

МЕХАНИЗМЫ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ ЧАСТИЦ ЛИПОПРОТЕИДОВ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ ОТ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ

© 2025 В.З. Ланкин^{1*}, К.Б. Шумаев^{1,2}, В.А. Медведева¹,
А.К. Тихазе¹, Г.Г. Коновалова¹

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии им. акад. Е.И. Чазова»
Минздрава России, 121552 Москва, Россия; электронная почта: lankin0309@mail.ru

² ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт биохимии имени А.Н. Баха РАН, 119071 Москва, Россия

Поступила в редакцию 24.09.2024

После доработки 05.12.2024

Принята к публикации 10.12.2024

Установлено, что при введении больным атеросклерозом *per os* препарата убихинона Q₁₀ (CoQ₁₀) окисленность (содержание липогидропероксидов) частиц липопротеидов низкой плотности (ЛНП) резко снижается, что подтверждает важную роль этого природного антиоксиданта в защите частиц ЛНП от свободнорадикального окисления (СРО) *in vivo*. Исследовано влияние липофильных природных антиоксидантов убихинола Q₁₀ (CoQ₁₀H₂) и α-токоферола (α-ТОН) на кинетические параметры Cu²⁺-инициированного СРО частиц ЛНП. В этой модельной системе показана возможность синергизма антиоксидантного действия CoQ₁₀H₂ и α-ТОН. Обсуждаются вероятные механизмы регенерации липофильных антиоксидантов в частицах ЛНП, в том числе регенерация α-ТОН из токофероксильного радикала (α-TO[•]) с участием CoQ₁₀H₂ и/или аскорбата.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: липопротеиды низкой плотности, свободнорадикальное окисление, антиоксиданты, убихинол Q₁₀, α-токоферол, биорегенерация антиоксидантов.

DOI: 10.31857/S0320972525010087 EDN: CPLPQB

ВВЕДЕНИЕ

Циркулирующие в кровяном русле наночастицы липид-транспортирующей системы – липопротеиды низкой плотности (ЛНП), в отличие от различных клеток и субклеточных структур (включая клетки крови), не содержат антиоксидантных ферментов (супероксид- и гидропероксид-оксидоредуктаз), защищающих липид-белковые надмолекулярные комплексы от повреждающего действия свободнорадикального окисления (СРО) [1]. Тем не менее ЛНП нуждаются в эффективной защите от СРО вследствие наличия большого количества субстрата окисления – ацилов полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) в фосфо-

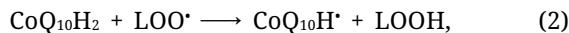
липidaх частиц [2]. Наружный фосфолипидный монослой ЛНП, так же как бислойные фосфолипидные мембранны, легко окисляется в аэробных условиях *in vitro* [3] и *in vivo* [4] как спонтанно, так и при катализе инициаторами разнообразной природы [5]. Наличие в плазме крови высокого парциального давления кислорода (pO₂), а также индукторов СРО (таких как ионы металлов переменной валентности, гемопротеиды, Cu-содержащие белки, липогидропероксиды (LOOH)), различных генераторов H₂O₂, супероксидного анион-радикала (O₂[•]) и других активных форм кислорода (АФК) [5] создаёт повышенную опасность повреждения частиц ЛНП вследствие их СРО в процессе циркуляции в кровяном русле.

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; ИБС – ишемическая болезнь сердца; ЛНП – липопротеиды низкой плотности; ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты; СРО – свободнорадикальное окисление; Asc=O – дегидроаскорбиновая кислота; Asc-OH – аскорбиновая кислота; Asc-O^{•-} – семидегидроаскорбат (свободный радикал аскорбата); CoQ₁₀ – окисленная форма коэнзима Q₁₀ (убихинон Q₁₀); CoQ₁₀H₂ – восстановленная форма коэнзима Q₁₀ (убихинол Q₁₀); CoQ₁₀H[•] – убисемихинон (свободнорадикальная форма коэнзима Q₁₀); LOOH – липогидропероксиды; LOO[•], LO[•] и L^{•-} – пероксильный, аллоксильный и алкильный радикалы липидов; O₂^{•-} – супероксидный анион-радикал; HO[•] – гидроксильный радикал; α-ТОН – α-токоферол (витамин Е); α-TO[•] – токофероксильный радикал; skQ1 – 10-(6'-пластохинонил)декилтрифенилфосфоний.

* Адресат для корреспонденции.

Полное отсутствие в этих структурных образованиях каких-либо антиоксидантных ферментов многократно повышает их подверженность СРО. Очевидно, что, исходя из прагматизма эволюции, наличие антиоксидантных белков в составе частиц ЛНП, конкретной функцией которых является транспорт липидов, синтезируемых в печени, в периферические ткани, является нецелесообразным. При этом все без исключения клетки должны были бы иметь ферментные системы утилизации этих белков после завершения липидного транспорта, что было бы сопряжено с дополнительным бесполезным расходом энергии. Природой был найден остроумный выход из создавшейся ситуации, заключающийся в создании эффективной системы неферментативного контроля СРО в ЛНП, представленной, прежде всего, жирорастворимыми фенольными антиоксидантами – восстановленной формой коэнзима Q₁₀ (убихинол Q₁₀, CoQ₁₀H₂) [6] и витамином Е (α-токоферолем, α-ТОН) [7]. Важно, что в отличие от истинного витамина α-ТОН (в организме не синтезируется) значительная часть CoQ₁₀H₂ (около 60%) поступает в ткани не из пищевых источников, а образуется в результате биосинтеза *de novo* [8]. Жирорастворимые витамины (включая α-ТОН) транспортируются частицами ЛНП и локализованы в гидрофобном ядре наночастиц [9]. В литературе высказано мнение, что CoQ₁₀H₂ является основным (наиболее эффективным) антиоксидантом, защищающим частицы ЛНП от окисления [10–12]. Тем не менее на 1 частицу ЛНП по расчётом приходится не более 1 молекулы CoQ₁₀H₂ [13], что делает невозможным осуществление этим антиоксидантом эффективной защитной функции без существования механизма его биорегенерации (восстановления) в ЛНП.

Считается, что α-ТОН и CoQ₁₀H₂ могут взаимодействовать с пероксильными радикалами (LOO[·]) липидов в следующих реакциях [14–16]:



Токофероксильный радикал (α-TO[·]), продуктируемый в процессе реакции (1), может вновь реагировать с LOO[·] или другой молекулой α-TO[·] с образованием нерадикальных продуктов [14]. В то же время CoQ₁₀H₂ последовательно окисляется LOO[·] до убисемихинона (CoQ₁₀H[·]) и далее – до полностью окисленной формы CoQ₁₀ (реакции (2) и (3)) [15]. Вместе с тем CoQ₁₀H₂ восстанавливает не только свободные радикалы липидов, но и α-TO[·] в реакции (4) [16]:



Эта реакция может лежать в основе синергизма антиоксидантного действия CoQ₁₀H₂ и α-TON, участвуя тем самым в биорегенерации α-TON, причём не исключено, что именно этот механизм может играть важную роль в предотвращении СРО частиц ЛНП. Так, при отсутствии CoQ₁₀H₂ накопление токофероксильных радикалов (α-TO[·]) может вызывать прооксидантное действие в ЛНП [17, 18], поскольку α-TO[·] в этих условиях может выступать в качестве инициатора цепных реакций:



где LH – ацилы ПНЖК; L[·] – алкильные радикалы липидов.

Тем не менее эффекты, наблюдаемые при взаимодействии CoQ₁₀H₂ и α-TON в модельных системах, не могут полностью объяснить биорегенерацию этих липофильных антиоксидантов в условиях *in vivo*, поскольку предполагаемая локализация CoQ₁₀H₂ и α-TON в частицах ЛНП [19] и описанные выше реакции взаимодействия этих жирорастворимых антиоксидантов в условиях *in vivo* не очевидны. В настоящей работе мы предприняли попытку экспериментально обосновать возможные механизмы биорегенерации CoQ₁₀H₂ и α-TON, обеспечивающие защиту этими антиоксидантами частиц ЛНП от СРО в процессе их циркуляции в кровяном русле.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

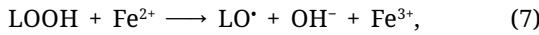
Реактивы. Для клинических исследований в работе использовали препарат убихинон Q₁₀ («Bioquione»; «Phrama Nord», Дания) в капсулах с соевым маслом. SkQ1 (10-(6'-пластохинонил)декилтрифенилfosфония) был любезно предоставлен академиком В.П. Скулачевым (НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова). Остальные реактивы были получены от фирмы «Sigma-Aldrich» (США).

Клиническое исследование влияния длительного введения *per os* препарата убихинона Q₁₀ (CoQ₁₀) больным ИБС на содержание липогидропероксидов в ЛНП плазмы крови. В клиническое исследование было включено 10 мужчин (49 ± 2,5 года) с хронической ишемической болезнью сердца (ИБС) и гиперлипидемией, которые проходили лечение в НМИЦ кардиологии Минздрава России. Пациенты не получали

липотропных препаратов и в течение 6 мес. принимали *per os* препарат убихинон Q₁₀ в суточной дозе 60 мг. Для контроля уровня LOOH в ЛНП у больных венозную кровь брали натощак в присутствии 1 мг/мл ЭДТА в качестве антикоагулянта и антиоксиданта, после чего изолировали ЛНП с помощью препаративного ультрацентрифугирования, как описано ниже. Данные по изменениям содержания LOOH в ЛНП больных ИБС при введении убихинона Q₁₀ представляли в % от исходного уровня (100%) LOOH в ЛНП.

Выделение ЛНП при помощи препаративного ультрацентрифугирования. Получение ЛНП из плазмы крови практически здоровых доноров проводили при помощи центрифугирования в градиенте плотности NaBr на ультрацентрифуге Beckman Optima XPN-80 («Beckman», США) [20]. Липопroteиды изолировали из трёх образцов плазмы крови, полученных от трёх разных здоровых доноров. В центрифужную пробирку вносили донорскую плазму, содержащую 1 мМ ЭДТА, осторожно насылали раствор NaBr с плотностью 1,006 г/мл и центрифугировали (105 000 *g* в течение 18 ч при 4 °C) в роторе Ti-60. После удаления верхнего слоя, содержащего липопroteиды очень низкой плотности, к содержимому пробирки добавляли при перемешивании расчётное количество NaBr и растворяли соль для создания плотности 1,065 г/мл, после чего пробирку дополняли раствором NaBr этой же плотности. После центрифугирования (105 000 *g* в течение 18 ч при 4 °C) отбирали верхний слой, содержащий флотировавшие ЛНП. Полученную фракцию ЛНП подвергали диализу в течение 18 ч при температуре 4 °C против 2000 объёмов 145 мМ NaCl в 50 мМ K₂Na-фосфатном буфере (рН 7,4).

Определение содержания липогидропероксидов в ЛНП с использованием реактива Fe²⁺-ксиленолоранж. Содержание гидропероксидов липидов (LOOH) в ЛНП определяли, используя окисление ионов Fe²⁺ при реакции с LOOH:



где LO[·] – алкоксильный радикал липидов.

Ионы Fe³⁺ (эквимолярные концентрации LOOH) образуют с ксиленоловым оранжевым (o-крезолсульфофталеин-3,3'-бисметилиминодиуксусной кислоты тетранатриевая соль) окрашенный комплекс, концентрацию которого измеряли на спектрофотометре UV-2600 Shimadzu («Shimadzu», Япония) ($\epsilon_{560} = 1,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) [21]. Для проведения анализов предварительно готовили реагент FOX, содержащий 1 мМ ксиленолового оранжевого и 2,5 мМ соли Мора Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ в 25 мМ H₂SO₄ с добавлением 9 объёмов 4,4 мМ бутилгидрокситолуола (ВНТ) в 90%-ном метаноле

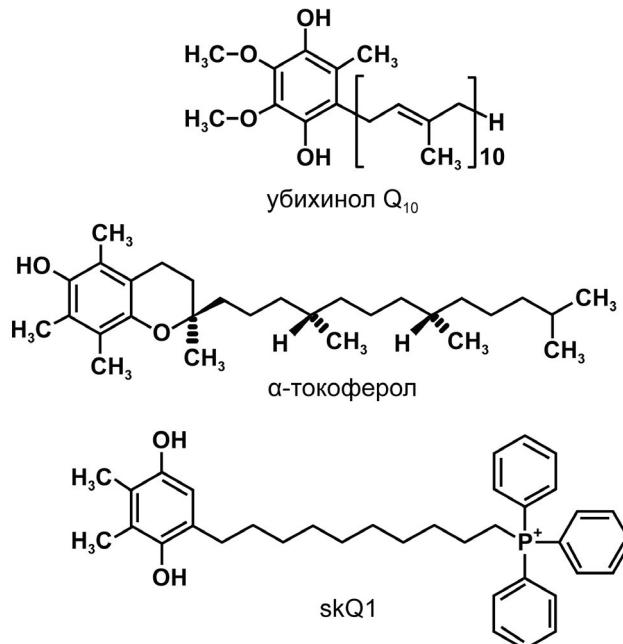


Рис. 1. Структурные формулы исследуемых липофильных фенольных антиоксидантов: убихинола Q₁₀ (CoQ₁₀H₂), α-токоферола, 10-(6'-пластохинонил)декилтрифенилfosфония (skQ1). Исследуемые антиоксиданты вводили в инкубационную смесь, содержащую ЛНП, в этанольных растворах (конечная концентрация спирта не более 2%), после чего встряхивали 1 мин в шейкере и инкубировали 4 мин при 37 °C

(степень чистоты для ВЭЖХ). В контрольных пробах LOOH количественно восстанавливали трифенилфосфином до гидроокисей, и поглощение этих образцов вычитали из показаний опытных проб [21]. В качестве стандарта использовали гидропероксид трет-бутила.

Исследование кинетики свободнорадикального Cu²⁺-инициированного окисления ЛНП. После диализа содержание белка в образцах ЛНП определяли по методу Лоури, а затем пробы разбавляли до 50 мкг белка/мл раствором, содержащим 154 мМ NaCl в 50 мМ K₂Na-фосфатном буфере (рН 7,4), и окисление частиц ЛНП при 37 °C индуцировали введением в среду инкубации 30 мкМ CuSO₄, после чего через фиксированные интервалы времени измеряли накопление конъюгированных диенов на спектрофотометре UV-2600 Shimadzu [22–24]. В ходе образования гидропероксидов ПНЖК (LOOH) происходит формирование конъюгированных двойных связей, поглощающих при 233 нм. Содержание LOOH (ΔD_{233}) в частицах ЛНП может быть рассчитано, исходя из коэффициента молярной экстинкции 22 000 $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Продолжительность периода индукции (τ) на кинетических кривых СРО липидов в ЛНП определяли, как описано ранее [25]. Исследование кинетики Cu²⁺-зависимого СРО частиц ЛНП *in vitro* проводили, используя ЛНП,

изолированные из плазмы крови трёх доноров (ЛНП, выделенные из плазмы крови каждого донора использовали в независимых экспериментах). С использованием кинетической модели Cu^{2+} -инициированного СРО частиц ЛНП исследовали ингибирующее действие природных фенольных липофильных антиоксидантов (α -токоферол, убихинол Q_{10}) и синтетического пластохионана (skQ1), структурные формулы которых приведены на рис. 1.

Получение убихинола Q_{10} и свободных радикалов α -токоферола и пробукола. $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ получали, восстанавливая CoQ_{10} боргидридом натрия (NaBH_4), для чего смешивали эквимолярные растворы этих соединений в этаноле [15]. Раствор NaBH_4 готовили непосредственно перед его использованием. Токофероксильный радикал ($\alpha\text{-TO}^\bullet$) получали окислением 400 мМ раствора $\alpha\text{-TOH}$ в изопропаноле порошком диоксида марганца (MnO_2). Для этого 1 мл раствора $\alpha\text{-TOH}$ смешивали с 100 мг диоксида марганца и 20 мин встряхивали на шейкере, после чего смесь центрифugировали и фильтровали надосадочную жидкость для полного удаления частиц MnO_2 . Феноксильный радикал пробукола (4,4'-(1-метилэтилиден)бис(тио))бис[2,6-бис(1,1-диметилэтил)фенола]) получали аналогично, окисляя 0,2 М раствор пробукола диоксидом марганца.

Спектроскопия электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Спектры ЭПР измеряли на автоматизированном спектрометре ESR 70-03 XD/2 УП «КБСТ» БГУ (Беларусь). Растворы свободных радикалов α -токоферола и пробукола в изопропаноле смешивали с этанолом и 160 мМ Na-фосфатным буфером (рН 7,4) в соотношении 8/1/1. Этую реакционную смесь (40 мкл) вводили в газопроницаемую капиллярную трубку PTFE Sub-Lite-Wall (внутренний диаметр – 0,635 мм; толщина стенки – 0,051 мм; «Zeus Industrial Products, Inc.», США). Капилляр дважды складывали и вставляли в кварцевую трубку диаметром ~4 мм, которая помещалась в резонатор спектрометра ЭПР. Регистрацию спектров $\alpha\text{-TO}^\bullet$ проводили при 25 °C и следующих условиях: ослабление СВЧ-мощности – 1 дБ; амплитуда ВЧ-модуляции – 0,05 мТл; СВ-частота – ~9,32 ГГц; коэффициент усиления – 1000; диапазон развёртки – 5 мТл. Запись спектров начинали через 2 мин после смешивания компонентов реакционной смеси.

Статистический анализ. В клиническом исследовании для статистического анализа использовали программы SPSS 14 Windows Version 7.0. С помощью критерия Колмогорова–Смирнова проводили оценку нормальности распределения переменных. Для оценки значимости различий экспериментальных данных по отношению к контролю использовали t -критерий Стьюдента.

Результаты, полученные в экспериментах *in vitro*, анализировали с помощью программы Origin Pro 8 («Origin Lab Corp.», США). Для сравнения средних значений использовали однофакторный дисперсионный анализ с последующим применением t -критерия Стьюдента, а также критерия Даннетта для оценки достоверности различий между группами. Данные всех проведённых исследований представлены как средние значения (M) ± стандартное отклонение (σ). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние убихинона Q_{10} на содержание липогидропероксидов в ЛНП плазмы крови больных ИБС. В течение первого месяца терапии CoQ_{10} содержание LOOH в ЛНП больных ИБС резко падает (на 61% от исходного уровня), а ко второму месяцу наблюдения – снижается до 19% и остается на близком к этому уровню в течение последующих 4 мес. терапии (рис. 2).

Следует отметить, что наблюдаемое выраженное антиоксидантное действие (по уменьшению содержания LOOH в ЛНП), отмеченное уже через 1 мес. после введения больным CoQ_{10} , может свидетельствовать о существовании его эффективной биорегенерации (восстановления) с образованием $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ в условиях *in vivo*, исследование механизма которой явилось предметом дальнейшего исследования.

Влияние экзогенных убихинола Q_{10} и α -токоферола на свободнорадикальное окисление частиц ЛНП *in vitro*. В экспериментах *in vitro* исследовали влияние экзогенных гидрофобных антиоксидантов $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$, $\alpha\text{-TOH}$ и синтетического

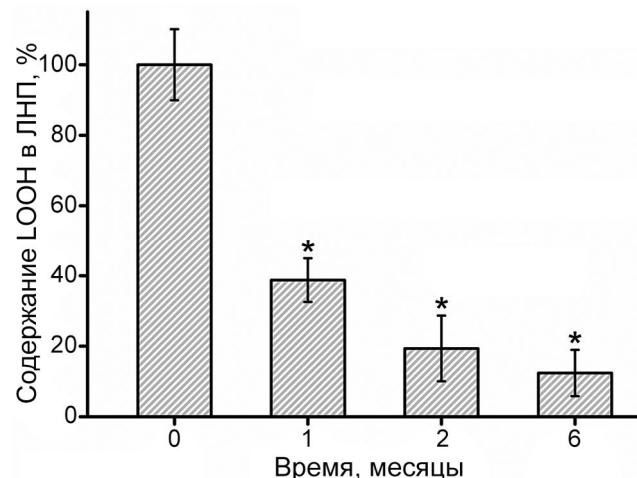


Рис. 2. Влияние перорального введения препарата убихинона Q_{10} больным ИБС на содержание LOOH в ЛНП плазмы крови. Различия с исходным уровнем LOOH в ЛНП были статистически значимы; * $p < 0,05$

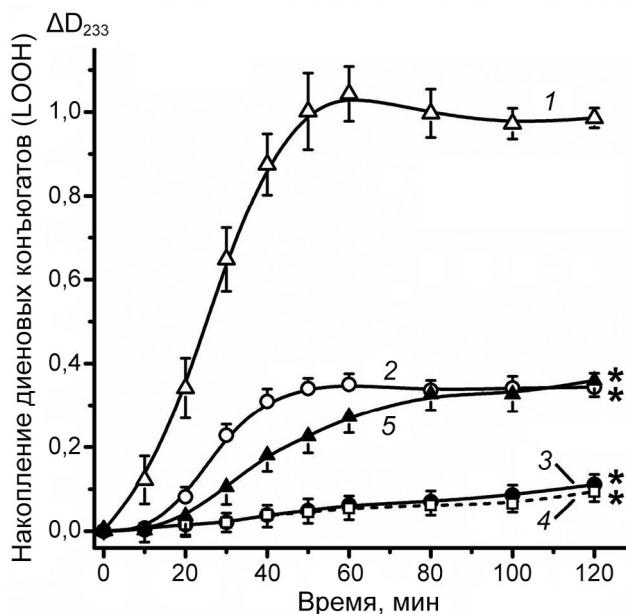


Рис. 3. Влияние различных липофильных антиоксидантов на кинетику накопления LOOH (диеновых конъюгатов) в процессе Cu^{2+} -инициированного СРО частиц ЛНП. 1 – Окисление нативных ЛНП без добавления антиоксидантов (контроль); 2 – ЛНП + 80 мкМ убихинола Q_{10} ; 3 – ЛНП + 80 мкМ а-токоферола; 4 – ЛНП + 80 мкМ убихинола Q_{10} + 80 мкМ а-токоферола; 5 – ЛНП + 80 мкМ skQ1. Статистически значимыми являются различия групп 2–5 по отношению к группе 1 (контроль); * $p < 0,05$

антиоксиданта skQ1 (аналог пластинона) на кинетику СРО частиц ЛНП в диапазоне концентраций 5–80 мкМ. Кинетические кривые накопления LOOH, образующихся в ЛНП при Cu^{2+} -инициированном СРО в присутствии исследованных фенольных антиоксидантов в концентрации 80 мкМ, представлены на рис. 3. Как видно из этих данных, исследованные антиоксиданты влияют на начальную скорость накопления LOOH и продолжительность периода индукции (τ) на кинетических кривых СРО частиц ЛНП (рис. 3).

Очевидно, что исследованные кинетические параметры могут быть корректно использованы для оценки эффективности действия антиоксидантов в модельной системе. Известно, что продолжительность периода индукции СРО (τ) прямо пропорциональна концентрации ингибитора СРО в системе – [InH] и обратно пропорциональна скорости инициирования СРО – ω , т.е. $\tau = [InH]/\omega$ [26]. В использованной нами системе окисления при изучении частиц ЛНП с неизменным составом липидов ω является величиной постоянной (constanta), исходя из чего продолжительность периода индукции СРО (τ) должна быть пропорциональна содержанию антиоксиданта (или его антиоксидантной активности). Из рис. 3 (кривая 2) видно, что $CoQ_{10}H_2$ в концентрации 80 мкМ вызы-

вает существенное увеличение продолжительности τ при СРО частиц ЛНП, а также уменьшение начальной скорости их окисления. При использовании такой же концентрации а-ТОН (рис. 3, кривая 3) или совместном действии $CoQ_{10}H_2$ и а-ТОН в концентрациях 80 мкМ (рис. 3, кривая 4) наблюдали практически полное подавление окисления ЛНП. Пластинон skQ1 в концентрации 80 мкМ оказывал более выраженное антиоксидантное действие (рис. 3, кривая 5) по сравнению с действием $CoQ_{10}H_2$ (рис. 3, кривая 2).

Данные по действию различных концентраций исследованных антиоксидантов на продолжительность τ при СРО частиц ЛНП представлены на рис. 4. Из этих результатов видно (рис. 4, кривая 1), что при введении 5 мкМ $CoQ_{10}H_2$ в среду окисления происходит увеличение продолжительности τ более чем в 2 раза (с 8 мин в контроле до 20 мин), однако значительно большее увеличение концентрации $CoQ_{10}H_2$ не приводит к заметному увеличению антиоксидантного действия ($\tau = 14$ мин при 80 мкМ $CoQ_{10}H_2$). Вместе с тем повышение концентрации а-ТОН при СРО частиц ЛНП от 5 до 80 мкМ вызывает весьма резкое увеличение продолжительности τ с 36 до 160 мин соответственно (рис. 4, кривая 2). Следует отметить, что добавление к частицам ЛНП $CoQ_{10}H_2$ в концентрациях 40 и 80 мкМ вместе с 10 мкМ

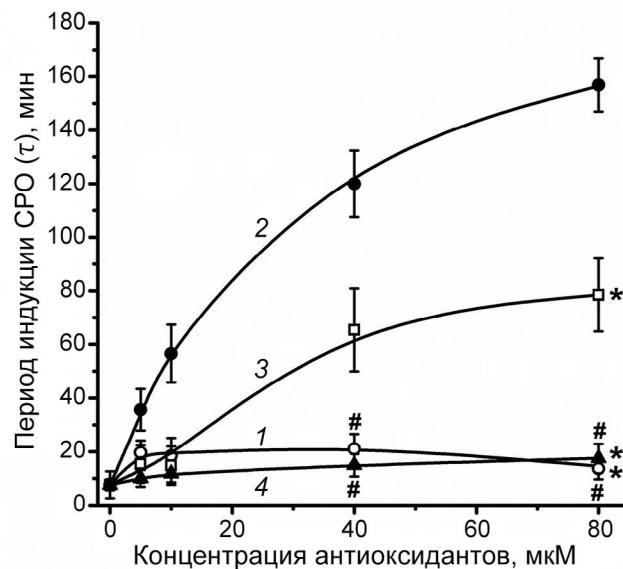


Рис. 4. Зависимость продолжительности периода индукции (τ) СРО частиц ЛНП (по накоплению диеновых конъюгатов) от концентрации добавленных фенольных липофильных антиоксидантов: убихинола Q_{10} (1), а-токоферола (2), сочетания 10 мкМ а-токоферола с различными концентрациями (5–80 мкМ) убихинола Q_{10} (3) и skQ1 (4). * $p < 0,05$ – статистически значимые различия групп 2, 3 и 4 по отношению к группе 2; # $p < 0,05$ – статистически значимые различия групп 1 и 4 по отношению к группе 3 при концентрациях убихинола Q_{10} и skQ1, равных 40 и 80 мкМ

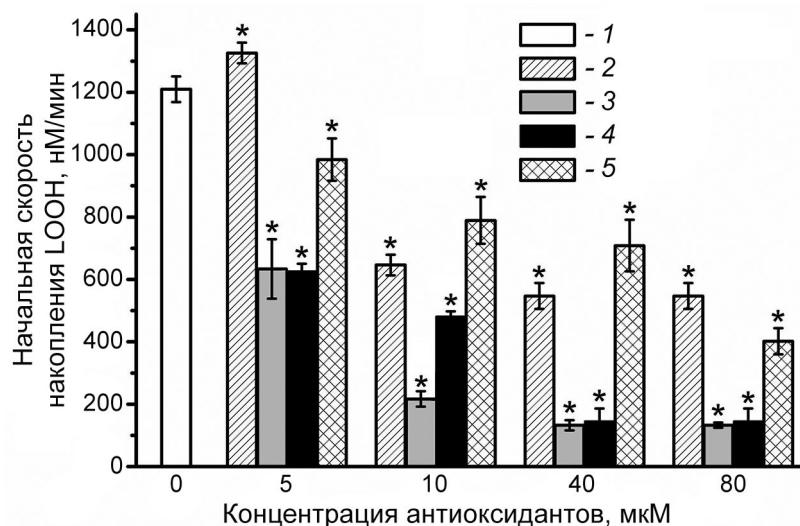


Рис. 5. Влияние различных концентраций экзогенных α -токоферола, убихинола Q₁₀ и skQ1 на начальную скорость Cu²⁺-инициированного СРО липидов в частицах ЛНП; 1 – нативные ЛНП без добавления антиоксидантов (контроль); 2 – ЛНП + убихинол Q₁₀; 3 – ЛНП + α -ТОН; 4 – ЛНП + α -ТОН + убихинол Q₁₀ (антиоксиданты добавлялись в эквимолярных концентрациях); 5 – ЛНП + skQ1. * $p < 0,05$ – статистически значимые различия экспериментальных групп по отношению к контролю (начальная скорость накопления LOOH при отсутствии антиоксидантов)

α -ТОН приводит к заметному росту продолжительности τ до 65 и 80 мин соответственно. Тем не менее при сочетании 10 мкМ α -ТОН с CoQ₁₀H₂ в низких концентрациях (5 и 10 мкМ) продолжительность τ была практически такой же, что и в присутствии одного CoQ₁₀H₂ (рис. 4, кривая 3). Пластохинон skQ1, который, как и CoQ₁₀H₂, является восстановленным хиноном, влиял на продолжительность τ в меньшей степени, чем другие антиоксиданты, включая CoQ₁₀H₂ (рис. 4, кривая 4).

В концентрации 5 мкМ CoQ₁₀H₂ заметно не влиял на величину начальной скорости накопления LOOH при СРО частиц ЛНП, тогда как при увеличении концентрации CoQ₁₀H₂ до 10–80 мкМ начальная скорость окисления ЛНП снижалась в 2–2,5 раза (рис. 5).

При введении в инкубационную среду 5 мкМ α -ТОН, напротив, начальная скорость окисления ЛНП резко снижалась (более чем в 2 раза), а при концентрации α -ТОН, равной 10 мкМ, начальная скорость накопления LOOH падала почти в 6 раз и прогрессивно уменьшалась при увеличении содержания антиоксиданта в среде СРО (рис. 5). При высоких концентрациях (40–80 мкМ) α -ТОН намного более эффективно ингибиравал начальную скорость СРО частиц ЛНП, чем CoQ₁₀H₂ и skQ1 (рис. 5). В то же время при одновременном добавлении в инкубационную среду равных концентраций CoQ₁₀H₂ и α -ТОН не наблюдалось их аддитивного действия во всём диапазоне использованных концентраций антиоксидантов (рис. 5). Начальная скорость накопления LOOH при введении этих антиоксидантов в среду окисле-

ния частиц ЛНП в концентрации 10 мкМ была лишь немного ниже, чем в присутствии только CoQ₁₀H₂ (рис. 5). При использовании других концентраций сочетанное действие этих антиоксидантов практически совпадало с действием одного α -токоферола (рис. 5).

Тем не менее внесение в среду окисления ЛНП CoQ₁₀H₂ в концентрациях 40 или 80 мкМ вместе с 10 мкМ α -ТОН усиливало антиоксидантное действие последнего почти в 2 и 9 раз соответственно (рис. 6, столбцы 4 и 5). Этот факт согласуется с данными по увеличению в аналогичных условиях продолжительности τ на кинетических кривых СРО в ЛНП (рис. 4, кривая 3).

Как уже отмечалось выше, совместное введение CoQ₁₀H₂ и α -ТОН в концентрации 10 мкМ, напротив, оказывает прооксидантное действие (рис. 5 и 6). Таким образом, анализ кинетических характеристик СРО частиц ЛНП показал, что введение в среду окисления высоких концентраций CoQ₁₀H₂, по-видимому, приводит к восстановлению радикалов α -ТОН, в результате чего низкие концентрации последнего более эффективно ингибируют процессы СРО в липид-белковых комплексах.

Восстановление токофероксильного радикала под действием убихинола Q₁₀ и аскорбата. Взаимодействие CoQ₁₀H₂ с α -TO[•] исследовали с помощью спектроскопии ЭПР (рис. 7). Как видно из данных, представленных на рис. 7, CoQ₁₀H₂ в водно-спиртовой среде количественно восстанавливает α -TO[•] (рис. 7, a; спектры 1–4). Токофероксильный радикал достаточно стабилен,

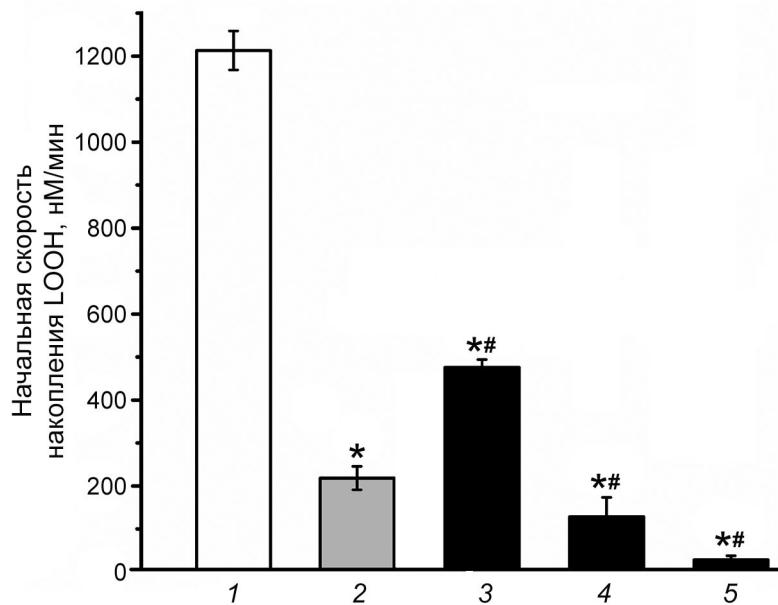


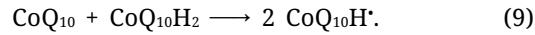
Рис. 6. Изменение начальной скорости Cu^{2+} -инициированного СРО в частицах ЛНП при добавлении 10 мкМ α -токоферола и различных концентраций (10–80 мкМ) убихинола Q_{10} ; 1 – окисление ЛНП без добавления антиоксидантов (контроль); 2 – ЛНП + 10 мкМ α -ТОН; 3 – ЛНП + 10 мкМ убихинола Q_{10} + 10 мкМ α -ТОН; 4 – ЛНП + 40 мкМ убихинола Q_{10} + 10 мкМ α -ТОН; 5 – ЛНП + 80 мкМ убихинола Q_{10} + 10 мкМ α -ТОН. * $p < 0,05$ – статистически значимые различия групп 2–5 по отношению к группе 1 (контроль); # $p < 0,05$ – статистически значимые различия групп 3–5 по отношению к группе 2 (ЛНП + 10 мкМ α -ТОН)

что позволило оценить его концентрацию (рис. 7, б). Следует также отметить, что $\alpha\text{-TO}^{\cdot}$ восстанавливается аскорбатом натрия (рис. 7, а; спектры 5–7). При высоких концентрациях этого антиоксиданта регистрируется небольшой дублетный сигнал ЭПР, характерный для свободного радикала аскорбиновой кислоты (семидегидроаскорбата) (рис. 7, а; спектр 7). Вместе с тем установлено, что $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ восстанавливает феноксильный радикал синтетического гидрофобного антиоксиданта пробукола (рис. 7; спектры 8 и 9). Действие этого фенольного антиоксиданта часто сравнивают с $\alpha\text{-TOH}$, в том числе при ингибировании процессов СРО в ЛНП [22, 27, 28].

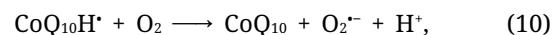
Восстановление токофероксильного радикала под действием $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ должно происходить в соответствии с реакцией (4), продуктами которой, наряду с $\alpha\text{-TOH}$, является $\text{CoQ}_{10}\text{H}^{\cdot}$, причём нельзя исключить, что эта реакция является обратимой. Вместе с тем $\text{CoQ}_{10}\text{H}^{\cdot}$ может участвовать в регенерации $\alpha\text{-TOH}$ по реакции:



Тем не менее нам не удалось зарегистрировать $\text{CoQ}_{10}\text{H}^{\cdot}$ в ходе восстановления $\alpha\text{-TO}^{\cdot}$. С другой стороны, мы показали образование $\text{CoQ}_{10}\text{H}^{\cdot}$ при неполном восстановлении CoQ_{10} боргидридом натрия. В этом случае $\text{CoQ}_{10}\text{H}^{\cdot}$, по-видимому, является продуктом реакции конпропорционирования между CoQ_{10} и $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ (рис. 7, в):



Снижение уровня $\text{CoQ}_{10}\text{H}^{\cdot}$ в реакционной среде (рис. 7, в) может быть связано с его одноэлектронным окислением молекулярным кислородом в процессе реакции:



в результате чего образуется супероксидный анион-радикал ($\text{O}_2^{\cdot-}$) [19, 29, 30].

Таким образом, отсутствие $\text{CoQ}_{10}\text{H}^{\cdot}$ в концентрации, достаточной для регистрации этого радикала в модельной системе, содержащей $\alpha\text{-TO}^{\cdot}$ и $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$, вероятно, обусловлено протеканием реакций (8) и (10).

Тем не менее следует иметь в виду, что использованная нами система является гомогенной, в отличие от ЛНП – структурных образований, состоящих из фосфолипидного монослоя и гидрофобного ядра, содержащего эфиры холестерина и триглицериды.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В начале 90-х годов прошлого века были сформулированы представления о том, что окисленные ЛНП играют важную роль в этиологии и патогенезе атеросклероза [31–35]. На основании этих работ были предприняты многочисленные

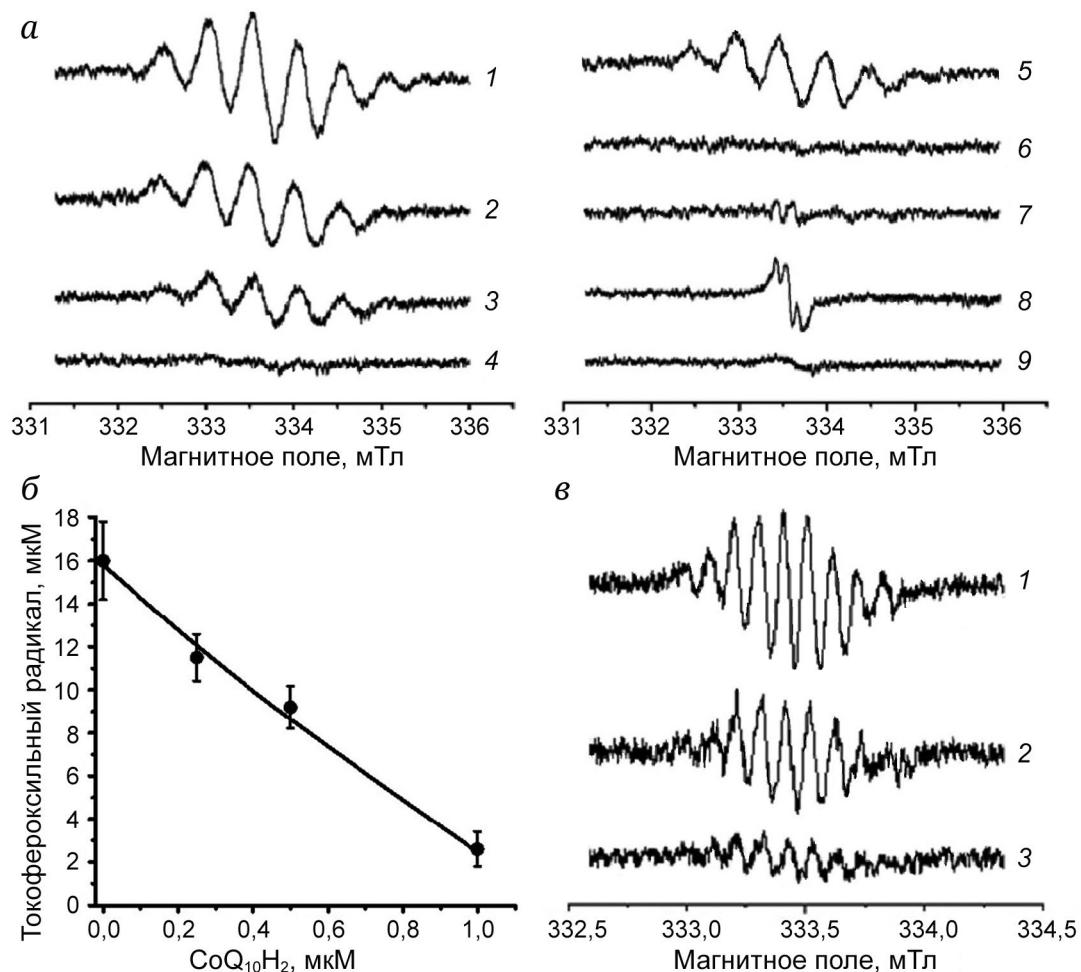


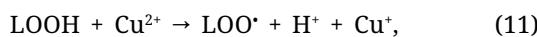
Рис. 7. Восстановление свободных радикалов α -токоферола (α -ТО') и пробукола. Спектры ЭПР свободных радикалов регистрировали в реакционной смеси, содержащей 320 мМ α -ТОН или 160 мМ пробукола, которые были предварительно окислены MnO_2 . *а* – Среда с α -ТО' без добавок (1); среда с α -ТО' после внесения $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ в концентрациях 0,25 (2), 0,5 (3) и 1 (4) мМ; среда с α -ТО' после внесения 1 (5), 2 (6) и 5 (7) мМ аскорбата Na; среда, содержащая феноксильный радикал пробукола (8); среда, содержащая феноксильный радикал пробукола после внесения 0,5 мМ $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ (9). *б* – Концентрационная зависимость восстановления α -ТО' убихинолом Q_{10} . *в* – Образование $\text{CoQ}_{10}\text{H}^{\cdot}$ в реакционной смеси при неполном восстановлении CoQ_{10} боргидридом натрия. Реакционная среда содержала 100 мкМ CoQ_{10} и 50 мкМ NaBH_4 . Спектры ЭПР записаны через 2 мин (1), 10 мин (2) и 30 мин (3) инкубации смеси

клинические исследования, в которых были сделаны попытки сдержать прогрессирование атеросклероза путём снижения окисляемости ЛНП у больных ИБС с помощью терапии высокими дозами витамина Е (α -ТОН) [36–39]. Положительного эффекта в этих клинических трайлах достигнуто не было. Это вызвало большое разочарование исследователей и привело к тому, что некоторые авторы стали полностью отрицать возможность влияния окисленных ЛНП на атерогенез [36–39]. Тем не менее нами было установлено, что ключевым фактором атерогенеза являются не окисленные (содержащие LOOH) ЛНП, а частицы ЛНП, химически модифицированные вторичными продуктами СРО – низкомолекулярными диарбонилами (малоновым диальдегидом и др.) [39–41]. Кроме того, было высказано предположение, что

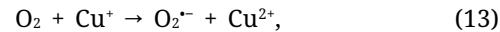
защиту частиц ЛНП от повреждения при их СРО осуществляет не α -ТОН, а $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ [42]. Это мнение противоречит представлению о том, что α -ТОН является более эффективным антиоксидантом, чем $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ [19]. Имеются данные, что в низких концентрациях $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ тормозит Cu^{2+} -инициированное СРО частиц ЛНП *in vitro* [43]. Введённый перорально CoQ_{10} после всасывания восстанавливается до $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ и транспортируется в печень, где он включается в частицы ЛНП, которые доставляют липиды в периферические ткани [44]. После перорального приёма CoQ_{10} максимальная концентрация $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ в плазме крови наблюдается уже через 6–8 ч, причём период полувыведения составляет более 30 ч [44]. Установлено, что введение CoQ_{10} *per os* способствует увеличению устойчивости частиц ЛНП к СРО [10–12, 45],

причём при длительной дотации его содержание в частицах ЛНП может возрастать почти в 3 раза [45]. Приведённые выше данные хорошо согласуются с полученными нами результатами, которые представлены на рис. 2, где видно, что уже через 30 дней после начала пероральной терапии с включением CoQ₁₀ исходное содержание LOOH в ЛНП снижается в 4 раза и достигает минимального уровня (в 8 раз ниже исходного) через 2 мес. после начала фармакотерапии, после чего в течение последующих 4 мес. концентрация LOOH в ЛНП больных ИБС практически не изменяется (достигает «насыщения») (рис. 2). Таким образом, наши результаты убедительно свидетельствуют о возможности эффективного восстановления CoQ₁₀ до CoQ₁₀H₂ *in vivo*, хотя это восстановление может и не быть следствием биорегенерации CoQ₁₀ непосредственно в составе частиц ЛНП, а отражает возможность биотрансформации этого антиоксиданта в процессе всасывания и/или при сборке частиц ЛНП в печени [44]. Биосинтез CoQ₁₀H₂ обеспечивает основную потребность организма в этом нутриенте, поскольку лишь около 40% CoQ₁₀H₂ поступает с пищей [8]. В соответствии с этим использование холестерин-снижающей фармакотерапии с включением ингибиторов HMG-СоА-редуктазы (статины), которые одновременно с ингибированием синтеза холестерина подавляют и биосинтез CoQ₁₀H₂, приводит к развитию дефицита CoQ₁₀H₂ [46–48]. Таким образом, терапия статинами способствует увеличению окисленности ЛНП больных [49]. Это тем более нежелательно, поскольку при заболеваниях сердечно-сосудистой системы отмечен дефицит CoQ₁₀ [50, 51], причём при атеросклерозе преимущественно снижается уровень его восстановленной формы [51]. Следует отметить, что дотация больным ИБС высоких пероральных доз витамина Е (α-токоферилсукцината) практически не влияет на окисляемость ЛНП [22]. Этот факт может свидетельствовать о том, что эфиры α-токоферола не полностью гидролизуются в организме больных ИБС с образованием активной антиоксидантной формы (свободного α-ТОН), хотя соответствующая арильгидролаза имеется в клетках стенки кишечника. С другой стороны, можно предположить, что *in vivo* влияние α-ТОН на окисляемость ЛНП зависит от его локализации в этих частицах [22].

Для исследования эффективности ингибирующего действия различных липофильных фенольных антиоксидантов мы использовали стандартную модель Cu²⁺-инициированного СРО частиц ЛНП [22–24]. Эта модель основана на образовании пероксильного (LOO[·]) и аллоксильного (LO[·]) радикалов липидов в следующих реакциях:



а также супероксидного анион-радикала (O₂^{·-}), пероксида водорода (H₂O₂) и гидроксильного радикала (HO[·]). Эти АФК продуктируются в катализируемых ионами меди реакциях:



В свою очередь, HO[·], LOO[·] и LO[·] взаимодействуют с ацилами ПНЖК (ЛН) фосфолипидов частиц ЛНП и тем самым участвуют в других цепных реакциях СРО.

Следовательно, использованная нами система окисления фактически моделирует процесс СРО частиц ЛНП, происходящий при окислительном стрессе под действием АФК *in vivo* и широко используется в работах по исследованию механизмов окислительных процессов в ЛНП *in vitro* [25, 52–54]. Результаты, полученные с использованием модели Cu²⁺-инициированного СРО частиц ЛНП, приведены на рис. 3–6. Анализ кинетических кривых СРО частиц ЛНП свидетельствует о том, что наиболее эффективным из исследуемых липофильных антиоксидантов является α-токоферол. Смесь эквимолярных концентраций CoQ₁₀H₂ и α-ТОН ингибирует СРО в основном так же, как один α-ТОН, хотя в присутствии 10 мкМ этих антиоксидантов наблюдается некоторый прооксидантный эффект в сравнении с той же концентрацией α-ТОН (рис. 5 и 6). Этот эффект CoQ₁₀H₂ можно объяснить участием CoQ₁₀H[·] в продукции O₂^{·-} (реакция (10)) и, как следствие, других АФК (реакции (14) и (15)). В высоких концентрациях (40 и 80 мкМ) α-ТОН и его сочетание с CoQ₁₀H₂ вызывает практически полное ингибирование реакций перекисного окисления в ЛНП (рис. 3 и 5). Нужно отметить, что, в отличие от α-ТОН, увеличение уровня CoQ₁₀H₂ почти не влияет на продолжительность периода индукции (τ) на кинетических кривых СРО (рис. 4). Такое действие CoQ₁₀H₂ согласуется с данными работы Nohl et al. [29], где было показано, что τ индуцированного азот-инициатором СРО липосом растёт при повышении концентрации CoQ₁₀H₂ заметно меньше, чем в присутствии α-ТОН.

В то же время добавление к частицам ЛНП CoQ₁₀H₂ в концентрации 80 мкМ вместе с 10 мкМ α-ТОН существенно усиливает антиоксидантное действие последнего (рис. 4 и 6). Эти результаты указывают на существование синергизма в механизме совместного антиоксидантного действия CoQ₁₀H₂ и α-ТОН. Объяснением такого

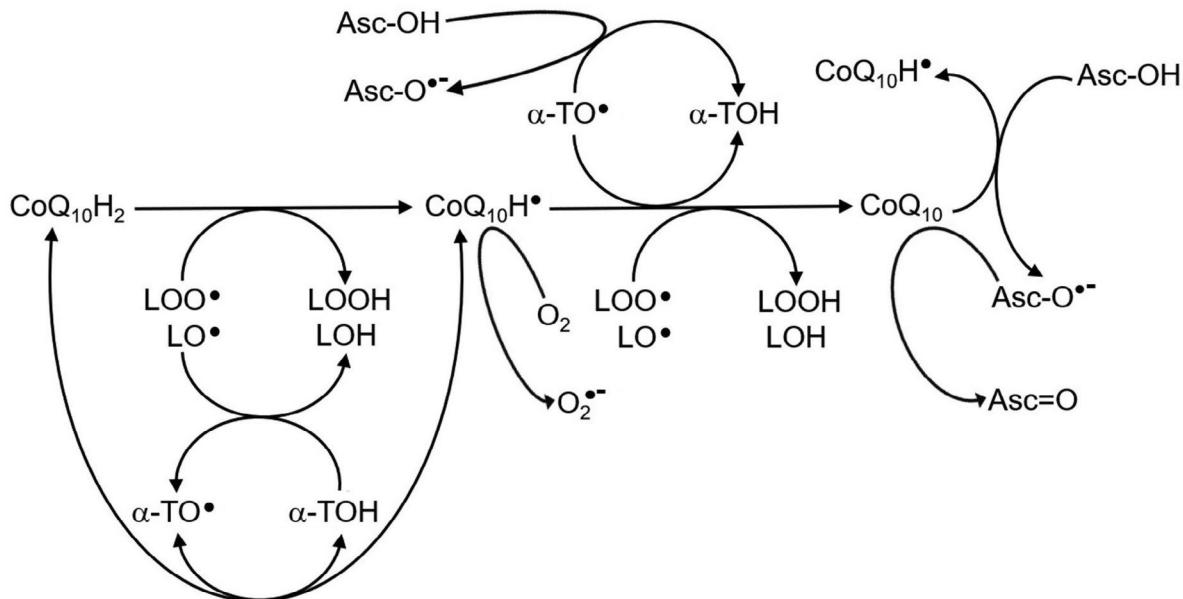
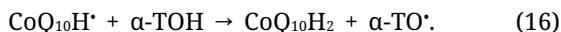


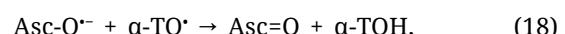
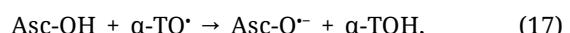
Рис. 8. Гипотетическая схема, иллюстрирующая возможные механизмы биорегенерации $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ и $\alpha\text{-TOH}$ в процессе СРО частиц ЛНП. Принятые обозначения: $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$, $\text{CoQ}_{10}\text{H}^\bullet$ и CoQ_{10} – убихинол Q_{10} (восстановленная форма коэнзима Q_{10}), убисемихинон Q_{10} и убихинон Q_{10} (окисленная форма коэнзима Q_{10}) соответственно; $\alpha\text{-TOH}$ и $\alpha\text{-TO}^\bullet$ – α -токоферол и токофероксильный радикал; Asc-OH, Asc-O^{•-} и Asc=O – аскорбиновая кислота, семидегидроаскорбат и дегидроаскорбат соответственно; LOO^\bullet и LO^\bullet – пероксильный и алкоксильный радикалы ПНЖК; LOOH и LOH – гидропероксид и гидроксид липидов

синергизма может быть восстановление в присутствии $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ (реакция (4)) токофероксильных радикалов, способных инициировать дальнейшие цепные реакции СРО в частицах ЛНП (реакция (5)) [19]. Действительно, в гомогенной модельной системе (водно-спиртовая смесь) нами было показано, что при молярном соотношении $\alpha\text{-TO}^\bullet$ и $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$, равном 1/31, происходит восстановление приблизительно 45% $\alpha\text{-TO}^\bullet$ (рис. 7, б). Важно отметить, что данный механизм биорегенерации $\alpha\text{-TOH}$ может объяснить эффективное антиоксидантное действие препарата CoQ_{10} при его введении больным атеросклерозом (рис. 2). Поскольку *in vivo* содержание $\alpha\text{-TOH}$ в частицах ЛНП значительно выше, чем $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$, не исключено, что реакция (4) является обратимой. Таким образом, можно предположить участие $\alpha\text{-TOH}$ в биорегенерации (восстановлении) убисемихинона Q_{10} в частицах ЛНП в ходе реакции:



Действительно, ранее было показано, что добавление $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ стимулирует образование феноксильного радикала пробукола в частицах ЛНП при их интенсивном окислении [28]. Полагают, что пробукол, как, возможно, и $\alpha\text{-TOH}$, окисляется образующимся в этих условиях $\text{CoQ}_{10}\text{H}^\bullet$. Однако в используемой нами гомогенной модельной системе феноксильный радикал пробукола, так же как $\alpha\text{-TO}^\bullet$, восстанавливается $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ (рис. 7, а).

Вместе с тем известно, что свободные радикалы пробукола и α -токоферола, но не $\text{CoQ}_{10}\text{H}^\bullet$, восстанавливаются аскорбиновой кислотой (Asc-OH) [27, 28, 55–57]. Этот механизм регенерации $\alpha\text{-TOH}$ согласуется с полученными нами результатами (рис. 7, а; спектры 5–7) и предполагает протекание следующих реакций:



где $\text{Asc-O}^{\bullet-}$ – семидегидроаскорбат (свободный радикал аскорбата); Asc=O – дегидроаскорбиновая кислота.

Тем не менее роль аскорбиновой кислоты в процессе защиты частиц ЛНП от СРО не до конца выяснена. Очевидно, что высокая концентрация аскорбата в плазме крови и наличие редуктазы семидегидроаскорбата ($\text{Asc-O}^{\bullet-}$) в мембране эритроцитов [55] нужны, прежде всего, для подавления взаимодействия образующихся при окислительном стрессе АФК (таких как $\text{O}_2^\bullet-$ и HO^\bullet) с частицами ЛНП. Как уже отмечалось, Asc-OH не регенерирует $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ из $\text{CoQ}_{10}\text{H}^\bullet$, однако, по имеющимся в литературе данным, аналоги CoQ_{10} с короткой цепью восстанавливаются до соответствующих убисемихинонов в реакциях с аскорбатом и семидегидроаскорбатом [30, 58]. Исходя из вышесказанного, можно полагать, что аскорбат восстанавливает $\alpha\text{-TO}^\bullet$ до $\alpha\text{-TOH}$ и CoQ_{10} до $\text{CoQ}_{10}\text{H}^\bullet$.

Возможное участие различных природных антиоксидантов в сопряжённых процессах защиты частиц ЛНП от цепных процессов СРО показано на нижеследующей схеме (рис. 8).

По всей видимости, система сопряжённых реакций липофильных и гидрофильных антиоксидантов функционирует как своеобразный редокс-буфер, обеспечивающий наиболее эффективную антиоксидантную защиту частиц ЛНП в условиях окислительного стресса.

Важно отметить, что характер действия CoQ₁₀H₂ и синтетического антиоксиданта skQ1 на Cu²⁺-индуцированное СРО в частицах ЛНП имеет сходный характер (рис. 3–5), несмотря на существенное различие небензохиноновой части их молекул (рис. 1). Предложенные нами механизмы биорегенерации коэнзима Q₁₀ и α-токоферола обсуждаются и другими авторами [16, 19]. На возможность протекания таких реакций указывают существующие представления о близости расположения CoQ₁₀H₂ и α-ТОН в частицах ЛНП, при котором бензохиноновая или хромановая части молекул этих антиоксидантов прымыкают к гидрофильным фосфатным группировкам фосфолипидов, а гидрофобные «хвосты» находятся вблизи ацилов ПНЖК фосфолипидов [19].

Необходимо учитывать, что в каждой частице ЛНП на 1 молекулу CoQ₁₀H₂ приходится до 12 молекул α-ТОН [13, 17], причём количество субстрата СРО – ацилов ПНЖК, в фосфолипидах ЛНП в молярном отношении составляет около 20–30 на 1 моль α-ТОН [59]. Если исходить из округлённых молярных соотношений между CoQ₁₀H₂/α-ТОН/ПНЖК = 1/10/300, становится понятно, что с учётом предполагаемых механизмов биорегенерации липофильных антиоксидантов ингибирование СРО в частицах ЛНП должно быть весьма эффективным. В действительности эта эффективность

может быть ещё выше, поскольку одна молекула восстановленного коэнзима Q₁₀ способна утилизировать два свободных радикала, действуя сначала как CoQ₁₀H₂, а затем – как CoQ₁₀H[·] (реакции (2) и (3)). Тем не менее конкретные механизмы антиоксидантной защиты частиц ЛНП и участия различных природных антиоксидантов в регуляции процессов СРО в частицах ЛНП нуждаются в дополнительном экспериментальном обосновании.

Вклад авторов. Ланкин В.З. – концепция исследования, написание варианта статьи и обсуждения результатов; Шумаев К.Б. – проведение ЭПР-спектрометрических исследований, обсчёт результатов, изготовление рисунков, написание варианта статьи и обсуждения результатов; Медведева В.А. – проведение кинетических исследований; Тихазе А.К. – подготовка списка литературы, участие в написании обсуждения статьи; Коновалова Г.Г. – проведение клинического исследования.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-15-00013).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Клиническая часть исследования проводилась в соответствии с этическими стандартами национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и её последующим изменением или сопоставимым нормам этики. От каждого из включённых в исследование участников было получено информированное добровольное согласие. Экспериментальные протоколы были одобрены Этическим комитетом Института клинической кардиологии НМИЦК Минздрава России 29 января 2018 года (идентификационный код проекта 233).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Sharapov, M. G., Gudkov, S. V., and Lankin, V. Z. (2021) Hydroperoxide reducing enzymes in the regulation of free radical processes, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 1256-1274, <https://doi.org/10.1134/S0006297921100084>.
- Shen, B. W., Scanu, A. M., and Kezdy, F. J. (1977) Structure of human serum lipoproteins inferred from compositional analysis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 837-841, <https://doi.org/10.1073/pnas.74.3.837>.
- Lankin, V. Z., Tikhaze, A. K., and Kosach, V. Ya. (2022) Comparative susceptibility to oxidation of different classes of blood plasma lipoproteins, *Biochemistry (Moscow)*, **87**, 1335-1341, <https://doi.org/10.1134/S0006297922110128>.
- Sharapov, M. G., Gudkov, S. V., and Lankin, V. Z. (2021) Role of glutathione peroxidases and peroxiredoxins in free radical induced pathologies, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 1418-1433, <https://doi.org/10.1134/S0006297921110067>.
- Lankin, V. Z., and Tikhaze, A. K. (2017) Role of oxidative stress in the genesis of atherosclerosis and diabetes mellitus: a personal look back on 50 years of research, *Curr. Aging Sci.*, **10**, 18-25, <https://doi.org/10.2174/187460980966160926142640>.
- Mellors, A., and Tappel, A. L. (1966) The inhibition of mitochondrial peroxidation by ubiquinone and ubiquinol, *J. Biol. Chem.*, **241**, 4353-4356, [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)99728-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)99728-0).
- Witting, L. A. (1980) Vitamin E and lipid antioxidants in free-radical-initiated reactions, *Free Radic. Biol.*, **4**, 295-319, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-566504-9.50016-7>.

8. Bliznakov, E. G., and Wilkins, D. J. (1998) Biochemical and clinical consequences of inhibiting coenzyme Q10 biosynthesis by lipid-lowering HMG-CoA reductase inhibitors (statins): a critical overview, *Adv. Ther.*, **15**, 218-228.
9. Hevonenja, T., Pentikäinen, M. O., Hyvönen, M. T., Kovánen, P. T., and Ala-Korpela, M. (2000) Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: basis for understanding molecular changes in modified LDL, *Biochim. Biophys. Acta.*, **15**, 189-210, [https://doi.org/10.1016/s1388-1981\(00\)00123-2](https://doi.org/10.1016/s1388-1981(00)00123-2).
10. Thomas, S. R., Neuzil, J., and Stocker, R. (1997) Inhibition of LDL oxidation by ubiquinol-10. A protective mechanism for coenzyme Q in atherosclerosis? *Mol. Aspects Med.*, **18**, 85-103, [https://doi.org/10.1016/s0098-2997\(97\)00031-9](https://doi.org/10.1016/s0098-2997(97)00031-9).
11. Thomas, S. R., Witting, P. K., and Stocker, R. (1999) A role for reduced coenzyme Q in atherosclerosis? *Biofactors*, **9**, 207-224, <https://doi.org/10.1002/biof.5520090216>.
12. Littarru, G. P., Battino, M., Tomasetti, M., Mordente, A., Santini, S., Oradei, A., Manto, A., and Ghirlanda, G. (1994) Metabolic implications of coenzyme Q₁₀ in red blood cells and plasma lipoproteins, *Mol. Aspects Med.*, **15**, 67-72, [https://doi.org/10.1016/0098-2997\(94\)90014-0](https://doi.org/10.1016/0098-2997(94)90014-0).
13. Stocker, R. (1993) Natural antioxidants and atherosclerosis, *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, **2**, 15-20.
14. Niki, E. (2014) Role of vitamin E as a lipid-soluble peroxy radical scavenger: *in vitro* and *in vivo* evidence, *Free Radic. Biol. Med.*, **66**, 3-12, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.03.022>.
15. Frei, B., Kim, M. C., and Ames, B. N. (1990) Ubiquinol-10 is an effective lipid-soluble antioxidant at physiological concentrations, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 4879-4883, <https://doi.org/10.1073/pnas.87.12.4879>.
16. Kagan, V. E., Fabisiak, J. E., and Quinn, E. J. (2000) Coenzyme Q and vitamin E need each other as antioxidants, *Protoplasma*, **214**, 11-18, <https://doi.org/10.1007/BF02524257>.
17. Bowry, V. W., Stocker, R. (1993) Tocopherol-mediated peroxidation. The prooxidant effect of vitamin E on the radical-initiated oxidation of human low-density lipoprotein, *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 6029-6044, <https://doi.org/10.1021/ja00067a019>.
18. Witting, P. K., Upston, J. M., and Stocker, R. (1997) Role of alpha-tocopheroyl radical in the initiation of lipid peroxidation in human low-density lipoprotein exposed to horse radish peroxidase, *Biochemistry*, **36**, 1251-1258, <https://doi.org/10.1021/bi962493j>.
19. Fong, C. W. (2023) Coenzyme Q 10 and Vitamin E synergy, electron transfer, antioxidation in cell membranes, and interaction with cholesterol, hal-03976270.
20. Lindgren, F. T. (1975) Preparative ultracentrifugal laboratory procedures and suggestions for lipoprotein analysis, in *Analysis of Lipids and Lipoproteins* (Perkins, E. G., ed) Champaign: Amer. Oil. Chemists Soc., pp. 204-224.
21. Nourooz-Zadeh, J., Tajaddini-Sarmadi, J., and Wolf, S. P. (1994) Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine, *Anal. Biochem.*, **220**, 403-409, <https://doi.org/10.1006/abio.1994.1357>.
22. Lankin, V. Z., Konovalova, G. G., Tikhaze, A. K., Shumaev, K. B., Kumskova, E. M., and Viigimaa, M. (2014) The initiation of the free radical peroxidation of low-density lipoproteins by glucose and its metabolite methylglyoxal: a common molecular mechanism of vascular wall injuries in atherosclerosis and diabetes, *Mol. Cell. Biochem.*, **395**, 241-252, <https://doi.org/10.1007/s11010-014-2131-2>.
23. Mark, J., and Burkitt, A. (2001) Critical overview of the chemistry of copper-dependent low density lipoprotein oxidation: roles of lipid hydroperoxides, α-tocopherol, thiols, and ceruloplasmin, *Arch. Biochem. Biophys.*, **394**, 117-135, <https://doi.org/10.1006/abbi.2001.2509>.
24. Patel, R. P., and Darley-Usmar, V. (1999) Molecular mechanisms of the copper dependent oxidation of low-density lipoprotein, *Free Radic. Res.*, **30**, 1-9, <https://doi.org/10.1080/10715769900300011>.
25. Kontush, A., Hubner, C., Finckh, B., Kohlschutter, A., and Beisiegel, U. (1994) Low density lipoprotein oxidizability by copper correlates to its initial ubiquinol-10 and polyunsaturated fatty acid content, *FEBS Lett.*, **341**, 69-73, [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)80242-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)80242-4).
26. Эмануэль Н. М., Денисов Е. Т., Майзус З. К. (1965) Цепные реакции окисления углеводородов в жидкой фазе, Москва, Наука, 375 с.
27. Kagan, V. E., Freisleben, H. J., Tsuchiya, M., Forte, T., and Packer, L. (1991) Generation of probucol radicals and their reduction by ascorbate and dihydrolipoic acid in human low density lipoproteins, *Free Radic. Res. Commun.*, **15**, 265-276, <https://doi.org/10.3109/10715769109105222>.
28. Shumaev, K. B., Ruuge, E. K., Dmitrovsky, A. A., Bykhovsky, V. Ya., and Kukharchuk, V. V. (1997) Effect of lipid peroxidation products and antioxidants on the formation of probucol radical in low density lipoproteins, *Biochemistry (Moscow)*, **62**, 657-660.
29. Nohl, H., Gille, L., and Kozlov, A. V. (1998) Antioxidant-derived prooxidant formation from ubiquinol, *Free Radic. Biol. Med.*, **25**, 666-675, [doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00105-1](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00105-1).
30. Roginsky, V. A., Mohr, D., and Stocker, R. (1996) Reduction of ubiquinone-1 by ascorbic acid is a catalytic and reversible process controlled by the concentration of molecular oxygen, *Redox Rep.*, **2**, 55-62, <https://doi.org/10.1080/13510002.1996.11747027>.

31. Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T. E., Khoo, J. C., and Witztum, J. L. (1989) Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity, *New Eng. J. Med.*, **320**, 915-924, <https://doi.org/10.1056/NEJM198904063201407>.
32. Kita, T., Ishii, K., Yokode, M., Kume, N., Nagano, Y., Arai, H., Arai, H., and Kawai, C. (1990) The role of oxidized low density lipoprotein in the pathogenesis of atherosclerosis, *Eur. Heart J.*, **11**, 122-127, https://doi.org/10.1093/eurheartj/11.suppl_e.122.
33. Witztum, J. L. (1994) The oxidation hypothesis of atherosclerosis, *Lancet*, **344**, 793-795, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(94\)92346-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(94)92346-9).
34. Yla-Herttula, S. (1994) Role of lipid and lipoprotein oxidation in the pathogenesis of atherosclerosis, *Drugs Today*, **30**, 507-514.
35. Steinberg, D. (1995) Role of oxidized LDL and antioxidants in atherosclerosis, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **369**, 39-48, https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1957-7_5.
36. Lakin, V. Z., and Tikhaze, A. K. (2017) Role of oxidative stress in the genesis of atherosclerosis and diabetes mellitus: a personal look back on 50 years of research, *Curr. Aging Sci.*, **10**, 18-25, <https://doi.org/10.2174/1874609809666160926142640>.
37. Lakin, V. Z., Tikhaze, A. K., and Melkumyants, A. M. (2022) Dicarbonyl-dependent modification of LDL as a key factor of endothelial dysfunction and atherosclerotic vascular wall damage, *Antioxidants*, **11**, 1565, <https://doi.org/10.3390/antiox11081565>.
38. Lakin, V. Z., Tikhaze, A. K., and Melkumyants, A. M. (2022) Malondialdehyde as an important key factor of molecular mechanisms of vascular wall damage under heart diseases development, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 128, <https://doi.org/10.3390/ijms24010128>.
39. Lakin, V. Z., Tikhaze, A. K., Sharapov, M. G., and Konovalova, G. G. (2024) The role of natural low molecular weight dicarbonyls in atherogenesis and diabetogenesis, *Rev. Cardiovasc. Med.*, **25**, 295, <https://doi.org/10.31083/j.rcm2508295>.
40. Lakin, V. Z., Tikhaze, A. K., and Konovalova, G. G. (2023) Differences in structural changes and pathophysiological effects of low-density lipoprotein particles upon accumulation of acylhydroperoxy derivatives in their outer phospholipid monolayer or upon modification of apoprotein B-100 by natural dicarbonyls, *Biochemistry (Moscow)*, **88**, 1910-1919, <https://doi.org/10.1134/S0006297923110196>.
41. Lakin, V. Z., Sharapov, M. G., Tikhaze, A. K., Goncharov, R. G., Antonova, O. A., Konovalova, G. G., and Novoselov, V. I. (2023) Dicarbonyl-modified low-density lipoproteins are key inducers of LOX-1 and NOX1 gene expression in the cultured human umbilical vein endothelial cells, *Biochemistry (Moscow)*, **88**, 2125-2136, <https://doi.org/10.1134/S0006297923120143>.
42. Stocker, R., Bowry, V. W., and Frei, B. (1991) Ubiquinol-10 protects human low density lipoprotein more efficiently against lipid peroxidation than does α -tocopherol, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 1646-1650, <https://doi.org/10.1073/pnas.88.5.1646>.
43. Ahmadvand, H., Mabuchi, H., Nohara, A., Kobayahi, J., and Kawashiri, M. A. (2013) Effects of coenzyme Q(10) on LDL oxidation *in vitro*, *Acta Med. Iran.*, **51**, 12-18.
44. Raizner, A. E. (2019) Coenzyme Q₁₀, *Methodist Debakey Cardiovasc. J.*, **15**, 185-191, <https://doi.org/10.14797/mdcj-15-3-185>.
45. Mohr, D., Bowry, V. W., and Stocker, R. (1992) Dietary supplementation with coenzyme Q₁₀ results in increased levels of ubiquinol-10 within circulating lipoproteins and increased resistance of human low-density lipoprotein to the initiation of lipid peroxidation, *Biochim. Biophys. Acta*, **1126**, 247-254, [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(92\)90237-P](https://doi.org/10.1016/0005-2760(92)90237-P).
46. Bargossi, A. M., Grossi, G., Fiorella, P. L., Gaddi, A., Di Giulio, R., and Battino, M. (1994) Exogenous CoQ₁₀ supplementation prevents plasma ubiquinone reduction induced by HMG-CoA reductase inhibitors, *Mol. Aspects Med.*, **15**, 187-193, [https://doi.org/10.1016/0098-2997\(94\)90028-0](https://doi.org/10.1016/0098-2997(94)90028-0).
47. Garrido-Maraver, J., Cordero, M. D., Oropesa-Avila, M., Vega, A.F., de la Mata, M., Pavon A. D., Alcocer-Gomez, E., Calero, C. P., Paz, M. V., Alanis, M., de Lavera, I., Cotan, D., and Sanchez-Alcazar, J. A. (2014) Clinical applications of coenzyme Q₁₀, *Front. Biosci.*, **19**, 619-633, <https://doi.org/10.2741/4231>.
48. Gutierrez-Mariscal, F. M., de la Cruz-Ares, S., Torres-Peña, J. D., Alcalá-Díaz, J. F., Yubero-Serrano, E. M., and López-Miranda, J. (2021) Coenzyme Q₁₀ and cardiovascular diseases, *Antioxidants*, **10**, 906, <https://doi.org/10.3390/antiox10060906>.
49. Lakin, V. Z., and Tikhaze, A. K. (2003) Atherosclerosis as a free radical pathology and antioxidative therapy of this disease, *Free Radic.*, **344**, 218-231.
50. Lakin, V. Z., Tikhaze, A. K., Kapel'ko, V. I., Shepel'kova, G. S., Shumaev, K. B., Panasenko, O. M., Konovalova, G. G., and Belenkov, Y. N. (2007) Mechanisms of oxidative modification of low density lipoproteins under conditions of oxidative and carbonyl stress, *Biochemistry (Moscow)*, **72**, 1081-1090, <https://doi.org/10.1134/S0006297907100069>.

51. Kontush, A., Reich, A., Baum, K., Spranger, T., Finckh, B., Kohlschütter, A., and Beisiegel, U. (1997) Plasma ubiquinol-10 is decreased in patients with hyperlipidaemia, *Atherosclerosis*, **129**, 119-126, [https://doi.org/10.1016/s0002-9150\(96\)06021-2](https://doi.org/10.1016/s0002-9150(96)06021-2).
52. Miura, S., Watanabe, J., Tomita, T., Sano, M., and Tomita, I. (1994) The inhibitory effects of tea polyphenols (flavan-3-ol derivatives) on Cu²⁺-mediated oxidative modification of low density lipoprotein, *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 1567-1572, <https://doi.org/10.1248/bpb.17.1567>.
53. Yeomans, V. C., Linseisen, J., and Wolfram, G. (2005) Interactive effects of polyphenols, tocopherol and ascorbic acid on the Cu²⁺-mediated oxidative modification of human low density lipoproteins, *Eur. J. Nutr.*, **44**, 422-428, <https://doi.org/10.1007/s00394-005-0546-y>.
54. Jayaraman, S., Gantz, D. L., Gursky, O. (2007) Effects of oxidation on the structure and stability of human low-density lipoprotein, *Biochemistry*, **46**, 5790-5797, <https://doi.org/10.1021/bi700225a>.
55. Beyer, R. E. (1994) The role of ascorbate in antioxidant protection of biomembranes: interaction with vitamin E and coenzyme Q, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **26**, 349-358, <https://doi.org/10.1007/BF00762775>.
56. Neuzil, J., Thomas, S. R., and Stocker, R. (1997) Requirement for, promotion, or inhibition by alpha-tocopherol of radical-induced initiation of plasma lipoprotein lipid peroxidation, *Free Radic Biol. Med.*, **22**, 57-71, [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(96\)00224-9](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(96)00224-9).
57. Carr, A. C., Zhu, B. Z., and Frei, B. (2000) Potential antiatherogenic mechanisms of ascorbate (vitamin C) and alpha-tocopherol (vitamin E), *Circ. Res.*, **87**, 349-354, <https://doi.org/10.1161/01.res.87.5.349>.
58. Guo, Q., and Packer, L. (1999) ESR studies of ascorbic acid-dependent recycling of the vitamin E homologue Trolox by coenzyme Q₀ in murine skin homogenates, *Redox Rep.*, **4**, 105-111, <https://doi.org/10.1179/135100099101534783>.
59. Chancharme, L., Thérond, P., Nigon, F., Zarev, S., Mallet, A., Bruckert, E., and Chapman, M. J. (2002) LDL particle subclasses in hypercholesterolemia. Molecular determinants of reduced lipid hydroperoxide stability, *J. Lipid Res.*, **43**, 453-462, [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(02\)30152-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(02)30152-8).

MECHANISMS OF ANTIOXIDANT PROTECTION OF LOW-DENSITY LIPOPROTEIN PARTICLES AGAINST FREE RADICAL OXIDATION

**V. Z. Lankin^{1*}, K. B. Shumaev^{1,2}, V. A. Medvedeva¹,
A. K. Tikhaze¹, and G. G. Konovalova¹**

¹ National Medical Research Center of Cardiology Named after Academician E. I. Chazov,
Ministry of Health of the Russian Federation, 121552 Moscow, Russia; e-mail: lankin0309@mail.ru

² Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences,
119071 Moscow, Russia

It was found that when patients with atherosclerosis are orally administered ubiquinon Q₁₀ (CoQ₁₀), the oxidation (lipohydroperoxide content) of low-density lipoprotein (LDL) particles sharply decreases, which confirms the important role of this natural antioxidant in protecting LDL particles from free radical oxidation *in vivo*. The influence of lipophilic natural antioxidants ubiquinol Q₁₀ (CoQ₁₀H₂) and α-tocopherol (α-TOH) on the kinetic parameters of Cu²⁺-initiated free radical oxidation of LDL particles was investigated. In this model system, the possible synergism of the antioxidant action of CoQ₁₀H₂ and α-TOH is shown. The probable mechanisms of bioregeneration of the lipophilic antioxidants in LDL particles, including regeneration of α-TOH from the tocopheroxyl radical (α-TO[·]) with the participation of CoQ₁₀H₂ and/or ascorbate, are discussed.

Keywords: low-density lipoproteins, free radical oxidation, antioxidants, ubiquinol Q₁₀, α-tocopherol, antioxidant bioregeneration