

# Кинетика антиоксидантной активности $\alpha$ -токоферола и некоторых его гомологов. Часть 1. Обзор проблемы.

## Теоретическая модель

\*Е. Ю. Канаровский<sup>a</sup>, О. В. Ялтыченко<sup>a</sup>, Н. Н. Горинчой<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Институт прикладной физики АН Молдовы,  
ул. Академическая, 5, г. Кишинев, MD-2028, Республика Молдова, \*e-mail: [kanarovskii@gmail.com](mailto:kanarovskii@gmail.com)

<sup>b</sup>Институт химии АН Молдовы,  
ул. Академическая, 3, г. Кишинев, MD-2028, Республика Молдова

Представлена первая часть теоретического исследования, посвященного описанию кинетики и механизма процесса липидной пероксидации с участием комплексов цитохрома *c* и кардиолипина с учетом влияния антиоксиданта. Рассмотрены основные компоненты систем АФК (активных форм кислорода) и АОЗ (антиоксидантной защиты) и их свойства. Обсуждаются ключевые особенности функционирования данных систем и различные каналы влияния их компонентов друг на друга как внутрисистемные, так и межсистемные, существенные для оптимального взаимодействия этих систем в организме. В обзоре особое внимание уделено экспериментальным работам, в которых изучаются свойства и структура комплексов цитохрома *c* и кардиолипидов различных типов, и проявляемая ими пероксидазная активность. В дополнение к двум известным способам регулирования пероксидазной активности этих комплексов, обсуждаемым в литературе, предложено учитывать еще один способ, который связан с возможностью включения молекул липофильного антиоксиданта в состав исследуемых комплексов. Предлагаемый способ регулирования пероксидазной активности, повышая эффективность контроля пероксидазного процесса, открывает новые возможности для регулирования процесса апоптоза клеток. На основе анализа экспериментальных работ по данной проблеме сформулирована теоретическая кинетическая модель пероксидазного процесса, включающая два пути протекания реакций – ферментативный путь с участием комплексов цитохрома *c* и кардиолипина и неферментативный путь с участием свободных радикалов. Система дифференциальных уравнений, описывающая кинетику процесса липидной пероксидации, построена с учетом ингибирующего влияния антиоксиданта. Полученная модельная система кинетических уравнений будет применена для изучения и сравнения антиоксидантных активностей витамина Е ( $\alpha$ -токоферола) и некоторых его гомологов с укороченной боковой цепью, опираясь на существующие теоретические и экспериментальные данные.

*Ключевые слова:* антиоксидантная активность, комплекс кардиолипина и цитохрома *c*, липидная пероксидация, химическая кинетика, свободные радикалы,  $\alpha$ -токоферол.

УДК 544.43; 544.473:577.15; 577.115

### ВВЕДЕНИЕ

Обширные исследования биохимических реакций с участием свободных радикалов (СР) в живом организме привели к концепции оксидативного стресса как патологического состояния, вызванного избыточными концентрациями СР. Значительное превышение физиологически нормального уровня СР наблюдается при радиационных, механических или химических поражениях, вызывая деструкцию тканей из-за развития воспалительной реакции, которая при хроническом течении может привести к опухолеобразованию. Высокий уровень СР имеет место и при постишемических, реперфузионных и гипероксических повреждениях, а также характерен для целого ряда патологических состояний при сердечно-сосудистых,

бронхолегочных и других заболеваниях [1–7]. Вследствие многочисленных экспериментальных данных об активном патологическом влиянии оксидативного стресса на ряд дегенеративных, воспалительных и системных заболеваний, а также на процесс старения, большое внимание стало уделяться изучению роли СР в развитии болезней человека и способам защиты от их действия с помощью антиоксидантов различных видов [5–14].

На начальных этапах исследований сложилось мнение, что СР играют только негативную роль в жизнедеятельности клетки, но в настоящее время происходит серьезный пересмотр взглядов на их значение для клеток и живого организма в целом [15]. Выделяют несколько основных функций, выполняемых СР в организме: защита против инфекционных

агентов; участие в сигнальных процессах; модификация молекул, участвующих в метаболизме живых существ; и, соответственно, повреждающее действие на компоненты клетки и на многие физиологические процессы в ней, такие как иммунная регуляция, и др. [7–11, 15].

Метаболизм живых существ в аэробных условиях непременно связан с идущими на клеточном уровне процессами кислородного окисления различных субстратов, в ходе которых образуются активные формы кислорода (АФК). Данная группа объединяет различные по химическому составу и реакционной способности молекулы и радикалы, содержащие кислород. К ним относятся как свободные радикалы: супероксид анион-радикал  $\bullet\text{OO}^-$ , гидроксильный радикал  $\text{HO}\bullet$ , гидропероксильный радикал  $\text{HO}\text{OO}\bullet$ , метастабильный радикал  $\text{NO}$  (оксид азота (II)); так и нерадикальные активные молекулы/ионы: синглетный кислород  $^1\text{O}_2$ , пероксид (перекись) водорода  $\text{H}_2\text{O}_2$ , пероксинитрит  $\text{ONOO}^-$ , гипохлорит-анион  $\text{ClO}^-$ , оксид азота (IV)  $\text{NO}_2$  и др. Их реакционные способности и время жизни  $\tau$  существенно отличаются – от наносекунд для  $\text{HO}\bullet$ , микросекунд для  $^1\text{O}_2$  (в воде  $k = 1/\tau \approx 3,2 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$  [16], но в зависимости от растворителя его время жизни может быть до нескольких наносекунд), и миллисекунд для  $\text{H}_2\text{O}_2$  [6, 16] до часов и даже дней (убисемихиноновый радикал) [1–4].

Для живых организмов характерно наличие двух принципиально отличающихся источников АФК: радикальные окислительные реакции и ферментативные реакции в системах, содержащих металлы переменной валентности. Появление АФК в обоих случаях есть результат неполного восстановления молекулы  $\text{O}_2$  [6, 17]. В процессе поэтапного одноэлектронного восстановления молекулярного кислорода  $\text{O}_2$  до воды  $\text{H}_2\text{O}$  последовательно получаем:  $\bullet\text{OO}^-$ , который в протонном растворителе может быть в виде  $\text{HO}\text{OO}\bullet$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{HO}\bullet$  и  $\text{H}_2\text{O}$  [17].

В биологической клетке в большинстве случаев триплетный кислород как реагент непосредственно не активен (за исключением реакций с флавинами [17]), поскольку для него в физиологических условиях прямые реакции окисления синглетных субстратов с получением синглетных продуктов крайне маловероятны (запрещены по спину). Чтобы реализовать необходимые для жизнедеятельности биологической клетки реакции окисления органических соединений для триплетного кислорода, существуют три пути использования его окислительного потенциала [17]: либо инициация реакций по радикальному механизму, либо возбуждение его в синглетное состояние с

последующей реакцией, либо активация его ферментами.

Синглетный кислород  $^1\text{O}_2$ , в отличие от триплетного, обладает достаточно высокой реакционной способностью и в принципе способен вступать в реакции с органическими соединениями, например, константа скорости его взаимодействия с полиненасыщенными жирными кислотами составляет  $k \sim 10^4 \div 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Однако он и очень быстро тушится в организме, причем тушение по физическому механизму значительно преобладает над тушением по химическому механизму [18], так, для  $\alpha$ -токоферола константы скоростей соответствующих процессов:  $k \sim 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  и  $k \sim 10^6 \div 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Также очень высока суммарная скорость его тушения у гистидина и триптофана  $k \sim 3 \div 5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , а максимально высокой является скорость его тушения  $\beta$ -каротином  $k \sim 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  [16–18]. Во многих ферментативных реакциях синглетный кислород образуется как сопутствующий продукт. Он также часто образуется в реакции рекомбинации  $\bullet\text{OO}^-$  [17], а у растений в фотоиндуцированных реакциях – при участии хлорофиллов [16].

Основным источником образования супероксид анион-радикала  $\bullet\text{OO}^-$  в живых организмах являются ферментативные системы, также он образуется как промежуточный продукт в некоторых неферментативных биохимических реакциях в клетках. Анион-радикал  $\bullet\text{OO}^-$  имеет амфотерные окислительно-восстановительные свойства, может окислять и восстанавливать ионы металлов переменной валентности. Как нуклеофил  $\bullet\text{OO}^-$  способен окислять фосфолипиды биомембран и вызывать окислительную модификацию различных белков, липопротеинов и нуклеотидов, но сила его как окислителя невелика [17]. Имеет большой радиус действия, сравнимый с размером клетки  $\sim 0,3 \div 0,5 \text{ мкм}$ , а, находясь в протонированной нейтральной форме  $\text{HO}\text{OO}\bullet$ , может проходить через мембраны клеток. Однако на клеточном уровне его эффект строго локализован благодаря супероксиддисмутазе, а также низкомолекулярным антиоксидантам: так, витамин Е инактивирует его посредством физического взаимодействия на расстоянии  $\sim 50 \text{ \AA}$ . Его протонированная нейтральная форма – радикал  $\text{HO}\text{OO}\bullet$  – немного более сильный окислитель, чем  $\bullet\text{OO}^-$ , но, как и  $\bullet\text{OO}^-$ , сохраняет амфотерные окислительно-восстановительные свойства [6, 17]. В целом  $\bullet\text{OO}^-$ , как и  $\text{HO}\text{OO}\bullet$ , могут быть окислителями только тех соединений, которые образуют устойчивые радикалы при отрыве от них электрона (протона в случае с  $\text{HO}\text{OO}\bullet$ ).

Поэтому чаще всего радикалы  $\bullet\text{OO}^-$  и  $\text{HO}\bullet$  становятся источниками других АФК, в частности, дисмутируя до перекиси водорода.

Перекись водорода – относительно стабильная молекула, поэтому способна диффундировать от места ее образования на значительные расстояния, и, будучи нейтральной, может проходить через мембраны клеток. Считается окислителем средней силы, тем не менее в живой клетке как окислитель действует только при участии ферментов [17].

Гидроксильный радикал, являясь очень сильным окислителем, при нормальном функционировании клетки чаще всего образуется из перекиси водорода при ее одно-электронном окислении, катализируемом железосодержащими соединениями, всегда имеющимися в клетках [6, 19, 20]. Также радикал  $\text{HO}\bullet$  может быть образован при взаимодействии  $\bullet\text{OO}^-$  с  $\text{H}_2\text{O}_2$  и  $\text{H}^+$ :  $\text{H}_2\text{O}_2 + \bullet\text{OO}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 + \text{HO}\bullet$ . Этот кислородный радикал очень высокореакционный и настолько короткоживущий (*in vivo* его время жизни около  $10^{-9}$  с, а радиус диффузии  $\sim 23 \text{ \AA}$ ), что ни у какого типа живых клеток нет фермента, который успел бы его обезвредить. Единственными защитниками клетки от него будут низкомолекулярные антиоксиданты, прежде всего витамины Е и С, глутатион, убихинон коэнзим  $\text{Q}_{10}$  и  $\beta$ -каротин (предшественник витамина А), при достаточном уровне их концентраций в организме.

В работе [15] предложено выделять из системы АФК отдельную группу, объединяющую участников и продукты цепного окисления липидов: липидные радикалы (алкильные  $\text{L}\bullet$ , алкоксильные  $\text{LO}\bullet$  и пероксильные  $\text{LOO}\bullet$  радикалы) и липидные пероксиды, прежде всего гидропероксиды ( $\text{LOOH}$ ). Эта группа «активных форм липидов» (АФЛ), как подчеркивается в [15], заметно отличается от группы чисто кислородных АФК по механизму образования и действия ее компонентов, по ряду индивидуальных свойств и функциональных различий, проявляемых ими в живой клетке, по соотношению их концентраций, которое значительно варьируется в ходе различных клеточных процессов. Важно отметить, что существуют некие пороговые уровни продукции АФК и АФЛ, выше которых они стимулируют процесс апоптоза, приводя к гибели клетки, а ниже которых они принимают участие в сигнальных процессах. Такие показатели организма как рождаемость и фертильность, а также способность к адаптации, старение и возрастные болезни зависят от величин этих пороговых уровней. Высоким пороговым

уровням АФК и АФЛ соответствуют высокие уровни фертильности и рождаемости, однако вероятность развития митохондриальных заболеваний также будет велика. Избыточная продукция АФК и АФЛ приводит к усилению различных видов системного метаболического стресса (оксидативного, карбонильного, нитрозативного и редуکتивного) в организме и, как следствие, к снижению продолжительности жизни из-за развития сердечно-сосудистых заболеваний, диабета, злокачественных процессов и т.д. [6, 15].

Эволюция осуществила (и осуществляет) отбор таким образом, что те живые организмы, которые обладали более гибкой и быстрой системой антиоксидантной защиты (АОЗ), получали преимущество в развитии как вид. У всех видов эукариот система АОЗ имеет свои функциональные особенности, но главные черты и принципы ее взаимодействия с системой АФК во многом схожи, и в условиях физиологической нормы живой организм способен эффективно контролировать разнообразные окислительные процессы, включая перекисное окисление липидов (ПОЛ). Свои защитные функции система АОЗ выполняет через регулирование концентраций СР разных видов и скоростей радикальных и окислительно-восстановительных реакций. В общем случае система АОЗ любого живого организма включает в себя два главных функциональных звена: 1) *ферментное* и 2) *неферментное*. Компонентный состав этих звеньев у анаэробных организмов, конечно же, отличается, так как окисляющим субстратом у них является не кислород (и его формы), а, например, сера или азот (и их формы). Тем не менее, и в составе системы АОЗ этих организмов также можно выделить подобные два звена.

1) *Ферментное звено* – это ферменты, которые вырабатываются в самом организме и препятствуют образованию АФК. В нем ведущую роль играют следующие типы ферментов: супероксиддисмутаза (SOD), каталаза (СТ), пероксидаза (Pox), глутатионпероксидаза (GPx), глутатионтрансфераза (GT) и глутатионредуктаза (GR).

*Супероксиддисмутаза* в разных своих формах содержит в качестве кофакторов активного центра один из ионов переходных металлов Cu, Mn, Fe, Ni и как дополнительный стабилизирующий кофактор Zn (в Cu-Zn-SOD, которая имеет наибольшую активность). Для SOD характерна очень высокая константа скорости реакции (при  $\text{pH} = 7$ :  $k \sim 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) [21–23]. SOD катализирует присоединение двух протонов  $\text{H}^+$  к супероксид анион-радикалу  $\bullet\text{OO}^-$  [24], преобразовывая его в перекись водорода  $\text{H}_2\text{O}_2$  и молекулярный кислород  $\text{O}_2$ . Реакция протекает в

два этапа (Me:  $n = 1$  для Cu [25] и  $n = 2$  для Fe [26], Mn [27], Ni [28]):  $\text{SOD-Me}^{(n+1)} + \bullet\text{OO}^- \rightarrow \text{SOD-Me}^{(n)} + \text{O}_2$  и  $\text{SOD-Me}^{(n)} + \bullet\text{OO}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{SOD-Me}^{(n+1)} + \text{H}_2\text{O}_2$ . Фермент SOD является важнейшей составной частью в системе АОЗ не только животных [21–23], но и растений [29, 30].

*Каталаза* вместе с пероксидазами относится к классу оксидоредуктаз [31] и выполняет каталитическое разложение перекиси водорода, образующейся в живой клетке, на воду и молекулярный кислород по реакции:  $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$  [32, 33]. Отметим, что СТ защищает SOD от инактивации перекисями и препятствует образованию высокотоксичного гидроксильного радикала. В свою очередь, SOD препятствует инактивации каталазы, которая может быть вызвана высокой концентрацией супероксид анион-радикала  $\bullet\text{OO}^-$ .

*Пероксидаза* катализирует окисление органических соединений перекисью водорода или органическими пероксидами. У ферментов обоих типов (каталазы и пероксидазы) активной группой является гематин, содержащий трехвалентное железо  $\text{Fe}^{3+}$  [31]. Пероксидазы, в основном используя в качестве субстрата  $\text{H}_2\text{O}_2$ , катализируют окисление органических соединений (включая липиды). Для многих видов пероксидаз  $\text{H}_2\text{O}_2$  является оптимальным субстратом, но некоторые проявляют большую активность в отношении органических пероксидов (включая липидные пероксиды).

*Глутатионпероксидаза* в качестве кофактора активного центра содержит селен и трипептид глутатион (GSH) [34, 35], с участием которого нейтрализует  $\text{H}_2\text{O}_2$ , переводя GSH в окисленную форму (GSSG) по реакции:  $2\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$ , и обезвреживает гидропероксиды липидов. Отметим, что благодаря наличию глутатионпероксидазы и каталазы клетки млекопитающих достаточно устойчивы к воздействию  $\text{H}_2\text{O}_2$  и органических пероксидов: при низком содержании  $\text{H}_2\text{O}_2$  обезвреживание органических пероксидов преимущественно катализируется пероксидазами, а при высоких концентрациях  $\text{H}_2\text{O}_2$  работают каталазы.

*Глутатионтрансфераза* – семейство мультифункциональных белков, которые используют GSH для метаболизма гидрофобных веществ [34]. Эти ферменты с молекулярной массой 43–57 кДа по строению могут быть гомо- или гетеродимерами и каждая субъединица имеет свой независимый активный центр, который, в свою очередь, содержит два субцентра – *G* и *H*. Субцентр *G* взаимодействует с глутатионом (содержит SH-группу, гистидин и аргинин); а субцентр *H* содержит глицин и выполняет связывание гидрофобного субстрата. Глутатионтрансферазы функционируют во всех

тканях организма и им отведена важная роль – они участвуют в обезвреживании ксенобиотиков и метаболизме лекарств, осуществляют инактивацию собственных метаболитов: некоторых стероидных гормонов, простагландинов, билирубина, желчных кислот, продуктов ПОЛ.

*Глутатионредуктаза* [36] восстанавливает дисульфидную связь окисленной формы глутатиона (GSSG) до его сульфгидрильной формы GSH в отношении молярных эквивалентов GSSG к GSH, равном 1:2. Реакция  $\text{GSSG} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow 2\text{GSH} + \text{NADP}^+$  идет с низкой скоростью, но именно она имеет большое значение для восстановления глутатиона, являющегося мощным антиоксидантом и без которого невозможна эффективная работа глутатионпероксидазы. Отношение концентраций форм GSSG к GSH в клетке – один из важнейших показателей при оценке уровня окислительного стресса [37, 38]. Для поддержания окислительного баланса клетки важно, чтобы в ней были высокий уровень GSH и низкий – GSSG. Активность глутатионпероксидазы, обеспечивающая антиоксидантную защиту клеточных и субклеточных структур организма, сильно зависит от присутствия селена.

От глутатиона зависит еще одна группа небольших окислительно-восстановительных ферментов – *глутаредоксины*, которые вместе с ферментами GR, GPx и глутатионом входят в самостоятельную антиоксидантную систему – систему глутатиона [39, 40]. При окислении глутаредоксинов соответствующими субстратами глутатион восстанавливает их неферментативно. В отличие от тиоредоксинов, которые восстанавливаются специальным ферментом тиоредоксинредуктазой, для глутаредоксинов нет оксидоредуктазы, которая бы специфически его восстанавливала, но эту функцию с успехом выполняет глутатион. Окисленный глутатион затем регенерируется глутатионредуктазой. При восстановлении глутатиона большое значение имеет NADPH (никотинамидадениндинуклеотидфосфат). Роль NADPH двойка: он проявляет антиоксидантную активность – при регенерации GSH обеспечивает восстановительные эквиваленты для биосинтетических реакций и окислительно-восстановительного процесса, направленного на защиту от токсичного действия АФК [41], и он же проявляет себя как прооксидант, участвуя в создании СР в иммунных клетках для уничтожения патогенов в процессе *респираторного взрыва* [42], критической реакции, которая возникает в фагоцитах для деградации чужеродных частиц и бактерий.

Стоит также упомянуть еще одно семейство антиоксидантных ферментов – перокси-

редоксины (Prxs). Prxs физиологически значимы, так как являются одними из самых распространенных белков у млекопитающих. Они контролируют уровень цитокин-индуцированных пероксидов, участвующих в передаче клеточных сигналов [43, 44]. Для антиоксидантных ферментов этой группы характерно окисление пероксидным субстратом (например, липидным гидропероксидом) тиольной группы R-SH редокс-активного цистеина в их активном центре до R-SOH состояния [44]:  $\text{Prx}(\text{red.}) + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Prx}(\text{ox.}) + 2\text{H}_2\text{O}$ . Восстановление Prx происходит благодаря одному из следующих белков: сульфиредоксину, сестрину-2 или тиоредоксину [45–48].

2) **Неферментное звено** – это низкомолекулярные антиоксиданты, препятствующие образованию продуктов перекисного окисления, таких как липидные гидропероксиды и др. Эта группа антиоксидантов тоже обширна и включает вещества разной природы и с разным механизмом действия. Антиоксиданты взаимодействуют со свободными радикалами, переходя в окисленные или стабильные радикальные формы, а затем под действием соответствующих ферментов или синергического действия других антиоксидантов снова преобразуются в восстановленные формы. В данную группу, прежде всего, включают не синтезируемые в организме человека низкомолекулярные химические соединения: витамины С, А и Е, каротиноиды и биофлавоноиды. К вырабатываемым в организме антиоксидантным низкомолекулярным химическим соединениям относятся – тиолы, убихинон коэнзим Q<sub>10</sub>, мочева кислота, металлосвязывающие белки, стероидные гормоны. Отметим, что тиолы (R-SH) не только являются эффективными антиоксидантами, но и необходимы для работы фермента глутатионпероксидазы. К естественным тиолам относятся глутатион, цистеин и дигидролипоат.

Важно, что действие низкомолекулярных антиоксидантов является неспецифичным, и они выполняют свою защитную функцию при самых разных патологических процессах. В целом проявление своей активности антиоксиданты реализуют либо непосредственным гашением СР (прямое действие), либо через активацию АОЗ организма (непрямое действие).

К антиоксидантам непрямого действия относятся витамины группы В, ионы железа, меди и марганца, селен, каротины и каротиноиды, метионин, цистеин, натрия селенит, а также глутаминовая и  $\alpha$ -липоевая кислоты. Наиболее важные следствия их активности – это повышение уровня глутатиона [34] и активности пероксидаз. В целом для них

основными механизмами являются: активация (реактивация) антиоксидантных ферментов; угнетение процессов, которые приводят к образованию и накоплению АФК; сдвиг процессов свободнорадикального окисления в сторону образования соединений с меньшей реакционной способностью; селективная индукция генов, кодирующих белки систем репарации повреждений и АОЗ; нормализация обмена веществ и др. [49–52]. Их принципиальное отличие от антиоксидантов прямого действия в том, что они способны снижать интенсивность свободнорадикального окисления *только* в живых системах (от клеточных органелл до организма в целом), но неэффективны *in vitro*.

Антиоксидантами прямого действия являются витамин Е (токоферолы и токотриенолы), витамин А, витамин С и др. По типу действия антиоксиданты прямого действия классифицируются как донаторы протона, полиены, катализаторы, ловушки СР и комплексообразователи [49, 52]. По растворимости антиоксиданты могут быть подразделены на водорастворимые и нерастворимые в воде (жирорастворимые) [49, 52–57]. Водорастворимыми являются следующие антиоксиданты: глутатион, мочева кислота, аскорбиновая кислота, селен, цинк, рибофлавин и  $\alpha$ -липоевая кислота (только в виде своей натриевой соли). К жирорастворимым антиоксидантам относятся: каротиноиды, токоферолы и токотриенолы, стероидные гормоны, убихиноны и  $\alpha$ -липоевая кислота.

Среди компонентов системы АОЗ стоит выделить полифенолы [53–57] в связи с возрастающим исследовательским интересом к этому обширному семейству антиоксидантов. Семейство полифенолов насчитывает более 4000 соединений и включает терпены (терпеноиды, изопреноиды), фенилпропаноиды и их производные (флавоноиды, танины, лигнаны, гликозиды) и азотсодержащие соединения (алкалоиды и гетероциклические ароматические молекулы). В последнее время особенно высок интерес к подклассу полифенолов: флаваноидам [58–60], которые помимо антиоксидантных свойств [61–66] обладают противомикробным [60, 67–69], противовоспалительным [60, 70, 71] и антиканцерогенным действиями [60, 72].

Отдельно следует отметить, что различные антиоксиданты способны по отношению друг к другу проявлять синергию [49, 51, 52]. Так, глутатион, являясь основным эндогенным (производимым в клетках) антиоксидантом прямого действия, участвует в поддержании экзогенных антиоксидантов, таких как витамины Е, А и С в их активной (восстановленной) форме. В свою очередь,  $\alpha$ -липоевая

кислота обладает способностью восстанавливать внутриклеточный глутатион и защищать убихинон коэнзим Q<sub>10</sub>, витамины E и C, при этом ее действие усиливают витамины группы B и т.д. Таким образом,  $\alpha$ -липовая кислота, будучи водо- и жирорастворимой, проявляет себя как универсальный компонент АОЗ, восстанавливая главные низкомолекулярные антиоксиданты.

В целом, тандем из оксидантной и антиоксидантной систем представляет собой сложную совокупность веществ разного вида и их взаимопревращений, находящихся в состоянии квазиравновесия. Дисбаланс между этими составляющими как в одну, так и в другую сторону приводит к неблагоприятным последствиям для организма. Следует подчеркнуть, что в небольших количествах образование АФК просто необходимо в организме, так как они участвуют в редокс-сигнализации. Как известно, редокс-состоянием клетки регулируются такие процессы как: клеточное дыхание, деление и дифференциация клеток, адаптация к стрессу, апоптоз и др. [1–11].

Проблема апоптоза клеток привлекает особое внимание исследователей в области биологии и медицины [12–15, 73–81]. Важную роль в развитии процесса апоптоза играет цитохром *c* (Cyt *c*). Выходу цитохрома *c* из митохондрий обычно предшествует «митохондриальный стресс», обусловленный в основном усиленным образованием СР. Он может начаться с получения апоптотического сигнала извне либо из-за внутренних причин и заканчивается перекисным окислением белков и липидов, набуханием матрикса и образованием крупных пор в наружной митохондриальной мембране, с последующим выходом цитохрома *c* из митохондрий в цитозоль и запуском апоптоза (подробнее см. [73–81]).

Далее, перед тем как перейти к рассмотрению поставленной задачи, перечислим физические методы экспериментального наблюдения, получившие наибольшее распространение при изучении кинетики различных биологических процессов, происходящих как в организме на разных иерархических уровнях – тканях, клетках, органеллах и мембранах, так и в модельных экспериментальных системах. К ним, прежде всего, относятся следующие методы:

– метод ЭПР (электронного парамагнитного резонанса) [82], который используется для получения информации о скоростях химических реакций благодаря тому, что форма спектральной линии ЭПР определяется взаимодействием неспаренного электрона с локальным окружением. Это свойство используется в так называемом методе спиновых меток [83], который основан на

внедрении стабильного парамагнитного центра в исследуемую систему;

– метод ЯМР (ядерного магнитного резонанса), использующийся для изучения структуры и молекулярного движения в различных веществах, в том числе и в биологических объектах [84, 85]. Он, в частности, позволяет получать систематические данные о динамической структуре липидных бислоев в мембранах хлоропластов [86];

– метод молекулярной визуализации MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization), который еще часто называют методом молекулярной гистологии [87]. А также модификация MALDI-IMS (MALDI Imaging Molecular Spectroscopy), дающая еще больше возможностей для получения и обработки экспериментальных биохимических данных [88];

– метод хемилюминесценции, который является мощным экспериментальным методом изучения перекисного окисления белков и липидов в различных биологических материалах благодаря тому, что интенсивность хемилюминесценции (наряду с другими оптическими параметрами такого сверхслабого свечения) однозначно отражает скорость окислительного процесса, в частности процесса ПОЛ [89–91]. Измерение интенсивности хемилюминесценции, с учетом частотных и временных характеристик ее спектра, дает возможность определять квазистационарные концентрации свободных радикалов и константы скоростей реакций с их участием, уточнять структурные особенности люминесцирующих продуктов, а также наблюдать изменение концентраций СР при наличии антиоксидантов в изучаемой биологической системе.

Комбинированное использование в одном эксперименте перечисленных (и некоторых других) современных методов дает широчайший спектр возможностей для исследования сложных биологических систем как *in vivo*, так и *in vitro* и позволяет определять специфические детали кинетики и механизмы процессов, протекающих в биологической системе, и ее разнообразные биохимические и биофизические свойства.

#### ОПИСАНИЕ КАТАЛИТИЧЕСКОГО И СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ПУТЕЙ ПРОЦЕССА ЛИПИДНОЙ ПЕРОКСИДАЦИИ С УЧАСТИЕМ КОМПЛЕКСА КАРДИОЛИПИНА И ЦИТОХРОМА С

Свойства и структура комплексов цитохрома *c* и кардиолипинов различных типов сейчас интенсивно изучаются в связи с тем, что данные комплексы проявляют пероксидазную активность [12–15, 74–78].

Сначала кратко опишем свойства компонентов этих комплексов, а затем перейдем к обсуждению кинетики пероксидазного процесса и построению системы дифференциальных уравнений, описывающих ее.

Цитохром *c* – это небольшой мембранный белок, в структуре которого содержится гем типа *c*, ковалентно-связанный с аминокислотными остатками его внутренней полости [92]. Благодаря такому строению цитохрома способны катализировать окислительно-восстановительные реакции. В классе цитохромов (их известно около 30 видов) он самый маленький и, в отличие от остальных цитохромов, хорошо растворим. Цитохромы присутствуют во всех клетках эукариот, где они локализованы на митохондриальных мембранах. В клетке *Cyt c* выполняет в основном две функции: одноэлектронный переносчик в дыхательной цепи [93], свободно связанный снаружи внутренней мембраной митохондрий, так как способен окисляться и восстанавливаться, не связывая при этом кислород; активатор апоптоза [93–95], так как при определенных условиях он может отсоединяться от мембраны, переходя в раствор в межмембранном пространстве, а затем из него в цитозоль, и тем самым активировать апоптоз.

Кардиолипин (дифосфатидилглицерол) является важным компонентом внутренней мембраны митохондрий в клетках эукариот (животных и растений) и составляет примерно 1/5 доли их липидного состава [96]. Он обнаружен даже в мембранах микроорганизмов (бактерий) [97]. Фосфолипиды этого типа имеют димерную структуру, в которой два фосфатидилглицерола соединены с глицеролом. В состав кардиолипина (CL) входят четыре длинные цепи жирных кислот (хвостовая часть) и два остатка ортофосфорной кислоты  $H_3PO_4$  (головная часть). Каждая из его четырех алкильных цепей  $C_{18}$  в большинстве животных тканей имеет две ненасыщенные связи, а каждая фосфатная группа CL имеет возможность связать один протон [98]. При нормальных физиологических условиях в организме человека ( $pH \approx 7$ ) CL имеет один отрицательный элементарный заряд, так как одна из его фосфатных групп депротонируется. Благодаря специфике физико-химических свойств фосфолипиды выполняют очень важную роль в построении и функционировании биологических мембран. Это, прежде всего, связано с наличием в их молекулах полярных и неполярных частей. В связи с этим длинные массивные хвостовые части молекул фосфолипидов гидрофобны, а их кислородосодержащие головные части гидрофильны, при этом головные части сравнительно легко подвергаются

депротонированию, приобретая отрицательный заряд. Кардиолипиды относятся к сложным (многокомпонентным) липидам, продуктами их гидролиза являются не только спирты и карбоновые кислоты, но и другие вещества, например фосфорная кислота и углеводы.

В липидных мембранах ламеллярного типа фосфолипиды формируют плоский двойной слой, при этом их неполярные хвостовые части (гидрофобные жирнокислотные ацильные цепи) направлены к средней линии бислоя параллельно друг другу, а их полярные головные части (гидрофильные остатки фосфорной кислоты, соединенные с добавочной группой атомов различной химической природы) погружены в воду. Липидные мембраны мицеллярного типа построены по такому же принципу, но с тем отличием, что мембрана имеет радиус кривизны, так как неполярные хвостовые части фосфолипидов направлены не параллельно, а по радиусам к общему центру [18]. Молекулы фосфолипидов в модели липидного бислоя удерживаются вместе сильными гидрофобными взаимодействиями и слабыми силами Лондона-Ван-дер-Ваальса. Жидкостно-мозаичная модель [18, 99] клеточных мембран расширяет модель липидного бислоя тем, что учитывает встроенные в липидный бислой молекулы белков, гидрофобные части которых погружены вовнутрь мембраны, а ионизованные остатки аминокислот расположены на ее поверхности. При физиологических температурах бислойные мембраны находятся в жидкокристаллическом состоянии: углеводородные остатки вращаются вдоль своей продольной оси и благодаря латеральной диффузии перемещаются в плоскости одного слоя, а также изредка перескакивают из одного слоя в другой. Такое трансмембранное движение называется флип-флоп переход, оно не нарушает прочных гидрофобных связей.

О строении и функциях митохондрий обширные сведения содержатся в [100–102], а для мембранно-связанного комплекса цитохрома *c* и кардиолипина (*Cyt-CL*) детальный анализ его структурных особенностей и возникающей у этого комплекса, благодаря изменениям в его белковой части (*Cyt c*), пероксидазной активности представлен в [78]. Краткий обзор экспериментальных работ, который показывает эволюцию представлений о структуре комплекса *Cyt-CL* и способах его связывания с мембраной, содержится в [103].

Стехиометрический состав комплекса *Cyt-CL* был изучен в работе [77] методом малоуглового рентгеновского рассеяния при исследовании микрокристаллического осадка, содержащего

такие комплексы, а также в работе [104] хемиллюминесцентным методом при исследовании изменения растворимости комплексов Cyt-CL в зависимости от концентрации цитохрома *c* и pH среды. Было показано, что число молекул кардиолипина ( $N_{CL}$ ), связанных с одной молекулой цитохрома *c*, практически постоянно в интервале кислотности от pH = 3,7 до pH = 5,5, а при увеличении значения pH в интервале от pH = 5,5 до pH = 7,4 число  $N_{CL}$  растет. Так, при значении pH = 7,4, что соответствует кислотности межклеточной жидкости и крови в организме человека,  $N_{CL}$  равно  $59 \pm 7$ . Из [104] также следует, что процесс образования комплекса Cyt-CL достаточно быстрый по сравнению с последующими более медленными реакциями каталитического цикла комплекса Cyt-CL (см. рис. 1). Значит, можно считать, что при наличии в модельной системе всех необходимых компонентов сразу начинаются реакции каталитического цикла (1)–(5), так как сборка комплексов Cyt-CL с оптимальным числом  $N_{CL}$  уже произошла. Детальному изучению пероксидазной функции комплекса Cyt-CL посвящен ряд работ [12–15, 73–78], в которых отмечается, что по мере увеличения числа молекул CL, входящих в состав комплекса Cyt-CL, вязкость в зоне их связывания с Cyt *c* будет постепенно расти. Из совокупности экспериментальных данных [12–15, 73–78] следует хорошо известная схема, согласно которой Cyt *c* изначально прикреплен к поверхности липидного бислоя мембран в основном электростатическими силами (головные части липидов заряжены отрицательно, а поверхность цитохрома *c* – положительно). Затем Cyt *c* довольно быстро, как указано в [104], собирает вокруг себя другие молекулы CL, остающиеся на поверхности мембран в виде кластеров. По мере присоединения новых молекул кардиолипина вклад гидрофобных взаимодействий растет, и молекулы CL начинают формировать моноламеллярную мицеллу вокруг цитохрома *c* – при этом поверхность мицеллы становится все более гидрофобной. Как следует из работ [15, 77, 104], в митохондриях цитохром *c* скорее всего не просто прикрепляется к поверхности липидного бислоя мембран: он способен «наматывать» слой молекул кардиолипина на себя, образуя сферические наноструктуры (наносферы) Cyt-CL. Сами по себе эти наносферы гидрофобны и не выходят в водный раствор, локализуясь внутри липидного бислоя мембраны. Таким образом, благодаря гидрофобным взаимодействиям образовавшийся мицеллярный комплекс начнет втягиваться

внутрь мембраны, так чтобы минимизировать общую энергию системы «мембрана + комплекс Cyt-CL» (при этом центральная часть комплекса Cyt-CL будет стремиться разместиться симметрично относительно средней линии липидного бислоя мембраны). Размеры белковой глобулы цитохрома *c*, находящегося внутри комплекса Cyt-CL, увеличиваются [77]. В пользу «набухания» белковой глобулы Cyt *c* напрямую свидетельствуют результаты измерения флуоресценции тирозиновых и триптофановых остатков цитохрома *c* при связывании последнего с кардиолипином [73–78]. В свою очередь, «набухание» белковой глобулы цитохрома *c* в результате совместного воздействия на нее всего монослоя присоединенного кардиолипина приводит к изменению конформации полипептидной цепи в Cyt *c* и появлению у него новых каталитических свойств [15, 73–78, 105], а также меняется и степень окисления в железо-порфирине.

Следует отметить, что вне комплекса с CL Cyt *c* проявляет чрезвычайно слабую пероксидазную активность [106], а в комплексе с CL его пероксидазная активность существенно возрастает, делая его активным участником мембранных процессов. Хотя не все детали строения комплекса Cyt-CL еще прояснены [107], но уже можно считать, что сборка самого комплекса осуществляется благодаря электростатическим взаимодействиям одного или нескольких положительно заряженных остатков аминокислот (лизина) с отрицательно заряженными фосфатными группами CL и гидрофобным взаимодействиям одного или нескольких остатков жирных кислот CL с аполярными сайтами белка, так что они участвуют в образовании «расплавленной» белковой глобулы. Каталитический механизм реакции также полностью еще не выяснен – на данный момент считается, что тирозильные радикалы (Tyr•), образующиеся на остатках тирозина, являются реактивными промежуточными продуктами цикла пероксидазы, приводящими к переокислению CL. В результате чего высококонсервативный Tyr67 является вероятным донором электронов (радикальным акцептором) в оксигеназной полуреакции пероксидазного комплекса Cyt-CL [105]. В конечном итоге, благодаря отмеченным структурным особенностям, комплексы Cyt-CL, погруженные в липидный слой мембраны митохондрий, способны осуществлять катализ липидной пероксидации.

Обратим также внимание на работу [14], в которой впервые была показана связь апоптоза клетки с пероксидазной активностью Cyt *c*,

формирующего комплексы с CL. Поскольку в составе комплексов Cyt-CL цитохром *c* функционирует как пероксидаза, катализируя перекисное окисление CL в митохондриальной мембране, то это, в свою очередь, способствует высвобождению Cyt *c*, а также других проапоптотических факторов из митохондрий. Таким образом, перекисное окисление липидов (включая и CL) может приводить как к увеличению пула Cyt *c*, доступного для выпуска, так и к изменению проницаемости (пермеабиллизации) наружной мембраны митохондрий. В результате чего, в связи с пермеабиллизацией митохондриальной мембраны активируется высвобождение нескольких проапоптотических белков, включая Cyt *c* [108], из межмембранного пространства митохондрий в цитозоль, а это ведет к активации специфических протеолитических ферментов каспаз (цистеин-зависимые аспартат-направленные протеазы) [109]. Каспазы расщепляют пептидную связь между аминокислотами в белках, при этом входящий в их активный центр цистеин, боковая цепь которого представлена тиольной группой, нуклеофильно атакует и расщепляет целевой белок только после остатка аспарагиновой кислоты.

В митохондриях живой клетки, как отмечается в работе [107], существуют по меньшей мере два способа регулирования пероксидазной активности комплекса Cyt-CL. Один из них связан с возможностью регулирования через фосфорилирование тирозинового остатка белка, что осуществляется переносом фосфатной ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) группы от молекулы АТФ (аденозинтрифосфата) на тирозиновый остаток белка благодаря специальным ферментам тирозинкиназам [110]. Известно, что тирозинное фосфорилирование является ключевым фактором в сигнальной трансдукции и регуляции ферментативной активности, так как может усилить или «отключить» функциональную активность многих клеточных белков, ферментов и белков сигнальных путей [111, 112]. В случае с комплексом Cyt-CL также было установлено, что фосфорилирование остатка тирозина Tyr48 в Cyt *c* может служить в качестве переключателя апоптоза через отключение процесса перекисного окисления CL [113]. Второй способ связан с интересной возможностью регулирования процесса перекисного окисления CL, что обеспечивается участием липидных гидропероксидов (вместо  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) в качестве источника окислительных эквивалентов, попадающих в каталитический цикл пероксидазы. Действительно, оказывается, что гидропероксиды CL (и жирных кислот) могут

ускорить процесс перекисного окисления CL более чем на два порядка [114]. В конечном итоге процесс перекисного окисления CL становится независимым от подачи окислительных эквивалентов поврежденными митохондриями [115]. Отметим также, что возможно существование еще одного (третьего) способа регуляции пероксидазной активности комплекса Cyt-CL, который связан с возможностью включения в состав комплекса Cyt-CL одной или нескольких молекул липофильного антиоксиданта. Теоретически этот новый способ регуляции будет нами рассмотрен ниже.

Таким образом, в здоровом организме апоптоз является неотъемлемой составной частью процессов развития и гомеостаза зрелой ткани, отвечая за нормальный ход процесса смены клеток. Механизм апоптоза практически универсален для млекопитающих. Запуск этого механизма происходит в тех случаях, когда вредное воздействие недостаточно сильно, чтобы вызвать патологическую форму клеточной смерти – некроз [79–81].

Процесс ПОЛ, который, в частности, может инициировать апоптоз, непосредственно обуславливает патологические нарушения барьерных свойств липидного бислоя мембран. В целом, процесс перекисного окисления субстрата, в частности ПОЛ, включает три стадии:

- стадия инициации – начинается генерация первичных свободных радикалов субстрата благодаря катализатору с участием АФК либо из-за действия внешнего фактора, например радиации или излучения;
- свободнорадикальная стадия – идет развитие образовавшейся радикальной цепи с последующим ее разветвлением;
- перекисная стадия – происходит образование перекисей липидов и других органических соединений.

Перейдем теперь непосредственно к описанию кинетики пероксидазного процесса с участием комплекса Cyt-CL, который, как было отмечено выше, можно классифицировать как пероксидазу. За основу описания каталитического цикла для комплекса Cyt-CL возьмем схему реакций, предложенную в [15]. На рис. 1 графически представлена схема реакций пероксидазной активности комплекса Cyt-CL, осуществляемой в рамках его каталитического цикла (ферментативный путь). Продолжение процесса ПОЛ, вызываемого пероксидазной активностью комплекса Cyt-CL, происходит на неферментативном пути с участием липидных радикалов, выход которых инициирован в каталитическом цикле. Первой стадии работы каталитического цикла соответствует

взаимодействие комплекса Cyt-CL с  $H_2O_2$ , что приводит как к изменению протеиновой части Cyt *c*, так и степени окисления атома железа в порфириновом кольце. На рис. 1 показано, как комплекс Cyt-CL (на схеме он обозначен, как состояние E) активируется перекисью водорода, последовательно проходя через активированные состояния  $E_1$  и  $E_2$ . Согласно [15], комплекс Cyt-CL является феррипероксидазой ( $Pr-Por-Fe^{3+}$ ), и здесь Pr – белковая часть комплекса Cyt-CL, Por – порфирин,  $Por-Fe^{3+}$  – гем ферри-цитохрома *c*.

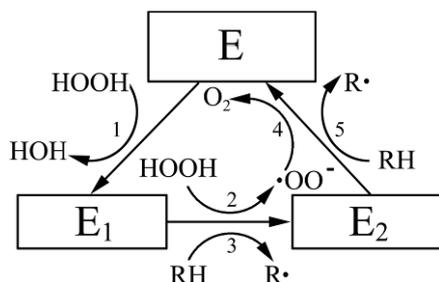
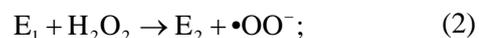


Рис. 1. Каталитический цикл, описывающий пероксидазную активность комплекса Cyt-CL.

Взаимодействие комплекса Cyt-CL (в состоянии E) с  $H_2O_2$  при переносе двух электронов от гемопротейна на  $H_2O_2$  приводит к образованию первого активированного комплекса – соединения I ( $Pr\cdot-Por-Fe^{4+}=O$ , здесь  $Pr\cdot$  – радикал тирозинового либо триптофанового остатка цитохрома *c*), обозначенного на схеме, как  $E_1$ . На второй стадии пероксидазного цикла одноэлектронное окисление субстрата (на схеме он обозначен как RH) приводит к образованию свободного радикала  $R\cdot$  и второго активированного комплекса – соединения II ( $Pr\cdot-Por-Fe^{3+}$  либо  $Pr-emH-Fe^{4+}=O$ ), обозначенного на схеме, как  $E_2$ . На третьей стадии при одноэлектронном восстановлении комплекса Cyt-CL из состояния  $E_2$  пероксидазный цикл замыкается с возвращением комплекса Cyt-CL в исходное неактивированное состояние E. При этом протекают следующие реакции:



Молекула субстрата (липида) обозначена здесь в общем виде как RH, так что для липидных молекул типа LH символ *R* обозначает основную (депротонированную) часть молекулы липида *L*, а для липидных молекул типа  $LH_2$  под *R* следует понимать радикальную группу H-L.

В целом, процесс ПОЛ идет как по ферментативному (каталитическому) пути –

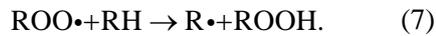
реакции (1)–(5) для субстрата RH (рис. 1) и реакции (8)–(8а) для субстрата ROOH, так и по неферментативному пути – реакции (6), (7), (9), (10)–(12), которые будут выписаны ниже. Таким образом, кроме молекул липида, на ферментативном пути реакции будут задействованы и продукты его окисления (гидропероксиды), так как для комплекса Cyt-CL гидропероксид липида является субстратом, как и сам липид [116], то есть эти субстраты будут конкурирующими. В работе [116] экспериментально исследована кинетика накопления продуктов ПОЛ в присутствии  $\alpha$ -токоферола или одного из его гомологов для тетралионеил-кардиолипина (TLCL), который, как «двойной» фосфолипид, условно относится к типу  $LH_2$ . TLCL имеет четыре жирнокислотные цепи вместо обычных двух. Его хвост состоит из двух двойных частей, так что с каждой стороны от головной части молекулы имеется по паре цепей жирных кислот, в отличие от обычных фосфолипидов, хвостовые части которых содержат по одной жирнокислотной цепи. В частности, в [116] было показано, что в ходе процесса липидной пероксидации образуются четыре продукта окисления: сначала – гидропероксид TLCL-OOH, затем – гидроксид TLCL-OH (восстановленный продукт) и двойной гидропероксид HOO-TLCL-OOH, а из них в завершение – продукт HO-TLCL-OOH, то есть процесс окисления по двум хвостовым частям TLCL идет независимо. Заключительная восстановленная форма HO-TLCL-OH не наблюдалась, по всей видимости, из-за достаточно короткого времени протекания реакции – 10 минут. Как отмечено в [116], при избытке перекиси водорода в основном будет идти накопление гидропероксидов, а при истощении запаса перекиси водорода пероксидазный цикл переключится на утилизацию молекул гидроперекисей.

В рассматриваемом случае вклад в то, насколько велика будет конечная концентрация продуктов ПОЛ – гидропероксидов ROOH, вносят как реакции разложения гидропероксидов, катализируемые комплексом Cyt-CL (реакции (8) и (8а), приведенные ниже), так и неферментативные реакции цепного окисления липидов, которые идут благодаря наличию радикала  $R\cdot$ , образующегося на ферментативном пути процесса ПОЛ (реакции (3) и (5)).

Для реакций жидкофазного окисления при взаимодействии радикалов  $R\cdot$  с молекулярным кислородом  $O_2$ , присутствующим обычно в жидкой фазе в достаточном количестве, с очень высокой скоростью образуются пероксильные радикалы  $ROO\cdot$  ( $k_6 \sim 10^7 \div 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) [18]. Итак, первая реакция продолжения цепи имеет вид:



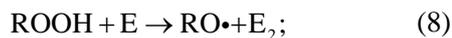
Затем происходит еще одна реакция продолжения цепи, приводящая к образованию 1-го продукта окисления липида – гидропероксида ROOH:



Далее цепная реакция активно развивается благодаря чередованию реакций (6) и (7).

Радикалы ROO• общепринято считать дающими главный вклад в процесс ПОЛ, так как только с их участием, согласно (6) и (7), идет продолжение цепи [18]. Отметим также, что из-за существенно более высокой реакционности у ROO•, чем у R•, для величин их концентраций будет иметь место неравенство  $[R\cdot] \ll [ROO\cdot]$ .

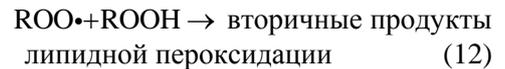
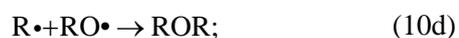
Далее на ферментативном пути мы будем учитывать еще один субстрат изучаемой пероксидазы (липидный гидропероксид) и его реакции, приводящие к вырожденному разветвлению первичной радикальной цепи:



Таким образом, для субстрата ROOH будем учитывать только его каталитический распад, согласно реакциям (8) и (8a), дающим преобладающий вклад. Термический распад ROOH, то есть реакцию без участия катализатора  $ROOH \rightarrow RO\cdot + HO\cdot$ , мы здесь не рассматриваем, так как в физиологических условиях ее протекание намного менее вероятно, чем каталитический распад. Другие реакции, например:  $ROOH + ROO\cdot \rightarrow RO\cdot + ROH + O_2$  и  $ROOH + R\cdot \rightarrow ROH + RO\cdot$ , которые могли бы привести к разветвлению цепи, как и реакции (8) и (8a), имеют еще более низкую вероятность реализации в живой клетке. То есть, далее будут учитываться только реакции (8) и (8a), дающие вырожденное разветвление цепи. В итоге, цепная реакция продолжается уже с участием радикала RO• [18], приводя к образованию 2-го продукта окисления липида – гидроксида ROH:



Далее выпишем возможные реакции рекомбинации липидных радикалов:



При дальнейшем рассмотрении реакциями (10a)–(10e) можно пренебречь из-за их малого вклада в кинетику исследуемого процесса по сравнению с реакцией (10), так как реакция (10) имеет наибольшую константу скорости реакции и выполняется неравенство:  $[ROO\cdot] \gg [R\cdot]$ ,  $[RO\cdot]$ . Отметим также, что реакция (10) обычно идет с последующим диспропорционированием и излучением кванта света  $h\nu$  [18, 91]:  $ROOOOR \rightarrow R'OH + R''=O + O_2 + h\nu$ .

Как известно, реакции рекомбинации радикалов отличаются значительным выделением энергии, так что продукт может оказаться в возбужденном состоянии и его переход в основное состояние может быть излучательным [18, 91]. Именно реакция (10) и приводит к появлению характерной люминесцентной вспышки, сигнализирующей о появлении радикалов ROO•. Измерение параметров данного излучения проводят методом хемилюминесценции [18, 91], и полученная таким образом информация помогает выяснить детали кинетики процесса ПОЛ и прояснить некоторые особенности его механизма. В общем случае реакции (10)–(11) благодаря излучению кванта хемилюминесценции можно использовать в роли оптических индикаторов кинетики процесса ПОЛ.

Резюмируя вышесказанное, подчеркнем, что в случае комплекса Cyt-CL субстратом являются как жирнокислотные цепи полиненасыщенных жирных кислот, входящие в состав фосфолипидов (типа LH или LH<sub>2</sub>), так и продукты реакций ПОЛ – гидроперекиси липидов (LOOH). Промежуточными продуктами реакций пероксидазного процесса являются также липидные радикалы (L•, LOO• и LO•). При этом надо иметь в виду, что в результате цепной реакции (6)–(7) на один липопероксильный радикал LOO• в биологических мембранах приходится образование достаточно большого количества молекул гидропероксида LOOH. Пока комплекс Cyt-CL не разрушен накоплением окисленных продуктов вблизи него, он будет продолжать разлагать молекулы LH и образующиеся в процессе ПОЛ молекулы LOOH, генерируя при этом новые радикалы. А поскольку после разветвления радикальной цепи процесс ПОЛ ускоряется, то при недостатке антиоксидантов в мембране он может приобрести взрывоподобный характер.

Таким образом, сочетание реакций разложения гидропероксидов, катализируемых комплексом Cyt-CL, с неферментативными

реакциями цепного окисления липидов, может привести к сильному локальному переокислению в биомембране. И это, как отмечается в работе [107], может стать причиной образования поры (даже без участия проапоптотических факторов), через которую затем возможен выход цитохрома *c* из митохондрии через межмембранное пространство в цитозоль, и тем самым будет инициирован процесс апоптоза клетки.

В связи с тем, что присутствие комплекса Cyt-CL внутри мембранного слоя заметно искривляет поверхность мембраны, обсудим те механизмы и усиливающие их факторы, которые препятствуют накоплению липидных радикалов, а значит, и продуктов окисления липидов, непосредственно в той зоне мембраны, где расположен комплекс Cyt-CL и поверхность мембраны наиболее сильно искривлена. При быстром латеральном перемещении липидных радикалов в мембране они не накапливаются в непосредственной близости от комплекса Cyt-CL, что обеспечивает более равномерное протекание реакций неферментативного пути пероксидазного процесса. Различные типы движений молекул в мембране вносят в латеральную подвижность свой вклад. Основным механизмом, препятствующим сильному локальному переокислению в биомембранах, по всей видимости, является механизм межмолекулярной эстафетной передачи радикального центра в углеводородной зоне мембран:  $R\bullet + RH \rightarrow RH + R\bullet$  [18]. Его высокий вклад в латеральную подвижность липидных радикалов обеспечивают три фактора: очень быстрое вращение липидных молекул вдоль своей продольной оси, способность липидных молекул легко выполнять внутримолекулярные перегруппировки и высокая плотность упаковки молекул в липидном бислое мембран. Другие типы движения молекул и радикалов липидов в мембране (латеральная диффузия и трансмембранные флип-флоп переходы) дают заметно меньший вклад. На плоских участках биомембран скорость латеральной диффузии молекул липидов достаточно высока, что способствует более равномерному распределению концентраций липидных молекул и радикалов в клеточной мембране (в удалении от комплекса Cyt-CL), но в искривленных участках мембраны (в местах расположения комплексов Cyt-CL) скорость латеральной диффузии существенно падает [18] (почти на два порядка). Вклад трансмембранных флип-флоп переходов в установление более равномерной концентрации липидных радикалов в мембране еще более низкий, чем для латеральной диффузии. Несмотря на то, что в искривленных участках

мембраны частота трансмембранных флип-флоп переходов значительно увеличивается [18] (более чем на два порядка), она по величине остается чрезвычайно низкой. Отметим также, что, согласно [18], механизм межмолекулярной эстафетной передачи, совместно с механизмом внутримолекулярной изомеризации (перестройки) радикала, лежит в основе реализации защитного действия низкомолекулярных жирорастворимых антиоксидантов (токоферолов, токотриенолов, убихинонов и каротиноидов).

#### УЧЕТ ВЛИЯНИЯ $\alpha$ -ТОКОФЕРОЛА И ЕГО ГОМОЛОГОВ НА ПЕРОКСИДАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСА Cyt-CL

Витамин Е ( $\alpha$ -токоферол) и его гомологи являются прямыми перехватчиками СР и тем самым защищают клетку от оксидативного стресса, который возникает при отклонении от нормального уровня АФК, участвующих в клеточном метаболизме. Изучению различных защитных свойств семейства витамина Е (токоферолы и токотриенолы) посвящено очень много исследований – витамин Е вполне заслуженно считают главным жирорастворимым антиоксидантом [4, 117–123].

Отметим, что токоферолы в биологических мембранах выполняют структурообразующую функцию через модифицирующее действие на фосфолипидные бислои. Важно также обратить внимание на способность  $\alpha$ -токоферола к образованию комплексов с фосфолипидами. Общий мембранотропный эффект токоферола заключается в его способности быть не только перехватчиком липидных радикалов, но и модулятором физических свойств липидного бислоя, поддерживая необходимую плотность упаковки фосфолипидов и ограничивая доступ кислорода к жирнокислотным цепям, а также он обеспечивает условия для выполнения в биомембранах антиоксидантной функции другими антиоксидантами. Мембранотропный эффект токоферолов проявляется в том, что их взаимодействие с насыщенными фосфолипидами «разрыхляет» липидный бислой, а с ненасыщенными фосфолипидами, напротив, приводит к его уплотнению, то есть снижает проницаемость мембран, а также токоферолы связывают свободные жирные кислоты, избыток которых дестабилизирует мембранную структуру. Следует подчеркнуть, что мембранотропный эффект  $\alpha$ -токоферола, способствуя уплотнению липидного бислоя, обеспечивает также дополнительное увеличение скорости эстафетной передачи радикальных центров, которая препятствует накоплению СР липидов и

продуктов их окисления непосредственно в зоне расположения комплекса Cyt-CL.

Таким образом, мы предполагаем, что присутствие  $\alpha$ -токоферола в составе комплекса Cyt-CL с учетом оказываемого  $\alpha$ -токоферолом мембранотропного эффекта будет способствовать уплотнению комплекса Cyt-CL и вхождению в его состав еще нескольких молекул CL. А так как пероксидазная активность комплекса растет пропорционально числу молекул CL [104], то присутствие  $\alpha$ -токоферола в составе комплекса Cyt-CL усилит его пероксидазную активность. Таким образом, наличие  $\alpha$ -токоферола в составе комплекса Cyt-CL открывает еще один способ (вышеупомянутый нами как третий способ) регуляции пероксидазной активности такого рода комплексов.

Отметим еще одну характерную особенность  $\alpha$ -токоферола, указанную в [4]:  $\alpha$ -токоферол наиболее активно тушит именно пероксильные радикалы и значительно слабее – алкильные радикалы. А так как пероксильный радикал ROO• является самым реакционноспособным радикалом, в сравнении с другими липидными радикалами – алкильным R• и алкоксильным RO•, то витамин E, присутствующий в мембранах, является очень эффективным тушителем цепной реакции, защищая мембрану от ПОЛ. При тушении липидных радикалов  $\alpha$ -токоферолом после донации протона образуется  $\alpha$ -токофероксил-радикал, который очень стабилен и к тому же способен также взаимодействовать с липидными радикалами, образуя достаточно безопасные для клетки окисленные молекулярные продукты. В живой клетке восстанавливать  $\alpha$ -токоферол из окисленного или радикального состояния до его более активной первоначальной формы способны витамин C, глутатион и убихинон коэнзим Q<sub>10</sub> – в этом проявляется синергия в системе АОЗ.

Антиоксиданты, обрывая радикальные цепи и тормозя процесс образования продуктов окисления, необходимы как оперативное средство регуляции пероксидазной активности комплекса Cyt-CL. Поскольку образование избыточного количества липидных гидропероксидов из-за вышеописанных радикальных реакций является толчком к запуску апоптоза [14], то с помощью антиоксидантов можно эффективно контролировать процесс ПОЛ в основном через его свободнорадикальную стадию, а значит, добиться контроля над процессом апоптоза в целом [124].

В простейшем случае описание кинетики ПОЛ с участием комплекса Cyt-CL и

$\alpha$ -токоферола или одного из его гомологов (PMS и C<sub>6</sub> – см. рис. 2) укладывается в рамки аналогичной схемы каталитических реакций (рис. 1) и реакций с участием CP, подобных описанным выше, но с антиоксидантом в роли дополнительного субстрата. В отличие от стандартного подхода к учету действия антиоксиданта, когда его учитывают только как перехватчика CP на неферментативном пути процесса ПОЛ, здесь мы в дополнение к его антирадикальной активности включим и реакции, возможные с его участием на ферментативном пути, описывающем пероксидазную активность комплекса Cyt-CL. Это, прежде всего, связано с нашим предположением о том, что в состав комплекса Cyt-CL при его нахождении внутри мембраны возможно вхождение одной или нескольких молекул жирорастворимого антиоксиданта. Такая постановка задачи формулируется впервые (пока не найдет своего экспериментального подтверждения или опровержения) и пока рассматривается теоретически, как возможный третий способ регуляции пероксидазной активности в дополнение к тем двум, что обсуждались ранее и отмечены в [107].

Итак, будем считать, что молекула антиоксиданта, для которой введем обычное обозначение InH, также задействована на ферментативном пути процесса ПОЛ, показанном на рис. 1, при этом символ для молекулы липида RH заменяется символом для молекулы антиоксиданта InH, которым, в частности, может быть или  $\alpha$ -токоферол или один из его гомологов с укороченной боковой цепью (хвостом): C<sub>6</sub> и PMS. В итоге, с комплексом Cyt-CL в состояниях E<sub>1</sub> и E<sub>2</sub> антиоксидант InH участвует в реакциях, которые полностью аналогичны соответствующим реакциям комплекса Cyt-CL с липидом RH (см. реакции (20) и (21), приведенные ниже, и реакции (3) и (5) соответственно).

Далее приведем структурные формулы для  $\alpha$ -токоферола и его гомологов:

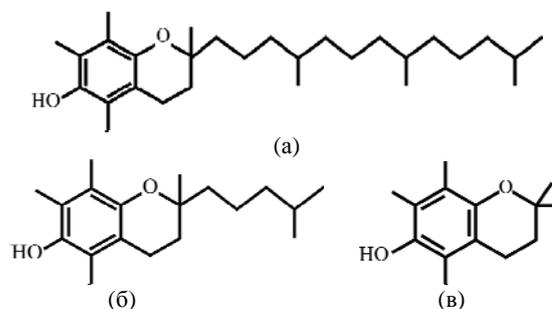
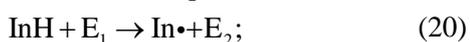


Рис. 2. (а)  $\alpha$ -токоферол (витамин E) и его гомологи с укороченным хвостом: (б) 2,5,7,8,-Tetramethyl-2-(4-methylpentyl)-6-chromanol (C<sub>6</sub>) и (в) 2,2,5,7,8-Pentamethyl-6-chromanol (PMS) соответственно.

Отметим, что как  $\alpha$ -токофероксил-радикал, так и радикальные формы гомологов  $\alpha$ -токоферола с укороченным хвостом ( $C_6$  и РМС) являются стабильными радикалами, и они также активно участвуют в реакциях с радикалами липидов, нейтрализуя их. Как и для  $\alpha$ -токоферола, окисленные и радикальные формы его гомологов  $C_6$  и РМС с помощью аскорбиновой кислоты или убихинона коэнзима  $Q_{10}$  могут быть легко восстановлены.

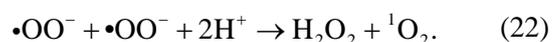
Перед тем как привести реакции, которые учитывают действие антиоксиданта на изучаемый пероксидазный процесс, кратко обсудим вопрос о равномерном распределении антиоксиданта в мембране, который важен для реализации антиоксидантами их защитного действия. Так как размер молекулы, масса и длина хвостовой части у  $\alpha$ -токоферола малы (а у его гомологов еще меньше), то для них скорость латеральной диффузии значительно выше, чем для молекул липидов, и при этом она не сильно падает на искривленных участках мембраны, то есть в местах расположения комплексов Cyt-CL. Высокая латеральная подвижность молекул  $\alpha$ -токоферола и  $\alpha$ -токофероксил-радикала (и их гомологов) обеспечивает их равномерное распределение в мембране, способствуя эффективной защите как комплекса Cyt-CL, так и остальной части мембраны от липидных радикалов и перекисления. Отметим, что эстафетный механизм для  $\alpha$ -токоферола:  $In\bullet + InH \rightarrow InH + In\bullet$  также вносит вклад в поддержание равномерного распределения молекул  $\alpha$ -токоферола и  $\alpha$ -токофероксил-радикала в мембране, но вклад этого механизма не столь велик, как для липидов, так как среднее расстояние между молекулами  $\alpha$ -токоферола намного больше, чем для липидных молекул. Следовательно, для низкомолекулярных антиоксидантов главный вклад в обеспечение их высокой подвижности вносит латеральная диффузия.

Для теоретического описания антиоксидантной активности  $\alpha$ -токоферола (и его гомологов  $C_6$  и РМС) в данной работе используется следующие реакции:



Отметим, что при высокой концентрации антиоксиданта обратная реакция для (13) начинает давать заметный вклад в кинетику исследуемого процесса, в этом случае антиоксидант будет проявлять прооксидантную активность. В этой работе при составлении общей системы дифференциальных уравнений мы эту реакцию не будем принимать во внимание, тем самым подразумевая, что концентрация антиоксиданта не столь высока.

Завершая описание общей схемы реакций исследуемого процесса, дополнительно включим в нее еще одно уравнение реакции для учета того факта, что супероксид анион-радикал может спонтанно дисмутировать в молекулярный кислород (время жизни супероксид анион-радикала в биологических субстратах составляет около  $10^{-6}$  с):



Для спонтанно идущей реакции (22) при  $pH = 7$  константа скорости реакции  $k \sim 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Образующийся в реакции (22) синглетный кислород  ${}^1O_2$  быстро переходит в триплетный  $O_2$  либо с излучением кванта хемилюминесценции, либо при его физическом или химическом тушении (например, как было отмечено во Введении, с очень высокой скоростью его тушат  $\beta$ -каротин или  $\alpha$ -токоферол).

В итоге, учитывая вклады прихода и ухода по каждому из задействованных реагентов в реакциях (1)–(22), получим систему дифференциальных уравнений, описывающих кинетику исследуемого пероксидазного процесса:

$$\begin{aligned} dE_1/dt &= k_1XE - k_2XE_1 - k_3SE_1 + k_{8a}PE_2 - k_{20}I_1E_1; \\ dE_2/dt &= k_2XE_1 + k_3SE_1 - k_4R_0E_2 - k_5SE_2 + \\ &+ k_8PE_1 - k_{8a}PE_2 + k_{20}I_1E_1 - k_{21}I_1E_2; \\ dE/dt &= -k_1XE + k_4R_0E_2 + k_5SE_2 - k_8PE_1 + k_{21}I_1E_2; \\ dR/dt &= k_3SE_1 + k_5SE_2 - k_6YR + k_7SR_1 + \\ &+ k_9SR_2 - k_{11}R_0R - k_{13}I_1R - k_{16}I_2R; \\ dR_0/dt &= k_2XE_1 - k_4E_2R_0 - k_{11}RR_0 - k_{22}R_0^2; \quad (23) \\ dR_1/dt &= k_6YR - k_7SR_1 - k_{10}R_1^2 - k_{12}P_1R_1 - k_{14}I_1R_1 - k_{17}I_2R_1; \\ dR_2/dt &= k_8PE_1 + k_{8a}PE_2 - k_9SR_2 - k_{15}I_1R_2 - k_{18}I_2R_2; \\ dP_1/dt &= k_7SR_1 - k_8EP_1 - k_{8a}E_2P_1 - k_{12}R_1P_1 + k_{14}I_1R_1; \\ dP_2/dt &= k_9SR_2 + k_{15}I_1R_2; \\ dI_1/dt &= -k_{13}RI_1 - k_{14}R_1I_1 - k_{15}R_2I_1 - k_{20}I_1E_1 - k_{21}I_1E_2; \\ dI_2/dt &= k_{13}RI_1 + k_{14}R_1I_1 + k_{15}R_2I_1 - k_{16}RI_2 - \\ &- k_{17}R_1I_2 - k_{18}R_2I_2 - k_{19}I_2^2 + k_{20}I_1E_1 + k_{21}I_1E_2. \end{aligned}$$

В (23) через  $E_1$ ,  $E_2$  и  $E$  обозначены концентрации двух активных форм и неактивной формы каталитического комплекса Cyt-CL

соответственно, а также введены следующие обозначения для концентраций реагентов:  $X \equiv [\text{H}_2\text{O}]$ ;  $Y \equiv [\text{O}_2]$ ;  $S \equiv [\text{RH}]$ ;  $R_0 \equiv [\bullet\text{OO}^-]$ ;  $R \equiv [\text{R}\bullet]$ ;  $R_1 \equiv [\text{ROO}\bullet]$ ;  $R_2 \equiv [\text{RO}\bullet]$ ;  $P_1 \equiv [\text{ROOH}]$ ;  $P_2 \equiv [\text{ROH}]$ ;  $I_1 \equiv [\text{InH}]$ ;  $I_2 \equiv [\text{In}\bullet]$ . Для катализатора из закона сохранения вещества следует соотношение:  $E_0 = E + E_1 + E_2$ . А если считать, что концентрации веществ  $X$ ,  $Y$  и  $S$  достаточно велики, то в первом приближении можно полагать:  $X = X_0$ ,  $Y = Y_0$  и  $S = S_0$ . В конечном итоге, используя для промежуточных радикальных форм ( $R_0$ ,  $R$ ,  $R_1$ ,  $R_2$ ) условия квазистационарности, несложно привести систему дифференциальных уравнений (23) к более простому виду, удобному для численных расчетов.

Сравнение антиоксидантных активностей  $\alpha$ -токоферола и каждого из его гомологов (РМС и  $\text{C}_6$ ) на основе результатов численного моделирования с использованием системы (23) является отдельным важным исследованием, выходящим за рамки данной работы, и ему будет посвящена вторая часть нашей работы.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ВЫВОДЫ

В нашей работе представлено теоретическое исследование (часть I) процесса липидной перекисидации, идущего при участии комплексов цитохрома  $c$  и кардиолипина, в ходе которого выполнено описание кинетики и механизма данного процесса с учетом влияния антиоксиданта. Помимо этого работа содержит краткий обзор исследований по ключевым моментам функционирования систем АФК и АОЗ в живом организме и исследований свойств и структурных особенностей комплексов Cyt-CL и  $\alpha$ -токоферола. Были затронуты общие вопросы, касающиеся основных компонентов систем АФК и АОЗ, их свойств и возможных каналов взаимного влияния компонентов этих систем как внутренних для каждой из систем, так и перекрестных (межсистемных), существенных для сбалансированного взаимодействия систем АФК и АОЗ. Также были упомянуты наиболее эффективные экспериментальные методы, применяемые в современных биофизических исследованиях.

В теоретической части этой статьи рассмотрены основные реакции, идущие на ферментативном и неферментативном пути процесса ПОЛ, вызванного и протекающего благодаря пероксидазной активности комплекса Cyt-CL. Приведен анализ различных каналов реакций, при этом указаны те из возможных реакций, которыми можно пренебречь, так как они дают наименьший вклад на определенном из

этапов процесса ПОЛ. Следует подчеркнуть, что в связи со спецификой пероксидазного комплекса Cyt-CL и мембранотропным эффектом  $\alpha$ -токоферола, рассматриваемого в роли антиоксиданта, при описании действия антиоксиданта нами были учтены его вклады на обоих путях процесса ПОЛ (ферментативном и неферментативном), в отличие от стандартной схемы описания действия антиоксиданта (антирадикальной активности) только как перехватчика свободных радикалов на неферментативном пути. Таким образом, предложенная кинетическая схема процесса ПОЛ с участием комплексов Cyt-CL, согласно уравнениям реакций (1)–(22), имеет наиболее полный вид, так как включает дополнительные вклады от новых каналов реакций с учетом действия антиоксиданта на ферментативном пути пероксидазного процесса согласно уравнениям (20) и (21). В итоге на основе вышеописанной химической кинетики процесса ПОЛ была получена система дифференциальных уравнений, которая при использовании имеющихся экспериментальных данных дает широкие возможности для численного моделирования. Полученная система дифференциальных уравнений с учетом указанных приближений позволяет, выполняя численное моделирование и сравнивая выходы продуктов окисления липидов, определять и сравнивать эффективность действия различных антиоксидантов (в частности,  $\alpha$ -токоферола и его гомологов) на процесс ПОЛ; находить некоторые неизвестные константы скоростей реакций; оценивать пероксидазную активность комплексов Cyt-CL с разными типами молекул CL и т.д. Результаты и анализ различных вариантов численного моделирования исследуемого процесса будут нами представлены в отдельной статье (часть II).

В заключение дадим структурное представление исследуемого процесса в виде простой топологической схемы. Поскольку процесс липидной перекисидации является сложным и многостадийным, то он, как любая сложная система, может быть подвергнут системно-структурному анализу для выделения основных структурных функциональных субъединиц и выявления связей между ними. Применяя данный подход к исследуемому процессу, можно выделить четыре главные системные субъединицы: входной поток, выходной поток, функциональный блок и регуляторный блок, осуществляющий обратную связь с функциональным блоком. Входной поток – это, прежде всего, ферментативные комплексы Cyt-CL, а также субстраты иссле-

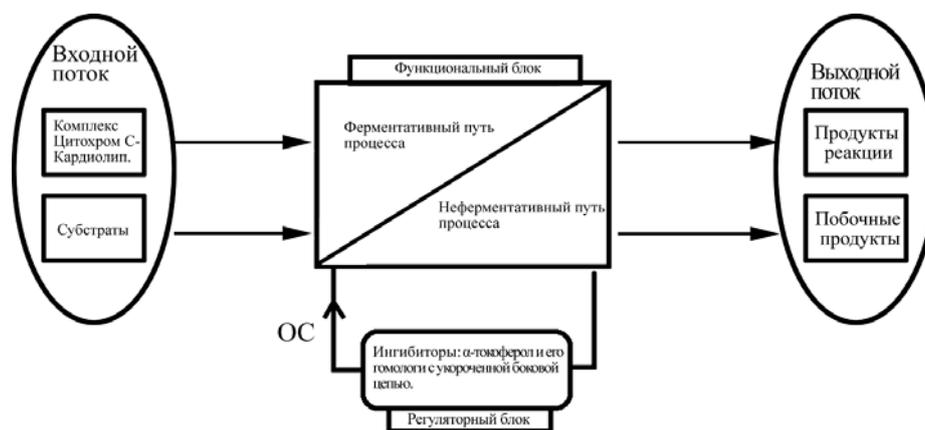


Рис. 3. Топологическая схема модельного процесса липидной перекисидации с участием комплекса Cyt-CL и  $\alpha$ -токоферола (или одного из его гомологов).

дуемого процесса: молекулы липидов, перекиси водорода и молекулярного кислорода. Функциональный блок условно можно разбить на два сопряженных между собой подблока – ферментативный и неферментативный (свободнорадикальный) пути протекания рассматриваемого процесса, аналитически представленного уравнениями реакций (1)–(22), на основе которых получена итоговая система кинетических уравнений (23). Выходной поток представлен основными продуктами реакций пероксидазного процесса и некоторыми побочными продуктами, что достаточно подробно обсуждалось выше. Для учета антиоксидантной активности  $\alpha$ -токоферола и некоторых его гомологов в схему включен регуляторный блок – он представляет ингибирующее влияние антиоксиданта на реакции, протекающие в процессе липидной перекисидации, как механизм обратной связи.

На данной топологической схеме представлена по сути структурно-динамическая модель процесса липидной перекисидации с участием комплекса Cyt-CL, учитывающая  $\alpha$ -токоферол или один из его гомологов с укороченным хвостом как ингибитор процесса ПОЛ.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Halliwell B. and Gutteridge J.M.C. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford: Oxford University Press. 5-th edition, 2015. 905 p.
- Кулинский В. И. *Соросовский Образовательный Журнал*. 1999, **5**(1), 2–7.
- Владимиров Ю.А. Общая патология клетки. В кн.: *Патологическая физиология*. Учеб. для мед. вузов. Под ред. Адо А.Д. М.: Триада, 2000, 16–50.
- Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Кандалинцева Н.В. *Фенольные антиоксиданты в биологии и медицине. Строение, свойства, механизмы действия*. Saarbrücken, Germany: LAP LAMBERT Academic Publishing, 2012. 496 с.
- Oxidative Stress and Diseases*. Lushchak V.I. and Gospodaryov D.V. (Eds). Rijeca, Croatia: InTech, 2012. 624 p.
- Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. *Окислительный стресс. Биохимический и патофизиологический аспекты*. М.: МАИК «Наука/Интерпериодика», 2001. 343 с.
- Principles of free radical biomedicine. Series: Biochemistry Research Trends*. Pantopoulos K. and Schipper H.M. (Eds). New York: Nova Biomedical Books, 2011, Vol. 1, 314 p.
- Winterbourn C.C. *Nat Chem Biol*. 2008, **4**(5), 278–286.
- Ray P.D., Huang B.W. and Tsuji Y. *Cell Signal*. 2012, **24**(5), 981–990.
- Bartosz G. *Biochem pharmacol*. 2009, **77**(8), 1303–1315.
- Segal A.W. *Ann Rev Immunol*. 2005, **23**, 197–223.
- Kagan V.E., Bayir H.A., Belikova N.A., Kapralov O. et al. *Free Radic Biol Med*. 2009, **46**(11), 1439–1453.
- Kagan V.E., Borisenko G.G., Tyurina Y.Y., Tyurin V.A. et al. *Free Radic Biol Med*. 2004, **37**(12), 1963–1985.
- Kagan V.E. Tyurin V.A., Jiang J., Tyurina Y.Y. et al. *Nat Chem Biol*. 2005, **1**, 223–232.
- Проскурнина Е.В., Владимиров Ю.А. Свободные радикалы как участники регуляторных и патологических процессов. В кн.: *Фундаментальные науки – медицине. Биофиз. мед. технол.* В 2-х томах. Под ред. Григорьева А.И., Владимирова Ю.А. М.: МАКС Пресс, 2015, т. 1, 38–71.
- Красновский А.А. *Биофизика*. 1994, **39**(2), 236–250.
- Метелица Д.А. *Активация кислорода ферментными системами*. М.: Наука, 1982. 256 с.
- Рубин А.Б. *Биофизика. В 2-х кн.: учеб. для биол. спец. вузов. Кн. 2. Биофизика клеточных процессов*. М.: Высшая школа, 1987. 303 с.
- Boveris A. *Methods Enzymol*. 1984, **105**, 429–435.
- Pryor W.A. *Annu Rev Physiol*. 1986, **48**, 657–667.

21. Elchuri S., Oberley T.D., Qi W., Eisenstein R.S. et al. *Oncogene*. 2005, **24**(3), 367–380.
22. Muller F.L., Song W., Liu Y., Chaudhuri A. et al. *Free Radic Biol Med*. 2006, **40**, 1993–2004.
23. Li Y., Huang, T.T., Carlson E.J., Melov S. et al. *Nat Genet*. 1995, **11**(4), 376–381.
24. Hayyan M., Hashim M.A., AlNashef I.M. *Chem Rev*. 2016, **116**(5), 3029–3085.
25. Tainer J.A., Getzoff E.D., Richardson J.S., Richardson D.C. *Nature*. 1983, **306**(5940), 284–287.
26. McCord J.M., Fridovich I. *Free Radic Biol Med*. 1988, **5**(5–6), 363–369.
27. Borgstahl G.E., Parge H.E., Hickey M.J., Beyer W.F. et al. *Cell*. 1992, **71**(1), 107–118.
28. Barondeau D.P., Kassmann C.J., Bruns C.K., Tainer J.A. et al. *Biochemistry*. 2004, **43**(25), 8038–8047.
29. Alscher R.G., Erturk N., Heath L.S. *J Exp Bot*. 2002, **53**(372), 1331–1341.
30. Raychaudhuri S.S., Deng X.W. *Bot Rev*. 2008, **66**(1), 89–98.
31. Chance B., Maehly A.C. *Methods in Enzymol*. 1955, **2**, 764–775.
32. Vainshtein B.K., Melik-Adamyany W.R., Barynin V.V., Vagin A.A. et al. *Nature*. 1981, **293**(5831), 411–412.
33. Fita I., Rossmann M.G. *J Mol Biol*. 1985, **185**(1), 21–37.
34. Meister A. *J Biol Chem*. 1988, **263**(33), 17205–17208.
35. Mills G.C. *J Biol Chem*. 1957, **229**(1), 189–197.
36. Krauth-Siegel R.L., Saleh M., Untucht-Grau R., Schirmer R.H., et al. *Eur J Biochem*. 1982, **121**(2), 259–267.
37. Sies H. *Free Radic Biol Med*. 1999, **27**(9–10), 916–921.
38. Lu S.C. *FASEB J*. 1999, **13**(10), 1169–1183.
39. Fernandes A.P., Holmgren A. *Antioxid Redox Signal*. 2004, **6**(1), 63–74.
40. Holmgren A. *J Biol Chem*. 1989, **264**(24), 13963–13966.
41. Rush G.F., Gorski J.R., Ripple M.G., Sowinski J. et al. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1985, **78**(3), 473–483.
42. Ogawa K., Suzuki K., Okutsu M., Yamazaki K. et al. *Immun Ageing*. 2008, **5**, 13-1–13-8.
43. Rhee S., Chae H., Kim K. *Free Radic Biol Med*. 2005, **38**(12), 1543–1552.
44. Claiborne A., Yeh J., Mallett T., Luba J. et al. *Biochemistry*. 1999, **38**(47), 15407–15416.
45. Jönsson T.J., Lowther W.T. *Sub-cell Biochem*. 2007, **44**, 115–141.
46. Budanov A.V., Sablina A.A., Feinstein E., Koonin E.V. et al. *Science*. 2003, **304**(5670), 596–600.
47. Ro S.-H., Nam M., Jang I., Park H.-W. et al. *PNAS USA*. 2014, **111**(21), 7849–7854.
48. Arnér E.S., Holmgren A. *Eur J Biochem*. 2000, **267**(20), 6102–6109.
49. Шахмарданова С.А., Гулевская О.Н., Селецкая В.В., Зеленская А.В. и др. *Журнал фундаментальной медицины и биологии*. 2016, **3**, 4–5.
50. Morel Y., Barouki R. *Biochem J*. 1999, **342**, 481–496.
51. Halliwell B. The antioxidant paradox. *Lancet*. 2000, **355**(9210), 1179–1180.
52. Зайцев В.Г., Островский О.В., Закревский В.И. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2003, **66**(4), 66–70.
53. Vattam D. A., Ghaedian R., Shetty K. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2005, **14**(2), 120–130.
54. Walker R.B., Everette J.D. *J Agric Food Chem*. 2009, **57**(4), 1156–1161.
55. Roy M.K., Koide M., Rao T.P., Okubo T. et al. *Int J Food Sci Nutr*. 2010, **61**(2), 109–124.
56. Pulido R., Bravo L., Saura-Calixto F. *J Agric Food Chem*. 2000, **48**(8), 3396–3402.
57. Meyer A.S., Yi O.S., Pearson D.A., Waterhouse A.L. et al. *J Agric Food Chem*. 1997, **45**(5), 1638–1643.
58. Nijveldt R.J., van Nood E., van Hoorn D.E.C., Boelens P.G. et al. *Am J Clin Nutr*. 2001, **74**, 418–425.
59. Ross J.A., Kasum C.M. *Annu Rev Nutr*. 2002, **22**, 19–34.
60. Middleton E., Jr., Kandaswami C., Theoharides T.C. *Pharmacol Rev*. 2000, **52**(4), 673–751.
61. Soobrattee M.A., Neergheen V.S., Luximon-Ramma A., Aruoma O.I. et al. *Mutat Res*. 2005, **579**(1–2), 200–213.
62. Bors W., Michel C., Saran M. *Methods Enzymol*. 1994, **234**, 420–429.
63. Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J. *J Nutr Biochem*. 2002, **13**, 572–584.
64. van Acker S.A., de Groot M.J., van den Berg D.J., Tromp M.N. et al. *Chem Res Toxicol*. 1996, **9**, 1305–1312.
65. Pietta P.G. *J Nat Prod*. 2000, **63**, 1035–1042.
66. Afanas'ev I.B., Dorozhko A.I., Brodskii A.V., Kostyuk V.A. et al. *Biochem Pharmacol*. 1989, **38**(11), 1763–1769.
67. Cowan M.M. *Clin Microbiol Rev*. 1999, **12**(4), 564–582.
68. Cushnie T.P.T., Hamilton V.E.S., Lamb A.J. *Microbiol Res*. 2003, **158**, 281–289.
69. Cushnie T.P.T., Lamb A.J. *Int J Antimicrob Agents*. 2005, **26**(5), 343–356.
70. Kim H.P., Son K.H., Chang H.W., Kang S.S. *J Pharmacol Sci*. 2004, **96**, 229–245.
71. Азарова О.В., Галактионова Л.П. *Химия растительного сырья*. 2012, **4**, 61–78.
72. Белицкий Г.А., Кирсанов К.И., Лесовая Е.А., Якубовская М.Г. *Успехи молекулярной онкологии*. 2014, **1**(1), 56–68.
73. Vladimirov Y.A. Free radicals in cell life: two sides of the same coin. In: *Oxidative Stress at Molecular, Cellular and Organ Levels*. Johnson P. and Boldyrev

- A.A. (Eds). Trivandrum, India: Research Signpost, 2002, pp. 13–43.
74. Владимиров Ю.А., Демин Е.М., Проскурнина Е.В., Осипов А.Н. *Биологические мембраны*. 2009, **26**(6), 493–504.
  75. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В., Измайлов Д.Ю., Новиков А.А. и др. *Биохимия*. 2006, **71**(9), 1225–1233.
  76. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В., Измайлов Д.Ю., Новиков А.А. и др. *Биохимия*. 2006, **71**(9), 1215–1224.
  77. Владимиров Ю.А., Ноль Ю.Ц., Волков В.В. *Кристаллография*. 2011, **56**(4), 712–719.
  78. Belikova N.A., Vladimirov Y.A., Osipov A.N., Kapralov A.A. et al. *Biochemistry*. 2006, **45**(15), 4998–5009.
  79. Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R. *Br J Cancer*. 1972, **26**(4), 239–257.
  80. Зенков Н.К., Меньшикова Е.Б., Вольский Н.Н., Козлов В.А. *Успехи современной биологии*. 1999, **119**(5), 440–450.
  81. Hengartner M.O. *Nature*. 2000, **407**, 770–776.
  82. Levine Ira N. *Molecular spectroscopy*. New York: John Wiley & Sons, 1975. 491 p.
  83. Лихтенштейн Г.И. *Метод спиновых меток в молекулярной биологии*. М.: Наука, 1974. 256 с.
  84. Ершов Б.А., *Спектроскопия ЯМР в органической химии. Учебное пособие для вузов*. Санкт-Петербург: СПбГУ, 1995. 263 с.
  85. Габуда С. П., Ржавин А. Ф. *Ядерный магнитный резонанс в кристаллогидратах и гидратированных белках*. Новосибирск: Наука, 1978. 160 с.
  86. Yashroy R.C. *J Biosci*. 1990, **15**(4), 281–288.
  87. Caldwell R.L., Caprioli R.M. *Mol Cell Proteomics*. 2005, **4**(4), 394–401.
  88. McDonnell L.A., Heeren R.M. *Mass Spectrom Rev*. 2007, **26**(4), 606–643.
  89. Владимиров Ю.А. *Соросовский Образовательный Журнал*. 2000, **6**(12), 13–19.
  90. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. *Перекисное окисление липидов в биологических мембранах*. М.: Наука, 1972. 252 с.
  91. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В. *Успехи биологической химии*. 2009, **49**, 341–388.
  92. Mavridou D.A., Ferguson S.J., Stevens J.M. *IUBMB Life*. 2013, **65**(3), 209–216.
  93. Ow Y.P., Green D.R., Hao Z., Mak T.W. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008, **9**(7), 532–542.
  94. Liu X., Kim C.N., Yang J., Jemmerson R., Wang X. *Cell*. 1996, **86**(1), 147–157.
  95. Zhivotovsky B., Orrenius S., Brustugun O.T., Døskeland S.O. *Nature*. 1998, **391**(6666), 449–450.
  96. *Биохимия. Учеб. для вузов*, Под ред. Е.С. Северина. М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. 784 с.
  97. Schlame M. *J Lipid Res*. 2008, **49**(8), 1607–1620.
  98. Schlame M., Brody S., Hostetler K.Y. *Eur J Biochem*. 1993, **212**(3), 727–733.
  99. Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. *Биохимия человека: В 2-х томах. Т. 2. Пер. с англ.* М.: Мир, 1993. 415 с.
  100. Кольман Я., Рем К.-Г. *Наглядная биохимия. Пер. с нем.* М.: Мир, 2000. 469 с.
  101. Быков В.Л. *Цитология и общая гистология*. Санкт-Петербург: СОТИС, 2002. 520 с.
  102. *Гистология, эмбриология, цитология: учебник*. Под ред. Афанасьева Ю.И., Юриной Н.А. 6-е изд. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. 800 с.
  103. Викулина А.С., Алексеев А.В., Проскурнина Е.В., Владимиров Ю.А. *Биохимия*. 2015, **80**(10), 1572–1577.
  104. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В., Алексеев А.В. *Биохимия*. 2013, **78**(10), 1391–1404.
  105. Kapralov A.A., Yanamala N., Tyurina Y.Y., Castro L. et al. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011, **1808**(9), 2147–2155.
  106. Basova L.V., Kurnikov I.V., Wang L., Ritov V.B. et al. *Biochemistry*. 2007, **46**(11), 3423–3434.
  107. Kagan V.E. Chu C.T., Tyurina Y.Y., Cheikhi A. et al. *Chem Phys Lipids*. 2014, **179**, 64–69.
  108. Ott M., Robertson J., Gogvadze V., Zhivotovsky B. et al. *PNAS USA*. 2002, **99**(3), 1259–1263.
  109. Pop C., Salvesen G.S. *J Biol Chem*. 2009, **284**(33), 21777–21781.
  110. Hanks S.K., Quinn A.M., Hunter T. *Science*. 1988, **241**(4861), 42–52.
  111. Hunter T. *Curr Opin Cell Biol*. 2009, **21**(2), 140–146.
  112. Hunter T., Eckhart W. *Cell*. 2004, **116**(2 Suppl), S35–S39.
  113. Pecina P., Borisenko G.G., Belikova N.A., Tyurina Y.Y. et al. *Biochemistry*. 2010, **49**(31), 6705–6714.
  114. Belikova N.A., Tyurina Y.Y., Borisenko G., Tyurin V. et al. *J Am Chem Soc*. 2009, **131**(32), 11288–11289.
  115. Petrosillo G., Ruggiero F.M., Paradies G. *FASEB J*. 2003, **17**(15), 2202–2208.
  116. Samhann-Arias A.K., Tyurina Y.Y. and Kagan V.E. *J Clin Biochem Nutr*. 2011, **48**(1), 91–95.
  117. Kagan V.E., Serbinova E.A., Forte T., Scita G. et al. *J Lipid Res*. 1992, **33**, 385–397.
  118. Atkinson J., Harroun T., Wassall S.R., Stillwell W. et al. *Mol Nutr Food Res*. 2010, **54**, 641–651.
  119. Niki E., Noguchi N. *Acc Chem Res*. 2004, **37**, 45–51.
  120. Kagan V.E., Serbinova E.A., Packer L. *Arch Biochem Biophys*. 1990, **282**, 221–225.
  121. Lucarini M, Pedulli G.F. Overview of antioxidant activity of Vitamin E. In: *The Encyclopedia of Vitamin E*, Preedy V.R. and Watson R.R. (Eds). Wallingford, UK: CABI Publishing, 2007, pp. 3–10.
  122. Mukai K., Itoh S., Morimoto H. *J Biol Chem*. 1992, **267**(31), 22277–22281.

123. Nagaoka S.-I., Inoue M., Nishioka C., Nishioku Y. et al. *J Phys Chem B*. 2000, **104**(4), 856–862.
124. Демин Е.М., Проскурина Е.В., Владимиров Ю.А. *Вестник МГУ. Сер. 2. Химия*. 2008, **49**(5), 354–360.

*Поступила 25.04.17*

### Summary

It is presented the first part of the theoretical study devoted to the description of the kinetics and mechanism of the lipid peroxidation process involving the complexes of cytochrome *c* and cardiolipin, taking into account the effect of the antioxidant. The main components of the ROS (reactive oxygen species) and AOD (antioxidant defense) systems and their properties are considered. The key features of the functioning of these systems and various channels of the influence of their components on each other, both intra-systemic and inter-systemic, essential for the optimal interaction of these systems in the organism are discussed. In the review a special attention is paid to the experimental works in which the properties and structure of the cytochrome *c* and cardiolipin complexes of various types along with the peroxidase activity manifested by them are studied. In addition to two known ways for regulating the peroxidase activity of these complexes, discussed in the literature, it

is proposed to take into account another way, which is connected with a possibility of the inclusion of the lipophilic antioxidant molecules in a composition of the complexes under study. The proposed way for regulating the peroxidase activity, increasing the effectiveness of the control over the peroxidase process, opens up new opportunities to regulate the process of the apoptosis of cells. Based on the analysis of experimental works on this problem, a theoretical kinetic model of the peroxidase process is formulated, which includes two reaction pathways – an enzymatic pathway involving the complexes of cytochrome *c* and cardiolipin, and a non-enzymatic pathway involving free radicals. The system of differential equations that describes the kinetics of the process of lipid peroxidation is constructed with account of the inhibiting effect of the antioxidant. The obtained model system of the kinetic equations will be used to study and compare the antioxidant activity of vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol) and some of its homologues with a shortened side chain, relying on the available theoretical and experimental data.

*Keywords: antioxidant activity, complexes of cytochrome c and cardiolipin, lipid peroxidation, chemical kinetics, free radicals,  $\alpha$ -tocopherol.*