

# НОРМАЛИЗАЦИЯ ПРОЦЕССОВ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ В МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ ПРИ РАЗВИТИИ ЛУЧЕВОЙ БОЛЕЗНИ ВОЗДЕЙСТВИЕМ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО КРАСНОГО СВЕТА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

УДК 612.015.11:612.273.2:577.7.001.57

Поступила 28.06.2013 г.



**С.Л. Малиновская**, д.б.н., профессор кафедры медицинской физики и информатики<sup>1</sup>;

**В.С. Ермолаев**, врач-радиолог<sup>2</sup>;

**А.П. Баврина**, к.б.н., доцент кафедры медицинской физики и информатики<sup>1</sup>;

**В.А. Монич**, д.б.н., профессор, зав. кафедрой медицинской физики и информатики<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород, 603005, пл. Минина и Пожарского, 10/1;

<sup>2</sup>Нижегородский областной онкологический диспансер, Н. Новгород, 603126, ул. Родионова, 190, корп. 5

**Цель исследования** — оценить уровень продуктов окислительной модификации белков (ОМБ) и перекисного окисления липидов (ПОЛ) в мышечной ткани крыс в процессе развития лучевой болезни при воздействии низкоинтенсивным красным светом на очаг облучения.

**Материалы и методы.** Исследованы уровень прямой и индуцированной ОМБ, а также параметры ПОЛ в мышечной ткани бедра крыс после воздействия ионизирующим излучением и при коррекции последствий облучения радиацией низкоинтенсивным красным светом. Интенсивность свободнорадикального окисления оценивали по содержанию продуктов ОМБ — алифатических альдегид- и кетон-динитрофенилгидразонов нейтрального и основного характера — и по уровню продуктов ПОЛ — диеновых конъюгатов, триеновых конъюгатов и оснований Шиффа. Для статистической обработки результатов использовали пакет прикладных программ SPSS.

**Результаты.** После воздействия на зону ионизирующего излучения низкоинтенсивным некогерентным красным светом в мышечной ткани крыс выявляется снижение интенсивности окислительных процессов — ОМБ и ПОЛ, т.е. происходит интенсификация процессов окисления. При последующем воздействии на ту же зону низкоинтенсивным красным светом наблюдается снижение уровня продуктов окисления.

**Заключение.** Воздействие низкоинтенсивным некогерентным красным светом на биологические ткани после облучения их ионизирующим излучением способствует снижению уровня накопления продуктов ПОЛ и ОМБ и препятствует развитию окислительного стресса.

**Ключевые слова:** свободнорадикальное окисление; ионизирующая радиация; низкоинтенсивный красный свет.

## English

## Normalization of Free-Radical Oxidation Processes in Muscular Tissue in Radiation Disease by Low-Intensity Red Light Exposure in Experiment

**S.L. Malinovskaya**, D.Bio.Sc., Professor, the Department of Medical Physics and Informatics<sup>1</sup>;

**V.S. Ermolayev**, Radiologist<sup>2</sup>;

**A.P. Bavrina**, PhD, Associate Professor, the Department of Medical Physics and Informatics<sup>1</sup>;

**V.A. Monich**, D.Bio.Sc., Professor, Head of the Department of Medical Physics and Informatics<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Nizhny Novgorod State Medical Academy, Minin and Pozharsky Square, 10/1, Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603005;

<sup>2</sup>Nizhny Novgorod Regional Oncological Hospital, Rodionova St., 190, Block 5, Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603126

Для контактов: Баврина Анна Петровна, тел. раб. +7 904-040-16-94; e-mail: annabavr@rambler.ru

**The aim of the investigation** was to assess the level of protein oxidative modification (POM) and lipid peroxidation (LP) products in muscular tissue of rats with radiation disease when exposed to low-intensity red light.

**Materials and Methods.** We studied the level of direct and induced POM, as well as LP parameters in rat femoral muscular tissue after ionizing radiation exposure and correction of radiation sequelae by low-intensity red light. Free-radical oxidation intensity was estimated by the content of POL products — neutral and basic aliphatic aldehyde- and cetone-dinitrophenylhydrazones; the level of LP products — diene conjugates, triene conjugates and Schiff's bases. SPSS software application package was used for statistical processing.

**Results.** Rat muscular tissue showed the decreased intensity of oxidative processes — POM and LP after the ionizing radiation area had been exposed to low-intensity incoherent red light, i.e., there was the intensification of oxidative processes. The following exposure of the same area to low-intensity red light resulted in decreased level of oxidation products.

**Conclusion.** The exposure of biological tissues to low-intensity incoherent red light after ionizing radiation contributes to the decrease of accumulation of POM and LP products and prevents from oxidative stress development.

**Key words:** free-radical oxidation; ionizing radiation; low-intensity red light.

В настоящее время проблема поиска эффективных радиопротекторов остается актуальной в связи с повсеместным использованием в медицине ионизирующих излучений. В результате экспонирования ионизирующими излучениями в тканях образуются ионы, возбужденные молекулы и свободные радикалы, при этом последние приводят к повреждению белков, липидов и молекул ДНК [1]. Известно [2], что низкоинтенсивный красный свет способствует активации антиоксидантных ферментов и, следовательно, может влиять на развитие реакций перекисного окисления липидов (ПОЛ) и окислительной модификации белков (ОМБ).

**Цель исследования** — оценка уровня продуктов окислительной модификации белков и перекисного окисления липидов в мышечной ткани крыс в процессе развития лучевой болезни при воздействии низкоинтенсивным красным светом на очаг облучения.

**Материалы и методы.** Работа проведена на беспородных белых крысах массой 180–250 г, которые были разделены на три группы. Контрольную группу составили 10 крыс, получивших локальную дозу облучения ионизирующей радиацией 9 Гр. Облучению подвергалась внутренняя сторона бедра площадью 1 см<sup>2</sup>. Облучение проводилось на установке «Луч-1» (Россия).

Вторая (опытная группа) включала в себя 10 крыс, получивших локальное облучение внутренней поверхности бедра ионизирующей радиацией по той же схеме и после этого три последовательных сеанса воздействия низкоинтенсивным широкополосным красным светом (ежедневно в течение 20 мин). Интенсивность широкополосного света в зоне светового пятна составила 5 мВт/см<sup>2</sup>. В эксперименте использовали свет сверхяркого светодиода с максимумом спектрального диапазона 630 нм и шириной на полувысоте 20 нм. Забор мышечной ткани бедра в контрольной и опытной группах производили на четвертые сутки.

В третью группу (интактная) вошли 10 животных, не подвергавшихся воздействию ни гамма-излучения, ни широкополосного красного света.

При проведении исследования неукоснительно соблюдались этические принципы, установленные Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (принятой в Страсбурге 18.03.1986 г. и подтвержденной в Страсбурге 15.06.2006 г.).

Интенсивность свободнорадикального окисления оценивали по содержанию продуктов ОМБ — алифатических альдегид- и кетон-динитрофенилгидразонов нейтрального и основного характера — и по уровню продуктов ПОЛ — диеновых конъюгатов (ДК), триеновых конъюгатов (ТК) и оснований Шиффа (ОШ).

Исследование ОМБ проводили по количеству карбонильных производных (по методу Е.Е. Дубининой) [3]: при 356 и 363 нм регистрировали алифатические альдегид-динитрофенилгидразоны нейтрального характера, при 370 нм — алифатические кетон-динитрофенилгидразоны нейтрального характера, при 430 и 530 — алифатические альдегид- и кетон-динитрофенилгидразоны основного характера.

Были исследованы спонтанная ОМБ и ОМБ, индуцированная пероксидом водорода и сульфатом железа. Если первый показатель характеризует конститутивную активность ОМБ, то второй демонстрирует приращение окислительной модификации белков после стимуляции, указывает на количество субстрата для ОМБ и возможность его вовлечения в эти процессы. В целом индуцированную ОМБ можно рассматривать как показатель устойчивости системы к окислению, индикатор стрессоустойчивости исследуемой ткани. Методика индуцированной ОМБ позволяет определить промежуточные продукты окисления, стимулируя их до образования конечных продуктов — карбонильных производных.

Уровень продуктов ПОЛ оценивали по методу И.А. Волчегорского в гептан-изопропанольных фракциях [4]. По данным автора, в гептане экстрагируются в основном нейтральные липиды, а в изопропаноле — фосфолипиды; таким образом, гептановая фракция свидетельствует об активности ПОЛ

в нейтральных липидах, а изопропанольная — в фосфолипидах.

Для статистической обработки результатов использовали пакет прикладных программ SPSS. Распределения большинства изучаемых параметров были нормальными или близкими к нормальным, что позволило использовать параметрический t-критерий Стьюдента для определения различий между двумя группами. Распределение продуктов ПОЛ нормальным не оказалось, поэтому был использован непараметрический критерий. Статистически значимыми считались различия при  $p \leq 0,05$ . Результаты представлены в виде  $M \pm \sigma$ , где  $M$  — среднее значение, а  $\sigma$  — среднее квадратичное отклонение.

**Результаты и обсуждение.** На первом этапе работы определяли содержание продуктов спонтанной ОМБ (алифатических альдегид- и кетон-динитрофенилгидразонов нейтрального и основного характера), выделенных из мышечной ткани бедра крыс, а также общего белка биуретовым методом в этих же пробах для последующего представления результатов в ед.опт.пл./г белка (табл. 1).

Полученные данные свидетельствуют о наличии статистически значимых изменений уровня ОМБ в опытной группе по сравнению с контрольной (кроме алифатических кетон-динитрофенилгидразонов основного характера, определяющихся при  $\lambda=530$  нм, что может быть связано с небольшим количеством этих продуктов в мышечной ткани крыс). Таким образом, после воздействия широкополосным красным светом на зону облучения животных гамма-излучением происходило достоверное снижение продуктов ОМБ. Кроме того, из табл. 1 видно, что различия между интактной и опытной группами отсутствуют, что свидетельствует о нормализации

процессов ОМБ после воздействия на образец низкоинтенсивным красным светом.

Следующей частью исследования было определение содержания промежуточных продуктов ОМБ в мышечной ткани бедра крыс (табл. 2).

Представленные данные свидетельствуют о том, что процесс образования промежуточных продуктов ОМБ в мышечной ткани крыс из контрольной группы идет более интенсивно. Статистически значимые различия получены при определении содержания всех промежуточных продуктов ОМБ, кроме алифатических кетон-динитрофенилгидразонов нейтрального характера. Таким образом, в биоматериале животных контрольной группы наблюдалось большее количество субстрата для ОМБ по сравнению с опытной группой. При сравнении результатов интактной и опытной групп статистически значимых различий не выявлено, что позволяет сделать вывод о корректирующем действии широкополосного красного света на ткани, облученные ионизирующей радиацией.

Последним этапом исследования стало определение продуктов липопероксидации в облученной мышечной ткани бедра крыс до и после воздействия красным светом. На этом этапе также получены статистически значимые различия в содержании первичных продуктов ПОЛ (ДК и ТК) и конечных продуктов (ОШ) в гомогенате тканей опытной и контрольной групп животных (табл. 3).

Полученные данные свидетельствуют, что воздействие на облученную мышечную ткань широкополосным красным светом приводит к статистически значимому снижению содержания промежуточных (ДК и ТК) и конечных (ОШ) продуктов ПОЛ. Как и при исследовании продуктов ОМБ, при анализе продуктов ПОЛ статистически значимых различий между интактной и опытной группами не выявлено, что

Т а б л и ц а 1

**Содержание алифатических альдегид- и кетон-динитрофенилгидразонов нейтрального и основного характера в мышечной ткани бедра крыс при спонтанной окислительной модификации белков, ед.оп.пл./г белка**

Длина волны, нм	Интактная группа	Контрольная группа	Опытная группа	p
356	0,320±0,039	0,530±0,061*	0,360±0,082**	0,021* 0,014**
363	0,340±0,044	0,540±0,058*	0,380±0,094**	0,034* 0,030**
370	0,380±0,060	0,550±0,070*	0,400±0,089**	0,030* 0,023**
430	0,190±0,023	0,340±0,034*	0,210±0,041**	0,004* 0,002**
530	0,029±0,011	0,048±0,016*	0,033±0,010	0,050* 0,445**

Примечание: здесь и далее содержание продуктов ОМБ — алифатических альдегид- и кетон-динитрофенилгидразонов нейтрального и основного характера — указано в соответствии с длинами волн, на которых у данных продуктов наблюдается максимум поглощения. \* — статистически значимые различия между интактной и контрольной группой; \*\* — между контрольной и опытной группами.

Таблица 2

Содержание алифатических альдегид- и кетон-динитрофенилгидразонов нейтрального и основного характера в мышечной ткани бедра крыс при индуцированной окислительной модификации белков, ед.оп.пл./г белка

Длина волны, нм	Интактная группа	Контрольная группа	Опытная группа	p
356	0,200±0,025	0,240±0,077*	0,210±0,029**	0,038* 0,046**
363	0,240±0,037	0,270±0,075*	0,250±0,044**	0,033* 0,050**
370	0,230±0,034	0,244±0,090	0,242±0,046	0,070* 0,060**
430	0,140±0,022	0,190±0,046*	0,150±0,025**	0,043* 0,050**
530	0,023±0,001	0,031±0,080*	0,025±0,007**	0,040* 0,050**

\* — статистически значимые различия между интактной и контрольной группами; \*\* — между контрольной и опытной группами.

Таблица 3

Содержание продуктов перекисного окисления липидов в мышечной ткани бедра крыс, отн. ед.

Продукты ПОЛ	Интактная группа	Контрольная группа	Опытная группа	p
ДК	0,210±0,020	0,240±0,049*	0,220±0,014**	0,045* 0,050**
ТК	0,200±0,035	0,220±0,043*	0,200±0,078**	0,050* 0,050**
ОШ	14,9±2,9	25,6±4,9*	16,6±4,4**	0,010* 0,020**

\* — статистически значимые различия между интактной и контрольной группами; \*\* — между контрольной и опытной группами.

говорит о приближении значений в опытной группе к норме.

Полученные результаты согласуются с литературными данными, свидетельствующими об активации процесса свободнорадикального окисления белков и липидов при различных патологических состояниях [5, 6]. Кроме того, имеющиеся на данный момент представления о механизмах фотобиологического действия красного света позволяют объяснить наблюдавшиеся эффекты нормализации уровня свободнорадикального окисления. Известно, что появляющиеся в процессе радиолитического активные формы кислорода вызывают накопление в тканях продуктов ОМБ и ПОЛ. Подобные эффекты наблюдались не только при воздействии ионизирующей радиацией, но и при наложении экспериментальной ишемии и возобновлении перфузии [7, 8], а также при развитии асфиксии [9]. Кроме того, последствия оксидативного стресса могут быть полностью или частично компенсированы действием низкоинтенсивного красного света. Подобные эффекты снижения содержания продуктов свободнорадикального окисления и активации антиоксидантных ферментов были экспериментально получены в работах [10, 11]. В основе

данных процессов лежат несколько фотохимических реакций. Во-первых, под действием красного света наблюдается высвобождение связанной с цитохром С-оксидазой окиси азота [12]; во-вторых, происходит активация супероксиддисмутазы и NO-синтазы [13]; в-третьих, наблюдается стимуляция процессов синтеза АТФ [14]. Каждая из этих реакций, а в особенности активация антиоксидантных ферментов, способна оказать существенное влияние на нормализацию процессов свободнорадикального окисления в поврежденных тканях. Например, окись азота, синтезируемая митохондриальной NO-синтазой, ингибирует дыхание вследствие образования связи с цитохром С-оксидазой [15]. Фотолиз этих молекулярных комплексов приводит к выходу свободной окиси азота и к реактивации переносчиков электронов в дыхательной цепи. В конечном итоге происходит восстановление процессов дыхания и активация синтеза молекул АТФ.

**Заключение.** Воздействие ионизирующего излучения на биологические ткани приводит к снижению активности антиоксидантной защиты и к активации свободнорадикальных процессов, выражающихся в повышении уровня продуктов окислительной моди-



фикации белков и перекисного окисления липидов. Последующее воздействие низкоинтенсивным некогерентным красным светом способствует снижению уровня накопления этих продуктов и препятствует развитию окислительного стресса в биологических тканях, подвергшихся воздействию ионизирующей радиации. Наблюдаемый эффект может быть связан с повышением активности антиоксидантных ферментов под действием широкополосного красного света.

**Финансирование исследования.** Работа выполнена за счет внебюджетных средств Нижегородской государственной медицинской академии.

**Конфликт интересов.** У авторов нет конфликта интересов.

## Литература

1. Ярмоненко С.П., Вайнсон А.А. Радиобиология человека и животных. М: Высшая школа; 2004; 549 с.
2. Чичук Т.В., Страшкевич И.А., Клебанов Г.И. Свободнорадикальные механизмы стимулирующего действия низкоинтенсивного лазерного излучения. Вестник Российской академии наук 1999; 2: 27–32.
3. Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А. и др. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения. Вопросы медицинской химии 1995; 41(1): 24–26.
4. Волчегорский И.А., Васильков А.Ю. Влияние аскорбиновой кислоты на ПОЛ и функциональное состояние нейтрофилов в ранние сроки после трансуретральной электрорезекции предстательной железы. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2000; 130(11): 516–518.
5. Биткина О.А., Копытова Т.В., Контрощикова К.Н., Баврина А.П. Уровень окислительного стресса у больных розацеа и обоснование терапевтического применения озono-кислородной смеси. Клиническая лабораторная диагностика 2010; 4: 13–16.
6. Turi J.L., Yang F., Garrick M.D., Piantadosi C.A., Ghio A.J. The iron cycle and oxidative stress in the lung. *Free Rad Biol Med* 2004; 36(7): 850–857, <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2003.12.008>.
7. Tavazzi B., Di Pierro D., Bartolini M., Marino M., Distefano S., Galvano M., Villani C., Giardina B., Lazzarino G. Lipid peroxidation, tissue necrosis, and metabolic and mechanical recovery of isolated reperfused rat heart as a function of increasing ischemia. *Free Radic Res* 1998; 28: 25–37.
8. Мониц В.А., Малиновская С.Л., Крылов В.Н. Влияние низкоинтенсивного красного света на функциональное состояние сердечно-сосудистой системы и крови крыс при моделировании клинической смерти. *Современные технологии в медицине* 2011; 1: 11–14.
9. Баврина А.П., Мониц В.А., Дружинин Е.А., Нестеров С.Л. Коррекция нарушений работы сердца крыс при воздействии низкоинтенсивным красным светом после моделирования асфиксии. *Медицинский академический журнал* 2010; 10(5): 44.
10. Малиновская С.Л., Мониц В.А., Артифексова А.А. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения и широ-

кополосного красного света на миокард при экспериментальной ишемии. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2008; 5: 509–511.

11. Monich V., Drugova O., Lazukin V., Bavrina A. Low-power light and isolated rat hearts after ischemia of myocardium. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 2011; 105: 21–24, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2011.06.006>.

12. Zhang R., Mio Y., Pratt P.F., Lohr N., Wartier D.C., Whelan H.T., Zhu D., Jacobs E.R., Medhora M., Bienengraeber M. Near infrared light protects cardiomyocytes from hypoxia and reoxygenation injury by a nitric oxide dependent mechanism. *J Mol Cell Cardiol* 2009; 46: 4–14, <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2008.09.707>.

13. Moriyama Y., Nguyen J., Akens M., Moriyama E.H., Lilje L. In vivo effects of low level laser therapy on inducible nitric oxide synthase. *Lasers Surg Med* 2009; 41: 227–231, <http://dx.doi.org/10.1002/lsm.20745>.

14. Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J Photochem Photobiol B: Biology* 1999; 49: 1–17, [http://dx.doi.org/10.1016/S1011-1344\(98\)00219-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1011-1344(98)00219-X).

15. Mason M.G., Nicholls P., Wilson M.T., Cooper C.E. Nitric oxide inhibition of respiration involves both competitive (heme) and noncompetitive (copper) binding to cytochrome c oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 708–713, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0506562103>.

## References

1. Yarmonenko S.P., Vaynson A.A. *Radiobiologiya cheloveka i zhivotnykh* [Human and animal radiobiology]. Moscow: Vysshaya shkola; 2004; 549 p.
2. Chichuk T.V., Strashkevich I.A., Klebanov G.I. Free-radical mechanisms of a stimulating effect of low-intensity laser radiation. *Vestnik Rossiyskoy akademii nauk* 1999; 2: 27–32.
3. Dubinina E.E., Burmistrov S.O., Khodov D.A., et al. Protein oxidative modification of human serum, the technique of its determination. *Voprosy meditsinskoy khimii* 1995; 41(1): 24–26.
4. Volchegorskiy I.A., Vasil'kov A.Yu. The effect of ascorbic acid on lipid peroxidation and functional state of neutrophils in an early period after transurethral prostate electroresection. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2000; 130(11): 516–518.
5. Bitkina O.A., Kopytova T.V., Kontorshchikova K.N., Bavrina A.P. Oxidative stress level in rosacea patients and validation of therapeutic application of ozone-oxygen mixture. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika* 2010; 4: 13–16.
6. Turi J.L., Yang F., Garrick M.D., Piantadosi C.A., Ghio A.J. The iron cycle and oxidative stress in the lung. *Free Rad Biol Med* 2004; 36(7): 850–857, <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2003.12.008>.
7. Tavazzi B., Di Pierro D., Bartolini M., Marino M., Distefano S., Galvano M., Villani C., Giardina B., Lazzarino G. Lipid peroxidation, tissue necrosis, and metabolic and mechanical recovery of isolated reperfused rat heart as a function of increasing ischemia. *Free Radic Res* 1998; 28: 25–37.
8. Monich V.A., Malinovskaya S.L., Krylov V.N. Influence of a low-intensive red light on a functional state of the rat cardiovascular system and blood at a clinical death simulation. *Sovremennyye tehnologii v medicine* 2011; 1: 11–14.
9. Bavrina A.P., Monich V.A., Druzhinin E.A.,

Nesterov S.L. Correction of rat cardiac disorders by low-intensity red light radiation after asphyxia simulation. *Meditsinskiy akademicheskij zhurnal* 2010; 10(5): 44.

10. Malinovskaya S.L., Monich V.A., Artifeksova A.A. The effect of low-intensity laser radiation and broad-band red light on myocardium in experimental ischemia. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2008; 5: 509–511.

11. Monich V., Drugova O., Lazukin V., Bavrina A. Low-power light and isolated rat hearts after ischemia of myocardium. *J Photochem Photobiol B* 2011; 105: 21–24, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2011.06.006>.

12. Zhang R., Mio Y., Pratt P.F., Lohr N., Wartier D.C., Whelan H.T., Zhu D., Jacobs E.R., Medhora M., Bienengraeber M. Near infrared light protects cardiomyocytes from hypoxia and reoxygenation injury by a nitric oxide

dependent mechanism. *J Mol Cell Cardiol* 2009; 46: 4–14, <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2008.09.707>.

13. Moriyama Y., Nguyen J., Akens M., Moriyama E.H., Lilge L. In vivo effects of low level laser therapy on inducible nitric oxide synthase. *Lasers Surg Med* 2009; 41: 227–231, <http://dx.doi.org/10.1002/lsm.20745>.

14. Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J Photochem Photobiol B* 1999; 49: 1–17, [http://dx.doi.org/10.1016/S1011-1344\(98\)00219-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1011-1344(98)00219-X).

15. Mason M.G., Nicholls P., Wilson M.T., Cooper C.E. Nitric oxide inhibition of respiration involves both competitive (heme) and noncompetitive (copper) binding to cytochrome c oxidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 708–713, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0506562103>.