токсическое действие NO^{\bullet} проявляется в ходе ишемического поражения сердечной мышцы [15].

Наряду с указанным выше прооксидантным действием, $OONO^-$ также является стимулятором перекисного окисления липидов [16] и вызывает окислительную модификацию различных белков, в том числе нитрозилирование тирозина, окисление триптофана и цистеина [17,18]. Установлено, что прооксидантное действие $OONO^-$ обусловлено образованием при его распаде OH^{\bullet} и радикала диоксида азота:



Таким образом, $OONO^-$ может быть ответственным за проапоптотическое действие NO . Благодаря прооксидантному действию $OONO^-$ происходит высвобождение цитохрома *c* из митохондрий, приводящее к индукции каскада реакций апоптоза [19].

1.3. Генерация АФК и АФА и их роль в окислительном стрессе.

При различных патологических процессах таких, как гипоксия, ишемия/реперфузия, старение, а также ингибирование окислительного фосфорилирования митохондрий, генерация АФК возрастает настолько, что антиоксидантная система клетки не может их нейтрализовать. Такое состояние обозначается как «окислительный стресс» [20]. В начальной стадии реперфузии, следующей после глубокой гипоксии, увеличение генерации АФК становится главной причиной повреждения тканей [3,21,22].

Состояние окислительного стресса приводит к нарушениям во внутренней и внешней митохондриальной мембране, окислению белков и *mtDNA*. АФК не только приводит к дисфункции клеток и органов, способствующим смерти, но и являются главной причиной диабета, рака, рассеянного склероза, глаукомы,

сердечно-сосудистые болезней, болезней Паркинсона и Альцгеймера, митохондриальных болезней [3].

При нормальном метаболизме клетки миокарда *АФК* нейтрализуются внутренней антиоксидантной системой, включающей антиоксидантные ферменты: супероксиддисмутазу (*SOD*), каталазу, глутатионпероксидазу (*GSH*-пероксидазой) и неферментативные антиоксиданты: α -токоферол (витамин *E*), восстановленный коэнзим Q_{10} (*CoQ_{10}*), β -каротин (предшественник витамина *A*), липоевую и аскорбиновую кислоту (витамин *C*), урат и глутатион (*GSH*) [10].

Mn-SOD наиболее интересна, так как способна катализировать превращение $O_2^{\bullet-}$ в H_2O_2 в месте его образования в митохондриях. Далее H_2O_2 нейтрализуется каталазой в пероксисомах и цитозоле или *GSH*-пероксидазой в митохондриях и цитозоле [10]. *Sirt3*, принадлежащий семейству сиртуинов, NAD^+ -зависимых белков, обладающих деацетилазной активностью, активирует экспрессию *Mn-SOD* [23].

Накопленные данные говорят о важной роли окислительного и нитрозативного стрессов в развитии патологий сердца. В сердечнососудистой системе *АФК* генерируются также несвязанной *NO*-синтазой (*NOS*), пероксидазами, *NADPH*-оксидазой, а также гемсодержащими белками. Причем генерация происходит в кардиомиоцитах, эндотелиальных клетках, гладкомышечных клетках кровеносных сосудов, фибробластах, опухолевых клетках [4].

NADPH-оксидаза (*Nox*) является одним из главных источников *АФК* и имеет отношение ко многим физиологическим и патологическим процессам в сердце, таким, как гипертрофия, апоптоз, сердечный приступ, гипоксическая адаптация. Семь каталитических субъединиц *NADPH*-оксидазного ферментного комплекса (*Nox1-5* и *Duox 1,2*) широко экспрессируются в клетках. В сердце и сердечнососудистой системе представлены субъединицы *Nox1*, *Nox2*, *Nox4*, и *Nox5*. Субъединицы *Nox 2,4* присутствуют в кардиомиоцитах, а *Nox2,4,5* – в эндотелиальных клетках миокарда. Однако *Nox5* вовсе отсутствует у грызунов.

Nox-ферменты генерируют АФК ($O_2^{\bullet-}$ и H_2O_2) путем переноса электронов от *NADPH* на O_2 . Каталитический центр *Nox* содержит две молекулы гема в *N*-терминальном трансмембранном регионе и *NADPH*-связывающий и *FAD*-связывающий домены на *C*-терминальном цитоплазматическом конце[4,24].

В кардиомиоцитах *Nox2* обычно неактивен, и для его активации необходим перенос регуляторных белков для формирования активных оксидазных комплексов на мембране. В сердечнососудистой системе *Nox2*-зависимая генерация АФК стимулируется агонистами *G*-белок-связанных рецепторов (например, ангиотенсин II, эндотелин-1), факторами роста и цитокинами. В отличие от других *Nox*, *Nox4* считается постоянно активным и зависящим только от уровня его экспрессии, которая, предположительно, происходит в перинуклеарном пространстве, включая эндоплазматический ретикулум, и в митохондриях.

В кардиомиоцитах *Nox2* найден преимущественно на плазматической мембране, в то время как *Nox4* предположительно располагается во внутриклеточных мембранных структурах. Точный механизм генерации АФК *NADPH*-оксидазами полностью не известен. *Nox2* скорее образует $O_2^{\bullet-}$, нежели H_2O_2 . *Nox4* же генерирует, по-видимому, свободно диффундирующий в клетке H_2O_2 .

Ксантинооксидаза (*XO*) является другим важным источником АФК в кардиомиоцитах. В нормальных условиях существует в виде ксантиндегидрогеназы (*XDH*), которая может быть преобразована в *XO* окислением сульфгидрильных остатков или путем ограниченного протеолиза. *XO* генерирует и $O_2^{\bullet-}$, и H_2O_2 через окислительное гидроксирование пуриновых субстратов, однако, H_2O_2 является основным продуктом при гипоксии. Продукты окисления в присутствии хелатного железа могут быть преобразованы в OH^{\bullet} . Избыточный уровень метаболитов *XO*, таких как мочевая кислота и АФК, может стать причиной окислительного стресса. Есть предположение, что активация *XO* зависит от *NADPH*-оксидазы [4].

АФК генерируется внутри митохондрий не только во внутренней мембране, например, с помощью моноаминоксидазы (*МАО*), располагающейся на внешней мембране. *МАО* принадлежит семейству флавопротеинов, располагается внутри внешней мембраны, катализирует окислительное дезаминирование катехоламинов и биогенных аминов, например, серотонина. Во время этого процесса образуется H_2O_2 , поэтому *МАО* может повышать уровень *АФК* как в матриксе митохондрий, так и в цитозоле. *МАО* существует в двух формах: *МАО-А* и *МАО-В* с отдельными субстратами и ингибиторами [4,10].

Казалось бы, уменьшение уровня кислорода O_2 при гипоксии должно приводить к снижению скорости образования супероксида. Однако, гипоксия инициирует увеличение скорости образования $O_2^{\bullet-}$ в комплексе *III* дыхательной цепи митохондрий [25]. Это является парадоксом при условии, что генерация $O_2^{\bullet-}$ соответствует закону действующих масс: скорость генерации прямо пропорциональна концентрации O_2 . Однако, положительная корреляция между концентрацией O_2 и генерацией $O_2^{\bullet-}$ была подтверждена на изолированных митохондриях [26].

Оксид азота *NO*, нейтральный свободный радикал, играет жизненно важную роль в функциональной активности сердечно-сосудистой системы. Окислительно-восстановительные реакции с *NO* сопровождаются образованием катионов нитрозония (NO^+) и нитроксильных анионов (NO^-); при физиологическом значении *pH* последние существуют преимущественно в протонированной форме, а именно в нитроксиле (*HNO*) [27–29]. В живых системах NO^+ и нейтральные *NO* склонны к включению в динитрозильные комплексы железа (*ДНКЖ*) и *S*-нитрозотиолы [27,29–31]. *ДНКЖ* с глутатионными или цистеиновыми лигандами вызывают релаксацию изолированных кровеносных сосудов, длительную гипотензию, значительно уменьшают зону инфаркта миокарда в изолированном сердце, ускоряют заживление ран кожи и подавляют эндометриоз у экспериментальных животных. В мооядерном парамагнитном *ДНКЖ* ион железа связан с двумя тиоловыми и

двумя нитрозильными лигандами общей формулы $\{(RS^+)_2Fe^+(NO^+)_2\}$, где RS^+ -тиоловые группы белков. Помимо тиолов с низкой молекулярной массой, лигандами ДНКЖ могут быть остатки цистеина и других аминокислот белков [29,32,33].

Образование NO в митохондриях катализируется митохондриальной NO -синтазой [11]. До недавнего времени было известно 3 вида NOS , являющиеся основными внутриклеточными поставщиками клеточного NO [26].

NOS производят NO из L -аргинина в присутствии O_2 и $NAD(P)H$. Кардиомиоциты экспрессируют эндотелиальные и нейрональные NOS . Индуцибельные NOS отсутствуют в здоровом миокарде, но их экспрессия может быть вызвана провоспалительными медиаторами [4,10].

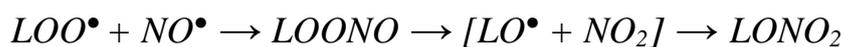
Другой путь синтеза NO осуществляется в ЭТЦ митохондрий, при восстановлении нитрита NO_2^- до NO . Это было показано на крысах, растениях, водорослях и дрожжах. В отличие от вышеуказанного пути, путь NO_2^- -редуктазы не зависит от уровня O_2 и активируется при гипоксии/аноксии. Митохондриальный NO_2^- -синтез NO катализируется цитохром c -оксидазой. Скорость этой реакции увеличивается с возрастанием концентрации NO_2^- и уменьшением pH , т.е. в условиях, которые существуют при гипоксии в клетке, становясь главным источником NO в клетке. Было найдено, что скорость синтеза NO цитохром c -оксидазой в изолированных митохондриях увеличивалась в присутствии SOD и перехватчика супероксида $MnTBAP$ ($Mn(III)$ -тетраakis (4-бензойной кислоты)), следовательно, образованный гипоксическими митохондриями $O_2^{\bullet-}$ реагирует с NO , как только появляется. Выработка NO митохондриями при гипоксии решает парадокс свободных радикалов, описанный выше. Пероксинитрит $OONO^-$, образующийся из $O_2^{\bullet-}$ и NO , в ответе за повышение окислительного стресса в клетке при гипоксии. В отличие от $O_2^{\bullet-}$, уровень которого снижается при клеточной гипоксии, уровень $OONO^-$ возрастает [4,26].

Вместе, генерация АФК и NO определяет так называемый «нитрозо/редокс баланс», который играет главную роль в патофизиологических состояниях [4].

Действие NO опосредованно такими его метаболитами, как S-нитрозотиолы. Предполагается, что низкомолекулярные и ассоциированные с белками S-нитрозотиолы принимают участие в транспорте и стабилизации молекулы оксида азота [34]. S-нитрозотиолы действуют аналогично эндотелиальному фактору релаксации [35], активируют гемсодержащую гуанилатциклазу и ингибируют агрегацию тромбоцитов [36]. В то же время, весьма вероятно, что основной формой депонирования NO в организме могут быть более стабильные по сравнению с S-нитрозотиолами при физиологических условиях нитрозильные комплексы негемового железа с тиольными группами [37].

NO также взаимодействует с белками посредством S-нитрозилирования цистеиновых остатков, изменяя функции белков. Интересно, что при повышении уровня $O_2^{\bullet-}$, S-нитрозилирование ингибируется. NO может выступать как антиоксидант, ингибируя XO и NADPH-оксидазу. NO является липофильным двухатомным газом, свободно диффундирующим через клеточную мембрану, что повышает возможность его участия в межклеточной сигнализации, адаптации тканей к гипоксии. Один тому яркий пример для митохондриальных NO из эндотелиальных клеток – гипоксическая вазодилатация [26].

Одним из антиоксидантных механизмов NO является реакции с радикалами липидов – алкоксильными и липоперекисными, вследствие чего происходит обрыв цепных реакций окисления, и образуются нитрозоперокси- и нитропроизводные липидов [38,39]:



Было установлено, что константа взаимодействия NO с алкоксильными и алкилпероксильными радикалами равна $\sim 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ [38,40,41]. NO – гидрофобная молекула и относится к липидрастворимым антиоксидантам, своей эффективностью сравнимым с α -токоферолом. Для модельной системы было

показано, что α -токоферол и *NO* ингибируют свободнорадикальное окисление линоленовой кислоты [40].

NO приводит к *cGMP*-зависимой и независимой сигнализации: молекула стимулирует синтез внутриклеточного циклического гуанозинмонофосфата (*cGMP*), активируя растворимую гуанилилциклазу, а *cGMP* и протеинкиназа *GI* в свою очередь модулируют функции миоцитов, их рост. *cGMP* является модулятором функций протеинкиназ, фосфодиэстераз, ионных каналов и других физиологически важных мишеней [26]. Конечным результатом этого сигнального пути может стать регуляция тонуса гладкой мускулатуры [42] и ингибирование образования тромбов [43]. Релаксация гладкой мускулатуры сосудов происходит под действием *cGMP*-зависимой протеинкиназы, которая фосфорилирует и активирует Ca^{2+} -чувствительные калиевые каналы [44].

S-нитрозоглутатион (*GSNO*) и *S*-нитрозо-*N*-ацетилпенициламин предотвращают окисление полиненасыщенных жирных кислот [45]. Кроме того, показано что эти соединения защищают легочный эпителий в условиях окислительного стресса и эндотелиальные клетки кровеносных сосудов от токсического действия окисленных липопротеинов низкой плотности (*ЛПНП*) [46]. В условиях окислительного стресса, индуцированного гидропероксидом трет-бутила, в культуре клеток гепатомы *S*-нитрозо-*N*-ацетилпенициламин и синтетический донор *NO* (*PAPA/NO*) защищают гепатоциты от гибели [47]. Было показано, что *NO* в этих условиях ингибирует образование малонового диальдегида – вторичного продукта перекисного окисления липидов. В то же время высокая концентрация *NO* приводила к уменьшению выживаемости клеток гепатомы, что может быть обусловлено дисфункцией митохондрий [47]. Таким образом, протекторная роль *S*-нитрозотиолов и свободного *NO*, вероятно, связана с их антиоксидантными свойствами.

Другим механизмом антиоксидантного действия *S*-нитрозотиолов может быть связывание свободных ионов железа в виде нитрозильных комплексов [48,49]. В связи с этим следует отметить, что *NO*, по-видимому, взаимодействует

с ферритином, который является основной формой депонирования железа в живых организмах. Таким образом, ферритин может участвовать в образовании нитрозильных комплексов железа [50]. Одновременно, синтез самого ферритина регулируется NO [51,52], а проходящая с участием ферритина микросомальная продукция $AФК$ ингибируется донорами NO [53]. Известно, что в зависимости от того, высвобождаются или связываются ионы железа, ферритин может быть, как антиоксидантом, так и прооксидантом [54,55]. Пул «свободного железа» играет ключевую роль в генерации радикалов липидов и $AФК$, модифицирующих биологически важные макромолекулы [56,57]. Низкомолекулярные тиолы и $O_2^{\bullet-}$ катализируют высвобождение ионов железа из ферритина [58].

По данным ряда исследователей NO может восстанавливать такой мощный биологический окислитель, как оксоферрилгем (*порфирин- $Fe^{IV}=O$*), до его ферриформы (*порфирин- Fe^{III}*) [59]. Описан механизм, в ходе которого образуется промежуточное соединение, содержащее группу *порфирин- $Fe-ONO$* . При распаде этого комплекса высвобождается ферриформа гема и нитрит NO_2^- [60]. Такой же механизм предлагают и для взаимодействия NO с гем-содержащими пероксидазами. Этот эффект NO также может играть чрезвычайно важную роль в защите от окислительного стресса, особенно в тканях с высоким содержанием гемопротеидов, как в сердечной мышце. Действительно, поражение эндотелия в ходе гипоксии и последующей реоксигенации коррелирует с образованием оксоферрилгемоглобина [61].

На данный момент известно, что в метаболизме NO принимают участие такие ферменты как глутатион- S -трансфераза, GSH -пероксидаза и ксантинооксидаза XO . GSH -пероксидаза может утилизировать $OONO^-$ и катализировать высвобождение NO из S -нитрозоглутатиона ($GSNO$). Глутатион- S -трансфераза катализирует GSH -зависимое образование NO из органических нитратов. XO способна восстанавливать NO_2^- до NO , то есть является, как и NO -синтаза, еще одним ферментативным источником NO . Важно отметить, что эти

ферменты также участвуют в метаболизме *АФК* – ксантинооксидаза генерирует $O_2^{\bullet-}$, а *GSH*-пероксидаза и глутатион-*S*-трансфераза детоксицируют H_2O_2 и органические гидропероксиды.

Цитотоксические и прооксидантное действие NO^- обычно связано с его способностью продуцировать $ONOO^-$ и другие сильные окислители в ходе взаимодействия с O_2 [15,28,62]. NO^-/HNO образуется в процессе одноэлектронного восстановления NO супероксиддисмутазами (*Cu*-, *Zn*- и *Mn-SOD*), ксантинооксидазой *XO*, *CoQ10-H2* и ферроцитохромом *c* [28,63,64].

Образование HNO обычно сопровождается нарушениями в функционировании *NOS* и распада *S*-нитрозотиолов [28]. В эукариотических клетках *АФК* преимущественно генерируются в митохондриях, а NO вырабатывается митохондриальной NO -синтазой. $ONOO^-$ и высокие концентрации NO необратимо ингибируют дыхание митохондрий, тогда как физиологические уровни NO (в наномолярном диапазоне) вызывают обратимое ингибирование цитохром *c*-оксидазы [65–68]. Однако ингибирование комплексов дыхательной цепи *I* и *III* под действием низкомолекулярных *S*-нитрозотиолов может стимулировать образование $O_2^{\bullet-}$ и H_2O_2 митохондриями [65,69,70]. В связи с этим важно, чтобы *GSNO* был одним из важнейших метаболитов NO в митохондриях [71].

Регуляторная функция NO в значительной степени может определяться балансом его прооксидантных и антиоксидантных свойств. Так, влияя на окислительно-восстановительный статус клетки и реакции свободно-радикального окисления NO может регулировать экспрессию митохондриальных генов и образование таких сигнальных молекул как изопростаноиды (производные арахидоновой кислоты) [19].

В определенных клинических патологиях и некоторых экспериментальных моделях был отмечен NO -индуцируемый апоптоз [72,73]. Запуск апоптоза происходил вследствие снижения уровня кардиолипина, активности

дыхательной цепи и выходом цитохрома *c* из митохондрий в цитозоль [74]. Клетки эндотелия капилляров обладают, однако, высокой стойкостью к *NO*-зависимому апоптозу, поскольку небольшие концентрации *NO* защищают эти клетки ингибированием каспаз [75]. Также высокий уровень глутатиона в клетке приводит к *GSH*-зависимому подавлению апоптоза вследствие *S*-нитрозилирования каспазы-3 [76,77].

1.4. Дыхательная цепь и образование АФК митохондриями.

Митохондрии являются главным источником молекул с макроэргическими фосфатными связями в нормальных клетках. Через различные транспортеры во внутренней мембране митохондрий в матрикс попадают углеводы и жирные кислоты. Электроны от окисленных в цикле Кребса углеводов и от *b*-окисления жирных кислот восстанавливают *NADH* и *FADH₂* соответственно, которые являются субстратами ЭТЦ [23,78]. Дыхательная цепь митохондрий состоит из 5 ферментных комплексов (I-V), интегральных мембранных белков (Рис. 1). Это *NADH-CoQ*-редуктаза (комплекс I), сукцинат *CoQ*-редуктаза (комплекс II), *CoQ*-цитохром *c*-редуктаза (комплекс III), цитохром *c*-оксидаза (комплекс IV) и *ATP*-синтаза (комплекс V) [1,79,80].

Убихинон *CoQ₁₀* и цитохром *c* – две свободно диффундирующие молекулы, которые выполняют функции переносчиков электронов между комплексами I и III, II и III [79]. В качестве доноров электронов для восстановления O_2 и образования H_2O используются *NADH*, *FADH₂* или сукцинат. Эта реакция является многоступенчатой: перенос электронов происходит через четыре белковых комплекса (I-IV) последовательно. Реакция сопряжена с переносом протонов H^+ через внутреннюю мембрану из матрикса в межмембранное пространство. Необходимо отметить, что перенос протонов через комплекс II отсутствует [23]. В результате, на внутренней мембране митохондрии создаётся электрохимический градиент, который используется *ATP*-синтазой для синтеза *ATP* из *ADP* и неорганического фосфата P_i , т.е. происходит окислительное

фосфорилирование [79–81]. Уменьшение электрохимического потенциала митохондрий ($\Delta\psi_m$) в клетке является сигналом к активации путей репарации и/или ликвидации повреждённых митохондрий [81].

После синтеза молекула *ATP* экспортируется из митохондрий в цитозоль через адениннуклеотид-транслоказу, а в матрикс при этом импортируется *ADP*, в то время как P_i также попадает в матрикс через мембранный фосфатный переносчик [23].

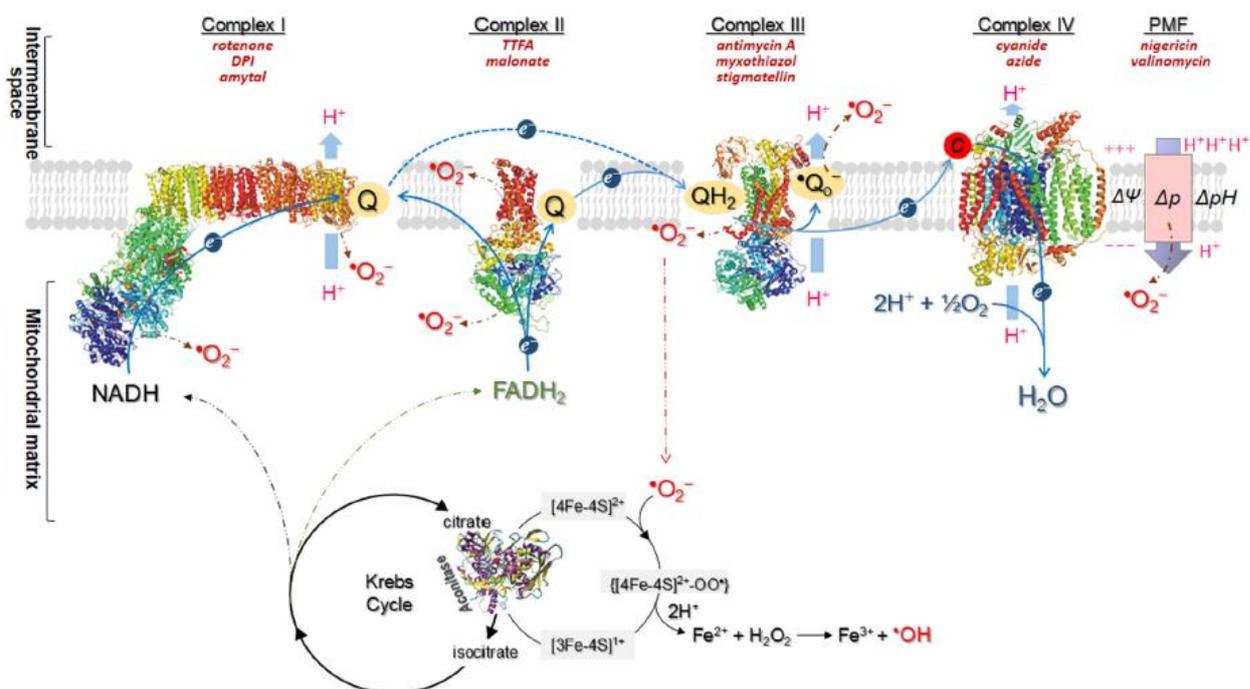


Рис. 1 Схема механизма генерации $O_2^{\bullet-}$ цепью переноса электронов, протон-движущей силой (PMF, Δp) и аконитазой цикла Кребса в митохондриях. Синие стрелки: транспорт электронов от *NADH* или *FADH₂* к O_2 или обратный поток электронов от сукцината, связанного с *FADH₂* к комплексу I. Стрелки коричневым пунктиром: центры генерации $O_2^{\bullet-}$ в митохондриях. При прохождении электронов через ЭТЦ, протоны накачиваются из митохондриального матрикса в межмембранное пространство, создавая градиент электрохимического потенциала $\Delta\psi$ или протон-движущую силу (Δp) через внутреннюю мембрану. ΔpH – разность *pH* через мембрану, протонный градиент. Δp может способствовать образованию $O_2^{\bullet-}$ в состояниях 2 и 4

дыхательной цепи. Черные окружности - аконитаза цикла Кребса, которая генерирует субстраты ЭТЦ - $NADH$ и $FADH_2$ и является источником образования OH^\bullet , индуцированных $O_2^{\bullet-}$. Ингибиторы, используемые для изучения компонентов ЭТЦ, ΔpH и $\Delta\psi$, выделены красным курсивом [78].

Вклад каждого комплекса ЭТЦ в общее количество образовавшегося $O_2^{\bullet-}$ зависит от ткани. В изолированных митохондриях млекопитающих *in vivo* большая часть $O_2^{\bullet-}$ образуется в комплексе I. Показано [82], что наибольшая скорость образования H_2O_2 – продукта превращений супероксидного радикала $O_2^{\bullet-}$ в матриксе митохондрий – наблюдается в состоянии 4 дыхательной цепи при наличии сукцината как субстрата дыхания и в отсутствии субстратов фосфорилирования. Как известно, в этих условиях трансмембранный потенциал достигает значений свыше 180 мВ, что никогда не наблюдается в состоянии 3 дыхательной цепи, то есть, при наличии и ADP , и Pi [82]. Усиленная генерация H_2O_2 в таком состоянии может быть легко снята добавлением либо ADP и Pi – субстратов фосфорилирования, либо разобщителей окислительного фосфорилирования, что ведет к снижению $\Delta\psi_m$ за счет запуска процесса синтеза ATP или увеличения протонной проводимости внутренней мембраны митохондрий, соответственно. На основе экспериментальных данных высказано предположение [83], что основная часть $O_2^{\bullet-}$ в указанных выше условиях генерируется в комплексе I и связана с обратным переносом электронов от сукцината на NAD^+ . Действительно, ротенон – ингибитор, блокирующий обратный перенос электронов в комплексе I – снижает скорость образования H_2O_2 в состоянии 4 на 80 %. В данном случае генерация $O_2^{\bullet-}$ происходит главным образом со стороны матрикса на внутренней мембране митохондрий.

Любопытно, что прямой транспорт электронов в комплексе I со связанного с NAD субстрата даёт небольшую генерацию $O_2^{\bullet-}$. При добавлении ротенона, скорость возрастает, но не достигает значений при обратном транспорте. Видимо, для высокой скорости генерации $O_2^{\bullet-}$ в комплексе I *in vitro* требуется

достаточный запас электронов, высокий трансмембранный градиент pH и особая конфигурация, возникающая при обратном транспорте электронов или при ингибировании комплекса I большой концентрацией миксатиазола (более известного, как ингибитор комплекса III).

В других участках ЭТЦ также возможна генерация $O_2^{\bullet-}$, в частности в присутствии ингибиторов электронного транспорта.

Комплекс III можно рассматривать, как важный источник $O_2^{\bullet-}$, особенно когда ЭТЦ подавляется антимицином, специфическим ингибитором центра Q_i . Доказано, что образование супероксидных радикалов в комплексе III происходит в результате взаимодействия семихинонных форм коэнзима Q_{10} ($CoQ_{10}^{\bullet-}$ и/или $CoQ_{10}-H^{\bullet}$), с O_2 [10,78].

Существуют два центра образования $O_2^{\bullet-}$ (Рис. 2): Q_o -центр, расположенный во внутренней мембране со стороны межмембранного пространства, и Q_i -центр, находящийся во внутренней мембране со стороны матрикса. $O_2^{\bullet-}$, образующиеся в Q_o -центре, выходят в межмембранное пространство, тогда как $O_2^{\bullet-}$ из центра Q_i , попадают только в матрикс [10,78].

В результате дыхания большая часть O_2 восстанавливается до H_2O . Однако, примерно 1-2 % восстанавливается частично до $O_2^{\bullet-}$, который может стать H_2O_2 или OH^{\bullet} [10,26].

При исследовании в изолированных митохондриях и в выделенном комплексе III было обнаружено, что генерация АФК увеличивается экспоненциально при значениях $\Delta\psi_m > 140$ mV. В гладкомышечных клетках бычьей коронарной артерии гипоксия вызвала гиперполяризацию $\Delta\psi_m$ и увеличение генерации АФК. Сильная взаимосвязь высокого $\Delta\psi_m$ и генерации АФК в сердце также следует из кардиопротекторного эффекта снижения $\Delta\psi_m$ [3].

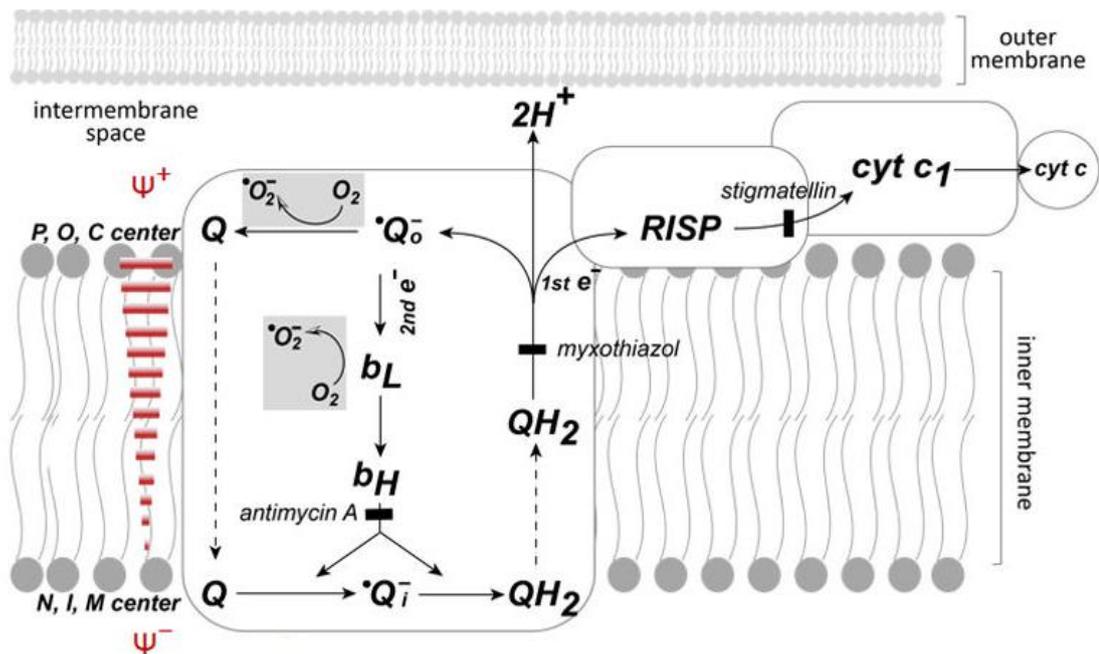


Рис. 2 Генерация $O_2^{\bullet-}$ в Q-цикле комплекса III. Серые области показывают реакции, связанные с генерацией $O_2^{\bullet-}$. P, O и C - положительная, внешняя и цитоплазматическая стороны мембраны. N, I и M - отрицательная, внутренняя и матричная стороны, соответственно. Закрашенные черные и красные прямоугольники показывают обратный перенос электрона от b_L к b_H с помощью ингибирования повторного окисления b_H антимицином A и мембранного потенциала $\Delta\psi$ [78].

Митохондриальные АФК опаснее для клетки, чем АФК из любых других источников, поскольку: 1) *mtDNA* более уязвима для OH^\bullet и других АФК, чем ядерная *DNA*, поскольку она ближе к источнику АФК, а OH^\bullet - короткоживущий радикал; 2) внутренняя митохондриальная мембрана поддерживает гораздо более высокую разность потенциалов, чем любая другая мембрана, она должна быть хорошим изолятором, чтобы быть устойчивой к электрическим пробоям: любое её повреждение АФК приводит к утечке H^+ и диссипации энергии дыхательной цепи; 3) кардиолипин, являющийся обязательным компонентом внутренней мембраны митохондрий, в отличие от других фосфолипидов, содержит не 1, а 4 остатка ненасыщенных жирных кислот; поэтому кардиолипин окисляется АФК гораздо быстрее, чем остальные фосфолипиды; 4) только

митохондриальные *AФК* вовлечены в инициацию программируемой смерти от органеллы до организма [10,84].

Разрушение митохондрии с дисфункцией, митоптоз, может произойти в результате открытия пор внутренней мембраны, вследствие чего исчезает $\Delta\psi_m$, а *NAD(P)H* и глутатион *GSH* покидают матрикс митохондрии. Органеллы с недостатком $\Delta\psi_m$ распознаются лизосомами и перевариваются. Этот механизм позволяет очищать митохондриальную популяцию от митохондрий с дисфункциями. В случае, когда все митохондрии потеряли $\Delta\psi_m$ (при появлении в клетке разобщителя или ингибитора дыхания), большинство из них скапливается около клеточного ядра, окружается мембраной и удаляется из клетки. Если процесс митоптоза проходит недостаточно быстро, то у митохондрий с повышенным содержанием кальция внутри происходит открытие поры, изменяющей проницаемость митохондриальной мембраны, снижение митохондриального мембранного потенциала $\Delta\psi_m$, набухание матрикса, и, наконец, разрушение внешней митохондриальной мембраны и выходу межмембранных белков в цитозоль, среди которых есть проапоптотические, как цитохром *c*, которые иницируют апоптоз [3,4,84].

1.5. *CoQ* и его восстановленная форма.

Причиной 31% всех смертельных случаев в мире являются сердечно-сосудистые заболевания (*ССЗ*) [85], 42% из которых приходится на ишемическую болезнь сердца (*ИБС*). Распространенность *ИБС* в последние годы растет не только за счет увеличения числа лиц пожилого возраста, но и за счет подверженности психоэмоциональным стрессам лиц среднего и молодого возраста.

Повреждение тканей сердца во время ишемии сопровождается изменениями в функционировании и морфологии, являющимися следствием окислительного стресса, уменьшением запасов *АТФ* в миоцитах, а также перекисного окисления липидов мембран клетки [20]. Было показано, что реперфузия сердца после

недлительной ишемии может предотвращать повреждение тканей. Восстановление тока крови после более длительной ишемии сопровождалось так называемого реперфузионного повреждения сердца. «Синдром реперфузии» у пациентов с острым инфарктом миокарда описали в 1972 году *Shen* и *Jenning*. Повреждение тканей сердца во время реперфузии, которое сопровождается резким снижением содержания CoQ_{10} – важного компонента клеток, участвующего в синтезе ATP и энергообеспечении организмов с аэробным метаболизмом миокарда, обусловлено двумя механизмами: увеличением проницаемости митохондриальных каналов и увеличением продукции свободных радикалов и $AФК$ в результате адгезии полиморфонуклеарных моноцитов [86]. Уменьшение количества CoQ_{10} в ишемизированном миокарде, в первую очередь, связано с повышенным расходом эндогенного CoQ_{10} на нейтрализацию продуцируемых свободных радикалов, что, в условиях ишемии миокарда, не может быть компенсировано организмом.

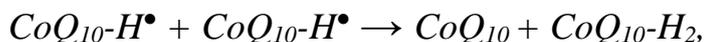
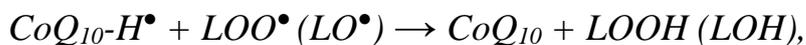
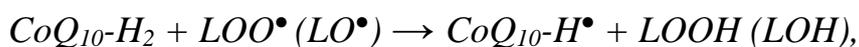
В организме человека CoQ_{10} синтезируется из производных тирозина, фенилаланина и мевалоновой кислоты. CoQ_{10} может находиться в организме в трех редокс формах: окисленной, полувосстановленной (семихинонной) и восстановленной [87]; более чем 90% находится в восстановленной форме (CoQ_{10-H_2} , убихинол) и около 10% – окисленной (CoQ_{10} , убихинон). Поскольку восстановленная форма CoQ_{10} является внутриклеточным антиоксидантом, исследователи предполагают, что окислительно-восстановительный статус этого кофермента является маркером патологий, вызванных окислительным стрессом [88]. Именно в восстановленной форме CoQ_{10} выступает в качестве антиоксиданта, предотвращающего повреждение мембран в липосомах, $ЛПНП$, в протеинах, DNA и биологических мембранах [89]. Более выраженный эффект CoQ_{10-H_2} по сравнению с окисленной формой обусловлен химическим строением веществ. Убихинол CoQ_{10-H_2} имеет два дополнительных электрона и протона, в отличие от убихинона. CoQ_{10} нейтрализует свободные радикалы, принимая электрон, тогда как убихинол отдает и обеспечивает, таким образом,

больший антиоксидантный эффект. Кроме того, две гидроксильные группы в молекуле $CoQ_{10}-H_2$ улучшают растворимость в воде и, значит, проникающую способность и биодоступность [90].

В процессе функционирования дыхательной цепи CoQ_{10} подвергается последовательному одноэлектронному восстановлению с образованием убисемихинона $CoQ_{10}-H^\bullet$ и полностью восстановленной формы – убихинола $CoQ_{10}-H_2$:

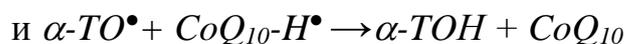
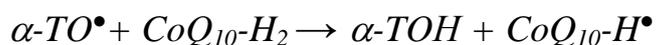
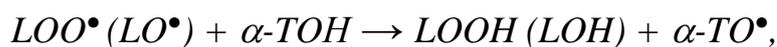


Восстановленные фенольные формы коэнзима CoQ_{10} , подобно другому природному фенолу – α -токоферолу, являются антиоксидантами, причем высокая эффективность антиоксидантного действия $CoQ_{10}-H_2$ *in vivo* определяется его возможностью непосредственно взаимодействовать с радикалами липидов типа LOO^\bullet или LO^\bullet с промежуточным образованием радикала $CoQ_{10}-H^\bullet$ в соответствии с реакциями [91–93]:



где LO^\bullet – алкоксильный радикал (гидроксильный, липоксильный), LOO^\bullet – диоксильный радикал (пероксильный, липопероксильный), $LOOH$ – гидропероксид (липогидропероксид) (Рис. 3).

Аналогичный механизм используется в процессе убихинол-зависимой биорегенерации феноксильных свободных радикалов α -токоферола ($\alpha-TO^\bullet$), образующихся при взаимодействии витамина E ($\alpha-TOH$) с липидными радикалами [91–93]:



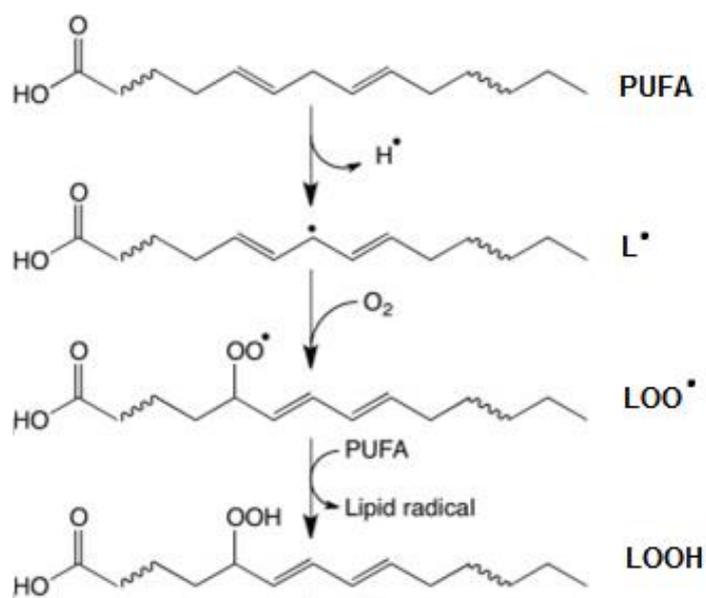


Рис 3. Схема реакций перекисного окисления липидов. PUFA – полиненасыщенные жирные кислоты, L $^\bullet$ – липидный радикал, LOO $^\bullet$ – пероксильный радикал, LOOH – гидропероксид.

Высокая эффективность восстановленной формы CoQ_{10} определяется способностью восстановления двух токофероксильных или липидных радикалов одной молекулой $CoQ_{10}-H_2$. Биологический смысл процесса состоит в том, что в окислительных реакциях расходуется не эссенциальный компонент (витамин E), а другой природный жирорастворимый антиоксидант – $CoQ_{10}-H_2$, потребность в котором может восполняться путем биосинтеза, а также путем быстрой регенерации в митохондриальной цепи переноса электронов [94].

CoQ_{10} , используемый для профилактики и терапии ССЗ, предотвращает повреждение биологических мембран [89], оказывает противоишемическое, кардиопротекторное и антигипертензивное действие [95,96]. Кардиопротекторные свойства развиваются благодаря тому, что CoQ_{10} участвует в биоэнергетических процессах в кардиомиоцитах как переносчик в цепи транспорта электронов в митохондриях, связывающий убихинон-редуктазу с bc_1 фрагментом (комплексом III) [97–99], ингибитор окисления и образования временных пор в мембране митохондрий под действием АФК [100].

Митохондриальный пул восстановленного коэнзима CoQ_{10} (Рис.4.) служит ключевым антиоксидантом, предохраняющим компоненты мембран митохондрий от окислительной модификации [101,102]. Парадоксально, но CoQ_{10} одновременно участвует и в образовании в митохондриях супероксидных анион-радикалов – посредством реакции своих свободнорадикальных интермедиатов (убисемихинонов) с O_2 [103,104]:

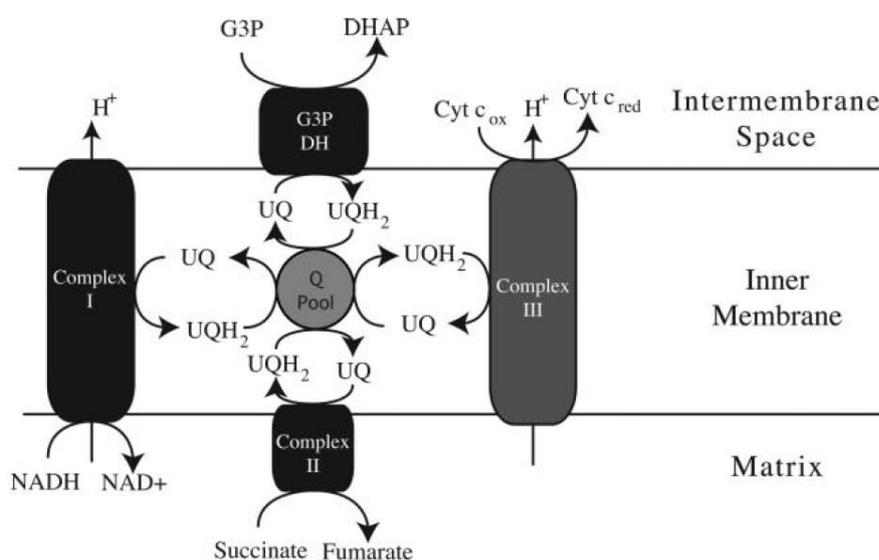
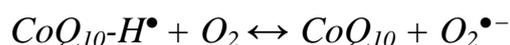


Рис.4. Взаимодействие ферментов дыхательной цепи с митохондриальным пулом убихинона. DHAP, дигидроксиацетонфосфат; UQ - убихинон; UQH₂ - убихинол; Cyt c_{ox} и Cyt c_{red} - окисленный и восстановленный Cyt c, соответственно [105].

В опубликованных результатах исследования фармакокинетики CoQ_{10} при однократном [106] и многократном [107] внутривенном введении показано, что значительная часть убихинона CoQ_{10} редуцируется в первые минуты после инъекции, и уже через 7 часов преобладает концентрация убихинола $CoQ_{10}\text{-H}_2$: снижение общего содержания CoQ_{10} в плазме сопровождается постепенным увеличением содержания $CoQ_{10}\text{-H}_2$.

Развитие прооксидантного эффекта на фоне введения $CoQ_{10}\text{-H}_2$ в дозах, превышающих терапевтическую (6 и 9 мг/кг), характерно для большинства антиоксидантов. К основным факторам, определяющим возможность инверсии

антиоксидантных свойств, относятся концентрация самого антиоксиданта, концентрация и химическая структура субстрата окисления и наличие в реакционной среде катионов металлов переходной валентности, в том числе в клетках и тканях органов [108].

Из-за своей первостепенной биологической роли, CoQ_{10} в настоящее время широко используется в качестве диетической добавки для стимулирования функций организма, в первую очередь, при опасности сердечно-сосудистых и/или нейродегенеративных заболеваний [109–113]. При этом отношение $CoQ_{10}-H_2$ /общий CoQ_{10} в крови часто используется как биомаркер окислительного стресса. Как известно, CoQ_{10} в организме исходит из двух источников: клеточного биосинтеза, который достигает максимума в раннем и среднем возрасте и постепенно снижается с возрастом, и диетических добавок [114,115]. Поскольку CoQ_{10} имеет высокую концентрацию именно в сердечной мышце, многие лабораторные, а также клинические исследования до сих пор связаны с поиском путей предотвращения и лечения сердечной недостаточности с помощью дополнительного введения в организм различных доз и лекарственных форм этого вещества [109].

Несмотря на существенные успехи в использовании различных по своему химическому составу препаратов с коэнзимом Q_{10} в терапевтической практике, почти непреодолимой преградой оставалась его низкая биодоступность. Долгое время практически все препараты содержали в своем составе окисленную форму CoQ_{10} , низкая биодоступность которой была связана с большой молекулярной массой, высокой липофильностью и плохой растворимостью в водной (полярной) среде. [88]. В настоящее время большое внимание уделяется исследованиям физико-химических, биохимических и фармакологических характеристик вновь созданных композиций, содержащих в качестве активной компоненты $CoQ_{10}-H_2$. Оказалось, что препараты, содержащие $CoQ_{10}-H_2$, обладают более подходящими для введения в организм характеристиками, в частности – более высокой биодоступностью. Восстановленный коэнзим Q_{10}

демонстрирует большую эффективность при более низких дозах, чем окисленный, поскольку он уже находится в активной форме и не нуждается в преобразовании организмом. Был проведен ряд лабораторных и клинических исследований, весьма отчетливо демонстрирующих перспективность использования препаратов с $10\text{-}H_2$ [88,90,116].

В результате проведенного доклинического исследования фармакологической активности препарата «водорастворимой формы убихинола-10» и референтного препарата на модели реперфузионного повреждения миокарда крыс была установлена фармакологическая активность $CoQ_{10}\text{-}H_2$ в дозе 3 мг/кг и прооксидантная активность – в дозе 9 мг/кг [95].

Создание лекарственных средств на основе восстановленного коэнзима Q_{10} в качестве активного вещества позволяет достичь максимального проявления терапевтического эффекта. Актуальным является создание готовой лекарственной формы $CoQ_{10}\text{-}H_2$, подходящей для инъекционного введения с высоким уровнем высвобождения, малой токсичностью и доказанной эффективностью. Приведенное ниже экспериментальное исследование было предпринято с целью изучения возможных механизмов кардиопротекторного действия созданного в Санкт-Петербурге препарата «водорастворимой формой убихинола-10».

1.6. Митохондриально-направленные антиоксиданты.

Последние пятнадцать лет активно велись поиски новых препаратов для защиты клеток от повреждений, вызванных образующимися в митохондриях свободными радикалами. Окислительные повреждения митохондрий могут быть снижены путем увеличения экспрессии антиоксидантных ферментов в митохондриях [117]. Большинство низкомолекулярных антиоксидантов, необходимых для увеличения антиоксидантной ёмкости, способно достигать митохондрий только в очень небольших количествах [118].

Для эффективного применения в медицине антиоксидант должен обладать следующими свойствами: избирательно накапливаться в митохондриях тканей, наиболее подверженных окислительным повреждениям, эффективно предотвращать образование окислительных повреждений внутри митохондрий, возвращаться в активную форму, находясь в митохондриях, и действовать как клинически эффективный антиоксидант в концентрациях, намного ниже вызывающих побочные токсические эффекты [119].

Одно из решений этой проблемы – присоединение молекулы с антиоксидантными свойствами к «переносчику», способному проникать через внешнюю мембрану клетки и мембраны митохондрий, таким образом, доставляя антиоксидант к месту, где он может предотвратить повреждения, возникающие в результате свободнорадикального окисления липидов.

Поскольку внутренняя мембрана митохондрий характеризуется большим отрицательным потенциалом, возможные антиоксиданты должны иметь положительно заряженную часть, например, липофильный катион, такой как трифенилфосфоний (*TRP*) [119].

Два свойства липофильных катионов позволяют им эффективно доставлять антиоксиданты в митохондрии: это их способность проходить через липидные бислои без необходимости специальных механизмов переноса, и накапливаться внутри митохондрий благодаря высокому мембранному потенциалу [120,121]. Липофильные катионы могут легко проходить сквозь фосфолипидные бислои, так как энергия активации для перемещения липофильного катиона сквозь гидрофобный барьер биологической мембраны гораздо ниже, чем для других катионов [122]. Энергия активации для такого переноса - энергия, требуемой для перемещения катиона из водной фазы в гидрофобный центр мембраны; в основном, определяется энергией Борна, увеличивающей энергию активации, и гидрофобной энергии, уменьшающей ее [121]. Энергия Борна W_B для катиона с зарядом Z равна:

$$W_B = \frac{339 Z^2}{r} \quad (\text{кДж/моль})$$

Таким образом, энтальпия, необходимая для переноса катиона внутрь мембраны, обратно пропорциональна радиусу (r) катиона. Гидрофобная энергия – энергия необходимая для переноса незаряженной молекулы такого же радиуса с такой же гидрофобностью из водной среды в липидный центр мембраны [121,122]. Это сила притяжения, и чем больше площадь поверхности гидрофобного катиона, тем сильнее гидрофобный эффект. Таким образом, большой гидрофобный радиус катиона TPP (около $4,2 \text{ \AA}$) позволяет ему легче, по сравнению с другими катионами, проходить через фосфолипидные бислои. Дальнейшее увеличение гидрофобности вещества должно увеличивать степень прохождения через мембраны.

Липофильные катионы перемещаются из положительно заряженной части в отрицательно заряженную, пока не образуется достаточно большой градиент концентраций, чтобы уравнивать электрохимический потенциал молекул в двух частях. На этой стадии поглощение вещества уравнивается с мембранным потенциалом $\Delta\psi$ и соотношением концентраций свободных, несвязанных катионов в двух частях описывается уравнением Нернста:

$$\Delta\psi = \frac{2,303RT}{F} \log_{10} \left(\frac{[cation_{in}]}{[cation_{out}]} \right)$$

Так как $2,303RT/F$ равняется $59,5-61,5 \text{ мВ}$ при $25-37^\circ\text{C}$, то при увеличении $\Delta\psi$ на каждые $\sim 60 \text{ мВ}$ накопление катионов внутри митохондрий будет увеличиваться в 10 раз. У плазматической мембраны потенциал составляет $30-60 \text{ мВ}$ (внутри отрицательный), накопление липофильных катионов в цитоплазме увеличится в 5-10 раз. Для митохондрий в клетках потенциал на мембране обычно равен $140-180 \text{ мВ}$ [121], и катионы из цитозоля будут дальше избирательно накапливаться внутри митохондрий в несколько сот раз лучше (Рис. 5). Из этого можно сделать вывод, что, присоединив липофильный катион

к антиоксиданту, можно будет его направить внутрь клетки и дальше в митохондрии, что позволит защитить митохондрии от окислительного стресса.

Много различных липофильных катионов имеют достаточную гидрофобную поверхность, чтобы проникать сквозь мембраны и накапливаться внутри митохондрий. Например, флуоресцентные липофильные катионы, такие как родамин, *JC-1* и компоненты *MitoTracker*, широко используемые для селективной визуализации митохондрий внутри клеток [123].

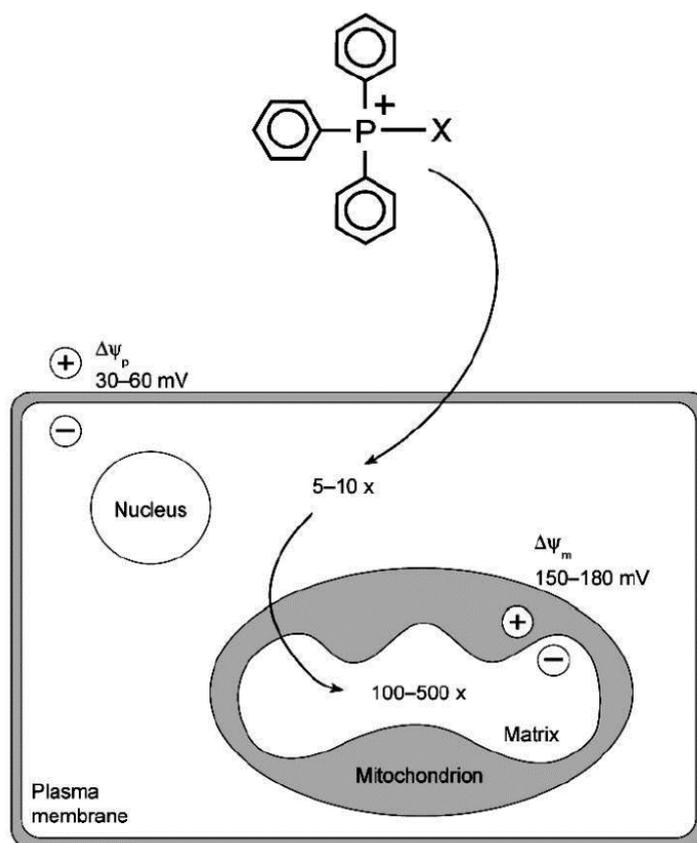


Рис. 5. Проникновение митохондриально-направленного соединения. Катион *TPP*, присоединенный к фрагменту *X* для доставки в митохондрии, накапливается в цитоплазме в 5-10-кратной концентрации, благодаря потенциалу плазматической мембраны ($\Delta\psi$), а затем в матриксе (в 100-500 раз больше) благодаря потенциалу митохондриальной мембраны ($\Delta\psi_m$) [121].

Вещества, содержащие липофильные катионы, как *TPP*, используются для измерения $\Delta\psi$ митохондрий [124]. Модель прохождения *TPP* катионов через мембраны имеет ряд важных следствий взаимодействия *TPP* катионов с

митохондриями. Во-первых, постоянная концентрация липофильных катионов в гидрофобном центре мембраны пренебрежимо мала, даже если они проходят относительно легко через мембраны. Это подтверждается очень низкой растворимостью даже очень гидрофобных *TRP* катионов [125]. Во-вторых, эти вещества имеют склонность адсорбироваться как монослой на поверхности фосфолипидных бислоев, благодаря локальной яме потенциальной энергии. При низких концентрациях, эта адсорбция приближенно описывается изотермой адсорбции Ленгмюра, которая подразумевает, что катионы адсорбируются независимо у мест связывания на поверхности [121,122,124]. В-третьих, более гидрофобные катионы алкилтрифенилфосфония более сильно адсорбируются на мембранах. Кроме того, *TRP* компонент всегда обнаруживаются в одном и том же положении в яме потенциальной энергии (*Рис. 6*) у поверхности мембран, тогда как гидрофобная алкильная цепь находится в гидрофобном центре мембраны [126,127]. Следовательно, расстояние, на которое присоединенная молекула может проникнуть в мембрану, определяется длиной алкильной цепи, присоединенной к *TRP* части [105]. И наконец, объем внутренней митохондриальной мембраны существенно больше объема внешней мембраны, значит большая доля катионов алкилтрифенилфосфония в митохондриях связаны с внутренней мембраной [121]. Небольшое увеличение гидрофобности, например, в случае *mitoE*, приведет к 84% связывания с мембраной. Для еще более гидрофобных веществ, например, *mitoQ*, доля связывания с мембраной должна быть еще выше [128].

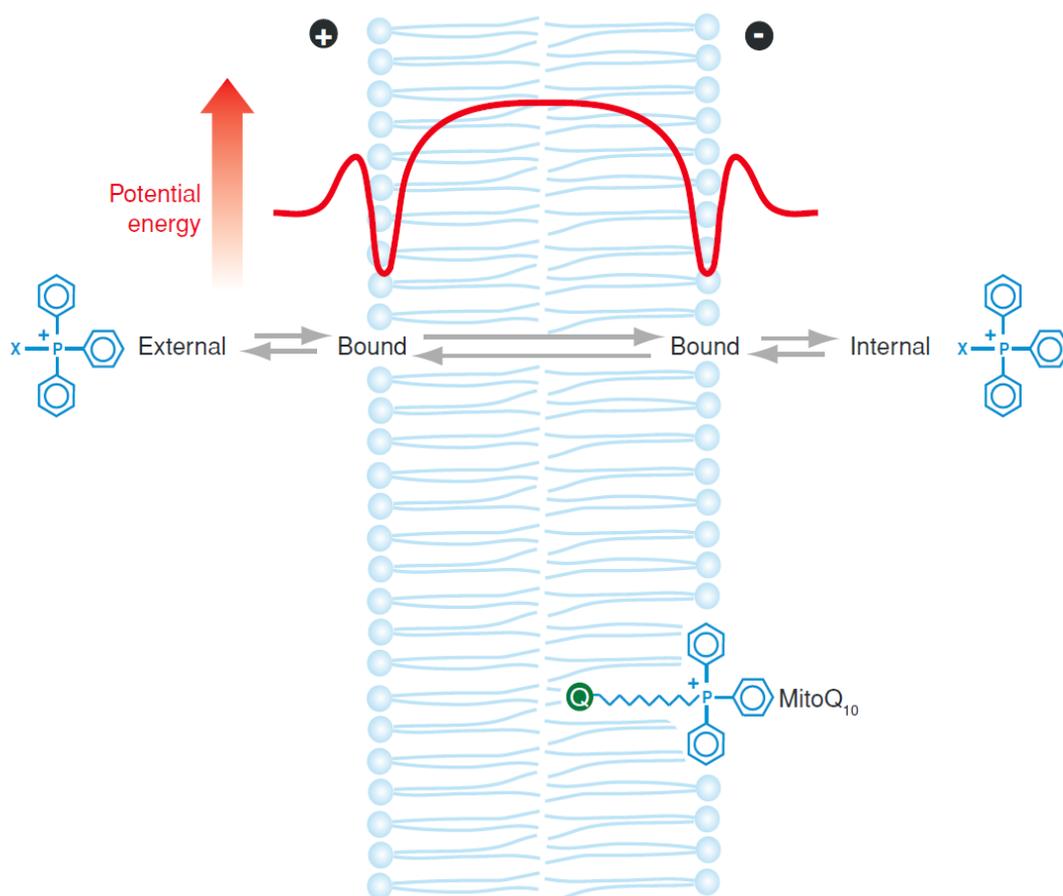


Рис. 6. Характерный энергетический профиль мембраны и схема движения соединений с TPP через фосфолипидный бислой. Во время движения катионы TPP первоначально адсорбируются на мембране в потенциальной энергетической яме на внешней поверхности мембраны, затем они быстро проходят через гидрофобное ядро мембраны к потенциальной энергетической яме на другой поверхности мембраны с последующей десорбцией из мембраны. MitoQ10 (показан) будет в основном присутствовать в адсорбированном состоянии на внутренней поверхности внутренней мембраны, причем фрагмент TPP будет находиться в потенциальной яме, а алкильный остаток Q внутри мембраны [127].

Множество различных антиоксидантов может быть направлено в митохондрии, с помощью присоединения TPP катиона, поэтому были получены вещества, содержащие различные антиоксидантные части, действующие на образующиеся в митохондриях активные формы кислорода и

свободнорадикальные интермедиаты липидов (Рис. 7). Были созданы антиоксиданты, эффективные против перекисного окисления липидов: митохондриально-направленный убихинол (*mitoQ*) и α -токоферол, основная часть натурального витамина E (*mitoVitE*) [127]. Кроме того, синтезировали митохондриально-направленную супероксид-дисмутазу (*mitoSOD*). *MitoPeroxidase* содержит GSH-пероксидазу, за счет чего достигается защита от перекисного окисления липидов, вызываемого Fe^{2+}/H_2O_2 . В настоящее время продолжаются работы по созданию и изучению взаимодействия таких молекул с митохондриями.

В статье 1997 г. В.П. Скулачев ввёл термин «феноптоз» для обозначения разных видов программируемой смерти организма. Там же он предположил, что старение – особый случай медленного феноптоза, вызванного митохондриальными АФК. Повышение концентрации митохондриальных АФК с возрастом было ранее продемонстрировано в митохондриях *Drosophila in vivo*, где проникающий катион был использован как зонд для АФК.

Группа д-ра Б.В. Черняка показала, что при варьировании катионного остатка, TPP может быть успешно заменен синтетическим Родамином 19 (*SkQR1*), Родамином В (*SkQR4*) или природными проникающими катионами берберином (*SkQB*) и пальмитином (*SkQP*). Каждый вариант был активен в тестовых системах, *SkQR1* был немного более эффективным.

Были показаны [84,129] следующие результаты антиоксидантной активности *SkQ*: $SkQB < MitoQ < SkQ3 < SkQ1 < SkQT$. Это означает, что удаление метильной и метокси групп CoQ_{10} повышает активность до *SkQT*, у которого нет метоксигруппы и одна метильная группа. Но удаление последней метильной группы (*SkQB*) резко уменьшает антиоксидантные свойства. *SkQT* – оптимальный антиоксидант, по крайней мере для изолированных митохондрий и культур клеток [84].

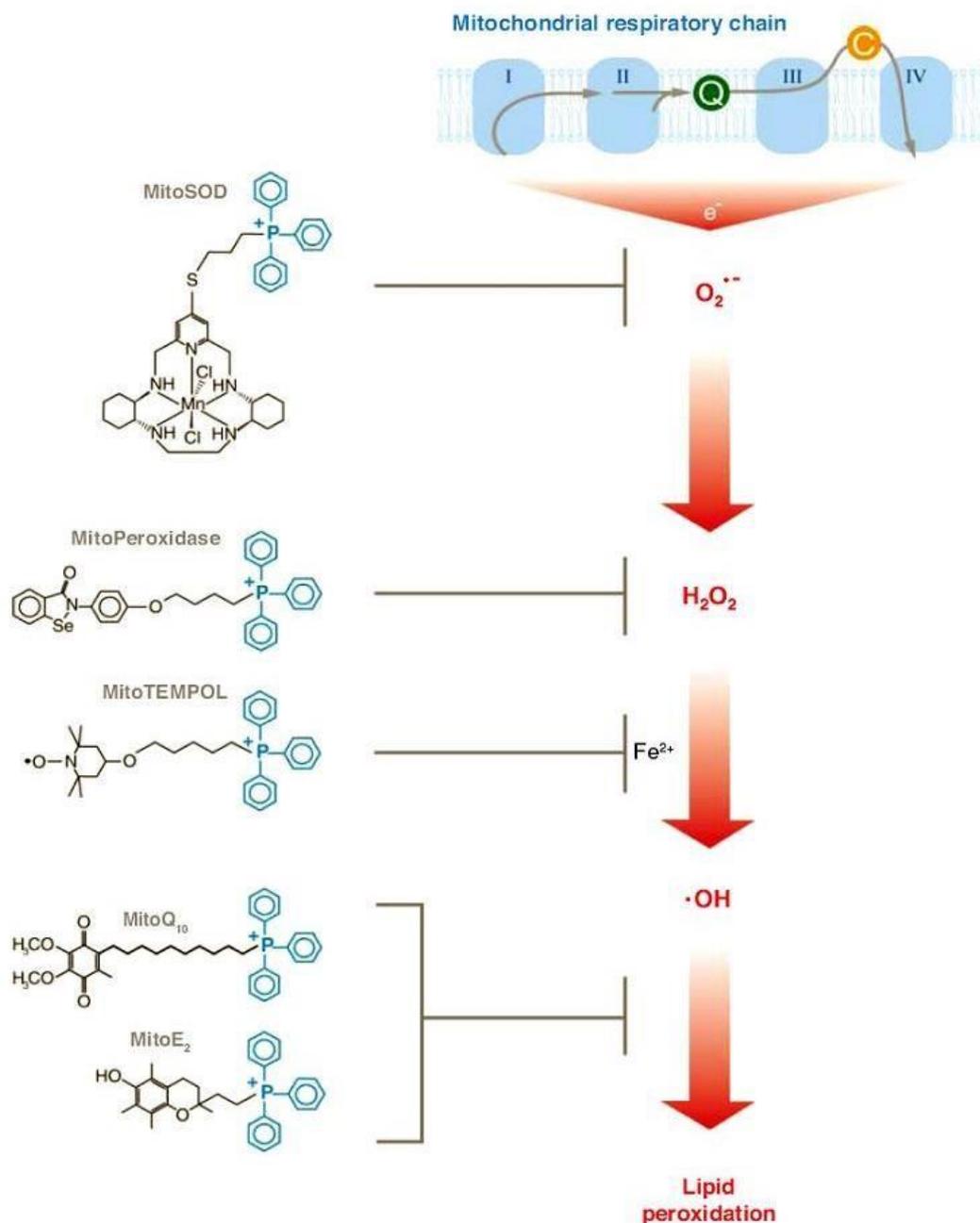


Рис. 7. Митохондриально-направленные антиоксиданты, действующие на разные активные формы кислорода [127].

В группе В.П. Скулачева было показано, что синтетический митохондриально-направленный антиоксидант *SkQ1* продлевает жизнь грибам, растениям, ракообразным, насекомым, рыбам и млекопитающим. У мышей с прогерией эффект применения *SkQ1* был идентичным митохондриально-направленной каталазе, которая значительно увеличивала время их жизни. У некоторых млекопитающих *SkQ1* замедлял развитие большого числа

заболеваний, обусловленных старением. Содержащий *SkQ1* препарат «Визомитин» доступен в России с 2012.

В работе [130] показано, что *SkQB* обладает гораздо меньшим антиоксидантным действием и существенно более высоким прооксидантным действием в сравнении с подобными производными пласто- и толухинона *SkQ1* и *SkQT* в экспериментах на изолированных митохондриях. При субмикромольных концентрациях *SkQB* можно рассматривать как митохондриально-направленный прооксидант. Возможность использования *SkQB* как противораковое лекарство для лечения, например, рака простаты, где клетки чувствительны к митохондриальным АФК, обсуждается.

Высокоэффективные *SkQ* позволяют использовать наномольные концентрации этих антиоксидантов для лечения *in vivo*, что уменьшает вредные побочные эффекты. Однако, передозировка возможна, в первую очередь поскольку *SkQ*, как и большинство антиоксидантов, становится прооксидантом при увеличении концентрации. К счастью, «окно» между про- и антиоксидантными эффектами велико (30-1000 раз). Для *MitoQ*- и *CoQ*-производных окно гораздо меньше.

Приведенное ниже экспериментальное исследование было предпринято с целью поиска зависимости активности митохондриально-направленных антиоксидантов от химической структуры этих веществ.

1.7. Образование динитрозильных комплексов железа в митохондриях.

Динитрозильные комплексы железа ДНКЖ с тиоловыми лигандами были обнаружены в тканях животных и дрожжах в 60-х годах XX в. тремя группами исследователей в СССР, США и Великобритании. Для ДНКЖ характерен анизотропный сигнал ЭПР с $g=2,03$. Парамагнитные центры (2,03 комплексы) были определены после того, как удалось продемонстрировать, что форма и другие параметры сигнала ЭПР полностью совпадают с формой и параметрами

сигнала ЭПР водорастворимых низкомолекулярных ДНКЖ с цистеиновыми лигандами в замороженном растворе.

В настоящее время, NO_2^- считается одним из основных источников NO в организме животных и человека, что обусловлено способностью его протонированной формой (азотистой кислоты) после восстановления образовывать NO . Источником NO для образования ДНКЖ в культуре клеток животных и человека может также быть NO -синтазная реакция. И наоборот, в физиологических условиях ДНКЖ, как и S -нитрозотиолы, являются донорами NO и ионов NO^+ [11].

Белковые ДНКЖ играют роль депо NO , но их основная функция, как и в случае с ДНКЖ, содержащими нетиоловые лиганды, состоит в стимулировании S -нитрозилирования тиолов (глутатиона или цистеина) путем передачи NO^+ . Другой путь состоит в передаче $Fe(NO_2)$ -групп на тиолы и ведет к образованию ДНКЖ с тиоловыми лигандами, разрушению железосерных кластеров белков. Этот процесс сопровождается ингибированием ряда ферментов, таких как Na^+/K^+ -АТРаза, глутатионредуктаза и глутатион- S -трансфераза [131]. Форма и ширина сигналов ЭПР белковых ДНКЖ определяются анизотропией g -фактора ($g_{\perp} = 2,04$; $g_{\parallel} = 2,014$) и сверхтонкой структурой (СТС), которая не меняется при возрастании температуры от $77K$ до температуры окружающей среды [132]. При таких условиях подвижность белка слишком мала, чтобы получить усреднение анизотропии g -фактора и СТС; такие различия более характерны для низкомолекулярных цистеиновых и глутатионовых ДНКЖ. При комнатной температуре ДНКЖ даёт синглетный сигнал с полушириной $0,7$ мТл при $g_{iso} = 2,03$ и разрешённой СТС с 13 компонентами. Образование этого сигнала является результатом сверхтонкого взаимодействия неспаренного электрона с ядрами азота двух NO^+ -лигандов и протонами четырех метиленовых групп, находящихся вблизи от атома серы двух цистеиновых или глутатионовых лигандов.

Анализ различных характеристик сигнала показывает, что ДНКЖ имеющим этот сигнал соответствует формула: $\{(RS^+)_2Fe^+(NO^+)_2\}$, где RS^+ - тиоловые группы белков; однако, возможна замена тиоловых групп нетиоловыми лигандами. Заряд NO^+ может быть нейтрализован отрицательно заряженными ионами, например, низкомолекулярными тиолами. В этом случае ДНКЖ характеризуются формулой: $\{(RS^+)_2Fe^+(NO^+ \dots \dots ^-SR^*)_2\}^-$. Эффективный электронный спин $S=1/2$; неспаренный электрон в основном локализован на d_{z^2} -орбитали атома железа с d^7 электронной конфигурацией [2].

Образование парамагнитных ДНКЖ с тиоловыми и нетиоловыми анионными лигандами включает диспропорционирование двух нейтральных молекул NO , что приводит к образованию нитрозильного катиона NO^+ и нитроксильного аниона NO^- :

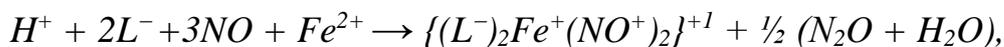


Эта реакция является стехиометрической и завершается образованием NO_2 и N_2O :



При образовании ДНКЖ две молекулы NO связываются с Fe^{2+} - ионами, d -орбитали которых способствуют миграции электронов между молекулами NO и образованию парамагнитных ДНКЖ.

Исходя из этого, общая реакция может быть записана в таком виде:



где L^- – анионные лиганды (включая тиолы).

Основной вклад в образование ДНКЖ дает слабо связанная форма эндогенного негемового железа, которое формирует лабильный пул железа [133].

Биологическое действие NO во многом зависит от способности его ионизированной формы NO^+ вызывать S -нитрозилирование белков и ферментов. Исследование этих реакций, с использованием ионов Fe^{2+} показали, что вновь

образовавшиеся *ДНКЖ* способствуют превращению NO в NO^+ и защищают последний от гидролиза. Однако, быстрое накопление *ДНКЖ* вряд ли возможно, если учитывать разрушающее действие $O_2^{\bullet-}$ на *ДНКЖ*. *S*-нитрозотиолы более устойчивы к действию $O_2^{\bullet-}$, поэтому реакции низкомолекулярных *ДНКЖ* с тиолами ведут к быстрому накоплению *S*-нитрозотиолов в клетках и тканях. Видимо это действие *ДНКЖ* является его главной физиологической ролью в живых системах.

ДНКЖ являются сигнальными агентами и регуляторами экспрессии генов, апоптоза, ферментативной активности и метаболизма железа. И, наконец, *ДНКЖ* с тиоловыми лигандами обладают мощными гипотензивными и вазодилататорными свойствами: они подавляют агрегацию тромбоцитов, ускоряют восстановление повреждений тканей [2].

Включение ионов железа в *ДНКЖ* может снижать их реактивность как инициаторов реакций с $O_2^{\bullet-}$, Хабера-Вайса и Фентона, а также ингибировать образование $OONO^-$. В связи с перечисленным несомненный интерес представляет исследование взаимодействия *ДНКЖ* с АФК и органическими радикалами, а также изучение механизмов образования *ДНКЖ* в модельных биологических системах [2].

В экспериментах на животных было обнаружено [134], что водные растворы *ДНКЖ* с глутатионовыми лигандами оказывают при введении в организм длительное гипотензивное действие. На основе таких *ДНКЖ* в Российском кардиологическом научно-производственном комплексе МЗ РФ создан лекарственный препарат «Оксаком», предназначенный для использования в качестве гипотензивного средства [135]. Нами показано [11], что *ДНКЖ* с тиоловыми лигандами проявляют антиоксидантный эффект, разрушаясь под действием $O_2^{\bullet-}$, образуемых в реакционной смеси. митохондриями или модельными ферментными системами.

В данной работе с помощью ЭПР-спектроскопии спиновых ловушек и ЭПР-оксиметрии проведено исследование влияния гипоксии различной степени, аноксии и реоксигенации на скорость генерации супероксида изолированными митохондриями сердца крысы, а также изучено при разных значениях парциального давления кислорода взаимодействие между супероксидными радикалами и ДНКЖ с глутатионовыми лигандами.

1.8. Фенольные соединения с антиоксидантными свойствами

В настоящее время хорошо известно, что повреждение митохондрий, вызванное окислительным стрессом, играет решающую роль в развитии патологий сердечно-сосудистой системы [136]. Митохондрии являются мембранными «энергетическими станциями» в эукариотических клетках. Они не только контролируют различные метаболические пути, но и функционируют в качестве основных регуляторов реакций на различные физиологические и биохимические воздействия на клетку. «Утечка» электронов из дыхательной цепи митохондрий при электронном транспорте и окислительном фосфорилировании является основным источником АФК [136,137]. АФК, включая $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , OH^{\bullet} и 1O_2 , являются нормальными продуктами клеточного аэробного метаболизма [138]. Большой интерес представляют $O_2^{\bullet-}$, образующиеся в Q_o -цикла комплекса III и попадающие в межмембранное пространства и цитозоль [139].

Митохондриальные АФК не только ответственны за некоторые генетические заболевания из-за наследственных мутаций митохондриальной DNA, но также являются основным фактором повреждения во время ишемии/реперфузии, воспаления, старения, канцерогенеза и нейродегенеративных заболеваний. Из-за значительной роли в клеточном энергетическом метаболизме, передаче сигналов и запрограммированной гибели клеток митохондрии являются привлекательными мишенями для доставки антиоксидантных препаратов [136–138].

Фенолы - это группа природных низкомолекулярных веществ, широко распространенных во многих растениях, семенах, фруктах и овощах. Обычные продукты содержат от следов до нескольких граммов фенолов на килограмм веса. Они являются важными компонентами рациона человека. Основным механизмом антиоксидантного действия фенольных соединений является тушение или перехват свободных радикалов и АФК [140,141]. Фенолы могут как защищать нормальные клетки от окислительного стресса в качестве антиоксидантов, так и вызывать некроз раковых или предраковых клеток, выступающих в качестве цитотоксических прооксидантов [142].

Несколько групп ученых связывают потенциальную антиатеросклеротическую роль с фенольными антиоксидантами, сообщая о положительном влиянии на ИБС типичной средиземноморской диеты, богатой фруктами и овощами. Регулярное употребление красного вина, богатого полифенолами, в умеренных дозах снижает смертность, связанную с ИБС, что может объяснить «французский парадокс», то есть низкий уровень ССЗ, несмотря на то, что рацион питания людей на юге Франции богат насыщенными жирами [138,143].

Флавоноиды принадлежат к классу полифенольных соединений растительного происхождения. Их можно отнести к важным вторичным продуктам метаболизма растений благодаря участию во многих ключевых процессах роста и развития. Флавоноиды участвуют в пигментации растений и могут определять окраску цветов, играют заметную роль в процессах клеточной сигнализации и сами могут служить мессенджерами химических сигналов, участвуют в процессах репродукции растений, в частности, в процессах развития и функционирования пыльцы, накоплении нектара, в созревании плодов и семян. Современные данные позволяют предположить, что флавоноиды могут участвовать в процессах экспрессии генов, изменять активность регуляторных белков и участвовать в регуляции клеточного деления. Важную роль флавоноиды играют в защите растений от различных неблагоприятных факторов

окружающей среды: действия ультрафиолета, температурного стресса, повышенной концентрации тяжелых металлов. Также флавоноиды защищают растения от бактериальной, вирусной и грибковой инфекции, от проникновения паразитов и повреждения насекомыми. Одной из заметных функций флавоноидов является их участие в защите растений от окислительного стресса благодаря выраженной антиоксидантной активности [144].

Фенольный каркас молекул флавоноидов содержат 15 атомов углерода (*Рис. 8*), образующих два ароматических кольца (А и В), которые соединены через три углеродных атома. Обычно общую формулу флавоноидов представляют следующим образом: $C_6-C_3-C_6$. Классификация флавоноидов основана на различиях в структуре трех углеродных атомов, соединяющих кольца. На схеме ниже они обозначены номерами 2, 3 и 4. Отличительными характеристиками этой группы атомов являются возможность присутствия двойной связи, присоединение карбонильной или гидроксильной групп, а также способность образовывать пяти- или шестичленное гетероциклическое кольцо С. Кроме того, ароматические кольца могут присоединяться не только к концевым атомам углеродной цепи C_3 .

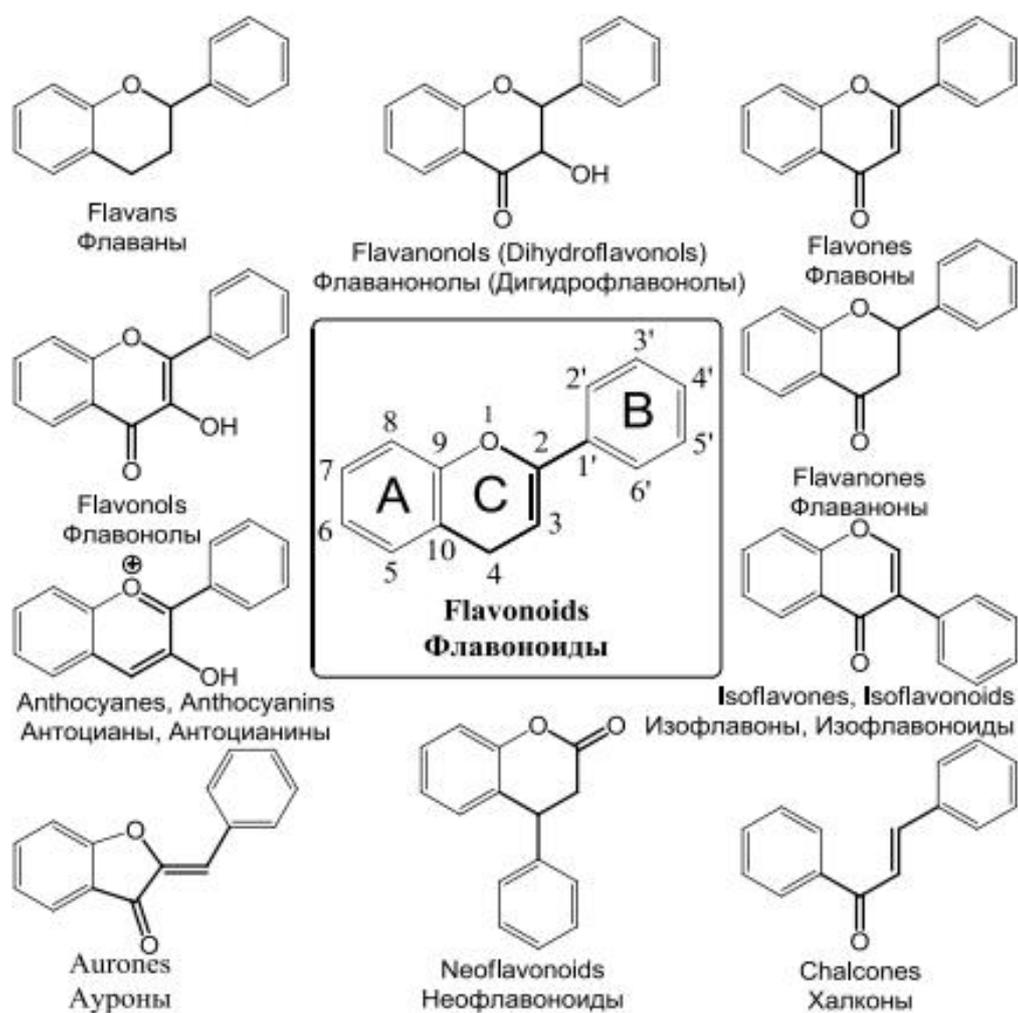


Рис. 8. Классификация флавоноидов, основанная на особенностях строения молекулы в области атомов углерода 2, 3, и 4 [144].

Антиоксидантный и биологический потенциал полифенолов основан на их молекулярной структуре, количестве и расположении гидроксильных групп, доступности фенольного водорода и возможности стабилизации феноксильных радикалов посредством донорства водорода или делокализации электронов [141,145,146].

В случае флавоноидов ранее были установлены критические структурные ограничения для оптимального антиоксидантного потенциала (Рис. 9): (1) катехольная группа В-кольца, являющаяся мишенью для радикалов и участвующая в делокализации электрона феноксильного радикала, (2) 2,3-

двойная связь, конъюгированную с фенольным кольцом и с карбонильной группой, которая позволяет дополнительно стабилизировать феноксильный радикал и (3) 3- и 5-гидроксильные группы, примыкающие к 4-кето-структуре. Квантово-механические исследования определили решающую роль 3-гидроксильной группы флавонолов. Структура кофейной кислоты, фенола класса оксикоричных кислот, (Рис. 10) содержит признаки (1) и (2) и является самым сильным антиоксидантом среди производных дигидроксикоричных кислот [146–148]. Две гидроксигруппы в орто-положении фенольного кольца кофейной кислоты, подобно флавоноидам, помогают предотвращать окисление ЛПНП человека *in vitro*, а также способны хелатировать ионы металлов переменной валентности [149].



Рис. 9 Молекула кверцетина; указаны группы, в наибольшей степени ответственные за связывание свободных радикалов.

На Рис. 10 показаны структурные формулы пяти изученных фенольных соединений, отличающиеся по строению и липофильности, включая представителей флавонолов (кверцетин и рутин), фенилпропанонов (кофейная кислота), стильбенов (ресвератрол) и *o*-метоксифенолов (куркумин).

Соединение		Структурная формула
Кверцетин		
Флавонолы	Рутин	
Стильбены	Ресвератрол	
Оксикоричные кислоты	Кофейная кислота	
	<i>para</i> -Кумаровая кислота	
<i>орто</i> -Метоксифенолы	Куркумин	

Рис. 10. Структурные формулы: кверцетина, рутина, ресвератрола, кофейной кислоты, *para*-кумаровой кислоты и куркумина.

Предполагается, что гидроксилы катехольной группы В-кольца, или гидроксильная группа в положении С-3 являются первичной мишенью для различных оксидантов. При окислении этих групп сначала образуются короткоживущие семихиноновые анион-радикалы, а затем ортохиноны (Рис. 11). Предполагается, что указанные гидроксильные группы могут вовлекаться в единый процесс внутримолекулярных превращений.

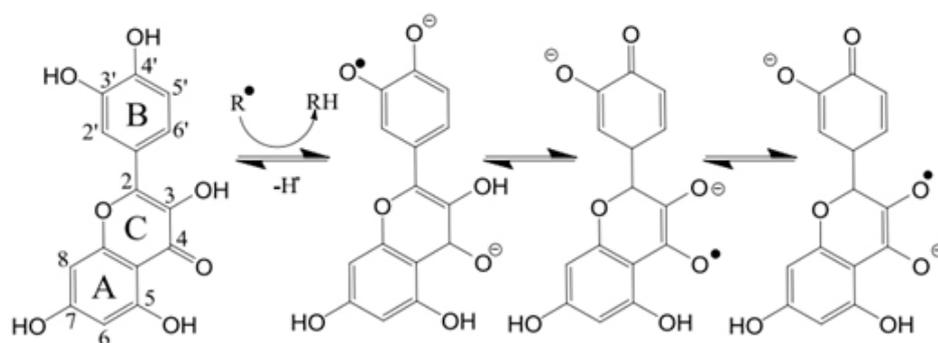


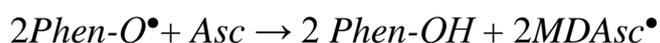
Рис. 11. Возможная последовательность молекулярных превращений кверцетина, инициируемых атакой радикалов на катехольную группу кольца В.

Гипотезы о влиянии флавоноидов на здоровье человека, включая положительное действие на сердечно-сосудистую систему, антиканцерогенное действие и т.д., также основаны на их антиоксидантных свойствах. В соответствии с общепринятой точкой зрения, антиоксидантные свойства флавоноидов основаны на их способности перехватывать свободные радикалы, а также хелатировать ионы металлов, участвующих в перекисном окислении.

Фенольные соединения (в реакциях – *Phen*) способны взаимодействовать с гидроксильным (LO^\bullet) и пероксильным (LOO^\bullet) радикалами липидов благодаря способности отдавать электрон (или атом водорода). В результате образуются радикалы фенолов – феноксилы $Phen-O^\bullet$, которые не участвуют в распространении окислительного процесса. Это связано с уникальной структурой их молекулы, в которой происходит стабилизация электронного облака.

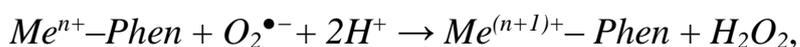
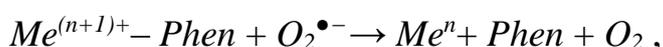


Возможно восстановление окисленных фенолов, которое может происходить разными путями, например, с участием аскорбиновой кислоты (*Asc*). В результате, образуется радикал монодигидроаскорбата ($MDAsc^\bullet$), который превращается в аскорбиновую кислоту и дегидроаскорбиновую кислоту (*Dha*) [144]:



Сообщалось, что биофлавоноиды обеспечивают защиту от повреждения *DNA*, вызванного OH^\bullet . Флавоноиды хорошо связывают ионы металлов и образуют с ними комплексы. Поскольку ионы металлов переменной валентности, в частности, железа и меди, являются инициаторами перекисного окисления и способствуют образованию свободных радикалов, их связывание является важным вкладом флавоноидов в защиту организма от окислительного стресса. Таким образом, антиоксидантное действие флавоноидов определяется не только их способностью перехватывать свободные радикалы из среды путем непосредственного взаимодействия с ними, но также способностью связывать (хелатировать) и удалять из среды ионы металлов, инициирующих появление свободных радикалов. Действительно, флавоноиды в сочетании с медью или железом предотвращают образование *AФК* [149].

Хелатирование металлов является наиболее эффективным путем подавления процессов перекисного окисления флавоноидами. Более того, при образовании комплексов с металлами переменной валентности, например, с Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^+ , Cu^{2+} и др., способность флавоноидов нейтрализовать свободные радикалы возрастает. Этот эффект достигается благодаря тому, что комплексы флавоноидов с металлами обладают супероксид дисмутазной активностью, т.е. образуют H_2O_2 , как и *SOD*. Указанные реакции комплекса флавоноида с металлом и $O_2^{\bullet-}$ можно записать следующим образом:



где Me – металлы переменной валентности.

Эти процессы были обнаружены не только *in vitro*, но также в экспериментах на животных. Так, комплексы Cu -рутин эффективно защищали от окисления легочную ткань животных, вдыхавших асбестовую пыль [150]. Высокую активность на животных, на клетках из различных органов или на субклеточных фракциях обнаруживали металлокомплексы рутина, кверцетина, катехина и других флавоноидов, что свидетельствует не только о большой общебиологической значимости этих комплексов, но также открывает перспективы их использования в медицине.

Потенциально молекулы флавоноидов могут иметь несколько сайтов связывания металлов, положение которых определяется наличием пар, расположенных рядом гидроксильных или карбонильных групп. Так, в связывании могут принимать участие пара 3- и 4- гидроксильных групп В-кольца. Указанную пару гидроксильных групп часто называют катехольной группой, хотя эта группа присутствует не только в катехинах, но и в некоторых других флавоноидах, например, в кверцетине, таксифолине и др. Кроме того, в связывании металлов могут принимать участие 3-гидроксильная и 4-карбонильная группы кольца С или 5-гидроксильная и 4-карбонильная группы, принадлежащие кольцам А и С соответственно [144].

Катехольная группа рассматривается некоторыми исследователями как наиболее вероятный центр связывания металлов. Вследствие депротонирования гидроксильных групп, связывание металлов в этом положении в щелочных средах ($pH=10$) проходит легче. Этот сайт связывания был исследован на примере комплекса кверцетина с ионами Cu^{2+} [150]. При создании комплекса соотношение кверцетин: Cu^{2+} составляло 2:1 (Рис. 12).

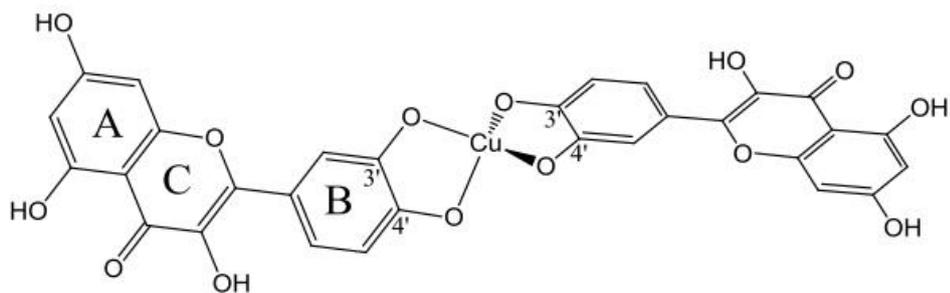


Рис. 12 Комплекс кверцетина с двухвалентной медью. Соотношение кверцетин: Cu^{2+} 2:1. Атом меди взаимодействует с гидроксильными группами катехольных групп, благодаря чему связывает две молекулы кверцетина. В предложенной схеме молекулы кверцетина располагаются в ортогональных плоскостях.

Было высказано предположение, что флавоноиды и другие фенольные антиоксиданты играют защитную роль против окислительного повреждения в сердечно-сосудистой системе, перехватывая различные свободные радикалы, включая АФК и АФА. Принимая во внимание благотворное влияние этих соединений на субклеточном уровне, представляется существенным интерес исследовать влияние растительных фенолов с различной структурой и физико-химическими свойствами на функциональную активность митохондрий сердца и производных ими $\text{O}_2^{\bullet-}$.

В этой работе мы исследовали, используя полярографию и ЭПР-спектроскопию с супероксидным зондом *TIRON*, влияние двух флавоноидов – кверцетина (*Qu*) и рутина (*Rut*) и трех других фенолов растительного происхождения - кофейной кислоты (*Caf-OH*), куркумина (*Cur*) и ресвератрола(*Rsv*).

1.9. Влияние гипоксии на организм.

Поскольку средний возраст во многих странах неуклонно растёт, инфаркт, инсульт и рак становятся самыми распространёнными причинами смерти в 21 веке. Причин этих расстройств много, и они разнообразны, включают генетическую предрасположенность и влияние окружающей среды, но имеют

общую черту: ограничение количества кислорода участвует в развитии этих патологий.

У каждой ткани всего организма свой широкий спектр «нормальности» с точки зрения оксигенации. Для миокарда парциальное давление кислорода (*oxygen tension*) составляет 20-25 *мм.рт.ст.* в состоянии покоя, и снижается до 10 *мм.рт.ст.* при максимальной нагрузке. Клетки коры надпочечников нормально функционируют при *oxygen tension* выше 60 *мм.рт.ст.*, в то время как мозговое вещество почки работает при гораздо более низких значениях [24]. Показано, что *oxygen tension* в крови около 80-100 *мм.рт.ст.* (или 10-12.5% O_2) [151]. В сосудах сетчатки глаза уровень кислорода равен 20 *мм.рт.ст.* (или 3-6% O_2). Так же, были получены данные, что в стандартных условиях (в среде, содержащей 20% O_2) культура клеток находится при концентрации кислорода в 2-5 раз выше, чем они, возможно, находятся *in vivo*.

Хотя гипоксия определяется индивидуально для каждой ткани, тем не менее, гипоксией называется состояние, при котором концентрация кислорода равна 0,5-5%. Клетки и организмы способны запускать адаптивный ответ на состояние гипоксии, который помогает справиться с угрозой. Под влиянием гипоксии повышается выброс *АФК* из внутренней мембраны митохондрий в межмембранное пространство, что ведёт к активации факторов транскрипции, включая *HIF*, активации гипоксической лёгочной вазоконстрикции, активации *AMP*-зависимой протеинкиназы и др. [24,80].

1.9.1. Физиологический ответ на гипоксию.

Когда содержание кислорода становится опасным, несколько хемосенсорных систем, действуя согласовано, быстро модулируют лёгочную вентиляцию и перфузию, а также циркуляцию крови, чтобы оптимизировать запас O_2 для нормального метаболизма. Эти ответы на гипоксию осуществляются гладкомышечными клетками сосудов, а также клетками

специальных хеморецепторов, таких как каротидные тела артериальной системы и нейроэпителиальные тельца воздухоносных путей [80].

Гладкомышечные клетки сосудов.

Периферийные кровеносные сосуды расширяются в ответ на низкое содержание O_2 , в то время как кровеносные сосуды лёгких сужаются, чтобы шунтировать кровь от слабо вентилируемых регионов, согласовывая вентиляцию с перфузией.

Гипоксическое сужение лёгочных сосудов, вазоконстрикция - быстрый ответ, который происходит в лёгочных артериях и венах, но больше в артериях сопротивления (маленького диаметра). Это происходит за счёт гладкомышечных клеток сосудов лёгких, в которых инициируется ингибирование одного или нескольких K^+ -каналов, отвечающих за мембранный потенциал. В результате деполяризации активируются потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы, что повышает уровень кальция в цитозоле и вызывает сокращение миоцитов. (Рис. 13А).

Гипоксическое расширение периферийных сосудов - другой быстрый ответ, который увеличивает перфузию крови областей с дефицитом O_2 . Это явление, по крайней мере, частично опосредуется K_{ATP} -каналами гладкомышечных клеток сосудистых стенок, которые открываются в ответ на вызванное гипоксией уменьшение ATP (Рис. 13В) [80].

Каротидные и нейроэпителиальные тельца.

Нейроэпителиальные тельца воздушных дыхательных путей чувствуют изменения во вдыхаемом воздухе, в то время как уровень O_2 в артериях контролируются каротидными тельцами. Оба ответа на уменьшение O_2 осуществляется инициацией активности эфферентных волокон для корректировки низкого *oxygen tension*.

Нейроэпителиальные тельца располагаются на бифуркациях воздухоносных путей. Это кластеры нейроэндокринных клеток, которые иннервируются афферентными и эфферентными нейронами (блуждающего

нерва), дают информацию дыхательным центрам, высвобождая нейромедиаторы, особенно серотонин.

Каротидные тельца сильно васкуляризованы, т.е. плотно окружены кровеносными сосудами, располагаются на бифуркации общих сонных артерий. Сенсорные элементы каротидных тельцев, гломусные клетки, активируют нейротрансмиттеры, большинство катехоламинов и ацетилхолин.

Возбуждение хеморецепторов гипоксией/гипоксемией зависит от наличия K^+ -каналов мембраны, чья активность ингибируется низким *oxygen tension*. Повышение уровня O_2 приводит к закрытию K^+ -каналов и, следовательно, к деполяризации мембраны и притоку Ca^{2+} через потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы. В результате повышенная концентрация Ca^{2+} – в цитозоле провоцирует высвобождение нейротрансмиттеров и активацию эфферентных волокон. (Рис. 14)

Фактическим сенсором O_2 в гломусных клетках и клетках нейроэпителиальных тельцев считается гемсодержащий протеин, тесно связанный с O_2 -чувствительными K^+ -каналами. Исследование предполагаемого гемсодержащего O_2 -сенсора в каротидных тельцах все ещё продолжается: NO-синтаза и гемоксигеназа – возможные кандидаты.

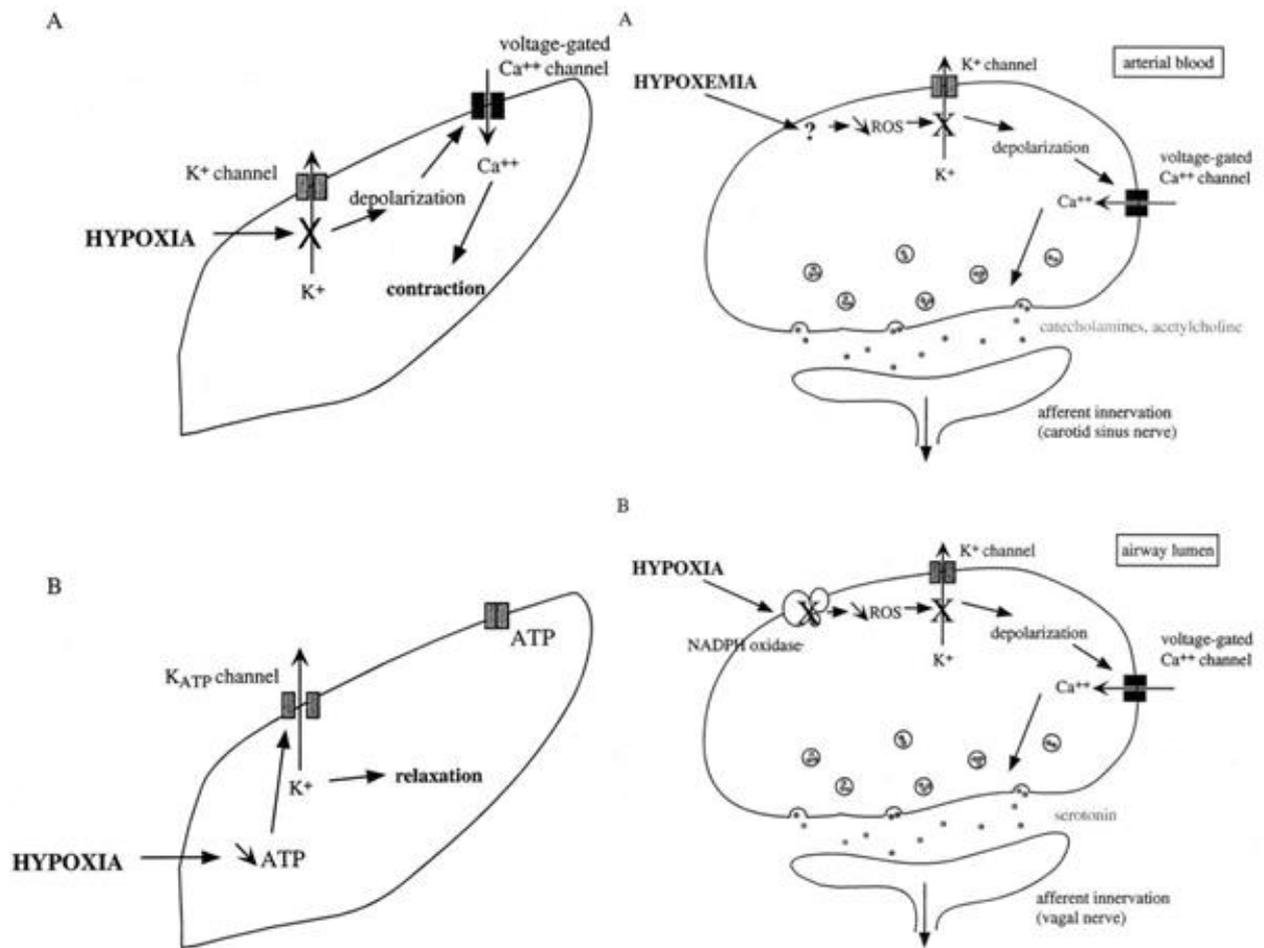


Рис.13. Схема ответа на гипоксию гладкомышечных клеток сосудистых стенок.

А. лёгочные артерии;

В. периферийные сосуды.

Рис.14. Схема ответа на гипоксию.

А. каротидные тельца;

В. нейроэпителиальные тельца.

В нейроэпителиальных тельцах значительное участие принимает *NADPH*-оксидаза. Предполагают, что при нормоксии *NADPH*-оксидаза генерирует АФК, которые содействуют активности канала. При гипоксии уровень АФК падает, тем самым ингибируя K^+ -каналы [80].

1.9.2. Регуляция клеточного метаболизма при адаптации к гипоксии.

Во многих организмах адаптация к изменению *oxygen tension* достигается кратковременными эффектами, связанными с энергетическим метаболизмом, и долгосрочными эффектами – экспрессией генов [26].

Фундаментальный параметр здоровой клетки - большой запас *АТФ*. Почти все энергозатратные процессы требуют гидролиз 1-2 кислотных связей в *АТФ*. Поддержание внутриклеточного гомеостаза при использовании *АТФ*-зависимых ионных насосов, таких как *Na⁺/K⁺-АТФаза*, потребляет 20-80% уровня расхода энергии в покое (*resting metabolic rate*).

Клеточная смерть происходит, когда продукция *АТФ* не соответствует потребностям в энергии для обеспечения ионного и осмотического равновесия. При падении уровня *O₂* происходит сбой *АТФаз*, ведущий к деполяризации мембраны, неконтролируемому притоку *Ca²⁺* и последовательной активации *Ca²⁺*-зависимых протеаз и фосфолипаз. Это приводит к неконтролируемому клеточному набуханию, гидролизу главных клеточных компонент и, в конечном счёте, к некрозу (*Рис. 15*) [80].

Помимо подавления энергетического метаболизма, во время гипоксии в клетках происходит переход с митохондриального дыхания на анаэробный гликолиз, что впервые было замечено Пастером, откуда и название - «*эффект Пастера*». Хотя гликолиз менее эффективен для генерации *АТФ*, чем окислительное фосфорилирование, при достаточном количестве глюкозы он может поддерживать выработку *АТФ* благодаря повышению активности ферментов гликолиза [22,80]. Это становится заметным в течение нескольких минут при аллостерической регуляции активности фосфофруктокиназы и дальше продолжается *HIF*-зависимой избыточной экспрессией ферментов гликолиза.

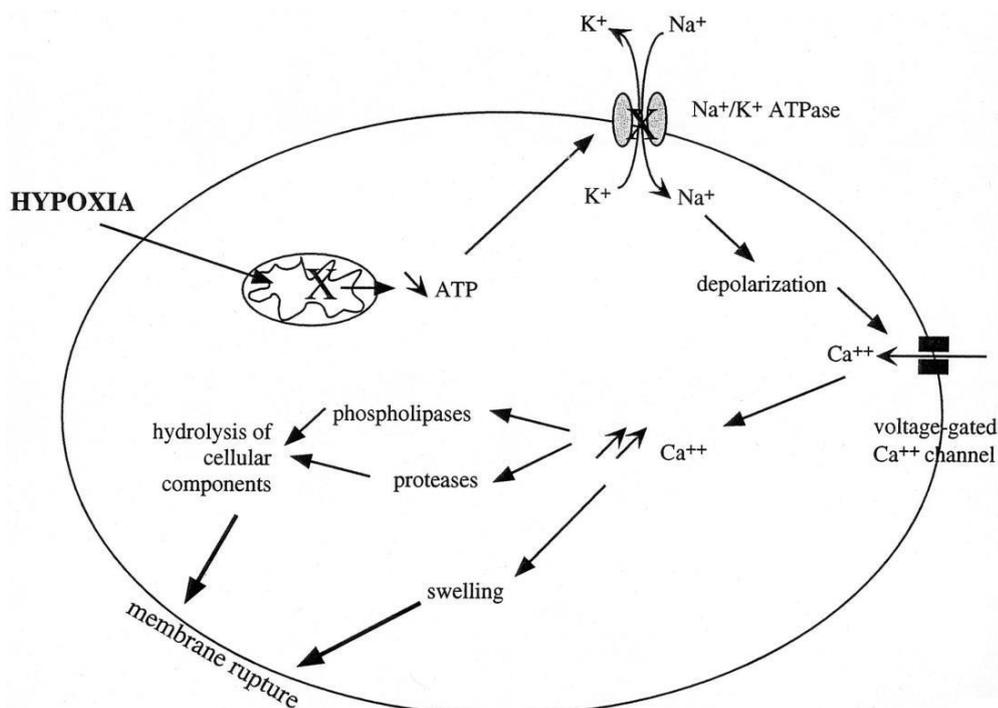


Рис. 15 Схема каскада реакций, ведущих к клеточной смерти, когда клетки испытывают гипоксию [80].

Фосфофруктокиназа (*PFK-1*) считается одним из главных регулятором гликолиза. Фермент аллостерически активируется *ADP* и *AMP* и ингибируется *ATP*, устанавливая скорость гликолиза (субстратное фосфорилирование) в соответствии с энергетическими потребностями. Самым мощным активатором *PFK-1* считается фруктозо-2,6-бисфосфат, а его синтез и деградация зависит от одного белка 6- фосфофрукто-2-киназа/фруктозо-2,6-бисфосфатаза (*PFK-2*). *PFK-2* регулируется фосфорилированием *ATP*-зависимой протеинкиназой (*AMPK*), а его экспрессия улучшается *HIF-1*. *AMPK* фосфорилирует один сайт *PFK-2*, что приводит к увеличению V_{max} киназной активности, следовательно, к увеличению продукции фруктозо-2, 6-бисфосфата и аллостерической активации *PFK-1*.

Так же, как фосфофруктокиназа *PFK-1*, другие ферменты метаболизма регулируются *AMP*, *ADP* и *ATP*. *AMPK* путем фосфорилирования и экспрессии генов включает катаболические пути, в которых генерируется *ATP*, и выключает анаболические, где *ATP* потребляется (Рис. 16). Активация *AMPK* так же

стимулирует перемещение транспортера глюкозы *Glut-4* на плазматическую мембрану, что приводит к поглощению глюкозы [80].

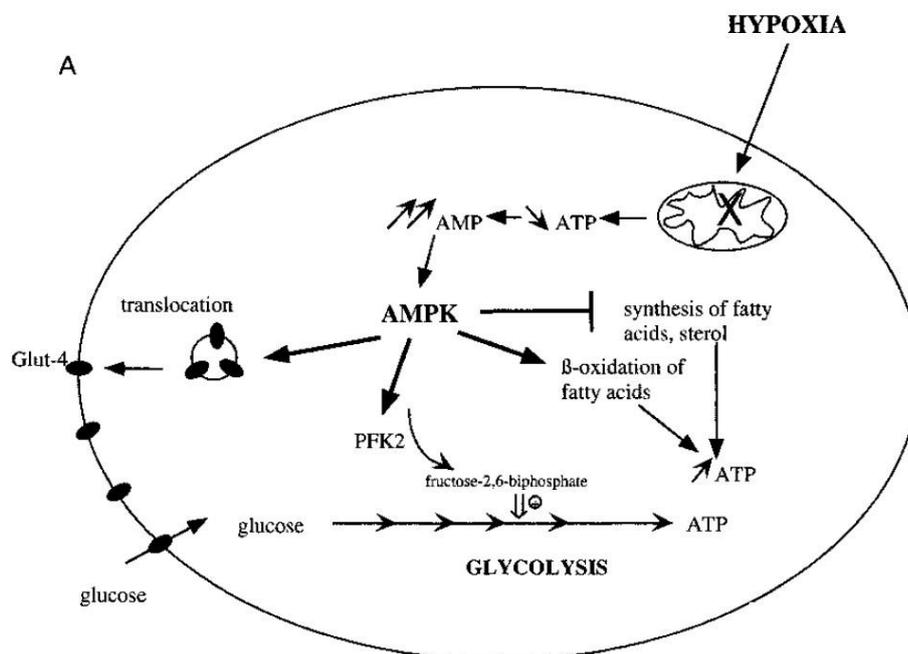


Рис. 16. Схема адаптивного ответа клеток на гипоксию: роль AMPK при адаптации клеточного метаболизма к условиям гипоксии.

1.9.3. Гипоксия - индуцируемый фактор HIF, его свойства и регуляция.

Защита от гипоксии зависит от *HIF*, который активирует широкий спектр генов, стимулирующих эритроцитоз, ангиогенез, метаболизм глюкозы, клеточную пролиферацию [22]. Этот высококонсервативный транскрипционный фактор был открыт как транскрипционный активатор эритропоэза, ответственного за активацию гена эритропоэтина [1,24].

HIF-1 является гетеродимером, состоящим из двух субъединиц: регулируемой O_2 *HIF-1a* (120 кДа) и O_2 -независимой *HIF-1b* (91-94 кДа, известна, как арил- гидрокарбон-рецептор ядерного транслокатора). Обе субъединицы содержат основные домены: N-конец – α -спираль-петля-спираль, необходимый для связывания с *DNA*, центральная часть – *PAS* домен, отвечающий за димеризацию, C-конец – трансактивационный домен (регулирует

транскрипцию в присутствии фактора транскрипции). *HIF-1b* экспрессируется постоянно и располагается в ядре [80,152].

Гипоксия или ишемия индуцирует экспрессию *HIF-1a mRNA*. В то время, как уровень *HIF-1a mRNA* постоянен при нормоксии и гипоксии, белок *HIF-1a* быстро разрушается при нормоксии и аккумулируется при гипоксии [80,152]. Были идентифицированы три изоформы *HIF-a* (*HIF-1a*, *HIF-2a*, *HIF-3a*). *HIF-1a* и *HIF-2a* структурно и функционально схожи [24,152]. У позвоночных развитие кровеносной и дыхательной системы сопровождалось появлением *HIF-2a*, который также регулируется O_2 и образует гетеродимер с *HIF-1b*, но экспрессируется в ограниченном количестве типов клеток, в то время как *HIF-1a* и *HIF-1b* экспрессируются во всех тканях человека и мыши [1]. *HIF-3a* же не имеет структурной части, отвечающей за трансактивацию, представленную у *HIF-1a* и *HIF-2a* в С-конце, поэтому *HIF-3a* может играть альтернативную роль отрицательного регулятора индуцируемой гипоксией экспрессии генов [22].

Недавние исследования на мышах показали, что *HIF-2a* действует как регулятор эритропоэтина. Ген *HIF-2a* отвечает за наследственно-семейный эритроцитоз и относительно высокий уровень концентрации гемоглобина при поликистозной болезни почек. Также *HIF-2a* играет решающую роль при защите от окислительного стресса [22].

В присутствии O_2 *HIF-1a* и *HIF-2a* подвергается ферментативному гидроксигированию пролиновых остатков (*p402*, *p564* для *HIF-1a* человека) с помощью пролилгидроксилаз (*PHDs*), которые используют O_2 и 2-оксоглутарат как субстраты и генерируют CO_2 и сукцинат как побочные продукты [1,24]. Гидроксигированные *HIF-1a*, *HIF-2a* далее распознаются белком гена опухолевого супрессора фон Хиппеля-Линдау (*pVHL*), что позволяет убиквитинлигазам, нацеленным на *HIF-1a* и *HIF-2a*, присоединять убиквитин, после чего весь комплекс быстро деградирует в протеосоме [1,152]. При гипоксии скорость гидроксигирования падает, негидроксигированный *HIF-1a* избегает взаимодействия с *pVHL*, стабилизируясь. После связывания со своим

гетеродимерным партнером *HIF-1b* главным образом в ядре, *HIF* трансктивирует гены, отвечающие за адаптацию к гипоксии/ишемии [1,22].

PHDs принадлежат к *Fe(II)*- и 2-оксоглутонат-зависимому диоксигеназному суперсемейству, которые присоединяют два атома кислорода к субстратам: первый используется при окислительном декарбоксилировании 2-оксоглутоната, производного сукцината и диоксида углерода, в то время как второй атом кислорода присоединяется напрямую к пролиновому остатку *HIF-a*. Эти белки называют «кислородными сенсорами», поскольку их активность строго зависит от *oxygen tension* [22,24,152].

Хлорид кобальта *CoCl₂* ингибирует активность *PHD* через внутриклеточное истощение запасов аскорбата (или витамина C), необходимого для активности *Fe²⁺*, тем самым стабилизируя *HIF-1a* [22]. АФК, в свою очередь, инактивируют *PHD* посредством окисления иона *Fe²⁺*, необходимого для гидроксирования *HIF-1a* каталитическим механизмом *PHD*, и, значит, также стабилизируют *HIF-1a* [152,153].

Было найдено 3 изоформы *PHD* (*PHD1*, *PHD2*, *PHD3*), каждая из которых располагается в отдельных тканях и имеет собственное субклеточное распределение. *PHD1* исключительно ядерный белок, *PHD2* в основном цитоплазматический (мигрирует между ядром и цитоплазмой), *PHD* может быть, как в ядре, так и в цитоплазме. Гипоксия уменьшает общую активность *PHD*, активируя *HIF-1a*-зависимую экспрессию *PHD2* и *PHD3*. *HIF*-индуцируемая экспрессия *PHD* обеспечивает быстрое удаление *HIF-a* после реоксигенации [22,152]. *PHD* селективно регулируются разными изоформами *HIF-a*. *PHD2* индуцируются *HIF-1a*, в то время как *PHD3*- и *HIF-1a*, и *HIF-2a* [152].

Дегградацию *HIF-a* с помощью *PHD* можно предотвратить ингибиторами *PHD*, например, недавно открытыми *TM6008* и *TM6089*, которые связываются с активным сайтом внутри *PHD2*, который отвечает за связь с *HIF-a*. Другим способом ингибировать дегградацию является использование конкурентных аналогов 2-оксоглутоната, например, *N*-оксалилглицин или *L*-минозин.

Эффективность этих способов пока не доказана. Важно отметить, что недостаток *PHD2* приводит к эритроцитозу путем активацией сигнальных путей в почках, а специфичных ингибиторов *PHD* определенного типа пока не существует [22].

Фактор ингибирования *HIF-1* (*FIH-1*) подавляет функции трансактивационного домена С-конца *HIF-1a*, гидроксiliруя аспарагиновый остаток *a* в присутствии O_2 , блокируя его возможную связь с белком-коактиватором *p-300*, тем самым препятствуя ген-мишеням *HIF* трансактивироваться [24,152].

Сиртуины (*Sirt*) – семейство NAD^+ -зависимых белков, обладающих деацетилазной активностью в ответ на гипоксию и регулирующих *HIF-1a* и *HIF-2a*. Ряд исследований подтвердил, что *Sirt1* подавляет транскрипцию генов-мишеней *HIF-1a*. Как бы то ни было, при гипоксии падает уровень NAD^+ , что приводит к подавлению *Sirt1*, последующему ацетилированию и активации *HIF-1a*. Также, ответ на гипоксию, *Sirt1* взаимодействует с *HIF-2a*, деацетилируя и стабилизируя его, что приводит к транскрипции гена-мишени *HIF-2a*, гена эритропоэтина. Недавние исследования показали, что митохондриальный *Sirt*, *Sirt3*, может дестабилизировать *HIF-1a*, ослабляя митохондриальную генерацию АФК. Также было показано, что *Sirt6* выступает как супрессор *HIF-1a* и активирует гликолиз, подавляя тем самым митохондриальное дыхание [152].

В [154] было показано, что при нормоксии отдельные митохондрии испытывают спонтанный всплеск генерации $O_2^{\bullet-}$, в дословном переводе – «супероксидную вспышку» или «дыхательный взрыв». «Дыхательный взрыв» наблюдается во всех типах клеток и запускается совместно активацией митохондриальной проницаемой поры и генерацией $O_2^{\bullet-}$ дыхательной цепью. Реоксигенация после гипоксии приводит к неконтролируемому «дыхательному взрыву» и повышает окислительный стресс. АФК инактивируют *PHD* и стабилизируют *HIF-1a*, хелатируя и окисляя комплексы *Fe (II)*- и *Fe (III)*-*PHD* [22]. При нормоксии не только митохондрии вовлечены в генерацию АФК и редокс-зависимую стабилизацию *HIF-1*, но также *NADPH*-оксидазы (*Nox*).

Таким образом, митохондриальные *AФК* и *AФК* от *Nox* вместе участвуют в стабилизации *HIF-1*, хотя и не одновременно [153]. Важно отметить, что при аноксии *AФК* не стабилизируют *HIF* [152].

Комплекс II, сукцинат *CoQ*-редуктаза, состоит из четырех субъединиц А, В, С и D и связывает цикл Кребса и *ЭТЦ*. В клетках с мутациями В и D субъединиц *HIF-1a* стабилизируется при нормоксии. Предпочтительное тому объяснение состоит в том, что за это ответственны *AФК* из комплекса II. В комплексе II электрон переносится от сукцината субъединицей А и далее на *CoQ₁₀* через субъединицы В, С, и D. При отсутствии или разрушении субъединиц В, С, и D электроны с флавиновых групп в субъединице А могут переходить только на *O₂*. Эксперименты подтвердили, что нарушение работы субъединицы В вызывает увеличения сигнала *AФК*, а стабилизация *HIF-1a* при этом ликвидируется антиоксидантами, что ещё раз подтверждает влияние *AФК* на *HIF* [24].

1.9.4. Регуляция экспрессии генов.

Некоторые ответы, развивающиеся в клетках и тканях под действием гипоксии, такие, как переключение на анаэробный метаболизм, улучшение васкуляризации и усовершенствование транспорта *O₂*, происходят путём активации уже существующих ферментов. Эти ферменты регулируются кодирующими их генами. К ним относятся: тирозин-гидроксилаза, который участвует в синтезе дофамина в гломусных клетках каротидных тельцев; ферменты гликолиза и транспортеры глюкозы *Glut 1*, *Glut 4*; *VEGF*, стимулирующий ангиогенез и активирующий *NO*-синтазу, которая увеличивает вазодилатацию; эритропоэтин и рецепторы трансферрина, которые благоприятствуют продукции эритроцитов [80].

HIF-1 регулирует экспрессию сотни генов с помощью нескольких главных механизмов:

а) связывается напрямую с нужными генами в цис-действующем элементе ответа на гипоксию (*hypoxia response element, HRE*), связывая белки-

коактиваторы (например, *p300*) для увеличения транскрипции генов. Последовательность *HIF-1*-регулируемых генов кодирует ряд белков, которые осуществляют ответ на гипоксию.

b) связывается напрямую и трансаktivирует ген, кодирующий транскрипционный фактор (*TF*), который активирует/репрессирует экспрессию вторичных генов, связываясь со сходными сайтами связи транскрипционных факторов.

c) активирует транскрипцию генов, кодирующих *microRNA*, которые связываясь с *mRNA*, либо блокирует их трансляцию, либо индуцируют их деградацию. *MicroRNA* – одноцепочечные некодирующие *RNA*, регулирующие экспрессию генов. Транскрипция некоторых *microRNA* блокирует экспрессию белков сборки железо-серных кластеров, необходимых в цикле Кребса и ЭТЦ [1]. Некоторые *microRNA* помимо участия в стабилизации *HIF-1a*, подавляют его же экспрессию. Было найдено, что избыточная экспрессия *miRNA-20b* и *miRNA 519c* была связана с понижением уровня *HIF-1a* [152].

d) активирует гены, кодирующие киназу 1 (*PDK1*) пируватдегидрогеназы (*PDH*), которая фосфорилирует и инактивирует каталитическую субъединицу *PDH*, ответственную за преобразование пирувата в ацетил-*CoA*. *PDK1* действует совместно с другим продуктом гена-мишени *HIF-1*, *LDHA*, который преобразует пируват в лактат, уменьшая количество субстрата для реакции *PDH*. Таким образом, *PDK1* эффективно ингибирует цикл Кребса и, соответственно, поток электронов через ЭТЦ. Усиление индукции этой киназы при гипоксии приводит к увеличению продукции АФК, стабилизации *HIF-1* [1,152].

Другим примером, демонстрирующим *HIF*-регуляцию АФК, является экспрессия *COX4-1*-регуляторной субъединицы цитохром *c*-оксидазы (комплекс *IV*) при аэробных условиях. В условиях гипоксии эта субъединица переключается в *COX4-2*. *HIF-1a* активирует транскрипцию генов, кодирующих *COX4-2*, и митохондриальную протеазу *LON*, которая отвечает за деградацию

СОХ4-1. Результаты экспериментов подтвердили, что при длительной гипоксии комплекс *IV* может стать источником *АФК*, если субъединица *СОХ4* не переключится [1].

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Получение изолированных митохондрий.

Эксперименты проводились на крысах линии *Wistar* с предварительного одобрения Комитета по этике *НИИ* экспериментальной кардиологии *ФГБУ «НМИЦ кардиологии»* Минздрава России в соответствии с «Руководством по уходу и использованию лабораторных животных».

Митохондрии выделяли методом дифференциального центрифугирования. Все этапы выделения митохондрий проводили при температуре (0-4) °C. После усыпления крысы внутрибрюшинным введением уретана (1,8 г/кг веса животного) или авертина (250 мг/кг веса) сердце вырезали и помещали в охлаждённую (-4°C) среду выделения. Среда выделения содержала: 70 мМ сахараза; 220 мМ маннитол; 50 мМ *HEPES*; 1 мМ *EDTA*; *pH* 7,4. Далее сердце перекладывали в охлаждённую чашку Петри, освобождали от предсердий и надрезали четыре раза с 4-х сторон для лучшей отмывки от крови. После этого сердце измельчали ножницами, снова промывали раствором среды выделения и пропускали через сито из нержавеющей стали (диаметр отверстий 0,8 мм) и гомогенизировали в течение 2-3 мин при соотношении ткань-среда выделения 1:8.

Осаждение митохондрий производили в два этапа на центрифуге *MLW K-24 (ГДР)*. Гомогенат центрифугировали 10 мин при 700g, супернатант, в котором содержались митохондрии, фильтровали и снова центрифугировали в течение 10 мин при 14000g. Осадок, суспендированный в 0,2 мл среды выделения с *BSA* (3 мг/мл), переносили в маленькую пробирку и хранили во льду.

2.2. Определение функциональной активности митохондрий

Скорость потребления кислорода митохондриальной *ЭТЦ* определяли с помощью электрода Кларка на полярографе *YSI 53* фирмы *Yellow Spring Instruments, Inc. (США)*. В качестве субстрата дыхания использовали: 4 мМ

сукцинат или 3 мМ глутамат и 4 мМ малат (состояние 4). Для определения скорости дыхания в состоянии 3 добавляли 300 мкМ ADP. Величину дыхательного контроля определяли по отношению скоростей поглощения кислорода в состоянии 3 и 4.

Среда инкубации в опытах с фенольными соединениями: 225 мМ сахароза, 20 мМ HEPES, 1 мМ EGTA, 4 мМ KH_2PO_4 , 3 мМ MgCl_2 , 10 мМ KCl, 2,5 мкМ ротенон; $\text{pH} = 7,4$; температура 25 °C; объем ячейки 1 мл; концентрация белка 0,3 - 0,7 мг/мл.

Скорости дыхания измеряли через 20 мин преинкубации при температуре 4 °C с изученными фенолами в концентрациях от 1 мкМ до 1 мМ (от 0,15 до 150–300 нмоль/мг белка).

Среда инкубации в опытах с $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$: 225 мМ сахароза, 20 мМ HEPES, 0,25 мМ EGTA, 4 мМ KH_2PO_4 , 3 мМ MgCl_2 , 10 мМ KCl, 200 мкМ EDTA, 2,5 мкМ ротенон; $\text{pH} = 7,4$; температура 25 °C; объем ячейки 1 мл; концентрация белка 0,3 - 0,7 мг/мл. Препарат $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$ содержал 1% раствор действующего вещества, а также вспомогательные вещества: макрогола глицерилрицинолеат, полисорбат 20, аскорбиновая кислота, динатрия эдетат, натрия хлорид, вода для инъекций [95].

Дыхание митохондрий изучали после 30 мин преинкубации митохондрий при температуре 4 °C с различными концентрациями $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$: исследуемый препарат добавляли к 50-60 мкл густой суспензии митохондрий из расчета 0,05–10 мкг действующего вещества/мг белка митохондрий. Контрольными были интактные митохондрии. Измерение дыхания митохондрий каждой группы проводили трижды.

2.3. ЭПР-оксиметрия.

Спектры ЭПР записывались на спектрометре E-109E фирмы "Varian" (США), оснащённом температурной приставкой E-254, и на малогабаритном

автоматизированном спектрометре *ESR 70-03 XD/2 «КБСТ» БГУ (Беларусь)*. Спектры на *E-109E* записывались и обрабатывались с помощью специальной программы, созданной на кафедре биофизики физического факультета *МГУ Б.В. Трубицыным* [155].

Для обеспечения постоянства газового состава реакционную смесь вводили в газопроницаемую *PTFE Sub-Lite-Wall* капиллярную трубку (внутренний диаметр 0,635 мм, толщина стенки 0,051 мм) фирмы *Zeus Industrial Products, Inc. (США)*. Заполненная капиллярная трубка дважды складывалась и вставлялась в кварцевую трубку (диаметром ~4 мм), открытую с обоих концов. Это обеспечивало достаточный поток газа варьируемого состава вокруг образца в резонаторе спектрометра ЭПР во время регистрации спектра

В ЭПР-оксиметрии используются различные парамагнитные зонды, параметры спектра которых зависят от спинового обмена Гейзенберга и магнитного диполь-дипольного взаимодействия с молекулярным кислородом. В наших экспериментах содержание O_2 в потоке газа контролировалось путем измерения ширины сигнала ЭПР фталоцианина лития *LiPc* (Рис. 17), внутри капиллярной трубки в реакционной смеси – путем измерения ширины низкопольной компоненты спектра ЭПР *TEMPONE-¹⁵N-D₁₆* (4-оксо-2,2,6,6-тетраметил-пиперидин- D_{16} -1-оксил-¹⁵N, Рис. 18А), которая линейно зависит от концентрации кислорода в окружающей среде (Рис. 18)[156,157]. Значения парциального давления рассчитывали по калибровочным кривым ширины линии сигнала ЭПР в зависимости от содержания кислорода (Рис 17В,18).

Спектры ЭПР *LiPc* и *TEMPONE-¹⁵N-D₁₆* регистрировали при СВЧ мощности <1 мВт, СВ частоте 9,15 ГГц, амплитуде ВЧ модуляции 0,005 – 0,02 мТл.

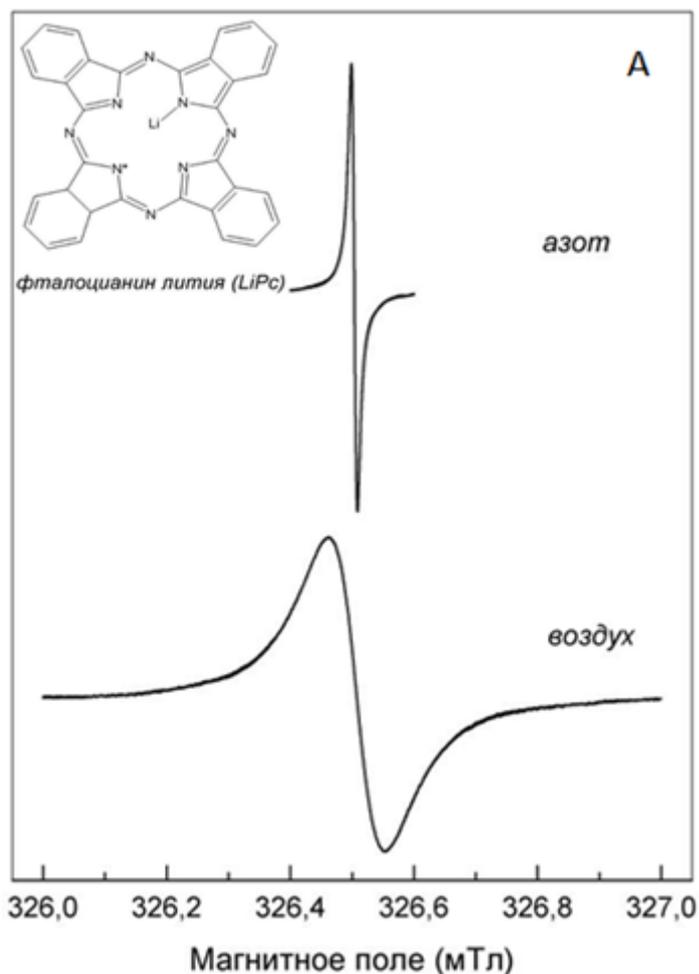
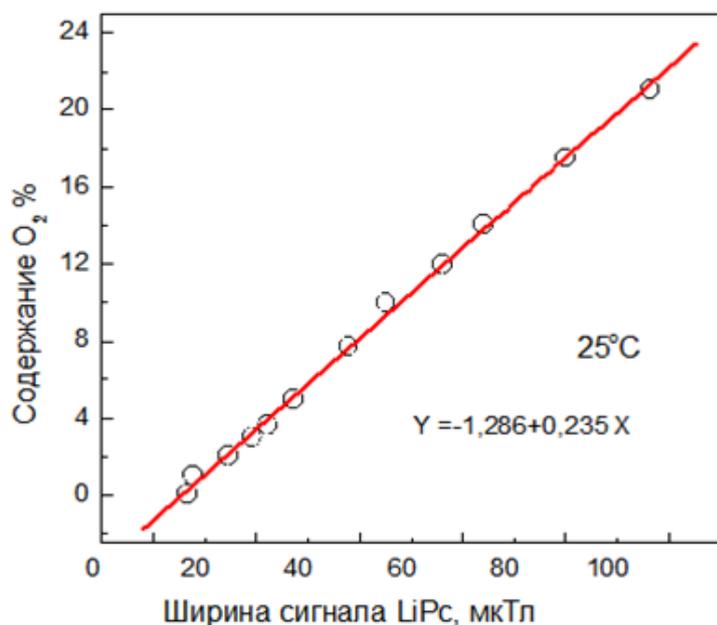


Рис. 17. Структурная формула фталоцианина лития $LiPc$, сигнал ЭПР $LiPc$ в азоте и в воздухе (А); зависимость ширины сигнала ЭПР $LiPc$ от содержания кислорода в газовом потоке (Б)



Б [158].

В случае кристалла $LiPc$ уширение линии происходит за счет спинового обмена Гейзенберга. В случае $TEMPONE-^{15}N-D_{16}$ уширение линий также обусловлено главным образом спиновым обменом Гейзенберга, поскольку в

условиях частых столкновений между чувствительным к кислороду нитроксидом и кислородом диполь-дипольное взаимодействие усредняется почти до нуля.

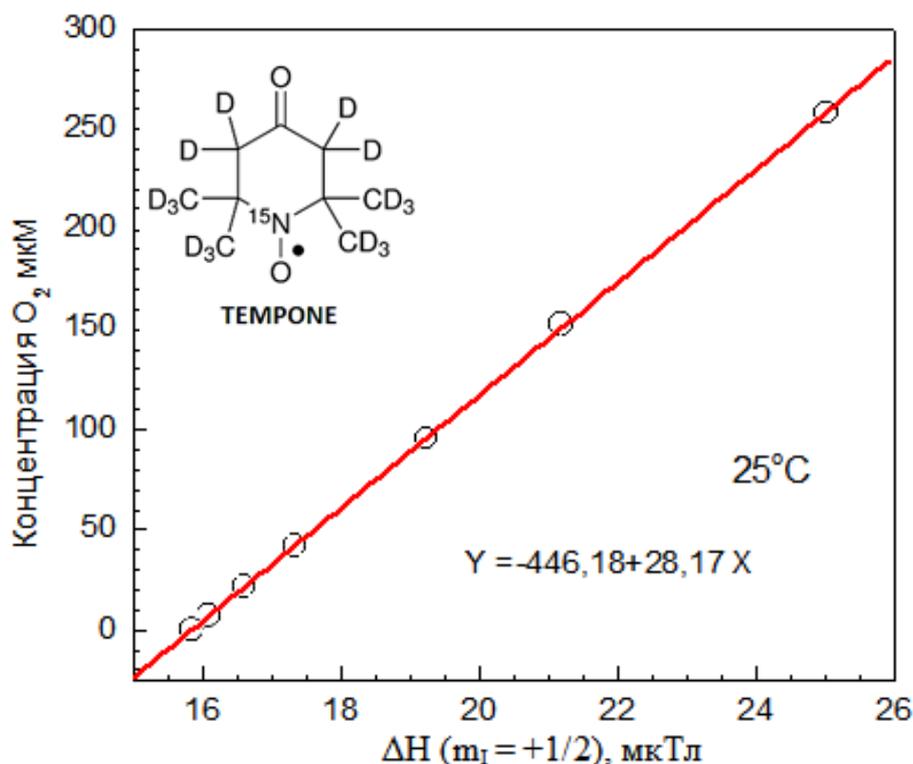


Рис. 18. Структура TEMPONE-¹⁵N-D₁₆ и зависимость ширины низкопольной компоненты сигнала ЭПР TEMPONE-¹⁵N-D₁₆ от концентрации кислорода в среде инкубации.

Парциальное давление кислорода (мм.рт.ст.) - количество кислорода в газовой смеси и равно давлению, которое имел бы кислород, входящий в состав газовой смеси, если бы только он занимал объём, равный объёму смеси при той же температуре. Для системы, находящейся в равновесии, концентрация кислорода в растворе точно определяется с помощью парциального давления кислорода и коэффициента растворимости. Например, концентрация кислорода в воде, насыщенной воздухом, при температуре 37°C равна 220 мкМ (содержание кислорода в воздухе 20,95%, соответствующее парциальное давление кислорода 159 мм.рт.ст., общее давление воздуха равно 1 атм=760 мм.рт.ст.). Термин *oxygen tension* используется в основном для выражения концентрации кислорода

в системах, которые находятся в неравновесном состоянии в газовой фазе. Он описывает локальную концентрацию кислорода и равен парциальному давлению кислорода, которое было бы, если данная система находилась в состоянии равновесия, при котором известно точная локальная концентрация кислорода.

В случае продувки образца воздухом (температура $\sim 25^\circ\text{C}$, 21% O_2 , 157,4 мм.рт.ст.) ширина низкопольной компоненты ($m_I = +1/2$) спектра ЭПР *TEMPONE*- ^{15}N - D_{16} была равна 26,8 мкТл, что соответствовало равновесной концентрации кислорода в среде инкубации митохондрий ~ 240 мкМ.

Измеряя реакцию кислородного зонда, помещенного внутрь капиллярной трубки с пробой, содержащей изолированные митохондрии, на продувку газами с различным содержанием O_2 , мы установили, что через 5 мин подачи газа *oxugen tension*, соответствующий концентрации кислорода в реакционной смеси, был практически такой же, как снаружи трубки. Некоторая разница, вероятно, существовала для обеспечения постоянного притока кислорода в капилляр. Следует отметить, что в присутствии антимицина *A* общая скорость потребления O_2 митохондриями была низкой и, по-видимому, определялась скоростью образования $\text{O}_2^{\bullet-}$.

2.4. ЭПР-спектроскопия спиновой ловушки *TIRON*.

Генерация $\text{O}_2^{\bullet-}$ изолированными митохондриями изучалась с помощью ЭПР-видимого перехватчика («scavenger») супероксида *TIRON* (4,5-диоксибензол-1,3-дисульфонат) (Рис. 19) [159]. При $\text{pH} < 9$ спектр *TIRON* представляет собой квартет, являющийся результатом взаимодействия неспаренного электрона с двумя неэквивалентными протонами с константами СТВ $a(\text{H2}) = 0,331$ мТл и $a(\text{H6}) = 0,178$ мТл (Рис. 19).

TIRON является эффективным перехватчиком $\text{O}_2^{\bullet-}$, также есть доказательства того, что *TIRON* может реагировать с OH^\bullet без образования заметного количества ЭПР-видимых семихинонов. Это согласуется с

результатами, полученными нами в системе Фентона, генерирующей OH^\bullet : мы не смогли обнаружить сигнал ЭПР. Следует также отметить, что *TIRON*, как хинол, может реагировать с другими свободными радикалами, то есть алкилпероксильными и алкоксильными радикалами. Однако в наших экспериментах с изолированными митохондриями (10-минутная инкубация в присутствии сукцината и антимицина *A*) это, по-видимому, не является серьезным ограничением для использования *TIRON* в качестве перехватчика $O_2^{\bullet-}$.

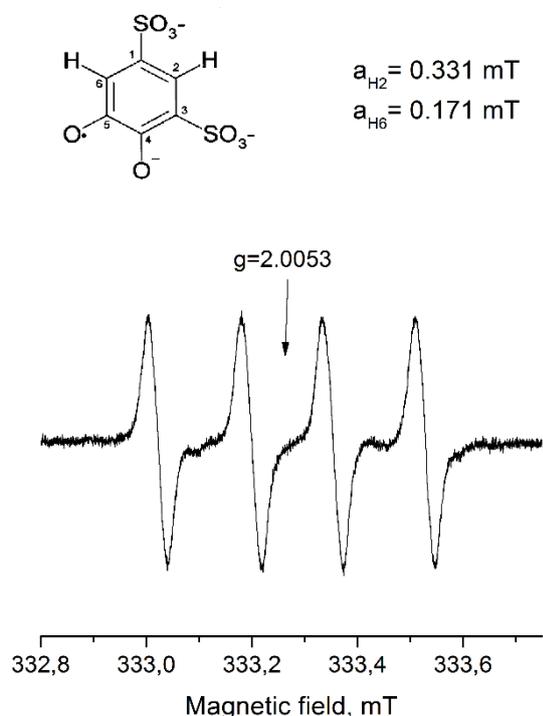


Рис. 19 Строение семихинонной формы стиновой ловушки *TIRON* и типичный спектр ЭПР *TIRON*.

Кроме того, на ключевую роль $O_2^{\bullet-}$ в образовании видимых ЭПР семихинонов *TIRON* указывало ингибирование этого процесса *SOD* (данные не представлены). Таким образом, в используемой нами системе образование свободных радикалов *TIRON* отражает генерацию $O_2^{\bullet-}$.

Ранее в нашей лаборатории было показано [160,161], что регистрация кинетики супероксид-зависимого окисления *TIRON* до *o*-семихинонов – свободнорадикальных интермедиатов – обеспечивает удобный метод измерения скорости образования $O_2^{\bullet-}$ как модельными ферментными системами, так и

электронными переносчиками митохондрий сердца. При этом скорость генерации $O_2^{\bullet-}$ в реакционной смеси оказалась пропорциональной квадрату интенсивности сигнала ЭПР семихинонов $TIRON^{\bullet-}$.

При исследовании взаимодействия препарата «водорастворимой формой убихинола-10» и фенольных соединений с $O_2^{\bullet-}$ различные концентрации исследуемых веществ вносили в среду инкубации митохондрий перед добавлением митохондрий.

Среда инкубации для измерений на спектрометре ЭПР: 250 мМ сахараза, 20 мМ HEPES, 1 мМ EGTA, 4 мМ KH_2PO_4 , 3 мМ $MgCl_2$ и 10 мМ TIRON; pH =7,4; температура 25 °C (если не указана иная); концентрация митохондрий в среде инкубации составляла 1-2 мг/мл.

Условия записи спектров ЭПР TIRON на спектрометре E-109E "Varian": СВЧ мощность 5 мВт, СВ частота 9,15 ГГц, амплитуда ВЧ модуляции 0,05 мТл; на спектрометре ESR 70-03 XD/2: ослабление СВЧ мощности 10 дБ, СВ частота 9,32 ГГц, амплитуда ВЧ модуляции 0.05 мТл. Выбор величины СВЧ мощности определялся требованием достижения максимальной чувствительности при неискажённой форме сигнала (Рис. 20).

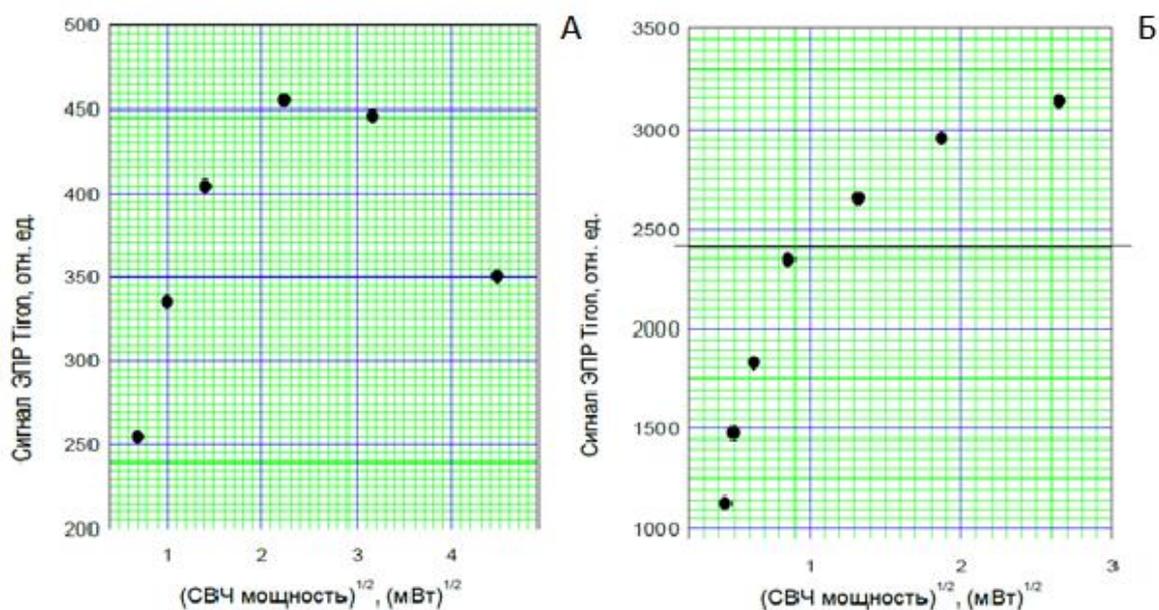


Рис. 20. Зависимость сигнала ЭПР TIRON от квадратного корня СВЧ мощности спектрометра Varian (А) и спектрометра ESR 70-03 XD/2 (Б)

2.5. Получение динитрозильных комплексов железа и запись спектров ЭПР.

Синтез фосфатных ДНКЖ проводили в аппарате Тунберга, в верхнюю часть которого помещали раствор закисного железа FeO в дистиллированной воде, а в нижнюю часть аппарата – 100 мМ фосфатный буфер ($pH=7,0$), как источник лигандов комплексов. После вакуумирования аппарата в него вводили NO и после встряхивания смешивали растворы железа и лигандов. В результате возникали ДНКЖ, включавшие в себя всё введённое железо. ДНКЖ с цистеиновыми и глутатионовыми лигандами получали из фосфатных ДНКЖ известной концентрации, добавляя к последним раствор цистеина или GSH в молярном соотношении 1:2. В некоторых случаях цистеиновые ДНКЖ синтезировались аналогично фосфатным, т.е. путем смешивания растворов $FeSO_4$ и цистеина в молярном соотношении 1:2 в сосуде Тунберга в атмосфере NO . Препараты ДНКЖ хранили при температуре жидкого азота ($-170^\circ C$).

Спектры ЭПР ДНКЖ регистрировали на спектрометре $E-109E$ "Varian" при комнатной температуре ($\sim 25^\circ C$). Условия регистрации спектров ЭПР: СВЧ мощность 10 мВт, СВ частота 9,15 ГГц, амплитуда ВЧ модуляции 0,2 или 0,4 мТл. Для генерации $O_2^{\bullet-}$ использовали ферментативную систему ксантин-ксантинооксидаза и изолированные митохондрии сердца в присутствии сукцината и антимицина А. Образцы помещали в газопроницаемые капилляры $PTFE$ 22 *Sub-Lite-Wall*, а запись спектров проводили при непрерывной продувке воздухом.

2.6. Определение скорости генерации супероксидных радикалов в системе ксантин-ксантинооксидаза.

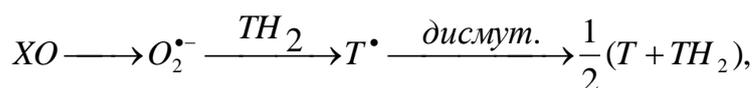
Ранее в нашей лаборатории было показано [162], что для определения скоростей образования $O_2^{\bullet-}$ митохондриями можно использовать супероксид-генерирующую систему ксантин-ксантинооксида.

Скорость генерации $O_2^{\bullet-}$ в модельной системе измеряли по скорости восстановления цитохрома *c*. Реакционная смесь содержала 250 мМ сахарозы, 20 мМ HEPES, 1 мМ EGTA, 0,2 мМ ксантина, 0,1 – 200 мкг/мл ксантиноксидазы и 27 мкМ цитохрома *c*; рН 7,4. Реакция инициировалась добавлением ксантиноксидазы. В качестве контрольного образца использовался раствор того же состава, что и реакционная среда, за исключением ксантиноксидазы. За восстановлением цитохрома *c* следили по изменению разностного оптического поглощения при 550 и 557 нм. Молярный дифференциальный коэффициент экстинкции был принят равным 21,1 мМ⁻¹см⁻¹.

Регистрация спектров ЭПР спиновой ловушки TIRON в ксантиноксидазной системе проводилась в условиях, аналогичных условиям регистрации в митохондриальной суспензии. Образцы также помещали в газопроницаемом тонкостенном капилляре PTFE 22 Sub-Lite-Wall в кварцевую трубку и непрерывно продували воздухом. Реакция инициировалась добавлением ХО (0,1 – 200 мкг/мл) в реакционную смесь, содержащую 10 мМ TIRON и основные компоненты среды спектрофотометрических исследований, за исключением цитохрома *c*.

Зависимость скорости восстановления цитохрома *c* от концентрации ХО имела линейный характер на всем диапазоне использованных концентраций. Отклонения от линейности, наблюдаемые со временем при больших количествах ксантиноксидазы, обусловлены восстановлением значительной части цитохрома *c* в реакционной среде. Зависимость величины двойного интеграла сигнала ЭПР TIRON от концентрации ХО не являлась линейной и аппроксимировалась квадратичной формой, что находится в согласии с ранее установленными закономерностями образования семихинона TIRON в супероксид-генерирующих системах [160]. Подобный характер зависимости обусловлен нестабильностью семихинона, который исчезает в результате реакции дисмутации за время ≈6с.

Упрощённую схему реакций:



согласно которой все молекулы $O_2^{\bullet-}$, образуемые в системе, реагируют с *TIRON* с образованием семихинона T^{\bullet} , а семихинон гибнет в реакции дисмутации, можно описать следующей системой кинетических уравнений:

$$\begin{aligned} \frac{d[O_2^{\bullet-}]}{dt} &= w - k_1[O_2^{\bullet-}] \\ \frac{d[T^{\bullet}]}{dt} &= k_1[O_2^{\bullet-}] - k_2[T^{\bullet}]^2, \end{aligned}$$

где w – скорость генерации $O_2^{\bullet-}$, k_1 и k_2 – константы скоростей реакций взаимодействия $O_2^{\bullet-}$ с *TIRON* и дисмутации семихинона соответственно. В стационарных условиях, достигаемых в экспериментах менее, чем за 5 минут, концентрации радикалов $O_2^{\bullet-}$ и T^{\bullet} остаются неизменными, то есть:

$$\frac{d[O_2^{\bullet-}]}{dt} = \frac{d[T^{\bullet}]}{dt} = 0.$$

При этом, как следует из приведенных выше уравнений, квадрат стационарной концентрации семихинона *TIRON* пропорционален скорости генерации $O_2^{\bullet-}$:

$$[T^{\bullet}]^2 = \frac{w}{k_2}$$

Линейный характер зависимости скорости генерации $O_2^{\bullet-}$ от концентрации *XO*, установленный по кинетике восстановления цитохрома *c*, позволил построить калибровочную кривую зависимости величины двойного интеграла стабильного сигнала семихинона *TIRON* от скорости образования кислородных радикалов в системе (Рис. 21).

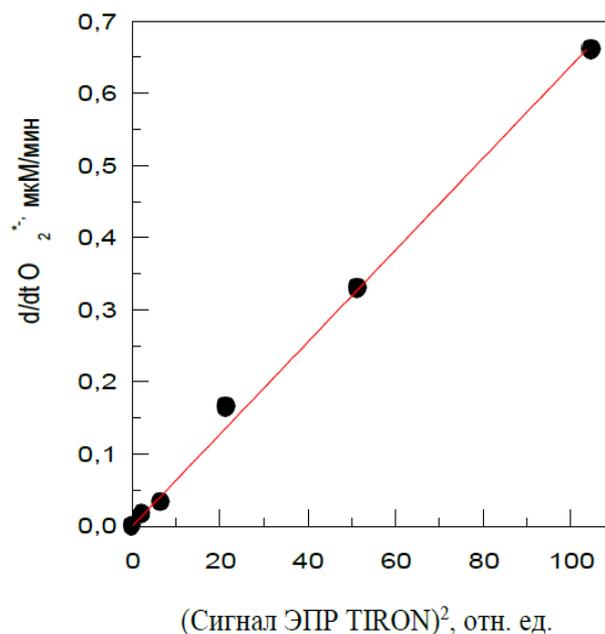


Рис. 21. Зависимость величины двойного интеграла стабильного сигнала семихинона TIRON от скорости образования кислородных радикалов в системе [162].

2.7. Исследование свободнорадикальных форм производных убихинона и пластохинона.

Семихинонные свободные радикалы являются промежуточными продуктами в окислительно-восстановительных реакциях, протекающих с участием хиноидных соединений. Методы ЭПР позволяют изучать электронную структуру образовавшихся парамагнитных интермедиатов путем определения значений g -тензора и констант сверхтонкого взаимодействия, чувствительных к локальному окружению радикала, в частности, образовавшимся водородным связям. Нами исследованы характеристики спектров ЭПР свободнорадикальных (семихинонных) форм: CoQ_1 , CoQ_4 , CoQ_{10} , $mitoQ$, $decylQ$, SkQ_1 , SkQ_3 , $SkQT$ и $SkQN$.

Хиноны были растворены в этаноле или изопропанолe, для их перевода в восстановленную форму использовали $NaBH_4$. Семихиноны образовались в процессе автоокисления соответствующих хинолов при $pH=7,8-8,5$, спектры

ЭПР регистрировали на спектрометре *E-109E "Varian"* при комнатной температуре ($\sim 25^\circ\text{C}$). Образцы помещали либо в стеклянные капилляры, либо в газопроницаемые капилляры *PTFE 22 Sub-Lite-Wall*, что позволяло проводить запись спектров при контролируемом парциальном давлении кислорода.

2.8. Реактивы и статистическая обработка.

В работе использовали реактивы фирм *Sigma Aldrich* (США), *ICN* (США), *Serva* (ФРГ), и других. Митохондриально-направленные антиоксиданты (*mitoQ* и *SkQ*) были предоставлены ООО «Митотехнология». Все растворы были приготовлены на деионизованной воде, нерастворимые в воде соединения были растворены в дважды перегнанном этаноле или изопропанолем. ДНКЖ с глутатионом изготовили на Экспериментальном производстве медико-биологических препаратов ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России. *S*-нитрозоцистеин и *S*-нитрозоглутатион синтезировали, как описано в [163], смешивая соответствующие тиолы и NaNO_2 в кислой среде.

Результаты представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего независимых экспериментов. Эксперименты с каждой концентрацией исследуемых веществ проводили в 3-6 повторах. Статистическую обработку данных проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) пакета программ *Origin 8* фирмы *OriginLab Corporation (USA)*. Достоверность отличий определяли с использованием непараметрического критерия Данна для множественных сравнений с контрольной группой. Различия считали достоверными при $P < 0,05$ – в тексте отмечено (*).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Закономерности генерации супероксидных радикалов комплексом III митохондрий сердца при разном парциальном давлении кислорода и разной температуре.

Сочетание методов ЭПР-спектроскопии спиновых ловушек и ЭПР-оксиметрии позволило нам исследовать кинетику образования короткоживущих свободных радикалов кислорода изолированными митохондриями сердца в условиях строго контролируемой оксигенации образца. На *Рис. 22* представлен суммарный спектр ЭПР нитроксильных радикалов *TEMPONE-¹⁵N-D₁₆* и семихинонов *TIRON* в суспензии митохондрий, генерирующих супероксид в комплексе III в присутствии сукцината и антимицина А. Реакционная смесь находилась в газопроницаемом капилляре при 25°C, а парциальное давление кислорода в газовом потоке поддерживалось во время регистрации спектров ЭПР на постоянном уровне.

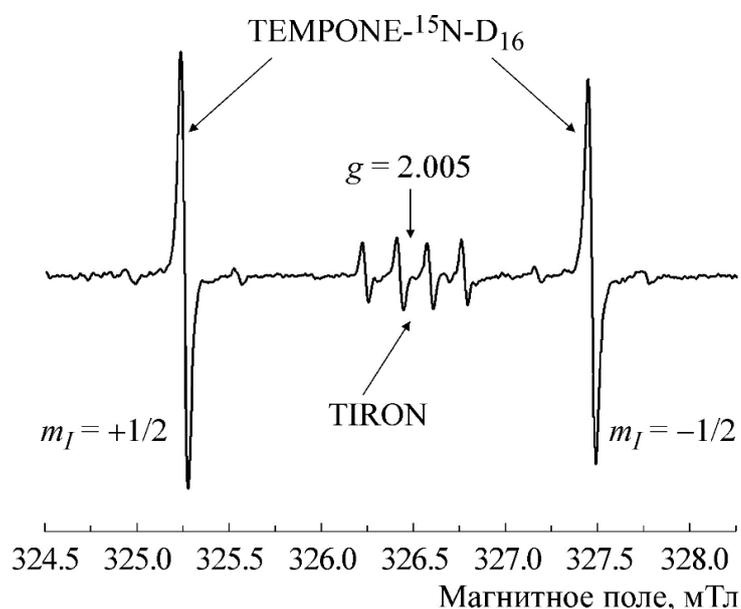


Рис. 22. Суммарный спектр ЭПР нитроксильных радикалов *TEMPONE-¹⁵N-D₁₆* и спиновой ловушки *TIRON* в суспензии митохондрий сердца крысы, генерирующих супероксид в комплексе III в присутствии сукцината и антимицина А. Образец находился в газопроницаемом капилляре при постоянной продувке воздухом (21% O₂), температура 25°C.

Нами было обнаружено (см. [160,161], а также «**Материалы и методы исследования**») что регистрация кинетики супероксид-зависимого окисления *TIRON* в свободнорадикальные интермедиаты – семихиноны *TIRON*– является удобным методом измерения скорости генерации супероксида как модельными ферментными системами, так и изолированными митохондриями. Показано [161,164], что скорость сукцинат-зависимого образования супероксидных радикалов в комплексе *III* митохондрий мала (около 0,01 нмоль $O_2^{\bullet-}$ /мин/мг белка), однако существенно возрастает (до 0,8-1,2 нмоль $O_2^{\bullet-}$ /мин/мг белка) в присутствии антимицина *A*, блокирующего перенос электронов от цитохромов *b* на окисленный *CoQ₁₀* [13]. Генерация $O_2^{\bullet-}$ в комплексе *III* полностью подавлялась ингибиторами *Q*-цикла (миксотиазолом и стигмателлином), блокирующими перенос электронов от убихинола на *Fe-S*-центр Риске.

Переход к аноксии (полному отсутствию кислорода в среде инкубации) в результате замены воздуха в газовом потоке на азот N_2 приводил к постепенному исчезновению спектра ЭПР семихинонов *TIRON*, что свидетельствует о правомерности использования газопроницаемых *PTFE Sub-Lite-Wall* капиллярных трубок в экспериментах с вариацией парциального давления кислорода (Рис. 23). Равновесие между внешней газовой средой (азотом) и находящейся в капилляре содержащей митохондрии реакционной смесью устанавливалось за 4–5 мин., при этом ширина низкопольной компоненты спектра ЭПР *TEMPONE-¹⁵N-D₁₆* уменьшалась до 18,6 мкТл. Спектр (4), полученный через 6 сек после замены азота на воздух, свидетельствуют о том, что в нашей системе достаточно небольшого количества кислорода в образце для начала генерации $O_2^{\bullet-}$ комплексом *III* изолированных митохондрий в присутствии антимицина *A*.

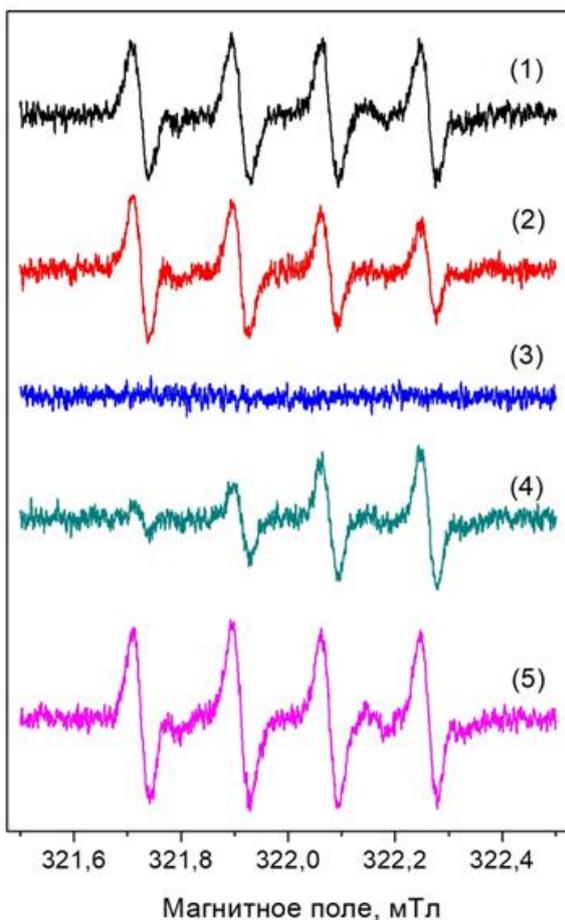


Рис. 23. Спектры ЭПР *TIRON* в инкубационной смеси, содержащей митохондрий сердца крысы, при изменении состава газовой среды: (1) 10 мин воздух, (2) 10 мин воздух, 2 мин N_2 , (3) 10 мин воздух, 5 мин N_2 , (4) 10 мин воздух, 5 мин N_2 , 6 сек воздух, (5) 10 мин воздух, 5 мин N_2 , 5 мин воздух.

TIRON имеет высокую константу скорости взаимодействия с $O_2^{\bullet-}$: для *SOD* она порядка $10^9 M^{-1}c^{-1}$, а для *TIRON* – $10^7 M^{-1}c^{-1}$ [165]. В данной работе *TIRON* использовался в качестве спиновой ловушки, т.е. с его помощью по величине относительно стабильного сигнала семихинона *TIRON* определяли скорость генерации $O_2^{\bullet-}$ в реакционной среде.

Концентрацию семихинонов *TIRON* $^{\bullet-}$ в образце, можно оценить с помощью моделирования процессов окисления *TIRON*, проходящих в среде инкубации, содержащей митохондрии как источник АФК. Схема реакций и взятые из литературных данных константы скоростей представлены в Таблице 1. Поскольку известны не все константы скоростей реакций TH_2 , $T^{\bullet-}$ и T (Таблица 2), для расчетов использовали константы близких по структуре бензосемихинонов и хинонов.

№	Реакция	Константа скорости $k, M^{-1}c^{-1}$	Ссылки
1	$O_2 \rightarrow O_2^{\bullet-}$	$(1,7-2,5) \cdot 10^{-4} (c^{-1})$	[13]
2	$TH_2 + O_2^{\bullet-} \rightarrow T^{\bullet-} + H_2O_2$	10^7	[165]
3	$T^{\bullet-} + O_2 \rightarrow T + O_2^{\bullet-}$	10^5	[166–168]
4	$T + O_2^{\bullet-} \rightarrow T^{\bullet-} + O_2$	10^9	[166–168]
5	$T^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow T + H_2O_2$	10^8	[167,168]
6	$2O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$	10^5	[167,169]
7	$2 T^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow T + TH_2$	10^8	[167,170]
8	$T + TH_2 \rightarrow 2T^{\bullet-} + 2H^+$	10^3	[167]
9	$T + H_2O \rightarrow \text{products}$	10^4	[171,172]
10	$TH_2 + O_2 \rightarrow T^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} + 2H^+$	0, (в модели $k=10^{-3}$)	
11	Диффузия O_2	1) газонепроницаемый капилляр 2) состояние равновесия (5 мин после продувки постоянным составом)	

Таблица 1. Схема реакций, протекающих в системе.

На основании представленной совокупности реакций была построена система дифференциальных уравнений 1-ого порядка (Таблица 2), решение которой производили в *Mathcad* с помощью метода Радау (Рис. 24, 25).

При построении модели было учтено следующее:

1) SO^3 - группы *TIRON* депротонированы, т.к. $pK_{a1} = 1,02, pK_{a2} = 1,70$, для фенольных же групп $pK_{a3} = 8,6, pK_{a4} = 14,5$ [173].

2) Начальная концентрация *TIRON* в образце $[T] = Y_2(t=0) = 10 \text{ мМ}$.

3) В среде инкубации начальная концентрация $[O_2]_{\max} = Y_5(t=0) = 240 \text{ мкМ}$ (температура $25^\circ C$).

4) Скорость генерации супероксида в стандартных условиях нашей системе, содержащей $3-5 \text{ мг мл}^{-1}$ белка митохондрий) была равной:

$$V_{gen}(O_2^{\bullet-}) = (0,8-1,2) \text{ нмоль мин}^{-1} \text{ мг}^{-1} [13] = (1.3-2) \cdot 10^{-5} \text{ моль } c^{-1} \text{ кг}^{-1}.$$

Тогда константа скорости равна: $k(O_2^{\bullet-}) = k_1 = V_{gen}/[O_2] = (1,7-2,5) \cdot 10^{-4} c^{-1}$

Обозначение	Соединение	Переменная <i>Mathcad</i>	Дифференциальное уравнение, $dY/dt, [M \cdot c^{-1}]$
ТН₂	хинол <i>TIRON</i>	Y₀	$dY_0/dt = -k_2 Y_0 Y_3 + k_7 Y_1 Y_1 - k_8 Y_0 Y_2 - k_{10} Y_0 Y_5$
Т^{•-}	семихинон <i>TIRON^{•-}</i>	Y₁	$dY_1/dt = k_2 Y_0 Y_3 - k_3 Y_1 Y_5 + k_4 Y_2 Y_3 - k_5 Y_1 Y_3 - k_7 Y_1 Y_1 + 2k_8 Y_0 Y_2 + k_{10} Y_0 Y_5$
Т	хинон <i>TIRON</i>	Y₂	$dY_2/dt = k_3 Y_1 Y_5 - k_4 Y_2 Y_3 + k_5 Y_1 Y_3 + k_7 Y_1 Y_1 - k_8 Y_0 Y_2 - k_9 Y_2 w$
O₂^{•-}	супероксидный анион-радикал	Y₃	$dY_3/dt = k_1 Y_5 - k_2 Y_0 Y_3 + k_3 Y_1 Y_5 - k_4 Y_2 Y_3 - k_5 Y_1 Y_3 - k_6 Y_3 Y_3 + k_{10} Y_0 Y_5$
H₂O₂	пероксид водорода	Y₄	$dY_4/dt = k_2 Y_0 Y_3 + k_5 Y_1 Y_3 + k_6 Y_3 Y_3$
O₂	молекулярный кислород	Y₅	1. $dY_5/dt = -k_1 Y_5 - k_3 Y_1 Y_5 + k_4 Y_2 Y_3 + k_6 Y_3 Y_3 - k_{10} Y_0 Y_5$ 2. $dY_5/dt = 0$
H₂O	вода	w	55,56 M

Таблица 2. Система дифференциальных уравнений 1-ого порядка, описывающих изменение концентраций реагентов при окислении *TIRON* в экспериментальной системе.

5) $O_2^{\bullet-}$ имеет $pK=4,8$, значит, при $pH=7,4$ практически весь депротонирован, т.е. находится в форме анион-радикала.

6) H_2O_2 имеет $pK=12,6$, следовательно, при $pH=7,4$ диссоциацией можно пренебречь.

7) Реакцию $T + H_2O_2$ не учитываем в нашей модели, поскольку при $pH=7,4$ ($pH < 12$) по [166] нет прямого взаимодействия.

8) Концентрация H_2O в образце $[H_2O] = w = 55,56 M$.

9) Исходя из исследований поглощения кислорода изолированными митохондриями полярографическим методом (не показано), концентрация O_2 в образце при добавлении антимицина *A* не меняется значительно ($\approx 5\%$). Это позволяет оценить концентрацию кислорода внутри капиллярной газопроницаемой трубки при установлении равновесия через 5 минут после продувки образца постоянным газовым составом: $[O_2]_{\text{вн}} \approx 0.95 [O_2]_{\text{макс}} = Y_5 = 228 \text{ мкМ}$ (температура 25°C).

t1 := 0 t2 := 1200 d := 10000 w := 55560000

A

$$\begin{array}{ll}
 k1 := 2.5 \cdot 10^{-4} & k2 := 10^1 \\
 k3 := 10^{-1} & k4 := 10^3 \\
 k5 := 10^2 & k6 := 10^{-1} \\
 k7 := 10^2 & k8 := 10^{-3} \\
 k9 := 10^{-2} & k10 := 10^{-9}
 \end{array}
 \quad
 Y(t1) := \begin{pmatrix} d \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 240 \end{pmatrix}$$

$$K(t, Y) := \begin{pmatrix} -k2 \cdot Y_0 \cdot Y_3 + k7 \cdot Y_1 \cdot Y_1 - k8 \cdot Y_0 \cdot Y_2 - k10 \cdot Y_0 \cdot Y_5 \\ k2 \cdot Y_0 \cdot Y_3 - k3 \cdot Y_1 \cdot Y_5 + k4 \cdot Y_2 \cdot Y_3 - k5 \cdot Y_1 \cdot Y_3 - k7 \cdot Y_1 \cdot Y_1 + k8 \cdot Y_0 \cdot Y_2 + k10 \cdot Y_0 \cdot Y_5 \\ k3 \cdot Y_1 \cdot Y_5 - k4 \cdot Y_2 \cdot Y_3 + k5 \cdot Y_1 \cdot Y_3 + k7 \cdot Y_1 \cdot Y_1 - k8 \cdot Y_0 \cdot Y_2 - k9 \cdot Y_2 \cdot w \\ k1 \cdot Y_5 - k2 \cdot Y_0 \cdot Y_3 + k3 \cdot Y_1 \cdot Y_5 - k4 \cdot Y_2 \cdot Y_3 - k5 \cdot Y_1 \cdot Y_3 - k6 \cdot Y_3 \cdot Y_3 + k10 \cdot Y_0 \cdot Y_5 \\ k2 \cdot Y_0 \cdot Y_3 + k5 \cdot Y_1 \cdot Y_3 + k6 \cdot Y_3 \cdot Y_3 \\ -k1 \cdot Y_5 - k3 \cdot Y_1 \cdot Y_5 + k4 \cdot Y_2 \cdot Y_3 + k6 \cdot Y_3 \cdot Y_3 - k10 \cdot Y_0 \cdot Y_5 \end{pmatrix}$$

Z := Radau(Y(t1), t1, t2, 50000, K)

	0	1	2	3	4	5
0	0	1·10 ⁴	0	0	0	0
1	0.024	10·10 ³	1.553·10 ⁻³	6.75·10 ⁻⁸	9.965·10 ⁻⁷	1.942·10 ⁻³
2	0.048	10·10 ³	3.095·10 ⁻³	1.354·10 ⁻⁷	1.367·10 ⁻⁶	4.774·10 ⁻³
3	0.072	10·10 ³	4.613·10 ⁻³	2.031·10 ⁻⁷	1.731·10 ⁻⁶	8.497·10 ⁻³
4	0.096	10·10 ³	6.097·10 ⁻³	2.7·10 ⁻⁷	2.087·10 ⁻⁶	0.013
5	0.12	10·10 ³	7.539·10 ⁻³	3.358·10 ⁻⁷	2.433·10 ⁻⁶	0.019
6	0.144	10·10 ³	8.932·10 ⁻³	4·10 ⁻⁷	2.767·10 ⁻⁶	0.025
Z = 7	0.168	10·10 ³	0.01	4.623·10 ⁻⁷	3.088·10 ⁻⁶	0.032
8	0.192	10·10 ³	0.012	5.224·10 ⁻⁷	3.393·10 ⁻⁶	0.04
9	0.216	10·10 ³	0.013	5.794·10 ⁻⁷	3.68·10 ⁻⁶	0.048
10	0.24	10·10 ³	0.014	6.334·10 ⁻⁷	3.951·10 ⁻⁶	0.057
11	0.264	10·10 ³	0.015	6.843·10 ⁻⁷	4.203·10 ⁻⁶	0.067
12	0.288	10·10 ³	0.016	7.322·10 ⁻⁷	4.439·10 ⁻⁶	0.077
13	0.312	10·10 ³	0.017	7.769·10 ⁻⁷	4.657·10 ⁻⁶	0.088
14	0.336	10·10 ³	0.018	8.185·10 ⁻⁷	4.859·10 ⁻⁶	0.1
15	0.36	10·10 ³	0.018	8.568·10 ⁻⁷	5.045·10 ⁻⁶	...

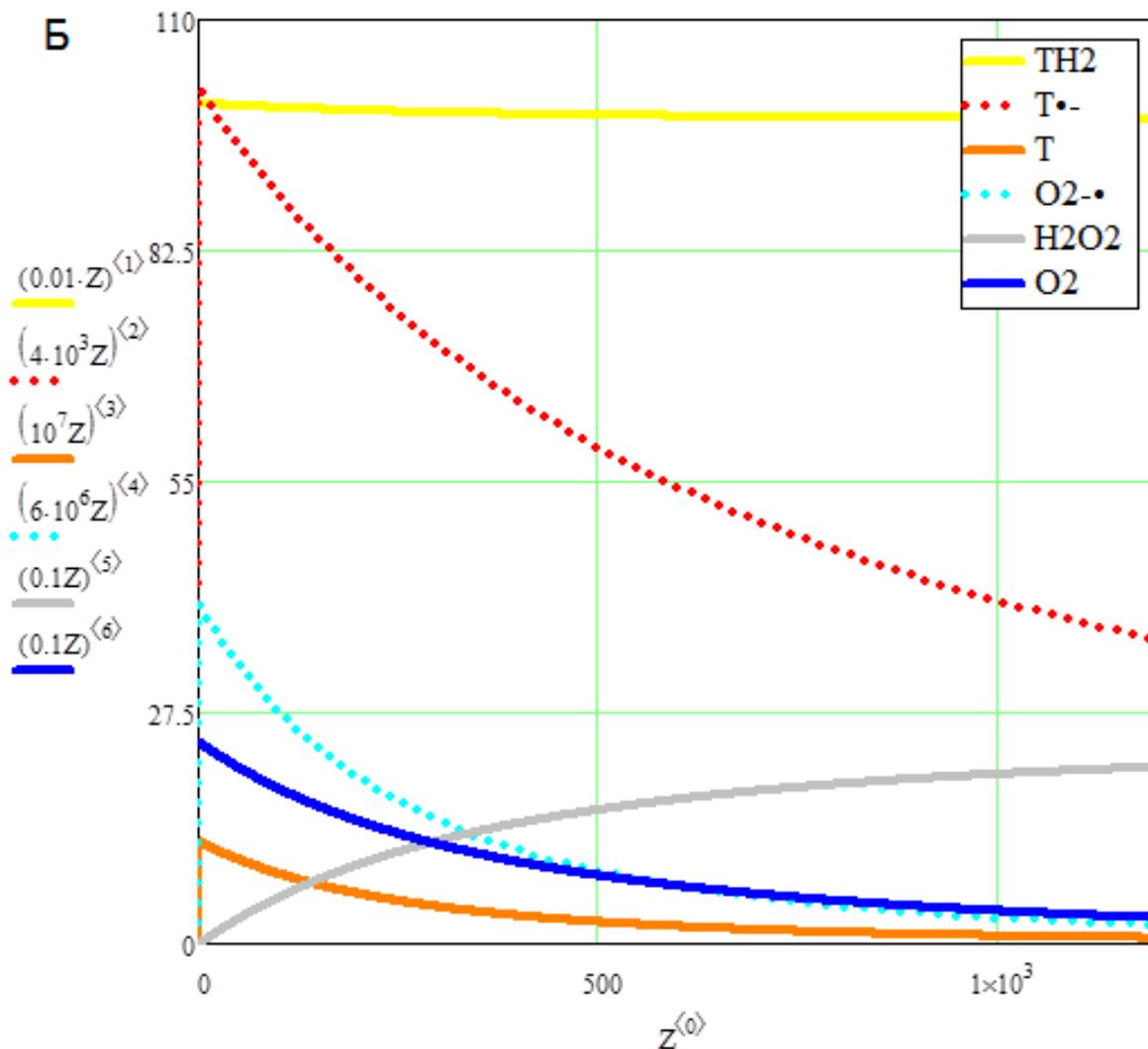


Рис. 24. Решение системы дифференциальных уравнений 1-ого порядка для реакционной смеси, находящейся в газонепроницаемой капиллярной трубке (А), рассчитанные из модели графики изменения концентрации веществ (мкМ) со временем (с)(Б) в закрытой системе.

t1 := 0 t2 := 1200 d := 10000 w := 55560000

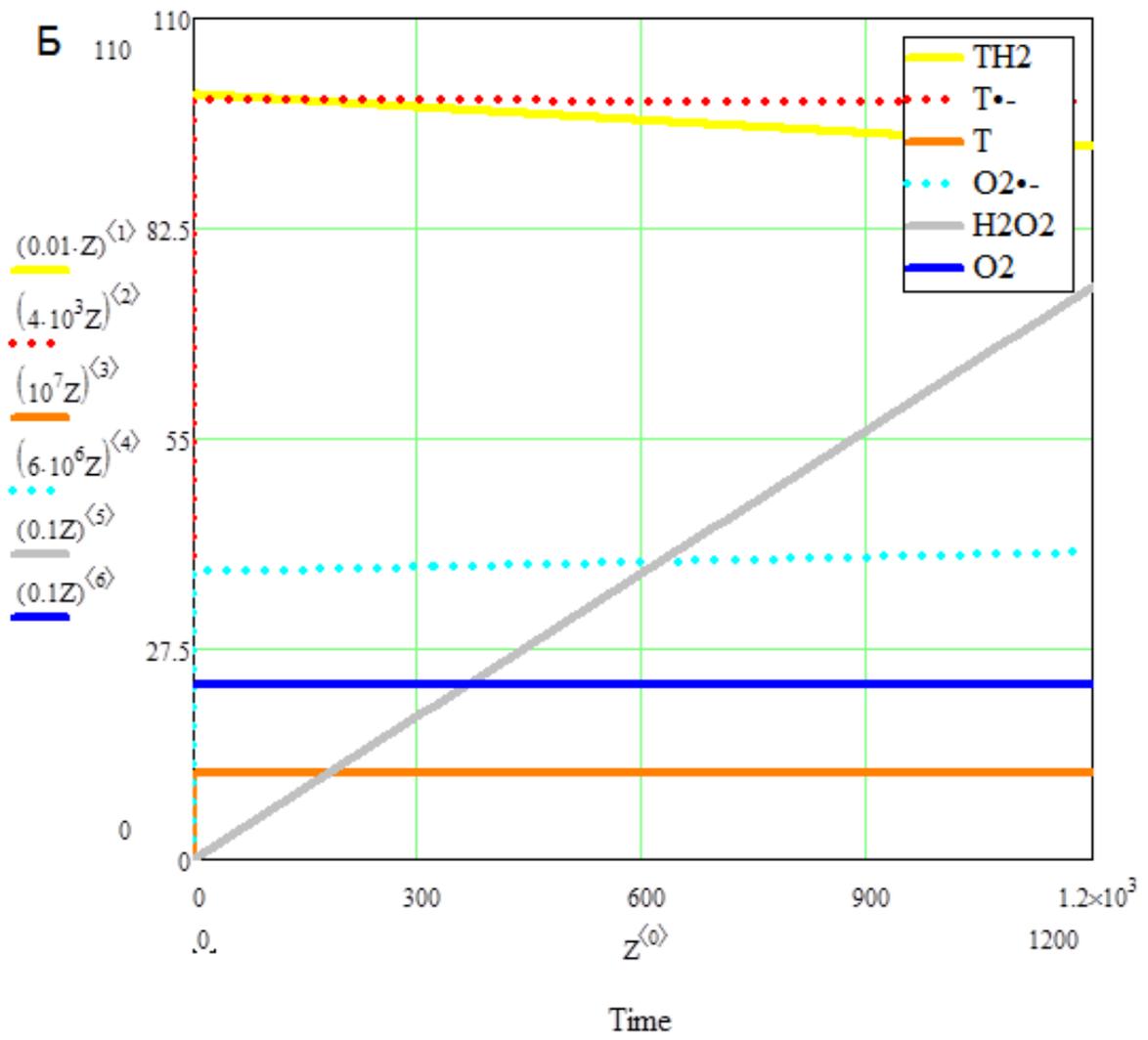
A

$$\begin{array}{ll}
 k1 := 2.5 \cdot 10^{-4} & k2 := 10^1 \\
 k3 := 10^{-1} & k4 := 10^3 \\
 k5 := 10^2 & k6 := 10^{-1} \\
 k7 := 10^2 & k8 := 10^{-3} \\
 k9 := 10^{-2} & k10 := 10^{-9}
 \end{array}
 \quad Y(t1) := \begin{pmatrix} d \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 228 \end{pmatrix}$$

$$K(t, Y) := \begin{pmatrix} -k2 \cdot Y_0 \cdot Y_3 + k7 \cdot Y_1 \cdot Y_1 - k8 \cdot Y_0 \cdot Y_2 - k10 \cdot Y_0 \cdot Y_5 \\ k2 \cdot Y_0 \cdot Y_3 - k3 \cdot Y_1 \cdot Y_5 + k4 \cdot Y_2 \cdot Y_3 - k5 \cdot Y_1 \cdot Y_3 - k7 \cdot Y_1 \cdot Y_1 + 2 \cdot k8 \cdot Y_0 \cdot Y_2 + k10 \cdot Y_0 \cdot Y_5 \\ k3 \cdot Y_1 \cdot Y_5 - k4 \cdot Y_2 \cdot Y_3 + k5 \cdot Y_1 \cdot Y_3 + k7 \cdot Y_1 \cdot Y_1 - k8 \cdot Y_0 \cdot Y_2 - k9 \cdot Y_2 \cdot w \\ k1 \cdot Y_5 - k2 \cdot Y_0 \cdot Y_3 + k3 \cdot Y_1 \cdot Y_5 - k4 \cdot Y_2 \cdot Y_3 - k5 \cdot Y_1 \cdot Y_3 - k6 \cdot Y_3 \cdot Y_3 + k10 \cdot Y_0 \cdot Y_5 \\ k2 \cdot Y_0 \cdot Y_3 + k5 \cdot Y_1 \cdot Y_3 + k6 \cdot Y_3 \cdot Y_3 \\ 0 \end{pmatrix}$$

Z := Radau(Y(t1), t1, t2, 50000, K)

	0	1	2	3	4	5
0	0	$1 \cdot 10^4$	0	0	0	0
1	0.024	$10 \cdot 10^3$	$1.475 \cdot 10^{-3}$	$6.092 \cdot 10^{-8}$	$9.29 \cdot 10^{-7}$	$1.824 \cdot 10^{-3}$
2	0.048	$10 \cdot 10^3$	$2.941 \cdot 10^{-3}$	$1.223 \cdot 10^{-7}$	$1.263 \cdot 10^{-6}$	$4.451 \cdot 10^{-3}$
3	0.072	$10 \cdot 10^3$	$4.385 \cdot 10^{-3}$	$1.834 \cdot 10^{-7}$	$1.592 \cdot 10^{-6}$	$7.883 \cdot 10^{-3}$
4	0.096	$10 \cdot 10^3$	$5.798 \cdot 10^{-3}$	$2.44 \cdot 10^{-7}$	$1.915 \cdot 10^{-6}$	0.012
5	0.12	$10 \cdot 10^3$	$7.173 \cdot 10^{-3}$	$3.036 \cdot 10^{-7}$	$2.228 \cdot 10^{-6}$	0.017
6	0.144	$10 \cdot 10^3$	$8.504 \cdot 10^{-3}$	$3.619 \cdot 10^{-7}$	$2.531 \cdot 10^{-6}$	0.023
7	0.168	$10 \cdot 10^3$	$9.782 \cdot 10^{-3}$	$4.185 \cdot 10^{-7}$	$2.823 \cdot 10^{-6}$	0.029
8	0.192	$10 \cdot 10^3$	0.011	$4.733 \cdot 10^{-7}$	$3.102 \cdot 10^{-6}$	0.036
9	0.216	$10 \cdot 10^3$	0.012	$5.255 \cdot 10^{-7}$	$3.365 \cdot 10^{-6}$	0.044
10	0.24	$10 \cdot 10^3$	0.013	$5.751 \cdot 10^{-7}$	$3.612 \cdot 10^{-6}$	0.052
11	0.264	$10 \cdot 10^3$	0.014	$6.22 \cdot 10^{-7}$	$3.845 \cdot 10^{-6}$	0.061
12	0.288	$10 \cdot 10^3$	0.015	$6.662 \cdot 10^{-7}$	$4.062 \cdot 10^{-6}$	0.071
13	0.312	$10 \cdot 10^3$	0.016	$7.076 \cdot 10^{-7}$	$4.265 \cdot 10^{-6}$	0.081
14	0.336	$10 \cdot 10^3$	0.017	$7.463 \cdot 10^{-7}$	$4.453 \cdot 10^{-6}$	0.091
15	0.36	$10 \cdot 10^3$	0.018	$7.822 \cdot 10^{-7}$	$4.626 \cdot 10^{-6}$...



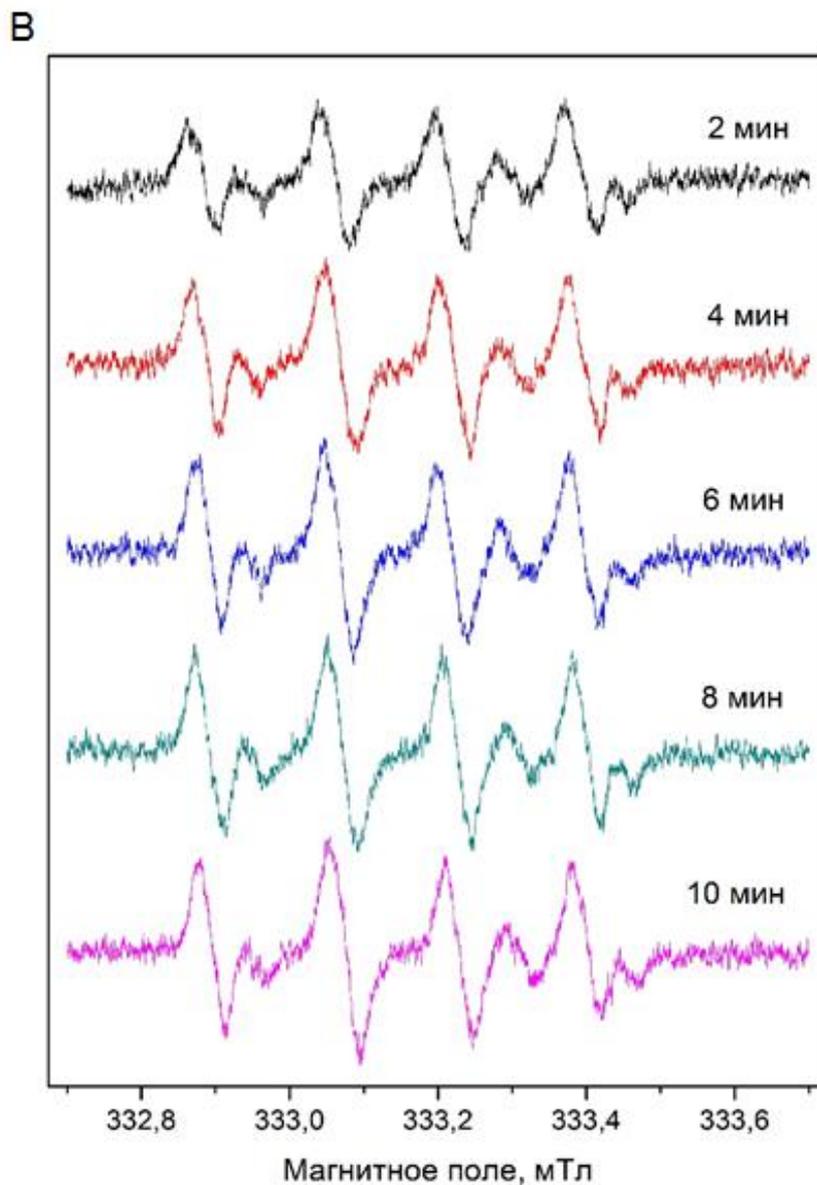


Рис. 25. Решение системы дифференциальных уравнений 1-ого порядка в случае установления равновесия между внешней газовой средой снаружи и смесью внутри газопроницаемого капилляра (А), рассчитанные из модели графики изменения концентрации веществ (мкМ) со временем (с) (Б) и спектры ЭПР TIRON в суспензии митохондрий (В) в газопроницаемой капиллярной трубке.

В целом разработанная модель удовлетворительно описывает экспериментальные данные по образованию семихинонов TIRON, полученные как в газонепроницаемых стеклянных капиллярах, так и в газопроницаемой

капиллярной трубке через 5 мин после установления равновесия между внешней газовой средой и смесью (Рис. 24, 25).

На Рис. 26(а) представлена зависимость интенсивности сигнала ЭПР семихинонов *TIRON*, образовавшихся в суспензии митохондрий в результате окисления спиновой ловушки супероксидными радикалами, от содержания кислорода в газовом потоке (т.е. от значения парциального давления кислорода). На Рис. 25б показана соответствующая зависимость скорости образования супероксида в митохондриях сердца, вычисленная с помощью супероксид-генерирующей модельной системы ксантин–ксантиноксидаза [160]. Из Рис. 26 видно, что, несмотря на некоторое падение интенсивности сигнала ЭПР *TIRON* при понижении содержания кислорода в газовом потоке, комплекс III митохондриальной дыхательной цепи продолжал образовывать супероксидные радикалы $O_2^{\bullet-}$, включая условия глубокой гипоксии (1,3% O_2).

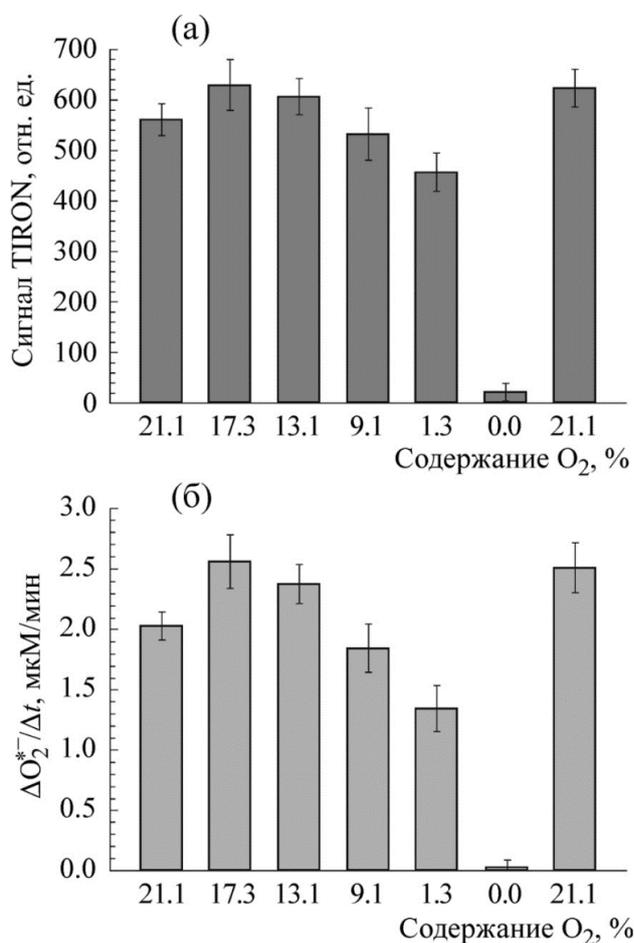


Рис. 26. Зависимость интенсивности сигнала ЭПР *TIRON* (а) и скорости образования супероксидных радикалов (б) в суспензии митохондрий сердца крысы от содержания кислорода в газовом потоке, продуваемом образцом. Кол-во экспериментов $n=6$. Условия инкубации, расчет скорости генерации супероксида и статистическая обработка полученных данных представлены в главе «Материалы и методы исследования» (раздел 2.8).

Генерация $O_2^{\bullet-}$ изолированными митохондриями сердца прекращалась только в условиях аноксии, т.е. после полного удаления кислорода из реакционной смеси при замене воздуха на азот. Реоксигенация (смена газовой среды с азота на воздух) приводила к быстрому росту сигнала ЭПР *TIRON*. После 5-минутной реоксигенации, когда установилось равновесие между внешней газовой средой и суспензией митохондрий, скорость образования $O_2^{\bullet-}$ оказалась несколько выше, чем до аноксии. Можно предположить [164], что глубокая гипоксия, последующие аноксия и реоксигенация сопровождаются определёнными изменениями в мембранах изолированных митохондрий сердца, вызывающими увеличение скорости образования супероксидных радикалов электронными переносчиками (семихинонами *CoQ₁₀*) комплекса *III* дыхательной цепи.

Кроме сукцината – субстрата комплекса *II*, мы использовали также глутамат и малат – субстраты комплекса *I*. Кинетика изменения сигнала ЭПР *TIRON* в случае субстратов комплекса *I* была похожа на предыдущие опыты сукцинатом (данные не приведены), однако в этом случае генерация супероксида в комплексе *III* прекращалась после добавления ротенона – ингибитора комплекса *I*.

Нами впервые было проведено исследование влияния температуры на образование $O_2^{\bullet-}$ митохондриями сердца. Эти опыты были проведены на малогабаритном автоматизированном спектрометре *ESR 70-03 XD/2*, позволяющем варьировать температуру газового потока, обдувающего газопроницаемый капилляр с суспензией митохондрий. На *Рис. 27* приведены спектры ЭПР спиновой ловушки *TIRON* в суспензии митохондрий, окисляющих сукцинат в присутствии антимицина *A*, в газопроницаемом капилляре при температурах 28°C и 37°C.

Измерения, проведенные при температурах 28°C и 37°C, показали, что интенсивность сигнала ЭПР *TIRON* и, соответственно, скорость генерации $O_2^{\bullet-}$ в митохондриях сердца несколько увеличивались с ростом температуры: при 28°C скорость составляла $4,75 \pm 0,75$ мкМ/мин, тогда как при 37°C скорость была

$5,87 \pm 0,49$ $\mu\text{M}/\text{мин}$. Основные закономерности процесса генерации $\text{O}_2^{\bullet-}$ митохондриями полностью сохранялись. Этот результат находится в соответствии с правилом Вант-Гоффа: при повышении температуры скорость химической реакции увеличивается.

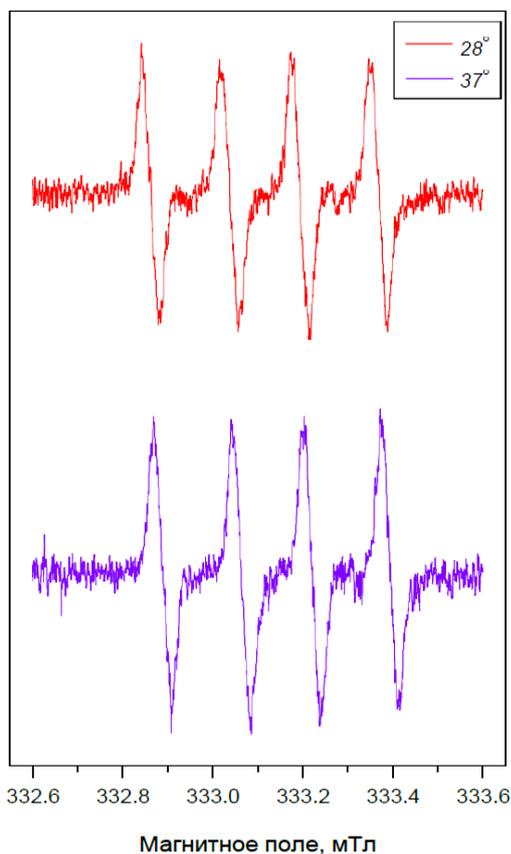


Рис. 27. Спектры ЭПР TIRON в суспензии митохондрий сердца крысы при температурах 28° и 37°С.

3.2. Кинетика образования и разрушения ДНКЖ при разных условиях.

При комнатной температуре ДНКЖ дают синглетный сигнал ЭПР с полушириной 0,7 мТл при $g_{iso} = 2,03$ (Рис. 28). Анализ различных характеристик этого сигнала показывает, что ДНКЖ соответствует формула: $\{(RS^+)_2Fe^+(NO^+)_2\}$, где RS^+ - тиоловые группы белков; однако, возможна замена тиоловых групп нетиоловыми лигандами [163,174].

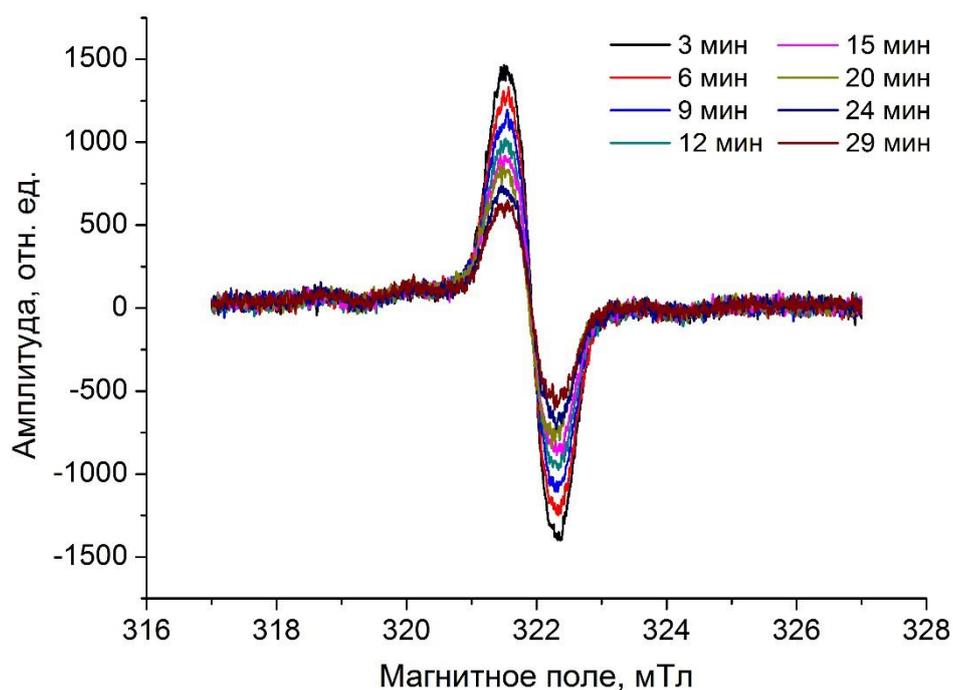


Рис. 28. Сигналы ЭПР ДНКЖ, добавленных к суспензии митохондрий сердца крысы. Имеют форму симметричного синглета с полушириной 0,7 мТл и центр $g = 2,03$.

Учитывая антиоксидантную активность ДНКЖ, мы изучали их синтез в изолированных митохондриях сердца крыс с использованием *S*-нитрозоцистеина в качестве донора *NO*. В этой серии наших экспериментов митохондриальные суспензии содержали экзогенный *L*-цистеин. Ранее было обнаружено, что в избытке этот тиол стимулирует образование преимущественно парамагнитного моноядерного ДНКЖ с тиолатными лигандами.

В этом исследовании образование тиолсодержащих ДНКЖ изучали методом ЭПР в условиях симулированной гипоксии (газовая среда + азот). На Рис. 29 показаны спектры ЭПР ДНКЖ (А) и кинетика образования ДНКЖ (Б). Переход от азота к кислороду сопровождался значительным снижением концентрации парамагнитного ДНКЖ. После 8-минутного воздействия кислорода концентрация ДНКЖ снизилась до ~ 18% от исходного уровня. Тем не менее, скорость разрушения ДНКЖ не изменилась в случае стимулированной антимицином *A* генерации $O_2^{\bullet-}$ митохондриальным комплексом III (Рис. 29Б,

кривая 2). Максимальная концентрация ДНКЖ, напротив, увеличилась. Парадоксальным результатом этого исследования было значительно более быстрое снижение концентрации ДНКЖ в аэробных условиях после добавления SOD и каталазы (Рис. 29Б, кривая 3). Способность этих антиоксидантных ферментов защищать ДНКЖ от $O_2^{\bullet-}$ -индуцированной деградации была продемонстрирована в наших предыдущих исследованиях [32,33].

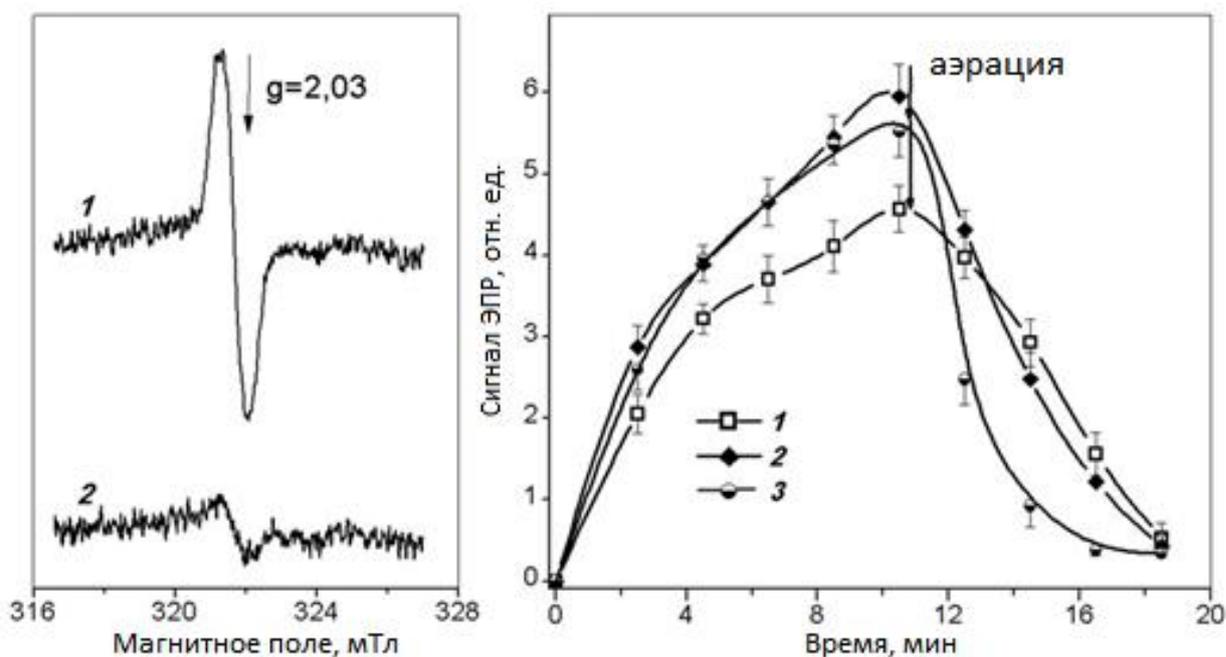


Рис. 29. Образование ДНКЖ в суспензиях изолированных митохондрий сердца крысы. (А) Спектры ЭПР тиолсодержащего ДНКЖ, записанные после 10,5-минутной инкубации в анаэробных условиях (1) и через 8 минут после перехода в аэробные условия (2). (Б) Кинетика образования ДНКЖ в инкубационной среде, содержащей митохондрии (22 мг/мл белка), 10 мМ цистеина и 12 мМ S-нитрозоцистеина в присутствии сукцината (1–3), антимицина А (2 и 3), 400 ед/мл SOD и 600 ед/мл каталазы (3). Переход от анаэробных к аэробным условиям обозначен стрелкой.

Принимая во внимание способность комплекса III для одновременного высвобождения $O_2^{\bullet-}$ в матрикс и межмембранное пространство [175,176], мы предположили, что этот эффект может быть следствием взаимодействия S-

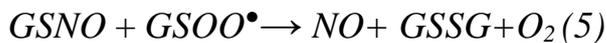
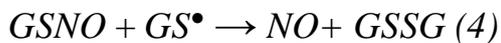
нитрозцистеина с $O_2^{\bullet-}$. Реакция $O_2^{\bullet-}$ с $GSNO$, как правило, дает NO , тиол и молекулярный кислород [177]:



Другими гипотетическими продуктами взаимодействия $GSNO$ с $O_2^{\bullet-}$ являются NO^- и $OONO^-$:



Тиоловые радикалы GS^{\bullet} и $GSOO^{\bullet}$ также обладают способностью инициировать разложение $GSNO$ до NO [178]:



В дополнение к реакциям 2 и 3, нужно отметить, что радикалы GS^{\bullet} могут генерироваться при взаимодействии $OONO^-$ с восстановленным глутатионом. $GSOO^{\bullet}$ образуются в результате реакции GS^{\bullet} с молекулярным кислородом O_2 [178,179].

Другой характерной особенностью $O_2^{\bullet-}$ является его способность провоцировать выделение железа из аконитазы и ферритина [180,181]. Очевидно, что митохондриальные изоформы этих белков продуцируют двухвалентное железо Fe^{2+} , необходимое для синтеза ДНКЖ. В наших исследованиях ферритин и $GSNO$, добавленные в реакционную среду, запускали синтез ДНКЖ; эта реакция усиливалась $O_2^{\bullet-}$, генерируемыми митохондриями (Рис. 30). Эти данные свидетельствуют о том, что при определенных условиях $O_2^{\bullet-}$ может инициировать синтез ДНКЖ, увеличивая концентрацию NO и железа в инкубационной среде. Между тем, нельзя исключить, что в суспензии митохондрий возможна регенерация ДНКЖ из интермедиатов, образующихся при их взаимодействии с АФК и АФА.

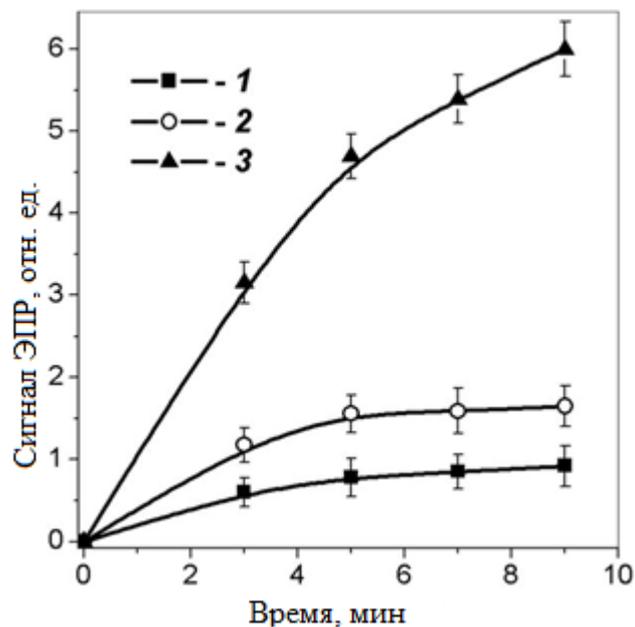


Рис. 30. Кинетика образования ДНКЖ с глутатионом в реакционной среде, содержащей: (1) 100 мМ К, Na-фосфатный буфер рН=7,4, 2 мМ GSH, 3 мМ GSNO и ферритин (0,2 мг/мл); (2) так же, как в (1) + митохондрии (5 мг белка/мл), 12 мМ сукцината; (3) то же, что и в (2) + 4 мМ антимицина А.

Вклад NO^- , образующихся по реакции 3, в синтез ДНКЖ также не должен быть исключен. На основании этих результатов мы предприняли исследование синтеза ДНКЖ в условиях симулированной гипоксии. Инкубационная среда содержала соль Ангели в качестве источника NO^-/HNO , ионы Fe^{2+} и цистеин. Добавление водорастворимого CoQ_1 в реакционную среду значительно увеличивало выход тиолата ДНКЖ, причем эффект хинона был чисто количественным (Рис. 31). В этом эксперименте был получен сигнал семихинонов CoQ_1 (Рис. 31Б, вставка). Эти результаты привели нас к заключению, что взаимодействие CoQ_1 с NO^- осуществляется путем одноэлектронного окисления NO^- :



Генерируемый таким образом NO склонен к связыванию с ионами железа в ходе формирования нитрозильных комплексов. Однако уменьшение скорости

реакции в результате аэрации (Рис. 31Б, кривая 2) можно объяснить образованием $OOONO^-$ при взаимодействии NO^- с O_2 .

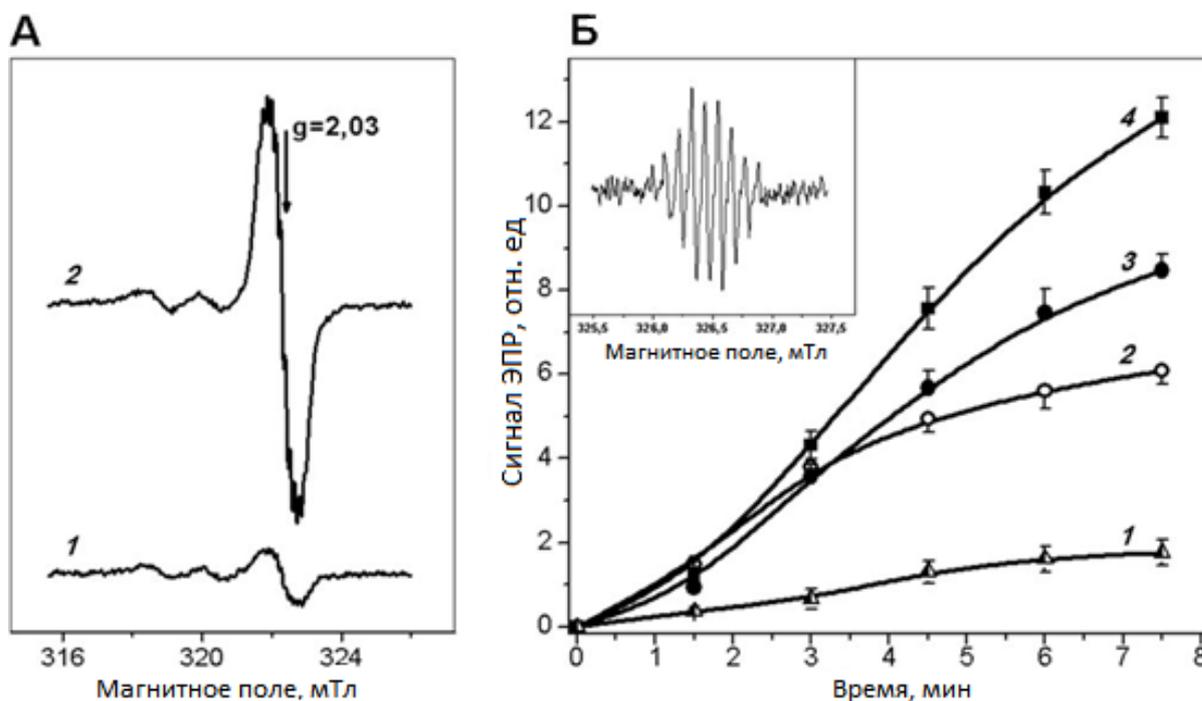


Рис. 31. Образование цистеинового ДНКЖ в присутствии NO^-/HNO . Реакционная среда содержала 100 мМ К, Na-фосфатный буфер $pH=7,4$, 1 мМ $FeSO_4$, 20 мМ цистеина и 5 мМ соли Ангели (донор NO^-/HNO). (А) Спектры ЭПР ДНКЖ с цистеином записывали в отсутствие (1) и в присутствии 3,8 мМ CoQ_1 (2). Реакционную смесь инкубировали в течение 7,5 мин в анаэробных условиях (Б). Кинетика образования ДНКЖ в реакционной среде в отсутствие добавок (1) и после добавления 1,6 мМ (кривые 2 и 3) и 3,8 мМ CoQ_1 (кривая 4). Реакционную среду инкубировали в анаэробных (кривые 1, 3 и 4) или аэробных условиях (кривая 2). На вставке показан спектр ЭПР семихинонов $CoQ_1^{\bullet-}$, зарегистрированных в условиях симулированной гипоксии.

В этих экспериментах, моделирующих гипоксию-реоксигенацию, уровень ДНКЖ определяется, с одной стороны, деструкцией ДНКЖ под действием $O_2^{\bullet-}$ и молекулярного кислорода O_2 [182] и, с другой стороны, образованием этих комплексов с участием ионов железа и оксида азота, причем продукция последних так же зависит от супероксида и других активных форм кислорода.

Нельзя исключить, что в суспензии митохондрий происходит регенерации ДНКЖ из промежуточных комплексов, образующихся при их взаимодействии с $O_2^{\bullet-}$.

3.3. Влияние ДНКЖ с глутатионом на генерацию супероксидных радикалов в модельной системе ксантин-ксантинооксидаза и митохондриями сердца при разном парциальном давлении кислорода.

ДНКЖ функционируют как триггеры антиоксидантных и прооксидантных процессов, а переключение свойств самих ДНКЖ зависит от парциального давления кислорода.

Эксперименты по исследованию действия ДНКЖ с глутатионовыми лигандами на генерацию $O_2^{\bullet-}$ проводились в модельной системе ксантин-ксантинооксидаза и в суспензии изолированных митохондрий из сердца крыс. Концентрация ДНКЖ в реакционной среде с ксантином и ксантинооксидазой была 100 мкМ, 10 мкМ, 1 мкМ и 0,1 мкМ (Рис.32). При добавлении 100 мкМ ДНКЖ наблюдалось практически полное исчезновение сигнала ЭПР спиновой ловушки TIRON, при использовании меньших концентраций эффект ДНКЖ был не столь значительным.

В условиях ферментативной продукции $O_2^{\bullet-}$ в системе ксантин-ксантинооксидаза при концентрации 10 мкМ ДНКЖ происходило постепенное возрастание сигнала спиновой ловушки (Рис. 33). Это свидетельствует о том, что ДНКЖ расходуются, вступая в реакцию с $O_2^{\bullet-}$, а образования или регенерации ДНКЖ в системе не происходит.

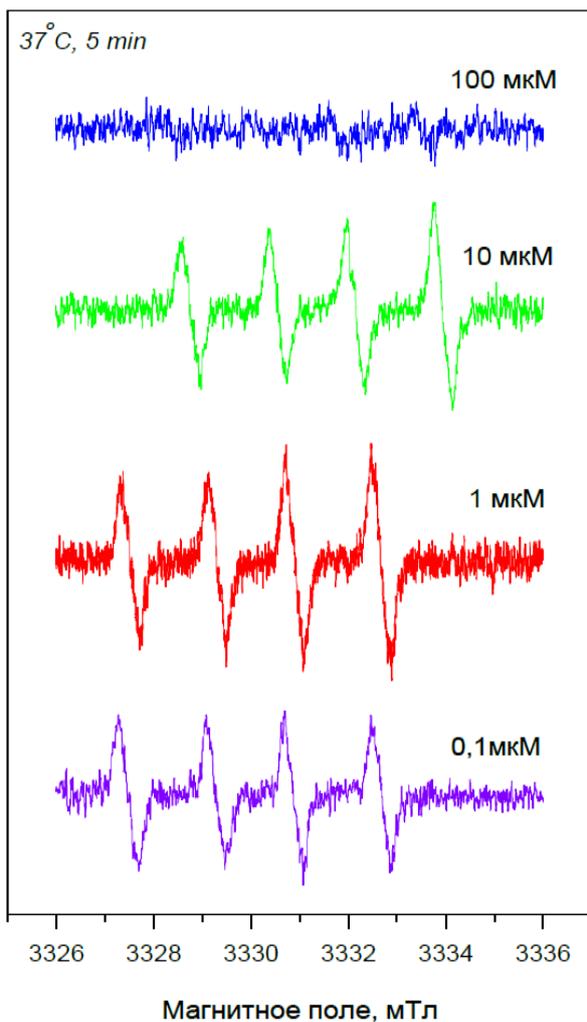


Рис. 32. Спектры ЭПР TIRON в модельной системе ксантин-ксантинооксидаза при разном содержании препарата ДНКЖ с глутатионом (концентрации указаны на Рис.), температура 37°C.

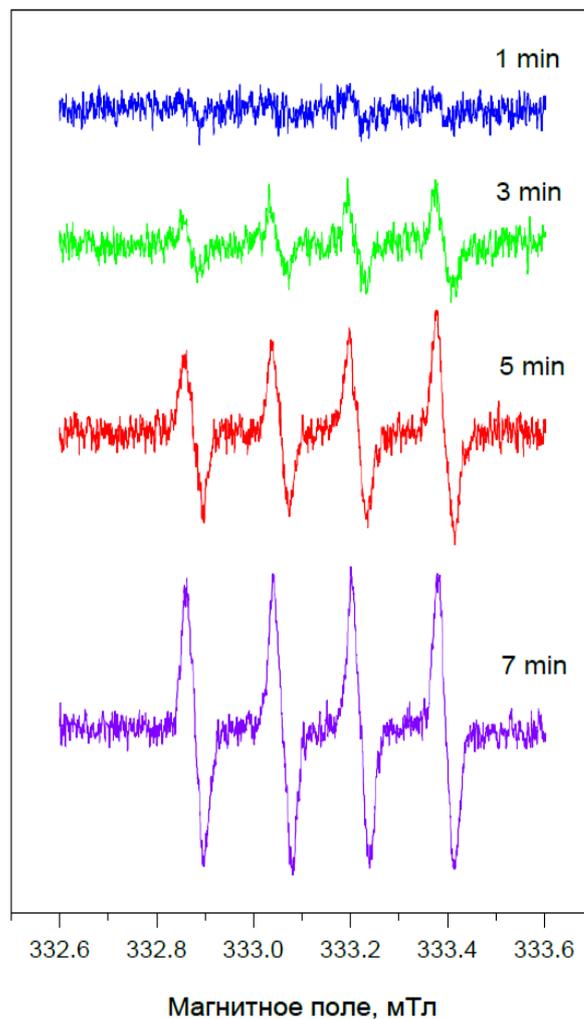


Рис. 33. Спектры ЭПР TIRON в модельной системе ксантин-ксантинооксидаза при разном времени регистрации (указаны на Рис.) в присутствии 10μM препарата ДНКЖ с глутатионом, температура 37°C.

В опытах с изолированными митохондриями, когда $O_2^{\bullet-}$ генерировался комплексом III в присутствии сукцината и антимицина А (ингибитора Q-цикла) при физиологической температуре 37°C (Рис. 34), вначале наблюдалась аналогичная с ксантин-ксантинооксидазой картина, т.е. при добавлении 100 мкМ ДНКЖ с глутатионом происходило исчезновение сигнала ЭПР TIRON. Это

свидетельствует о том, что ДНКЖ имеет сравнимую или более высокую константу скорости взаимодействия с $O_2^{\bullet-}$, чем TIRON.

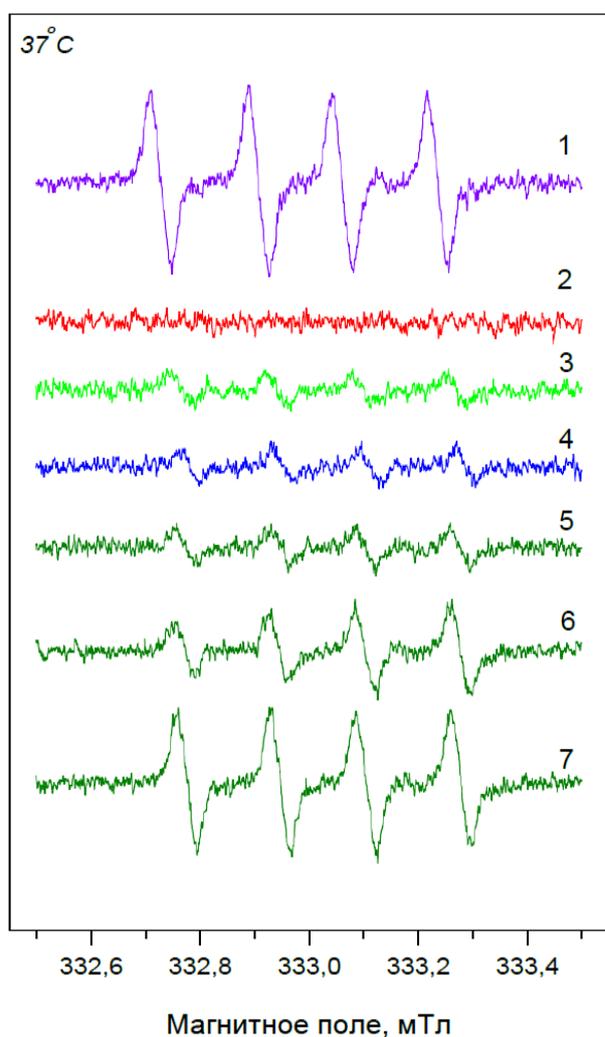


Рис. 34. Спектры ЭПР TIRON в суспензии митохондрий сердца крысы линии Wistar (антимидцин А + сукцинат) при разном содержании препарата ДНКЖ с глутатионом в реакционной смеси: (1) без препарата (10 мин); (2) 100мкМ (10 мин); (3) 10 мкМ (10 мин); (4) 1 мкМ (10 мин); (5) 0,1 мкМ (1 мин); (6) 0,1 мкМ (5 мин); (7) 0,1 мкМ (10 мин). температура 37°C.

Однако в отличие от экспериментов в системе ксантин-ксантинооксидаза, в опытах с митохондриями последующего возраста сигнала не происходило даже при концентрации 1 мкМ препарата ДНКЖ с глутатионом после 10 минут с начала эксперимента. Таким образом, можно предположить существование связанного с митохондриями механизма, стимулирующего процесс образования ДНКЖ в митохондриях. Это может быть связано с тем, что митохондрии являются источником железа и NO для формирования ДНКЖ (см. раздел 3.2). Ранее было установлено [11], что в присутствии митохондрий выход ДНКЖ, образующихся под действием NO^- , существенно возрастает. Возможно, что NO^- вызывает высвобождение ионов железа, но в отличие от $O_2^{\bullet-}$, образует с ним и

тиоловыми лигандами ДНКЖ, которые обладают антиоксидантными свойствами.

Тем не менее, при концентрации 0,1 мкМ ДНКЖ с глутатионом с самого начала эксперимента наблюдался рост сигнала TIRON, и через 10 минут сигнал достигал постоянного значения. Однако это значение было меньше, чем сигнал при отсутствии препарата (Рис. 35).

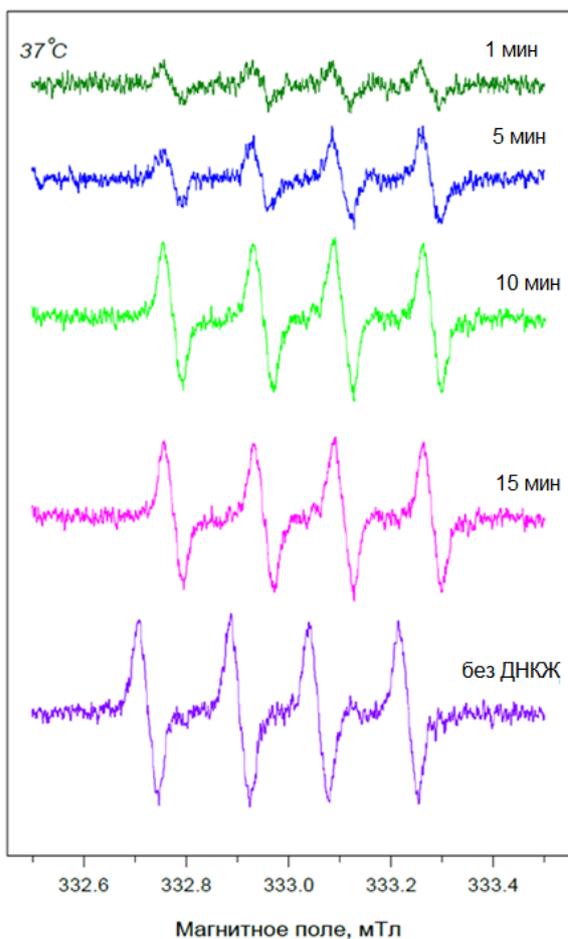


Рис. 35. Спектры ЭПР TIRON в суспензии митохондрий сердца крыс линии Wistar (антимидин А + сукцинат) при разном времени регистрации в присутствии 0,1 мкМ препарата ДНКЖ с глутатионом, температура 37°.

На Рис. 36 показана зависимость величины сигнала ЭПР TIRON от содержания в инкубационной смеси ДНКЖ с глутатионовыми лигандами. Из этого рисунка видно, что при нормоксии (~21% O₂) скорость образования свободных радикалов спиновой ловушки TIRON существенным образом зависит от концентрации ДНКЖ в суспензии митохондрий. В концентрации 1-100 мкМ препарат не влиял на скорость поглощения кислорода митохондриями при добавлении сукцината как субстрата окисления (не показано).

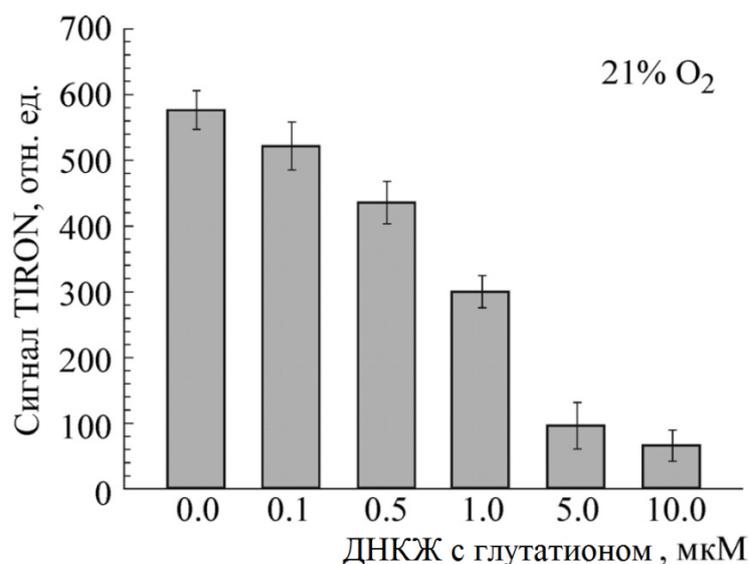


Рис. 36. Зависимость интенсивности сигнала ЭПР *TIRON* в суспензии митохондрий сердца крысы от концентрации ДНКЖ с глутатионом в среде инкубации. Содержание кислорода в газовом потоке 21%, температура ~25°C. Кол-во экспериментов $n=5$. Условия инкубации и статистической обработки полученных данных представлены в главе «Материалы и методы исследования» (раздел 2.8).

При добавлении ДНКЖ в концентрации ≥ 1 мМ наблюдалось практически полное исчезновение сигнала ЭПР *TIRON* (не показано). Необходимо отметить, что для спиновой ловушки *TIRON* характерна высокая константа скорости взаимодействия с супероксидными радикалами [160,161]. Следовательно, глутатионовые ДНКЖ должны иметь сравнимую константу скорости взаимодействия с супероксидом, чем *TIRON*. Контрольный эксперимент с *GSH* без ДНКЖ дал результат на порядок меньше.

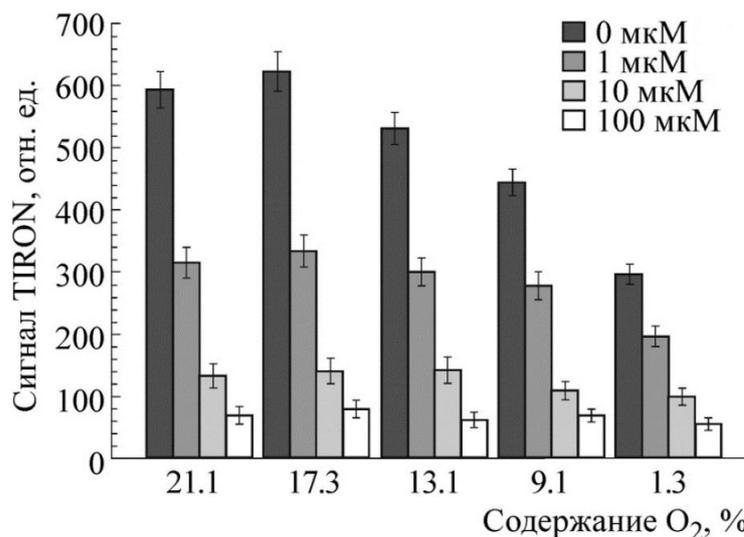


Рис. 37. Зависимость интенсивности сигнала ЭПР TIRON в суспензии митохондрий сердца крысы от содержания кислорода в газовом потоке и концентрации ДНКЖ с глутатионом в среде инкубации. Кол-во экспериментов $n=5$. Условия инкубации и статистической обработки полученных данных представлены в главе «Материалы и методы исследования» (раздел 2.8).

На Рис. 37 представлена зависимость интенсивности сигнала ЭПР TIRON в суспензии митохондрий сердца крысы от содержания кислорода в газовом потоке и концентрации ДНКЖ с глутатионом в среде инкубации. Как видно из этого рисунка, ДНКЖ с глутатионом эффективно взаимодействуют с супероксидными радикалами при разных значениях парциального давления кислорода, включая условия глубокой гипоксии. При концентрациях ДНКЖ с глутатионом 0,1–1 мкМ в течение более длительной инкубации (20–30 мин) происходило постепенное увеличение сигнала ЭПР семихинона TIRON. Эти данные согласуются с результатами наших предыдущих исследований изучения антиоксидантного действия ДНКЖ с различными лигандами в модельных системах [32,33,163,183,184].

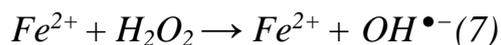
Нами обнаружено [11], что после максимального ингибирующего действия ДНКЖ с глутатионом в системе с митохондриями величина сигнала ЭПР TIRON растет более медленно, чем в модельной супероксид-генерирующей системе ксантин-ксантинооксидаза. Можно предположить, что ДНКЖ в присутствии

митохондрий либо не разрушаются полностью, либо происходит их частичная регенерация.

3.4. ДНКЖ: возможные механизмы образования и антирадикальной активности в митохондриях сердца.

Образование АФК и АФА в митохондриях находилось в центре внимания в течение длительного периода времени. Однако очень важными неферментативными источниками АФК и свободных радикалов липидов являются реакции Фентона и Хабера-Вейсса, катализируемые Fe^{2+} . Особый интерес исследователей к этим реакциям определяется решающей ролью последних в патогенезе многих тяжелых патологий, включая ССЗ [31,185–187]. Ишемия миокарда и реперфузия, как правило, связаны с ацидозом и, как следствие, повышенным образованием $O_2^{\bullet-}$, выделением трехвалентного или двухвалентного железа из металлопротеинов [185]. Лабильный пул железа при этом пополняется за счет взаимодействия $O_2^{\bullet-}$ и H_2O_2 с ферритином [187–189], Fe-S кластерами аконитазы и другими железо-серными белками [186,188]. Кроме того, благодаря своей способности контролировать гомеостаз лабильного пула железа, ферритин может играть роль прооксиданта или антиоксиданта [30,183,185–189]. Роль АФК и низкомолекулярного железа в образовании ДНКЖ в мышечных макрофагах RAW 264.7 была также показана в [190].

Можно предположить, что антиоксидантная активность тиолсодержащего ДНКЖ определяется способностью связывать «свободное» железо и, как следствие, ингибировать реакцию Фентона [191,192]:



Тот же механизм может объяснить цитопротекторную и антиоксидантную активность нитрита, который может быть восстановлен до NO и продуцировать ДНКЖ, тем самым предотвращая окислительную модификацию внутренних мембран митохондрий и выход цитохрома c в цитоплазму [193]. Ранее было

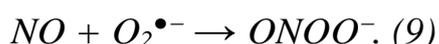
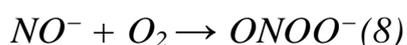
показано, что ДНКЖ, образующиеся в результате инкубации GSNO, GSH и ферритина, эффективно ингибируют перекисное окисление липидов в митохондриальных мембранах [33]. Кроме того, тиолсодержащие ДНКЖ способны напрямую перехватывать O_2 и другие промежуточные продукты свободнорадикального окисления [32,33,163,183,184].

Наши исследования показали, что ДНКЖ может эффективно конкурировать за $O_2^{\bullet-}$ с спиновой ловушкой TIRON, характеризующейся высоким значением константы скорости взаимодействия с $O_2^{\bullet-}$. Соответственно, константа скорости взаимодействия ДНКЖ с $O_2^{\bullet-}$ может быть сопоставимой таковой для TIRON ($10^7 M^{-1} c^{-1}$) [165]. Поскольку константа скорости реакции GSH с $O_2^{\bullet-}$ составляет приблизительно $10^2-10^3 M^{-1} c^{-1}$ [194,195], захват супероксида глутатионовыми лигандами ДНКЖ вряд ли вносит существенный вклад в антирадикальное действие этих комплексов.

В наших исследованиях увеличение генерации АФК в митохондриях после перехода от анаэробных к аэробным условиям сопровождается распадом ДНКЖ. В отсутствие антимицина А роль донора $O_2^{\bullet-}$ играл митохондриальный комплекс I [196]. Тем не менее, антимицин А индуцировал усиленную генерацию $O_2^{\bullet-}$ митохондриальным комплексом III, запуская синтез ДНКЖ. В этих условиях SOD, добавленный к митохондриальным суспензиям, не мог защитить ДНКЖ от вредного воздействия $O_2^{\bullet-}$, высвобождаемого в матрикс, но мог эффективно ингибировать образование NO при разрушении S-нитрозотиолов. Такой специфический эффект SOD является дополнительным аргументом в пользу гипотезы о том, что ДНКЖ действительно синтезируются в митохондриях. Ключом к пониманию механизма образования ДНКЖ является вовлечение свободного NO и OONO⁻ в высвобождение ионов Fe^{2+} из кластеров ферритина и Fe-S одновременно с АФК [31,68,185]. Yang и соавт. показали, что в клетках E.coli ДНКЖ, связанные с аконитазой, под действием L-цистеина превращаются в низкомолекулярные цистеиновые ДНКЖ, причем последний быстро

разрушается при окислении молекулярным кислородом O_2 [197]. Интересно, что действие NO на митохондриальный комплекс III имеет сходный характер с влиянием антимицина A [69]. Установлено, что скорость генерации $O_2^{\bullet-}$ и H_2O_2 субмитохондриальными частицами резко возрастает в присутствии $GSNO$.

В наших исследованиях CoQ_1 вызывал эффективное окисление NO^-/HNO до оксида азота (реакция 6). По мнению других авторов [64], некоторые хиноны, например, бензохинон, могут окислять NO^- до NO . Вместе с тем, возможна и обратная реакция: было высказано предположение, что реакция убихинола $CoQ-H_2$ с NO дает нитроксил NO^- [63,69]. Из вышесказанного можно сделать вывод, что в условиях гипоксии образование NO^-/HNO является специфическим ответом митохондрий на возрастающие концентрации восстановленного CoQ . Оксигенация митохондрий сопровождается увеличением концентрации окисленного CoQ , что способствует преобразованию NO^-/HNO в NO . В то же время постгипоксическая реоксигенация тканей сердца, например, в ходе миокардиальной ишемии/реперфузии, должна сопровождаться усилением генерации $OONO^-$ [15,185,198]:



Известно, что при взаимодействии свободного NO с $O_2^{\bullet-}$ образуется $ONOO^-$, который является сильным окислителем. Прооксидантное действие $ONOO^-$ обусловлено образованием при его декомпозиции гидроксильного радикала и радикала диоксида азота [163].



Существуют доказательства того, что взаимодействие NO^-/HNO с O_2 дает широкий спектр АФА, кроме $OONO^-$, хотя все они оказывают сходные эффекты [32,62]. Связываясь с ДНКЖ, NO предотвращает образование $OONO^-$ по реакциям 8 и 9 и, таким образом, защищает митохондрии от необратимых изменений, вызванных $OONO^-$. Не исключено, что O_2 способен реагировать с

одним из *NO*-лигандов *ДНКЖ*, в результате чего образуется комплекс, содержащий присоединенный *OONO*. Образование таких интермедиатов было предсказано в работах [2,33,163], и экспериментально подтверждено при исследовании взаимодействия нефизиологических форм *ДНКЖ* с O_2 [182]. Формирование комплексов, содержащих связанный с металлом пероксинитрит, обнаружено в случае взаимодействия нитрозильных комплексов меди с H_2O_2 [199]. В результате внутримолекулярной перегруппировки упомянутые выше промежуточные комплексы распадаются без образования свободнорадикальных продуктов. Известно, что $OONO^-$, связанный с гемовым железом, изомеризуется в нитрат [174]. Мы полагаем, что гипотетический промежуточный продукт реакции $O_2^{\bullet-}$ с тиолсодержащим *ДНКЖ* также распадается без образования свободных радикалов. Данный механизм может объяснить разрушение *ДНКЖ* в аэробных условиях [197], включая взаимодействие этих комплексов с O_2 . Таким образом, можно предположить, что этот молекулярно-биофизический механизм ответственен за наблюдаемый антирадикальный эффект глутатионовых *ДНКЖ*. Следует отметить, что в отличие от работы [182], в наших экспериментах входящий в состав промежуточного комплекса пероксинитрит может взаимодействовать с глутатионовыми лигандами.

В то же время *ДНКЖ* может напрямую реагировать с $OONO^-$ [32,33]. Также вероятно, что *ДНКЖ* способен ослаблять индуцируемую *NO* усиленную генерацию *АФК* в митохондриях [66], что является дополнительной поддержкой гипотезы о решающей роли *ДНКЖ* как триггеров или регуляторов свободнорадикальных процессов.

3.5. Влияние «водорастворимой формы убихинола-10» на генерацию супероксидных радикалов в комплексе III дыхательной цепи. Свободнорадикальные интермедиаты (семихиноны) митохондриально-направленных антиоксидантов.

Данные о влиянии «водорастворимой формы убихинола-10» на параметры функционального состояния митохондрий сердца крысы представлены в *Таблице 3.*

Группы	Скорость поглощения кислорода, нмоль/мин мг белка		Дыхательный контроль
	Состояние 4	Состояние 3	
Контроль, интактные митохондрии, n=5	16,2 ± 2,2	40,6 ± 4,4	2,52 ± 0,27
Митохондрии с $CoQ_{10}-H_2$ 0,05 мкг/мг белка, n=3	15,7 ± 0,3	39,5 ± 2,0	2,52 ± 0,12
Митохондрии с $CoQ_{10}-H_2$ 0,1 мкг/мг белка, n=3	15,9 ± 0,3	37,0 ± 2,1	2,32 ± 0,13
Митохондрии с $CoQ_{10}-H_2$ 1 мкг/мг белка, n=3	16,2 ± 0,2	35,8 ± 3,3	2,21 ± 0,19
Митохондрии с $CoQ_{10}-H_2$ 10 мкг/мг белка n=3	20,1 ± 1,5 *	32,0 ± 1,9 *	1,60 ± 0,21 *

Таблица 3. Скорость поглощения кислорода и дыхательный контроль митохондрий после 30 мин инкубации с препаратом $CoQ_{10}-H_2$ в концентрации 0,05, 0,1, 1 и 10 мкг/мг белка. Условия инкубации и статистической обработки полученных данных представлены в главе «Материалы и методы исследования» (раздел 2.8).

Полученные данные показывают, что предварительная инкубация митохондрий с препаратом $CoQ_{10}-H_2$ в концентрации 0,05-1 мкг действующего вещества/мг белка не приводила к значимому снижению эффективности окислительного фосфорилирования. Однако, при увеличении концентрации препарата происходило достоверное снижение дыхательного контроля: инкубация митохондрий с 10 мкг/мг $CoQ_{10}-H_2$ вызывала уменьшение дыхательного контроля на 34%. При этом под действием исследуемого препарата наблюдалось снижение скорости поглощения кислорода в

присутствии *ADP* (состояние 3) на 20% и увеличение скорости поглощения кислорода в состоянии 4 (без *ADP*) на 32%.

Как известно, в щелочной среде в присутствии O_2 имеет место автоокисление убихинолов. При этом образуются свободнорадикальные интермедиаты – семихиноны $CoQ_{10}^{\bullet-}$, которые характеризуются многокомпонентными спектрами ЭПР с хорошо разрешенной СТС (Рис. 38). Нами была сделана попытка получить в тех же экспериментальных условиях (щелочная среда инкубации, присутствие O_2) спектр ЭПР свободных радикалов $CoQ_{10}-H_2$ – действующего вещества препарата «водорастворимая форма убихинола-10». Нам не удалось регистрировать спектр ЭПР $CoQ_{10}^{\bullet-}$ однако, при $pH \geq 8,5$ появился дублетный спектр ЭПР (Рис. 39), по своим параметрам характерный для свободных радикалов аскорбиновой кислоты. Действительно, в разделе «**Материалы и методы исследования**» было указано, что аскорбиновая кислота входит в состав исследуемого препарата.

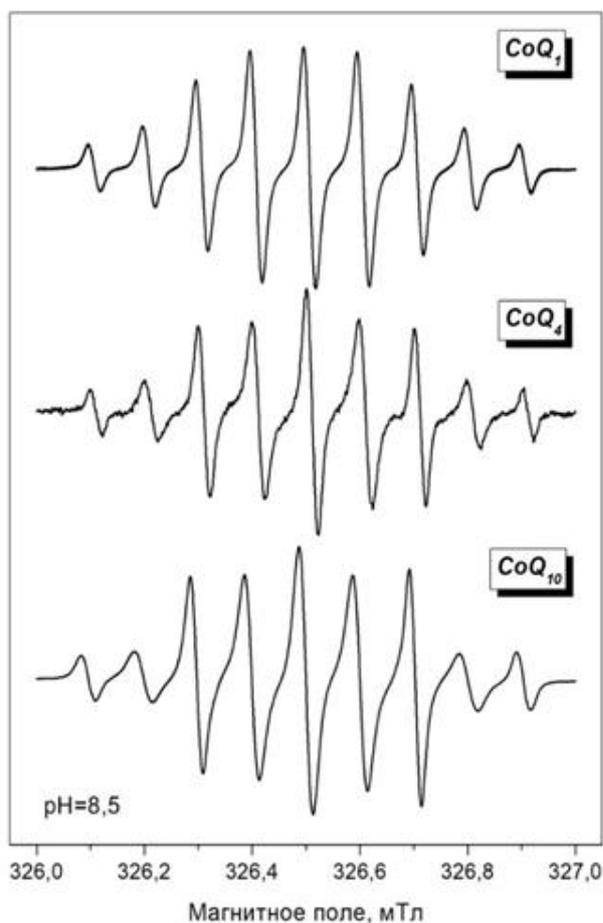


Рис. 38. Спектры ЭПР свободных радикалов коэнзимов *Q* с разной длиной изопреновой цепи ($CoQ_1^{\bullet-}$, $CoQ_4^{\bullet-}$ и $CoQ_{10}^{\bullet-}$) в изопропанол. Параметры спектров: $g = 2,0057$; $a(3H) = 0,19$ мТл; $a(2H) = 0,099$ мТл. Образцы находились ($pH \geq 8,5$) в газопроницаемых PTFE Sub-Lite-Wall капиллярах фирмы Zeus Industrial Products, Inc. (США). Содержание кислорода в газовом потоке 21%, температура $\sim 25^\circ C$.

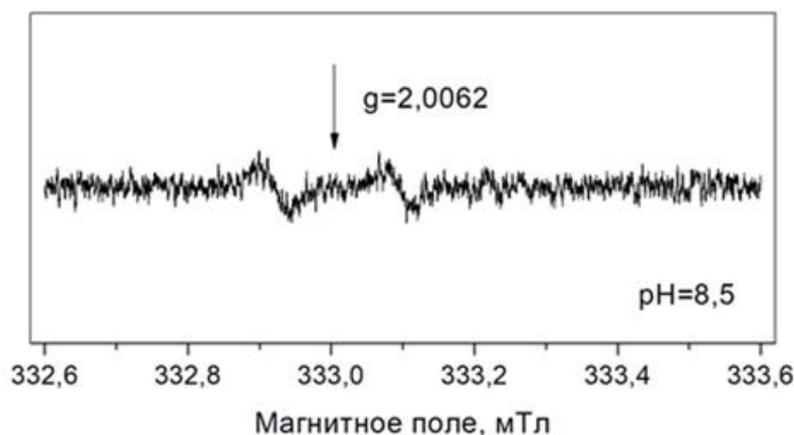


Рис. 39. Спектр ЭПР при добавлении препарата $CoQ_{10}-H_2$ в среду инкубации митохондрий. Параметры дублетного сигнала: $g = 2,0062$; $a = 0,179$ мТл. Образец находился ($pH \geq 8,5$) в газопроницаемом PTFE Sub-Lite-Wall капилляре фирмы Zeus Industrial Products, Inc. (США). Содержание кислорода в газовом потоке 21%, температура 25°C.

Регистрация супероксидных анион-радикалов в наших экспериментах было основано на реакции *TIRON* с $O_2^{\bullet-}$, в результате которой образуются относительно стабильные *o*-семихиноны *TIRON* [200]. Как известно, появление этих свободных радикалов является индикатором процесса генерации $O_2^{\bullet-}$ из-за большей скорости окисления *TIRON* (как катехола) супероксидом по сравнению со скоростью образования самих $O_2^{\bullet-}$.

Также были проведены эксперименты с изолированными митохондриями, образующими $O_2^{\bullet-}$ в *bc*₁-сегменте дыхательной цепи [139,176]. Реакционная смесь (см. раздел «**Материалы и методы исследования**») содержала, кроме митохондрий, препарат «водорастворимая форма убихинола-10» в варьруемой концентрации действующего компонента от 0,05 до 1 мМ. На Рис. 40А представлены спектры ЭПР *TIRON* без $CoQ_{10}-H_2$ в реакционной смеси (контроль) и в присутствии 1 мМ $CoQ_{10}-H_2$. Из этого рисунка видно, что при добавлении $CoQ_{10}-H_2$ в такой концентрации наблюдалось практически полное исчезновение сигнала ЭПР *TIRON*, который не появлялся по крайней мере в течение 30 мин инкубации. Однако, при этом даже в условиях отсутствия автоокисления (в

случае *Рис. 40А* $pH=7.4$, в отличие *Рис. 39*, где $pH \geq 8,5$) регистрировался небольшой дублетный сигнал ЭПР аскорбиновой кислоты. Для *TIRON* как перехватчика радикалов характерна весьма высокая константа скорости взаимодействия с $O_2^{\bullet-}$ [165]. Следовательно, $CoQ_{10}-H_2$ в составе препарата «водорастворимая форма убихинола-10» должен иметь сравнимую или даже более высокую константу скорости взаимодействия с $O_2^{\bullet-}$, чем *TIRON*.

На *Рис. 40Б* представлены спектры ЭПР *TIRON* в присутствии $0,2 \text{ мМ } CoQ_{10}-H_2$, запись которых началась после разных времен инкубации. Из этого рисунка видно, что регистрируемый спектр ЭПР свободных радикалов *TIRON* появляется только после 14 минутной инкубации и достигает максимальной величины (сравнимой с контрольным образцом) после 28 мин.

Подобная задержка появления регистрируемого спектра ЭПР наблюдалась для всей серии соответствующих опытов. Сигнал ЭПР *TIRON* появлялся с некоторой задержкой, четко зависящей от количества препарата $CoQ_{10}-H_2$, введенного в среду инкубации. Необходимо отметить, что во всех образцах, содержащих $CoQ_{10}-H_2$ в концентрации $\geq 0,02 \text{ мМ}$, в начале инкубации регистрировался небольшой дублетный сигнал ЭПР, характерный для аскорбиновой кислоты.

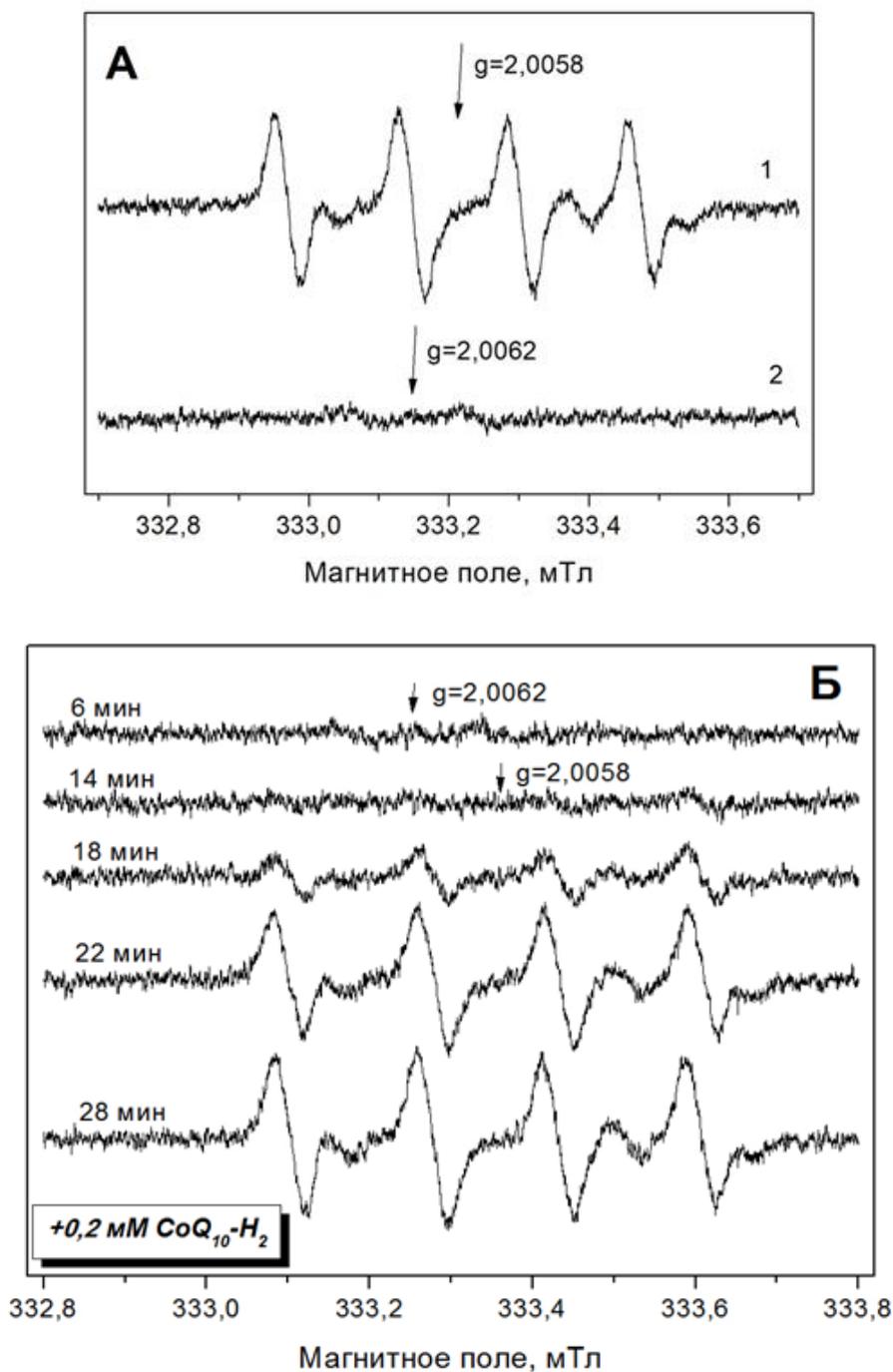


Рис. 40. Спектры ЭПР TIRON в суспензии митохондрий: (А) без $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$ (1), в присутствии 1 мМ $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$ (2). Время инкубации до начала регистрации спектров 10 мин; (Б) в присутствии 0,2 мМ $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$. Времена инкубации до начала регистрации спектров указаны на рисунке. Образцы находились в газопроницаемых PTFE Sub-Lite-Wall капиллярах фирмы Zeus Industrial Products, Inc. (США). Содержание кислорода в газовом потоке 21%, температура $\sim 25^\circ\text{C}$.

На основе полученных данных была построена зависимость времени задержки появления спектра ЭПР *TIRON* от концентрации «водорастворимой формы убихинола-10» ($CoQ_{10}-H_2$) в инкубационной смеси. Соответствующая зависимость представлена на *Рис. 41*.

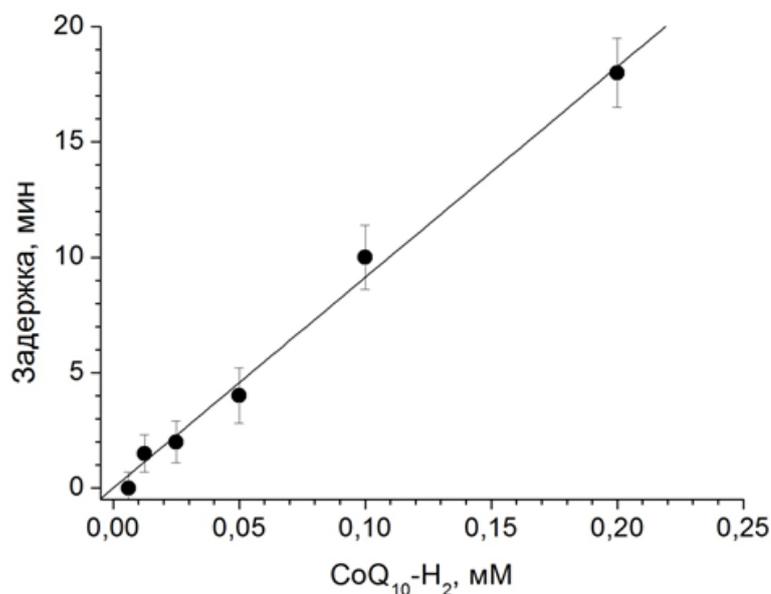
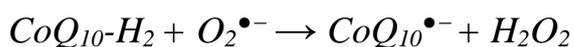


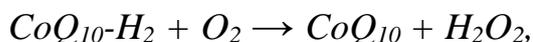
Рис. 41. Зависимость времени задержки появления спектра ЭПР свободных радикалов *TIRON* от концентрации $CoQ_{10}-H_2$ в инкубационной смеси. Количество экспериментов $n=5$. Условия инкубации и статистическая обработка полученных данных представлены в разделе «Материалы и методы исследования».

Полученные нами результаты по подавлению сигнала ЭПР семихинонов $TIRON^{\bullet-}$ показывают, что в условиях опытов с изолированными митохондриями сердца «водорастворимая форма убихинола-10» является эффективным антиоксидантом, успешно конкурирующим с перехватчиком супероксидных радикалов *TIRON*. При этом необходимо отметить, что действующее вещество препарата $CoQ_{10}-H_2$ надежно защищено от автоокисления, характерного для восстановленных форм различных хиноидных соединений в присутствии кислорода в щелочной среде.

Ранее была предложена следующая схема реакций взаимодействия разных форм CoQ_{10} и O_2 [201]:



Исходя из суммарной наблюдаемой реакции:



супероксидный радикал $\text{O}_2^{\bullet-}$ не образуется. Таким образом, полученные результаты находятся в соответствии предложенной схемой.

Далее нами были исследованы характеристики спектров ЭПР свободнорадикальных (семихинонных) форм митохондриально-направленных антиоксидантов *mitoQ*, *decylQ*, *SkQ₁*, *SkQ₃* и *SkQT*, а также ряда форм коэнзима *Q*: *CoQ₁*, *CoQ₄* и *CoQ₁₀*. Семихиноны образовывались в процессе автоокисления соответствующих хинолов в слабощелочной среде при $\text{pH} \sim 7,8-8,5$ в изопропанол, после чего регистрировались их спектры ЭПР. Полученные экспериментальные спектры ЭПР исследуемых соединений были симулированы и представлены на *Рис. 42*.

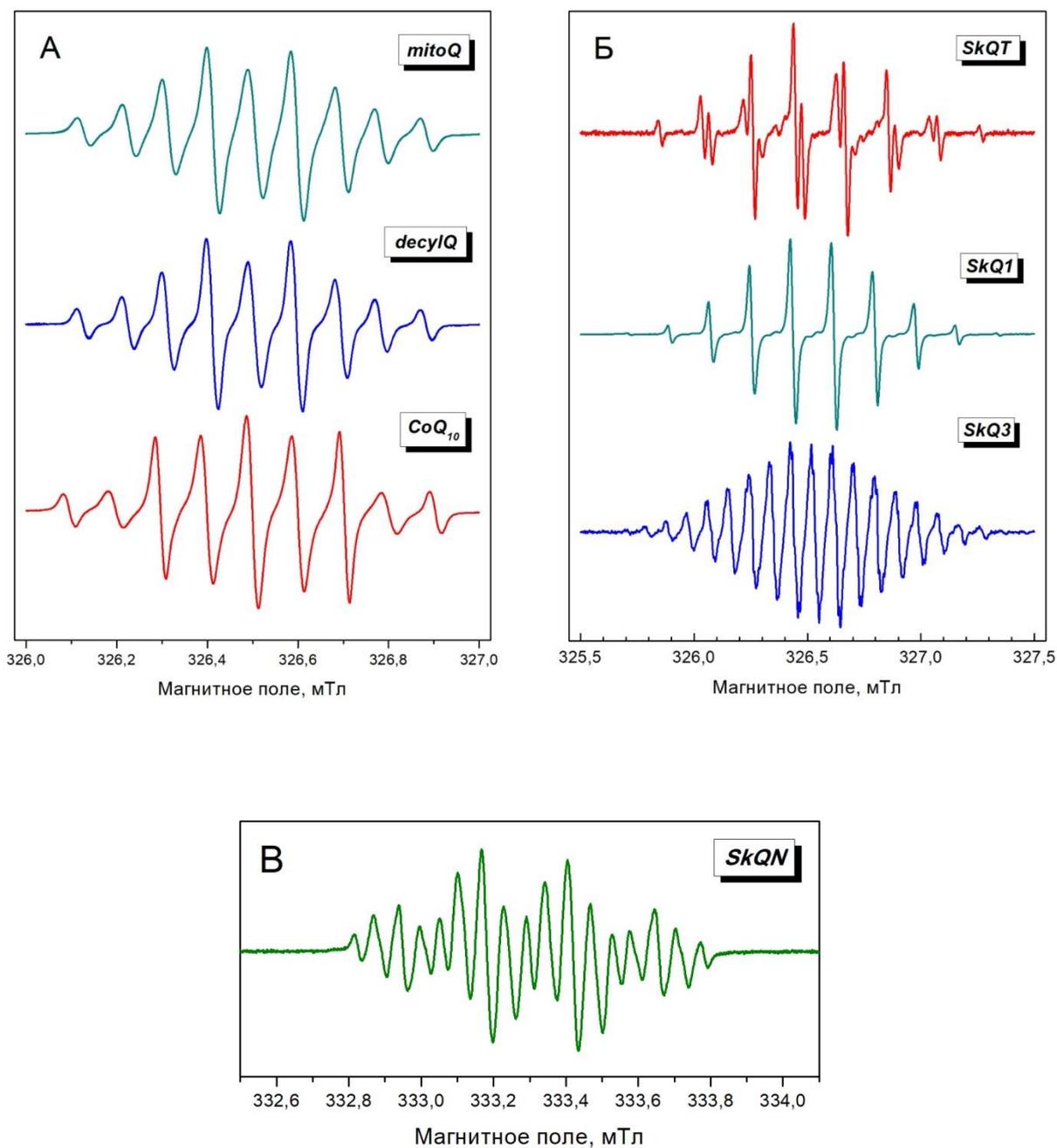


Рис. 42. Спектры ЭПР CoQ , митохондриально-направленных антиоксидантов $mitoQ$, $decylQ$ и SkQ .

Структурные формулы исследуемых веществ представлены на Рис. 43.

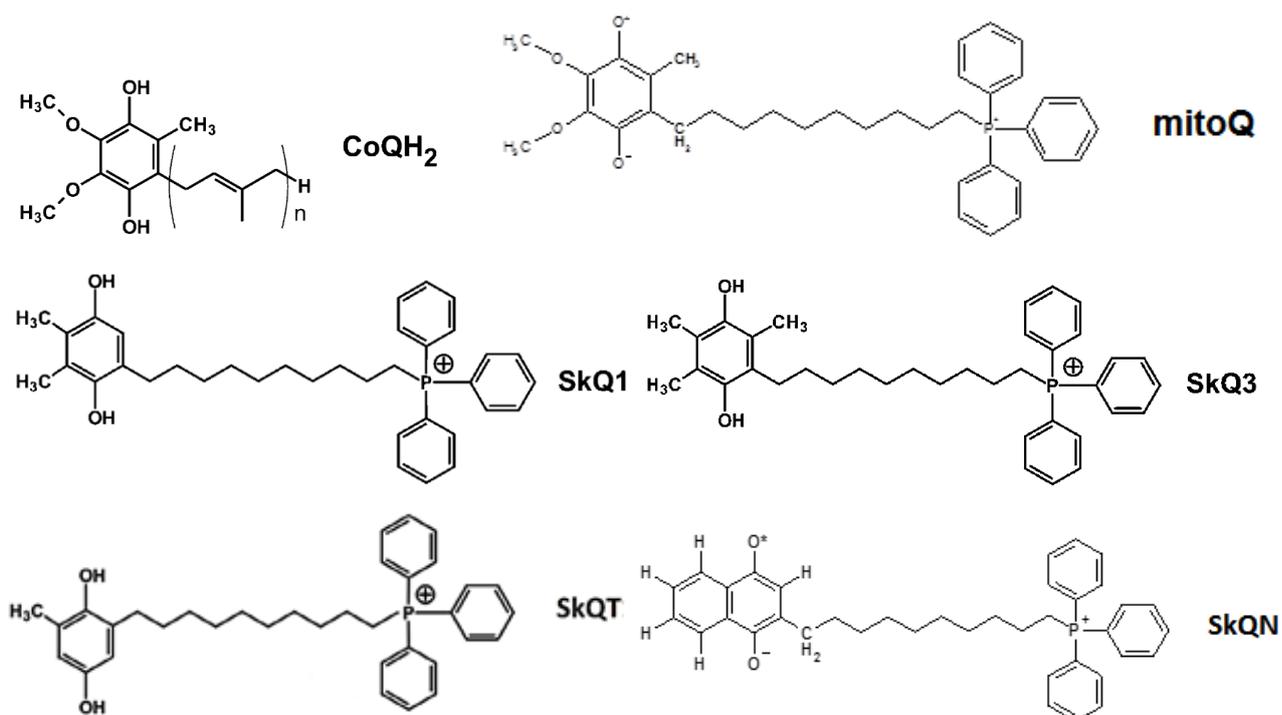


Рис. 43. Структура молекул CoQ_N , SkQ_1 , SkQ_3 , $SkQT_1$, $SkQN$

В спектрах ЭПР CoQ_1 , CoQ_4 , CoQ_{10} , $mitoQ$ и $decylQ$ (Рис. 38 и 42А) присутствует 9 компонент сверхтонкой структуры (СТС): неспаренный электрон взаимодействует с тремя протонами $-CH_3$ группы в положении 5 и двумя протонами $-CH_2$ группы в положении 6 кольца хинона. Протоны метильной группы в положении 5 вызывают расщепление почти в 2 раза больше, чем протоны метиленовой группы в положении 6: $a(3H) \approx 0,19$ мТл, $a(2H) \approx 0,099$ мТл. Значит, плотность неспаренного электрона у атомов углерода в положении 5 и 6 также различается в 2 раза, а длина изопренового остатка и наличие углеводородной цепи и трифенилфосфония не влияют на распределение электронной плотности.

У молекулы SkQ_1 в отличие от CoQ и $mitoQ$ в углеродном кольце в положении 2, 3 находятся метельные группы. Спектры ЭПР SkQ_1 на Рис. 42Б обусловлены взаимодействием неспаренного электрона с 9 почти магнитно-эквивалентными протонами (метельных групп в положении 2 и 3, метиленовой группы в положении 6 и протона в положении 5) хиноидного кольца. Спектры ЭПР этих семихинонов содержат 10 компонент, $a(9H) \approx 0,18$ мТл. В SkQ_1

электронная плотность равномерно распределена между атомами углерода всего кольца.

Спектр ЭПР анион-радикала SkQ_3 (в отличие от SkQ_1 в хиноидном кольце протон в положении 5 заменен на CH_3 группу) оказался сложнее, чем у радикала SkQ_1 , поскольку неспаренный электрон распределен неоднородно по атомам C1-C6 кольца. Протоны $-CH_3$ групп в положениях 2, 3 и 5 дают расщепление в 2 раза большее, чем протоны метиленовой группы в положении углерода 6. Спектр ЭПР SkQ_3 состоит из 21 линии, 4 из которых обладают малой интенсивности), $a(9H) \approx 0,18$ мТл, $a(2H) \approx 0,09$ мТл.

На *Рис. 42Б* также представлен спектр ЭПР свободных радикалов $SkQT$ – производного пластохинона, похожего на SkQ_1 . В случае $SkQT_1$ протоны $-CH_3$ группы в положении 2, $-CH_2$ группы при C6 и протоны в положениях 3, 5 кольца вызывают разное расщепление в спектре, что говорит о неравномерном взаимодействии неспаренного электрона с $-H$ группами углеродного кольца. $a(3H) \approx 2,1$ мТл, $a(2H) \approx 2,0$ мТл, $a(2H) \approx 1,8$ мТл.

На *Рис. 42В* приведен спектр ЭПР свободных радикалов $SkQN$ – митохондриально-направленного антиоксиданта, отличающийся по строению от предшественников наличием второго бензольного кольца. Симуляция спектра дала следующие значения констант СТС: $a(4H) \approx 0,06$ мТл, $a(2H) \approx 0,231$ мТл и $a(1H) \approx 0,239$ мТл.

Таким образом, изученные нами характеристики анион-радикалов коэнзимов CoQ и эффективно взаимодействующих с митохондриями производных убихинона и пластохинона четко показывают, что распределение неспаренного электрона по углеродным атомам хиноидного кольца определяется их боковыми группами.

3.6. Влияние фенольных соединений растительного происхождения на дыхательную активность митохондрий.

В своей работе мы исследовали, используя полярографию и ЭПР-спектроскопию спиновых ловушек, влияние пяти отличающихся по строению и липофильности фенольных соединений на функциональные характеристики митохондрий сердца и взаимодействие с генерируемыми ими супероксидными радикалами. Структурные формулы изученных фенолов – двух флавонолов (кверцетина и рутина), фенилпропанола (кофейной кислоты), стильбена (ресвератрола) и о-метоксифенола (куркумина) – показаны на *Рис. 10*.

Чтобы определить, связано ли изменение интенсивности спектра ЭПР семихинонов *TIRON* с влиянием используемых нами фенольных соединений на генерацию $O_2^{\bullet-}$ в изолированных митохондриях, мы изучили влияние этих веществ на дыхательную активность и сопряжение электронного транспорта с синтезом *АТФ*. Особое внимание было уделено концентрационным зависимостям действия исследуемых фенольных антиоксидантов.

Полученные данные о зависимости параметров митохондриального дыхания от концентрации фенольных соединений в инкубационной среде приведены на *Рис. 44 и 45*. Результаты экспериментов показывают, что *Caf-OH*, *Rsv* и *Rut* при концентрациях до 1 *мМ* не влияли ни на скорость поглощения кислорода в состоянии 4, ни на сопряжение переноса электронов с синтезом *АТФ*. *Qu* не влиял на параметры митохондриального дыхания в состоянии 4 во всем диапазоне концентраций, который мы изучали, но добавление 1 *мМ* привело к снижению дыхательного контроля на 50%. При концентрациях до 100 *мкМ* *Cur* также не влиял на дыхание митохондрий в состоянии 4, но уменьшал его на 42% при 1 *мМ*. Концентрационная зависимость действия *Cur* на дыхательный контроль была нелинейной, максимальное снижение (на 38%) наблюдалось при 100 *мкМ* этого полифенола.

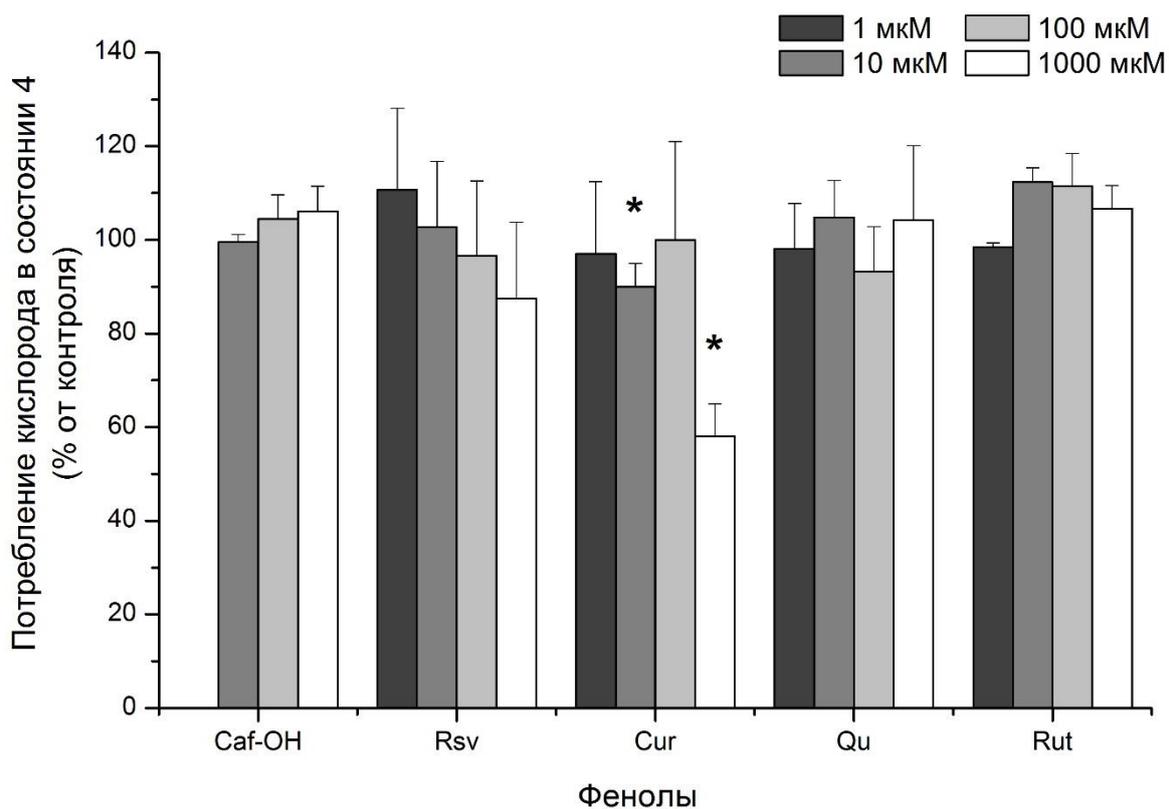


Рис. 44. Зависимость скорости потребления кислорода в состоянии 4 от концентрации фенольных соединений в суспензии митохондрий сердца крысы. Скорость потребления кислорода в состоянии 4 составляла $21,83 \pm 5,17$ нмоль/мин/мг белка. Количество экспериментов для одной точки $n=5$. Условия инкубации и статистической обработки полученных данных представлены в разделе «Материалы и методы исследования».

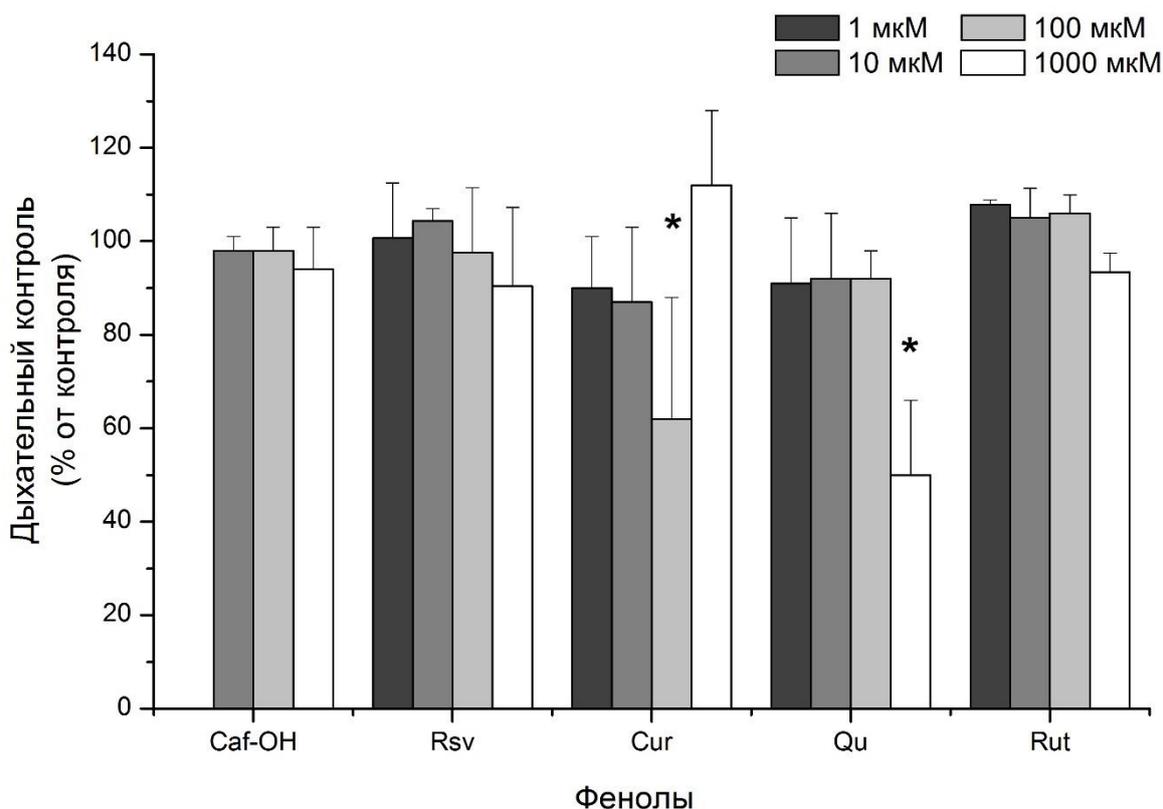


Рис. 45. Зависимость дыхательного контроля от концентрации фенольных соединений в суспензии митохондрий сердца крысы. Дыхательный контроль составил $3,05 \pm 0,24$. Количество экспериментов для одной точки $n=5$. Условия инкубации и статистической обработки полученных данных представлены в разделе «Материалы и методы исследования».

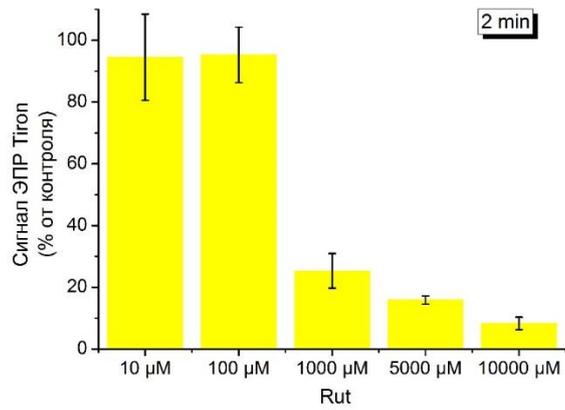
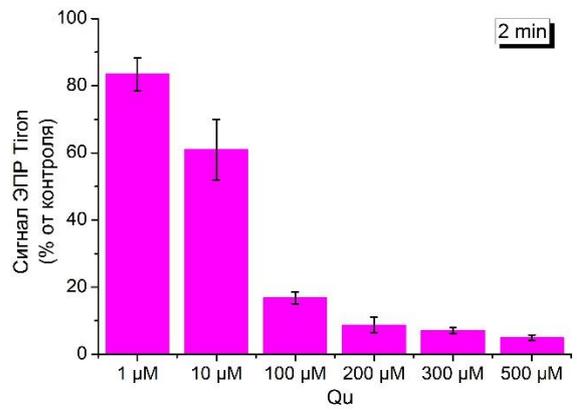
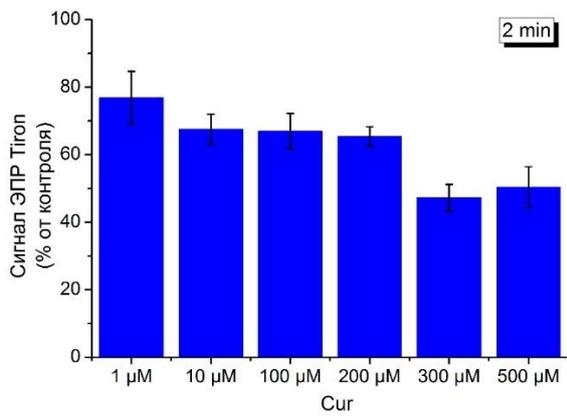
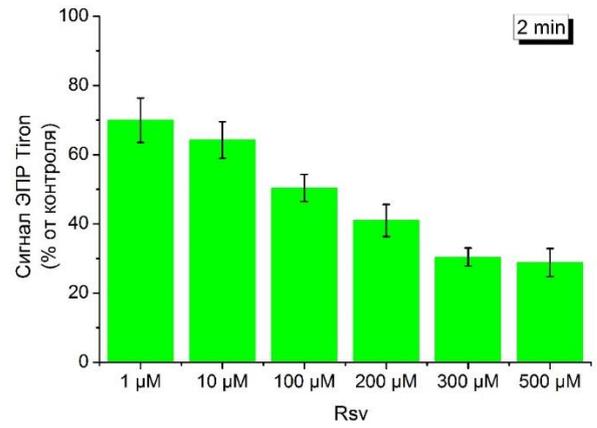
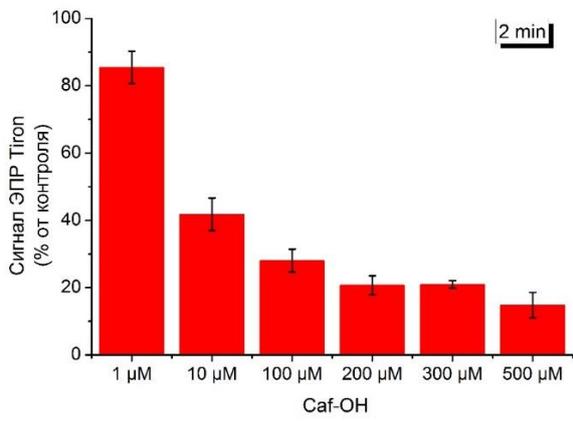
3.7. Закономерности генерации супероксидных радикалов комплексом III митохондрий сердца в присутствии различных фенольных соединений.

Способность перехватывать $O_2^{\bullet-}$ исследуемых фенольных соединений (кверцетин, рутин, кофейная кислота, куркумин и ресвератрол) исследовали методом ЭПР-спектроскопии с перехватчиком супероксида *TIRON* и ЭПР-оксиметрией на модели, в которой $O_2^{\bullet-}$ генерировался комплексом III

изолированных митохондрии сердца крысы в присутствии сукцината и антимицина *A*.

Мы показали, что при добавлении 1 *mM Qu*, *Caf-OH*, *Cur* или *Rsv*, а также 10 *mM Rut* к изолированным митохондриям сердца наблюдается почти полное исчезновение сигнала ЭПР *TIRON* (данные не представлены). В диапазоне концентраций 10 – 500 *мкМ Qu*, *Caf-OH*, *Cur* и *Rsv* и 1-10 *mM Rut* также перехватывали $O_2^{\bullet-}$ в зависимости от концентрации фенольных соединений. Экспериментальные данные, полученные через 2 *мин* и 10 *мин* инкубации реакционной смеси, показаны на *Рис. 46*. Из сравнения этих рисунков следует, что в случае малых концентраций фенолов во время инкубации происходит постепенное увеличение сигнала ЭПР *TIRON*, по-видимому, связанное с необратимым окислением этих соединений в результате взаимодействия с $O_2^{\bullet-}$. При концентрациях 100–500 *мкМ Caf-OH* и *Rsv* 200–500 *мкМ Cur* и 1–10 *mM Rut* активность перехвата супероксида остается неизменной в течение 10 *мин*. Ряд исследований установил [165], что для *TIRON* характерна высокая константа скорости взаимодействия с супероксидными анион-радикалами, от $10^7 M^{-1}c^{-1}$. Таким образом, для успешной конкуренции с *TIRON* фенолы также должны иметь высокую константу взаимодействия с $O_2^{\bullet-}$. Можно предположить, что способность удалять $O_2^{\bullet-}$ лежит в основе антиоксидантного эффекта изученных нами соединений.

(A)



(Б)

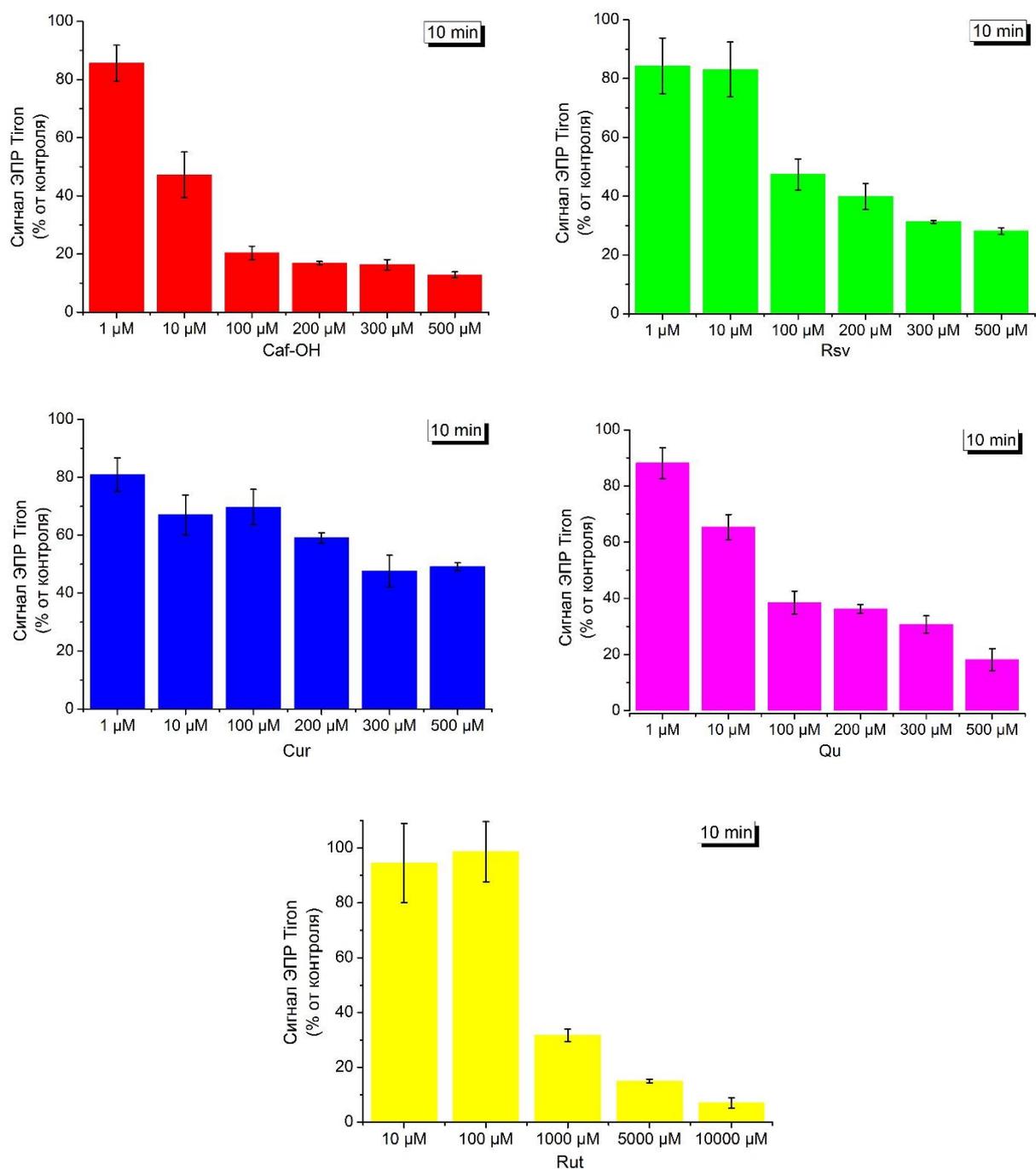


Рис. 46. Зависимость относительной интенсивности сигнала ЭПР TIRON от концентрации фенольных соединений в суспензии митохондрий сердца крысы. Спектры регистрировали через 2 мин (А), 10 мин (Б) инкубации в аэробных условиях. Количество экспериментов для одной точки $n=5$. Условия инкубации и статистической обработки полученных данных представлены в разделе «Материалы и методы исследования».

Возможность прямого взаимодействия семихинонов *TIRON* с фенольными соединениями была проверена в экспериментах по влиянию *Caf-OH* на сигнал ЭПР свободных радикалов *TIRON*, возникающий при автоокислении. Известно [159], что в щелочной среде автоокисление *TIRON* происходит с образованием семихинонов. В инкубационной среде, используемой при $pH=7,4$, сигналы ЭПР *TIRON* практически не регистрировались. Они появились только при $pH \geq 8,0$. В этом диапазоне $pH=8,0-8,5$ их интенсивность была значительно ниже, чем в условиях образования $O_2^{\bullet-}$ митохондриями при $pH = 7,4$. Мы обнаружили, что при $pH=8,0-8,5$ *Caf-OH* в концентрациях, использованных в этом исследовании, не оказала значительного влияния на кинетику образования семихинонов *TIRON*.

Далее была изучена зависимость антирадикального действия исследуемых фенолов от парциального давления кислорода в инкубационной смеси (Рис. 47). Видно, что 500 мкМ *Caf-OH* и 5 мМ *Rut* перехватывали 80–90% супероксидного радикала, тогда как 500 мкМ *Rsv* – 70-75%. Для этих веществ зависимость скорости перехватывания $O_2^{\bullet-}$ от парциального давления кислорода была слабо выражена. При нормальном парциальном давлении *Qu* в концентрации 500 мкМ перехватывал 93% $O_2^{\bullet-}$, тогда как *Cur* в той же концентрации – только около 60% супероксида. Таким образом *Cur* был менее эффективен, чем большинство исследуемых фенольных антиоксидантов. Вместе с тем, антирадикальная активность по отношению к $O_2^{\bullet-}$ как у *Cur*, так и у *Qu* снижалась с уменьшением парциального давления кислорода.

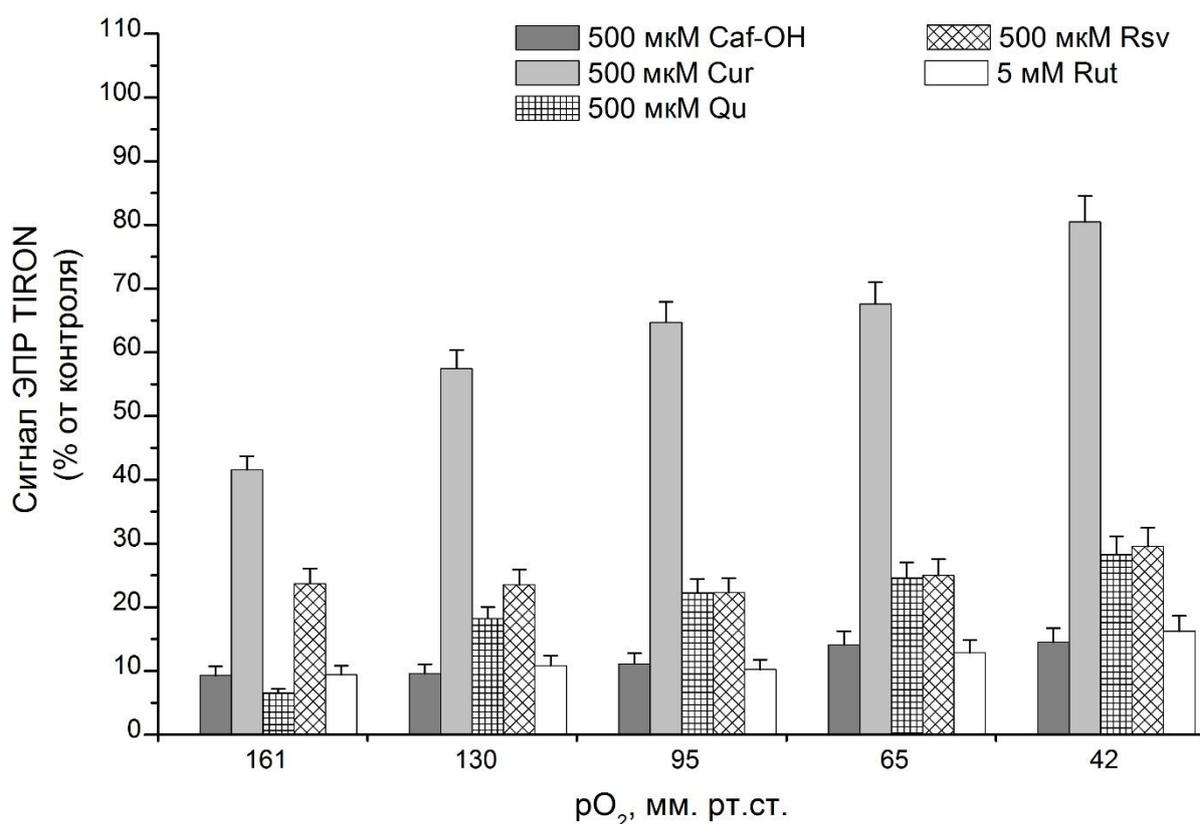


Рис. 47. Зависимость относительной интенсивности сигнала ЭПР TIRON в присутствии фенолов от парциального давления кислорода. Спектры регистрировали при 500 мкМ Caf-OH, Cur, Qu и Rsv и 5 мМ Rut в суспензии митохондрий сердца крысы. Относительные интенсивности сигнала ЭПР TIRON без фенолов: 100% (161 мм рт. ст.), 95,2% (130 мм рт. ст.), 85% (95 мм рт. ст.), 68,7% (65 мм рт. ст.) и 53,6% (42 мм рт. ст.). Количество экспериментов для одной точки n=5. Условия инкубации и статистической обработки полученных данных представлены в разделе «Материалы и методы исследования».

АФК, генерируемые в избытке митохондриями при нарушении баланса между про- и антиоксидантными процессами в клетке, могут реагировать с липидами, белками и нуклеиновыми кислотами, вызывая окислительный стресс. Повреждение этих макромолекул приводит к развитию хронических патологий,

связанных с возрастом, таких как ССЗ, диабет, хроническое воспаление, нейродегенеративные нарушения и рак [140].

На сегодняшний день известно более 8000 флавоноидов и других фенольных соединений растительного происхождения. Наибольший интерес представляет антиоксидантная активность таких соединений, которые способны как удалять высокоактивные свободные радикалы, так и уменьшать их образование [202].

Результаты настоящего исследования ясно демонстрируют, что во время инкубации фенольные соединения различной структуры и физико-химических свойств могут эффективно перехватывать супероксидные радикалы, образующиеся в комплексе *III* изолированных митохондрий сердца крысы в изученном диапазоне концентраций. Полученные данные свидетельствуют о том, что кверцетин и рутин (флавонолы), кофейная кислота (фенилпропанон), куркумин (*o*-метоксифенол) и ресвератрол (стильбен) обладают значительным потенциалом в качестве антиоксидантов для различных внутриклеточных систем.

Установлено, что основными механизмами антиоксидантного действия фенольных соединений являются: (1) перехват свободных радикалов с образованием неактивных феноксильных радикалов и (2) связывание ионов металлов переменной валентности, в частности ионов железа, т.е. снижение окислительно-восстановительной активности катионов металлов [203]. Антиоксидантная активность фенолов определяется их способностью отдавать атом водорода или электрон, что приводит к образованию стабильного феноксильного радикала, неспаренный электрон которого делокализован в ароматической структуре [146,204].

Кофейная кислота относится к классу гидроксикоричных кислот, представляет собой фенольную кислоту и производное катехина, выделенное из различных растений. Известно, что *Caf-OH* является ингибитором окислительной модификации ЛПНП. Недавно было высказано предположение,

что *Caf-OH* может регенерировать α -токоферол на поверхности ЛПНП [145–147]. Высокая антиоксидантная активность *Caf-OH* объясняется делокализацией неспаренных электронов в сопряженной боковой цепи (*Рис. 10*) [145,146]. *Caf-OH* предотвращает повреждение тонкой кишки при ишемии/реперфузии, а также успешно защищает митохондрии печени и мозга мыши от окислительного стресса [145].

Кверцетин является основным диетическим флавоноидом и может специфически накапливаться в митохондриях. Из-за большого количества гидроксильных групп и сопряженных π -орбиталей *Qu* может эффективно удалять $O_2^{\bullet-}$, образованный митохондриями. Исследования *in vivo* на крысах показали, что *Qu* может играть защитную роль в реперфузионном повреждении ишемии в клетках мозга и сердца, может снизить цитотоксическое действие АФК и уменьшить апоптоз, опосредованный митохондриями [137]. Эти данные согласуются с тем, что в нашей экспериментальной системе *Qu* наряду с *Caf-OH* был наиболее эффективными перехватчиками $O_2^{\bullet-}$ (*Рис. 46 и 47*).

Рутин - флавоноид (*Рис. 10*), который содержится во многих растениях и является кверцетиновым гликозидом. Сообщалось, что *Rut* имеет широкий спектр биологических эффектов, включая противовоспалительную, антиоксидантную, нейропротекторную, нефропротекторную и гепатозащитную активность. Было показано, что благодаря двум гидроксильным группам В-кольца, как и в случае с *Qu*, *Rut* отдает электроны свободным радикалам, превращая их в более стабильные интермедиаты и ингибируя дальнейшие реакции, индуцируемые свободными радикалами [205]. Тем не менее, в наших экспериментах *Rut* перехватывал $O_2^{\bullet-}$ в концентрациях, значительно превышающих *Qu*.

Ресвератрол – природный стильбен. Недавнее исследование с использованием импульсного радиолиза подтвердило, что только гидроксигруппа в пара-положении *Rsv* действует как мишень для свободных радикалов, тогда как гидроксильные группы в мета-положении участвуют

только во вторичной стабилизации феноксильного радикала [146,148]. Неспаренный электрон феноксильного радикала R_{sv} делокализован в двух ароматических кольцах, что приводит к его пониженной реакционной способности и, следовательно, к эффективному ингибированию цепных свободнорадикальных реакций, таких как перекисное окисление липидов. Кроме того, ингибирование процессов свободнорадикального окисления под действием R_{sv} отчасти может быть обусловлено его способностью хелатировать ионы металлов [143,206]. Согласно [138], R_{sv} эффективно удаляет $O_2^{\bullet-}$ только при концентрации 100 μM или выше, что согласуется с результатами наших исследований (Рис. 46). В то же время следует отметить, что при 2-минутной инкубации в нашей модельной системе R_{sv} в концентрациях 1–10 μM также частично удалял митохондриальный $O_2^{\bullet-}$ (Рис. 46), но дозозависимое влияние на сигнал ЭПР *TIRON* было слабее по сравнению с *Caf-OH*.

Способность куркумина перехватывать свободные радикалы, как и в случае других растительных фенолов, определяется главным образом гидроксильными группами его ароматических колец. В то же время *Cur* представляет собой β -дикетон, который характеризуется кето-енольной таутомерией, а его енольная форма имеет сопряженную с полиенами структуру, которая участвует в стабилизации феноксильных радикалов куркумина. Подобно *Qu*, *Cur* защищает кардиомиоциты от повреждений, вызванных окислительным стрессом, связанных с ишемией/реперфузией, а также поддерживает функционирование митохондрий в этих условиях. Анализ литературы показывает, что *Cur* обладает как антиоксидантными, так и прооксидантными свойствами [137,149,207]. Однако *Cur* относительно слабее, чем другие фенолы, удаляет $O_2^{\bullet-}$, реагируя с ним только при высоких концентрациях, что согласуется с нашими результатами (>200 μM). Интересно, что комплексы *Cur* с медью и марганцем способны удалять $O_2^{\bullet-}$ - путем имитации *SOD* [208].

Известно, что способность фенольных антиоксидантов перехватывать $O_2^{\bullet-}$ выше для более гидрофильных соединений с большим количеством гидроксильных групп. Липофильные полифенолы, такие как *Cur*, эффективно удаляют липидные свободные радикалы [209]. Это свойство *Cur*, по-видимому, осложняет его взаимодействие с $O_2^{\bullet-}$, который в нашем эксперименте преимущественно локализован в водной фазе. В свою очередь, наиболее гидрофильное из изученных нами соединений, *Caf-OH*, оказалось наиболее эффективным перехватчиком $O_2^{\bullet-}$, генерируемого митохондриями. Низкая антирадикальная активность *Rut*, которая является более гидрофильным, чем *Qu*, по-видимому, связана с гликозилированием гидроксигруппы в 3-положении С-кольца.

С другой стороны, антиоксидантная активность полифенолов растений, таких как *Caf-OH*, *Qu*, *Rsv* и *Cur*, также может осуществляться и через модулирование антиоксидантного ответа клеток – эффекта, который важен *in vivo* [137,210]. Известно, что из-за электрофильных свойств кофейная кислота и метаболиты флавоноидов могут реагировать с тиольными группами некоторых регуляторных белков [210]. В связи с этим нельзя исключать, что действие *Caf-OH* частично связано с модификацией митохондриальных белков. Действительно, обратимая модификация остатков цистеина белков дыхательной цепи приводит к снижению продукции АФК митохондриями [211]. Следует отметить, что в наших экспериментах с *Caf-OH*, *Rsv*, *Qu* и *Rut* не было прямой корреляции между антиоксидантной активностью изучаемых фенольных соединений и их влиянием на дыхание митохондрий (Рис. 44- 45).

Известно, что цитопротекторный эффект флавоноидов положительно коррелирует с их антирадикальной активностью в отношении $O_2^{\bullet-}$ [212]. Антиоксидантные свойства *Caf-OH* также связаны с его защитным эффектом *in vivo*, в том числе в условиях аноксии-реоксигенации [145]. Эти данные согласуются с тем, что основным механизмом снижения уровня $O_2^{\bullet-}$ в наших

экспериментах является антирадикальная активность протестированных фенольных соединений.

Понимание молекулярных и биофизических механизмов взаимодействия антиоксидантов и свободных радикалов откроет путь для создания более эффективных лекарственных препаратов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное нами исследование четко продемонстрировало возможности использования спектроскопии ЭПР как удобного и чувствительного метода изучения закономерностей образования активных форм кислорода в митохондриях клеток сердечной мышцы и модельных ферментативных системах, а также исследования антиоксидантных и прооксидантных свойств природных соединений различного химического строения, таких как динитрозильные комплексы железа и производные фенола. Исследование взаимосвязей между действием на клетки сердечной мышцы различных биохимических и физико-химических факторов и функциональными характеристиками митохондрий в норме и в условиях пониженного парциального давления кислорода является актуальной задачей биоэнергетики. Выяснение механизмов регуляторных процессов, которые могли бы в условиях гипоксии и аноксии предотвратить в клетках миокарда избыточное образование *АФК* и метаболитов оксида азота, имеет важное теоретическое и практическое значение. Появление регистрируемого спиновыми ловушками $O_2^{\bullet-}$ на границе внутренней мембраны митохондрий с межмембранным пространством возможно при разных значениях парциального давления кислорода. Полученные результаты и приведённые в литературе данные других авторов (см. работы [10,156] позволяют заключить, что митохондрии сердца характеризуются способностью образовывать *АФК* даже при малом содержании кислорода в среде вокруг митохондрий, т.е. в условиях, характерных для ишемии сердечной мышцы.

ДНКЖ с тиольными лигандами также проявляют антиоксидантные свойства, перехватывая образуемый в митохондриях и модельных ферментативных системах супероксид. Нами показано, что добавление *ДНКЖ* с глутатионом в разных концентрациях в суспензию изолированных митохондрий сердца крыс уменьшает скорость генерации $O_2^{\bullet-}$ при разных парциальных

давлениях кислорода. Отсюда следует, что *ДНКЖ* эффективно взаимодействуют с супероксидными радикалами даже в условиях глубокой гипоксии.

С другой стороны, $O_2^{\bullet-}$, образующийся в митохондриях, может способствовать выработке связанного с тиолом *ДНКЖ*, высвобождая *NO* из *S*-нитрозотиолов или свободного железа из железо-связанных белков в митохондриях. Превращение *HNO* в *NO*, катализируемое коэнзимом *Q*, также играет роль в этом процессе. Очевидно, что вышеуказанные реакции являются частью системы, ответственной за антиоксидантное и цитопротекторное действие *NO* в условиях окислительного и нитрозативного стресса.

Ответом митохондрий сердца на патологический стресс и нарушение равновесия между прооксидантными и антиоксидантными процессами в клетках может быть образование в кардиомиоцитах *АФК* и физиологически значимых метаболитов оксида азота. Нами получены новые данные о закономерностях взаимодействия *АФК* с основным антиоксидантом клетки – восстановленным коэнзимом *Q*. Установлено, что препарат «водорастворимой формы убихинола-10» в присутствии митохондрий проявляет антиоксидантные свойства и способен к прямому взаимодействию с $O_2^{\bullet-}$, который генерируется комплексом *III* митохондриальной дыхательной цепи.

Полученные нами результаты также предоставляют убедительные доказательства того, что природные фенольные соединения различной структуры могут действовать как эффективные антиоксиданты, удаляя митохондриями супероксид при различных парциальных давлениях кислорода.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Уменьшение парциального давления кислорода сопровождается падением скорости генерации супероксидных радикалов изолированными митохондриями сердца, при этом митохондрии продолжают образовывать супероксид в условиях глубокой гипоксии ($\approx 15 \text{ мм.рт.ст.}$), характерной для острой сердечной патологии. Образование $O_2^{\bullet-}$ прекращается только в условиях полной аноксии. После реоксигенации до нормального парциального давления кислорода скорость образования $O_2^{\bullet-}$ несколько выше (на 25 %), чем до аноксии.

2. Увеличение температуры от комнатной ($\approx 25^\circ\text{C}$), использованной в большинстве экспериментов по ЭПР-спектроскопии с изолированными митохондриями сердца, до физиологической (37°C) сопровождается увеличением скорости генерации супероксида приблизительно на 24% при сохранении основных кинетических закономерностей процесса.

3. Динитрозильные комплексы железа с глутатионовыми лигандами эффективно перехватывают при различных значениях парциального давления кислорода свободные радикалы кислорода в системах, моделирующих окислительный стресс в клетках сердечной мышцы. При этом данные комплексы в концентрации 1-100 μM практически не влияют на поглощение кислорода изолированными митохондриями сердца.

4. Восстановленный коэнзим Q (CoQ_{10-H_2}) в составе препарата «водорастворимая форма убихинола-10» действует как эффективный антиоксидант в условиях генерации супероксида изолированными митохондриями сердца. В отличие от восстановленных коэнзимов Q (CoQ_{10-H_2} , CoQ_4-H_2 и CoQ_1-H_2) в изопропанол, в случае «водорастворимой формы убихинола-10» при повышении pH (≥ 8) не наблюдается автоокисления с образованием убисемихинонов – свободнорадикальных промежуточных продуктов.

5. Свободные анион-радикалы коэнзимов CoQ_{10} , а также производных убихинона и пластохинона $mitoQ$, $decylQ$, $SkQ1$, $SkQ3$, $SkQT$ и $SkQN$ (митохондриально направленных антиоксидантов), являющихся промежуточными продуктами в окислительно-восстановительных реакциях хиноидных соединений, существенно отличаются по распределению плотности неспаренного электрона по углеродным атомам хиноидного кольца.

6. Растительные фенольные соединения различной структуры являются эффективными перехватчиками свободных радикалов кислорода, образующихся в митохондриях сердца и модельной ферментативной системе. Наибольшей антирадикальной активностью обладают кофейная кислота и кверцетин, которые в концентрации 500 мкМ снижали уровень $O_2^{\bullet-}$ на 80-90% тогда как ресвератрол и куркумин в той же концентрации перехватывали 70-75% и 60% супероксида, соответственно.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Semenza G.L. Hypoxia-inducible factor 1: Regulator of mitochondrial metabolism and mediator of ischemic preconditioning // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 2011. Vol. 1813, № 7. P. 1263–1268.
2. Vanin A.F. Dinitrosyl iron complexes with thiolate ligands: Physico-chemistry, biochemistry and physiology // *Nitric Oxide.* 2009. Vol. 21, № 1. P. 1–13.
3. Kadenbach B. et al. The role of mitochondrial membrane potential in ischemic heart failure // *Mitochondrion.* 2011. Vol. 11, № 5. P. 700–706.
4. Zhang Y. et al. Oxidative and nitrosative stress in the maintenance of myocardial function // *Free Radic. Biol. Med.* 2012. Vol. 53, № 8. P. 1531–1540.
5. Владимиров Ю.А., Азизова О.А., Деев А.И. Свободные радикалы в живых системах. Итоги науки и техники. Биофизика. Москва: ВИНТИ, 1992. Vol. 52.
6. Kellogg E.W., Fridovich I. Superoxide, Hydrogen Peroxide, and Singlet Oxygen in Lipid Peroxidation by a Xanthine Oxidase System // *J. Biol. Chem.* 1975. Vol. 250, № 22. P. 8812–8817.
7. Chance B., Sies H., Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. // *Physiol. Rev.* 1979. Vol. 59, № 3. P. 527–605.
8. Fridovich I. Biological effects of the superoxide radical // *Arch. Biochem. Biophys.* 1986. Vol. 247, № 1. P. 1–11.
9. Schubert J., Wilmer J.W. Does hydrogen peroxide exist “free” in biological systems? // *Free Radic. Biol. Med.* 1991. Vol. 11, № 6. P. 545–555.
10. Orrenius S., Gogvadze V., Zhivotovsky B. Mitochondrial Oxidative Stress: Implications for Cell Death // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2007. Vol. 47, № 1. P. 143–183.
11. Shumaev K.B. et al. Formation of dinitrosyl iron complexes in cardiac mitochondria // *Biophysics.* 2010. Vol. 55, № 3. P. 406–411.
12. Bringold U., Ghafourifar P., Richter C. Peroxynitrite formed by mitochondrial NO synthase promotes mitochondrial Ca²⁺ release // *Free Radic. Biol. Med.* 2000. Vol. 29, № 3–4. P. 343–348.

13. Свиряева И.В. Свободные радикалы кислорода и антиоксиданты в митохондриях сердца и модельных системах. МГУ, 2008.

14. Poderoso J.J. et al. The regulation of mitochondrial oxygen uptake by redox reactions involving nitric oxide and ubiquinol // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274, № 53. P. 37709–37716.

15. Ma X.L. et al. Opposite effects of nitric oxide and nitroxyl on postischemic myocardial injury // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999. Vol. 96, № 25. P. 14617–14622.

16. Radi R. et al. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide // *Arch. Biochem. Biophys.* 1991. Vol. 288, № 2. P. 481–487.

17. Murray J. et al. Oxidative Damage to Mitochondrial Complex I Due to Peroxynitrite: IDENTIFICATION OF REACTIVE TYROSINES BY MASS SPECTROMETRY // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278, № 39. P. 37223–37230.

18. Ischiropoulos H., Al-Mehdi A.B. Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications // *FEBS Lett.* 1995. Vol. 364, № 3. P. 279–282.

19. Brookes P.S. et al. Mitochondria: regulators of signal transduction by reactive oxygen and nitrogen species // *Free Radic. Biol. Med.* 2002. Vol. 33, № 6. P. 755–764.

20. Dhalla N.S., Temsah R.M., Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases: // *J. Hypertens.* 2000. Vol. 18, № 6. P. 655–673.

21. Singh N. et al. Oxidative stress and heart failure // *Mol. Cell. Biochem.* 1995. Vol. 147, № 1–2. P. 77–81.

22. Miyata T., Takizawa S., van Ypersele de Strihou C. Hypoxia. 1. Intracellular sensors for oxygen and oxidative stress: novel therapeutic targets // *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 2011. Vol. 300, № 2. P. C226–C231.

23. Smith R.A.J. et al. Mitochondrial pharmacology // *Trends Pharmacol. Sci.* 2012. Vol. 33, № 6. P. 341–352.

24. Schumacker P.T. Lung Cell Hypoxia: Role of Mitochondrial Reactive Oxygen Species Signaling in Triggering Responses // *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2011. Vol. 8, № 6. P. 477–484.

25. Guzy R.D. et al. Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing // *Cell Metab.* 2005. Vol. 1, № 6. P. 401–408.
26. Poyton R.O. et al. Mitochondria and Hypoxic Signaling: A New View // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2009. Vol. 1177, № 1. P. 48–56.
27. Hughes M.N. Relationships between nitric oxide, nitroxyl ion, nitrosonium cation and peroxynitrite // *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1999. Vol. 1411, № 2–3. P. 263–272.
28. Shoman M.E., Aly O.M. Retracted: Nitroxyl (HNO): A Reduced Form of Nitric Oxide with Distinct Chemical, Pharmacological, and Therapeutic Properties // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016. Vol. 2016. P. 1–15.
29. Vanin A.F. Dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands as a “working form” of endogenous nitric oxide // *Nitric Oxide.* 2016. Vol. 54. P. 15–29.
30. Hogg N. The biochemistry and physiology of S-nitrosothiols // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2002. Vol. 42, № 1. P. 585–600.
31. Bresgen N., Eckl P. Oxidative Stress and the Homeodynamics of Iron Metabolism // *Biomolecules.* 2015. Vol. 5, № 2. P. 808–847.
32. Shumaev K.B. et al. Interaction of Oxoferrylmyoglobin and Dinitrosyl-Iron Complexes // *Biochem. Mosc.* 2004. Vol. 69, № 5. P. 569–574.
33. Shumaev K.B. et al. Dinitrosyl Iron Complexes Bind with Hemoglobin as Markers of Oxidative Stress // *Methods in Enzymology.* Elsevier, 2008. Vol. 436. P. 445–461.
34. Hogg N. Biological chemistry and clinical potential of S-nitrosothiols // *Free Radic. Biol. Med.* 2000. Vol. 28, № 10. P. 1478–1486.
35. Patel R.P. et al. Biological aspects of reactive nitrogen species // *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1999. Vol. 1411, № 2–3. P. 385–400.
36. Butler A.R., Rhodes P. Chemistry, Analysis, and Biological Roles of S-Nitrosothiols // *Anal. Biochem.* 1997. Vol. 249, № 1. P. 1–9.
37. Vanin A.F., Stukan R.A., Manukhina E.B. Physical properties of dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands in relation with their vasodilator activity //

Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol. 1996. Vol. 1295, № 1. P. 5–12.

38. Rubbo H. et al. Nitric Oxide Regulation of Superoxide and Peroxynitrite-dependent Lipid Peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivative // J. Biol. Chem. 1994. Vol. 269, № 42. P. 26066–26075.

39. Schafer F.Q. et al. Comparing beta-Carotene, Vitamin E and Nitric Oxide as Membrane Antioxidants // Biol. Chem. 2002. Vol. 383, № 3–4. P. 671–681.

40. Rubbo H. et al. Nitric Oxide Reaction with Lipid Peroxyl Radicals Spares α -Tocopherol during Lipid Peroxidation. Greater oxidant protection from the pair nitric oxide/ α -tocopherol than α -tocopherol/ascorbate // J. Biol. Chem. 2000. Vol. 275, № 15. P. 10812–10818.

41. Padmaja S., Huie R.E. The reaction of nitric oxide with organic peroxyl radicals // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1995. Vol. 195, № 2. P. 539–533.

42. Ignarro L.J., Kadowitz P.J. The Pharmacological and Physiological Role of Cyclic GMP in Vascular Smooth Muscle Relaxation // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 1985. Vol. 25. P. 171–191.

43. Radomski M.W., Palmer R.M.J., Moncada S. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide // Br. J. Pharmacol. 1987. Vol. 92, № 3. P. 639–646.

44. Archer S.L. et al. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. // Proc. Natl. Acad. Sci. 1994. Vol. 91, № 16. P. 7583–7587.

45. Chamulitrat W. Nitric Oxide Inhibited Peroxyl and Alkoxy Radical Formation with Concomitant Protection against Oxidant Injury in Intestinal Epithelial Cells // Arch. Biochem. Biophys. 1998. Vol. 355, № 2. P. 206–214.

46. Gutierrez H.H. et al. Nitric oxide regulation of superoxide-dependent lung injury: oxidant-protective actions of endogenously produced and exogenously administered nitric oxide // Free Radic. Biol. Med. 1996. Vol. 21, № 1. P. 43–52.

47. Joshi M.S., Ponthier J.L., Lancaster J.R. Cellular antioxidant and pro-oxidant actions of nitric oxide // *Free Radic. Biol. Med.* 1999. Vol. 27, № 11–12. P. 1357–1366.
48. Yalowich J.C. et al. Mechanisms of nitric oxide protection against tert-butyl hydroperoxide-induced cytotoxicity in iNOS-transduced human erythroleukemia cells. // *Biochem. Mosc.* 1999. Vol. 38, № 33. P. 10691–10698.
49. Kanner J., Harel S., Rina G. Nitric oxide as an antioxidant // *Arch. Biochem. Biophys.* 1991. Vol. 289, № 1. P. 130–136.
50. Watts R.N., Richardson D.R. The mechanism of nitrogen monoxide (NO)-mediated iron mobilization from cells: NO intercepts iron before incorporation into ferritin and indirectly mobilizes iron from ferritin in a glutathione-dependent manner // *Eur. J. Biochem.* 2002. Vol. 269, № 14. P. 3383–3392.
51. Oberle S., Schröder H. Ferritin May Mediate SIN-1-Induced Protection against Oxidative Stress // *Nitric Oxide.* 1997. Vol. 1, № 4. P. 308–314.
52. Jucketi M.B., Weber M., Vercellotti G.M. Nitric oxide donors modulate ferritin and protect endothelium from oxidative injury // *Free Radic. Biol. Med.* 1996. Vol. 20, № 1. P. 63–73.
53. Puntarulo S., Cederbaum A.I. Inhibition of Ferritin-Stimulated Microsomal Production of Reactive Oxygen Intermediates by Nitric Oxide // *Arch. Biochem. Biophys.* 1997. Vol. 340, № 1. P. 19–26.
54. Picard V. et al. Role of Ferritin in the Control of the Labile Iron Pool in Murine Erythroleukemia Cells // *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273, № 25. P. 15382–15386.
55. Gutteridge J.M.C., Halliwell B. Free Radicals and Antioxidants in the Year 2000: A Historical Look to the Future // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2006. Vol. 899, № 1. P. 136–147.
56. Stadtman E.R., Levine R.L. Protein oxidation // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2000. Vol. 899, № 1. P. 191–208.
57. Reif D.W. et al. Alloxan- and glutathione-dependent ferritin iron release and lipid peroxidation // *Arch. Biochem. Biophys.* 1989. Vol. 269, № 2. P. 407–414.

58. Boyer R.F., Grabill T.W., Petrovich R.M. Reductive release of ferritin iron: A kinetic assay // *Anal. Biochem.* 1988. Vol. 174, № 1. P. 17–22.
59. Gorbunov N.V. et al. Reduction of Ferrylmyoglobin and Ferrylhemoglobin by Nitric Oxide: A Protective Mechanism against Ferryl Hemoprotein-Induced Oxidations // *Biochem. Mosc.* 1995. Vol. 34, № 20. P. 6689–6699.
60. Herold S., Rehmann F.-J.K. Kinetics of the reactions of nitrogen monoxide and nitrite with ferryl hemoglobin // *Free Radic. Biol. Med.* 2003. Vol. 34, № 5. P. 531–545.
61. McLeod L.L., Alayash A.I. Detection of a ferrylhemoglobin intermediate in an endothelial cell model after hypoxia-reoxygenation // *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 1999. Vol. 277, № 1. P. H92–H99.
62. Miranda K.M. et al. Unique Oxidative Mechanisms for the Reactive Nitrogen Oxide Species, Nitroxyl Anion // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276, № 3. P. 1720–1727.
63. Poderoso J.J. et al. The reaction of nitric oxide with ubiquinol: kinetic properties and biological significance // *Free Radic. Biol. Med.* 1999. Vol. 26, № 7–8. P. 925–935.
64. Buyukafsar K., Nelli S., Martin W. Formation of nitric oxide from nitroxyl anion: role of quinones and ferricytochrome c // *Br. J. Pharmacol.* 2001. Vol. 132, № 1. P. 165–172.
65. Poderoso J.J. et al. Nitric Oxide Inhibits Electron Transfer and Increases Superoxide Radical Production in Rat Heart Mitochondria and Submitochondrial Particles // *Arch. Biochem. Biophys.* 1996. Vol. 328, № 1. P. 85–92.
66. Brown G.C., Borutaite V. Nitric Oxide, Mitochondria, and Cell Death // *Int. Union Biochem. Mol. Biol. Life.* 2001. Vol. 52, № 3–5. P. 189–195.
67. Shiva S. et al. Mechanisms of the interaction of nitroxyl with mitochondria // *Biochem. J.* 2004. Vol. 379, № 2. P. 359–366.
68. Dai Z. et al. Nitric oxide and energy metabolism in mammals: Nitric Oxide and Obesity // *BioFactors.* 2013. Vol. 39, № 4. P. 383–391.

69. Iglesias D.E. et al. Nitric oxide interacts with mitochondrial complex III producing antimycin-like effects // *Free Radic. Biol. Med.* 2015. Vol. 89. P. 602–613.
70. Dahm C.C., Moore K., Murphy M.P. Persistent S-nitrosation of complex I and other mitochondrial membrane proteins by S-nitrosothiols but not nitric oxide or peroxynitrite: implications for the interaction of nitric oxide with mitochondria // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 281, № 15. P. 10056–10065.
71. Steffen M. et al. Metabolism of S-nitrosoglutathione in intact mitochondria // *Biochem. J.* 2001. Vol. 356, № 2. P. 395–402.
72. Albina J.E., Reichner J.S. Role of nitric oxide in mediation of macrophage cytotoxicity and apoptosis // *Cancer Metastasis Rev.* 1998. Vol. 17, № 1. P. 39–53.
73. Borutaite V., Brown G.C. Nitric oxide induces apoptosis via hydrogen peroxide, but necrosis via energy and thiol depletion // *Free Radic. Biol. Med.* 2003. Vol. 35, № 11. P. 1457–1468.
74. Ushmorov A., Ratter F., Lehmann V. Nitric-oxide-induced apoptosis in human leukemic lines requires mitochondrial lipid degradation and cytochrome C release // *Blood.* 1999. Vol. 93, № 7. P. 2342–2352.
75. Li J. et al. Nitric Oxide Reversibly Inhibits Seven Members of the Caspase Family via S-Nitrosylation // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997. Vol. 240, № 2. P. 419–424.
76. Chandra J., Samali A., Orrenius S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress // *Free Radic. Biol. Med.* 2000. Vol. 29, № 3–4. P. 323–333.
77. Umansky V. et al. Glutathione is a factor of resistance of Jurkat leukemia cells to nitric oxide-mediated apoptosis // *J. Cell. Biochem.* 2000. Vol. 78, № 4. P. 578–587.
78. Chen Y.-R., Zweier J.L. Cardiac mitochondria and Reactive Oxygen Species generation // *Circ. Res.* 2014. Vol. 114, № 3. P. 524–537.
79. Romanovsky Yu.M., Tikhonov A.N. Molecular energy transducers of the living cell. Proton ATP synthase: a rotating molecular motor // *Uspekhi Fiz. Nauk.* 2010. Vol. 180, № 9. P. 931.

80. Michiels C. Physiological and Pathological Responses to Hypoxia // *Am. J. Pathol.* 2004. Vol. 164, № 6. P. 1875–1882.

81. Friedman J.R., Nunnari J. Mitochondrial form and function // *Nature.* 2014. Vol. 505, № 7483. P. 335–343.

82. Korshunov S.S., Skulachev V.P., Starkov A.A. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria // *FEBS Lett.* 1997. Vol. 416, № 1. P. 15–18.

83. McLennan H.R., Esposti M.D. The Contribution of Mitochondrial Respiratory Complexes to the Production of Reactive Oxygen Species // *J. Bioenerg. Biomembr.* 2000. Vol. 32, № 2. P. 153–162.

84. Skulachev V.P. Cationic antioxidants as a powerful tool against mitochondrial oxidative stress // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013. Vol. 441, № 2. P. 275–279.

85. Cervantes Gracia K., Llanas-Cornejo D., Husi H. CVD and Oxidative Stress // *J. Clin. Med.* 2017. Vol. 6, № 2. P. 22.

86. Halestrap A. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion—a target for cardioprotection // *Cardiovasc. Res.* 2004. Vol. 61, № 3. P. 372–385.

87. Sanz A., Navas P. Editorial: Coenzyme Q Redox State and Cellular Homeostasis // *Front. Physiol.* 2018. Vol. 9. P. 912.

88. Lopez-Lluch G. et al. Bioavailability of coenzyme Q10 supplements depends on carrier lipids and solubilization // *Nutrition.* 2019. Vol. 57. P. 133–140.

89. Ibrahim W.H. et al. Dietary Coenzyme Q10 and Vitamin E Alter the Status of These Compounds in Rat Tissues and Mitochondria // *J. Nutr.* 2000. Vol. 130, № 9. P. 2343–2348.

90. Hosoe K. et al. Study on safety and bioavailability of ubiquinol (Kaneka QH™) after single and 4-week multiple oral administration to healthy volunteers // *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2007. Vol. 47, № 1. P. 19–28.

91. Зенков Н.К. et al. Фенольные биоантиоксиданты. Новосибирск: СО РАМН, 2003. P. 328.

92. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс. Биохимические и патофизиологические аспекты. Москва: МАИК «Наука/Интерпериодика», 2001. P. 343.
93. Bentinger M., Brismar K., Dallner G. The antioxidant role of coenzyme Q // *Mitochondrion*. 2007. Vol. 7. P. S41–S50.
94. Kuchmenko E.B. et al. The effect of complexes of precursors and modulators of coenzyme Q biosynthesis on the functional state of heart mitochondria of old rats // *Biochem. Mosc. Suppl. Ser. B Biomed. Chem.* 2009. Vol. 3, № 4. P. 386–392.
95. Калатанова А.В. et al. Оценка эффективности препаратов кофермента Q10 в условиях экспериментальной ишемии – реперфузии миокарда крыс // *Медицинский Академический Журнал*. 2016. Vol. 16, № 4. P. 23–24.
96. Ivanov A.V. et al. Single Intravenous Injection of Coenzyme Q10 Protects the Myocardium after Irreversible Ischemia // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2013. Vol. 155, № 6. P. 771–774.
97. Brand M.D. et al. Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins // *Free Radic. Biol. Med.* 2004. Vol. 37, № 6. P. 755–767.
98. Lenaz G., Genova M.L. Mobility and function of Coenzyme Q (ubiquinone) in the mitochondrial respiratory chain // *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 2009. Vol. 1787, № 6. P. 563–573.
99. Wang Y., Hekimi S. Understanding Ubiquinone // *Trends Cell Biol.* 2016. Vol. 26, № 5. P. 367–378.
100. Li G. et al. Coenzyme Q10 protects SHSY5Y neuronal cells from beta amyloid toxicity and oxygen-glucose deprivation by inhibiting the opening of the mitochondrial permeability transition pore // *BioFactors*. 2005. Vol. 25, № 1–4. P. 97–107.
101. Forsmark-Andree P., Ernster L. Evidence for a protective effect of endogenous ubiquinol against oxidative damage to mitochondrial protein and DNA during lipid peroxidation // *Mol. Aspects Med.* 1994. Vol. 15. P. s73–s81.

102. James A.M., Smith R.A.J., Murphy M.P. Antioxidant and prooxidant properties of mitochondrial Coenzyme Q // Arch. Biochem. Biophys. 2004. Vol. 423, № 1. P. 47–56.
103. Murphy M.P. How mitochondria produce reactive oxygen species // Biochem. J. 2009. Vol. 417, № 1. P. 1–13.
104. Brand M.D. The sites and topology of mitochondrial superoxide production // Exp. Gerontol. 2010. Vol. 45, № 7–8. P. 466–472.
105. James A.M. et al. Interactions of mitochondria-targeted and untargeted ubiquinones with the mitochondrial respiratory chain and reactive oxygen species: implications for the use of exogenous ubiquinones as therapies and experimental tools. // J. Biol. Chem. 2005. Vol. 280, № 22. P. 21295–21312.
106. Kalenikova E.I. et al. Redox status and pharmacokinetics of coenzyme Q10 in rat plasma after its single intravenous administration // Biochem. Mosc. Suppl. Ser. B Biomed. Chem. 2014. Vol. 8, № 3. P. 267–272.
107. Каленикова Е.И. et al. Доклиническое изучение фармакокинетики инновационной лекарственной формы убихинола для внутривенного введения // Химико-Фармацевтический Журнал. 2017. Vol. 51, № 11. P. 3–7.
108. Leon-Gonzalez A.J., Auger C., Schini-Kerth V.B. Pro-oxidant activity of polyphenols and its implication on cancer chemoprevention and chemotherapy // Biochem. Pharmacol. 2015. Vol. 98, № 3. P. 371–380.
109. Kumar A. et al. Role of coenzyme Q10 (CoQ10) in cardiac disease, hypertension and Meniere-like syndrome // Pharmacol. Ther. 2009. Vol. 124, № 3. P. 259–268.
110. Littarru G.P., Tiano L. Bioenergetic and Antioxidant Properties of Coenzyme Q10: Recent Developments // Mol. Biotechnol. 2007. Vol. 37, № 1. P. 31–37.
111. Littarru G.P., Tiano L. Clinical aspects of coenzyme Q10: An update // Nutrition. 2010. Vol. 26, № 3. P. 250–254.

112. Yang Y.-K. et al. Coenzyme Q10 treatment of cardiovascular disorders of ageing including heart failure, hypertension and endothelial dysfunction // *Clin. Chim. Acta*. 2015. Vol. 450. P. 83–89.
113. Varela-Lopez A. et al. Coenzyme Q and Its Role in the Dietary Therapy against Aging // *Molecules*. 2016. Vol. 21, № 3. P. 373.
114. Hernandez-Camacho J.D. et al. Coenzyme Q10 Supplementation in Aging and Disease // *Front. Physiol.* 2018. Vol. 9. P. 44.
115. Lee S.Q.E. et al. Cellular factories for coenzyme Q10 production // *Microb. Cell Factories*. 2017. Vol. 16, № 1. P. 39.
116. Matsuo K. et al. Stability of ubiquinol-10 (reduced form of coenzyme Q10) in human blood // *Biomed. Chromatogr.* 2016. Vol. 30, № 4. P. 500–502.
117. Schriener S.E., Linford N.J., Martin G.M. Extension of Murine Life Span by Overexpression of Catalase Targeted to Mitochondria // *Science*. 2005. Vol. 308, № 5730. P. 1909–1911.
118. Murphy M.P. Development of lipophilic cations as therapies for disorders due to mitochondrial dysfunction // *Expert Opin. Biol. Ther.* 2001. Vol. 1, № 5. P. 753–764.
119. Smith R.A.J. et al. Mitochondria-Targeted Antioxidants in the Treatment of Disease // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2008. Vol. 1147, № 1. P. 105–111.
120. Liberman E.A. et al. Mechanism of coupling of oxidative phosphorylation and the membrane potential of mitochondria // *Nature*. 1969. Vol. 222, № 5198. P. 1076–1078.
121. Ross M.F. et al. Lipophilic triphenylphosphonium cations as tools in mitochondrial bioenergetics and free radical biology // *Biochem. Mosc.* 2005. Vol. 70, № 2. P. 222–230.
122. Flewelling R.F., Hubbell W.L. Hydrophobic ion interactions with membranes. Thermodynamic analysis of tetraphenylphosphonium binding to vesicles // *Biophys. J.* 1986. Vol. 49, № 2. P. 531–540.

123. Cossarizza A. et al. A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993. Vol. 197, № 1. P. 40–45.
124. Azzone G.F., Pietrobon D., Zoratti M. Determination of the Proton Electrochemical Gradient across Biological Membranes // *Current Topics in Bioenergetics*. Elsevier, 1984. Vol. 13. P. 1–77.
125. Koehorst R.B.M. et al. Lipid Bilayer Topology of the Transmembrane α -Helix of M13 Major Coat Protein and Bilayer Polarity Profile by Site-Directed Fluorescence Spectroscopy // *Biophys. J.* 2004. Vol. 87, № 3. P. 1445–1455.
126. Smith R.A.J. et al. Targeting Coenzyme Q Derivatives to Mitochondria // *Methods in Enzymology*. Elsevier, 2004. Vol. 382. P. 45–67.
127. Murphy M.P., Smith R.A.J. Targeting antioxidants to mitochondria by conjugation to lipophilic cations // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2007. Vol. 47, № 1. P. 629–656.
128. Kelso G.F. et al. Selective Targeting of a Redox-active Ubiquinone to Mitochondria within Cells: ANTIOXIDANT AND ANTIAPOPTOTIC PROPERTIES // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276, № 7. P. 4588–4596.
129. Severina I.I. et al. In search of novel highly active mitochondria-targeted antioxidants: Thymoquinone and its cationic derivatives // *FEBS Lett.* 2013. Vol. 587, № 13. P. 2018–2024.
130. Vyssokikh M.Y. et al. SkBQ — Prooxidant addressed to mitochondria // *Biochem. Mosc.* 2013. Vol. 78, № 12. P. 1366–1370.
131. Maria F.D. et al. The specific interaction of dinitrosyl-diglutathionyl-iron complex, a natural NO carrier, with the glutathione transferase superfamily: suggestion for an evolutionary pressure in the direction of the storage of nitric oxide. // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278, № 43. P. 42283–42293.

132. Vanin A.F. et al. The 2.03 Signal as an Indicator of Dinitrosyl–Iron Complexes with Thiol-Containing Ligands // Nitric Oxide. 1998. Vol. 2, № 4. P. 224–234.
133. Reddy D., Lancaster J., Cornforth D. Nitrite inhibition of Clostridium botulinum: electron spin resonance detection of iron-nitric oxide complexes // Science. 1983. Vol. 221, № 4612. P. 769–770.
134. Lakomkin V.L. et al. Long-lasting hypotensive action of stable preparations of dinitrosyl-iron complexes with thiol-containing ligands in conscious normotensive and hypertensive rats // Nitric Oxide. 2007. Vol. 16, № 4. P. 413–418.
135. Chazov E.I. et al. Hypotensive effect of Oxacom® containing a dinitrosyl iron complex with glutathione: Animal studies and clinical trials on healthy volunteers // Nitric Oxide. 2012. Vol. 26, № 3. P. 148–156.
136. Visioli F. et al. Polyphenols and Human Health: A Prospectus // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2011. Vol. 51, № 6. P. 524–546.
137. Gibellini L. et al. Natural Compounds Modulating Mitochondrial Functions // Evid. Based Complement. Alternat. Med. 2015. Vol. 2015. P. 1–13.
138. Jia Z. et al. EPR studies on the superoxide-scavenging capacity of the nutraceutical resveratrol // Mol. Cell. Biochem. 2008. Vol. 313, № 1–2. P. 187–194.
139. Ksenzenko M. et al. Effect of electron transfer inhibitors on superoxide generation in the cytochrome *bc*₁ site of the mitochondrial respiratory chain // FEBS Lett. 1983. Vol. 155, № 1. P. 19–24.
140. Moukette B.M. et al. Effect of electron transfer inhibitors on superoxide generation in the cytochrome *bc*₁ site of the mitochondrial respiratory chain. // Biol. Res. 2015. Vol. 48, № 1. P. 15.
141. Benedec D. et al. Polyphenolic Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities for Two Romanian Subspecies of *Achillea distans* Waldst. et Kit. ex Willd. // Molecules. 2013. Vol. 18, № 8. P. 8725–8739.
142. Gorlach S., Fichna J., Lewandowska U. Polyphenols as mitochondria-targeted anticancer drugs // Cancer Lett. 2015. Vol. 366, № 2. P. 141–149.

143. Pietraforte D. et al. On-line EPR study of free radicals induced by peroxidase/H₂O₂ in human low-density lipoprotein // *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids*. 2002. Vol. 1583, № 2. P. 176–184.
144. Тараховский Ю.С. et al. Флаваноиды: биохимия, биофизика, медицина. Пушино: Synchronobook, 2013.
145. Khan F.A., Maalik A., Murtaza G. Inhibitory mechanism against oxidative stress of caffeic acid // *J. Food Drug Anal.* 2016. Vol. 24, № 4. P. 695–702.
146. Villano D. et al. Comparison of antioxidant activity of wine phenolic compounds and metabolites in vitro // *Anal. Chim. Acta*. 2005. Vol. 538, № 1–2. P. 391–398.
147. Laranjinha J., Cadenas E. Redox Cycles of Caffeic Acid, alpha-Tocopherol, and Ascorbate: Implications for Protection of Low-Density Lipoproteins Against Oxidation // *IUBMB Life*. 1999. Vol. 48, № 1. P. 57–65.
148. Bors W., Michel C. Chemistry of the Antioxidant Effect of Polyphenols // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2002. Vol. 957, № 1. P. 57–69.
149. Nimse S.B., Pal D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms // *RSC Adv.* 2015. Vol. 5, № 35. P. 27986–28006.
150. Kostyuk V.A. et al. Influence of Metal Ions on Flavonoid Protection against Asbestos-Induced Cell Injury // *Arch. Biochem. Biophys.* 2001. Vol. 385, № 1. P. 129–137.
151. Steurer J. et al. Changes in Arterial and Transcutaneous Oxygen and Carbon Dioxide Tensions during and after Voluntary Hyperventilation // *Respiration*. 1997. Vol. 64, № 3. P. 200–205.
152. Ong S.-G., Hausenloy D.J. Hypoxia-inducible factor as a therapeutic target for cardioprotection // *Pharmacol. Ther.* 2012. Vol. 136, № 1. P. 69–81.
153. Calvani M. et al. Time-Dependent Stabilization of Hypoxia Inducible Factor-1 α by Different Intracellular Sources of Reactive Oxygen Species // *PLoS ONE* / ed. Slominski A.T. 2012. Vol. 7, № 10. P. e38388.

154. Wang W. et al. Superoxide Flashes in Single Mitochondria // Cell. 2008. Vol. 134, № 2. P. 279–290.
155. Трубицин Б.В. et al. Модернизация спектрометров ЭПР: компьютеризированное управление блоком развертки магнитного поля, повышение точности регистрации и компьютерной обработки сигналов ЭПР // Сборник X Международная конференция «Магнитный резонанс в химии и биологии». Суздаль, 1998. P. 9–10.
156. Hou H. et al. Electron paramagnetic resonance assessment of brain tissue oxygen tension in anesthetized rats: // Anesth. Analg. 2003. P. 1467–1472.
157. James P.E., Grinberg O.Y., Swartz H.M. Superoxide production by phagocytosing macrophages in relation to the intracellular distribution of oxygen // J. Leukoc. Biol. 1998. Vol. 64, № 1. P. 78–84.
158. Sviryaeva I.V., Mertsalova A.S., Ruuge E.K. Formation of superoxide radicals in isolated cardiac mitochondria: Effect of low oxygen concentration // Biophysics. 2010. Vol. 55, № 2. P. 230–233.
159. Otto M. et al. The tiron radical as indicator substance in catalytic determination of trace metals // Talanta. 1981. Vol. 28, № 5. P. 345–347.
160. Ledenev A.N. et al. A simple assay of the superoxide generation rate with Tiron as an EPR-visible radical scavenger // Biochem. Int. Vol. 13, № 2. P. 391–396.
161. Korkina O.V., Ruuge E.K. Generation of superoxide radicals by heart mitochondria: a study by the method of spin trapping under conditions of constant oxygenation // Biofizika. 2000. Vol. 45, № 4. P. 695–699.
162. Коркина О.В. Генерация свободных радикалов кислорода в митохондриях нормального и ишемического миокарда. МГУ, 2000.
163. Shumaev K.B. et al. Interaction of reactive oxygen and nitrogen species with albumin- and methemoglobin-bound dinitrosyl-iron complexes // Nitric Oxide. 2008. Vol. 18, № 1. P. 37–46.

164. Свиряева И.В., Рууге Э.К. Генерация свободных радикалов кислорода в митохондриях сердца: эффект гипоксии-реоксигенации // Биофизика. 2006. Vol. 51. P. 478–484.
165. Bors W. Pulse-radiolytic investigations of catechols and catecholamines II. Reactions of Tiron with oxygen radical species // Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj. 1979. Vol. 582, № 3. P. 537–542.
166. Song Y. et al. Semiquinone Radicals from Oxygenated Polychlorinated Biphenyls: Electron Paramagnetic Resonance Studies // Chem. Res. Toxicol. 2008. Vol. 21, № 7. P. 1359–1367.
167. Roginsky V., Barsukova T. Kinetics of oxidation of hydroquinones by molecular oxygen. Effect of superoxide dismutase // J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2. 2000. № 7. P. 1575–1582.
168. Neta P., Grodkowski J. Rate Constants for Reactions of Phenoxy Radicals in Solution // J Phys Chem Ref Data. 2005. Vol. 34, № 1. P. 91.
169. Pantopoulos K., Schipper H.M. Principles of free radical biomedicine. Volume I Volume I. New York: Nova Biomedical Books, 2012.
170. Borovansky J. et al. Mechanistic studies of melanogenesis: the influence of N-substitution on dopamine quinone cyclization // Pigment Cell Res. 2006. Vol. 19, № 2. P. 170–178.
171. Garg S., Rose A.L., Waite T.D. Production of Reactive Oxygen Species on Photolysis of Dilute Aqueous Quinone Solutions: Photochemistry and Photobiology, 2007, 83 // Photochem. Photobiol. 2007. Vol. 83, № 4. P. 904–913.
172. Escribano J. et al. A kinetic study of the suicide inactivation of an enzyme measured through coupling reactions. Application to the suicide inactivation of tyrosinase // Biochem. J. 1989. Vol. 262, № 2. P. 597–603.
173. Bozor I., Simandi L.I. Oxidation of Tiron by (pyrophosphato)manganese(III). Kinetics and mechanism. // J. Chem. Soc. Dalton Trans. 2002. № 16. P. 3226–3233.

174. Shumaev K.B. et al. Formation of a new type of dinitrosyl iron complexes bound to cysteine modified with methylglyoxal // *Biophysics*. 2013. Vol. 58, № 2. P. 172–177.
175. Muller F.L., Liu Y., Van Remmen H. Complex III Releases Superoxide to Both Sides of the Inner Mitochondrial Membrane // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279, № 47. P. 49064–49073.
176. Bleier L., Dröse S. Superoxide generation by complex III: From mechanistic rationales to functional consequences // *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 2013. Vol. 1827, № 11–12. P. 1320–1331.
177. Trujillo J. et al. Renoprotective effect of the antioxidant curcumin: Recent findings // *Redox Biol.* 2013. Vol. 1, № 1. P. 448–456.
178. Karoui H. et al. Characterization of Sulfur-centered Radical Intermediates Formed during the Oxidation of Thiols and Sulfite by Peroxynitrite: ESR-SPIN TRAPPING AND OXYGEN UPTAKE STUDIES // *J. Biol. Chem.* 1996. Vol. 271, № 11. P. 6000–6009.
179. Rotta J.C.G., Lunardi C.N., Tedesco A.C. Nitric oxide release from the S-nitrosothiol zinc phthalocyanine complex by flash photolysis // *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2003. Vol. 36, № 5. P. 587–594.
180. Biemond P. et al. Superoxide dependent iron release from ferritin in inflammatory diseases // *Free Radic. Biol. Med.* 1988. Vol. 4, № 3. P. 185–198.
181. Vasquez-Vivar J., Kalyanaraman B., Kennedy M.C. Mitochondrial Aconitase Is a Source of Hydroxyl Radical: AN ELECTRON SPIN RESONANCE INVESTIGATION // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275, № 19. P. 14064–14069.
182. Tran N.G. et al. Phenol Nitration Induced by a {Fe(NO)₂}₁₀ Dinitrosyl Iron Complex // *J. Am. Chem. Soc.* 2011. Vol. 133, № 5. P. 1184–1187.
183. Zabbarova I.V. et al. The interaction of ferritin and myoglobin as inductors of lipid peroxidation. The role of reactive oxygen and nitrogen species // *Biophysics*. 2004. Vol. 49. P. 607–613.

184. Gudkov L.L. et al. Antioxidant and prooxidant action of nitric oxide donors and metabolites // *Biophysics*. 2007. Vol. 52, № 3. P. 315–321.
185. Kruszewski M. The role of labile iron pool in cardiovascular diseases // *Acta Biochim. Pol.* 2004. Vol. 51, № 2. P. 471–480.
186. Zweier J., Talukder M. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury // *Cardiovasc. Res.* 2006. Vol. 70, № 2. P. 181–190.
187. Gammella E. et al. Iron-Induced Damage in Cardiomyopathy: Oxidative-Dependent and Independent Mechanisms // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015. Vol. 2015. P. 1–10.
188. Thomas C.E., Morehouse L.A. Ferritin and Superoxide-dependent Lipid Peroxidation” // *J. Biol. Chem.* 1985. Vol. 260, № 6. P. 3275–3280.
189. Yoon H.-H., Lee M.-S., Kang J.-H. Reaction of ferritin with hydrogen peroxide induces lipid peroxidation // *BMB Rep.* 2010. Vol. 43, № 3. P. 219–224.
190. Bosworth C.A. et al. Dinitrosyliron complexes and the mechanism(s) of cellular protein nitrosothiol formation from nitric oxide // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2009. Vol. 106, № 12. P. 4671–4676.
191. Lu C., Koppenol W.H. Inhibition of the Fenton reaction by nitrogen monoxide // *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* 2005. Vol. 10, № 7. P. 732–738.
192. Li Q. et al. Nitrosothiol Formation and Protection against Fenton Chemistry by Nitric Oxide-induced Dinitrosyliron Complex Formation from Anoxia-initiated Cellular Chelatable Iron Increase // *J. Biol. Chem.* 2014. Vol. 289, № 29. P. 19917–19927.
193. Vakhnina L.V., Ruuge E.K. The kinetics of the development of the ESR signal with $g=2.03$ in mitochondria treated with nitrite // *Biophysics*. 1972. Vol. 17. P. 690–692.
194. Winterbourn C.C., Metodiewa D. The reaction of superoxide with reduced glutathione // *Arch. Biochem. Biophys.* 1994. Vol. 314, № 2. P. 284–290.

195. Jones C.M. et al. Kinetics of superoxide scavenging by glutathione: an evaluation of its role in the removal of mitochondrial superoxide // *Biochem. Soc. Trans.* 2003. Vol. 31, № 6. P. 1337–1339.
196. Vinogradov A.D., Grivennikova V.G. Oxidation of NADH and ROS production by respiratory complex I // *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 2016. Vol. 1857, № 7. P. 863–871.
197. Yang J. et al. Oxygen is required for the l-cysteine-mediated decomposition of protein-bound dinitrosyl-iron complexes // *Free Radic. Biol. Med.* 2010. Vol. 49, № 2. P. 268–274.
198. Pacher P., Beckman J.S., Liaudet L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease // *Physiol. Rev.* 2007. Vol. 87, № 1. P. 315–424.
199. Kalita A., Deka R.C., Mondal B. Reaction of a Copper(II)–Nitrosyl Complex with Hydrogen Peroxide: Phenol Ring Nitration through a Putative Peroxynitrite Intermediate // *Inorg. Chem.* 2013. Vol. 52, № 19. P. 10897–10903.
200. Greenstock C.L., Miller R.W. The oxidation of tiron by superoxide anion. Kinetics of the reaction in aqueous solution and in chloroplasts // *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1975. Vol. 396, № 1. P. 11–16.
201. Nakayama T., Hashimoto M., Hashimoto K. Superoxide Dismutase Inhibition of Oxidation of Ubiquinol and Concomitant Formation of Hydrogen Peroxide // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1997. Vol. 61, № 12. P. 2034–2038.
202. Pietta P.-G. Flavonoids as Antioxidants // *J. Nat. Prod.* 2000. Vol. 63, № 7. P. 1035–1042.
203. Mura F. et al. New insights into the antioxidant activity of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic systems: Spectroscopic, electrochemistry, and cellular studies // *Free Radic. Res.* 2014. Vol. 48, № 12. P. 1473–1484.
204. Fernandez-Panchon M.S. et al. Antioxidant Activity of Phenolic Compounds: From *In Vitro* Results to *In Vivo* Evidence // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2008. Vol. 48, № 7. P. 649–671.

205. Ghorbani A. Mechanisms of antidiabetic effects of flavonoid rutin // Biomed. Pharmacother. 2017. Vol. 96. P. 305–312.
206. Karlsson J. et al. trans-Resveratrol Protects Embryonic Mesencephalic Cells from tert-Butyl Hydroperoxide: Electron Param // J. Neurochem. 2000. Vol. 75, № 1. P. 141–150.
207. Das K.C., Das C.K. Curcumin (diferuloylmethane), a singlet oxygen (1O_2) quencher // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002. P. 5.
208. Priyadarsini K.I. Chemical and Structural Features Influencing the Biological Activity of Curcumin // Curr. Pharm. Des. 2013. Vol. 19, № 11. P. 2093–2100.
209. Choudhury A. et al. Synthesis and Evaluation of the Anti-Oxidant Capacity of Curcumin Glucuronides, the Major Curcumin Metabolites // Antioxidants. 2015. Vol. 4, № 4. P. 750–767.
210. Sirota R., Gibson D., Kohen R. The role of the catecholic and the electrophilic moieties of caffeic acid in Nrf2/Keap1 pathway activation in ovarian carcinoma cell lines // Redox Biol. 2015. Vol. 4. P. 48–59.
211. Chouchani E.T. et al. Cardioprotection by S-nitrosation of a cysteine switch on mitochondrial complex I // Nat. Med. 2013. Vol. 19, № 6. P. 753–759.
212. Potapovich A.I., Kostyuk V.A. Comparative Study of Antioxidant Properties and Cytoprotective Activity of Flavonoids // Biochem. Mosc. 2003. Vol. 68, № 5. P. 514–519.