ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
им. М.В. ЛОМОНОСОВА»
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ТОМСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ОНКОЛОГИИ»

На правах рукописи

МАНСКИХ ВАСИЛИЙ НИКОЛАЕВИЧ

# ЭФФЕКТЫ МИТОХОНДРИАЛЬНО-НАПРАВЛЕННЫХ АНТИОКСИДАНТОВ: ОБЩАЯ ТОКСИКОЛОГИЯ, ВЛИЯНИЕ НА ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ И ОБЩЕПАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ

14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук

Научные консультанты:

доктор биологических наук, профессор, академик РАН

Скулачев В.П.

доктор медицинских наук, профессор

Перельмутер В.М.

Томск-2016

## ОГЛАВЛЕНИЕ

**СПИСОК ОКРАЩЕНИЙ**……...…….6
**ВВЕДЕНИЕ**……..……...……7
**ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**……...….17
1.1 Активные формы кислорода (АФК) и окислительный стресс как основные предполагаемые мишени для митохондриально-направленных антиоксидантов……..…17
1.1.1 Краткая характеристика АФК и других свободных радикалов……...17
1.1.2 Общая патофизиология окислительного стресса……..19
1.2 Данные о роли митохондрий как источника АФК в клетке……...23
1.2.1 Генерация митохондриями супероксид-анион радикала ($O_2^{\bullet -}$)……...23
1.2.2 Уровень продукции АФК ($O2^{\bullet -}$) митохондриями животных тканей *in vivo*……..……25
1.2.3 Парадоксальная продукция митохондриями пероксида водорода ($H_2O_2$) при гипоксии…….……28
1.2.4 Физиологическое значение продукции АФК в митохондриях…….…..29
1.3 Митохондриально-направленные антиоксиданты: общая характеристика и представители. Пластохинонилдецилтрифенилфосфоний (SkQ1) в ряду других митохондриальных антиоксидантов……..…….……30
1.3.1 Общие сведения……30
1.3.2 Химическое строение, физические свойства и фармакокинетика SkQ1…….33
1.3.3 Сравнительное исследование свойств SkQ1 и других производных проникающих катионов на субклеточных объектах……..…35
1.4 Эффекты митохондриально-направленных антиоксидантов в связи с ролью окислительного стресса в патогенезе основных общепатологических процессов и связанных с ними заболеваний человека и животных……40
1.4.1 Альтерация (дистрофические процессы, некроз и апоптоз)……40
1.4.2 Воспаление, иммунный ответ и иммунопатологические реакции…..…….52

1.4.3 Регенерация, компенсаторно-приспособительные процессы
и атрофия……57
1.4.4 Опухолевый рост……..……62
1.4.5 Нарушения крово- и лимфообращения……..…67
1.4.6 Старение и возраст-зависимые изменения тканей и органов……..…69
1.4.7 Эффекты митохондриальных антиоксидантов:
общий взгляд на состояние проблемы…….……76

**ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**……...84
2.1 Испытуемые вещества (SkQ)……..……84
2.2 Животные……..…84
2.3 Токсикопатологическое исследование……...…..90
2.4 Тестирование влияния вещества на продолжительность жизни
и спектр спонтанной патологии у животных……..…92
2.5 Моделирование альтеративной патологии……..…….93
2.6 Моделирование воспалительных реакций……94
2.7 Моделирование компенсаторно-приспособительных процессов……...…95
2.8 Моделирование атрофии……....…96
2.9 Модели опухолевого роста…….96
2.10 Гистотехнические и гистохимические методы…….…..97
2.11. Морфометрические методы……..……...98
2.12 Определение активности миелопероксидазы в тканях
при воспалении……100
2.13 Определение профиля экспрессии генов в тканях сердца……...……101
2.14 Статистические методы……..…102
2.15 Биоэтические аспекты исследования…….……103
2.16 Дизайн исследования…….……104

**ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**……..……...…106
3.1Токсикологическая патология SkQ1…….……106
3.1.1 1Изменения, вызванные острой интоксикацией SkQ1…….……...…106

3.1.1.1Данные исследования трупов на некропсии……..……107
3.1.1.2 Результаты гистологического исследования органов
павших животных……...……112
3.1.2 Морфологическое состояние органов и тканей после
хронического перорального введения препарата SkQ1……...……115
3.1.2.1 Суммарное описание морфологии органов
у контрольных самок разных групп…….……..……115
3.1.2.2 Суммарное описание морфологии органов
у контрольных самцов разных групп…….……129
3.1.2.3 Суммарное описание морфологии органов
у самок разных групп, получавших препарат SkQ1…….……137
3.1.2.4 Суммарное описание морфологии органов
у самцов разных групп, получавших SkQ1…….……..…145
3.1.2.5 Общее заключение по результатам морфологического
исследования……153
3.2 Эффекты SkQ1 на продолжительность жизни животных……153
3.2.1 Инбредные мыши BALB/c и C57Bl/6…….…….……..…153
3.2.2 Хомячок Кэмпбелла (*Phodopus campbelli*) и обыкновенная
слепушонка (*Ellobius talpinus*)……164
3.3 Патоморфологический анализ погибших животных,
получавших SkQ1 *per os* на протяжении всей жизни……..……168
3.3.1 Инбредные мыши BALB/c……168
3.3.1.1 Опухоли……168
3.3.1.2 Инфекционно-воспалительные заболевания……168
3.3.1.3 Неинфекционная патология…….……..……..…169
3.3.2 Инбредные мыши C57Bl/6…….……176
3.3.3 Хомячок Кэмпбелла (*Phodopus campbelli*)…….……178
3.3.4 Обыкновенная слепушонка (*Ellobius talpinus*)……180
3.4 Влияние SkQ1 на экспериментальные альтеративные процессы….……188
3.4.1 Цитостатическое поражение семенников……188
3.4.2 Токсическая дистрофия печени……..…191

3.5 Влияние SkQ1 и SkQR1 на воспалительные реакции……194
3.5.1 Асептическое экссудативное воспаление
поджелудочной железы (острый панкреатит)……..……194
3.5.2 Бактериальное экссудативное (гнойное) воспаление почек
(гнойный пиелонефрит)……..…195
3.5.3Продуктивное аутоиммунное воспаление
суставов стопы (аутоиммунный ревматоидный артрит)…….……199
3.6 Влияние SkQ1 на компенсаторно-приспособительные процессы……203
3.6.1 Репаративная регенерация кожи после механической травмы……..…203
3.6.2 Возрастная гипертрофия и фиброз миокарда……..……204
3.6.3 Влияние SkQ1 на развитие диспластических и метапластических
возрастных изменений в слезной железе крыс Вистар……207
3.7 Влияние SkQ1 на процессы атрофии на модели спонтанной
патологии у SOD1-трансгенных мышей B6SJL-Tg(SOD1-G93A)dl1Gur/J.....209
3.8 Влияние SkQ1 на опухолевый рост…….……212
3.8.1 Спонтанные опухоли у мышей линии BALB/c……..……212
3.8.2 Спонтанные опухоли у мышей линий C57Bl/6
и B6SJL-Tg(SOD1-G93A)dl1Gur/J……..……218
3.8.3 Спонтанные опухоли у самок хомячка Кэмпбелла
(*Phodopus campbelli*)……218
3.8.4 Спонтанные опухоли у слепушонки обыкновенной
(*Ellobius talpinus*)……222
3.9 Влияние SkQ1 на экспрессию генов в миокарде……224
**ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ**…….……228
**ВЫВОДЫ**……252
**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**……...……255

# СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФК – активные формы кислорода
ВЛМ – водный лабиринт Морриса
КОЕ-Ф – колониеобразующая единица фибробластов
ЛД – летальная доза
ПОЛ – перекисное окисление липидов
Услов. ед. – условные единицы
C12TPP – вещество, соответствующее SkQ1 без антиоксидантной части (пластохинона)
CD – поверхностный маркер клеточной дифференцировки
CoQ – коэнзим Q
CTAB - гексадецилтриметиламмония бромид
HIF-1 – индуцируемый гипоксией фактор-1
GO – генная онтология (Gene Ontology)
ICAM-1 – молекула межклеточной адгезии-1
KEGG – Киотская энциклопедия генов и геномов (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)
MitoQ – соединение проникающего катиона трифенинлфосфония и убихинона.
MMP9 – матриксная металлопротеиназа 9
MnSOD - супероксиддисмутаза митохондрий
NAC – N-ацетил-L-цистеин
NF-κB – транскрипционный ядерный фактор каппа-би
PEDF – фактор, продуцируемый пигментным эпителием сетчатки
SkQ1 – 10-(6'-пластохинонилдецил)трифенилфосфония бромид
SkQR1 – флуоресцентный аналог SkQ1, содержащий родамин в качестве проникающего катиона (коньюгат пластохинона с децилродамином 19)
SPF – статус, обозначающий свободу от специфических патогенов (specific pathogen free)
TGFβ1 – трансформирующий фактор роста-бета-1
TNFα – фактор некроза опухолей-альфа
TUNEL – метод детекции двунитиевых разрывов при апоптозе (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling)
VCAM – васкулярная молекула межклеточной адгезии
VEGF – фактор роста сосудистого эндотелия

# ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность проблемы.** Поиск новых мишеней для таргетной терапии патологических состояний является одной из важнейших задач современной фундаментальной и прикладной медицины. Очень важно, что в качестве таких мишеней могут выступать не только гены и их продукты (рецепторы, сигнальные молекулы и т.д.), но и биологические процессы, играющие ключевую роль в патогенезе тех или иных заболеваний. При этом очевидно, что, чем универсальней патогенетическая роль данных процессов, тем более широкий спектр нозологических единиц может быть показанием для потенциального терапевтического воздействия и тем большие перспективы открываются при таргетном воздействии на мишень. Одним из таких универсальных процессов является окислительный стресс, который в той или иной степени имеет место при подавляющем большинстве патологических состояний и играет особенно важную роль в патогенезе альтеративных и воспалительных поражений, а также в канцерогенезе, старении и развитии ряда возраст-зависимых патологий [Halliwell, Gutteridge, 1984; Katz, 1986; Halliwell, 1987; Flaherty, Weisfeldt, 1988; Halliwell, 1989; Halliwell, Gutteridge, 1990; Aruoma et al., 1991; Harman, 1992; Guyton, Kensler, 1993; Martínez-Cayuela, 1995; Зенков и соавт., 2001; Меньшикова и соавт., 2006; Анисимов, 2008; Khansari et al., 2009; Skulachev et al., 2011; Dai et al., 2014; Gupta et al., 2014]. Такая ситуация привела к логичной идее использовать антиоксиданты (вещества различной химической природы, нейтрализующие образование свободных радикалов) в качестве лекарственных средств для терапии различных заболеваний и средств, замедляющих развитие признаков старения и увеличивающих продолжительность жизни (геропротекторов) [Меньшикова и соавт., 2006; Зенков и соавт., 2001; Анисимов, 2008; Skulachev et al., 2011; 2014; Gupta et al., 2014]. Однако, все обычные антиоксидантные препараты (аскорбиновая кислота, α-токоферол, N-ацетилцистеин и др.) обладали двумя существенными недостатками: они не имели избирательности по отношению к клеточным компартментам, играющим ведущую роль в развитии окислительного

стресса и могли оказывать только «одноразовое» антиокислительное действие, утрачивая свои антиоксидантные свойства после взаимодействия со свободными радикалами [Armstrong, 2008; Antonenko et al., 2008; Skulachev et al., 2009]. Этим, по-видимому, во многом объясняется весьма скромное (в сравнении с ожиданиями) место, которое занимают неизбирательные антиоксиданты в современной комплексной терапии заболеваний, в том числе и связанных со старением [Villalba et al., 2010; Skulachev V.P. et al., 2011; Giordano et al., 2013]. Между тем, существуют определенные данные, согласно которым одним из важных мест образования свободных радикалов – активных форм кислорода (АФК) – являются митохондрии, и именно эти органеллы способны при окислительном повреждении инициировать активацию сигнальных путей, ведущих к гибели клеток, а, следовательно – к повреждению тканей и функциональным нарушениям органов и систем [Murphy, 2009; Skulachev et al., 2009]. Отсюда возникла мысль повысить эффективность препаратов, обладающих антиоксидантной активностью, обеспечив их направленное накопление в митохондриях. Усилиями нескольких научных коллективов (прежде всего В.П.Скулачева и M.Murphy) было создано целое семейство таких соединений, получивших название митохондриально-направленных антиоксидантов (*mitochondria-targeted antioxidants*). Среди этих антиоксидантов особое место принадлежит субстанции, получившей обозначение SkQ1 (10-(6'-пластохинонилдецил)трифенилфосфоний). Благодаря тому, что в качестве антиоксидантной части в этом веществе присутствует пластохинон, данный митохондриально-направленный антиоксидант обладает потенциальной способностью к регенерации в дыхательной цепи митохондрий, то есть может выступать как уникальный антиоксидант многократного действия [Antonenko et al., 2008]. Синтезирован и ряд других митохондриально-направленных антиоксидантов разнообразного строения, в частности, соединение SkQR1, в котором пластохинон соединен с митохондриальным флуоресцентным красителем – родамином 19. Между тем, для решения вопроса о возможном клиническом применении препаратов на основе этих субстанций необходима

информация об их эффектах (в том числе и токсических), которые возникают *in vivo* на клеточном и тканевом уровне и, реализуются, в конечном счете, на уровне физиологических и патофизиологических реакций как в исходно здоровом организме, так и при различных патологических состояниях (в том числе и связанных с возрастом). Поскольку митохондриально-направленные антиоксиданты уже сейчас входят в клиническую практику, и вопрос об их эффектах является проблемой настоящего времени, всестороннее тестирование этих препаратов на здоровых животных и на моделях различных заболеваний не может не быть чрезвычайно актуальным. Изучение закономерностей действия этих препаратов на клетки, ткани и органы *in vivo* позволит не только очертить круг возможных применений митохондриально-направленных антиоксидантов (в частности, SkQ1) в клинике, но и косвенным образом выявит действительное значение образующихся в митохондриях свободных радикалов в развитии признаков старения и в патогенезе различных заболеваний. Кроме того, исключительное значение могут иметь эффекты митохондриальных антиоксидантов, непосредственно связанные не с устранением повреждающего действия свободных радикалов, а с вмешательством этих соединений в работу сигнальных систем клетки. Важно заметить, что исследование действия препаратов путем простого перебора различных моделей заболеваний в ряде случаев гораздо менее информативно по сравнению с анализом их влияния на типовые общепатологические процессы, поскольку последний подход позволяет получать не только частные данные, но и очертить ряд общих областей возможного применения данного класса соединений.

**Разработанность проблемы.** Митохондриально-направленные антиоксиданты к настоящему времени уже достаточно хорошо изучены в отношении их физико-химических свойств и активности в клеточных и бесклеточных системах *in vitro*. Существует ряд публикаций о терапевтической эффективности этих соединений в отношении различных заболеваний в условиях эксперимента *in vivo* (ишемия почки, мозга, миокарда, катаракта и др.) и в клинике (сухой глаз, начальная катаракта). Опубликованы работы о влиянии SkQ1 на возрастные изменения у

лабораторных животных (инволюция тимуса, ухудшение неврологического статуса, саркопению). Относительно влияния на продолжительность жизни лабораторных млекопитающих опубликована только одна работа [Юрова и соавт., 2010], в которой не было выполнено подробного исследования спонтанной патологии (кроме опухолей). До настоящего времени не производилось систематического анализа влияния митохондриально-направленных соединений на развитие типовых патологических процессов, так же как отсутствуют специальные публикации о тестировании токсичности этих веществ на лабораторных животных.

**Цель работы.** Исследовать митохондриально-направленные антиоксиданты-соединения пластохинона в отношении общей токсичности, влияния на продолжительность жизни и спонтанную патологию у лабораторных животных разных видов, а также на развитие основных общепатологических процессов.

**Задачи работы:**

1. Изучить изменения в организме здоровых лабораторных животных, возникающих при остром однократном внутривенном и хроническом пероральном введении препаратов SkQ1.
2. Исследовать влияние длительного перорального введения различных доз SkQ1 на продолжительность жизни животных различных видов и линий, в том числе и в зависимости от условий содержания.
3. Оценить влияние продолжительного перорального введения различных доз SkQ1 на развитие и спектр возраст-зависимой патологии у животных различных видов и линий, в том числе и в зависимости от условий содержания.
4. Изучить влияние SkQ1 на глобальную экспрессию генов в сердце у лабораторных мышей и его связь с действием препарата на возникающие в миокарде спонтанные возрастные изменения.

5. Исследовать влияние SkQ1 на развитие альтеративных процессов (жировой дистрофии, некроза и апоптоза) на моделях острой токсической дистрофии печени и цитостатического поражения семенников.
6. Изучить влияние SkQ1, а также SkQR1 на развитие разных типов воспаления: острого асептического (на модели острого панкреатита, индуцированного аргинином), острого бактериального (на модели острого пиелонефрита) и продуктивного аутоиммунного (на модели ревматоидного артрита).
7. Оценить влияние SkQ1 на репаративную регенерацию на модели заживления ран кожи у здоровых молодых и старых мышей и животных с генетически обусловленным диабетом второго типа.
8. Исследовать эффект продолжительного перорального введения SkQ1 на компенсаторно-приспособительные процессы в форме гипертрофии и фиброза миокарда на модели возрастных изменений в сердце у лабораторных мышей.
9. Изучить влияние SkQ1 на развитие атрофии на модели патологических изменений у SOD-1 трансгенных мышей линии (B6SJL-Tg(SOD1-G93A)dl1Gur/J).
10. Дать морфологическую характеристику комплексу возрастных изменений (включающих дисплазию и гардеровскую метаплазию), возникающих в слезной железе крыс и влияния на них SkQ1.
11. Изучить влияние SkQ1 на различные варианты и модели спонтанного канцерогенеза у животных различных видов и линий.

**Научная новизна.** В настоящей работе впервые описана патоморфологическая картина интоксикации при внутривенном введении летальных доз SkQ1 и установлено, что гибель при этом происходит от отека легких. В то же время, было показано, что продолжительное пероральное введение SkQ1 в дозах до 2000 нмоль/кг не вызывает патологических изменений в органах животных. Впервые был изучен эффект SkQ1 на продолжительность жизни самцов и самок линейных

мышей (C57BL/6 и BALB/c) в SPF-условиях и диких животных (хомячок Кэмпбелла и обыкновенная слепушонка), содержавшихся в конвенциональном виварии. Установлено, что SkQ1 увеличивает продолжительность жизни животных в конвенциональных условиях и самцов (но не самок) линейных мышей в SPF-виварии. Это увеличение продолжительности жизни в конвенциональных условиях не было связано с изменением спектра спонтанной патологии, а у самцов мышей оно сопровождалось снижением частоты спонтанной возрастной (воспалительной) кардиомиопатии и не приводило к росту частот спонтанных опухолей. Впервые проведено систематическое изучение эффектов митохондриально-направленных антиоксидантов на развитие типовых общепатологических процессов (альтерации, экссудативного и продуктивного воспаления (в том числе и иммунного), репаративной регенерации, атрофии, компенсаторно-приспособительных реакций, дисплазии и опухолевого роста), в том числе и на некоторых новых моделях болезней (опухолей тимуса, гемолитической анемии, дисплазии эпителиального компонента в слезной железе). Было установлено, что митохондриальные антиоксиданты – производные пластохинона - не оказывают значимого эффекта на альтеративные изменения (жировую дистрофию, некроз, апоптоз) при токсическом поражении печени и семенников и снижает выраженность инфильтрации клетками-эффекторами (лимфоцитами, макрофагами, гранулоцитами) во всех исследованных моделях воспаления (бактериальный пиелонефрит, асептический панкреатит, аутоиммунный артрит). В то же время было показано, что SkQ1 ингибирует развитие фиброза и гипертрофии миокарда, а также метаплазии эпителия слезной железы, гемолитической анемии и метастатического распространения фолликулярных лимфом. Впервые изучен эффект SkQ1 на экспрессию генов *in vivo* (в сердце) и показано снижение активности сигнальных путей, ответственных за клеточную адгезию и трансэндотелиальную миграцию (ICAMs, VCAMs), но не систем, вовлеченных в развитие некроза или апоптоза. Эти молекулярные изменения происходили параллельно с уменьшением развития патоморфологических изменений в тканях (гипертрофии и фиброза) и хорошо

согласовались с обнаруженным влиянием SkQ1 на типовые патологические процессы, в которых значительную роль играет миграция циркулирующих клеток.

**Теоретическая и практическая значимость.** Основное теоретическое значение данной работы заключается в изменении и уточнении представлений о мишенях и механизме действия митохондриально-направленных соединений пластохинона. Преимущественное действие SkQ1 на воспалительные процессы, а также на регенерацию и компенсаторно-приспособительные явления, связанное с его влиянием на экспрессию молекул клеточной адгезии, процессы миграции клеток из кровотока и состав инфильтрата указывает, что эффекты данного вещества не сводятся только к уменьшению окислительных повреждений клеток и тканей. Это существенно меняет представление о механизме действия препаратов на основе SkQ1 и открывают новые перспективы для их исследования в эксперименте и использования в клинике. Практическое значение настоящей работы состоит в том, что в ней впервые в условиях эксперимента была показана эффективность SkQ1 и SkQR1 в отношении целого ряда заболеваний и патологических состояний – острого пиелонефрита, острого панкреатита, ревматоидного артрита, фолликулярной лимфомы, гемолитической анемии, гипертрофии и фиброза миокарда, заживления травм кожи при диабете второго типа, установлено наличие у препарата геропротекторных свойств. Эти результаты могут быть приняты во внимание при планировании и проведении клинических испытаний препаратов на основе митохондриально-направленных соединений пластохинона. Кроме того, в ходе работы были охарактеризованы возрастные изменения слезной железы крыс и несколько новых моделей болезней человека (тимомы типа B1, гемолитической анемии), которые могут быть использованы для тестирования разнообразных лекарственных субстанций. Наконец, в настоящей работе было произведено токсикопатологическое исследование SkQ1, включая тестирование канцерогенной активности на животных обоих полов и разных видов, данные которого должны учитываться при клинических испытаниях SkQ1.

**Методология и методы исследования.** Работа представляет собой экспериментальных исследование эффектов разных доз испытуемых соединений, выполненное с использованием 15 различных моделей на лабораторных животных, а также большого набора методов детекции изменений, возникающих в органах и тканях *in vivo*: патоморфологических, морфометрических, гистохимических, иммуногистохимических, биохимических, молекулярно-биологических с применением соответствующих способов статистической обработки данных.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. SkQ1 при длительном применении в терапевтических дозах не вызывает токсикопатологических изменений в органах и тканях и не обладает канцерогенной активностью.
2. SkQ1 при длительном (пожизненном) применении увеличивает продолжительность жизни животных разных линий и видов, обитающих в различных условиях, причем этот эффект может сопровождаться снижением частоты неинфекционных воспалительных поражений сердца (кардиомиопатии), либо происходить без изменений спектра спонтанных патологических изменений в органах и тканях.
3. Основные эффекты митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 обусловлены его влиянием на воспаление (сходном с влиянием его аналога SkQR1) и компенсаторно-приспособительные процессы, что связано с модулирующим действием этого соединения на внутриклеточные сигнальные пути, ответственные за провоспалительную активацию эндотелия и миграцию циркулирующих клеток в ткани; гораздо менее эффективно действие SkQ1 на альтерацию и канцерогенез.

**Публикации.** По материалам диссертации было опубликовано 44 работы на русском и английском языках, в том числе 1 монография и 21 статья в журналах, соответствующих критериям и из списка ВАК.

**Степень достоверности и апробация работы.** Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным объемом материала исследования, использованием современных методических подходов, адекватных критериев статистической оценки и публикацией данных в журналах с высоким импакт-фактором. Материалы работы были представлены на 8-м Всероссийском съезде онкологов (Санкт-Петербург, 11-13 сентября 2013г.), 7-й Российской конференции по фундаментальной онкологии «Петровские чтения» (Санкт-Петербург, 22 апреля 2011г.), 10-й Российской конференции по фундаментальной онкологии «Петровские чтения» (Санкт-Петербург, 25 апреля 2014г.), 2-й Ежегодной конференции «Наука о лабораторных животных: современные подходы (Санкт-Петербург, 21-22 декабря 2012г.), 3-й Ежегодной конференции специалистов по работе с лабораторными животными (Новосибирск, 25-28 сентября 2013г.), 18-й Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 21 - 25 апреля 2014 г.), XXI Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2014" (Москва, 7-11 апреля 2014 г.), XXI Российском национальном конгрессе ”Человек и лекарство”, (Москва, 7-11 апреля 2014 г.), IX Конференции молодых ученых-онкологов, посвященную памяти академика РАМН Н.В.Васильева "Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии" (Томск, 25 апреля 2014г.), IV Съезде физиологов СНГ «Физиология и здоровье человека» (Сочи-Дагомыс, 8-12 октября 2014г.), на семинарах НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ (2009-2015гг.), V Всероссийской научной интернет-конференции с международным участием «Современные проблемы анатомии, гистологии и эмбриологии животных» (Казань, 2014г.), Rus-LASA – ICLAS International Conference “Science-based assessment of laboratory animal welfare” (Санкт-Петербург, 17-19 ноября 2014), V International Interdisciplinary Academic Conference «Innovations & Humans» (Анталия, 26 апреля – 7 мая 2014г.), 51st European Renal Association – European Dialysis and Transplant Association Congress (Амстердам, 31 мая – 3 июня 2014г.), II International Conference «Homo sapiens liberatus» (Москва, 2 – 4 марта 2015г.).

**Личный вклад автора.** Работа по экспериментальному моделированию и исследованию общей токсичности SkQ1, его влияния на альтеративные процессы в семенной железе и продуктивное воспаление (ревматоидный артрит) выполнена автором совместно с А.А. Андреевым-Андриевским, исследование влияния SkQ1 на продолжительность жизни животных – совместно с М.С. Красильщиковой, М.П. Мошкиным, И.Г. Шабалиной и К.А. Роговиным, действие на атрофию (боковой амиотрофический склероз), токсическую альтерацию в печени и асептическое воспаление (панкреатит) – совместно с М.Л. Ловатем, влияние SkQR1 на острое бактериальное воспаление (пиелонефрит) – совместно с Е.Ю. Плотниковым и Д.Б. Зоровым, исследование SkQ1 на репаративную регенерацию кожи – совместно с И.А. Демьяненко, О.П. Ильинской и О.Ю. Плетюшкиной, на глобальную экспрессию генов в сердце - совместно с И.И. Галкиным и Р.А.Зиновкиным. Вся морфологическая часть работ, включая проведение некропсий животных, гистотехническую обработку материала, диагностическую верификацию патологических изменений и их качественную, полуколичественную и количественную (морфометрическую) оценку, статистическую обработку и интерпретацию результатов выполнена лично автором.

# ГЛАВА 1.
# ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1 Активные формы кислорода (АФК) и окислительный стресс как основные предполагаемые мишени для митохондриально-направленных антиоксидантов

### 1.1.1 Краткая характеристика АФК и других свободных радикалов

Окислительно-восстановительные реакции с участием кислорода являются сущностной чертой любого аэробного организма. Помимо участия в генерации энергии (аэробное дыхание), эти реакции имеют большое значение для осуществления физиологических регуляторных и защитных функций. Однако, неизбежным побочным следствием (а иногда – и основным эффектом) такого рода процессов является продукция активных форм кислорода (АФК). В настоящее время известны следующие основные разновидности АФК:

1) *супероксидный анион-радикал - $O_2^{\cdot -}$ (супероксид-анион, «проксимальная митохондриальная АФК»* по M. P. Murphy [Murphy, 2009]*;*
2) *гидроксильный радикал - $OH^{\cdot}$*
3) *пергидроксильный радикал - $HOO^{\cdot}$*
4) *перекись водорода - $H_2O_2$*
5) *синглетный кислород – $O_2^{\cdot}$*

Кроме указанных форм АФК, существуют и другие варианты активных свободных радикалов, в частности, достаточно активным соединением является оксид азота NO. Вторичные продукты, образующиеся при взаимодействии перечисленных соединений с органическими субстратами, также обладают свободнорадикальными свойствами. К ним относятся алкоксильные (RO.) и пероксильные ($ROO^{\cdot}$) радикалы, гидроперекиси ROOH, липоперекиси LOOH, модифицированные азотистые основания в ДНК, радикалы аминокислот и т.п. [Хавинсон и соавт., 2003; Меньщикова и соавт., 2006, Празднова, 2013]. В общем случае, *свободным радикалом* называется молекула, имеющая один или несколько

неспаренных электронов на внешней орбитали, что обуславливает наличие у нее дополнительной валентности и высокой реакционной способности [Владимиров и соавт., 1991; Владимиров, 1998]. Таким образом, по происхождению все известные свободные радикалы подразделяют на следующие три класса [Владимиров, 1998]:

1) *первичные* - возникают как результат реакций одноэлектронного восстановления при участии металлов с переменной валентностью; к ним относятся, в частности, супероксид-анион, оксид азота, радикалы убихинона;

2) *вторичные* – происходят из радикал-образующих молекул; к ним относятся, такие соединения, как гидроксильный радикал и липидные радикалы;

3) *третичные* - образуются при действии вторичных радикалов на молекулы антиоксидантов и других легко окисляемых соединений.

Первичные радикалы в норме выполняют ряд важных функций в организме, и проявляют негативные эффекты только при нарушении баланса их продукции; вторичные сами по себе оказывают цитотоксическое действие; третичные же занимают промежуточное положение [Празднова, 2013].

Каждая из названных выше разновидностей АФК обладает определенными происхождением и физико-химическими особенностями, которые во многом обуславливают их присутствие в тех или иных компартментах клетки (митохондрии, цитозоль) и различное участие в физиологических и патофизиологических реакциях [Halliwell, Gutteridge, 1984; Katz, 1986; Halliwell, 1987; Halliwell, 1989; Halliwell, Gutteridge, 1990; Aruoma et al., 1991; Martínez-Cayuela, 1995; Зенков и соавт., 2001; Меньшикова и соавт., 2006]. В любом живом организме существует физиологически нормальный уровень свободнорадикальных процессов. Так, например, постоянно протекающее перекисное окисление липидов (ПОЛ), необходимо для регулирования липидного состава, проницаемости мембран и ряда других биосинтетических процессов [Зенков и соавт., 2001]. Иммуноциты млекопитающих используют АФК для борьбы с внутри- и внеклеточными патогенами [Babior, 2004; Ojha et al., 2008]. Существует целый ряд других примеров участия АФК в регуляции клеточных

функций [Suzuki et al., 1997]. Однако все же внутриклеточный уровень содержания АФК в норме достаточно низок, и клетка либо инактивирует их с помощью антиоксидантных систем, либо восстанавливает нанесенные ими повреждения с помощью репарационных процессов [Кения и соавт., 1993].

Главной патологической ситуацией, связанной с участием свободных радикалов, является окислительный стресс.

### 1.1.2 Общая патофизиология окислительного стресса

*Окислительным (оксидативным) стрессом* называют явление, при котором наблюдается нарушение баланса между образованием АФК и работой тканевых и клеточных антиоксидантных систем [Sies, 1991]. Таким образом, окислительный стресс возникает, когда продукция АФК увеличивается вследствие активации АФК-продуцирующих систем, либо в результате снижения способности клетки к их нейтрализации [Празднова, 2013].

Уровень АФК, превышающий компенсаторные возможности антиоксидантных систем, вызывает серьёзные нарушения в структуре и функциях клеток и тканей, поскольку АФК способны вызывать повреждения важнейших биомолекул. Поврежденные макромолекулы либо подвергаются репарации, либо уничтожаются, однако темпы репарации при окислительном стрессе часто отстают от темпов накопления повреждений, вследствие чего в организме накапливаются поврежденные молекулы [Grune et al., 1997; Molecular Biology of Free Radicals…, 1998]. В зависимости от силы стресса, клетки могут претерпевать дистрофические изменения (с нарушением при этом функциональных отправлений тканей и органов и развитием патологических компенсаторных явлений), погибнуть в результате апоптоза, когда внутреннее содержимое клетки оказывается внутри апоптотических телец, которые удаляются фагоцитами без повреждения окружающей ткани или в результате некроза, если окислительные повреждения слишком велики [Логинов, Матюшин, 1991; Проскуряков и соавт., 2002; Манских, 2007]. При некрозе клеточная мембрана нарушается и содержимое клетки высвобождается в окружающую среду, что может в результате вызвать

альтерацию, воспалительные изменения и даже аутоиммунный ответ на окружающие клетки и ткани [Проскуряков и соавт., 2005; Манских, 2007]. В качестве мишеней для свободных радикалов при окислительном стрессе могут выступать липиды, белки и нуклеиновые кислоты.

В физиологических условиях индуцируемое АФК ПОЛ играет важную роль в обновлении мембран [Празднова, 2013]. Однако, избыток продуктов ПОЛ вызывает деструктивные эффекты и, в конечном счете, приводит к развитию дистрофических, апоптотических и некротических процессов. В частности, окисление фосфолипидов ведет к изменению адекватной упаковки клеточных мембран, что может вызвать повреждение ассоциированных с ними белков [Richter et al., 1987]. Кроме того, ПОЛ может приводить к повреждению клеточных рецепторов, а также некторых связанных с мембраной ферментов, например, Na+/K+-АТФазы [Болдырев и соавт., 2001], которой принадлежит ключевая роль в обеспечении водно-ионного гомеостаза клетки и нарушение работы которой ведет к развитию баллонной дистрофии [Струков, Серов, 1995]. В митохондриях в результате свободно-радикальных реакций могут повреждаться как ферменты матрикса, так и компоненты дыхательной цепи [Празднова, 2013]. Поврежденные мембраны утрачивают энергетический потенциал и избирательную проницаемость, что реализуется в падении синтеза АТФ (важнейшее событие в развитии баллонной дистрофии и некроза) и высвобождении из митохондрии факторов, инициирующих апоптоз [Пальцев, Аничков, 2003; Манских В.Н., 2007].

В условиях окислительного стресса процессы нерегулируемой модификации белков достигают значительного уровня и приводят, в конечном счете, к утрате ими биологических функций (ферментативной, транспортной, рецепторной и др.) [Владимиров, 1998; Зенков и соавт., 2001]. При тяжелом оксидантном стрессе инактивации могут быть подвергнуты ферменты антиоксидантной защиты и репарации, что делает развитие свободнорадикальных процессов неконтролируемым, а восстановление поврежденных клеточных структур – невозможным [Празднова, 2013].

Существенно отметить, что в результате изменения структуры белков могут возникать новые антигены, что способно спровоцировать аутоиммунный ответ [Проскуряков и соавт., 2005], особенно в случае гибели поврежденных клеток некротическим путем. Окислительной модификации могут быть подвергнуты не только внутриклеточные белки, но и компоненты межклеточного вещества, что также может реализоваться в форме фибриноидного набухания и фибриноидного некроза, а впоследствии быть причиной развития воспалительного ответа, аутоиммунных реакций, фиброза и гиалиноза [Струков, Серов, 1995].

Чрезвычайно большие биологические последствия имеет повреждающее действие АФК на ДНК. Молекула ДНК может повреждаться при непосредственном взаимодействии с АФК, в основном - гидроксид-радикалом и (в меньшей степени) супероксид-анионом кислорода [Владимиров, 1998; Зенков и соавт., 2001]. Гидроксид-радикал $OH^{\cdot}$ может действовать на пуриновые и пиримидиновые основания, а также на остатки рибозы и дезоксирибозы [Зенков и соавт., 2001]. Интересно, что, как это было показано в ряде экспериментов, митохондриальная ДНК подвержена воздействию АФК в большей степени, чем ядерная [Finkel, Holbrook, 2000; Barja, Herrero, 2000]. В числе причин этих различий указывается несколько факторов. В частности, предполагается, что митохондрия является основным местом образования свободных радикалов и АФК в клетке, имеет менее эффективные системы репарации ДНК, и, кроме того, митохондриальная ДНК не ассоциирована с гистоновыми комплексами, которые могли бы обеспечить ей дополнительную защиту [Dizdaroglu, 1985; Finkel, Holbrook, 2000; Barja, Herrero, 2000].

АФК способны повреждать ДНК не только за счет непосредственного взаимодействия, но и при посредстве генотоксичных продуктов перекисного окисления липидов и белков, реагирующих с ДНК [Ames, 1989; Rodriguez et al., 1995]. Образующийся в результате процессов окислительного стресса малоновый диальдегид способен образовывать аддукты с гуанином, аденином и цитозином, причем показано, что такие аддукты могут быть причиной транзиций и трансверсий [Dedon et al., 1998]. Кроме того, известно, что избыточная генерация

АФК и накопление продуктов ПОЛ могут не только вызывать мутации, но усиливать эффект других мутагенов, в частности, химических [Guetens et al., 2002; Blokhina et al., 2003]. Повреждение ДНК при окислительном стрессе происходит также в результате действия нуклеаз, которые активируются при повышении концентрации внутриклеточных ионов кальция, наблюдаемого в ходе окислительного стресса [Cadenas, 2000]. В конечном счете, все эти механизмы реализуются на уровне генотоксического эффекта в виде нарушений целостности молекул ДНК, генных мутаций и хромосомных перестроек [Дурнев, Середенин, 1999, Ильинских и соавт., 2011]. Спектр биологических последствий таких изменений крайне широк – от гибели клеток с нерепарированными разрывами ДНК за счет активности белка p53 и апоптоза или ухода в сенесенс – до появления в тканях клеточных клонов с измененными морфологическими и функциональными свойствами (неопухолевой неоплазии), в том числе и способных дать начало развитию опухолей (опухолевая неоплазия) [Пальцев, Аничков, 2003; Анисимов, 2008; Ильинских и соавт., 2011]. Исходя из сказанного, становится очевидным, что, несмотря на многообразие форм АФК, процессов свободнорадикального окисления и биомолекул-мишеней, окислительный стресс представляет собой однотипную общую системную ответную реакцию организма на действие разнообразных стрессоров, т.е. имеет неспецифический характер (Соколовский, 2008) и потенциально может реализоваться на клеточном и тканевом уровне в форме практически любого из известных общепатологических процессов – от дистрофических изменений до опухолевого роста включительно [Струков, Серов, 1995; Пальцев, Аничков, 2003].

Таким образом, существует значительное количество данных об изменениях, возникающих в живых системах при окислительном стрессе. Источниками активных форм кислорода могут быть экзогенные химические или физические агенты, прямо или косвенно увеличивающие генерацию АФК – так называемые прооксиданты, а также различные ферментативные процессы, катализируемые оксидазами в цитозоле и митохондриальными дыхательными системами [Halliwell, Gutteridge, 1984; Katz, 1986; Halliwell, 1987; Halliwell, 1989; Halliwell,

Gutteridge, 1990; Aruoma et al., 1991; Martínez-Cayuela, 1995; Storz, Imlay, 1999; Зенков и соавт., 2001; Pomposiello, Demple, 2002; Меньшикова и соавт., 2006]. Представление о том, что именно митохондрии генерируют основной пул свободных радикалов как в физиологических условиях, так и при многих патологических состояниях, и послужили основанием для разработки митохондриально-направленных антиоксидантных соединений.

## 1.2 Данные о роли митохондрий как источника АФК в клетке

### 1.2.1 Генерация митохондриями супероксид-анион радикала ($O_2^{\bullet -}$)

Многими авторами митохондрии считаются важным источником АФК в большинстве клеток млекопитающих [Chance et al., 1979; Nohl, 1981; Cadenas, Davies, 2000; Raha, Robinson, 2000; Muller, 2000; Turrens, 2003; Andreyev et al., 2005; Balaban et al., 2005; Adam-Vizi, Chinopoulos, 2006; Murphy, 2009]. Эта продукция АФК, которая, как полагают, является ключевым фактором повреждения и дисфункции митохондрий при большом спектре патологических процессов; кроме того, АФК обладают мощным регулирующим действием на целый ряд сигнальных внутриклеточных путей, транслирующих изменения окислительно-восстановительного статуса в митохондриях на уровень общих клеточных реакций [Drogue, 2002; Balaban et al., 2005]. Следовательно, знание того, как митохондрии производят АФК совершенно необходимо для понимания патогенеза и поиска терапевтических митохондриально-таргетированных воздействий при большом числе болезней и патологических состояний.

Первое сообщение о том, что дыхательная цеп способна генерировать АФК, было опубликовано в 1966 году [Jensen, 1966], а затем в пионерских работах Б. Чанса и соавторов было твердо установлено, что изолированные митохондрии также производят $H_2O_2$ [Chance et al., 1979; Loschen et al., 1971; Boveris, Chance, 1973]. В дальнейшем выяснилось, что этот $H_2O_2$ образовался в митохондриях в результате дисмутации супероксида ($O_2^{\bullet -}$) генерируемого дыхательной цепью [Loschen et al., 1974; Forman, Kennedy, 1974]. Одновременное открытие собственной супероксиддисмутазы митохондрий (MnSOD) стало веским

аргументом в пользу большого биологического значения митохондриальной продукции $O_2^{\bullet -}$ [Weisiger, Fridovich, 1973]. С этого и до настоящего времени накопилась большая и труднообозримая литература, посвященная молекулярным механизмам генерации митохондриальных АФК. В целом, существует два основных источника АФК, установленных в экспериментах на изолированных митохондриях (преимущественно, но не исключительно на комплексе I): обратный перенос электронов, когда значение *Δp* высокое, а пул CoQ истощается, и флавинмононуклеотид, когда имеет место высокое значение соотношения НАД-Н/НАД$^+$. Следует, однако, отметить, что, когда митохондрии активно синтезируют АТФ, скорость производства $O_2^{\bullet -}$ очень низка, а сайт, где образуются АФК, неопределенным. Основное (около 80%) количество супероксид-аниона образуется при потере электронов электронно-транспортной цепью митохондрий [Halliwell, 1981]. Таковая потеря имеет место при передаче электронов в комплексе НАД(Ф)-Н-кофермент Q-редуктаза и составляет обычно 1 – 4 % от общего потока электронов в цепи [Терешина, 2005].

Стоит отметить, что основное внимание в большинстве оригинальных и обзорных работ уделяется продукции так называемой проксимальной митохондриальной форме АФК – $O_2^{\bullet -}$, которая образуется за счет молекулярной машинерии, расположенной во внутренней мембране и в матриксе митохондрий [Murphy, 2009], хотя есть и другие потенциально важные источники АФК, связанные с наружной мембраной и межмембранным пространством [Cadenas, Davies, 2000; Andreyev et al., 2005]. Это особое внимание к проксимальным АФК связано с тем, что именно их образование и является главной мишенью для митохондриально-направленных антиоксидантов и именно на редукцию производства $O_2^{\bullet -}$ возлагаются наибольшие терапевтические надежды. Однако, с этой точки зрения важен не только механизм, но и уровень продукции АФК митохондриями в разных ситуациях.

### 1.2.2 Уровень продукции АФК ($O2^{\bullet-}$) митохондриями животных тканей in vivo

Для исследования того, какое значение имеет митохондриальная продукция $O_2^{\bullet-}$ для развития окислительных повреждений и активации связанных с окислительно-восстановительными реакциями сигнальных путей необходимо знать, сколько $O_2^{\bullet-}$ генерируется митохондриями в естественных условиях. Наибольший темп производства $H_2O_2$ изолированными митохондриями происходит в так называемом «состоянии 2», когда они имеют высокую $\Delta p$, уменьшенный пул CoQ и не производят АТФ [Murphy, 2009]. В этих условиях генерация АФК идет в основном за счет обратного транспорта электронов на комплексе I, и около 1-2% от $O_2$ потребляемого изолированными митохондриями в этих условиях преобразуется в $O_2^{\bullet-}$ [Andreyev et al., 2005; Chance et al., 1979; Kudin et al., 2004]. С того времени, как эта оценка была опубликована Б. Чансом и соавторами [Chance et al., 1979; Boveris, Chance, 1973], она получила очень широкое распространение в литературе и часто ошибочно приводится в качестве как показатель того количества кислорода, который преобразуется в супероксид в условиях *in vivo*, хотя даже в оригинальной публикации подчеркивается, что полученные результаты можно интерпретировать только относительно условий конкретного эксперимента [Boveris, Chance, 1973]. Прямая экстраполяция данных, полученных *in vitro,* на естественные условия *in vivo* оказывается невозможной по нескольким причинам. Во-первых, максимальная продукция $O_2^{\bullet-}$ изолированными митохондриями происходит во время обратного переноса электронов в условиях насыщенных концентраций субстратов, таких как сукцинат, уровни которых в естественных условиях намного ниже. Во-вторых, измерения на изолированных митохондриях выполняются, как правило, с использованием аэрированной до насыщения воздухом среды, содержащей ~ 200 мкмоль $O_2$. Поскольку митохондриальная продукция $O_2^{\bullet-}$, вероятно, пропорциональна концентрации $O_2$, а физиологический уровень $O_2$ вокруг митохондрий составляет приблизительно 10-50 мкМ, генерация $O_2^{\bullet-}$ *in vivo* может быть в 5-10 раз ниже, чем в изолированных митохондриях в том же состоянии. Третий и самый важный

фактор, ограничивающий экстраполяцию результатов, полученных *in vitro* на продукцию $O_2^{\bullet}$- в естественных условиях является то, что митохондрии в большинстве ситуаций *in vivo*, вероятно, будут производить АТФ и таким образом, будет находиться в «состоянии 3» с пониженным *Δp* и относительно окисленным пулом НАД-Н и CoQ [Murphy, 2009]. Следовательно, темпы генерации ими $H_2O_2$ являются незначительными по сравнению с состояниями 1 или 2. Вследствие этого уровни продукции $O_2^{\bullet -}$ в 0,12-2% от потребленного при дыхании кислорода митохондриями *in vitro* не могут быть экстраполированы на ситуации в естественных условиях, где митохондриальная генерация $O_2^{\bullet-}$ а *priori* должна быть во много раз ниже. В связи с этим, некоторые авторы указывают на невозможность в настоящее время даже грубо оценить, какое количество $O_2^{\bullet-}$ производится митохондриями в естественных условиях, прежде всего из-за недостатка знаний о базовом режиме функционирования митохондрий *in vivo* [Murphy, 2009]. Доля митохондрий с уменьшенным пулом НАД-Н и обратным переносом электронов в разных клетках также неизвестна. Если митохондрии в естественных условиях проводят большую часть своего времени в режиме близком к «состоянию 3» (это считается самым вероятным), то оценка продукции $O_2^{\bullet -}$ в матриксе, исходя из данных на изолированных митохондриях, становится совершенно недостоверной [Murphy, 2009]. Таким образом, хотя имеется серьезное косвенное свидетельство относительно образования в митохондриях биологически значимого уровня АФК в форме окислительных повреждений компонентов этих органелл, дать точную количественную оценку уровню генерации $O_2^{\bullet -}$ в виде доли от потребленного при дыхании кислорода в митохондриях внутри клеток пока не представляется возможным.

Если оценка митохондриальной продукции $O_2^{\bullet-}$ от количества потребленного кислорода невозможна, то можно ли оценить генерацию АФК митохондриями каким-либо другим путем, основываясь на данных *in vitro*? Максимально возможное производство $O_2^{\bullet -}$ в естественных условиях должно быть пропорционально содержанию в митохондриях дыхательных комплексов (таких как комплекс I), и коррелировать с максимальной скоростью дыхания. Тем

не менее, фактический уровень продукции $O_2^{\bullet -}$ настолько тесно зависит от таких факторов, как *Δp* и соотношение НАД-Н / $НАД^+$ (которые подвержены заметным колебаниям *in vivo*), что совершенно невозможно сказать, насколько изменения в продукции АФК митохондриями, выделенные из животных разного возраста или гормонального статуса, имеют отношение к ситуации в живой клетке [Murphy, 2009]. Можно ли выполнить такую оценку путем прямого измерения уровня АФК в тканях? К сожалению, пока не существует корректных методов, позволяющих по таким результатам даже приблизительно количественно оценить уровень генерации митохондриями $O_2^{\bullet -}$ в естественных условиях. Классическая оценка производства $H_2O_2$ была выполнена для перфузированной печени, где производство пероксида водорода в целом органе измеряли по изменениям «каталазного соединения I» [Oshino et al., 1975]. В этих условиях была установлена скорость продукции приблизительно в 80 нмоль/мин. $H_2O_2$ на грамм сырого веса ткани [Palacios-Callender et al., 2004], причем около 12 нмоль/мин $H_2O_2$ на г сырого веса получалось при пересчете результатов на чистые митохондрии [Boveris et al., 1972]. Однако даже в этой работе авторы заключили, что продукция внутриклеточными митохондриями $H_2O_2$ в этих условиях была такой же, как для изолированных митохондрий, потребляющих сукцинат и генерирующих $H_2O_2$ при обратном переносе электронов [Boveris et al., 1972]. Поэтому, несмотря на частые спекуляции на эту тему в различных публикациях, все еще сложно сказать, каков в действительности уровень генерации $O_2^{\bullet -}$ митохондриями в живых тканях, как он меняется при различных физиологических обстоятельствах и каков его количественный вклад в общий пул АФК, хотя и нет сомнений, что это биологически значимое количество. Это обстоятельство необходимо иметь ввиду при обсуждении эффектов митохондриально-направленных антиоксидантов, поскольку эти эффекты могут быть связаны не с защитой от большого пула $O_2^{\bullet -}$, генерируемых митохондриями, а с более тонким вмешательством в сигнальные системы, регулируемые митохондриальными АФК. Интересный и относительно хорошо изученный пример сочетания ролей митохондриальных АФК как источника окислительных

повреждений и модулятора сигнальных функций представляет ситуация гипоксии.

### 1.2.3 Парадоксальная продукция митохондриями пероксида водорода ($H_2O_2$) при гипоксии

Твердо установлено, что производство митохондриальных АФК увеличивается в условиях очень низкой концентрации $O_2$ [Murphy, 2009]. Эти гипоксические эффекты проявляются в культуре клеток, если содержание $O_2$ в среде уменьшается с 21% до 1-3% [Guzy, Schumacker, 2006]. Точный молекулярный механизм увеличения продукции АФК митохондриями при дефиците кислорода пока не расшифрован, но находится в состоянии активного изучения [Murphy, 2009].

О том, что в условиях гипоксии возникает окислительный стресс, хорошо известно [Зенков и соавт., 2001]. Еще более интересными оказались данные о том, что генерируемые при недостатке кислорода митохондриальные АФК играют важную сенсорную роль. Оказалось, что продукцией митохондриями АФК определяется содержание в клетках HIF-1 - цитокина, который играет центральную роль в ответе клеток на гипоксию [Semenza, 2004]. HIF-1 является гетеродимером (включающим HIF-1α и HIF-1β), который транспортируется в ядро и, в сочетании с другими белками, инициирует транскрипцию ряда генов в ответ на недостаток кислорода [Mateo et al., 2003; Semenza, 2004; Zhou et al., 2007]. HIF-1α конститутивно экспрессируется в клетке, но, в условиях нормоксии, он быстро гидроксилируется по остаткам пролина, что маркирует HIF-1α для быстрой убиквитин-зависимой протеосомальной деградации [Semenza, 2004; Patten et al., 2010]. Когда концентрация $O_2$ падает, HIF-1α перестает разрушаться, что позволяет сформироваться гетеродимеру HIF-1 и индуцировать транскрипцию серии генов, отвечающих на гипоксию [Sanjuán-Pla et al., 2005]. Важным фактором, регулирующим накопление HIF-1, является то, что пролилгидроксилаза чувствительна к $H_2O_2$, вероятно, по причине реакции с пероксидом негемовым железа в активном центре фермента [Guzy, Schumacker,

2006]. Причем, было показано, что эффекты гипоксии, вызванные действием митохондриальных АФК на HIF-1, могут быть заблокированы митохондриально-адресованными антиоксидантами [Guzy, Schumacker, 2006]. Таким образом, дыхательная цепь митохондрий может выступать в качестве сенсора $O_2$, генерируя $H_2O_2$ в условиях гипоксии и снижая активность пролилгидроксилазы, тем самым стабилизируя HIF-1α и модулируя клеточный ответ на гипоксию [Guzy, Schumacker, 2006].

### 1.2.4 Физиологическое значение продукции АФК в митохондриях

Приведенный выше пример активации HIF-1 при гипоксии позволяет предполагать, что, помимо чисто патологических следствий генерации АФК, эти процессы, возможно, имеют некоторый позитивный биологический смысл. Наибольшее физиологическое значение, по-видимому, имеет сигнальная функция АФК [Droge, 2002; Balaban et al., 2005]. Окислительно-восстановительные сигналы внутри клетки могут приводить к высвобождению из митохондрий $H_2O_2$, который модулирует активность белков-мишеней с помощью обратимого окисления критических тиоловых групп белков [Hurd et al., 2007], изменяя, таким образом, активность таких ферментов, как киназы, фосфатазы и факторы транскрипции в митохондриях, цитозоле или ядре. Хотя в настоящее время весьма мало известно о митохондриальной редокс-сигнализации [Murphy, 2009], все же имеются некоторые указания относительно того, какими могут быть эти вероятные сигнальные пути. Например, митохондриальный $H_2O_2$ может выступать в качестве ретроградного сигнала в клетку, сообщая о состоянии $\Delta p$ или окислительно-восстановительного состояния пула НАД-Н, что позволяет соответствующим образом корректировать транскрипцию, трансляцию транспорт или деградацию компонентов митохондрий. Весьма интересны, хотя пока и немногочисленны сообщения о АФК в качестве регуляторов дифференцировки, особенно мышечных клеток, миофибробластов и остеокластов [Bai et al., 2005; Popova et al., 2010; Srinivasan et al., 2010; Lee et al., 2011; Nierobisz et al.2011; Hyeon et al., 2013].

Данные о сигнальной функции АФК в физиологических и патологических ситуациях, несмотря на свою немногочисленность, имеют принципиальное значение, поскольку позволяют предполагать и объяснять эффекты митохондриально-направленных антиоксидантов, несводимые к простой защите компонентов клеток и тканей от окислительных повреждений.

## 1.3Митохондриально-направленные антиоксиданты: общая характеристика и представители. Пластохинонилдецилтрифенилфосфоний (SkQ1) в ряду других митохондриальных антиоксидантов

### 1.3.1 Общие сведения

Использование отрицательного заряда внутри митохондрий для направленного накопления в них химических соединений начинается с изящной работы группы Е. А. Либермана и В. П. Скулачева, в которой было показано, что ионы с делокализованным положительным зарядом (ионы трифенилфосфония) избирательно проникают в митохондрии [Liberman et al., 1969]. В этих ионах заряд распределен по большой гидрофобной молекуле, что препятствует ориентации диполей воды вокруг ионизированного атома и позволяет ионам проникать через мембраны, используя энергию трансмембранной разности потенциалов ($\Delta\psi$) [Liberman et al., 1969; Grinius et al., 1970; Bakeeva et al., 1970; Isaev et al., 1970; Liberman, Skulachev, 1970; Green, 1974; Скулачев, 1989; Antonenko et al., 2008; Cortés-Rojo et al., 2011]. Поскольку матрикс митохондрий является единственным отрицательно заряженным компартментом внутри клетки, вещество, соединенное с положительно заряженным проникающим ионом, будет избирательно накапливаться в митохондриях с коэффициентом накопления 1000 при $\Delta\psi$ равном 180 мВ согласно уравнению Нернста [Liberman, Skulachev, 1970; Скулачев, 1989]. Результаты работ с проникающими катионами в свое время послужили одним из важнейших аргументов в пользу справедливости хемоосмотический концепции П. Митчелла, а сами такие катионы по предложению Д. Грина получили название «Скулачев-ионов» (Sk) [Green, 1974].

Вскоре после открытия проникающих катионов было показано, что они могут служить «молекулами–электровозами», обеспечивая накопление в митохондриях незаряженных соединений, связанных с катионами [Скулачев, 1989; Северин и соавт., 1970; Levitsky, Skulachev, 1972]. В связи с появлением и популяризацией свободнорадикальной теории старения Д. Хармана [Harman, 1956; Harman, 1992], объясняющей возникновение целого ряда патологических состояний повреждающим действием АФК, возникла естественная идея использовать соединения антиоксиданта с проникающим катионом для того, чтобы очистить «самое грязное место в клетке», т.е. внутреннее пространство митохондрий, где, как полагали, образуется наибольшее количество АФК [Antonenko et al., 2008].

Принцип «молекул-электровозов» для накопления в митохондриях различных антиоксидантов был впервые применен М. Мэрфи и Р. Смитом. Они синтезировали соединения, состоящие из тиобутила [Burns et al., 1995] или α-токоферола [Smith et al., 1999], соединенных с катионом трифенилфосфония [Antonenko et al., 2008]. Позже эти антиоксиданты были заменены на убихинол, что позволило получить возобновляемый антиоксидант (окисленные формы убихинона, возникающие в результате его антиоксидантной активности, могут восстанавливаться с помощью дыхательной цепи митохондрий) [Kelso et al., 2001; Cochemé et al., 2007; Eremeyev et al., 2009; Antonenko et al., 2008; Duveau et al., 2010]. Было обнаружено, что такое соединение, названное MitoQ – накапливается в энергизованных митохондриях, используя энергию $\Delta\psi$; оно предотвращает окисление митохондриальных липидов радикалами OH• *in vitro*, увеличивает выживаемость клеток, чувствительных к АФК, при концентрациях MitoQ намного более низких, чем CoQ или α-токоферола, увеличивает продолжительность жизни культур фибробластов при повышенном содержании кислорода [James et al., 2005; Kelso et al., 2002; Saretzki et al., 2003; Jauslin et al., 2003; Murphy, Smith, 2007; Antonenko et al., 2008].

К сожалению, при увеличении концентрации MitoQ проявились его прооксидантные свойства [James et al., 2005; O'Malley et al., 2006; Doughan,

Dikalov, 2007], что ограничивает практическую применимость данного вещества для терапии заболеваний [Antonenko et al., 2008].

Имея ввиду эти результаты и цель – усовершенствовать воздействие на митохондрии антиоксидантами путем их адресной доставки, группой В.П.Скулачева был синтезирован и испытан большой ряд соединений, отличающихся от MitoQ строением как одной только антиоксидантной части (SkQ1, SkQ3, SkQ5, DMQ, SkQT), так и обоих – антиоксидантного компонента и проникающего катиона (SkQ4, SkQ2M, SkQR1, SkQRT1 SkQBerb и SkQPalm) (таблица 1).

Таблица 1 – Общая характеристика важнейших представителей класса митохондриально-направленных антиоксидантов

| | |
|---|---|
| **SkQ1** | Соединение антиоксиданта из хлоропластов растений – пластохинона и трифенилфосфония в качестве проникающего катиона. Обладает очень высокой антиоксидантной и проникающей способностью, широким коридором эффективных концентраций между антиоксидантной и прооксидантной активностью и многочисленными биологически значимыми эффектами. Наиболее изученное соединение класса митохондриально-направленных антиоксидантов. |
| **MitoQ** | Соединение проникающего катиона трифенинлфосфония и антиоксиданта из дыхательной цепи митохондрий – убихинона. Исторически первый представитель класса митохондриально-направленных антиоксидантов. Оказывает большое число биологически значимых эффектов, но обладает худшими по сравнению с SkQ1 характеристиками антиоксидантной активности. Аналог MitoQ - MitoQ10 - пока не испытан *in vivo*. |
| **SkQR1** | Флуоресцентный аналог SkQ1, позволяющий следить за его распределением как митохондриально-таргетированного вещества в живой клетке или организме (в качестве проникающего катиона использован родамин). Обладает несколько иными свойствами по сравнению с SkQ1 − большей проникающей способностью по отношению к липидным мембранам, существенно меньшей стабильностью в водных растворах. Показаны значимые позитивные эффекты на моделях ишемического повреждения. |
| **SkQ2M** | Соединение, в котором в качестве проникающего катиона использован карнитин. По результатам опытов *in vitro* обладает очень слабой проникающей способностью. Эффекты *in vivo* не известны. |
| **SkQ3** | Модифицированный, более стабильный вариант SkQ1, однако, обладающий менее выраженными антиоксидантными свойствами. Используется в качестве действующей субстанции в биотехнологических препаратах, предназначенных для защиты растений от стресса, продления срока их жизни. |
| **SkQ4** | Митохондриально-направленное соединение, не содержащее фосфора и ароматических групп. По результатам тестов *in vitro* обладает ослабленной по сравнению с SkQ1 проникающей способностью. На биологических системах не испытывалось. |

*Окончание таблицы 1*

| | |
|---|---|
| **SkQ5** | Соединение с укороченным линкерным звеном между остатком трифенилфосфония и антиоксидантом. Существенно менее гидрофобно. Проникающая и антиоксидантная активность ниже, чем у SkQ1. Свойства *in vivo* не известны. |
| **SkQT1, SkQTR1** | Аналоги соответственно SkQ1 и SkQR1, в которых в качестве антиоксидантной части присоединен не пластохинон, а тимохинон. Имеются ограниченные данные об антиоксидантной и проникающей активности *in vitro*. Считаются перспективными для исследования *in vivo*, однако результаты таких экспериментов пока не опубликованы. |
| **DMQ, C12−TPP** | Вещества, по структуре сходные с SkQ1 и MitoQ, но с отсутствующей (C12−TPP) или менее выраженной (DMQ) − антиоксидантной активностью, используются в экспериментах в качестве контрольных соединений. |
| **SkQBerb, SkQPalm** | Первые митохондриально-направленные антиоксиданты, сконструированные исключительно из натуральных компонентов, а именно, остатков пластохинона, нонила, ацетила и берберина или пальмитина. Обладают антиоксидантной активностью *in vitro, in vivo* не испытаны. |
| **C10Berb, C10Palm** | Аналоги SkQBerb и SkQPalm без остатка пластохинона, используются в качестве контрольных соединений |

Примечание – таблица составлена по данным работы Ю. Н. Антоненко и соавторов [Antonenko et al., 2008] с дополнениями, взятыми из других публикаций [Asin-Cayuela et al., 2004; Tauskela, 2007; Khailova et al., 2008; Rokitskaya et al., 2008; Plecitá-Hlavatá et al., 2009; Izyumov et al., 2010; Severin et al. 2010; Antonenko et al., 2011; Skulachev et al., 2011; Lyamzaev et al., 2011; Chernyak et al., 2012; Antonenko et al., 2012; Pustovidko et al., 2013; Chernyak et al., 2013; Antonenko et al., 2013; Rokitskaya et al., 2013; Khailova et al., 2014].

Наиболее перспективным и изученным из них в настоящее время является SkQ1, поэтому его свойства будут описаны более подробно в сравнении с остальными. В качестве контрольного соединения в опытах с SkQ1 обычно используется C12TPP – вещество, соответствующее SkQ1 без антиоксидантной части (пластохинона).

### 1.3.2 Химическое строение, физические свойства и фармакокинетика SkQ1

Название «SkQ» представляет собой комбинацию принятого сокращенного наименования «Скулачев-ионов» (Sk) и хинона (Q).

Химически SkQ1 – это [10-(4,5-диметил-3,6-диоксоциклогекса-1,4-диен-1-ил)децил](трифенил)фосфония бромид (по номенклатуре IUPAC) или 10-(6'-пластохинонилдецил)трифенилфосфоний бромид, то есть основание, состоящее из трифенилфосфония, связанного с пластохиноном через 10-членную

предельную углеводородную цепочку и представленное как соль бромоводородной кислоты (рисунок 1).

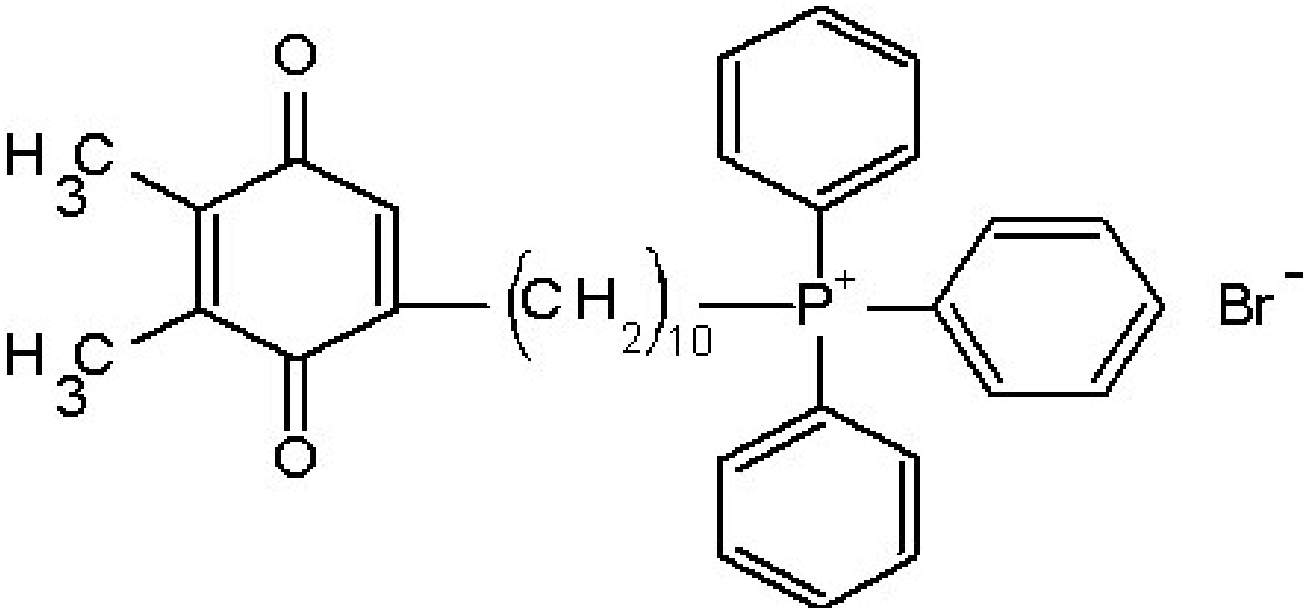


Рисунок 1 – Структурная формула митохондриально-адрессованного соединения пластохинона SkQ1 (10-(6'-пластохинонилдецил)трифенилфосфония бромида). Примечание – молярная масса SkQ1 равна 617 г/моль.

Таким образом, SkQ1 схож по строению с MitoQ, за исключением антиоксидантной части, в которой обычный для дыхательной цепи митохондрий убихинон заменен на компонент электроннотранспортной цепи хлоропластов - пластохинон. Такая модификация была сделана исходя из положения, что пластохинон – более эффективный антиоксидант, чем убихинон [Kruk et al., 1997; Loshadkin et al., 2002; Roginsky et al., 2003], поскольку это свойство более важно для хлоропластов, продуцирующих кислород и поглощающих свет с образованием синглетного кислорода. Кислая среда тилакоидов также способствуют окислительному стрессу, так как протонирование супероксид-аниона (с образованием радикала $HO_2^{\bullet}$) значительно повышает его агрессивность [Antonenko et al., 2008]. Следовательно, замена убихинона на пластохинон должна повысить антиоксидантную активность митохондриально-направленного соединения и увеличить «окно» между антиоксидантным и прооксидантным действием. В чистом виде лиофильно высушенный SkQ1 представляет собой коричневатую смолообразную массу, растворы которой имеют желтоватый цвет.

Препарат хорошо растворим в органических растворителях, в частности, в 96% этаноле и при температуре 0$^{o}$C остается стабильным в течение многих недель. Водные растворы этого вещества чрезвычайно нестабильны, SkQ1 полностью разрушается при 25$^{o}$C и pH=7,0 уже через сутки. Разрушение вещества резко ускоряется на свету. Пластиковая посуда легко сорбирует на свои стенки SkQ1 из водных растворов; в стеклянной посуде сорбция также происходит, но значительно меньше. Все это создает особые трудности в работе с SkQ1 и требует тщательного динамического контроля его концентрации в рабочих растворах.

Вещество обладает выраженной липофильностью. В доклинических исследованиях на животных распределение SkQ1 в органах и тканях происходило в течение 48 ч после внутривенного и внутрижелудочного введения. Было обнаружено, что SkQ1 присутствует в наибольших концентрациях в тканях почки, печени и сердце в течение 1 ч после введения. SkQ1 относительно быстро подвергается ферментативному расщеплению и ковалентному связыванию с белками.

### 1.3.3 Сравнительное исследование свойств SkQ1 и других производных проникающих катионов на субклеточных объектах

*Проницаемость билипидной мембраны для катионных производных хинонов.* Серия различных производных проникающих катионов была испытана группой В.П.Скулачева на способность проникать через билипидную мембрану [Antonenko et al., 2008]. Прямые измерения скорости переноса этих соединений из одного монослоя билипидной мембраны в другой показали, что указанная скорость падает в ряду SkQR1>SkQ1>SkQ3>MitoQ. В области концентраций $5 \cdot 10^{-5}$–$5 \cdot 10^{-4}$ M SkQ1 создавал диффузионный потенциал в полном соответствии с уравнением Нернста. Таким образом, SkQ1, SkQ3 и SkQR1 имели наивысшую проникающую способность среди всех синтезированных новых соединений [Antonenko et al., 2008].

Коэффициент накопления можно оценить, учитывая величину $\Delta\psi$ на внешней мембране клетки и на мембране митохондрий, что в сумме соответствует

104-кратному градиенту SkQ между внеклеточной средой и матриксом митохондрий, а также необходимо учесть коэффициент распределения мембрана/вода, который составляет в случае SkQ $1 \cdot 10^4$. Таким образом, концентрация SkQ1 во внутреннем липидном монослое внутренней мембраны митохондрий может превышать его концентрацию во внеклеточной среде в 108 раз, т.е. составлять около 1 · 10–4 М при 1 · 10–12 М SkQ1 во внеклеточной среде (рисунок 2).

*Антиоксидантные свойства SkQ в различных модельных системах*. Анти- и прооксидантные свойства SkQ были исследованы группой В.П.Скулачева в водных растворах, мицеллах, липосомах и билипидных мембранах [Antonenko et al. 2008]. Способность SkQ1 нейтрализовать радикалы $OH^{\bullet}$ в водных растворах измерялась по снижению уровня люминесценции люминола, индуцированной азоинициатором 2,2'-азобис(2-амиди-нопропан) дигидрохлоридом. В этой системе 0,5 мкМ $SkQ1H_2$ (восстановленная форма SkQ1) существенно снижает люминесценцию, в то время как окисленный SkQ1 гораздо менее эффективен. $MitoQH_2$ обладал значительно меньшей эффективностью, чем $SkQ1H_2$, а MitoQ был совершенно не активен. Прооксидантная активность SkQ1 и MitoQ в водных растворах измерялась по скорости окисления соответствующих гидрохинонов до хинонов или по скорости восстановления $O_2$ до $O_2^{\bullet -}$. Оба метода ясно показали, что прооксидантная активность MitoQ значительно выше, чем SkQ1.

Антиоксидантную активность тех же соединений в липидных мицеллах определяли по торможению перекисного окисления метилового эфира линолевой кислоты. Характеристикой антиоксидантной способности $SkQ1H_2$ и $MitoQH_2$ служила константа скорости реакции между пероксидным радикалом оксигенированного остатка линолевой кислоты с хинолом, которая конкурировала с развитием цепной реакции. Было показано, что реакционная способность $SkQ1H_2$ оказалась почти в 4 раза выше, чем у $MitoQH_2$. Окисленные формы SkQ1 и MitoQ были неактивны в этой системе [Roginsky et al., 2009].

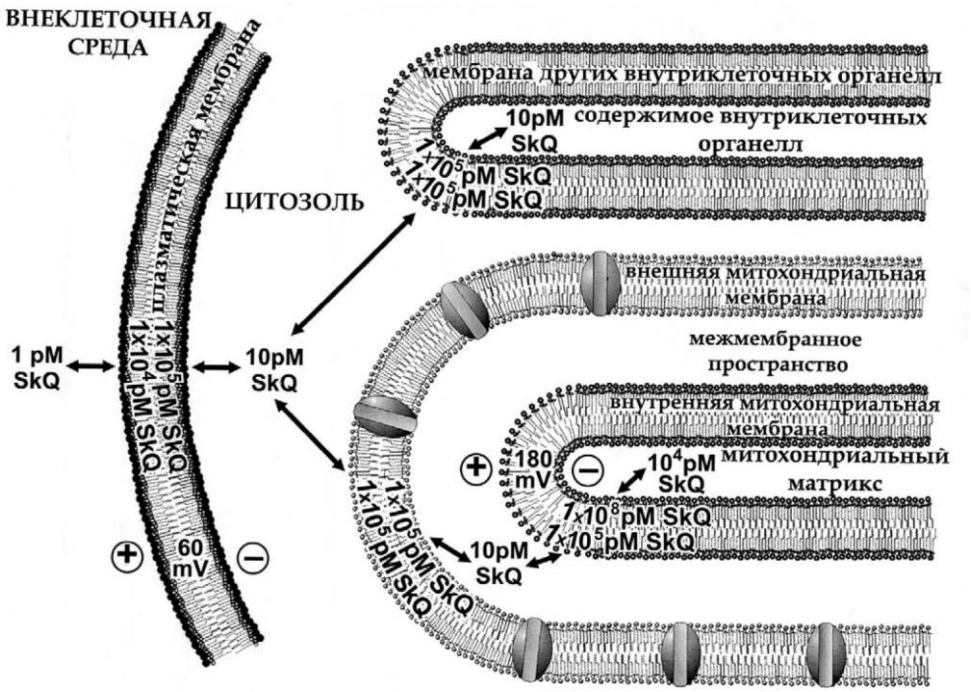



Рисунок 2 – Схема, иллюстрирующая накопление SkQ во внутреннем монослое внутренней мембраны митохондрий (из работы Ю. Н. Антоненко и соавторов [Antonenko et al. 2008]). Примечание – величины $\Delta\psi$ на внешней мембране клетки и на внутренней мембране митохондрий приняты соответственно за 60 и 180 мВ, а коэффициент распределения SkQ в системе мембрана/вода за 10 000:1.

В другой серии экспериментов, выполненных в группе В.П.Скулачева [Antonenko et al. 2008] исследовали антиоксидантную активность SkQ1 и MitoQ в липосомах, используя разные методические подходы. Было показано, что накопление веществ, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (наиболее распространенный способ детекции перекисного окисления липидов) заметно замедляется в присутствии $SkQ1H_2$, а окисленная форма SkQ1 была значительно менее эффективна. Для изучения АФК-зависимого повреждения белков в мембранах была использована модель, где измерялась электрическая проводимость, создаваемая в билипидной мембране грамицидином Д. Было показано, что инактивация грамицидиновых каналов предотвращается SkQ1 и MitoQ, причем SkQ1 был более эффективен [Antonenko et al. 2008].

Наконец, было изучено влияние различных концентраций SkQ1 на дыхательные параметры и интенсивность процессов перекисного окисления липидов в печени крыс после гипотермического хранения органа (Петренко и

соавт., 2009). В предварительных экспериментах было установлено, что холодное хранение изолированной печени крыс в течение 18 часов приводит к накоплению продуктов, взаимодействующих с 2-тиобарбитуровой кислотой, повышению интенсивности Fe(2+)-аскорбат-индуцированного перекисного окисления липидов и угнетению функциональной активности митохондрий. Согласно результатам проведенных испытаний, SkQ1 дозозависимо ингибирует активацию свободнорадикальных процессов, что позитивно влияет на энергетическое сопряжение митохондрий.

*Взаимодействие с изолированными митохондриями*. Измеренная общая скорость окисления $SkQ1H_2$ оказалась ниже, чем скорость восстановления SkQ1 дыхательной цепью. Это означает, что в дышащих митохондриях SkQ1 в основном находится в восстановленной форме, которая обладает высокой антиоксидантной активностью [Antonenko et al. 2008]. Чрезвычайно важен вопрос о соотношении антиоксидантной и прооксидантной активности соединений на основе проникающих катионов, которое может быть оценено по скорости накопления малонового диальдегида. Сравнение эффективности различных соединений, ингибирующих накопления малонового диальдегида в изолированных митохондриях сердца крыс приведено в таблице 2. По результатам этого теста можно видеть, что SkQ1 и SkQR1 были наиболее эффективны, а MitoQ – наименее эффективен среди испытанных соединений. Диапазон концентраций, при которых проявляется исключительно антиоксидантный эффект для SkQ1 оказался существенно шире (0,9–850 нМ), чем для MitoQ (350–550 нМ), а SkQ3 занял промежуточное положение (25–1600 нМ) [Antonenko et al., 2008].

При концентрации SkQ1, SkQ3 или MitoQ выше $10^{-6}$ М проявлялся разобщающий эффект этих соединений. Концентрации, при которых проявлялся разобщающий эффект SkQ, более чем в 1000 раз превышали концентрации, при которых проявлялось их антиоксидантное действие. Для MitoQ это «окно» было значительно меньше [Antonenko et al., 2008]. Было показано, что антиоксидантное действие SkQ1 проявлялось, прежде всего, в защите от перекисного окисления

Таблица 2 – Концентрации соединений, снижающие в два раза скорость образования малонового диальдегида в митохондриях сердца крысы, обработанных Fe2+ и аскорбатом (по Ю.Н. Антоненко и соавторам (Antonenko et al., 2008))

| **Соединение** | **C1/2, нМ** |
|---|---|
| SkQ1 | 25 |
| SkQR1 | 25 |
| SkQ3 | 400 |
| DMQ | 110 |
| MitoQ | 1000 |
| Децилпластохинон | 2000 |
| C12TPP | нет эффекта при 2 000 |

кардиолипина, фосфолипида характерного для внутренней мембраны митохондрий [Antonenko et al., 2008]. Значение этого факта связано с тем, что перекисное окисление кардиолипина является ключевым событием при окислительном стрессе в митохондриях [Tyurin et al. 2007; Basova, et al. 2007; Skulachev et al., 2010] и инициирует апоптоз [Choi, 2007]. Блокируя это окисление, SkQ1 может предотвратить гибель клеток. Еще более эффективно производные пластохинона блокируют такой ранний этап апоптоза, как фрагментация митохондрий. В этом случае защитный эффект проявлялся при $8 \cdot 10^{-13}$ M SkQR1 и $1 \cdot 10^{-11}$ M SkQ1.

Только имея ввиду описанные выше два свойства SkQ1, а именно – то, что он является возобновляемым антиоксидантом и специфически накапливается в митохондриях, можно объяснить эффективность столь низких концентраций препарата. Однако эффективное накопление катионных хинонов в митохондриях приводит к тому, что уже в микромолярных концентрациях они проявляют прооксидантную активность и стимулируют апоптоз в условиях окислительного стресса. В случае MitoQ защитный эффект практически немедленно сменяется на противоположный при небольшом повышении концентрации хинона; благодаря широкому окну между антиоксидантным и прооксидантным эффективными концентрациями, составляющему три порядка, SkQ1 в значительной степени огражден от такого побочного явления [Antonenko et al., 2008]. В целом,

эксперименты показали, что SkQ1 является значительно более эффективным антиоксидантом, чем другие его испытанные аналоги. Эти результаты позволяют считать SkQ1 (наряду с SkQR1, некоторым недостатком которого является низкая стабильность вещества) одним из самых перспективных митохондриально-направленных соединений для испытания на терапевтическую активность в отношении различных болезненных состояний и лежащих в их основе общепатологических процессов, в развитии которых значительную роль играет окислительный стресс митохондриального генеза.

## 1.4 Эффекты митохондриально-направленных антиоксидантов в связи с ролью окислительного стресса в патогенезе основных общепатологических процессов и связанных с ними заболеваний человека и животных.

### 1.4.1 Альтерация (дистрофические процессы, некроз и апоптоз)

Под альтерацией в общей патологии приято понимать совокупность морфологических реакций клеток и тканей в ответ на различные повреждающие воздействия [Авцын, Шахламов, 1979; Саркисов, 1988, Струков, Серов, 1995; Лекции…, 1996; Саркисов и соавт., 1997; Пальцев, Аничков, 2001; Лекции…, 2003; Пауков, 2015]. Выделяют две большие категории таких реакций: дистрофические процессы, то есть видимые изменения клеток и тканевых структур, отражающие нарушения их метаболизма, и процессы гибели (некроза в широком смысле этого слова) [Авцын, Шахламов, 1979; Непомнящих, 1991; Струков, Серов, 1995; Лекции…, 1996; Пальцев, Аничков, 2001; Пауков, 2015]. К сожалению, понятие «дистрофии» и список относящихся к ней явлений, равно как и классификация этих процессов, имеют некоторую неопределенность и по-разному описываются даже в учебной патоморфологической литературе [Шперлинг, 1974; Крыжановский, 1974; Молдавский, 1989; Струков, Серов, 1995; Лекции…, 1996; Пальцев, Аничков, 2001; Лекции…, 2003; Пауков, 2015].

Похожим образом ситуация обстоит и с гибелью клеток, современная классификация которой, помимо уже традиционных для патологии некроза и апоптоза, включает в себя множество других вариантов, подчас таких экзотичных, как энтоз, пироптоз и корнификация [Galluzzi et al., 2012], часть из которых описана лишь в единичных работах на моделях *in vitro*.

Несмотря на такую неопределенность, обычную для интенсивно развивающихся областей исследования, имеются положения, относящиеся к альтеративным реакциям клеток и тканей, которые признаются всеми авторами. Так, например, в любой классификации дистрофических процессов присутствуют жировая, гиалиново-капельная и гидропическая дистрофии [Авцын, Шахламов, 1979; Саркисов, 1988; Faccini, J. M. 1990, Непомнящих, 1991; Струков, Серов, 1995; Лекции…, 1996; Саркисов и соавт., 1997; Monographs on Pathology of Laboratory Animals…,1983-1998; Пальцев, Аничков, 2001; Goljan, 2001; Лекции…, 2003; Greaves, 2007; Underwood, 2009; Haschek, 2009; Thoolen, 2010; Toxicologic pathology…, 2013; Пауков, 2015], причем, механизмом первой из них считается избыточное поступление в клетку предшественников триглицеридов, блокирование ферментов, осуществляющих окисление или ингибирование ферментов, ответственных за синтез фосфолипидов и липопротеинов; гиалиново-капельная дистрофия вызывается гиперпродукцией белков, нарушением их структуры и фолдинга или ингибированием протеосомальной и лизосомальной утилизации белковых компонентов; гидропическая дистрофия связана либо с простым нарушением избирательной проницаемости клеточной мембраны (например, белками-перфоринами), либо с падением уровня АТФ в клетке, связанной, в том числе, с дисфункцией митохондрий, либо с ингибированием функций белков, ответственных за поддержание водно-ионного баланса [Мансуров, Мироджов, 1979; Авцын, Шахламов, 1979; Лебедев и соавт., 1984; Струков, Серов, 1995; Лекции…, 1996; Пальцев, Аничков, 2001; Goljan, 2001; Majno, 2004; Greaves 2007; Underwood, 2009; Thoolen, 2010; Toxicologic pathology…, 2013]. Эти типы дистрофий, обычно наблюдающиеся в клетках паренхимы органов, можно назвать «классическими паренхиматозными

дистрофиями». Другие варианты клеточных и тканевых реакций (в паренхиме и в строме органов), как зернистая дистрофия, амилоидоз, кальциноз, гемосидероз, липофусциноз, мукоидное и фибриноидное набухание и т.д. как дистрофические изменения признаются не всеми исследователями [Зайд, Потапова, 1973; Шперлинг, 1974; Авцын, Шахламов, 1979; Непомнящих, 1991; Пальцев, Аничков, 2001; Goljan, 2001; Лекции…, 2003; Majno, 2004; Underwood, 2009; Toxicologic pathology…, 2013]. То же можно сказать и о гибели клеток и тканевых структур – некроз (в том числе и фибриноидный) и апоптоз как два важнейших самостоятельных варианта имеются в любых классификациях [Струков, Серов, 1995; Лекции…, 1996; Levin, 1999; Пальцев, Аничков, 2001; Majno, 2004; Greaves, 2007; Elmore, 2007; Манских, 2007; Underwood, 2009; Haschek, 2009; Thoolen, 2010; Galluzzi et al., 2012; Toxicologic pathology…, 2013; Пауков, 2015], тогда как, например, аутофагия представляет собой более широкое понятие, чем просто процесс клеточной гибели [Манских, 2007], митотическая катастрофа иногда считается вариантом апоптоза, а многие другие явления (автошизис, энтоз, пироптоз и т.д.) пока имеет значение только для очень узкого круга экспериментальных наблюдений [Galluzzi et al., 2012]. Важной особенностью «классических» дистрофий и таких вариантов клеточной тканевой гибели, как апоптоз и некроз, служит их универсальность – все они вполне характерны самых разнообразных органов – печени, почек, сердца, головного мозга, желудочно-кишечного тракта, органов кроветворения и т.д. и могут быть ответом на широкий круг повреждающих внешних и внутренних факторов, таких как ишемия, интоксикация, вирусные инфекции и т.д. способных оказывать неспецифическое повреждающее действие на внутриклеточные ферментные и сигнальные системы. Морфологическая форма реакции на альтерацию больше зависит от особенностей метаболизма ткани и силы повреждающего воздействия, чем от природы альтерирующего фактора (например, в печени типичным ответом на умеренное повреждение служит жировая дистрофия, при более сильных воздействиях наблюдается апоптоз, гидропическая дистрофия и некроз гепатоцитов) [Thoolen, 2010].

Вполне понятно, что окислительному стрессу и методам его предотвращения отводится особое место в патогенезе заболеваний, в основе которых лежат разнообразные альтеративные процессы (ишемическая болезнь сердца, цереброваскулярная болезнь, ишемия почек, токсическая дистрофия печени, почек и миокарда, цитостатическая и лучевая болезни, сахарный диабет, вирусный гепатит и многие другие) [Halliwell, 1984; Katz, 1986; Halliwell, 1987; Flaherty, Weisfeldt, 1988; Halliwell, 1989; Halliwell, Gutteridge, 1990; Логинов, Матюшин, 1991; Aruoma et al., 1991; Harman, 1992; Martínez-Cayuela, 1995; Gupta et al., 2014]. Наибольшее внимание исследователей привлекали свободнорадикальные процессы при ишемическом и гипоксическом повреждении тканей, особенно в ситуации реоксигенации (реперфузии), с которой связан феномен гиперпродукции АФК в тканях, перенесших ишемию. Проблема образования свободных радикалов при гипоксии уже была упомянута в разделе 1.2.3, и было отмечено, что, несмотря на интенсивную разработку этого вопроса, механизм генерации АФК все еще остается загадочным. То же самое можно сказать и о всплеске продукции АФК при реперфузии, несмотря на то, что роль АФК в развитии дистрофических, некротических и апоптотических процессов в тканях, перенесших гипоксию и подвергнувшихся альтерации после реоксигенации, не подлежит сомнению [Авцын, Шахламов, 1979; Струков, Серов, 1995; Лекции…, 1996; Пальцев, Аничков, 2001; Проскуряков и соавт., 2002; Лекции…, 2003; Underwood, 2009]. Митохондриальный вклад в генерацию АФК во время реперфузии связан, как полагают, с резким ростом потребления кислорода митохондриями и пропорциональным увеличением утечки электронов из электроннотранспортной цепи (см. раздел 1.2) [Murphy, 2009]. Другими источниками радикалов при реперфузионном повреждении служат реакции, катализируемые ксантиноксидазой, прооксидантная активность которой также зависит от фактора, высвобождающегося из митохондрий при нарушении их целостности [Flaherty, Weisfeldt, 1988; Martínez-Cayuela, 1995; Saksela et al., 1999] и циклооксигеназой. Кроме того, значительный вклад в продукцию АФК в очагах ишемии оказывают клетки воспалительного инфильтрата (см. 1.4.2), вызываемое

ими повреждение принято называть вторичной альтерацией. В нервной ткани дополнительное повреждающее воздействие производят активируемые свободными радикалами процессы эксайтотоксичности [Halliwell, Gutteridge, 1984; Чугунов и соавт., 2009]. Образующиеся АФК повреждают ферментативные системы клетки, приводя к жировой дистрофии (в печени и в миокарде), ингибируют ферменты, ответственные за ионный гомеостаз и нарушают избирательную проницаемость клеточной мембраны (гидропическая дистрофия и некроз в почках, сердце, печени, мозге), нарушают нормальную конформацию белков и макромолекулярных структур (гиалиново-капельная дистрофия в печени и других органах), вызывают повреждение мембран митохондрий и других органелл, высвобождение митохондриальных апоптоз-инициирующих факторов и депонированных в эндоплазматической сети ионов кальция, разрывы в ДНК, что завершается активацией ряда протеинкиназ, фосфолипаз, и гидролаз и, в конечном счете – апоптозом или некрозом клеток [Авцын, Шахламов, 1979; Струков, Серов, 1995; Лекции…, 1996; Пальцев, Аничков, 2001; Проскуряков и соавт., 2002; Лекции…, 2003; Majno, 2004; Манских, 2007; Underwood, 2009; Часовских, 2009; Thoolen, 2010; Пауков, 2015].

Подобные сценарии развития альтеративных процессов с участием свободнорадикальных реакций, вызванных АФК, описаны не только для ситуации с ишемическим и реперфузионным повреждением тканей, но и для других повреждающих агентов – механической травмы [Halliwell, 1987 Halliwell, Gutteridge, 1990], ионизирующей радиации [Рябченко, 1979; Комар, Хансон, 1980; Тимофеев – Ресовский и соавт., 1980; Halliwell, 1987; Aruoma et al., 1991; Harman, 1992; Martínez-Cayuela, 1995; Празднова, 2013], эндогенных метаболических факторов (таких, как амилоидные белки, в том числе и при болезни Альцгеймера) [Halliwell, Gutteridge, 1990; Harman, 1992; Martínez-Cayuela, 1995], различных химических соединений (аллоксана, препаратов-цитостатиков, этанола, парацетамола, тиоацетамида, четыреххлористого углерода и др.), вирусных инфекций [Halliwell, 1987; Halliwell, Gutteridge, 1990; Aruoma et al., 1991; Martínez-Cayuela, 1995]. Правда, стоит заметить, что во всех этих случаях больше

известно о цитозольных и микросомальных механизмах продукции АФК, чем о митохондриальных [Halliwell, 1987, Halliwell, Gutteridge, 1990; Aruoma et al., 1991; Martínez-Cayuela, 1995]. Накоплено довольно много информации о позитивной роли классических, не направленных на митохондрии антиоксидантов (токоферола, аскорбиновой кислоты и др.) при альтеративной патологии [Harman, 1992; Gupta et al., 2014], однако ни один из них не вошел в повседневную клиническую практику.

Было опубликовано большое количество сообщений об эффектах митохондриально-таргетированных соединений, оказываемых на связанные с альтерацией экспериментальные патологические состояния и альтеративные процессы в клетках и органах, главным образом на апоптоз, индуцированный в клетках *in vitro* и на повреждения, вызванные ишемией и реперфузией *ex vivo* и in *vivo*. Правда, в подавляющем большинстве работ не ставилось специальной задачи изучить особенности и динамику тканевых (гистопатологических) изменений, вызванных альтерирующим агентом; во многих случаях о таких эффектах приходится судить на основании полученных авторами косвенных данных (биохимических, физиологических).

Среди исследованных препаратов первое место принадлежит MitoQ (см. таблицу 1). На моделях *in vitro* показано, что данное соединение успешно предотвращает апоптоз, индуцированный пероксидом водорода в клетках остеосаркомы *143B* [Keiso et al., 2001], ионизирующим излучением в клетках гепатомы [Jadidian et al., 2014], гентамицином в линии клеток из кортиева органа [Ojano-Dirain, et al., 2012], 6-гидроксидопамином в клетках линии SH-SY5Y [Solesio et al., 2013], гипергликемией в бета-клетках островков Лангерганса поджелудочной железы [Lim et al., 2011], 2-метоксиэстрадиолом в клетках нейробластомы [Zhang et al., 2011], бета-амилоидом в нейронах [Manczak et al., 2010], гипохлорной кислотой в клетках фетальной печени [Whiteman et al., 2008], мутациями в митохондриальном геноме [Jou et al., 2007], воздействием на рецептор нейтротрофина в эмбриональных мотонейронах [Pehar et al., 2007], инфракрасным и ультрафиолетовым излучением в фибробластах [Schroeder et al.,

2007; Oyewole et al., 2014], докозогексаеноевой кислотой и бутиратом в иммортализованных колоноцитах [Ng et al., 2005], бессывороточной средой в клетках феохромоцитомы [Galeotti et al., 2005] ингибированием синтеза глютатиона в фибробластах больных атаксией Фридриха [Jauslin et al., 2003]. Впрочем, в литературе имеются и противоположные указания, согласно которым MitoQ в ряде модельных систем не ингибирует апоптоз и даже сам выступает в качестве индуктора апоптоза и аутофагии, главным образом за счет своих прооксидантных свойств [Doughan, Dikalov, 2007; Jarvis et al., 2007; Leo et al., 2008; Mustapha et al., 2010; Vlachantoni et al., 2011; Gonzalez et al., 2014; Jadidian et al., 2014]. Сообщалось также о результатах экспериментов *in vitro*, в которых MitoQ как антиоксидантный агент и ингибитор апоптоза был заметно слабее таких веществ, как мелатонин и тирон [Oyewole et al., 2014; Jou et al., 2007].

На моделях *in vivo* и *ex vivo* многих заболеваний, в основе которых лежат альтеративные процессы (гибель клеток) также показана эффективность MitoQ. Это относится к гематологическим проявлениям (тромбоцитопении) при лучевой болезни [Ramsey et al., 2014], амиотрофическому латеральному склерозу [Miquel et al., 2014], другим нейродегенеративным расстройствам [Chaturvedi, Beal, 2008; Hobbs et al., 2008; McManus et al., 2011; Wani et al., 2011; Orsucci et al., 2011] (при которых простые антиоксиданты дают очень ограниченный эффект [Giordano et al., 2013], ототоксическому действию гентамицина [Ojano-Dirain et al., 2014], нефропатии, вызванной цисплатином [Mukhopadhyay et al., 2012], адриамициновой кардиомиопатии [Smith, Murphy, 2010], признакам альтерации при хранении почечных трансплантантов при низких температурах [Mitchell et al., 2011; Parajuli et al., 2012], повреждению хрящевой ткани, вызванному оксидативным стрессом при механическом воздействии [Wolff et al., 2013], ишемическому и реперфузионному повреждению печени [Mukhopadhyay et al., 2012] и миокарда [Adlam et al., 2005; Neuzil et al., 2007], начальным признакам апоптоза, вызванным в кардиомиоцитах объемной перегрузкой сердца [Gladden et al., 2011]. Из дистрофических процессов изучено только влияние MitoQ на токсическую (алкогольную) жировую дистрофию печени, выраженность которой

уменьшалась под действием этого препарата [Chacko et al., 2011]. Механизм действия MitoQ на процессы альтерации связывают, прежде всего, с его антиоксидантными свойствами и ингибированием редокс-зависимых сигнальных процессов, приводящих к клеточной гибели, такими, как укорочение теломер, последствия активации НАДФ-Н-оксидазы и ксантиноксидазы, открытие митохондриальной поры (mPTP), транслокация проапоптотического белка Bax в митохондрии и перераспределение ионов кальция между клеточными компартментами [Saretzki et al., 2003; Valencia et al., 2006; Lowes et al., 2009; Cuperus, et al., 2010; Schmidt et al., 2010; Gladden et al., 2011; Davidson, et al. 2012; Solesio et al., 2013; Sun et al., 2014]. Действия MitoQ на процессы фибриноидного некроза и стромальные дистрофии специально никем не исследовалось, однако, имеются указания на подавление этим препаратом экспрессии металлопротеиназ в фибробластах, вызванной фрагментацией коллагеновых волокон и предотвращении, таким образом, порочного круга, приводящего к усугублению деструктивных процессов в соединительной ткани [Fisher et al., 2009].

Публикаций, посвященных влиянию на альтеративные процессы митохондриальных проникающих антиоксидантов – производных пластохинона (SkQ1, SkQR1, SkQBerb, SkQPalm и др.) значительно меньше, чем аналогичных работ с работ с MitoQ, однако результаты этих исследований заслуживают самого пристального внимания. *In vitro* была показана высокая эффективность наномолярных концентраций SkQ1, SkQR1, SkQBerb, SkQPalm как ингибиторов апоптоза и его ранней стадии – дробления митохондрий – вызванных пероксидом водорода и другими воздействиями, такими как ультрафиолетовое излучение, TNFα и белок p66shc в клетках самого разного происхождения [Izyumov et al., 2004; Skulachev, 2005; Chernyak et al., 2006; Pletjushkina et al., 2006; Pletjushkina et al., 2006; Antonenko et al., 2008; Plotnikov et al., 2008; Фетисова и соавт., 2010; Fetisova et al., 2010; Skulachev, 2011; Skulachev et al., 2011; Фетисова и соавт., 2011; Lyamzaev et al., 2011; Zorov et al., 2013; Galimov et al., 2014], причем разница между концентрациями препаратов с антиоксидантным и прооксидантным (проапоптотическим) эффектами составляла 1000 раз. Эти результаты послужили

основанием для детального исследования влияния митохондриально-направленных соединений пластохинона на моделях альтеративных изменений *in vivo* и *ex vivo*, особенно в головном мозге, миокарде и в почках. Так, в обширной работе Л.Е. Бакеевой и соавторов [Bakeeva et al., 2008] исследовано действие SkQ1 и 10-(6'-пластолхинонил) децилродамина (SkQR1) *ex vivo* и *in vivo* на крысиных моделях инфаркта почки и сердца, вызванных ишемией/реперфузией, а так же ишемического инсульта. Об эффективности соединений в отношении альтеративных изменений судили по размерам очага поражения, выживаемости животных и уровню маркерных ферментов в крови. Во всех перечисленных моделях SkQ1 или SkQR1 оказывали заметное защитное действие. Было показано, что концентрации SkQ1 порядка 125–250 нмоль/кг в день в течение 2–3 недель уменьшают размер инфарктной зоны, вызванной ишемией/реперфузией сердца *in vivo*, и снижают содержание в крови лактатдегидрогеназы и сердечной изоформы креатинкиназы, уровень которых возрастает в результате ишемии/реперфузии за счет высвобождения ферментов при гибели клеток. Авторами данной работы было обнаружено, что у крыс с единственной почкой ишемия/реперфузия этой почки приводит к гибели большинства животных через четыре дня, в то время как однократная инъекция SkQ1 или SkQR1 (1 мкмоль/кг за день до ишемии) спасает жизнь почти всех крыс. Введение SkQR1 сопровождается уменьшением содержания АФК в клетках почек, нормализацией в крови уровня креатинина и некоторых других контролируемых почкой параметров. В то же время, показано, что SkQ1, обладающий меньшей, чем SkQR1 способностью, проникать через мембраны, спасает жизнь животных, но не приводит к нормализации содержания АФК в клетках почки и креатинина в крови. При использовании модели компрессионной ишемии/реперфузии мозга было показано, что однократное введение крысам за день до операции 1 мкмоль SkQR1/кг уменьшает размер очага повреждения мозга. На этой модели SkQ1 был неэффективен предположительно вследствие более низкой проницаемости гематоэнцефалического барьера для данного вещества. Интересно, что результаты дальнейших исследований действия SkQR1 при ишемии/реперфузии головного мозга показали, что механизм его

нейропротекторного эффекта в данном реализуется во многом благодаря стимуляции синтеза эритропоэтина в почках, который оказывает непосредственный защитный эффект на ишемизированную ткань [Silachev et al., 2012; Silachev et al., 2014]. Еще одним возможным механизмом нейропротективного действия антиоксидантов-производных пластохинона является предотвращение оксидативного стресса за счет мягкого разобщения и предотвращения митохондриальной гиперполяризации [Plotnikov et al., 2012; Silachev et al., 2014; Khailova et al., 2014]. Стоит упомянуть, что SkQR1 оказывал благоприятный эффект и в весьма своеобразной ситуации – при экспериментальной ишемии стенки мочевого пузыря в случае острой задержке мочи [Kirpatovsky et al., 2013]. Кроме ишемии, ингибирующее действие препаратов семейства SkQ на процессы повреждения в нервной ткани было показано на разных моделях болезни Альцгеймера (в том числе и *ex vivo*) [Kapay et al., 2011; Jankauskas et al., 2012; Skulachev, 2012; Kapay et al., 2013; Stefanova et al., 2014] и на модели возрастной ретинопатии [Saprunova et al., 2012].

Другой группой исследователей было изучено перорального введения с пищей SkQ1 в течение 2-3 недель на величину ишемического и реперфузионного повреждения сердца в условиях эксперимента на самцах крыс [Писаренко и соавт., 2009]. Контрольным крысам перорально (с пищей) вводили такие же дозы бромида натрия, так как SkQ1 содержит, кроме органической части (пластохинона, линкера и трифенилфосфония), также и бромид-ионы. После анестезии у животных индуцировали региональную ишемию миокарда, после которой в течение часа выполнялась реперфузия. Главным критерием оценки эффекта служил размер зоны инфаркта миокарда, определяемый после обработки срезов сердца тетразолием синим. Пероральное введение SkQ1 с пищей в суточных дозах 125 нмоль/кг и 250 нмоль/кг в течение 2 или 3 недель ститистически значимо уменьшало размеры зоны инфаркта. Паралельно в крови уменьшалась активность маркерных ферментов (лактатдегидрогеназы и фракции МВ креатинкиназы) по сравнению с их активностью после реперфузии у контрольных животных. Одновременно наблюдалось улучшение биохимических

показателей состояния зоны риска: большей сохранностью пула аденинуклеотидов и увеличением количества фосфокреатина. В подвергнутой ишемии части сердца достоверно уменьшалось накопление лактата и повышалось содержание пировиноградной кислоты. Авторы работы пришли к определенному заключению, согласно которому введение с пищей SkQ1 увеличивает устойчивость миокарда к ишемии и последующей реперфузии, равно как купирует метаболические изменения в кардиомиоцитах, возникающие в постишемическом периоде. Этот вывод был полностью подтвержден на модели ишемического повреждения миокарда *ex vivo*, причем причину обнаруженного эффекта авторы видели в повышении антиоксидантного статуса кардиомиоцитов [Лакомкин, Капелько, 2009].

Несколько разных аспектов влияния митохондриально-направленных антиоксидантов на альтерацию в почках были изучены в работах группы Д.Б. Зорова и Е.Ю. Плотникова [Plotnikov et al., 2009; Plotnikov et al., 2010; Plotnikov et al., 2011]. Полагая, что наиболее важными поражениями почек, в основе которых лежит окислительное повреждение, являются нефропатия, вызванная рабдомиолизом, гентамицин-индуцированное поражение и повреждение, вызванное ишемией/реперфузией, эти патологии были выбраны в качестве типовых для разработки митохондриально-направленной стратегии защиты почек. Рядом экспериментов, выполненным этими исследователями, было подтверждено, что митохондрии действительно играют ключевую роль в этих патологиях, являясь одновременно источником и мишенью для чрезмерного производства АФК. Авторами было обнаружено, что SkQR1 избавляет почку от вредного воздействия перечисленных патологий. Внутрибрюшинное введение SkQR1 до индукции патологического состояния не только нормализовало уровень АФК и продуктов ПОЛ в митохондриях почек, но также приводило к снижению уровня цитохрома *c* в крови, восстанавливало нормальную выделительную функцию почек и значительно понижало смертность среди животных, имеющих единственную почку, подверженную ишемии/реперфузии. Производное SkQR1 без пластохинона (C12R1), взятое в качестве контрольного соединения, обладало

некоторыми, хотя и ограниченными, нефропротективными свойствами и также повышало выживаемость животных после ишемии/реперфузии. Детальное исследование показало, что SkQR1 индуцирует некоторые молекулярные элементы систем, обеспечивающих ишемическую толерантность в почках и нефропротекцию при ишемии, таких как увеличение уровня эритропоэтина и фосфорилирование киназы гликогенсинтазы 3β в почках. SkQR1 также нормализовал уровень почечного эритропоэтина, который снижается после ишемии/реперфузии почки и введения известного нефротоксического агента гентамицина.

Результаты испытания митохондриально-направленных соединений пластохинона на других моделях альтерации представлены в единичных публикациях. Так, было показано, что SkQ1 ингибирует возрастной липофусциноз пигментного эпителия [Saprunova et al., 2010], лентикулярную дегенерацию [Snytnikova et al., 2012], структурные изменения миофибрилл при развитии саркопении [Vays et al., 2014], реперфузионные изменения в трансплантанте печени после его хранения в гипотермических условиях [Cherkashina et al., 2011]. Имеются косвенные основания полагать, что этот препарат мог бы быть эффективен против развития гемосидероза при некоторых гемолитических состояниях, поскольку способен повышать устойчивость эритроцитов к гемолизу, вызванному окислительным стрессом [Omarova, Antonenko, 2014].

Из всего рассмотренного материала можно заключить, что митохондриальные антиоксиданты исследованы (с констатацией многочисленных позитивных результатов) на довольно значительном, но далеко не полном круге важнейших экспериментальных патологических состояний, сопровождающихся альтерацией и что при довольно подробной характеристике наблюдавшихся эффектов на молекулярно-биологическом, цитологическом (*in vitro*), биохимическом и физиологическом (*in vivo, ex vivo*) уровнях, имеется очень мало данных об изменениях соответствующих тканевых (гистопатологических) реакций.

### 1.4.2 Воспаление, иммунный ответ и иммунопатологические реакции

Врожденный и адаптивный иммунитет представляют собой сложную систему физиологических клеточных и молекулярных взаимодействий, которые могут реализоваться как в виде адекватной воспалительной реакции, иммунного ответа на патоген и саногенеза, так и в форме неадекватного воспаления или иммунопатологической реакции, приводящих к хронизации заболевания, альтеративным изменениям (вторичной альтерации) и нарушению нормального функционирования органов [Струков, 1981; Маянский, 1991, Струков, Серов, 1995; Пальцев, Аничков, 2001]. Воспалительный ответ может быть связан с иммунными (с участием Т-лимфоцитов и комплекса антиген-антитело) или неиммунными механизмами (инициированными за счет взаимодействия определенных эндогенных или экзогенных молекул с толл-подобными рецепторами и последующими секрецией цитокинов, активацией эндотелия и рекрутированием клеток—эффекторов в очаг воспаления) [Струков, 1981; Лекции…, 1996; Лекции…, 2003; Majno, 2004; Проскуряков и соавт., 2005; Medzhitov, 2007; Мейл и соавт., 2007; Underwood, 2009; Пауков, 2015].

Как известно, существует несколько форм локального острого экссудативного (серозное, катаральное, серозно-лейкоцитарное, гнойное, фибринозное, геморрагическое, гнилостное) и локального же хронического продуктивного (интерстициальное, гранулематозное) воспаления [Струков, 1981; Струков, Кауфман, 1989; Маянский, 1991, Струков, Серов, 1995; Лекции…, 1996; Пауков, 2015]. Вариант воспаления определяется как свойствами патогена или флогогена (вирулентностью, существованием внутри или вне клеток, наличием у него экзотоксина, способностью вызывать альтерацию и иммунопатологические формы ответа, способом ухода от систем элиминации), так и состоянием самого организма (уровнем экспрессии цитокинов и толл-рецепторов, молекул адгезии на эндотелии, количеством и статусом Т-лимфоцитов и т.д.) [Лекции…, 1996; Лекции…, 2003; Majno, 2004; Проскуряков и соавт., 2005; Underwood, 2009]. Системное воспаление, иначе именуемое «синдромом системной воспалительной реакции», возникает вследствие попадания лигандов, активирующих толл-

подобные рецепторы в общий кровоток, что ведет к генерализованной активации эндотелия и лейкоцитов, нарушению гомеостаза (в том числе и активации внутрисосудистого свертывания крови) и регуляции сосудистого тонуса, повреждению тканей и, в конечном счете – к полиорганной недостаточности [Tsokos, 2007; Lowes et al., 2008, Lowes et al., 2013]. Наиболее яркой нозологической формой, в основе патогенеза которой лежит синдром системного воспаления, является сепсис (чаще всего бактериальный), хотя возможно развитие этого синдрома и без участия патогенов [Tsokos, 2007; Zhang et al., 2010]. Из иммунопатологических реакций известны многообразные первичные и вторичные иммунодефициты, аллергические реакции (то есть, варианты неадекватного по силе и форме иммунного ответа) и аутоиммунные состояния (при которых наблюдается иммунный ответ на собственные антигены) [Лекции…, 1996; Лекции…, 2003; Мейл, 2007; Underwood, 2009]. Все эти формы иммунопатологических реакций, в конечном счете, реализуются в виде неадекватного по форме, направлению и силе воспалительного ответа с развитием повреждения и функциональной недостаточности органов и систем.

Продукция свободных радикалов и окислительный стресс играют несколько ролей, важных для развития как адекватных, так и патологических воспалительных и иммунобиологических реакций. Во-первых, окислительно-восстановительные процессы, по-видимому, влияют на состояние гемопоэза (гранулоцитопоэза), продукцию и дифференцировку иммунокомпетентных клеток (на это указывают результаты опытов с митохондриально-направленными антиоксидантами, см. далее). Во-вторых, АФК-зависимые сигнальные пути играют заметную роль в провоспалительной активации эндотелия [Parthasarathi et al., 2002; Ichimura et al., 2003; Muller et al., 2003; Barhoumi et al., 2004; Zhang et al., 2007; Wang et al., 2012; Mackenzie et al., 2013]. В-третьих, имеются указания на роль АФК как активатора врожденных механизмов инициации воспаления (в частности, компонентов инфламмасомы, ответственных за процессинг провоспалительных цитокинов) и как важного дополнительного стимула (наряду с антигенами, мембранным интерфейсом и определенным набором цитокинов)

при запуске адаптивного иммунного ответа [Parthasarathi et al., 2002; Despande et al., 2002; Yu et al., 2002; Griffiths, 2005; Hu et al., 2006; Cruz et al., 2006; Tse et al., 2007; Simmonds, Foxwell, 2008; Tschopp, Schroder, 2010; Pelletier et al., 2012; Valcarcel-Ares et al., 2014]. Наконец, в-четвертых, общеизвестна роль свободнорадикальных процессов в осуществлении эффекторной фазы иммуногенеза, киллинге патогенов и повреждении собственных тканей организма, в том числе и при синдроме системной воспалительной реакции [Hadjigogos, 2003; Hitchon, El-Gabalawy, 2004; Remans et al., 2005; Fernandez et al., 2006; Lowes et al., 2008]. Правда, в этих последних случаях большую роль традиционно отводят внемитохондриальным АФК, нежели АФК митохондриального происхождения. Здесь же стоит отметить, что гибель важных клеток-эффекторов воспаления - нейтрофилов, от которой зависит форма воспалительной реакции (серозно-лейкоцитарная с незначительной вторичной альтерацией или гнойная с тяжелыми деструктивными последствиями для ткани) также зависит от интенсивности продукции АФК [Fay et al., 2006, Fialkow et al., 2007]. Еще одним важным моментом является способность пероксида водорода индуцировать гиперпродукцию митохондриальных АФК, что ведет к замыканию связи между ними по типу «порочного круга» [Zorov et al., 2000] и может играть определенную роль в патогенезе хронизации воспалительных процессов.

Несмотря на существующие указания о значении АФК в воспалительных и иммунобиологических процессах, попытки применения нетаргетированных антиоксидантов для терапии таких состояний (в частности, экспериментального ревматоидного артрита) оказались малоуспешными и противоречивыми [Jonsson et al., 1986; De Bandt et al., 2002; Ilhan et al., 2004; Hultqvist et al., 2006; Canter et al., 2007; Elmali et al., 2007; Rosenbaum et al., 2010; Sanchez-Barcelo et al., 2010; Yu et al., 2012; Malviya et al., 2013; Ishibashi, 2013].

Работ, в которых изучалось влияние митохондриально-направленных антиоксидантов на воспалительные и иммунобиологические состояния существенно меньше, чем публикаций о действии этих препаратов на патологии, в основе которых лежат альтеративные процессы. Прежде всего, следует указать

на результаты исследований влияния митохондриально-таргетированных соединений на фоновое состояние иммунной системы и на клеточные процессы в иммунокомпетентных органах [Obukhova et al., 2009; Shipounova et al., 2010; Marthandan et al., 2011; Yang et al., 2012]. В частности, одним из наиболее заметных изменений при старении млекопитающих является прогрессивная инволюция тимуса, среди последствий которой называют повышение восприимчивости к инфекциям (хотя в действительности такая связь еще нуждается в строгих экспериментальных доказательствах). В работе Л.А. Обуховой и соавторов [Obukhova et al., 2009] сообщалось, что SkQ1 в низких дозах (250 нмоль/кг в сутки) ингибировал возрастную инволюцию тимуса у нормальных (линия Вистар) и подверженных преждевременному старению (линия OXYS) крыс. SkQ1 сохранял общий вес и объем органа, объем коры тимуса и его медуллы, клеточность тимуса, и содержание в нем клеток, экспрессирующих маркеры CD3, CD4 и CD8. Интересно, что SkQ1 оказался особенно эффективен в случае подверженных старению крыс. На основании этих данных авторы высказали предположение, что SkQ1 замедляет возрастное ослабление функций иммунной системы и что это свойство может объяснить способность данного препарата удлинять жизнь лабораторных животных (см. *1.4.7*). В другой работе кратковременное (3 недели) введение молодым мышам SkQ1 снижало относительное содержание CD8+ (но не CD4+) Т-лимфоцитов в селезенке (причем, одновременно понижалось содержание наивных Т-клеток и увеличивалось количество Т-клеток памяти), в то время как воздействие этим веществом на спленоциты в культуре *in vitro* (24ч., 50 нмоль/л) приводило к незначительному повышению процента Т-лимфоцитов (прежде всего CD4+), возможно, за счет слабого цитотоксического действия на другие клетки (В-лимфоциты) [Yang et al., 2012]. В культуре клеток периферической крови человека та же концентрация не оказывала никаких эффектов ни на содержание разных субпопуляций Т-лимфоцитов, ни на экспрессию ими маркеров активации или регуляторных молекул (ICOS, PD-1, CTLA-4). Кроме того, в селезенке мышей, обработанных SkQ1, увеличивалось содержание плазмоцитоидных

дендритных клеток и снижалось содержание гранулоцитов, а содержание натуральных киллеров, Т-НК-клеток и регуляторных Т-лимфоцитов оставалось неизменным [Yang et al., 2012]. По результатам еще одного исследования SkQ1 (0,9 и 28,8 нмоль/кг в день в течение двух лет) предотвращал возрастное повышение относительного числа гранулоцитов, не влияя на стволовые кроветворные и мезенхимальные клетки, только повышая продукцию фактора, стимулирующего образование колоний фибробластов [Shipounova et al., 2010]. Все эти данные о «мягком» влиянии митохондриального антиоксиданта SkQ1 на гемопоэз и позволяют предполагать роль АФК в регуляции продукции, дифференцировке и гибели иммуноцитов, хотя не исключена возможность стимуляции этим препаратом других сигнальных путей, не зависимых от АФК. Что касается последней возможности, то такая ситуация была выявлена в случае ответа эндотелиоцитов в культуре *in vitro* на провоспалительную стимуляцию TNFα, поскольку снижение экспрессии молекул межклеточной адгезии (ICAM-1, VCAM, E-селектина) наблюдалось при действии не только SkQ1, но и лишенного антиоксидантной части митохондриально-направленного соединения C12TPP, причем происходило это благодаря ингибированию экспрессии NF-κB [Romashchenko et al., 2013; Zinovkin et al., 2014]. Существенно, что SkQ1 подавлял секрецию интерлейкинов 6 и 8 в стимулированной TNFα культуре эндотелиальных клеток и повышенную фоновую экспрессию молекул межклеточной адгезии на эндотелии аорты у старых мышей, но не влиял на избыточное содержание TNFα и интерлейкина 6 в крови у тех же животных [Zinovkin et al., 2014].

Помимо данных о влиянии митохондриальных антиоксидантов на физиологические параметры, косвенно отражающие способность организма к воспалительному и иммунному ответу, существуют и прямые исследования эффектов указанных препаратов на данные реакции. Нужно отметить, что все эти результаты были получены с применением MitoQ. Было показано, что MitoQ снижает выраженность продуктивной воспалительной реакции при колите, индуцированном декстраном, уменьшая выраженность инфильтрации

лимфоцитами и макрофагами, а также степень вторичной альтерации и ульцеративные явления в слизистой оболочке [Dashdorj et al., 2013]. Это же вещество было способно уменьшать выраженность микроглиальной реакции, продукции микроглией интерлейкина 6 и гибель нейронов в спинном мозге при экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите (рассеянном склерозе) [Mao et al., 2013; Davies et al., 2013]. Оба указанных случая представляют собой модели продуктивного воспаления. Экссудативное воспаление в этом отношении пока остается совсем не изученным. Общий механизм действия митохондриально-направленных антиоксидантов на воспалительные поражения также остается неясным.

В отношении синдрома системной воспалительной реакции (который может иметь неинфекционную природу или возникать в рамках сепсиса и септического шока) имеется несколько работ с четким указанием на позитивные эффекты MitoQ. Использование этого препарата на модели индуцированного бактериальным липополисахаридом эндотоксинового шока показало не только улучшение функционального статуса митохондрий, но и снижение продукции противовоспалительных цитокинов, равно как и физиологических и биохимических маркеров органной дисфункции [Lowes, et al., 2008; Supinski et al., 2009; Lowes et al., 2013]. Наконец, была сделана попытка исследовать действие MitoQ на выживаемость мышей при экспериментальной малярии, которая дала отрицательный результат [Francischetti et al., 2014]. Нужно, однако, сказать, что последняя работа имеет к воспалению и иммуногенезу только косвенное отношение.

### 1.4.3 Регенерация, компенсаторно-приспособительные процессы и атрофия

К группе компенсаторно-приспособительных реакций принято относить все те процессы, которые возникают как ответ на повреждающее воздействие, тем или иным образом восполняющий утраченные структуру и функцию ткани и органа [Авцын, Шахламов, 1979; Непомнящих, 1991; Струков, Серов, 1995;

Лекции…, 1996; Пальцев, Аничков, 2001; Лекции…, 2003; Пауков, 2015]. К ним относят регенерацию (физиологическую, репаративную (адекватную повреждению) полную (реституцию) или не полную (субституцию) и патологическую (неадекватную повреждению) избыточную или недостаточную, по механизму – внутриклеточную и клеточную), гиперплазию (в том числе и органелл), гипертрофию (в том числе и отдельных внутриклеточных структур), организацию, гистологическую аккомодацию, метаплазию, дисплазию [Струков, Серов, 1995, Лекции…, 1996]. Механизмы, отвечающие за осуществление этих процессов, очень сложны и, в конечном счете, реализуются на уровне регуляции функциональной активности клеток, клеточной пролиферации и дифференцировки [Авцын, Шахламов, 1979; Саркисов, 1988; Струков, Серов, 1995; Лекции…, 1996; Пальцев, Аничков, 2001; Лекции…, 2003; Majno, 2004; Moseley et al., 2004; Greaves, 2007; Menke et al., 2007; Underwood, 2009; Maronpot et al., 2010; Thoolen, 2010; Toxicologic pathology…, 2013; Пауков, 2015]. Исходя из такого положения, возможности применения митохондриально-направленных антиоксидантов при компенсаторно-приспособительных явлениях во многом зависят от того, в какой степени АФК влияют на синтез цитокинов, ответ на цитокиновую стимуляцию и активацию ряда вариантов клеточной дифференцировки. Следует также иметь ввиду, что эти препараты могут косвенно оказывать влияние на выраженность процессов компенсации, модулируя выраженность альтеративных явлений или воспалительного ответа (см. раздел 1.4.1 и 1.4.2).

В отношении влияния митохондриальных антиоксидантов на цитокиновую продукцию и процессы дифференцировки, играющие огромную роль в репаративной регенерации, существенные результаты были получены в работе Е.Н. Поповой и соавторов [Popova et al., 2010]. Целью этого исследования было изучение возможной роли АФК при передаче сигнала, в модуляции цитоскелета и в дифференциации фибробластов. SkQ1 в наномолярной концентрации активировал сигнальный путь Rho/ROCK/LIMK, после чего следовало фосфорилирование кофилина и стабилизация актиновых стрессовых волокон, а

затем и дифференцировка подкожных фибробластов человека в миофибробласты, что показала экспрессия в этих клетках особой изоформы фибронектина (EDA-ФН) и гладкомышечного актина (α-ГМА). Было показано также, что этот эффект опосредован трансформирующим фактором роста β1 (TGFβ1), который активировался матриксной металлопротеиназой-9 (MMP9) в культуральной среде. Удаление АФК стимулировало секрецию MMP9, но не ее процессинг. Тот же эффект достигался использованием ненаправленного антиоксиданта тролокса при более высокой концентрации, однако тиол-содержащий антиоксидант NAC ингибировал активность MMP9 и оказался не в состоянии индуцировать дифференциацию миофибробластов. Фенотип миофибробластов поддерживался благодаря аутокринной TGFβ1-зависимой стимуляции после удаления SkQ1. Авторами был сделан вывод, что удаление АФК в митохондриях индуцирует TGFβ1-зависимую дифференциацию миофибробластов, что может быть крайне важно для активации процесса заживления ран, однако, одновременно может усиливать развитие фиброза. Действительно, было показано, что SkQ1 позитивно влияет на многие реакции при заживлении кожных ран [Demianenko et al., 2010]; что касается склеротических процессов и фиброза, то данные на этот счет пока отсутствуют. В то же время было показано, что другой митохондриальный антиоксидант – MitoQ – не только не индуцировал, но и даже предотвращал фиброз клубочков почки при диабетической нефропатии у мышей, ингибируя ряд профибротических сигнальных путей, предотвращая накопление в ядрах бета-катенина и фосфорилированного транскрипционного фактора Smad2/3 [Chacko et al., 2010]. Эти данные вполне согласуются с представлениями о роли окислительного стресса в развитии фиброза [Walters et al., 2008]. Из других данных о влиянии митохондриальных препаратов на процессы клеточной регенерации и пролиферации (гиперплазии) заслуживают упоминания результаты работы [Schäfer, M., 2003], в которой была показана способность MitoQ подавлять пролиферацию эндотелиальных клеток в ответ на гипоксию, что может иметь определенное значение, например, в онкологии и в офтальмологической патологии.

Существуют сообщения о АФК в качестве регуляторов дифференцировки мышечных клеток, миофибробластов и остеокластов [Bai et al., 2005; Popova et al., 2010; Srinivasan et al., 2010; Lee et al., 2011; Nierobisz et al.2011; Hyeon et al., 2013] однако о том, могут ли митохондриальные антиоксиданты влиять на течение подобных метапластических процессов *in vivo*, пока ничего не известно.

Относительно много публикаций было посвящено влиянию митохондриальных антиоксидантов на процессы внутриклеточной регенерации и компенсаторный ответ после различных повреждающих воздействий, прежде всего в нервной ткани. Было показано, что SkQ1 увеличивает функциональную пластичность и способствует восстановлению функционального ответа при Альцгеймер-подобной и другой возрастной нейропатологии у крыс [Amstislavskaya et al., 2010; Stefanova et al., 2010; Skulachev, 2012; Stefanova et al., 2014], после травмы мозга [Isaev et al., 2012], воздействия бета-амилоидом на гиппокамп *ex vivo* [Kapay et al., 2011; Kapay et al., 2013] (последний эффект был показан также для MitoQ) [Ma et al., 2011].

Существуют многочисленные указания на роль окислительного стресса и митохондриальных АФК в развитии гипертрофии миокарда, которая, как известно, является неблагоприятной формой ответа при большом числе заболеваний сердечно-сосудистой системы, часто заканчиваясь декомпенсацией и дилатацией [Li et al., 1995; Lebovitz et al., 1996, Cieslik et al., 2011; Tsutsui et al., 2011; Maulik, Kumar, 2012; Madamanchi, Runge, 2013]. В связи с этим были предприняты исследования, показавшие, что MitoQ снижает развитие гипертрофии миокарда у животных с экспериментальной гипертонической болезнью, причем авторы связывают этот эффект с улучшением функционального состояния эндотелия кровеносных сосудов [Graham et al., 2009].

Атрофия представляет собой общепатологический процесс, который возникает как следствие растянутого во времени слабого повреждающего воздействия, в результате которого усиливается апоптоз и/или снижается способность ткани к внутриклеточной или внеклеточной репаративной регенерации [Авцын, Шахламов, 1979; Саркисов, 1988; Струков, Серов 1995;

Лекции…, 1996; Пальцев, Аничков, 2001; Лекции…, 2003; Majno, 2004; Greaves, 2007; Underwood, 2009; Toxicologic pathology…, 2013; Пауков, 2015]. Таким образом, атрофия может возникать как последствие слабой и длительной альтерации, так и в результате нарушения компенсаторно-приспособительных реакций (декомпенсации). В связи с этим, атрофические изменения ряда органов (тимуса, Х-зоны надпочечников, селезенки, мышц, гонад, нейронов сетчатки и внутреннего уха и др.) часто возникают как возраст-зависимые процессы (старческая инволюция) и во многом обусловлены соответствующими изменениями гормонального фона [Струков, Серов, 1995; Лекции…, 1996; Monographs on Pathology of Laboratory Animals…, 1983-1998; Pathology of the mouse: reference and atlas…, 1999; Пальцев, Аничков, 2001; Greaves, 2007; Underwood, 2009; Toxicologic pathology…, 2013]. Как было показано выше, альтеративные изменения (апоптоз) и, по крайней мере, отчасти, компенсаторно-приспособительные процессы могут модулироваться АФК-зависимыми сигнальными путями. Следовательно, можно ожидать, что и в процессах атрофии АФК играют определенную роль, а митохондриальные антиоксиданты могут оказаться эффективными при патологиях, в основе которых лежит атрофия. Имеется несколько работ, позволяющих судить о наличии у митохондриально-направленных препаратов терапевтического действия в отношении атрофических заболеваний. Согласно опубликованным данным, MitoQ способен замедлять развитие экспериментальных амиотрофического латерального склероза [Miquel et al., 2014] и врожденной ретинопатии [Vlachantoni et al., 2011], а SkQ1 - саркопении, ретинопатии, остеопороза и инволюции тимуса у ускоренно стареющих крыс OXYS [Vays et al., 2014, Obukhova et al., 2009, Markovets et al., 2011]. Большая работы по исследованию эффектов SkQ1 на атрофические возрастные заболевания глаз разных животных в эксперименте и в клинике была выполнена В.В. Нероевым и соавторами [Neroev et al., 2008]. Введение капель SkQ1 оказывало мощное терапевтическое действие на уже развившиеся катаракту и ретинопатию у крыс OXYS в возрасте 3-12 месяцев, но не 24 месяцев. Капли с SkQ1 препятствовали развитию глаукомы. В ветеринарной клинике

лечение каплями SkQ1 получали 293 животных (собак, кошек и лошадей), страдавших ретинопатиями. В 61 случае после лечения посредством SkQ1 зрение восстановилось. В экспериментах *ex vivo* было установлено, что 20 нМ SkQ1 сильно ингибировал макрофагальную трансформацию клеток пигментного эпителия при культивации заднего сектора глаза. Этот эффект возможно связан с наблюдаемым терапевтическим действием SkQ1 *in vivo*. Дальнейшее изучение показало, что эффект SkQ1 на ретинопатию связан, в том числе, с нормализацией экспрессии факторов роста сосудов (VEGF и PEDF) в сетчатке крыс линии OXYS [Markovets et al., 2011]. Стоит, однако, отметить, что авторы не обсуждают, был ли эффект SkQ1 в конечном счете связан с замедлением атрофии или с развитием каких-то компенсаторно-приспособительных процессов в сетчатке.

### 1.4.4 Опухолевый рост

Понятие «опухолевый рост» объединяет в себе огромное и невероятно многообразное число патологических процессов, различия между которыми кроются в их тканевом происхождении и наборе молекулярных изменений в генетическом аппарате. Общей особенностью этих процессов является нарушенный контроль за клеточной пролиферацией и дифференцировкой [Авцын, Шахламов, 1979; Струков, Серов, 1995; Лекции…, 1996; Пальцев, Аничков, 2001; Лекции…, 2003; Underwood, 2009; Пауков, 2015]. Другие свойства – клеточная и тканевая атипия, способность к инвазивному росту, разным типам метастазирования и т.д. варьируют в зависимости от типа новообразований и даже между индивидуальными случаями опухолей [Струков, Серов, 1995; Лекции…, 1996; Пальцев, Аничков, 2001; Лекции…, 2003]. Инвазивный рост и способность к генерализации свойственны прежде всего злокачественным новообразованиям; метастазирование доброкачественных опухолей происходит исключительно редко [Струков, Серов, 1995]. Последние, кроме того, представляю собой очень слабо очерченную группу, поскольку границы между доброкачественными опухолями с одной стороны, пороками развития и

гиперплазиями – с другой проводятся на основании условных признаков. Выделяют три основных стадии развития злокачественных опухолей: инициацию, связанную с приобретением клеткой тем или иным путем генетических или эпигенетических изменений, вызывающих малигнизацию; промоцию – стадию, во время которой происходит селективное размножение клона генетически измененных клеток и прогрессию – образование собственно опухоли и ее распространение по организму лимфогенным, гематогенным или имплантационным путем [Guyton, Kensler, 1993; Лекции…, 1996; Анисимов, 2008].

АФК, образующиеся в митохондриях могут играть важную роль в процессах неопластической трансформации и канцерогенеза, прежде всего на этапе инициации опухоли, что связано с генотоксическим действием свободных радикалов [Ames, 1989; Harman, 1992, Guyton, Kensler, 1993; Martínez-Cayuela, 1995; Farinati, 1998; Анисимов, 2008; Gupta, 2014]. О роли АФК на этапах промоции и прогрессии опухолей, в том числе и в метастазировании, известно значительно меньше [Harman, 1992; Guyton, Kensler, 1993]. При этом важно отметить, что традиционные антиоксиданты были способны только удлинять латентный период развития спонтанных опухолей у лабораторных животных, причем частота новообразований даже повышалась благодаря увеличению средней продолжительности жизни и увеличению числа особей, доживших до срока появления опухоли [Анисимов, 2008].

Говоря о месте проблемы АФК разного происхождения в онкологии, нельзя не упомянуть, что они играют большую роль в цитостатическом эффекте ионизирующего излучения и ряда лекарственных препаратов, применяемых для терапии злокачественных новообразований [Martínez-Cayuela, 1995].

О возможном влиянии митохондриальных антиоксидантов на процессы инициации опухолевого роста можно судить по косвенным данным, согласно которым SkQ1 способен оказывать антимутагенный эффект и снижать фоновый уровень хромосомных аномалий [Chistyakov et al., 2010], а MitoQ – ингибировать

образование микроядер, вызванного наночастицами кобальта [Raghunathan et al., 2013].

Опубликовано немало работ с использованием митохондриальных антиоксидантов, выполненных на различных линиях опухолевых клеток, где эти последние использовались как модели их нормальных аналогов. В то же время, сообщения о результатах целенаправленного изучения эффектов митохондриально-таргетированных веществ на опухолевый рост как таковой пока что единичны.

В частности, было обнаружено [Agapova et al., 2008], что SkQ1 добавленный в питьевую воду (5 нмоль/кг в день) подавляет спонтанное развитие опухолей (преимущественно лимфом) у мышей линии $p53^{-/-}$ и тормозит рост ксенографтов HCT116/$p53^{-/-}$ рака ободочной кишки человека на бестимусных мышах. SkQ1 не вызывает значительных изменений в росте опухолевых ксенографтов SiHa (HPV-16-ассоциированного рака шейки матки человека), однако продолжительность жизни мышей с опухолями заметно увеличивается. Показано, что SkQ1 и другие катионные антиоксиданты являются субстратами для Р-гликопротеина, повышенная активность которого, определяет множественную лекарственную устойчивость опухолевых клеток. В связи с этим, менее выраженный противоопухолевый эффект SkQ1 в ксенографтах HCT116 с мутантной формой p53, может быть связан с повышением активности Р-гликопротеина и снижением накопления SkQ1 в этих клетках. SkQ1 ингибирует пролиферацию клеток HCT116 $p53^{-/-}$ и SiHa и вызывает дифференцировку различных опухолевых клеток in vitro. Под действием SkQ1 наблюдается координированное изменение формы клеток, организации цитоскелета и появление Е-кадгеринпозитивных межклеточных контактов у опухолевых клеток эпителиального происхождения. В Ras- и SV40-трансформированных фибробластах SkQ1 восстанавливает актиновые стресс-фибриллы и фокальные контакты. SkQ1подавляет рост сосудов в имплантатах матригеля, что позволяет предположить важную роль митохондриальных АФК в опухолевом ангиогенезе. Традиционный антиоксидант NAC, использованный в качестве контрольного соединения, также замедлял опухолевый рост и изменял

фенотип опухолевых клеток подобно SkQ1, но его эффект проявлялся лишь в 1 000 000 раз больших дозах. Исключительно высокая эффективность SkQ1, связанная с его накоплением в митохондриях, как кажется авторам этой работы, подтверждает важную роль митохондриальных АФК в процессе неопластической трансформации [Agapova et al., 2008].

В другой большой работе было изучено влияние SkQ1 на развитие спонтанных опухолей у мышей трех разных линий [Юрова и соавт., 2010]. Самкам аутбредной линии SHR, инбредной линии 129/Sv и трансгенным мышам HER-2/neu (с высокой частотой карцином молочной железы) перорально с питьевой водой вводили SkQ1 в суточных дозах от 0,5-2500 нмоль/кг. Контрольные мыши получали чистую питьевую воду. Было установлено, что SkQ1 не оказал эффекта на развитие новообразований ни в одной из примененных доз и ни на одной из линий животных.

Имеется также одна работа, в которой тестировалось действие SkQ1 на индуцированный канцерогенез в мягких тканях [Аникин и соавт., 2013]. 90 мышам-самкам SHR весом 25-30 г однократно подкожно в область правого бедра вводилось по 2 мг бенз(а)пирена в 0,2 мл растительного масла. Контрольные мыши (1-я группа) дополнительным воздействиям не подвергались. Подопытные мыши 2-й и 3-й групп, начиная со следующего дня после введения канцерогена, получали постоянно с питьевой водой SkQ1 в двух дозах: 5 и 50 нмоль/кг веса в сутки в течение всей жизни. Опыт был завершен на 358-й день опыта. До 20-й недели опыта динамика нарастания количества мышей с опухолями была схожа во всех группах. Однако затем процесс нарастания количества мышей с впервые обнаруженными опухолями в группах, получавших SkQ1, происходил медленнее, чем в контрольной группе. Изучение динамики роста опухолей на месте введения бенз(а)пирена показало, что наибольший прирост объема опухолей наблюдался у мышей контрольной группы, что сопровождалось более быстрой их гибелью. К 30 неделе жизни мышей 1-й группы (контроль) в живых осталось 20% животных, во 2-й группе (5 нмоль SkQ1) — 30%, в 3-й — 40%. Средний объем опухолей к 40 неделе составлял в контроле около 40 $см^3$, 13 $см^3$ во 2-й группе и 21 $см^3$ в 3-й.

Результаты проведенного исследования позволяют предположить, что введение с питьевой водой SQ1в дозах 5 и 50 нмоль/кг оказывает тормозящее действие на канцерогенез в мягких тканях, вызванный подкожным введением бенз(а)пирена мышам SHR.

Определенный интерес в смысле применения митохондриальных антиоксидантов в качестве компонента противоопухолевой химиотерапии могут представлять данные работ Е.К. Фетисовой и соавторов [Фетисова и соавт., 2010; Фетисова и соавт., 2011]. В этих публикациях было показано, что SkQR1 избирательно накапливается в митохондриях нормальных и опухолевых клеток. В условиях окислительного стресса SkQR1 защищает клеточный пул восстановленного глютатиона. Суперэкспрессия Р-гликопротеина (Pgp 170) насоса множественной лекарственной устойчивости сильно подавляет накопление SkQR1, а ингибиторы Pgp 170 стимулируют накопление SkQR1 в различных клеточных линиях, свидетельствуя о том, что SkQR1 является субстратом Pgp 170. Защитный эффект SkQR1 от окислительного стресса снижается в клетках, суперэкспрессирующих Pgp 170. Исходя из всех этих данных, авторы высказывают предположение, что митохондриально-направленные антиоксиданты могут выборочно защищать нормальные (Pgp 170-отрицательные) клетки от токсического воздействия противоопухолевой химиотерапии, связанного с окислительным стрессом и тем самым способствовать клинической эффективности противоопухолевой терапии вместе со снижением ее побочных эффектов.

Наконец, было опубликовано сообщение о том, что MitoQ обладает в 30 раз большей цитотоксической активностью (способностью индуцировать аутофагию и апоптоз) по отношению к клеткам рака молочной железы в сравнении с нормальными клеточными элементами этого органа [Rao et al., 2010]. В какой степени эти данные могут быть востребованы в терапевтическом смысле, пока неясно.

Обобщая все сказанное об исследованиях эффектов митохондриально-направленных антиоксидантов на опухолевый рост, нельзя не отметить, что таких

работ явно недостаточно для сколько-нибудь определенных выводов. В частности, все наблюдения в работах со спонтанным канцерогенезом были произведены на самках, в то время как половые различия могут быть существенным фактором, влияющим на процессы канцерогенеза, а тестирование на животных обоих полов включено в стандартную программу оценки канцерогенной активности лекарственных препаратов [Руководство по проведению доклинических…, 2012].

### 1.4.5 Нарушения крово- и лимфообращения

К числу нарушений циркуляции крови и лимфы относят огромное число разнообразных процессов, которые развиваются на многих уровнях, от тканевого (стазы, сладжи, микротромбы и микроэмболы, паренхиматозные петехиальные кровоизлияния и т.д.) до организменного (шок, ДВС-синдром и другие) [Струков, Серов, 1995; Лекции…, 1996; Пальцев, Аничков, 2001; Лекции…, 2003; Underwood, 2009; Пауков, 2015]. Эффекты митохондриальных антиоксидантов пока что известны только в отношении последствий нарушения режима кровоснабжения тканей (ишемия и реоксигенация), о чем уже шла речь в разделе 1.4.1 и в отношении функциональных нарушений в миокарде, ведущих к развитию аритмии и сердечной недостаточности. Применение митохондриальных антиоксидантов для этой цели считается особенно оправданным ввиду чрезвычайной роли редокс-баланса для обеспечения нормальной сократительной функции сердца и отсутствия ингибиторов НАДФ-Н оксидазы, с активностью которой связывают развитие миокардиальной дисфункции [Zhang et al., 2012].

Для MitoQ была показана способность предотвращать функциональные нарушения миокарда, вызванные кокаином [Supinski et al., 2009], объемной перегрузкой [Gladden et al., 2011] или бактериальным эндотоксином [Vergeade et al., 2010]. Действие SkQ1 было исследовано *ex vivo* на моделях сердечной аритмии у крыс [Bakeeva et al., 2008]. Найдено, что добавка в пищу крайне малых количеств SkQ1 (до 0,02 нмоль SkQ1/кг в день в течение трех недель) устраняет аритмию, вызванную перфузией изолированного сердца раствором с $H_2O_2$ или

экспериментальной ишемией/ реперфузией миокарда. Эти данные были подтверждены и дополнены в другой работе [Капелько, Лакомкин, 2009]. SkQ1 вводился крысам перорально в течение 3 недель в широком диапазоне доз, после чего ставился эксперимент с ишемией в условиях нормотермии с последующей реперфузией. Отмечавшиеся в начале реперфузии нарушения ритма были статистически достоверно меньше выражены у животных, получавших SkQ1 в суточных дозах 0,5 и 5 нмоль/кг. В конце реперфузии статистически значимое лучшее восстановление частоты сокращений по сравнению с контролем выявлялось у крыс, получавших препарат в дозах 0,5 и 250 нмоль/кг, а развиваемого давления - у крыс, получавших 0,5 нмоль/кг SkQ1. Уровень восстановления интегрального показателя сократительной функции, оцененный на основании указанных параметров, был в 2 раза выше у животных, которым вводился SkQ1 в суточных дозах 0,5 и 250 нмоль/кг. Как считают авторы исследования, приведенные результаты работы позволяют предполагать, что протективный эффект исследованного препарата в отношении нарушений ритма сердца при реперфузии миокарда после ишемии реализуется за счет повышения его антиоксидантного статуса. Действие SkQ1 было также изучено на экспериментальной модели катехоламиновой (адреналиновой) аритмии сердца [Лакомкин и соавт., 2011]. Испытуемое вещество вводили перорально в разных суточных дозах, причем введение препарата крысам начинали за 2 недели до индуцирования аритмии. Введение адреналина (в хвостовую вену), выполненное с целью индукции аритмии (экстрасистолии) вызывало быстрое повышение артериального давления и падение частоты сокращений сердца. Выраженность изменения этих показателей была сходной во всех группах крыс. Суммарное число экстрасистол, равно как и индекс интенсивности аритмии оказался в несколько раз ниже у животных, получавших SkQ1. Препарат был эффективен в суточных дозах 0,5, 2 и 20 нмоль/кг. Меньшие дозы SkQ1 не оказывали статистически достоверных эффектов. Существенно, что антиаритмогенное действие препарата сочеталось с повышением выживаемости животных после индукции аритмии. Результаты этой работы показали, что введение

митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 значительно повышает резистентность сердца к аритмогенному влиянию катехоламинов.

Достойны упоминания несколько работ, показавших возможность коррекции эндотелиальной дисфункции митохондриальными антиоксидантами, что создает перспективы для использования этих соединений в целях терапии нарушений микроциркуляции при самых разных патологических состояниях (септическом шоке, диабете, коагулопатиях и т.д.) [Fink et al., 2009; Fink et al., 2012; Mackenzie et al., 2013; Gioscia-Ryan et al., 2014; Galkin et al., 2014]. Наконец, существует работа, в которой было показано, что MitoQ восстанавливает физиологический ответ сосудов на нитроглицерин, нарушенный содержанием животных на диете с повышенным количеством поваренной соли [Ma et al., 2014].

### 1.4.6 Старение и возраст-зависимые изменения тканей и органов

Старение, безусловно, не является элементарным общепатологическим процессом. Более того, оно представляет собой настолько сложное явление, что в нем невозможно провести грань между физиологическими и патологическими изменениями. Разные авторы квалифицируют старение и как болезнь, и как физиологический этап онтогенеза [Дильман, 1987; Анисимов, 2008]. Однако, независимо от квалификации этого процесса, не вызывает возражений утверждение, что именно со старением связано развитие большого числа заболеваний, получивших название возраст-зависимых патологий, а патогенез и морфологические проявления этих болезней охватывают почти весь спектр известных общепатологических процессов [Давыдовский, 1966]. Учитывая многообразие данных, (представленных в предыдущих разделах), которые позволяют думать о возможности влияния митохондриальных антиоксидантов в той или иной мере практически на все основные группы общепатологических процессов, целесообразно рассмотреть вопрос о том, каковы могут быть эффекты этих препаратов на старение и связанные с ним болезненные изменения в органах и тканях. Эта задача особенно оправдана тем, что замедление процессов старения

было одной из изначальных целей, которые преследовались при создании митохондриально-направленных антиоксидантов [Skulachev, 2007; Skulachev et al., 2011].

Теоретической основой для применения антиоксидантов с целью влияния на возрастные изменения в организме послужила выдвинутая Д.Харманом в 50-е годы свободнорадикальная теория старения [Harman, 1956; Harman, 1972; Harman, 1992], в дальнейшем развитая самим автором и его многочисленными последователями [Barja, 1999; Wei, 1998; Schriner et al., 2005; Cui et al., 2012; Gruber et al., 2013]. Однако, применение традиционных антиоксидантов, таких, как витамин Е или аскорбиновая кислота в экспериментальных условиях показали только небольшое увеличение продолжительности жизни лабораторных животных [ААнисимов, 2008; Carocho, Ferreira, 2013]. Имеются и некоторые другие данные, ограничивающие роль свободнорадикальных процессов в развитии старения и возрастной патологии [Halliwell, 2006; Halliwell, 2007; Speakman, Selman, 2011].

На основании предположения, что старение представляет собой один из вариантов программируемой гибели организма, реализуемой через апоптотические процессы в органах и тканях, вызываемые постоянной генерацией митохондриями определенного уровня АФК, было предложено использовать митохондриальные антиоксиданты как направленное средство против старения, прерывающее этот сигнальный путь, причем более эффективно, чем обычные антиоксидантные препараты [Скулачев, 2009; Skulachev, 2009; Skulachev et al., 2009; Skulachev, 2012].

Оценка влияния любых препаратов, действующих на старение и возрастные изменения (геропротекторов) может быть выполнена по нескольким параметрам. Во-первых, может быть оценен такой интегральный показатель, как продолжительность жизни животных – средняя, медианная, максимальная и т.д. [Анисимов, 2008, Гаврилов, Гаврилова, 1991]. Во-вторых, оценке подлежат те спонтанные анатомические, гистологические (гистопатологические), ультраструктурные, биохимические, экспрессионные и физиологические

изменения, которые закономерно развиваются с возрастом [Анисимов, 2008]. Наконец, можно оценить влияние препаратов на экспериментальные модели болезней, о которых известно, что частота их повышается с возрастом и которые встречаются с наибольшей частотой у старых индивидуумов (сахарного диабета второго типа, атеросклероза, болезни Альцгеймера и т.д.). Все три подхода дают в равной степени важную информацию, необходимую для всесторонней и комплексной оценки влияния выбранного препарата на старение и возможности его использования как геропротектора.

Было опубликовано несколько сообщений о результатах испытания митохондриально-направленных антиоксидантов на продолжительность жизни разнообразных организмов. В частности, было установлено, что SkQ1 в чрезвычайно низких (наномолярных и субнаномолярных) концентрациях увеличивает продолжительность жизни грибов (*Podospora anserina*), ракообразных (*Ceriodaphnia affinis*), и насекомых (*Drosophila melanogaster*). [Skulachev, 2007; Skulachev et al., 2009; Krementsova et al., 2012], а MitoQ – трансгенных *Caenorhabditis elegans*, служащих своеобразной моделью болезни Альцгеймера и *Drosophila melanogaster* с дефицитом супероксиддисмутазы (но не влияет на животных дикого типа) [Magwere et al., 2006; Dai et al., 2014; Ng et al., 2014]. Относительно млекопитающих имеются весьма ограниченные данные о том, что SkQ1 способен увеличивать среднюю продолжительность жизни самок мышей трех линий – инбредных 129/sv, C57BL, аутбредной SHR и трансгенной *her2/neo* [Юрова и соавт., 2011]. Важно отметить, что, хотя в последней работе нет подробной характеристики результатов патоморфологических исследований трупов павших животных, приведенные в ней данные показывают, что препарат не оказывает влияния ни на частоту опухолей, ни на их органный спектр. Исследования влияния митохондриально-направленных антиоксидантов на самцов лабораторных грызунов не опубликованы. Интересно отметить, что существуют параллели между эффектами SkQ1 и ограничения питания на продолжительность жизни, при этом причина такого сходства пока не расшифрована [Skulachev, 2011].

Работ по исследованию действия митохондриально-направленных антиоксидантов на возрастные, в том числе и патологические изменения в организме было выполнено довольно много и большая часть из них была нами уже упомянута раньше в связи с обсуждением эффектов препаратов, оказываемых на разные типы общепатологических процессов, лежащих в основе этих изменений. В ряде работ были исследованы крысы линии OXYS, в которых повышенный уровень АФК приводит к развитию преждевременного старения (прогерии). Было показано, что добавление к пище очень малых доз SkQ1 (50 нмоль/кг х день) предотвращало связанные с возрастом: (а) развитие катаракты и ретинопатий в глазах, (б) атрофические процессы в скелетных мышцах (саркопению), перекисное окисления липидов и карбонилирование белков в скелетных мышцах и (в) снижение минерализации костей (остеопороз) [Vays et al., 2014; Saprunova et al., 2010; Saprunova et al., 2012; Skulachev et al., 2011; Neroev et al., 2008]. Из других биохимических изменений известно влияние SkQ1 на содержание триптофана и кинуренина в хрусталике [Snytnikova et al., 2012], уровень 17β-эстрадиола и NO [Chistyakov et al., 2010; Chistyakov et al., 2012], тестостерона, дегидроэпиандростерона, гормона роста, инсулин-подобного фактора роста в плазме крови [Kolosova et al., 2012], окисление кардиолипина митохондрий [Skulachev et al., 2010], экспрессию генов цитокинов VEGF и PEDF в сетчатке [Markovets et al., 2011]. Интересно, что изучение другого митохондриального антиоксиданта - MitoQ – показало, что он не оказывает влияния на глобальную экспрессию генов в органах [Rodriguez-Cuenca et al., 2010] а сравнение N-ацетилцистеина и SkQ1выявило, что только последний обладает способностью влиять на возрастные изменения половых гормонов и ростовых факторов в крови самцов крыс [Kolosova et al., 2012].

Значительные возрастные изменения у человека и животных происходят в органах кроветворения и иммуногенеза. Были опубликованы результаты, свидетельствующие о том, что пожизненное добавление мышам SkQ1 в питьевую воду не влияет на гемопоэтические стволовые клетки и более дифференцированные гемопоэтические предшественники, но значительно

замедляет возрастные изменения в периферической крови [Shipounova et al., 2010]. В течение первых 13 месяцев, SkQ1 (0,9 или 28,8 нмоль/кг в сутки) предотвращает возрастной миелоидный сдвиг (увеличение доли гранулоцитов и снижение доли лимфоцитов) у мышей. В течение следующего года эффект исчезает, и гемограмма получавших препарат 2-летних мышей не отличается от контроля. Число мезенхимальных стволовых клеток в костном мозге не меняется в течение 2 лет введения SkQ1, однако концентрация этих клеток в потомстве колониеобразующих единиц фибробластов (КОЕ-Ф) растет с увеличением дозы SkQ1. Концентрация КОЕ-Ф после 1 и 2 лет введения SkQ1 была в два раза выше, чем у молодых мышей. Помимо этого, было показано, что SkQ1 предотвращает развитие самого известного маркера возрастных изменений в гематопоэтической системе – инволюции тимуса [Obukhova et al., 2009].

Известно, что старение часто сопровождается нарушениями различных функций центральной нервной системы, в частности, встречающимися у пожилых людей болезнями Альцгеймера и Паркинсона в развитии которых большую роль отводят митохондриальным АФК [Reddy, 2006, Armstrong, 2008]. Оказалось, что митохондриальные антиоксиданты способны предотвращать развитие подобных нарушений. Было исследовано [Stefanova et al., 2010] влияние SkQ1 (250 нмоль SkQ1/кг х сутки во время еды) на поведение в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» и в тесте «Открытое поле», а также на пространственную память в тесте «водный лабиринт Морриса» (ВЛМ) крыс среднего возраста (12 мес.) линии Вистар и линии OXYS с ускоренным темпом старения. У 14-месячных, а также 3-месячных крыс линии OXYS по сравнению с крысами линии Вистар значительно снизились показатели активности в тесте «Открытое поле», замечена повышенная тревожность в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт», и проявилось ослабление способности к обучению в тесте ВЛМ. Крысы обеих линий, обработанные SkQ1, проявляли значительно более высокую двигательную и поисковую активности в тесте «Открытое поле» и меньшее беспокойство в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» по сравнению со схожими по возрасту крысами контрольной группы. Крысы линии

Вистар, обработанные SkQ1, выявили ослабление способности к обучению в тесте ВЛМ в сравнении с контрольной группой. Таким образом, SkQ1 оказывал благоприятное воздействие на двигательную и поисковую функции головного мозга крыс. Тем не менее, SkQ1 не изменял способность к обучению, проявленную крысами линии OXYS в тесте ВЛМ и немного уменьшал эту способность у крыс линии Вистар, что может быть связано с различиями в окислительно-восстановительном гомеостазе. В другой работе [Amstislavskaya et al., 2010] изучили действие митохондриально-ориентированного антиоксиданта, SkQ1, на сексуальную мотивацию у самцов 12-месячных крыс линии Вистар и самцов крыс линии OXYS с ускоренным темпом старения. При наличии сексуального стимула, различий между 4- и 12-месячными самцами крыс линии Вистар обнаружено не было; однако 12-месячные самцы крыс линии OXYS продемонстрировали боле низкую склонность к сексуальной мотивации по сравнению с 4-месячными крысами линии OXYS и 12-месячными крысами линии Вистар. Авторы изучили действие SkQ1 на сексуальную мотивацию самцов крыс 12-месячного возраста при продолжительном приеме, начиная с 1,5-месячного возраста (10, 50 или 250 нмоль/кг в сутки), 45-дневное введение SkQ1, начиная с 10,5-месячного возраста (50 нмоль/кг), и 3-месячное введение препарата, начиная с 9-месячного возраста (250 нмоль/кг). SkQ1 не влияли на двигательную активность, однако, SkQ1 увеличивал время, проведенное у перегородки. Значительно более высокая степень мотивационной стадии сексуального поведения проявилась у крыс линии OXYS после длительного превентивного воздействия SkQ1 в дозировке 50 и 250 нмоль/кг. Продолжительное терапевтическое введение препарата крысам линии OXYS с ускоренным темпом старения в течение 3 месяцев в дозировке 250 нмоль/кг также оказалось эффективным. Другим свидетельством нейропротекторного действия SkQ1 при старении является информация о том, что SkQ1 способен замедлять развитие Альцгеймер-подобных поражений у крыс [Isaev et al., 2013; Stefanova et al., 2014]. MitoQ также оказался способен уменьшать развитие изменений, возникающих при болезнях Альцгеймера и Паркинсона в различных экспериментальных

моделях [Manczak et al., 2010; McManus et al., 2011; Solesio et al., 2013], хотя попытки его применения в клинике против болезни Паркинсона окончились безуспешно [Snow et al., 2010]. Было высказано предположение, что эффекты митохондриальных антиоксидантов при болезни Альцгеймера связаны с их способностью предотвращать гиперфосфорилирование белка тау, при котором в качестве посредника могут выступать индуцированные бета-амилоидом митохондриальные АФК [Skulachev et al., 2011, Skulachev, 2012].

Из других эффектов митохондриальных антиоксидантов, оказываемых на изменения, связанные со старением, следует упомянуть способность MitoQ снижать выраженность возрастной дисфункции эндотелия [Gioscia-Ryan et al., 2014], тормозить укорочение теломер [Saretzki et al., 2003], а SkQ1 – повышать репродукцию (у плодовых мушек) [Tsybul'ko et al., 2010], снижать частоту хромосомных аберраций [Chistyakov et al., 2010] и каким-то пока не известным путем обеспечивать выживание организма при нарушениях гомеостаза, способных вызвать смерть [Zorov et al., 2012].

Помимо собственно возрастных изменений, с точки зрения геронтологии и геропротекции имеет определенное значение влияние митохондриально-направленных антиоксидантов на заболевания, которые часто развиваются у пожилых людей, хотя их и нельзя отнести к числу непосредственных признаков старения, поскольку они могут быть и у молодых субъектов с определенными генетическими дефектами или развиваться при действии некоторых факторов внешней среды. Это злокачественные новообразования, амилоидоз, сахарный диабет 2-го типа (инсулиновая резистентность тканей), атеросклероз, артериальная гипертензия (гипертоническая болезнь) [Анисимов, 2008]. О злокачественных новообразованиях уже шла речь в разделе, посвященном опухолевому росту (1.4.4), об осложнениях атеросклероза, в основе которых лежат ишемия-реперфузия и другие формы альтерации – в разделе 1.4.1, о влиянии митохондриальных антиоксидантов на некоторые последствия гипертонии (гипертрофия миокарда) и диабетической гипергликемии (фиброз клубочков почек) – в разделе о компенсаторно-приспособительных процессах

(1.4.3), поэтому здесь можно ограничится небольшими добавлениями, касающимися диабета и атеросклероза. Существует большая литература, посвященная роли окислительного стресса в патогенеза атеросклероза, диабета и их осложнений [Зенков и соавт., 2001; Kashiwagi, 2001; Van Reyk et al., 2003; Merzonk et al., 2003; Ланкин и соавт., 2005; Mackenzie et al., 2013; Jain et al., 2014; Wang et al., 2014] и ряд сообщений о позитивных эффектах традиционных антиоксидантов при этих заболеваниях [Балаболкин и соавт., 2003; Rajendran, 2014]. Что касается митохондриальных антиоксидантов, то данные на этот счет ограничиваются единичными сообщениями. В частности, было обнаружено, что MitoQ способен уменьшать выраженность биохимических маркеров у животных с генетически-обусловленным метаболическим синдромом (который, как известно, служит фоном для развития атеросклероза и диабета второго типа) или метаболическим синдромом, вызванным жирной диетой, причем значительно эффективнее, чем такие препараты, как апоцинин и аллопуринол [Mercer et al., 2012; Feillet-Coudray et al., 2014]. В то же время, с помощью SkQ1 не удалось повлиять на уровень толерантности к глюкозе, состояние митохондрий и инсулин-зависимых сигнальных путей в мышечной ткани у мышей с индуцированной инсулинорезистентностью [Paglialunga et al., 2012].

### 1.4.7 Эффекты митохондриальных антиоксидантов: общий взгляд на состояние проблемы

Рассмотренный здесь большой литературный материал может быть основанием для нескольких определенных обобщающих утверждений.

Свободно-радикальные механизмы, в том числе с участием АФК, являются одной из главных тем, когда речь идет о патогенезе разнообразных заболеваний. Большое количество данных, накопленных за полвека с момента появления теории D. A. Harman [Harman, 1956], свидетельствует о колоссальном внимании исследователей к роли окислительных повреждений разнообразных макромолекул в развитии различных заболеваний и лежащих в их основе

общепатологических процессов. Источником свободных радикалов в этих ситуациях выступают как патологические реакции, вызванные повреждающими агентами (например, ионизирующим излучением), так и процессы, изначально предназначенные для вполне физиологических функций (такие, как генерация гидроксил-аниона при фагоцитозе). Согласно многим исследованиям, митохондрии вносят значительный вклад в развитие окислительного стресса при различных состояниях, прежде всего при ишемии с последующей реперфузией, хотя точная оценка этого вклада наталкивается на большие технические трудности. Тем не менее, имеются определенные основания для того, чтобы считать митохондрии одной из важнейших мишеней для направленной антиоксидантной терапии. В настоящее время создано целое семейство соединений, способных проникать в митохондрии и доставлять в них антиоксидантные компоненты. Ряд тестов, проведенных на системах *in vitro,* показал, что одним из самых перспективных по многим параметрам соединений является SkQ1 и его аналоги. Многочисленные испытания на моделях различных заболеваний обнаружили ряд позитивных эффектов, которые суммированы в таблице 3. Между тем, нельзя не заметить, что перечень процессов и состояний,

Таблица 3 – Важнейшие заболевания и состояния, при которых известна или предполагается патогенетическая роль АФК [Halliwell, 1987; Halliwell, Gutteridge, 1990; Aruoma et al., 1991; Harman, 1992; Martínez-Cayuela, 1995], лежащие в основе их развития общепатологические процессы и данные об эффективности митохондриально-направленных антиоксидантов в экспериментальных или в клинических исследованиях

| Заболевание | Основной тип (основные типы) общепатологических процессов | Эффективность митохондриально-направленных антиоксидантов |
|---|---|---|
| *Токсические повреждения* | | |
| Поражения, вызванные токсическими газами ($NO_2$, $SO_2$, $O_3$) | Альтерация | Не исследована |
| Поражения, вызванные компонентами табачного дыма | Альтерация | Не исследована |
| Токсические эффекты параквата | Альтерация | Не исследована |
| Токсические эффекты пероральных препаратов железа | Альтерация | Не исследована |
| Токсические эффекты гиперецина и других фотосенсебилизаторов | Альтерация | Не исследована |
| Токсические эффекты гипероксии | Альтерация | Не исследована |

*Продолжение таблицы 3*

| Заболевание | Основной тип (основные типы) общепатологических процессов | Эффективность митохондриально-направленных антиоксидантов |
|---|---|---|
| Токсические эффекты алкоголя (в том числе алкоголизм, алкоголь-индуцированная перегрузка железом, алкогольные миопатия и кардиомиопатия) | Альтерация | Показана в отношении экспериментального алкогольного жирового гепатоза |
| Токсические эффекты нестероидных противовоспалительных препаратов на желудочно-кишечный тракт | Альтерация | Не исследована |
| Токсические эффекты примахина и других подобных веществ (фавизм) | Альтерация | Не исследована |
| Токсические эффекты адриамицина, блеомицина и некоторых других цитостатиков | Альтерация | Показана в отношении кардиомиопатии, вызванной адриамицином и цисплатиновой нефропатии |
| Токсические эффекты тяжелых металлов (Pb, Cd, Hg) | Альтерация | Не исследована |
| Нефро- и ототоксические эффекты аминогликозидов (гентамицина) | Альтерация | Показана |
| Эффекты нейротоксинов | Альтерация | Не исследована |
| Диабетогенное действие аллоксана (индукция диабета 1-го типа) | Альтерация | Не исследована |
| Токсическая дистрофия печени, вызванная четыреххлористым углеродом | Альтерация | Не исследована |
| Поражения печени, вызванные липополисахаридами бактерий | Альтерация | Показана |
| Токсические эффекты фенилгидразина | Альтерация | Не исследована |
| Нефропатия, вызванная рабдомиолизом | | Показана (снижение смертности при отсутствии влияния на показатели функции почек) |
| Диабетическая нефропатия | Альтерация, компенсаторно-приспособительные процессы (фиброз) | Показана |
| Повреждения органов, вызванные их функциональной перегрузкой | Альтерация | Показано в отношении апоптоза в миокарде, индуцированного объемной перегрузкой и повреждения хряща, вызванного избыточным механическим воздействием |
| *Инфекционно-воспалительные поражения, в том числе аутоиммунные болезни* | | |
| Синдром системного воспаления (в том числе и сепсис) | Воспаление, альтерация | Показана в отношении функциональных и биохимических изменений, вызванных бактериальным липополисахаридом |

*Продолжение таблицы 3*

| Заболевание | Основной тип (основные типы) общепатологических процессов | Эффективность митохондриально-направленных антиоксидантов |
|---|---|---|
| Гломерулонефриты (в том числе мембранозные и идиопатические) | Иммунопатологические процессы, воспаление, компенсаторно-приспособительные процессы (фиброз) | Не исследована |
| Васкулиты (в том числе индуцированные лекарствами и вирусами, такими, как вирус гепатита В) | Иммунопатологические процессы, воспаление, альтерация, компенсаторно-приспособительные процессы (фиброз) | Не исследована |
| Аутоиммунные заболевания (в том числе системная красная волчанка, аутоиммунные васкулиты, дерматомиозиты, миастения, гастриты и нефротические синдромы) | Иммунопатологические процессы воспаление, альтерация, компенсаторно-приспособительные процессы (фиброз) | Не показана |
| Ревматоидный артрит | Иммунопатологические процессы, воспаление, альтерация | Не исследована |
| Панкреатит | Воспаление, альтерация | Не исследована |
| ВИЧ-инфекция (некоторые формы) | Иммунопатологические процессы, воспаление, альтерация | Не исследована |
| Аллергический энцефаломиелит | Иммунопатологические процессы, воспаление, альтерация | Не исследована |
| Рассеянный склероз | Иммунопатологические процессы, воспаление, альтерация | Не исследована |
| Малярия | Альтерация | Не показана |
| Контактный дерматит | Иммунопатологические процессы, воспаление, альтерация | Не исследована |
| Пневмокониоз | Воспаление, компенсаторно-приспособительные процессы (фиброз) | Не исследована |
| Язвенный колит | Иммунопатологические процессы воспаление, альтерация | Показана на модели колита, индуцированного декстраном |
| *Дисрегенераторные и атрофические процессы* | | |
| Анемия Фанкони | Альтерация, компенсаторно-приспособительные процессы (атрофия) | Не исследована |
| Бронхопульмональная дисплазия | Компенсаторно-приспособительные процессы (патологическая регенерация) | Не исследована |
| Эмфизема легких | Альтерация, компенсаторно-приспособительные процессы (атрофия) | Не исследована |
| Мышечная дистрофия | Альтерация, компенсаторно-приспособительные процессы (атрофия) | Показана в отношении возрастной саркопении |
| Цирроз печени разного происхождения | Альтерация (воспаление, иммунопатологические процессы) компенсаторно-приспособительные процессы (атрофия) | Не исследована |

*Продолжение таблицы 3*

| Заболевание | Основной тип (основные типы) общепатологических процессов | Эффективность митохондриально-направленных антиоксидантов |
|---|---|---|
| Ретинопатии разного генеза (в том числе фоторетинопатия) | Альтерация, компенсаторно-приспособительные процессы (атрофия) | Показана в отношении фоторетинопатии, врожденной ретинопатии у генетически измененных мышей и возрастной ретинопатии |
| Ретролентальная фиброплазия | Альтерация, компенсаторно-приспособительные процессы (атрофия, фиброз) | Не исследована |
| Катаракта | Альтерация | Показана |
| Глаукома | Альтерация | Показана |
| *Метаболические нарушения* | | |
| Идиопатический гемохроматоз | Альтерация | Не исследована |
| Талассемия и другие хронические анемии, особенно лечение множественными гемотрансфузиями (с развитием гемохроматоза и гемосидероза) | Альтерация | Не исследована |
| Алиментарная недостаточность (квашиоркор) | Альтерация | Не исследована |
| Поражения, связанные с дефицитом селена | Альтерация | Не исследована |
| Поражения, связанные с дефицитом витамина Е | Альтерация | Не исследована |
| Порфирия | Альтерация | Не исследована |
| Подагра | Воспаление | Не исследована |
| Амилоидоз | Альтерация | Не исследована |
| Старение и ассоциированные с ним метаболические изменения и заболевания, включая и случаи преждевременного старения | Альтерация, воспаление, иммунопатологические и компенсаторно-приспособительные процессы (все типы включая возрастную атрофию ряда органов), нарушения кровообращения, опухолевый рост | Показана на нескольких модельных объектах, особенно в отношении саркопении, ретинопатии, остеопороза и инволюции тимуса у ускоренно стареющих крыс OXYS |
| Болезнь Альцгеймера | Альтерация, компенсаторно-приспособительные процессы (атрофия) | Показана на разных моделях |
| Болезнь Паркинсона | Альтерация, компенсаторно-приспособительные процессы (атрофия) | Показана в эксперименте, не подтверждена в клинических исследованиях |
| Боковой амиотрофический склероз | Альтерация, компенсаторно-приспособительные процессы (атрофия) | Показана |
| Атеросклероз | Альтерация, воспаление, компенсаторно-приспособительные процессы (фиброз), нарушения кровообращения | Не исследована |
| Гипертрофия миокарда, связанная с артериальной гипертензией | Компенсаторно-приспособительные процессы (фиброз, гипертрофия) | Показана |

*Окончание таблицы 3*

| Заболевание | Основной тип (основные типы) общепатологических процессов | Эффективность митохондриально-направленных антиоксидантов |
|---|---|---|
| Липофусциноз | Альтерация | Показана для пигментного эпителия глаза при старении |
| *Злокачественные и доброкачественные новообразования* | Опухолевый рост | Показано в отношении химического канцерогенеза в мягких тканях и спонтанного канцерогенеза у животных с нокаутным геном белка p53; неоднозначно влияние на рост ксенографтов опухолей и отсутствие достаточных данных о влиянии на спонтанный канцерогенез у лабораторных животных из линий без генетических модификаций |
| *Ишемические, гипоксические и реперфузионные поражения* | | |
| Ишемический инсульт | Альтерация | Показана (уменьшение зоны инфаркта) |
| Инфаркт миокарда | Альтерация | Показана |
| Инфаркт почки | Альтерация | Показана (снижение смертности при отсутствии влияния на показатели функции почек) |
| Ишемическое повреждение печени | Альтерация | Показана |
| Ишемическое повреждение мочевого пузыря при острой задержке мочи | Альтерация | Показана в отношении функциональных нарушений этого органа в эксперименте |
| Изменения, возникающие в трансплантированных органах | Альтерация | Показана для трансплантантов почек и печени |
| Дисбарический остеонекроз | Альтерация | Не исследована |
| Контрактура Дюпюитрена | Компенсаторно-приспособительные процессы (фиброз) | Не исследована |
| *Аритмии и другие функциональные нарушения миокарда* | Нарушения кровообращения | Показана для аритмии, вызванной адреналином и для функциональных нарушений миокарда, индуцированных кокаином, объемной перегрузкой, бактериальным эндотоксином |
| *Респираторный дистресс-синдром взрослых* | Альтерация, нарушения кровообращения | Не исследована |
| *Механические травматические повреждения и процессы регенерации после них (включая дисрегенераторные процессы, сопровождающие различные общие и местные заболевания)* | Альтерация, воспаление, компенсаторно-приспособительные процессы | Показан эффект на заживление ран, а также на восстановление функций мозга после механической травмы |
| *Термические повреждения (ожоги и обморожения)* | Альтерация, воспаление, компенсаторно-приспособительные процессы | Не исследована |
| *Радиационные поражения (в том числе ультрафиолетовым и солнечным светом)* | Альтерация, воспаление, компенсаторно-приспособительные процессы | Показана в отношении лучевой тромбоцитопении |

выбранный для исследования эффектов митохондриально-направленных антиоксидантов, в значительной степени обусловлен комбинаторикой и перебором ситуаций, для которых известна или предполагается некая роль АФК, а учет эффективности, как видно из всего предыдущего обзора, в основном велся по довольно разнородным показателям, часто очень общим и неспецифичным, а иногда и произвольно выбранным авторами в соответствии с их представлениями о патогенезе определенного заболевания. В ряде случаев это сильно затрудняло простое сопоставление результатов разных исследований даже для одной и той же нозологической формы, и тем более делало невозможным как-то обобщить полученную информацию вне рамок конкретных моделей определенных нозологических единиц. Одним из выходов был бы анализ этих данных с точки зрения общепатологических процессов, которые позволяют анализировать и экстраполировать данные, полученные на моделях различных заболеваний. Однако, как видно из таблицы 3, в большом числе случаев проявления заболевания связаны с реализацией нескольких типов общепатологических процессов, а, поскольку специальное внимание на это не обращалось, то и данные этих исследований для названного анализа часто оказываются совершенно недостаточными. Более того, по этой причине ряд форм общепатологических процессов просто не был исследован в ходе упомянутых выше работ. Таким образом, специальное исследование влияния митохондриальных антиоксидантов вообще и SkQ1 в частности на общепатологические процессы является одним из необходимых элементов теоретической базы, которая бы послужила для анализа эффектов препаратов этой группы. Другим важным аспектом являются некоторые, пока немногочисленные данные о возможных эффектах SkQ1, напрямую не связанных с его антиоксидантной активностью, в частности, его влияние на экспрессию рецепторов, ответственных за активацию эндотелия при воспалении. Между тем, как раз данных о действии этого соединения на разные типы воспалительной реакции крайне мало, и это может служить еще одним аргументом в пользу того, что изучение влияния препарата на течение общепатологических реакций никак не может быть заменено только

тестированием его на патологиях, предполагаемых его основным биохимическим действием. Не исключено, что именно эти эффекты могут оказаться более важными, чем те, которые ожидались от лекарственной субстанции сообразно с изначальными представлениями о ее действии на биологические системы. Наконец, вещество, имеющее столь большое число эффектов, потенциально важных для клиники, не может быть тестировано в клинических испытаниях без данных о вызываемых им в разных дозах и при разных путях введения токсикопатологических изменениях в органах и тканях. Все эти вопросы могут быть разрешены только путем специальных целенаправленных исследований.

# ГЛАВА 2.

# МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

## 2.1 Испытуемые вещества (SkQ)

SkQ1 (10-(6′-пластохинонил)децилтрифенил-фосфоний, окисленная и восстановленная формы) и SkQR1 (10-(6′-пластохинонил) децилродамин 19) были синтезированы согласно опубликованному протоколу (Antonenko et al., 2008) в Институте митоинженерии МГУ им. М.В. Ломоносова. Для сохранения вещества в восстановленной форме и предотвращения его окисления кислородом воздуха оно смешивалось с аскорбиновой кислотой в соотношении 1:3. Эта форма употреблялась только в эксперименте с токсической дистрофией печени.

## 2.2 Животные

Мыши линии BALB/c. Для тестирования влияния SkQ1 на продолжительность жизни и спонтанную патологию у мышей BALB/c были использованы 298 самок (контрольная группа – 98 мышей, группа «1 нмоль/кг/сутки SkQ1» - 97 мышей, группа «30 нмоль/кг/сутки SkQ1» - 103 мыши) и 138 самцов (контрольная группа – 43 мыши, «1 нмоль/кг/сутки SkQ1» - 51 мышь, группа «30 нмоль/кг/сутки SkQ1» - 44 мыши), свободных от специфической патогенной микрофлоры (SPF-статус, *питомник НПО «Пущино»*). Животных содержали в условиях SPF-вивария Института биоорганической химии (ИБХ) им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН до естественной гибели. Содержание мышей осуществляли при температуре +22$^{o}$C, на стандартной диете, воду и корм животные получали *ad libitum*. SkQ1 животные получали с питьевой водой на протяжении всей жизни в дозах 1 и 30 нмоль/кг в сутки (кроме того, животные были рождены от самок, получавших эту воду на протяжении всего срока беременности). Воду меняли каждые 3 дня, препарат добавляли в концентрации, рассчитанной исходя из суточного потребления питьевой воды с регулярными поправками на вес животных. Этот режим был выбран на основании предварительных исследований стабильности препарата в питьевой воде, содержащейся в поилках для

лабораторных животных. Всех павших мышей подвергали обязательной некропсии, однако, для анализа частот и спектра спонтанных новообразований учитывали только животных, доживших до времени появления опухолей и трупы которых были достаточно сохранны для макроскопической и микроскопической диагностики. Такой материал составляли 186 самок и 105 самцов, из которых в контрольной группе было 62 самки и 30 самцов, в группе «1 нмоль/кг/сутки SkQ1» – 59 самок и 39 самцов и в группе «1 нмоль/кг/сутки SkQ1» – 65 самок и 36 самцов. Во время некропсии обязательно регистрировали все найденные изменения и определяли массу сердца, печени, легких, почек, селезенки, мозга. Для гистологического исследования во всех случаях обязательно забирали головной мозг, сердце, печень, селезенку, мезентериальный лимфатический узел, обе почки (с надпочечниками), фрагмент средней доли печени, легкие и все органы, в которых были видны макроскопические изменения. Кроме того, восемь специальных групп самок были подвергнуты эвтаназии (ингаляцией $CO_2$) с целью получения адекватного материала для морфометрического и молекулярно-биологического анализа изменений, возникающих при развитии возрастных гипертрофии и фиброза миокарда:

1) три группы (контрольная, 1 нмоль/кг SkQ1 в сутки, 30 нмоль/кг SkQ1 в сутки), каждая из которых включала в себя 7 животных в возрасте 14 месяцев для исследования профиля экспрессии генов в миокарде;

2) три группы (контрольная, 1 нмоль/кг SkQ1 в сутки, 30 нмоль/кг SkQ1 в сутки), каждая из которых состояла из 14 или 15 животных в возрасте 24 месяцев, для выполнения морфологического и морфометрического исследования сердца;

3) две группы молодых контрольных животных (в возрасте 3 месяцев): одна, состоящая из 7 мышей (для исследования экспрессии генов) и другая из 15 мышей (для морфометрических исследований сердца). У всех животных на момент эвтаназии отсутствовали любые признаки инфекционных и инвазивных поражений.

Кроме того, 60 мышей-самцов двухмесячного возраста, приобретенных в питомнике НПО «Пущино», содержавшихся в условиях SPF-вивария НИИ

митоинженерии МГУ им. М.В. Ломоносова, были использованы в эксперименте по исследованию влияния SkQ1 на цитостатическое поражение семенников (см. *2.5*).

Мыши линии C57BL. Мыши C57BL/6 содержались в виварии SPF-статуса (Wenner-Gren Institute, Stockholm University, Stockholm). Содержание мышей осуществляли при температуре +22$^{o}$C, на стандартной диете, воду и корм они получали *ad libitum*. Животные получали с питьевой водой 1400 нмоль/кг SkQ1 в сутки на протяжении всей жизни, начиная с возраста 14-16 недель. 17 контрольных мышей (9 самцов и 8 самок) и 17 мышей, получавших препарат (7 самцов и 10 самок) были подвергнуты эвтаназии (ингаляцией $CO_2$) в соответствии с этическими требованиями по причине тяжелого морбидного статуса (согласно заключению ветеринарного врача) и подвергнуты некропсии и гистопатологическому исследованию. Во время некропсии обязательно регистрировали все найденные изменения. Для гистологического исследования во всех случаях обязательно забирали головной мозг, сердце, печень, селезенку, мезентериальный лимфатический узел, обе почки (с надпочечниками), поджелудочную железу, икроножную мышцу, половые органы, кожу, желудок, тонкий и толстый кишечник, фрагмент средней доли печени, легкие и все органы, в которых были видны макроскопические изменения. Помимо этого, мыши-самки данной линии числом 91, трехмесячного возраста, приобретенные в питомнике НПО «Пущино», содержавшиеся в условиях SPF-вивария НИИ митоинженерии МГУ им. М.В. Ломоносова, были использованы в эксперименте по исследованию влияния SkQ1 на острую токсическую дистрофию печени (см. *2.5*).

Мыши-гибриды F1(CBAxC57Bl/6). Изучение влияния перорального введения SkQ1 на регенерацию тканей в ране кожи у старых животных было проведено на самках гибридов F1(CBAxC57Bl/6) (34 особи). Работа была выполнена в не-SPF-условиях вивария МГУ. Экспериментальная группа (10 животных) состояла из мышей, имеющих возраст 2 года (24 месяца), получавших для питья воду, содержавшую SkQ1. Испытуемое вещество вводили мышам по достижении ими возраста 16 месяцев и до окончания эксперимента. Расчетная доза получаемого с

водой испытуемого вещества составляла 100 нмоль/кг в сутки. Контрольная группа мышей (12 особей) была составлена из животных того же возраста, которым SkQ1 не вводился. Еще одна группа была представлена молодыми мышами (возраст - 6 месяцев), не получавшими препарат. Все животные использовались в эксперименте с нанесением ран кожи.

Мыши линии C57BLKS-Leprdb/J (db/db). Тестирование эффекта перорального введения SkQ1 на регенерацию поврежденных тканей кожи при экспериментальном сахарном диабете (II типа) было выполнено на самцах C57BLKS-Leprdb/J (db/db) (22 мыши). Эти мыши имеют в геноме рецессивную мутацию в гене рецептора лептина (db), следствием чего служат возникающие у них тяжелые нарушения метаболизма углеводов и жиров. У гомозигот (db/db) уже на пятой неделе жизни наблюдается самопроизвольное развитие ожирения, биохимических и морфологических изменений, соответствующих сахарному диабету II типа. Гетерозиготные животные (db/+) подобных нарушений не имеют [Srinivasan, Ramaro, 2007]. Эксперимент был осуществлен в не-SPF-условиях вивария МГУ. Опытная группа (8 особей) состояла из мутантных гомозигот (db/db), имеющих возраст 21 неделю. Испытуемое вещество начинали вводить мышам по достижении ими возраста 10 недель и продолжали введение до завершения эксперимента: животным один раз в сутки вводили в ротовую полость SkQ1 в виде раствора в 20% глицерине. Вводимый объем раствора соответствовал суточной дозе испытуемого вещества 250 нмоль/кг массы тела. Контрольная группа (9 мышей) была составлена из гомозиготных мутантных особей (db/db), которым вводили глицерин без SkQ1 в таком же объеме, что и мышам из опытной группы. Еще одна группа (5 особей) была представлена гетерозиготными мышами (db/+), также получавшими только глицерин. Все животные использовались в эксперименте с нанесением ран кожи.

SOD1-трансгенные мыши B6SJL-Tg(SOD1-G93A)dl1Gur/J. Животных содержали в условиях SPF-вивария Института митоинженерии МГУ им. М.В.Ломоносова до естественной гибели. Содержание мышей осуществляли при температуре +22$^{o}$C, на стандартной диете, воду и корм животные получали *ad libitum*. Из них были

сформированы следующие группы: 1) контроль (12 самцов+10 самок); 2) мыши (10 самцов +10 самок), получавшие SkQ1 в дозе 50 нмоль/кг с возраста 140 суток в воде для питья; 3) мыши (10 самцов+10 самок), получавшие SkQ1в дозе 250 нмоль/кг с возраста 140 суток в воде для питья; 4) мыши (12 самцов+10 самок), получавшие SkQ1 в дозе 1250 нмоль/кг с возраста 140 суток в воде для питья. Животных содержали до их естественной гибели. Во время некропсии обязательно регистрировали все найденные изменения и определяли массу стандартного набора органов (сердца, печени, легких, почек, селезенки, мозга). Для гистологического исследования во всех случаях обязательно забирали головной мозг, сердце, печень, селезенку, мезентериальный лимфатический узел, обе почки (с надпочечниками), фрагмент средней доли печени, легкие и все органы, в которых были видны макроскопические изменения.

Аутбредные крысы Вистар. Работа по исследованию возможных токсикопатологических эффектов перорального введения больших доз SkQ1 выполнена на крысах стока Вистар обоего пола SPF-категории, общим числом 145 голов, из них самцов – 73, самок - 72. Токсичность препарата при внутривенном введении была изучена на 67 самцах. Возраст животных в начале эксперимента составлял 6-7 недель для самок и 7-8 – для самцов. Крысы были получены из питомника НПО "Пущино". Крыс содержали группами (3-6 особей) однородными по полу при температуре 20-23$^{o}$C и влажности 35-75%. Животные имели свободный доступ к стерилизованному стандартному комбикорму (*Асортимент-АГРО*, Россия) и стерильной апирогенной воде. Световой день длился 12 часов (включение света в 9:00). Длительность адаптации животных после получения их питомника составляла не менее 7 суток. Для эксперимента с индукцией ревматоидного артрита использовали 75 самок в возрасте 5-6 недель, в опыте с аргинин-индуцированным панкреатитом было 39 самок того же возраста (см. *2.6*). Слезные железы от 17 самок (7 контрольных и 10 – получавших 250 нмоль/кг в сутки SkQ1 с питьевой водой) в возрасте 18 месяцев, эвтаназированных ингаляцией $CO_2$, были исследованы гистологически с целью верификации в них возрастных изменений. Помимо этого, 45 крыс из

конвенционального вивария НИИ ФХБ им. А.Н.Белозерского МГУ использовали в эксперименте с индукцией острого пиелонефрита (см.2.6).

Хомячки Кэмпбелла (*Phodopus campbelli, Thomas, 1905, Rodentia, Cricetidae*). Хомячков содержали с учетом условий жизни этих зверьков в природе. Животные жили круглый год на улице в специально выстроенном помещении из металлической сетки под крышей. Пары (самка и самец) содержались в просторных пластиковых садках 70х40х40 см с заменяемой подстилкой. Освещение - естественный световой день. Температура, влажность – уличные условия в течение круглого года. Для опыта использовали животных массой 30-40 г, с момента, когда они способны питаться самостоятельно. Препарат в дозах 5 и 50 нмоль/кг в сутки летом давался с питьевой водой, а в холодное время года – каплями *per os*. В каждом случае гибели выполнялась некропсия с регистрацией в протоколе всех найденных изменений, за исключением трупов с далеко зашедшими гнилостными изменениями, производилось взвешивание тела и измерение опухолей в трех проекциях. Всего было вскрыто 111 самок и 42 самца, из которых 105 самок и 36 самцов составляли животные, дожившие до появления первых опухолей. Гистологическое исследование органов (кроме опухолей, подлежавших обязательному анализу) было выполнено только для 20 контрольных самок и для 45 самок, получавших SkQ1 (у самцов гистологически верифицировали только макроскопически видимые опухоли); обязательными объектами его были сердце, легкие, печень, почки, селезенка, желудок, а также ткани с макроскопически видимыми изменениями; в части случаев, при сохранности этих органов, забирали также кусочки разных отделов желудочно-кишечного тракта, головной мозг, надпочечники, половые органы, образцы кожи и мышц.

Обыкновенные слепушонки (*Ellobius talpinus, Pallas*). В эксперименте использованы обыкновенные слепушонки (*Ellobius talpinus*), отловленные в Искитимском районе Новосибирской области. Животных (самок и самцов, массой 45-50г.) содержали в конвенциональном виварии Института систематики и экологии животных СО РАН группами («семьями) по 3-5 особей в условиях,

близких к естественным. В частности, световой и температурный режимы меняли в соответствии с их сезонными ритмами (апрель-ноябрь: 15-20°С, 16 ч. освещение, 8 ч. темнота; ноябрь-апрель: 10-15°С, 24 ч. темнота). В качестве пищи предлагали морковь (*ad libitum*) и гранулы корма для мышей (*Лабораторснаб,* Россия) из расчета 2 гранулы на особь в день. Из отловленных в природе животных и родившихся в виварии их потомков были случайным образом сформированы экспериментальная и контрольная группы. Опытная группа получала с пищей (гранулами) SkQ1 из расчета 50 нмоль/кг/сутки. Контрольная группа получала пищу без препарата. Все зверьки жили до их естественной гибели. Возраст животных, рожденных в природе, определяли *post mortem* по длине корня второго моляра, сравнивая его с калибровочными данными [Евдокимов, 2001]. Трупы павших животных без признаков выраженного аутолиза подвергали некропсии. Всего было исследовано 96 погибших животных. Для гистологического анализа в каждом случае забирали сердце, легкие, печень, почки, селезенку, гонады, патологические объемные образования и все органы, в которых выявлялись макроскопически видимые поражения.

### 2.3 Токсикопатологическое исследование

Исследование острой токсичности SkQ1 при внутривенном введении. Работа выполнена на самцах белых крыс линии Вистар массой 265±3,4 г в начале эксперимента. Животные содержались в условиях естественного освещения и имели свободный доступ к пище и воде. Перед началом эксперимента за животными наблюдали в течение недели. Крысы, общим числом 67, были разбиты на 7 экспериментальных групп: контрольную, получавшую физиологический раствор (0,9% NaCl) или раствор SkQ1 на физиологическом растворе с различными концентрациями. Вводимые дозы составляли 1, 5, 7,5, 10, 15 и 30 мг/кг. Растворы готовили таким образом, чтобы объем вводимой жидкости составлял 2 мл/кг массы тела, за исключением дозы 30 мг/кг, где объем был несколько большим – 4,6 мл/кг. Следует отметить, что во всех случая объем вводимой жидкости не превышал допустимый объем для внутривенного введения

(2 мл). Вещества вводили в яремную вену в течение не менее 30 с. После введения животных помещали в индивидуальные камеры. В течение первых суток после введения наблюдали за поведением и состоянием животных. Павших крыс вскрывали, осматривали и определяли массы органов. Образцы тканей фиксировали для гистологических исследований. В конце эксперимента (через 14 суток после введения веществ) животных умерщвляли дислокацией шейных позвонков и проводили макроскопическое и микроскопическое исследование органов и тканей согласно опубликованным рекомендациям [Ruben et al., 1992; Tucker, 1997; Handbook of Toxicology, 2002; Bregman et al., 2003; Sellers et al., 2007; Michael, 2007; Fiette et al., 2011].

Исследование хронической токсичности SkQ1 при внутрижелудочном введении. Внутрижелудочное введение веществ осуществляли при помощи изогнутых стальных канюль (16-18 G в зависимости от размера крысы) и инъекционных шприцов. Крысы получали 400 и 2000 нмоль/кг SkQ1 1 раз в сутки (раствора - 0,14 и 0,7 мл/кг соответственно). Контрольным животным вводили растворитель (0,70 мл/кг). Дозы корректировали еженедельно по мере роста крыс. Длительность курса введения вещества составляла 8 недель. Состояние части животных исследовали через 8 недель приема препарата (полный курс), чрез 4 недели (половина длительности курса), а также спустя две недели после прекращения введения SkQ1. Дополнительно были обследованы группы интактных животных, не подвергавшихся каким-либо экспериментальным воздействиям. Во время курса введения SkQ1 состояние крыс еженедельно оценивали по массе тела и визуально в ходе осмотра, ежедневно – в ходе осмотра в клетках содержания и при проведении манипуляции внутрижелудочного введения вещества. По окончании курса животных забивали, проводили морфологическое исследование внутренних органов и забирали пробы тканей для гистологического исследования. Эвтаназию крыс осуществляли ингаляцией $CO_2$. Эвтаназированных животных вскрывали, протоколировали видимые признаки состояния органов и тканей. Отпрепаровывали и определяли массу головного мозга, сердца, легких, тимуса, печени, почек, надпочечников, селезенки, органов

репродуктивной сферы: семенников, придатков семенников и вентральных долей простаты у самцов; яичников и матки – у самок, а также депозитов полостного жира: эпидидимального - у самцов, жира, окружающего яичники и матку – у самок. Для гистологического исследования забирали образцы тканей головного мозга, гипофиза, трахеи, легких, сердца, печени, почек, мочевого пузыря, надпочечников, органов репродуктивной сферы, щитовидной железы, мышц, слюнных желез, пищевода, желудка, двенадцатиперстной кишки, толстого кишечника, лимфатических узлов, тимуса и кожных покровов.

## 2.4 Тестирование влияния SkQ1 на продолжительность жизни и спектр спонтанной патологии у животных

Эксперименты по изучению влияния SkQ1 на продолжительность жизни и спонтанную патологию проводились на животных разных видов и линий (мышей BALB/c, C57BL/6, B6SJL-Tg(SOD1-G93A)dl1Gur/J, хомячков Кэмпбелла и обыкновенных слепушонок), содержавшихся в разных условиях и получавших разные дозы SkQ1 (см. 2.2). Животные жили до их естественной гибели или до эвтаназии по причине тяжелого морбидного статуса. У павших животных регистрировали возраст на момент гибели, трупы подвергали обязательной некропсии и, при достаточной сохранности, гистопатологическому исследованию с использованием, в зависимости от показаний, широкого набора специальных методов окраски (см. 2.10). Выявленную опухолевую и неопухолевую патологию диагностировали согласно рекомендациям, изложенным в специальных статьях и руководствах по патоморфологии лабораторных животных [Faccini et al., 1990; Pathobiology…, 1996; International Classification…, 2001; Pathology of the mouse…, 1999; Morse et al. 2002; Kogan, et al., 2002; Nikitin et al., 2004; Percy, Barthold, 2007; Greaves, 2007; Kondo et al., 2008; Pettan-Brewer, Treuting, 2011; Background Lesions…, 2012]. При обнаружении изменений, ранее не описанных у лабораторных животных, ориентировались на диагностические критерии общей патологии [Струков, Серов, 1995] и на информацию об аналогичной патологии у человека [Classification of tumours…, 2001].

## 2.5 Моделирование альтеративной патологии

Цитостатическое поражение семенников. Моделирование цитостатического поражения семенников проводилось на двухмесячных самцах линии BALB/c согласно опубликованному протоколу [Yeh et al., 2007]. Животные были разделены на шесть групп по 10 особей в каждой. Интактная группа получала внутрижелудочно физиологический раствор. Контрольная группа получала доксорубицин (*Sigma,* USA) внутрибрюшинно в дозе 3 мг/кг каждые 2 дня так, чтобы суммарная доза доксорубицина после курса инъекций составила 9 мг/кг. Третья группа животных получала доксициклин внутрижелудочно и доксорубицин внутрибрюшинно. Доксициклин (*Sigma,* USA) вводился в дозе 2,5 мг/кг в момент начала эксперимента, на 2 и 4 сутки, а доксорубицин инъецировался в дозе 3 мг/кг на через 1 сутки после начала опыта, а также на 3 и 5 сутки (т.е., каждую дозу доксорубицина вводили через 1 сутки после введения доксициклина). Четвертая, пятая и шестая группа получали доксорубицин внутрибрюшинно и SkQ1 внутрижелудочно. Препарат SkQ1 вводится в течение 28 суток в дозах 50, 250 и 1250 нмоль/кг соответственно в четвертой, пятой и шестой группах, один раз в сутки, а доксорубицин инъецировали всем мышам в дозе 3 мг/кг на 1, 3 и 5 сутки эксперимента. Через 28 дней после начала введения препаратов производилась эвтаназия мышей ингаляцией $CO_2$ и забор материала (семенников) для гистологического анализа [Russell et al., 1990].

Острая токсическая дистрофия печени. Для индукции токсической дистрофии печени трехмесячным самкам мышей линии C57BL однократно внутрижелудочно вводился четыреххлористый углерод (*Merck,* USA) в 50% растворе на оливковом масле в дозе 2,5 мг/кг. Животных эвтаназировали ингаляцией $CO_2$ через 24 ч после введения. SkQ1 и другие испытуемые вещества вводили внутрижелудочно в течение 5 дней перед введением четыреххлористого углерода (тетрахлорметана). В данном эксперименте были следующие группы животных: интактный контроль (n=5, без введения тетрахлорметана), негативный контроль (n=5, животным 5 дней вводилось оливковое масло), плацебо (n=9, животным 5 дней вводилась аскорбиновая кислота в той же дозе, что и в смеси с восстановленным SkQ1), три

опытные группы, которым 5 дней вводилась окисленная форма SkQ1 (n=10-11) в дозах 50, 250 и 1250 нмоль/кг в сутки и четыре опытные группы (n=10-11), которым вводилась восстановленная форма препарата в дозах 2, 10, 50 и 250 нмоль/кг в сутки. При некропсии кусочки печени фиксировали для гистологического анализа.

## 2.6 Моделирование воспалительных реакций

Моделирование острого асептического неиммунного воспаления. Моделью асептического неиммунного воспаления служил острый экспериментальный панкреатит. Эксперимент проводили на самках аутбредной линии Вистар. Острый панкреатит моделировали однократным внутрибрюшинным введением аргинина (*Sigma*, USA) в дозе 1 г/кг веса в виде 20% раствора, приготовленного на фосфатном буфере (pH=6,8). Интактная группа (n=7), получала однократную внутрибрюшинную инъекцию физиологического раствора. Объем вводимого раствора аналогичен объему, вводимому животным экспериментальных групп (2,5 мл). Контрольная группа (n=12) получала инъекцию аргинина без дополнительного медикаментозного воздействия. Две экспериментальные группы (n=11 и 9) предварительно в течение 10 дней получали с питьевой водой SkQ1 в дозе 50 и 250 нмоль/кг в сутки (доза добавлялась в воду из расчета суточного потребления животными). На 9 сутки будет произведена внутрибрюшинная инъекция аргинина. Через 24 часа животные подвергаются эвтаназии. Взвешивали тело животного, извлекали и оценивали массу поджелудочной железы, половину которой использовали для биохимической оценки степени воспалительной инфильтрации по удельной активности миелопероксидазы, а половину фиксировали для гистологического анализа.

Моделирование острого бактериального неиммунного воспаления. Бактериальное неиммунное воспаление исследовали на модели острого пиелонефрита. Пиелонефрит индуцировали введением бактерий в мочевой пузырь аутбредным белым крысам Вистар (180-200 г) [Gupta et al., 1995]. Животных анестезировали

золетилом (внутримышечное введение 3 мг/100 г массы тела крысы). Инфицирование проводили с помощью интрауретральной инстилляции посредством полиэтиленового катетера (*Clay Adams,* USA) 5 мл на кг $1 \times 10^8$ КОЕ/мл бактериальной композиции из фекалий крыс. SkQR1 вводили интраперитонеально в дозе 100 нмоль/кг через 1 час после инфицирования; введение той же дозы препарата повторяли через 12, 24, 36, и 48 часов; всего каждая крыса получала 500 нмоль/кг SkQR1. По окончании эксперимента животные были подвергнуты эвтаназии ингаляцией $CO_2$. В каждой из трех групп (интактные, контрольные и экспериментальные крысы) было по 15 особей. Одна из почек служила для гистологического анализа, вторую использовали для биохимической оценки степени воспалительной инфильтрации по удельной активности миелопероксидазы

Моделирование хронического продуктивного аутоиммунного воспаления. Моделью воспаления такого типа служил аутоиммунный ревматоидный артрит. Это заболевание индуцировали иммунизацией крыс Вистар в возрасте 5-6 недель (по 15 самок в каждой группе) свиным коллагеном второго типа (*Chondrex,* USA) в соответствии с опубликованным протоколом [Rosloniec et al., 2004]. SkQ1 вводили внутрижелудочно с помощью зонда в дозах 50, 250, и 1250 нмоль/кг/сутки. Животным из группы негативного контроля вводился дексаметазон (*Sigma,* USA) (в дозе 1,5 мг/кг внутримышечно 1 раз в неделю); позитивный контроль не получал никакого дополнительного медикаментозного воздействия, за исключением того, что всем контрольным крысам внутрижелудочно вводился раствор, не содержащий SkQ1, в том же объеме, что и экспериментальным группам. Одна группа состояла из интактных крыс. Животных подвергали эвтаназии ингаляцией $CO_2$ спустя 4 недели после начала эксперимента, для гистологического исследования забирались обе стопы.

### 2.7 Моделирование компенсаторно-приспособительных процессов

*Моделирование репаративной регенерации кожи*. Регенерация тканей кожи изучалась на модели механической порезанной раны у старых мышей и мышей с

генетически обусловленной патологией обмена (см. 2.2). Животных предварительно анестезировали эфиром. Для моделирования кожной раны мышам в межлопаточной области удаляли шерстяной покров и обрабатывали поверхность кожи этанолом. Затем при помощи ножниц и пинцета производили ранение, проникающее через все слои кожи (0,49 мм$^2$). Спустя 7 суток (старые мыши) или 7 и 13 суток (db/db) после нанесения ран животных подвергали эвтаназии ингаляцией углекислого газа и забирали образцы кожи с областью раны для гистоморфометрического исследования.

Моделирование фиброза и гипертрофии. Фиброз и гипертрофия исследовались на модели спонтанных возрастных изменений миокарда у самок мышей линии BALB/c в возрасте 24 месяцев (см. раздел 2.2) .

Моделирование диспластических и метапластических изменений. Моделью служили спонтанные возрастные изменения слезной железы у крыс Вистар в возрасте 18 месяцев (см. раздел 2.2).

## 2.8 Моделирование атрофии

Атрофия исследовалась на модели спонтанной патологии у SOD1-трансгенных мышей B6SJL-Tg(SOD1-G93A)dl1Gur/J, страдающих боковым амиотрофическим склерозом и рядом других заболеваний (см. раздел 2.2).

## 2.9 Модели опухолевого роста

В качестве моделей опухолевого роста использовались спонтанные новообразования, развивавшиеся у самцов и самок мышей линий BALB/c, C57BL/6, B6SJL-Tg(SOD1-G93A)dl1Gur/J, хомячков Кэмпбелла и обыкновенных слепушонок (см. раздел 2.2). У животных, доживших до естественной гибели в контрольных группах и группах, получавших разные дозы SkQ1, определяли общую частоту и гистологический спектр опухолей, возраст на момент смерти от различных новообразований (латентный период канцерогенеза), частоту диссеминированных и первично-множественных неоплазм.

## 2.10 Гистотехнические и гистохимические методы

Образцы органов во всех случаях фиксировали в 10% растворе формалина на фосфатном буфере (pH=7,4). Небольшое число объектов было зафиксировано в жидкости Карнуа (глаза, образцы печени) и Буэна (слезные железы). После фиксации (24 ч. в формалине и жидкости Буэна, 3 часа – в жидкости Карнуа) препараты тщательно отмывали от фиксатора (проточной водопроводной водой в случае формалина, 70% этанолом в случае жидкости Буэна и 96% этанолом в случае фиксатора Карнуа). Объекты, содержавшие костную ткань, декальцинировали в 14% растворе ЭДТА (pH=7,0) от одной до десяти недель (в зависимости от размеров). Затем образцы дегидратировали в 7 порциях изопропанола (99,7%, *IsoPrep, БиоВитрум,* Россия), пропитывали в 2 порциях парафина (*Histomix, БиоВитрум,* Россия) по 2 часа и заливали в него. Срезы (4 мкм) готовили на ротационном микротоме RM 2245 (*Leica,* Germany), помещали на предметные стекла и окрашивали после предварительного депарафинирования и регидратации. Для выявления липидов из фиксированных в формалине образцов печени изготовляли замороженные срезы на криотоме CM 1950 (*Leica,* Germany). Во всех случаях, независимо от задач исследования, наряду с другими методами срезы обязательно окрашивали гематоксилином и эозином по общепринятой методике [Меркулов, 1969]. С целью идентификации изменений при экспериментальных патологических состояниях, а также для диагностики спонтанных опухолей использовали следующие специальные методы окрашивания: по Ван Гизону, Массону, Маллори (коллаген), Футу (ретикулиновые волокна), Тенцеру-Унна (эластин), железным гематоксилином, фосфорновольфрамовым гематоксилином (миофибриллярная исчерченность), Гимза, Граму-Вейгерту, Вартин-Старри, Цилю-Нильсену (бактерии), толуидиновым синим (гранулы тучных клеток), Фонтана-Массону, Гримелиусу, паральдегид-фуксином по Гомори (секреторные гранулы), ализариновым красным, по фон Косса (депозиты солей кальция), по Лепене (гемоглобин), гематоксилином-светлым зеленым-сафранином О (протеогликаны суставного

хряща), Перлсу (гемосидерин), Шморлю (липофусцин), суданом III (липиды), Браше (суммарная РНК, плазмоциты), реактивом Шиффа-йодной кислотой (ШИК) по Мак Манусу (полисахариды и содержащие их структуры) с обработкой части срезов амилазой из *Bacillus subtilis* (D-PAS) (*БиоВитрум,* Россия), альциановым синим при pH=1,0 и 2,5 (муцины и гиалуроновая кислота) с предобработкой срезов гиалуронидазой из бычьего семенника (*БиоВитрум,* Россия), конго красным и тиофлавином S с последующим изучением в поляризованном свете и в ультрафиолетовых лучах соответственно (амилоид) [Меркулов, 1969; Лилли, 1969; Саркисов, Перов, 1996; Сапожников, Доросевич, 2000]. Для иммуногистохимического выявления поверхностных и цитоплазматических иммуноглобулинов на лимфоидных опухолевых клетках мышей использовали кроличьи поликлональные антитела, меченные пероксидазой (*Dako,* UK), после соответствующей предобработки срезов [Ward et al., 2006; Криволапов, Лееман, 2006; Kunder et al., 2007]. Апоптоз верифицировали с помощью TUNEL-метода с использованием набора TACS-XL In Situ Apoptosis Detection Kit - TACS Blue (*Trevigen,* USA) согласно инструкции фирмы-изготовителя.

## 2.11. Морфометрические методы

Готовые гистологические препараты исследовали с помощью микроскопа AxioScope A1 (*Carl Zeiss,* Germany), фотографирование осуществляли цифровой камерой высокого разрешения MRc.5 (*Carl Zeiss,* Germany). Все морфометрические процедуры выполнялись «слепым методом» на зашифрованных препаратах, с учетом существующих рекомендаций [Автандилов, 1990; Ward, Thoolen, 2011].

Для оценки состояния семенников после цитотоксического повреждения использовали нижеперечисленные критерии [Yeh et al., 2007], которые определяли на поперечном срезе через центр органа: 1) число семенных канальцев; 2) средний диаметр канальцев (в мкм) с помощью программы

AxioVision 3.0 (*Carl Zeiss*, Germany); 3) состояние герминального эпителия, оцененное полуколичественно (в баллах) по преобладающей (не менее, чем в 50% канальцев) степени повреждения согласно следующей шкале: 0 баллов – интактный герминальный эпителий, представлены все клеточные компартменты; 1 балл – уменьшение рядов герминативных клеток, типичная стратификация сохранена; 2 балла – субтотальная гибель незрелых элементов сперматогенеза, зрелые клетки (сперматозоиды и сперматиды) относительно сохранны; 3 балла – субтотальное или тотальное разрушение как зрелых, так и незрелых элементов сперматогенеза; 4 балла – полная гибель клеточных элементов (в том числе клеток Сертоли), коллапс канальцев, склероз и минерализация семенника.

С целью оценки состояния печеночной паренхимы после воздействия четыреххлористым углеродом оценивали относительную площадь пораженной паренхимы (в 10 полях зрения микроскопа AxioScope A1 при увеличении х50 с помощью программы AxioVision 3.0) и глубину поражения (согласно шкале, приведенной на рисунке 13). Индекс тяжести поражения печени определяли как произведение двух названных величин.

Воспалительные изменения поджелудочной железы оценивали по ее относительной массе (к массе тела, в %) и по степени инфильтрации нейтрофилами в баллах согласно шкале, показанной на рисунке 15.

При пиелонефрите выраженность воспаления оценивали в 10 полях зрения микроскопа AxioScope A1 при увеличении х400 отдельно для коркового, мозгового вещества и сосочка почки согласно следующей шкале: 0 – 0–4 лейкоцита в поле зрения; 1 – 5 – 50 лейкоцитов в поле зрения; 2 – 50-100 лейкоцитов в поле зрения; 3 – более 100 лейкоцитов в поле зрения; 4 – поле зрения, занятое гнойным содержимым абсцесса.

Полуколичественную оценку тяжести поражения при экспериментальном ревматоидном артрите осуществляли на суставах стопы (горизонтальные срезы) с помощью четырехстепенной балльной системы (0-признак отсутствует; 1 – выражен слабо; 2 – выражен умеренно; 3 – выражен резко). Для оценки были выбраны 5 признаков артрита (инфильтрация периартикулярных тканей, синовит,

гиперплазия синовиальной оболочки, деструкция суставного хряща и костной ткани) в соответствии с принятым в литературе подходом к оценке экспериментального артрита у крыс [Li at al., 2012].

Для оценки репаративной регенерации оценивали сокращение раневой поверхности, для чего производили фотографирование поврежденных участков кожи при помощи камеры Casio Exilim EX-Z75 (*Casio,* Japan). Площадь ран измеряли на фотографиях, применяя программу анализа изображений ImageJ, в качестве оцениваемого показателя использовали отношение площадей на разных стадиях заживления к исходной площади, выраженное в процентах. Анализ развития грануляционной или рубцовой ткани производили на 2 поперечных гистологических срезах, проходящих через центр раны, на которых определяли среднюю толщину указанных тканей.

Степень возрастной гипертрофии миокарда оценивали по массе сердца, выраженность миокардиального фиброза по относительной площади, занимаемой в миокарде волокнами коллагена на препаратах, окрашенных по ван Гизон (10 полей зрения микроскопа AxioScope A1 при увеличении х400, с помощью программ AxioVision 3.0 и Image J). Выраженность возрастных диспластических и метапластических изменений в слезной железе крыс оценивали в трехбалльной системе (0 – отсутствие, 1 – слабо выраженные, 2 – умеренно выраженные, 3 – резко выраженные).

## 2.12 Определение активности миелопероксидазы в тканях при воспалении

Половину поджелудочной железы (в случае панкреатита) или почку (в случае пиелонефрита) крысы гомогенизировали во льду в 10 мл 50 mM калий-фосфатного буфера (pH=6,0) в гомогенизаторе Поттера (тефлон-стекло). Затем 1,5 мл гомогенизированного образца центрифугировали в течение 15 мин 14000 об/мин при 4°C, полученный осадок ресуспендировали в 1 мл 50 mM калий-фосфатного буфера (pH=6,0), содержащего 0,5% CTAB (*Sigma,* USA). Образцы подвергали трехкратному замораживанию-оттаиванию и центрифугировали 10

минут при 10,600×*g*. Перед проведением реакции образцы разводили в пять раз 50 mM калий-фосфатным буфером (pH=6,0), 0,5% CTAB. Затем готовили реакционную смесь для измерения миелопероксидазной активности (5 мг ортофенилендиамина (*Sigma,* USA); 10 мл ТИФА-буфера (0,1М цитрат натрия, 0,2 М $Na_2HPO_4$, pH=5,0 доводят ортофосфорной кислотой); 5 мл дистиллированной воды; 5,5 мкл 30% $H_2O_2$). По 150 мкл реакционной смеси помещали в 96-луночную плашку для иммуноферментного анализа и вносили по 50 мкл образцов. После 5 минут инкубации при комнатной температуре реакцию останавливали, добавляя в каждую лунку по 100 мкл 10% раствора серной кислоты. Измерение оптической плотности при длине волны 492 мм проводили на планшетном спектрофотометре SPECTROstar NANO (*BMG Labtech,* USA). Определение концентрации общего белка проводили по протоколу Bio-Rad Protein Assay (Bradford) (*Bio-Rad,* USA). Перед измерением исходные образцы разводили в 20 фосфатно-солевым буфером. В качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин (*PAA Laboratories*, Germany). Полученные данные выражали в относительных (условных) единицах активности миелопероксидазы/количество общего белка.

### 2.13 Определение профиля экспрессии генов в тканях сердца

Экстракция РНК и олигонуклеотидный микроэррей. РНК была изолирована из тканей сердца (после замораживания в жидком азоте и гомогенизации) с помощью набора реагентов Qiagen RNeasy Mini Kit (*Qiagen, Inc. Valencia* CA), процедура выполнялась в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Количество РНК было измерено с помощью системы NanoDrop (*Thermo Scientific NanoDrop Products,* USA), а качество оценивалось с использованием Agilent Total RNA 6000 chip (*Agilent Technologies*, USA). Пулы РНК из сердец от каждой группы мышей составляли 1 микрограмм очищенной РНК. 400 нанограмм суммарной РНК были амплифицированы с помощью набора Illumina® TotalPrep™ RNA Amplification Kit (*Ambion,* USA). Амплифицированную РНК

гибридизировали в системе MouseRef-8 v2.0 Expression BeadChips (*Illumina,* USA) (~25,600 RefSeq транскриптов) в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Представление и анализ данных осуществляли с помощью программного обеспечения GenomeStudio (*Illumina,* USA) и Gene Expression Module.

КЕГГ-анализ транскрипционных путей. После идентификации генов, на транскрипцию которых значимое влияние оказывало введение SkQ1, их список был обработан с использованием базы данных Gene Ontology (GO) и анализа сигнальных путей Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (http://www.genome.jp/kegg/). Эти две аналитических процедуры выполнялись (на наборах генов, транскрипция которых повышалась или понижалась под действием SkQ1) с использованием WebGestalt (http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt/), являющийся частью системы Onto-Tools (http://vortex.cs.wayne.edu/projects.htm). Этот подход позволяет сравнить экспрессию специфических генов в экспериментальных образцах с фоновой экспрессией генов у грызунов в наборе Onto-Tools или в другом определенном исследователем наборе генов. Функциональный кластеринг генов в GO-группах выражался в двух показателях, описывающих степень обогащения набора генов (the degree of gene-set enrichment, R), то есть, как избыточно представленная GO-группа соотносится с тем, что можно было бы ожидать в случае полного бэкграундного геномного набора, а также с учетом вероятности случайного обогащения такого набора. В данной работе использовалось отсечение на уровне по меньшей мере двух генов, необходимых для того, чтобы представлять GO-группу, при величине уровня p меньшей или равной 0,05. Аналогичные критерии были использованы для проведения кластеринга генов в функциональные сигнальные пути (произведенные из KEGG).

## 2.14 Статистические методы

Статистический анализа данных, представленных на кривых выживаемости, производили методом Каплана-Мейера. Показатели масс органов в

токсикологических исследованиях сравнивали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с апостериорным сравнением по Даннету (факторы: доза SkQ1 и длительность курса введения), а также тестом Стьюдента, с поправкой на попарные сравнения. Статистическую обработку данных проводили отдельно для самок и самцов. Кривую доза-эффект для данных о падеже животных анализировали методом пробит-анализа. При анализе частот встречаемости того или иного признака использовали критерий $\chi^2$ Фишера. Прочие количественные данные оценивали с помощью параметрических и непараметрических методов (Стьюдента, Вилкоксона-Ман-Уитни с применением поправки Бонферрони на множественные сравнения, а также способа Краскала-Уоллеса и коэффициента ранговой корреляции Спирмена). Данные, в зависимости от их характера, представляли в виде среднего значения (M), среднего значения и ошибки среднего (M±m) или среднего значения и стандартного отклонения (M±SD). За статистически значимый принимали уровень достоверности $p<0.05$. Для выполнения статистической обработки результатов и построения диаграмм использовали стандартные пакеты программ – SAS, GraphPad Prism 5.0 и Statistica 6.0.

## 2.15 Биоэтические аспекты исследования

Все исследовательские процедуры и условия содержания грызунов отвечали этическим правилам работы с лабораторными животными, в том числе Европейской директиве FELASA-2010, а также протоколам, утвержденным комиссиями по биоэтике тех учреждений, в которых выполнялись исследования (НИИ физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского, НИИ Митоинженерии, Биологического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова (Москва), Института биоорганической химии РАН им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова (Москва), Wenner-Gren Institute (Стокгольм), Института систематики и экологии животных СО РАН, Института цитологии и генетики (Новосибирск), Института экологии и эволюции им. А.Н. Северцова (Москва)). Дизайн и планы всех исследований

проходили экспертизу и утверждение биоэтическими комиссиями названных учреждений.

## 2.16 Дизайн исследования

Дизайн исследования в виде общей схемы, дающей представление о логической структуре работы и суммирующей информацию о материале диссертации, представлен на рисунке 3.

Рисунок 3 – Общая схема дизайна исследования.

# ГЛАВА 3.
# РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

## 3.1. Токсикологическая патология SkQ1

### 3.1.1. Изменения, вызванные острой интоксикацией SkQ1

Для определения общей токсичности SkQ1 как потенциальной лекарственной субстанции было проведено исследование реакции лабораторных крыс на внутривенное введение разных его доз.

Данные о количестве павших животных и времени гибели относительно момента введения SkQ1 приведены в таблице 4.

Таблица 4 – Падеж крыс после внутривенного введения разных доз SkQ1

| Доза, мг/кг | 0 | 1 | 5 | 7,5 | 10 | 15 | 30 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Количество крыс: пало/всего | 0/10 | 0/9 | 2/10 | 1/9 | 6/10 | 7/10 | 9/9 |
| Время смерти, минуты | - | - | 150 | 15 | 12,7 ±2,5 | 11,8 ±1,5 | 5,3 ±0,9 |

Основываясь на полученных данных, были рассчитаны следующие параметры кривой доза-эффект:

$ЛД_{50}$-10,4 (7,6-14,4) мг/кг (16,9 (12,3-23,3) мкмоль/кг);

$ЛД_{10}$–4,4мг/кг (7,1 мкмоль/кг);

$ЛД_{16}$–5,3мг/кг (8,6 мкмоль/кг);

$ЛД_{84}$ – 20,2 мг/кг (32,7 мкмоль/кг).

Терминальное состояние у большинства павших животных развивалось в течение минут после введения вещества (таблица 4). Непосредственно перед развитием агонии у крыс ненадолго повышалась двигательная активность, они совершали несколько пробежек по камере. Агония длилась 1-2 минуты. Дыхательные движения были затруднены, становились более редкими и

глубокими и затем останавливались. Сердце продолжало биться, сердечные сокращения были урежены, силой выше, чем обычные. Затем следовали 2-3, иногда несколько, беспорядочных дыхательных движения, после чего останавливалось сердце. Агония в ряде случаев сопровождалась мочеиспусканием, дефекации не было отмечено. В отдельных случаях изо рта и носа отделялась розоватая пена.

Наблюдение за животными длилось 14 суток после введения веществ и включало ежедневный осмотр. Гибель крыс после первых суток не отмечена. При осмотре животных, получавших большие дозы SkQ1 (7,5, 10 и 15 мг/кг) наблюдались вялость, шерсть часто была взъерошена, иногда имела неопрятный вид. В ряде случаев обнаруживали бурые выделения из носовых ходов, в единичных случаях – бурое окрашивание вокруг глаз. При дыхании были слышны хрипы. Выраженность этих проявлений постепенно снижалась и к концу эксперимента животные, получавшие SkQ1, не отличались от контрольных крыс.

#### 3.1.1.1 Данные исследования трупов на некропсии

*Внешний осмотр*. Шерсть павших животных была чистой и гладкой. Кожа подошвенной части стопы задних конечностей практически во всех случаях была бледная, почти белая. Напротив, кожа мошонки у большинства животных имела интенсивно-розовую окраску. Конъюнктива глаз у половины павших крыс была бледной, у другой половины – выражено покрасневшая. Область ноздрей у большинства крыс была покрыта пенистыми выделениями с примесью крови. В отдельных случаях отмечено выделение розоватой пены из ротового отверстия. Слизистая оболочка полости рта чаше анемична, реже – нормальной окраски. Анус был либо сомкнут, либо зиял.

При разрезе по белой линии живота обнаруживали практически полное отсутствие *жировой клетчатк*и, что нормально для животных данного вида и возраста. *Мускулатура* была выражено анемична.

*Подкожные лимфоузлы* у большинства крыс оставались неизменными, в части случаев отмечено небольшое увеличение подчелюстных лимфоузлов (4 случая), выраженная инъекция сосудов этих же лимфоузлов (3 случая), общая гиперемия узлов или кровоизлияния под капсулой (4 случая).

*Кости и связки* видимых изменений не имели.

Область расположения и морфология собственно *щитовидной железы* видимых изменений не имели.

В шейной части трахеи в ряде случаев обнаруживалось пенистое содержимое с примесью крови.

*Пищевод* был без видимых изменений.

При осмотре *грудной полости* костальная и легочная плевра были гладкими, блестящими. Выпот в полости отсутствовал.

*Тимус* чаще имел розовый цвет с серым оттенком, реже бледно-кремовый. Под капсулой вилочковой железы (на вентральной стороне в 8 случаях, а в 2 случаях - и на дорзальной стороне) отмечены множественные точечные полиморфные кровоизлияния. У одного животного отмечены выраженное кровенаполнение сосудов и некоторое увеличение органа в размерах.

*Легкие* были резко увеличены, большая часть их имела цвет от бледно-розового до интенсивно-розового, в нескольких случаях – красный. Наблюдалась выраженная очаговая гиперемия, с вовлечением, как правило, всех долей легких, в единичных случаях такие очаги занимали одну из долей или, наоборот, легкие оказывались гиперемированными целиком. На поверхности разреза из бронхов выделялась пенистая жидкость (рисунок 4).

*Перикард* был в пределах нормы. *Сердце* было увеличено в размерах, цвет был темно-вишневым, часто неравномерным. В ряде случаев отмечена значительная инъекция коронарных сосудов, единично – пятнистые кровоизлияния под эпикардом. Сердце в 12 случаях имело камеры, переполненные темной жидкой кровью, в остальных случаях желудочки были пусты. Миокард, эндокард, и клапаны видимых изменений не имели.

Крупные приносящие сосуды были резко полнокровны, цвет крови в них был темно-красным, почти черным.

При осмотре *брюшной полости* расположение органов было анатомически правильным, париетальный и висцеральный листки брюшины были гладкими, блестящими, без видимых изменений. Выпот в полости отсутствовал.

*Печень* имела цвет от светло-коричневого до темно-вишневого. Размер печени в ряде случаев был больше обычного, края - закруглены. На разрезе типичный рисунок был сохранен. В ряде случаев (7 крыс) изменения расценены как умеренно выраженная гиперемия.

*Желчный пузырь* у крыс отсутствует.

Сосуды *брыжейки,* как правило, были выражено инъецированы. *Висцеральные лимфоузлы* были нормального вида.

Серозные покровы и слизистая оболочка *тонкого кишечника* видимых изменений не имели. В двух случаях было обнаружено повышенное кровенаполнение поверхностных сосудов, а в одном – единичное кровоизлияние диаметром 2 мм в каудальной половине подвздошной кишки. Содержимое кишечника было кашицеобразным, желто-коричневого цвета и не имело специфического запаха.

*Толстый кишечник* у большинства животных имел нормальную морфологию. В трех случаях было обнаружено небольшое скопление газов, в одном – была видна инъекция поверхностных сосудов.

*Желудок* всегда был практически пуст. Слизистая оболочка была анемична, в остальном, отличий от нормы не было обнаружено.

*Поджелудочная железа* имела белую, розоватую или сероватую окраску. Отмечен единичный случай гиперемии, других видимых изменений не обнаружено.

*Почки* имели цвет от темно-коричневого до темно-вишневого: у 7 животных почки были тотально гиперемированы, у 7 – напротив, несколько анемичны. Во всех случаях капсула легко снималась, на разрезе – прослеживалась граница между корковым и мозговым веществом, кровенаполнение этих зон было

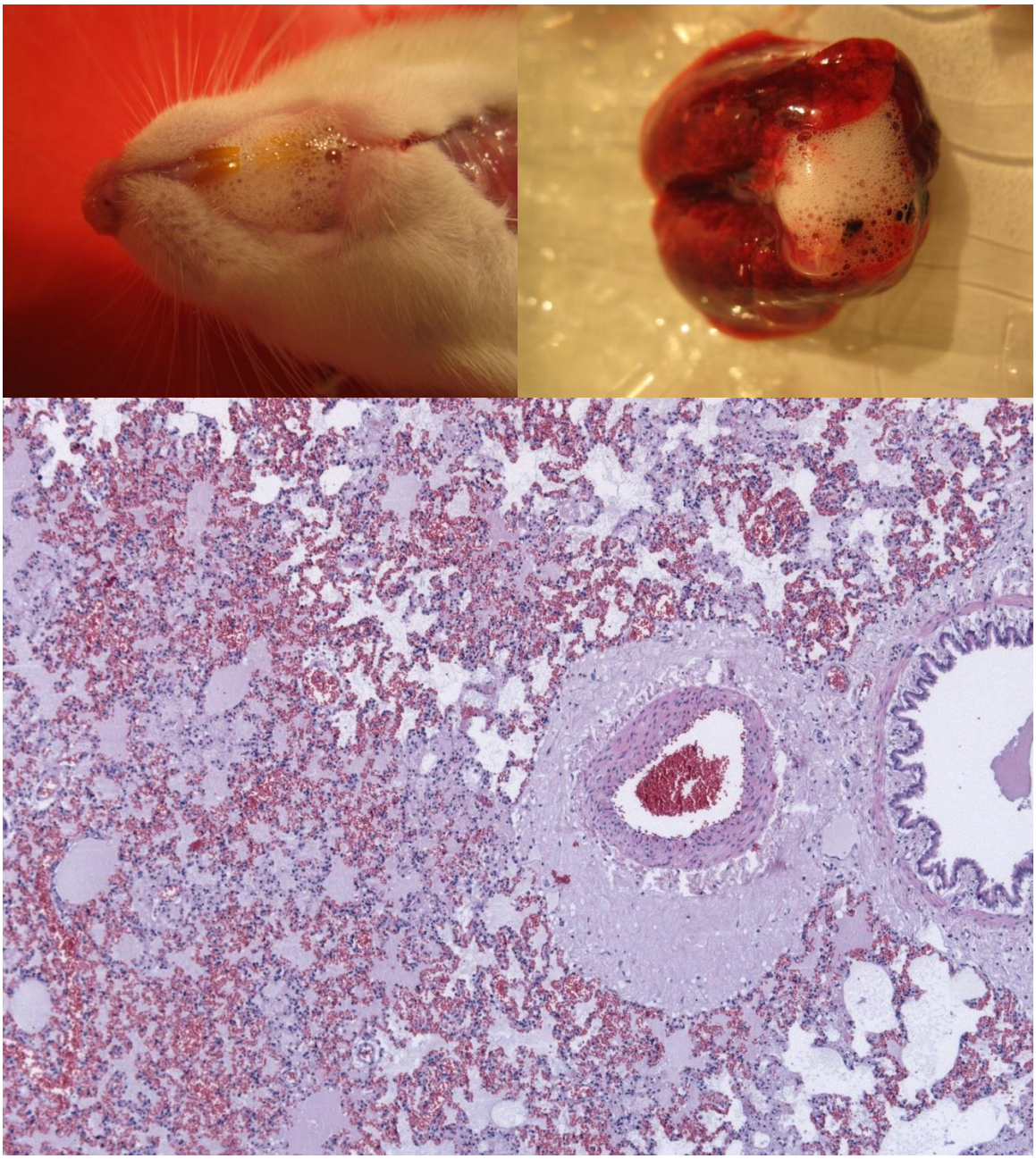


Рисунок 4 – Отек легких как важнейшее морфологическое изменение, наблюдаемое у животных, погибших от острой интоксикации SkQ1 при внутривенном введении. Примечание – верхняя панель: макроскопические проявления отека легких на некропсии: пенистые выделения из ротового отверстия у павшей крысы (слева) и типичный вид легких после выделения из органокомплекса грудной полости (справа); нижний рисунок: типичная гистологическая картина выраженного интерстициального и альвеолярного отека. Окраска гематоксилином и эозином, х100.

относительно равномерным и одинаковым. Лоханки были свободными от патологического содержимого. *Надпочечники* ни у одного животного не имели видимых изменений. *Мочевой пузырь* был в большинстве случаев пуст, у 4

остальных – заполнен мочой. Стенка мочевого пузыря не имела видимых изменений.

*Половые органы и придаточный аппарат* имели нормальную морфологию.

При осмотре *черепной полости* и твердой мозговой оболочки видимых изменений не было обнаружено. Поверхностные сосуды *головного мозга* были наполнены кровью. Их инъекция была от слабой до умеренной. На поперечных разрезах вещество головного мозга и его структуры имели нормальный вид.

*В области взятия крови и введения вещества в яремную вену* наблюдались отек, гиперемия и имбибиция окружающих тканей до 1,5 см в окружности, а также небольшие затеки крови за счет ее распространения по межфасциальным пространствам, обусловленные манипуляциями с животными. Массы органов павших крыс приведены в таблице 5.

Таблица 5 – Массовые коэффициенты (г/кг массы тела, M±m) органов крыс, павших от интоксикации SkQ1

| Орган | Физиологический раствор | SkQ1, мг/кг | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 5 | 7,5 | 10 | 15 |
| *Мозг* | 5,5±0,3 | 4,3±0,8 | 5,0±0,2 | 6,2±0,3 | 6,1±0,5 |
| *Сердце* | 3,8±0,1 | 4,3±0,8 | 5,0±0,2 | 5,9±0,3* | 6,1±0,5* |
| *Легкие* | 6,6±0,4 | 11,0±0,9 | 17,6±1,4 | 21,9±1,8* | 15,6±2,5* |
| *Печень* | 47,0±1,8 | 34,0±4,9 | 67,8±2,8* | 58,9±1,3* | 57,5±8,6 |
| *Почка* | 3,3±0,1 | 3,6±0,4 | 4,8±0,0* | 5,0±0,7 | 4,8±0,7* |
| *Надпочечники* | 0,22±0,01 | 0,19±0,04 | 0,22±0,03 | 0,24±0,01 | 0,27±0,03 |
| *Селезенка* | 5,2±0,2 | 6,7±0,4 | 5,8±0,3 | 7,4±0,4* | 6,7±1,1 |
| *Тимус* | 2,3±0,2 | 2,5±0,6 | 2,9±0,1* | 3,9±0,5* | 3,5±0,5 |
| *Семенник* | 4,6±0,1 | 3,5±1,3 | 4,7±1,0 | 4,2±0,3 | 4,6±0,4 |

Примечание – * - $p<0.05$ по отношению к эвтаназированным контрольным животным, которым вводился физиологический раствор хлорида натрия.

Как видно из этих данных, наблюдалось увеличение массы органов, обусловленное явлениями острых генерализованных нарушений кровообращения в виде неравномерного полнокровия разных органов, а также отеком легких.

При вскрытии животных, забитых через 14 суток после введения вещества видимых морфологических изменений большинства органов обнаружено не было.

В целом, при макроскопическом исследовании органы животных, получавших SkQ1, и крыс контрольной группы не отличались, за исключением легких крыс, которым вводили большие дозы SkQ1 (5 мг/кг и более): легкие последних имели более насыщенную розовато-сиреневую окраску, иногда неравномерную. Размеры легких были в пределах нормы. Массовые коэффициенты органов животных, эвтаназированных в конце периода наблюдения, приведены в таблице 6. Отмеченные различия масс органов контрольных и опытных крыс не носят систематического или дозозависимого характера; применение поправки Бонферрони на множественное сравнение показывает, что эти различия имеют случайную природу.

Таблица 6 – Массовые коэффициенты органов крыс (г/кг массы тела, M±m) через 14 дней после введения препарата SkQ1

| Орган | Физиологический раствор | SkQ1, мг/кг | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 5 | 7,5 | 10 | 15 |
| *Мозг* | 5,5±0,3 | 6,3±0,1 | 6,3±0,2* | 6,9±0,3 | 6,5±0,7 | 6,5±0,6 |
| *Сердце* | 3,8±0,1 | 4,1±0,2 | 4,0±0,1 | 3,9±0,2 | 3,8±0,2 | 3,2±0,2* |
| *Легкие* | 6,6±0,4 | 6,4±0,3 | 6,6±0,3 | 7,5±0,4* | 6,4±0,3 | 5,5±0,3* |
| *Печень* | 47,0±1,8 | 51,6±1,5 | 50,9±1,9 | 56,7±2,1* | 46,4±1,3 | 48,1±1,8 |
| *Почка* | 3,3±0,1 | 3,3±0,1 | 3,5±0,1 | 4,1±0,2* | 3,5±0,2 | 3,7±0,2 |
| *Надпочечники* | 0,22±0,01 | 0,19±0,01 | 0,21±0,02 | 0,24±0,02 | 0,22±0,02 | 0,22±0,02 |
| *Селезенка* | 5,2±0,2 | 6,8±0,6* | 6,0±0,6 | 7,2±0,7* | 5,7±0,7 | 6,5±1,7 |
| *Тимус* | 2,3±0,2 | 2,2±0,2 | 2,0±0,1 | 2,2±0,3 | 1,9±0,1 | 2,9±0,6 |
| *Семенник* | 4,6±0,1 | 4,9±0,2 | 5,0±0,2 | 5,0±0,2 | 5,0±0,4 | 4,9±0,1 |

Примечание – * - $p<0.05$ по отношению к эвтаназированным контрольным животным, которым вводился физиологический раствор хлорида натрия.

### 3.1.1.2 Результаты гистологического исследования органов павших животных

*Печень*: общая структура была органа сохранена, отчетливо прослеживались компоненты долек и портальных трактов (триад). Отмечалось резко выраженное полнокровие центральных вен и синусоидов, изменения со стороны гепатоцитов и купферовых клеток отсутствовали.

*Тонкая кишка*: слизистая, подслизистая, мышечная оболочки и сероза не имели патологических изменений.

*Легкие*: отмечалось крайне резко выраженное полнокровие межальвеолярных перегородок; в просвете альвеол было обнаружено большое количество пенистых слабобазофильных или эозинофильных компонентов отечной жидкости, местами со значительной примесью эритроцитов, а также выявлялся массивный периваскулярный и перибронхиальный отек (рисунок 4). Эозинофильные компоненты отечной жидкости были видны также в просвете бронхов.

*Сердце*: в камерах сердца содержались нормальные форменные элементы крови; в миокарде были видны множество расширенных, полнокровных сосудов и отек интерстиция. Кардиомиоциты имели нормальную морфологию. Эпикард и эндокард (в том числе и клапаны) патологических изменений не имели.

*Почка*: клубочки имели нормальную клеточность, были резко расширены, полнокровны; отмечалось выраженное полнокровие сосудов мозгового и коркового вещества; в проксимальных канальцах были видны признаки умеренно выраженной «зернистой дистрофии».

*Головной мозг*: зональная структура коры, строение структур белого вещества и гиппокампа отчетливо прослеживались; отмечено резкое полнокровие сосудов в ткани мозга, а также в мозговых оболочках и в хороидном сплетении с явлениями сладжа эритроцитов; были видны признаки перицеллюлярного и периваскулярного отека, «темные» пирамидные клетки в зубчатой извилине гиппокампа.

*Семенник*: семенные канальцы содержали нормальные элементы сперматогенеза и клетки Сертоли, в интерстиции отмечалось выраженное полнокровие сосудов, со стороны клеток Лейдига изменений не отмечено.

*Придаток семенника*: канальцы придатка имели обычное строение, отмечено полнокровие сосудов стромы.

*Поджелудочная железа*: ацинарные клетки типичного вида, с четкой базофилией периферических отделов цитоплазмы и секреторными эозинофильными

гранулами в апикальной части; протоки без видимых изменений; резкое полнокровие сосудов стромы и инсулярного аппарата.

*Щитовидная железа*: были видны фолликулы с типичными структурой и размерами, с нормальным количеством коллоида; эпителий фолликулов имел нормальное строение; полнокровие сосудов интерстиция.

*Слюнная железа*: ацинарные отделы (серозного типа) и выводные протоки, а также интерстиций патологических изменений не имели.

*Тимус*: отмечено резко выраженное полнокровие капилляров и венул коркового и мозгового вещества с массивными эритроцитарными экстравазатами, особенно выраженными в мозговом веществе и на границе корковой и мозговой зон. Со стороны клеток паренхимы и стромы органа изменений не выявлено.

*Лимфатический узел*: структура органа отчетливо прослеживалась, мозговые тяжы содержат значительное число гистиоцитов и незрелых клеток плазматического ряда; корковое плато содержало фолликулы со значительно увеличенными центрами размножения, в каждом из которых видно большое число фагоцитирующих макрофагов, содержащих клеточный дебрис. Сосуды мозгового вещества и паракортикальной зоны, а также окружающей узел соединительной ткани резко полнокровны.

*Селезенка*: фолликулы белой пульпы имели обычное строение, содержали реактивные центры умеренных размеров; красная пульпа была резко полнокровна, ее клеточный состав соответствовал норме.

Таким образом, наиболее ярким морфологическим признаком острой интоксикации SkQ1 был отек легких, который, очевидно, и является причиной гибели животных. У погибших крыс были отмечены также неспецифические изменения в форме неравномерного полнокровия сосудов разных органов, а также эритроцитарные экстравазаты в тимусе, которые являются известной реакцией сосудистого русла этого органа на гиперкапнию (наблюдается, в частности, при эвтаназии животных углекислым газом) [Frith et al., 2000], в данном случае вызванную нарушением газообмена в отечных легких.

### 3.1.2 Морфологическое состояние органов и тканей после хронического перорального введения препарата SkQ1

Кроме исследования общей токсичности SkQ1 как потенциальной лекарственной субстанции, было произведено изучение возможных токсикопатологических эффектов данного препарата в составе лекарственной рецептуры для перорального введения. Исследовали животных (самцов и самок), получавших препарат в двух дозах в течение 4 и 8 недель и еще в двух группах (одна – самцы, другая - самки) после 8 недель введение препарата прекращалось, и животные дополнительно содержались в течение 2 недель в тех же условиях («период восстановления»). Массы и весовые коэффициенты внутренних органов крыс приведены в таблицах 7 и 8. Выявленные в нескольких случаях различия между группами животных носили случайных и несистематический характер: например, тимус у самок, получавших 400 нмоль/кг/сутки SkQ1 в течение 4 недель, был меньше, а у самок, которым вводили 2000 нмоль/кг препарата в сутки в течение 8 недель – больше, чем у контрольных животных. Применение поправки Бонферрони на множественные сравнения при статистическом анализе показывает, что эти различия во всех группах имеют случайную природу и недостоверны.

#### 3.1.2.1 Суммарное описание морфологии органов у контрольных самок разных групп

Результаты макроскопического исследования органов животных

*Шерсть* животных чистая, гладкая. *Кожа* розовая, покровы подошвенных частей стоп бледные, иногда отмечался умеренный цианоз. Отмечалась бледность склер (конъюнктив), бледность или небольшой цианоз *видимых слизистых оболочек* (рта, носа) без патологических продуктов или изъязвлений на них. *Анус* во всех случаях сомкнут.

*Подкожная клетчатка* была выражена незначительно, мышцы нормальной консистенции, анемичные. Размеры и окраска *подкожных лимфатических узлов* были в пределах нормы. *Молочные железы* не изменены.

*Костно-суставной аппарат* видимых изменений не имел.

*Мягкие ткани шеи, трахея, гортань, глотка, щитовидная и слюнные железы* без видимых изменений. *Пищевод* видимых изменений не имел. При вскрытии

Таблица 7 – Абсолютные массы внутренних органов крыс (мг, M±m) в эксперименте по исследованию токсичности хронического перорального введения SkQ1

| | 0 недель | 4 недели | 8 нед | 8 недели+2 недели восстановления |
|---|---|---|---|---|
| ***Мозг*** | | | | |
| Самцы | | | | |
| Контроль | 2046±35 | 2174±23 | 2174±24 | 2151±22 |
| 400 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 2165±42 | 2185±22 | 2245±50 |
| 2000нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 2152±38 | 2194±25 | 2232±29 |
| Самки | | | | |
| Контроль | 1941±32 | 1952±40 | 2014±32 | 1966±25 |
| 400 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 2036±23 | 2012±41 | 2078±23 |
| 2000нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 1919±32 | 2031±32 | 2004±30 |
| ***Легкие*** | | | | |
| Самцы | | | | |
| Контроль | 1914±135 | 2032±128 | 1998±78 | 2266±243 |
| 400 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 2212±265 | 2119±217 | 2100±126 |
| 2000нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 1579±100 | 2292±354 | 2473±296 |
| Самки | | | | |
| Контроль | 1486±78 | 1723±123 | 1844±139 | 1680±101 |
| 400 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 1810±228 | 1692±74 | 1790±141 |
| 2000нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 1486±60 | 1790±143 | 2004±295 |
| ***Сердце*** | | | | |
| Самцы | | | | |
| Контроль | 1190±48 | 1343±23 | 1433±55 | 1396±46 |
| 400 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 1400±56 | 1483±39 | 1512±32 |
| 2000нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 1320±37 | 1443±85 | 1513±92 |
| Самки | | | | |
| Контроль | 882±13 | 970±39 | 967±21 | 992±28 |
| 400 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 905±26 | 941±35 | 1039±35 |
| 2000нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 915±45 | 992±50 | 935±24 |
| ***Печень, г*** | | | | |
| Самцы | | | | |
| Контроль | 16.8±1.1 | 19.4±1.6 | 20.5±0.6 | 19.8±1.1 |
| 400 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 18.4±1.5 | 22.1±1.0 | 19.0±0.4 |
| 2000нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 17.3±1.4 | 20.6±1.4 | 21.6±1.9 |

*Продолжение таблицы 7*

| | 0 недель | 4 недели | 8 недель | 8 недель+2 недели восстановления |
|---|---|---|---|---|
| ***Печень, г*** | | | | |
| Самки | | | | |
| Контроль | 11.0±0.4 | 14.6±0.8 | 14.6±0.4 | 14.5±0.6 |
| 400 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 13.4±0.4 | 13.5±0.5 | 13.7±0.6 |
| 2000нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 12.6±0.6 | 14.2±1.0 | 13.9±0.9 |
| ***Почки*** | | | | |
| Самцы | | | | |
| Контроль | 3602±246 | 3577±89 | 4269±198 | 4421±232 |
| 400 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 4099±254 | 4563±154 | 4345±244 |
| 2000 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 3241±180 | 4234±157 | 4510±263 |
| Самки | | | | |
| Контроль | 2553±53 | 2644±89 | 2739±58 | 2918±105 |
| 400 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 2615±70 | 2834±108 | 2871±65 |
| 2000 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 2487±109 | 2699±166 | 2793±125 |
| ***Надпочечники*** | | | | |
| Самцы | | | | |
| Контроль | 76±6 | 91±4 | 87±7 | 79±4 |
| 400 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 101±8 | 81±5 | 72±3 |
| 2000 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 73±5 | 86±5 | 82±6 |
| Самки | | | | |
| Контроль | 100±2 | 109±6 | 117±3 | 119±6 |
| 400 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 121±4 | 108±8 | 117±5 |
| 2000 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 102±5 | 116±6 | 115±9 |
| ***Тимус*** | | | | |
| Самцы | | | | |
| Контроль | 402±23 | 496±35 | 303±14 | 235±32 |
| 400 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 455±17 | 366±19 | 252±22 |
| 2000 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 467±20 | 330±32 | 236±33 |
| Самки | | | | |
| Контроль | 389±21 | 456±37 | 348±16 | 334±15 |
| 400 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 429±28 | 347±14 | 361±25 |
| 2000 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 444±43 | 349±21 | 312±19 |
| ***Селезенка*** | | | | |
| Самцы | | | | |
| Контроль | 927±80 | 994±47 | 1077±59 | 918±55 |
| 400 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 961±55 | 983±49 | 903±36 |
| 2000 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 788±69 | 1112±118 | 1030±102 |
| Самки | | | | |
| Контроль | 794±29 | 788±55 | 733±33 | 758±38 |
| 400 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 661±68 | 735±36 | 806±39 |
| 2000 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 652±22 | 839±42 | 735±22 |
| ***Полостной жир (эпидидимальный у самцов, яичниковый – у самок)*** | | | | |
| Самцы | | | | |
| Контроль | - | 7547±982 | 10142±1038 | 10627±1539 |
| 400 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 7112±743 | 14202±1476 | 7150±667 |
| 2000 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 5376±527 | 8972±1184 | 10359±1837 |

*Окончание таблицы 7*

| | 0 недель | 4 недели | 8 недель | 8 недель+2 недели восстановления |
|---|---|---|---|---|
| ***Полостной жир (эпидидимальный у самцов, яичниковый – у самок)*** | | | | |
| Самки | | | | |
| Контроль | - | - | 5834±421 | 7400±1218 |
| 400 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | - | 4694±676 | 6831±1156 |
| 2000 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | - | 4346±884 | 5853±1241 |
| ***Репродуктивные органы самцов*** | | | | |
| Семенники | | | | |
| Контроль | 3715±169 | 3340±155 | 3927±179 | 3808±215 |
| 400 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 3770±66 | 3979±160 | 3832±190 |
| 2000 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 3296±104 | 3936±143 | 4120±192 |
| Придатки семенников | | | | |
| Контроль | 1140±61 | 1276±68 | 1419±47 | 1512±71 |
| 400 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 1383±19 | 1418±37 | 1378±30 |
| 2000 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 1221±23 | 1389±53 | 1602±106 |
| Вентральные доли простаты | | | | |
| Контроль | 709±48 | 716±75 | 742±59 | 777±35 |
| 400 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 814±85 | 674±92 | 831±97 |
| 2000 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 714±54 | 733±46 | 734±61 |
| ***Репродуктивные органы самок*** | | | | |
| Яичники (с яйцеводами) | | | | |
| Контроль | 140±7 | 142±7 | 126±4 | 124±6 |
| 400 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 151±11 | 127±9 | 138±7 |
| 2000 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 145±8 | 126±11 | 117±7 |
| Матка | | | | |
| Контроль | 505±36 | 488±35 | 573±32 | 556±41 |
| 400 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 519±36 | 678±65 | 645±69 |
| 2000 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 504±36 | 601±57 | 552±29 |

Таблица 8 – Относительные массы внутренних органов крыс (г/кг массы тела, M±m) в эксперименте по исследованию токсичности хронического перорального введения SkQ1

| | 0 недель | 4 недели | 8 недели | 8 недель+2 недели восстановления |
|---|---|---|---|---|
| ***Мозг*** | | | | |
| Самцы | | | | |
| Контроль | 5.87±0.19 | 5.14±0.24 | 4.67±0.16 | 4.31±0.09 |
| 400 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 5.04±0.22 | 4.25±0.13 | 4.56±0.12 |
| 2000 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 5.47±0.16 | 4.70±0.16 | 4.39±0.24 |
| Самки | | | | |
| Контроль | 7.93±0.17 | 7.61±0.29 | 7.00±0.16 | 6.69±0.22 |
| 400 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 7.86±0.15 | 7.60±0.20 | 6.89±0.12 |
| 2000 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 8.07±0.35 | 7.47±0.32 | 7.08±0.26 |
| ***Легкие*** | | | | |
| Самцы | | | | |
| Контроль | 5.44±0.32 | 4.80±0.36 | 4.30±0.23 | 4.49±0.39 |
| 400 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 5.08±0.49 | 4.07±0.30 | 4.26±0.26 |
| 2000 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 4.01±0.26 | 4.75±0.47 | 4.96±0.87 |
| Самки | | | | |
| Контроль | 6.05±0.28 | 6.67±0.39 | 6.40±0.45 | 5.75±0.49 |
| 400 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 6.94±0.79 | 6.38±0.26 | 5.97±0.54 |
| 2000нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 6.25±0.34 | 6.60±0.70 | 7.09±1.12 |

*Продолжение таблицы 8*

| | 0 недель | 4 недели | 8 недели | 8 недель+2 недели восстановления |
|---|---|---|---|---|
| ***Сердце*** | | | | |
| Самцы | | | | |
| Контроль | 3.39±0.09 | 3.17±0.12 | 3.07±0.10 | 2.79±0.04 |
| 400 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 3.24±0.09 | 2.89±0.12 | 3.07±0.07 |
| 2000 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 3.35±0.08 | 3.05±0.06 | 2.92±0.07 |
| Самки | | | | |
| Контроль | 3.60±0.05 | 3.75±0.07 | 3.37±0.10 | 3.37±0.11 |
| 400 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 3.49±0.10 | 3.55±0.13 | 3.44±0.10 |
| 2000 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 3.82±0.14 | 3.61±0.10 | 3.28±0.05 |
| ***Печень, г*** | | | | |
| Самцы | | | | |
| Контроль | 47.80±1.95 | 46.35±5.17 | 44.04±1.67 | 39.54±1.97 |
| 400 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 42.39±2.97 | 42.93±2.31 | 38.64±0.67 |
| 2000 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 43.35±2.46 | 43.62±1.63 | 41.25±1.32 |
| Самки | | | | |
| Контроль | 44.78±1.50 | 56.39±1.63 | 50.72±1.63 | 48.81±0.59 |
| 400 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 51.73±1.96 | 50.80±1.82 | 45.32±2.06 |
| 2000 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 52.67±2.29 | 51.27±1.96 | 48.27±1.59 |
| ***Почки*** | | | | |
| Самцы | | | | |
| Контроль | 10.19±0.42 | 8.48±0.50 | 9.11±0.27 | 8.81±0.35 |
| 400 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 9.47±0.49 | 8.89±0.45 | 8.81±0.44 |
| 2000 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 8.17±0.28 | 9.02±0.23 | 8.72±0.30 |
| Самки | | | | |
| Контроль | 10.42±0.17 | 10.27±0.30 | 9.52±0.23 | 9.89±0.33 |
| 400 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 10.09±0.28 | 10.68±0.35 | 9.52±0.19 |
| 2000 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 10.36±0.19 | 9.79±0.25 | 9.77±0.16 |
| ***Надпочечники*** | | | | |
| Самцы | | | | |
| Контроль | 0.22±0.01 | 0.22±0.02 | 0.18±0.01 | 0.16±0.01 |
| 400 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 0.23±0.02 | 0.16±0.01 | 0.15±0.00 |
| 2000 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 0.18±0.01 | 0.18±0.01 | 0.16±0.01 |
| Самки | | | | |
| Контроль | 0.41±0.01 | 0.42±0.02 | 0.41±0.01 | 0.40±0.02 |
| 400 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 0.47±0.01 | 0.40±0.02 | 0.39±0.02 |
| 2000 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 0.43±0.02 | 0.42±0.02 | 0.40±0.02 |
| ***Тимус*** | | | | |
| Самцы | | | | |
| Контроль | 1.17±0.10 | 1.16±0.08 | 0.65±0.03 | 0.47±0.07 |
| 400 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 1.06±0.05 | 0.71±0.05 | 0.51±0.04 |
| 2000 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 1.19±0.07 | 0.70±0.07 | 0.45±0.04 |
| Самки | | | | |
| Контроль | 1.58±0.07 | 1.77±0.15 | 1.21±0.07 | 1.14±0.06 |
| 400 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 1.65±0.11 | 1.31±0.05 | 1.20±0.08 |
| 2000 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 1.83±0.14 | 1.27±0.05 | 1.10±0.07 |

*Окончание таблицы 8*

| | 0 недель | 4 недели | 8 недели | 8 недель+2 недели восстановления |
|---|---|---|---|---|
| ***Селезенка*** | | | | |
| Самцы | | | | |
| Контроль | 2.61±0.13 | 2.34±0.13 | 2.31±0.14 | 1.83±0.08 |
| 400 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 2.24±0.15 | 1.91±0.10 | 1.84±0.08 |
| 2000 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 2.02±0.22 | 2.37±0.25 | 1.98±0.16 |
| Самки | | | | |
| Контроль | 3.24±0.10 | 3.08±0.25 | 2.55±0.13 | 2.56±0.08 |
| 400 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 2.54±0.24 | 2.76±0.06 | 2.67±0.11 |
| 2000 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 2.74±0.13 | 3.06±0.11 | 2.58±0.06 |
| ***Полостной жир (эпидидимальный у самцов, яичниковый – у самок)*** | | | | |
| Самцы | | | | |
| Контроль | - | 17.29±1.51 | 21.66±2.10 | 20.97±2.64 |
| 400 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 16.41±1.55 | 27.35±2.51 | 14.52±1.37 |
| 2000нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 13.62±1.31 | 18.85±2.00 | 19.32±2.72 |
| Самки | | | | |
| Контроль | - | - | 20.21±1.30 | 24.49±3.31 |
| 400 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | - | 17.36±2.02 | 22.36±3.38 |
| 2000 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | - | 15.32±2.51 | 19.92±3.72 |
| ***Репродуктивные органы самцов*** | | | | |
| Семенники | | | | |
| Контроль | 10.56±0.22 | 7.87±0.42 | 8.40±0.32 | 7.58±0.28 |
| 400 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 8.76±0.27 | 7.75±0.41 | 7.80±0.44 |
| 2000 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 8.40±0.42 | 8.40±0.29 | 8.02±0.36 |
| Придатки семенников | | | | |
| Контроль | 3.24±0.12 | 3.00±0.16 | 3.03±0.06 | 3.01±0.08 |
| 400 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 3.21±0.08 | 2.76±0.11 | 2.80±0.10 |
| 2000 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 3.11±0.13 | 2.96±0.11 | 3.10±0.14 |
| Вентральные доли простаты | | | | |
| Контроль | 2.03±0.15 | 1.67±0.16 | 1.59±0.13 | 1.56±0.09 |
| 400 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 1.89±0.19 | 1.31±0.17 | 1.68±0.19 |
| 2000 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 1.83±0.16 | 1.57±0.11 | 1.42±0.09 |
| ***Репродуктивные органы самок*** | | | | |
| Яичники (с яйцеводами) | | | | |
| Контроль | 0.57±0.02 | 0.55±0.02 | 0.44±0.01 | 0.42±0.02 |
| 400 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 0.58±0.04 | 0.48±0.03 | 0.46±0.02 |
| 2000 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 0.61±0.05 | 0.46±0.03 | 0.41±0.02 |
| Матка | | | | |
| Контроль | 2.06±0.13 | 1.89±0.14 | 1.99±0.10 | 1.91±0.17 |
| 400 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 2.01±0.15 | 2.56±0.24 | 2.15±0.26 |
| 2000 нмоль/кг/сутки SkQ1 | - | 2.10±0.10 | 2.18±0.16 | 1.94±0.10 |

*грудной полости* обнаруживали гладкую, блестящую висцеральную и париетальную *плевру*, без наличия выпота в плевральной полости. *Тимус* имел нормальные размеры, сероватый или серовато-желтый цвет, иногда на его

поверхности обнаруживались единичные бледные петехии. *Легкие* покрыты гладкой блестящей висцеральной плеврой, имели серовато-розовый цвет, нормальное кровенаполнение, «воздушную» консистенцию, коллапс после вскрытия грудной полости выражен в нормальной степени. *Перикард* без особенностей. При исследовании сердца в небольшом числе случаев отмечалась выраженная инъекция эпикардиальных сосудов. Примерно в половине случаев обнаруживалось переполнение камер сердца жидкой темной кровью, иногда со сгустками, в других случаях выявляли пустые желудочки. Миокард, эндокард и клапаны изменений не имели. *Легочная и полые вены* переполнены кровью черно-красного цвета.

При исследовании *брюшной полости* обнаруживалось анатомически правильное расположение внутренних органов, отсутствие выпота, блестящая и гладкая висцеральная и париетальная брюшина. *Печень* умеренно полнокровная, темно-красно-коричневая с сизым оттенком, иногда с видимым крапчатым рисунком долек, края острые или слегка закруглены. На разрезе ткань умеренно плотная, нормального кровенаполнения. *Желудок* был наполнен небольшим количеством желтоватого содержимого, слизистая оболочка бледноватая, сероза морфологических изменений не имела. В *тонком кишечнике* присутствовало нормальное количество физиологического кашецеобразного полужидкого содержимого желтовато-коричневого цвета, без специфического запаха. Пейеровы бляшки хорошо выражены. *Слепая кишка* заполнена физиологическим содержимым, стенка ее видимых особенностей не имела. *Толстая кишка* содержала оформленный кал. Слизистая оболочка кишки и сероза видимых изменений не имели. Сосуды *брыжейки* умеренно инъецированы, *абдоминальные лимфатические узлы* нормальных размеров и окраски. *Сальник* без морфологических изменений. *Поджелудочная железа* нормальной консистенции, беловато-желтого или бледно-коричневатого цвета, без видимых изменений. *Селезенка* темно-красного цвета, с гладкой поверхностью, эластичной консистенции, на разрезе без обильного соскоба. *Почки* в половине случаев были анемичны, кора и пирамида – бледные, в других случаях отмечалось умеренное

или выраженное неравномерное полнокровие коры и интермедиальной зоны при нормальном кровенаполнении пирамиды. Капсула снималась легко во всех случаях, лоханка без особенностей. *Надпочечники* желтого или желтовато-коричневого цвета, без видимых изменений. *Мочевой пузырь* был пуст, иногда содержал небольшое количество прозрачной желтоватой мочи. Стенка мочевого пузыря макроскопических изменений не имела.

*Половые органы* видимых изменений не имели.

При осмотре *полости черепа* и *твердой мозговой оболочки* изменений не найдено. Внешний осмотр *головного мозга* аномалий строения и патологических изменений не выявил. На поперечных разрезах структуры головного мозга видимых изменений не имели.

Результаты гистологического исследования органов животных

*Кожа:* покрыта эпидермисом, состоящим из отчетливых базального, шиповатого, зернистого и рогового слоев. Строение слоев и морфология кератиноцитов не отличаются от нормы, целостность их нигде не нарушена. Дерма представлена волокнистой соединительной тканью без признаков инфильтрации, фиброза или иных патологических изменений. В дерме содержаться волосяные фолликулы и сальные железы нормального строения. В части образцов присутствуют небольшое количество подкожной жировой клетчатки и нормальные элементы молочной железы.

*Глаз и его придаточный аппарат:* роговица покрыта интактным многослойным плоским неороговевающим эпителием с хорошо выраженной стратификацией; собственное вещество роговицы построено из коллагеновых волокон и фибробластоподобных клеток, без патологических изменений, десцеметова мембрана интактна. Передняя камера глаза патологических изменений не имеет, радужка, и цилиарное тело без видимых изменений, угол передней камеры глаза и фонтановы пространства не склерозированы. Капсула хрусталика отчетливо видна, собственно хрусталик состоит из неизмененных хрусталиковых волокон. Видимые на препарате элементы стекловидного тела гомогенные, без клеточной

инфильтрации. Сетчатка имеет типичное зональное строение, ядерные, фоторецепторный, сетчатые и ганглионарный слои хорошо выражены, инфильтрации, деструктивных и дистрофических изменений не имеют. Слой нервных волокон хорошо выражен, интактен. Сосудистая оболочка заднего сектора глаза, склера, пигментный эпителий, диск и начальный ретробульбарный отрезок зрительного нерва, а также веки и конъюнктива видимых изменений не имеют. Железа Гардера построена из ацинусов, сложенных из мономорфных клеток с пенистой цитоплазмой и пикнотичными ядрами, протоки и интерстиций не изменены.

*Головной мозг:* зональная структура коры, строение белого вещества и гиппокампа отчетливо прослеживаются; отмечаются небольшое агональное полнокровие сосудов в ткани мозга, а также в мозговых оболочках и в хороидном сплетении с явлениями сладжа эритроцитов; отдельные «темные» пирамидные клетки.

*Сердце:* эпикард, миокард, эндокард, его дупликатуры (клапаны) и субэндокардиальный слой – у большинства животных без патологических особенностей. Кардиомиоциты имеют типичный вид и нормальное расположение. Количество стромальной соединительной ткани в пределах нормы, сосуды стромы умеренного кровенаполнения. Только в одном случае отмечались небольшие очаги фиброза миокарда – слабо выраженная кардиомиопатия (диагноз «миокардит» у мышей и крыс может быть установлен только в том случае, если он является компонентом достоверно выявленного инфекционного заболевания, в прочих случаях воспалительные и склеротические изменения в сердце принято обозначать как кардиомиопатию (Ruben et al., 1992; Tucker, 1997; Pathobiology…, 1996; Pathology of the mouse…, 1999)) (рисунок 5).

*Аорта:* просвет сосуда патологических элементов не содержит, эндотелий, подэндотелиальный слой, средняя оболочка и адвентиция с прилежащей бурой жировой клетчаткой без патологических явлений.

*Легкие:* при малом увеличении прослеживается нормальное строение органа. Типичная структура стенок бронхов сохранена, морфологических изменений в

них не отмечено. Стенки альвеол не утолщены, обычного кровенаполнения. Альвеолярные ходы и мешочки нормальных размеров. Просвет альвеол и бронхов пуст. В одном случае обнаружен умеренный агональный периваскулярный отек легких.

*Тимус:* имел типичное дольчатое строение с отчетливой границей между темной, богатой лимфоцитами корой и более светлым мозговым веществом. Дольки разделены интактной капсулой. Иногда под капсулой видны небольшие эритроцитарные экстравазаты без явлений воспаления. Стромальные эпителиальные клетки крупные, светлые, с пузырьковидным ядром, без заметных патологических изменений. Лимфоциты представлены нормальными зрелыми формами с небольшим числом бластных клеток. Вокруг тимуса отмечается значительное количество интактной медиастинальной жировой клетчатки.

*Слюнные железы:* околоушная, поднижнечелюстная и подъязычная железы построены по обычному ацинарному типу с соответствующим каждой железе нормальным вариантом секреторного концевого отдела (серозного, серозно-муцинозного и муцинозного соответственно). Паренхима и строма желез без патологических изменений.

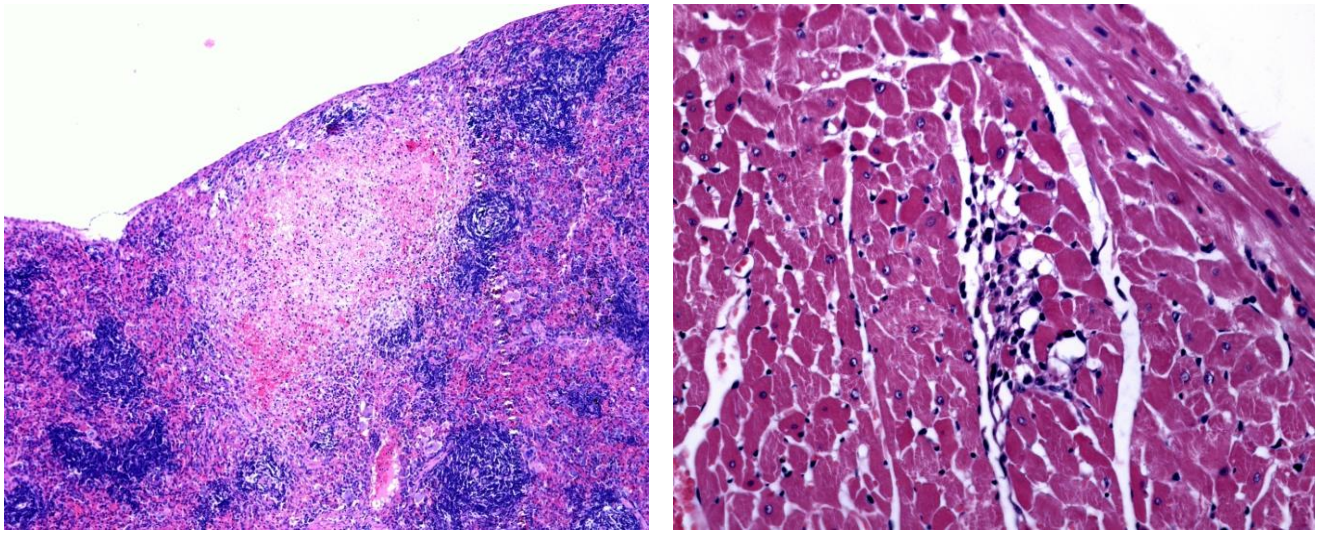


Рисунок 5 – Морфологические проявления острого инфаркта селезенки (левый рисунок) и кардиомиопатии (правый рисунок), найденные у контрольных самок крыс Вистар: окраска гематоксилином и эозином, левый рисунок – х100, правый – х400.

*Лимфатические узлы:* покрыты интактной капсулой, имеют типичное зональное строение, содержат корковое плато, паракортикальную зону и мозговые тяжи нормальной морфологии. Герминальные центры выражены слабо или совсем не отмечаются.

*Гортань:* слизистая оболочка интактна, голосовые связки, мышечный и хрящевой аппарат, а также адвентиция без патологических явлений.

*Трахея:* просвет патологических продуктов не содержит, слизистая оболочка интактна, покрыта реснитчатым эпителием респираторного типа. Хрящевая основа трахеи и надхрящница, а также адвентиция патологических изменений не имеют.

*Пищевод:* имеет интактную морфологию, слизистая оболочка покрыта нормальным плоским ороговевающим эпителием, имеющим типичную стратификацию, со стороны подслизистой, мышечной оболочки (состоящей из двух слоев поперечнополосатой мускулатуры) и адвентиции изменений не отмечено.

*Желудок:* эпителий слизистой оболочки преджелудка и слизистой части желудка обычного строения. Структура и клеточный состав желез слизистой оболочки в пределах нормы. Во всех случаях отмечена слабая диффузная инфильтрация слизистой оболочки всех отделов зрелыми полиморфноядерными лейкоцитами нормальной морфологии. Мышечная оболочка, подслизистая основа и серозная оболочка без изменений.

*Двенадцатиперстная кишка:* слизистая оболочка, подслизистая основа, мышечная оболочка и сероза без патологических изменений, ворсинки и крипты хорошо выражены, покрыты интактным эпителием. В подслизистой основе содержаться бруннеровы железы нормальной морфологии.

*Тощая кишка*: все компоненты слизистой оболочки интактны, ворсинки хорошо выражены; подслизистая основа, мышечная оболочка и сероза без патологических изменений.

*Слепая кишка:* выстилающие эпителиоциты хорошо выражены, интактные; крипты не увеличены, количество бокаловидных клеток и их секреторная

активность в пределах нормы; собственная пластинка слизистой оболочки содержит небольшое количество зрелых лимфоцитов, рассеянных диффузно; подслизистая основа, мышечная оболочка и сероза без патологических изменений.

*Толстая кишка*: выстилающие эпителиоциты хорошо выражены, интактные; крипты не увеличены, количество бокаловидных клеток и их секреторная активность в пределах нормы; собственная пластинка слизистой оболочки содержит небольшое количество зрелых лимфоцитов, рассеянных диффузно; подслизистая основа, мышечная оболочка и сероза без патологических изменений.

*Печень:* во всех отчетливо прослеживается дольчатая структура органа. Синусоиды, сосуды портальных трактов и центральные вены обычного кровенаполнения. Пространства Диссе не расширены, количество стромальной соединительной ткани портальных трактов в пределах нормы. Инфильтрации в портальных трактах и в паренхиме органа не отмечено, за исключением единичных незрелых гематопоэтических клеток. Со стороны клеток Купфера, эндотелия сосудов и гепатоцитов изменений не наблюдается.

*Селезенка*: капсула и трабекулярный аппарат нормальной толщины, без морфологических изменений. У одного животного найден некроз типичной клиновидной формы с умеренно выраженными явлениями демаркационного воспаления (острый инфаркт) (рисунок 5). В прочих случаях общая структура органа сохранена, отмечается нормальное соотношение красной и белой пульпы. Фолликулы имеют нормальное строение, зональная структура отчетливо прослеживается, герминальные центры отсутствуют. Инфильтрации красной пульпы со стороны маргинальной зоны фолликулов не отмечено. Красная пульпа умеренно полнокровная, имеет нормальный клеточный состав, представленный зрелыми лимфоцитами, плазмоцитами и макрофагами. Сосудистые структуры селезенки без морфологических изменений.

*Почки*: отчетливо прослеживаются корковый и мозговой слои типичного строения. Клубочки имеют нормальную структуру, базальные мембраны не

утолщены, клеточность клубочков в пределах нормы. Проксимальные и дистальные канальцы нормальной структуры, эпителий без признаков дистрофии. Мозговое вещество у всех животных содержало базофильные депозиты фосфорнокислого кальция. Интерстиций во всех случаях имел нормальную морфологию, количество его не увеличено. Сосуды почки нормального кровенаполнения.

*Мочевой пузырь:* слизистая оболочка покрыта нормальным переходным эпителием, в полости органа патологических продуктов не отмечено, собственная пластинка слизистой оболочки, мышечная оболочка и адвентиция без патологических изменений.

*Яичники:* окружены интактной яичниковой капсулой; поверхность органа покрыта неизмененным герминальным эпителием. Строма органа интактна, окружает нормальное число примордиальные фолликулов неизмененной морфологии, а также фолликулы на разных стадиях цикла – первичные, вторичные и желтые тела с соответствующими нормальными чертами морфологического строения.

*Матка*: просвет матки обычных размеров, патологических продуктов не содержит. Эндометрий выстлан цилиндрическим эпителием нормальной морфологии, под которым располагается строма матки с хорошо заметными железами без признаков значительной воспалительной инфильтрации. Миометрий представлен слоями, состоящими из гладких миоцитов с хорошо различимыми ядрами. Серозная оболочка матки сохраняет нормальное строение на всем протяжении, патологических образований на ее поверхности нет.

*Гипофиз:* общая структура органа во всех случаях сохранена, отчетливо видны дистальная и промежуточная часть, а также нейрогипофиз обычного строения. В дистальной части (аденогипофизе) соотношение между базофильными и оксифильными клетками нормальное. Дистрофические, гипертрофические или воспалительные изменения отсутствуют в любой части органа.

*Щитовидная железа:* представлена фолликулярными структурами вариабельного размера, содержащими эозинофильный коллоид и выстланными эпителиальными

клетками разной морфологии – от цилиндрической до уплощенной, в зависимости от степени наполненности коллоидом. Эпителиальные клетки фолликулов имеют нормальную морфологию. Парафолликулярные клетки расположены в интерстиции, количество и морфология их соответствуют норме. В интерстиции железы патологических изменений не отмечено.

*Надпочечники:* общая структура сохранена, капсула интактна, корковое вещество состоит из хорошо выраженных клубочковой, пучковой и сетчатой зон, причем в цитоплазме клеток пучковой зоне отмечается вариабельное количество округлых пустот (липидных капель), отражающее нормальную вариабельность функциональной активности клеток этой зоны. Гипертрофических и гиперпластических явлений в корковом веществе не отмечено. Клетки мозгового вещества имеет типичную нормальную морфологию.

*Поджелудочная железа:* расположена в нормальной абдоминальной жировой ткани, ацинарные клетки типичного вида, с четкой базофилией периферических отделов цитоплазмы и круглым компактным ядром; экзокриноциты собраны в типичные концевые отделы; эпителий протоков интактен; инсулярный аппарат представлен в основном широкоцитоплазменными клетками с круглым ядром (бета-клетки) с небольшим числом узкоцитоплазменных клеток (альфа-клетки и другие клеточные элементы), располагающихся по периферии островков; патологических изменений в островках Лангерганса не отмечено. Строма органа также без патологических изменений.

*Скелетная мышца*: состоит из поперечнополосатых многоядерных миосимпластов обычной морфологии с хорошо заметной исчерченностью и периферически расположенными ядрами. Миоциты собраны в пучки, разделенные интерстициальной тканью без признаков фиброза и воспалительной инфильтрации.

### 3.1.2.2 Суммарное описание морфологии органов у контрольных самцов разных групп

Результаты макроскопического исследования органов животных

*Шерсть* животных чистая, гладкая. *Кожа* розовая, покровы подошвенных частей стоп бледные, иногда отмечался умеренный цианоз. Отмечалась бледность склер (конъюнктив), бледность или небольшой цианоз *видимых слизистых оболочек* (рта, носа) без патологических продуктов или изъязвлений на них. *Анус* во всех случаях сомкнут.

*Подкожная клетчатка* была выражена незначительно, мышцы нормальной консистенции, анемичные. Размеры и окраска *подкожных лимфатических узлов* были в пределах нормы.

*Костно-суставной аппарат* видимых изменений не имел.

*Мягкие ткани шеи, трахея, гортань, глотка, щитовидная и слюнные железы* без видимых изменений.

*Пищевод* видимых изменений не имел.

При вскрытии *грудной полости* обнаруживали гладкую, блестящую висцеральную и париетальную *плевру*, без наличия выпота в плевральной полости. *Тимус* имел нормальные размеры, сероватый или серовато-желтый цвет, иногда на его поверхности обнаруживались единичные бледные петехии. *Легкие* покрыты гладкой блестящей висцеральной плеврой, имели серовато-розовый цвет, нормальное кровенаполнение, «воздушную» консистенцию, коллапс после вскрытия грудной полости выражен в нормальной степени. *Перикард* без особенностей. При исследовании сердца в небольшом числе случаев отмечалась выраженная инъекция эпикардиальных сосудов. Примерно в половине случаев обнаруживалось переполнение камер средца жидкой темной кровью, иногда со сгустками, в других случаях выявляли пустые желудочки. Миокард, эндокард и клапаны изменений не имели.

*Легочная и полые вены* были переполнены кровью черно-красного цвета.

При исследовании *брюшной полости* обнаруживалось анатомически правильное расположение внутренних органов, отсутствие выпота, блестящая и гладкая висцеральная и париетальная брюшина. *Печень* умеренно полнокровная, темно-красно-коричневая с сизым оттенком, иногда с видимым крапчатым рисунком долек, края острые или слегка закруглены. На разрезе ткань умеренно плотная, нормального кровенаполнения. *Желудок* был наполнен небольшим количеством желтоватого содержимого, слизистая бледноватая, сероза морфологических изменений не имела. В одном случае был найден язвенный дефект слизистой оболочки. В *тонком кишечнике* присутствовало нормальное количество физиологического кашецеобразного полужидкого содержимого желтовато-коричневого цвета, без специфического запаха. Пейеровы бляшки хорошо выражены. У одного животного был найден красноватый дефект слизистой оболочки 1х1 мм. *Слепая кишка* заполнена физиологическим содержимым, стенка ее видимых особенностей не имела. *Толстая кишка* содержала оформленный кал. Слизистая кишки и сероза видимых изменений не имели. Сосуды *брыжейки* умеренно инъецированы, *абдоминальные лимфатические узлы* нормальных размеров и окраски. *Сальник* без морфологических изменений. *Поджелудочная железа* нормальной консистенции, беловато-желтого или бледно-коричневатого цвета, без видимых изменений. *Селезенка* темно-красного цвета, с гладкой поверхностью, эластичной консистенции, на разрезе без обильного соскоба.

*Почки* в половине случаев были анемичны, кора и пирамида – бледные, в других случаях отмечалось умеренное или выраженное неравномерное полнокровие коры и интермедиальной зоны при нормальном кровенаполнении пирамиды. Капсула снималась легко во всех случаях, лоханка без особенностей.

*Надпочечники* желтого или желтовато-коричневого цвета, во всех случаях без видимых изменений.

*Мочевой пузырь* был пуст, иногда содержал небольшое количество прозрачной желтоватой мочи. Стенка мочевого пузыря макроскопических изменений не имела.

*Половые органы* видимых изменений не имели.

При осмотре *полости черепа* и *твердой мозговой оболочки* изменений не найдено. Внешний осмотр *головного мозга* аномалий строения и патологических изменений не выявил. На поперечных разрезах структуры головного мозга видимых изменений не имели.

Результаты гистологического исследования органов животных

*Кожа:* покрыта эпидермисом, состоящим из отчетливых базального, шиповатого, зернистого и рогового слоев. Строение слоев и морфология кератиноцитов не отличаются от нормы, целостность их нигде не нарушена. Дерма представлена волокнистой соединительной тканью без признаков инфильтрации, фиброза или иных патологических изменений. В дерме содержаться волосяные фолликулы и сальные железы нормального строения. В части образцов присутствует небольшое количество подкожной жировой клетчатки.

*Глаз и его придаточный аппарат:* роговица покрыта интактным многослойным плоским неороговевающим эпителием с хорошо выраженной стратификацией; собственное вещество роговицы построено из коллагеновых волокон и веретеновидных клеток, без патологических изменений, десцеметова мембрана интактна. Передняя камера глаза патологических изменений не имеет, радужка, и цилиарное тело без видимых изменений, угол передней камеры глаза и фонтановы пространства не склерозированы. Капсула хрусталика отчетливо видна, собственно хрусталик состоит из неизмененных хрусталиковых волокон. Видимые на препарате элементы стекловидного тела гомогенные, без клеточной инфильтрации. Сетчатка имеет типичное зональное строение, ядерные, фоторецепторный, сетчатые и ганглионарный слои хорошо выражены, инфильтрации, деструктивных и дистрофических изменений не имеют. Слой нервных волокон хорошо выражен, интактен. Сосудистая оболочка заднего сектора глаза, склера, пигментный эпителий, диск и начальный ретробульбарный отрезок зрительного нерва, а также веки и конъюнктива видимых изменений не имеют. Железа Гардера построена из ацинусов, сложенных из мономорфных

клеток с пенистой цитоплазмой и пикнотичными ядрами, протоки и интерстиций не изменены.

*Головной мозг:* зональная структура коры, строение белого вещества и гиппокампа отчетливо прослеживаются; отмечается небольшое агональное полнокровие сосудов в ткани мозга, а также в мозговых оболочках и в сосудистом (хороидном) сплетении с явлениями сладжа эритроцитов; отдельные «темные» пирамидные клетки.

*Сердце:* эпикард, миокард, эндокард, его дупликатуры (клапаны) и субэндокардиальный слой – без патологических особенностей. Кардиомиоциты имеют типичный вид и нормальное расположение. Количество стромальной соединительной ткани в пределах нормы, сосуды стромы умеренного кровенаполнения.

*Аорта:* просвет сосуда патологических элементов не содержит, эндотелий, подэндотелиальный слой, средняя оболочка и адвентиция с прилежащей бурой жировой клетчаткой без патологических явлений.

*Легкие:* при малом увеличении прослеживается нормальное строение органа. Типичная структура стенок бронхов сохранена, морфологических изменений в них не отмечено. Стенки альвеол не утолщены, обычного кровенаполнения. Альвеолярные ходы и мешочки нормальных размеров. Просвет альвеол и бронхов пуст.

*Тимус:* имел типичное дольчатое строение с отчетливой границей между темной, богатой лимфоцитами корой и более светлым мозговым веществом. Дольки разделены интактной капсулой. Иногда под капсулой видны небольшие эритроцитарные экстравазаты без явлений воспаления. Стромальные эпителиальные клетки крупные, светлые, с пузырьковидным ядром, без заметных патологических изменений. Лимфоциты представлены нормальными зрелыми формами с небольшим числом бластных клеток. Вокруг тимуса отмечается значительное количество интактной медиастинальной жировой клетчатки. В двух случаях наблюдался массовый апоптоз лимфоцитов в коре с фагоцитозом апоптозных тел макрофагами (картина «звездного неба») (рисунок 6).

*Слюнные железы:* околоушная, поднижнечелюстная и подъязычная железы построены по обычному ацинарному типу с соответствующим каждой железе нормальным вариантом секреторного концевого отдела (серозного, серозно-муцинозного и муцинозного соответственно). Паренхима и строма желез без патологических изменений.

*Лимфатические узлы:* покрыты интактной капсулой, имеют типичное зональное строение, содержат корковое плато, паракортикальную зону и мозговые тяжи нормальной морфологии. Герминальные центры не отмечаются или слабо выражены.

*Гортань:* слизистая оболочка интактна, голосовые связки, мышечный и хрящевой аппарат, а также адвентиция без патологических явлений.

*Трахея:* просвет патологических продуктов не содержит, слизистая оболочка интактна, покрыта реснитчатым эпителием респираторного типа. Хрящевая основа трахеи и надхрящница, а также адвентиция патологических изменений не имеют.

*Пищевод:* имеет интактную морфологию, слизистая оболочка покрыта нормальным плоским ороговевающим эпителием, имеющим типичную стратификацию, со стороны подслизистой основы, мышечной оболочки (состоящей из двух слоев поперечнополосатой мускулатуры) и адвентиции изменений не отмечено.

*Желудок:* эпителий слизистой оболочки преджелудка и слизистой части желудка обычного строения. Структура и клеточный состав желез слизистой оболочки в пределах нормы, за исключением одного случая, в котором отмечен участок некроза слизистой оболочки с гиперемией и инфильтрацией нейтрофилами (острая язва) (рисунок 6). Во всех случаях отмечена слабая диффузная инфильтрация слизистой оболочки всех отделов зрелыми полиморфноядерными лейкоцитами нормальной морфологии. Мышечная оболочка, подслизистая основа и серозная оболочка без изменений.

*Двенадцатиперстная кишка:* слизистая оболочка, подслизистая основа, мышечная оболочка и сероза без патологических изменений, ворсинки и крипты

хорошо выражены, покрыты интактным эпителием. В подслизистой основе содержаться бруннеровы железы нормальной морфологии.

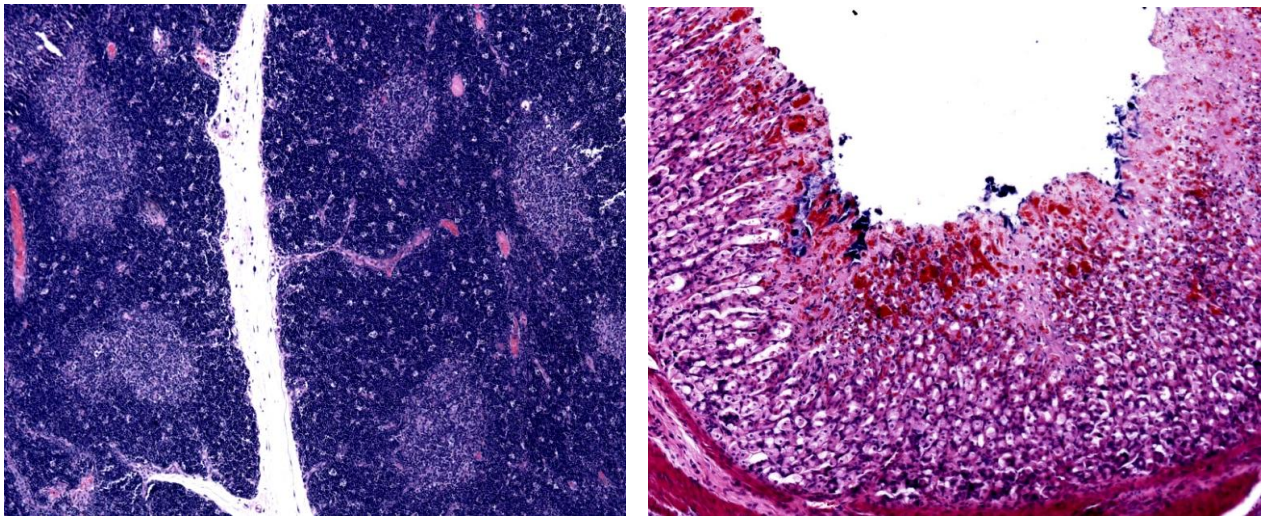


Рисунок 6 – Выраженная картина массового апоптоза лимфоцитов и фагоцитоза апоптотических телец макрофагами («звездное небо») в коре тимуса (слева) и острая язва железистого отдела желудка (справа). Окраска гематоксилином и эозином, х100. Примечание – подобные изменения были выявлены у двух контрольных самцов и у двух самцов в группах, получавших SkQ1 4 и 8 недель.

*Тощая кишка*: все компоненты слизистой оболочки интактны, ворсинки хорошо выражены; подслизистая основа, мышечная оболочка и сероза без патологических изменений.

*Слепая кишка:* выстилающие эпителиоциты хорошо выражены, интактные; крипты не увеличены, количество бокаловидных клеток и их секреторная активность в пределах нормы; собственная пластинка слизистой оболочки содержит небольшое количество зрелых лимфоцитов, рассеянных диффузно; подслизистая основа, мышечная оболочка и сероза без патологических изменений.

*Толстая кишка*: выстилающие эпителиоциты хорошо выражены, интактные; крипты не увеличены, количество бокаловидных клеток и их секреторная активность в пределах нормы; собственная пластинка слизистой содержит небольшое количество зрелых лимфоцитов, рассеянных диффузно; подслизистая основа, мышечная оболочка и сероза без патологических изменений.

*Печень:* Отчетливо прослеживается дольчатая структура органа. Синусоиды, сосуды портальных трактов и центральные вены обычного кровенаполнения. Пространства Диссе не расширены, количество стромальной соединительной ткани портальных трактов в пределах нормы. Присутствует незначительное количество гематопоэтических элементов миелоидного и эритроидного рядов. Со стороны клеток Купфера, эндотелия сосудов и гепатоцитов изменений не наблюдается.

*Селезенка*: капсула и трабекулярный аппарат нормальной толщины, без морфологических изменений. Общая структура органа сохранена, отмечается нормальное соотношение красной и белой пульпы. Фолликулы имеют нормальное строение, зональная структура отчетливо прослеживается, герминальные центры отсутствуют. Инфильтрации красной пульпы со стороны маргинальной зоны фолликулов не отмечено. Красная пульпа умеренно полнокровная, имеет нормальный клеточный состав, представленный зрелыми лимфоцитами, плазмоцитами и макрофагами. Сосудистые структуры селезенки без морфологических изменений.

*Почки*: корковый и мозговой слои типичного строения отчетливо прослеживаются во всех случаях. Клубочки имеют нормальную структуру, базальные мембраны не утолщены, клеточность клубочков в пределах нормы. Проксимальные и дистальные канальцы нормальной структуры, эпителий без признаков дистрофии. Интерстиций имеет нормальную морфологию, количество его не увеличено. Сосуды почки нормального кровенаполнения.

*Мочевой пузырь:* слизистая оболочка покрыта нормальным переходным эпителием, в полости органа патологических продуктов не отмечено, собственная пластинка, мышечная оболочка и адвентиция без патологических изменений.

*Семенники*: общее строение органов не изменено, капсула интактна, семенные канальцы содержат нормальные элементы сперматогенеза и сустеноциты, в интерстиции патологические изменения отсутствуют, отмечается нормальное число интактных клеток Лейдига, собранных в небольшие группы. Со стороны сети яичка также никаких патологических изменений не найдено. Только в одном

случае выявлена тотальная атрофия герминального эпителия отдельных семенных канальцев в одном семеннике.

*Предстательная железа:* представлена нормальными тубулярными структурами, выстланными железистым однослойным эпителием, с эозинофильным секретом в просвете, погруженными в нежную волокнистую соединительную ткань. Как паренхима, так и строма патологических изменений не имеет.

*Гипофиз:* общая структура органа сохранена, отчетливо видны дистальная и промежуточная часть, а также нейрогипофиз обычного строения. В дистальной части (аденогипофизе) соотношение между базофильными и оксифильными клетками нормальное. Дистрофические, гипертрофические или воспалительные изменения отсутствуют в любой части органа.

*Щитовидная железа:* представлена фолликулярными структурами вариабельного размера, содержащими эозинофильный коллоид и выстланными эпителиальными клетками разной морфологии – от цилиндрической до уплощенной, в зависимости от степени наполненности коллоидом. Эпителиальные клетки фолликулов имеют нормальную морфологию. Парафолликулярные клетки расположены в интерстиции, количество и морфология их соответствуют норме. В интерстиции железы патологических изменений не отмечено.

*Надпочечники:* общая структура сохранена, капсула интактна, корковое вещество состоит из хорошо выраженных клубочковой и пучковой зон, причем в цитоплазме клеток пучковой зоне отмечается вариабельное количество округлых пустот (липидных капель), отражающее нормальную вариабельность функциональной активности клеток этой зоны. Гипертрофических и гиперпластических явлений в корковом веществе не отмечено. Клетки мозгового вещества имеют типичную нормальную морфологию.

*Поджелудочная железа:* расположена в нормальной абдоминальной жировой ткани, ацинарные клетки типичного вида, с четкой базофилией периферических отделов цитоплазмы и круглым компактным ядром; экзокриноциты собраны в типичные концевые отделы; эпителий протоков интактен; инсулярный аппарат представлен в основном широкоцитоплазменными клетками с круглым ядром

(бета-клетки) с небольшим числом узкоцитоплазменных клеток (альфа-клетки и другие клеточные элементы), располагающихся по периферии островков; патологических изменений в островках Лангерганса не отмечено. Строма органа также без патологических изменений.

*Скелетная мышца*: состоит из поперечнополосатых многоядерных миосимпластов обычной морфологии с хорошо заметной исчерченностью и периферически расположенными ядрами. Миоциты собраны в пучки, разделенные интерстициальной тканью без признаков фиброза и воспалительной инфильтрации.

### 3.1.2.3 Суммарное описание морфологии органов у самок разных групп, получавших препарат SkQ1

*Результаты макроскопического исследования органов животных*

*Шерсть* животных чистая, гладкая. *Кожа* розовая, покровы подошвенных частей стоп бледные, иногда отмечался умеренный цианоз. Отмечалась бледность склер (конъюнктив), бледность или небольшой цианоз *видимых слизистых оболочек* (рта, носа) без патологических продуктов или изъязвлений на них. *Анус* во всех случаях сомкнут.

*Подкожная клетчатка* была выражена незначительно, мышцы нормальной консистенции, анемичные. Размеры и окраска *подкожных лимфатических узлов* были в пределах нормы. *Молочные железы* не изменены.

*Костно-суставной аппарат* видимых изменений не имел.

Мягкие ткани шеи, трахея, гортань, глотка, щитовидная и слюнные железы без видимых изменений.

*Пищевод* видимых изменений не имел.

При вскрытии *грудной полости* обнаруживали гладкую, блестящую висцеральную и париетальную *плевру*, без наличия выпота в плевральной полости. *Тимус* имел нормальные размеры, сероватый или серовато-желтый цвет, иногда на его поверхности обнаруживались редкие бледные петехии.

*Легкие* покрыты гладкой блестящей висцеральной плеврой, имели серовато-розовый цвет, нормальное кровенаполнение, «воздушную» консистенцию, коллапс после вскрытия грудной полости выражен в нормальной степени.

*Перикард* без особенностей. При исследовании сердца в небольшом числе случаев отмечалась выраженная инъекция эпикардиальных сосудов. Примерно в половине случаев обнаруживалось переполнение камер сердца жидкой темной кровью, иногда со сгустками, в других случаях выявляли пустые желудочки. Миокард, эндокард и клапаны изменений не имели. *Легочная и полые вены* переполнены кровью черно-красного цвета.

При исследовании *брюшной полости* обнаруживалось анатомически правильное расположение внутренних органов, отсутствие выпота, блестящая и гладкая висцеральная и париетальная брюшина.

*Печень* умеренно полнокровная, темно-красно-коричневая с сизым оттенком, иногда с видимым крапчатым рисунком долек, края острые или слегка закруглены. На разрезе ткань умеренно плотная, нормального кровенаполнения.

*Желудок* был наполнен небольшим количеством желтоватого содержимого, слизистая оболочка бледноватая, сероза морфологических изменений не имела. В *тонком кишечнике* присутствовало нормальное количество физиологического кашецеобразного полужидкого содержимого желтовато-коричневого цвета, без специфического запаха. Пейеровы бляшки хорошо выражены. *Слепая кишка* заполнена физиологическим содержимым, стенка ее видимых особенностей не имела. *Толстая кишка* содержала оформленный кал. Слизистая оболочка кишки и сероза видимых изменений не имели.

Сосуды *брыжейки* умеренно инъецированы, *абдоминальные лимфатические узлы* нормальных размеров и окраски. *Сальник* без морфологических изменений. *Поджелудочная железа* нормальной консистенции, беловато-желтого или бледно-коричневатого цвета, без видимых изменений. *Селезенка* темно-красного цвета, с гладкой поверхностью, эластичной консистенции, на разрезе без обильного соскоба. *Почки* в половине случаев были анемичны, кора и пирамида – бледные, в других случаях отмечалось умеренное или выраженное неравномерное

полнокровие коры и интермедиальной зоны при нормальном кровенаполнении пирамиды. Капсула снималась легко во всех случаях, лоханка без особенностей. *Надпочечники* желтого или желтовато-коричневого цвета, без видимых изменений.

*Мочевой пузырь* был пуст, иногда содержал небольшое количество прозрачной желтоватой мочи. Стенка мочевого пузыря макроскопических изменений не имела.

*Половые органы* видимых изменений не имели.

При осмотре *полости черепа* и *твердой мозговой оболочки* изменений не найдено. Внешний осмотр *головного мозга* аномалий строения и патологических изменений не выявил. На поперечных разрезах структуры головного мозга видимых изменений не имели.

Результаты гистологического исследования органов животных

*Кожа:* покрыта эпидермисом, состоящим из отчетливых базального, шиповатого, зернистого и рогового слоев. Строение слоев и морфология кератиноцитов не отличаются от нормы, целостность их нигде не нарушена. Дерма представлена волокнистой соединительной тканью без признаков инфильтрации, фиброза или иных патологических изменений. В дерме содержаться волосяные фолликулы и сальные железы нормального строения. В части образцов присутствует небольшое количество подкожной жировой клетчатки и нормальные элементы молочной железы.

*Глаз и его придаточный аппарат:* роговица покрыта интактным многослойным плоским неороговевающим эпителием с хорошо выраженной стратификацией; собственное вещество роговицы построено из коллагеновых волокон и веретеновидных фибробластоподобных клеток, без патологических изменений, десцеметова мембрана интактна. Передняя камера глаза патологических изменений не имеет, радужка, и цилиарное тело без видимых изменений, угол передней камеры глаза и фонтановы пространства не склерозированы. Капсула хрусталика отчетливо видна, собственно хрусталик состоит из неизмененных

хрусталиковых волокон. Видимые на препарате элементы стекловидного тела гомогенные, без клеточной инфильтрации. Сетчатка имеет типичное зональное строение, ядерные, фоторецепторный, сетчатые и ганглионарный слои хорошо выражены, инфильтрации, деструктивных и дистрофических изменений не имеют. Слой нервных волокон хорошо выражен, интактен. Сосудистая оболочка заднего сектора глаза, склера, пигментный эпителий, диск и начальный ретробульбарный отрезок зрительного нерва, а также веки и конъюнктива видимых изменений не имеют. Железа Гардера построена из ацинусов, сложенных из мономорфных клеток с пенистой цитоплазмой и пикнотичными ядрами, протоки и интерстиций не изменены.

*Головной мозг:* зональная структура коры, строение белого вещества и гиппокампа отчетливо прослеживаются; отмечается небольшое агональное полнокровие сосудов в ткани мозга, а также в мозговых оболочках и в хороидном сплетении с явлениями сладжа эритроцитов; отдельные артифициальные «темные» пирамидные клетки.

*Сердце:* эпикард, миокард, эндокард и субэндокардиальный слой – без патологических особенностей. Кардиомиоциты имеют типичный вид и нормальное расположение. Количество стромальной соединительной ткани в пределах нормы, сосуды стромы умеренного кровенаполнения.

*Аорта:* просвет сосуда патологических элементов не содержит, эндотелий, подэндотелиальный слой, средняя оболочка и адвентиция с прилежащей бурой жировой клетчаткой без патологических явлений.

*Легкие:* при малом увеличении прослеживается нормальное строение органа. Типичная структура стенок бронхов сохранена, морфологических изменений в них не отмечено. Стенки альвеол не утолщены, обычного кровенаполнения. Альвеолярные ходы и мешочки нормальных размеров. Просвет альвеол и бронхов пуст.

*Тимус:* имел типичное дольчатое строение с отчетливой границей между темной, богатой лимфоцитами корой и более светлым мозговым веществом. Дольки разделены интактной капсулой. Иногда под капсулой видны небольшие

эритроцитарные экстравазаты без явлений воспаления. Стромальные эпителиальные клетки крупные, светлые, с пузырьковидным ядром, без заметных патологических изменений. Лимфоциты представлены нормальными зрелыми формами с небольшим числом бластных клеток. Вокруг тимуса отмечается значительное количество интактной медиастинальной жировой клетчатки.

*Слюнные железы:* околоушная, поднижнечелюстная и подъязычная железы построены по обычному ацинарному типу с соответствующим каждой железе нормальным вариантом секреторного концевого отдела (серозного, серозно-муцинозного и муцинозного соответственно). Паренхима и строма желез без патологических изменений.

*Лимфатические узлы:* покрыты интактной капсулой, имеют типичное зональное строение, содержат корковое плато, паракортикальную зону и мозговые тяжи нормальной морфологии. Герминальные центры выражены слабо или не отмечаются.

*Гортань:* слизистая оболочка интактна, голосовые связки, мышечный и хрящевой аппарат, а также адвентиция без патологических явлений.

*Трахея:* просвет патологических продуктов не содержит, слизистая оболочка интактна, покрыта реснитчатым эпителием респираторного типа. Хрящевая основа трахеи и надхрящница, а также адвентиция патологических изменений не имеют.

*Пищевод:* имеет интактную морфологию, слизистая оболочка покрыта нормальным плоским ороговевающим эпителием, имеющим типичную стратификацию, со стороны подслизистой основы, мышечной оболочки (состоящей из двух слоев поперечнополосатой мускулатуры) и адвентиции изменений не отмечено.

*Желудок:* эпителий слизистой оболочки преджелудка и слизистой части желудка обычного строения. Структура и клеточный состав желез слизистой оболочки в пределах нормы. Во всех случаях отмечена слабая диффузная инфильтрация слизистой оболочки всех отделов зрелыми полиморфноядерными лейкоцитами

нормальной морфологии. Мышечная оболочка, подслизистая основа и серозная оболочка без изменений.

*Двенадцатиперстная кишка:* слизистая оболочка, подслизистая основа, мышечная оболочка и сероза без патологических изменений, ворсинки и крипты хорошо выражены, покрыты интактным эпителием. В подслизистой основе содержаться бруннеровы железы нормальной морфологии.

*Тощая кишка*: все компоненты слизистой оболочки интактны, ворсинки хорошо выражены; подслизистая основа, мышечная оболочка и сероза без патологических изменений.

*Слепая кишка:* выстилающие эпителиоциты хорошо выражены, интактные; крипты не увеличены, количество бокаловидных клеток и их секреторная активность в пределах нормы; собственная пластинка слизистой оболочки содержит небольшое количество зрелых лимфоцитов, рассеянных диффузно; подслизистая основа, мышечная оболочка и сероза без патологических изменений.

*Толстая кишка*: выстилающие эпителиоциты хорошо выражены, интактные; крипты не увеличены, количество бокаловидных клеток и их секреторная активность в пределах нормы; собственная пластинка слизистой оболочки содержит небольшое количество зрелых лимфоцитов, рассеянных диффузно; подслизистая основа, мышечная оболочка и сероза без патологических изменений.

*Печень:* отчетливо прослеживается дольчатая структура органа. Синусоиды, сосуды портальных трактов и центральные вены обычного кровенаполнения. Пространства Диссе не расширены, количество стромальной соединительной ткани портальных трактов в пределах нормы. Воспалительной инфильтрации в портальных трактах и в паренхиме органа не отмечено, присутствует только незначительное количество гематопоэтических элементов миелоидного и эритроидного рядов. Со стороны клеток Купфера, эндотелия сосудов и гепатоцитов изменений не наблюдается.

*Селезенка*: капсула и трабекулярный аппарат нормальной толщины, без морфологических изменений. Общая структура органа сохранена, отмечается нормальное соотношение красной и белой пульпы. Фолликулы имеют нормальное строение, зональная структура отчетливо прослеживается, герминальные центры отсутствуют. Инфильтрации красной пульпы со стороны маргинальной зоны фолликулов не отмечено. Красная пульпа умеренно полнокровная, имеет нормальный клеточный состав, представленный зрелыми лимфоцитами, плазмоцитами и макрофагами. Сосудистые структуры селезенки без морфологических изменений.

*Почки*: отчетливо прослеживается корковый и мозговой слои типичного строения. Клубочки имеют нормальную структуру, базальные мембраны не утолщены, клеточность клубочков в пределах нормы. Проксимальные и дистальные канальцы нормальной структуры, эпителий без признаков дистрофии. Мозговое вещество всех животных содержит базофильные минеральные депозиты. Интерстиций имеет нормальную морфологию, количество его не увеличено. Сосуды почки нормального кровенаполнения.

*Мочевой пузырь:* слизистая оболочка покрыта нормальным переходным эпителием, в полости органа патологических продуктов не отмечено, собственная пластинка, мышечная оболочка и адвентиция без патологических изменений.

*Яичники:* окружены интактной яичниковой капсулой; поверхность органа покрыта неизмененным герминальным эпителием. Строма органа интактна, окружает нормальное количество примордиальных фолликулов обычного вида, а также фолликулы на разных стадиях цикла – первичные, вторичные и желтые тела с соответствующими нормальными чертами морфологического строения.

*Матка*: просвет матки обычных размеров, патологических продуктов не содержит. Эндометрий выстлан цилиндрическим эпителием нормальной морфологии, под которым располагается строма матки с хорошо заметными железами без признаков значительной воспалительной инфильтрации. Миометрий представлен слоями, состоящими из гладких миоцитов с хорошо

различимыми ядрами. Серозная оболочка матки сохраняет нормальное строение на всем протяжении, патологических образований на ее поверхности нет.

*Гипофиз:* общая структура органа сохранена, отчетливо видны дистальная и промежуточная часть, а также нейрогипофиз обычного строения. В дистальной части (аденогипофизе) соотношение между базофильными и оксифильными клетками нормальное. Дистрофические, гипертрофические или воспалительные изменения отсутствуют в любой части органа.

*Щитовидная железа:* представлена фолликулярными структурами вариабельного размера, содержащими эозинофильный коллоид и выстланными эпителиальными клетками разной морфологии – от цилиндрической до уплощенной, в зависимости от степени наполненности коллоидом. Эпителиальные клетки фолликулов имеют нормальную морфологию. Парафолликулярные клетки расположены в интерстиции, количество и морфология их соответствуют норме. В интерстиции железы патологических изменений не отмечено.

*Надпочечники:* общая структура сохранена, капсула интактна, корковое вещество состоит из хорошо выраженных клубочковой, пучковой и сетчатой зон, причем в цитоплазме клеток пучковой зоне отмечается вариабельное количество округлых пустот (липидных капель), отражающее нормальную вариабельность функциональной активности клеток этой зоны. Гипертрофических и гиперпластических явлений в корковом веществе не отмечено. Клетки мозгового вещества имеют типичную нормальную морфологию.

*Поджелудочная железа:* расположена в нормальной абдоминальной жировой ткани, ацинарные клетки типичного вида, с четкой базофилией периферических отделов цитоплазмы и круглым компактным ядром; экзокриноциты собраны в типичные концевые отделы; эпителий протоков интактен; инсулярный аппарат представлен в основном широкоцитоплазменными клетками с круглым ядром (бета-клетки) с небольшим числом узкоцитоплазменных клеток (альфа-клетки и другие эндокринные клеточные элементы), располагающихся по периферии островков; патологических изменений в островках Лангерганса не отмечено. Строма органа также без патологических изменений.

*Скелетная мышца*: состоит из поперечнополосатых многоядерных миосимпластов обычной морфологии с хорошо заметной исчерченностью и периферически расположенными ядрами. Миоциты собраны в пучки, разделенные интерстициальной тканью без признаков фиброза и воспалительной инфильтрации.

### 3.1.2.4 Суммарное описание морфологии органов у самцов разных групп, получавших SkQ1

Результаты макроскопического исследования органов животных

*Шерсть* животных чистая, гладкая. *Кожа* розовая, покровы подошвенных частей стоп бледные, иногда отмечался умеренный цианоз. Отмечалась бледность склер (конъюнктив), бледность или небольшой цианоз *видимых слизистых оболочек* (рта, носа) без патологических продуктов или изъязвлений на них. *Анус* во всех случаях сомкнут.

*Подкожная клетчатка* была выражена незначительно, мышцы нормальной консистенции, анемичные. Размеры и окраска *подкожных лимфатических узлов* были в пределах нормы.

*Костно-суставной аппарат* видимых изменений не имел.

*Мягкие ткани шеи, трахея, гортань, глотка, щитовидная и слюнные железы* без видимых изменений.

*Пищевод* видимых изменений не имел.

При вскрытии *грудной полости* обнаруживали гладкую, блестящую висцеральную и париетальную *плевру*, без наличия выпота в плевральной полости. *Тимус* имел нормальные размеры, сероватый или серовато-желтый цвет, иногда на его поверхности обнаруживались единичные бледные петехии.

*Легкие* покрыты гладкой блестящей висцеральной плеврой, имели серовато-розовый цвет, нормальное кровенаполнение, «воздушную» консистенцию, коллапс после вскрытия грудной полости выражен в нормальной степени.

*Перикард* без особенностей. При исследовании сердца в небольшом числе случаев отмечалась выраженная инъекция эпикардиальных сосудов. Примерно в половине случаев обнаруживалась переполнение камер сердца жидкой темной кровью, иногда со сгустками, в других случаях выявляли пустые желудочки. Миокард, эндокард и клапаны изменений не имели.

*Легочная и полые вены* переполнены кровью черно-красного цвета.

При исследовании *брюшной полости* обнаруживалось анатомически правильное расположение внутренних органов, отсутствие выпота, блестящая и гладкая висцеральная и париетальная брюшина.

*Печень* умеренно полнокровная, темно-красно-коричневая с сизым оттенком, иногда с видимым крапчатым рисунком долек, края чаще острые, реже слегка закруглены. На разрезе ткань умеренно плотная, нормального кровенаполнения.

*Желудок* был наполнен небольшим количеством желтоватого содержимого, слизистая оболочка бледноватая, сероза морфологических изменений не имела. У одного животного имел место дефект слизистой оболочки красного цвета 1х1 мм.

В *тонком кишечнике* присутствовало нормальное количество физиологического кашецеобразного полужидкого содержимого желтовато-коричневого цвета, без специфического запаха. Пейеровы бляшки хорошо выражены. *Слепая кишка* заполнена физиологическим содержимым, стенка ее видимых особенностей не имела. *Толстая кишка* содержала оформленный кал. Слизистая оболочка кишки и сероза видимых изменений не имели.

Сосуды *брыжейки* умеренно инъецированы, *абдоминальные лимфатические узлы* нормальных размеров и окраски. *Сальник* без морфологических изменений. *Поджелудочная железа* нормальной консистенции, беловато-желтого или бледно-коричневатого цвета, без видимых изменений.

*Селезенка* темно-красного цвета, с гладкой поверхностью, эластичной консистенции, на разрезе без обильного соскоба.

*Почки* в половине случаев были анемичны, кора и пирамида – бледные, в других случаях отмечалось умеренное или выраженное неравномерное полнокровие

коры и интермедиальной зоны при нормальном кровенаполнении пирамиды. Капсула снималась легко во всех случаях, лоханка без особенностей.

*Надпочечники* желтого или желтовато-коричневого цвета, без видимых изменений.

*Мочевой пузырь* был пуст, иногда содержал небольшое количество прозрачной желтоватой мочи. Стенка мочевого пузыря макроскопических изменений не имела.

*Половые органы* видимых изменений не имели.

При осмотре *полости черепа* и *твердой мозговой оболочки* изменений не найдено. Внешний осмотр *головного мозга* аномалий строения и патологических изменений не выявил. На поперечных разрезах структуры головного мозга видимых изменений не имели.

Результаты гистологического исследования органов животных

*Кожа:* покрыта эпидермисом, состоящим из отчетливых базального, шиповатого, зернистого и рогового слоев. Строение слоев и морфология кератиноцитов не отличаются от нормы, целостность их нигде не нарушена. Дерма представлена волокнистой соединительной тканью без признаков инфильтрации, фиброза или иных патологических изменений. В дерме содержаться волосяные фолликулы и сальные железы нормального строения. В части образцов присутствует небольшое количество подкожной жировой клетчатки.

*Глаз и его придаточный аппарат:* роговица покрыта интактным многослойным плоским неороговевающим эпителием с хорошо выраженной стратификацией; собственное вещество роговицы построено из коллагеновых волокон и фибробластоподобных клеток, без патологических изменений, десцеметова мембрана интактна. Передняя камера глаза патологических изменений не имеет, радужка, и цилиарное тело без видимых изменений, угол передней камеры глаза и фонтановы пространства не склерозированы. Капсула хрусталика отчетливо видна, собственно хрусталик состоит из неизмененных хрусталиковых волокон. Видимые на препарате элементы стекловидного тела гомогенные, без клеточной

инфильтрации. Сетчатка имеет типичное зональное строение, ядерные, фоторецепторный, сетчатые и ганглионарный слои хорошо выражены, инфильтрации, деструктивных и дистрофических изменений не имеют. Слой нервных волокон хорошо выражен, интактен. Сосудистая оболочка заднего сектора глаза, склера, пигментный эпителий, диск и начальный ретробульбарный отрезок зрительного нерва, а также веки и конъюнктива видимых изменений не имеют. Железа Гардера построена из ацинусов, сложенных из мономорфных клеток с пенистой цитоплазмой и пикнотичными ядрами, протоки и интерстиций не изменены.

*Головной мозг:* зональная структура коры, строение белого вещества и гиппокампа отчетливо прослеживаются; отмечаются небольшое агональное полнокровие сосудов в ткани мозга, а также в мозговых оболочках и в сосудистом (хороидном) сплетении с явлениями сладжа эритроцитов; выявляются отдельные «темные» пирамидные клетки.

*Сердце:* эпикард, миокард, эндокард (в том числе клапаны) и субэндокардиальный слой – без патологических особенностей. Кардиомиоциты имеют типичный вид и нормальное расположение. Количество стромальной соединительной ткани в пределах нормы, сосуды стромы умеренного кровенаполнения.

*Аорта:* просвет сосуда патологических элементов не содержит, эндотелий, подэндотелиальный слой, средняя оболочка и адвентиция с прилежащей бурой жировой клетчаткой без патологических явлений.

*Легкие:* при малом увеличении прослеживается нормальное строение органа. Типичная структура стенок бронхов сохранена, морфологических изменений в них не отмечено. Стенки альвеол не утолщены, обычного кровенаполнения. Альвеолярные ходы и мешочки нормальных размеров. Просвет альвеол и бронхов пуст.

*Тимус:* имел типичное дольчатое строение с отчетливой границей между темной, богатой лимфоцитами корой и более светлым мозговым веществом. Дольки разделены интактной капсулой. Иногда под капсулой видны небольшие эритроцитарные экстравазаты без явлений воспаления. Стромальные

эпителиальные клетки крупные, светлые, с пузырьковидным ядром, без заметных патологических изменений. Лимфоциты представлены нормальными зрелыми формами с небольшим числом бластных клеток. Вокруг тимуса отмечается значительное количество интактной медиастинальной жировой клетчатки. В двух случаях наблюдался массовый апоптоз лимфоцитов в коре с фагоцитозом апоптозных тел макрофагами (картина «звездного неба») (рисунок 6).

*Слюнные железы:* околоушная, поднижнечелюстная и подъязычная железы построены по обычному ацинарному типу с соответствующим каждой железе нормальным вариантом секреторного концевого отдела (серозного, серозно-муцинозного и муцинозного соответственно). Паренхима и строма желез без патологических изменений.

*Лимфатические узлы:* покрыты интактной капсулой, имеют типичное зональное строение, содержат корковое плато, паракортикальную зону и мозговые тяжи нормальной морфологии. Герминальные центры выражены слабо или не отмечаются.

*Гортань:* слизистая оболочка интактна, голосовые связки, мышечный и хрящевой аппарат, а также адвентиция без патологических явлений.

*Трахея:* просвет патологических продуктов не содержит, слизистая интактна, покрыта реснитчатым эпителием респираторного типа. Хрящевая основа трахеи и надхрящница, а также адвентиция патологических изменений не имеют.

*Пищевод:* имеет интактную морфологию, слизистая оболочка покрыта нормальным плоским ороговевающим эпителием, имеющим типичную стратификацию, со стороны подслизистой, мышечной оболочки (состоящей из двух слоев поперечнополосатой мускулатуры) и адвентиции изменений не отмечено.

*Желудок:* эпителий слизистой оболочки преджелудка и слизистой части желудка обычного строения. Структура и клеточный состав желез слизистой оболочки в пределах нормы, за исключением одного случая, в котором отмечен участок некроза слизистой оболочки с гиперемией и инфильтрацией нейтрофилами (острая язва) (рисунок 6). Во всех случаях отмечена слабая диффузная

инфильтрация слизистой оболочки всех отделов зрелыми полиморфноядерными лейкоцитами нормальной морфологии. Мышечная оболочка, подслизистая основа и серозная оболочки без изменений.

*Двенадцатиперстная кишка:* слизистая оболочка, подслизистая основа, мышечная оболочка и сероза без патологических изменений, ворсинки и крипты хорошо выражены, покрыты интактным эпителием. В подслизистой основе содержаться бруннеровы железы нормальной морфологии.

*Тощая кишка*: все компоненты слизистой оболочки интактны, ворсинки хорошо выражены; подслизистая основа, мышечная оболочка и сероза без патологических изменений.

*Слепая кишка:* выстилающие эпителиоциты хорошо выражены, интактные; крипты не увеличены, количество бокаловидных клеток и их секреторная активность в пределах нормы; собственная пластинка слизистой оболочки содержит небольшое количество зрелых лимфоцитов, рассеянных диффузно; подслизистая основа, мышечная оболочка и сероза без патологических изменений.

*Толстая кишка*: выстилающие эпителиоциты хорошо выражены, интактные; крипты не увеличены, количество бокаловидных клеток и их секреторная активность в пределах нормы; собственная пластинка слизистой оболочки содержит небольшое количество зрелых лимфоцитов, рассеянных диффузно; подслизистая основа, мышечная оболочка и сероза без патологических изменений.

*Печень:* отчетливо прослеживается дольчатая структура органа. Синусоиды, сосуды портальных трактов и центральные вены обычного кровенаполнения. Пространства Диссе не расширены, количество стромальной соединительной ткани портальных трактов в пределах нормы. Воспалительной инфильтрации в портальных трактах и в паренхиме органа не отмечено, присутствует только незначительное количество гематопоэтических элементов миелоидного и эритроидного рядов. Со стороны клеток Купфера, эндотелия сосудов и гепатоцитов изменений не наблюдается.

*Селезенка*: капсула и трабекулярный аппарат нормальной толщины, без морфологических изменений. Общая структура органа сохранена, отмечается нормальное соотношение красной и белой пульпы. Фолликулы имеют нормальное строение, зональная структура отчетливо прослеживается, герминальные центры отсутствуют. Инфильтрации красной пульпы со стороны маргинальной зоны не отмечено. Красная пульпа умеренно полнокровная, имеет нормальный клеточный состав, представленный зрелыми лимфоцитами, плазмоцитами и макрофагами. Сосудистые структуры селезенки без морфологических изменений.

*Почки*: отчетливо прослеживается корковый и мозговой слои типичного строения. Клубочки имеют нормальную структуру, базальные мембраны не утолщены, клеточность клубочков в пределах нормы. Проксимальные и дистальные канальцы нормальной структуры, эпителий без признаков дистрофии. Интерстиций имеет нормальную морфологию, количество его не увеличено. Сосуды почки нормального кровенаполнения.

*Мочевой пузырь:* слизистая оболочка покрыта нормальным переходным эпителием, в полости органа патологических продуктов не отмечено, собственная пластинка, мышечная оболочка и адвентиция без патологических изменений.

*Семенники*: общее строение органов не изменено, капсула интактна, семенные канальцы содержат нормальные элементы сперматогенеза и сустеноциты, в интерстиции патологические изменения отсутствуют, отмечается нормальное число интактных клеток Лейдига, собранных в небольшие группы. Со стороны сети яичка также никаких патологических изменений не найдено.

*Предстательная железа:* представлена нормальными тубулярными структурами, выстланными железистым однослойным эпителием, с эозинофильным секретом в просвете, погруженными в нежную волокнистую соединительную ткань. Как паренхима, так и строма патологических изменений не имеет.

*Гипофиз:* общая структура органа сохранена, отчетливо видны дистальная и промежуточная часть, а также нейрогипофиз обычного строения. В дистальной части (аденогипофизе) соотношение между базофильными и оксифильными

клетками нормальное. Дистрофические, гипертрофические или воспалительные изменения отсутствуют в любой части органа.

*Щитовидная железа:* представлена фолликулярными структурами вариабельного размера, содержащими эозинофильный коллоид и выстланными эпителиальными клетками разной морфологии – от цилиндрической до уплощенной, в зависимости от степени заполненности коллоидом. Эпителиальные клетки фолликулов имеют нормальную морфологию. Парафолликулярные клетки расположены в интерстиции, количество и морфология их соответствуют норме. В интерстиции железы патологических изменений не отмечено.

*Надпочечники:* общая структура сохранена, капсула интактна, корковое вещество состоит из хорошо выраженных клубочковой, сетчатой и пучковой зон, причем в цитоплазме клеток пучковой зоне отмечается вариабельное количество округлых пустот (липидных капель), отражающее нормальную вариабельность функциональной активности клеток этой зоны. Гипертрофических и гиперпластических явлений в корковом веществе не отмечено. Клетки мозгового вещества имеют типичную нормальную морфологию.

*Поджелудочная железа:* расположена в нормальной абдоминальной жировой ткани, ацинарные клетки типичного вида, с четкой базофилией периферических отделов цитоплазмы и круглым компактным ядром; экзокриноциты собраны в типичные концевые отделы; эпителий протоков интактен; инсулярный аппарат представлен в основном широкоцитоплазменными клетками с круглым ядром (бета-клетки) с небольшим числом узкоцитоплазменных клеток (альфа-клетки и другие эндокринные клеточные элементы), располагающихся по периферии островков; патологических изменений в островках Лангерганса не отмечено. Строма органа также без патологических изменений.

*Скелетная мышца*: состоит из поперечнополосатых многоядерных миосимпластов обычной морфологии с хорошо заметной исчерченностью и периферически расположенными ядрами. Миоциты собраны в пучки, разделенные интерстициальной тканью без признаков фиброза и воспалительной инфильтрации.

### 3.1.2.5 Общее заключение по результатам морфологического исследования

Сравнительная гистоморфологическая картина различных органов контрольных животных (самцов и самок) и животных, получавших SkQ1, представлена на рисунках 7-16. Тщательно выполненное патоморфологическое исследование не обнаружило никаких признаков неблагоприятного (токсического) действия препарата SKQ1 на экспериментальных животных на всех сроках опыта. Выявленные в отдельных случаях изменения (петехии на поверхности тимуса) являются известными агональными явлениями, вызванными эвтаназией путем ингаляции $CO_2$ или известной фоновой патологией (острые язвы желудка, кальцинаты в мозговом веществе почек, явления апоптоза в тимусе) [Ruben et al., 1992; Tucker, 1997; Background lesions…, 2012]. У контрольных животных (самок) были отмечены единичные случаи патологических изменений (кардиомиопатии, инфаркта селезенки), которые не встретились у животных, получавших SkQ1 *per os*. Ни в одной экспериментальной группе не было отмечено превышения частоты какой-либо фоновой патологии по сравнению с контролем.

## 3.2 Эффекты SkQ1 на продолжительность жизни животных

### 3.2.1 Инбредные мыши BALB/c и C57Bl/6

Исследование влияния SkQ1 на продолжительность жизни инбредных самок и самцов BALB/c в условиях группового содержания в SPF-виварии дало различные результаты. Кривые продолжительности жизни для каждой группы самцов и самок мышей BALB/c представлены на рисунке 17. Как видно на данном рисунке, кривые выживаемости подопытных самцов лежат заметно правее контрольной кривой (различия обеих опытных кривых от контрольной достоверны - $p<0,05$, тест Каплан-Мейера), что соответствует достоверному увеличению медианной (средней) продолжительности жизни животных. У самок такого эффекта обнаружено не было ($p>0,05$, тест Каплан-Мейера). Нужно отметить, что медианная продолжительность жизни контрольных самцов в данном эксперименте составила 690 суток, тогда как этот показатель у контрольных

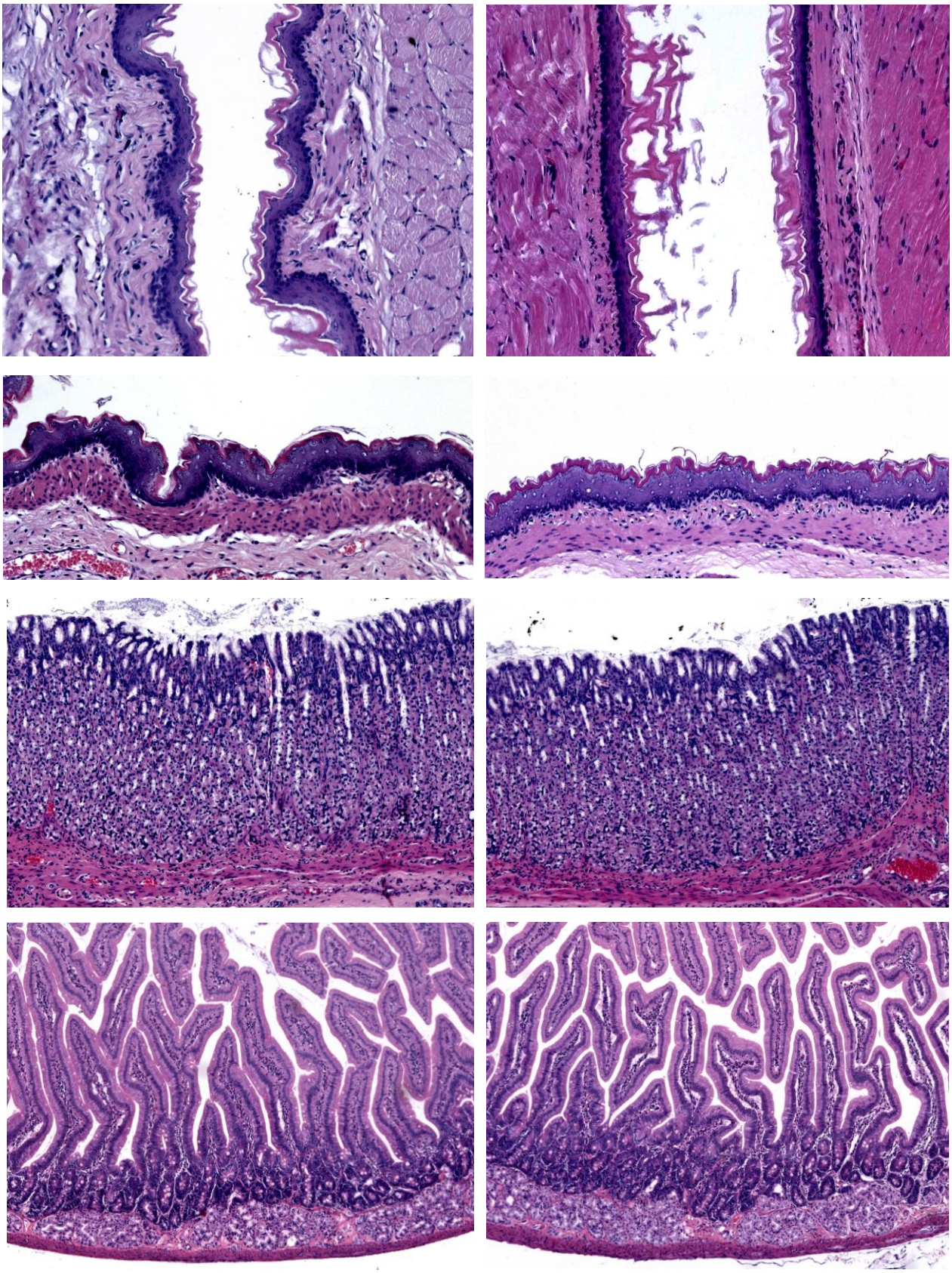


Рисунок 7 – Морфологическая картина органов крыс Вистар из контрольной группы (слева) и крыс, получавших SkQ1 (справа). Сверху вниз: пищевод (х200), преджелудок (х200), дно железистого желудка (х100), двенадцатиперстная кишка (х100). Окраска гематоксилином и эозином.

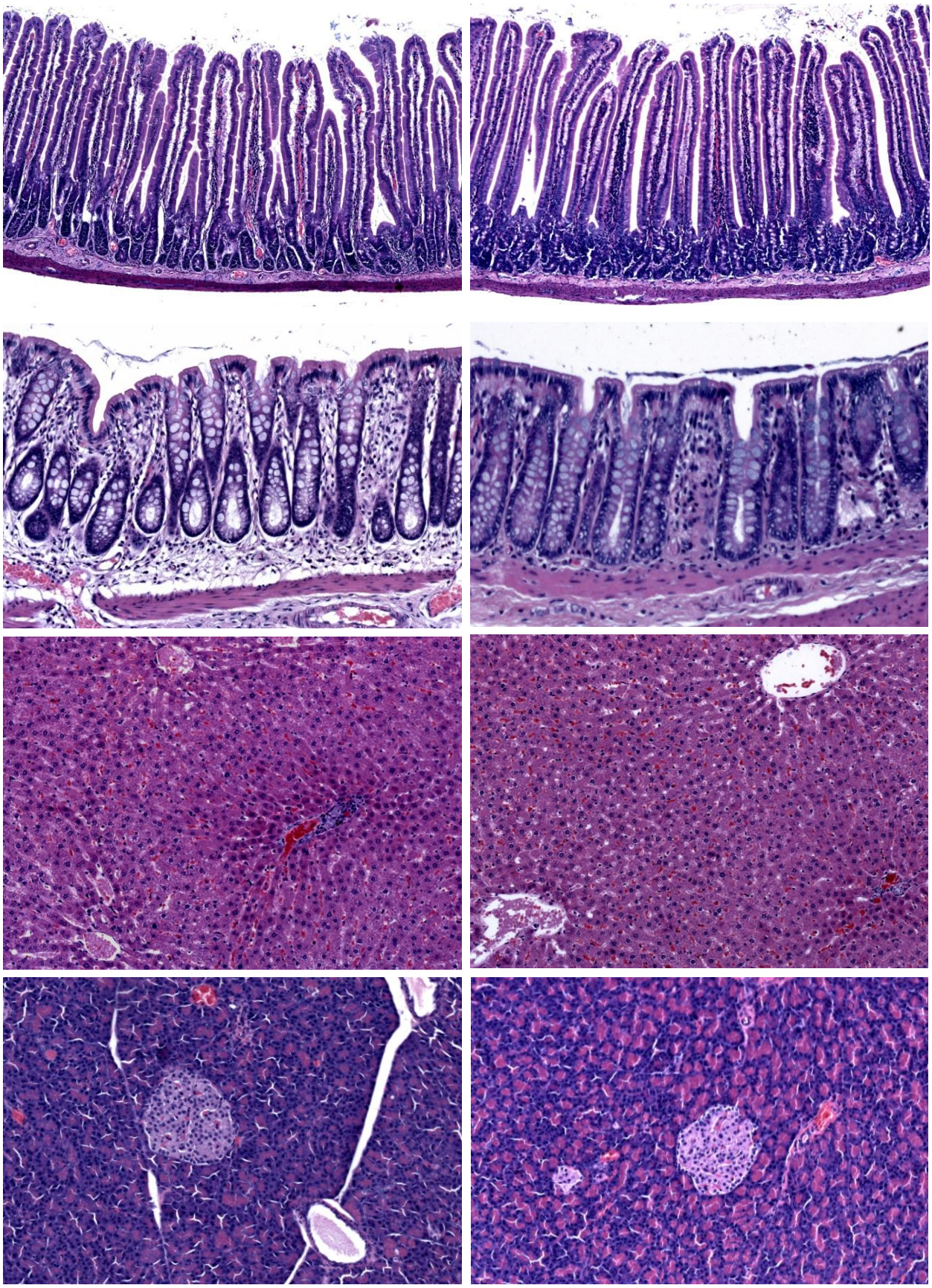


Рисунок 8 – Морфологическая картина органов крыс Вистар из контрольной группы (слева) и крыс, получавших SkQ1 (справа). Сверху вниз: тонкая (тощая) кишка (х100), толстая (ободочная) кишка (х200), печень (х200), поджелудочная железа (х200). Окраска гематоксилином и эозином.

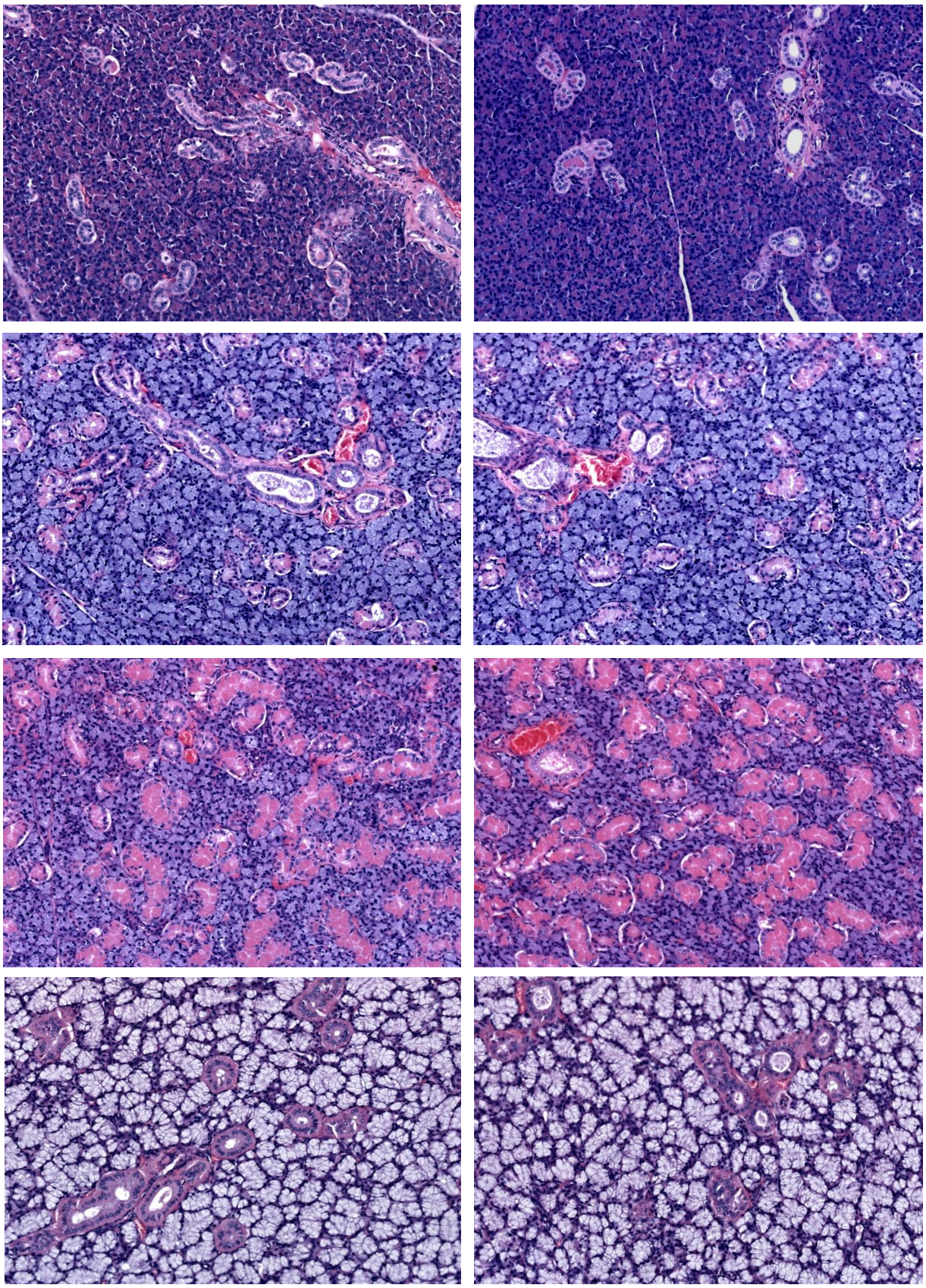


Рисунок 9 – Морфологическая картина органов крыс Вистар из контрольной группы (слева) и крыс, получавших SkQ1 (справа). Сверху вниз: околоушная слюнная железа, поднижнечелюстная слюнная железа самки, поднижнечелюстная слюнная железа самца, подъязычная слюнная железа. Окраска гематоксилином и эозином (х200).

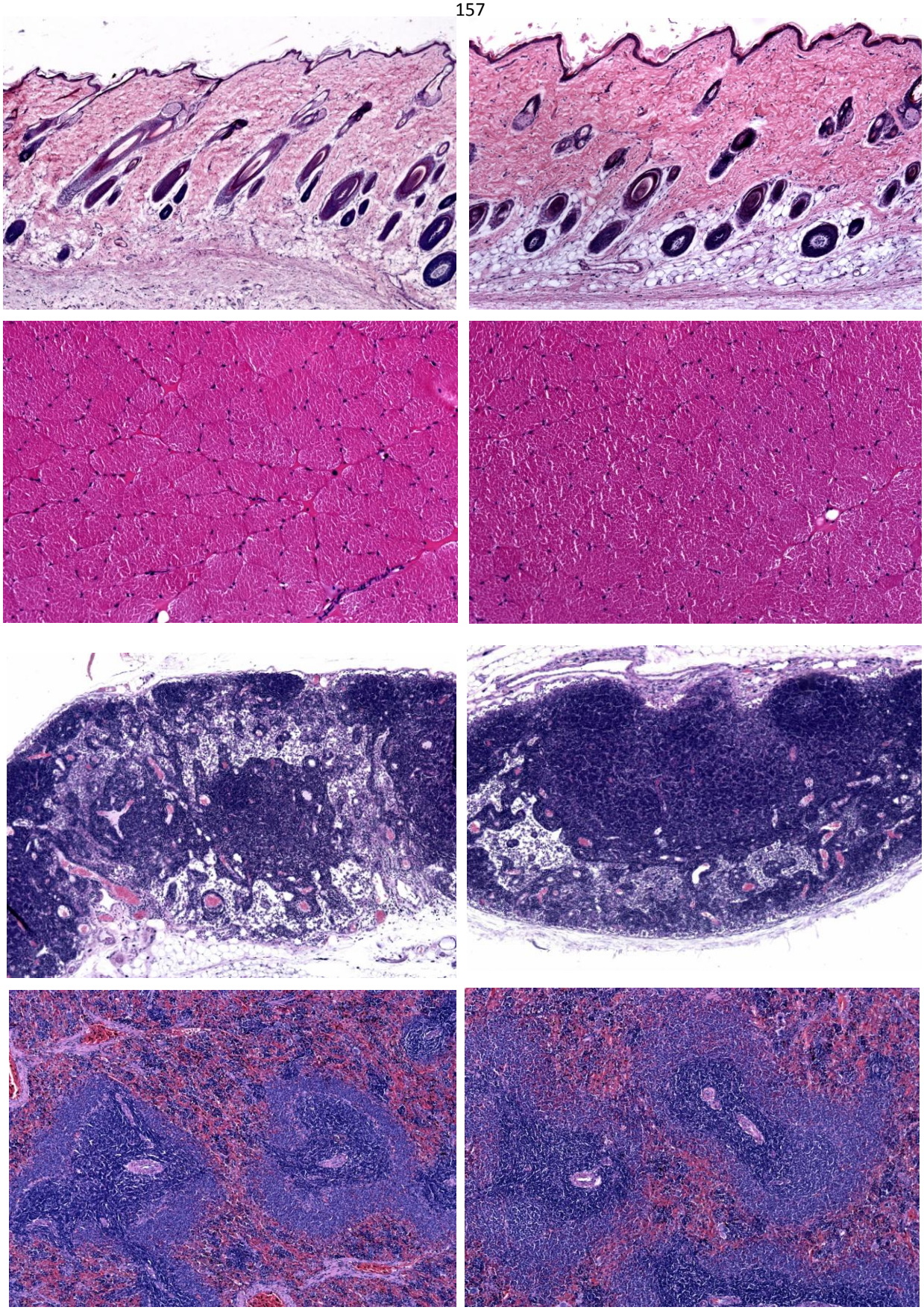


Рисунок 10 – Морфологическая картина органов крыс Вистар из контрольной группы (слева) и крыс, получавших SkQ1 (справа). Сверху вниз: кожа брюха (х100), четырехглавая мышца бедра (скелетная мышца) (х400), мезентериальный лимфатический узел (х100), селезенка (х200). Окраска гематоксилином и эозином.

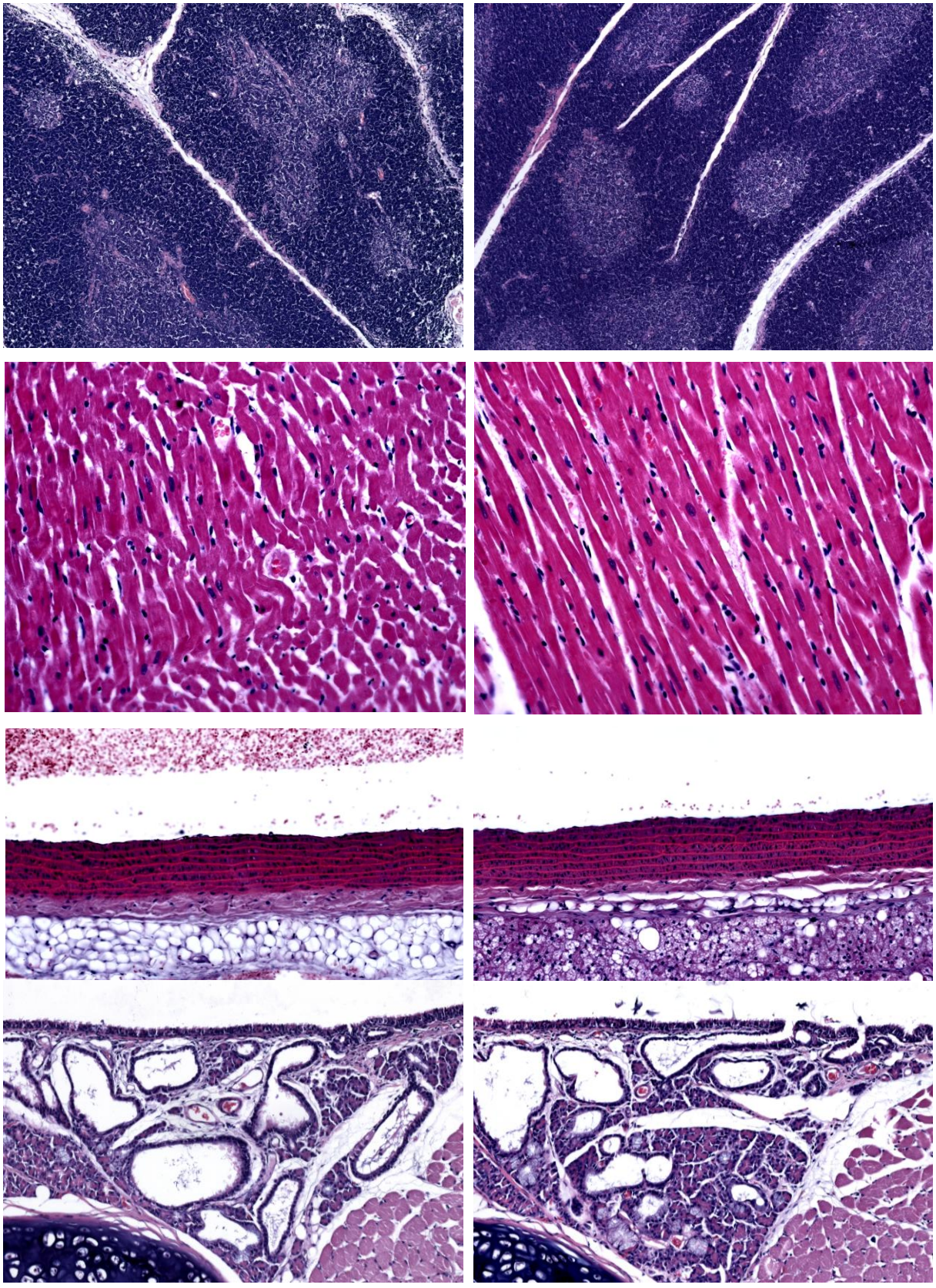


Рисунок 11 – Морфологическая картина органов крыс Вистар из контрольной группы (слева) и крыс, получавших SkQ1 (справа). Сверху вниз: тимус (х200), миокард (х400), стенка аорты (х200), гортань (х50). Окраска гематоксилином и эозином.

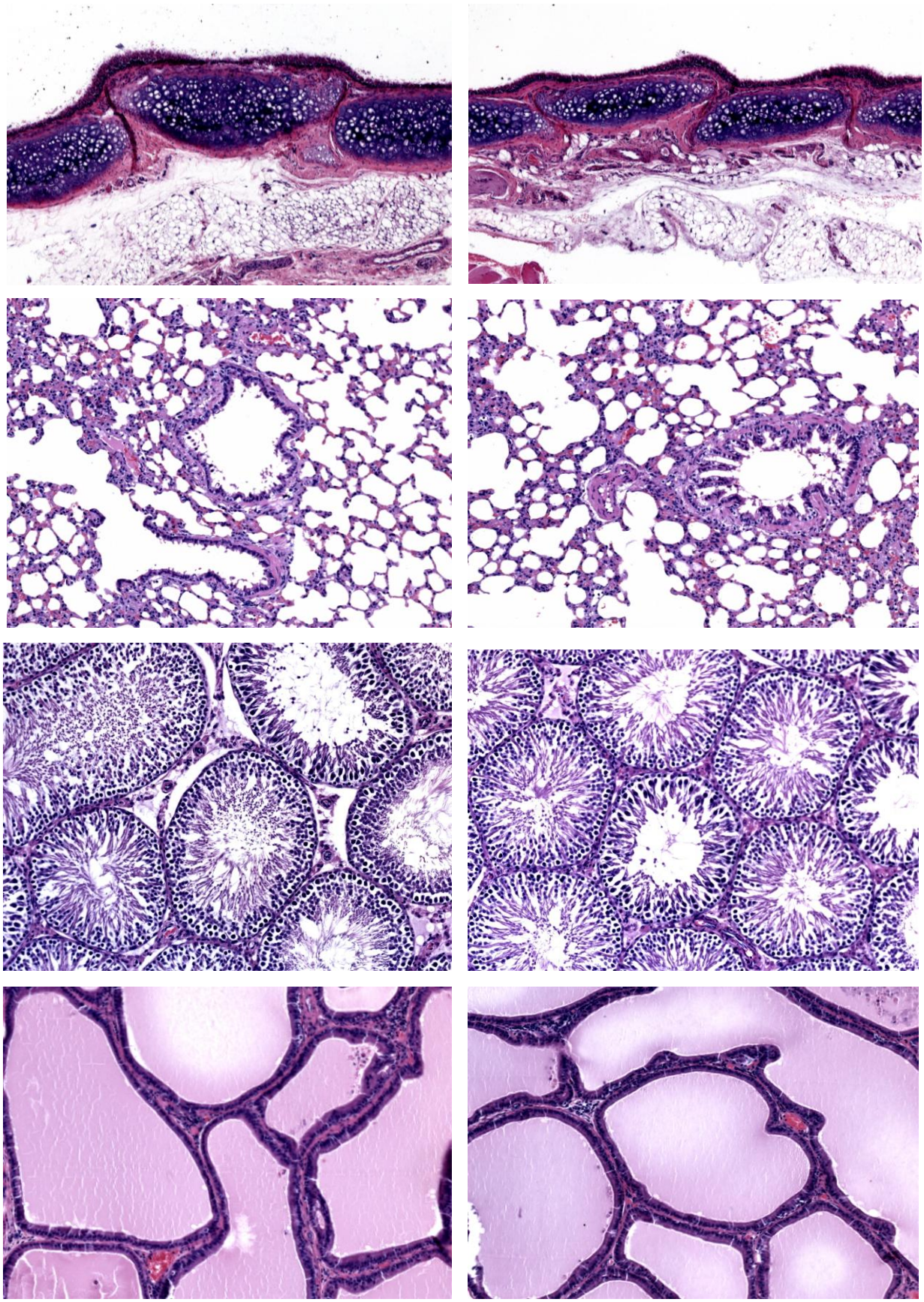


Рисунок 12 – Морфологическая картина органов крыс Вистар из контрольной группы (слева) и крыс, получавших SkQ1 (справа). Сверху вниз: трахея (х50), легкое (х100), семенник (х200), предстательная железа (х200). Окраска гематоксилином и эозином.

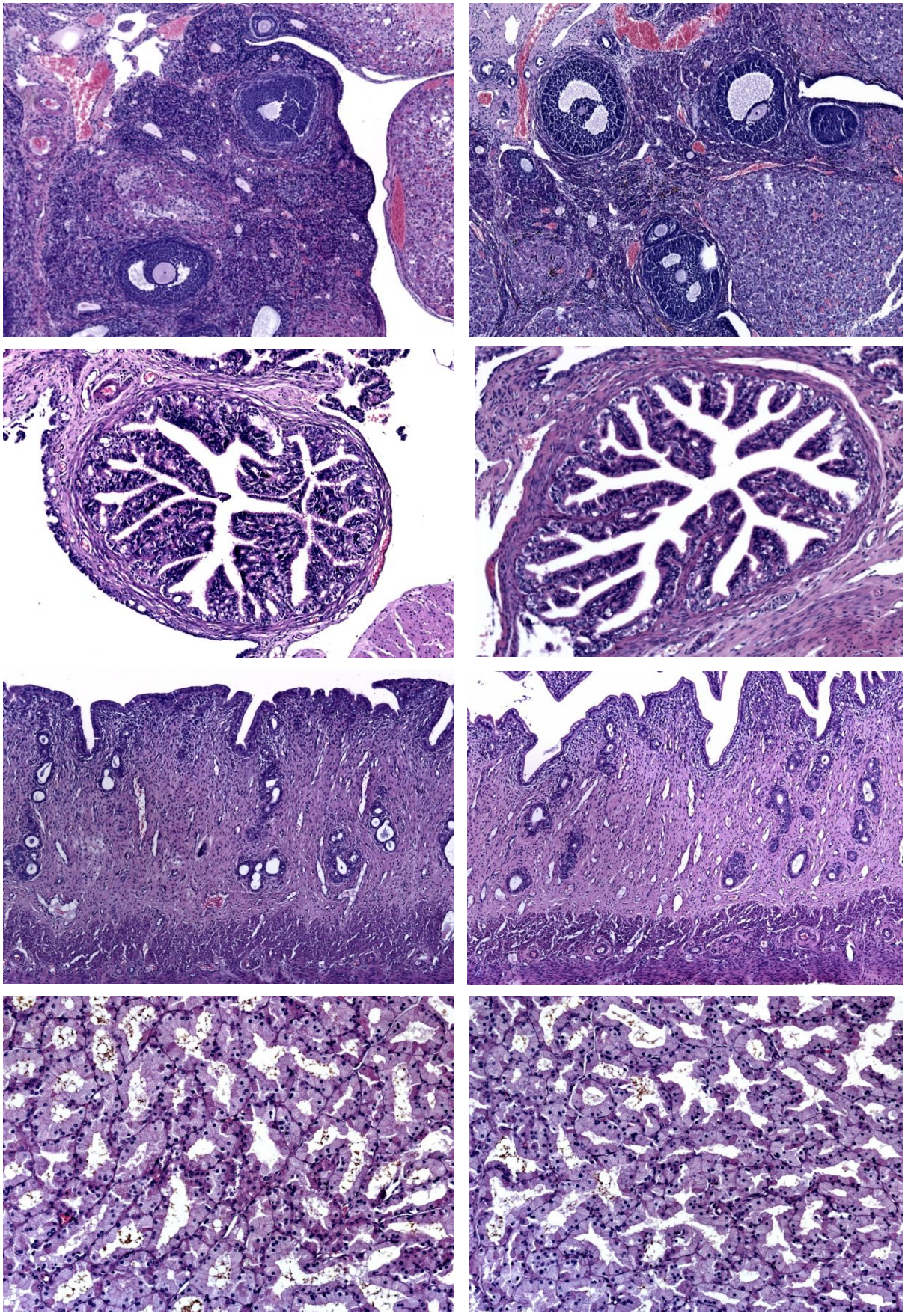


Рисунок 13 – Морфологическая картина органов крыс Вистар из контрольной группы (слева) и крыс, получавших SkQ1 (справа). Сверху вниз: яичник (х200), овидукт (х200), матка (рог) (х100), железа Гардера (х200). Окраска гематоксилином и эозином.

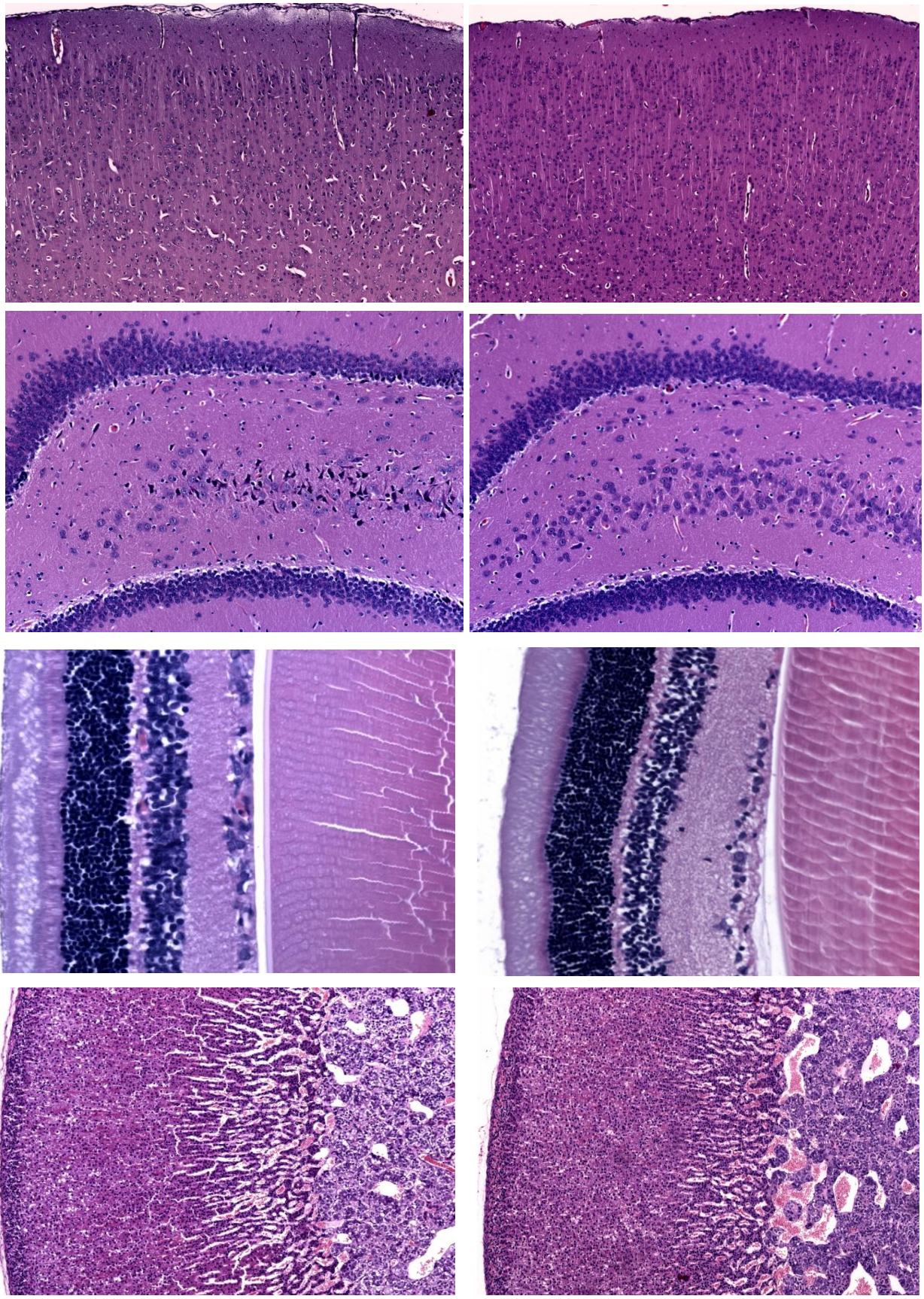


Рисунок 14 – Морфологическая картина органов крыс Вистар из контрольной группы (слева) и крыс, получавших SkQ1 (справа). Сверху вниз: кора больших полушарий головного мозга (х100), гиппокамп (х400), сетчатка и хрусталик глаза (х400), надпочечник (х100). Окраска гематоксилином и эозином.

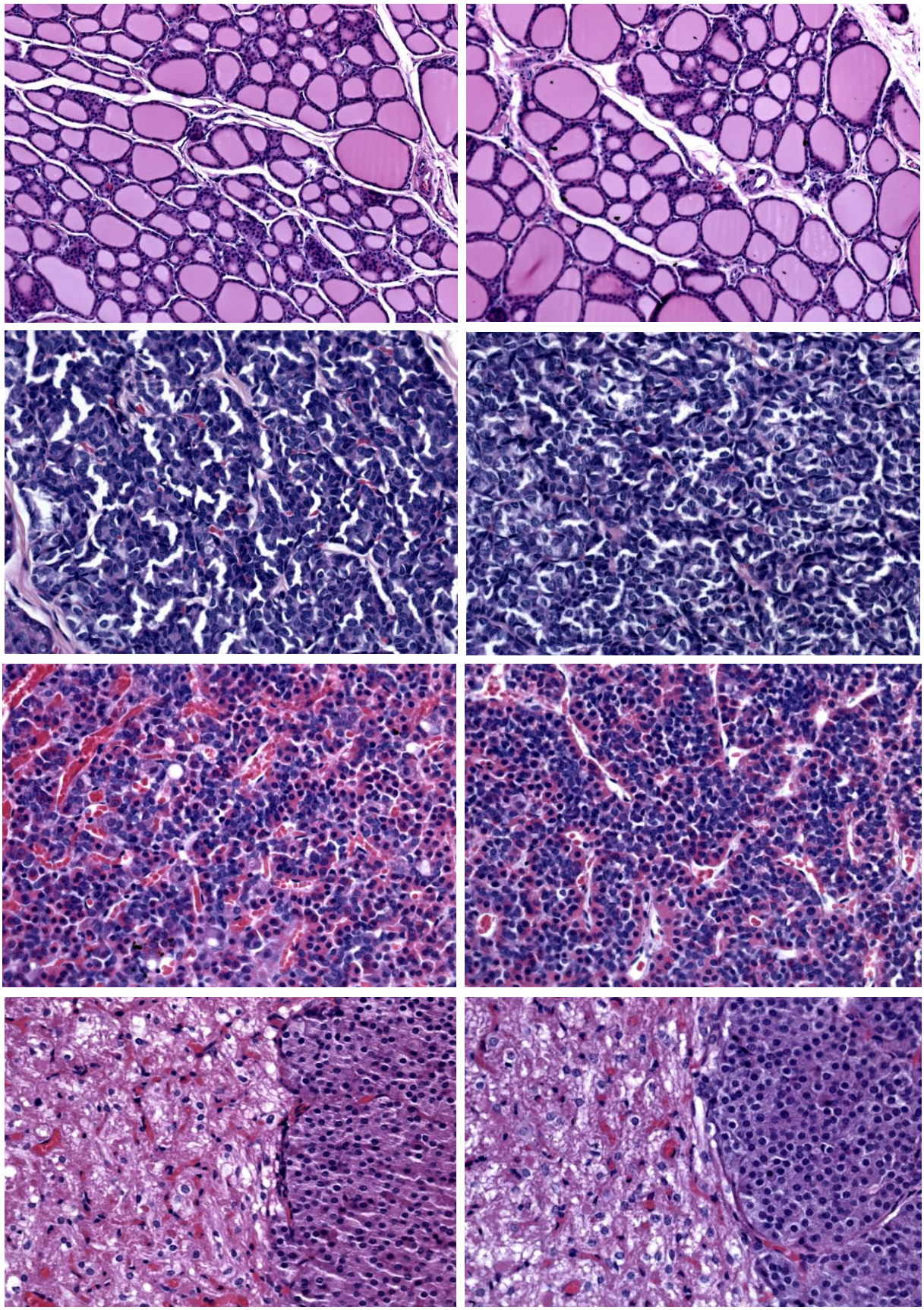


Рисунок 15 – Морфологическая картина органов крыс Вистар из контрольной группы (слева) и крыс, получавших SkQ1 (справа). Сверху вниз: щитовидная железа (х200), паращитовидная железа (х400), аденогипофиз (х400), промежуточная доля и *pars distalis* гипофиза (х400). Окраска гематоксилином и эозином.

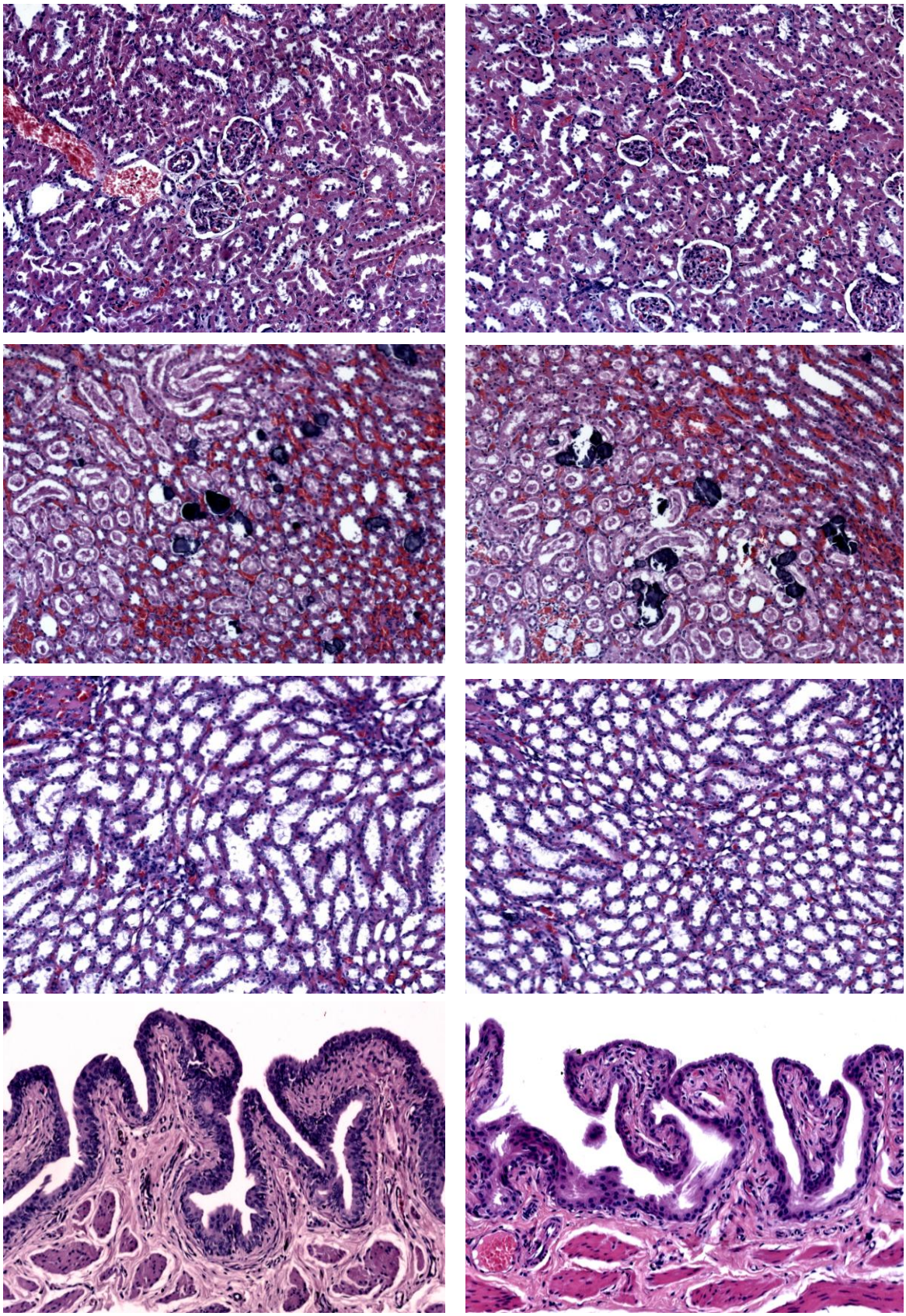


Рисунок 16 – Морфологическая картина органов крыс Вистар из контрольной группы (слева) и крыс, получавших SkQ1 (справа). Сверху вниз: кора почки (х200), мозговое вещество почки самки (содержит кальцинаты) (х200), мозговое вещество почки самца (х200), мочевой пузырь (х200). Окраска гематоксилином и эозином.

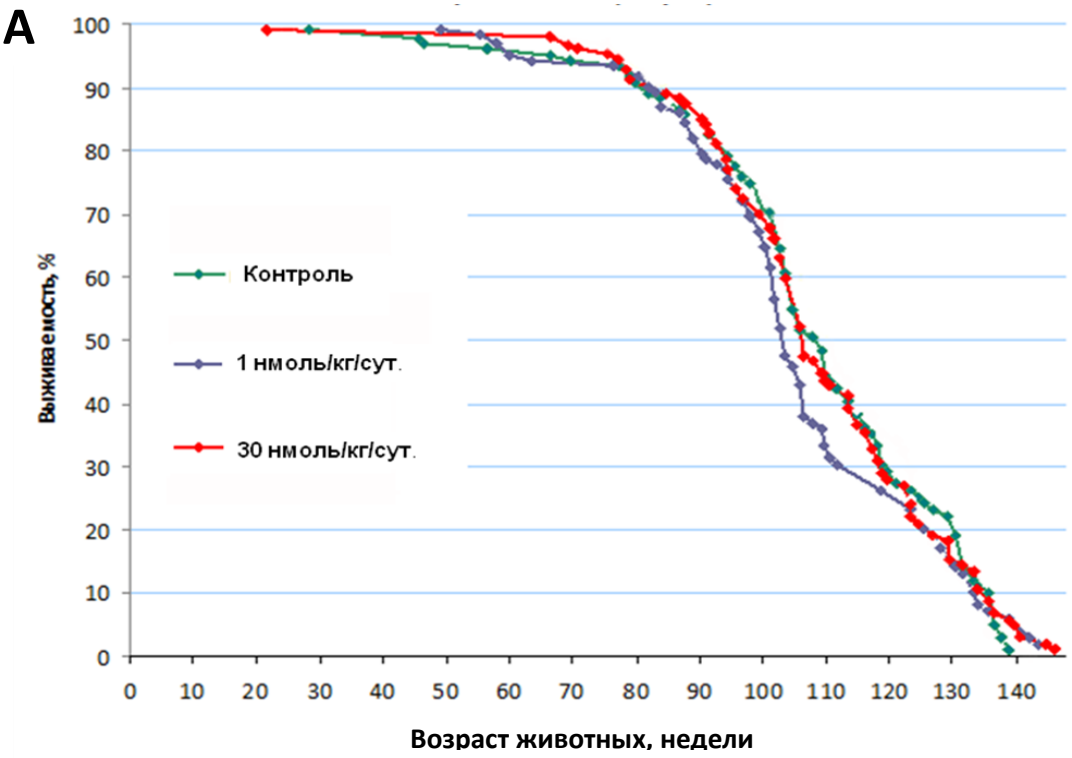
самок был равен 770 суткам. SkQ1 увеличивал продолжительность жизни самцов в SPF-условиях так, что она становилась неотличимой от продолжительности жизни самок, обитающих в тех же условиях ($p>0,05$).

Медианная продолжительность жизни самцов и самок линии C57Bl/6, также содержавшихся в SPF-условиях, однако, кроме того, в индивидуальных клетках, достоверно не различалась (740 и 773 дня соответственно, $p>0,05$). Пероральное пожизненное введение SkQ1 (1400 нмоль/кг/сутки), как и в случае BALB/c, не оказывало влияния на медианную продолжительность жизни самок ($p>0,05$), но увеличивало этот показатель у самцов до 937 дней ($p<0,05$).

### *3.2.2* Хомячок Кэмпбелла (*Phodopus campbelli)* и обыкновенная слепушонка *(Ellobius talpinus)*

В специальных сериях экспериментов было изучено влияние SkQ1 на продолжительность жизни диких грызунов двух видов – хомячка Кэмпбелла (*Phodopus campbelli*) и обыкновенной слепушонки (*Ellobius talpinus*),
животных, в том числе в отношении температурного и светового режима. Эти данные могут быть сопоставлены с результатами, полученными на животных противоположного типа – линейных лабораторных мышах из SPF-вивариев и необходимы для того, чтобы судить об универсальности действия SkQ1 на продолжительность жизни млекопитающих.

Кривые, характеризующие динамику гибели хомячков Кэмпбелла, показаны на рисунке 18. На этом рисунке видно, что SkQ1 увеличивает продолжительность жизни этих животных, сдвигая кривую гибели животных, получавших препарат, вправо по отношению к контрольной кривой (достоверность различий: $p<0,05$, тест Каплан-Мейера). Впрочем, этот эффект наблюдался не во всех экспериментальных сериях и зависел, по-видимому, от уровня ресурсных затрат, связанных с размножением животных, поскольку в указанных сериях было выявлено отчетливое позитивное влияние SkQ1 на репродукцию, и на показатели половой зрелости животных.



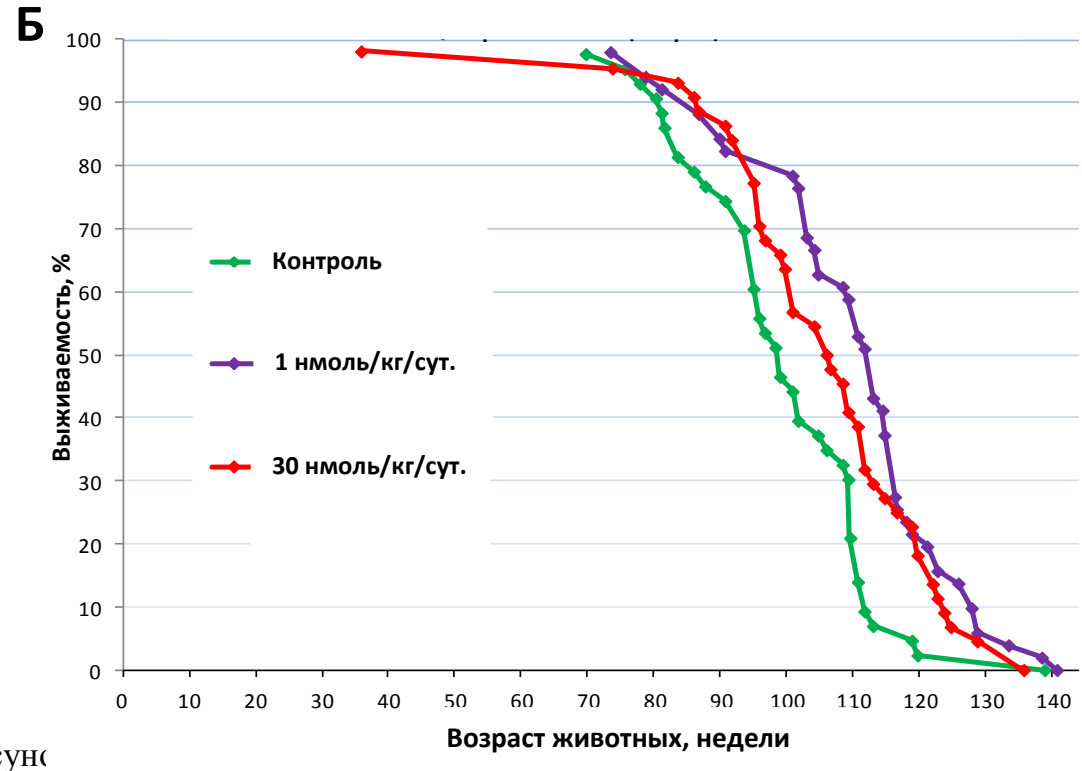




Рисунок гибели от естественных причин самок (А) и самцов (Б) мышей линии BALB/c в условиях SPF-вивария. Примечание – достоверность различий контрольных и обеих опытных кривых: в случае самок - $p>0,05$, в случае самцов - $p<0,05$, тест Каплан-Мейера.

содержавшихся в условиях, воспроизводящих естественную среду обитания этих

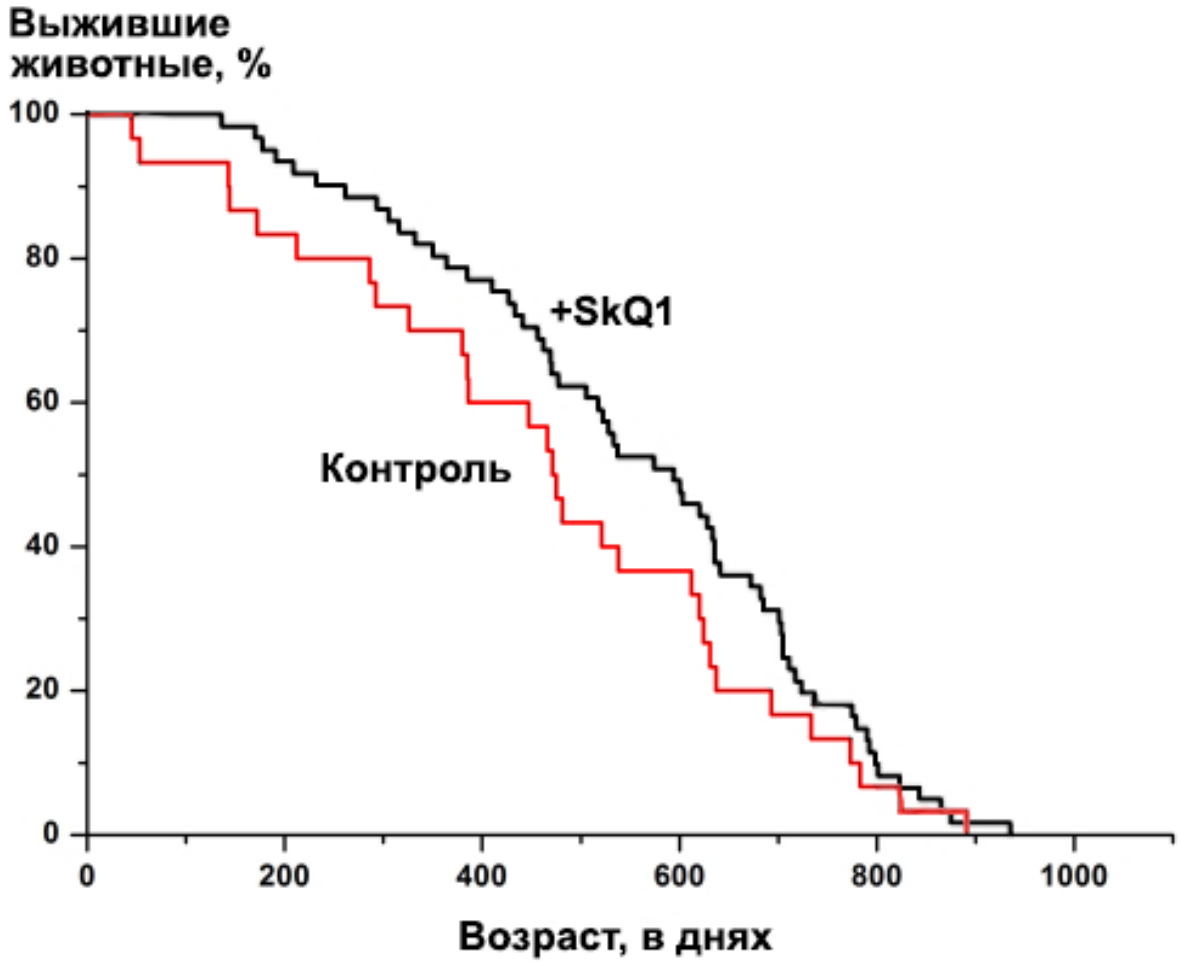



Рисунок 18 – Кривые, показывающие влияние SkQ1 (объединенные данные для групп, получавших 5 и 50 нмоль/кг/сутки) на динамику гибели от естественных причин самок хомячка Кэмпбелла (*Phodopus campbelli)* в условиях вивария, приближенных к естественной среде обитания. Примечание - достоверность различий между кривыми гибели контрольных животных и хомячков, получавших препарат: $p<0,05$, тест Каплан-Мейера.

Увеличение продолжительности жизни было установлено и для обыкновенной слепушонки, причем продолжительность жизни у самцов увеличивалась больше, чем у самок. Этот вывод очевиден при сравнении кривых гибели опытных и контрольных животных (рисунок 19). Кривые гибели слепушонок, получавших SkQ1 лежат заметно правее кривых гибели контрольных групп (достоверность различий: $p>0,05$, тест Каплан-Мейера).

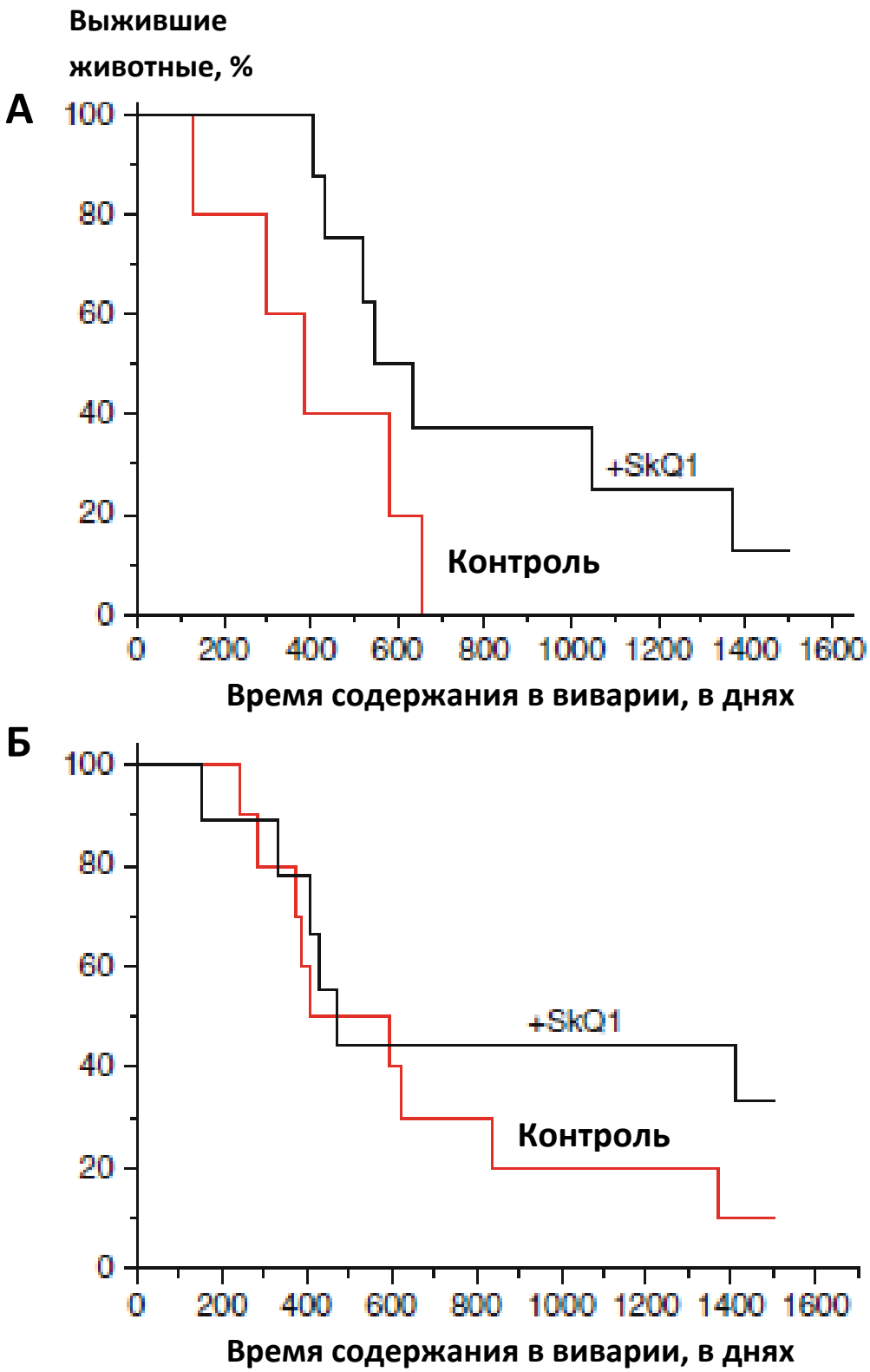



Рисунок 19 – Кривые, показывающие влияние SkQ1 (50 нмоль/кг/сутки) на динамику гибели от естественных причин самцов (А) и самок (Б) обыкновенной слепушонки (*Ellobius talpinus*) содержавшихся в условиях вивария, приближенных к естественной среде обитания. Примечание - достоверность различий между контролем и опытом для самок и самцов: $p<0,05$, тест Каплан-Мейера.

## 3.3 Патоморфологический анализ погибших животных, получавших SkQ1 *per os* на протяжении всей жизни

### 3.3.1 Инбредные мыши BALB/c

#### 3.3.1.1 Опухоли

Опухоли составляли группу наиболее частых патологических процессов, наблюдавшихся у мышей BALB/c. Общие частоты злокачественных опухолей во всех опытных группах, как у самцов, так и у самок отличалась от контроля недостоверно (во всех случаях $p>0,1$). Детально результаты исследований действия SkQ1 на опухолевый рост у мышей BALB/c представлены в разделе 3.8.1.

#### 3.3.1.2 Инфекционно-воспалительные заболевания

Хотя животные SPF-статуса в целом не подвержены эпидемическим инфекциям, тем не менее, это не исключает возникновения среди них спорадических гнойно-воспалительных заболеваний. Кроме того, длительное содержание животных в экспериментах с исследованием естественного старения делает риск контаминации мышей с изначальным SPF-статусом достаточно высоким. Среди инфекционных заболеваний, которые были отмечены у погибших животных в исследованиях SkQ1, встречались, прежде всего, неспецифические гнойно-воспалительные поражения – интерстициальный экссудативный нефрит, гнойный и серозный метрит, абсцессы препуциальных желез (у самцов) и острая гнойная бронхопневмония (рисунок 20, таблица 9). Пневмония, как правило, была осложнением опухолей системы крови – лимфом и лейкозов. Метрит чаще всего возникал в результате инфицирования матки при врожденной патологии – мукометре. В редких случаях воспаление принимало распространенный характер, с развитием морфологической картины сепсиса (септикопиемии). По данным бактериоскопии на мазках и срезах, окрашенных по Граму и Гимза, а также результатам бактериологического мониторинга вивария можно сделать вывод, что причиной воспалительных заболеваний были

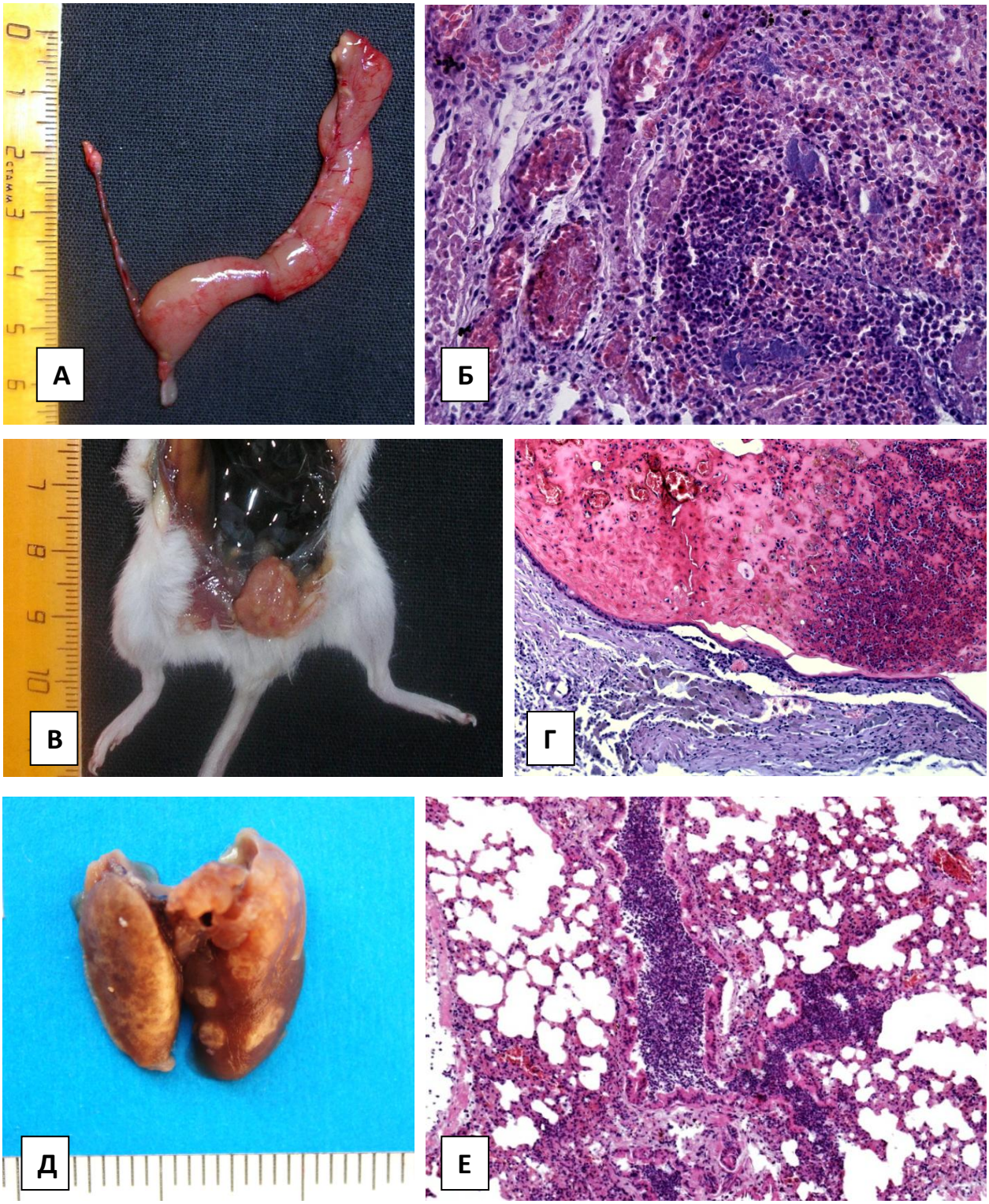



Рисунок 20 – Инфекционные гнойно-воспалительные поражения, отмеченные у мышей BALB/c: А, Б - гнойный метрит (эмпиема матки), макроскопическая (А) и микроскопическая картина (Б, окраска гематоксилином и эозином, х400); В,Г – нагноившаяся ретенционная киста (абсцесс) препуциальной железы, макроскопическая (В) и микроскопическая картина (окраска гематоксилином и эозином, х200); Д,Е – гнойная бронхопневмония, макроскопическая (Д) и микроскопическая картина (Е, окраска гематоксилином и эозином, х100).

Таблица 9 – Встречаемость спонтанных патологических процессов (кроме опухолей, характеристика опухолей приведена в таблице 18), выявленных у погибших самцов и самок мышей BALB/c, получавших SkQ1 на протяжении всей жизни

| САМЦЫ | | | |
|---|---|---|---|
| Патологические изменения | Контроль | 1 нмоль/кг/сут. | 30 нмоль/кг/сут. |
| Хроническая прогрессирующая нефропатия | 2/24 (8,3%) | 3 /31 (9,7%) | 2/31 (6,5%) |
| Обструктивная уропатия | 5/30(16,7%) | 2/39 (5,1%) | 2/36 (5,6%) |
| Интерстициальный экссудативный нефрит | 0/24 (0%) | 1/31 (3,2%) | 1/31 (3,2%) |
| Острые пневмонии (в том числе и ассоциированные с опухолями крови) | 2/24 (8,3%) | 3/31 (9,7%) | 2/31 (6,5%) |
| Гепатиты разной этиологии | 4 /24 (16,7%) | 5/31(16,1%) | 2/31 (6,5%) |
| Энтериты | 0 /24 (0%) | 0/31 (0%) | 1/31 (3,2%) |
| Геликобактерный колит (тифлит) | 1/24 (4,2%) | 3/31 (9,8%) | 2/31 (6,5%) |
| Септикопиемия | 0/ 24 (0%) | 1/31 (3,2%) | 1/31 (3,2%) |
| Васкулиты и тромбозы | 2 /24 (8,3%) | 0/39 (0%) | 2/31 (6,5%) |
| Кардиомиопатия | 7 /27 (25,9%) | 1/31(3,2%)** | 2/32 (6,3)* |
| Абсцессы и кисты препуциальной железы | 2/30 (6,7%) | 5/39(12,8%) | 0/36 (0%) |
| Острая язва желудка | 0 /24 (0%) | 1/31 (3,2%) | 1/31(3,2%) |
| Эпикардиальная минерализация | 2/30 (6,7%) | 1/39 (2,6%) | 0/36 (0%) |
| Ульцеративный дерматит | 4/30(13,3%) | 1/31 (3,2%) | 1/31 (3,2%) |
| Генерализованный липофусциноз органов | 0/24 (0%) | 1/31 (3,2%) | 0/31 (0%) |
| Трупы с морфологической картиной неспецифических нарушений системного кровообращения без изменений во внутренних органах | 5/24 (20,8%) | 6/31 (19,4%) | 9/31(29,3%) |
| САМКИ | | | |
| Патологические изменения | Контроль | 1 нмоль/кг/сут. | 30 нмоль/кг/сут. |
| Хроническая прогрессирующая нефропатия | 2/35 (5,7%) | 3/45 (6,7%) | 5/39 (12,8%) |
| Гидронефроз | 1/62 (1,6%) | 0/59 (0%) | 1/65 (1,5%) |
| Неамилоидная гиалиновая гломерулопатия | 1/35 (2,9%) | 0/45 (0%) | 0/39 (0%) |
| Острые пневмонии (в том числе и ассоциированные с опухолями крови) | 1/35 (2,9%) | 0/45 (0%) | 1/39 (2,6%) |
| Гепатиты разной этиологии | 2/35 (5,7%) | 3/45 (6,7%) | 3/39 (7,7%) |
| Энтериты | 2/35 (5,7%) | 1/45 (2,2%) | 0/39 (0%) |
| Геликобактерный колит (тифлит) | 3/35 (8,6%) | 1/45 (2,2%) | 1/39 (2,6%) |
| Острый гнойный метрит | 3/35 (8,6%) | 2/45 (4,4%) | 1/39 (2,6%) |
| Мукометра/гидрометра | 1/62 (1,6%) | 9/59(15,3%)** | 3/65 (7,7%) |
| Гигантская мукометра | 0/62 (0%) | 2/59(3,4%)* | 3/65 (4,6%)* |
| Септикопиемия | 1/35 (2,9%) | 2/45 (4,4%) | 0/39 (0%) |
| Васкулиты и тромбозы | 2/35 (5,7%) | 2/45 (4,4%) | 5/39 (12,8%) |
| Кардиомиопатия | 1/35 (2,9%) | 3/45 (6,7%) | 2/39 (5,1%) |
| Острая язва желудка | 1/35 (2,9%) | 1/45 (2,2%) | 1/39 (2,6%) |
| «Мезентериальная болезнь» | 0/35 (0%) | 0/45 (0%) | 1/39 (2,6%) |
| Эпикардиальная минерализация | 3/62(4,8%) | 1/59 (1,7%) | 2/65 (3,1%) |
| Генерализованный липофусциноз органов | 0/35 (0%) | 0/45 (0%) | 1/39 (2,6%) |
| Трупы с морфологической картиной неспецифических нарушений системного кровообращения без изменений во внутренних органах | 1/35 (2,9%) | 2/45 (4,4%) | 4/39 (10,3%) |

Примечание – выборка для каждого случая представлена числом животных, у которых сохранность трупа позволяла поставить соответствующий диагноз. Отличия от контроля: *- $p<0,05$; **- $p<0,01$.

патогенные грампозитивные стафилококки и капсульные грамотрицательные палочки (клебсиеллы).

Еще одной важной, относительно нередкой формой инфекционных поражений были колиты и гепатиты (рисунок 21, таблица 9). Колиты поражали слепую и проксимальный отдел толстой кишки, сопровождались смешанной нейтрофильно-лимфоцитарной инфильтрацией слизистой оболочки и резкой гиперплазией крипт. Гепатиты обычно имели фокальный характер, чаще всего в виде слабо реактивных некрозов печени, гораздо реже – со значительной нейтрофильной или лимфо-гистиоцитарной инфильтрацией очагов некроза или с развитием на их месте крупных гранулем. Редкие случаи энтеритов были ассоциированы с гепатитом описанного типа. Иногда гепатит имел форму диффузного активного интерстициального продуктивного воспаления; встречался и Рейе-подобный синдром. Причиной описанных поражений кишечника и печени служили, по данным серологического мониторинга здоровья животных и анализа морфологической картины [The Mouse…, 2006; Persy, Barthold, 2007; Pathology of the mouse…, 1999] контаминация коронавирусом мышиного гепатита и геликобактером. Сравнение частот разных инфекционных поражений в группах самцов и самок, получавших разные дозы SkQ1 (0, 1 и 30 нмоль/кг/сутки), а также их суммарных частот патологий такого типа не обнаружило достоверного и значимого влияния препарата на них (таблица 9, во всех случаях $p>0,05$).

### 3.3.1.3 Неинфекционная патология

### Сердечно-сосудистая патология

Наиболее важной формой кардиоваскулярной патологии у исследованных павших мышей BALB/c оказалась кардиомиопатия (таблица 9, рисунок 22, А-В). Это заболевание неизвестной этиологии, встречающееся у лабораторных грызунов и характеризующееся развитием асептического хронического воспаления в миокарде с гибелью части кардиомиоцитов, гипертрофией оставшихся клеток сердца и развитием очагового фиброза [Pathobiology…, 1996; Pathology of the mouse…, 1999; Greaves, 2007; Background Lesions…,2012].

Идиопатический (а не инфекционный) характер поражения считается главным отличительным признаком этой болезни в дифференциальной диагностике с миокардитом,поэтому такой диагноз принято устанавливать во всех случаях, в которых инфекционная природа поражения сердца не доказана [Pathobiology…, 1996; Pathology of the mouse…, 1999]. Еще одним морфологическим признаком поражений сердца при кардиомиопатии у мышей служит появление клеток с ядрами типа Аничкова, причем не только среди клеток стромы, но среди кардиомиоцитов. Частота кардиомиопатий существенно различалась у животных разного пола, контрольные самцы поражались примерно на порядок чаще, чем самки: встречаемость болезни составила 25,9 и 2,9% от числа погибших животных соответственно. При этом оказалось, что обе исследованные дозы SkQ1 - 1 и 30 нмоль/кг/сутки, получаемые в течение всей жизни - существенно снижают частоту развития кардиомиопатии у мышей-самцов: соответственно, до 3,2% ($p<0,01$) и 6,3% ($p<0,05$) (таблица 9). Таким образом, частота этой формы патологии у самцов, подвергавшихся воздействию препарата, снижалась до уровня, наблюдаемого у самок. В то же время, препарат ни в одной из доз не оказал никакого влияния на частоту кардиомиопатии у самок, которая, как уже было упомянуто выше, встречалась у них относительно редко.

Среди других неопухолевых патологических изменений кардиоваскулярной системы, встреченных у павших мышей BALB/c, были: атриальный тромбоз, периваскулиты и васкулиты сосудов разных органов и эпикардиальный кальциноз с локальным фиброзом эпикарда (рисунок 22). Все эти формы патологии типичны для мышей линии BALB/c, особенно эпикардиальная минерализация, частота которой не зависит от возраста животных и, по-видимому, это заболевание не вызывает гибели мышей [Pathobiology…, 1996; Pathology of the mouse…, 1999; Brayton, 2006; Greaves, 2007; Background Lesions…, 2012]. Перечисленные поражения у самцов и у самок были весьма редки (единичные случаи в каждой группе). Нужно сказать, что ни в одной из групп не удалось обнаружить влияния

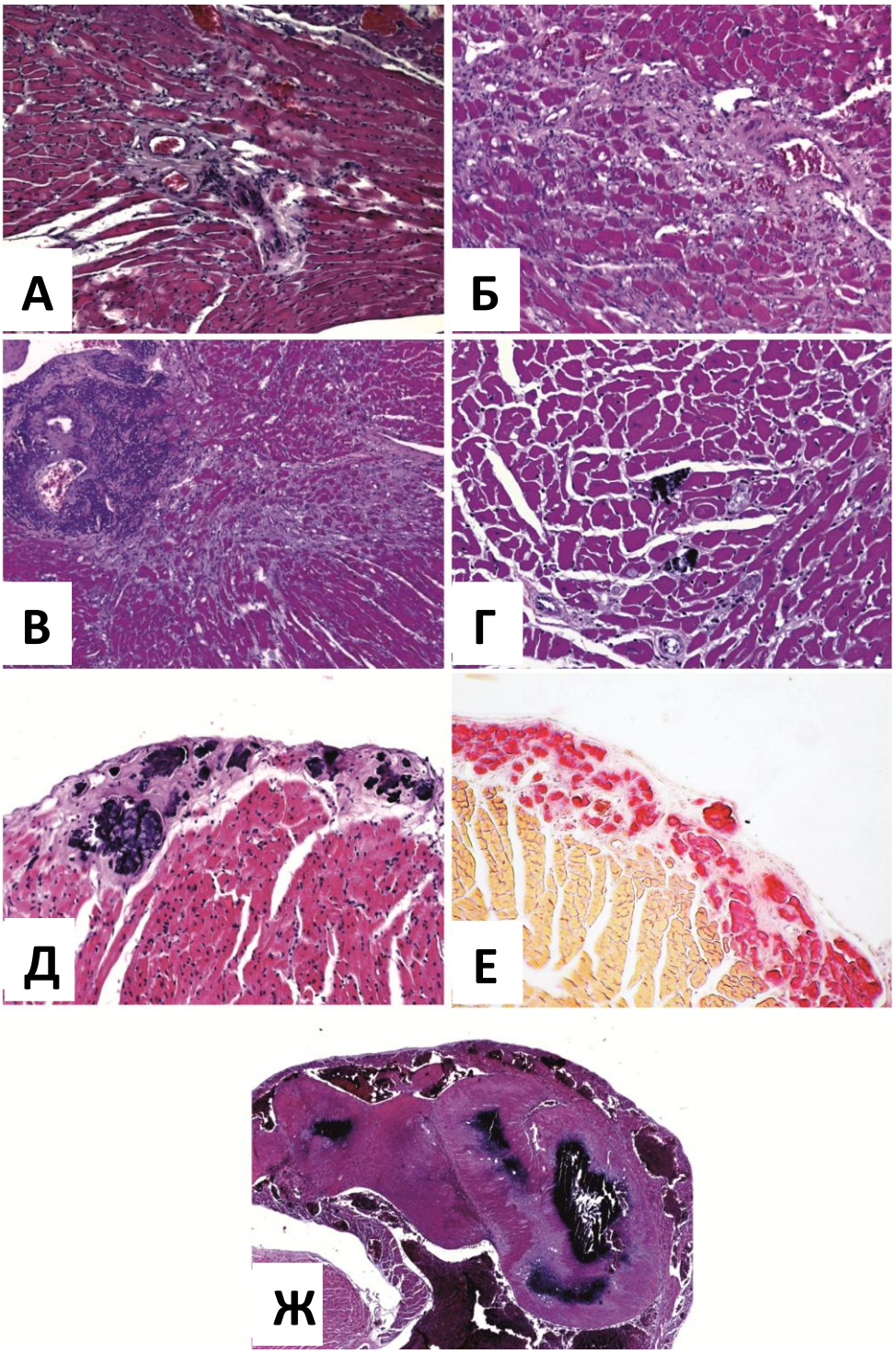



Рисунок 22 – Типичные патологические изменения сердца у старых (~2-летнего возраста) мышей линий BALB/c и C57BL/6 Примечание - А – умеренно выраженный периваскулярный фиброз миокарда (кардиомиопатия) у мыши BALB/c; Б – резко выраженный фиброз миокарда (кардиомиопатия) у мыши C57BL/6; В – выраженное периваскулярные и интерстициальные продуктивное воспаление и фиброз миокарда (кардиомиопатия) у мыши C57BL/6; Г – миокардиальная минерализация, мышь C57BL/6; Д, Е – эпикардиальная минерализация, мышь BALB/c; Ж – атриальный тромбоз, мышь BALB/c. А-Д – окраска гематоксилином и эозином, х200; Е – окраска ализариновым красным (для выявления депозитов кальция), х200; Ж – окраска гематоксилином и эозином, х50.

SkQ1 на частоту любого из перечисленных вариантов кардиоваскулярной патологии (таблица 9, во всех названных случаях $p>0,05$).

## Мукометра/гидрометра

Мукометра – хорошо известное врожденное заболевание (полигенной природы), характерное для мышей-самок линии BALB/c, при котором отсутствует нормальное сообщение между влагалищем и одним или обоими рогами матки, в результате чего отток маточного секрета становится затруднен или невозможен [Brayton, 2006; Persy, Barthold, 2007]. Эта анатомическая аномалия внутреннего строения матки приводит к тому, скопившийся секрет растягивает ее порой до гигантских размеров (рисунок 23). Такие животные обычно бесплодны. Иногда в

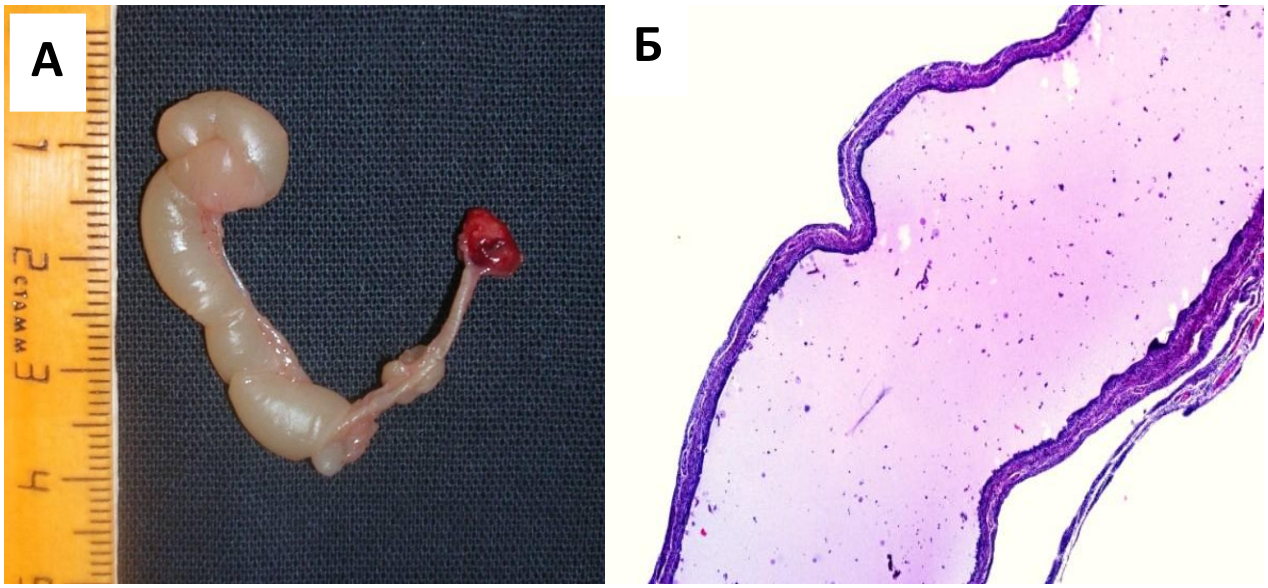



Рисунок 23 – Мукометра (гидрометра) у мыши линии BALB/c Примечание – А - макроскопический вид: мукометра правого рога матки, заметна также опухоль (гемангиома) левого яичника; Б - гистологическая картина: атрофия стенок матки, просвет заполнен эозинофильным содержимым с клеточным дебрисом (окраска гематоксилином и эозином, х100).

результате гнойно-воспалительных осложнений (гнойный или серозный метрит), а возможно, и само по себе данное заболевание может привести животное к гибели. Интересно, что у мышей в группе, получавшей 30 нмоль/кг препарата в сутки на протяжении всей жизни, включая внутриутробный период (когда эта

доза давалась их родителям), частота мукометры составила 7,7%, а в группе, получавшей 1 нмоль/кг в сутки – 15,3% при частота в контрольной группе 1,6% (уровни достоверности: $p<0,1$ и $p<0,01$ соответственно) (таблица 9). Была оценена также частота случаев, в которых матка достигала гигантских размеров (10 см), сдавливала окружающие органы и сама по себе могла служить причиной гибели животного. Этот показатель тоже оказался выше у животных, получавших SkQ1. В то время, как в контроле такие случаи не встречались, в группе, получавшей 30 нмоль/кг препарата в сутки, они встретились у 3,4% животных, а в группе, которой давался 1 нмоль/кг препарата – у 4,6% животных (в обоих случаях $p<0,05$). Частота этой врожденной болезни, характерной только для самок BALB/c, естественно, не коррелировала с возрастом ($r=-0,023$, $p>0,1$).

**Прочая неинфекционная патология**

У погибших животных разных групп регистрировались отдельные случаи прогрессирующей нефропатии, обструктивной уропатии и кист препуциальных желез (у самцов), неамилоидной гиалиновой гломерулопатии, острых стрессовых язв желудка (обычно на фоне тяжелой опухолевой или инфекционной патологии), гидронефроза (вызванного опухолевой обструкцией мочеточников), «мезентериальной болезни», липофусциноза внутренних органов (почек и селезенки) (таблица 9). Кроме того, у единичных особей посмертное морфологическое исследование, даже при относительной сохранности гистологических структур основных органов и тканей, не позволило достоверно верифицировать причину гибели животных. Не исключено, что смерть этих животных наступила вследствие внезапной остановки сердца, при которой никаких четких признаков, кроме неравномерного полнокровия внутренних органов, выявить не удается [Pathology of the mouse…, 1999; Son, 2003]. В целом, никаких значимых отличий в частоте перечисленных патологических изменений в каждой из опытных групп по сравнению с контролем не отмечено (таблица 9, во всех перечисленных случаях $p>0,05$).

### 3.3.2 Инбредные мыши C57Bl/6

У контрольных мышей (оба пола) встречались следующие патологические изменения: разнообразные доброкачественные и злокачественные опухоли, хроническая прогрессирующая нефропатия, гемолитическая анемия, продуктивный гепатит, гиперпластический колит, гиперплазия субкапсулярных клеток в надпочечниках, гиперплазия эндометриальных желез, ульцеративный дерматит, абсцессы разной локализации, гиперплазия эпителия семенных пузырьков, системный васкулит, спонтанная жировая дистрофия печени, минерализация гипоталамуса и миокарда, амилоидоз, кардиомиопатия, гиалиново-капельная дистрофия эпителия железистого желудка, ацидофильный кристаллический пневмонит.

У мышей обоих полов, получавших 1400 нмоль/кг/сутки SkQ1 были обнаружены: доброкачественные и злокачественные опухоли, продуктивный везикулит, гнойный эндометрит, ульцеративный дерматит, обструктивная уропатия, панкреатит, хроническая прогрессирующая нефропатия, системный васкулит, гемолитическая анемия, продуктивный гепатит, гиперпластический колит, гиперплазия субкапсулярных клеток в надпочечниках, гиперплазия эндометриальных желез, нодулярная гиперплазия клеток аденогипофиза, абсцессы разной локализации, кардиомиопатия, кишечный дивертикул, спонтанная жировая дистрофия печени, ацидофильный кристаллический пневмонит.

Частоты перечисленных выше поражений рубрифицированы и суммированы в таблице 10. Как видно на этой таблице, спектр патологий у опытных и контрольных животных был в целом сходным; различия по отдельным нозологиям были представлены казуистическими случаями. Частоты всех перечисленных патологических процессов достоверно не различались (во всех случаях $p>0,05$), за исключением возрастной кардиомиопатии. Это заболевание у мышей C57Bl/6 было сходно с подобной патологией у BALB/c (рисунок 21). Кроме того, стоит заметить, что у C57Bl/6 встречаются минеральные депозиты в миокарде (рисунок 22, Г), которые, однако, как считается, не имеют отношения к

Таблица 10 – Встречаемость спонтанных патологических процессов, выявленных у самцов и самок мышей C57BL/6, получавших1400 нмоль/кг/сутки SkQ1 на протяжении всей жизни

| Патологические изменения | Контроль (8♀, 9♂) | Опыт (10♀, 7♂) |
|---|---|---|
| Доброкачественные опухоли | 3/17 (17,7%) | 8/17 (47,2%) |
| Злокачественные опухоли | 11/17 (64,9%) | 8/17 (47,2%) |
| Суммарное число выявленных опухолей* | 14 | 16 |
| Субкапсулярная гиперплазия коры надпочечника | 1/17 (5,9%) | 1/17 (5,9%) |
| Нодулярные гиперпластические изменения эпителия семенных пузырьков | 1/17 (5,9%) | 0/17 (0%) |
| Нодулярная гиперплазия эндокриноцитов аденогипофиза | 0/17 (0%) | 1/17 (5,9%) |
| Кистозная гиперплазия эндометрия | 3/17 (17,7%) | 2/17 (11,8%) |
| Инфекционно-воспалительные поражения мочевого тракта | 0/17 (0%) | 1/17 (5,9%) |
| Инфекционно-воспалительные поражения печени | 4/17 (23,6%) | 3/17 (17,7%) |
| Инфекционно-воспалительные поражения поджелудочной железы | 2/17 (11,8%) | 6/17 (35,4%) |
| Инфекционно-воспалительные поражения пищеварительного тракта | 5/17 (29,5%) | 8/17 (47,2%) |
| Инфекционно-воспалительные поражения мезентериальной области | 5/17 (29,5%) | 1/17 (5,9%) |
| Инфекционно-воспалительные поражения репродуктивной системы | 7/17 (41,3%) | 4/17 (23,6%) |
| Инфекционно-воспалительные поражения кожи | 1/17 (5,9%) | 1/17 (5,9%) |
| Суммарное число выявленных инфекционно-воспалительных поражений разных органов | 24 | 24 |
| Системный продуктивный васкулит | 2/17 (11,8%) | 2/17 (11,8%) |
| Кардиомиопатия | 8/17 (47,2%) | 1/17 (5,9%)# |
| Хроническая прогрессирующая нефропатия | 11/17 (64,9%) | 7/17 (41,3%) |
| Обструктивная уропатия | 1/17 (5,9%) | 1/17 (5,9%) |
| Системный амилоидоз | 4/17 (23,6%) | 1/17 (5,9%) |
| Минерализация миокарда | 1/17 (5,9%) | 0/17 (0%) |
| Минерализация гипоталамуса | 1/17 (5,9%) | 0/17 (0%) |
| Гиалиново-капельная дистрофия эпителия железистого желудка | 1/17 (5,9%) | 0/17 (0%) |
| Жировая дистрофия печени | 2/17 (11,8%) | 2/17 (11,8%) |
| Кристаллический макрофагальный пневмонит | 5/17 (29,5%) | 4/17 (23,6%) |
| Гемолитическая анемия | 9/17 (53,1%) | 7/17 (41,3%) |
| Кишечный дивертикул | 0/17 (0%) | 1/17 (5,9%) |

Примечание – отличия от контроля: #- $p<0,05$; * - у контрольных мышей (обоих полов) встречались следующие опухоли: диссеминированные и локализованные (в пейеровых бляшках) диффузные лимфобластные и диссеминированная иммунобластная лимфомы, лимфатическая лейкемия, фолликулярные лимфомы, гистиоцитарная саркома печени, аденома гипофиза, хориокарцинома яичника, кавернозная гемангиома подкожной клетчатки. У мышей обоих полов, получавших 1400 нмоль/кг/сутки SkQ1 были обнаружены: диссеминированные и локализованные (в пейеровых бляшках) диффузные лимфобластные лимфомы, фолликулярная лимфома, гистиоцитарная саркома селезенки, тубулостромальная аденома яичника, аденома гипофиза, папиллярная аденома щитовидной железы, гемангиома подкожной клетчатки.

кардиомиопатии [Persy, Barthold, 2007]. Эпикардиальных кальцинатов, характерных для линии BALB/c, у данных животных, напротив, никогда не наблюдалось. Статистическое сравнение частот кардиомиопатии у мышей опытных и контрольных групп (суммарно, для обоих полов, ввиду малого числа особей), показало, что SkQ1 оказывает на C57Bl/6 тот же эффект, что и на самцах BALB/c, а именно, снижает встречаемость заболевания у павших животных с 47,1% в контроле до 5,9% в опытной группе ($p<0,05$).

### 3.3.3 Хомячок Кэмпбелла (*Phodopus campbelli)*

Самой частой патологией, служившей причиной гибели около половины животных во всех группах, были опухоли, причем SkQ1 не оказывал достоверного влияния на частоту новообразований (см. раздел 3.8.3). Из прочей патологии детального анализа заслуживали инфекционные и неинфекционные воспалительные поражения (таблица 11). Из инфекционных заболеваний чаще всего встречалась гнойная пневмония (рисунок 24, А), имеющая характер бронхопневмонии, иногда с образованием абсцессов на периферии легких. Другие гнойно-воспалительные процессы были представлены единичными случаями ульцеративного дерматита и болезни Тайзера. Поражения сердца представляли собой продуктивное интерстициальное склерозирующее воспаление неизвестной этиологии (рисунок 24, Б). Кроме того, почти у всех животных отмечена своеобразная патология в виде резко выраженной гиперплазии эпителия преджелудка с образованием множества роговых кист (гиперкератозом). Помимо гиперкератоза, наблюдались также резко выраженные явления продуктивного эрозивного гастрита и псевдоэпителиоматозная гиперплазия плоского эпителия вплоть до картин раннего инвазивного рака (рисунок 24, В). Погруженный рост эпителия иногда достигал мышечного слоя преджелудка. Однако, ни в одном случае не встретилось прорастание эпителием стенки преджелудка насквозь, равно как не наблюдались и метастазы, даже в регионарном лимфоузле. Все это позволяет высказаться о воспалительном происхождении указанных разрастаний. В единичных случаях отмечалась гибель животных от истощения вследствие

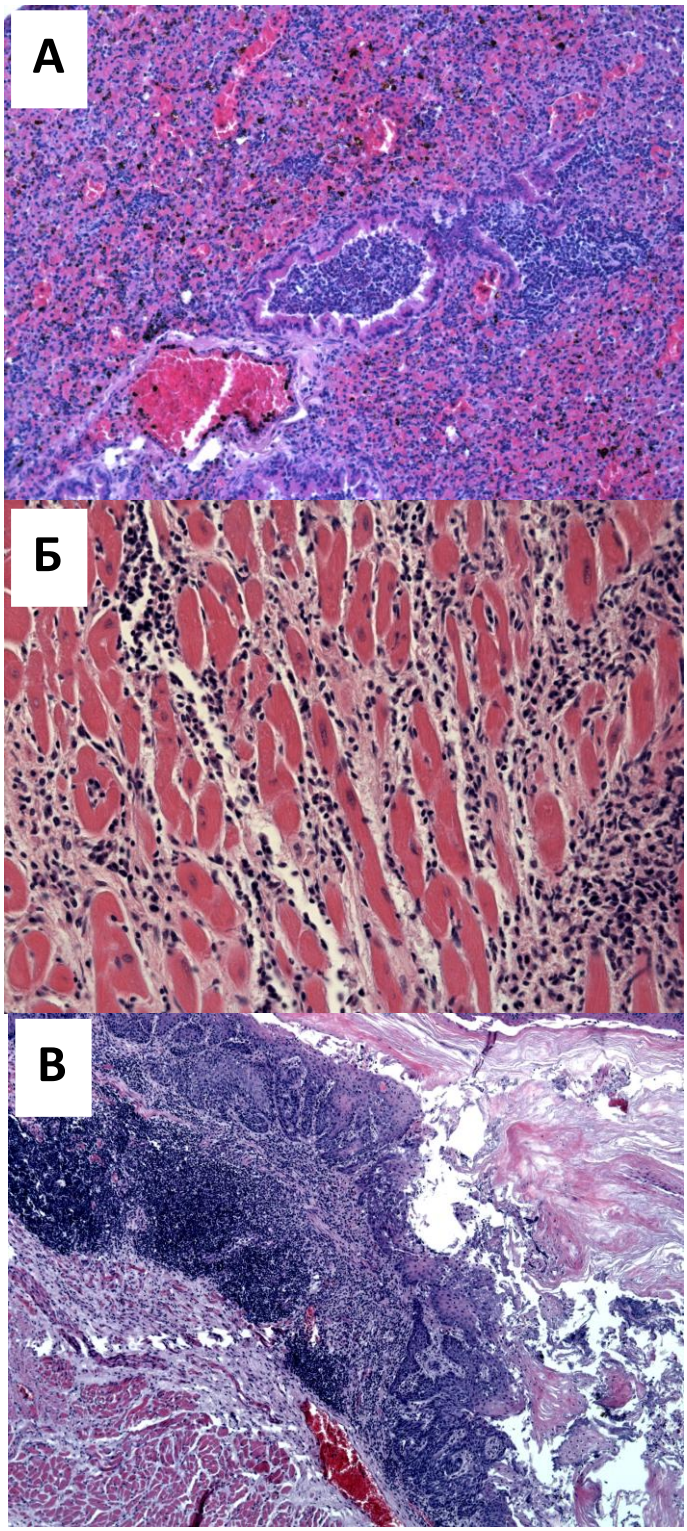



Рисунок 24 – Патологические неопухолевые изменения у хомячка Кэмпбелла *(Phodopus campbelli)*: А - экссудативная пневмония. Б - продуктивное интерстициальное склерозирующее воспаление в миокарде. В - гиперкератоз, псевдоэпителиоматозная гиперплазия и выраженное продуктивное воспаление слизистой оболочки преджелудка. Окраска гематоксилином и эозином, А – х200, Б – х400, В - х100.

возникших состояний с механическим препятствием для прохождения пищи (безоары из волос и роговых масс, заполняющих просвет желудка, неправильный прикус).

Для статистических сравнений, основные изменения, обнаруженные при гистологическом изучении образцов от трупов самок, получавших и не получавших SkQ1, были сгруппированы в следующей таблице (таблица 11).

Таблица 11 – Встречаемость важнейших неопухолевых патологических изменений у хомячка Кэмпбелла *(Phodopus campbelli)*

| Группа | Общая частота гнойно-воспалительной патологии | Частота пневмоний | Частота воспалительных поражений сердца |
|---|---|---|---|
| Контроль, самки | 7/20 (35%) | 4/20 (20%) | 1/20 (5%) |
| 5 + 50 нмоль/кг SkQ1, самки | 9/45 (20%) | 5/45 (11%) | 4/45 (9%) |

Примечание – во всех случаях для различий между опытной и контрольной группами $p>0,05$.

Частота любого из перечисленных вариантов неопухолевой патологии не менялась под действием SkQ1 (во всех случаях $p>0,05$).

### 3.3.4 Обыкновенная слепушонка *(Ellobius talpinus)*

Соотношение павших животных разного возраста в опытных и контрольных группах, послуживших материалом для патоморфологического исследования, представлено в таблице 12. Как видно из этой таблицы, в целом эти группы по возрастному параметру были сопоставимы. Частоты различных выявленных патологических изменений представлены в таблице 13.

#### Опухоли и опухолеподобные воспалительные реакции

Влияние SkQ1 на опухолевый рост описано в разделе 3.8.4, здесь стоит лишь упомянуть, что опухоли у слепушонки обыкновенной встретились в относительно небольшом числе случаев и что данный препарат на частоту опухолей у этого животного достоверного влияния не оказал. Помимо истинных

Таблица 12 – Возрастная и половая структура изученного материала

| Возрастная группа | Самки, контроль (n=25) | Самки, SkQ1 (n=21) | Самцы, контроль (n=24) | Самцы, SkQ1 (n=26) |
|---|---|---|---|---|
| До 1 года | 3 (12%) | 0 | 3 (13%) | 6 (23%) |
| 1-2 года | 17 (68%) | 15 (71%) | 16 (66%) | 15 (57%) |
| 2-3 года | 3 (12%) | 2 (10%) | 5 (21%) | 3 (12%) |
| Более 3 лет | 2 (8%) | 4 (19%) | 0 | 2 (8%) |

опухолей, у обыкновенной слепушонки были отмечены процессы, проявления которых очень сильно напоминали новообразования. Во-первых, это были лейкемоидные реакции, когда в крови сердца и крупных сосудов наблюдается большое число незрелых гемопоэтических клеток; аналогичные клетки замещают собой большую часть пульпы селезенки и образуют обширные инфильтраты в портальных трактах печени и под капсулой почки (рисунок 25, И, К). Как видно из таблицы 13, такие явления были найдены во всех группах у 15-29% животных, причем частота лейкемоидных реакций достоверно не отличалась ни в одной из исследованных групп (во всех случаях $p>0,05$). Морфологически такие картины могут создать впечатление лейкоза, однако, ассоциация в подавляющем большинстве случаев с инфекционными поражениями, отсутствие замещения опухолевыми клетками значительных зон паренхимы в печени и в почках (что обычно при лейкозах), наконец, наличие мегакариоцитов в инфильтратах и очагов экстрамедуллярного гемопоэза в печени и под капсулой почек у части животных без каких-либо других изменений позволяет провести дифференциальную диагностику. Во-вторых, на опухолевый рост очень похожи хронические воспалительные процессы в мягких тканях и в средостении (рисунок 25, В). Гистологически при этом выявляется обширный плотный инфильтрат из фибробластов, характерных макрофагов с крупными ядрами (часто ядер 2-5), бластов и плазматических клеток. Проникновение инфильтрата по интерстицию создает впечатление неопластической инвазии. Однако, значительная примесь нейтрофильных лейкоцитов, очаги хронического абсцедирования, а также

Таблица 13 – Частота встречаемости животных с разными вариантами патологических изменений среди самок и самцов обыкновенной слепушонки (*Ellobius talpinus, Pallas*) контрольных и опытных групп

| Патологические изменения | Самки, контроль (n=25) | Самки, SkQ1 (n=21) | Самцы, контроль (n=24) | Самцы, SkQ1 (n=26) |
|---|---|---|---|---|
| Аномалии развития органов | 2/25 (8%) | 3/21 (14%) | 3/24 (13%) | 3/26 (12%) |
| Опухоли | См. раздел 3.8.4. | | | |
| Лейкемоидные реакции | 4/25 (16%) | 6/21 (29%) | 6/24 (25%) | 4/26 (15%) |
| Септикопиемия | 2/25 (8%) | 2/21 (10%) | 5/24 (21%) | 4/26 (15%) |
| Пневмонии | 8/25 (32%) | 3/21 (14%) | 10/24 (42%) | 11/26 (42%) |
| Абсцессы мягких тканей, внутренних органов и другие локализованные гнойно-воспалительные поражения | 3/25 (12%) | 0//21 (0%) | 2/24 (8%) | 2/26 (8%) |
| Продуктивные воспалительные поражения | 5/25 (20%) | 4/21 (19%) | 6/24 (25%) | 4/26 (15%) |
| Цестодозы | 2/25 (8%) | 2/21 (10%) | 0/24 (0%) | 3/26 (12%) |
| Кардиомиопатии | 1/25 (4%) | 0/21 (0%) | 1/24 (4%) | 2/26 (8%) |
| Тромбозы, инфаркты внутренних органов (кроме связанных с сепсисом) и постинфарктные рубцовые изменения | 2/25 (8%) | 2/21 (10%) | 1/24 (4%) | 3/26 (12%) |
| Дистрофические изменения паренхиматозных клеток печени и почек неясной этиологии | 5/25 (20%) | 7/21 (33%) | 4/24 (17%) | 1/26 (4%) |
| Минеральные депозиты и очаги оссификации тканей и органов | 3/25 (12%) | 1/21 (5%) | 2/24 (8%) | 1/26 (4%) |
| Прочие изменения | - | Изменения в почках по типу обструктивной уропатии (у 1 животного) | Фокусы «альтерации» в печени и дилатация отдельных канальцев в почке (у 1 животного), холестериновые депозиты в легких (у 1 животного) | - |
| Гибель от травм и других случайных причин без специфических изменений во внутренних органах | 4/25 (16%) | 3/21 (14%) | 3/24 (13%) | 4/26 (15%) |

Рисунок 25

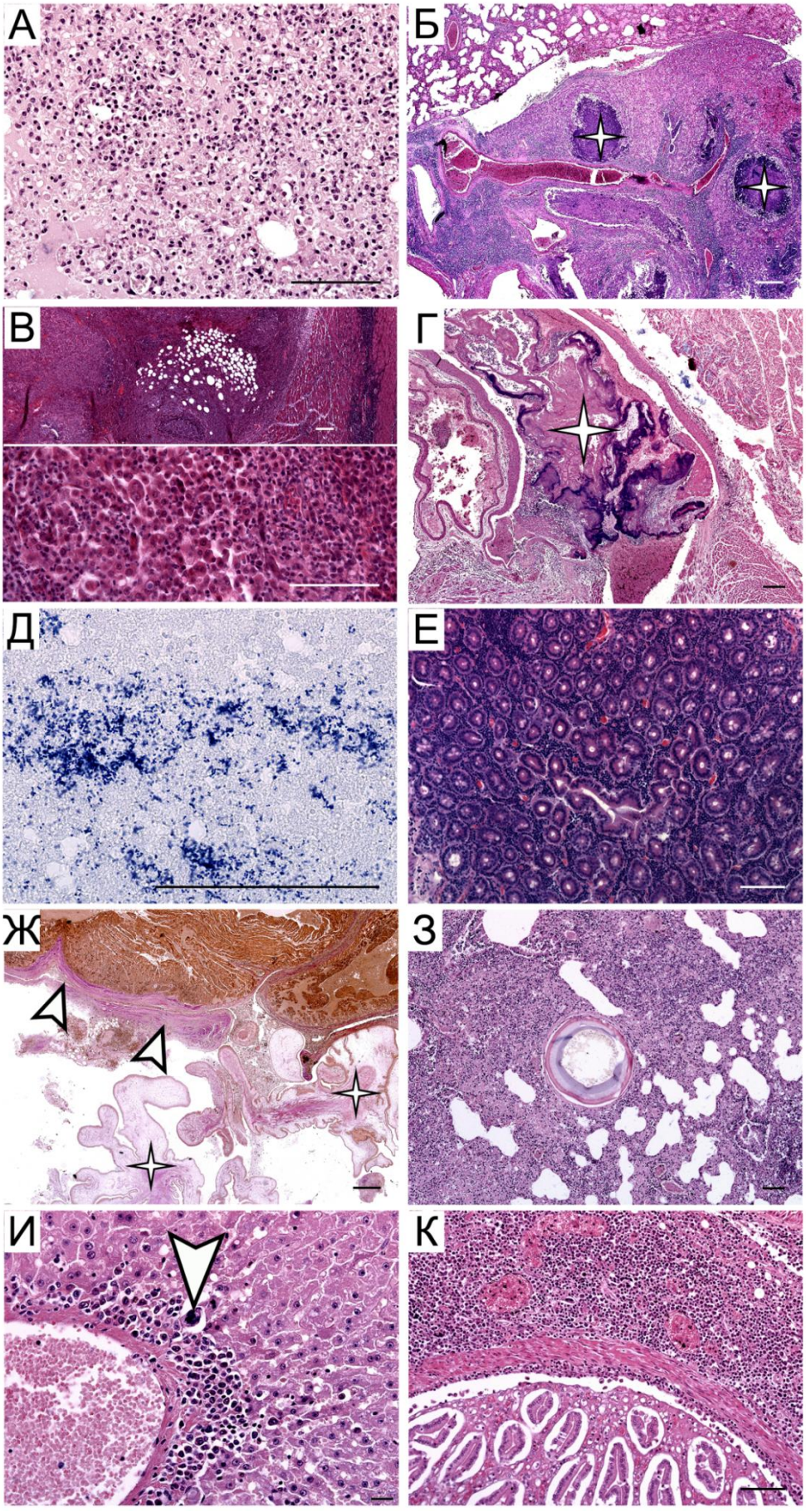


Рисунок 25 – Инфекционные и инвазивные поражения, отмеченные у обыкновенной слепушонки (*Ellobius talpinus, Pallas*): А – серозно-лейкоцитарная пневмония; Б – долевая абсцедирующая пневмония (множественные абсцессы легкого, звездочки); В – гнойно-гранулематозная «псевдоопухоль» мягких тканей конечности (верхняя половина рисунка – общий вид инфильтрированных тканей (дермы, мышц и жировой клетчатки), нижняя половина – клеточный состав инфильтрата, представленный плазмоцитами, полиморфными макрофагами и нейтрофилами); Г – массивный обтурирующий инфицированный тромб (звездочка) в устье аорты при сепсисе, темные массы – скопления бактерий; Д – многочисленные бактерии типа грамположительных стрептококков в пораженной ткани легкого; Е – интерстициальный лимфоцитарный энтерит в тощей кишке; Ж – цестода грудной полости, адгезированная к перикарду (звездочки), явления перикардиального и эпикардиального фиброза (стрелки); З – инкапсулированный цистицерк в легком; И – экстрамедуллярный гемопоэз (бласты и мегакариоцит (стрелка) в портальном тракте печени (лейкемоидная реакция) при сепсисе; К – массивный инфильтрат из бластных клеток под капсулой в воротах почки (экстрамедуллярный гемопоэз, лейкемоидная реакция) при сепсисе. А – Г, Е, З-К – окраска гематоксилином и эозином; Д – окраска по Граму-Вейгерту; Ж – окраска по Ван Гизону. Ж, Б – 25х; В (верхняя половина), Г – 50х; З – 100х; Е, К – 200х; А, В (нижняя половина), И – 400х; Д – 1000х. Масштабные линейки 100 мкм на А, В, Д, Е, З – К, 200 мкм на Г и 500 мкм на Б и Ж.

нередко находимые колонии бактерий позволяют довольно определенно установить воспалительную, а не опухолевую природу процесса.

## Инфекции и инвазии

Как видно из таблицы 13, наиболее частой патологией почти во всех группах были воспалительные поражения легких – пневмонии. Относительно мало случаев пневмоний встретилось в группе самок, получавших SkQ1, однако, по сравнению с контрольной группой это различие не оказалось достоверным ($p>0,05$). Пневмонии носили характер либо серозно-лейкоцитарных, с явлениями альвеолярного отека (рисунок 25, А), либо абсцедирующих (рисунок 25, Б), часто с вовлечением других органов средостения и генерализацией с развитием септикопиемии. В последнем случае наблюдались крупные инфицированные тромбы в сердце и крупных сосудах (рисунок 25, Г), очаги некрозов в печени, почках, селезенке и метастатические абсцессы в почках, печени, миокарде, мягких тканях, коже и кишечной стенке. Как правило, септикопиемия сопровождалась описанными выше изменениями по типу лейкемоидной реакции. Септикопиемия встречалась чаще у самцов, чему самок, однако, это различие

было недостоверным ($p>0,05$); SkQ1 также не оказал достоверного влияния на частоту септикопиемии ($p>0,05$). Локализованные абсцессы мягких тканей и внутренних органов (кроме легких) были обнаружены в меньшем числе случаев, чем пневмонии и септикопиемии. Они были отмечены со сходной частотой во всех группах, кроме самок, получавших SkQ1, где такие случаи не встретились. Особенностью гнойно-воспалительных поражений у слепушонки (как локализованных, так и при генерализованной инфекции) служит образование по периферии очага обширного инфильтрата из макрофагов и плазматических клеток с большим числом бластов, так что все образование может симулировать гемопоэтическую опухоль (описание см. выше).

По-видимому, все случаи гнойно-воспалительных поражений, отмеченные у обыкновенной слепушонки, независимо от их формы и локализации, имеют одну и ту же этиологию. По крайней мере, в срезах, окрашенных с использованием методов для выявления микроорганизмов, во

всех случаях выявлялись грамположительные стрептококки (рисунок 25, Д), не имеющие заметной капсулы и приобретающие дополнительный цвет при окраске по Цилю-Нильсену. Располагались эти бактерии главным образом внеклеточно (часто в центре абсцессов или зон некроза), но встречались и в цитоплазме лейкоцитов и макрофагов. Других микроорганизмов в пораженных тканях при всех вариантах обработки срезов для гистобактериоскопии никогда не наблюдалось. Кроме экссудативных поражений, у части животных были отмечены интерстициальные продуктивные инфильтраты в печени, легких, тощей кишке, состоящие в основном из лимфоцитов (рисунок 25, Е). Различий между группами животных в частоте поражений данного типа найдено не было (таблица 13). Этиология их осталась неясной, так как даже при применении ряда специальных окрасок никаких микроорганизмов в пораженных тканях обнаружить не удалось. Гельминтозная инвазия была представлена цистицерками в легких (рисунок 25, З), зрелыми цестодами в грудной полости (с адгезией к перикарду и явлениями фиброза эпикарда и перикарда) (рисунок 25, Ж) и одним

случаем огромной многокамерной финны в брюшной полости. Цестоды были найдены с приблизительно одинаковой частотой во всех группах, кроме контрольных самцов, где гельминты не были обнаружены.

**Прочие поражения**

Аномалии строения органов (рисунок 26, А-В, Д) встречались с почти одинаковой суммарной частотой во всех группах (достоверность различий - во всех случаях $p>0,05$).

Кардиомиопатия, похожая на аналогичную патологию у мышей, в виде единичных случаев встречалась во всех группах, кроме самок, получавших SkQ1, где это заболевание не было обнаружено. У небольшой части животных наблюдались явления острых спонтанных (не связанных с сепсисом) тромбозов с развитием типичных инфарктов в печени, в матке и в почках (рисунок 26, З), а также характерные постинфарктные рубцы (рисунок 26, И). Частота этих поражений у разных групп достоверно не различалась ($p>0,05$). Дистрофические изменения гепатоцитов (жировая дистрофия – рисунок 26, Е) и клеток проксимальных канальцев почек (жировая и гидропическая дистрофия – рисунок 26, Ж) встречались относительно нередко (таблица 13), достоверных различий между самцами и самками, а также между опытными и контрольными группами обнаружено не было ($p>0,05$). Этиология этих поражений не ясна. В части случаев дистрофические изменения наблюдаются одновременно как в почках, так и в печени, и вся картина очень напоминает ту, которая характерна для Рейе-подобного синдрома у мышей [Persy, Barthold, 2007]. Минеральные депозиты имеют вид характерных аморфных масс в интерстиции почек, в скелетной мускулатуре, в дерме, в миокарде предсердий, старых фиброзных рубцах, в легких и особенно часто – в стенках крупных артерий (рисунок 26, К). Обычно такие депозиты имеются сразу в нескольких органах, что указывает на них как на маркер системных нарушений минерального обмена. Нередко по периферии очагов минерализации виден эктопический остеогенез. Число

Рисунок 26

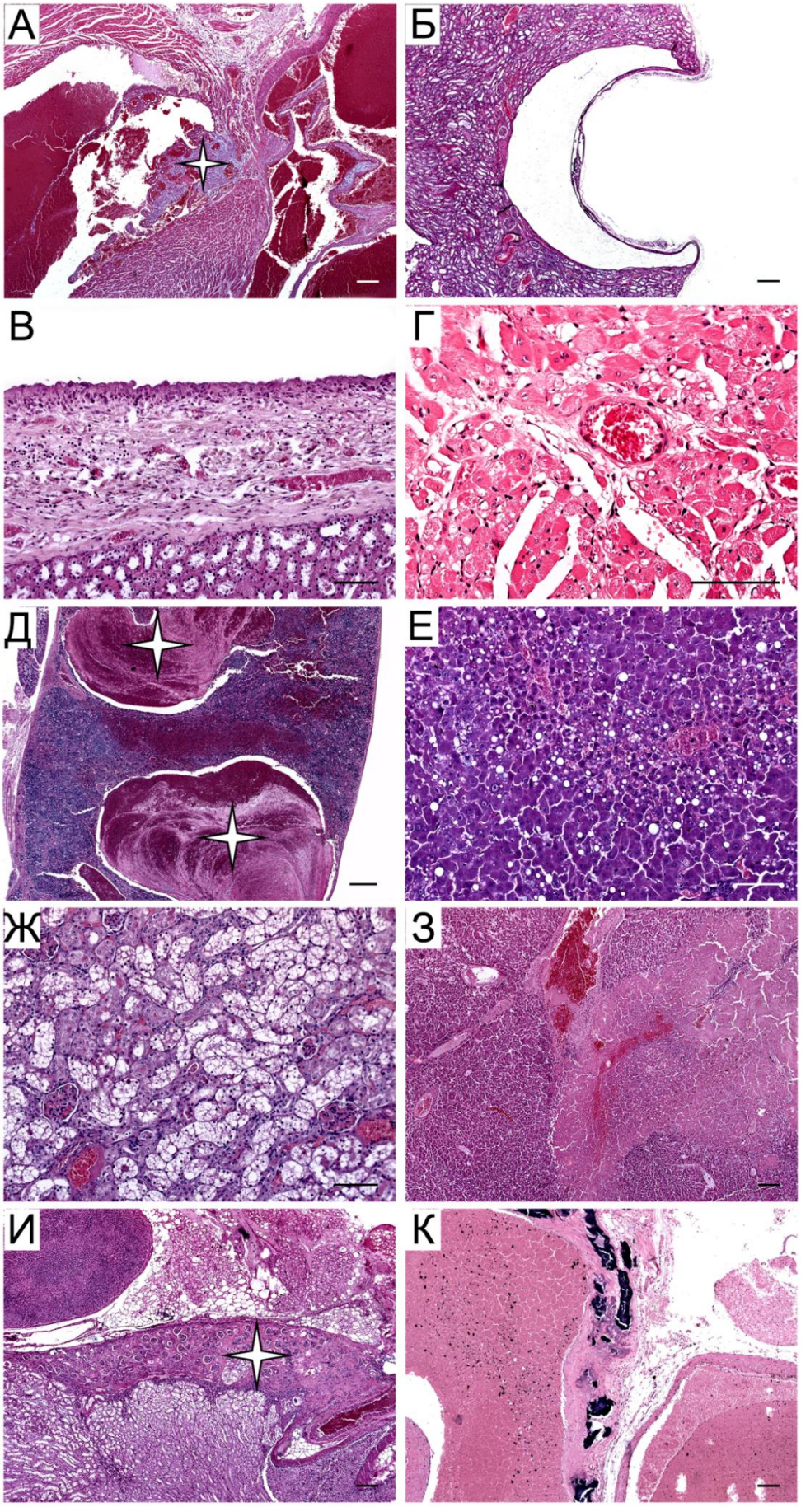


Рисунок 26 – Неинфекционные и неопухолевые поражения отмеченные у обыкновенной слепушонки (*Ellobius talpinus, Pallas*): А – аномальное строение предсердно-желудочкового клапана (звездочка); Б – однокамерная серозная киста почки; В – утолщенная капсула почки, выстланная псевдомногослойным эпителием; Г – кардиомиопатия (вакуолярная дистрофия и фиброз миокарда); Д – ангиэктазия и массивный тромбоз в селезенке (пелиозные кисты, звездочки); Е – спонтанная жировая дистрофия печени; Ж – гидропическая дистрофия проксимальных канальцев почки; З – инфаркт печени (светлая зона); И – постинфарктный рубец в почке (звездочка); К – дистрофическая минерализация и эктопический остеогенез (черно-синие депозиты) в аорте. Окраска гематоксилином и эозином. Д – 25х; А, Б, З, И – 50х; К – 100х; В, Е, Ж-200х; Г – 400х. Масштабные линейки 100 мкм на В, Г, Е, Ж, К, 200 мкм на А, Б, З, И и 500 мкм на Д.

животных с минеральными депозитами было небольшим (таблица 13) и достоверно не различалось в зависимости от группы. Некоторое количество исследованных животных (порядка 13-16% в каждой группе) не имело никаких патогистологических изменений; гибель их была связана с травмами и другими случайными причинами.

Таким образом, в настоящей работе нами было установлено, что обыкновенная слепушонка характеризуется весьма специфичным набором патологии, а SkQ1, увеличивающий продолжительность жизни особей обыкновенной слепушонки, не оказывает достоверного влияния на относительную частоту разных форм встречающихся у них патологических процессов.

## 3.4 Влияние SkQ1 на экспериментальные альтеративные процессы

### 3.4.1 Цитостатическое поражение семенников

Клетки сперматогенеза являются интенсивно пролиферирующими элементами, которые очень чувствительны к альтеративному действию окислительного стресса, вызванного некоторыми цитостатиками [Yeh et al., 2007]. При введении доксорубицина в семенниках наблюдается субтотальная гибель (апоптоз) сперматогенных элементов (за исключением зрелых спермиев), что сопровождается уменьшением диаметра семенных канальцев, отеком интерстиция и вакуолярными изменениями в клетках Сертоли; клетки Лейдига при этом

выглядят интактными (рисунок 27). Число канальцев, оцененное по количеству их на поперечном срезе, при этом не изменялось (таблица 14).

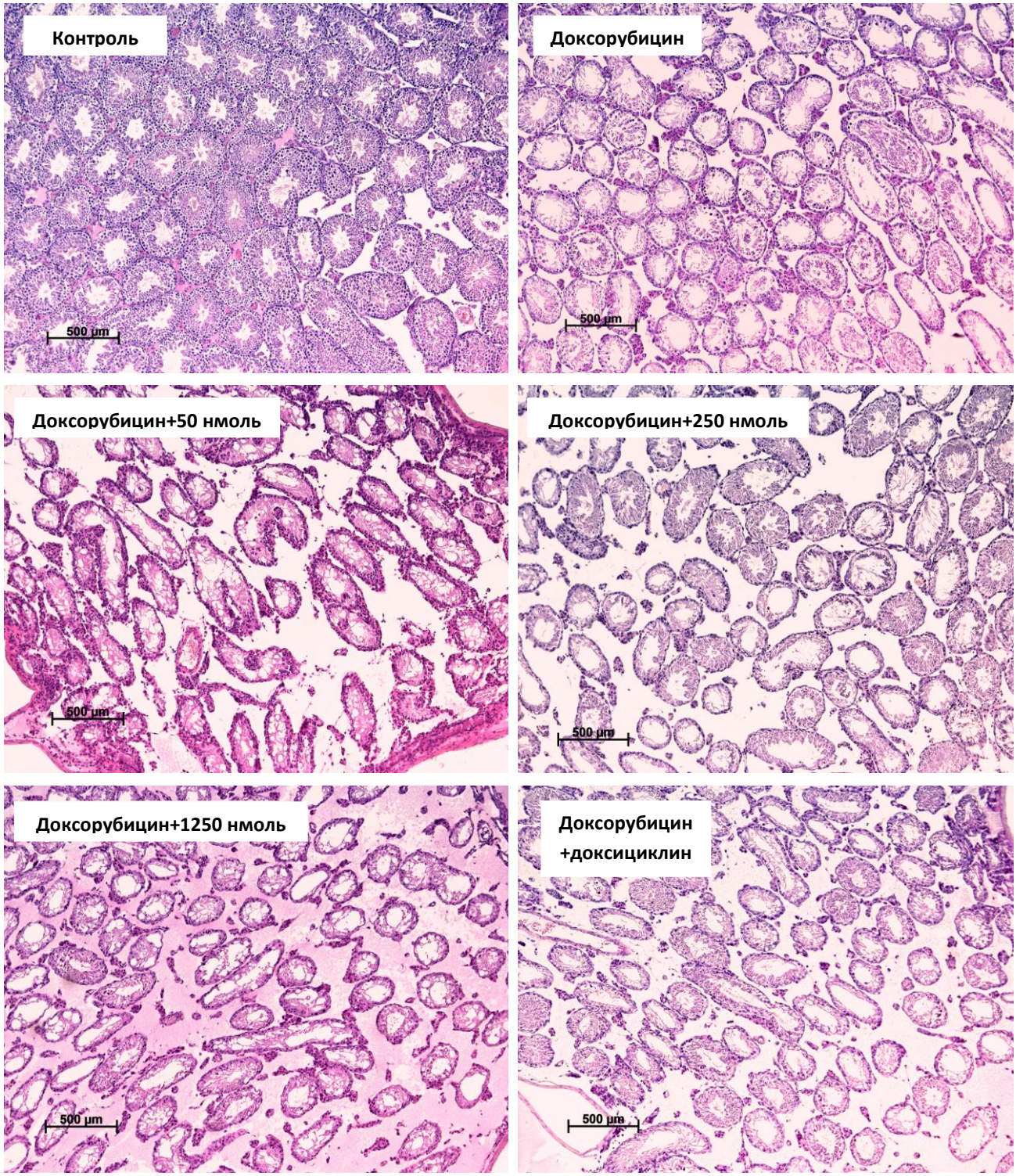



Рисунок 27 – Репрезентативные примеры гистологической картины семенников мышей интактной группы, групп, подвергнутых действию доксоциклина, а также доксоциклина, доксорубицина и различных доз SkQ1. Окраска гематоксилином и эозином, х100.

Таблица 14 - Морфометрические показатели состояния семенников мышей интактной группы, групп, подвергнутых действию доксоциклина, а также доксоциклина, доксорубицина и различных доз SkQ1

| ГРУППА | N | Число канальцев на поперечном срезе через середину семенника (M±m) | Средний диаметр семенных канальцев, мк (M±m) | Состояние герминального эпителия (в баллах) (M) |
|---|---|---|---|---|
| Контроль | 10 | 163,8±13,1 | 288,0±12,5* | 0,1* |
| Доксорубицин | 8 | 156,0±6,1 | 186,5±13,8 | 2,75 |
| Доксорубицин+50 нМ SkQ1 | 4 | 146,3±12,7 | 184,6±21,4 | 2,5 |
| Доксорубицин+250 нМ SkQ1 | 6 | 188,3±12,9 | 218±11,3** | 2,3 |
| Доксорубицин+1250 нМ SkQ1 | 8 | 160,5±13,0 | 187,4±9,7 | 2,75 |
| Доксорубицин+доксициклин | 9 | 167,7±9,9 | 184,2±6,1 | 2,67 |

Примечание – * - достоверное отличие от всех прочих групп ($p<0,05$), ** - отличие от группы «Доксорубицин» ($p=0,09$).

Применение доксициклина, который, по литературным данным, [Yeh et al., 2007] обладает протективным действием в отношении цитостатического эффекта доксорубицина, в данном случае не повлиял на картину и морфометрические параметры паренхимы семенников мышей (таблица 14). SkQ1 в дозах 50, 250 и 1250 нмоль/кг/сутки также не оказал влияния на состояние сперматогенного эпителия и диаметр семенных канальцев, за исключением группы, получавшей дозу в 250 нмоль/кг/сутки, в которой отмечена тенденция к сохранению большего диаметра семенных канальцев и несколько лучшее состояние элементов сперматогенеза по сравнению с контролем, подвергнутым действию доксорубицина.

Таким образом, SkQ1 оказал очень слабое влияние на альтеративные процессы в семенниках мышей, вызванные цитостатиком доксорубицином, и только в одной дозе – 250 нмоль/кг/сутки.

### 3.4.2 Токсическая дистрофия печени

Токсическая дистрофия печени, вызванная четыреххлористым углеродом, служит моделью альтеративного действия индуцированного окислительного стресса на клеточные элементы с низкой скоростью пролиферации [Huo et al.. 2011]. С целью лучшего понимания механизма действия препарата на окислительное повреждение, на данной модели была проведена сравнительная оценка эффектов двух разных редокс-форм SkQ1 – окисленной и восстановленной. При введении мышам четыреххлористого углерода обнаруживаются явления альтерации печеночной паренхимы соответствующие картине типичного токсического повреждения печени: жировая и гидропическая дистрофия (различимые при окрашивании замороженных срезов суданом III), а также гибель гепатоцитов (апоптоз с появлением TUNEL-позитивных ядер и онкотический некроз с воспалительным ответом) в перицентральной зоне долек (рисунки 28 и 29).

Степень выраженности альтеративных поражений различалась у отдельных животных в одной и той же группе в довольно широких пределах (рисунок 28). Результаты количественной морфологической оценки выраженности изменений в печени контрольных животных и мышей, получавших разные дозы SkQ1 (окисленной и восстановленной форм) представлены на таблице 15.

Как видно на этой таблице, глубина альтерации, площадь поражения и интегральный индекс повреждения во всех случаях характеризовались похожими значениями и применение адекватных методов статистической оценки (метод Манн-Уитни с поправкой Бонферрони, при исходно принятом уровне $p<0,05$) показало отсутствие достоверных различий между всеми группами, которым был введен четыреххлористый углерод. Не было отмечено и зависимости величины перечисленных параметров от концентрации SkQ1. Следовательно, окисленная и

восстановленная формы SkQ1 во всех примененных дозах (50, 250, 1250 нмоль/кг) не оказали существенного влияния на альтерацию в паренхиме печени.

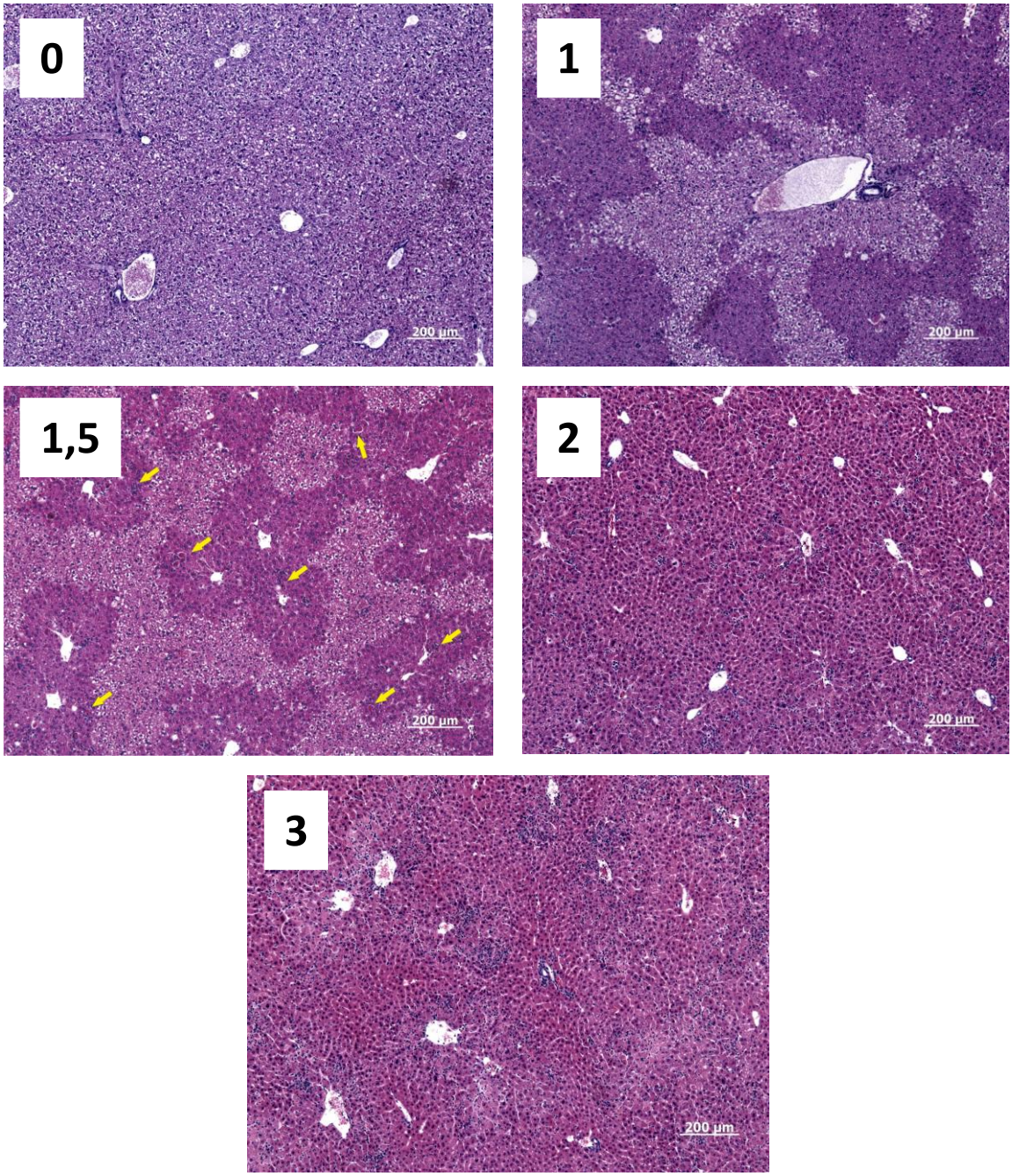



Рисунок 28 – Поражение печени при введении тетрахлорметана: интактная паренхима печени со степенью повреждения 0, гепатоциты имеют оптически пустую цитоплазму (косвенный признак заполнения гликогеном), не демонстрируют альтеративных изменений; паренхима печени со степенью повреждения 1, выраженная мелкокапельная жировая дистрофия гепатоцитов перицентральной зоны долек; паренхима печени со степенью поражения 1,5, выраженная мелкокапельная жировая дистрофия гепатоцитов, видны отдельные участки онкотического некроза (желтые стрелки); паренхима печени со степенью поражения 2, значительные очаги онкотического некроза; паренхима печени со степенью поражения 3, тяжелое поражение печени с обширными полями онкотического некроза гепатоцитов (светлые перицентральные участки, сопровождаемые инфильтратами). Окраска гематоксилином и эозином, х100.

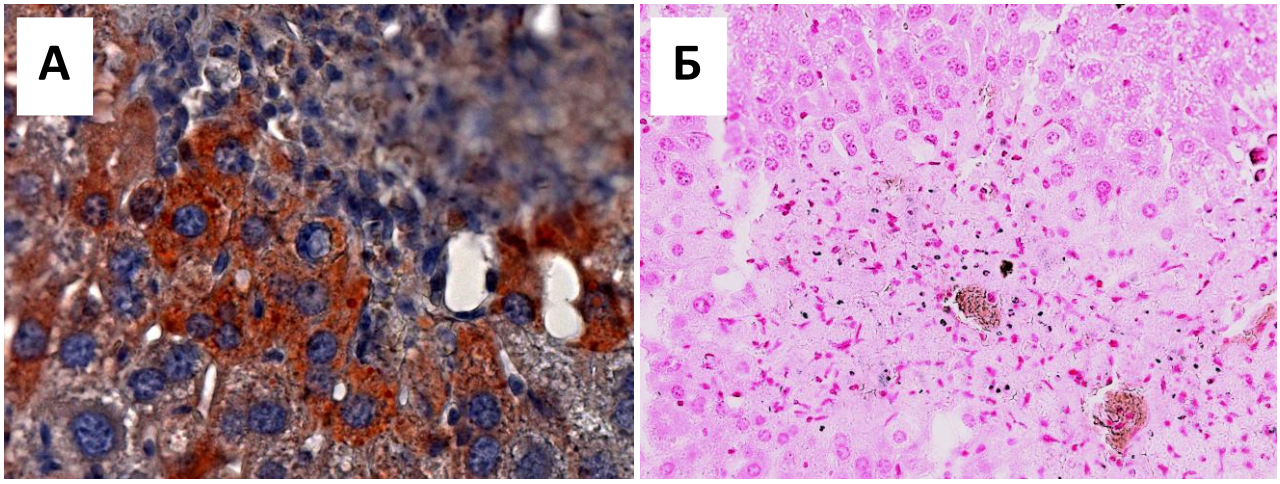



Рисунок 29 – Гистохимическая верификация альтеративных процессов в печеночной паренхиме, вызванных четыреххлористым углеродом: А - жировая дистрофия гепатоцитов по периферии очага некроза при интоксикации четыреххлористым углеродом. Замороженный срез, окраска суданом III и гематоксилином, х1000. Б - «апоптотический некроз» в перицентральной зоне дольки: черно-синее окрашивание ядер, имеющих двунитиевые разрывы ДНК. Окраска TUNEL-методом, х400.

Таблица 15 – Морфометрические показатели состояния паренхимы печени после введение четыреххлористого углерода и разных доз SkQ1

| Группа | Относительная площадь вовлеченной паренхимы (в %, M±m) | Тяжесть поражения паренхимы, в баллах (M) | Индекс тяжести поражения (% площади поражения Х тяжесть поражения в баллах, M±m) |
|---|---|---|---|
| Интактный контроль, n=5 | 0 | 0 | 0 |
| Негативный контроль, n=5 | 53,92±1,4 | 2 | 108±2,8 |
| Плацебо, n=9 | 55,66±1,8 | 1,5 | 83,42±6,6 |
| Восстановленный SkQ1, 250 нмоль/кг, n=10 | 54,52±3,2 | 1,8 | 95±6,4 |
| Восстановленный SkQ1, 50 нмоль/кг, n=10 | 53,39±1,7 | 1,7 | 87±8,4 |
| Восстановленный SkQ1 10, нмоль/кг, n=10 | 51,42±3,2 | 2,1 | 103±8,9 |
| Восстановленный SkQ1 2 нмоль/кг), n=11 | 54,78±1,1 | 2,0 | 109±8,5 |
| Окисленный SkQ1, 1250 нмоль/кг, n=11 | 51,18±1,6 | 2,0 | 100±3,0 |
| Окисленный SkQ1 250 нмоль/кг, n=10) | 55,42±2,4 | 1,7 | 94±7,4 |
| Окисленный SkQ1, 50 нмоль/кг, n=10) | 49,67±1,7 | 2,2 | 108±5,8 |

## 3.5 Влияние SkQ1 и SkQR1на воспалительные реакции

### 3.5.1 Асептическое экссудативное воспаление поджелудочной железы (острый панкреатит)

У интактных животных никаких признаков панкреатита не обнаруживалось. Введение мышам аргинина вызвало целых комплекс изменений в поджелудочной железе, характерный для острого экссудативного воспаления в данном органе [Бойко, 1970; Николаев, 1976; Канаян и соавт., 1984] и в окружающей жировой ткани (острого панкреатита и перипанкреатита): отек, нейтрофильную инфильтрацию разной степени выраженности и вторичную альтерацию в форме колликвационного онкотического некроза (рисунок 30). Поражение железы носило очаговый характер; степень выраженности воспаления была вариабельна у животных из одной и той же группы. Биохимический анализ удельного содержания миелопероксидазы, отражающий выраженность воспалительной (нейтрофильной и моноцитарно-макрофагальной) инфильтрации ткани, показывает почти десятикратный рост этого показателя (с 6,1±2,5 до 52,9±9,93 услов. ед. /мг общего белка, $p<0,01$). Экссудация вызывает также достоверное увеличение массы железы по сравнению с интактными животными ($p<0,01$). Применение SkQ1 в дозах 50 и 250 нмоль/кг достоверно уменьшило относительную массу органа по сравнению с этим показателем у крыс, которым вводился только аргинин (рисунок 31). Причем, это уменьшение было настолько значительным, что масса желез от животных из этих опытных групп статистически не отличалась от значений у контрольных крыс. Выраженность воспаления, оцененная по морфологической картине инфильтрации нейтрофилами поджелудочной железы (в баллах) и по удельной активности миелопероксидазы в ткани органа, также достоверно уменьшалась приблизительно в три раза, однако, только в группе животных, получавших 250 нмоль/кг SkQ1 (с 1,5 до 0,6 балла и с 49,9±13,74 до 15,8±3,21 услов. ед. /мг общего белка, в обоих случаях $p<0,01$) (таблица 16). Все это свидетельствует о наличии у SkQ1 способности ингибировать воспалительные явления, прежде всего –

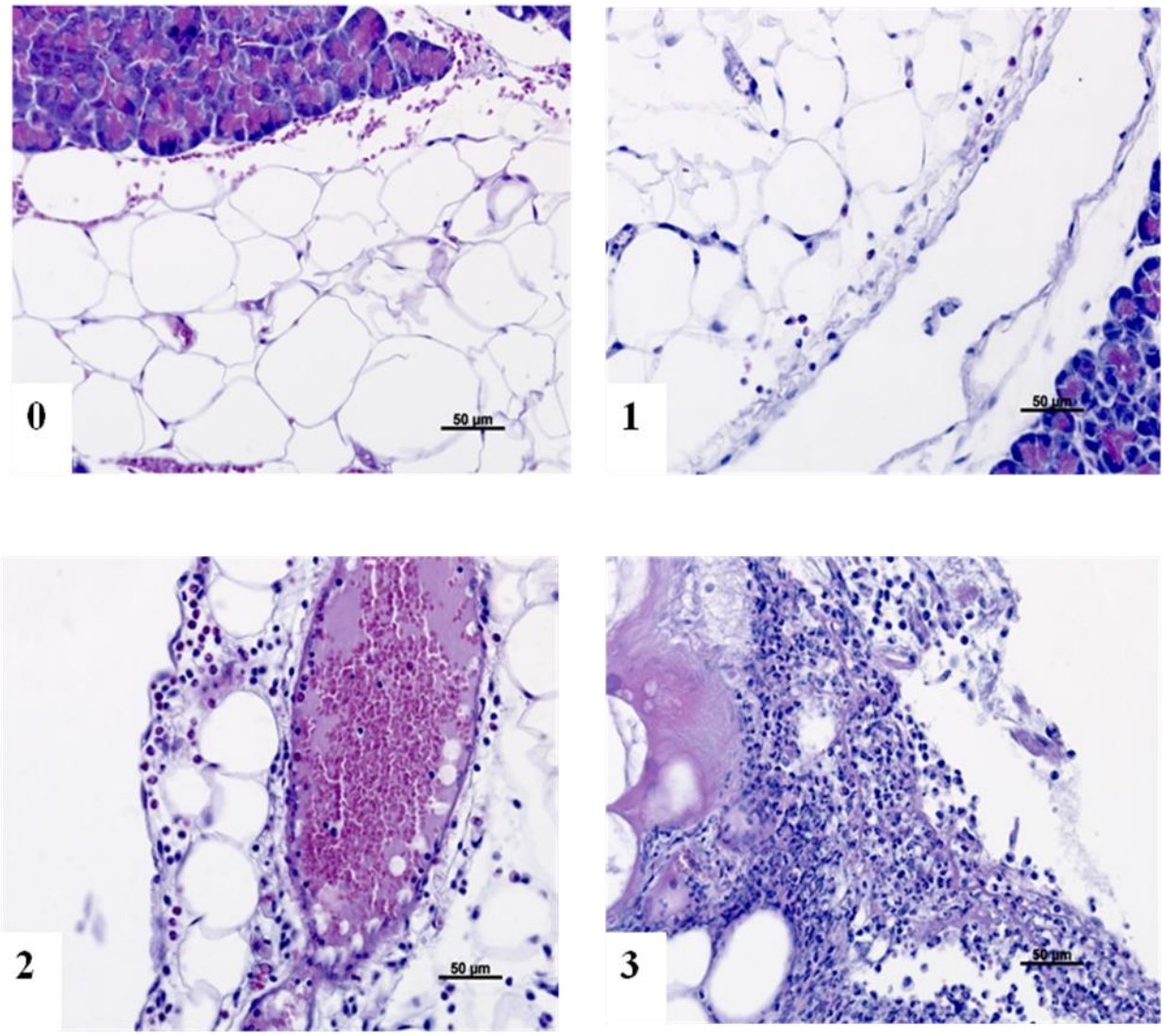



Рисунок 30 – Варианты гистологической картины изменений в поджелудочной железе крыс, наблюдавшиеся у животных в эксперименте с индукцией острого панкреатита аргинином и лечением SkQ1: 0-3 – степени выраженности воспалительной реакции (в баллах), от полного отсутствия (0), до слабого (1) и выраженного (2) серозного или деструктивного гнойного (3) воспаления. Окраска гематоксилином и эозином, х200.

клеточную инфильтрацию, в условиях острого экссудативного асептического воспаления в поджелудочной железе.

### 3.5.2 Бактериальное экссудативное (гнойное) воспаление почек (гнойный пиелонефрит)

Поражение почек у крыс при экспериментальном бактериальном воспалении почек - гнойном пиелонефрите - было вполне характерным для этого заболевания и хорошо выявлялось на микроскопическом и макроскопическом

Таблица 16 – Выраженность воспалительных изменений в поджелудочной железе, оцененная с помощью полуколичественного анализа морфологической картины (степени инфильтрации нейтрофилами, в баллах) и по содержанию миелопероксидазы в тканях органа

| ГРУППА | Средний балл выраженности воспалительной инфильтрации | Активность миелопероксидазы в поджелудочной железе ( услов. ед. / мг общего белка) |
|---|---|---|
| Интактный контроль (n=7) | 0 | 6,1±2,50 |
| Нелеченный панкреатит (n=12) | 1,5 | 52,9±9,93 |
| SKQ1 50 нмоль/кг/сут. (n=11) | 1,5 | 49,9±13,74 |
| SKQ1 250 нмоль/кг/сут. (n=9) | 0,6* | 15,8±3,21* |

Примечание – * - отличие от негативного контроля, p<0,01.

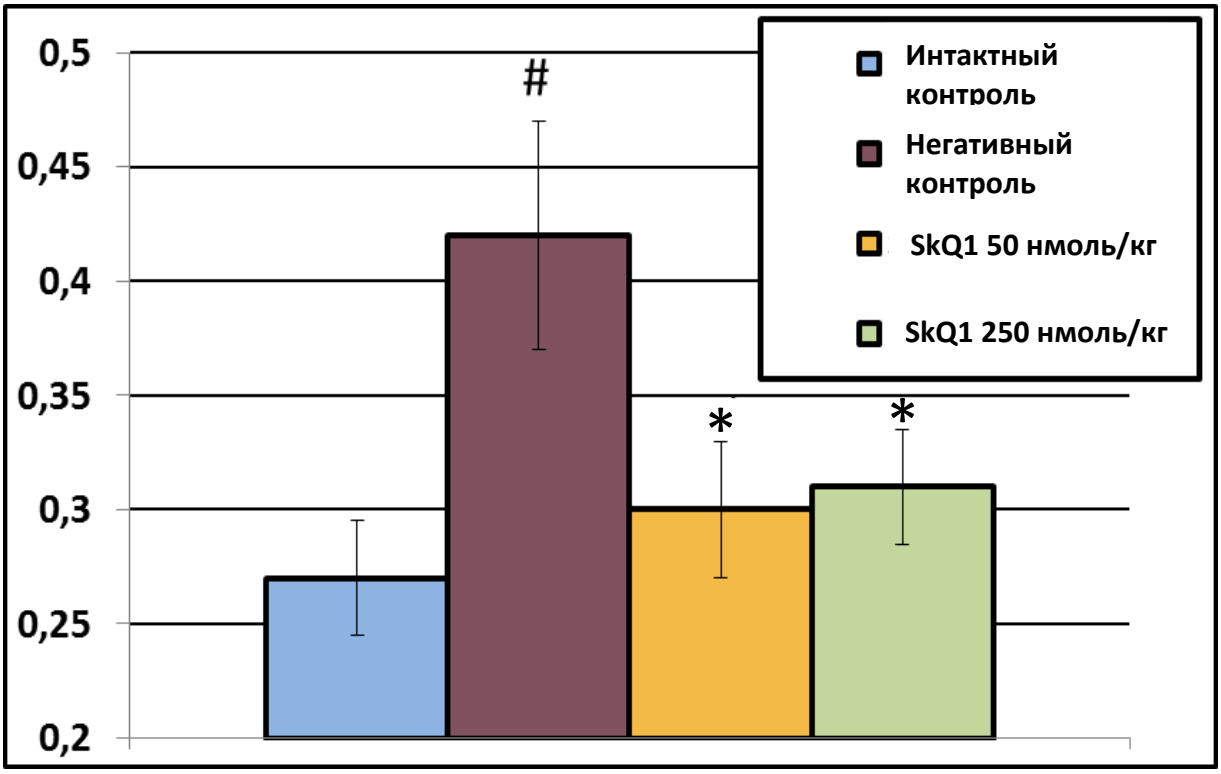



Рисунок 31 – Относительная масса поджелудочной железы (% от общей массы тела). Примечание - # - отличие от интактного контроля (p<0,01), * - отличие от негативного контроля (мыши, которым вводился аргинин без SkQ1).

уровнях (рисунок 32). На некропсии отмечалось переполнение лоханки гноем, разрушение сосочка почки и образование абсцессов, захватывающих разные компартменты органа за счет восходящего интраканаликулярного распространения инфекции. Гистологически выявлялись интенсивная лейкоцитарная инфильтрация интерстиция (с абсцедированием), скопления нейтрофилов и гнойных телец в просвете канальцев и собирательных трубок, а также дистрофические изменения канальцевого эпителия. В лейкоцитарном инфильтрате, помимо нейтрофилов, встречались в небольшом числе моноциты, макрофаги и эозинофилы; в лоханке, в тканях некротизированного сосочка, а также в центре абсцессов можно было видеть скопления бактерий в виде интенсивно окрашенных базофильных масс. SkQR1 (в суммарной дозе 500 нмоль/кг) оказал значительное влияние на морфологические проявления пиелонефрита у крыс. У животных уменьшились величина и число визуально регистрируемых на некропсии абсцессов в почках (рисунок 32, А).

Интерстициальная лейкоцитарная инфильтрация также становилась значительно меньше (рисунок 32, Б, В), чему соответствовало достоверное ($p<0,01$) уменьшение степени выраженности воспаления во всех компартментах почки, представленной в баллах (рисунок 32, Г). Активность миелопероксидазы, которая отражает степень воспалительной инфильтрации тканей почки и многократно возрастает при пиелонефрите, достоверно снижалась под действием SkQR1 ($p<0,05$), хотя и не до значений, характерных для интактных животных (рисунок 33).

Все это свидетельствует о способности SkQR1 снижать выраженность воспалительной инфильтрации при остром экссудативном воспалении, вызванном введением бактерий.

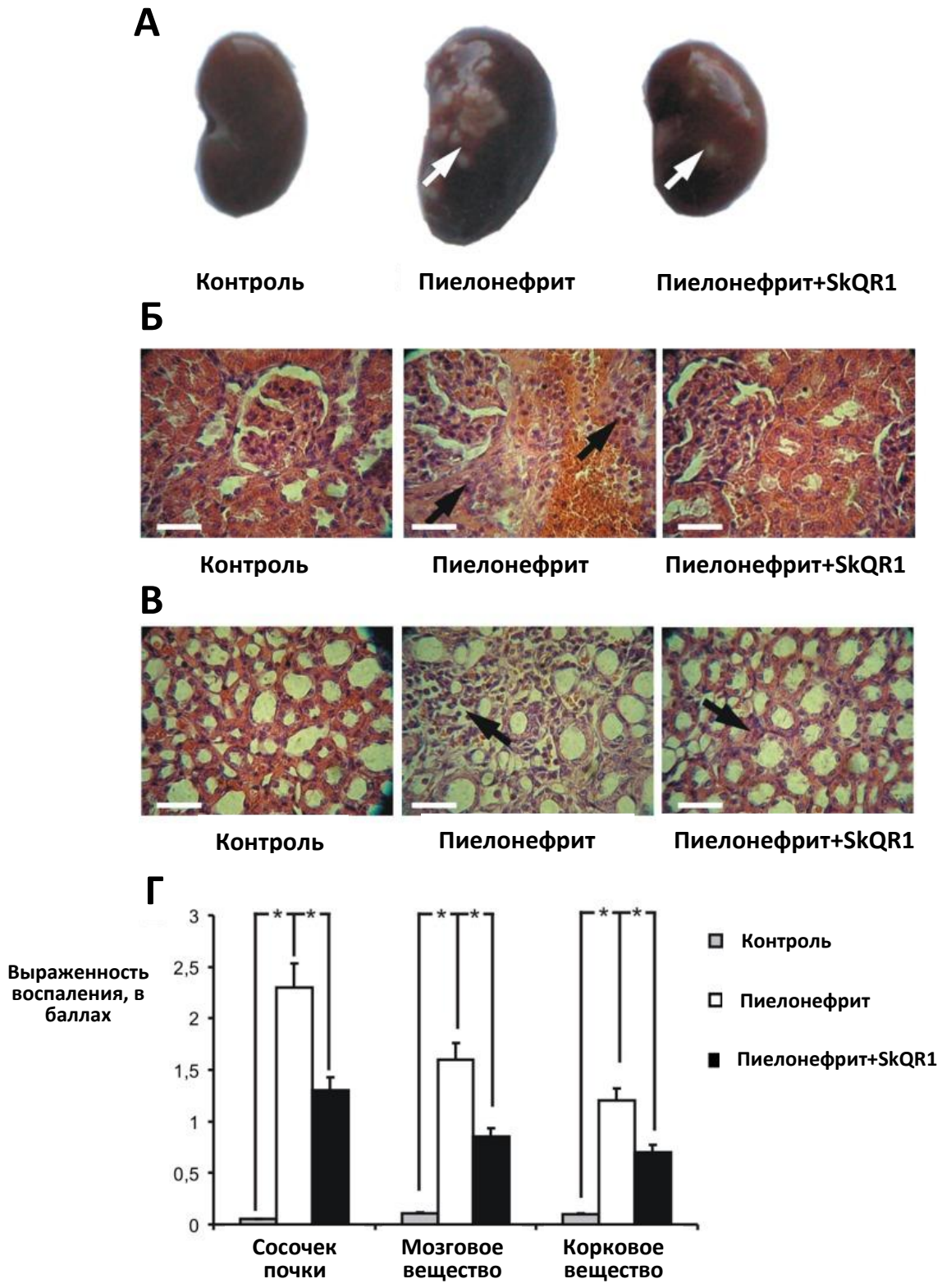



Рисунок 32 – Морфология острого экспериментального пиелонефрита и ее изменения под влиянием SkQR1: А – макроскопическая картина, Б – гистологическая картина изменений в корковом веществе, В – гистологическая картина изменений в мозговом веществе (Б и В – окраска гематоксилином и эозином, х400, масштабные линейки – 50 мкм, стрелками показаны нейтрофилы), Г – диаграмма, показывающая выраженность воспаления в разных компартментах почки, оцененную по степени лейкоцитарной инфильтрации (в баллах). Примечание –* - $p<0,01$.

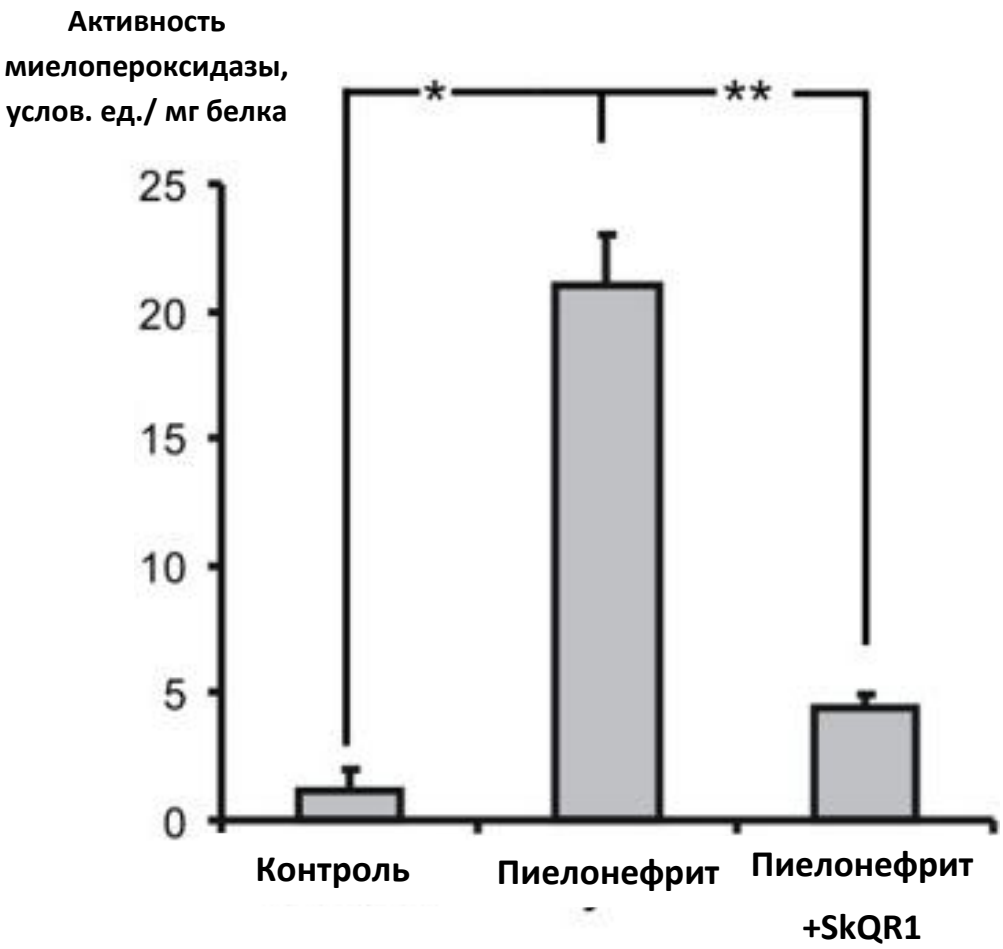



Рисунок 33 – Диаграмма, показывающая выраженность лейкоцитарной инфильтрации в тканях почки (*in toto*) контрольных животных и животных с пиелонефритом (с и без SkQR1), оцененную по содержанию миелопероксидазы (в условных единицах / мг общего белка). Примечание – * - $p<0,01$, ** - $p<0,05$).

### 3.5.3 Продуктивное аутоиммунное воспаление суставов стопы (аутоиммунный ревматоидный артрит)

При гистологическом исследовании образцов из групп позитивного контроля и от животных, получавших SkQ1, была выявлена следующая морфологическая картина (рисунок 34). Кожа, подкожная клетчатка и мышцы почти не имели воспалительной инфильтрации, хотя и отмечались признаки умеренного фиброза дермы, связанного, по-видимому, с длительными отечными изменениями, которые характерны для этого заболевания и были хорошо заметны макроскопически. Суставные капсулы и синовиальные оболочки суставов плюсны и предплюсны были инфильтрированы лимфоцитами и макрофагами, степень продуктивной инфильтрации варьировала в широких пределах – от

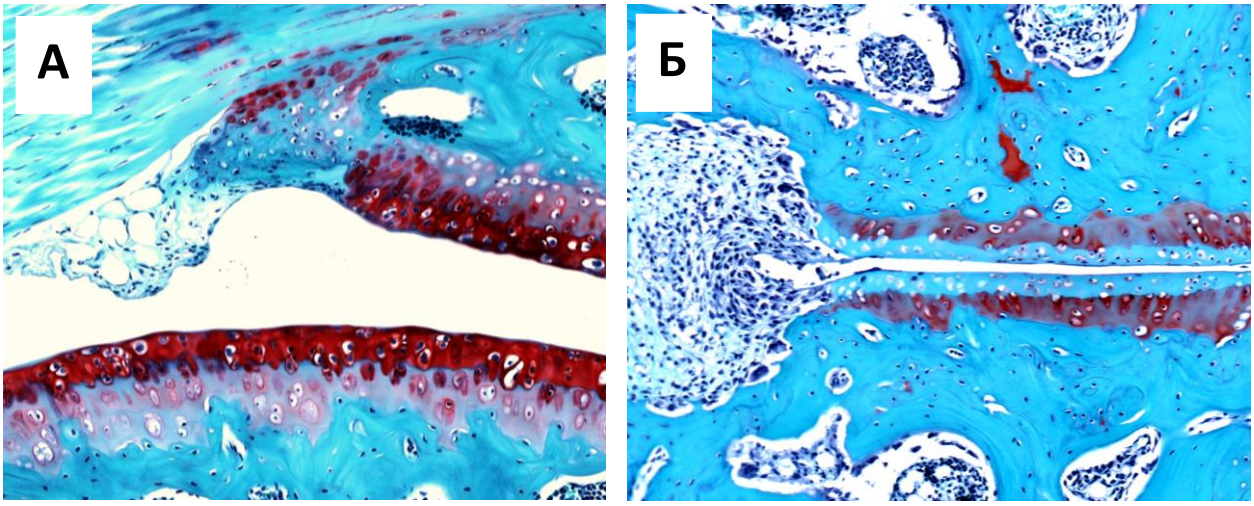



Рисунок 35 - Изменение гистохимических свойств и разрушение суставного хряща при экспериментальном продуктивном ревматоидном артрите, вызванном иммунизацией крыс коллагеном свиньи: А – типичная морфология интактного суставного хряща; Б – некроз хондроцитов и утрата протеогликанов (красного окрашивания) хрящевым матриксом при коллаген-индуцированном ревматоидном артрите. Окраска гематоксилином, прочным зеленым и сафранином О, х200.

минимальной до резко выраженной, иногда с формированием грануляционной ткани. В некоторых случаях синовиальная оболочка была значительно утолщена, состояла из нескольких рядов клеток (синовиоцитов) и образовывала многочисленные сосочкообразные складки в полости сустава. Среди клеток синовии попадались многочисленные фигуры митоза (гиперплазия синовиоцитов). Суставной хрящ был изменен только в некоторых случаях, когда наблюдалась его краевая деструкция или разрушение растущим паннусом из грануляционной ткани со стороны синовиальной оболочки (вторичная альтерация). Более четко разрушение хряща было заметно на препаратах, окрашенных для выявления протеогликанов хрящевого матрикса сафранином О (рисунок 35). Иногда по периферии суставов наблюдалась резорбция кости, на месте которой оказывалась ткань из фибробластоподобных клеток и многоядерных гигантских клеточных элементов (остеокластов). Таким образом, при использовании модели коллаген-индуцированного продуктивного иммунного воспаления суставов были получены морфологические изменения, соответствующие описанной в литературе картине экспериментального ревматоидного артрита у крыс [Li et al., 2013].

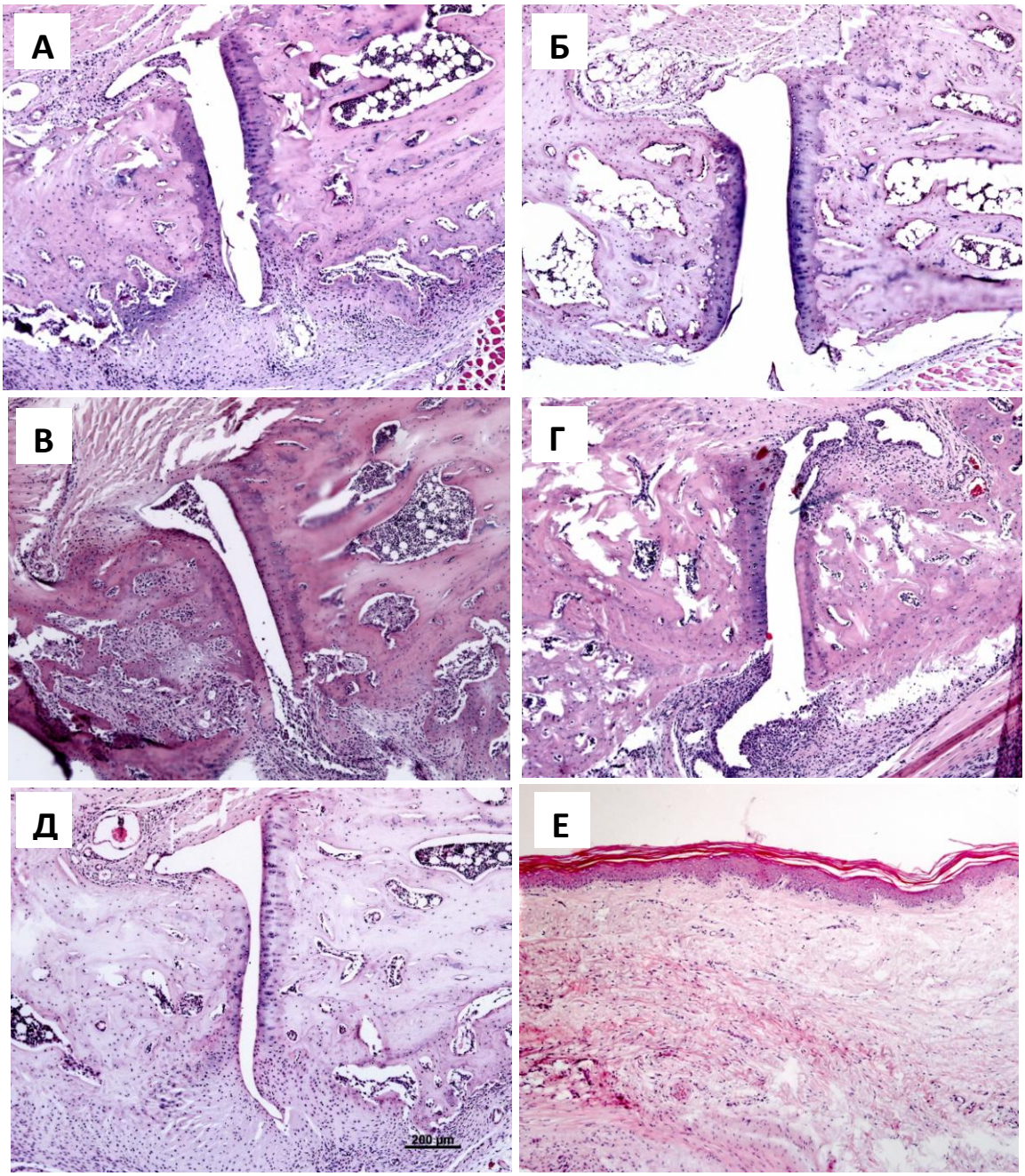



Рисунок 34 – Влияние SkQ1 на морфологические изменения при экспериментальном ревматоидном артрите: А - негативный контроль (нелеченный артрит). Умеренно выраженные продуктивный синовит, гиперплазия синовиальной оболочки, деструктивные процессы в суставном хряще и костной ткани. Б - позитивный контроль (лечение дексаметазоном). Деструктивные, воспалительные и гиперпластические процессы отсутствуют. В - SkQ1 50 нмоль/кг/сут. Резко выраженные продуктивный синовит, гиперплазия синовиальной оболочки, деструктивные процессы в суставном хряще и костной ткани. Г - SkQ1 250 нмоль/кг/сут. Резко выраженные продуктивный синовит, гиперплазия синовиальной оболочки, деструктивные процессы в суставном хряще и костной ткани. Д - SkQ1 1250 нмоль/кг/сут. Слабо выраженные продуктивный синовит. Гиперплазия синовиальной оболочки, деструктивные процессы в суставном хряще и костной ткани отсутствуют. Е - Негативный контроль. Периартикулярные ткани и кожа. Воспалительные изменения отсутствуют. Окраска гематоксилином и эозином, х100.

Принципиально иной была только картина изменений у животных, которым вводился дексаметазон. Деструкция суставного хряща у них никогда не наблюдалась; явления воспалительной инфильтрации синовиальной оболочки и гиперплазия ее отсутствовали или были выражены в минимальной степени почти у всех животных.

Результаты полуколичественной оценки описанных поражений представлены в таблице 17. Видно, что SkQ1 во всех группах дозозависимо снижал выраженность всех патологических изменений в суставах, однако, достоверные различия с контрольной (нелеченной) группой были достигнуты только у животных, получавших дозу 1250 нмоль/кг и только для одного показателя – степени продуктивной инфильтрации в синовиальной оболочке (снижение с 2,47 балла в контроле до 1,29 баллов в группе с SkQ1, $p<0,05$**).**
Нужно отметить, что и в этом случае эффект SkQ1 значительно (примерно в 4 раза) уступал результатам, достигнутым с помощью дексаметазона

Таблица 17 – Влияние SkQ1 на развитие продуктивного воспаления на модели коллаген-индуцированного ревматоидного артрита у крыс Вистар

| Вариант опыта (во всех группах N=15) | Периартикулярное воспаление | Синовит | Деструкция суставного хряща | Гиперплазия синовиальной оболочки | Деструкция костной ткани |
|---|---|---|---|---|---|
| Негативный контроль (артрит без введения препаратов) | 0,13 (±0,09) | 2,47 (±0,17) | 1,14 (±0,33) | 1,14 (±0,31) | 1,57 (±0,35) |
| Позитивный контроль (дексаметазон) | 0,00 (±0,00) | 0,36 (±0,17)# | 0,00 (±0,00)# | 0,14 (±0,14)# | 0,27 (±0,27)# |
| SkQ1 50 нмоль/кг | 0,00 (±0,00) | 2,33 (±0,19) | 1,27 (±0,41) | 1,09 (±0,41) | 1,18 (±0,44) |
| SkQ1 250 нмоль/кг | 0,07 (±0,07) | 1,56 (±0,34) | 1,00 (±0,49) | 0,88 (±0,40) | 0,88 (±0,48) |
| SkQ1 1250 нмоль/кг | 0,07 (±0,07) | 1,29 (±0,22)* | 0,64 (±0,31) | 0,62 (±0,21) | 0,46 (±0,24) |

Примечание – оценка произведена в трехбалльной шкале, результаты представлены в виде M (±m), # - $p<0,01$, * - $p<0,05$.

($p<0,01$). Существенно, что во всех группах, получавших SkQ1, наблюдалась тенденция к снижению степени выраженности всех типов изменений в суставах, развивающихся при экспериментальном ревматоидном артрите, причем прослеживался дозозависимый характер этого эффекта. Однако достоверное отличие от контроля было получено только при применении дозы 1250 нмоль/кг и только в отношении выраженности продуктивного синовита. По эффективности подавления продуктивной воспалительной инфильтрации SkQ1 в несколько раз уступал дексаметазону.

### 3.6 Влияние SkQ1 на компенсаторно-приспособительные процессы

#### 3.6.1 Репаративная регенерация кожи после механической травмы

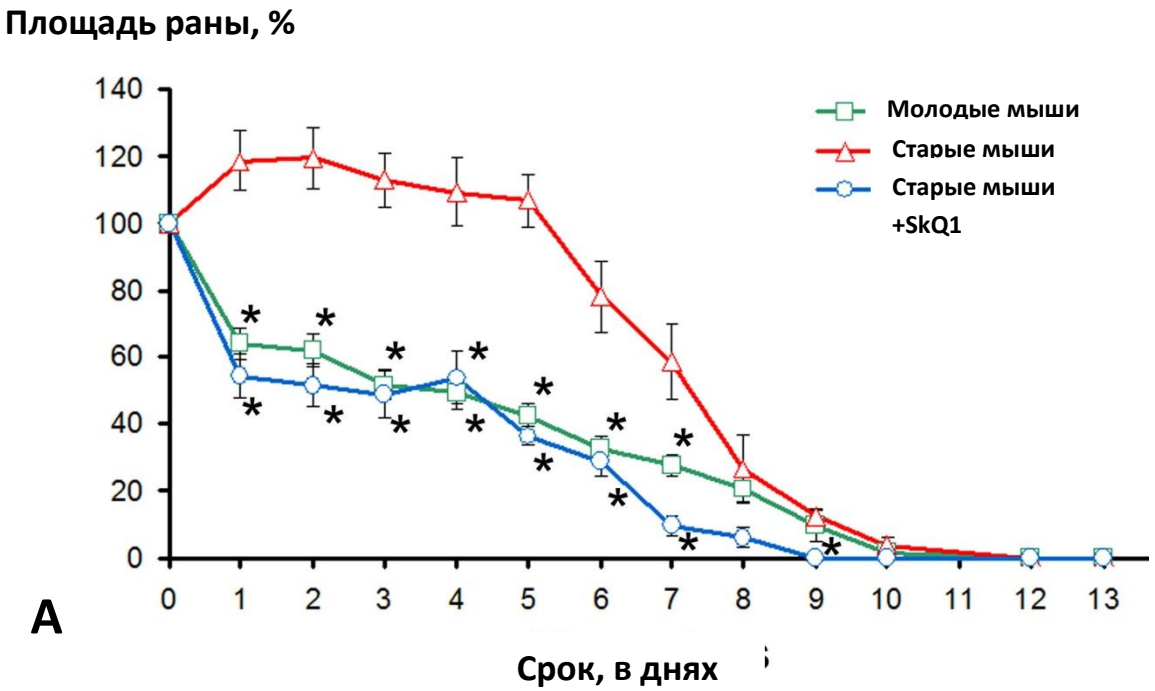
В качестве модели для тестирования способности SkQ1 влиять на репаративную регенерацию за счет механизма клеточной гиперплазии было использовано заживление кожной раны после линейной механической травмы у старых (в возрасте 24 месяца) мышей и животных с генетическими нарушениями углеводного обмена по типу инсулин-независимого диабета (db/db). Как в случае старения, так и при диабете имеет место снижение способности тканей к репарации повреждений [Balaban et al., 2005; Rosen, 2001]. Как видно на рисунке 35, SkQ1 (100 нмоль/кг/сутки) практически нивелировал возрастное снижение репаративной способности кожи, так что сокращение площади раневой поверхности у мышей, получавших препарат, происходило почти в том же темпе, что и у молодых (в возрасте 6 месяцев) животных (рисунок 36, А). Этому соответствовало и активное образование грануляционной ткани (рисунок 36, Б), уровень развития которой на 7-й день после повреждения не отличался от этого показателя у контрольных молодых мышей ($p>0,05$), но был достоверно больше, чем у старых животных ($p<0,01$). Важно отметить, что уровень развития рубцовой ткани, оцененный по ее площади на срезах на 13-й день после нанесения раны (рисунок 36, Б), существенно не отличался от такового у старых животных($p>0,05$), тогда как у молодых контрольных он был значительно больше ($p<0,05$).

У мышей db/db SkQ1 (250 нмоль/кг/сутки) хотя и способствовал сокращению площади полнослойной раны кожи (так что на 6-й и 7-й дни этот показатель у них был достоверно меньше, чем в группе контрольных мышей db/db), однако динамика заживления повреждения была далеко не такой, как у гетерозиготных животных (db/+), у которых нарушения углеводного обмена не развиваются (рисунок 37, А). Возможно, что снижение динамики сокращения кожной раны у мышей db/db связано не только с метаболическим дефектом как таковым, но и с очень сильным развитием жировой клетчатки, что затрудняло сближение краев раны по механическим причинам, на которые SkQ1 никак не мог повлиять. Исследование образования грануляционной ткани, проведенное на 7-й день после нанесения повреждения, показало, что ее развитие у мышей db/db, получавших препарат, значительно больше, чем у мышей db/db без SkQ1 ($p<0,01$), хотя и не достигает такого уровня, который отмечен у гетерозиготных животных (db/+) (рисунок 37, Б).

Таким образом, SkQ1 оказывал существенное влияние на репаративные процессы в коже у старых мышей и у животных с генетическими дефектами углеводного метаболизма, причем основной его эффект заключался в повышении образования грануляционной (но не рубцовой) ткани, что и влекло за собой сокращения раневой поверхности.

### 3.6.2 Возрастная гипертрофия и фиброз миокарда

Компенсаторно-приспособительные процессы в форме гипертрофии и связанного с ней диффузного фиброза были исследованы на модели спонтанных возрастных изменений миокарда у 24-месячных мышей-самок BALB/c, получавших разные дозы SkQ1 (1 и 30 нмоль/кг/сутки) в сравнении с интактными животными того же возраста и молодыми трехмесячными самками. Такие возрастные явления показаны для мышей из разных линий [Pathology of the mouse…, 1999]. У старых мышей-самок BALB/c с небольшой частотой встречается спонтанная кардиомиопатия (при которой наблюдаются выраженные фиброз и гипертрофия миокарда, см. раздел 3.3.1.3), однако, животных с этой патологией не встретилось



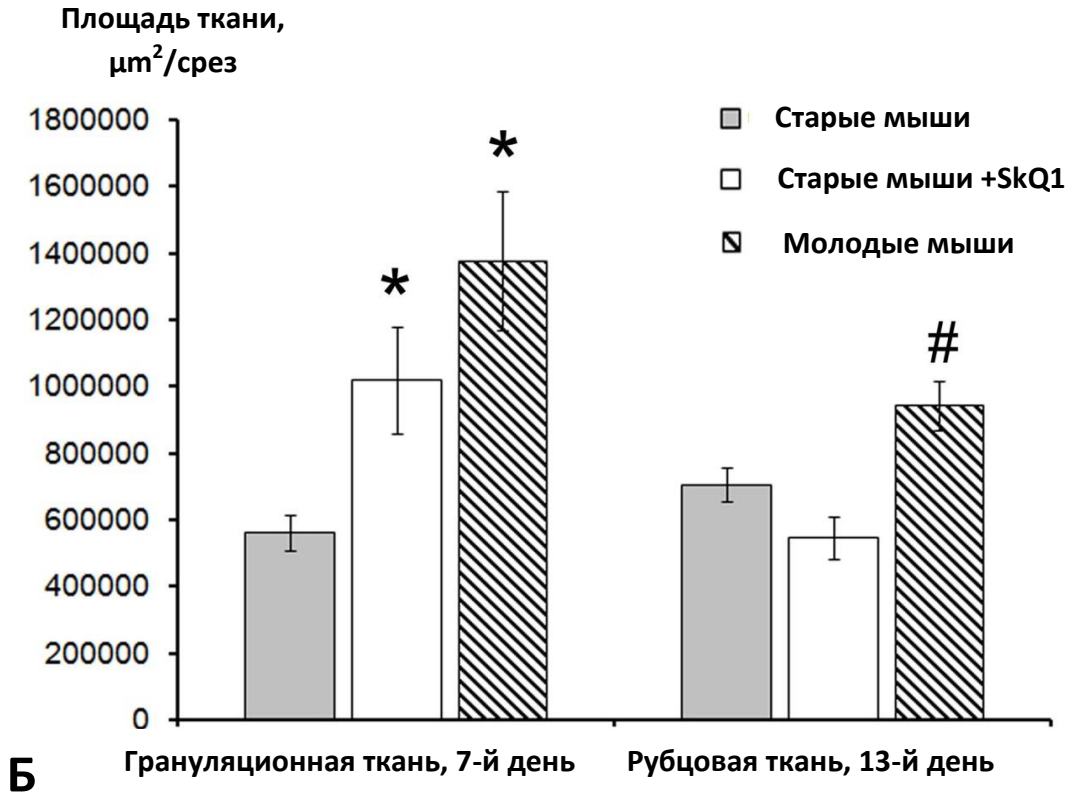




Рисунок 36 – Влияние SkQ1 (100 нмоль/кг/сутки) на заживление полнослойной раны кожи у старых (24 месяца) мышей: А – скорость сокращения площади раневой поверхности, Б – параметры развития грануляционной ткани и ее созревания в рубцовую. Примечание – достоверность отличий от группы старых мышей: * - $p<0,01$; # - $p<0,05$.

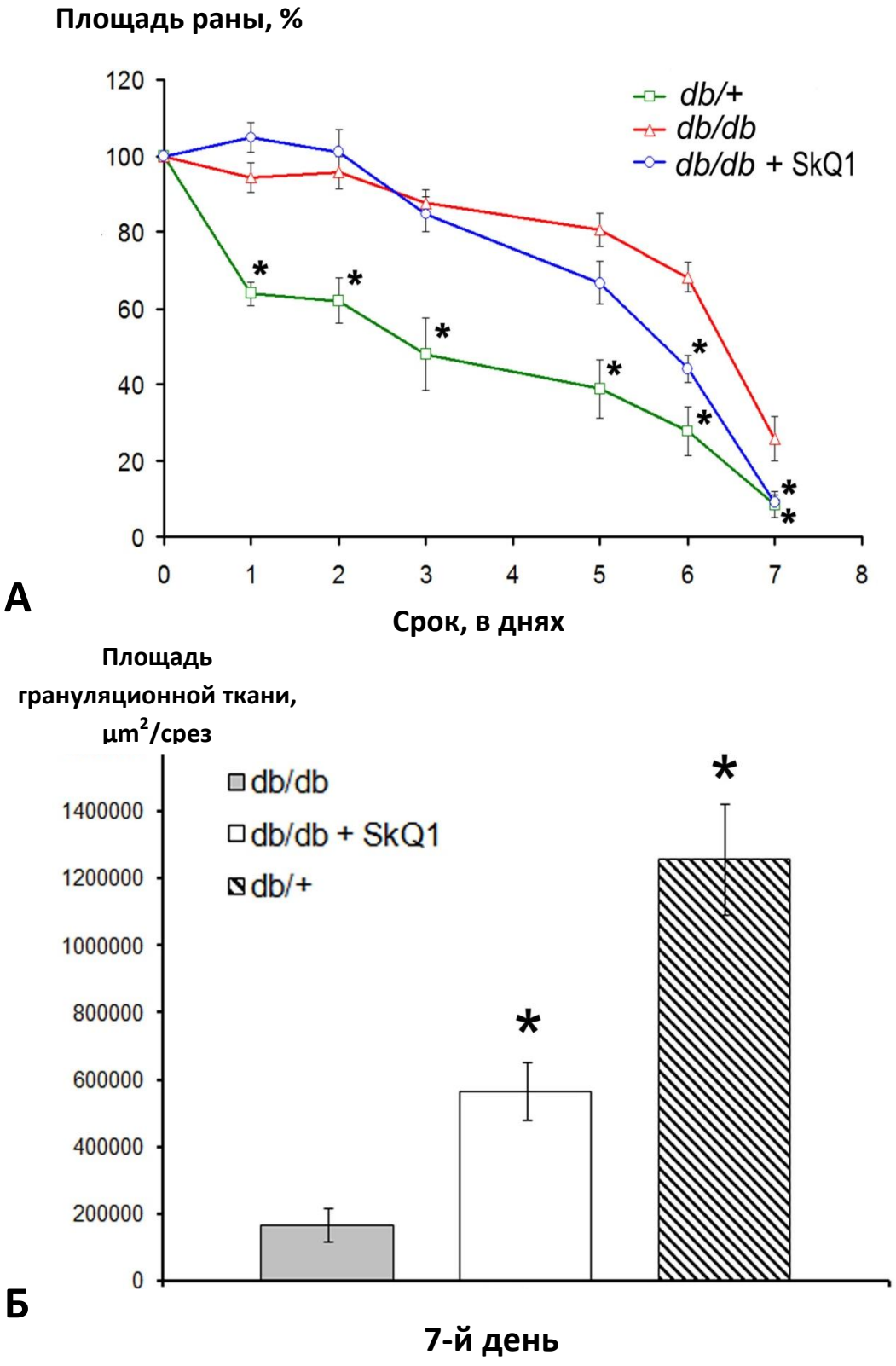



Рисунок 37 – Влияние SkQ1 (250 нмоль/кг/сутки) на заживление полнослойной раны кожи у мышей с генетическими нарушениями углеводного обмена по типу инсулиннезависимого диабета (db/db): А – скорость сокращения площади раневой поверхности, Б – степень развития грануляционной ткани. Примечание – достоверность отличий от группы старых мышей: * - $p<0,01$; # - $p<0,05$.

в группах, послуживших для данного исследования. Было установлено, что масса сердца у мышей в возрасте 24 месяцев приблизительно на треть больше, чем масса сердца трехмесячных животных; SkQ1 в суточных дозах 1 и 30 нмоль/кг достоверно ($p<0,05$) уменьшал эту разницу почти на 50% (рисунок 38). Этот эффект был заметен и в отношении размеров сердца (рисунок 39). В миокарде 24-месячных животных при специальных гистохимических окрасках на коллаген и сравнении с трехмесячными мышами был заметен слабо выраженный диффузный фиброз (рисунок 39). Морфометрически это выразилось в статистически достоверном ($p<0,01$) увеличении относительной площади, занимаемой коллагеном на срезах миокарда, окрашенных по Ван Гизон с 1.85±0.18% до 2.77±0,22% соответственно. Выраженность диффузного фиброза у 24-месячных мышей достоверно ($p<0,01$) уменьшалась при применении 1 и 30 нмоль/кг SkQ1 (рисунок 38).

Все приведенные здесь данные позволяют сделать определенный вывод о способности SkQ1 уменьшать выраженность ответа по типу гипертрофии и развитие фиброза на модели возрастных изменений миокарда у мышей.

### 3.6.3 Развитие диспластических и метапластических возрастных изменений в слезной железе крыс Вистар

Слезная железа крыс Вистар представляет собой орган, в котором возрастные изменения выражены особенно ярко. Эти изменения касаются как паренхимы, так и стромы железы (рисунок 40). Спектр паренхиматозных изменений [Walker, 1958; Background lesions…, 2012] включает в себя гиперплазию элементов протоковой системы («дуктуляризацию») (рисунок 40, Д), превращение типичных для слезной железы серозных концевых отделов (рисунок 40, А) в структуры, характерные для продуцирующей липиды железы Гардера («гардеровская метаплазия») (рисунок 40, В, Г) и особый тип изменений, который по всем формальным признакам [Струков, Серов, 1995] может быть отнесен к классу дисплазий (рисунок 40, Б). Стоит, однако, отметить, что высокой частоте подобных диспластических изменений в слезной железе крыс Вистар

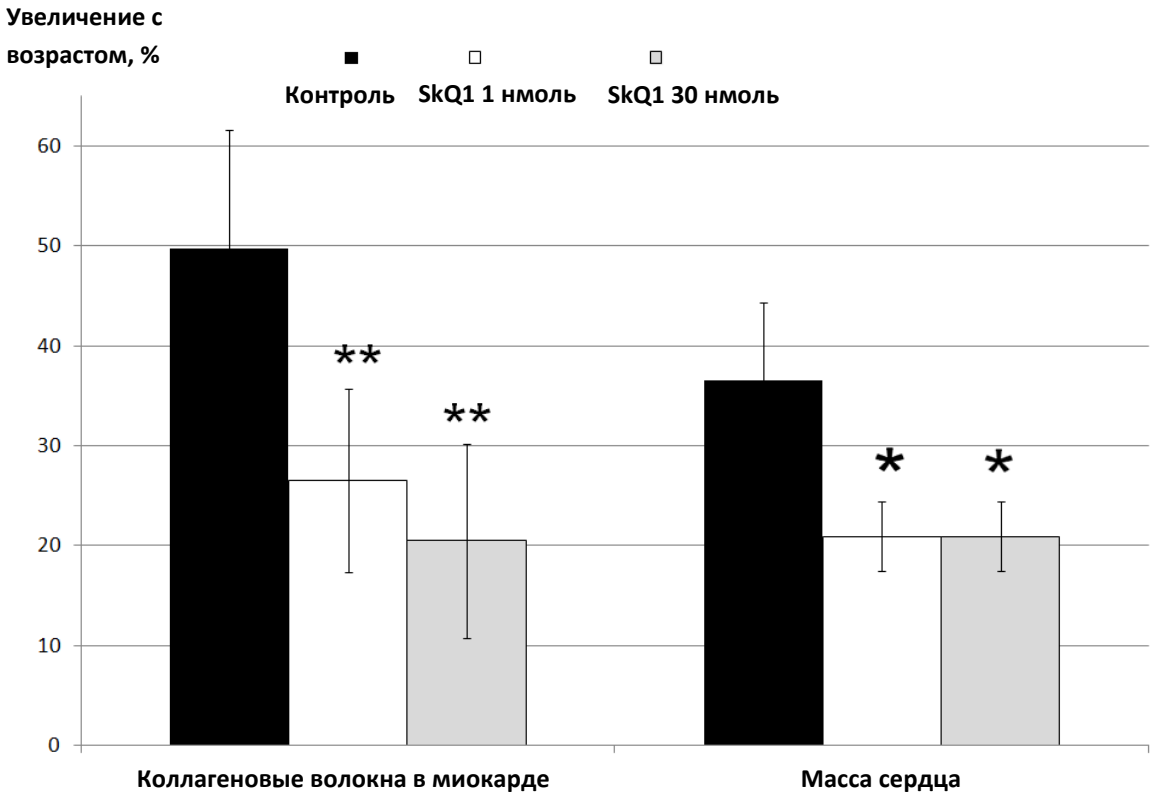



Рисунок 38 – Влияние SkQ1 на развитие возрастной гипертрофии миокарда и фиброза у мышей-самок BALB/c. Примечание - показатели выраженности фиброза (относительная площадь, занимаемая коллагеном на срезах миокарда, окрашенных по Ван Гизон) и гипертрофии (масса сердца) представлены в виде превышения над уровнем у контрольных молодых (3 месяца) животных (в %). Различия между контрольной и опытными группами: *$p < 0.05$; **$p < 0.01$.

Рисунок 39 - Типичные макроскопический вид сердец (верхняя панель) и гистологическая картина миокарда на препаратах, окрашенных пикрофуксином по Ван Гизон (нижняя панель, 400х) у молодых контрольных мышей (3 месяца) и у старых мышей (24 месяца) получавших и не получавших SkQ1 (1 и 30 нмоль/кг/сут.). Примечание – коллагеновые волокна в строме миокарда окрашены в красный цвет.

противостоит большая редкость развития карцином этого органа [Tucker, 1997]. Стромальные возрастные изменения представлены главным образом интерстициальной клеточной инфильтрацией лимфоцитами, гистиоцитами, эозинофилами, лаброцитами и изредка – нейтрофилами и эпителиоидными клетками плоть до образования гранулем. Исследование влияния SkQ1 (250 нмоль/кг/сутки на протяжении всей жизни) на частоту и выраженность диспластических изменений у крыс Вистар в возрасте 18 месяцев показало, что у животных, получавших этот препарат, оба указанных параметра характеризовались меньшими значениями, чем в контроле (частота – 60 и 100% соответственно, выраженность – 0,7 и 1,2 балла соответственно). Однако, эти различия не были достоверными ($p>0,05$). Совершенно иная ситуация выявилась при сравнении частоты гардеровской метаплазии, которая в контроле наблюдалась у 86% крыс, тогда как в у животных, получавших SkQ1, она составила всего 10% ($\chi2=9,75$; $p<0,05$). Стромальная клеточная инфильтрация (лимфоцитами, гистиоцитами и лаброцитами) у животных обеих групп была выражена очень слабо. Таким образом, пожизненное пероральное введение SkQ1 позволило предотвратить развитие возрастных метапластических изменений в слезной железе, но не оказала такого же явного влияния на дисплазию в этом органе.

### 3.7 Влияние SkQ1 на процессы атрофии на модели спонтанной патологии у SOD1-трасненных мышей B6SJL-Tg(SOD1-G93A)dl1Gur/J

Супероксиддисмутаза 1 (SOD1) является одним из важнейших компонентов системы, обеспечивающей редокс-гомеостаз в клетках. Последствия дефектов этого фермента могут проявляться как утратой им антиоксидантной функции, так и нарушением его протеосомальной деградации, в результате чего он накапливается в клетках и вызывает их гибель путем апоптоза. Именно последний механизм (гибель мотонейронов передних рогов спинного мозга) лежит в основе развития бокового амиотрофического склероза у трансгенных мышей линии B6SJL-Tg(SOD1-G93A)dl1Gur/J.

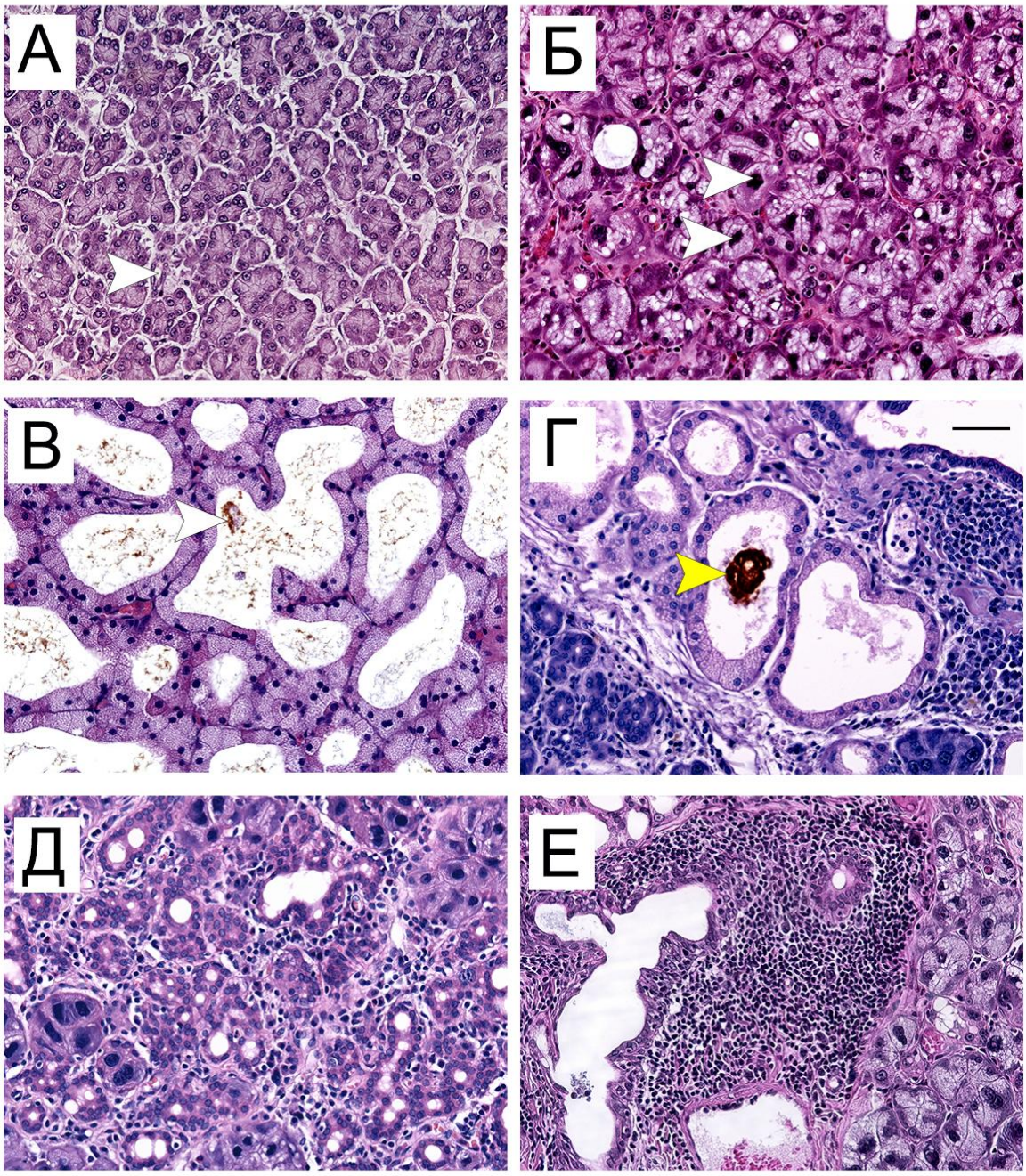



Рисунок 40 – Морфологические варианты возрастных изменений в экзорбитальной слезной железе крыс линии Вистар: А – слезная железа молодого животного (3 мес.). Стрелкой показан интралобулярный проток; Б – диспластические изменения в паренхиме слезной железы. Стрелками указаны митозы; В – железа Гардера. Стрелкой указан агрегат порфирина в просвете концевого отдела; Г – гардеризация паренхимы слезной железы. Стрелкой указан агрегат порфирина в просвете метапластического ацинуса; Д – “дуктуляризация” паренхимы железы; Е – лимфо-гистио-плазмоцитарная инфильтрация стромы железы. Масштабная линейка на Г 50 мкм. Окрашивание гематоксилином и эозином, ×400.

Исследование пожизненного введения SkQ1 в дозах 50, 250, и 1250 нмоль/кг/день показало отсутствие достоверного эффекта любой из этих доз на продолжительность жизни самцов и самок этой линии, гибель которых в основном вызывается атрофическими изменениями спинного мозга (во всех случаях $p>0,05$) . Однако, исследование спектра сопутствующей патологии позволило обнаружить некоторые отличия между группами, получавшими и не получавшими препарат. Оказалось, что у 42% интактных мышей (самцов и самок) B6SJL-Tg(SOD1-G93A)dl1Gur/J развивается тяжелая гемолитическая анемия с характерной морфологической картиной в виде выраженного гемосидероза печени и красной пульпы селезенки (рисунок 41).

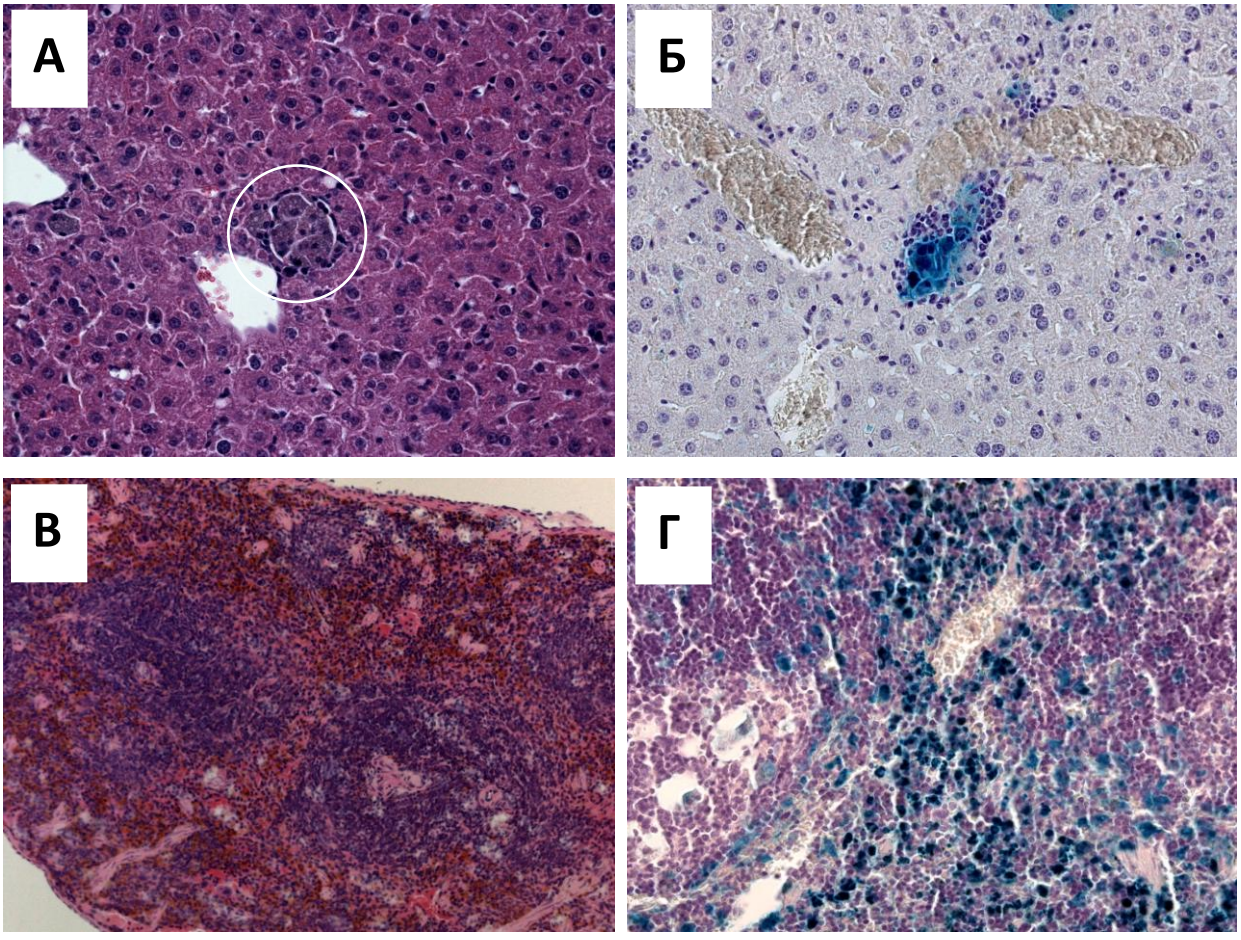



Рисунок 41 – Морфологические изменения (накопление гемосидерина в местных макрофагах) печени и селезенки при тяжелой гемолитической анемии у трансгенных мышей линии B6SJL-Tg(SOD1-G93A)dl1Gur/J: А – печень, окраска гематоксилином и эозином, х400; Б – печень, реакция Перлса с докраской квасцовым кармином х400; В – селезенка, окраска гематоксилином и эозином, х200; Г – селезенка, реакция Перлса с докраской квасцовым кармином, х400. Примечание - многочисленные гемосидерофаги (на снимке А – в центре белого круга) содержат в цитоплазме коричневый пигмент, дающий позитивную реакцию Перлса (синее окрашивание).

Введение SkQ1 приводило к тому, что указанные изменения были отмечены только у 8% животных (суммарная частота для всех групп, получавших SkQ1, $p<0,01$).

Кроме гемолитической анемии, были обнаружены единичные случаи прогрессирующей нефропатии, обструктивной уропатии, сепсиса, интерстициальной экссудативной пневмонии, родентолепиоза и злокачественных новообразований. Ввиду низкой частоты указанных изменений они не подлежали статистической оценке. Общий вывод данного исследования заключается в том, что SkQ1 не оказывает влияния на гибель животных линии B6SJL-Tg(SOD1-G93A)dl1Gur/J, вызванную развитием атрофических изменений в передних рогах спинного мозга при боковом амиотрофическом склерозе, однако, снижает частоту развивающейся у мышей этой линии тяжелой гемолитической анемии с гемосидерозом печени и селезенки.

## 3.8 Влияние SkQ1 на опухолевый рост

### 3.8.1 Спонтанные опухоли у мышей линии BALB/c

Данные о влиянии SkQ1 на продолжительность жизни самцов и самок мышей линии BALB/c приведены в разделе 3.2.1, информация о развивающихся у них неопухолевых патологических изменениях – в разделе 3.3.1.

Общая частота злокачественных опухолей во всех группах как у самцов (контроль – 46,7%, 1 нмоль/кг/сутки – 56,4%, 30 нмоль/кг/сутки – 55,6%), так и у самок (контроль – 91,9%, 1 нмоль/кг/сутки – 91,5%, 30 нмоль/кг/сутки – 92,3%) не различалась (во всех случаях $p>0,1$). Средняя продолжительность жизни у самок со злокачественными опухолями была несколько больше, чем у самцов; SkQ1 не оказывал на этот параметр никакого влияния (таблица 18). Подавляющее большинство новообразований у животных из всех исследованных групп было представлено гематопоэтическими неоплазмами различных гистологических фолликулярная и разные варианты диффузной крупноклеточной лимфомы, реже

Таблица 18 - Частоты спонтанных опухолей разных типов и продолжительность жизни мышей линии BALB/c контрольных групп и животных, получавших SkQ1

| Показатель/группа | САМКИ | | | САМЦЫ | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Контроль | 1 нмоль SkQ1/кг/сутки | 30 нмоль SkQ1/кг/сутки | Контроль | 1 нмоль SkQ1/кг/сутки | 30 нмоль SkQ1/кг/сутки |
| Животные со злокачественными опухолями | 57/62 (91,9%) | 54/59 (91,5%) | 60/65 (92,3%) | 14/30 (46,7%) | 22/39 (56,4%) | 20/36 (55,6%) |
| СПЖ животных со злокачественными опухолями | 802±102 | 785±106 | 808±94 | 742±92 | 785±82 | 762±90 |
| Животные с опухолями системы крови | 55/62 (88,5%) | 52/59 (88,1%) | 55/65 (83,8%) | 7/30 (23,3%) | 16/39 (41,0%) | 14/36 (38,8%) |
| СПЖ животных с опухолями системы крови | 799±101 | 786±106 | 801±90 | 730±124 | 800±80 | 753±86 |
| Животные с фолликулярными лимфомами | 16/62 (25,8%) | 5/48 (10,4%)* | 6/50 (12,3%)* | 2/28 (7,1%) | 2/34 (5,9%) | 4/32 (13,8%) |
| Животные с диссеминированными фолликулярными лимфомами | 13/62 (21,0%) | 3/48 (6,3%)** | 5/50 (10,0%) | 2/28 (7,1%) | 2/34 (5,9%) | 3/32 (9,4%) |
| Животные с доброкачественными аденомами легких | 7/62 (11,3%) | 8/59 (13,6%) | 8/65 (12,3%) | 2/30 (6,7%) | 4/39 (10,3%) | 6/36 (16,7%) |
| Животные с первично-множественными аденомами легких | 1/62 (1,6%) | 1/59 (1,7%) | 1/65 (1,5%) | 1/30 (3,3%) | 2/39 (5,1%) | 1/36 (2,8%) |
| СПЖ животных с аденомами легких | 873±118 | 881±117 | 871±98 | 757±33 | 815±39 | 785±110 |
| Животные с аденокарциномами легких | 8/62 (12,9%) | 5/59 (8,5%) | 7/65 (10,8%) | 4/30 (13,3%) | 5/39 (12,8%) | 2/36 (5,6%) |
| СПЖ животных с аденокарциномами легких | 853±117 | 879±98 | 861±123 | 714±44 | 747±90 | 901±69 |
| Животные с доброкачественными гемангиомами | 10/62 (16,1%) | 7/59 (11,9%) | 8/65 (12,3%) | 4/30 (13,3%) | 2/39 (5,1%) | 2/36 (5,6%) |
| Животные с первично-множественными гемангиомами | 1/62 (1,6%) | 0/59 (0%) | 0/65 (0%) | 1/30 (3,3%) | 1/39 (2,6%) | 0/36 (0%) |
| СПЖ животных с гемангиомами | 845±73 | 841±100 | 887±88 | 799±149 | 808±30 | 748±118 |
| Животные с гемангиосаркомами | 1/62 (1,6%) | 1/59 (1,7%) | 1/65 (1,5%) | 3/30 (10,0%) | 0/39 (0%) | 3/36 (8,3%) |
| СПЖ с гемангиосаркомами | 922 | 699 | 808 | 784±45 | - | 716±63 |

Примечание - средняя продолжительность жизни (СПЖ) указана в днях (M±SD); показатели, статистически значимо отличавшиеся от контрольных, отмечены звездочками: * - $p<0,1$; **$p<0,05$; в остальных случаях эффект SkQ1 был статистически недостоверен. Выборки для фолликулярных лимфом меньше, чем для остальных новообразований, поскольку в некоторых случаях сохранность материала не позволяла уточнить гистологический тип гематопоэтической опухоли.

была диагностирована лимфобластная лимфома; было также небольшое число вариантов, бронхоальвеолярными аденомами и аденокарциномами легких, а также опухолями, происходящими из эндотелия кровеносных сосудов – гемангиомами и гемангиосаркомами (печени, яичников, селезенки, надпочечников, матки, мягких тканей) (рисунок 42).

Первое место по частоте у животных всех групп занимали неоплазмы крови. Самки во всех группах характеризовались особенно большими частотами этих новообразований (83-89%), что в 2-4 раза выше, чем частота лимфом и лейкозов у самцов. Преобладающими формами были случаев других опухолей (лимфома маргинальной зоны селезенки, мелкоклеточная лимфома, миелоидные лейкозы). Диссеминированные гематопоэтические опухоли могли поражать любые органы и ткани, но чаще всего опухолевое поражение затрагивало селезенку, печень, тимус, пейеровы бляшки и лимфатические узлы всех групп (мезентериальные – чаще других), причем была отмечена асимметрия вовлечения правого и левого параренальных лимфатических узлов (правый поражался значительно реже и меньше левого). Фолликулярные лимфомы и лимфобластные лимфомы тимуса, по данным литературы, являются соответственно В- и Т-клеточными неоплазмами [Pathology of the mouse..., 1999, International Classification …, 2001, Morse et al. 2002]; диффузные крупноклеточные лимфомы (центробластные и иммунобластные) у исследованных нами животных имели В-клеточное происхождение, о чем свидетельствовало позитивное иммуногистохимическое окрашивание антителами против IgG мыши (рисунок 43) [Ward et al., 2006].

В целом, у самцов и самок опытных групп общая частота опухолей крови достоверно не отличалась от контрольного уровня. Однако, у самок в группах, получавших 1 и 30 нмоль SkQ1/кг/день было замечена тенденция к снижению частоты случаев фолликулярной лимфомы (с 25,8% до 6,4 % и 12,3%, p равно 0,053 и 0,087 соответственно) а в группе, получавшей 1 нмоль/кг/день – также и достоверное уменьшение случаев диссеминированной фолликулярной лимфомы

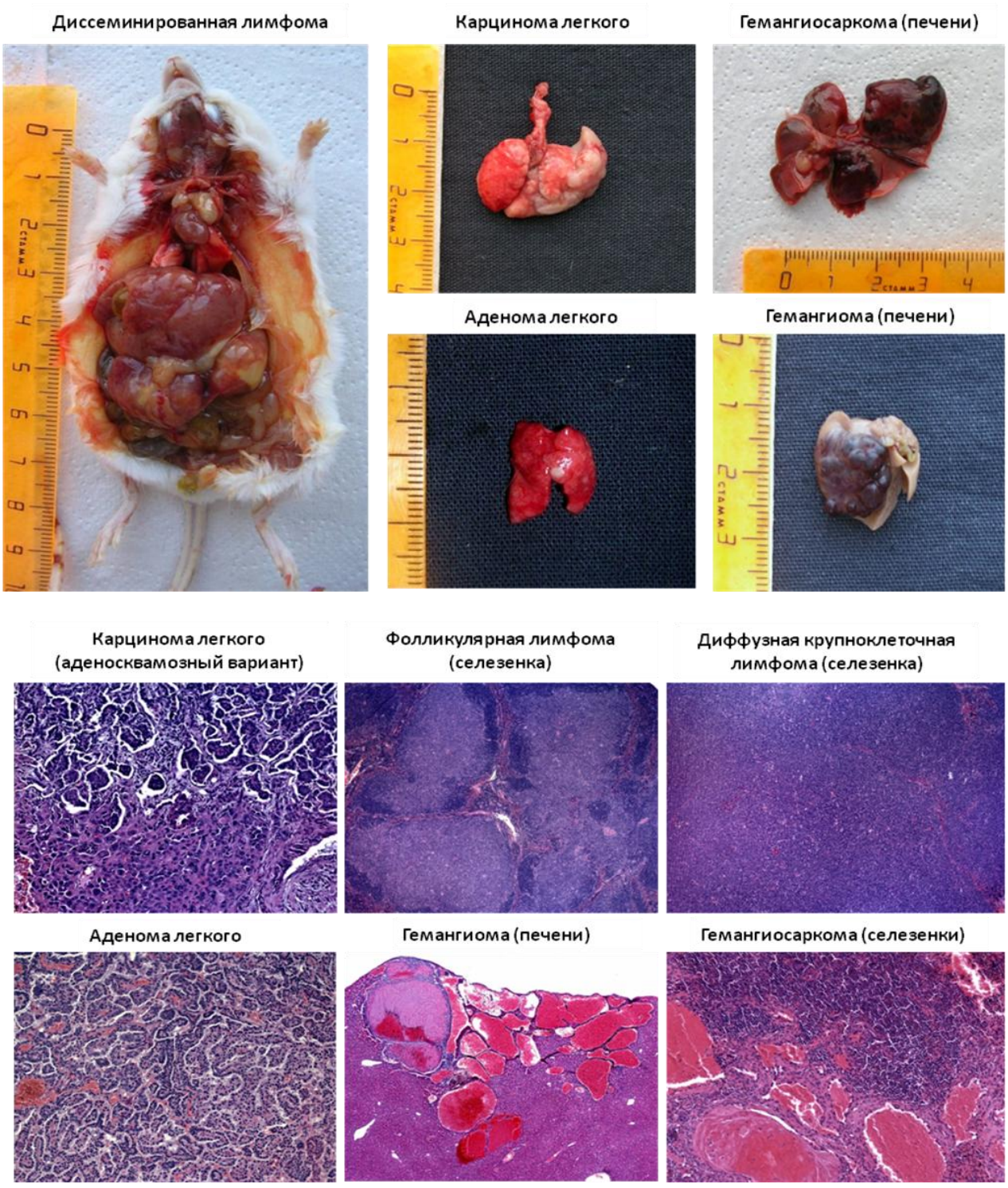



Рисунок 42 – Общая макроскопическая и гистологическая морфология мажорных опухолей, отмеченных у мышей линии BALB/c в эксперименте с SkQ1. Примечание - все гистологические изображения выполнены с препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином; гемангиома, фолликулярная и диффузная крупноклеточная лимфомы – х50, гемангиосаркома и аденома легкого – х200, карцинома легкого – х400.

по сравнению с контролем (с 21,0% до 6,3%, $p<0,05$). Продолжительность жизни животных с лимфомами и лейкозами во всех группах самцов и самок была приблизительно одинаковой. Масса селезенки, выбранная как дополнительный показатель степени развития поражений при лимфомах и лейкозах, у животных разных групп не различалась.

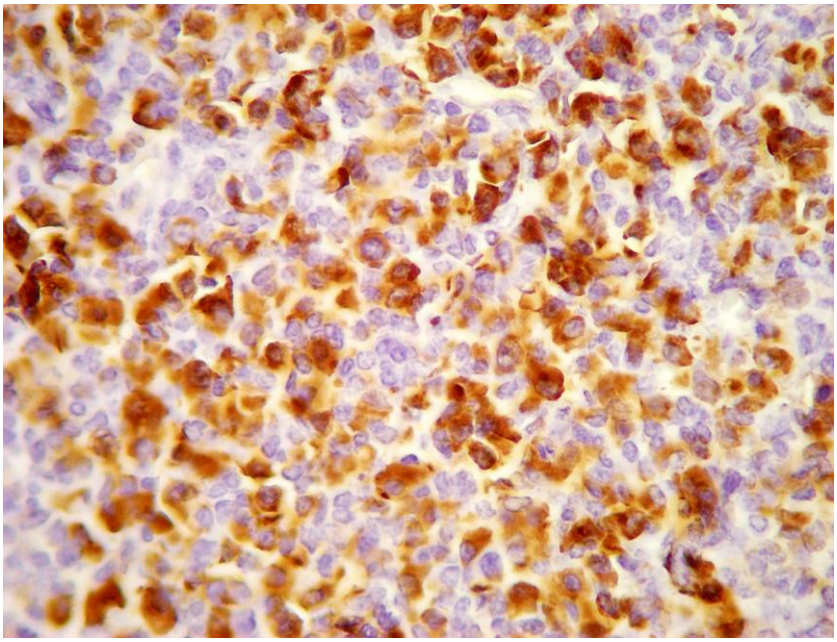


Рисунок 43 – В-клеточная лимфома у мыши BALB/c: позитивное иммуногистохимическое окрашивание опухолевых клеток антителами к IgG мыши, меченными пероксидазой, дополнительная окраска ядер гематоксилином, х1000.

Опухоли легких у мышей BALB/c относительно часты (20-24%) и представлены доброкачественными аденомами и злокачественными аденокарциномами. Последние новообразования способны к метастазированию, которое, обычно носит интраорганный характер и не распространяется за пределы легких. Частота доброкачественных и злокачественных у опытных и контрольных животных всех групп достоверно не отличалась (во всех случаях $p>0,05$). Не было отмечено различий в продолжительности жизни животных с этими опухолями, а также в частотах первично-множественных аденом легких. Выраженность поражения легких при аденокарциномах, оцененная по их массе, не различалась

между группами мышей, получавших и не получавших SkQ1 (во всех случаях $p>0,05$).

Мыши BALB/c характеризуются высокой частотой возникновения опухолей эндотелиального происхождения (гемангиом и гемангиосарком). Эти неоплазмы чаще встречаются в печени, селезенке и в яичниках, но могут быть найдены и в любом другом органе. Спонтанное нарушение целостности опухоли в некоторых случаях вело к массивному фатальному кровотечению. Частота доброкачественных и злокачественных сосудистых новообразований, в том числе и первично-множественных, оказалась достоверно не зависящей от введения SkQ1 (во всех случаях $p>0,05$). Не было различий и в возрасте животных, погибших с этими неоплазмами (во всех случаях $p>0,05$).

У всех мышей, независимо от группы и пола, наблюдалась субкапсулярная гиперплазия коры надпочечников. Кроме того, были отмечены единичные случаи сарком мягких тканей (рабдомиосаркомы, фибросаркомы, злокачественной фиброзной гистиоцитомы), гистиоцитарной саркомы, мезотелиомы, кортикальной карциномы надпочечников, гепатоцеллюлярной и холангиоцеллюлярной карциномы, миоэпителиальной карциномы слюнной железы, рака молочной железы (тип В), злокачественной нейроэндокринной опухоли слепой кишки и плоскоклеточных раков желудка, цымбаловской железы и мочевого пузыря, лейомиомы, стромального полипа матки и железистого полипа желудка. Ввиду единичности этих новообразований, было невозможно сделать вывод о влиянии SkQ1 на их развитие.

Таким образом, в опыте на самцах и самках мышей BALB/c SkQ1 не оказывал достоверного влияния на суммарную частоту опухолей и встречаемость большинства мажорных доброкачественных и злокачественных новообразований. При этом стоит заметить, что SkQ1 снижал частоту фолликулярных лимфом у самок и тормозил их диссеминацию, однако не влиял на продолжительность жизни животных с опухолями разных типов.

### 3.8.2 Спонтанные опухоли у мышей линий C57Bl/6 и B6SJL-Tg(SOD1-G93A)dl1Gur/J

У инбредных мышей линии C57Bl/6, результаты исследования влияния SkQ1 на продолжительность жизни которых представлены в разделе 3.2.1, а спектры спонтанной патологии в разделе 3.3.2, наблюдались разнообразные опухоли (таблица 10). Как видно на таблицы 10, число выявленных новообразований у мышей контрольной группы и группы, получавшей SkQ1 (1400 нмоль/кг/сутки) было сходным, и суммарная частота их достоверно не различалась ($p>0,05$). Относительная малочисленность выборок и большое разнообразие гистологических типов новообразований не позволяет произвести корректной статистической оценки достоверности различий между группами по частоте отдельных форм неоплазм.

У трансгенных мышей B6SJL-Tg(SOD1-G93A)dl1Gur/J (раздел 3.7) также наблюдались злокачественные новообразования (фолликулярная лимфома, лимфобластная лимфома и высокодифференцированная аденокарцинома железистого желудка), которые возникали очень рано и приводили к гибели животных в возрасте 197-267 дней, что намного меньше латентного периода развития спонтанных опухолей у животных бэкграундной линии (350-400 дней). Однако число зарегистрированных в данном эксперименте опухолей было невелико и не позволяло обнаружить влияние SkQ1 на их развитие.

### 3.8.3 Спонтанные опухоли у самок хомячка Кэмпбелла (*Phodopus campbelli)*

Данные о продолжительности жизни животных, неопухолевой патологии и другие сведения об эксперименте, в котором производился учет опухолей у самок хомячка Кэмпбелла, представлены в разделах 3.2.2 и 3.3.3. Опухоли были частой патологией во всех группах (таблица 19). Причем, наибольший вклад в эту рубрику вносили не известные у хомячков спорадические неоплазмы матки, яичников, легких, кожи и ее придатков, а очень своеобразные новообразования тимуса, которые не встречаются у других лабораторных животных (рисунки 44 и 45). Макроскопически эти опухоли выглядели как очень крупные мягко-

Таблица 19 – Общая характеристика опухолей у хомячков Кэмпбелла *(Phodopus campbelli)*, не получавших и получавших разные дозы SkQ1

| Группа | Общее число животных с опухолями | Минимальный латентный период развития (возраст животных на момент выявления первой опухоли) для опухолей вообще (в скобках – для тимом), в днях | Число животных с опухолями тимуса (тимомами) | Объем опухолей тимуса (тимом), $см^3$ (M±SD) |
|---|---|---|---|---|
| Контроль, самки | 19/44 (43%) | 461 (502) | 12/44 (27%) | 1,24±1,04 |
| Контроль, самцы | 9/21 (43%) | 449 (449) | 7/21 (33%) | 1,78±2,01 |
| 5 + 50 нмоль/кг/сутки SkQ1, самки | 34/67 (51%) | 430 (468) | 25/67 (37%) | 1,22±1,10 |
| 50 нмоль/кг/сутки SkQ1, самцы | 10/21 (48%) | 457 (457) | 7/21 (33%) | 0,88±0,96 |

Примечание – во всех случаях для различий между опытом и контролем $p>0,05$.

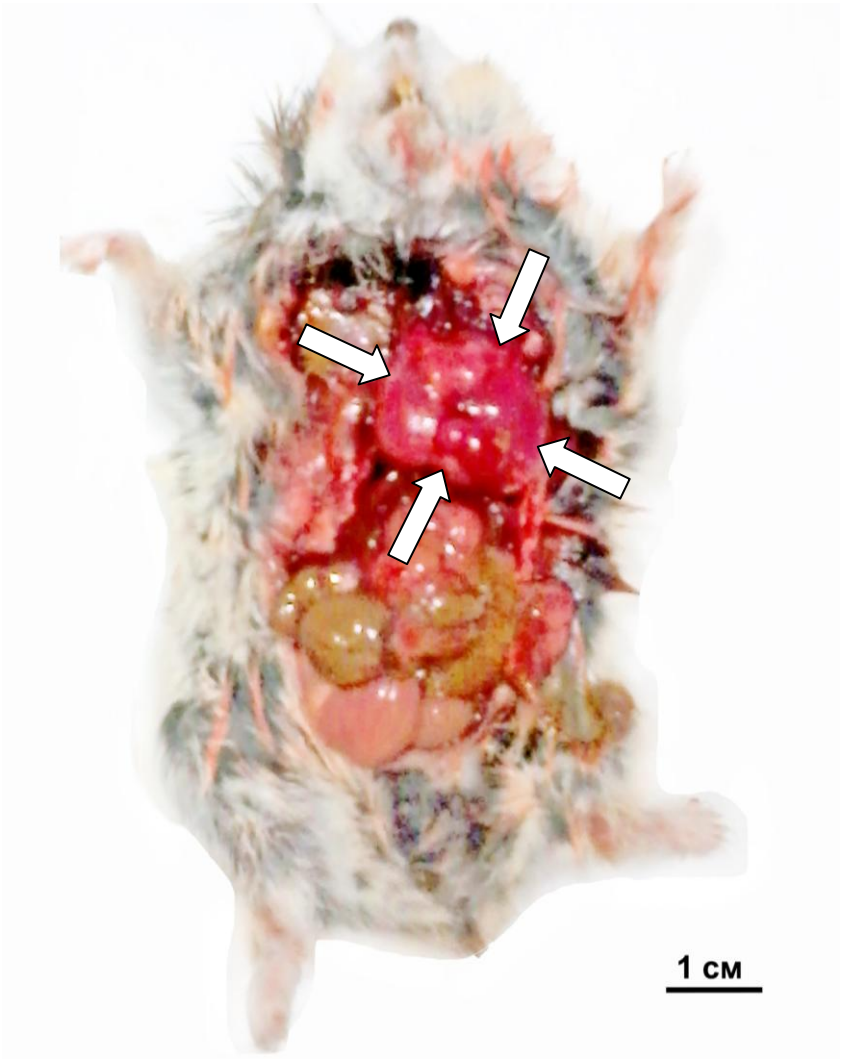



Рисунок 44 – Тимома у хомячка Кэмпбелла (*Phodopus campbelli)*, макроскопическая картина: опухоль в средостении отмечена стрелками.

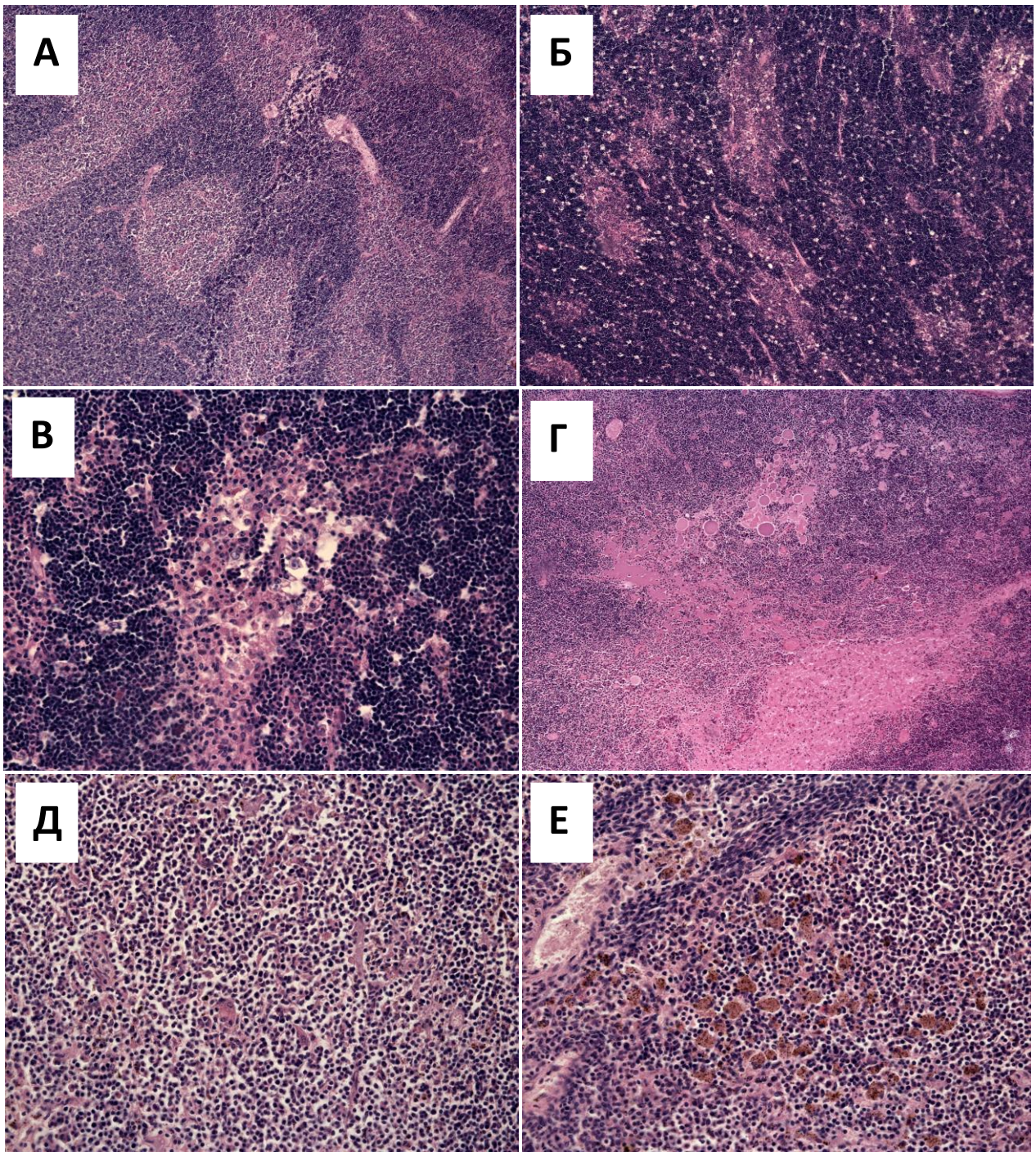



Рисунок 45 – Опухоль тимуса (тимома типа В1), варианты гистологического строения: А – вариант с четкой дифференцировкой на «корковое» и «мозговое» вещество; Б – вариант с заметным «стиранием» органоидности, хаотичное расположение зон «коркового» и «мозгового» вещества, множество фагоцитирующих макрофагов («звездное небо»); В – детальное изображение участка препарата, показанного на предыдущем снимке: «мозговое» вещество представлено макрофагами и эпителиоцитами стромы тимуса, «корковое» - главным образом зрелыми лимфоцитами; Г – вариант с полным отсутствием органоидных зон, очаг некроза, множество белковых кист; Д - клеточный состав опухоли, изображенной на предыдущем снимке – смесь из малых лимфоцитов, макрофагов, фибробластов и стромальных эпителиоцитов; Е – участок старого кровоизлияния: гемосидерофаги. Окраска гематоксилином и эозином, А,Б,Г – х100, В,Д,Е – х400.

эластичные узлы, обычно серовато-коричневого цвета, с гладкой поверхностью. На разрезе они были построены из серой ткани с участками желтоватых некрозов и, изредка, кровоизлияний. Величина опухолей (до 2,5х1,5х1,5 см) была такова, что они зачастую занимали большую часть пространства грудной клетки, оттесняя и сдавливая органы грудной полости в дорзальном направлении (рисунок 44); это, по-видимому, и служило причиной смерти, так как метастазы, опухолевый плеврит или местный инфильтративный рост никогда не обнаруживались. Гистологическое строение опухолей было вариабельным и непохожим ни на один тип опухолей, обычно встречающихся у лабораторных грызунов. В одних случаях новообразования чрезвычайно напоминали уродливый тимус с полями коркового и мозгового вещества, с многочисленными макрофагами (картина «звездного неба») (рисунок 45, А, Б). В других деление на «корковое» и «мозговое» вещество и сходство со структурой тимуса утрачивались, опухоль приобретала гомогенное строение (рисунок 45, Г). Основную ее часть составляли малые лимфоциты, бластные клетки практически отсутствовали (рисунок 45, В, Д). Во всех случаях в опухоли присутствовали в разном количестве макрофаги и эпителиальные клетки стромы тимуса, причем последние иногда приходилось старательно отыскивать. Митозов ни разу найдено не было, зато присутствовали многочисленные погибающие апоптозом лимфоидные клетки. Иногда наблюдалась не гибель отдельных клеток, а целые некротические очаги (рисунок 45, Г). Изредка удавалось видеть кисты, заполненные эозинофильным материалом, участки фиброза, кровоизлияний и скопления гемосидерофагов (рисунок 45, Е). Иногда отмечались небольшие лимфогистиоцитарные инфильтраты в легких, однако они никогда не достигали такого развития, как при лимфомах у мышей.

Описанные новообразования были найдены у хомячка Кэмпбелла впервые; их патоморфологическая картина полностью соответствует эпителиальной опухоли тимуса - тимоме типа В1 человека, которая характеризуется низкой степенью злокачественности [International classification …, 2001]. Такие неоплазмы ранее были найдены у европейского хомячка [Brandes et al., 2004]. Другие опухоли

(карциномы матки, яичников, легких, кожи и ее придатков) были единичными и принадлежали к типам, хорошо известным у лабораторных хомячков [Persy, Barthold, 2007; Kondo et al., 2008]; смерть животных наступала либо от метастазирования в легкие, либо по причине интоксикации продуктами распада опухолевых узлов. Что касается SkQ1, то его введение ни в одной из доз не оказывало достоверного влияния ни на общую частоту новообразований, ни на частоту тимом, равно как и на их размеры и латентный период (таблица 19, во всех случаях $p>0,05$).

### 3.8.4 Спонтанные опухоли у слепушонки обыкновенной *(Ellobius talpinus)*

Данные о продолжительности жизни животных, неопухолевой патологии и другие сведения об эксперименте, в котором производился учет опухолей у обыкновенной слепушонки, представлены в разделах 3.2.2 и 3.3.4.

Суммарно опухоли были найдены у 9 исследованных животных из 96 (9%). По отношению к животным, дожившим до возраста появления первой опухоли (549-й день), частота неоплазм составила 16%. Таким образом, встречаемость новообразований у обыкновенной слепушонки в 3-4 раза меньше, чем у аутбредных лабораторных мышей (но сопоставима с частотой опухолей у домовых мышей [Манских В.Н, 2004]), а срок появления первой опухоли приблизительно в полтора раза больше [Анисимов В.Н., 2008].

Гистологический спектр опухолей у обыкновенной слепушонки сильно отличался от спектра новообразований, обычно наблюдаемого у лабораторных мышей большинства линий (рисунок 46). Из 9 встретившихся неоплазм три были доброкачественными гепатоаденомами (в одном случае было установлено наличие множества очагов эритропоэза в опухолевой ткани), 1 – гепатоцеллюлярной карциномой, 1 – аденомой легкого, 1 – кортикальной аденомой надпочечника, 1 – анапластической феохромоцитомой, поразившей мозговое вещество надпочечника, 1 – гемангиосаркомой селезенки, 1 – очень своеобразной карциносаркомой, развившейся в промежности (желтоватая

Рисунок 46

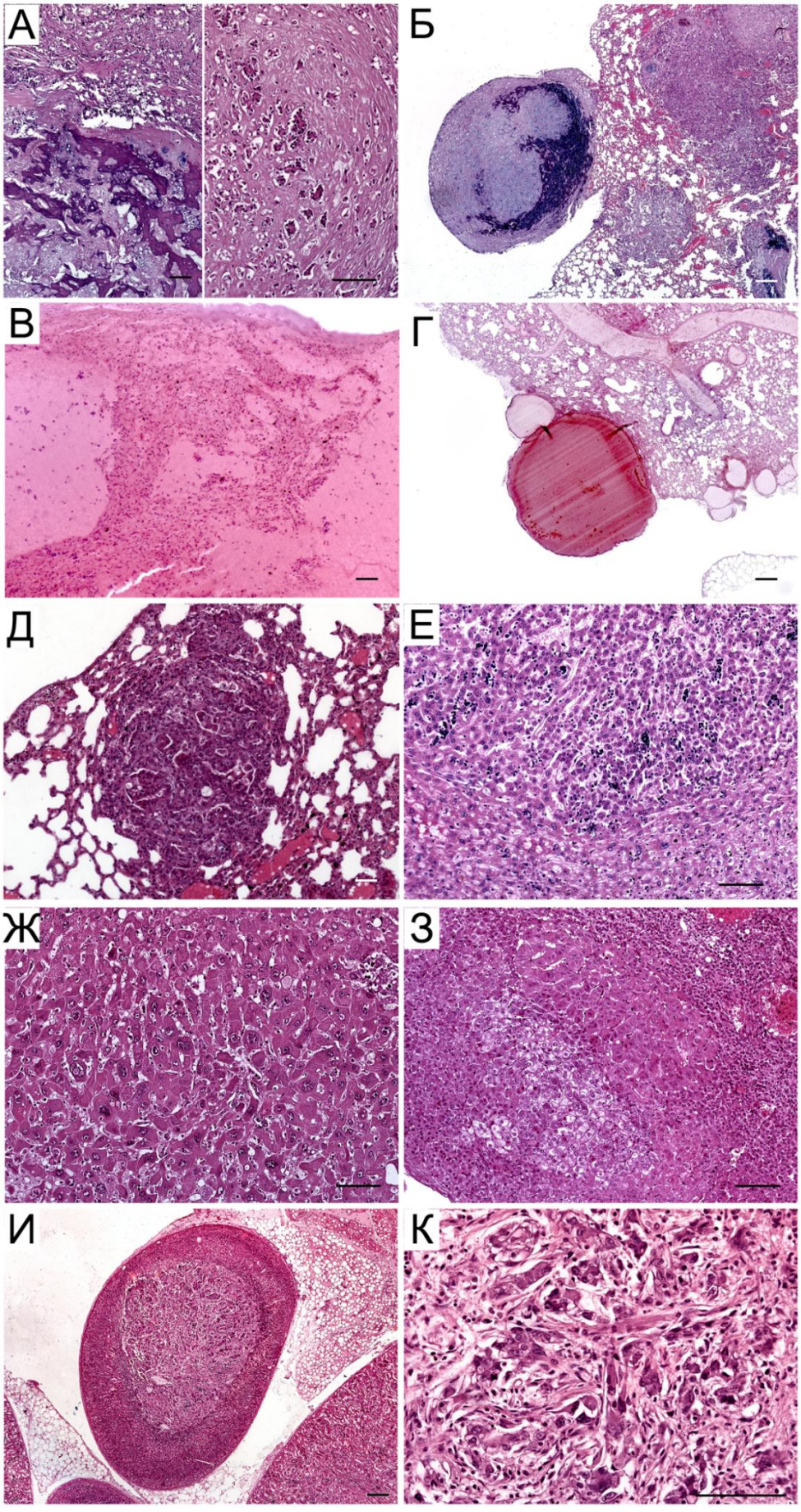


Рисунок 46 – Спонтанные опухоли, развившиеся у слепушонки обыкновенной *(Ellobius talpinus)*: А–карциносаркома промежности (слева – участок типичной хондросаркомы с эктопическим остеогенезом, справа – аденоидные структуры в опухоли); Б – метастазы той же опухоли в легких, отчетливая хондроидная дифференцировка; В – гемангиосаркома селезенки; Г – метастазы той же опухоли в легких; Д – солидно-папиллярная аденома легкого; Е – трабекулярная аденома печени с большим числом очагов экстрамедуллярного эритропоэза, опухолевая ткань сдавливает прилежащую нормальную ткань печени; Ж – умереннодифференцированная гепатоцеллюлярная карцинома; З – кортикальная аденома надпочечника; И, К – злокачественная анапластическая феохромоцитома. Окраска гематоксилином и эозином. Б, Г, И – 50х; А (левая часть), В, Д – 100х; А (правая часть), Е, Ж, З – 200х; К – 400х. Масштабные линейки 100 мкм на А, В, Д – З, К и 200 мкм на Б, Г, И.

опухоль размерами 20х15х15 мм костной твердости; гистологически – участки, построенные по типу фибросаркомы и хондросаркомы с аденоидными эпителиальными структурами; многочисленные метастазы в печени, в легких, по брюшине и в селезенке).

Частоты опухолей у контрольных самцов (8%) и самок (8%) с одной стороны и у самцов и самок, получавших SkQ1 (14% и 8% соответственно) – с другой - достоверно не различались ($p>0,1$).

### 3.9 Влияние SkQ1 на экспрессию генов в миокарде

Учитывая то, что SkQ1 оказывал влияние на развитие возрастных морфологических изменений миокарда (см. разделы 3.3.1.3, 3.3.2, 3.6.2), было исследовано влияние этого препарата на экспрессию генов в сердце мышей-самок BALB/c в возрасте 14 месяцев, которые получали SkQ1 ежесуточно с питьевой водой в течение всей жизни. Было обнаружено, что у мышей, которым вводили 1 и 30 нмоль/кг SkQ1, экспрессия соответственно 310 и 300 генов изменялась не менее чем 50% от уровня у контрольных животных ($p<0,05$), причем из них 220 генов были общими для обеих групп. Из этих 220 генов экспрессия была повышена у 152 и снижена у 68. Однако, идентифицировать какой-либо специфический биологический процесс, связанный с такими изменениями профиля экспрессии генов с помощью кластерного KEGG-анализа не удалось. В таблице 20 приведены наиболее важные сигнальные пути, в которые вовлечены

Таблица 20 – Сигнальные пути в миокарде, уровень экспрессии генов которых менялся в группах, получавших 1 и 30 нмоль SkQ1 на кг веса в сутки по сравнению с контрольной группой ($p < 0.05$)

| Сигнальный путь | Доля генов сигнального пути с измененной экспрессией (%) |
|---|---|
| Адгезивные соединения | 4 |
| Трансэндотелиальная миграция (лейкоцитов) | 10 |
| Молекулы клеточной адгезии (CAMs) | 7 |
| Сигнальный путь Т-клеточного рецептора | 12 |
| Сигнальная система фосфодитилинозитола | 10 |

гены с измененной экспрессией. Импакт-фактор был вычислен для каждого внутреннего параметра сигнального пути включая нормализованный уровень изменений в экспрессии генов, отвечающих на воздействие, статистическую значимость набора генов и топологию сигнального пути, что обеспечивает возможность адекватной биологической интерпретации результатов [Draghici et al., 2007].

Примечательно, что SkQ1 изменял, прежде всего, экспрессию генов, продукты которых вовлечены в осуществление процессов адгезии разнообразных циркулирующих клеток (лейкоцитов, различных стволовых элементов, клеток-предшественников фибробластов, опухолевых клеток) к эндотелию и межклеточные контакты (такие кластеры биологических процессов, как «адгезивные контакты», «трансэндотелиальная миграция лейкоцитов», «молекулы межклеточной адгезии»). Несмотря на то, что SkQ1 является митохондриально-направленным соединением, только один ген с измененной транскрипцией имел митохондриальную локализацию.

Имея ввиду описанное выше (раздел 3.5) влияние SkQ1 на развитие воспалительных клеточных реакций, особое внимание было обращено на сигнальные пути, связанные с продукцией провоспалительных цитокинов, хемокинов и их рецепторов. Результаты анализа данных в отношении этих процессов (Gene Onthology id: GO:0006954) представлены в таблице 21. Как видно на этой таблице, гены, ответственные за иммунный и воспалительный ответ, давали разнонаправленную реакцию на введение SkQ1.

Таблица 21 – Гены воспалительного ответа, экспрессия которых в миокарде старых (в возрасте 14 месяцев) мышей BALB/c значимо изменялась под действием SkQ1

| Принятое обозначение | Ген | Функция | Изменение экспрессии, количество раз* |
|---|---|---|---|
| SCGB1A1 | Secretoglobin, family 1A, member 1 (uteroglobin) | Негативная регуляция продукции цитокинов | -9.6 |
| CXCL15 | Cxcl15 chemokine (C-X-C motif) ligand 15 | Хемотаксис нейтрофилов | -6.6 |
| CHIA | Chia1 chitinase, acidic 1 | Гидролиз хитина, иммунный ответ TH2-типа | -3.7 |
| AGER | Advanced glycosylation end product-specific receptor | Рецептор конечного продукта усиленного гликозилирования, позитивная регуляция воспалительного ответа | -3.3 |
| CHI3L3 | Chitinase-like 3 | Бета-N-ацетилгексозаминидаза | -3.1 |
| REG3G | Regenerating islet-derived 3 gamma | Позитивная регуляция заживления ран | -2.9 |
| HC | Hemolytic complement | Активация комплемента, позитивный регулятор секреции хемокинов | -2.4 |
| HP | Haptoglobin | Утилизация гемоглобина | -2.1 |
| PSTPIP1 | Proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein 1 | Негативная регуляция CD2-опосредованной активации Т-клеток | +2.5 |

Примечание – *повышение экспрессии по сравнению с контрольным уровнем обозначено знаком «+», снижение – «-».

*Окончание таблицы 21*

| Принятое обозначение | Ген | Функция | Изменение экспрессии, количество раз* |
|---|---|---|---|
| GATA3 | GATA binding protein 3 | Транскрипционный фактор, опосредующий регуляцию дифференцировки Th1- и Th2-лимфоцитов | +2.6 |
| PIK3CD | phosphatidylinositol 3-kinase catalytic delta polypeptide | Опосредует многие аспекты иммуногенеза | +2.7 |
| CD28 | CD28 antigen | Ко-стимуляторный сигнал Т-клеток, требующийся для их активации | +2.9 |
| NFKBID | nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells inhibitor, delta | Негативная регуляция I-каппа-B-киназы /NF-каппа-B-сигналинга | +2.9 |
| PIK3CG | Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, gamma polypeptide | Сборка адгезивных соединений и цитотоксичность NK-клеток | +3.1 |
| PBK | PDZ binding kinase. | Активация лимфоидных клеток | +4.2 |
| RASGRP1 | RAS guanyl releasing protein 1 | Регуляция развития Т и В клеток, их гомеостаз и дифференцировка | +5.1 |
| CCL25 | Ccl25 chemokine (C-C motif) ligand 25 | Хемотаксис тимоцитов, макрофагов и дендритных клеток | +6.2 |
| LAT | Lat linker for activation of T cells | Активация пути сигнальной трансдукции с антигенного рецептора Т-клеток | +6.7 |

Таким образом, было показано, что основной мишенью для действия SkQ1 в миокарде мышей служат гены, ответственные за воспалительную активацию эндотелия, процессы трансэндотелиальной миграции и рекрутирования циркулирующих клеток из сосудистого русла в ткань.

# ГЛАВА 4

# ОБСУЖДЕНИЕ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в ходе настоящей работы данные (таблица 22) и многочисленные результаты, опубликованные разными авторами, изучавшими эффекты и механизм действия митохондриально-направленных антиоксидантов вообще и SkQ1 в частности на различных моделях, позволяют сделать целый ряд обобщений и экстраполяций. Результаты исследований, представленных в настоящей работе и посвященных разным эффектам митохондриально-направленных антиоксидантных препаратов, могут быть объединены вокруг трех основных проблем: токсикопатологического действия этих веществ, их эффектов на продолжительность жизни, репродукцию и спектр спонтанной патологии (геропротекторной активности), а также проблемы эффективности и механизма действия данных агентов в отношении основных общепатологических процессов.

Токсикопатологическое исследование является обязательной частью программы по тестированию безопасности потенциального лекарственного

Таблица 22 – Общий обзор результатов исследования общей токсичности SkQ1 и эффектов митохондриально-направленных антиоксидантов на продолжительность жизни животных, спектр спонтанной патологии и развитие общепатологических процессов в условиях эксперимента, полученных в настоящей работе

| Токсикопатологическое исследование | | |
|---|---|---|
| Вариант исследования | Дозы SkQ1 | Эффекты |
| Острая токсичность при однократном внутривенном введении | 1, 5, 7,5, 10, 15 и 30 мг/кг | $LD_{50}$=10,4 (7,6-14,4) мг/кг ), в летальных дозах вызывает гибель животных (самцов крыс Вистар) от отека легких в срок от нескольких минут до 2-3 часов после инъекции |
| Хроническая токсичность максимальных потенциальных терапевтических доз при пероральном введении | 400 и 2000 нмоль/кг SkQ1 1 раз в сутки | Ежедневное введение препарата в срок до 8 недель (+2 недели перерыва) не вызывает изменений морфологических характеристик органов и тканей животных (самцов и самок крыс Вистар) в сравнении с контрольной группой |
| Эффекты на продолжительность жизни животных | | |
| Вид и линия | Пол и условия содержания | Эффекты |
| Мыши BALB/c | Самцы, SPF | Увеличение средней продолжительности жизни |
| Мыши BALB/c | Самки, SPF | Не обнаружено достоверного увеличения средней продолжительности жизни |

*Продолжение таблицы 22*

| Эффекты на продолжительность жизни животных | | |
|---|---|---|
| Вид и линия | Пол и условия содержания | Эффекты |
| Мыши C57Bl/6 | Самцы, SPF | Увеличение средней продолжительности жизни |
| Мыши C57Bl/6 | Самки, SPF | Не обнаружено достоверного увеличения средней продолжительности жизни |
| Обыкновенные слепушонки (*Ellobius talpinus)* | Самцы и самки, конвенциональные условия, приближенные к естественной среде обитания | Увеличение средней продолжительности жизни |
| Хомячки Кэмпбелла (*Phodopus campbelli)* | Самцы и самки, конвенциональные условия, приближенные к естественной среде обитания | Увеличение средней продолжительности жизни |
| Влияние на спектр спонтанных патологических процессов (кроме опухолей) | | |
| Вид и линия | Пол и условия содержания | Эффекты |
| Мыши BALB/c | Самцы, SPF | Снижение частоты возрастной кардиомиопатии |
| Мыши BALB/c | Самки, SPF | Увеличение частоты и выраженности мукометры (гидрометры) |
| Мыши C57Bl/6 | Самцы, SPF | Снижение частоты возрастной кардиомиопатии |
| Мыши C57Bl/6 | Самки, SPF | Снижение частоты возрастной кардиомиопатии |
| Обыкновенные слепушонки (*Ellobius talpinus)* | Самцы и самки, конвенциональные условия, приближенные к естественной среде обитания | Не обнаружено достоверного эффекта |
| Хомячки Кэмпбелла (*Phodopus campbelli)* | Самцы и самки, конвенциональные условия, приближенные к естественной среде обитания | Не обнаружено достоверного эффекта |
| Влияние на развитие экспериментальных общепатологических процессов (в том числе на опухолевый рост) | | |
| Тип общепатологических процессов | Модель | Эффективность |
| Альтерация | | |
| Некроз, апоптоз, жировая дистрофия | CCl4-индуцированная токсическая дистрофия печени у мышей C57Bl/6 | Не обнаружено достоверного эффекта на морфологические показатели альтерации |
| Апоптоз | Доксорубицин-индуцированное цитостатическое поражение семенников у мышей BALB/c | Не обнаружено достоверного эффекта на морфологические показатели альтерации |
| Воспаление | | |
| Асептическое экссудативное | Аргинин-индуцированный панкреатит у крыс Вистар | Обнаружено снижение показателей, характеризующих степень выраженности воспалительной инфильтрации (нейтрофилами и моноцитами) |
| Инфекционное (бактериальное) экссудативное | Бактериальный пиелонефрит у крыс Вистар | Обнаружено снижение показателей, характеризующих степень выраженности воспалительной инфильтрации (нейтрофилами и моноцитами) |
| Аутоиммунное продуктивное | Коллаген-индуцированный ревматоидный артрит у крыс Вистар | Обнаружено снижение показателей, характеризующих степень выраженности воспалительной инфильтрации (лимфоцитами и макрофагами) |

*Окончание таблицы 22*

| Влияние на развитие экспериментальных общепатологических процессов (в том числе на опухолевый рост) | | |
|---|---|---|
| Тип общепатологических процессов | Модель | Эффективность |
| Компенсаторно-приспособительные процессы | | |
| Репаративная регенерация | Регенерация кожи после механической травмы у старых (18 месячных) мышей CBAxC57Bl/6 F1 | Ускорение образования грануляционной ткани и эпителизации (закрытия) раны |
| Репаративная регенерация | Регенерация кожи после механической травмы у старых мышей db/db с нарушениями углеводного и липидного обмена | Ускорение образования грануляционной ткани и эпителизации (закрытия) раны |
| Гипертрофия | Возрастная гипертрофия миокарда у мышей BALB/c | Уменьшение морфологических показателей, характеризующих выраженность гипертрофии |
| Фиброз | Возрастной фиброз миокарда у мышей BALB/c | Уменьшение морфологических показателей, характеризующих выраженность фиброза |
| Атрофия | Боковой амиотрофический склероз у трансгенных мышей B6SJL-Tg(SOD1-G93A)dl1Gur/J | Не обнаружено достоверного эффекта |
| Атрофия | Гемолитическая анемия у трансгенных мышей B6SJL-Tg(SOD1-G93A)dl1Gur/J | Достоверное снижение частоты встречаемости тяжелой гемолитической анемии |
| Метаплазия и дисплазия | Возрастные изменения паренхиматозных клеток в слезной железе крыс Вистар | Снижение частоты развития гардеровской метаплазии |
| Опухолевый рост | | |
| Карциномы | Спонтанные карциномы легких у самцов и самок мышей BALB/c | Не обнаружено достоверного эффекта |
| Тимомы | Спонтанные тимомы у хомячков Кэмпбелла | Не обнаружено достоверного эффекта |
| Лимфомы и лейкозы | Спонтанные лимфомы и лейкозы у самцов и самок мышей BALB/c | Обнаружено снижение частоты фолликулярных лимфом и их диссеминированных форм |
| Саркомы | Спонтанные гемангиосаркомы у самцов и самок мышей BALB/c | Не обнаружено достоверного эффекта |
| Другие спорадические опухоли | Спонтанные опухоли у самцов и самок мышей линий BALB/c, B6SJL-Tg(SOD1-G93A)dl1Gur/J, C57Bl/6, хомячков Кэмпбелла (*Phodopus campbelli)*, обыкновенных слепушонок (*Ellobius talpinus)* | Не обнаружено достоверного эффекта |

соединения [Хабриев, 2005; Руководство по проведению доклинических исследований…, 2012]. Исследованное вещество (SkQ1) при внутривенном введении оказалось способно вызвать быструю гибель животных. Согласно существующим классификациям химических соединений по острой токсичности при парентеральном введении, SkQ1 ($LD_{50}$ = 10,4 мг/кг) может быть отнесен к препаратам с умеренной токсичностью по К.К.Сидорову (1973) и OECD или к

высокотоксичным веществам по ГОСТ 12.1.007-76 [Березовская, 2003]. Патоморфологическая (макро- и микроскопическая) картина при гибели животных от острой интоксикации в результате внутривенной инъекции данного вещества была одинаковой независимо от величины вводимой летальной дозы. Почти во всех исследованных органах и тканях обнаруживали только неспецифические изменения, обычные для острой гибели в виде последствий нарушений кровообращения: острое венозное полнокровие органов, стазы и сладжи форменных элементов крови в микроциркуляторном русле, мелкие эритроцитарные экстравазаты и слабо выраженные явления отека интерстиция в органах большого круга кровообращения. Никаких изменений в паренхиматозных клетках разных органов, за исключением «зернистой дистрофии», представляющей собой, как известно, обратимое «набухание» клеточных органелл в ответ на изменение условий тканевой среды [Зайд, Потапова, 1973; Струков, Серов, 1995] не отмечалось. Наряду с описанными явлениями, наблюдались и относительно более специфические изменения в виде резко выраженного интерстициального и альвеолярного отека легких и кровоизлияний в мозговом веществе тимуса, возникающие, как считается, в ответ на острую гиперкапнию [Frith et al., 2000], которая в данном случае развивается из-за нарушений газообмена в легких. Развитие отека легких, по-видимому, связано с выраженным действием SkQ1 как поверхностно-активного вещества [Antonenko et al., 2008], иначе говоря, мембраноатакующего детергента, которое ведет к исчезновению способности альвеолярно-капиллярного барьера удерживать плазму крови в микроциркуляторном русле. Характерно, что у выживших после острого отравления животных никаких морфологических изменений в органах не обнаруживается.

Хроническое (субхроническое) токсическое действие SkQ1 при пероральном введении было протестировано на дозах (400 и 2000 нмоль/кг в сутки), превышающих максимальные суточные дозировки, для которых были описаны какие-либо терапевтические эффекты, могущие иметь потенциальное клиническое значение (1-1400 нмоль/кг). Гибель животных не была отмечена ни в

одном случае, ни среди самок, ни среди самцов. Гистопатологическое и макроскопическое исследования большого набора органов и тканей, взятых от эвтаназированных контрольных и опытных крыс на разных сроках (до 8 недель) не выявили никаких специфических изменений: были обнаружены только единичные случаи фоновой патологии, характерные для интактных крыс линии Вистар [Tucker, 1997; Background lesions..., 2012]. Частоты этих изменений между контрольными и опытными группами достоверно не различались. Не было обнаружено постоянных, достоверных и значимых различий между группами в массовых показателях, полученных при взвешивании тела и органов. Из этих данных можно заключить, что SkQ1, по крайней мере, в дозах до 2000 нмоль/кг в сутки не оказывает видимого токсического эффекта. К сожалению, сравнить токсикологические характеристики SkQ1 с другими митохондриально-направленными антиоксидантами (например, с MitoQ) или с другими соединениями трифенилфосфония не представляется возможным из-за отсутствия опубликованных данных по этому вопросу.

Говоря о хроническом токсическом действии SkQ1, стоит упомянуть также результаты изучения последствий его длительного (пожизненного) введения *per os* в дозах до 1400 нмоль/кг в сутки животным разных видов и линий, полученные в настоящей работе, а также некоторые данные других авторов, исследования которых предполагали длительное воздействие данного вещества [Neroev et al., 2008; Юрова и соавт., 2010; Saprunova et al., 2010; Skulachev et al., 2011; Saprunova et al., 2012; Vays et al., 2014]. Во всех этих случаях не были зарегистрированы какие-либо значимые негативные эффекты на физиологические функции и морфологическое строение разных органов и систем, в том числе и отсутствие местно-раздражающего действия, тератогенности, эмбриотоксичности, иммунотоксичности, нейротоксичности, миелотоксичности и генотоксических эффектов [Obukhova et al., 2009; Shipounova et al., 2010; Chistyakov et al., 2010; Yang et al., 2012; Stefanova et al., 2014]. В отношении генотоксического эффекта стоит особенно подчеркнуть, что SkQ1 не только не повышал уровень аберраций хромосом, но даже снижал их частоту [Chistyakov et al., 2010]. То же касается

нейро- миело- и иммунотоксичности, поскольку показатели состояния нервной системы, систем кроветворения и иммунной защиты у старых животных, получавших длительно данное соединение, были лучше, чем в контрольных группах [Obukhova et al., 2009; Shipounova et al., 2010; Stefanova et al., 2014]. Существенно отметить, что ни в одной из этих доз препарат не оказывал заметного канцерогенного или опухоль-промотирующего эффекта (см. ниже).

Экспериментальное изучение влияния митохондриально-направленных антиоксидантов на продолжительность жизни кажется совершенно естественным с точки зрения одной из лидирующих точек зрения на механизм старения – свободнорадикальной теории [Harman, 1956; Harman,1972; Harman,1992; Wei, 1998; Schriner et al., 2005; Cui et al., 2012; Gruber et al., 2013]. Многочисленные попытки увеличить продолжительность жизни животных разных видов и классов с помощью обычных антиоксидантов не привели к сколько-нибудь значительным результатам, увеличивая среднюю продолжительность жизни не более, чем на 10% [Анисимов, 2008]. Интересно отметить, что при этом не уменьшается кумулятивная частота спонтанных опухолей, а лишь сдвигается вправо кривая гибели от них [Анисимов, 2008].

К сожалению, SkQ1 – единственный митохондриально-направленный антиоксидант, чей эффект на продолжительность жизни разных животных изучен достаточно подробно; в связи с этим его невозможно сравнить с другими аналогичными веществами. Исключением могут быть только три публикации [Magwere et al., 2006; Dai et al., 2014; Ng et al., 2014], в которых показано, что MitoQ увеличивает продолжительность жизни трансгенных *Caenorhabditis elegans,* служащих своеобразной моделью болезни Альцгеймера и *Drosophila melanogaster* с дефицитом супероксиддисмутазы, но не влияют на таких же животных дикого типа. SkQ1 в чрезвычайно низких (наномолярных и субнаномолярных) концентрациях увеличивает продолжительность жизни грибов (*Podospora anserina*), ракообразных (*Ceriodaphnia affinis*), и насекомых (*Drosophila melanogaster*) [Skulachev, 2007; Skulachev, 2009; Krementsova et al., 2012]. В отношении млекопитающих существовали лишь ограниченные данные

[Юрова и соавт., 2010], которые благодаря результатам, полученным в настоящей работе, значительно расширены. Оказалось, что SkQ1 достоверно увеличивает продолжительность жизни животных разных видов, однако, это увеличение сильно зависит от условий содержания и пола. В частности, была установлена способность SkQ1 увеличивать среднюю продолжительность жизни обоих полов животных дикого типа (обыкновенной слепушонки и хомячка Кэмпбелла), обитающих в конвенциональных условиях, т.е., в ситуации, когда они контактируют с разнообразной, в том числе и патогенной микрофлорой. Это вполне отвечает данным литературы, согласно которым продолжительность жизни аутбредных мышей-самок SHR увеличивалась при введении препарата *per os* в дозах 0,5-50 нмоль/кг/сутки [Юрова и соавт., 2010]. Интересно, что при этом было констатировано увеличение репродуктивной способности животных в виде увеличения числа выводков; это в определенной мере также отвечает данным только что упомянутой работы о более продолжительном сохранении эстральной функции у мышей SHR, получавших SkQ1, по сравнению с контролем. В то же время, ни в настоящем исследовании, ни другим авторам [Юрова и соавт., 2010] с помощью названного препарата не удалось увеличить продолжительность жизни самок мышей различных линий, независимо от того, содержались ли эти мыши в конвенциональных (инбредные 129/Sv, трансгенные HER-2/neu, литературные данные) или в SPF-условиях (инбредные линии BALB/c, C57BL, данные настоящей работы). Следует подчеркнуть, что в обоих случаях использовались сходные дозы (хотя ширина диапазона доз была различна) и путь введения (*per os* с питьевой водой). Способность SkQ1 увеличивать продолжительность жизни самцов мышей инбредных линий впервые была протестирована в настоящей работе на SPF-животных BALB/c и C57BL. Оказалось, что исследованный препарат достоверно увеличивал среднюю продолжительность жизни этих животных, однако лишь до значений, характерных для самок тех же линий (приблизительно на 10%). Таким образом, в целом была подтверждена геропротекторная активность SkQ1, однако при этом обнаружились указанные

различия этого эффекта в зависимости от пола и условий жизни экспериментальных животных.

Для того, чтобы выяснить механизм такого необычного геропротекторного эффекта исследованного митохондриально-направленного антиоксиданта, целесообразно было проанализировать полученные при некропсии и патогистологическом исследовании сведения о причинах гибели животных в контрольных и опытных группах. К сожалению, в литературе на этот счет имеются только очень ограниченные данные, касающиеся спонтанных опухолей [Юрова и соавт., 2010]. Однако, сопоставление этих данных с результатами, полученными в настоящей работе, позволяет сделать вполне определенные выводы.

Основной причиной смерти самок BALB/c и C57BL, содержавшихся в SPF-условиях, были злокачественные опухоли. В частности, суммарная частота неоплазм у контрольных самок BALB/c составляла 92% и эта величина никак не менялась под влиянием SkQ1. Частота опухолей у контрольных самок 129/Sv также составляла порядка 90%, а у трансгенных мышей HER-2/neu, содержавших в геноме человеческий онкоген, опухоли молочной железы поражали 100% животных [Юрова и соавт., 2010]. В то же время, частота опухолей у контрольных самок SHR была менее 70%. В настоящем исследовании частота новообразований у контрольных хомячков Кэмпбелла составляла 60%, частота же опухолей у павших обыкновенных слепушонок была только 9%. Среди павших контрольных самцов BALB/c опухолями были поражены менее 50% животных. Сопоставление всех этих данных показывает, что SkQ1 оказывает значимый эффект на продолжительность жизни животных тогда и только тогда, когда частота спонтанных опухолей у них составляет 70% и менее. Все это недвусмысленно указывает на то, что основной «мишенью» для SkQ1 как геропротектора служит неопухолевая патология. В целом, такая мысль уже высказывалась ранее [Юрова и соавт., 2010], однако патоморфологический материал, служивший для этого заключения, не был достаточно полноценным, в частности, не позволял проанализировать вклад конкретных неопухолевых

патологий в общую морбидность павших мышей контрольных и опытных групп. Относительно спектра патологических изменений, обнаруженных на некропсии, указывалось только на наличие среди основных причин смерти абсцедирующей пневмонии, и, кроме того, на «поражение печени, почек, кишечные патологии в виде энтерита и энтероколита с отеком и вздутием кишечника, а также язвенный дерматит» [Юрова и соавт., 2010].

Локализованная и генерализованная (септикопиемия) гнойно-воспалительная патология, прежде всего в форме абсцедирующей пневмонии, составляла главную часть среди поражений, обнаруженных у павших особей обыкновенной слепушонки и у хомячков Кэмпбелла. Частота инфекционной патологии, и вообще спектр заболеваний у этих животных на момент смерти значимо не изменялись под действием SkQ1, хотя общая продолжительность жизни животных несколько увеличивалась. Очевидно, это свидетельствует о том, что данный препарат обладает весьма ограниченной способностью повышать устойчивость животных к биологическим болезнетворным агентам. Стоит, однако, заметить, что речь не идет о восстановлении или поддержании «ослабленного» у старых животных иммунного статуса в прямом смысле этого слова, поскольку в действительности он с возрастом претерпевает весьма неоднозначные и разнонаправленные изменения, которые еще более неоднозначно сказываются на течении инфекционных болезней [Анисимов, 2008]. Учитывая также, что SkQ1 не обладает антибактериальными свойствами (а большинство заболеваний у указанных животных имело именно бактериальную природу, установленную гистобактериоскопическим исследованием), приходится искать причины этого среди других факторов, влияющих на исход инфекционного процесса. В этом отношении чрезвычайное значение приобретают данные о поражениях, обнаруженных у мышей-самцов, содержавшихся в SPF-условиях. Оказалось, что среди павших контрольных животных линии BALB/c около трети составляли особи с явлениями возрастной кардиомиопатии, представляющей собой заболевание неинфекционной этиологии, в котором сочетаются воспалительные, склеротические и гипертрофические изменения

миокарда [Bellini et al., 1976; Pathobiology…, 1996; Pathology of the mouse…, 1999; Greaves, 2007; Background Lesions…, 2012]. Чрезвычайно существенным являлось то, что у самок этой линии случаи кардиомиопатии составляли единичные проценты. SkQ1 в обоих примененных дозах (1 и 30 нмоль/кг/сутки) достоверно снижал частоту этого заболевания у самцов, так, что она становилась статистически неотличимой от встречаемости кардиомиопатии у самок; низкая частота кардиомиопатии у самок под действием SkQ1 никак не изменялась (таблица 23). Этот результат поразительно совпадает с выводами, полученными при исследовании влияния SkQ1 на продолжительность жизни животных. Результаты, полученные на мышах C57BL,у которых SkQ1 снижал частоту кардиомиопатии в еще большей степени, принципиально не противоречат этому совпадению, хотя указанный материал, ввиду его небольшой величины, не позволяет провести раздельное статистическое сравнение частот кардиомиопатии между самками и самцами в опытных и контрольных группах.

Таким образом, общий анализ данных по изучению геропротекторных свойств SkQ1 приводит к неожиданному итоговому результату: этот

Таблица 23 – Частота встречаемости спонтанной возрастной кардиомиопатии (%) у погибших от естественных причин контрольных животных и у мышей, получавших SkQ1

| SkQ1, нмоль/кг в сутки | BALB/c, самки | BALB/c, самцы | C57BL/6 (самки и самцы) |
|---|---|---|---|
| 0 | 2.9 (N=35) | 25.9 (N=27) | 47.1 (N=17) |
| 1 | 6.7 (N=45) | 6.3* (N=31) | - |
| 30 | 5.1 (N=39) | 3.2** (N=32) | - |
| 1400 | - | - | 5.9* (N=17) |

Примечание – достоверность различий с соответсвующими контрольными группами *$p < 0,05$; **$p < 0,01$.

препарат относительно слабо влияет на развитие инфекционных поражений (увеличивая продолжительность жизни животных, но не снижая суммарную частоту заболеваемости) и гораздо сильнее – на возрастную патологию миокарда (увеличивая продолжительность жизни и снижая частоту болезни). Единственным общим звеном патогенеза, которое выявляется при сопоставлении заболеваний столь разных групп (инфекции и возрастные изменения миокарда), выступает воспаление (вызванное инфекционными агентами – в первом случае и асептическое – во втором). Этот вывод, вполне согласуется с данными, полученными в настоящей работе (а также с данными литературы, см. ниже), свидетельствующими о первенствующем значении и инфекционного, и асептического воспаления среди других общепатологических процессов в качестве мишени для действия митохондриально-направленных антиоксидантов.

Оставляя пока (с целью соблюдения порядка изложения) обсуждение действия SkQ1 на воспалительные реакции и обусловленную ими патологию, необходимо коротко сказать о других заболеваниях, наблюдавшихся у животных, содержавшихся в SPF-условиях. Увеличение продолжительности жизни самцов BALB/c за счет влияния препарата на кардиомиопатию не могло не сказаться на относительной частоте других заболеваний, в частности, оно привело к (недостоверному) повышению суммарной частоты опухолей (на 9% в каждой группе). Что касается инфекционной патологии, то на нее у этих животных SkQ1 не оказал никакого постоянного и значимого влияния. Возможно, это было связано с ее невысокой частотой, а также и с этиологией (большая часть поражений вызвана коронавирусом гепатита мышей). На другие спонтанные патологические процессы, большое разнообразие которых было обнаружено у исследованных животных (включая дистрофический кальциноз эпикарда, столь частый у BALB/c), SkQ1 не оказал никакого достоверного влияния; в части случаев это, возможно, было связано с незначительной частотой встречаемости этих поражений. Исключение составляет только мукометра (гидрометра) – уникальная патология самок BALB/c, которая представляет генетически обусловленный дефект развития полового тракта, заключающейся в отсутствии

сообщения между некоторыми его отделами. Частота этого заболевания достоверно возрастала у животных, получавших SkQ1 начиная с внутриутробного периода. Учитывая практически полное отсутствие конкретных данных о молекулярном механизме развития мукометры [Persy, Barthold, 2007], можно лишь предположить, что процессы, ответственные за разрушение (апоптоз клеток) перегородок между разными отделами репродуктивной системы в эмбриогенезе у мышей находятся под контролем сигнальных путей, активация которых зависит от митохондриальных АФК и прерывается митохондриально-направленным антиоксидантом SkQ1.

Обсуждение данных, полученных при исследовании разных моделей общепатологических процессов, предполагает рассмотрение сразу нескольких вопросов – в какой степени свободнорадикальные процессы задействованы в патогенезе того или иного патологического состояния, насколько важно участие в этих процессах активных форм кислорода митохондриального происхождения и как это соотносится с данными об эффектах различных митохондриально-направленных антиоксидантов, полученных в настоящей работе и другими авторами. Все это в полной мере относится к альтерации, наиболее изученной со всех названных точек зрения.

С самого начала необходимо сказать, что, если оставить в стороне прямую альтерацию, наименее интересную с точки зрения попыток воздействия на нее, то все равно приходится считаться с огромным числом возможных этиологических агентов и патогенетических механизмов, в конечном счете, приводящих к двум основным формам конечного ответа – некрозу или апоптозу. Среди этих факторов и механизмов ишемия, вероятно, занимает первое место по степени предполагаемого участия в ее патогенезе активных форм кислорода. И, действительно, большая часть работ по изучению митохондриально-направленных антиоксидантов на альтерацию была выполнена на различных моделях, воспроизводящих ситуацию ишемии-реперфузии [Adlam et al., 2005; Neuzil et al., 2007; Bakeeva et al., 2008; Писаренко и соавт., 2009; Plotnikov et al., 2009; Лакомкин, 2009; Plotnikov et al., 2010; Plotnikov et al., 2011; Skulachev et al.,

2011; Silachev et al., 2012; Mukhopadhyay et al., 2012; Kirpatovsky et al., 2013; Silachev et al., 2014]. При этом нужно отметить, что указанные авторы интересовались скорее интегральным эффектом исследованных препаратов, который регистрировался часто с помощью физиологических тестов (то есть, он мог быть связан с модулированием процессов воспаления, регенерации, компенсации и др.), чем воздействием на собственно ишемическую альтерацию. Следует также учесть, что основную роль в развитии повреждения после ишемии отводят все же свободным радикалам внемитохондриального происхождения [Halliwell, 1987; Flaherty, Weisfeldt, 1988; Halliwell, Gutteridge, 1990; Aruoma et al., 1991; Martínez-Cayuela, 1995; Saksela et al., 1999]. Основным выводом из работ по исследованию действия препаратов группы SkQ на ишемическое повреждение является то, что они оказывают протективный эффект, в частности, при инсульте головного мозга, только при прекондиционировании, и что важнейшую роль в этом играет не непосредственное действие этих веществ на нейроны, а их способность активировать синтез эритропоэтина, который и оказывается главным действующим медиатором [Plotnikov et al., 2009; Plotnikov et al., 2010; Plotnikov et al., 2011].

В настоящей работе исследовалось действие SkQ1 на моделях химического повреждения, отличных от ишемии-реперфузии, но часто используемых для испытания лекарственных веществ и воспроизводящих токсическое повреждение печени и цитостатическое поражение семенников. В первом случае повреждающим агентом выступает четыреххлористый углерод – ксенобиотик, токсическое действие которого проявляется после взаимодействия с цитохромом P450 [Weber et al., 2003; Huo et al., 2011]. Два основных механизма, которые вызывают повреждение гепатоцитов, являются активация ПОЛ и нарушение гомеостаза кальция [Masuda, 2006]. В случае поражения, вызванного четыреххлористым углеродом, возникают три главных варианта альтерации – жировая дистрофия, апоптоз и некроз [Weber et al., 2003; Masuda, 2006]. Все эти явления наблюдались на модели, использованной в настоящей работе. При этом, не обнаружено никакого достоверного эффекта ни на площадь поражения, ни на

ее глубину, а это значит, что ни одна из форм альтерации не предотвращалась SkQ1. Причем, данный вывод относится к обеими исследованными версиями препарата – окисленной и восстановленной. В целом, этот результат можно считать вполне ожидаемым, если учесть, что большинство свободных радикалов в этой модели альтерации имеет микросомальное и цитозольное, а не митохондриальное происхождение [Weber et al., 2003; Masuda, 2006]. При этом, однако, стоит упомянуть, что другой митохондриальный антиоксидант, обладающий более низким антиокислительным действием, чем SkQ1 – MitoQ [Antonenko et al., 2008] – ингибировал развитие жировой дистрофии печени, индуцированной этанолом [Chacko et al., 2011]. Несколько иная ситуация имеет место в случае цитостатической болезни, индуцированной доксорубицином. В основном эффект этого цитостатика связывают с активными формами кислорода, причем, генерируемыми именно митохондриями; меньшее значение придают повреждению ДНК и нарушениям внутриклеточного кальциевого гомеостаза [Kalivendi et al., 2005; Yeh et al., 2007; Ruan et al., 2015]. Альтерация в сперматогенных элементах семенной железы при действии доксорубицина реализуется в форме апоптоза, без дистрофических и некротических процессов [Yeh et al., 2007]. В настоящем исследовании был установлен очень слабый протективный эффект SkQ1 в отношении гибели клеток герминативного эпителия семенников, несмотря на широкий диапазон использованных доз (50-1250 нмоль/кг/сутки). Полученный результат может быть объяснен, если считать, что окислительный стресс – не главный, или, по крайней мере, не единственный процесс, который опосредует апоптоз, вызванный доксорубицином. Действительно, хотя в литературе очень широко обсуждается именно прооксидантное действие этого препарата, существуют вполне определенные данные, свидетельствующие в пользу того, что доксорубицин вполне активен как проапоптотический агент, даже когда фактор окислительного стресса исключен. В этом случае апоптоз индуцируется низкими дозами цитостатика, ингибирующими гемоксигеназу-1 [Bernuzzi et al., 2009]. Результаты настоящей работы вполне поддерживают последнюю точку и недвусмысленно указывают на

незначительную роль активных форм кислорода митохондриального происхождения в патогенезе цитостатической болезни, вызванной доксорубицином, по крайней мере, в отношении сперматогенных клеток. Стоит, однако, упомянуть, что в отношении адриамициновой кардиомиопатии другой митохондриальный антиоксидант – MitoQ – оказался вполне эффективен [Smith, Murphy, 2010], хотя его антиоксидантный потенциал ниже, чем у SkQ1 (см. раздел 1.3.3). Что касается дистрофических процессов, то, помимо уже названной жировой дистрофии печени, на которую SkQ1 не оказал никакого влияния, следует еще раз указать на отсутствие эффектов этого вещества в отношении спонтанной минерализации эпикарда у мышей BALB/c (см. выше). Это указание имеет значение в связи с тем, что кальциноз некоторыми авторами рассматривается в числе процессов, в развитии которых определенную роль играют активные формы кислорода [Khan, 2014]. В целом же, обобщая литературные и собственные данные можно заключить, что митохондриальные антиоксиданты оказались значительно менее эффективными в отношении альтеративных процессов, чем это можно было ожидать, исходя из частого упоминания активных форм кислорода, генерируемых митохондриями, в качестве участников патогенеза разных форм альтерации и из экспериментов на модельных системах *in vitro*. Кроме того, по крайней мере, часть известных эффектов оказалась обусловлена повышением уровня эритропоэтина, а не прямым действием на продукцию свободных радикалов в очаге поражения. Все это, как кажется, должно вести к пересмотру оценки патогенетической роли митохондриальных активных форм кислорода в патогенезе альтерации.

Если альтерация, и в особенности процессы некроза и апоптоза, изначально рассматривалась как перспективная мишень для митохондриально-направленных антиоксидантов, то этого нельзя сказать о воспалении, интерес к которому с этой точки зрения стал появляться значительно позже, и скорее, в результате побочных наблюдений и неоднозначных результатов, полученных на моделях альтеративной патологии, чем на основе априорных данных о роли митохондриальных свободных радикалов в воспалительной реакции.

Большинство свободнорадикальных процессов при воспалении связывают с активными ионами, продуцируемыми в цитозоле клеток-эффекторов (гранулоцитов и макрофагов) и вызывающими вторичную альтерацию, а не с дисфункцией митохондрий [Hadjigogos, 2003; Hitchon, El-Gabalawy, 2004; Remans et al., 2005; Fernandez et al., 2006; Lowes et al., 2008]. В связи с этим, трудно было ожидать значимого эффекта от митохондриально-направленных антиоксидантов. Между тем, были получены вполне определенные данные о том, что на ряде моделей митохондриальный антиоксидант MitoQ оказывает позитивное влияние в плане уменьшения активности воспалительной реакции [Mao et al., 2013; Dashdorj et al., 2013; Davies et al., 2013]. Полученные в настоящей работе результаты позволяют значительно расширить информацию о противовоспалительных эффектах митохондриально-направленных антиоксидантных препаратов. Оказалось, что SkQ1 и SkQR1 способны подавлять развитие воспаления, точнее, инфильтрацию клетками-эффекторами разного типа (гранулоцитами, лимфоцитами, макрофагами) при самых разнообразных типах воспалительных поражений – асептическом экссудативном (остром панкреатите), бактериальном экссудативном (остром гнойном пиелонефрите) и аутоиммунном продуктивном воспалении (ревматоидном артрите). Следует заметить, что обнаруженный эффект был все же меньше, чем у препарата глюкокортикоидных гормонов (дексаметазона), использованного в качестве одного из контролей в эксперименте с аутоиммунным ревматоидным артритом. Результаты исследований действия SkQ1 на воспаление очень хорошо согласуются с данными о спектре спонтанной патологии у грызунов, длительное время получавших разные дозы названного препарата. Особенно показательными являются данные о влиянии SkQ1 на спонтанную возрастную кардиомиопатию у мышей – заболевание, в патогенезе которого воспалительные процессы составляют важнейшую компоненту [Pathobiology…, 1996; Hirasawa et al., 1998; Pathology of the mouse…, 1999; Greaves, 2007; Background Lesions…, 2012].

Для выяснения механизма, лежащего в основе эффекта SkQ1 на воспалительную инфильтрацию, большое значение могут иметь данные о влиянии

этого вещества на профиль экспрессии генов в тканях, в которых развивается воспаление. В настоящей работе было показано, что в сердце – органе, где как раз развивается асептическое воспалительное поражение в форме возрастной кардиомиопатии – SkQ1 в наибольшей степени снижает экспрессию генов, ответственных за провоспалительную активацию эндотелия, адгезию и трансэндотелиальную миграцию циркулирующих клеток, прежде всего клеток-эффекторов воспаления, из кровяного русла. Интересно отметить, что длительное введение MitoQ не отразилось на профиле генной экспрессии в миокарде [Rodriguez-Cuenca et al., 2010]. Вывод о влиянии SkQ1 именно на процессы трансэндотелиальной миграции и провоспалительной активации эндотелия хорошо согласуется с данными, полученными другими авторами. Так, в частности, было показано, что в системе *in vitro* SkQ1 эффективно снижал индуцированную провоспалительным цитокином TNFα экспрессию на эндотелиальных клетках молекул, ответственных за адгезию к ним лейкоцитов (ICAM-1, VCAM, E-селектина) [Romashchenko et al., 2013; Zinovkin et al., 2014]. Интересно, что подобным же (хотя и меньшим) действием обладал аналог SkQ1, лишенный антиоксидантной части (пластохинона) – C12TPP, что означает неполную зависимость названного эффекта от способности препарата удалять активные формы кислорода. Стоит, однако, заметить, что C12TPP, как и SkQ1, можно рассматривать как «превентивного» антиоксиданта, поскольку он может снижать продукцию АФК митохондриями за счет усиления разобщающего действия жирных кислот [Severin et al., 2010]. Детальный молекулярный анализ показал, что экспрессия адгезивных молекул на эндотелии зависит от сигнальных путей, регулируемых NF-κB и p38. SkQ1 никак не влиял на фосфорилирование (активацию) p38, но существенно уменьшал активацию NF-κB, ингибируя фосфорилирование и протеолитическое расщепление его ингибиторной субъединицы IκBα. Считается, что эти процессы зависят от продукции АФК комплексом I дыхательной цепи митохондрий [Romashchenko et al., 2015]. Существенно, что SkQ1 подавлял секрецию интерлейкинов 6 и 8 в стимулированной TNFα культуре эндотелиальных клеток и повышенную

экспрессию молекул межклеточной адгезии на эндотелии аорты у старых мышей, но не влиял на избыточное содержание TNFα и интерлейкина 6 в крови у тех же животных [Zinovkin et al., 2014]. Все эти данные говорят о том, что именно воспаление как общепатологический процесс, и, точнее, провоспалительная активация эндотелия сосудистого русла может быть основной мишенью для действия препаратов типа SkQ1. Что касается влияния митохондриальных антиоксидантов на систему специфического иммунитета, то на этот счет результаты настоящей работы не могут дать никакой точной информации, хотя в то же время и не противоречат данным литературы, впрочем, весьма немногочисленным [Obukhova et al., 2009; Yang et al., 2012].

Процессы атрофии в сильной степени зависят от апоптоза, который представляет собой проявление альтерации. Так же, как и в случае альтерации, нам не удалось показать достоверного влияния SkQ1 на этот тип общепатологических процессов на модели бокового амиотрофического склероза у трансгенных мышей B6SJL-Tg(SOD1-G93A)dl1Gur/J, хотя MitoQ, согласно литературным данным, оказывал слабое положительное воздействие в подобной модельной системе [Miquel et al., 2014]. При этом неожиданно выяснилось, что SkQ1 уменьшал изменения в органах, связанных с развитием гемолитической анемии у трансгенных мышей. По-видимому, в данном случае *in vivo* имеет место эффект, ранее описанный *in vitro* и напрямую связанный с антиоксидантными свойствами препарата, а именно – его способность повышать устойчивость эритроцитов к гемолизу, вызванному окислительным стрессом [Omarova, Antonenko, 2014]. Безусловно, этот эффект заслуживает дальнейшего изучения, в том числе и в связи с его возможным терапевтическим применением. Возвращаясь к атрофии, следует отметить, что действие SkQ1 в случае возрастной ретинопатии – важнейшего заболевания атрофической природы, в отношении которого показана эффективность названного препарата – также, по-видимому, обусловлена не непосредственным ингибированием апоптоза, а влиянием на компенсаторные и иные процессы через систему цитокинов VEGF и PEDF [Markovets et al., 2011].

Нарушения кровообращения не были предметом настоящего исследования, главным образом из-за отсутствия адекватной модели большинства из них (за исключением ишемии и некоторых форм аритмий), и вследствие сложности и неэлементарности возникающих при этом изменений в органах и тканях, воспроизводящих другие общепатологические реакции.

Репаративная регенерация представляет собой очень сложный комплекс явлений, в котором митохондриально-направленные антиоксиданты могут действовать на пролиферацию и дифференцировку разных типов клеток, на процессы воспаления, первичной или вторичной альтерации и т.д. Приведенные в настоящей работе данные об ускорении заживления ран прекрасно дополняются литературными данными, согласно которым при репаративных процессах SkQ1 резко меняет состав воспалительного инфильтрата, уменьшая его нейтрофильную компоненту, что, возможно, предотвращает развитие вторичной альтерации, тем самым, способствует репарации поврежденных тканей [Demianenko et al., 2010]. По-видимому, здесь имеет место тот же эффект препарата на активацию эндотелия и его способность обеспечивать рекрутирование циркулирующих клеток, который был обсужден выше. Другим важным компонентом эффекта SkQ1 на репаративную регенерацию является его способность регулировать секрецию цитокина TGFβ1, стимулирующего пролиферацию фибробластов *in vitro* [Popova et al., 2010]. Интересно, что, стимулируя выработку этого цитокина в культуре и, возможно, в грануляционной ткани, данный препарат не усиливал, а напротив, предотвращал развитие возрастного фиброза миокарда (см. далее).

Существуют многочисленные указания на роль окислительного стресса и митохондриальных АФК в развитии гипертрофии миокарда [Li et al., 1995; Lebovitz et al., 1996; Cieslik et al., 2011; Tsutsui et al., 2011; Maulik, Kumar, 2012; Madamanchi, Runge, 2013]. Показано, что MitoQ снижает развитие гипертрофии миокарда у животных с экспериментальной гипертонической болезнью, причем авторы связывают этот эффект с улучшением функционального состояния эндотелия кровеносных сосудов [Graham et al., 2009]. Наши данные, полученные на модели спонтанных возрастных изменений миокарда у мышей BALB/c вполне

согласуются с таким выводом и даже несколько расширяют его, а именно – что это улучшение функционального состояния связано со снижением реакции эндотелия на провоспалительные стимулы (об этом сказано выше, при обсуждении влияния SkQ1 на воспаление). Ранее было показано, что MitoQ предотвращал фиброз клубочков почки при диабетической нефропатии у мышей, ингибируя ряд профибротических сигнальных путей, предотвращая накопление в ядрах бета-катенина и фосфорилированного транскрипционного фактора Smad2/3 [Chacko et al., 2010]. Согласно данным, представленным в настоящей работе, антисклеротическим эффектом обладает и SkQ1, по крайней мере, в отношении возрастного фиброза миокарда у мышей BALB/c. Трудно сказать, в какой мере упомянутые изменения сигнальных путей, выявленные в экспериментах с MitoQ, актуальны для ситуации с SkQ1. Данные об изменениях экспрессии генов в миокарде мышей позволяют предположить, что и в данном случае наиболее вероятным является изменение эндотелия сосудов в отношении реакции на провоспалительные воздействия. Было показано, что развитие фиброза миокарда зависит от миграции циркулирующих мезенхимальных фибробластоподобных клеток-предшественников, которые используют сходные с клетками-эффекторами воспаления адгезивные молекулы и механизмы трансэпителиальной миграции [Zeisberg et al., 2007; Sopel et al., 2011]. Впрочем, ингибирование хронического воспаления во многих случаях само по себе означает ингибирование следующего за ним фиброза [Cieslik et al., 2011].

Эффективное подавление SkQ1 процессов гардеровской метаплазии в слезной железе крыс, представляющей собой загадочное явление пока что совершенно неизвестной молекулярной природы, приходится оставить на уровне констатации факта, поскольку его анализ требует дополнительного глубокого исследования механизмов этого типа реакций. Возможно, оно каким-то образом зависит от типа слабо выраженных продуктивных воспалительных процессов, часто сопровождающих изменения подобного рода в слезной железе [Walker, 1958; Williams et al., 1994;  Draper et al., 1998].

Опухолевый рост – это общепатологический процесс, который, как и альтерация, *a priori* предполагался в качестве перспективной мишени для препаратов группы митохондриально-направленных антиоксидантов, прежде всего из-за их антимутагенного действия [Chistyakov et al., 2010; Raghunathan et al., 2013]. В действительности оказалось, что результаты испытаний этих веществ на разных моделях экспериментальной онкологии очень неоднозначны. С одной стороны, на ряде искусственных моделей – ксенографтов опухолей человека HCT116/p53$^{-/-}$ [Agapova et al., 2008], индуцированных сарком мягких тканей [Аникин и соавт., 2013], лимфом у мышей с нокаутом гена p53 [Agapova et al., 2008] – показана способность SkQ1 ингибировать опухолевый рост. С другой стороны, немногочисленные опубликованные данные об испытаниях эффективности этого соединения как ингибитора развития спонтанных опухолей у мышей не выявили противоопухолевого эффекта, но и не обнаружили у него канцерогенного действия [Юрова и соавт., 2010]. Результаты настоящего исследования, полученные на очень большом материале – самцов и самок несколько линий и видов животных – полностью подтверждают отсутствие у SkQ1 выраженной способности подавлять спонтанный канцерогенез в эпителиальных и мезенхимальных, особенно гематопоэтических, тканях, равно как и полное отсутствие у него во всех исследованных дозах способности вызывать опухоли. Некоторым исключением является действие данного соединения на метастазирование фолликулярных лимфом у мышей BALB/c. Учитывая, что при метастатическом распространении опухолевых клеток (тем более – лимфоидных), согласно современным взглядам (теории «ниши» и «прениши»), используются те же самые механизмы рекрутирования из кровотока, что и при воспалении [Zlotnik, 2004; Wels et al., 2008; Psaila, Lyden, 2009], возможно, что ингибирование провоспалительной активации эндотелия SkQ1 тем самым подавляло и генерализованное распространение указанных новообразований. Впрочем, обнаруженный эффект в отношении генерализации лимфом был незначительным, во всяком случае, он не отражался на продолжительности жизни животных.

Обобщая весь материал настоящей работы, можно сделать заключение о том, что SkQ1 и его аналог SkQR1 представляют собой перспективные биологически активные субстанции группы митохондриально-направленных антиоксидантов, оказывающие целый ряд позитивных эффектов на моделях различных патологических процессов и не вызывающее в испытанных терапевтических дозах никаких патоморфологических изменений в органах и тканях. Результаты настоящей работы позволяют иначе, чем это можно было сделать на основании априорных соображений, представить механизм действия SkQ1. Полученные материалы определенно показывают, что основной эффект этого соединения на исследованные общепатологические процессы заключается в способности ингибировать провоспалительную активацию эндотелия и связанную с ней миграцию из кровотока различных клеток, осуществляющих патологические реакции (лейкоцитов, мезенхимальных клеток-предшественников, лимфоидных опухолевых клеток), а не только (а, может быть, и не столько) в возможности с помощью SkQ1 предотвращать альтерацию, вызванную свободными радикалами (АФК митохондриального происхождения). Это заключение может быть проиллюстрировано схемой, изображенной на рисунке 47. На этой схеме отражены взаимоотношения между известными глобальными молекулярными механизмами, обеспечивающими эффекты митохондриально-таргетированных антиоксидантов группы пластохинона и действием этих субстанций на общепатологические процессы в условиях эксперимента и группы заболеваний, вызывающих спонтанную возраст-зависимую гибель лабораторных животных. Как можно видеть, ингибирование провоспалительной активации эндотелия связано с заметно большим спектром выявленных позитивных эффектов, чем прямое антиоксидантное действие в смысле защиты биополимеров от повреждения свободными радикалами. Вероятный общий механизм действия на миграцию из кровотока циркулирующих клеток, исходя из данных опубликованных работ на моделях *in vitro* [Romashchenko et al., 2013; Zinovkin et al., 2014], заключается в том, что митохондриально-адресованныеантиоксиданты, удаляя АФК, прерывают

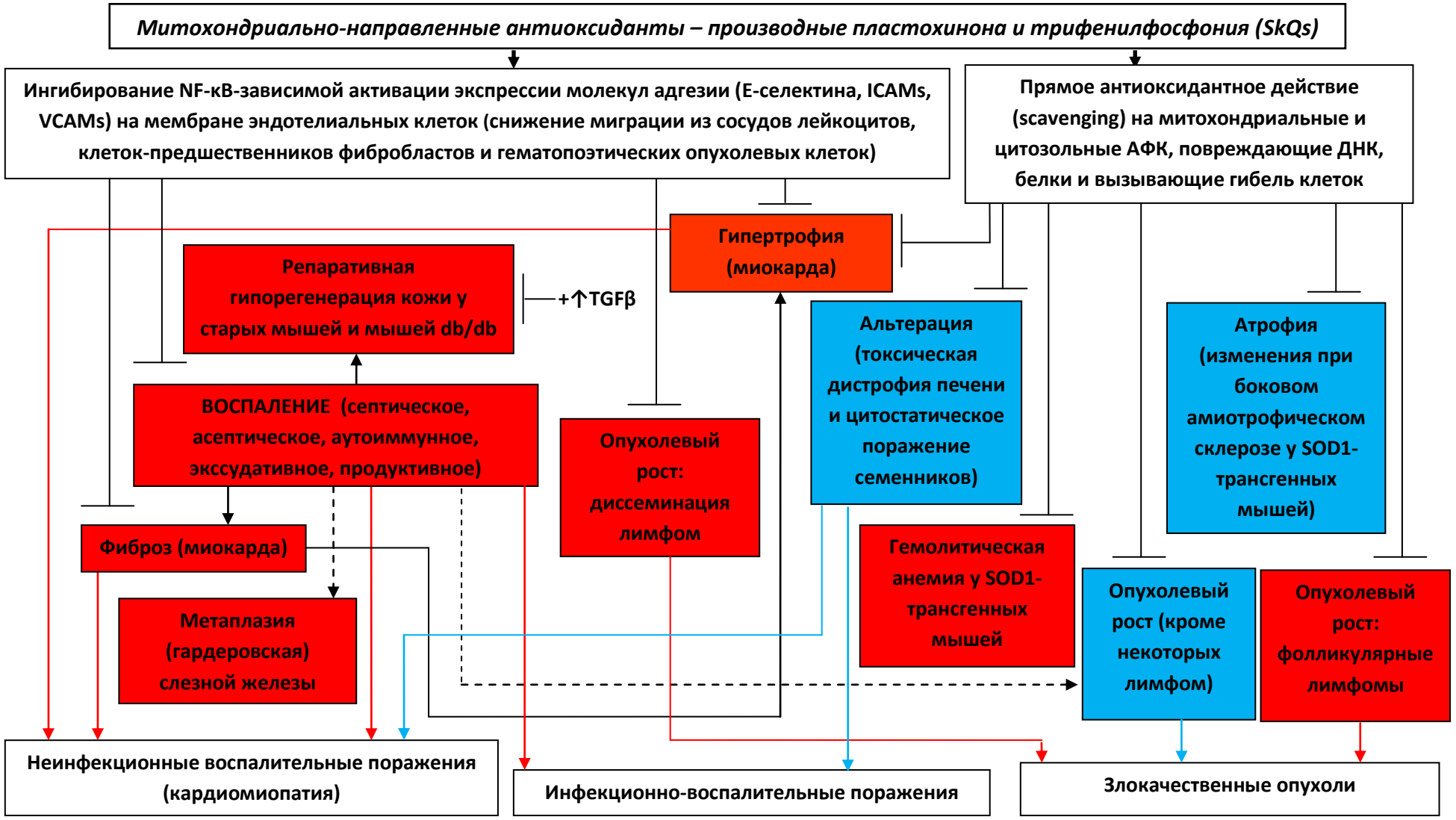



Рисунок 47 - Общая схема взаимосвязей между предполагаемыми молекулярными механизмами действия митохондриально-направленных антиоксидантов группы SkQ (верхний ряд белых клеток) и патологическими процессами, изученными в настоящей работе (цветные клетки), а также между общепатологическими процессами и тремя главными группами заболеваний, влияющими на продолжительность жизни лабораторных грызунов (нижний ряд белых клеток). Примечание - красным цветом выделены патологические процессы, в отношении которых выявлено позитивное действие изученных соединений, синим – процессы, в отношении которых достоверных положительных эффектов отмечено не было.

митохондриальный путь активации эндотелия TNFα, опосредованный АФК-зависимым фосфорилированием ингибиторной субъединицы NF-kB IkBa (рисунок 48).

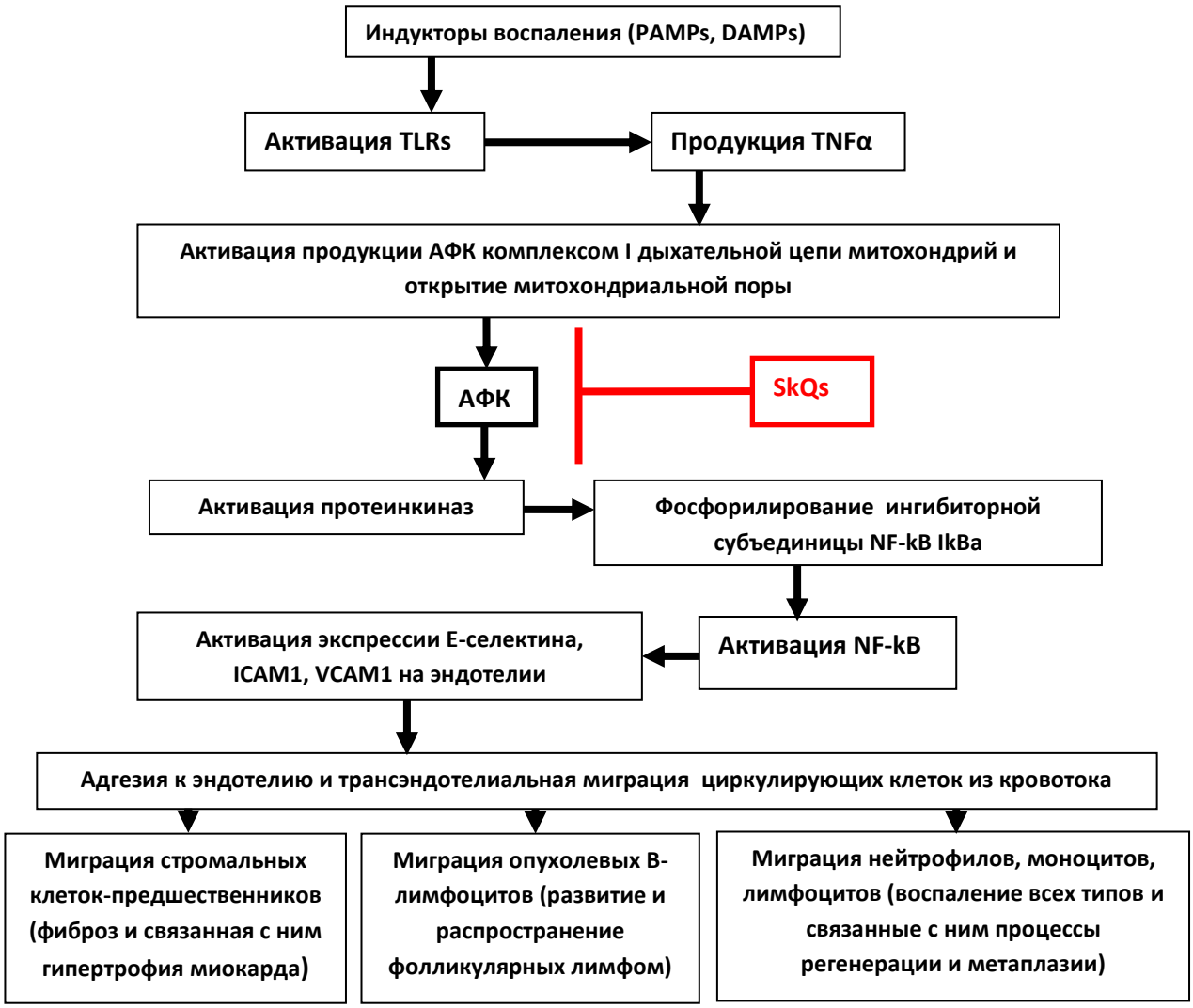



Рисунок 48 – Вероятный общий молекулярный механизм, опосредующий эффекты, оказываемые митохондриально-направленными соединениями пластохинона на изученные типовые общепатологические процессы.

Несомненно, что интенсивное развитие исследований митохондриально-направленных антиоксидантов, наблюдающееся в настоящее время, будет способствовать уточнению и более глубокому пониманию этих связей.

# ВЫВОДЫ

1. SkQ1 представляет собой перспективную субстанцию группы митохондриально-направленных антиоксидантов, оказывающую ряд позитивных эффектов на моделях различных патологических процессов и не вызывающую в испытанных терапевтических дозах патоморфологических изменений в органах и тканях.
2. В условиях испытания острой токсичности при внутривенном введении SkQ1 характеризуется параметром $LD_{50}$ = 10,4 мг/кг и в летальных дозах вызывает гибель животных от токсического отека легких без развития специфических изменений в других внутренних органах.
3. Пероральное введение SkQ1 самцам и самкам крыс Вистар в дозах 400 и 2000 нмоль/кг SkQ1 1 раз в сутки на протяжении 8 недель не вызывает никаких морфологических изменений во внутренних органах животных.
4. Длительное (пожизненное) пероральное введение малых доз SkQ1 увеличивает среднюю продолжительность жизни животных дикого типа (обыкновенных слепушонок и хомячков Кэмпбелла), обитающих в условиях конвенционального вивария, а также самцов (но не самок) мышей линий BALB/c и C57BL, содержавшихся в SPF-условиях.
5. Пожизненное пероральное введение SkQ1 в дозах от 1 до 1400 нмоль/кг/сутки в несколько раз снижает частоту развития спонтанной возрастной кардиомиопатии у мышей C57BL и у мышей-самцов (но не самок) BALB/c, и не оказывает значимого влияния на спектр спонтанной патологии у обыкновенной слепушонки и хомячка Кэмпбелла.
6. Пожизненное пероральное введение SkQ1 в дозах от 1 до 1400 нмоль/кг/сутки не оказывало канцерогенного или опухоль-промотирующего действия на спонтанные новообразования ни у самцов, ни у самок животных всех исследованных линий и видов.

7. SkQ1 не оказывает значимого влияния на развитие альтеративной патологии при экспериментальной токсической дистрофии печени и цитостатическом поражении семенников у мышей.
8. SkQ1 и SkQR1 существенно и достоверно уменьшают выраженность воспалительной инфильтрации клетками-эффекторами (гранулоцитами, макрофагами, лимфоцитами) тканей при всех исследованных формах воспалительной реакции (остром экссудативном бактериальном, остром асептическом и аутоиммунном продуктивном воспалении) на моделях острого панкреатита, острого пиелонефрита и ревматоидного артрита.
9. SkQ1 обладает способностью стимулировать репаративную регенерацию кожи у старых животных и у мышей с наследственными дефектами углеводного и липидного обмена (db/db), что проявляется в ускоренных образовании грануляционной ткани и закрытии раневой поверхности.
10. Пожизненное пероральное введение SkQ1 достоверно уменьшает развитие возрастных гипертрофии и фиброза миокарда у мышей BALB/c, что сопровождается также изменением профиля экспрессии генов в сердце, особенно тех сигнальных путей, которые ответственны за трансэндотелиальную миграцию циркулирующих клеток (ICAMs, VCAMs).
11. SkQ1 не влияет на гибель от атрофических изменений на модели бокового амиотрофического склероза у SOD1-трансгенных мышей B6SJL-Tg(SOD1-G93A)dl1Gur/J, однако, достоверно ингибирует у них развитие гемолитической анемии.
12. Длительное пероральное введение препарата SkQ1 предотвращает развитие возрастных метапластических изменений в слезной железе крыс Вистар.
13. SkQ1 не оказывает значимого тормозящего влияния на развитие спонтанных новообразований разных гистологических типов у всех исследованных животных (самцов и самок мышей BALB/c, C57BL, B6SJL-Tg(SOD1-G93A)dl1Gur/J, хомячков Кэмпбелла и обыкновенных слепушонок), за исключением фолликулярных лимфом (у самок BALB/c),

частота и диссеминация которых уменьшались, однако, без влияния на продолжительность жизни.

14. Основной механизм действия митохондриально-направленного соединения SkQ1 на исследованные общепатологические процессы заключается в его способности ингибировать провоспалительную активацию эндотелия и связанную с ней миграцию из кровотока различных клеток, осуществляющих патологические реакции (гранулоцитов, макрофагов, лимфоцитов, мезенхимальных клеток-предшественников, лимфоидных опухолевых клеток), а не в возможности предотвращать альтерацию, вызванную свободнорадикальными реакциями.

# СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

**1.** Автандилов, Г.Г. Медицинская морфометрия. Руководство. / Г.Г. Автандилов. – М.: Медицина, 1990. - 384 с.

**2.** Авцын, А. П. Ультраструктурные основы патологии клетки / А. П. Авцын, В. А. Шахламов. – М.: Медицина, 1979. - 320 с.,

**3.** Аникин, И. В. Действие производного пластохинола SkQ1 на канцерогенез в мягких тканях, индуцированный бенз(а)пиреном / И. В. Аникин, И. Г. Попович, М. Л. Тындык, М. А. Забежинский, М. Н. Юрова, В. П. Скулачев, В. Н. Анисимов // Вопросы онкологии. - 2013. – Т. 59, N 1. – С. 89-93.

**4.** Анисимов, В. Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения: В 2 т. — 2-е изд., перераб. и доп. / В. Н. Анисимов— СПб.: Наука. — 2008. — Т. 1. — 481 с.; — Т. 2. — 434 с.

**5.** Балаболкин, М. И. Применение антиоксидантов из группы флавоноидов в лечении ретинопатии при сахарном диабете / М. И. Балаболкин, М. С. Никишова, А. И. Волков //Проблемы эндокринологии. - 2003. - Т.49. - С.3-6.

**6.** Березовская, И. В. Классификация химических веществ по параметрам острой токсичности при парентеральных способах введения / И.В.Березовская // Химико-фарамцевтический журнал. – 2003. – Т. 37. – С.32-34.

**7.** Бойко, Ю. Г. Патологическая анатомии и патогенез острого панкреатита / Ю. Г. Бойко – Минск: Беларусь, 1970. – 152с.

**8.** Болдырев, А. А. Антиоксидантные системы в тканях мышей с ускоренным темпом старения (SAM) / А. А. Болдырев, М. О. Юнева, Е. В. Сорокина, Г. Г. Крамаренко, Т. Н. Федорова, Г. Г. Коновалова, В. З. Ланкин // Биохимия. - 2001. - Т. 66. - С. 1157-1163.

**9.** Владимиров, Ю. А. Свободные радикалы в живых системах / Ю. А. Владимиров, О. А. Азизова, А. И. Деев, А. В. Козлов, А. Н. Осипов, Д. И. Рощупкин // Итоги науки итехники ВИНИТИ АН СССР (серия Биофизика). – М., 1991. – Т. 29. – 252 с.

**10.** Владимиров, Ю. А. Свободные радикалы и антиоксиданты / Ю. А. Владимиров // Вестник РАМН. - 1998. - N 7. С.43-51

**11.** Гаврилов, Н. А. Биология продолжительности жизни / Н. А. Гаврилов, Н. С. Гаврилова. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Наука, 1991. – 280 с.

**12.** Давыдовский, И. В. Геронтология / И. В. Давыдовский. – М.: Медицина, 1966. – 300 с.

**13.** Дильман, В. М. Четыре модели медицины / В. М. Дильман. – М.: Медицина, 1987. – 262 с.

**14.** Дурнев, А. Б. Мутагенез, скрининг и фармакологическая профилактика / А. Б. Дурнев, С. Г. Середенин. - М.: Медицина, 1999. - 430 с.

**15.** Евдокимов, Н.Г. Популяционная экология обыкновенной слепушонки / Н.Г. Евдокимов. Екатеринбург: Издательство «Екатеринбург», 2001. – 144 с.

**16.** Зайд, И. С. К вопросу о сущности зернистой дистрофии миокардиальных клеток / И. С. Зайд, В. Б. Потапова // Архив патологии. – 1973. – Т. 35, N 7. – С. 28-33.

**17.** Зенков, Н. К. Окислительный стресс. Биохимические и патофизиологические аспекты / Н. К. Зенков, В. З. Лапкин, Е. Б. Меньщикова. - М.: Наука / Интерпериодика, 2001. - 343с.

**18.** Ильинских, Н. Н. Микроядерный анализ в оценке цитогенетической нестабильности / Н. Н. Ильинских, А. С. Ксенц, Е. Н. Ильинских, В. Н. Манских, С. А. Васильев, И. Н. Ильинских. – Томск: Издательство ТГПУ, 2011. – 312 с.

**19.** Канаян, А. С. Патологическая анатомия и патогенез экспериментального панкреатита / А. С. Канаян, Н. К. Пермяков, Г. П. Титова, К. П. Арабаджян // Архив патологии. – 1984. – Т. 46, N 4. – С. 64-71.

**20.** Кения, М. В. Роль низкомолекулярных антиоксидантов при окислительном стрессе / М. В. Кения, А. И. Лукаш, Е. П. Гуськов // Успехи современной биологии. – 1993. - Т.13. – С.456-470.

**21.** Комар, В. Е. Информационные макромолекулы при лучевом поражении клеток / В. Е. Комар, К. П. Хансон. - М.: Атомиздат, 1980. - 176 с.

**22.** Криволапов, Ю. А. Морфологическая диагностика лимфом / Ю. А. Криволапов, Е. Е. Леенман. – СПб: КОСТА, 2006. – 208 с.

**23.** Крыжановский, Г. Н. Дистрофический процесс (некоторые аспекты проблемы) / Г. Н. Крыжановский // Архив патологии. – 1974. – Т. 36, N 5. – С. 3-12.

**24.** Лакомкин, В.Л. Защитный эффект митохондриального антиоксиданта SkQ1 при ишемии и реперфузии сердца / В. Л. Лакомкин, В. И. Капелько // Кардиология. – 2009. – Т. 49, N 10. – С. 55—60.

**25.** Лакомкин, В.Л. Митохондриальный антиоксидант SkQ1 уменьшает интенсивность желудочковых аритмий, вызванных адреналином / В. Л. Лакомкин, А. А. Абрамов, В. И. Капелько // Кардиология. – 2011. –Т. 51, N 11. – С. 60-64.

**26.** Ланкин, В. З. Окислительный стресс при атеросклерозе и диабете / В. З. Ланкин, М. О. Лисина, Н. Е. Арзамасцева, Г. Г. Коновалова, Л. В. Недосугова, А. И. Каминный, А. К. Тихазе, Ф. Т. Агеев, В. В. Кухарчук, Ю. Н. Беленков // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2005. - Т.140. - С.48-51.

**27.** Лебедев, С. П. Алкогольный гиалин и промежуточные филаменты как маркеры алкогольного поражения внутренних органов / С. П. Лебедев, Л. Г. Виноградова, Г. К. Сухова // Архив патологии. – 1984. – Т. 46, N 11. – С. 52-58.

**28.** Лекции по общей патологической анатомии (общий курс) / Под ред. В. В. Серова, М. А. Пальцева. – М., 1996. – 280 с.

**29.** Лекции по патологической анатомии /под ред. М. А. Пальцева. – М., 2003. – 256 с.

**30.** Лилли, Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия / Р. Лилли. - Москва: Мир, 1969. – 645 с.

**31.** Логинов, А. С. Свободные радикалы в хронической патологии печени / А. С.Логинов, Б. Н.Матюшин // Архив патологии. – 1991. – Т. 53, N 6. – С. 75-79.

**32.** Манских, В. Н. Очерки эволюционной онкологии / В. Н. Манских - Томск: Издательство СибГМУ, 2004. – 172 с.

**33.** Манских, В. Н. Пути гибели клетки и их биологическое значение / В. Н. Манских // Цитология. – 2007. – Т. 49. – С. 909-915.

**34.** Мансуров, Х. Х. О природе и происхождении гепатоцеллюлярного гиалина – телец Маллори / Х. Х. Мансуров, Г. К. Мироджов // Архив патологии. – 1979. – Т. 41, N 12. – С. 65-70.

**35.** Маянский, Д. Н. Хроническое воспаление / Д. Н. Маянский – М.: Медицина, 1991. – 272с.

**36.** Мейл, Д. Иммунология / Д. Мейл, Д. Бростофф, Д. Рот, А. Ройт. – М.: Логосфера, 2007. – 556 с.

**37.** Меньшикова, Е. Б. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты / Е.Б. Меньшикова, В. З. Ланкин, Н. К. Зенков, И. А. Бондарь, Н. Ф. Круговых, В. А.Труфакин. - М.: Слово. - 2006. - 556 с.

**38.** Меркулов Г. А. Курс патогистологической техники / Г. А. Меркулов. – Ленинград: Медицина, 1969. – 424 с.

**39.** Молдавский, М. И. Филогенетический аспект дистрофий / М. И. Молдавский // Архив патологии. – 1989. – Т. 51, N 8. – С. 3-9.

**40.** Непомнящих Л. М. Морфогенез важнейших общепатологических процессов в сердце / Л. М. Непомнящих – Новосибирск: Наука, 1991. – 352с.

**41.** Николаев, Ю. М. Некоторые вопросы морфологии и патогенеза перитонитогенного панкреатита / Ю. М. Николаев // Архив патологии. – 1976. – Т. 38, N 7. – С. 38-44.

**42.** Пальцев, М. А. Патологическая анатомия: в 2 т. / М. А. Пальцев, Н. М. Аничков. – М.: Медицина, 2001. – Т.1. – 528 с.

**43.** Пауков, В.С. Патологическая анатомия: в 2 т. / В. С. Пауков. – М.: ГЭОТАР-Медия, 2015. – Т.1. – 720с.

**44.** Петренко, А. Ю. Влияние митохондриального антиоксиданта 10-(6-пластохинонил) децилтрифенилфосфония на интенсивность пероксидных процессов и дыхательную активность изолированной печени крыс после гипотермического хранения / А. Ю. Петренко, И. А. Сосимчик, Д. В. Черкашина,

О. А. Семенченко, В. П. Скулачев // Украинский биохимический журнал. – 2009. – Т. 81, N 6. – С. 43-48.

**45.** Писаренко, О. И. Добавление SkQ1 к рациону крыс уменьшает ишемическое и реперфузионное повреждение миокарда in vivo / О. И. Писаренко, Л. И. Серебрякова, О. В. Цкитишвили, И. М. Студнева // Кардиология. – 2009. – Т. 49, N 11. – С. 39—45.

**46.** Празднова, Е. В. Оценка биологической активности антиоксидантов на основе анализа экспрессии стресс-индуцибельных бактериальных оперонов: дисс. … канд. биол. наук 03.01.04, 03.02.07 /Празднова Евгения Валерьевна. - Ростов-на-Дону, 2013. – 173 с.

**47.** Проскуряков, С. Я. Иммунология апоптоза и некроза / С. Я. Проскуряков, В. Л., Габай, А. Г. Конопляников, И. А. Замулаева, А. И. Колесникова // Биохимия. – 2005. – Т.70. – С.1593-1605.

**48.** Проскуряков, С. Я. Некроз - активная, управляемая форма программируемой клеточной гибели / С. Я. Проскуряков, В. Л. Габай, А. Г. Конопляников // Биохимия. – 2005. – Т.67. – С.467-491.

**49.** Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под ред. А. Н. Миронова. — М.: Гриф и К, 2012. – 914 с.

**50.** Рябченко, Н. И. Радиация и ДНК / Н. И. Рябченко - М.: Атомиздат, 1979. – 467 с.

**51.** Сапожников А. Г. Гистологическая и микроскопическая техника: Руководство / А. Г. Сапожников, А. Е. Доросевич. - Смоленск: САУ, 2000. – 476 с.

**52.** Саркисов Д. С. Микроскопическая техника (руководство для врачей и лаборантов) / Д.С. Саркисов, Ю.Л. Перов. – Москва: Медицина, 1996. – 544 с.

**53.** Саркисов, Д. С. Общая патология человека / Д. С. Саркисов, М. А. Палъцев, Н. К. Хитров. – 2-е изд. – М.: Медицина, 1997. – 608 с.

**54.** Саркисов, Д. С. Очерки истории общей патологии / Д. С. Саркисов. – М.: Медицина, 1988. - 336с.

**55.** Северин, С. Е. Возможная роль карнитина в транспорте жирных кислот через мембраны митохондрий / С. Е. Северин, В. П. Скулачев, Л. С. Ягужинский // Биохимия. - 1970. – Т. 35 – С. 1250-1253.

**56.** Скулачев, В. П. Как отменить программу старения организма? / В. П. Скулачев // Российский химический журнал.— 2009.— Т. 53.— С. 125-140.

**57.** Скулачев, В. П. Энергетика биологических мембран / В. П. Скулачев. – М.: Наука, 1989. - 564 с.

**58.** Соколовский, В. В. Тиолдисульфидная система в реакции организма на факторы окружающей среды / В. В. Соколовский. - СПб.:Наука. - 2008. - С.23-27.

**59.** Струков, А. И. Новые аспекты учения о воспалении (иммунное воспаление) / А. И. Струков // Архив патологии. – 1981. – Т. 43, N 1. – С. 3-12.

**60.** Струков, А. И. Гранулематозное воспаление и гранулематозные болезни / А. И.Струков, О. Я. Кауфман – М.: Медицина, 1989. – 182с.

**61.** Струков, А. И. Патологическая анатомия / А. И. Струков, В. В. Серов – Москва: Медицина, 1995. – 696 с.

**62.** Терешина, Е. В. Старение, окислительный стресс и антиоксиданты / Е. В. Терешина. // Геронтология и гериатрия. – 2005. – N 5. - С.31-33.

**63.** Тимофеев-Ресовский, Н. В. Ведение в молекулярную радиобиологию (физико-химические основы) / Н. В. Тимофеев-Ресовский, А. В. Савич, М. И. Шаляпов. - М.: Медицина, 1980. - 320 с.

**64.** Фетисова, Е. К. Р-гликопротеин, обусловливающий множественную лекарственную устойчивость, препятствует проявлению антиапоптотического действия митохондриально направленного антиоксиданта SkQR1 / Е. К. Фетисова, А. В. Аветисян, Д. С. Изюмов, М. В. Коротецкая, В. Н. Ташлицкий, В. П. Скулачев, Б. В. Черняк // Цитология. – 2011. – Т. 53, N 6. – С. 488–497.

**65.** Фетисова, Е. К. Р-гликопротеин, обусловливающий множественную лекарственную устойчивость, препятствует проявлению антиапоптотического действия митохондриально направленного антиоксиданта SkQR1 / Е. К. Фетисова, А. В. Аветисян, Д. С. Изюмов, М. В. Коротецкая, В. Н. Ташлицкий, В. П. Скулачев, Б. В. Черняк // Цитология. – 2010. – Т.52, N 12. – С. 1031–1040.

**66.** Хабриев Р. У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Р. У. Хабриев. – М.: Медицина, 2005. − 832 с.

**67.** Хавинсон, В. Х. Свободнорадикальное окисление и старение / В. Х. Хавинсон, В. А. Баринов, А. В. Арутюнян, В. В. Малинин. - СПб.: Наука, 2003. — 327 с.

**68.** Часовских, Н. Ю. Молекулярные механизмы апоптоза при окислительном стрессе: дисс … канд. мед. наук: 14.00.16 / Часовских Наталья Юрьевна. – Томск, 2009. - 191 с.

**69.** Чугунов, А. В. Коррекция свободнорадикального окисления - патогенетический подход к лечению острого ишемического инсульта / А. В. Чугунов, П. Р. Камчатов, Н. А. Михайлова // Журнал невропатологии и психиатрии. – 2009. – N 10. – С. 65-68.

**70.** Шперлинг, И. Д. Состояние и перспективы учения о клеточных дистрофиях / И. Д. Шперлинг // Архив патологии. – 1974. – Т. 36, N 10. – С. 67-71.

**71.** Юрова, М. Н. Влияние митохондриального антиоксиданта SKQ1 на старение, продолжительность жизни и спонтанный канцерогенез у мышей трех линий / М. Н. Юрова, М. А. Забежинский, Т. С. Пискунова, М. Л. Тындык, И. Г. Попович, В. Н. Анисимов // Успехи геронтологии. - 2010. – Т. 23, N 3. - С. 430-441.

**72.** Adam-Vizi, V. Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species / V. Adam-Vizi, C. Chinopoulos // Trends Pharmacol. Sci. – 2006. – Vol. 27. – P. 639–645.

**73.** Adlam, V.J. Targeting an antioxidant to mitochondria decreases cardiac ischemia-reperfusion injury / V. J. Adlam, J. C. Harrison, C. M. Porteous, A. M. James, R. A. Smith, M. P. Murphy, I. A. Sammut // FASEB J. – 2005. – Vol. 19. – P. 1088-1095.

**74.** Agapova, L. S. Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 3. Inhibitory effect of SkQ1 on tumor development from p53-deficient cells / L. S. Agapova, B. V. Chernyak, L. V. Domnina, V. B. Dugina, A. Y. Efimenko, E. K. Fetisova, O. Y. Ivanova, N. I. Kalinina, N. V.

Khromova, B. P. Kopnin, P. B. Kopnin, M. V. Korotetskaya, M. R. Lichinitser, A. L. Lukashev, O. Y. Pletjushkina, E. N. Popova, M. V. Skulachev, G. S. Shagieva, E. V. Stepanova, E. V. Titova, V. A. Tkachuk, J. M. Vasiliev, V. P. Skulachev // Biochemistry (Mosc). – 2008. – Vol. 73. – P. 1300-1316.

**75.** Ames, B. N. Endogenous DNA damage as related to cancer and aging / B. N. Ames // Mutat. Res. — 1989. — Vol. 214. — P. 41-46.

**76.** Amstislavskaya, T. G. Effects of the mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 on sexually motivated behavior in male rats / T. G. Amstislavskaya, L. N. Maslova, D. V. Gladkikh, I. I. Belousova, N. A. Stefanova, N. G .Kolosova // Pharmacol. Biochem. Behav. – 2010. – Vol. 96. – P. 211-216.

**77.** Andreyev, A. Y. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species / A. Y. Andreyev, Y. E. Kushnareva, A. A. Starkov // Biochemistry (Mosc). – 2005. – Vol. 70. – P. 200–214.

**78.** Antonenko Y. N. Penetrating cations enhance uncoupling activity of anionic protonophores in mitochondria / Y. N. Antonenko, L. S. Khailova, D. A. Knorre, O. V. Markova, T. I. Rokitskaya, T. M. Ilyasova, I. I. Severina, E. A. Kotova, Y. E. Karavaeva, A. S. Prikhodko, F. F. Severin, V. P. Skulachev // PLoS One. – 2013. – Vol. 8. – E61902.

**79.** Antonenko, Y. N. Derivatives of rhodamine 19 as mild mitochondria-targeted cationic uncouplers / Y. N. Antonenko, A. V. Avetisyan, D. A. Cherepanov, D. A. Knorre, G. A. Korshunova, O. V. Markova, S. M. Ojovan, I. V. Perevoshchikova, A. V. Pustovidko, T. I. Rokitskaya, I. I. Severina, R. A. Simonyan, E. A. Smirnova, A. A. Sobko, N. V. Sumbatyan, F. F. Severin, V. P. Skulachev // J. Biol. Chem. – 2011. – Vol. 286. – P. 17831-17840.

**80.** Antonenko, Y. N. Effect of liposomes on energy-dependent uptake of the antioxidant SkQR1 by isolated mitochondria / Y. N. Antonenko, I. V. Perevoshchikova, T. I. Rokitskaya, R. A. Simonyan, V. V. Tashlitsky, V. P. Skulachev // J. Bioenerg. Biomembr. – 2012. – Vol. 44. – P. 453-460.

**81.** Antonenko, Y. N. Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 1. Cationic plastoquinone derivatives:

synthesis and *in vitro* studies / Y. N. Antonenko, A. V. Avetisyan, L. E. Bakeeva, B. V. Chernyak, V. A. Chertkov, L. V. Domnina, O. Y. Ivanova, D. S. Izyumov, L. S. Khailova, S. S. Klishin, G. A. Korshunova, K. G. Lyamzaev, M. S. Muntyan, O. K. Nepryakhina, A. A. Pashkovskaya, O. Y. Pletjushkina, A. V. Pustovidko, V. A. Roginsky, T. I. Rokitskaya, E. K. Ruuge, V. B. Saprunova, I. I. Severina, R. A. Simonyan, I. V. Skulachev, M. V. Skulachev, N. V. Sumbatyan, I. V. Sviryaeva, V. N. Tashlitsky, J. M. Vassiliev, M. Y. Vyssokikh, L. S. Yaguzhinsky, A. A. Zamyatnin Jr., V. P. Skulachev // Biochemistry (Mosc). – 2008. – Vol. 73. – P. 1273-1287.

**82.** Antonenko, Y. N. Protective effects of mitochondria-targeted antioxidant SkQ in aqueous and lipid membrane environments / Y. N. Antonenko, V. A. Roginsky, A. A. Pashkovskaya, T. I. Rokitskaya, E. A. Kotova, A. A. Zaspa, B. V. Chernyak, V. P. Skulachev // J. Membr. Biol. – 2008. – Vol. 222. – P. 141-149.

**83.** Armstrong, J.S. Mitochondria-directed therapeutics / J.S. Armstrong // Antioxid. Redox Signal. – 2008. – Vol. 10. – P. 575-578.

**84.** Aruoma, O. I. Oxygen free radicals and human diseases / O. I. Aruoma, H. Kaur, B. Halliwell //J. R. Soc. Health. – 1991. – Vol. 111. – P. 172-177.

**85.** Asin-Cayuela, J. Fine-tuning the hydrophobicity of a mitochondria-targeted antioxidant / J. Asin-Cayuela, A. R. Manas, A. M. James, R. A. Smith, M. P. Murphy // FEBS Lett. – 2004. – Vol. 571. – P. 9-16.

**86.** Babior, B. M. NADPH oxidase / B. M. Babior // Curr Opin Immunol. - 2004. - Vol.16. - P. 42-47.

**87.** Background Lesions in Laboratory Animals. A Color Atlas. – Saunders Ltd, 2012. – 256 p.

**88.** Bai, X. C. Reactive oxygen species stimulates receptor activator of NF-kappaB ligand expression in osteoblast / X. C. Bai, D. Lu, A. L. Liu, Z. M. Zhang, X. M. Li, Z. P. Zou, W. S. Zeng, B. L. Cheng, S. Q. Luo //J. Biol. Chem. – 2005. – Vol. 280. – P. 17497-17506.

**89.** Bakeeva, L. E. Conversion of biomembrane-produced energy into electric form. II. Intact mitochondria / L. E. Bakeeva, L. L. Grinius, A. A. Jasaitis, V. V. Kuliene, D.

O. Levitsky, E. A. Liberman, I. I. Severina, V. P. Skulachev // Biochim. Biophys. Acta. – 1970. – Vol. 216. – P. 12-21.

**90.** Bakeeva, L. E. Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 2. Treatment of some ROS- and age-related diseases (heart arrhythmia, heart infarctions, kidney ischemia, and stroke) / L. E. Bakeeva, I. V. Barskov, M. V. Egorov, N. K. Isaev, V. I. Kapelko, A. V. Kazachenko, V. I. Kirpatovsky, S. V. Kozlovsky, V. L. Lakomkin, S. B. Levina, O. I. Pisarenko, E. Y. Plotnikov, V. B. Saprunova, L. I. Serebryakova, M. V. Skulachev, E. V. Stelmashook, I. M. Studneva, O. V. Tskitishvili, A. K. Vasilyeva, I. V. Victorov, D. B. Zorov, V. P. Skulachev // Biochemistry (Mosc). – 2008. –Vol. 73. – P. 1288-1299.

**91.** Balaban, R.S. Mitochondria, Oxidants, and Aging / R. S. Balaban, S. Nemoto, T. Finkel // Cell. – 2005. – Vol. 120. – P. 483-495.

**92.** Barhoumi, R. Manganese potentiates lipopolysaccharide-induced expression of NOS2 in C6 glioma cells through mitochondrial-dependent activation of nuclear factor kappaB / R. Barhoumi, J. Faske, X. Liu, R. B. Tjalkens // Brain Res. Mol. Brain Res. – 2004. – Vol. 122. – P. 167-179.

**93.** Barja, G. Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity / G. Barja // J. Bioenerg. Biomembr. – 1999. – Vol. 31. – P. 347–366.

**94.** Barja, G. Oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life span in the heart and brain of mammals / G. Barja, A. Herrero // FASEB J. - 2000. - Vol.14. - P.312-318.

**95.** Basova, L. V. Cardiolipin switch in mitochondria: shutting off the reduction of cytochrome c and turning on the peroxidase activity / L. V. Basova, I. V. Kurnikov, L. Wang, V. B. Ritov , N. A. Belikova, I. I. Vlasova, A. A. Pacheco, D. E. Winnica, J. Peterson, H. Bayir, D. H. Waldeck, V. E. Kagan // Biochemistry. – 2007. – Vol. 46. – P. 3423-3434.

**96.** Bellini, O. Histological and histochemical studies of myocardial lesions in BALBc/Cr mice / O. Bellini, A. M. Casazza, A. di Marco // Lab. Anim. Sci. – 1976. – Vol.26. – P.329-333.

**97.** Bernuzzi, F. Reactive oxygen species-independent apoptosis in doxorubicin-treated H9c2 cardiomyocytes: role for heme oxygenase-1 down-modulation / F. Bernuzzi, S. Recalcati, A. Alberghini, G. Cairo // Chem. Biol. Interact. – 2009. – Vol. 177. – P. 12-20.

**98.** Blokhina, O. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review / O. Blokhina, E. Virolainen, K. Fagerstedt // Ann.Bot. Lond. - 2003. - Spec. N. - P.179-194.

**99.** Boveris, A. The cellular production of hydrogen peroxide / A. Boveris, N. Oshino, B. Chance // Biochem. J. – 1972. – Vol.128. – P. 617-630.

**100.** Boveris, A. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: general properties and effect of hyperbaric oxygen / A. Boveris, B. Chance // Biochem. J. – 1973. – Vol. 134. – P. 707–716.

**101.** Brandes, K. Comparative morphologic and immunohistochemical investigation of spontaneously occurring thymomas in a colony of European hamsters / K. Brandes, F. Fend, S. Monecke, J. P. Teifke, W. Breuer, W. Hermanns //Vet. Pathol. - 2004. - Vol. 41. - P.346-352.

**102.** Brayton, C. Spontaneous diseases in commonly used strains / C. Brayton // The Mouse in Biomedical Research. - Elsevier: ACLAM series, 2006. - P. 623-718.

**103.** Bregman, C.L. Recommended tissue list for histopathologic examination in repeat-dose toxicity and carcinogenicity studies: a proposal of the society of toxicologic pathology (STP) / C. L. Bregman, R. R. Adler, D.G. Morton // Toxicol. Pathol. – 2003. – Vol.31. – P.252–253.

**104.** Burns, R. J. Synthesis and characterization of thiobutyltriphenylphosphonium bromide, a novel thiol reagent targeted to the mitochondrial matrix / Burns R. J., Smith R. A., Murphy M. P. // Arch. Biochem. Biophys. – 1995. – Vol. 322. – P. 60-68.

**105.** Cadenas, E. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging / E. Cadenas, K. J. Davies // Free Rad. Biol. Med. - 2000. - Vol. 29. - P. 222-230.

**106.** Canter, P. H. The antioxidant vitamins A, C, E and selenium in the treatment of arthritis: a systematic review of randomized clinical trials / P. H. Canter, B. Wider, E. Ernst, // Rheumatol. – 2007. – Vol. 46. – P. 1223-1233.

**107.** Carocho, M. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives / M. Carocho, I. C. Ferreira // Food Chem. Toxicol. – 2013. – Vol. 51. – P. 15–25.

**108.** Chacko, B.K. Mitochondria-targeted ubiquinone (MitoQ) decreases ethanol-dependent micro and macro hepatosteatosis / B. K. Chacko, A. Srivastava, M. S. Johnson, G. A. Benavides, M. J. Chang, Y. Ye, N. Jhala, M. P. Murphy, B. Kalyanaraman, V. M. Darley-Usmar // Hepatology. – 2011. – Vol. 54. – P. 153-163.

**109.** Chacko, B.K. Prevention of diabetic nephropathy in Ins2(+/)$^{-}$(AkitaJ) mice by the mitochondria-targeted therapy MitoQ // B. K. Chacko, C. Reily, A. Srivastava, M. S. Johnson, Y. Ye, E. Ulasova, A. Agarwal, K. R. Zinn, M. P. Murphy, B. Kalyanaraman, V. Darley-Usmar // Biochem. J. – 2010. – Vol. 432. – P. 9-19.

**110.** Chance, B. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs / B. Chance, H. Sies, A. Boveris // Physiol. Rev. – 1979. – Vol. 59. – P. 527–605.

**111.** Chaturvedi, R. K. Mitochondrial approaches for neuroprotection / R. K. Chaturvedi, M. F. Beal // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2008. – Vol. 1147. – P. 395-412.

**112.** Cherkashina, D. V. Mitochondria-targeted plastoquinone derivative SkQ(1) decreases ischemia-reperfusion injury during liver hypothermic storage for transplantation / D. V. Cherkashina, I. A. Sosimchik, O. A. Semenchenko, V. V. Volina, A. Y. Petrenko // Biochemistry (Mosc). – 2011. – Vol. 76. – P. 1022-1029.

**113.** Chernyak, B. V. Novel mitochondria-targeted compounds composed of natural constituents: conjugates of plant alkaloids berberine and palmatine with plastoquinone / B. V. Chernyak, Y. N. Antonenko, E. R. Galimov, L. V. Domnina, V. B. Dugina, R. A. Zvyagilskaya, O. Y. Ivanova, D. S. Izyumov, K. G. Lyamzaev, A. V. Pustovidko, T. I. Rokitskaya, A. G. Rogov, I. I. Severina, R. A. Simonyan, M. V. Skulachev, V. N. Tashlitsky, E. V. Titova, T. A. Trendeleva, G. S. Shagieva // Biochemistry (Mosc). – 2012. – Vol. 77. – P. 983-995.

**114.** Chernyak, B. V. Novel penetrating cations for targeting mitochondria / B. V. Chernyak, Y. N. Antonenko, L. V. Domnina, O. Y. Ivanova, K. G. Lyamzaev, A. V.

Pustovidko, T. I. Rokitskaya, I. I. Severina, R. A. Simonyan, T. A. Trendeleva, R. A. Zvyagilskaya // Curr. Pharm. Des. – 2013. – Vol. 19. – P. 2795-2806.

**115.** Chernyak, B. V. Production of reactive oxygen species in mitochondria of HeLa cells under oxidative stress / B. V. Chernyak, D. S. Izyumov, K. G. Lyamzaev, A. A. Pashkovskaya, O. Y. Pletjushkina, Y. N. Antonenko, D. V. Sakharov, K. W.Wirtz, V. P. Skulachev // Biochim. Biophys. Acta. – 2006. –Vol. 1757. – P. 525-534.

**116.** Chistyakov, V. A. Antimutagenic activity of mitochondria-targeted plastoquinone derivative / V. A. Chistyakov, M. A. Sazykina, A. A. Alexandrova, N. I. Belichenko, E. V. Mashkina, L. V. Gutnikova, P. V. Zolotukhin, T. P. Shkurat // Biochemistry (Mosc). – 2010. – Vol. 75. – P. 269-273.

**117.** Chistyakov, V. A. Effect of plastoquinone derivative 10-(6'-plastoquinonyl) decyltriphenylphosphonium (SkQ1) on estrous cycle and 17β-estradiol level in rats / V. A. Chistyakov, S. V. Dem'yanenko, A. A. Alexandrova, L. V. Gutnikova, V. N. Prokof'ev, O. N. Kosheleva // Biochemistry (Mosc). – 2012. – Vol. 77. – P.1382-1386.

**118.** Chistyakov, V. A. Effect of plastoquinone derivative 10-(6'-plastoquinonyl)decyltriphenylphosphonium (SkQ1) on contents of steroid hormones and NO level in rats / V. A. Chistyakov, V. A. Serezhenkov, A. A. Alexandrova, N. P. Milyutina, V. N. Prokof'ev, E. V. Mashkina, L. V. Gutnikova, S. V. Dem'yanenko // Biochemistry (Mosc). – 2010. – Vol. 75. – P. 1383-1387.

**119.** Chistyakov, V. A. Superoxide scavenging activity of plastoquinone derivative 10-(6'-plastoquinonyl)decyltriphenylphosphonium (SkQ1) / V. A. Chistyakov, E. V. Prazdnova, L. V. Gutnikova, M. A. Sazykina, I. S. Sazykin // Biochemistry (Mosc). – 2012. – Vol. 77. – P. 776-778.

**120.** Choi, S. Y. Cardiolipin deficiency releases cytochrome c from the inner mitochondrial membrane and accelerates stimuli-elicited apoptosis / S. Y. Choi, F. Gonzalvez, G. M. Jenkins, C. Slomianny, D. Chretien, D. Arnoult, P. X. Petit, M. A. Frohman // Cell Death Differ. – 2007. – Vol.14. – P. 597-606.

**121.** Cieslik, K. A. Immune-inflammatory dysregulation modulates the incidence of progressive fibrosis and diastolic stiffness in the aging heart / K. A. Cieslik, G. E.

Taffet, S. Carlson, J. Hermosillo, J. Trial, M. L. Entman // J. Mol. Cell Cardiol. - 2011. - Vol. 50. - P. 248-256.

**122.** Classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of hematopoietic and lymphoid tissues. – Lion: IACR Press, 2001. – 351 p.

**123.** Cochemé, H. M. Mitochondrial targeting of quinones: therapeutic implications / H. M. Cochemé, G. F. Kelso, A. M. James, M. F. Ross, J. Trnka, T. Mahendiran, J. Asin-Cayuela, F. H. Blaikie, A. R. Manas, C. M. Porteous, V. J. Adlam, R. A. Smith, M. P. Murphy // Mitochondrion. – 2007. – Vol. 7(Suppl). – P. 94-102.

**124.** Cortés-Rojo, C. Importance of oxidative damage on the electron transport chain for the rational use of mitochondria-targeted antioxidants / C. Cortés-Rojo, A. R. Rodríguez-Orozco // Mini Rev. Med. Chem. – 2011. – Vol. 11. – P. 625-632.

**125.** Cruz, C. M. ATP activates an ros-dependent oxidative stress response and secretion of pro-inflammatory cytokines in macrophages / C. M. Cruz, A. Rinna, H. J. Forman, A. L. Ventura, P. M. Persechini, D. M. Ojcius // J. Biol. Chem. – 2006. – Vol. 282. – P. 2871-2879.

**126.** Cui, H. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging / H. Cui, Y. Kong, H. Zhang // J. Signal. Transduct. – 2012. – P. 646354.

**127.** Cuperus, R. Fenretinide induces mitochondrial ROS and inhibits the mitochondrial respiratory chain in neuroblastoma / R. Cuperus, R. Leen, G. A. Tytgat, H. N. Caron, A. B. van Kuilenburg // Cell Mol. Life Sci. – 2010. – Vol. 67. – P. 807-816.

**128.** Dai, D.F. Mitochondrial oxidative stress in aging and healthspan / D. F. Dai, Y. A. Chiao, D. J. Marcinek, H. H. Szeto, P. S. Rabinovitch // Longev. Healthspan. 2014. – Vol. 3. – P. 6.

**129.** Dashdorj, A. Mitochondria-targeted antioxidant MitoQ ameliorates experimental mouse colitis by suppressing NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory cytokines / Dashdorj A., Jyothi K.R., Lim S., Jo A., Nguyen M.N., Ha J., Yoon K.S., Kim H.J., Park J.H., Murphy M.P., Kim S.S. // BMC Med. – 2013. – Vol. 11. – P. 178.

**130.** Davidson, S.M. Slow calcium waves and redox changes precede mitochondrial permeability transition pore opening in the intact heart during hypoxia and

reoxygenation / S.M. Davidson, D.M. Yellon, M.P. Murphy, M.R. Duchen // Cardiovasc. Res. – 2012. – Vol. 93. – P. 445-453.

**131.** Davies, A.L. Neurological deficits caused by tissue hypoxia in neuroinflammatory disease / A. L. Davies, R. A. Desai, P. S. Bloomfield, P. R. McIntosh, K. J. Chapple, C. Linington, R. Fairless, R. Diem, M. Kasti, M. P. Murphy, K. J. Smith // Ann. Neurol. – 2013. – Vol. 74. – P. 815-825.

**132.** De Bandt, M. Vitamin E uncouples joint destruction and clinical inflammation in a transgenic mouse model of rheumatoid arthritis / M. De Bandt, M. Grossin, F. Driss, J. Pincemail, C. Babin-Chevaye, C. Pasquier // Arthrit. Rheumat. – 2002. – Vol. 46. – P. 522-532.

**133.** Dedon, P. C. Indirect mutagenesis by oxidative DNA damage: formation of the pyrimidopurinone adduct of deoxyguanosine by base propenal / P. C. Dedon, J. P. Plastaras, C. A. Rouzer, L. J. Marnett // Proc.Nat. Acad. Sci. USA. – 1998. – Vol.95. – P.11113-11116.

**134.** Demianenko, I. A. Novel mitochondria-targeted antioxidants, "Skulachev-ion" derivatives, accelerate dermal wound healing in animals / I. A. Demianenko, T. V. Vasilieva, L. V. Domnina, V. B. Dugina, M. V. Egorov, O. Y. Ivanova, O. P. Ilinskaya, O. Y. Pletjushkina, E. N. Popova, I. Y. Sakharov, A. V. Fedorov, B. V. Chernyak // Biochemistry (Mosc). – 2010. – Vol. 75. – P. 274-280.

**135.** Despande, A. Silica-induced generation of extracellular factor(s) increases reactive oxygen species in human bronchial epithelial cells / A. Despande, P. K. Narayanan, B. L. Lehnert // Toxicol. Science. – 2002. – Vol. 67. – P. 275-283.

**136.** Dizdaroglu, M. Formation of an 8-hydroxyguanine moiety in deoxyribonucleic acid on gamma-irradiation in aqueous solution / M. Dizdaroglu // Biochemistry. - 1985. - V.24. – P.4476-4481.

**137.** Doughan, A. K. Mitochondrial redox cycling of mitoquinone leads to superoxide production and cellular apoptosis / A. K. Doughan, S. I. Dikalov // Antioxid. Redox Signal. – 2007. – Vol. 9. – P. 1825-1836.

**138.** Draghici, S. A systems biology approach for pathway level analysis / Draghici S., Khatri P., Tarca A.L., Amin K., Done A., Voichita C., Georgescu C., Romero R. // Genome Res. - 2007. - Vol. 17. - P. 1537-1545.

**139.** Draper, C. E. Age-related changes in morphology and secretory responses of male rat lacrimal gland / C. E. Draper, E. Adeghate, P. A. Lawrence, D. J. Pallot, A. Garner, J. Singh // J. Auton. Nerv. Syst. – 1998. – Vol. 69. – P. 173-183.

**140.** Droge, W. Free radicals in the physiological control of cell function / W. Droge // Physiol. Rev. – 2002. – Vol. 82. – P. 47–95.

**141.** Duveau, D.Y. Synthesis and characterization of mitoQ and idebenone analogues as mediators of oxygen consumption in mitochondria / D. Y. Duveau, P. M. Arce, R. A. Schoenfeld, N. Raghav, G. A. Cortopassi, S. M. Hecht // Bioorg. Med. Chem. – 2010. – Vol. 18. – P. 6429-6441.

**142.** Elmali, N. Effects of resveratrol in inflammatory arthritis / N. Elmali, O. Baysal, A. Harma, I. Esenkaya, B. Mizrak // Inflammation. – 2007. – Vol.30. – P. 1-6.

**143.** Elmore, S. A. Apoptosis: a review of programmed cell death / S. Elmore // Toxicol. Pathol. – 2007. – Vol.35. – P. 495-516.

**144.** Eremeyev, S. A. Molecular mechanisms of transformation of SkQ mitotropic quinones and the search for new approaches to creation of selective free radical traps / S. A. Eremeyev, V. I. Kargin, K. A. Motovilov, V. N. Tashlitsky, V. Y. Markov, G. A. Korshunova, N. V. Sumbatyan, M. Y. Vyssokikh, L. S. Yaguzhinsky // Biochemistry (Mosc). – 2009. – Vol. 74. – P. 1114-1124.

**145.** Faccini, J. M. Mouse Histopathology: A glossary for use in toxicity and carcinogenicity studies / J. M. Faccini, D. P. Abbot, J. J. Paulus. – Amsterdam: Elsevier, 1990. – 238 p.

**146.** Farinati, F. Oxidative DNA damage accumulation in gastric carcinogenesis / F. Farinati //Gut. - 1998. - Vol.42. - P. 351-356.

**147.** Fay, A. J. SK channels mediate NADPH oxidase-independent reactive oxygen species production and apoptosis in granulocytes / A. J. Fay, X. Qian, Y. N. Jan, L. Y. Jan // PNAS. – 2006. – Vol. 103. – P. 17548-17553.

**148.** Feillet-Coudray, C. The mitochondrial-targeted antioxidant MitoQ ameliorates metabolic syndrome features in obesogenic diet-fed rats better than Apocynin or Allopurinol / C. Feillet-Coudray, G. Fouret, R. Ebabe Elle, J. Rieusset, B. Bonafos, B.Chabi, D.Crouzier, K.Zarkovic, N. Zarkovic, J.Ramos, E.Badia, M.P.Murphy, J.P.Cristol, C.Coudray // Free Radic. Res. – 2014. – N – P.1-46.

**149.** Fernandez, D. Signaling abnormalities in systemic lupus erythematosus as potential drug targets / D. Fernandez, E. Bonilla, P. Phillips, A. Perl // Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets. – 2006. – Vol. 6. – P. 305-311.

**150.** Fetisova, E. K. Mitochondria-targeted antioxidant SkQR1 selectively protects MDR (Pgp 170)-negative cells against oxidative stress / E. K.Fetisova, A. V. Avetisyan, D. S. Izyumov, M. V. Korotetskaya, B. V. Chernyak, V. P.Skulachev // FEBS Lett. – 2010. – Vol. 584. – P. 562-566.

**151.** Fialkow, L. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function / L. Fialkow, Y. Wang, G. P.Downey // Free Radic. Biol. Med. – 2007. – Vol. 42. – P. 153-164.

**152.** Fiette, L. Necropsy and sampling procedures in rodents / L. Fiette, M. Slaoui // Methods Mol. Biol. – 2011. – Vol.691. – P. 39-67.

**153.** Fink, B. D. Mitochondrial targeted coenzyme Q, superoxide, and fuel selectivity in endothelial cells / B.D. Fink, Y. O'Malley, B. L. Dake, N. C. Ross, T. E. Prisinzano, W. I. Sivitz // PLoS One. – 2009. – Vol. 4. – E4250.

**154.** Fink, B.D. Bioenergetic effects of mitochondrial-targeted coenzyme Q analogs in endothelial cells / B. D. Fink, J. A. Herlein, M. A.Yorek, A. M. Fenner, R. J. Kerns, W. I. Sivitz // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2012. – Vol. 342. – P. 709-719.

**155.** Finkel, T. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing / T. Finkel, N. Holbrook // Nature. - 2000. - Vol. 408. - P 239-247.

**156.** Fisher, G.J. Collagen fragmentation promotes oxidative stress and elevates matrix metalloproteinase-1 in fibroblasts in aged human skin / G. J. Fisher, T. Quan, T. Purohit, Y. Shao, M. K. Cho, T. He, J. Varani, S. Kang, J. J. Voorhees // Am. J. Pathol. – 2009. – Vol. 174. – P. 101-114.

**157.** Flaherty J. T. Reperfusion injury / J. T. Flaherty, M. L. Weisfeldt // Free Radic. Biol. Med. – 1988. – Vol. 5. – P. 409-419.

**158.** Forman, H. J. Role of superoxide radical in mitochondrial dehydrogenase reactions // H. J. Forman, J. A. Kennedy // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1974. – Vol. 60. – P.1044–1050.

**159.** Francischetti, I. M. Tempol, an intracellular antioxidant, inhibits tissue factor expression, attenuates dendritic cell function, and is partially protective in a murine model of cerebral malaria // I. M. Francischetti, E. Gordon, B. Bizzarro, N. Gera, B. B. Andrade, F. Oliveira, D. Ma, T. C. Assumpção, J. M. Ribeiro, M. Pena, C. F. Qi, A. Diouf, S. E. Moretz, C. A. Long, H. C. Ackerman, S. K. Pierce, A. Sá-Nunes, M. Waisberg // PLoS One. – 2014. – Vol. 9. – E.87140.

**160.** Frith, C. H. Non-proliferative lesions of the hematopoetic system in rats / C. H. Frith, J. M. Ward, M. Chandra, P. Losco // Guides for Toxicologic Pathology. - STP/ARP/AFIP, Washington DC. - 2000. - 21 c.

**161.** Galeotti, T. Protective role of MnSOD and redox regulation of neuronal cell survival / T. Galeotti, G. Pani, C. Capone, B. Bedogni, S. Borrello, C. Mancuso, M. L. // Eboli Biomed. Pharmacother. – 2005. – Vol.59. – P. 197-203.

**162.** Galimov, E. R. Prooxidant properties of p66shc are mediated by mitochondria in human cells / E. R. Galimov, B. V. Chernyak, A. S. Sidorenko, A. V. Tereshkova, P. M. Chumakov // PLoS One. – 2014. – Vol. 9. – E86521.

**163.** Galkin, I. I. Mitochondria-targeted antioxidants prevent TNFα-induced endothelial cell damage / I. I. Galkin, O. Y. Pletjushkina, R. A. Zinovkin, V. V. Zakharova, I. S. Birjukov, B. V. Chernyak, E. N. Popova // Biochemistry (Mosc). – 2014. – Vol. 79. – Vol. 124-130.

**164.** Galluzzi, L. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012 / L. Galluzzi, I. Vitale, J. M. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, T. M. Dawson, V. L. Dawson, W. S. El-Deiry, S. Fulda, E. Gottlieb, D. R. Green, M. O. Hengartner, O. Kepp, R. A. Knight, S. Kumar, S. A. Lipton, X. Lu, F. Madeo, W. Malorni, P. Mehlen, G. Nuñez, M. E. Peter, M. Piacentini, D. C. Rubinsztein, Y. Shi, H. U. Simon, P.

Vandenabeele, E. White, J. Yuan, B. Zhivotovsky, G. Melino, G. Kroemer // Cell Death. Differ. – 2012. –Vol. 19. – P. 107-120.

**165.** Giordano, S. Autophagy as an essential cellular antioxidant pathway in neurodegenerative disease / S. Giordano, V. Darley-Usmar, J. Zhang // Redox Biol. – 2013. – Vol.2. – P. 82-90.

**166.** Gioscia-Ryan, R. A. Mitochondria-targeted antioxidant (MitoQ) ameliorates age-related arterial endothelial dysfunction in mice / R. A. Gioscia-Ryan, T. J. LaRocca, A. L.Sindler, M. C. Zigler, M. P. Murphy, D. R. Seals // J. Physiol. – 2014. - N 592. – P.2549-2561.

**167.** Gladden, J.D. Novel insights into interactions between mitochondria and xanthine oxidase in acute cardiac volume overload / J. D. Gladden, B. R. Zelickson, C. C. Wei, E. Ulasova, J. Zheng, M. I. Ahmed, Y. Chen, M. Bamman, S. Ballinger, V. Darley-Usmar, L. J. Dell'Italia // Free Radic. Biol. Med. – 2011. – Vol. 51. – P. 1975-1984.

**168.** Goljan, E. Patological Notes: General pathology / E. Goljan. - Lippincott Williams&Wilkins, 2001 – 233 p.

**169.** Gonzalez, Y. Atg7- and Keap1-dependent autophagy protects breast cancer cell lines against mitoquinone-induced oxidative stress / Y. Gonzalez, B. Aryal, L. Chehab, V. A. Rao // Oncotarget. – 2014. – Vol. 5. – P.1526-1537.

**170.** Graham, D. Mitochondria-targeted antioxidant MitoQ10 improves endothelial function and attenuates cardiac hypertrophy / D. Graham, N. N. Huynh, C. A. Hamilton, E. Beattie, R. A. Smith, H. M. Cochemé, M. P. Murphy, A. F. Dominiczak // Hypertension. – 2009. – Vol. 54. – P. 322-328.

**171.** Greaves P. Histopathology of preclinical toxicity studies / P. Greaves - 3rd edition. – Elsevier, 2007. – 960 p.

**172.** Green, D. The electromechanochemical model for energy coupling in mitochondria / D. Green // Biochim. Biophys. Acta. – 1974. – Vol. 346. – P. 27-78.

**173.** Griffiths, H. R. ROS as signalling molecules in T cells-evidence for abnormal redox signalling in the autoimmune disease, rheumatoid arthritis / Griffiths H. R. // Redox Rep. – 2005. – Vol. 10. – P. 273-280.

**174.** Grinius, L. L. Conversion of biomembrane-produced energy into electric form. I. Submitochondrial particles / L. L. Grinius, A. A. Jasaitis, Yu. L. Kadziauskas, E. A. Liberman, V. P. Skulachev, V. P. Topali, L. M. Tsofina, M. A. Vladimirova // Biochim. Biophys. Acta. – 1970. – Vol. 216. – P. 1-12.

**175.** Gruber, J. Mitochondria-targeted antioxidants and metabolic modulators as pharmacological interventions to slow ageing / Gruber J., Fong S., Chen C.B., Yoong S., Pastorin G., Schaffer S., Cheah I., Halliwell B. // Biotechnol. Adv. – 2013. – Vol. 31. – P. 563-592.

**176.** Grune, T. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells / T. Grune, T. Reinheckel, K. J. Davies // The FASEB J. - 1997. - Vol. 11. - P. 526- 534.

**177.** Guetens, G. Oxidative DNA damage: biological significance and methods of analysis / G. Guetens, G. De Boeck, M. Highley, A. T. van Oosterom, E. A. de Bruijn // Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. - 2002. - N 4-5. - P.331-457.

**178.** Gupta, R. An ascending non-obstructive model for chronic pyelonephritis in BALB/c mice / R. Gupta, N.K. Ganguly, V. Ahuja, K. Joshi, S. Sharma // J. Med. Microbiol. – 1995. – Vol.43. – P.33–36.

**179.** Gupta, R. K. Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: a review / R. K. Gupta, A. K. Patel, N. Shah, A. K. Chaudhary, U. K. Jha, U. C. Yadav, P. K. Gupta, U. Pakuwal // Asian Pac. J. Cancer Prev. – 2014. – Vol.15. – P. 4405-4409.

**180.** Guyton, K. Z. Oxidative mechanisms in carcinogenesis / K. Z. Guyton, T. W. Kensler // Br. Med. Bull. – 1993. – Vol. 49. – P. 523-544.

**181.** Guzy, R. D. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia / R. D. Guzy, P. T. Schumacker // Exp. Physiol. – 2006. – Vol. 91. – P. 807–819.

**182.** Hadjigogos, K. The role of free radicals in the pathogenesis of rheumatoid arthritis / K. Hadjigogos // Panminerva Med. – 2003. – Vol. 45. – P. 7-13.

**183.** Halliwell, B. Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis / B. Halliwell // Br. J. Exp. Pathol. – 1989. – Vol. 70. – P. 737-757.

**184.** Halliwell, B. Oxidants and human disease: some new concepts / B. Halliwell //FASEB J. – 1987. – Vol. 1. – P. 358-364.

**185.** Halliwell, B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? / B. Halliwell // Biochem. J. – 2007. – Vol. 401. – P. 1–11.

**186.** Halliwell, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? / B. Halliwell // J. Neurochem. – 2006. – Vol. 97. – P. 1634–1658.

**187.** Halliwell, B. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease / B. Halliwell, J. M. Gutteridge // Biochem. J. – 1984. – Vol. 219. – P. 1-14.

**188.** Halliwell, B. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview / B. Halliwell, M. C. Gutteridge // Meth. Enzymol. - 1990. - Vol. 186. - P. 1-85.

**189.** Halliwell, B. The biological effects of the superoxide radical and its products / B. Halliwell // Bull. Eur. Physiopathol. Respir. **–** 1981. – Vol.17 – Suppl. 21-29.

**190.** Handbook of Toxicology / M. J. Derelanko, M. A. Hollinger (eds). - Second edition. - CRC Press, 2002. – 976 p.

**191.** Harman, D. A biologic clock: the mitochondria? / D. Harman // J. Am. Geriatrics Soc. – 1972. – Vol. 20. – P. 145–147.

**192.** Harman, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry / D. Harman / J. Gerontol. – 1956. – Vol. 11. – P. 298–300.

**193.** Harman, D. Role of free radicals in aging and disease / D. Harman // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 1992. – Vol. 673. – P. 126-141.

**194.** Haschek, W. M. Fundamentals of Toxicologic Pathology / W. M. Haschek, C. G. Rousseaux, M. A. Wallig. - 2nd Edition. – Elsevier Inc, 2009. – 700 p.

**195.** Hirasawa, M. Spontaneous myocarditis in DBA/2 mice. Light microscopic study with transmission and X-ray analytical electron microscopic studies / M. Hirasawa, Y. Kitaura, H. Deguchi, A. Ukimura, K. Kawamura // Virchows Arch. –1998. – Vol.432. - P. 461-468.

**196.** Hitchon, C. A. Oxidation in rheumatoid arthritis / C. A. Hitchon, H. S. El-Gabalawy // Arthritis Res. Ther. – 2004. – Vol. 6. – P. 265-278.

**197.** Hobbs, C. E. Neonatal rat hypoxia-ischemia: Effect of the anti-oxidant mitoquinol, and S-PBN / C. E. Hobbs, M. P. Murphy, R. A. Smith, D. E. // Oorschot. Pediatr. Int. – 2008. – Vol. 50. – P. 481-488.

**198.** Hu, S. Silica-induced apoptosis in alveolar macrophages: evidence of in vivo thiol depletion and the activation of mitochondrial pathway / S. Hu, H. Zhao, N. H. Al-Humadi, X. J. Yin, J. K. Ma // J. Toxicol. Environ. Health A. – 2006. – Vol. 69. – P. 1261-1284.

**199.** Hultqvist, M. A new arthritis therapy with oxidative burst inducers / M. Hultqvist, P. Olofsson, K. A. Gelderman, J. Holmberg, R. Holmdahl // PLoS Med. – 2006. – Vol. 3. – E348.

**200.** Huo, H.Z. Hepatoprotective and antioxidant effects of licorice extract against $CCl_4$-induced oxidative damage in rats// H. Z. Huo, B. Wang, Y. K. Liang, Y. Y Bao, Y. Gu / Int. J. Mol. Sci. – 2011. – Vol.12. – P. 6529-6543.

**201.** Hurd, T. R. Detection of reactive oxygen species-sensitive thiol proteins by redox difference gel electrophoresis: implications for mitochondrial redox signaling / T. R. Hurd, T. A. Prime, M. E. Harbour, K. S. Lilley, M. P. Murphy // J. Biol. Chem. – 2007. – Vol. 282. – P. 22040–22051.

**202.** Hyeon, S. Nrf2 deficiency induces oxidative stress and promotes RANKL-induced osteoclast differentiation / S. Hyeon, H. Lee, Y. Yang, W. Jeong // Free Radic. Biol. Med. – 2013. – Vol. 65. P. 789-799.

**203.** Ichimura, H. Mechano-oxidative coupling by mitochondria induces proinflammatory responses in lung venular capillaries / H. Ichimura, K. Parthasarathi, S. Quadri, A. C. Issekutz, J. Bhattacharya // J. Clin. Invest. – 2003. – Vol. 111. – P. 691–699.

**204.** Ilhan, A. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester against experimental allergic encephalomyelitis-induced oxidative stress in rats / A. Ilhan, O. Akyol, A. Gurel, F. Armutcu, M. Iraz, E. Oztas // Free Radic. Biol. Med. – 2004. – Vol. 37. – P. 386-394.

**205.** International Classification of Rodent Tumors. The Mouse - Berlin: Springer-Verlag, 2001. – 476 p.

**206.** Isaev, I. I. Conversion of biomembrane-produced energy into electric form. II. Intact mitochondria / I. I. Isaev, E. A. Liberman, V. D. Samuilov, V. P. Skulachev, L. M. Tsofina // Biochim. Biophys. Acta. – 1970. – Vol. 216. – P. 22-29.

**207.** Isaev, N. K. Brain aging and mitochondria-targeted plastoquinone antioxidants of SkQ-type / N. K. Isaev, E. V. Stelmashook, N. N. Stelmashook, I. N. Sharonova, V. G. Skrebitsky // Biochemistry (Mosc). – 2013. – Vol. 78. – P. 295-300.

**208.** Isaev, N. K. Mitochondria-targeted plastoquinone antioxidant SkQR1 decreases trauma-induced neurological deficit in rat / N. K. Isaev, S. V. Novikova, E. V. Stelmashook, I. V. Barskov, D. N. Silachev, L. G. Khaspekov, V. P. Skulachev, D. B. Zorov // Biochemistry (Mosc). – 2012. – Vol. 77. – P. 996-999.

**209.** Ishibashi, T. Molecular hydrogen: new antioxidant and anti-inflammatory therapy for rheumatoid arthritis and related diseases / T. Ishibashi // Curr. Pharm. Design. – 2013. – Vol. 19. – P. 6375-6381.

**210.** Izyumov, D. S. "Wages of fear": transient threefold decrease in intracellular ATP level imposes apoptosis / D. S. Izyumov, A. V. Avetisyan, O. Y. Pletjushkina, D. V. Sakharov, K. W. Wirtz, B. V. Chernyak, V. P. Skulachev // Biochim. Biophys. Acta. – 2004. – Vol. 1658. – P. 141-147.

**211.** Izyumov, D. S. Mitochondria as source of reactive oxygen species under oxidative stress. Study with novel mitochondria-targeted antioxidants--the "Skulachev-ion" derivatives / D. S. Izyumov, L.V. Domnina, O. K. Nepryakhina, A. V. Avetisyan, S. A. Golyshev, O. Y. Ivanova, M. V. Korotetskaya, K. G. Lyamzaev, O. Y. Pletjushkina, E. N. Popova, B. V. Chernyak // Biochemistry (Mosc). – 2010. – Vol. 75. – P. 123-129.

**212.** Jadidian, A. Evaluation of Apoptotic Markers in HEI-OC1 Cells Treated With Gentamicin With and Without the Mitochondria-Targeted Antioxidant Mitoquinone / A. Jadidian, P. J. Antonelli, C.P. Ojano-Dirain // Otol. Neurotol. – 2014. – Vol. 36. – P. 526-530.

**213.** Jain, S. S. High-fat diet-induced mitochondrial biogenesis is regulated by mitochondrial-derived reactive oxygen species activation of CaMKII / S. S. Jain, S.

Paglialunga, C. Vigna, A. Ludzki, E. A. Herbst, J. S. Lally, P. Schrauwen, J. Hoeks, A. R. Tupling, A. Bonen, G. P. Holloway // Diabetes. – 2014. – Vol. 63. – P. 1907-1913.

**214.** James A. M. Interactions of mitochondria-targeted and untargeted ubiquinones with the mitochondrial respiratory chain and reactive oxygen species. Implications for the use of exogenous ubiquinones as therapies and experimental tools / A. M. James, H. M. Cochemé, R. A. Smith, M. P. Murphy // J. Biol. Chem. – 2005. – Vol. 280. – P. 21295-21312.

**215.** Jankauskas, S. S. Mitochondria-targeted antioxidant SkQR1 ameliorates gentamycin-induced renal failure and hearing loss / S. S. Jankauskas, E. Y. Plotnikov, M. A. Morosanova, I. B. Pevzner, L. D. Zorova, V. P. Skulachev, D. B. Zorov // Biochemistry (Mosc). – 2012. – Vol. 77. – P. 666-670.

**216.** Jarvis, R.M. Mitochondria-targeted antioxidants do not prevent tumour necrosis factor-induced necrosis of L929 cells / R. M. Jarvis, J. Göttert, M. P. Murphy, E. C. Ledgerwood // Free Radic. Res. – 2007. – Vol. 41. – P. 1041-1046.

**217.** Jauslin, M. L. Mitochondria-targeted antioxidants protect Friedreich Ataxia fibroblasts from endogenous oxidative stress more effectively than untargeted antioxidants / M. L. Jauslin, T. Meier, R. A. Smith, M. P. Murphy // FASEB J. – 2003. – Vol. 17. – P. 1972-1974.

**218.** Jensen, P. K. Antimycin-insensitive oxidation of succinate and reduced nicotinamide-adenine dinucleotide in electron-transport particles. I. pH dependency and hydrogen peroxide formation / P. K. Jensen // Biochim. Biophys. Acta. – 1966. – Vol. 122. – P.157–166.

**219.** Jonsson, H. No effect of acetylcystein on refractory rheumatoid arthritis / H. Jonsson, F. A. Wollheim, B. Svensson // Clin. Exp. Rheumatol. – 1986. – Vol. 4. – P. 363-364.

**220.** Jou, M. J. Melatonin protects against common deletion of mitochondrial DNA-augmented mitochondrial oxidative stress and apoptosis / M. J. Jou, T. I. Peng, P. Z. Yu, S. B. Jou, R. J. Reiter, J. Y. Chen, H. Y. Wu, C. C. Chen, L. F. Hsu // J. Pineal. Res. – 2007. – Vol. 43. – P. 389-403.

**221.** Kalivendi, S. V. Doxorubicin activates nuclear factor of activated T-lymphocytes and Fas ligand transcription: role of mitochondrial reactive oxygen species and calcium / S. V. Kalivendi, E. A. Konorev, S. Cunningham, S. K. Vanamala, E. H. Kaji, J. Joseph, B. Kalyanaraman // Biochem. J. – 2005. – Vol. 389. – P. 527-539.

**222.** Kapay N. A. Mitochondria-targeted plastoquinone antioxidant SkQ1 prevents amyloid-β-induced impairment of long-term potentiation in rat hippocampal slices / N. A. Kapay, O. V. Popova, N. K. Isaev, E. V. Stelmashook, R. V. Kondratenko, D. B. Zorov, V. G. Skrebitsky, V. P. Skulachev // J. Alzheimers Dis. – 2013. – Vol. 36. – P. 377-383.

**223.** Kapay, N. A. In vivo injected mitochondria-targeted plastoquinone antioxidant SkQR1 prevents β-amyloid-induced decay of long-term potentiation in rat hippocampal slices / N. A. Kapay, N. K. Isaev, E. V. Stelmashook, O. V. Popova, D. B. Zorov, V. G. Skrebitsky, V. P. Skulachev // Biochemistry (Mosc). – 2011. – Vol. 76. – P. 1367-1370.

**224.** Kashiwagi, A. Complication of diabetes mellitus and oxidative stress / A. Kashiwagi // Jap. Med. Ass. Jor. - Vol.44. - P.521-528.

**225.** Katz, M. A. The expanding role of oxygen free radicals in clinical medicine / M. A. Katz //West. J. Med. – 1986. – Vol.144. – P. 441-446.

**226.** Kelso, G. F. Prevention of mitochondrial oxidative damage using targeted antioxidants / G. F. Kelso, C. M. Porteous, G. Hughes, E. C. Ledgerwood, A. M. Gane, R. A. Smith, M. P. Murphy // Ann. NY Acad. Sci. – 2002. – Vol. 959. – P. 263-274.

**227.** Kelso, G. F. Selective targeting of a redox-active ubiquinone to mitochondria within cells: antioxidant and antiapoptotic properties / G. F. Kelso, C. M. Porteous, C. V. Coulter, G. Hughes, W. K. Porteous, E. C. Ledgerwood, R. A. Smith, M. P. Murphy // J. Biol. Chem. – 2001. – Vol. 276. – P. 4588-4596.

**228.** Khailova, L. S. Cations SkQ1 and MitoQ accumulated in mitochondria delay opening of ascorbate/FeSO4-induced nonspecific pore in the inner mitochondrial membrane / L. S. Khailova, V. I. Dedukhova, E. N. Mokhova // Biochemistry (Mosc). – 2008. – Vol. 73. – P. 1121-1124.

**229.** Khailova, L.S. A short-chain alkyl derivative of Rhodamine 19 acts as a mild uncoupler of mitochondria and a neuroprotector / L. S. Khailova, D. N. Silachev, T. I.

Rokitskaya, A. V. Avetisyan, K. G. Lyamsaev, I. I. Severina, T. M. Il'yasova, M. V. Gulyaev, V. I. Dedukhova, T. A. Trendeleva, E. Y. Plotnikov, R. A. Zvyagilskaya, B. V. Chernyak, D. B. Zorov, Y. N. Antonenko, V. P. Skulachev // Biochim. Biophys. Acta. – 2014. – Vol. – P.

**230.** Khan, S. R. Reactive oxygen species, inflammation and calcium oxalate nephrolithiasis / S. R. Khan // Transl. Androl. Urol. – 2014. – Vol. 3. – P. 256-276.

**231.** Khansari, N. Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer / N. Khansari, Y. Shakiba, M. Mahmoudi //Recent Pat Inflamm. Allergy Drug Discov. - 2009. - V.3. - P.73-80.

**232.** Kirpatovsky, V.I. Role of oxidative stress and mitochondria in onset of urinary bladder dysfunction under acute urine retention / V. I. Kirpatovsky, E. Y. Plotnikov, I. S. Mudraya, S. A. Golovanov, V. V. Drozhzheva, R. A. Khromov, D. Y. Chernikov, V. P. Skulachev, D. B. Zorov // Biochemistry (Mosc). – 2013. – Vol. 78. – P. 542-548.

**233.** Kogan, S. C. Bethesda proposals for classification of nonlymphoid hematopoietic neoplasms in mice / S. C. Kogan, J. M. Ward, M. R. Anver, J. J. Berman, C. Brayton, R. D. Cardiff, J. S. Carter, S. de Coronado, J. R. Downing, T. N. Fredrickson, D. C. Haines, A. W. Harris, N. L. Harris, H. Hiai, E. S. Jaffe, I. C. MacLennan, P. P. Pandolfi, P. K. Pattengale, A. S. Perkins, R. M. Simpson, M. S. Tuttle, J. F. Wong, H. C. Morse 3rd // Blood. – 2002. – Vol.100. – P.238-245.

**234.** Kolosova, N. G. The mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 but not N-acetylcysteine reverses aging-related biomarkers in rats / N. G.Kolosova, N. A. Stefanova, N. A. Muraleva, V. P. Skulachev // Aging (Albany NY). – 2012. – Vol. 4. – P. 686-694.

**235.** Kondo, H. Spontaneous Tumors in Domestic Hamsters / H. Kondo, M. Onuma, H. Shibuya, T. Sato // Vet. Pathol. – 2008. - Vol. 45. – P. 674–680.

**236.** Krementsova, A. V. Reproducible effects of the mitochondria-targeted plastoquinone derivative SkQ1 on Drosophila melanogaster lifespan under different experimental scenarios / A. V. Krementsova, N. V. Roshina, E. A. Tsybul'ko, O. Y. Rybina, A. V. Symonenko, E. G. Pasyukova // Biogerontology. – 2012. – Vol. 13. – P. 595-607.

**237.** Kruk, J. Fluorescence lifetimes study of alpha-tocopherol and biological prenylquinols in organic solvents and model membranes / J. Kruk, M. Jemiola-Rzeminska, K. Strzalka // Chem. Phys. Lipids. – 1997. – Vol. 87. – P. 73-80.

**238.** Kudin, A. P. Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria / A. P. Kudin, N. Y. Bimpong-Buta, S. Vielhaber, C. E. Elger, W. S. Kunz // J. Biol. Chem. – 2004. – Vol. 279. – P. 4127–4135.

**239.** Kunder, S. A comprehensive antibody panel for immunohistochemical analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded hematopoietic neoplasms of mice: analysis of mouse specific and human antibodies cross-reactive with murine tissue / S. Kunder, J. Calzada-Wack, G. Hölzlwimmer, J. Müller, C. Kloss, W. Howat, J. Schmidt, H. Höfler, M. Warren, L. Quintanilla-Martinez // Toxicol. Pathol. – 2007. – Vol.35. – P.366-375.

**240.** Lebovitz, R.M. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice / R. M. Lebovitz, H. Zhang, H. Vogel, J. Cartwright Jr., L. Dionne, N. Lu, S. Huang, M. M. Matzuk // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1996. - Vol. 93. - P. 9782-9787.

**241.** Lee, S. Mitochondrial $H_2O_2$ generated from electron transport chain complex I stimulates muscle differentiation / S. Lee, E. Tak, J. Lee, M. A. Rashid, M. P. Murphy, J. Ha, S.S. Kim // Cell Res. – 2011. – Vol. 21. – P. 817-834.

**242.** Leo, S. The mitochondrial antioxidants MitoE(2) and MitoQ(10) increase mitochondrial Ca(2+) load upon cell stimulation by inhibiting Ca(2+) efflux from the organelle / S. Leo, G. Szabadkai, R. Rizzuto // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2008. – Vol. 1147. – P. 264-274.

**243.** Levin, S. The nomenclature of cell death : recommendations of an ad hoc Committee of the Society of Toxicologic Pathologists / S. Levin, T. J. Bucci, S. M. Cohen, A. S. Fix, J. F. Hardisty, E. K. LeGrand, R. R. Maronpot, B. F. Trump // Toxicol. Pathol. – 1999. – Vol. 27. – P. 484-490.

**244.** Levitsky, D. O. Carnitine: the carrier transporting fatty acyls into mitochondria by means of an electrochemical gradient of H + / Levitsky D. O., Skulachev V. P. // Biochim. Biophys. Acta. – 1972. – Vol. 275. – P. 33-50.

**245.** Li, Y. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase / Y. Li, T. T. Huang, E. J. Carlson, S. Melov, P. C. Ursell, J. L. Olson, L. J. Noble, M. P. Yoshimura, C. Berger, P. H. Chan, D. C. Wallace, C. J. Epstein // Nat. Genet. - 1995. - Vol. 11. - P. 376-381.

**246.** Li, Y. Inhibitory effect of the antimalarial agent artesunate on collagen-induced arthritis in rats through nuclear factor kappa B and mitogen-activated protein kinase signaling pathway / Y. Li, S. Wang, Y. Wang, C. Zhou, G. Chen, W. Shen, C. Li, W. Lin, S. Lin, H. Huang, P. Liu, X. Shen / Transl. Res. – 2013. – Vol.161. – P. 89-98.

**247.** Liberman, E. A. Conversion of biomembrane-produced energy into electric form. 3. Chromatophores of Rhodospirillum rubrum / E. A. Liberman, V. P. Skulachev // Biochim. Biophys. Acta. – 1970. – Vol. 216. – P. 30-42.

**248.** Liberman, E. A. Mechanism of coupling of oxidative phosphorylation and the membrane potential of mitochondria / E. A. Liberman, V. P. Topaly, L. M. Tsofina, A. A. Jasaitis, V. P. Skulachev // Nature. – 1969. – Vol. 222. – P. 1076-1078.

**249.** Lim, S. Mitochondria-targeted antioxidants protect pancreatic β-cells against oxidative stress and improve insulin secretion in glucotoxicity and glucolipotoxicity / S. Lim, M. A. Rashid, M. Jang, Y. Kim, H. Won, J. Lee, J. T. Woo, Y. S. Kim, M. P. Murphy, L. Ali, J. Ha, S. S. Kim // Cell Physiol. Biochem. – 2011. – Vol. 28. – P. 873-886.

**250.** Loschen, G. Respiratory chain linked $H_2O_2$ production in pigeon heart mitochondria / G. Loschen, L. Flohe, B. Chance // FEBS Lett. – 1971. – Vol.18. – P. 261–264.

**251.** Loschen, G. Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide / G. Loschen, A. Azzi, C. Richter, L. Flohe // FEBS Lett. – 1974. – Vol. 42. – P. 68–72.

**252.** Loshadkin, D. Substituted p-hydroquinones as inhibitors of lipid peroxidation / D. Loshadkin, V. Roginsky, E. Pliss // Int. J. Chem. Kinetics. – 2002. Vol. 34. – P. 162-171.

**253.** Lowes, D. A. The mitochondria targeted antioxidant MitoQ protects against fluoroquinolone-induced oxidative stress and mitochondrial membrane damage in

human Achilles tendon cells / D. A. Lowes, C. Wallace, M. P. Murphy, N. R. Webster, H. F. Galley // Free Radic. Res. – 2009. – Vol. 43. – P. 323-328.

**254.** Lowes, D. A. The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ protects against organ damage in a lipopolysaccharide-peptidoglycan model of sepsis / D. A. Lowes, B. M. Thottakam, N. R. Webster, M. P. Murphy, H. F. Galley // Free Radic. Biol. Med. – 2008. – Vol. 45. – P. 1559-1565.

**255.** Lowes, D.A. Antioxidants that protect mitochondria reduce interleukin-6 and oxidative stress, improve mitochondrial function, and reduce biochemical markers of organ dysfunction in a rat model of acute sepsis / D. A. Lowes, N. R. Webster, M. P. Murphy, H. F. Galley // Br. J. Anaesth. – 2013. – Vol. 110. – P. 472-480.

**256.** Lyamzaev, K. G. Novel mitochondria-targeted antioxidants: plastoquinone conjugated with cationic plant alkaloids berberine and palmatine / K. G. Lyamzaev, A. V. Pustovidko, R. A. Simonyan, T. I. Rokitskaya, L. V. Domnina, O. Y. Ivanova, I. I. Severina, N. V. Sumbatyan, G. A. Korshunova, V. N. Tashlitsky, V. A. Roginsky, Y. N. Antonenko, M. V. Skulachev, B. V. Chernyak, V. P. Skulachev // Pharm. Res. – 2011. – Vol. 28. – P. 2883-2895.

**257.** Ma, S. Transgenic overexpression of uncoupling protein 2 attenuates salt-induced vascular dysfunction by inhibition of oxidative stress / S. Ma, Q. Wang, Y. Zhang, D. Yang, D. Li, B. Tang, Y. Yang // Am. J. Hypertens. – 2014. – Vol. 27. P. 345-354.

**258.** Ma, T. Amyloid β-induced impairments in hippocampal synaptic plasticity are rescued by decreasing mitochondrial superoxide / T. Ma, C. A. Hoeffer, H. Wong, C. A. Massaad, P. Zhou, C. Iadecola, M. P. Murphy, R. G. Pautler, E. Klann J. Neurosci. – 2011. – Vol. 31. – P.5589-5595.

**259.** Mackenzie, R.M. Mitochondrial reactive oxygen species enhance AMP-activated protein kinase activation in the endothelium of patients with coronary artery disease and diabetes / R. M. Mackenzie, I. P. Salt, W. H. Miller, A. Logan, H. A. Ibrahim, A. Degasperi, J. A. Dymott, C. A. Hamilton, M. P. Murphy, C. Delles, A.F. Dominiczak // Clin. Sci. (Lond). – 2013. – Vol. 124. – P. 403-411.

**260.** Madamanchi, N. R. Redox signaling in cardiovascular health and disease / N. R. Madamanchi, M. S. Runge // Free Radic. Biol. Med. - 2013. - Vol. 61. - P. 473-501.

**261.** Magwere, T. The effects of exogenous antioxidants on lifespan and oxidative stress resistance in Drosophila melanogaster / T. Magwere, M. West, K. Riyahi, M. P. Murphy, R. A. Smith, L. Partridge // Mech. Ageing Dev. – 2006. – Vol. 127. – P. 356-370.

**262.** Majno, G. Cells, Tissues, and Disease: principles of general pathology / G. Majno, I. Joris. - Oxford University Press, 2004. - 1040 p.

**263.** Malviya, G. Biological therapies for rheumatoid arthritis: progress to date / S. Salemi, B. Lagana, A. P. Diamanti, R. D'Amelio, A. Signore // BioDrugs: clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy. – 2013. – Vol. 27. – P. 329-345.

**264.** Manczak, M. Mitochondria-targeted antioxidants protect against amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease neurons / M. Manczak, P. Mao, M. J. Calkins, A. Cornea, A. P. Reddy, M. P. Murphy, H. H. Szeto, B. Park, P. H. Reddy // J. Alzheimers Dis. – 2010. – Vol. 20 (Suppl. 2). – P. 609-631.

**265.** Mao, P. MitoQ, a mitochondria-targeted antioxidant, delays disease progression and alleviates pathogenesis in an experimental autoimmune encephalomyelitis mouse model of multiple sclerosis / P. Mao, M. Manczak, U. P. Shirendeb, P. H. Reddy // Biochim. Biophys. Acta. – 2013. – N 1832. – P. 2322-2331.

**266.** Markovets, A. M. Therapeutic action of the mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 on retinopathy in OXYS rats linked with improvement of VEGF and PEDF gene expression / A. M. Markovets, A. Z. Fursova, N. G. Kolosova // PLoS One. – 2011. – Vol. 6. – E 21682.

**267.** Maronpot, R.R. Hepatic enzyme induction: histopathology / R. R. Maronpot, K. Yoshizawa, A. Nyska, T. Harada, G. Flake, G. Mueller, B. Singh, J. M. Ward // Toxicol. Pathol. – 2010. – Vol.38. – P. 776-795.

**268.** Marthandan, S. An investigation of the effects of MitoQ on human peripheral mononuclear cells / S. Marthandan, M. P. Murphy, E. Billett, Y. Barnett // Free Radic. Res. – 2011. – Vol. 45. – P. 351-358.

**269.** Martínez-Cayuela, M. Oxygen free radicals and human disease / M. Martínez-Cayuela // Biochimie. – 1995. – Vol. 77. – P. 147-161.

**270.** Masuda, Y. Learning toxicology from carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity / Y. Masuda // Yakugaku Zasshi. – 2006. – Vol. 126. – P. 885-899.

**271.** Mateo, J. Regulation of hypoxia-inducible factor-1$\alpha$ by nitric oxide through mitochondriadependent and -independent pathways / J. Mateo, M. Garc´ıa-Lecea, S. Cadenas, C. Hern´andez, S. Moncada // Biochem. J. – 2003. – Vol. 376. – P. 537–544.

**272.** Maulik, S. K. Oxidative stress and cardiac hypertrophy: A review / S. K. Maulik, S. Kumar // Toxicol. Mech. Methods. - 2012. - Vol. 22. - P. 359-366.

**273.** McManus, M.J. The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ prevents loss of spatial memory retention and early neuropathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease / M. J. McManus, M. P. Murphy, J. L. Franklin // J. Neurosci. – 2011. – Vol. 31. – P. 15703-15715.

**274.** Medzhitov, R. TLR-mediated innate immune recognition / R. Medzhitov / Semin. Immunol. – 2007. – Vol.19. – P. 1-2.

**275.** Menke, N. B. Impaired wound healing / N. B. Menke, K. R. Ward, T. M. Witten, D. G. Bonchev, R. F. Diegelmann // Clinics in Dermatol. - 2007. – Vol. 25. - P. 19–25.

**276.** Mercer, J.R. The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ decreases features of the metabolic syndrome in ATM+/-/ApoE-/- mice / J.R. Mercer, E. Yu, N. Figg, K. K. Cheng, T. A. Prime, J. L. Griffin, M. Masoodi, A.Vidal-Puig, M. P. Murphy, M. R. Bennett // Free Radic. Biol. Med. – 2012. – Vol. 52. – P. 841-849.

**277.** Merzonk, S. Antioxydant status and levels of different vitamins by high performance liquid chromatography in diabetics subjects with multiple complications / S. Merzouk, A. Hichami, S. Madani, H. Merzouk, A.Y. Berrouiguet, J. Prost, K. Moutairou, N. Chabane-Sari, N. A. Khan // Gen. Physiol. and Biophys. - 2003. - Vol. 22. - P.15-27.

**278.** Michael, B. Evaluation of organ weights for rodent and non-rodent toxicity studies: a review of regulatory guidelines and a survey of current practices / B. Michael, B. Yano, R. S. Sellers, R. Perry, D. Morton, N. Roome, J.K. Johnson, K. Schafer, S. Pitsch // Toxicol. Pathol. – 2007. – Vol.35. – P.742-750.

**279.** Miquel, E. Neuroprotective effects of the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis / E. Miquel, A. Cassina, L.

Martínez-Palma, J.M. Souza, C. Bolatto, S. Rodríguez-Bottero, A. Logan, R. A. Smith, M. P. Murphy, L. Barbeito, R. Radi, P. Cassina // Free Radic. Biol. Med. – 2014. – Vol.70. – P. 204-213.

**280.** Mitchell, T. The mitochondria-targeted antioxidant mitoquinone protects against cold storage injury of renal tubular cells and rat kidneys / T. Mitchell, D. Rotaru, H. Saba, R. A. Smith, M. P. Murphy, L. A. MacMillan-Crow // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2011. – Vol. 336. – P. 682-692.

**281.** Molecular Biology of Free Radicals in Human Diseases / Eds. O. Aruoma, B. Halliwell. - London. - 1998. – 453 p.

**282.** Monographs on Pathology of Laboratory Animals: Endocrine System; Respiratory System; Digestive System; Urinary System; Genital System; Nervous System; Integument and Mammary Glands; Hemopoietic System; Cardiovascular and Musculoskeletal Systems; Eye and Ear. / T. C. Jones, C. C. Capen, U. Mohr (eds). – New York: Springer-Verlag, 1983-1998.

**283.** Morse, H. C. 3rd. Bethesda proposals for classification of lymphoid neoplasms in mice / H. C. Morse 3rd, M. R. Anver, T. N. Fredrickson, D. C. Haines, A. W. Harris, N. L. Harris, E. S. Jaffe, S. C. Kogan, I. C. MacLennan, P. K. Pattengale, J. M. Ward // Blood. – 2002. – Vol. 100. – P. 246-258.

**284.** Moseley, R. Comparison of oxidative stress biomarker profiles between acute and chronic wound environments / R. Moseley, J. R. Hilton, R. J. Waddington, K. G. Harding, P. Stephens, D. W. Thomas // Wound Rep. Reg. – 2004. – Vol. 12.– P. 419–429.

**285.** Mukhopadhyay, P. Mitochondrial reactive oxygen species generation triggers inflammatory response and tissue injury associated with hepatic ischemia-reperfusion: therapeutic potential of mitochondrially targeted antioxidants / P. Mukhopadhyay, B. Horváth, Z. Zsengellėr, S. Bátkai, Z. Cao, M. Kechrid, E. Holovac, K. Erdėlyi, G. Tanchian, L. Liaudet, I. E. Stillman, J. Joseph, B. Kalyanaraman, P. Pacher // Free Radic. Biol. Med. – 2012. – Vol. 53. – P. 1123-1138.

**286.** Mukhopadhyay, P. Mitochondrial-targeted antioxidants represent a promising approach for prevention of cisplatin-induced nephropathy / P. Mukhopadhyay, B.

Horváth, Z. Zsengellér, J. Zielonka, G. Tanchian, E. Holovac, M. Kechrid, V. Patel, I. E. Stillman, S. M. Parikh, J. Joseph, B. Kalyanaraman, P. Pacher // Free Radic. Biol. Med. – 2012. – Vol. 52. – P. 497-506.

**287.** Muller, F. The nature and mechanism of superoxide production by the electron transport chain / F. Muller // J. Am. Aging Assoc. – 2000. – Vol. 23. – P. 227–253.

**288.** Muller, W.A. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response / W. A. Muller // Trends Immunol. - 2003. - Vol. 24. - P. 327-334.

**289.** Murphy, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species / M. P. Murphy // Biochem. J. – 2009. – Vol. 417. – P. 1–13.

**290.** Murphy, M. P. Targeting antioxidants to mitochondria by conjugation to lipophilic cations / M. P. Murphy, R. A. Smith // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. – 2007. – Vol. 47. – P. 629-656.

**291.** Mustapha, N.M. NADPH Oxidase versus Mitochondria-Derived ROS in Glucose-Induced Apoptosis of Pericytes in Early Diabetic Retinopathy / N. M. Mustapha, J. M. Tarr, E. M. Kohner, R. Chibber // J. Ophthalmol. – 2010. – Vol. 2010. – P. 746978.

**292.** Neroev, V. V. Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 4. Age-related eye disease. SkQ1 returns vision to blind animals / V.V. Neroev, M. M. Archipova, L. E. Bakeeva, A. Zh. Fursova, E. N. Grigorian, A. Y. Grishanova, E. N. Iomdina, Zh. N. Ivashchenko, L. A. Katargina, I. P. Khoroshilova-Maslova, O. V. Kilina, N. G. Kolosova, E. P. Kopenkin, S. S. Korshunov, N. A. Kovaleva, Y. P. Novikova, P. P. Philippov, D. I. Pilipenko, O. V. Robustova, V. B. Saprunova, I. I. Senin, M. V. Skulachev, L. F. Sotnikova, N. A. Stefanova, N. K. Tikhomirova, I. V. Tsapenko, A. I. Shchipanova, R. A. Zinovkin, V. P. Skulachev // Biochemistry (Mosc). - 2008. – Vol. 73. – P. 1317-1328.

**293.** Neuzil, J. Mitochondria transmit apoptosis signalling in cardiomyocyte-like cells and isolated hearts exposed to experimental ischemia-reperfusion injury / J. Neuzil, C. Widén, N. Gellert, E. Swettenham, R. Zobalova, L. F. Dong, X. F. Wang, C. Lidebjer, H. Dalen, J. P. Headrick, P. K. Witting // Redox Rep. – 2007. – Vol. 12. – P. 148-162.

**294.** Ng, L. F. The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ extends lifespan and improves healthspan of a transgenic Caenorhabditis elegans model of Alzheimer disease / L. F. Ng, J. Gruber, I. K. Cheah, C. K. Goo, W. F. Cheong, G. Shui, K. P. Sit, M. R. Wenk, B. Halliwell // Free Radic. Biol. Med. – 2014. – Vol. 71. – P.390-401.

**295.** Ng, Y. The role of docosahexaenoic acid in mediating mitochondrial membrane lipid oxidation and apoptosis in colonocytes / Y. Ng, R. Barhoumi, R. B. Tjalkens, Y. Y. Fan, S. Kolar, N. Wang, J. R. Lupton, R. S. Chapkin // Carcinogenesis. –2005. – Vol. 26. – P. 1914-1921.

**296.** Nierobisz, L.S. MitoQ10 induces adipogenesis and oxidative metabolism in myotube cultures / L. S. Nierobisz, D. C. McFarland, P. E. Mozdziak // Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. – 2011. – Vol. 158. – P. 125-131.

**297.** Nikitin, A.Y. Classification of Proliferative Pulmonary Lesions of the Mouse: Recommendations of the Mouse Models of Human Cancers Consortium / A. Y. Nikitin, A. Alcaraz, M. R. Anver, R. T. Bronson, R. D. Cardiff, D. Dixon, A. E. Fraire, E. W. Gabrielson, W. T. Gunning, D. C. Haines, M. H. Kaufman, R. I. Linnoila, R. R. Maronpot, A. S. Rabson, R. L. Reddick, S. Rehm, N. Rozengurt, H. M. Schuller, E. N. Shmidt, W. D. Travis, J. M. Ward, T. Jacks // Cancer Res. – 2004. – Vol. 64. – P. 2307-2316.

**298.** Nohl, H. The biochemical mechanism of the formation of reactive oxygen species in heart mitochondria / H. Nohl // J.Mol.Cell.Cardiol. - 1981. - Vol.13. - P.66.

**299.** Obukhova, L. A. Mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 inhibits age-dependent involution of the thymus in normal and senescence-prone rats / L. A. Obukhova, V. P. Skulachev, N. G. Kolosova //Aging (Albany NY). – 2009. – Vol. 1. – 389-401.

**300.** Ojano-Dirain, C.P. Mitochondria-targeted antioxidant MitoQ reduces gentamicin-induced ototoxicity / C. P. Ojano-Dirain, P. J. Antonelli, C. G. Le Prell // Otol. Neurotol. – 2014. – Vol. 35. – P. 533-539.

**301.** Ojano-Dirain, C.P. Prevention of gentamicin-induced apoptosis with the mitochondria-targeted antioxidant mitoquinone / C. P. Ojano-Dirain, P. J. Antonelli // Laryngoscope. – 2012. – Vol. 122. – P. 2543-2548.

**302.** Ojha, N.Assessment of wound-site redox environment and the significance of Rac2 in cutaneous healing / N. Ojha, S. Roy, G. He, S. Biswas, M. Velayutham, S. Khanna, P. Kuppusamy, J.L. Zweier, C.K. Sen // Free Radic Biol Med. - 2008. - Vol.44. - P. 682-691.

**303.** O'Malley, Y. Reactive oxygen and targeted antioxidant administration in endothelial cell mitochondria / Y. O'Malley, B. D. Fink, N. C. Ross, T. E. Prisinzano, W. I. Sivitz // J. Biol. Chem. – 2006. – Vol. 281. – P. 39766-39775.

**304.** Omarova, E. O. Inhibition of oxidative hemolysis in erythrocytes by mitochondria-targeted antioxidants of SkQ series / E. O. Omarova, Y. N. Antonenko // Biochemistry (Mosc). – 2014. – Vol. 79. – P. 139-145.

**305.** Orsucci, D. Targeting mitochondrial dysfunction and neurodegeneration by means of coenzyme Q10 and its analogues / D. Orsucci, M. Mancuso, E. C. Ienco, A. LoGerfo, G. Siciliano // Curr. Med. Chem. – 2011. – Vol. 18. – P. 4053-4064.

**306.** Oshino, N. The properties of hydrogen peroxide production under hyperoxic and hypoxic conditions of perfused rat liver / N. Oshino, D. Jamieson, B. Chance // Biochem. J. – 1975. – Vol. 146. – P. 53–65.

**307.** Oyewole, A.O. Comparing the effects of mitochondrial targeted and localized antioxidants with cellular antioxidants in human skin cells exposed to UVA and hydrogen peroxide / A. O. Oyewole, M. C. Wilmot, M. Fowler, M. A. Birch-Machin // FASEB J. – 2014. – Vol. 28. – P. 485-494.

**308.** Paglialunga, S. Targeting of mitochondrial reactive oxygen species production does not avert lipid-induced insulin resistance in muscle tissue from mice / S. Paglialunga, B. van Bree, M. Bosma, M. P. Valdecantos, E. Amengual-Cladera, J. A. Jörgensen, D. van Beurden, G. J. den Hartog, D. M. Ouwens, J. J. Briedé, P. Schrauwen, J. Hoeks // Diabetologia. – 2012. – Vol. 55. – 2759-2768.

**309.** Palacios-Callender, M. Endogenous NO regulates superoxide production at low oxygen concentrations by modifying the redox state of cytochrome c oxidase / M. Palacios-Callender, M. Quintero, V. S. Hollis, R. J. Springett, S. Moncada // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2004. – Vol. 101. – P. 7630–7635.

**310.** Parajuli, N. MitoQ blunts mitochondrial and renal damage during cold preservation of porcine kidneys // N. Parajuli, L. H. Campbell, A. Marine, K. G. Brockbank, L. A. Macmillan-Crow // PLoS One. – 2012. – Vol. 7. – E48590.

**311.** Parthasarathi, K. Mitochondrial Reactive Oxygen Species Regulate Spatial Profile of Proinflammatory Responses in Lung Venular Capillaries / K. Parthasarathi, H. Ichimura, S. Quadri, A. Issekutz, J. Bhattacharya // J. Immunol. – 2002. – Vol. 169. – P. 7078–7086.

**312.** Pathobiology of Aging Mouse, Vol.1&2. - ILSI Press. Washington D.C., 1996. – 527+505 p.

**313.** Pathology of the mouse: reference and atlas /Ed. R.R. Maronpot. - Vienna: Cache River Press, 1999. - 700p.

**314.** Patten, D. A. Hypoxia-inducible factor-1 activation in nonhypoxic conditions: the essential role of mitochondrial-derived reactive oxygen species / D. A. Patten, V. N. Lafleur, G. A. Robitaille, D. A. Chan, A. J. Giaccia, D. E. Richard // Mol. Biol. Cell. – 2010. – Vol. 21. – P. 3247-3257.

**315.** Pehar, M. Mitochondrial superoxide production and nuclear factor erythroid 2-related factor 2 activation in p75 neurotrophin receptor-induced motor neuron apoptosis / M. Pehar, M. R. Vargas, K. M. Robinson, P. Cassina, P. J. Díaz-Amarilla, T. M. Hagen, R. Radi, L. Barbeito, J. S. Beckman // J. Neurosci. – 2007. – Vol. 27. – P. 7777-7785.

**316.** Pelletier, M. New tricks from an old dog: mitochondrial redox signaling in cellular inflammation / M. Pelletier, T. S. Lepow, L. K. Billingham, M. P. Murphy, R. M. Siegel // Sem. Immunol. – 2012. – Vol. 24. – P. 384-392.

**317.** Percy, D. H. Pathology of Laboratory Rodents and Rabbits / D. H. Percy, S. W. Barthold - 3nd ed. - Ames, IA: Iowa State University Press, 2007. - 315p.

**318.** Pettan-Brewer, C. Practical pathology of aging mice / C. Pettan-Brewer, P. M. Treuting // Pathobiology of Aging & Age-related Diseases. – 2011. – Vol.1. P.1-16.

**319.** Plecitá-Hlavatá, L. Pro-oxidant mitochondrial matrix-targeted ubiquinone MitoQ10 acts as anti-oxidant at retarded electron transport or proton pumping within

Complex I / L. Plecitá-Hlavatá, J. Jezek, P. Jezek // Int. J. Biochem. Cell Biol. – 2009. – Vol. 41. – P. 1697-1707.

**320.** Pletjushkina, O. Y. Effect of oxidative stress on dynamics of mitochondrial reticulum / O. Y. Pletjushkina, K. G. Lyamzaev, E. N. Popova, O. K. Nepryakhina, O. Y. Ivanova, L. V. Domnina, B. V. Chernyak, V. P. Skulachev // Biochim. Biophys. Acta. – 2006. – Vol. 1757. – P. 518-524.

**321.** Pletjushkina, O. Y. Hydrogen peroxide produced inside mitochondria takes part in cell-to-cell transmission of apoptotic signal / O. Y. Pletjushkina, E. K. Fetisova, K. G. Lyamzaev, O. Y. Ivanova, L. V. Domnina, M. Y. Vyssokikh, A. V. Pustovidko, A. V. Alexeevski, D. A. Alexeevski, J. M. Vasiliev, M. P. Murphy, B. V. Chernyak, V. P. Skulachev // Biochemistry (Mosc). – 2006. – Vol. 71. – P. 60-67.

**322.** Plotnikov, E. Y. Interrelations of mitochondrial fragmentation and cell death under ischemia/reoxygenation and UV-irradiation: protective effects of SkQ1, lithium ions and insulin / E. Y. Plotnikov, A. K. Vasileva, A. A. Arkhangelskaya, I. B. Pevzner, V. P. Skulachev, D. B. Zorov // FEBS Lett. – 2008. – Vol. 582. – P. 3117-3124.

**323.** Plotnikov, E. Y. Mechanisms of nephroprotective effect of mitochondria-targeted antioxidants under rhabdomyolysis and ischemia/reperfusion / E. Y. Plotnikov, A. A. Chupyrkina, S. S. Jankauskas, I. B. Pevzner, D. N. Silachev, V. P. Skulachev, D. B. Zorov // Biochim. Biophys. Acta. – 2011. – Vol. 1812. – P. 77-86.

**324.** Plotnikov, E. Y. Mild uncoupling of respiration and phosphorylation as a mechanism providing nephro- and neuroprotective effects of penetrating cations of the SkQ family / E. Y. Plotnikov, D. N. Silachev, S. S. Jankauskas, T. I. Rokitskaya, A. A. Chupyrkina, I. B. Pevzner, L. D. Zorova, N. K. Isaev, Y. N. Antonenko, V. P. Skulachev, D. B. Zorov // Biochemistry (Mosc). – 2012. – Vol. 77. – P. 1029-1037.

**325.** Plotnikov, E. Y. Myoglobin causes oxidative stress, increase of NO production and dysfunction of kidney's mitochondria / E. Y. Plotnikov, A. A. Chupyrkina, I. B. Pevzner, N. K. Isaev, D. B. Zorov // Biochim. Biophys. Acta. – 2009. – Vol. 1792. – P. 796-803.

**326.** Plotnikov, E. Y. New-generation Skulachev ions exhibiting nephroprotective and neuroprotective properties / E. Y. Plotnikov, D. N. Silachev, A. A. Chupyrkina, M. I.

Danshina, S. S. Jankauskas, M. A. Morosanova, E. V. Stelmashook, A. K. Vasileva, E. S. Goryacheva, Y. A. Pirogov, N. K. Isaev, D. B. Zorov // Biochemistry (Mosc). – 2010. – Vol. 75. – P. 145-150.

**327.** Pomposiello, P. J. Global adjustment of microbial physiology during free radical stress / P. J. Pomposiello, B. Demple // Adv. Microb. Physiol. – 2002. - Vol.46. – P.319-341.

**328.** Popova, E. N. Scavenging of reactive oxygen species in mitochondria induces myofibroblast differentiation / E. N. Popova, O. Y. Pletjushkina, V. B. Dugina, L. V. Domnina, O. Y. Ivanova, D. S. Izyumov, V. P. Skulachev, B. V. Chernyak // Antioxid. Redox Signal. – 2010. – Vol. 13. – P. 1297-1307.

**329.** Psaila, B. The metastatic niche: adapting the foreign soil / B. Psaila, D. Lyden // Nat. Rev. Cancer. – 2009. – Vol. 9. – P. 285-293.

**330.** Pustovidko, A. V. Derivatives of the cationic plant alkaloids berberine and palmatine amplify protonophorous activity of fatty acids in model membranes and mitochondria / A. V. Pustovidko, T. I. Rokitskaya, I. I. Severina, R. A. Simonyan, T. A. Trendeleva, K. G. Lyamzaev, Y. N. Antonenko, A. G. Rogov, R. A. Zvyagilskaya, V. P. Skulachev, B. V. Chernyak // Mitochondrion. – 2013. – Vol. 13. – P. 520-525.

**331.** Raghunathan, V.K. Influence of particle size and reactive oxygen species on cobalt chrome nanoparticle-mediated genotoxicity / V. K. Raghunathan, M. Devey, S. Hawkins, L. Hails, S. A. Davis, S. Mann, I. T. Chang, E. Ingham, A. Malhas, D. J. Vaux, J. D. Lane, C. P. Case // Biomaterials. – 2013. – Vol. 34. – P. 3559-3570.

**332.** Raha, S. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing / S. Raha, B. H. Robinson. // Trends Biochem. – 2000. – Vol. 25. – P. 502–508.

**333.** Rajendran, P. Antioxidants and human diseases / P. Rajendran, N. Nandakumar, T. Rengarajan, R. Palaniswami , E.N. Gnanadhas, U. Lakshminarasaiah, J. Gopas, I. Nishigaki // Clin. Chim. Acta. – 2014. – Vol. 436. – P.332-347.

**334.** Ramsey, H. Mitoquinone restores platelet production in irradiation-induced thrombocytopenia / H. Ramsey, Q. Zhang, M. X. Wu // Platelets. – 2014. – N - P.1-8.

**335.** Rao, V.A. The antioxidant transcription factor Nrf2 negatively regulates autophagy and growth arrest induced by the anticancer redox agent mitoquinone / V. A.

Rao, S. R. Klein, S. J. Bonar, J. Zielonka, N. Mizuno, J. S. Dickey, P. W. Keller, J. Joseph, B. Kalyanaraman, E. Shacter // J. Biol. Chem. – 2010. – Vol. 285. – P. 34447-34459.

**336.** Reddy, P.H. Mitochondrial oxidative damage in aging and Alzheimer's disease: implications for mitochondrially targeted antioxidant therapeutics / P. H. Reddy // J. Biomed. Biotechnol. – 2006. – Vol. 2006. – P. 31372.

**337.** Remans, P. H. Intracellular free radical production in synovial T lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis / P. H. Remans, M. van Oosterhout, T. J. Smeets, M. Sanders, W. M. Frederiks, K. A. Reedquist, P. P. Tak, F. C. Breedveld, J. M. van Laar // Arthritis Rheum. – 2005. – Vol. 52. – P. 2003-2009.

**338.** Richter, C. Biophysical consequence of lipid peroxidation in membranes / C. Richter // Chem. Phys. Lipids. - 1987. - Vol. 44. - P.175-189.

**339.** Rodriguez, H. Mapping of Cu/H2O2-induced DNA damage at nucleotide resolution in human genomic DNA by ligation- mediated polymerase chain reaction / H. Rodriguez, R. Drouin, G. P. Holmquist, T. R. O'Connor, S. Boiteux, J. Laval, J. H. Doroshow, S. A. Akman // J. Biol. Chem. - 1995. Vol. 270. - P. 17633-17640.

**340.** Rodriguez-Cuenca, S. Consequences of long-term oral administration of the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ to wild-type mice / S. Rodriguez-Cuenca, H. M. Cochemé, A. Logan, I. Abakumova, T. A. Prime, C. Rose, A. Vidal-Puig, A. C. Smith, D. C. Rubinsztein, I. M. Fearnley, B. A. Jones, S. Pope, S. J. Heales, B. Y. Lam, S. G. Neogi, I. McFarlane, A. M. James, R. A. Smith, M. P. Murphy // Free Radic. Biol. Med. – 2010. – Vol. 48. – P. 161-172.

**341.** Roginsky, V. Substituted p-hydroquinones as inhibitors of lipid peroxidation / V. Roginsky, T. Barsukova, D. Loshadkin, E. Pliss // Chem. Phys. Lipids. – 2003. – Vol.125. – P. 49-58.

**342.** Roginsky V. A. Chain-breaking antioxidant activity of reduced forms of mitochondria-targeted quinones, a novel type of geroprotectors. / V.A. Roginsky, V.N. Tashlitsky, V.P. Skulachev // Aging (Albany). – 2009. – Vol. 1. – P. 481-489.

**343.** Rokitskaya, T. I. Electrogenic proton transport across lipid bilayer membranes mediated by cationic derivatives of rhodamine 19: comparison with anionic

protonophores / T. I. Rokitskaya, T. M. Ilyasova, I. I. Severina, Y. N. Antonenko, V. P. Skulachev // Eur. Biophys. J. – 2013. – Vol. 42. – P. 477-485.

**344.** Rokitskaya, T.I. Kinetic analysis of permeation of mitochondria-targeted antioxidants across bilayer lipid membranes / T. I. Rokitskaya, S. S. Klishin, I. I. Severina, V. P. Skulachev, Y. N. Antonenko // J. Membr. Biol. – 2008. – Vol. 224. – P. 9-19.

**345.** Romashchenko, V. P. Mitochondria-targeted compounds decrease TNF-a-dependent endothelium activation / V. P. Romashchenko, I. I. Galkin, V. V. Zakharova, O. Y. Pletjushkina, B. V. Chernyak, R. A. Zinovkin, E. N. Popova // FEBS J. – 2013. – Vol. 280 (Suppl. 1). – P. 246.

**346.** Romashchenko, V. P. Low concentrations of uncouplers of oxidative phosphorylation prevent inflammatory activation of endothelial cells by tumor necrosis factor / V. P. Romaschenko, R. A. Zinovkin, I. I. Galkin, V. V. Zakharova, A. A. Panteleeva, A. V. Tokarchuk, K. G. Lyamzaev, O. Y. Pletjushkina, B. V. Chernyak, E. N. Popova // Biochemistry (Mosc). – 2015. – Vol. 80. – P. 610-619.

**347.** Rosen, P. The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society P. Rosen, P. P. Nawroth, G. King, W. Moller, H. J. Tritschler, L. Packer // Diabetes Metabolism Research and Reviews. – 2001. – Vol. 17. – P. 289-212.

**348.** Rosenbaum, C. C. Antioxidants and antiinflammatory dietary supplements for osteoarthritis and rheumatoid arthritis / C. C. Rosenbaum, D. P. O'Mathuna, M. K. Chavez Shields // Alternat. Therap. Health Med. – 2010. – Vol.16. – P. 32-40.

**349.** Rosloniec, E. F. Collagen-induced arthritis / E. F. Rosloniec, M. Cremer, A. Kang, L. K. Myers // Current protocols in immunology, Chapter 15, 2001. – Unit 15.5.

**350.** Ruan, Y. SIRT1 suppresses doxorubicin-induced cardiotoxicity by regulating the oxidative stress and p38MAPK pathways / Y. Ruan, C. Dong, J. Patel, C. Duan, X. Wang, X. Wu, Y. Cao, L. Pu, D. Lu, T. Shen, J. Li // Cell Physiol. Biochem. – 2015. – Vol. 35. – P. 1116-1124.

**351.** Ruben, Z. Non-proliferative lesions of the heart and vasculature in rat / Z. Ruben, R. J. Arceo, S. P. Bishop, M. R. Elwell, W. D. Kerns, G. M. Mesfin, G. E. Sandusky, J. F. Van Vleet // Guides for Toxicologic Pathology. - STP/ARP/AFIP, Washington DC. - 1992. - 10 c.

**352.** Russell, L. D. Histological and histopathological evaluation of the testis / L. D. Russell, R. A. Ettlin, A. P. Sinha Nikim, E. D. Clegg – Clearwater, FL: Cache River Press, 1990. – 286 p.

**353.** Saksela, M. Irreversible conversion of xanthine dehydrogenase into xanthine oxidase by a mitochondrial protease / M. Saksela, R. Lapatto, K. O. Raivio // FEBS Lett. – 1999. – Vol. 443. – P.117-120.

**354.** Sanchez-Barcelo, E. J. Clinical uses of melatonin: evaluation of human trials / E. J. Sanchez-Barcelo, M. D. Mediavilla, D. X. Tan, R. J. Reiter // Curr. Med. Chem. – 2010. – Vol. 17. – P. 2070-2095.

**355.** Sanjuán-Pla, A. A targeted antioxidant reveals the importance of mitochondrial reactive oxygen species in the hypoxic signaling of HIF-1alpha / A. Sanjuán-Pla, A. M. Cervera, N. Apostolova, R. Garcia-Bou, V. M. Víctor, M. P. Murphy, K. J. McCreath // FEBS Lett. – 2005. – Vol. 579. – P. 2669-2674.

**356.** Saprunova, V. B. Lipofuscin granule dynamics during development of age-related macular degeneration / V. B. Saprunova, D. I. Pilipenko, A. V. Alexeevsky, A. Zh. Fursova, N. G. Kolosova, L. E. Bakeeva // Biochemistry (Mosc). – 2010. – Vol. 75. – P. 130-138.

**357.** Saprunova, V. B. SkQ1 slows development of age-dependent destructive processes in retina and vascular layer of eyes of wistar and OXYS rats / V. B. Saprunova, M. A. Lelekova, N. G. Kolosova, L. E. Bakeeva // Biochemistry (Mosc). – 2012. – Vol. 77. – P. 648-658.

**358.** Saretzki, G. MitoQ counteracts telomere shortening and elongates lifespan of fibroblasts under mild oxidative stress / G. Saretzki, M. P. Murphy, T. von Zglinicki // Aging Cell. – 2003. – Vol. 2. – P. 141-143.

**359.** Schäfer, M. Role of redox signaling in the autonomous proliferative response of endothelial cells to hypoxia / M. Schäfer, C. Schäfer, N. Ewald, H. M. Piper, T. Noll Circ. Res. – 2003. – Vol. 92. – P. 1010-1015.

**360.** Schmidt, S.P. Misfolding of short-chain acyl-CoA dehydrogenase leads to mitochondrial fission and oxidative stress / S. P. Schmidt, T. J. Corydon, C. B. Pedersen, P. Bross, N. Gregersen // Mol. Genet. Metab. – 2010. – Vol. 100. P. 155-162.

**361.** Schriner, S. E. Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria / S. E. Schriner, N. J. Linford, G. M. Martin, P. Treuting, C. E. Ogburn, M. Emond, P.E. Coskun, W. Ladiges, N. Wolf, H. Van Remmen, D.C. Wallace, P.S. Rabinovitch // Science. – 2005. – Vol. 308. – P. 1909–1911.

**362.** Schroeder, P. Cellular response to infrared radiation involves retrograde mitochondrial signaling / P. Schroeder, C. Pohl, C. Calles, C. Marks, S. Wild, J. Krutmann // Free Radic. Biol. Med. – 2007. – Vol. 43. – P. 128-135.

**363.** Sellers, R. S. Society of Toxicologic Pathology position paper: organ weight recommendations for toxicology studies / R. S. Sellers, D. Morton, B. Michael, N. Roome, J. K. Johnson, B. L. Yano, R. Perry, K. Schafer // Toxicol. Pathol. – 2007. – Vol.35. – P.751-755.

**364.** Semenza, G. L. O2-regulated gene expression: transcriptional control of cardiorespiratory physiology by HIF-1 / G. L. Semenza // J. Appl. Physiol. – 2004. – Vol. 96. – P. 1173–1177.

**365.** Severin, F. F. Penetrating cation/fatty acid anion pair as a mitochondria-targeted protonophore / F. F. Severin, I. I. Severina, Y. N. Antonenko, T. I. Rokitskaya, D. A. Cherepanov, E. N. Mokhova, M. Y. Vyssokikh, A. V. Pustovidko, O. V. Markova, L. S. Yaguzhinsky, G. A. Korshunova, N. V. Sumbatyan, M. V. Skulachev, V. P. Skulachev // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 2010. – Vol. 197. – P. 663-668.

**366.** Shipounova, I. N. Reactive oxygen species produced in mitochondria are involved in age-dependent changes of hematopoietic and mesenchymal progenitor cells in mice. A study with the novel mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 / I. N. Shipounova, D. A. Svinareva, T. V. Petrova, K. G. Lyamzaev, B. V. Chernyak, N. I. Drize, V. P. Skulachev // Mech. Ageing Dev. – 2010. – Vol. 131. – P. 415-421.

**367.** Sies, H. Oxidative Stress II. Oxidants and antioxidants / H. Sies. – London: Academic Press,1991. - 368 p.

**368.** Silachev, D. N. The mitochondria-targeted antioxidants and remote kidney preconditioning ameliorate brain damage through kidney-to-brain cross-talk / D. N. Silachev, N. K. Isaev, I. B. Pevzner, L. D. Zorova, E. V. Stelmashook, S. V. Novikova, E. Y. Plotnikov, V. P. Skulachev, D. B. Zorov // PLoS One. – 2012. – Vol. 7. – E 51553.

**369.** Silachev, D. N. The Mitochondrion as a Key Regulator of Ischaemic Tolerance and Injury / D. N. Silachev, E. Y. Plotnikov, I. B. Pevzner, L. D. Zorova, V. A. Babenko, S. D. Zorov, V. A. Popkov, S. S. Jankauskas, V. P. Zinchenko, G. T. Sukhikh, D. B. Zorov // Heart Lung Circ. – 2014. – Vol. 23 – P. 897-904.

**370.** Simmonds, R. E. Signalling, inflammation and arthritis: NF-kappaB and its relevance to arthritis and inflammation / R. E. Simmonds, B. M. Foxwell // Rheumatology. – 2008. – Vol. 47. – P. 584-590.

**371.** Skulachev V. P. Mitochondria-targeted antioxidants as promising drugs for treatment of age-related brain diseases / V. P. Skulachev // J. Alzheimers Dis. – 2012. – Vol. 28. – P. 283-289.

**372.** Skulachev, M. V. Mitochondrial-targeted plastoquinone derivatives. Effect on senescence and acute age-related pathologies / M. V. Skulachev, Y. N. Antonenko, V. N. Anisimov, B. V. Chernyak, D. A. Cherepanov, V. A. Chistyakov, M. V. Egorov, N. G. Kolosova, G. A. Korshunova, K. G. Lyamzaev, E. Y. Plotnikov, V. A. Roginsky, A. Y. Savchenko, I. I. Severina, F. F. Severin, T. P. Shkurat, V. N. Tashlitsky, K. M. Shidlovsky, M. Y. Vyssokikh, A. A. Zamyatnin Jr., D. B. Zorov, V. P. Skulachev // Curr. Drug Targets. – 2011. – Vol. 12. – P. 800-826.

**373.** Skulachev, V. P. How to clean the dirtiest place in the cell: cationic antioxidants as intramitochondrial ROS scavengers / V. P. Skulachev // IUBMB Life. – 2005. – Vol. 57. – P. 305-310.

**374.** Skulachev, V. P. SkQ1 treatment and food restriction--two ways to retard an aging program of organisms / V. P. Skulachev // Aging (Albany NY). – 2011. – Vol. 3. – P. 1045-1050.

**375.** Skulachev, V. P. A biochemical approach to the problem of aging: "megaproject" on membrane-penetrating ions. The first results and prospects / Skulachev V. P. Biochemistry (Mosc). – 2007. – Vol. 72. – P. 1385-1396.

**376.** Skulachev, V. P. An attempt to prevent senescence: a mitochondrial approach / V. P. Skulachev, V. N. Anisimov, Y. N. Antonenko, L. E. Bakeeva, B. V. Chernyak, V. P. Erichev, O. F. Filenko, N. I. Kalinina, V. I. Kapelko, N. G. Kolosova, B. P. Kopnin, G. A. Korshunova, M. R. Lichinitser, L. A. Obukhova, E. G. Pasyukova, O. I. Pisarenko, V. A .Roginsky, E. K. Ruuge, I. I. Senin, I. I. Severina, M. V. Skulachev, I. M. Spivak, V. N. Tashlitsky, V. A. Tkachuk, M. Y. Vyssokikh, L. S. Yaguzhinsky, D. B. Zorov // Biochim. Biophys. Acta. – 2009. – Vol. 1787. – P. 437-461.

**377.** Skulachev, V. P. New data on biochemical mechanism of programmed senescence of organisms and antioxidant defense of mitochondria / V. P. Skulachev // Biochemistry (Mosc). – 2009. – Vol. 74. – P. 1400-1403.

**378.** Skulachev, V. P. Prevention of cardiolipin oxidation and fatty acid cycling as two antioxidant mechanisms of cationic derivatives of plastoquinone (SkQs) / V. P. Skulachev, Y. N. Antonenko, D. A. Cherepanov, B. V. Chernyak, D. S. Izyumov, L. S. Khailova, S. S. Klishin, G. A. Korshunova, K. G. Lyamzaev, O. Y. Pletjushkina, V. A. Roginsky, T. I. Rokitskaya, F. F. Severin, I. I. Severina, R. A. Simonyan, M. V. Skulachev, N. V. Sumbatyan, E. I. Sukhanova, V. N. Tashlitsky, T. A. Trendeleva, M. Y. Vyssokikh, R. A. Zvyagilskaya // Biochim. Biophys. Acta. – 2010. – Vol. 1797. – P.878-889.

**379.** Skulachev, V. P. Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants. / V. P. Skulachev // Q. Rev. Biophys. – 1996. – Vol. 29. – P. 169–202.

**380.** Skulachev, V. P. What is "phenoptosis" and how to fight it? / V. P. Skulachev // Biochemistry (Mosc). – 2012. – Vol. 77. – P. 689-706.

**381.** Skulachev, V.P. Cationic antioxidants as a powerful tool against mitochondrial oxidative stress / V. P. Skulachev // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2013. – Vol. 441. – P. 275-279.

**382.** Smith, R. A. Selective targeting of an antioxidant to mitochondria / R. A. Smith, C. M. Porteous, C. V. Coulter, M. P. Murphy // Eur. J. Biochem. – 1999. – Vol. 263. – P. 709-716.

**383.** Smith, R.A. Animal and human studies with the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ / R.A. Smith, M. P. Murphy // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2010. – Vol. 1201. –P. 96-103.

**384.** Snow, B.J. A double-blind, placebo-controlled study to assess the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ as a disease-modifying therapy in Parkinson's disease / B. J. Snow, F. L. Rolfe, M. M. Lockhart, C. M. Frampton, J. D. O'Sullivan, V. Fung, R. A. Smith, M. P. Murphy, K. M. Taylor; Protect Study Group // Mov. Disord. – 2010. – Vol. 25. – P. 1670-1674.

**385.** Snytnikova, O. A. The therapeutic effect of mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 and Cistanche deserticola is associated with increased levels of tryptophan and kynurenine in the rat lens / O. A. Snytnikova, Y. P. Tsentalovich, N. A. Stefanova, A. Zh. Fursova., R. Kaptein, R. Z. Sagdeev, N. G. Kolosova // Dokl. Biochem. Biophys. – 2012. – Vol. 447. – P. 300-303.

**386.** Solesio, M. E. The mitochondria-targeted anti-oxidant MitoQ reduces aspects of mitochondrial fission in the 6-OHDA cell model of Parkinson's disease // M.E. Solesio, T. A. Prime, A. Logan, M. P. Murphy, M. Del Mar Arroyo-Jimenez, J. Jordán, M. F. Galindo // Biochim. Biophys. Acta. – 2013. – Vol. 1832. – P. 174-182.

**387.** Son, W. C. Factors contributory to early death of young cd-1 mice in carcinogenicity studies / W. C. Son // Toxicol. Lett. - 2003. - Vol. 145. - P. 88-98.

**388.** Sopel, M.J. Myocardial fibrosis in response to angiotensin ii is preceded by the recruitment of mesenchymal progenitor cells / M. J. Sopel, N. L. Rosin, T. D. Lee, J. F. Legare // Lab. Invest. - 2011. - Vol. 91. - P. 565-578.

**389.** Speakman, J.R. The free-radical damage theory: Accumulating evidence against a simple link of oxidative stress to ageing and lifespan / J. R. Speakman, C. Selman // Bioessays. – 2011. – Vol. 33. – P. 255–259.

**390.** Srinivasan, K. Animal models in type 2 diabetes research: an overview / K. Srinivasan, P. Ramarao // Indian J. Med. Res. – 2007. – Vol. 125. – P. 451-472.

**391.** Srinivasan, S. Role of mitochondrial reactive oxygen species in osteoclast differentiation / S. Srinivasan, A. Koenigstein, J. Joseph, L. Sun, B. Kalyanaraman, M. Zaidi, N. G. Avadhani // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2010. – Vol. 1192. – P. 245-252.

**392.** Stefanova, N. A. Alzheimer's disease-like pathology in senescence-accelerated OXYS rats can be partially retarded with mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 / N. A. Stefanova, N. A. Muraleva, V. P. Skulachev, N. G. Kolosova // J. Alzheimers Dis. – 2014. – Vol. 38. – P. 681-694.

**393.** Stefanova, N. A. Behavioral effects induced by mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 in Wistar and senescence-accelerated OXYS rats / N. A. Stefanova, A. Zh. Fursova, N. G. Kolosova // J. Alzheimers Dis. – 2010. – Vol. 21. – P. 479-491.

**394.** Storz, G. Oxidative stress / G. Storz, J. A. Imlay //Cur. Opin. Microbiol. - 1999. - Vol.2. – P.188-194.

**395.** Sun, C. Carbon ion beams induce hepatoma cell death by NADPH oxidase-mediated mitochondrial damage / C. Sun, Z. Wang, Y. Liu, Y. Liu, H. Li, C. Di, Z. Wu, L. Gan, H. Zhang // J. Cell Physiol. – 2014. – Vol. 229. – P. 100-107.

**396.** Supinski, G.S. MitoQ administration prevents endotoxin-induced cardiac dysfunction / G. S.Supinski, M. P. Murphy, L. A. Callahan // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. – 2009. – Vol. 297. – P. 1095-1102.

**397.** Suzuki, Y. J. Oxidants as stimulator of signal transduction / Y. J. Suzuki, H. J. Forman, A. Sevanian // Free Radic. Biol. Med. – 1997. - Vol.22. - P 269-285.

**398.** Tauskela, J.S. MitoQ--a mitochondria-targeted antioxidant / J. S. Tauskela // IDrugs. – 2007. – Vol. 10. – P. 399-412.

**399.** The Mouse in Biomedical Research, Vol.1-4 / J. Fox (ed.). – 2nd ed. –ACLAM series, Elsevier, 2006. – 2134 p.

**400.** Thoolen, B. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse hepatobiliary system / B. Thoolen, R. R. Maronpot, T. Harada, A. Nyska, C. Rousseaux, T. Nolte, D. E. Malarkey, W. Kaufmann, K. Küttler, U. Deschl, D. Nakae, R. Gregson, M. P. Vinlove, A. E. Brix, B. Singh, F. Belpoggi, J. M. Ward // Toxicol. Pathol. – 2010. – Vol.38 (7 Suppl). – P. 5S-81S.

**401.** Toxicologic pathology. Nonclinical safety assessment. – Boca Raton-London-New York: Taylor&Francis Group, CRC Press, 2013. – 1015 p.

**402.** Tschopp, J. NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? / J. Tschopp, K. Schroder // Nat. Rev. Immunol. – 2010. – Vol. 10. – P. 210-215.

**403.** Tse, H. M. Disruption of Innate-Mediated Proinflammatory Cytokine and Reactive Oxygen Species Third Signal Leads to Antigen-Specific Hyporesponsiveness / H. M. Tse, M. J. Milton, S. Schreiner, J. L. Profozich, M. Trucco, J. D. Piganelli // J. Immunol. – 2007. – Vol. 178. – P. 908-917.

**404.** Tsokos, M. Postmortem diagnosis of sepsis / M. Tsokos // Forensic Sci. Int. – 2007. – Vol.165. – P.155-164.

**405.** Tsutsui, H. Oxidative stress and heart failure / H. Tsutsui, S. Kinugawa, S. Matsushima // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. - 2011. - Vol. - 301. - P 2181-2190.

**406.** Tsybul'ko, E. A. Mitochondria-targeted plastoquinone derivative SkQ1 increases early reproduction of Drosophila melanogaster at the cost of early survival / E. A. Tsybul'ko, N. V. Roshina, O. Y. Rybina, E. G. Pasyukova // Biochemistry (Mosc). – 2010. – Vol. 75. – P. 265-268.

**407.** Tucker, M. J. Diseases of the Wistar Rat / M. J. Tucker - London: Taylor&Francis, 1997. – 254 p.

**408.** Turrens J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species / J. F. Turrens // J. Physiol. – 2003. – Vol. 552. – P. 335–344.

**409.** Tyurin, V. A. Interactions of cardiolipin and lyso-cardiolipins with cytochrome c and tBid: conflict or assistance in apoptosis. / V. A. Tyurin, Y. Y. Tyurina, A. N. Osipov, N. A. Belikova, L. V. Basova, A. A. Kapralov, H. Bayir, V. E. Kagan // Cell Death Differ. – 2007. – Vol. 14. – P. 872-875.

**410.** Underwood, J.C.E. General and systematic pathology / J.C.E. Underwood. – 5 edition. - Churchill Livingstone, 2009. – 872 p.

**411.** Valcarcel-Ares, M. N. Mitochondrial dysfunction promotes and aggravates the inflammatory response in normal human synoviocytes / M. N. Valcarcel-Ares, R. R.

Riveiro-Naveira, C. Vaamonde-Garcia, Loureiro J., L. Hermida-Carballo, F. J. Blanco, M. J. Lopez-Armada // Rheumatology. – 2014. – Vol. 53. – P. 1332-1343.

**412.** Valencia, A. 7-Dehydrocholesterol enhances ultraviolet A-induced oxidative stress in keratinocytes: roles of NADPH oxidase, mitochondria, and lipid rafts / A. Valencia, A. Rajadurai, A. B. Carle, I.E. Kochevar // Free Radic. Biol. Med. – 2006. – Vol. 41. – P. 1704-1718.

**413.** Van Reyk, D. M. Oxidative stress and diabetes / D. M. Van Reyk, M. C. Gillies, M. Davies // J. Redox Rept. - 2003. - Vol. 8. - P. 187-192.

**414.** Vays, V. B. Antioxidant SkQ1 delays sarcopenia-associated damage of mitochondrial ultrastructure / V. B. Vays, C. M. Eldarov, I. M. Vangely, N. G. Kolosova, L. E. Bakeeva, V. P. Skulachev // Aging (Albany NY). – 2014. – Vol. 6. – P. 140-148.

**415.** Vergeade, A. Mitochondrial impairment contributes to cocaine-induced cardiac dysfunction: Prevention by the targeted antioxidant MitoQ / A. Vergeade, P. Mulder, C. Vendeville-Dehaudt, F. Estour, D. Fortin, R. Ventura-Clapier, C. Thuillez, C. Monteil // Free Radic. Biol. Med. – 2010. – Vol. 49. – P. 748-756.

**416.** Villalba, J.M. Therapeutic use of coenzyme Q10 and coenzyme Q10-related compounds and formulations / J.M. Villalba, C. Parrado, M. Santos-Gonzalez, F. J. Alcain // Expert Opin. Investig. Drugs. – 2010. – Vol. 19. – P. 535-554.

**417.** Vlachantoni, D. Evidence of severe mitochondrial oxidative stress and a protective effect of low oxygen in mouse models of inherited photoreceptor degeneration / D. Vlachantoni, A. N. Bramall, M. P. Murphy, R. W. Taylor, X. Shu, B. Tulloch, T. Van Veen, D. M. Turnbull, R. R. McInnes, A. F. Wright // Hum. Mol. Genet. – 2011. – Vol. 20. – P. 322-335.

**418.** Walker, R. Age changes in the rat's exorbital lacrimal gland / R. Walker // Anat. Rec. – 1958. – Vol. 132. – P. 49-69.

**419.** Walters, D.M. Oxidative stress and antioxidants in the pathogenesis of pulmonary fibrosis: a potential role for Nrf2 / D. M. Walters, H. Y. Cho, S. R. Kleeberger // Antioxidants&redox signaling. - 2008. - Vol. 10. - P. 321-332.

**420.** Wang, J. G. Disorders in angiogenesis and redox pathways are main factors contributing to the progression of rheumatoid arthritis: a comparative proteomics study / J. G. Wang, W. D. Xu, W. T. Zhai, Y. Li, J. W. Hu, B. Hu, M. Li, L. Zhang, W. Guo, J. P. Zhang, L. H. Wang, B. H. Jiao // Arthrit. Rheumat. – 2012. – Vol. 64. – P. 993-1004.

**421.** Wang, X. High selenium impairs hepatic insulin sensitivity through opposite regulation of ROS / Wang X., Zhang W., Chen H., Liao N., Wang Z., Zhang X., Hai C. // Toxicol. Lett. – 2014. – Vol. 224. – P. 16-23.

**422.** Wani, W.Y Protective efficacy of mitochondrial targeted antioxidant MitoQ against dichlorvos induced oxidative stress and cell death in rat brain / W.Y. Wani, S. Gudup, A. Sunkaria, A. Bal, P. P. Singh, R. J. Kandimalla, D. R. Sharma, K. D. Gill // Neuropharmacology. – 2011. – Vol. 61. – P. 1193-1201.

**423.** Ward, J.M. Grading of lesions / J. M. Ward, B. Thoolen // Toxicol. Pathol. – 2011. – Vol.39. – P.745-746.

**424.** Ward, J.M. Immunohistochemical markers for the rodent immune system / J. M. Ward, C. R. Erexson, L. J. Faucette, J. F. Foley, C. Dijkstra, G. Cattoretti // Toxicol. Pathol. – 2006. – Vol.34. – P.616-630.

**425.** Weber, L. W. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model / L. W. Weber, M. Boll, A. Stampfl // Crit. Rev. Toxicol. – 2003. – Vol. 33. – P. 105-136.

**426.** Wei, Y. H. Oxidative stress and mitochondrial DNA mutations in human aging / Y. H. Wei // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. – 1998. – Vol. 217. – P. 53–63.

**427.** Weisiger, R. A. Superoxide dismutase: organelle specificity / R. A. Weisiger, I. Fridovich // J. Biol. Chem. – 1973. – Vol. 248. – P. 3582–3592.

**428.** Wels, J. Migratory neighbors and distant invaders: tumor-associated niche cells / J. Wels, R. N. Kaplan, S. Rafii, D. Lyden // Genes Dev. – 2008. – Vol. 22. – P. 559-574.

**429.** Whiteman, M. Do mitochondriotropic antioxidants prevent chlorinative stress-induced mitochondrial and cellular injury? / M. Whiteman, J. P. Spencer, H. H. Szeto, J. S. Armstrong // Antioxid. Redox Signal. – 2008. – Vol. 10. – P. 641-650.

**430.** Williams, R. M. Innervation and mast cells of the rat exorbital lacrimal gland: the effects of age // R. M. Williams, J. Singh, K. A. Sharkey // J. Auton. Nerv. Syst. – 1994. – Vol. 47. – P. 95-108.

**431.** Wolff, K. J. Mechanical stress and ATP synthesis are coupled by mitochondrial oxidants in articular cartilage / K. J. Wolff, P. S. Ramakrishnan, M. J. Brouillette, B. J. Journot, T. O. McKinley, J. A. Buckwalter, J. A. Martin // J. Orthop. Res. – 2013. – Vol. 31. – P. 191-196.

**432.** Yang, Y. In vivo immunoregulatory properties of the novel mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 / Y. Yang, S. Karakhanova, S. Soltek, J. Werner, P. P. Philippov, A. V. Bazhin // Mol. Immunol. – 2012. – Vol. 52. – P. 19-29.

**433.** Yeh, Y. C. Protection by doxycycline against doxorubicin-induced oxidative stress and apoptosis in mouse testes / Y. C. Yeh, H. C. Lai, C. T. Ting, W. L. Lee, L. C. Wang, K. Y. Wang, H. C. Lai, T. J. Liu / Biochem. Pharmacol. – 2007. – Vol. 74. – P. 969-980.

**434.** Yu, D. H. Over-expression of extracellular superoxide dismutase in mouse synovial tissue attenuates the inflammatory arthritis / D. H. Yu, J. K. Yi, H. S. Yuh, S. Park, H. J. Kim, K. B. Bae, Y. R. Ji, N. R. Kim, S. J. Park, H. Kim do, S. H. Kim, M. O. Kim, J. W. Lee, Z. Y. Ryoo // Exp. Mol. Med. – 2012. – Vol. 44. – P. 529-535.

**435.** Yu, J.H. Suppression of cerulein-induced cytokine expression by antioxidants in pancreatic acinar cells / J. H. Yu, J. W. Lim, W. Namkung, H. Kim, K. H. Kim / Lab. Invest. – 2002. – Vol. 82. – P. 1359-1368.

**436.** Zeisberg, E. M. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis / E. M. Zeisberg, O. Tarnavski, M. Zeisberg, A. L. Dorfman, J. R. McMullen, E. Gustafsson, A. Chandraker, X. Yuan, W. T. Pu, A. B. Roberts, E. G. Neilson, M. H. Sayegh, S. Izumo, R. Kalluri // Nat. Med. - 2007. - Vol. 13. - P. 952-961.

**437.** Zhang, Q. Involvement of reactive oxygen species in 2-methoxyestradiol-induced apoptosis in human neuroblastoma cells / Q. Zhang, Y. Ma, Y. F. Cheng, W. J. Li, Z. Zhang, S. Y. Chen // Cancer Lett. – 2011. – Vol. 313. – P. 201-210.

**438.** Zhang, D. X. Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells / D. X. Zhang, D. D. Gutterman // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. - 2007. - Vol. 292. - P. 2023-2031.

**439.** Zhang, Q. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury / Q. Zhang, M. Raoof, Y. Chen, Y. Sumi, T. Sursal, W. Junger, K. Brohi, K. Itagaki, C. J. Hauser // Nature. – 2010. – Vol. 464. – P. 104-107.

**440.** Zhang, Y. Oxidative and nitrosative stress in the maintenance of myocardial function / Y. Zhang, C. G. Tocchetti, T. Krieg, A. L. Moens // Free Radic. Biol. Med. – 2012. – Vol. 53. – P. 1531-1540.

**441.** Zhou, J. Thioredoxin 1 and thioredoxin 2 have opposed regulatory functions on hypoxia-inducible factor-1alpha / J. Zhou, A. E.Damdimopoulos, G. Spyrou, B. Brüne J. Biol. Chem. – 2007. – Vol. 282. – P. 7482-7490.

**442.** Zinovkin, R.A. Role of mitochondrial reactive oxygen species in age-related inflammatory activation of endothelium / R.A. Zinovkin, V.P.Romaschenko, I.I. Galkin, V.V. Zakharova, O.Y. Pletjushkina, B.V. Chernyak, E.N. Popova // Aging (Albany NY). – 2014. – Vol.6. – P. 661-674.

**443.** Zlotnik, A. Chemokines in neoplastic progression / A. Zlotnik // Semin. Cancer Biol. – 2004. – Vol. 14. – P. 181-185.

**444.** Zorov, D. B. Perspectives of mitochondrial medicine / D. B. Zorov, N. K. Isaev, E. Y. Plotnikov, D. N. Silachev, L. D. Zorova, I. B. Pevzner, M. A. Morosanova, S. S. Jankauskas, S. D. Zorov, V. A. Babenko // Biochemistry (Mosc). – 2013. – Vol. 78. – P. 979-790.

**445.** Zorov, D. B. The phenoptosis problem: what is causing the death of an organism? Lessons from acute kidney injury / D. B. Zorov, E. Y. Plotnikov, S. S. Jankauskas, N. K. Isaev, D. N. Silachev, L. D. Zorova, I. B. Pevzner, N. V. Pulkova, S. D. Zorov, M. A. Morosanova // Biochemistry (Mosc). – 2012. – Vol. 77. – P. 742-753.

**446.** Zorov, D. B. Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes / D.B. Zorov, C.R. Filburn, L.O. Klotz, J.L. Zweier, S.J. Sollott // J. Exp. Med. – 2000. – Vol. 192. – P. 1001-1014.