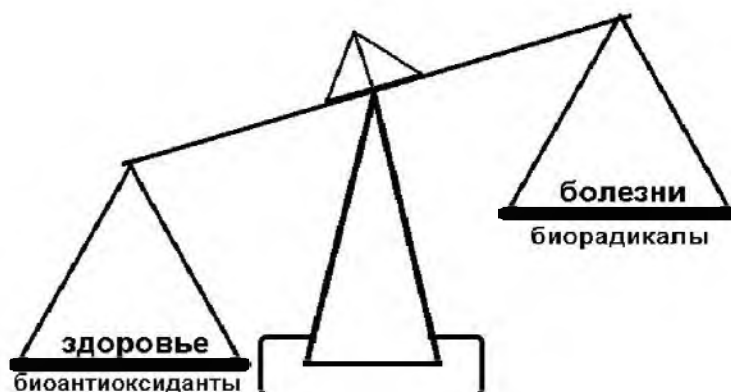


МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ (БГУ)

В.А. Костюк,
А.И.Потапович

БИОРАДИКАЛЫ И БИОАНТИОКСИДАНТЫ



Минск 2004

УДК 577.121.7+577.125.+577.16+616-008

Авторы
В.А. Костюк, А.И.Потапович

Рецензенты:

Доктор химических наук, профессор *О. И. Шадыро*;
Доктор биологических наук, профессор *Т. С. Морозкина*.

Рекомендовано Ученым Советом биологического факультета БГУ
29.04. 2004 г., протокол № 8

Биорадикалы и биоантиоксиданты: Монография. В.А. Костюк,
А.И.Потапович. – Мн.: БГУ, 2004. – 174 с.

В монографии изложены современные представления о классификации, физико-химических свойствах, механизмах образования активных форм кислорода и других биорадикалов. Рассмотрены молекулярные основы их физиологического и патогенетического действия в организме, проанализированы пути детоксикации биорадикалов с помощью ферментативной защитной системы. Обобщены и проанализированы особенности взаимодействия биорадикалов с различными группами низкомолекулярных соединений-антиоксидантов, объединенных термином биоантиоксиданты. Особое внимание уделено флавоноидам, одной из наиболее интересных и интенсивно изучаемых групп природных антиоксидантов.

Предназначена для студентов, аспирантов, научных сотрудников и медицинских работников, интересующихся проблемами свободнорадикальной биологии и медицины.

Табл. 29, Ил. 39. Библиогр. 598 назв.

УДК 577.121.7+577.125.+577.16+616-008

ББК72я73

© В.А. Костюк, А.И.Потапович., 2004

©БГУ, 2004

ISBN

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	4
Глава 1. Биорадикалы.....	6
1.1. Классификация и номенклатура	6
1.2. Физико-химические свойства биорадикалов	8
1.3. Образование и роль биорадикалов в аэробных организмах.....	19
1.3.1. Физиологически значимые пути образования биорадикалов	20
1.3.2. Нефизиологическая продукция биорадикалов	23
1.4. Механизмы детоксикации биорадикалов в организме	35
Литература.....	50
Глава 2. Флавоноиды.....	74
2.1 Классификация флавоноидов	76
2.2 Физико-химические свойства флавоноидов.....	82
2.3 Краткий обзор методов получения и анализа флавоноидов	99
2.4 Биологическая активность флавоноидов	103
2.4.1 Р-витаминная активность.....	105
2.4.2 Антиоксидантная активность.....	106
2.4.2.1 Антирадикальная активность флавоноидов в физико-химических системах	107
2.4.2.2 Антирадикальная активность флавоноидов в бесклеточных биологических системах.....	113
2.4.2.3 Защитное действие флавоноидов в условиях клеточного окислительного стресса	134
2.4.3 Прооксидантное действие флавоноидов.....	140
2.5 Влияние ионов металлов на биологическую активность природных флавоноидов	145
2.6 Перспективы терапевтического использования флавоноидов при некоторых распространенных заболеваниях	159
Литература	160

ВВЕДЕНИЕ

В конце 60-х годов было установлено, что в клетках аэробных организмов образуется анион-радикал кислорода и выявлена специальная ферментная система, обеспечивающая его детоксикацию. В результате этого открытия и последовавших за ним исследований стало ясно, что образование свободных радикалов в организме не является каким-то исключительным событием, имеющим место только при редких патологических состояниях, а, напротив, биорадикалы и продукты их взаимодействия с органическими молекулами – пероксиды, образуются как побочные, а иногда и как основные продукты метаболизма. В нормально функционирующих клетках аэробных организмов уровень биорадикалов поддерживается на оптимальном уровне благодаря наличию сложной, многоуровневой системы антирадикальной защиты. Однако развитие промышленного производства и антропогенное воздействие на биосферу, связанное с другими видами человеческой деятельности, сформировали к началу 21 века агрессивную по отношению к живым организмам окружающую среду. Токсичные ксенобиотики, поступающие с продуктами питания, питьевой водой и вдыхаемым воздухом, ионизирующая радиация и жесткое ультрафиолетовое излучение стимулируют повышенное образование в организме биорадикалов. Сложившаяся ситуация усугубляется тем, что современная технология приготовления пищи и рафинирование продуктов питания ведут к снижению потребления природных антиоксидантов, необходимых для защиты организма от повреждающего действия биорадикалов и предупреждения развития окислительного стресса. Известно, что умеренный окислительный стресс может стимулировать пролиферацию клеток или, напротив, запустить реализацию программы гибели клетки – апоптоз. Сильный окислительный стресс ведет к повреждению цитоскелета и хромосомного аппарата и в итоге – гибели клеток и некрозу ткани. СПИД, рак, сердечно-сосудистые патологии, диабет, ревматоидный артрит, а также эпилепсия, катаракты и многие другие заболевания сопровождаются развитием окислительного стресса. Поэтому в настоящее время не вызывает сомнений целесообразность использования в качестве средств профилактики и терапии соединений-антиоксидантов. В химическом смысле антиоксидантами являются вещества, способные взаимодействовать с пероксильными радикалами (алкилпероксилами) и обрывать процесс цепного свободнорадикального окисления, а также способные ингибировать окисление органических соединений, акцептируя алкильные радикалы. Такими соединениями яв-

ляются различные фенолы, как правило, пространственно затрудненные, ароматические амины, нитроксильные радикалы и хиноны. В живых организмах ингибирующим действием в отношении процессов свободно-радикального окисления обладает значительно более широкая группа веществ, многие из которых не обладают способностью тормозить такие реакции в простых химических системах или обладают ею в незначительной степени, то есть не являются классическими антиоксидантами. В качестве примера могут быть приведены глутатион и соединения селена – селенит и селенометионин и различные хелаторы ионов металлов. Поэтому для обозначения всех потенциальных ингибиторов свободнорадикальных процессов в биологических системах часто используют термин – "биоантиоксиданты". В качестве возможных фармакологических средств среди биоантиоксидантов наибольшего внимания, несомненно, заслуживают витамины и другие природные малотоксичные соединения. Известно, что витамины природного происхождения на 50 % более активны, чем синтетические препараты, поскольку последние представляют рацемические смеси стереоизомеров. Значительно меньший риск отрицательных побочных эффектов при длительном использовании также является несомненным преимуществом природных соединений. В последние годы научные и коммерческие интересы многочисленных фармацевтических фирм связаны с полифенольными соединениями растительного происхождения – флавоноидами. Флавоноиды входят в состав ряда лекарственных препаратов, многочисленных биологически активных добавок (БАД) и пищевых добавок. Существует достаточно широкая клиническая практика использования флавоноидов как средств профилактической и даже заместительной и патогенетической терапии. Именно широкий научный и коммерческий интерес и то обстоятельство, что биологические эффекты флавоноидов являются областью научных интересов авторов, обусловили особое внимание к флавоноидам в данной книге.

1. БИОРАДИКАЛЫ

1.1 . Классификация и номенклатура

Биорадикалы – это возникающие в биологических системах частицы, имеющие на внешней электронной оболочке один или несколько неспаренных электронов. Поскольку при химическом взаимодействии с другими молекулами или атомами биорадикалы стремятся получить недостающий, или отдать "лишний" электрон, они характеризуются высокой химической активностью и способны инициировать быстрые, цепные неуправляемые реакции окисления различных субстратов, приводящие к модификации органических молекул и деградации надмолекулярных клеточных структур. Свободнорадикальное окисление – наиболее известный, но не единственный процесс, протекающий с участием биорадикалов. Имеются убедительные экспериментальные данные, свидетельствующие, что в организме могут протекать реакции радикальной фрагментации, следствием которых также является структурно-функциональные нарушения клеточных структур и макромолекул [1, 2].

Биорадикалы образуются в результате окислительно-восстановительных превращений, ведущих к появлению на свободной валентной орбитали "родительской" молекулы нового электрона, или, наоборот, удалению одного электрона из электронной пары. Обычно такие одноэлектронные реакции протекают с обязательным участием ионов металлов с переменной валентностью. Гораздо реже биорадикалы образуются в результате гомолиза, т.е. разрыва химической связи, в результате которого обе образовавшиеся частицы имеют по одному неспаренному электрону. Такая возможность имеет место, например, при воздействии на биологические объекты жесткого ультрафиолетового излучения. При написании структурных химических формул наличие неспаренного электрона обозначают точкой в положении верхнего индекса при соответствующем атоме. Если радикал является заряженной частицей, то обозначение радикала предшествует обозначению заряда.

В настоящее время для биорадикалов существуют и используются в научной литературе как тривиальные, так и систематические названия. В соответствии с решением Международной Комиссии по Номенклатуре Неорганической Химии (ИЮПАК) рекомендовано два способа образования систематического названия неорганических и органических радикалов – так называемая координационная (радикально-функциональная) и заместительная номенклатура [3]. При образовании систематического названия органических радикалов более удобно использовать замести-

тельную номенклатуру, а координационная номенклатура более удобна в отношении названия неорганических радикалов. В соответствии с новыми номенклатурными требованиями больше нет необходимости писать "свободный" перед словом "радикал". О радикальной природе рассматриваемой частицы в соответствии с заместительной номенклатурой говорит окончание "ил". Так радикалы $\text{RO}\cdot$ и $\text{HO}\cdot$ имеют наименование, соответственно "алкоксил" и "гидроксил". В соответствии с координационной номенклатурой о радикальной природе химической частицы говорит точка в скобках, которая идет после названия радикала. В случае наличия заряда после точки ставится арабская цифра, указывающая на величину заряда, и затем его знак. Кроме того, несущие заряд гомоатомные радикальные частицы и радикалы, состоящие из атома водорода и любого другого атома, имеют в названии окончание "ид", например $\text{O}_2^{\cdot-}$, следует обозначать "диоксид ($\cdot 1-$)" и называть "диоксид-радикал-анион", хотя и устоявшийся русскоязычный термин "анион-радикал кислорода" широко используется. Допустимо также использование тривиального названия "супероксид", хотя в научной литературе ИЮПАК рекомендует преимущественно использовать систематические названия. Существенно новым можно считать и рекомендацию не злоупотреблять производными от "пероксид" и "гидропероксид". Группа из двух связанных между собой атомов кислорода называется "диоксид". В соответствии с номенклатурой ИЮПАК радикал $\text{ROO}\cdot$ рекомендуется называть "алкилдиоксил", но допускается и альтернативное название "алкилпероксил". Молекулярный кислород называется "диоксигеном", а озон – "триоксигеном".

В результате химических превращений, протекающих с участием биорадикалов или собственно радикалов, в организме образуются весьма активные молекулярные соединения: перекись водорода, гипохлорит, гидроперекиси липидов и ряд подобных им по химической активности соединений. Такие активные молекулы, наряду с радикалами, получили в англоязычной литературе название "reactive species", что в русской литературе чаще всего переводится как "активные формы". Но в данной книге для обозначения всей совокупности радикалов и активных молекул, образующихся при их участии в организме, мы будем использовать понятие биорадикалы. Halliwell [4] предложил разделить все биорадикалы на три основные группы: активные формы кислорода (АФК), азота (АФА) и хлора (АФХ). Каждая такая группа, как показано на рис. 1.1, включает первичные радикалы, образующиеся в организме в результате ферментативных и неферментативных реакций, а также при воздействии на живые системы различных внешних факторов, и образующиеся при участии первичных радикалов активные молекулы и вторичные радика-

лы. Кроме того, предлагается выделить в отдельную группу и активные формы липидов [5].

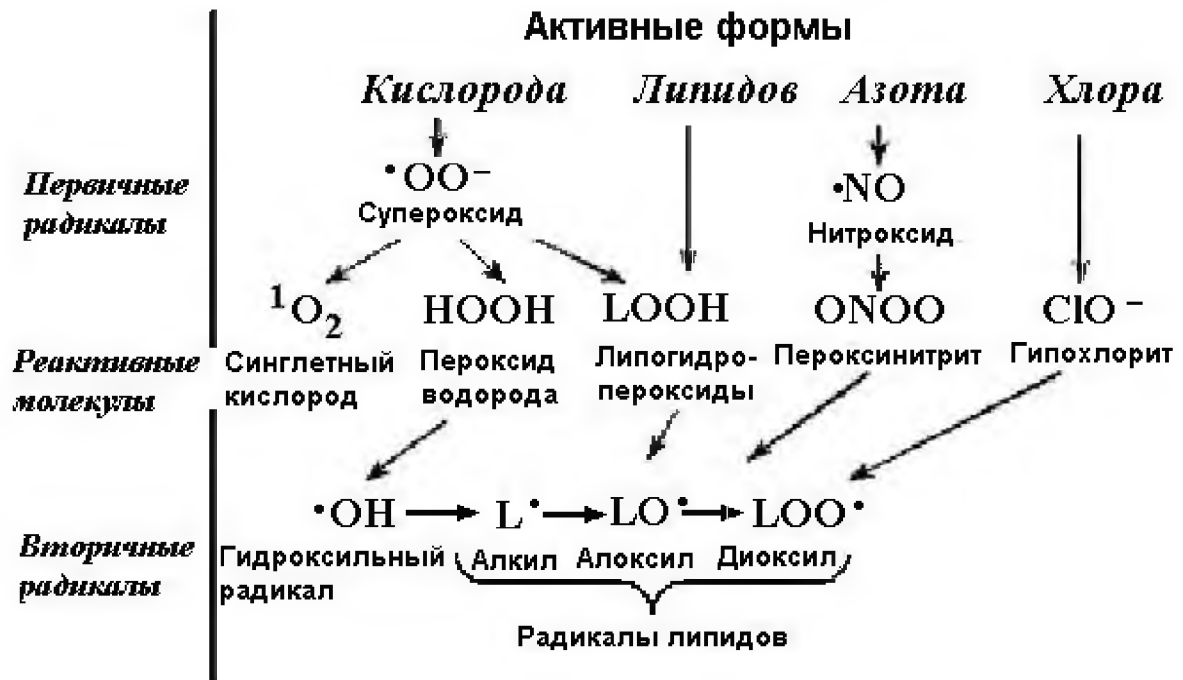


Рис. 1.1. Классификация биорадикалов

1.2 Физико-химические свойства биорадикалов

Появление более двух миллиардов лет тому назад в атмосфере земли молекулярного кислорода явилось важнейшим фактором ускорения эволюции. Благодаря более эффективным механизмам получения энергии, организмы, использующие кислород в качестве конечного акцептора электронов, оказались преимущественной формой живой материи и повсеместно распространились в биосфере. Решающую роль в возникновении и распространении аэробных организмов сыграло то обстоятельство, что, несмотря на высокий энергетический выход реакций окисления, молекулярный кислород практически инертен по отношению к органическим молекулам. Это уникальное свойство кислорода обусловлено тем, что его молекула в основном состоянии имеет триплетную электронную конфигурацию, для которой характерно наличие на p^* - разрыхляющей молекулярной орбитали двух неспаренных электронов с параллельными спинами (рис. 1.2). В отличие от кислорода, большинство органических молекул в основном состоянии являются синглетными, то есть спины электронов на внешней орбитали ориентированы антипараллельно.

Орбиталь	Основное состояние ${}^3\Sigma_gO_2$	Синглетный кислород		Супероксид $O_2^{\cdot-}$	Пероксид O_2^{2-}
		${}^1\Delta_gO_2$	${}^1\Sigma_g+$		
$\sigma^* 2p$	○	○	○	○	○
$\pi^* 2p$	↑ ○	↓ ○	↑ ↓	↓ ↓	↓ ↓
$\pi\cdot 2p$	↑ ↓	↑ ↓	↑ ↓	↑ ↓	↑ ↓
$\sigma\cdot 2p$	↑ ↓	↑ ↓	↑ ↓	↑ ↓	↑ ↓
$\sigma^* 2s$	↑ ↓	↑ ↓	↑ ↓	↑ ↓	↑ ↓
$\sigma\cdot 2s$	↑ ↓	↑ ↓	↑ ↓	↑ ↓	↑ ↓
$\sigma^* 1s$	↑ ↓	↑ ↓	↑ ↓	↑ ↓	↑ ↓
$\sigma\cdot 1s$	↑ ↓	↑ ↓	↑ ↓	↑ ↓	↑ ↓

Рис. 1.2. Электронная структура молекулы кислорода в основном, возбужденном и частично восстановленном состоянии

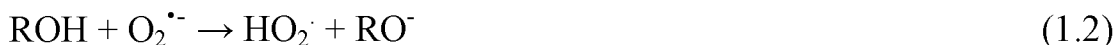
Согласно принципу Паули, чтобы произошла химическая реакция с такой молекулой, у одного из электронов в молекуле кислорода должно произойти обращение спина. Ввиду того, что такое обращение спина относительно медленный процесс, кислород гораздо менее реакционноспособен, чем можно было предполагать на основании термодинамических расчетов [6, 7]. Спиновые запреты, ограничивающие реакции молекулярного кислорода, могут быть преодолены в результате перехода молекулы кислорода в возбужденное состояние или в случае последовательного добавления одиночных электронов с образованием радикальных промежуточных продуктов [6, 7]. Ключевую роль в свободнорадикальных процессах, протекающих с участием молекулярного кислорода, играет анион-радикал кислорода или супероксид. Анион-радикал кислорода характеризуется наличием на p^* - разрыхляющей орбитали дополнительного электрона (см. рис. 1.2) и обладает ионными и радикальными свойствами. Несмотря на то, что для получения устойчивой электронной оболочки ему необходимо присоединение единственного электрона, анион-радикал кислорода является мягким, многофункциональным реагентом [8]. Его химическая активность сильно зависит от окружающей среды и наиболее выражена в апротонных, неполярных растворителях, тогда как в водных растворах она минимальна [6].

В апротонной среде супероксид является сильным нуклеофильным агентом [6] и способен вступать в реакции нуклеофильного замещения.



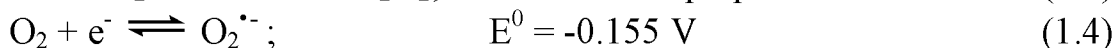
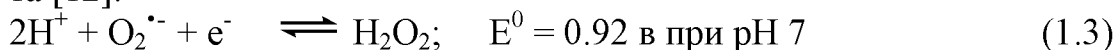
Такого типа реакции протекают при взаимодействии анион-радикала кислорода с диацилпероксидами [9] и фосфолипидами [6]. В последнем случае супероксид-анион атакует эфирную связь, отщепляя жирную кислоту. Стадия нуклеофильной атаки является начальным этапом окисления анион-радикалом кислорода дисульфидных соединений [8].

Анион-радикал кислорода является также сильным Бренстедовским основанием, то есть акцептором протонов [6, 10]. В апротонной среде он депротонирует, в соответствии с уравнением 1.2, гидропероксиды [9], тиолы [8], хлороформ [11], молекулы воды [12].



Характер действия супероксида в конкретных системах зависит от используемого растворителя. Например, в бензоле $O_2^{\bullet -}$ реагирует с хлороформом как основание, а в диметилформаиде он действует как нуклеофил [11].

Участие анион-радикала кислорода в окислительно-восстановительных процессах обусловлено его способностью функционировать в качестве как окислительного, так и восстановительного агента [12].



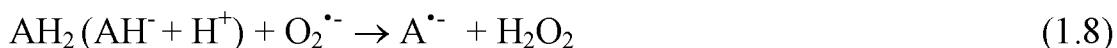
В апротонной среде супероксид способен окислять тиолы [8], ароматические углеводороды [13], производные тимина и тимидина [14], катехолы [10], нуклеотиды [15]. В водной среде $O_2^{\bullet -}$ окисляет адреналин [16] и дезферриоксамин [17].

Особое внимание было уделено исследованию взаимодействия анион-радикала кислорода с основными природными антиоксидантами – α -токоферолом и аскорбиновой кислотой. Было показано, что α -токоферол окисляется в $O_2^{\bullet -}$ -генерирующих системах [18, 19]. Однако в последующих исследованиях [10, 20, 21] было установлено, что супероксид анион взаимодействует с α -токоферолом без прямого переноса электрона, а по механизму переноса протона (депротонирования), то есть имеет место кислотно-основной процесс, при котором анион-радикала кислорода функционирует как основание Бренстеда. Образующийся анион субстрата окисляется молекулярным кислородом по одноэлектронному механизму:



Очевидно, что α -токоферол не способен быть ловушкой анион-радикала кислорода, так как реакция 1.5 очень медленная, $k_5 = 0,59 \text{ М}^{-1}\text{с}^{-1}$ [20] и, что еще более важно, в гидрофобных зонах клетки, в частности клеточных мембранах, взаимодействие $\text{O}_2^{\cdot-}$ с α -токоферолом приводит к образованию значительно более активной протонированной формы анион-радикала кислорода.

Ряд экспериментальных данных свидетельствует, что в апротонной среде по механизму депротонирования протекает и реакция анион-радикала кислорода с аскорбиновой кислотой [10, 20, 21]. Однако в водной среде между ними, по-видимому, имеет место истинное окислительно-восстановительное взаимодействие с переносом атома водорода и протона с молекулы аскорбиновой кислоты (при физиологических значениях рН - аскорбат иона, $\text{pK}_a = 4,2$) на $\text{O}_2^{\cdot-}$ [22]:



Высокая скорость реакции 1.8 ($k_8 = 5 \cdot 10^4 \text{ М}^{-1}\text{с}^{-1}$) [23] позволяет сделать вывод, что одной из функций аскорбиновой кислоты в организме является детоксикация анион-радикала кислорода.

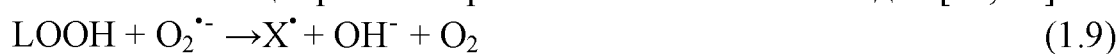
При детальном исследовании механизма участия анион-радикала кислорода в окислении органических молекул установлено, что прямой перенос электрона на супероксид имеет место при окислении только некоторых субстратов, например, соединений типа сульфината натрия ($\text{RSO}_2^- + \text{Na}$) [8]. В основном, окисление органических молекул, например тиолов [8] и катехолов [10], протекает по депротонирующему механизму. В случае нуклеотидов окисление протекает через образование пероксидных радикалов [15].

Общепринято, что в водных растворах химическая активность анион-радикала кислорода, в том числе и его окислительные свойства, выражена значительно слабее, чем в апротонной среде, и в гидрофильном окружении он действует, в основном, как восстанавливающий агент [6, 24]. Показано, что $\text{O}_2^{\cdot-}$ легко восстанавливает паранитротетразолий хлористый [25, 26]. Константа скорости этой реакции равна $6,7 \cdot 10^4 \text{ М}^{-1}\text{с}^{-1}$ при рН 7 и $10^4 \text{ М}^{-1}\text{с}^{-1}$ при рН 10 [27]. Благодаря высокой скорости восстановления, паранитротетразолий хлористый является одним из наиболее распространенных индикаторов $\text{O}_2^{\cdot-}$ [26, 28]. Другим широко используемым индикатором анион-радикала кислорода является феррицитохром с

[29]. Константа скорости этой реакции в диапазоне физиологических значений pH (7,0-7,6) находится в пределах $2,6-10 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [12, 30]. Наряду с ионами железа и меди, входящими в состав активных центров ферментов, анион-радикал кислорода восстанавливает свободные металлы и их низкомолекулярные комплексы [6, 24, 31].

В 1954 г Гершман и Жильберт (Gershman, Gilbert) предположили, что многие токсичные эффекты кислорода обусловлены образующимися в организме кислородными радикалами [6]. Позднее эта гипотеза, известная в настоящее время как супероксидная теория токсичности кислорода, была развита и экспериментально подтверждена в работах Фридовича [7]. В настоящее время ключевая роль анион-радикала кислорода в развитии различных патологических процессов не вызывает сомнения [6, 24, 32, 33], однако вопрос о конкретных механизмах этого феномена является предметом интенсивных исследований и активно дискутируется. Неоднозначность существующих в этой области представлений в значительной степени обусловлена тем, что анион-радикал кислорода способен вовлекаться, в зависимости от конкретных условий его микроокружения, в широкий круг химических реакций.

Существуют две возможности участия $\text{O}_2^{\cdot-}$ в деструктивных процессах в клетке. Первая связана с прямым повреждающим действием анион-радикала кислорода. Во втором случае имеет место опосредованное действие, при котором анион-радикал кислорода вовлекается в процессы, приводящие к появлению более активных химических агентов. Что касается прямого повреждающего действия, то, несмотря на ряд косвенных данных, свидетельствующих о потенциальной способности $\text{O}_2^{\cdot-}$ модифицировать молекулы нуклеиновых кислот [14, 15], экспериментальные результаты свидетельствуют, что такая возможность в условиях *in vivo* не реализуется [32]. Более вероятной представляется возможность модификации анион-радикалом кислорода белковых молекул. Показано, например, что $\text{O}_2^{\cdot-}$ инактивирует глутатионпероксидазу [34] и каталазу [35]. Тем не менее, инактивация ферментов супероксидом достаточно медленный процесс и не может рассматриваться в качестве основного механизма повреждающего действия $\text{O}_2^{\cdot-}$. Анион-радикал кислорода практически инертен по отношению к неокисленным липидам и не способен отрывать атом водорода даже в полиненасыщенных жирных кислотах [36], однако реагирует с гидропероксидами липидов ($k_9=7,4 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ при pH 8,1), образуя высокоактивный радикальный продукт (X^{\cdot}), способный инициировать перекисное окисление липидов [36, 37].



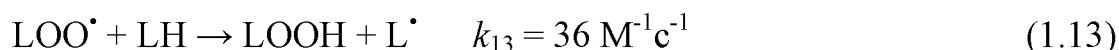
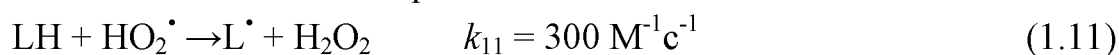
Возможность реакции (1.9) была подтверждена также Sutherland, и Gebicki, которые идентифицировали продукт X^\bullet как радикал LO^\bullet [38]. К противоположному выводу пришли Borg с соавторами [39], установившие, что при нейтральном значении pH добавление гидропероксидов трет-бутила или линолевой кислоты не влияет на скорость спонтанного уменьшения содержания $O_2^{\bullet-}$, полученного методом импульсного радиолита. Однако эти результаты не доказывают принципиальную невозможность реакции (1.9), а свидетельствуют, что при физиологических условиях она значительно менее эффективна, чем неферментативная дисмутация $O_2^{\bullet-}$, константа скорости которой равна $5,6 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. В аprotонной среде взаимодействие радикала $O_2^{\bullet-}$ с гидропероксидами происходит, по-видимому, по депротонирующему механизму с образованием протонированной формы анион-радикала кислорода [9]:



Таким образом, обобщая имеющиеся в настоящее время данные о химической активности анион-радикала кислорода, можно заключить, что повреждение и гибель клеток в присутствии систем, генерирующих $O_2^{\bullet-}$ [6], не может быть следствием его прямого взаимодействия с липидами, белками и нуклеиновыми кислотами.

Значительно большее экспериментальное обоснование имеет точка зрения, в соответствии с которой цитотоксическое действие $O_2^{\bullet-}$ опосредовано через образование других форм активированного кислорода: протонированного анион-радикала кислорода (HO_2^\bullet), синглетного кислорода (1O_2), феррил ($FeOH^{3+}$ или FeO^{2+}) и перферрил ($Fe^{3+}-O_2^{\bullet-}$ или $Fe^{2+}-O_2$) ионов, гидроксильного радикала ($\bullet OH$), пероксинитрита ($ONOO^-$).

Известно, что HO_2^\bullet значительно более активный химический агент, чем $O_2^{\bullet-}$ [6, 24]. Кроме того, он не несет электрического заряда, что дает возможность ему легко внедряться в липидный слой клеточных мембран [24, 40]. Показано [40], что в водно-спиртовой среде (70 % этанола) при pH 2, HO_2^\bullet способен отрывать протон и инициировать перекисное окисление ненасыщенных жирных кислот:



Константа скорости реакции 1.11 сравнительно низкая и значительно уступает константе скорости спонтанной дисмутации HO_2^\bullet в этих условиях ($8,7 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [40]. Однако поскольку протонирование анион-

радикала кислорода происходит в основном вблизи мембран (здесь разница в значении рН с цитоплазмой достигает трех единиц), HO_2^\bullet быстро внедряется в липидный слой, где большая концентрация полиненасыщенных жирных кислот может обеспечить высокую скорость реакций 1.11 и 1.13 [40].

При поглощении энергии и возбуждении молекулы кислорода ориентация спина одного из электронов на p^* разрыхляющей молекулярной орбитали изменяется на противоположную, что приводит к появлению электронов с антипараллельными спинами (см. рис. 1.2). Такое возбужденное состояние молекулы кислорода называется синглетным и характеризуется высокой химической активностью, поскольку в этом случае снимаются спиновые ограничения, налагаемые на молекулярный кислород принципом Паули. В природе возможно образование двух форм синглетного кислорода: $^1\Delta_g$ и $^1\Sigma_g^+$ [6], однако биологического значения вторая форма возбужденного кислорода не имеет, поскольку существует чрезвычайно короткое время (значительно меньшее, чем нужно для взаимодействия с окружающими молекулами), после чего превращается в форму $^1\Delta_g$ (обычно обозначается $^1\text{O}_2$). Экспериментальное подтверждение участия синглетного кислорода в процессе перекисного окисления липидов получено рядом авторов [39, 41, 42]. Обладая высокой окислительной активностью, $^1\text{O}_2$ способен внедряться по месту двойных связей в молекулы полиненасыщенных жирных кислот с образованием соответствующих гидропероксидов [43, 44]. Поэтому его роль в перекисном окислении липидов заключается в поддержании и развитии цепных радикальных реакций за счет процессов вторичного инициирования [45, 46]. Синглетный кислород вызывает окислительное повреждение белков, например, коллагена эпителия кожи, каталазы, супероксиддисмутазы [47], а также ДНК [48, 49] в результате модификации гуанилового основания [49]. В то же время показано, что мутагенное действие такого мощного потенциального источника синглетного кислорода, как фотовозбужденный рибофлавин или люмифлавин, связано с $\text{O}_2^{\bullet -}$, но не с $^1\text{O}_2$ [50]. Синглетный кислород играет ключевую роль при развитии ряда патологических процессов, таких как катаракта [51, 52], протопорфирии [53], синдром ишемии-реперфузии [54]. Экспериментально доказано участие $^1\text{O}_2$ в процессах фагоцитоза [55]. В организме синглетный кислород образуется в неферментативных процессах, протекающих с участием фотосенсибилизаторов [50-52], или с помощью ферментов, например, миелопероксидазы [55]. В последнем случае количество $^1\text{O}_2$, генерируемого активированными фагоцитами, может составлять до 19 % от всего поглощенного кислорода [55]. В различных лабораториях с помощью

специфических ловушек и прямых методов показано, что синглетный кислород может образовываться при взаимодействии $O_2^{\cdot-}$ с H_2O_2 [41, 56] или в результате спонтанной дисмутации анион-радикала кислорода [57, 58]. Однако выход синглетного кислорода в обоих случаях незначителен, и этот механизм в реализации цитотоксического действия $O_2^{\cdot-}$ имеет только второстепенное значение [6, 24, 59].

Радикал $\cdot OH$ чрезвычайно реакционноспособен и может окислять практически все низкомолекулярные органические молекулы [60-62], а также белки [63-68], нуклеиновые кислоты [32, 69, 70] и другие биополимеры [71]. Гидроксильный радикал способен отрывать атом водорода от молекул ненасыщенных жирных кислот и инициировать перекисное окисление липидов [6, 24].

Общепринято, что в условиях *in vivo* $\cdot OH$ образуется, главным образом, в результате катализируемой железом реакции Хабера-Вейса [6, 24, 72], которая представляет собой совокупность двух элементарных процессов: реакции Фентона (14) и восстановления трехвалентного железа $O_2^{\cdot-}$ (15):



В организме взрослого человека содержится около 4 г железа, однако практически все оно входит в состав гемоглобина, миоглобина, цитохромов и простетических групп ферментов. Некоторое количество железа связано с транспортирующими и депонирующими белками, нуклеиновыми кислотами или низкомолекулярными хелаторами типа: АТФ, ГТФ, цитрат, - и только крайне незначительный пул свободного железа находится в движении между запасующими и утилизирующими системами [6, 24]. Поэтому большое значение имеет выяснение возможности участия различных форм связанного железа и других металлов с переменной валентностью в реакции Хабера-Вейса.

Образование комплекса железа с хелатором может изменить ОВП пары Fe^{2+}/Fe^{3+} в сторону облегчения или, напротив, затруднения реакций 1.14 и 1.15. Кроме этого, лиганд может быть ловушкой гидроксильного радикала, эффективность которой зависит от величины соответствующей константы скорости реакции и геометрии образовавшегося комплекса [24, 73]. Например, альбумин связывает ионы железа и меди, которые могут при этом восстанавливаться и работать как реагент Фентона. Об-

разующийся в результате реакции 1.14 гидроксильный радикал взаимодействует с молекулой белка, то есть имеет место биологически несущественная, сайт-специфичная реакция, а альбумин функционирует как "жертвенный" антиоксидант [24].

В настоящее время установлено, что комплексы железа с рядом низкомолекулярных лигандов, например ЭДТА или нуклеотидами, катализируют реакцию Хабера-Вейса более эффективно, чем свободное железо [6, 24, 73-75]. Среди нуклеотидов наиболее эффективные реагенты Фентона при связывании железа образуют гуанозинтрифосфат, цитидинтрифосфат и аденозинтрифосфат. Менее активны комплексы соответствующих дифосфатов. Комплексы железа с монофосфатами реакцию Хабера-Вейса не катализируют [74, 76].

Относительно возможности участия в реакции Хабера-Вейса железа, связанного с металл-транспортирующими белками крови, имелись противоречивые данные. Однако тщательные исследования, выполненные в ряде лабораторий, показали, что при существующей в условиях *in vivo* степени "нагруженности" ионами железа, то есть на 20-50%, трансферрин и лактоферрин ингибируют реакцию Хабера-Вейса [6, 24, 77-79]. Полностью нагруженные железом белки [2 молекулы Fe^{3+} на молекулу белка] не проявляют антиокислительных свойств, но и сами не катализируют реакцию Хабера-Вейса [79]. Эти экспериментальные результаты согласуются с теоретическим выводом, который может быть сделан из сопоставления значений ОВП для пары $O_2/O_2^{\cdot-}$ (-155 мВ) и трансферрин- $Fe^{3+}/$ трансферрин- Fe^{2+} (> -280 мВ) [80]. В кислой среде железо может высвободиться из полностью нагруженных металл-транспортирующих белков и участвовать в реакции Фентона [79]. Вместе с тем, ионы железа, связанные с другими белками, в частности, утероферрином и пурпурной кислой фосфатазой из бычьей селезенки, способны восстанавливаться и катализировать реакцию Хабера-Вейса, оставаясь связанными с лигандом [80].

Железо, депонируемое в ферритине, также катализирует разложение пероксида водорода. Образующийся при этом гидроксильный радикал способствует деградации ферритина в гемосидерин, воздействуя на белок в пределах мицеллярного ядра [24, 81]. Показано, что ряд агентов – анион-радикал кислорода [77, 82-85], аскорбиновая кислота [24], полигидроксипиримидины [86] – способны мобилизовать из молекулы ферритина ионы Fe^{2+} , которые вовлекаются в цитотоксические процессы через реакцию Фентона. Имеются экспериментальные данные, свидетельствующие, что такой механизм может реализоваться при развитии артритов [83].

Гемопротеиды – гемоглобин, миоглобин и, возможно, цитохром с, – в обычных условиях способны катализировать гомолитическое разложение органических гидропероксидов, но не H_2O_2 [6, 24, 72, 87, 88]. Первоначальные данные, свидетельствующие об их способности функционировать в качестве реагентов Фентона, по-видимому, являются некорректными, так как они были получены в экспериментах, не исключающих возможность высвобождения свободного железа при деградации гемопротеидов. Кроме того, в этих экспериментах использовали неспецифические ловушки $\cdot\text{OH}$ [24, 87]. В условиях *in vivo* деградация гемоглобина и появление комплексов железа с низкомолекулярными лигандами может происходить в очагах воспаления, а также при проникновении гемоглобина в различные ткани [89].

Гидроксильный радикал является, по-видимому, не единственной формой активного кислорода, образующейся при взаимодействии двухвалентного железа и пероксида водорода. Ряд исследователей показали, что в этом случае могут образовываться феррил (FeOH^{3+} или FeO^{2+}) или перферрил ($\text{Fe}^{3+}\text{-O}_2\cdot^-$ или $\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$) ионы, химическая активность которых сравнима с активностью гидроксильного радикала [76, 77, 89-92]. Возможно, что выход продуктов в реакции 1.14 зависит от состояния железа: при реакции со свободным Fe^{2+} продуцируются преимущественно феррил-ион или $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O}_2)^{2+}$, а в случае хелатированного железа в основном (до 90%) образуется $\cdot\text{OH}$ [76]. В физиологических условиях, которые характеризуются крайне низкими концентрациями железа, доступного для участия в реакции Хабера-Вейса, наиболее вероятно преимущественное образование гидроксильного радикала [90].

К настоящему времени получены убедительные экспериментальные данные, свидетельствующие, что реакция Хабера-Вейса лежит в основе противоопухолевого действия и кардиотоксичности адриамицина и других антрациклиновых антибиотиков [70, 93] и канцерогенного действия асбестов [94]. Показано, что гидроксильный радикал играет ключевую роль в воспалительных процессах [95, 96]. Тем не менее, существует ряд фактов, которые ставят под сомнение значение этой реакции и участие гидроксильного радикала в патогенетических процессах [6, 72]. Один из них, который может быть назван "парадоксальным", заключается в чрезвычайно высокой химической активности гидроксильного радикала. Благодаря этому, $\cdot\text{OH}$ может пройти от места образования до места взаимодействия путь, равный всего 5-10 собственным диаметрам [72]. При этом, любая молекула или даже фрагмент макромолекулы, не имеющий функциональной нагрузки, будет выполнять роль антиоксиданта. Это обстоятельство значительно ограничивает возможности $\cdot\text{OH}$ реагировать с

полиненасыщенными липидами, нуклеиновыми кислотами, каталитическими центрами ферментов, несмотря на то, что они являются наиболее легко окисляемыми субстратами. Поэтому более выраженным патогенетическим действием в биологических системах будет обладать агент, активность которого меньше, чем у гидроксильного радикала, но достаточная, чтобы он избирательно и быстро реагировал с функционально более значимыми, легко окисляемыми субстратами [77]. Таким агентом может быть комплекс железа или другого металла с переменной валентностью с низкомолекулярным лигандом. Например, в экспериментах *in vitro* показано, что комплексы Fe^{2+} АДФ и Fe^{2+} ЭДТА инициируют развитие перекисного окисления липидов в микросомах печени [46, 97, 98] и мозга [99]. Регенерация таких комплексов происходит при участии НАДФН-зависимого флавопротеида, в результате прямого переноса электрона [46, 97], или опосредуется через образование анион-радикала кислорода [98].

Аргументы, свидетельствующие об ограниченной возможности гидроксильного радикала инициировать патогенетические процессы в организме, в значительной степени снимаются, если принять во внимание так называемую "сайт-специфичную" концепцию его действия. Суть этой концепции заключается в том, что образование гидроксильного радикала в клетке происходит не равномерно во всем объеме, а только в определенных сайтах – участках, где удерживаются ионы металлов с переменной валентностью, главным образом, железа и меди [24, 77]. Если такой сайт локализован на внутриклеточной мембране или макромолекуле, несущей функциональную нагрузку, то вследствие минимального расстояния между местом образования и потенциальной мишенью гидроксильный радикал имеет большие шансы реализовать свой цитотоксический потенциал, избежав встречи с различными низкомолекулярными метаболитами и антирадикальными агентами. Так, если лигандом металла является молекула ДНК, следствием образующегося $\cdot OH$ будет модификация азотных оснований. Если ионы металла связаны с фосфолипидами мембран, гидроксильный радикал будет инициировать перекисное окисление липидов. С позиции "сайт-специфичной" концепции достаточно убедительно объясняется и выявленное в ряде случаев отсутствие эффекта ловушек $\cdot OH$ в модельных системах [24]. Однако остается неясным, почему при различных патологических процессах *in vivo* и в модельных системах *in vitro* выявлена высокая эффективность защитного действия СОД, если роль $O_2^{\cdot -}$ сводится только к восстановлению ионов железа (реакция 1.15), и в то же время во многих случаях неэффективна каталаза [6].

Образование в организме гидроксильных радикалов происходит и при воздействии ионизирующей радиации, в результате радиолиза воды [100-103]. Однако принимая во внимание, что процесс радиолиза не является "сайт-специфичным" и происходит равномерно во всем объеме клетки, прямое повреждающее действие $\cdot\text{OH}$ имеет место, по-видимому, при воздействии очень высоких доз ионизирующей радиации.

В последнее время большое внимание уделяется взаимодействию анион-радикала кислорода с монооксидом азота (NO). Первые публикации об образовании NO в организме человека и животных появились в 1987 году. Исследовательскими группами, возглавляемыми Сальватором Монкадой (Великобритания) и Луисом Иньярро (США), были получены однозначные доказательства того, что фактор, секретируемый клетками эндотелия кровеносных сосудов в ответ на действие ацетилхолина, брадикинина и некоторых других вазодилататоров и вызывающий расслабление гладких мышц сосудов, есть не что иное, как оксид азота (NO) – простая, двухатомная молекула, находящаяся при физиологических условиях в газообразном состоянии [104, 105]. В последовавших за этим открытием многочисленных исследованиях было показано, что NO является биологическим медиатором с широким спектром действия, участвующим в регуляции кровяного давления, моторики желудка, дыхания, синаптической передачи, памяти, роста и развития клеток костного мозга, заживлении ран, иммунной регуляции и эрекции пениса [106-114]. Малые размеры и отсутствие заряда обеспечивают монооксиду азота высокую проницаемость через мембраны клеток и субклеточных структур, а наличие одного электрона с неспаренным спином позволяет отнести его к биорадикалам и придает высокую реакционную способность. В водном растворе реакция радикалов $\text{O}_2^{\cdot-}$ и NO протекает очень быстро, константа скорости равна $3,7 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [115], приводя к образованию высокотоксичного интермедиата – пероксинитрита (ONOO^-). Установлено, что ONOO^- вносит существенный вклад в развитие атеросклероза [116], повреждение клеток и тканей при воспалительных процессах и сепсисе, ишемии-реперфузии [107, 117]. Возможно, что токсическое действие пероксинитрита в значительной степени обусловлено образующимся при его разложении гидроксильным радикалом [107, 116, 117].

1.3. Образование и роль биорадикалов в аэробных организмах

У аэробных организмов от простейших до млекопитающих монооксид азота, анион-радикал кислорода, пероксид водорода и другие биорадикалы являются обычными метаболитами, образующимися в нормально функционирующих клетках. Существующие пути образования биоради-

калов можно разделить на две группы: физиологически значимые пути и нефизиологические пути. В первом случае биорадикалы являются рабочим элементом той или иной функциональной системы организма, например неспецифического иммунитета или гуморальной сигнализации, и выполняют конкретную физиологическую функцию. Процесс их образования, как правило, ферментативный, тонко регулируется, а продукция осуществляется в количествах, необходимых для реализации соответствующей функции. Нефизиологическое образование биорадикалов часто представляет собой неферментативный процесс, однако может полностью или частично катализироваться рядом оксидоредуктаз как интактных, так и патологически модифицированных. Образующиеся в этих процессах биорадикалы в лучшем случае являются малотоксичными побочными продуктами метаболических и биоэнергетических процессов, в худшем, чрезвычайно опасными агентами, требующими немедленной детоксикации.

1.3.1. Физиологически значимые пути образования биорадикалов

В организме человека радикал NO^\bullet образуется из аминокислоты L-аргинина в результате ферментативной реакции, катализируемой NO-синтетазой [118]. Кофакторами NO-синтетазы служат: гем, FAD, FMN, тетрагидробиоптерин (ТГБ), кальмодулин и ионы кальция. Предполагают, что эти агенты также играют важную роль в регуляции активности фермента. В настоящее время известно три типа синтетаз оксида азота, или три изофермента, кодируемых разными генами, но имеющих значительную гомологию аминокислотных последовательностей [111]. **NO-синтетаза I типа** присутствует в нейронах мозга, и ее нередко называют нейрональной конститутивной синтетазой NO. Активность конститутивной NO-синтетазы наиболее высока в нейронах мозжечка и в астроглии. Этот фермент представляет собой гомодимер (состоит из двух одинаковых субъединиц) с молекулярной массой субъединицы 160 кДа и характеризуется обратимым связыванием с кальмодулином. Регуляция этого фермента осуществляется при участии ионов Ca^{2+} . **NO-синтетаза II типа** впервые была выделена из макрофагов. Она представляет собой гомодимер с молекулярной массой 130 кДа. Этот фермент преимущественно находится в растворимой форме и относится к индуцибельной изоформе NO-синтетазы, в противоположность конститутивным ферментам он менее зависим от ионов Ca^{2+} или кальмодулина. **NO-синтетаза III типа** характерна для эндотелиальных клеток. Молекулярная масса этого фермента составляет 133 кДа. Этот изофермент, так же как и NO-синтетаза I типа, характеризуется обратимым связыванием с кальмодулином, и ак-

тивность его зависит от внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} . NO-ситаза III типа также обнаружена в нейронах мозга. Данный изофермент может находиться как в растворимой, так и мембранно-связанной форме. Фермент, связанный с плазматической мембраной, по-видимому, играет существенную роль в регуляции кровотока, участвуя в механизмах передачи соответствующих сигналов (трансдукции), от регуляторных центров к эффекторам.

Основным физиологическим процессом, ведущим к образованию анион-радикала кислорода и пероксида водорода, является так называемый "дыхательный взрыв" в различных типах гранулярных и агранулярных лейкоцитов и, в первую очередь, нейтрофилах и макрофагах. Дыхательный взрыв характеризуется возрастанием потребления клетками кислорода, усилением в них катаболизма глюкозы и образования НАДФН через гексозомонофосфатный шунт. При этом практически весь потребляемый кислород расходуется на образование анион-радикала кислорода НАДФН-оксидазным комплексом, локализованным на внешней стороне плазматической мембраны фагоцитирующих клеток [119, 120]. Анион-радикал кислорода и образующийся в результате его ферментативной дисмутации пероксид водорода играют чрезвычайно важную роль в реакциях неспецифического и специфического иммунитета, направленных против различных бактерий, грибковых и гельминтных инфекций, а также собственных инфицированных вирусами или трансформированных клеток. В настоящее время известны три возможных механизма реализации бактерицидного действия АФК:

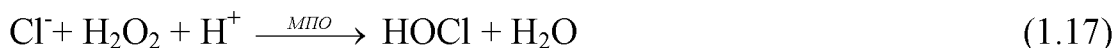
- участие в образовании активных оксидантов в реакции Хабер-Вейса (см. уравнения 1.14-1.16);
- реакция анион-радикал кислорода с монооксидом азота и образование пероксинитрита;
- вовлечение пероксида водорода в реакции, катализируемые ферментом миелопероксидаза, в результате которых образуются активные формы хлора и, в первую очередь, гипохлорит.

По-видимому, наименьшее значение имеет первый из приведенных механизмов. Физиологическая роль реакции Хабер-Вейса, детально рассмотренной в разделе 1.2, ограничивается вероятным дефицитом в области развития иммунной реакции ионов металлов с переменной валентностью. Что касается двух других механизмов, то считают, что пероксинитрит, образующийся в результате взаимодействия анион-радикал кислорода с монооксидом азота, является важным цитотоксическим агентом, продуцируемым макрофагами, а гипохлорит, образующийся

под действием миелопероксидазы, – основной бактерицидный агент нейтрофилов.

Миелопероксидаза, сокращенно МПО (донор: пероксид водорода, оксидоредуктаза, КФ 1.11.1.7), молекулярная масса ~ 150 кДа, – основной, сильно гликозилированный белок, образующий вместе с тиреоидпероксидазой, лактопероксидазой, эозинпероксидазой, простагландин Н-синтазой и пероксидазином суперсемейство пероксидаз [121-123]. Наибольшее количество МПО содержится в азурофильных гранулах полиморфно-ядерных лейкоцитов (5 % от сухого веса клеток) и моноцитах (1-2 %) [124, 125]. При фагоцитозе, сопровождающимся обязательной активацией фагоцитирующих клеток и развитием дыхательного взрыва, МПО секретируется вместе с АФК как во внеклеточную среду, так и в фагосома. В обоих компартментах МПО усиливает окислительный потенциал АФК, катализируя образование различных оксидантов, при этом пероксид водорода используется как ко-субстрат [125-127]. В настоящее время с помощью рентгеноструктурного анализа выяснена трехмерная структура (3D-структура) МПО [128]. Фермент представляет собой гомодимер, каждый мономер которого состоит из легкой (А или В) и тяжелой (С или D) полипептидной цепи и включает гем и ион кальция. Между собой мономеры соединены одиночным дисульфидным мостиком. Легкие и тяжелые полипептидные цепи мономеров МПО образуются из общего белкового предшественника в ходе посттрансляционного процессинга.

Известно несколько молекулярных процессов, катализируемых МПО [124, 125]. Наиболее важным в плане реализации физиологического действия рассматриваемого фермента, по-видимому, является образование гипохлорита в результате реакции анионов хлора (Cl⁻) с пероксидом водорода, протекающей в соответствии со следующим уравнением:



Именно с продукцией гипохлорита, который является чрезвычайно эффективным бактерицидным агентом, способным разрушить бактериальные стенки, связывают участие МПО в процессах неспецифического иммунитета и, в частности, фагоцитоза [129]. Миелопероксидаза катализирует реакции пероксида водорода и с другими галидами (Br⁻, I⁻), а также псевдогалидами (SCN⁻), однако в силу их низкой концентрации в плазме (100 мкМ Br⁻ и 50 мкМ SCN⁻), в сравнении с концентрацией ионов хлора (100 мМ) [125], физиологического значения эти реакции не имеют. Ключевую роль в каталитическом механизме МПО играет гем, который совершает переход из основного состояния в окисленную форму, – ак-

тивный феррил π катион-радикал (комплекс I пероксидазы), – и затем, в результате последующей одностадийной двухэлектронной реакции, возвращается в основное состояние, восстанавливая при этом галиды до гипогалитов:



Совокупность двух приведенных выше реакций получила название – цикл хлоризации (chlorination cycle).

1.3.2. Нефизиологическая продукция биорадикалов

Существует несколько механизмов, обуславливающих возможность нефизиологической продукции биорадикалов:

- окисление органических соединений, в первую очередь фенолов и полифенолов;
- утечка электронов с компонентов электронтранспортных цепей на кислород;
- биотрансформация и токсификация некоторых ксенобиотиков монооксигеназами и некоторыми другими оксидоредуктазами.

В конце 60-х – начале 70-х годов прошлого века было показано, что окисление ряда биологически важных флавинов, как свободных, так и входящих в состав белков [130, 131], а также адреналина, норадреналина и ряда других биогенных аминов [132] молекулярным кислородом (так называемое автоокисление) представляет собой цепной свободнорадикальный процесс, интермедиатами которого являются радикальные метаболиты соответствующих фенолов (семихиноны) и анион-радикал кислорода. В норме продукция биорадикалов в результате автоокисления эндогенных фенолов, по-видимому, не существенна, однако в некоторых условиях, например эмоциональном стрессе, способствующем выбросу катехоламинов, продукция биорадикалов может существенно усиливаться и быть одной из причин развития патологических изменений в органах и тканях.

Утечка электронов в дыхательной цепи митохондрий и коротких электронтранспортных цепях эндоплазматического ретикулума и некоторых других клеточных мембран, по-видимому, является основным механизмом нефизиологического образования биорадикалов. Хотя в нормально работающих митохондриях цитохромы и другие белки, входящие в состав дыхательных комплексов с диоксигеном, не взаимодействуют, его одноэлектронное восстановление и образование анион-радикала кисло-

рода возможно на уровне убихинона. В условиях *in vitro* структурно-функциональные нарушения в митохондриях приводят к значительному росту нефизиологической продукции анион-радикала кислорода и пероксида водорода, при этом утечка электронов происходит не только с молекулы убихинола, но и на уровне цитохромов дыхательной цепи [133-135]. Классическим примером развития структурно-функциональных нарушений в митохондриях, ведущих к росту продукции биорадикалов, является синдром ишемии-реперфузии. В этом случае первичные нарушения в системе окислительного фосфорилирования митохондрий, вызванные дефицитом кислорода в условиях ишемии, способствуют значительному увеличению утечки электронов с различных компонентов электрон-транспортной цепи и усиленной продукции анион-радикала кислорода и других АФК после восстановления кровообращения и уровня кислорода в ишемизированной ткани. В результате развивается окислительный стресс и интенсифицируются процессы перекисного окисления, существенно усугубляющие последствия ишемии как в самих митохондриях, так и в клетках и ткани в целом. Существуют многочисленные экспериментальные данные об образовании продуктов ПОЛ при ишемии (гипоксии) и особенно при реперфузии (реоксигенации) печени [136], скелетных мышц и миокарда [137-139], головного мозга [140-143]. О существенном вкладе свободнорадикальных процессов в повреждающее действие ишемии-реперфузии свидетельствует хороший терапевтический эффект различных по своей структуре антиоксидантов: α -токоферола [144], маннитола [139], производных 1,4-дигидропиридина [145] и о-бензохинона [146], низкомолекулярных СОД-миметиков [147] и даже лечебной диеты с высоким содержанием природных антиоксидантов [148, 149].

Утечка электронов на кислород с компонентов дыхательной цепи митохондрий далеко не единственный источник биорадикалов при ишемии-реперфузии. В 1981 г. Granger, Rutili и McCord высказали гипотезу, что при ишемии в слизистой тонкого кишечника фермент ксантиндегидрогеназа (КФ 1.2.1.37) способен под действием протеаз, активируемых ионами кальция, превращаться в ксантиноксидазу [150]. Оба фермента катализируют окисление различных пуринов до мочевой кислоты, но если ксантиндегидрогеназа (Д-форма) использует в качестве акцепторов электронов НАД⁺, то ксантиноксидаза (О-форма) переносит электрон на молекулярный кислород с образованием анион-радикала [151]. Превращение Д-формы фермента в О-форму может быть обусловлено и окислением одной или нескольких тиоловых групп [152-154]. В последующих исследованиях [155, 156] были получены следующие экспериментальные

доказательства, свидетельствующие, что образование ксантинооксидазы и генерация анион-радикал кислорода являются ключевым звеном в постшемическом повреждении слизистой тонкого кишечника:

- ксантиндегидрогеназа превращается в ксантинооксидазу сразу после создания ишемии;
- при ишемии происходит деградация макроэргических соединений и увеличение содержания гипоксантина более, чем в 20 раз;
- морфологические изменения, образование продуктов ПОЛ и снижение содержания восстановленного глутатиона происходят, главным образом, в первые минуты после начала реперфузии и в значительной степени подавляются аллопуринолом (ингибитор процесса конверсии ксантиндегидрогеназы) и особенно ферментом, убирающим анион-радикал кислорода, – супероксиддисмутазой (СОД).

Высокая эффективность защитного действия супероксиддисмутазы была выявлена также при ишемии-реперфузии сердца в экспериментальных [157-160] и клинических [161] исследованиях, при ишемии-реперфузии поджелудочной железы [162] и кожи [163]. В то же время в экспериментах с изолированными гепатоцитами установлено, что ксантиндегидрогеназа превращается в ксантинооксидазу после того, как практически все клетки теряют жизнеспособность и, более того, конверсия происходит только после высвобождения фермента из гепатоцитов [164]. Тем не менее, аллопуринол [165] и СОД [136, 165, 166] оказывают хороший защитный эффект при ишемически-реперфузионном повреждении печени. Объяснить эти противоречивые, на первый взгляд, результаты можно, допустив, что образование ксантинооксидазы и генерация анион-радикала кислорода при ишемии-реперфузии печени и других органов первоначально происходит не во всех клетках, а в наиболее чувствительных к этому воздействию.

В связи с этим особого внимания заслуживают эндотелиальные клетки. Эндотелий выстилает внутреннюю поверхность кровеносных сосудов всех органов и тканей и является не просто пассивным барьером, разделяющим кровь и сосудистую стенку, но и важным регулятором сосудистого тонуса и проницаемости [167]. Регуляция сосудистого тонуса связана с синтезируемыми в эндоплазматическом ретикулуме эндотелиальных клеток эйкозаноидами - простагландинами и лейкотриенами [168]. Исходным субстратом для синтеза эйкозаноидов является арахидоновая кислота, транспортируемая в эндотелиальные клетки с кровью [167]. Функционирование сплошного монослоя эндотелиальных клеток как селективно-проницаемого барьера тесно связано с их морфологическими особенностями. Среди таких особенностей в первую очередь следует вы-

делить наличие гликокаликса, богатого углеводами покрытия, своеобразной "одежды" эндотелиальной клетки. Гликокаликс функционирует как барьер, разделяющий проникающие в клетки молекулы по размеру, форме и заряду [167]. Функция эндотелия как селективного барьера возможна только при плотном прилегании клеток друг к другу, которое обеспечивается цитоконтрактивными и цитоскелетными элементами. Повреждение микрофиламентов некоторыми препаратами приводит к нарушению проницаемости эндотелиального слоя, которое снимается после отмывания клеток и восстановления целостности микрофиламентного аппарата [169]. Эндотелиальные клетки капилляров и мелких сосудов различных органов, включая печень, сердце, легкие, почки, характеризуются высоким уровнем ксантиндегидрогеназы, значительно превышающим ее содержание в других типах клеток, например эпителиальных или паренхиматозных [152, 170]. В гипоксических условиях ксантиндегидрогеназа эндотелиальных клеток почти полностью превращается в ксантиноксидазу [161]. Ratyч, Chuknyiska, Bulkley [170] установили, что реоксигенация эндотелиальных клеток после 45-минутной гипоксии вызывает их повреждение и лизис без участия клеток белой крови, и эти повреждения почти полностью предотвращаются при добавлении в культуральную среду СОД и каталазы и, в несколько меньшей степени, аллопуринола. Основываясь на этих результатах, они постулировали возможность существования в различных органах и тканях единого пускового механизма реперфузионных повреждений, локализованного в эндотелиальных клетках [170]. Однако существуют экспериментальные данные, которые противоречат данной гипотезе. Например, показано, что первичное повреждение может локализоваться в паренхиматозных клетках тонкого кишечника [150, 155] и эпителиальных клетках, выстилающих поверхность почечных канальцев [171].

Еще одним потенциальным источником активных форм кислорода в условиях реперфузии являются нейтрофилы, присутствующие в циркулирующей крови [41, 119, 120, 172]. Однако эти клетки не содержат ксантиноксидазы, и процесс генерации активных форм кислорода в них (феномен дыхательного взрыва) не чувствителен к действию аллопуринола [173]. Поэтому, принимая во внимание имеющиеся экспериментальные данные о высокой эффективности защитного действия аллопуринола при реперфузионных повреждениях почек [174], тонкого кишечника [150, 155, 156], миокарда [175] и поджелудочной железы [162], логичен вывод, что действием одних только активированных нейтрофилов нельзя объяснить возникновение и развитие реперфузионных повреждений. Однако в некоторых тканях, например легких [176], тонком кишеч-

нике [177] и, возможно, мозге, в котором защитный эффект аллопуринола при реперфузии незначителен [178], нейтрофилы вносят основной вклад в реперфузионные повреждения. Накопление нейтрофилов в зоне первичного повреждения происходит благодаря хемоаттрактантным свойствам активных форм кислорода и поврежденных эндотелиальных клеток [170]. Реагируя со специфичными стимулами различной природы, нейтрофилы активируются, в них развивается дыхательный взрыв, сопровождающийся высвобождением протеолитических ферментов [179] и образованием активных форм кислорода: анион-радикала, пероксида водорода, гидроксильного радикала [41, 119, 120, 172] и HOCl [180]. В результате как внутри, так и снаружи эндотелиальных клеток создаются возможности для инициирования свободнорадикальных процессов, включая перекисное окисление липидов. Накапливающиеся гидропероксиды и другие продукты ПОЛ изменяют морфологию эндотелиальных клеток, нарушают их функции и, в первую очередь, барьерные свойства эндотелия [167, 170, 181-186]. Появляется возможность для взаимодействия активированных фагоцитов с гладкомышечными и паренхиматозными клетками и, вследствие этого, их повреждение. Таким образом, активированные нейтрофилы выполняют роль своеобразного усилителя в цепочке событий: стимул – повреждение ткани.

Оригинальная концепция патогенеза при ишемии-реперфузии органов и тканей стала развиваться после того, как было установлено, что эндотелиальный релаксирующий фактор является монооксидом азота (NO) [104, 105, 187, 188], и показано, что он способен с высокой скоростью реагировать с анион-радикалом кислорода, образуя пероксинитрит (ONOO^-) [115]. Монооксид азота продуцируется эндотелиальными клетками, а также макрофагами и нейтрофилами [111, 189-191]. Важнейшими физиологическими функциями NO является поддержание нормального уровня вазодилатации и предотвращение тромбогенеза [106, 188, 192, 193]. Ингибирование синтеза эндотелиального релаксирующего фактора с помощью L-нитроаргинина в слизистой тонкого кишечника приводит к нарушению микроциркуляции и развитию ишемии [194, 195]. Аналогичный результат (вторичная ишемия) может быть следствием расходования монооксида азота в реакции с супероксидом, активно продуцируемым эндотелиальными клетками и нейтрофилами в постишемический период. Более того, высокотоксичный продукт этой реакции – пероксинитрит и образующийся при его разложении гидроксильный радикал вносят существенный, возможно основной, вклад в повреждение клеток и тканей [107, 116, 117, 196-199]. Такой механизм вовлечения анион-радикала кислорода в патогенетические процессы косвенно подтверждают экспери-

ментальные данные, свидетельствующие, что кортикальная культура, полученная из трансгенных мышей с гиперпродукцией СОД, устойчива как к нейротоксическому действию агентов, стимулирующих продукцию NO, так и к действию ишемии [200, 201].

Наблюдающееся в последние десятилетия бурное развитие промышленности и, в первую очередь, химического производства, повсеместно привели к резкому ухудшению экологической обстановки и накоплению в воздухе, воде и продуктах питания химических соединений, представляющих потенциальную опасность для человека и животных. Токсическое действие многих из этих соединений обусловлено способностью инициировать в организме свободнорадикальные процессы, приводящие к окислительному повреждению клеток и тканей, локализация и характер которых определяется природой воздействующего агента. Примером таких соединений являются: галогеналканы (тетрахлорметан, трихлорбромметан, 1,2 дибромэтан, галотан), хинонсодержащие соединения (менидион, адриамицин), некоторые спирты [202-205].

Впервые идея о свободнорадикальном механизме токсического действия тетрахлорметана была высказана около сорока лет назад [206]. В середине 60-х прошлого века годов Ghoshal и Recknagel экспериментально подтвердили инициирование свободнорадикальных реакций и образование продуктов перекисного окисления липидов при интоксикации CCl_4 [207, 208]. Несколько позднее Slater установил, что добавление НАДФН и CCl_4 вызывает в микросомальной фракции печени крыс перекисное окисление липидов, и предположил, что оно инициируется трихлорметильным радикалом (CCl_3^{\cdot}), образующимся в процессе метаболизма тетрахлорметана [209, 210]. Существуют многочисленные экспериментальные данные, свидетельствующие, что в метаболической активации CCl_4 главную роль играет монооксигеназная система эндоплазматического ретикулаума печени крыс [211-215]. Благодаря тому, что связь углерод - хлор в молекуле тетрахлорметана сильно поляризована, углерод, имеющий положительный заряд, легко принимает электрон с активного центра цитохрома P-450. В результате последующего гомолитического распада восстановленного интермедиата образуется CCl_3^{\cdot} :



Образование трихлорметильного радикала подтверждено методом ЭПР с использованием специфических спиновых ловушек в микросомах печени и условиях *in vivo* [216-218]. При исследовании кинетики взаимодействия CCl_3^{\cdot} с полиненасыщенными жирными кислотами установлено, что в присутствии кислорода интенсивность сигнала ЭПР, характерного

для трихлорметильного радикала, резко снижается. На основании этих экспериментов было постулировано, что в аэробных условиях $\text{CCl}_3\cdot$ легко реагирует с кислородом, и в результате этой реакции образуется перекисный радикал – $\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$ [219-221]. Однако экспериментально подтвердить образование $\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$ радикала при метаболизме тетрахлорметана не удалось даже в системах *in vitro*, вероятно, вследствие его высокой химической активности [221, 222]. Показано, что $\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$ очень быстро реагирует с полиненасыщенными жирными кислотами и еще более активно – с различными антиоксидантами: аскорбиновой кислотой, β -каротином, α -токоферолом, прометазаном. Значения соответствующих констант скорости реакции второго порядка находятся в диапазоне $10^6 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$ - $10^9 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$ [219]. Радикал $\text{CCl}_3\cdot$ реагирует с различными субстратами значительно медленнее, чем $\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$, значения констант скорости реакции не превышают $10^5 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$ [219]. Кроме того, $\text{CCl}_3\cdot$ взаимодействует с полиненасыщенными жирными кислотами и антиоксидантами практически с одинаковой скоростью. Поэтому α -токоферол и прометазан, эффективно ингибируя реакции $\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$ с полиненасыщенными жирными кислотами, не оказывают существенного влияния на реакции этих субстратов с $\text{CCl}_3\cdot$ [222].

Образующиеся в процессе метаболизма тетрахлорметана радикалы $\text{CCl}_3\cdot$ и $\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$ вовлекаются в последующие метаболические процессы через реакции отрыва водорода и галоалкилирование. В результате первой реакции образуется хлороформ и радикал молекулы донора водорода. В случае, если донором водорода являются полиненасыщенные ацилы мембранных фосфолипидов, образующиеся радикалы инициируют процесс перекисного окисления липидов. В результате реакций галоалкилирования трихлорметильная группа ковалентно связывается с различными молекулами: липидами, белками, нуклеиновыми кислотами, пиримидиновыми и пуриновыми основаниями. Так как α -токоферол и прометазан ингибируют перекисное окисление липидов, инициируемое тетрахлорметаном в микросомах печени и изолированных гепатоцитах, не оказывая существенного влияния на процессы ковалентного связывания [220, 223-226], был сделан вывод о том, что в реакции отрыва водорода участвует, главным образом, активный радикал $\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$, а галоалкилирование обусловлено ковалентным связыванием с различными субстратами радикала $\text{CCl}_3\cdot$ [204, 221, 222, 227]. Значительное внимание было уделено в последние годы исследованию роли перекисного окисления липидов и галоалкилирования в гепатотоксических эффектах галогензамещенных углеводов. В экспериментах *in vitro* установлено, что повреждение компонентов электронтранспортных цепей эндоплазматиче-

ского ретикулума и инактивация системы микросомального окисления [204, 223], нарушение системы кальциевого гомеостаза [204, 222, 224, 228], секреция липопротеидов и жировое перерождение печени [204, 223] обусловлены, главным образом, галоалкилированием. Однако показано, что основной причиной повреждения и гибели изолированных клеток печени при их инкубации в присутствии галогензамещенных углеводов является развитие перекисного окисления липидов [204, 223]. Повреждающее действие перекисного окисления липидов обусловлено, по-видимому, двумя механизмами [204]. Во-первых, изменяются структурно-функциональные свойства мембран в результате потери полиненасыщенных жирных кислот и накопления окисленных липидов. Во-вторых, образуются низкомолекулярные, токсичные продукты окисления мембранных липидов. Среди этих соединений особое значение придается насыщенным и ненасыщенным альдегидам. Так, малоновый диальдегид, один из конечных продуктов ПОЛ, образует внутри- и межмолекулярные перекрестные сшивки, в результате происходит инактивация ферментов, в том числе и не имеющих сульфгидрильных групп [229], сшивание белков и нуклеиновых кислот [230]. Получающиеся в этих случаях флуоресцентные хромофоры, так называемые шиффовы основания, имеют следующую структуру: $R-N=CH-CH=CH-NH-R_1$ [229]. Детально исследованы механизмы образования и особенности цитотоксического действия 4-гидроксиалкенов, обладающих широким кругом токсических эффектов [204, 231-237]. Эти водорастворимые соединения диффундируют от места образования в различные участки клетки и даже в межклеточное пространство, а связываясь с альбумином крови, они способны распространиться по всему организму. 4-гидроксиалкены легко вступают в реакции с $-SH$ и $-NH_2$ группами белков, образуя соответствующие аддукты. Уже в физиологических концентрациях (менее 10^{-6} М) 4-гидроксиалкены стимулируют аденилатциклазу и фосфолипазу плазматической мембраны гепатоцитов и нейтрофилов, оказывают хемоаттрактантное и хемокинетическое действие на нейтрофилы, ингибируют ДНК-полимеразу и модулируют процессы пролиферации и неопластической трансформации [204, 235-237]. При концентрации 10^{-5} М и выше 4-гидроксиалкены снижают скорость дыхания митохондрий и микросомального окисления, ингибируют глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназу, микросомальную Ca^{2+} - Mg^{2+} -АТФазу, лизосомальные ферменты [204]. Эти соединения рассматривают как основные медиаторы экспериментального фиброза печени, индуцируемого тетрахлорметаном [238].

При рассмотрении роли галоалкилирования и перекисного окисления липидов в патогенетических эффектах галогензамещенных углеводов

дов следует учитывать, что в нормальном организме только незначительная часть образующихся пероксидов липидов вовлекается в процессы радикального разрушения до альдегидов и других токсичных низкомолекулярных продуктов [239]. Основное количество гидропероксидов быстро восстанавливается в соответствующие оксисоединения, неспособные участвовать в дальнейших свободнорадикальных процессах [240]. Так, например, через час после перорального введения четыреххлористого углерода в дозе 250 мкл/100 г массы тела на фоне значительного увеличения в печени количества диеновых конъюгатов наблюдается сравнительно небольшое увеличение содержания гидропероксидов липидов и ТБК-активных соединений (табл. 1.1). Это означает, что образующиеся при CCl₄-инициируемом ПОЛ гидропероксиды липидов (LOOH) быстро восстанавливаются в соответствующие спиртовые группы, не вовлекаясь в последующие процессы радикальной дегградации, а сопряженные двойные связи (диеновые конъюгаты) сохраняются в молекулах образующихся продуктов (LOH) [240].

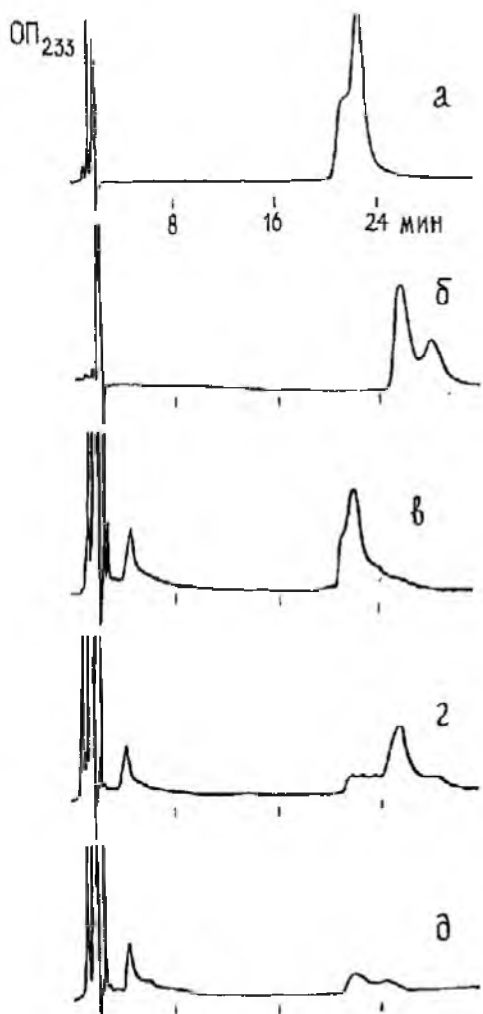
Таблица 1.1

Содержание различных продуктов перекисного окисления липидов, образующихся в печени крыс через 1 ч после перорального введения четыреххлористого углерода (250 мкл/100 г массы тела)

Определяемый параметр	Содержание, нмоль/г ткани
Диеновые конъюгаты	158,0 ± 25,2
Гидропероксиды	10,9 ± 1,8
ТБК-активные продукты	4,0 ± 3,2

Интересно, что если в экспериментах использовались животные, предварительно содержащиеся на диете, исключаяющей содержание витамина Е и селена, доля гидропероксидов липидов среди продуктов ПОЛ существенно увеличивается [241, 242]. Напротив, дополнительное введение в пищу селена, витамина Е или других антиоксидантов приводило почти к полному ингибированию перекисного окисления липидов [241, 242]. Гидропероксиды полиненасыщенных жирных кислот могут легко восстанавливаться в присутствии глутатионпероксидазы [243]. Однако продукты окисления фосфолипидов и других входящих в состав мембран липидов не являются субстратом данного фермента [244]. Для восстановления гидропероксидов фосфолипидов может быть предложен механизм, включающий их предварительный гидролиз и последующее восстановление пероксидов жирных кислот глутатионпероксидазой [245, 246]. Реализации такого механизма способствует то, что гидролиз окисленных фосфолипидов под действием фосфолипазы А₂ происходит зна-

чительно быстрее, чем в случае неокисленных молекул [247-249]. Кроме того, фосфолипаза A_2 активируется продуктами свободнорадикального



окисления [249]. Однако это не единственный механизм восстановления гидропероксидов фосфолипидов. В ряде работ показано, что в печени и некоторых других органов может иметь место восстановление гидропероксидов фосфолипидов без их предварительного гидролиза [244, 250-256]. Об этом, например, свидетельствуют эксперименты [244, 255], в которых гидропероксиды фосфатидилхолина инкубировались 20 мин при 37°C в 10 %-ном гомогенате печени и затем методом жидкостной хроматографии высокого давления анализировались образующиеся продукты. Полученные результаты (рис. 1.3) позволяют сделать вывод, что гидропероксиды фосфатидилхолина легко восстанавливаются в гомогенате печени в соответствующие окисоединения и для их восстановления не требуется предварительного гидролиза фосфатидилхолина. Данный процесс ферментативный и катализируется рядом цитоплазматических белков, которые в качестве кофактора используют восстановленный глутатион [256].

Рис. 1.3. Хроматограммы ВЭЖХ окисленного фосфатидилхолина и продуктов его восстановления

а – окисленный ФХ; б - то же после обработки NaBH_4 ; в – окисленный ФХ сразу после добавления в гомогенат печени; г – окисленный ФХ после 20 мин инкубации в гомогенате печени; д – липиды из гомогената печени

Возвращаясь к вопросу о роли процессов ПОЛ и галоалкилирования (ковалентного связывания) в реализации токсического действия продуктов метаболической активации четыреххлористого углерода, следует отметить, что ответ на этот вопрос могут дать исследования с использованием соединений, способных избирательно влиять на эти процессы в условиях *in vivo*. В этом отношении интерес представляют производные 1,2-бензохинона, структурные формулы которых приведены на рис. 1.4.

Таблица 1.3

Влияние ОБХ₂* на образование первичных продуктов ПОЛ (ДК) и ковалентное связывание радикальных метаболитов в печени крыс через два часа после перорального введения четыреххлористого углерода

Условия эксперимента	ДК, нмоль/г ткани	Ковалентное связывание ¹⁴ С из ССl ₄ , нмоль/г ткани
Контрольные животные	0	0
+ ССl ₄ , 250 мкл/кг	119 ± 18,2	8,3 ± 0,25
+ ССl ₄ , 250 мкл/кг + ОБХ ₂ , 200 мг/кг	11 ± 4,0	6,1 ± 0,95

* - ОБХ₂ вводился за 10 мин до введения четыреххлористого углерода

Известно, что одной из мишеней гепатотоксического действия четыреххлористого углерода являются гидроксилирующие ферменты эндоплазматического ретикулума печени. Так, было показано [260, 261], что пероральное введение четыреххлористого углерода в дозе 1 мл/кг массы тела уже через 2 часа приводит к снижению содержания цитохрома Р-450 в эндоплазматическом ретикулуме печени более чем на 50 % (табл. 1.4, рис. 1.4). Еще в большей степени снижается эффективность микросомального окисления, в частности скорость гидроксилирования анилина и полностью подавляется способность микросом печени к метаболической активации ССl₄. Такой результат действия ССl₄ является следствием структурной и функциональной гетерогенности цитохрома Р-450, поскольку очевидно, что в первую очередь инактивируются формы цитохрома, катализирующие метаболизм галогензамещенных углеводов.

Таблица 1.4

Влияние предварительного введения ОБХ1 на содержание диеновых конъюгатов и состояние системы микросомального окисления печени крыс через 2 часа после отравления ССl₄ (1 мл/кг массы тела)

Условия эксперимента	Содержание ДК, нмоль/г ткани	Параметры системы микросомального окисления		
		Содержание цитохрома Р-450 нмоль/мг белка	Гидроксилазная активность нмоль/мг белка мин	ССl ₄ -пероксидазная активность
Контроль	0	0,82 ± 0,10	0,52 ± 0,10	1,04 ± 0,20
+ ССl ₄	194,9	0,37 ± 0,03	0,10 ± 0,02	0,07 ± 0,03
+ ОБХ ₂ + ССl ₄	30,5	0,45 ± 0,03	0,19 ± 0,04	0,12 ± 0,04

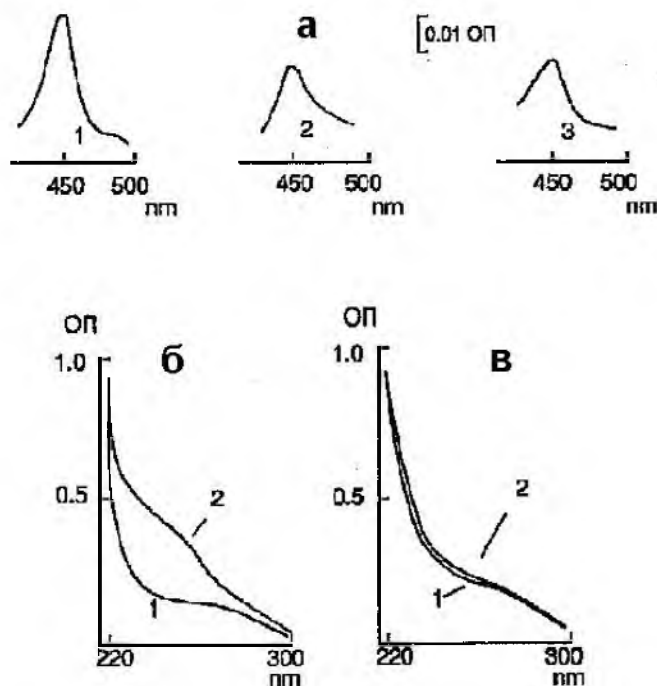


Рис. 1.4. Влияние предварительного введения ОБХ₂ (200 мг/кг) на спектры, отражающие содержание цитохрома Р-450 и ДК в печени крыс в норме и через два часа после интоксикации ССl₄ (1 мл/кг) [260].

а – типичные дифференциальные спектры карбонильного комплекса цитохрома Р-450 из печени: контрольных животных (1), животных, отравленных ССl₄, без (2) и на фоне предварительного введения ОБХ₂ (3); б – типичный УФ-спектр липидов печени контрольных животных (1) и животных, отравленных ССl₄ (2); в – типичный УФ-спектр липидов печени животных, которым вводили ОБХ₂ (1) и животных, отравленных ССl₄ на фоне предварительного введения ОБХ₂ (2)

Предварительное введение ОБХ₂ в дозе 200 мг/кг массы тела за 10 мин до отравления

ССl₄ приводило к ингибированию образования диеновых коньгатов почти на 85 % (табл. 1.4, рис.1.4 б и в). Однако способность микросом печени к метаболической активации ССl₄ практически не восстанавливалась, а их N-гидроксилазная активность и содержание в мембранах эндоплазматического ретикулума цитохрома Р-450 восстанавливались только на 10-20 % (табл. 1.4, рис.1.4 а). Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что ингибирование перекисного окисления липидов не устраняет инактивирующего действия ССl₄ на систему микросомального окисления клеток печени. Основным повреждающим фактором в этом случае является, по-видимому, ковалентное связывание радикальных метаболитов ССl₄ (ССl₃[•]) с соответствующими белковыми молекулами.

1.4. Механизмы детоксикации биорадикалов в организме

Для локализации и ограничения зоны действия физиологически значимых биорадикалов и детоксикации биорадикалов, возникающих нефизиологическим путем, у аэробных организмов в ходе эволюции сформировались сложная защитная система, включающая ферменты и низкомолекулярные соединения.

Ключевым ферментом антиоксидантной защитной системы является супероксиддисмутаза (КФ 1.15.1.1), катализирующая реакцию диспропорционирования анион-радикалов кислорода:



Впервые супероксиддисмутазная активность была выявлена Мак-Кордом и Фридовичем в 1969 году [29]. Они показали, что ускорение реакции (1.21) является физиологической функцией медь-содержащего белка эритрокупреина (гемокупреина), известного с 1938 года [262]. Так как, кроме иона меди, открытый Мак-Кордом и Фридовичем фермент содержал цинк, он был назван – медь-, цинк-содержащая супероксиддисмутаза. Cu-,Zn-СОД состоит из двух субъединиц, каждая из которых имеет молекулярную массу 16300 Да [7]. Константа скорости реакции (1.21) в присутствии Cu-,Zn-СОД равна $2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ и не зависит от величины рН в интервале 4,8 - 10,2 [7]. Несколько позднее были выявлены марганец-содержащий [263] и железо-содержащий [264] ферменты. Cu-,Zn-СОД присутствует во всех эукариотических клетках, где содержится, в основном, в цитозоле [7, 265]. Некоторое количество этого фермента находится в лизосомах [266] и пероксисомах [267]. Железо-содержащий фермент найден только у прокариотов. Марганец-содержащая СОД присутствует у прокариотов и в митохондриях эукариотических клеток [7]. Однако предшественник митохондриальной Mn-СОД синтезируется в цитозоле, в митохондриях происходит лишь отщепление от него полипептидного фрагмента [268, 269].

Сравнительно недавно была выделена и исследована экстрацеллюлярная форма супероксиддисмутазы [270-273]. Экстрацеллюлярная СОД является основным изоферментом в плазме, лимфе и синовиальной жидкости и представляет собой гликопротеид, состоящий из 4 субъединиц. Каждая субъединица имеет молекулярную массу около 30 кДа и содержит ионы меди и цинка. Кроме более высокой молекулярной массы, субъединица экстрацеллюлярной СОД отличается от субъединицы цитоплазматической Cu-,Zn-СОД аминокислотным составом, антигенными свойствами и генным локусом, кодирующим аминокислотную последовательность апофермента. Каталитическая активность экстрацеллюлярной СОД значительно ниже, чем у цитоплазматического фермента.

При аффинном разделении на гепарин-сефарозе выявлены три фракции экстрацеллюлярной СОД: *A*, *B*, *C*. Фракция *A* не имеет сродства к гепарину, фракция *B* обладает слабым сродством, фракция *C* хорошо связывается гепарином [274-277]. Фракция *C* способна связываться не только с гепарином, но и с другими гликозаминогликанами. Вследствие этого в условиях *in vivo* экстрацеллюлярная СОД *C* в основном связана с гликокаликсом эндотелиальных клеток сосудистой стенки, тогда как формы *A* и *B* находятся преимущественно в плазме. Связь между гликозаминогликанами клеточной поверхности и экстрацеллюлярной СОД *C* имеет электростатическую природу. Связывающий участок расположен доста-

точно далеко от каталитического центра, благодаря чему в условиях *in vivo* фермент, иммобилизованный на клеточной поверхности, сохраняет основную часть активности [277]. Показано, что вводимый внутривенно в больших концентрациях гепарин (1000 ЕД/кг) вытесняет форму С фермента с поверхности эндотелиальных клеток и вследствие этого увеличивается количество экстрацеллюлярной СОД в плазме крови [274, 275].

Содержание изоферментов супероксиддисмутазы в отдельных органах и тканях экспериментальных животных существенно различается. Наиболее высокий уровень Cu-,Zn-СОД выявлен в печени (до 350 мкг/г массы ткани), почках (185 мкг/г массы ткани) и поджелудочной железе (165 мкг/г массы ткани). В сердце, мозге и эритроцитах содержание этого изофермента составляет около 60-70 мкг/г массы ткани (клеток). Наименьший уровень супероксиддисмутазной активности выявлен в мышечной и жировой ткани [278, 279]. Активность Mn-СОД снижается в ряду: сердце, почки, печень, мозг, поджелудочная железа, мышечная и жировая ткань. В эритроцитах Mn-СОД отсутствует [278]. В отдельных органах также существуют различия в распределении супероксиддисмутазной активности. Например, в мозге глиальные клетки содержат супероксиддисмутазы в шесть раз больше, чем нейроны [280].

С возрастом, в процессе индивидуального развития организма, удельная активность супероксиддисмутазы в печени, сердце и мозге мышей снижается, хотя снижение активности в сердце и мозге компенсируется увеличением количества фермента [281]. Есть данные, что с возрастом общая супероксиддисмутирующая активность в мозге может даже увеличиваться [282]. Одной из причин, обуславливающих снижение удельной активности СОД, может быть посттрансляционная модификация белка в результате его неферментативного гликозилирования [283].

Образующийся в процессе диспропорционирования анион-радикала кислорода пероксид водорода (реакция 1.21) может утилизироваться с помощью двух ферментов: каталазы (КФ 1.11.1.6) и глутатионпероксидазы (КФ 1.11.1.9).

Каталаза катализирует разложение пероксида водорода с образованием молекулярного кислорода и воды:



Наибольшая каталазная активность выявлена в печени, крови (эритроциты) и почках. В головном мозге каталаза практически отсутствует [278, 279]. Каталитическая активность этого фермента чрезвычайно высокая. Одна молекула каталазы может разложить за секунду 44000 молекул пероксида водорода [284]. В присутствии фермента реакция (1.22) почти не требует энергии активации и ее скорость определяется скоро-

стью диффузии субстрата к активному центру фермента [284, 285]. Однако каталаза характеризуется большой величиной K_m , и эффективное разложение пероксида водорода происходит только при его высокой концентрации [7, 285]. Поэтому в клетке максимальная каталазная активность характерна для мест с высокой продукцией H_2O_2 , например пероксисомах [7, 267]. Защита каталазы от высоких концентраций собственного субстрата, по-видимому, обеспечивается НАДФН. Каждая субъединица тетрамерной молекулы каталазы способна связывать молекулу восстановленного никотинамидадениндинуклеотидфосфата, который препятствует образованию неактивной формы фермента под действием H_2O_2 [286].

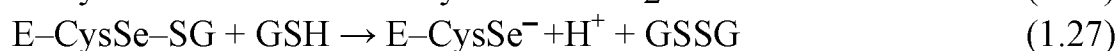
Основную роль в детоксикации пероксида водорода в клетке играет глутатионпероксидаза. Экспериментальные результаты, подтверждающие этот вывод, получены на культивируемых эндотелиальных клетках [287], эпителиальных клетках слизистой желудка [288] и печени крыс *in vivo* [289]. Впервые глутатион-зависимый фермент, защищающий в эритроцитах гемоглобин от повреждающего действия пероксида водорода, был выявлен Милсом в 1957 году [290]. В настоящее время установлено, что молекула "классической" глутатионпероксидазы представляет собой тетрамер, состоящий из идентичных субъединиц. Молекулярный вес всей молекулы около 85 кДа, одной субъединицы – 21 кДа [291-293]. Каждая субъединица фермента содержит один атом селена в виде селеноцистеина [292, 294, 295]. В качестве донора водорода глутатионпероксидаза использует только восстановленный глутатион, однако фермент обладает широкой субстратной специфичностью в отношении восстанавливаемого субстрата и, кроме пероксида водорода (реакция 1.23), способен катализировать двухэлектронное восстановление различных органических гидропероксидов, в том числе и гидропероксидов свободных полиненасыщенных жирных кислот [243, 291]:



Гидропероксидные группы полиненасыщенных жирных кислот, входящих в состав молекул фосфолипидов, не являются субстратом для классической селен-содержащей глутатионпероксидазы [296].

Кинетика действия селен-содержащей глутатионпероксидазы соответствует механизму двойного замещения или пинг-понг механизму [291]. Суммарная реакция (уравнения 1.23 или 1.24) включает ряд элементарных стадий:





Кажущиеся константы скорости второго порядка (k_1) реакции глутатионпероксидазы из печени хомяка с различными гидропероксидами равны: для гидропероксида t-бутила – $7,06 \cdot 10^5 \text{ mM}^{-1} \text{ мин}^{-1}$; гидропероксида кумила – $1,04 \cdot 10^6 \text{ mM}^{-1} \text{ мин}^{-1}$; гидропероксида линолевой кислоты – $2,36 \cdot 10^6 \text{ mM}^{-1} \text{ мин}^{-1}$; пероксида водорода – $2,98 \cdot 10^6 \text{ mM}^{-1} \text{ мин}^{-1}$ [292].

Содержание глутатионпероксидазы в различных тканях организма уменьшается в ряду: *печень > эритроциты > почки > желудок > сердце = легкие = мозг > плазма > мышцы* [278, 297, 298]. Около 75 % глутатионпероксидазной активности определяется в цитоплазме клеток, остальное количество фермента локализовано в митохондриях [297, 299, 300]. В плазме крови выявлен изофермент, отличающийся иммунологически от внутриклеточной глутатионпероксидазы. Подобно внеклеточной СОД апофермент плазматической формы является гликопротеидом [301]. Показано, что существуют возрастные и суточные (циркадные) изменения активности глутатионпероксидазы в различных тканях экспериментальных животных [298, 302]. В период снижения активности глутатионпероксидазы в сердце отмечена активация процессов перекисного окисления липидов [302].

Уровень глутатионпероксидазы в тканях чрезвычайно чувствителен к алиментарному поступлению селена в организм. Содержание животных в течение нескольких недель на *Se*-дефицитной диете приводит к резкому снижению глутатионпероксидазной активности [293, 297, 303] и пропорциональному уменьшению тканевого уровня соответствующего иммунореактивного белка [293, 303]. Степень снижения активности фермента неодинакова в различных тканях, которые по чувствительности к дефициту селена располагаются следующим образом: *плазма > печень > почки > сердце = легкие > эритроциты* [297].

При однократном внутривенном введении *Se*, как селенита или селенометионина, животным, содержащимся на *Se*-дефицитной диете, нормальный уровень активности фермента в плазме, почках, желудке и печени восстанавливался в течении 48 часов [293, 297]. По вопросу о том, каким образом селен включается в состав молекулы фермента, существует две точки зрения. В соответствии с первой, селен модифицирует неактивный белок-предшественник уже после завершения его синтеза (посттрансляционное включение) [304]. Однако более глубокое экспериментальное подтверждение, по-видимому, имеет точка зрения, что включение *Se* в белковую молекулу происходит в ходе нормального трансляционного процесса [293].

В настоящее время защитную роль глутатионпероксидазы рассматривают в двух аспектах. Во-первых, фермент способен восстанавливать пероксид водорода, предотвращая его вовлечение в реакцию Фентона и ингибируя свободнорадикальные процессы на стадии инициирования. Во-вторых, восстанавливая гидропероксиды полиненасыщенных жирных кислот, глутатионпероксидаза блокирует свободнорадикальные процессы на стадии разветвления цепи [297]. Так как "классическая" глутатионпероксидаза не способна восстанавливать гидропероксиды жирных кислот, входящих в состав липидов биологических мембран, то для реализации ее защитного действия необходимо участие фосфолипазы A_2 , катализирующей предварительный гидролиз фосфолипидов [245, 246]. Протеканию этой реакции способствует то обстоятельство, что окисленные жирные кислоты отщепляются фосфолипазой A_2 значительно быстрее, чем неокисленные [247-249]. Кроме того, фосфолипаза A_2 активируется продуктами свободнорадикального окисления [249]. Наиболее эффективно гидролизуются фосфолипазой A_2 фосфатидилэтаноламин и фосфатидилхолин [249], являющиеся основными субстратами реакций перекисного окисления липидов в биологических мембранах. Следует отметить, что фосфолипаза A_2 , в частности митохондриальный фермент, оказывает интрамембранное действие, то есть катализирует гидролиз липидов, расположенных на одной с ней мембране [305]. Гидролиз экзогенных липидов происходит после их связывания с клеточными мембранами [306].

В организме глутатионпероксидаза функционирует не только как компонент защитной антиокислительной системы, но и играет важную роль в процессах биосинтеза простагландинов и лейкотриенов [291, 307, 308].

Наряду с "классической" селен-зависимой глутатионпероксидазой, в организме присутствует ряд других ферментов, выполняющих сходную функцию. К таким ферментам относятся глутатионтрансферазы (глутатион-S-трансферазы) (КФ 2.5.1.18). Кроме реакций конъюгации глутатиона с многочисленными электрофильными субстратами, глутатионтрансферазы катализируют реакции восстановления органических гидропероксидов [309, 310], включая пероксиды фосфолипидов [311], эндопероксиды (эпоксиды) [307, 308, 310], но неактивны в отношении гидропероксида водорода [309, 310]. Поскольку в состав глутатионтрансферазы селен не входит, ее часто называют селен-независимая глутатионпероксидаза. Наибольшая селен-независимая глутатионпероксидазная активность выявлена в печени, значительно ниже содержание фермента в легких и сердце [298]. Глутатионтрансфераза выделена также из эритро-

цитов [312] и клеток кожи [313]. В гепатоцитах около 80 % глутатионтрансферазы (около 10 % всего растворимого белка) находится в цитоплазме, остальное количество почти равномерно распределено между микросомами, внешней мембраной митохондрий и ядрами [309, 314]. Цитоплазматическая глутатионтрансфераза представляет собой семейство изоферментов, которые разделяют в зависимости от величины значения pI на три класса: *Alpha* (основные), *Mu* (нейтральные) и *Pi* (кислые) [310]. Все цитозольные формы являются димерами, состоящими из одинаковых или гетерогенных субъединиц с молекулярной массой около 25 кДа [310, 313, 315]. Микросомальный (мембраносвязанный) фермент – обычно тример или тетрамер, состоящий из субъединиц с молекулярной массой 17 кДа [310]. Функциональные свойства субъединицы в димере не зависят от природы соседнего полипептида как в отношении каталитической активности, так и в отношении чувствительности к действию ингибиторов [310]. Значительные различия в каталитических свойствах исходных субъединиц обуславливают существование широкого спектра изоферментов глутатионтрансферазы, отличающихся по степени пероксидазной активности [315]. При содержании животных на селендефицитной диете наблюдается увеличение активности всех изоферментов глутатионтрансферазы, являющееся, по-видимому, компенсаторной реакцией на уменьшение в тканях уровня глутатионпероксидазы [316, 317]. Однако тяжелые последствия недостатка селена в пище [241, 267, 318-320] свидетельствуют, что антиокислительная функция глутатионпероксидазы компенсируется глутатионтрансферазой не полностью. Вместе с тем, в некоторых органеллах, например ядрах, глутатионтрансфераза играет важную роль в предотвращении повреждающего действия пероксидов липидов [321].

Около двадцати лет назад было показано, что в цитоплазме печени и эритроцитах крыс присутствует глутатион-зависимый белковый фактор, ингибирующий перекисное окисление липидов, даже в отсутствие фосфолипазы A_2 [322, 323]. Первоначально его связывали с цитоплазматической глутатионтрансферазой. Однако оказалось, что, подобно селенсодержащей глутатионпероксидазе, цитоплазматический селеннезависимый фермент ингибирует перекисное окисление липидов только при наличии условий для гидролиза липидов и высвобождения гидропероксидов ненасыщенных жирных кислот из мембран [245, 324]. В последующих исследованиях было показано присутствие в цитоплазме клеток печени [244, 250, 255, 256], сердца [251] и мозга [252] белка, способного эффективно восстанавливать гидропероксиды фосфолипидов без их предварительного гидролиза. Выделенный из сердца свиней белок, на-

званный глутатионпероксидазой гидропероксидов фосфолипидов, оказался мономером с молекулярной массой 23 кДа [253]. Фермент содержал один атом селена на молекулу белка и катализировал восстановление гидропероксидов водорода, линолевой кислоты и фосфатидилхолина в присутствии восстановленного глутатиона, с константами скоростей реакции второго порядка, равными соответственно: $1,8 \cdot 10^5 \text{ mM}^{-1} \text{ мин}^{-1}$; $1,8 \cdot 10^6 \text{ mM}^{-1} \text{ мин}^{-1}$; $8,0 \cdot 10^5 \text{ mM}^{-1} \text{ мин}^{-1}$ [253]. Сходная по структуре и субстратной специфичности мономерная глутатионпероксидаза была выделена из печени крыс [254]. При исследовании тканевого распределения мономерной глутатионпероксидазы максимальная активность выявлена в печени и почках. Значительно ниже активность фермента в сердце, легких и мозге. Минимальный уровень мономерной глутатионпероксидазы характерен для мышц [298]. Существенных возрастных изменений в активности фермента не выявлено [298].

Установлено, что мономерная глутатионпероксидаза ингибирует фотосенсибилизированное окисление липидов тень эритроцитов, полностью восстанавливая гидропероксиды фосфолипидов и холестерина без их предварительного гидролиза. "Классическая" глутатионпероксидаза ингибировала этот процесс только в присутствии фосфолипазы A_2 , при этом гидропероксиды холестерина не восстанавливались [246].

Семейство глутатионпероксидаз является примером наиболее филогенетически старых белков. Они выявлены у бактерий и простейших [325]. У позвоночных известны четыре гена, контролирующего синтез различных селен-содержащих ферментов [325, 326]. Кроме рассмотренных выше "классической", плазматической и мономерной глутатионпероксидаз, особый изофермент найден в желудочно-кишечном тракте [326]. Аминокислотная последовательность у всех ферментов, за исключением мономерной глутатионпероксидазы, совпадает приблизительно на 90 %, тогда как гомология между "классической" и мономерной глутатионпероксидазой - менее 30 % [326]. Такое значительное различие в аминокислотной последовательности этих белков указывает, что расхождение между соответствующими генами началось около миллиарда лет назад. Наиболее консервативным фрагментом у глутатионпероксидаз является каталитический центр, состоящий из селеноцистеина, триптофана и глутамина [325]. Его высокая филогенетическая устойчивость обусловлена, по видимому, идеальным выполнением своих функций, исключаящим одноэлектронный перенос и образование радикальных и других высокоактивных интермедиатов, как это характерно для гем-содержащих и селен-независимой пероксидаз [326]. Дивергенция селен-содержащих ферментов проходила в направлении изменения субстратной специфичности

связывающего участка. Более высокая его липофильность у глутатионпероксидазы фосфолипидов обусловлена отсутствием остатков аргинина в этом локусе [326].

Для эффективного функционирования различных глутатионпероксидаз необходим высокий уровень восстановленного глутатиона. В частности, мономерная глутатионпероксидаза восстанавливает гидропероксиды в модельных условиях при 1-3 мМ концентрации GSH [246]. Поэтому в клетке глутатион находится, главным образом, в восстановленной форме. Например, для эритроцитов отношение GSH/GSSG близко к 10 [327]. Высокое соотношение GSH/GSSG поддерживается благодаря активности глутатионредуктазы (КФ 1.6.4.2), фермента катализирующего реакцию:



In vivo единственным субстратом для глутатионредуктазы является НАДФН [87]. В зрелых эритроцитах регенерация НАДФН возможна только в результате глюкозо-6-фосфатдегидрогеназной реакции пентозофосфатного цикла [87]. Поэтому катализирующий эту реакцию фермент глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (КФ 1.1.1.49) функционирует в эритроцитах как один из ключевых элементов антиокислительной защитной системы. Существуют многочисленные экспериментальные доказательства, что генетически обусловленный дефицит глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы коррелирует с повышенной чувствительностью эритроцитов к гемолитическому действию ксенобиотиков, бактериальных и вирусных инфекций, стресса [87].

Кроме глутатиона, являющегося универсальным донором водорода для селен-содержащих и селен-независимых пероксидаз, в аэробных организмах присутствует ряд других низкомолекулярных соединений, часто объединяемых термином – "биоантиоксиданты". Введение данного термина обусловлено тем обстоятельством, что при исследовании биологических объектов выявлены вещества, ингибирующие свободнорадикальные реакции в различных модельных системах и организме в целом, но не обладающие или обладающие в незначительной степени способностью тормозить такие реакции в простых химических системах, то есть не являющиеся классическими антиоксидантами. В качестве примера могут быть приведены упоминавшиеся выше соединения селена – селенит и селенометионин. Известные в настоящее время биоантиоксиданты могут быть классифицированы по механизму действия следующим образом:

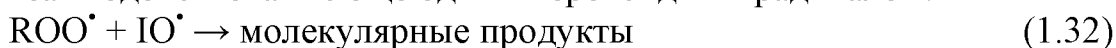
- классические антиоксиданты (обрывающие цепь агенты);
- ловушки инициаторов свободнорадикальных реакций;

- хелаторы (железосвязывающие агенты);
- кофакторы и низкомолекулярные компоненты защитных антиокислительных ферментов и их предшественники

Большинство фенолов является цепь-обрывающими агентами [328]. Они взаимодействуют с пероксидными радикалами (реакция 1.29), предотвращая развитие цепного свободнорадикального окисления (реакции 1.30 и 1.31):

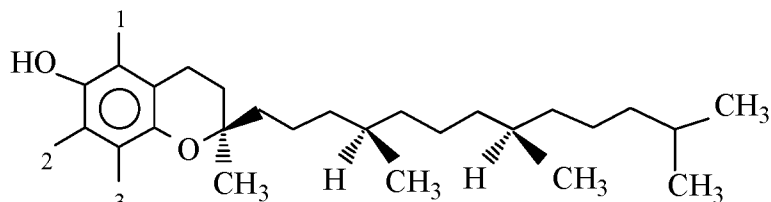


Образующиеся в результате реакции (1.29) феноксильные радикалы являются резонансно стабильными структурами, неспособными продолжать цепь свободнорадикальных реакций [328], однако они способны взаимодействовать с еще одним пероксидным радикалом:



Водорастворимые антирадикальные агенты, например аскорбиновая кислота, могут восстанавливать феноксильные радикалы в исходные фенолы.

Эффективность антиоксидантов в биологических системах зависит от ряда факторов, включая их активность по отношению к пероксидным радикалам. Для того, чтобы антиоксиданты были способны в сравнительно небольших концентрациях предотвращать окисление полиненасыщенных жирных кислот и других легко окисляемых субстратов (RH), константа скорости реакции (1.29) должна быть значительно выше константы скорости реакции (1.30), то есть $k_{29} \gg k_{30}$. Наиболее эффективным природным антиоксидантом является, по-видимому, α -токоферол. Это соединение, являющееся метильным производным токола [2-метил-2-(4,8,12-триметил-ридецил)-хроман-6-ол], часто называют витамином E, что не совсем точно, поскольку в препаратах, выделенных из растительного сырья, присутствуют и другие метильные производные токола, обладающие E-витаминной активностью. Они отличаются друг от друга числом и положением метильных групп в ароматическом кольце [329, 330]:



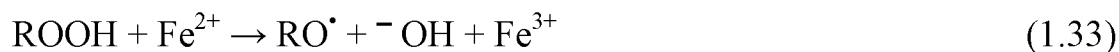
α -токоферол - (1 - CH₃, 2 - CH₃, 3 - CH₃); β -токоферол - (1 - CH₃, 2 - H, 3 - CH₃);
 γ -токоферол - (1 - H, 2 - CH₃, 3 - CH₃); δ -токоферол - (1 - H, 2 - H, 3 - CH₃);
 токол - (1 - H, 2 - H, 3 - H)

Антирадикальная активность токоферолов уменьшается в ряду α , β , γ , δ , токол [328, 331-333]. Количественно этот показатель может быть охарактеризован величиной k_{29} [328]. Для α -токоферола константа скорости реакции взаимодействия с алкилпероксидными радикалами составляет, по разным источникам: $1,5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ [334], $2,0 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ [335], $5,1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ [336], $2,6 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ [337] и $3,2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ [328]. В последней работе приведены и величины k_{25} для β , γ и δ токоферолов равные соответственно 1,3; 1,4 и $0,44 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ [328]. Однако эти значения определены для реакций, протекающих в гомогенных системах, содержащих неполярный растворитель. Для гетерогенных систем, в которых окисляемые липиды структурированы в виде бислойных и многослойных липосом, антиоксидантная активность токоферолов, как и других фенольных антиоксидантов, существенно снижена. Например, α -токоферол в этих условиях в 500 раз менее активен, чем при окислении липидов в хлорбензоле [338]. По-видимому, основной причиной данного феномена является эффект "всплывания", или выталкивание пероксидных радикалов из неполярного окружения в водную фазу. Вследствие этого, молекулы антиоксидантов взаимодействуют с радикалами в полярном окружении, где сильный сольватационный эффект воды снижает "подвижность" атома водорода гидроксильной группы [338]. Кроме того, липофильные антиоксиданты будут, преимущественно, аккумулироваться в липидах, и их реальная концентрация в водной фазе значительно ниже усредненной расчетной величины. Сравнительно низкая антиокислительная активность α -токоферола в мембранах может быть связана и с низкой подвижностью его молекул, обусловленной наличием боковой фитольной цепи. В частности, показано, что способность α -токоферола и его аналогов с различной длиной фитольной цепи ингибировать перекисное окисление липидов в биологических мембранах *in vitro* тем ниже, чем больше длина фитольной цепи [339].

Тем не менее, даже в гетерогенных системах константа скорости реакции (1.29) значительно превышает константу скорости реакции (1.30) ($k_{30} = 36 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ [40]). Поэтому токоферолы эффективно ингибируют перекисное окисление липидов в модельных системах [52, 332, 333, 340, 341]. В случае использования липосом из линоленовой кислоты торможение окисления выявлено при соотношении α -токоферола и субстрата 1 : 1500-2000 [340]. Так и константа скорости реакции взаимодействия токоферолов с радикалами гидропероксидов, их антиокислительная активность, уменьшается в ряду: α , β , γ , δ , токол [332, 333]. Реакция 1.29 может рассматриваться как практически необратимая, так как показано, что константа скорости обратной реакции, то есть взаимодействия гид-

ропероксида трет-бутила с радикалом α -токоферола, равна всего $3,65 \cdot 10^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ [342]. α -Токоферол также прямо не взаимодействует с гидропероксидами [343].

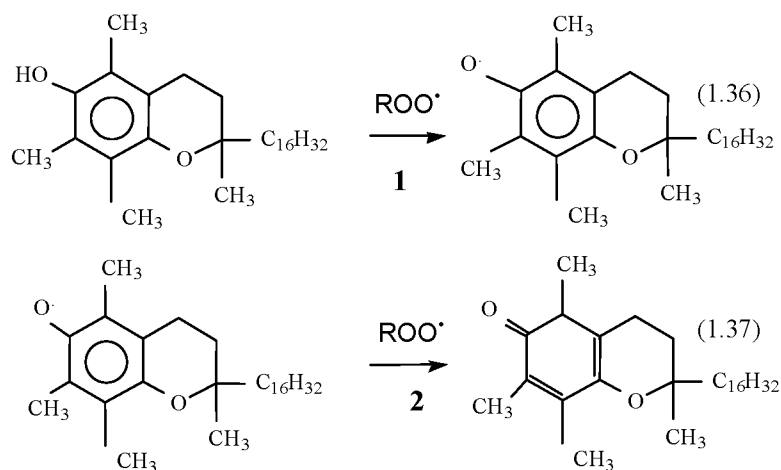
Антиокислительная активность α -токоферола и других антиоксидантов в модельных системах зависит от природы иницирующего агента, места и скорости образования радикалов [341]. Например, кроме алкилпероксидных, α -токоферол легко реагирует с алкоксильными радикалами (RO^\bullet), образующимися в реакции вторичного иницирования:



Однако эффективность антиокислительного действия α -токоферола при иницировании окисления полиненасыщенных липидов алкоксильными радикалами (реакция 1.35) незначительна, поскольку величина k_{34} не намного превышает значение k_{35} [326].



Полагают, что при достаточно интенсивном иницировании свободных радикалов их реакция с α -токоферолом протекает в две стадии [344]. Вначале происходит отрыв атома водорода с образованием α -токофероксил-радикала (уравнение 1.36) и затем образуется α -токоферил-хинон (уравнение 1.37). Образование α -токоферил-хинона экспериментально подтверждено при добавлении α -токоферола в реакционную среду, содержащую гидропероксид линолевой кислоты и FeCl_3 [343].



Однако существует точка зрения, что при взаимодействии α -токофероксил-радикала с другим радикалом образуется не α -токоферил-хинон, а соответствующие аддукты [345, 346].

В условиях низкой скорости генерации алкилпероксидных радикалов, α -токофероксил-радикалы могут взаимодействовать друг с другом, обра-

зую димерные формы [339, 346]. В биологических системах из α -токофероксил радикала в результате реакции с аскорбиновой кислотой (витамин С), цистеином или восстановленным глутатионом может быть регенерирован исходный α -токоферол. Впервые на возможность реакции между витаминами Е и С указал Tarpeil в 1962 году [347]. Несколько позднее это предположение получило прямое экспериментальное подтверждение и методом импульсного радиолита в среде вода-спирт-ацетон была определена соответствующая константа скорости реакции, равная $1,55 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ [348]. Значительно меньшая величина константы ($5,49 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$) была получена другими авторами с помощью метода регистрации быстрой кинетики, однако в этих экспериментах использовали не α -токофероксил-радикал, а более устойчивый 5,7-диизопропил-токофероксил-радикал [349]. Скорость восстановления α -токофероксил-радикала цистеином и глутатионом приблизительно на порядок меньше, чем аскорбиновой кислотой [336], однако, учитывая высокое содержание восстановленного глутатиона в организме, это соединение может рассматриваться как важнейший регенерирующий агент для витамина Е. Более того, получены экспериментальные подтверждения, что существует фактор белковой природы, то есть фермент, катализирующий реакцию α -токофероксил-радикала с восстановленным глутатионом [314].

Кроме рассмотренных выше радикальных реакций, α -токоферол эффективно детоксицирует синглетный кислород. Этот процесс включает два типа реакций: физическое тушение, при котором не происходит окисления α -токоферола, и химическое взаимодействие, протекающее с его окислением. В полярных и особенно неполярных растворителях физическое тушение является преобладающим процессом, поскольку константа скорости этой реакции ($1-8 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, в зависимости от типа растворителя) значительно превышает константу скорости окисления α -токоферола синглетным кислородом ($1 - 4 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$) [339, 350].

В организме животных и человека витамин Е представлен, главным образом, в виде α -токоферола, другие токоферолы найдены в значительно меньшем количестве. Например, у людей в сыворотке крови содержание α -токоферола более чем в сорок раз превышает уровень β -токоферола и почти на порядок больше, чем содержание γ -токоферола [351]. В норме уровень витамина Е в сыворотке колеблется от 0,8 до 1,5 мг/100 мл. Содержание токоферолов ниже 0,5 мг на 100 мл сыворотки рассматривается как витамин Е-дефицитное состояние [330]. В эритроцитах присутствует только α -токоферол, который локализован, главным образом, в плазматической мембране [352]. В печени содержание витамина Е составляет 200 ± 25 мкг/г ткани (крысы), при этом три четверти

внутриклеточного α -токоферола равномерно распределены между эндоплазматическим ретикулумом, митохондриями и цитоплазмой и около 8 % локализовано в ядрах гепатоцитов [353]. Показано, что содержание α -токоферола в клетке и процесс гидролиза его эфиров, в частности α -токоферол ацетата, контролируется уровнем внутриклеточного кальция [354].

Особое внимание в последнее время было уделено исследованию содержания α -токоферола и других природных антиоксидантов в липопротеидах низкой плотности, окислительная модификация которых рассматривается как ключевой момент в развитии атеросклероза [355-357]. Показано, что содержание α -токоферола в среднем составляет 6 молекул на один липопротеид, и это примерно в 20-300 раз превышает содержание других антиоксидантов – γ -токоферола, каротиноидов и убихинона Q₁₀ [357]. При окислении липопротеидов низкой плотности *in vitro* α -токоферол, содержание которого определяет окислительную резистентность липопротеидов, расходуется в первую очередь [357]. Вместе с тем, есть данные, что продолжительность лаг-периода и скорость индуцированного медью окисления липопротеидов низкой плотности не коррелирует с уровнем эндогенного α -токоферола, хотя эти параметры очень чувствительны к добавлению экзогенного α -токоферола [358].

Ключевая роль α -токоферола в системе антиоксидантной защиты организма подтверждается многочисленными экспериментами, свидетельствующими о высокой эффективности его применения при патологических состояниях, сопровождающихся активацией свободнорадикальных реакций [351, 359-367], и активации процессов перекисного окисления липидов в тканях при недостатке витамина E в пище [351, 353, 368-370].

Витамин C (аскорбиновая кислота) является одним из наиболее эффективных водорастворимых антиоксидантов [371, 372]. Например, окисление фосфолипидов, триацилглицеридов и эфиров холестерина, инициируемое в плазме крови активированными полиморфноядерными лейкоцитами или системой генерации пероксидных радикалов, наблюдается только после полного расходования эндогенной аскорбиновой кислоты, даже если мочевая кислота, билирубин, α -токоферол и восстановленный глутатион остаются в сравнительно высокой концентрации [372]. Помимо того, что аскорбиновая кислота является хорошей ловушкой анион-радикала кислорода [22, 23], это соединение эффективно инактивирует алкилпероксидные радикалы с константой скорости, равной $7,5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [336]. В модельных системах в присутствии ионов железа или других металлов с переменной валентностью аскорбиновая кислота способна оказывать прооксидантное действие вследствие ее реакции с

Fe^{3+} и регенерации двухвалентного железа, участвующего в реакции Фентона [373-377]. Баланс между про- и антиоксидантными свойствами аскорбиновой кислоты характеризуется преобладанием прооксидантного действия при сравнительно низких – и проявлением антиоксидантного действия при высоких концентрациях.

Высокая антиокислительная активность выявлена у некоторых гормонов, в частности, содержащих фенольную группу эстрогенов (женских половых гормонов) – эстрадиола, эстриола и эстрона [378]. Химическая модификация этих соединений и исследование антиокислительного и защитного действия полученных производных при развитии окислительного стресса может быть перспективным направлением по созданию новых антиоксидантов – более эффективных, чем их эндогенные аналоги.

В отличие от рассмотренных выше фенольных соединений, биологически активные хиноны – убихинон (коэнзим Q) и витамины K_1 (филлохинон), K_2 (менахинон), K_3 (менадион) не имеют в своей структуре "подвижного" атома водорода, благодаря которому они могли бы легко вступать во взаимодействие со свободными радикалами. Тем не менее, в последние годы получены экспериментальные результаты, свидетельствующие, что эндогенный убихинон [379-382] и витамины группы K [383] являются эффективными потенциальными антиоксидантами и способны предохранять биологические мембраны от повреждающего действия свободнорадикальных процессов. Установлено, что антиоксидантным действием обладают восстановленные формы этих соединений, постоянно регенерируемые в клетке в результате окислительно-восстановительных реакций, катализируемых различными флавопротеидами [379, 381-383]. Значения констант скоростей реакций восстановленных форм со свободными радикалами значительно превышают величины этого параметра у соответствующих хинонов. Например, реакция восстановленного витамина K с алкилпероксидными радикалами имеет константу скорости реакции $5,8 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, тогда как исходный витамин K реагирует с теми же радикалами с константой скорости $2,1 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ [383].

Выраженной биологической активностью обладают и синтетические хиноны, в том числе производные о-бензохинона. Эти соединения оказывают хороший защитный эффект в условиях ишемии и реперфузии головного мозга [384, 385], сердца [386], почек [387]. Установлено, что производные о-бензохинона легко восстанавливаются компонентами электронтранспортной цепи митохондрий и микросом [388, 389] в диоксисбензолы, способные легко отдавать водородные атомы гидроксильных групп свободным радикалам [257, 390].

Природные и синтетические хиноны являются также чрезвычайно эффективными ингибиторами свободнорадикальных реакций фрагментации, которые, наряду с процессами свободнорадикального окисления, вносят существенный вклад в радикальное повреждение биомембран и модификацию макромолекул [2, 391, 392]. По-видимому, роль реакций фрагментации особенно существенна в условиях дефицита кислорода (гипоксии). Следует отметить, что, подавляя фрагментацию различных углеродцентрированных радикалов, хиноны восстанавливаются до семихинонов, которые способны ингибировать процессы цепного свободнорадикального окисления по классическому механизму, акцептируя алкильные и алкилперекисные радикалы [2].

В дополнение к рассмотренным низкомолекулярным антиоксидантам в качестве эффективных биоантиокислителей, по-видимому, можно рассматривать и полиненасыщенные ацилы мембранных фосфолипидов. При их взаимодействии с различными биорадикалами образуются гидропероксиды липидов, соединения очень реакционноспособные и опасные для клетки, но вместе с тем являющиеся, как было показано выше, субстратом для чрезвычайно эффективной ферментной защитной системы, включающей различные глутатионзависимые пероксидазы и S-трансферазы. Благодаря этим ферментам, гидропероксиды липидов быстро восстанавливаются в соответствующие окисоединения, не способные участвовать в дальнейших свободнорадикальных реакциях. Кроме того, полиненасыщенные ацилы с оксигруппами не накапливаются, а удаляются из молекул фосфолипидов с помощью фосфолипазы A₂. В результате функционирования такого антиоксидантного механизма от биорадикалов защищаются информационные молекулы, ферменты и другие ключевые элементы клетки. Функционально значимые нарушения в структуре фосфолипидного бислоя и клеточных мембран в целом возникают лишь в условиях, когда образование биорадикалов в клетках и тканях превышает защитные антиоксидантные возможности.

Литература

1. *Петряев Е.П., Шадыро О.И.* Радиационная химия бифункциональных соединений / Минск. Университетское, 1986.
2. *Muller S.N., Batra R., Senn M., Giese B., Kisel M.A., Shadyro O.* Chemistry of C-2 glycerol radicals: indication for a new mechanism of lipid damage // *J Am Chem Soc.* 1997. Vol.119. P.2795-2803.
3. *Koppenol W.H.* Names for inorganic radicals (IUPAC Recommendations 2000) // *Pure Appl Chem.* 2000. Vol.72. P.437-446.
4. *Halliwell B., Gutteridge J.M.C.* Free radicals in biology and medicine / University Press. Oxford, 1999.

5. *Владимиров Ю.А.* Свободные радикалы и антиоксиданты // Вестн. РАМН. 1998. № 7. С.43–51.
6. *Фридович И.* Радикалы кислорода, пероксид водорода и токсичность кислорода / Свободные радикалы в биологии. 1979. М: Мир. Т.1. С.272-314.
7. *Halliwell B., Gutteridge J.M.C.* Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease // *Biochem J.* 1984. Vol.219. P.1-14.
8. *Oae S., Takata T., Kim Y.H.* Reaction of organic sulfur compounds with superoxide anion-III. Oxidation of organic sulfur compounds to sulfinic and sulfonic acids // *Tetrahedron.* 1981. Vol.37. P.37-44.
9. *Stanley J.P.* Reactions of superoxide with peroxides // *J Org Chem.* 1980. Vol.45. P.413-418.
10. *Nanni E.J., Stallings M.D., Sawyer D.T.* Does superoxide ion oxidize catechol, atocopherol, and ascorbic acid by direct electron transfer? // *J Am Chem Soc.* 1980. Vol.102. P.1481-1484.
11. *Purrington S.T., Kenion G.B.* Superoxide: base, nucleophile, radical, or electron transfer reagent? // *J Chem Soc, Chem Commun.* 1982. P.731-732.
12. *Sutton H.C., Sangster D.F.* Reactivity of semiquinone radicals and its relation to the biochemical role of superoxide // *J Chem Soc.* 1982. Vol.78. P.695-711.
13. *Lee-Ruff E., Timms N.* Superoxide mediated autoxidation of hydrocarbons // *Can J Chem.* 1980. Vol.58. P.2138-2141.
14. *Harayame T., Mori K., Yanada R., Iio K., Fujita Y., Yoneda F.* Oxidation of thymine derivatives with superoxide ion // *J Chem Soc, Chem Commun.* 1988. P.1171-1178.
15. *Yamane H.Y., Yada N., Katori E., Mashino T., Nagano T., Hirobe M.* Base liberation from nucleotides by superoxide and intramolecular enhancement effect of phosphate group // *Biochem Biophys Res Commun.* 1987. Vol.142. P.1104-1110.
16. *Freeman M.L., Spitz D.R., Meredith M.J.* Does heat shock enhance oxidative stress? Studies with ferrous and ferric iron // *Radiat Res.* 1990. Vol.124. P.288-293.
17. *Davies M.J., Donkor R., Dunster C.A., Gee C.A., Jonas S., Willson R.L.* Desferrioxamine (desferal) and superoxide free radicals // *Biochem J.* 1987. Vol.246. P.725-729.
18. *Nishikimi M., Machlin L.J.* Oxidation of alpha-tocopherol model compound by superoxide anion. // *Arch Biochem Biophys.* 1975. Vol.170. P.684-689.
19. *Nishikimi M., Yamada H., Yagi K.* Oxidation by superoxide of tocopherols dispersed in aqueous media with deoxycholate // *Biochim Biophys Acta.* 1980. Vol.627. P.101-108.
20. *Afanas'ev I.B., Grabovetskii V.V., Kuprianova N.S.* Kinetics and mechanism of the reactions of superoxide ion in solution. Part 5. Kinetics and mechanism of the interaction of superoxide ion with vitamin E and ascorbic acid // *J Chem Soc Perkin Trans II.* 1987. P.281-285.
21. *Афанасьев И.Б.* Свободно-радикальные ингибиторы и промоторы в биологических процессах // Кислородные радикалы в биологии и медицине. 1988. Рига, РМИ. С.9-25.
22. *Scarpa M., Stevanato R., Viglino P., Rigo A.* Superoxide ion as active intermediate in the autoxidation of ascorbate by molecular oxygen // *Biol Chem.* 1983. Vol.258. P.6695-6697.
23. *Cabelli D.E., Bielski B.H.J.* Kinetics and Mechanisms for the Oxidation of Ascorbic Acid/Ascorbate by HO₂/O₂⁻ Radicals. A Pulse Radiolysis and Stopped-Flow Photolysis Study // *J Phys Chem.* 1983. Vol.87. P.1809-1814.

24. *Halliwell B., Gutteridge J.M.C.* Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts // *Arch Biochem Biophys.* 1986. Vol.246. P.501-514.
25. *Beauchamp C., Fridovich I.* Superoxide dismutase improved assays assay applicable to acrylamide gels // *Anal Biochem.* 1971. Vol.44. P.276-287.
26. *Beyer W.F., Jr.and Fridovich I.* Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions // *Anal Biochem.* 1987. Vol.161. P.559-566.
27. *Auclair C., Voisin E.* Nitroblue tetrazolium reduction // *Handbook of methods for oxygen radical research.* R.A.Boca Raton (ed). Greenwald, Florida, 1985. P.123-132
28. *Flohe L., Otting F.* Superoxide dismutase assays // in *Methods in Enzymology* (Packer L. and Board A., eds) 1984. Vol.105. P.93-104.
29. *Mc Cord J.M., Fridovich I.* Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein) // *J Biol Chem.* 1969. Vol.244. P.6049-6055.
30. *Butler J.* Kinetics and mechanism of the reduction of ferricytochrome c by the superoxide anion // *J Biol Chem.* 1982. Vol.257. P.10747-10750.
31. *Halliwell B.* Superoxide - dependent formation of hydroxyl radicals in presence of iron chelates - is it a mechanism for hydroxyl radical production in biochemical systems // *FEBS Lett.* 1978. Vol.92. P.321-326.
32. *Halliwell B., Aruoma O.I.* DNA damage by oxygen-derived species // *FEBS Lett.* 1991. Vol.281. P.9-19.
33. *Afanas'ev I.B.* Superoxide ion: chemistry and biological implications / CRC Press. Boston, 1991.
34. *Blum J., Fridovich I.* Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical // *Arch Biochem Biophys.* 1985. Vol.240. P.500-508.
35. *Kono Y., Fridovich I.* Superoxide radical inhibits catalase // *J Biol Chem.* 1982. Vol.257. P.5751-5754.
36. *Thomas M.J., Mehl K.S., Pryor W.A.* The role of superoxide in xanthine oxidase-induced autooxidation of linoleic acid // *J Biol Chem.* 1982. Vol.257. P.8343-8347.
37. *Каган В.И., Приленко Л.Л., Савов В.М., Писарев В.А., Елуашвили И.А., Козлов Ю.П.* Об участии свободных активных форм кислорода в ферментативном перекисном окислении липидов в биомембранах // *Биохимия.* 1979. Т.44, вып.3. С.482-489.
38. *Sutherland M.W., Gebicki J.M.* A reaction between the superoxide free radical and lipid hydroperoxide in sodium linoleate micelles // *Arch Biochem Biophys.* 1982. Vol.214. P.1-11.
39. *Bors W., Michel C., Saran M.* Superoxide anions do to react with hydroperoxides // *FEBS Lett.* 1979. Vol.107. P.403-406.
40. *Gebicki J.M., Bielski H.J.* Comparison of the capacities of the perhydroxyl and the superoxide radicals to initiate chain oxidation of linoleic acid // *J Am Chem Soc.* 1981. Vol.103. P.7020-7022.
41. *Kellogg E.W., Fridovich I.* Superoxide, hydrogen peroxide, and singlet oxygen in lipid peroxidation by xanthine oxidase system // *J Biol Chem.* 1975. Vol.250. P.8812-8817.
42. *King M.M., Lai E.K., McCay P.B.* Singlet oxygen production associated with enzyme-catalyzed lipid peroxidation in liver microsomes // *J Biol Chem.* 1975. Vol.250. P.6496-6502.

43. Pryor W.A. The formation of free radicals and the consequences of their reactions in vivo // Photochem Photobiol. 1978. Vol.28. P.787-801.
44. Frimer A.A. The reactions of singlet oxygen with olefins. The question of mechanism // Chemical Rev. 1979. Vol.79. P.359-387.
45. Svingen B.A., O'Neal F.O., Aust S.D. The role of superoxide and singlet oxygen in lipid peroxidation // Photochem Photobiol. 1978. Vol.28. P.803-809.
46. Svingen B.A., Buege J.A., O'Neal F.O., Aust S.D. The mechanism of NADPH-dependent lipid peroxidation. The propagation of lipid peroxidation // J Biol Chem. 1979. Vol.254. P.5892-5899.
47. Carbonare M.D., Pathak M.A. Skin photosensitizing agents and the role of reactive oxygen species in photoaging // J Photochem Photobiol B. 1992. Vol.30. P.105-124.
48. Sies H., Menck C.F.M. Singlet oxygen induced DNA damage // Mutation Research. 1992. Vol.275. P.367-375.
49. Lutgerink J.T., Vandenakker E., Smeets I., Pachen D., Vandijk P., Aubry J.M., Joenje H., Lafleur M.V.M., Retel J. Interaction of singlet oxygen with DNA and biological consequences // Mutation Research. 1992. Vol.275. P.377-386.
50. Kale H., Harikumar P., Kulkarni S.B., Nair P.M., Netrawali M.S. Assessment of the genotoxic potential of riboflavin and lumiflavin. B. Effect of light // Mutation Research. 1992. Vol.298. P.17-23.
51. Zigler J.S., Goosey J.D. Photosensitized oxidation in the ocular lens - evidence for photosensitizers endogenous to the human lens // Photochem Photobiol. 1981. Vol.33. P.869-874.
52. Hiramitsu T., Miura Y., Machida H. Photosensitizer-induced lipid peroxidation in retinal homogenates under illumination // J Clinical Biochemistry and Nutrition. 1992. Vol.12. P.109-114.
53. Фум Х. Фотосенсибилизированное окисление и синглетный кислород. Биологические следствия // Свободные радикалы в биологии. М. Мир, 1979. Т.2.
54. Kukreja R.C., Hess M.L. The oxygen free radical system - from equations through membrane-protein interactions to cardiovascular injury and protection // Cardiovascular Research. 1992. Vol.26. P.641-655.
55. Steinbeck M.J., Khan A.U., Karnovsky M.J. Intracellular singlet oxygen generation by phagocytosing neutrophils in response to particles coated with a chemical trap // J Biol Chem. 1992. Vol.267. P.13425-13433.
56. Lynch R.E., Fridovich I. Lynch R.E., Fridovich I. Autoinactivation of xanthine oxidase. The role of superoxide radical and hydrogen peroxide // Biochim Biophys Acta. 1979. Vol.571. P.195-200.
57. Khan A.U. Direct spectral evidence of the generation of singlet molecular oxygen ($^1\text{O}_2$) in the reaction of potassium superoxide with water // J Am Chem Soc. 1981. Vol.103. P.6516-6517.
58. Corey E.J., Mehrotra M.M., Khan A.U. Water induced dismutation of superoxide anion generates singlet molecular oxygen // Biochem Biophys Res Commun. 1987. Vol.145. P.842-846.
59. Aubry J.M., Rigaudy J. A search for singlet oxygen in the disproportionation of superoxide anion // J Am Chem Soc. 1981. Vol.103. P.4965-4966.
60. Bors W., Michel C., Erben-Russ M., Kreileder B., Tait D., Saran M. Rate constants of sparingly water-soluble phenolic antioxidants with hydroxyl radicals // in Oxygen radicals in chemistry and biology. 1984. Germany: Berlin. P.95-99. -.

61. *Greenhill P.G., O'Grady B.V.* The rate constant of the reaction of hydroxyl radicals with methanol, ethanol and (D3) methanol // *Aust J Chem.* 1986. Vol.39. P.1775-1787.
62. *Halliwell B., Gutteridge J.M.C., Aruoma O.I.* The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals // *Anal Biochem.* 1987. Vol.165. P.215-219.
63. *Willson R.L., Dunster C.A., Forni L.G., Gee C.A., Kittridge K.J.* Organic free radicals and proteins in biochemical injury: electron- or hydrogen-transfer reactions? // *Phil Trans R Soc Lond.* 1985. Vol.311. P.545-563.
64. *Davies K.J.A., Delsignore M.E.* Protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of secondary and tertiary structure // *J Biol Chem.* 1987. Vol.262. P.9908-9913.
65. *Davies K.J.A., Lin S.W., Pacifici R.E.* Protein damage and degradation by oxygen radicals . IV. Degradation of denatured protein // *J Biol Chem.* 1987. Vol.262. P.9914-9920.
66. *Davies K.J.A.* Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects // *J Biol Chem.* 1987. Vol.262. P.9895-9901.
67. *Davies K.J.A., Delsignore M.E., Lin S.W.* Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids // *J Biol Chem.* 1987. Vol.262. P.9902-9907.
68. *Robert V., Ayoub S., Berson G.* Effects of hydroxyl radicals on ATPase and protein structure of myofibrils from rat heart // *Am J Physiology.* 1987. Vol.261. P.H1785-H1790.
69. *Dizdaroglu M., Gajewski E., Reddy P., Margolis S.A.* Structure of a hydroxyl radical induced DNA-protein cross-link involving thymine and tyrosine in nucleohistone // *Biochem.* 1989. Vol.28. P.3625-3628.
70. *Rumyantseva G.V., Weiner L.M., Frolova E.I., Fedorova O.S.* Hydroxyl radical generation and DNA strand scission mediated by natural anticancer and synthetic quinones // *FEBS Lett.* 1989. Vol.242. P.397-400.
71. *Myint P., Deeble D.J., Beaumont P.C., Blake S.M., Phillips G.O.* The reactivity of various free radicals with hyaluronic acid: steady-state and pulse radiolysis studies // *Biochim Biophys Acta.* 1987. Vol.925. P.194-202.
72. *Cadenas E.* Biochemistry of oxygen toxicity // *Annu Rev Biochem.* 1989. Vol.58. P.79-110.
73. *Gutteridge J.M.C.* Ferrous-salt-promoted damage to deoxyribose and benzoate. The increased effectiveness of hydroxyl-radical scavengers in the presence of EDTA // *Biochem J.* 1987. Vol.243. P.709-714.
74. *Floyd R.A., Lewis C.A.* Hydroxyl free radical formation from hydrogen peroxide by ferrous iron-nucleotide complexes // *Biochem.* 1983. Vol.22. P.2645-2649.
75. *Floyd R.A., Zaleska M.M.* Involvement of activated oxygen species in membrane peroxidation: possible mechanisms and biological consequences // in *Oxygen radicals in chemistry and biology.* 1984. Germany: Berlin. P.285-296.
76. *Vile G.F., Winterbourn C.C., Sutton H.C.* Radical-driven Fenton reactions: studies with paraquat, adriamycin, and anthraquinone 6-sulfonate and citrate, ATP, ADP, and pyrophosphate iron chelates // *Arch Biochem Biophys.* 1987. Vol.259. P.616-626.
77. *Aust S.D., Morehouse L.A., Thomas C.E.* Role of metals in oxygen radical reactions // *J Free Rad Biol Med.* 1985. Vol.1. P.3-25.
78. *Gutteridge J.M.C., Paterson S.K., Segal A.W., Halliwell B.* Inhibition of lipid peroxidation by the iron-binding protein lactoferrin // *Biochem J.* 1981. Vol.199. P.259-261.

79. *Aruoma O.I., Halliwell B.* Superoxide-dependent and ascorbate-dependent formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron // *J Biochem.* 1987. Vol.241. P.273-278.
80. *Sibille J.C., Doi K., Aisen P.* Hydroxyl radical formation and iron-binding proteins. Stimulation by the purple acid phosphatases // *J Biol Chem.* 1987. Vol.262. P.59-62.
81. *Grady J.K., Chen Y., Chasteen N.D., Harris D.C.* Hydroxyl radical production during oxidative deposition of iron in ferritin // *J Biol Chem.* 1989. Vol.264. P.20224-20229.
82. *Samokyszyn V.M., Thomas C.E., Reif D.W., Saito M., Aust S.D.* Release of iron from ferritin and its role in oxygen radical toxicities // *Drug Metabol Rev.* 1988. Vol.19. P.283-303.
83. *Biemond P., Swaak A.J.G., van Eijk H.G., Koster J.F.* Intraarticular ferritin-bound iron in rheumatoid arthritis // *Arthritis Rheum.* 1986. Vol.29. P.1187-1193.
84. *Bolann B.J., Ulvik R.J.* Release of iron from ferritin by xanthine oxidase. Role of the superoxide radical // *Biochem J.* 1987. Vol.243. P.55-59.
85. *Monteiro H.P., Winterbourn C.C.* The superoxide-dependent transfer of iron from ferritin to transferrin and lactoferrin // *Biochem J.* 1988. Vol.256. P.923-928.
86. *Monteiro H.P., Winterbourn C.C.* Release of iron from ferritin by divicine, isouramil, acid-hydrolyzed vicine, and dialuric acid and initiation of lipid peroxidation // *Arch Biochem Biophys.* 1989. Vol.271. P.536-545.
87. *Clemens M.R., Waller H.D.* Lipid peroxidation in erythrocytes // *Chem Phys Lipids.* 1987. Vol.45. P.251-268.
88. *Puppo A., Halliwell B.* Formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron // *Biochem J.* 1988. Vol.249. P.185-190.
89. *Minotti G., Aust S.D.* The requirement for iron (III) in the initiation of lipid peroxidation by iron (II) and hydrogen peroxide // *J Biol Chem.* 1987. Vol.262. P.1098-1104.
90. *Halliwell B., Gutteridge J.M.C.* Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation - an update // *FEBS Let.* 1992. Vol.307. P.108-112.
91. *Yin D.Z., Lingnert H., Ekstrand B., Brunk U.T.* Fenton reagents may not initiate lipid peroxidation in an emulsified linoleic acid model system // *Free Radical Biology and Medicine.* 1992. Vol.13. P.543-556.
92. *Shen X., Tian J.D., Li J., Li X.Y., Chen Y.L.* Formation of the excited ferryl species following fenton reaction // *Free Radical Biology and Medicine.* 1992. Vol.13. P.585-592.
93. *Вайнер Л.М., Сушков Д.Г., Румянцева Г.В.* Генерация гидроксильных радикалов при окислительно-восстановительных превращениях хинонов. Роль ОН-радикалов в микросомальных монооксигеназных реакциях // *Кислородные радикалы в биологии и медицине.* 1988. Рига, РМИ. С.28-42.
94. *Aust A.E., Lund L.G.* The role of iron in asbestos-catalyzed damage to lipids and DNA // in *Biological Oxidation systems.* 1990. New York. Tokyo. P.597-605.
95. *Ozaki Y., Ohashi T., Niwa Y.* Oxygen radical production by neutrophils from patients with bacterial infection and rheumatoid arthritis // *Inflammation.* 1986. Vol.10. P.119-130.
96. *Snyderman R.* Mechanisms of inflammation and leukocyte chemotaxis in the rheumatic diseases // *Med Clin N Amer.* 1986. Vol.70. P.217-235.
97. *Tien M., Svingen B.A., Aust S.D.* Superoxide dependent lipid peroxidation // *Federation Proc.* 1981. Vol.40. P.179-182.

98. *Afanas'ev I.B., Dorozhko A.I., Polozova N.I., Kuprianova N.S., Brodskii A.V., Ostrachovitch E.A., Korkina L.G.* Is superoxide an initiator of microsomal lipid peroxidation? // *Arch Biochem Biophys.* 1993. Vol.302. P.200-205.
99. *Marton A., Sukosd-Rozlosnik N., Vertes A., Horvath I.* The effect of EDTA-Fe(III) complexes with different chemical structure on the lipid peroxidation in brain microsomes // *Biochem Biophys Res Commun.* 1987. Vol.145. P.211-217.
100. *Lea D.E.* Action of radiations on living cells / Cambridge University Press. Cambridge, 1955.
101. *Тарусов Б.Н.* Первичные процессы лучевого поражения / Госатомиздат. М. 1962.
102. *Бак З., Александр П.* Основы радиобиологии / Издательство АН СССР. М. 1963.
103. *Magee J.L.* Nonhomogeneous processes in radiation research: radical diffusion models // *Can J Phys.* 1990. Vol.68. P.853-857.
104. *Ignarro L.J., Wood K.S., Byrns R.E., Chaudhuri G.* Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide // *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987. Vol.84(24). P.9265-9269.
105. *Palmer R.M.J., Ferrige A.G., Moncada S.* Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor // *Nature.* 1987. Vol.327. P.524-526.
106. *Stamler J.S., Singel D.J., Loscalzo J.* Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms // *Science.* 1992. Vol.258. P.1898-1902.
107. *Beckman J.S., Beckman T.W., Chen J., Marshall P.A., Freeman B.A.* Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide // *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990. Vol.87. P.1620-1624.
108. *Togashi H., Sakuma I., Yoshioka M, Kobayashi T., Yasuda H., Kitabatake A., Saito H., Gross S.S., Levi R.* A central nervous system action of nitric oxide in blood pressure regulation // *J Pharmacol Exper Therap.* 1992. Vol.262. P.343-347.
109. *Andriantsitohaina R., Surprenant A.* Acetylcholine released from guinea-pig submucosal neurones dilates arterioles by releasing nitric oxide from endothelium // *J Physiology.* 1992. Vol.453. P.493-502.
110. *Kilbourn R.G., Gross S.S., Lodato R.F., Adams J., Levi R., Miller L.L., Lachman L.B., Griffith O.W.* Inhibition of interleukin-1-alpha-induced nitric oxide synthase in vascular smooth muscle and full reversal of interleukin-1-alpha-induced hypotension by nomega-amino-L-arginine // *J National Cancer Institute.* 1992. Vol.84. P.1008-1016.
111. *Koshlund D.E.* The molecule of the year // *Science.* 1992. Vol.258. P.861-865.
112. *Nathan C.F.* Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells // *Faseb J.* 1992. Vol.6. P.3051-3064.
113. *Сорокин Д.Ю.* Нитрификация в тканях млекопитающих // *Успехи современ. биол.* 1991. Т.111. вып.2. С.201-206.
114. *Марков Х.М.* Окись азота и окись углерода - новый класс сигнальных молекул // *Успехи физиолог. наук.* 1996. Т.27. №4. С.30-43.
115. *Blough N.V., Zafiriou O.C.* Reaction of superoxide with nitric-oxide to form peroxonitrite in alkaline aqueous-solution // *Inorg Chem.* 1985. Vol.24. P.3502-3504.
116. *Darley-Usmar V.M., O'Leary V.J., Wilson M.T., Hogg N.* Hydroxyl radical formation from the simultaneous generation of superoxide and nitric oxid: mechanisms and implications for the pathogenesis of atherosclerosis // *Free Radical Research Communications.* 1992. Vol.16 Suppl.1. P.P.A.13.1.

117. *Beckman J.S., Ischiropoulos H., Zhu L., Chen J., Chen J., Martin J.C., Smith C.D.* Production of peroxynitrite by activated rat alveolar macrophages // *Free Radical Research Communications*. 1992. Vol.16 Suppl.1. P.A.13.4.
118. *Barbul A.* Nitric oxide from L-arginine // in *A bioregulatory system*. 1990. Amsterdam, P.317-329
119. *Babior B.M., Kipnes R.S., Curmutte J.T* Biological defense mechanisms: the production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent // *J Clin Invest*. 1993. Vol.52. P.741-744.
120. *Curmutte J.T., Babior B.M* Biological defense mechanisms: the effect of bacteria and serum on superoxide production by granulocytes // *J Clin Invest*. 1974. Vol.53. P.1662-1672.
121. *Kimura S., Ikeda-Saito M.* Human myeloperoxidase and thyroid peroxidase, two enzymes with separate and distinct physiological functions, are evolutionarily related members of the same gene family // *Proteins*. 1988. Vol.3. P.113-120.
122. *Marnett L.J.* Prostaglandin H synthase // in *Biological Oxidation Systems* (C.C.Reddy, G.A.Hamilton, K.M.Madyastha eds). 1990. Academic Press. New York. P.637-655
123. *Nelson R.E., Fessler L.I., Takagi Y., Blumberg B., Keene D.R., Olson P.F., Parker C.G., Fessler J.H.* Peroxidase: a novel enzyme-matrix protein of *Drosophila* development // *EMBO J*. 1994. Vol.13. P.3438-3447.
124. *Klebanoff S.J.* Phagocytic cells: products of oxygen metabolism // in *Inflammation: basic principles and clinical correlates* (Gallin J.L., Goldstein I.M., Snyderman R. eds). 1988. Raven Press. New York, P.391-444
125. *Podrez E.A., Abu-Soud H.M., Hazen S.L.* Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis // *Free Radic Biol Med*. 2000. Vol.28. P.1717-1725.
126. *Nauseef W.M., Malech H.L.* Analysis of the peptide subunits of human neutrophil myeloperoxidase // *Blood*. 1986. Vol.67. P.1504-1507.
127. *Hurst J.K.* Myeloperoxidase-active site structure and catalytic mechanisms // in *Peroxidases in chemistry and biology* (Everse J., Everse K., Grisham M.B. eds). 1991. CRC Press. Boca Raton, P.37-62
128. *Zeng J., Fenna R.E.* X-ray crystal structure of canine myeloperoxidase at 3 Å resolution // *J Mol Biol*. 1992. Vol.226. P.185-207.
129. Владимирюв Ю.А. Свободные радикалы в биологических системах // *Соросовский*. 2000. Т.6. №12. С.13-19.
130. *Ballou D., Palmer G., Massey V.* Direct demonstration of superoxide anion production during the oxidation of reduced flavin and of its catalytic decomposition by erythrocyte prein // *Biochem Biophys Res Commun*. 1969. Vol.36. P.898-904.
131. *Massey V., Strickland S., Mayhew S.G., Howell L.G., Engel P.C., Matthews R.G., Schuman M., Sullivan P.A.* The production of superoxide anion radicals in the reaction of reduced flavins and flavoproteins with molecular oxygen // *Biochem Biophys Res Commun*. 1969. Vol.36. P.891-897.
132. *Misra H.P., Fridovich I.* The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase // *J Biol Chem*. 1972. Vol.247. P.3170-3175.
133. *Ksenzenko M., Konstantinov A.A., Khomutov G.B., Khomutov G.B., Ruuge E.K* Effect of electron transfer inhibitors on superoxide generation in the cytochrome bc1 site of the mitochondrial respiratory chain // *FEBS Lett*. 1983. Vol.155. P.19-24.

134. *Cadenas E., Boveris A.* Cadenas E., Enhancement of hydrogen peroxide formation by protophores and ionophores in antimycin-supplemented mitochondria // *Biochem J.* 1980. Vol.188. P.31-37.
135. *Bize I.B., Oberley L.W., Morris H.P.* Superoxide dismutase and superoxide radical in Morris hepatomas // *Cancer Res.* 1980. Vol.40. P.3686-3693.
136. *Kazui M., Andreoni K.A., Norris E.J., Klein A.S., Burdick J.F., Beattie C., Sehnert S.S., Bell W.R., Bulkley G.B., Risby T.H.* Breath ethane - a specific indicator of free-radical-mediated lipid peroxidation following reperfusion of the ischemic liver // *Free Radical Biology and Medicine.* 1992. Vol.13. P.509-515.
137. *Архипенко Ю.В., Каган В.Е., Чуракова Т.Д.* Роль перекисного окисления липидов в повреждении мембран саркоплазматического ретикулума ишемизированных скелетных мышц // Тезисы докладов II Всесоюзного симпозиума, 20 ноября 1978. Москва, 1978. С.39-40
138. *Berrizbeitia L.D., McGrath L.B., Klabunde R.E.* Oxygen modulation of superoxide radical injury in the krebs-perfused, isolated rabbit heart // *J Invest Surg.* 2002. Vol.15(5). P.251-257.
139. *Larsen M., Webb G., Kennington S., Kelleher N., Sheppard J., Kuo J., Unsworth-White J.* Mannitol in cardioplegia as an oxygen free radical scavenger measured by malondialdehyde // *Perfusion.* 2002. Vol.17(1). P.51-55.
140. *Yoshida S., Inoh S., Asano T., Sano K., Kubota M, Shimazaki H., Ueta N.* Effect of transient ischemia on free fatty acids and phospholipids in the gerbil brain // *J Neurosurg.* 1980. Vol.53. P.323-331.
141. *Yoshikawa T, Fukukawa Y., Wakamatsu Y., Takemura S., Tanaka H., Kondo M* Experimental hypoxia and lipid peroxide in rats // *Biochem Med.* 1982. Vol.27. P.207-213.
142. *Haba K., Ogawa N., Mizukawa K., Mori A.* Time course of changes in lipid peroxidation, pre- and postsynaptic cholinergic indices, NMDA receptor binding and neuronal death in the gerbil hippocampus following transient ischemia // *Brain Res.* 1991. Vol.540. P.116-122.
143. *Lazzarino G., Vagnozzi R., Tavazzi B., Pastore F.S., Dipierro D., Siragusa P., Belli A., Giuffre R., Giardina B.* MDA, oxypurines, and nucleosides relate to reperfusion in short-term incomplete cerebral ischemia in the rat // *Free Radical Biology and Medicine.* 1992. Vol.13. P.489-498.
144. *Полюхович Г.С., Васильева Г.С., Маслова Г.Т., Боборико Т.Л., Сперанский С.Д.* Эффективность некоторых антиоксидантов при экспериментальных ишемии и инфаркте миокарда у крыс // *Вопр. мед. химии.* 1991. №4. С.54-56.
145. *Велена А.Х., Дубур Г.Я.* Действие антиоксидантов 1,4-дигидропиридинового ряда на процессы, сопровождающие ишемическое повреждение // Тезисы докладов II Всесоюзного симпозиума, 20 ноября 1978. Москва, 1978. С.70.
146. *Лунец Е.Ф., Ушков А.А., Харламова А.И., Костюк В.А.* Фармакологический подход к изучению роли перекисного окисления липидов в ишемических повреждениях мозга // *Материалы VII Всесоюзной конференции по химии органических пероксидов.* Волгоград. 1980. С.334.
147. *Masini E., Cuzzocrea S., Mazzon E., Marzocca C., Mannaioni P.F., Salvemini D.* Protective effects of M40403, a selective D.superoxide dismutase mimetic, in myocardial ischaemia and reperfusion injury in vivo // *Br J Pharmacol.* 2002. Vol.136. P.905-917.

148. *Hamilton K.L., Staib J.L., Phillips T., Hess A., Lennon S.L., Powers S.K.* Exercise, antioxidants, and HSP72: protection against myocardial ischemia/reperfusion // *Free Radic Biol Med.* 2003. Vol.34. P.800-809.
149. *Rajak S., Banerjee S.K., Sood S., Dinda A.K., Gupta Y.K., Gupta S.K., Maulik S.K.* *Embllica officinalis* causes myocardial adaptation and protects against oxidative stress in ischemic-reperfusion injury in rats // *Phytother Res.* 2004. Vol.18. P.54-60.
150. *Granger D.N., Rutili G., McCord J.M.* Superoxide radicals in feline intestinal ischemia // *Gastroenterology.* 1981. Vol.81. P.22-29.
151. *McCord J.M., Fridovich I.* The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase // *J Biol Chem.* 1968. Vol.243. P.5753-5760.
152. *Jarasch E.D., Bruder G., Heid H.W.* Significance of xanthine oxidase in capillary endothelial cells // *Acta Physiol Scand.* 1986. Vol.548. P.39-46.
153. *Nakamura M., Kurebayashi H., Yamazaki I.* One-electron and two-electron reductions of acceptors by xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase // *J Biochem.* 1978. Vol.83. P.9-17.
154. *Kaminski Z.W., Jezewska M.M.* Involvement of a single thiol group in the conversion of the NAD⁺-dependent activity of rat liver xanthine oxidoreductase to the O₂-dependent activity // *Biochem J.* 1982. Vol.207. P.341-346.
155. *Granger D.N., Hollwarth M.E., Parks D.A.* Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals // *Acta Physiol Scand.* 1986. Vol.548. P.47-63.
156. *Schoenberg M.H., Younes M., Haglund U., Fredholm B., Sellin D., Jung H., Schildberg F.W.* The participation of the hypoxanthine-xanthine oxidase system in the generation of free radicals after intestinal ischemia // in *Oxygen radicals in chemistry and biology* (Bors W. ed). 1984. Walter de Gruyter & Co. Berlin. P.851-857
157. *Tatebe S., Nakazawa M., Miyamura H., Hayashi J., Eguchi S., Imai S.* Myocardial protection of neonatal heart by cardioplegic solution with recombinant human superoxide dismutase // *Annals of Thoracic Surgery.* 1992. Vol.54. P.124-129.
158. *Hatori N., Sjoquist P.O., Marklund S.L., Ryden L.* Effects of recombinant human extracellular-superoxide dismutase type-C on myocardial infarct size in pigs // *Free radical Biol Med.* 1992. Vol.13. P.221-230.
159. *Konya L., Kekesi V., Kekesi V., Feher J.* The Effect of superoxide dismutase in the myocardium during reperfusion in the dog // *Free radical Biol Med.* 1992. Vol.13. P.527-532.
160. *Qiu Y.M., Galinanes M., Galinanes M., Cargnoni A., Cargnoni A., Hearse D.J.* PEG-SOD improves postischemic functional recovery and antioxidant status in blood-perfused rabbit hearts // *Am J Physiol.* 1992. Vol.263. P.H1243-H1249.
161. *Ohkubo S., Murakami E., Takekoshi N., Matsui S., Tsugawa H., Kanemitsu S.* The clinical effect of superoxide dismutase on reperfusion injury in acute myocardial infarction // *Free Radical Research Communications.* 1992. Vol.16.Suppl.1. P.A.20.31.
162. *Sanfey H., Sarr M.G., Bulkley G.B., Cameron J.L.* Oxygen-derived free radicals and acute pancreatitis: a review // *Acta Physiol Scand.* 1986. Vol.548. P.109-118.
163. *Huang L., Privalle C.T., Serafin D., Klitzman B.* Increased survival of skin flaps by scavengers of superoxide radical // *FASEB J.* 1987. Vol.1. P.129-132.
164. *Groot H., Litauer A.* Reoxygenation injury in isolated heratocytes: cell death precedes conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase // *Biochem Biophys Res Commun.* 1988. Vol.155. P.278-282.

165. *Adkison D., Hollwarth M.E., Benoit J.N., Parks D.A., McCord J.M., Granger D.N.* Role of free radicals in ischemia-reperfusion injury to the liver // *Acta Physiol Scand.* 1986. Vol.548. P.101-107.
166. *Kawamoto S., Inoue M, Tashiro S., Morino Y., Miyauchi Y.* Inhibition of ischemia and reflow-induced liver injury by an SOD derivative that circulates bound to albumin // *Arch Biochem Biophys.* 1990. Vol.277. P.160-165.
167. *Hennig B., Chow C.K.* Lipid peroxidation and endothelium cell injury: implications in atherosclerosis // *Free Radic Biol Med.* 1988. Vol.4. P.99-106.
168. *Ryan U.S., Ryan J.W.* Cell biology of pulmonary endothelium // *Circulation.* 1984. Vol.70. P.11146-11162.
169. *Shasby D.M., Shasby S.S., Sullivan J.M., Peach M.J.* Role of endothelial cell cytoskeleton in control of endothelial permeability // *Circ Res.* 1982. Vol.51. P.657-661.
170. *Ratyck R.E., Chuknyiska R.S., Bulkley G.B.* The primary localization of free radical generation after anoxia/reoxygenation in isolated endothelial cells // *Surgery.* 1987. Vol.102. P.122-131.
171. *Greene E.L., Paller M.S.* Xanthine oxidase produces O₂⁻ in posthypoxic injury of renal epithelial cells // *Am J Physiol.* 1992. Vol.263. P.F251-F255.
172. *Iyer G.Y.N., Islam M.F., Quastel J.H.* Biochemical aspects of phagocytosis // *Nature.* 1961. Vol.192. P.535-541.
173. *Jones H.P., Grisham M.B., Bose S.K., Shannon V.A., Schott A., McCord J.M.* Effect of allopurinol on neutrophil superoxide production, chemotaxis or degranulation // *Biochem Pharm.* 1985. Vol.34. P.3673-3676.
174. *Chatterjee S.W, Berne T.V* Protective effect of allopurinol in renal ischemia // *Am J Surg.* 1976. Vol.131. P.658-660.
175. *De Wall R.A., Vasko K.A., Stanley E.L., Kezdi P.* Responses of the ischemic myocardium to allopurinol // *Am Heart J.* 1971. Vol.82. P.362-370.
176. *Breda M.A., Holl T.S., Stuart R.S.* Twenty-four hour lung preservation by hypothermia and leukocyte depletion // *Heart Trans.* 1985. Vol.4. P.325-329.
177. *Grisham M.B., Hernandez L.A., Granger D.N.* Xanthine oxidase and neutrophils infiltration in intestinal ischemia // *Am J Physiol.* 1986. Vol.251. P.567-574.
178. *Lindsay S., Liu T.H., Xu J., Marshall P.A., Thompson J.K., Parks D.A., Freeman B.A., Hsu C.Y., Beckman J.S.* Role of xanthine dehydrogenase and oxidase in focal cerebral ischemic injury to rat // *Am J Physiol.* 1991. Vol.261. P.H2051-H2057.
179. *Janoff A.* At least three human neutrophil lysosomal proteases are capable of degrading joint connective tissue // *Ann N Y Acad Sci.* 1975. Vol.256. P.402-408.
180. *Kukreja R.C., Weaver A.B., Hess M.L.* Stimulated human neutrophils damage cardiac sarcoplasmic reticulum function by generation of oxidants // *Biochim Biophys Acta.* 1989. Vol.990. P.198-205.
181. *Sasaguri Y., Nakashima T, Morimatsu M., Yagi K.* Injury to cultured endothelial cells from human umbilical vein by linoleic acid hydroperoxide // *J Appl Biochem.* 1984. Vol.6. P.144-150.
182. *Sasaguri Y., Morimatsu M., Kinoshita T., Nakashima T., Inagaki T, Yagi K.* Difference in susceptibility to injury by linoleic acid hydroperoxide between endothelial and smooth muscle cells of arteries // *J Appl Biochem.* 1985. Vol.7. P.70-78.
183. *Sasaguri Y., Morimatsu M., Nakashima T, Tokunaga O., Yagi K.* Difference in the inhibitory effect of linoleic acid hydroperoxide on prostacyclin biosynthesis between cul-

- tured endothelial cells from human umbilical cord vein and cultured smooth muscle cells from rabbit aorta // *Biochem Intern.* 1985. Vol.11. P.517-521.
184. *Hennig B., Enoch C., Chow C.K.* Linoleic acid hydroperoxide increases the transfer of albumin across Cultured endothelial monolayers // *Arch Biochem Biophys.* 1986. Vol.248. P.353-357.
 185. *Hiebert L.M., Liu J.* Heparin protects cultured arterial endothelial cells from damage by toxic oxygen metabolites // *Atheroscler.* 1990. Vol.83. P.47-51.
 186. *Ochi H., Ochi H., Murota S.I.* Prostacyclin does not play any cytoprotective role in endothelial cell injury induced by 15-hydroperoxy-eicosatetraenoic acid, an arachidonate lipoxygenase product // *Prostagl Leukotr Essential Fatty Acids.* 1990. Vol.41. P.157-161.
 187. *Ignarro L.J., Byrns R.E., Buga G.M., Wood K.S.* Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary-artery vein possesses pharmacologic and chemical-properties identical to those of nitric oxide radical // *Circulation Research.* 1987. Vol.61. P.866-879.
 188. *Moncada S., Radomski M.W., Palmer R.M.J.* Endothelium-derived relaxing factor - identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet-function // *Biochem Pharm.* 1988. Vol.37. P.2495-2501.
 189. *Palmer R.M.J., Ashton D.S., Moncada S.* Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine // *Nature.* 1988. Vol.333. P.664-666.
 190. *Marletta M.A., Yoon P.S., Iyengar R., Leaf C.D., Wishnok J.S.* Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate nitric oxide is an intermediate // *Biochemistry.* 1988. Vol.27. P.8706-8711.
 191. *McCall T.B., Boughton-Smith N.K., Palmer R.M.J., Whittle B.J.R., Moncada S.* Synthesis nitric oxide from L-arginine by neutrophils. Release and interaction with superoxide anion // *Biochemical J.* 1989. Vol.261. P.293-296.
 192. *Radomski M.W., Palmer R.M.J., Moncada S.* The role of nitric oxide and CGMP in platelet adhesion to vascular endothelium // *Biochem Biophys Res Commun.* 1987. Vol.148. P.1482-1489.
 193. *Radomski M.W., Palmer R.M.J., Moncada S.* Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium // *Lancet.* 1987. Vol.2. P.1057-1058.
 194. *Nakahashi G., Yoshikawa T, Ichikawa H., Tujigiwa M, Minamiyama Y., Matuyama K., Komura S., Kondo M.* Effect of vasodilator on the small intestinal mucosal injury by L-nitroarginine in rats // *Free Radical Research Communications.* 1992. Vol.16. Suppl.1. P.A.13.7.
 195. *Nakahashi G., Yoshikawa T, Ichikawa H., Tujigiwa M, Minamiyama Y., Matuyama K., Komura S., Kondo M.* The new model of the intestinal mucosal injury induced by endothelium-derived relaxing factor (EDRF) synthetic inhibitor in rats // *Free Radical Research Communications.* 1992. Vol.16. Suppl.1. P.A.13.8.
 196. *Nagafuji T., Uchida H., Tameda C., Sugiyama M., Koide T., Nagano H.* Involment of nitric-oxide formation in pathogenesis of ischemic neuronal necrosis in the gerbil hippocampus // *J Neurochemistry* 1992. Vol.59. S. P.34.
 197. *Radi R., Beckman J.S., Bush K.M., Freeman B.A.* Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide // *J Biol Chem.* 1991. Vol.226. P.4244-4250.
 198. *Radi R., Beckman J.S., Bush K.M., Freeman B.A.* Peroxynitrite- induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide // *Arch Biochem Biophys.* 1991. Vol.288. P.481-487.

199. *Dawson V.L., Dawson T.M., Bartley D.A., Uhl G.R., Snyder S.H.* Mechanisms of nitric oxide-mediated neurotoxicity in primary brain cultures // *J Neurosci.* 1993. Vol.13. P.2651-2661.
200. *Kinouchi H., Epstein C.J., Mizui T., Carlson E., Chen S.F., Chan P.H.* Attenuation of focal cerebral ischemic injury in transgenic mice overexpressing CuZn superoxide dismutase // *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991. Vol.88. P.11158-11162.
201. *Chan P.H., Chu L., Chen S.F., Carlson E., Epstein C.J.* Reduced neurotoxicity in transgenic mice overexpressing human copper-zinc- superoxide dismutase // *Stroke.* 1991. Vol.21. P.80-82.
202. *Dianzani M.U.* Dietary prooxidants // in *Trace Elements, Micronutrients, and Free Radicals* (I.E. Dreosti ed). 1991. The Humana Press Inc. P.77-105.
203. *Poli G., Chiarpotto E., Biasi F., Albano E., Danni O., Danni O.* Lipid peroxidation and hepatocyte damage in animal model and human patients // in *Free Radicals and the Liver* (G. Csomos, J. Feher eds). 1992. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. P.36-42.
204. *Dianzani M.U.* Free radicals in physiology and pathology // *Boll Soc It Biol Sper.* 1992. Vol.68. P.491-511.
205. *Maellaro E., Casini A.F., Del Bello B., Comporoti M.* Lipid peroxidation and antioxidant systems in the liver injury produced by glutathione depleting agents // *Biochem Pharmacol.* 1990. Vol.39. P.1513-1521.
206. *Butler T.C.* Reduction of carbon tetrachloride in vivo and reduction of carbon tetrachloride and chloroform in vitro by tissues and tissue constituents // *J Pharmac Exp.* 1961. Vol.134. P.311-319.
207. *Ghoshal A.K., Recknagel R.O.* Positive evidence of acceleration of lipoperoxidation in rat liver by carbon tetrachloride: in vivo experiments // *Life Sci.* 1965. Vol.4. P.1521-1530.
208. *Recknagel R.O., Ghoshal A.K.* Lipoperoxidation of rat liver microsomal lipids induced by carbon tetrachloride // *Nature.* 1966. Vol.210. P.1162-1163.
209. *Slater T.F.* Necrogenic action of carbon tetrachloride in the rat: a speculative mechanism based on activation // *Nature.* 1966. Vol.209. P.36-46.
210. *Slater T.F.* Free radical mechanisms of tissues injury / Pion Ltd. London, 1972.
211. *Dawkins M.J.R.* Carbon tetrachloride poisoning in liver of new-born rat // *J Pathol Bacteriol.* 1963. Vol.85. P.189-196.
212. *Glende E.A., Recknagel R.O.* Microsomal electron transport and in vitro CCl₄-induced lipoperoxidation in rat liver by carbon tetrachloride: in vivo experiments // *Fed Proc.* 1970. Vol.29. P.755.
213. *Pani P., Corongiu F.P., Sanna A., Corongiu L.* Protection by lead nitrate against carbon tetrachloride hepatotoxicity // *Drug Metab Disposition.* 1975. Vol.3. P.148-154.
214. *Pasquali-Ronchetti I., Bini A., Botti B., Alojsio G.D., Fornieri C., Vannini V.* Ultrastructural and biochemical changes induced by progressive lipid peroxidation on isolated microsomes and rat liver endoplasmic reticulum // *Labor Invest.* 1980. Vol.42. P.457-468.
215. *Арчаков А.И.* / Микросомальное окисление. 1975. М.: Наука.
216. *Albano E., Loot K.A.K., Slater T.F., Stier A., Symons M.C.R., Tomasi A.* Spin-trapping studies on the free-radical products formed by metabolic activation of carbon tetrachloride in rat liver microsomal fractions isolated hepatocytes and in vivo in the rat // *Biochem J.* 1982. Vol.204. P.593-603.

217. *Tomasi A., Albano E., Loo K.A.K., Slater T.F.* Spin trapping of free radical products of CCl₄ activation using pulse radiolysis and high energy radiation procedures // *FEBS Lett.* 1980. Vol.122. P.303-306.
218. *Connor H.D., Thurman R.G., Galizi M.D., Mason R.P.* The formation of novel free radical metabolite from CCl₄ in the perfused rat liver and in vivo // *J Biol Chem.* 1986. Vol.261. P.4542-4548.
219. *Packer J.S., Slater T.F., Willson R.L.* Reactions of the carbon tetrachloride-related peroxy free radical with amino acids: pulse radiolysis evidence // *Life Sci.* 1978. Vol.23. P.2617-2620.
220. *Forny L.G., Packer J.S., Slater T.F., Willson R.L.* Reactions of the trichloromethyl and halothane-derived peroxy radicals with unsaturated fatty acids: pulse radiolysis study // *Chem Biol Interac.* 1983. Vol.45. P.171-177.
221. *Slater T.F., Cheeseman K.H., Ingold K.U.* Carbon tetrachloride toxicity as a model for studying free-radical mediated liver injury // *Phil Trans R Soc Lond.* 1985. Vol.311. P.633-645.
222. *Dianzani M.U.* Biochemical aspects of fatty liver // in *Hepatotoxicology* (Meeks R.G., Harrison S.D., Bull R.J.- eds). 1991. CRC Press Inc. London. P.327-399.
223. *Poli G., Cheeseman K.H., Slater T.F., Dianzani M.U.* The role of lipid peroxidation in CCl₄-induced damage to liver microsomal enzymes: comparative studies in vitro using microsomes and isolated liver cells // *Chem Biol Interac.* 1981. Vol.37. P.13-24.
224. *Waller R.L., Glende E.A. J, Recknagel R.O.* Carbon tetrachloride and bromotrichloromethane toxicity // *Biochem Pharm.* 1983. Vol.32. P.1613-1617.
225. *Dianzani M.U., Poli G.* Lipid peroxidation and haloalkylation in CCl₄-induced liver injury // in *Free radicals in liver injury.* 1985. IRL Press. Oxford, England. P.149-158.
226. *Poli G., Albano E., Biasi F., Cecchini G., Carini R., Bellomo G., Dianzani M.U.* Lipid peroxidation stimulated by carbon tetrachloride or iron and hepatocyte death: protective effect of vitamine E // in *Free radicals in liver injury.* 1985. IRL Press. Oxford, England. P.207-215.
227. *Benedetto C., Dianzani M.U., Ahmed M., Cheeseman K., Connelly C., Slater T.F.* Activation of carbon tetrachloride, and distribution of NADPH-cytochrome c reductase, cytochrome P-450, and other microsomal enzyme activities in rat tissues // *Biochim Biophys Acta.* 1981. Vol.677. P.363-372.
228. *Bellomo G., Richelmi P., Mirabelli F., Marinoni V., Abbagnano A.* Inhibition of liver microsomal calcium ion sequestration by oxidative stress: role of protein sulphhydryl groups // in *Free radicals in liver injury.* 1985. IRL Press. Oxford, England. P.139-142.
229. *Chio K.S., Tappel A.L.* Synthesis and characterization of the fluorescent products derived from malonaldehyde // *Biochemistry.* 1969. Vol.8. P.2821-2827.
230. *Nair V., Cooper C.S., Vietti D.E., Turner G.A.* The chemistry of lipid peroxidation metabolites: crosslinking reactions of malondialdehyde // *Lipids.* 1986. Vol.21. P.6-10.
231. *Benedetti A., Comporti M., Esterbauer H.* Identification of 4-hydroxynonenal as a cytotoxic product originating from the peroxidation of liver microsomal lipids // *Biochim Biophys Acta.* 1980. Vol.620. P.281-296.
232. *Benedetti A., Pompella A., Fulceri R., Romani A., Comporti M.* Detection of 4-hydroxynonenal and other aldehydic products of lipid peroxidation in the liver of bromobenzene-intoxicated mice // in *Free radicals in liver injury.* 1985. IRL Press. Oxford, England. P.71-75.

233. *Esterbauer H.* Lipid peroxidation products: formation, chemical properties and biological activities // in *Free radicals in liver injury*. 1985. IRL Press. Oxford, England. P.29-47.
234. *Slater T.F.* Free-radical mechanisms in tissue injury // *Biochem J*. 1984. Vol.222. P.1-15.
235. *Fazio V.M., Barrera G., Martinotti S., Farace M.G., Giglioni B., Frati L., Manzari V., Dianzani M.U.* 4-Hydroxynonenal, a products of cellular lipid peroxidation, which modulates c-myc and and globin gene expression in K562 erythroleukemic cells // *Cancer Res*. 1992. Vol.52. P.4866-4871.
236. *Curzio M., Esterbauer H., Di Mauro C., Dianzani M.U.* Influence of the lipid peroxidation products 4-hydroxynonenal on neutrophil migration // *Int J Immunotherapy*. 1990. Vol.6. P.13-18.
237. *Dianzani M.U., Paradisi L., Parola M., Barrera G., Rossi M.A.* Action of the aldehydes derived from lipid peroxidation on isolated liver plasmamembranes // in *Free radicals, Lipoproteins, and Membrane Lipids* (Crastes de Paulet ed). 1991. Plenum Press. New York. P.171-181.
238. *Parola M., Albano E., Leonarduzzi G., Muraca R., Dianzani I., Poli G., Dianzani M.U.* Evidence for a possible role of lipid peroxidation in experimental liver fibrosis // in *Free radicals: From Basic Science to Medicine* (Poli G. ed). 1993. Birkhauser Verlag. Basel, Switzerland. P.274-286.
239. *Sagai M., Tappel A.L.* Lipid peroxidation induced by some halomethanes as measured by in vivo pentane production in the rat // *Toxicol Appl Pharmacol*. 1979. Vol.49. P.283-291.
240. *Потанович А.И. Костюк В.А.* Антиокислительное действие производных о-бензохинона в условиях ССl₄-индуцируемого перекисного окисления липидов в печени крыс // *Биохимия*. 1988. Т.53. № 2. С.233-237.
241. *Hafeman D.G., Hoekstra W.G.* Protection against carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation in the rat by dietary vitamin E, selenium, and methionine as measured by ethane evolution // *J Nutr*. 1977. Vol.107. P.656-665.
242. *Hafeman D.G., Hoekstra W.G.* Lipid peroxidation in vivo during vitamin E and selenium deficiency in the rat as monitored by ethane evolution // *J Nutr*. 1977. Vol.107. P.666-672.
243. *Little C., O'Brien P.J.* An intracellular GSH-peroxidase interaction with a lipid peroxide substrate // *Biochem Biophys Res Commun*. 1968. Vol.31. P.145-150.
244. *Костюк В.А.* Устойчивость продуктов окисления липидов в печени крыс и пути их утилизации // *Биохимия*. Т.51.№8. С.1392-1397.
245. *Tan K.H., Meyer D.J., Belin J., Ketterer B.* Inhibition of microsomal lipid peroxidation by glutathione and glutathione transferases B and AA // *Biochem J*. 1984. Vol.220. P.243-252.
246. *Thomas J.P., Maiorino M., Ursini F., Girotti A.W.* Protective action of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase against membrane-damaging lipid peroxidation // *J Biol Chem*. 1990. Vol.265. P.454-461.
247. *Ungemach F.R.* Plasma membrane damage of hepatocytes following lipid peroxidation: involvement of phospholipase A2 // in *Free radicals in liver injury*. 1985. IRL Press. Oxford, England. P.127-134.

248. Марзоев А., Мурталипов Д., Алматов К. Роль перекисного окисления липидов митохондрий в их гидролизе эндогенной фосфолипазой A₂ // Бюлл. exper. биол. мед. 1987. №7. С.35-38.
249. Beckman J.K., Borowitz S.M., Burr I.M. The role of phospholipase A activity in rat liver microsomal lipid peroxidation // J.Biol.Chem. // J Biol Chem. 1987. Vol.262. P.1479-1481.
250. Ursini F., Maiorino M., Valente M., Ferri L., Gregolin C. Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides // Biochim Biophys Acta. 2003. Vol.710. P.197-211.
251. Maiorino M., Ursini F., Leonelli M., Finato N., Gregolin C. A pig heart peroxidation inhibiting protein with glutathione peroxidase activity on phospholipid hydroperoxides // Biochem Intern. 1982. Vol.5. P.575-583.
252. Ursini F., Maiorino M., Bonaldo L., Gregolin C. The glutathione peroxidase active on phospholipid hydroperoxides: studies on the enzyme from pig brain // in Oxygen radicals in chemistry and biology (Bors W. ed). 1984. Walter de Gruyter & Co. Berlin. P.713-718
253. Ursini F., Maiorino M., Gregolin C. The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase // Biochim Biophys Acta. 1985. Vol.839. P.62-70.
254. Duan Y.J., Komura S., Fiszer-Szafarz B., Szafarz D., Yagi K. Purification and characterization of a novel monomeric glutathione peroxidase from rat liver // J Biol Chem. 1988. Vol.263. P.19003-19008.
255. Kostyuk V.A., Komura S., Yagi K. Reduction of Various Lipid Hydroperoxides by Rat Liver Homogenate // Biochem Int. 1985. Vol.11. P.803-808.
256. Костюк В.А. Возможные пути восстановления пероксидов липидов в печени и их внутриклеточная локализация // Биохимия. 1986. Т.51. №7. С.1059-1065.
257. Костюк В.А., Лунец Е.Ф. Ингибирование производными о-бензохинона перекисного окисления липидов в микросомах печени // Биохимия. 1983. Т.48. №9. С.1491-1495.
258. Костюк В.А. Влияние производных о-бензохинона на свободнорадикальные процессы, инициируемые в микросомах печени крыс четыреххлористым углеродом // Биохимия. 1991. Т.56. № 1.- С.109-114.
259. Kostyuk V.A., Potapovich A.I., Tereshchenko S.M. 4-(4-R-phenylamino)-5-methoxy-1,2-benzoquinones are New Selective Inhibitors of Carbon Tetrachloride-initiated Free Radical Reactions in Liver // Biochem Int. 1991. Vol.25. P.167-172.
260. Костюк В.А. Роль ковалентного связывания и перекисного окисления липидов в повреждении печени четыреххлористым углеродом // Биохимия. 1991. Т.56. № 10. С.1878-1885.
261. Kostyuk V.A., Potapovich A.I. Damage of the Liver Microsomal Mixed Function Oxidase System by Carbon Tetrachloride. *In vivo* Study with Selective Inhibitor of Lipid Peroxidation // Biochem Int. 1991. Vol.25. P.349-353.
262. Mann T., Keilin D. Hemocuprein and hepatocuprein, copper-protein compounds of blood and liver in mammals // Proc R Soc London B Biol Sci. 1938. Vol.126. P.303-315.
263. Keele B.B., McCord J.M., Fridovich I. Superoxide dismutase from *Escherichia coli* B; A new manganese-containing enzyme // J Biol Chem. 1970. Vol.245. P.6176-6181.

264. *Yost F.J., Fridovich I.* An iron-containing superoxide dismutase from *Escherichia coli* B // *J Biol Chem.* 1973. Vol.248. P.4905-4908.
265. *Hassan H.M.* Biosynthesis and regulation of superoxide dismutases // *Free radical Biol Med.* 1988. Vol.5. P.377-385.
266. *Geller B.L., Winge D.R.* Rat liver Cu, Zn- superoxide dismutase. Subcellular location in lysosomes // *J Biol Chem.* 1982. Vol.257. P.8945-8952.
267. *Delrio L.A., Sandalio L.M., Palma J.M., Bueno P., Corpas F.J.* Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications // *Free Radical Biology and Medicine.* 1992. Vol.13. P.557-580.
268. *Ishikawa T., Hunaiti A.R., Piechot G., Wolf B.* Isolation and characterization of basic superoxide dismutase consisting of Mr-25000 subunits in rat liver // *Eur J Biochem.* 1987. Vol.170. P.317-323.
269. *Wispe J.R., CJC, Burhans M.S., Kropp K.E., Korfhagen T.R., Whitsett J.A.* Synthesis and processing of the precursor for human manganese-superoxide dismutase // *Biochem Biophys Acta.* 1989. Vol.994. P.30-36.
270. *Marklund S.L., Holme E., Hellner L.* Superoxide dismutase in extracellular fluids // *Clin Chim Acta.* 1982. Vol.126. P.41-51.
271. *Marklund S.L.* Human copper containing superoxide dismutase of high molecular weight // *Proc Natl Acad Sci USA.* 1982. Vol.79. P.7634-7638.
272. *Marklund S.L., Bjelle A., Elmqvist L.G.* Superoxide dismutase isoenzymes of the synovial fluid in rheumatoid arthritis and in reactive arthritides // *Ann Rheum Dis.* 1986. Vol.45. P.847-851.
273. *Дубинина Е.Е., Туркин В.В., Дробот И.В.* Выделение супероксиддисмутазы из плазмы крови // *Деп. ВИНТИ. № 7043-В-89.*
274. *Karlsson K., Marklund S.L.* Heparin-induced release of extracellular-superoxide dismutase to human blood plasma // *Biochem J.* 1987. Vol.256. P.55-59.
275. *Karlsson K., Marklund S.L.* Heparin-, dextran sulfate- and protamine-induced release of extracellular-superoxide dismutase to plasma in pigs // *Biochim Biophys Acta.* 1988. Vol.967. P.110-114.
276. *Marklund S.L., Karlsson K., Edlund T., Engstrom A., Hjalmarsson K., Skogman G., Tibell L.* Oxy-radicals in molecular biology and pathology // *J Cell Biochem.* 1988. Vol.12A. P.31.
277. *Adachi T., Marklund S.L.* Interactions between human extracellular superoxide dismutase c and sulfated polysaccharides // *J Biol Chem.* 1989. Vol.264. P.8537-8541.
278. *Grankvist K., Marklund S.L., Taljedal I.B.* CuZn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse // *Biochem J.* 1981. Vol.199. P.393-398.
279. *Mavelli I., Rigo A., Federico R., Ciriolo M.R., Rotilio G.* Superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in developing rat brain // *Biochem J.* 1982. Vol.204. P.535-540.
280. *Savolainen H.* Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in rat brain // *Res Commun Chem Pathol Pharm.* 1978. Vol.21. P.173-176.
281. *Reiss U., Gershon D.* Comparison of cytoplasmic superoxide dismutase in liver, heart and brain of aging rats and mice // *Biochem Biophys Res Commun.* 1976. Vol.73. P.255-262.
282. *Ceballospicot I., Nicole A., Clement M., Bourre J.M., Sinet P.M.* Age-related changes in antioxidant enzymes and lipid peroxidation in brains of control and transgenic mice

- overexpressing copper-zinc superoxide dismutase // *Mutation Research*. 1976. Vol.275. P.281-293.
283. *Arai K., Maguchi S., Fujii S., Ishibashi H., Oikawa K., Taniguchi N.* Glycation and inactivation of human Cu-Zn-superoxide dismutase // *J Biol Chem*. 1987. Vol.262. P.16969-16972.
284. *Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э., Хилл Р., Леман И.* Основы биохимии / Мир. М., 1981.
285. *Aebi H.* Catalase in Vitro // *Methods in Enzymology*. 1984. Vol.105. P.121-126.
286. *Kirkman H.N., Galiano S., Gaetani G.F.* The function of catalase-bound NADPH // *J Biol Chem*. 1987. Vol.262. P.660-666.
287. *Suttorp N., Toepfer W, Roka L.* Antioxidant defense mechanisms of endothelial cells: glutathione redox cycle versus catalase // *Am J Physiol*. 1986. Vol.251. P.671-680.
288. *Hiraishi H., Terano A., Ota S., Mutoh H., Sugimoto T., Razandi M, Ivey K.J.* Antioxidant defenses of cultured gastric cells against oxygen metabolites - role of GSH redox cycle and endogenous catalase // *Am J Physiol*. 1991. Vol.261. P.921-928.
289. *Simmons T W., Jamall I.S.* Significance of alterations in hepatic antioxidant enzymes. Primacy of glutathione peroxidase // *Biochem J*. 1988. Vol.251. P.913-917.
290. *Mills G.C.* Hemoglobin catabolism. 1. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown // *J Biol Chem*. 1957. Vol.229. P.189-197.
291. *Flohe L.* Glutathione peroxidase brought into focus // *Free radicals in biology*. 1982. Vol.5. P.223-254.
292. *Chaudiere J., Tappel A.L.* Purification and characterization of selenium-glutathione peroxidase from hamster liver // *Arch Biochem Biophys*. 1983. Vol.226. P.448-457.
293. *Reddy C.C., Li N.Q., Reddy P.S., Hildenbrandt G.R., Reddy A.P., Scholz R.W., Tu C.-P.D.* Selenium-dependent glutathione peroxidase: expression in selenium deficiency // *Biological Oxidation systems*. 1990. Vol.1. P.473-485.
294. *Rotruck J., Pope A., Ganther H., Swanson A., Hoekstra W* Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase // *Science*. 1973. Vol.179. P.588-590.
295. *Tappel A.L.* Selenium-glutathione peroxidase: properties and synthesis // *Curr Top Cell Regul*. 1984. Vol.24. P.87-97.
296. *Grossmann A., Wendel A.* Phospholipid hydroperoxides are not substrates for selenium-dependent glutathione peroxidase // in *Oxygen radicals in chemistry and biology* (Bors W. ed). 1984. Walter de Gruyter & Co. Berlin. P.719-722.
297. *Tappel A.L.* Selenium-glutathione peroxidase and vitamin E // *Am J Clin Nutr*. 1974. Vol.27. P.960-965.
298. *Zhang L., Maiorino M, Roveri A., Ursini F.* Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase: specific activity in tissues of rats of different age and comparison with other glutathione peroxidases // *Biochim Biophys Acta*. 1989. Vol.1006. P.140-143.
299. *Stults F.H., Forstrom J.W., Chiu D.T.Y., Tappel A.L.* Rat liver glutathione peroxidase: purification and study of multiple forms // *Arch Biochem Biophys*. 1977. Vol.183. P.490-497.
300. *Mbemba F., Houbion A., Raes M, Remacle J.* Subcellular localization and modification with ageing of glutathione, glutathione peroxidase and glutathione reductase activities in human fibroblasts // *Biochim Biophys Acta*. 1985. Vol.838. P.211-220.

301. *Takahashi K., Avissar N., Whitin J., Cohen H.* Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: a selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme // *Arch Biochem Biophys.* 1987. Vol.256. P.677-686.
302. *Lapenna D., Degioia S., Mezzetti A., Porreca E., Ciofani G., Marzio L., Capani F., Diilio C., Cuccurullo F.* Circadian Variations in Antioxidant Defences and Lipid Peroxidation in the Rat Heart // *Free Rad Res.* 1992. Vol.17. P.187-194.
303. *Takahashi K., Newburger P.E., Cohen H.J.* Glutathione peroxidase protein // *J Clin Invest.* 1986. Vol.77. P.1402-1404.
304. *Sunde R.A., Hoekstra W.G.* Incorporation of selenium from selenite and selenocystine into glutathione peroxidase in the isolated perfused rat liver // *Biochem Biophys Res Commun.* 1980. Vol.93. P.1181-1188.
305. *Winter J.M., Lenting N.B.M., Neys F.W., van den Bosch H.* Hydrolysis of membrane-associated phosphoglycerides by mitochondrial phospholipase A // *Biochim Biophys Acta.* 1987. Vol.917. P.169-177.
306. *Lenting N.B.M., Neys F.W., Bosch H.* Hydrolysis of exogenous substrates by mitochondrial phospholipase A // *Biochim Biophys Acta.* 1987. Vol.917. P.178-185.
307. *Hong Y., Li C.H., Burgess J.R., Chang M., Salem A., Skikumar K., Reddy C.C.* The role of selenium-dependent and selenium-independent glutathione peroxidases in the formation of prostaglandin F2a // *J Biol Chem.* 1989. Vol.264. P.13793-13800.
308. *Burgess J.R., Hong Y., Chang M., Hildenbrandt G., Scholz R.W., Reddy C.C.* Involvement of glutathione peroxidases in prostaglandin biosynthesis // in *Biological Oxidation systems.* 1990. New York. Tokyo. P.667-682.
309. *Morgenstern R., DePierre J.W.* Microsomal glutathione transferase // *Rev Biochem Toxicol.* 1985. Vol.7. P.67-104.
310. *Mannervik B.* The role of glutathione transferases in the cellular resistance to electrophilic compounds produced by biological oxidations // in *Biological Oxidation systems.* 1990. New York. Tokyo. P.515-526.
311. *Ланкин В.З., Тихазе А.К., Юсис Ю.Г. и др.* Ферментативная регуляция перекисного окисления липидов в биомембранах: роль фосфолипазы A₂ и глутатион-S-трансферазы // *ДАН СССР.* 1985. Т.281. №1. С.204-207.
312. *Dirr H.W., Schabert J.C.* Purification and partial characterization of the glutathione S-transferase of rat erythrocytes // *Biochim Biophys Acta.* 1988. Vol.957. P.173-177.
313. *Boccio G.D., Di Ilio C., Alin P., Jornvall H., Mannervik B.* Identification of a novel glutathione transferase in human skin homologous with Class Alpha glutathione transferase 2-2 in the rat // *Biochem J.* 1987. Vol.244. P.21-25.
314. *Scholz R.W., Graham K.S., Wynn M.K., Reddy C.C.* Interaction of glutathione and a-tocopherol in the inhibition of lipid peroxidation in rat liver microsomes // in *Biological Oxidation systems.* 1990. New York. Tokyo. P.841-867.
315. *Stockman P.K., McLellan L.I., Hayes J.D.* Characterization of the basic glutathione S-transferase B1 and B2 subunits from human liver // *Biochem J.* 1987. Vol.244. P.55-61.
316. *Stone W.L., Dratz E.A.* Increased glutathione -S-transferase activity in antioxidant-deficient rats // *Biochim Biophys Acta.* 1980. Vol.631. P.503-506.
317. *Arthur J.R., Morrice P.C., Nicol F., Beddows S.E., Boyd R., Hayes J.D., Beckett G.J.* The effects of selenium and copper deficiencies on glutathione S-transferase and glutathione peroxidase in rat liver // *Biochem J.* 1987. Vol.248. P.539-544.

318. *Reddy K., Tappel A.L.* Effect of dietary selenium and autoxidized lipids on the glutathione peroxidase system of gastrointestinal tract and other tissues // *J Nutr.* 1974. Vol.104. P.1069-1078.
319. *Forman H.J., Fisher A.B.* Role of glutathione peroxidase in tolerance and adaptation of rats to hyperoxia // in *Oxygen radicals in chemistry and biology* (Bors W. ed). 1984. Walter de Gruyter & Co. Berlin. P.699-704.
320. *Jamall I.S., Haldar D., Wadewitz A.G.* Effects of dietary selenium on lipid peroxidation, mitochondrial function and protein profiles in the heart of the myopathic Syrian Golden Hamster (BIO 14.6) // *Biochem Biophys Res Commun.* 1987. Vol.144. P.815-820.
321. *Tirmenstein M.A., Reed D.J.* Role of a partially purified glutathione S-transferase from rat liver nuclei in the inhibition of nuclear lipid peroxidation // *Biochim Biophys Acta.* 1989. Vol.995. P.174-180.
322. *Burk R.F., Trumble M.J., Lawrence R.A.* Rat hepatic cytosolic glutathione-dependent enzyme protection against lipid peroxidation in the NADPH-microsomal lipid peroxidation system // *Biochim Biophys Acta.* 1980. Vol.618. P.35-41.
323. *Fujii S., Dale G.L., Beutler E.* Glutathione-dependent protection against oxidative damage of the human red cell membrane // *Blood.* 1984. Vol.63. P.1096-1101.
324. *Meyer D.J., Tan K.H., Christodoulides L.G., Ketterer B.* Recent studies of selenium-independent GSH peroxidases (GSH transferases) from the rat // in *Free radicals in liver injury.* 1985. IRL Press. Oxford, England. P. 221-224.
325. *Flohe L., Aumann K-D., Brigelius-Flohe R.* The selenium-containing peroxidases: how they work and what they might be good for? // *Book of abstracts inter. symp. on antioxidant and disease prevention.* 30 June-3 July 1993. Stockholm, Sweden. 1993. P.32-33.
326. *Ursini F.* Peroxidases and vitamin E // *Book of abstracts inter. symp. on antioxidant and disease prevention.* 30 June-3 July 1993. Stockholm, Sweden. 1993. P.33-35.
327. *Biology Data Book.* Blood non-protein nitrogenous substances: man / Fed. Am. Soc. Exp. Biol. Bethesda, Maryland. 1972.
328. *Burton G.W., Ingold K.U.* Vitamin E: Application of the principles of physical organic chemistry to exploration of its structure and function // *Acc Chem Res.* 1986. Vol.19. P.194-201.
329. *Nomenclature Policy: Generic description and trivial names for vitamins and related compounds* // *J Nutr.* 1986. Vol.116. P.8-16.
330. *Ступичев В.Б., Конь И.Я.* Биологическая роль жирорастворимых витаминов // *Итоги науки и техники. ВИНТИ Сер. Физиология человека и животных.* 1989 Т.37. С.1-226.
331. *Burton G.W., Ingold K.U.* Autoxidation of biological molecules. 1. The antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants in vitro // *J Am Chem Soc.* 1981. Vol.103. P.6472-6477.
332. *Fukuzama K., Tokumura A., Ouchi S., Tsukatani H.* Antioxidant activities of tocopherols on Fe²⁺-ascorbate-induced lipid peroxidation in lecithin liposomes // *Lipids.* 1982. Vol.17. P.511-513.
333. *Fukuzawa K., Chida H., Ouchi S., Tokumura A., Tsukatani H.* Lipid-antioxidant activities of tocopherols in liposomes // *Vitamins (Japan).* 1982. Vol.56. P.641-652.

334. *Niki E., Tanimura R., Kamiya Y.* Oxidation of lipids. II. Rate of inhibition of oxidation of α -tocopherol and hindered phenols measured by chemiluminescence // *Bull Chem Soc Jpn.* 1982. Vol.55. P.1551-1555.
335. *Kharitonova A.A., Kozlova Z.G., Tsepalov V.F., Gladyshev G.P.* // *Kinet Katal.* 1979. Vol.20. P.593-599.
336. *Niki E., Yamamoto Y., Kamiya Y.* Oxidation of phosphatidylcholine and its inhibition by vitamin E and vitamin C // *Oxygen radicals in chemistry and biology.* Walter de Gruyter & Co. Germany: Berlin, 1984. P.273-280
337. *Бурлакова Е.Б., Алесенко А.В., Молочкина Е.М., Пальмина Н.П., Храпова Н.Г.* Биоантиоксиданты при лучевом поражении и злокачественном росте. -М.:Наука, 1975.
338. *Burclay L R.C.* 1992 Syntex Award Lecture. Model biomembranes: quantitative studies of peroxidation, antioxidant action, partitioning, and oxidative stress // *Can J Chem.* 1993. Vol.71. P.1-16.
339. *Ерин А.Н., Скрытин В.И., Прилипко Л.Л., Каган В.Е.* Витамин Е: молекулярные механизмы действия в биологических мембранах // *Кислородные радикалы в биологии и медицине.* // *Кислородные радикалы в биологии и медицине.* 1988. Рига, РМИ. С. 109-129.
340. *Hicks M., Gebicki J.M.* Inhibition of peroxidation in linoleic acid membranes by nitroxide radicals, butylated hydroxytoluene, and α -tocopherol // *Arch Biochem Biophys.* 1981. Vol.210. P.56-63.
341. *Palozza P., Moualla S., Krinsky N.I.* Effects of beta-carotene and alpha-tocopherol on radical-initiated peroxidation of microsomes // *Free Radical Biology and Medicine.* 1992. Vol.13. P.127-136.
342. *Mukai K., Kohno Y., Ishizu K.* Kinetic study of the reaction between vitamin E radical and alkyl hydroperoxides in solution // *Biochem Biophys Res Commun.* 1988. Vol.155. P.1046-1050.
343. *Igarashi O., Matsukawa H., Inagaki C.* Reactivity of α -tocopherol with hydroperoxide of methyl linoleate // *J Nutr Sci Vitaminol.* 1976. Vol.22. P.267-270.
344. *Праїор У.* Роль свободнорадикальных реакций в биологических системах // *Свободные радикалы в биологии.* 1979. М: Мир. Т.1. С.13-87.
345. *Urano S., Yamanoi S., Hattori Y., Matsuo M.* Radical scavenging reactions of α -tocopherol. II. The reaction with some alkyl radicals // *Lipids.* 1977. Vol.12. P.105-111.
346. *Niki E.* Dynamics of action of radical scavenging antioxidants against lipid peroxidation // *Book of abstracts inter. symp. on antioxidant and disease prevention.* 30 June-3 July 1993. Stockholm, Sweden. 1993. P.30-31.
347. *Tappel A.L.* Vitamin-E as the biological lipid antioxidant // *Vitamines and Hormones.* 1962. Vol.20. P.493-498.
348. *Packer J.E., Slater T.F., Willson R.L.* Direct observation of a free-radical interaction between vitamin E vitamin C // *Nature.* 1979. Vol.278. P.737-738.
349. *Mukai K., Fukuda K., Ishizu K., Kitamura Y.* Stopped-flow investigation of the reaction between vitamin E radical and vitamin C in solution // *Biochem Biophys Res Commun.* 1987. Vol.146. P.134-139.
350. *Clough R.L., Yee B.G., Foote C.S.* Chemistry of singlet oxygen. 30. The unstable primary product of tocopherol photooxidation // *J Am Chem Soc.* 1979. Vol.101. P.683-686.

351. *Ohrvall S., Tengblad S., Vessby B.* Tocopherol serum concentrations in a reference population of swedish men and women - lower levels in subjects with abdominal adiposity // Book of abstracts inter. symp. on antioxidant and disease prevention. 30 June-3 July 1993. Stockholm, Sweden. 1993. P.106-107.
352. *Mino M, Nishida Y., Kijima Y., Iwakoshi M., Nakagama S.* Tocopherol level in human blood cells // J Nutr Sci Vitaminol. 1979. Vol.25. P.505-516.
353. *Pappu A.S., Fatterpaker P., Sreenivasan A.* Alterations in lipid composition of subcellular membranes of rat liver in vitamin E deficiency // Indian J Biochem Biophys. 1979. Vol.16. P.143-147.
354. *Pascoe G.A., Reed D.J.* Relationship between cellular calcium and vitamin E metabolism during protection against cell injury // Arch Biochem Biophys. 1987. Vol.253. P.287-296.
355. *Steinberg D., Parthasarathy S., Carew T.E., Khoo J.C., Witztum J.L.* Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity // N Engl J Med. 1989. Vol.320. P.915-924.
356. *Esterbauer H., Gebicki J., Puhl H., Juergens G.* The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL // Free Rad Biol Med. 1992. Vol.13. P.341-390.
357. *Esterbauer H.* Inhibition of lipoprotein oxidation by antioxidants // Book of abstracts inter. symp. on antioxidant and disease prevention. 30 June-3 July 1993. Stockholm, Sweden. 1993. P.53-54.
358. *Cominacini L., Garbin U., Cenci B., Davoli A., Pasini C., Ratti E., Gaviraghi G., Locascio V., Pastorino A.M.* Predisposition to LDL oxidation during copper-catalyzed oxidative modification and its relation to alpha-tocopherol content in humans // Clin Chim Acta. 1991. Vol.204. P.57-68.
359. *Masugi F., Nakamura T.* Measurement of thiobarbituric acid value in liver homogenate solubilized with sodium dodecylsulphate and variation of the values affected by vitamin E and drugs // Vitamins. 1977. Vol.51. P.21-29.
360. *Okada S., Hamazaki S., Ebina Y., Li J.L., Midorikawa O.* Nephrotoxicity and its prevention by vitamin E in ferric nitrilotriacetate-promoted lipid peroxidation // Biochim Biophys Acta. 1987. Vol.922. P.28-33.
361. *Морозкина Т.С., Шкробнева И.И., Полякова З.И. и др.* Эффективность комплексного применения витаминов Е, А и С в норме и при росте злокачественных опухолей у животных // Здоровохранение Беларуси. 1988. №8. С.39-42.
362. *Clausen J.* The influence of selenium and vitamin-E on the enhanced respiratory burst reaction in smokers // Biol Trace Elem Resear. 1991. Vol.31. P.281-291.
363. *Sugiyama M, Tsuzuki K., Matsumoto K., Ogura R.* Effect of vitamin-E on cytotoxicity, DNA single strand breaks, chromosomal aberrations, and mutation in chinese hamster V-79 cells exposed to ultraviolet-B light // Photochem Photobiol. 1992. Vol.56. P.31-34.
364. *Kheireldin A.A., Hamdy M.A., Motawi T.K., Shaheen A.A., Elgawad H.M.A.* Biochemical changes in arthritic rats under the influence of vitamin-E // Agents and Actions. 1992. Vol.36. P.300-305.
365. *Meydani M* Dietary antioxidants modulation of aging and immune-endothelial cell interaction // Mechanisms of Ageing and Development. 1999. Vol.111. P.123-132.

366. *Pascoe G.A., Olafsdottir K., Reed D.J.* Vitamin E protection against chemical-induced cell injury. I. Maintenance of cellular protein thiols as a cytoprotective mechanism. // *Arch Biochem Biophys.* 1987. Vol.256. P.150-158.
367. *Pascoe G.A., Reed D.J.* Vitamin E protection against chemical-induced cell injury. II. Evidence for a threshold effect of cellular alpha-tocopherol in prevention of adriamycin toxicity. // *Arch Biochem Biophys.* 1987. Vol.256. P.159-166.
368. *Архипенко Ю.В., Джанаридзе Л.М., Гуткин Д.В., Рожницкая И.И., Стричев В.Б.* Сравнительная оценка влияния недостаточности витамина Е на перекисное окисление липидов и транспорт Ca^{2+} в сердечной и скелетной мышцах // *Вопр. мед. химии.* 1987. Т.33. № 1. С.122-127.
369. *Lee H.-S., Csallany A.S.* Measurement of free and bound malondialdehyde in vitamin E-deficient and -supplemented rat liver tissues // *Lipids.* 1987. Vol.22. P.104-107.
370. *Gee D.L., Tappel A.L.* The effect of exhaustive exercise on expired pentane as a measure in vivo lipid peroxidation in the rat // *Life Sci.* 1981. Vol.28. P.2425-2427.
371. *Wayner D.D.M., Burton G.W., Igonld K.U., Barclay L.R.C., Locke S.J.* The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma // *Biochim Biophys Acta.* 1987. Vol.924. P.408-419.
372. *Frei B., Stocker R., Ames B.* Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma // *Proc Natl Acad Sci.* 1988. Vol.85. P.9748-9752.
373. *Дорожек А.И., Бродский А.В., Афанасьев И.Б.* Хелатирующее и антирадикальное действие рутина в процессе перекисного окисления липидов микросом и липосом // *Биохимия.* 1988. Т.53. №10. С.1660-1666.
374. *Владимиров Ю.А., Арчаков А.И.* // *Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.* -М.: Наука, 1972.
375. *Heikkila R.E.* Ascorbic acid, lipid peroxidation and the interactions of drugs with their receptors in rat brain tissue preparations // in *Oxygen radicals in chemistry and biology* (Bors W. ed). 1984. Walter de Gruyter & Co. Berlin. P.371-375.
376. *Miller D.M., Aust S.D.* Studies of ascorbate-dependent, iron-catalyzed lipid peroxidation // *Arch Biochem Biophys.* 1989. Vol.271. P.113-119.
377. *Baysal E., Sullivan S.G., Stern A.* Prooxidant and antioxidant effects of ascorbate on tBuOOH-induced erythrocyte membrane damage // *Int J Biochem.* 1989. Vol.21. P.1109-1113.
378. *Yagi K., Komura S.* Inhibitory effect of female hormones on lipid peroxidation // *Biochem Inter.* 1986. Vol.13. P.1051-1055.
379. *Takayanagi R., Takeshige K., Minakami S.* NADH- and NADPH-dependent lipid peroxidation in bovine heart submitochondrial particles // *Biochem J.* 1980. Vol.192. P.853-860.
380. *Solaini G., Landi L., Pasquali P., Rossi C.A.* Protective effect of endogenous coenzyme Q on both lipid peroxidation and respiratory chain inactivation induced by an adriamycin-iron complex // *Biochem Biophys Res Commun.* 1987. Vol.147. P.572-580.
381. *Landi L., Fiorentini D., Cabrini L., Stefanelli C., Sechi A.M.* Effects of free radicals produced by sonolysis on ubiquinone-containing vesicles // *Biochim Biophys Acta.* 1989. Vol.984. P.21-25.
382. *Mellors A., Tappel A.L.* The inhibition of mitochondrial peroxidation by ubiquinone and ubiquinol // *J Biol Chem.* 1966. Vol.241. P.4353-4356.

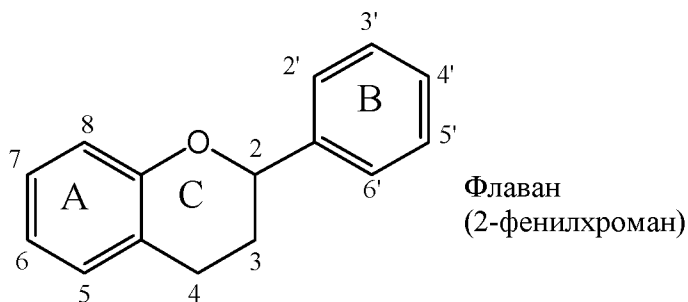
383. *Бурлакова Е.Б., Сторожок Н.М., Храпова Н.Г.* Изучение суммарной активности природных антиоксидантов липидов хемилюминесцентным методом // *Биофизика*. 1988. Т.33. №4. С.584-588.
384. *Лунец Е.Ф., Титовец Э.П., Власюк П.А., Ковган Т.А.* Экспериментальные данные о повышении устойчивости головного мозга к острой тотальной ишемии // *Акт. вопр. невропат.* 1971. Минск: Наука и техника. С.57-64.
385. *Харламова А.Н.* Исследование нарушений и возможностей коррекции мозгового кровообращения и метаболизма при гипоксических состояниях: Дис...канд. мед.наук. Смоленск. 1974. 173с.
386. *Шалатонин В.Т., Васильева Л.П., Полохович Г.С.* Фармакологические эффекты антиоксидантов при ишемии, инфаркте и постишемической реперфузии сердца // *Фармакология и токсикология природных и синтетических соединений*. Тез.докл. V съезда фармац.,фармак. и токсикол., 1-2 июня 1989 Минск. 1989. С.133-134.
387. *Савченко Н.Е., Соклаков В.И., Лунец Е.Ф.* Влияние производного ортобензохинона на консервирующие свойства перфузионного раствора // *Док. АН БССР*. 1980. Т.24. №5. С.472-474.
388. *Титовец Э.П., Лунец Е.Ф., Матусевич П.А.* Взаимодействие некоторых производных о-бензохинона с митохондриальной дыхательной цепью при изменении липофильности молекулы // Тез.докл. IV межд. биофизического конгресса, 1972. М. Т.3. С.195.
389. *Костюк В.А.* Ингибирование микросомального окисления производными о-бензохинона // *Биохимия*. 1987. Т.52. № 3. С.335-358.
390. *Kamataki T., Sugita O., Naminohira S., Kitagawa* Effects of various compounds on lipid peroxidation mediated by detergent-solubilized rat liver NADPH-cytochrome c reductase // *Japan J Pharmacol.* 1978. Vol.28. P.837-845.
391. *Shadyro O.I., Glushonok G.K., Glushonok T.G., Edimecheva I.P., Moroz A.G., Sosnovskaya A.A., Yurkova I.L., Polozov G.I.* Quinones as free-radical fragmentation inhibitors in biologically important molecules // *Free Radic Res.* 2002. Vol.36. P.859-867.
392. *Edimecheva I.P., Kisel M.A., Shadyro O., Vlasov A.P., Yurkova I.L.* The damage to phospholipids caused by free radical attack on glycerol and sphingosine backbone // *Int J Radiat Biol.* 1997. Vol.71. P.555-560.

2. ФЛАВОНОИДЫ.

К флавоноидам (от латинского *flavus* –желтый) относятся природные полифенолы, синтезируемые через ацетат/малонат и шикиматный пути высшими растениями, включая мхи и папоротники, и некоторыми микроорганизмами. В основе молекулы флавоноидов и их конденсированных производных – процианидинов – лежит так называемый $C_6C_3C_6$ -скелет. Флавоноиды являются наиболее распространенными фенольными соединениями растительного происхождения. В настоящее время известно более 4000 различных флавоноидов, имеющих не только желтую, но и интенсивно красную и голубую окраску, а также не имеющих окраски [1]. В отдельном растении могут образовываться и содержаться различные флавоноиды, и их качественный состав может быть использован как классификационный признак при описании родов и семейств. Роль флавоноидов в растениях важна и многообразна, и первое, что следует отметить, благодаря наличию интенсивной окраски они создают цветное разнообразие растительного мира. Окраска растений, кроме эстетического, эмоционального воздействия на человека играет в природе важную утилитарную роль, участвуя в установлении экологических взаимосвязей между микроорганизмами, растениями и животными. Ярко окрашенные цветы служат визуальным сигналом для опыляющих эти растения насекомых, а не менее яркая окраска семян и плодов привлекает птиц и других животных, способствуя воспроизведению растений и их распространению на новые территории. Кроме воздействия на зрительный аппарат, флавоноиды могут осуществлять химическую передачу информации, привлекая (аттрактанты) или отталкивая (репелленты) другие организмы, воздействуя на их органы вкуса и обоняния. Например, катехины, благодаря терпким, вяжущим свойствам, защищают растения от вредных насекомых [2]. В зеленых растениях флавоноиды участвуют в некоторых реакциях световой фазы фотосинтеза, катализируя транспорт электронов и управляя ионными каналами, связанными с процессами фотофосфорилирования [2, 3]. Кроме того, являясь эффективными светофильтрами, поглощающими как УФ, так и видимое излучение, флавоноиды защищают хлоропласты от прямой солнечной радиации и фотодинамического повреждения. При их дефиците в результате нарушения процессов вторичного метаболизма, что имеет место, например, у мутантов растения *Arabidopsis*, наблюдается сильное окислительное повреждение клеток [4]. Наконец, многие флавоноиды, в частности флаван-3-олы и флаван-3,4-диолы, являются ключевыми субстратами для биосинтетических процессов, ведущих к образованию фенольных полимеров –

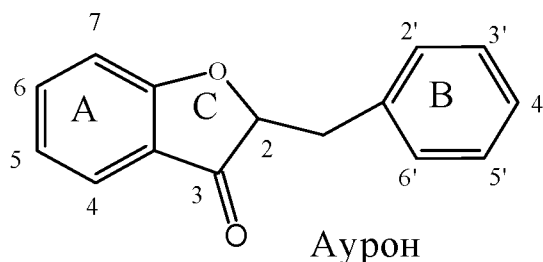
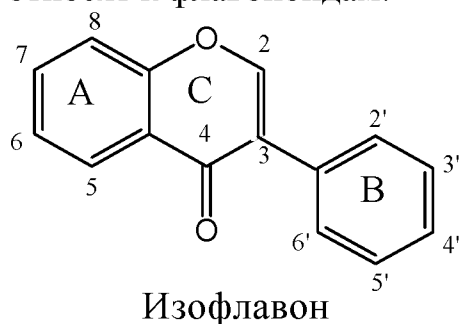
дубильных веществ. Благодаря высокому содержанию в съедобных растениях, флавоноиды в достаточно большом количестве содержатся в пище и различных напитках (соки, вина, чай), являясь необходимым неэнергетическим диетическим компонентом. Среднестатистическое поступление флавоноидов в организм человека составляет около 600 мг/день [2]. Однако эта цифра сильно различается в разных странах. Например, среднее ежедневное потребление флавоноидов в Нидерландах составляет только 23 мг [4, 5], из которых 16 мг/день – это кверцетин. Это больше, чем ежедневное потребление витамина Е (7-10 мг) [5, 6], но значительно меньше, чем потребление флавоноидов жителями США – приблизительно 1 г [6]. Фармакологические эффекты флавоноидов были обнаружены в 1936 году Сент-Дьердьи, открывшим витамины группы Р и установившим их полифенольную структуру [7, 8]. В настоящее время установлено, что флавоноиды обладают выраженными антиаллергическими, антиканцерогенными, противовоспалительными и противовирусными свойствами [5, 9]. Не вызывает сомнений, что разнообразная биологическая активность флавоноидов обусловлена наличием в их молекулах реактивных гидроксильных и карбонильных групп. Кроме того, эти соединения способны превращаться в биологических системах в различные хиноны, которые могут взаимодействовать со специфическими функциональными группами белков-ферментов, изменяя их третичную структуру и каталитические свойства. Особенно активны в этом отношении агликоны флавоноидов. Однако большинство флавоноидов содержится в растениях и поступает в организм человека в виде гликозидов, т.е. молекул флавоноидов (агликонов), гликозилированных по гидроксильным группам различными моно- и олигосахаридами. Молекулы флавоноидов могут также метилироваться и ацетилироваться. Именно благодаря различиям в расположении и типах заместителей и существует огромное разнообразие молекулярных структур среди природных флавоноидов.

2.1 Классификация флавоноидов



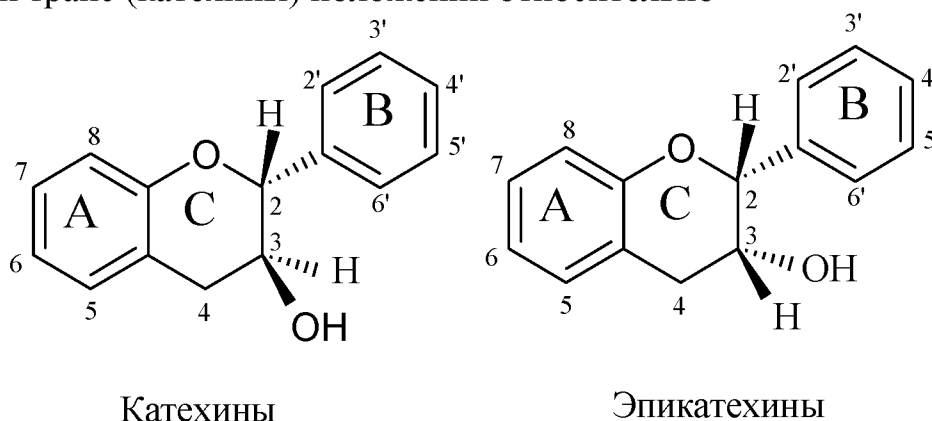
$C_6C_3C_6$ -скелет, который, как указывалось выше, лежит в основе всех флавоноидов, наиболее часто представлен структурой флавана. Степень окисленности пирана,

расположенного в центре 2-фенилхромана (кольцо C), играет определяющее значение в классификации флавоноидов. Несмотря на огромное количество индивидуальных соединений, все флавоноиды могут быть отнесены к сравнительно небольшому числу групп, каждая из которых характеризуется наличием у всех ее представителей одинакового ароматического ядра [10]. В зависимости от наличия в кольце C двойной связи между углеродными атомами 2 и 3, гидроксильных и карбонильной групп выделяют следующие основные классы флавоноидов: халконы, флавоны, флавонолы, дигидрофлавоны (флаваноны), дигидрофлавонолы (флаванололы), флаван-3-олы (катехины), флаван-3,4-диолы (проантоцианидины) и антоцианидины (рис. 2.1). Значительно реже растительные пигменты в качестве ароматического ядра имеют структуру изофлавона ($C_6C_{2+1}C_6$) или ауруна ($C_6C_{1+2}C_6$). Изофлавоноиды и ауруны тоже часто относят к флавоноидам.



Для некоторых классов флавоноидов характерна пространственная изомерия, или стереоизомерия, и, в частности, геометрическая, или как теперь принято называть, цис-транс-изомерия. В этом случае два заместителя в циклической структуре могут располагаться по одну или по разные стороны плоскости цикла. Тот изомер, в котором оба заместителя расположены по одну сторону кольца, называется цис-изомером, а в другом случае мы имеем транс-изомер.

Например, у флаван-3-олов существует возможность расположения гидроксильной группы при С-3 и фенила при С-2 как в цис (эпикатехины), так и транс (катехины) положении относительно



плоскости пирана. Цис-транс расположение заместителей при С-2 и С-3 относительно плоскости пирана может также быть у дигидрофлавонов, дигидрофлавонолов и флаван-3,4-диолов.

Исходя из наличия или отсутствия в структуре флавоноидов моно- или олигосахаридного фрагмента каждый класс подразделяют на соответствующие флавоноид-гликозиды и флавоноид-агликоны. Исключением в этом отношении являются катехины. Для них характерно не гликозилирование, а галлирование, т.е. присоединение в положение С-3 остатка галловой кислоты и образование катехин-галлатов. С-3-гликозиды антоцианидинов часто называют общим термином антоцианы.

К флавоноидам относят и наиболее многочисленную группу танинов – конденсированные танины (процианидины), или так называемые “негидролизуемые дубильные вещества“. Процианидины – это полифенольные образования, состоящие из мономерных единиц флаван-3-олов, реже флаван-3,4-диолов. Полимеризация идет в результате связывания углеродного атома С-4 одного мономера с углеродным атомом С-8 другого мономера (связь $\beta_{4\rightarrow 8}$). Реже полимеризация идет за счет образования связи $\beta_{4\rightarrow 6}$. Даже при образовании димера из эпикатехина и катехина возможно образование 4 изомеров: эпикатехин-катехин (процианидин-В1); эпикатехин-эпикатехин (процианидин-В2); катехин-катехин (процианидин-В3) и катехин-эпикатехин (процианидин-В4) [11]. При образовании из эпикатехина и катехина тримеров, тетрамеров и других олигомеров количество возможных изомеров возрастает соответственно до 8, 16 и далее в соответствии с известной формулой 2^n . Поскольку в состав молекул процианидинов может входить до 17 мономеров [12, 13], количество потенциально возможных изомеров может превысить сто тысяч.

Кроме того, многообразие процианидинов обусловлено возможностью присоединения к гидроксильным группам различных заместителей. Наиболее часто гидроксил при С-3 замещен галловой кислотой.

Важнейшие представители основных классов флавоноидов и их структурные формулы приведены в табл. 2.1.

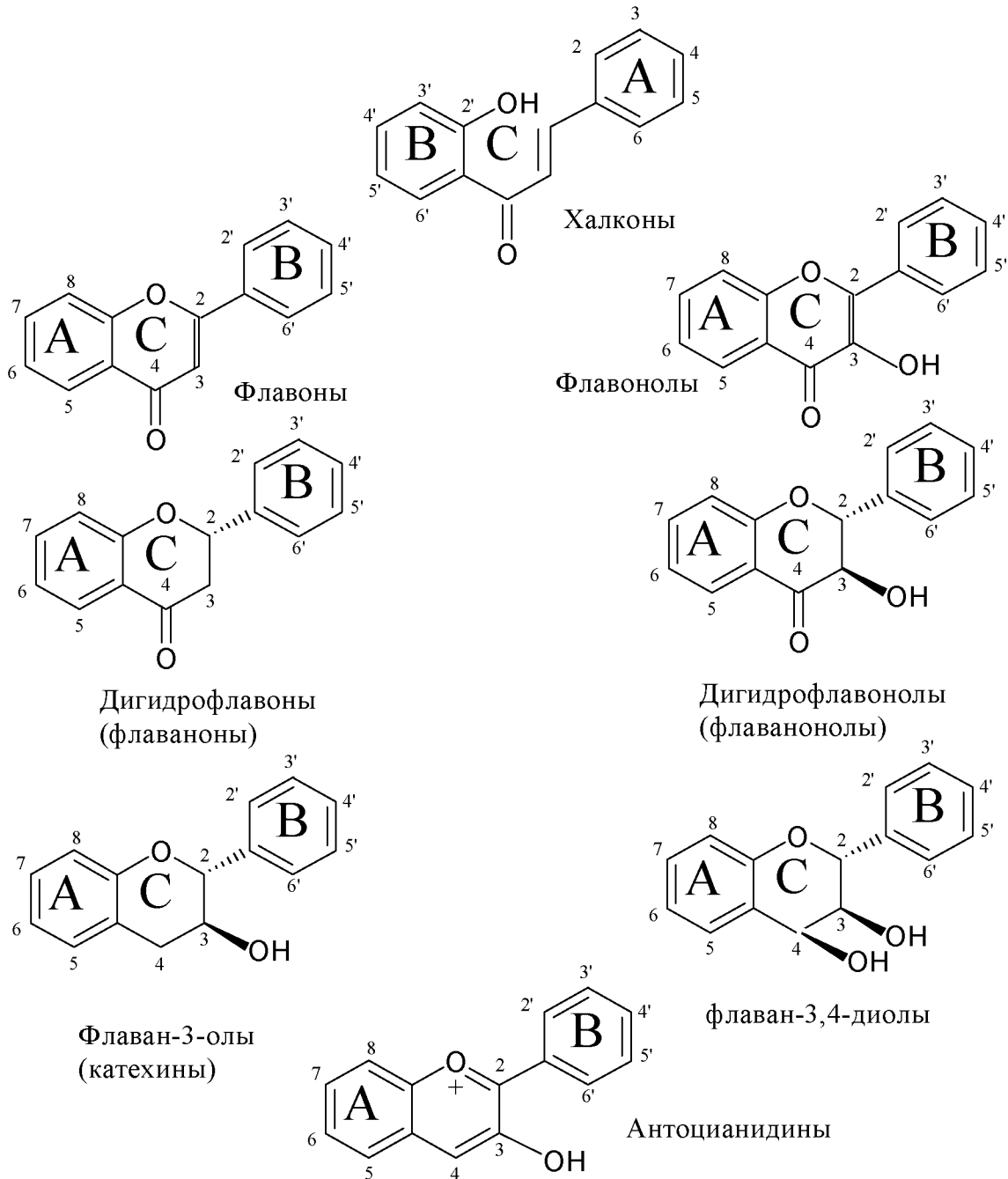
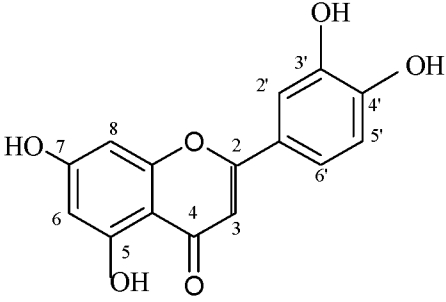
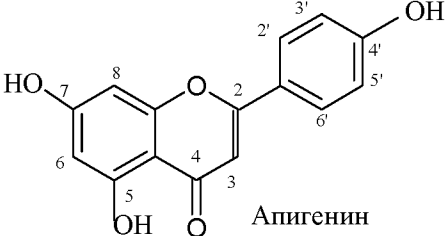
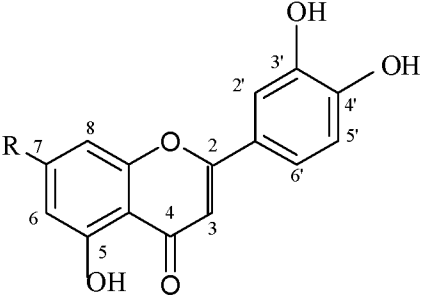
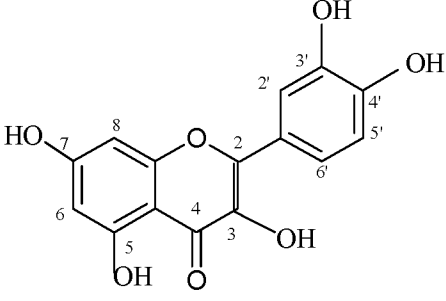
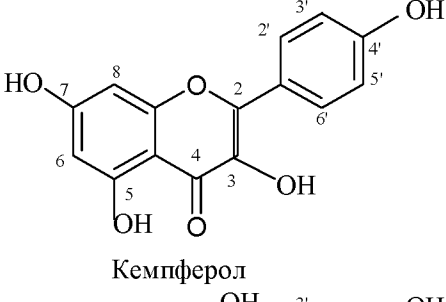
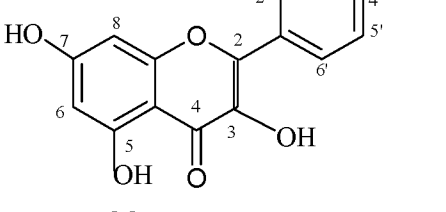
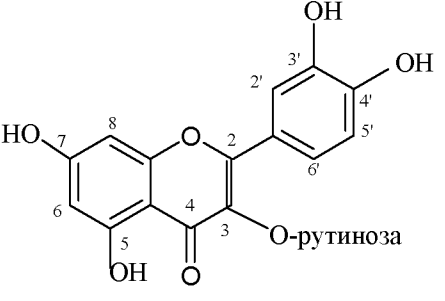
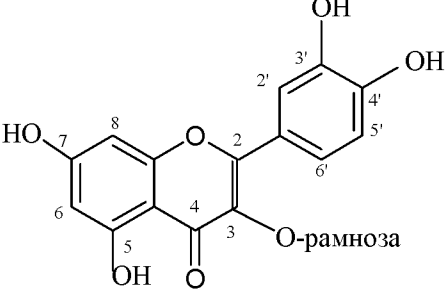
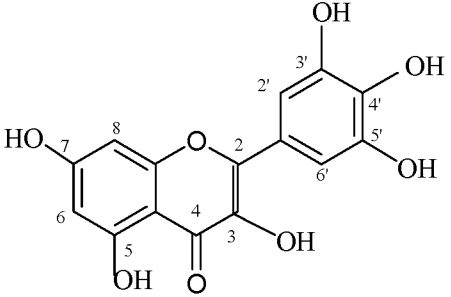
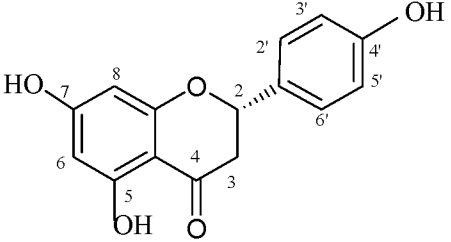
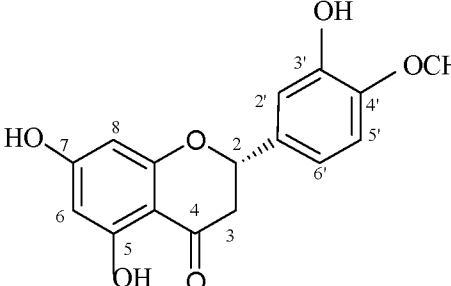
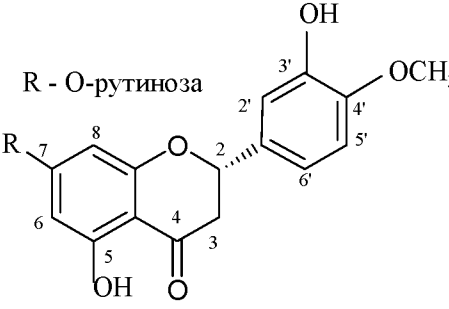
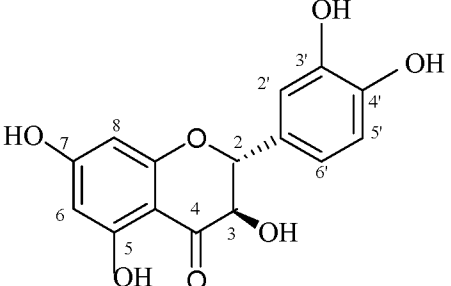


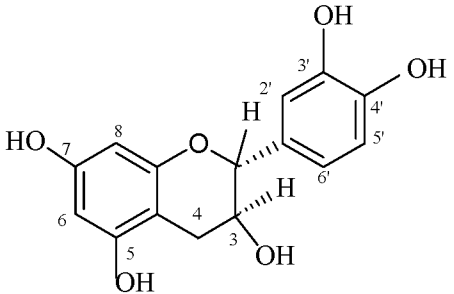
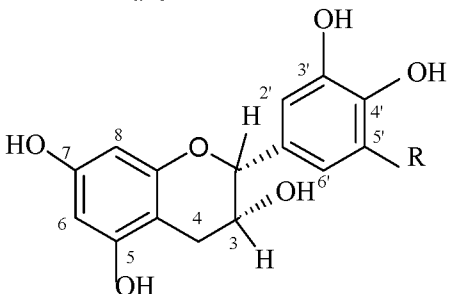
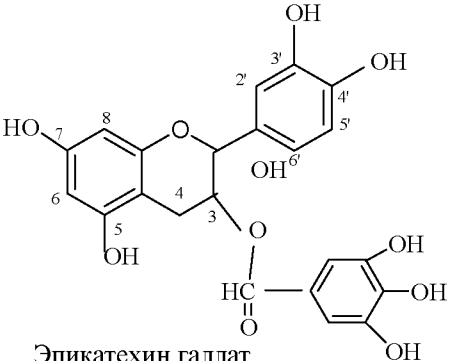
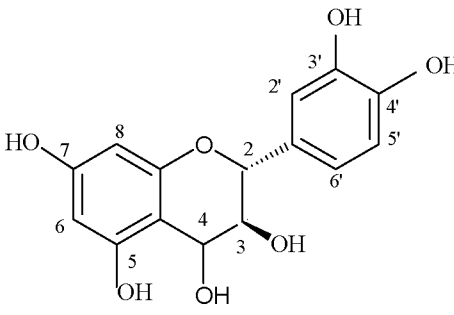
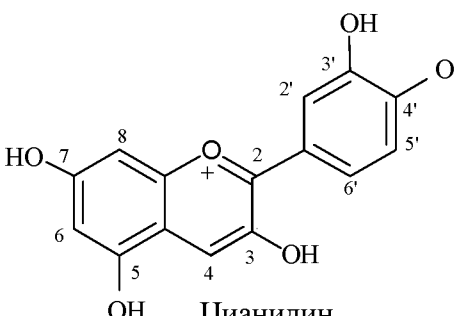
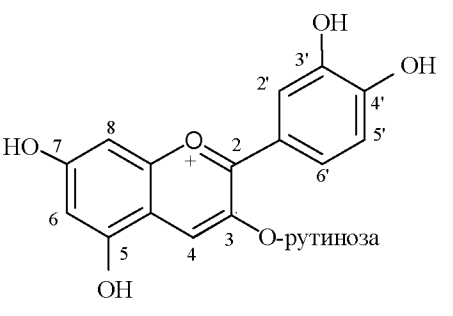
Рис. 2.1 Основные классы флавоноидов

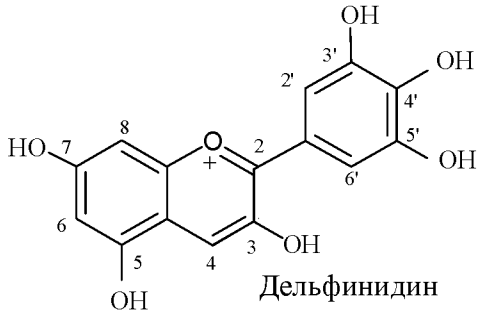
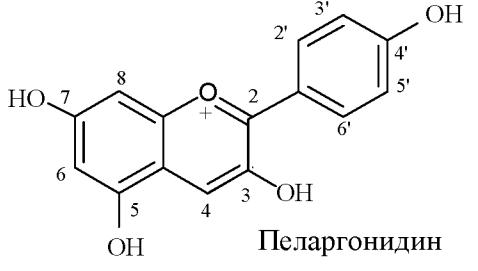

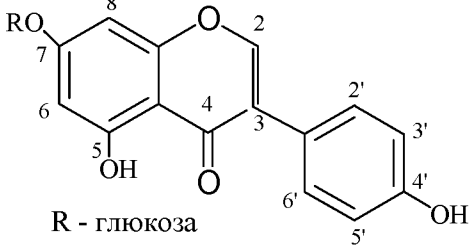
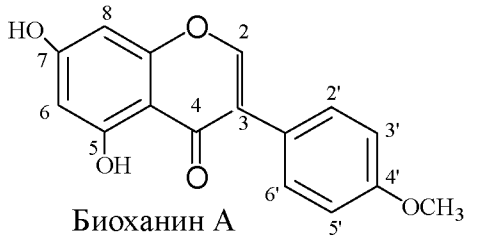
Таблица 2.1

Наиболее известные флавоноиды

Классы флавоноидов	Агликоны	Гликозиды (галлаты)
Флавоны	 <p>Лютеолин</p>  <p>Апигенин</p>	 <p>Лютеолин-7-глюкозид R - O-глюкоза</p>
Флавонолы	 <p>Кверцетин</p>  <p>Кемпферол</p>  <p>Морин</p>	 <p>Рутин (3-рамноглюкозил кверцетин)</p>  <p>Кверцетрин</p>

	 <p>Мирицетин</p>	
<p>Флаваноны (дигидро- флавоны)</p>	 <p>Нарингенин</p>	 <p>Гесперетин</p>  <p>R - О-рутиноза</p> <p>Гесперидин</p>
<p>Флавано- нолы (дигидро- флавонолы, флаванолы)</p>	 <p>Дигидрокверцетин (таксифолин)</p>	

<p>Флаван-3-олы (катехины)</p>	 <p>Катехин</p>  <p>R- H - Эпикатехин. R-OH - Эпигаллокатехин</p>	 <p>Эпикатехин галлат</p>
<p>Флаван-3,4-диолы (лейкоантоцианидины; проантоцианидины)</p>	 <p>Лейкоцианидин</p>	
<p>Антоцианидины</p>	 <p>Цианидин</p>	 <p>Керацианин</p>

	 <p>Дельфинидин</p>	
	 <p>Пеларгонидин</p>	
Изофлавоноиды	 <p>Генистеин</p>	 <p>R - глюкоза</p> <p>Генистин</p>
	 <p>Биоханин А</p>	

2.2 Физико-химические свойства флавоноидов

Характерный желтый цвет, присущий значительной части флавоноидов, обусловлен способностью их молекул поглощать свет в области 320-420 нм (полоса 1). Наличие или отсутствие в спектре поглощения полосы 1 определяется степенью окисленности кольца С. Типичная полоса 1 с максимумом (λ_{max}) в области 360-385 нм характерна для спектра поглощения флавоноидов, имеющих двойную связь в положении С2-С3 (флавоны и флавонолы и их гликозиды) (рис. 2.2).

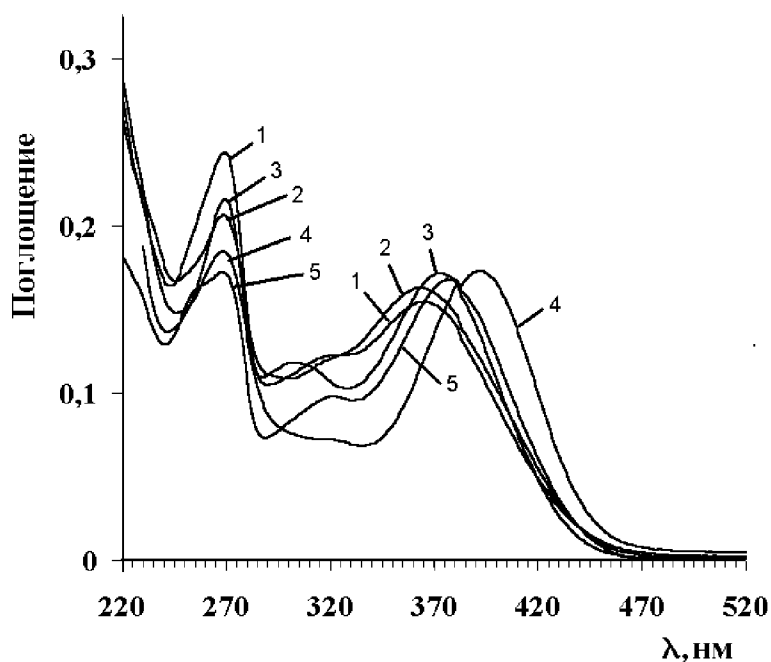


Рис. 2.2 УФ/видимый спектр поглощения некоторых окрашенных флавоноидов (10 мкМ) в 0,1 М фосфатном буфере рН 7,4
1 – рутин; 2 – лютеолин; 3 – кемпферол; 4 – морин; 5 – кверцетин.

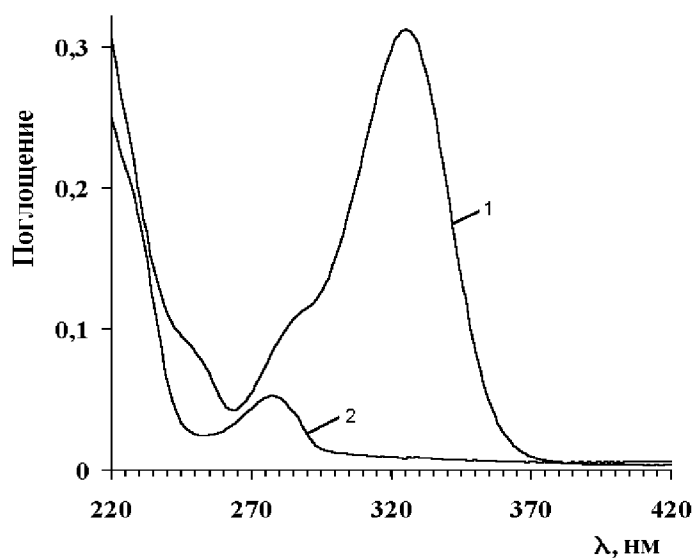


Рис. 2.3 УФ/видимый спектр поглощения таксифолина (1) и эпикатехина (2) (10 мкМ растворы в 0,1 М фосфатном буфере рН 7,4)

Дигидрофлавоны, дигидрофлавонолы и катехины бесцветны. Но если у дигидрофлавонов и дигидрофлавонолов отсутствие окраски обусловлено смещением полосы 1 в ультрафиолетовую область, с λ_{max} от 310 до 330 нм (рис. 2.3, спектр 1), то в спектре поглощения катехинов полоса 1 отсутствует (рис. 2.3, спектр 2). Красно-синие антоцианидины и анто-

цианы поглощают свет в более дальней области видимого спектра, λ_{max} от 490 до 540 нм. Таким образом, метод спектрофотометрии может использоваться для идентификации основных классов флавоноидов.

На положение максимума поглощения полосы 1 у флавонов и флавонолов влияет наличие гидроксильной группы при С3, количество и положение гидроксильных групп в кольце В. Это хорошо видно при сравнении спектров поглощения кверцетина и близких ему по структуре флавоноидов: лютеолина, морина и кемпферола (рис. 2.2). У кверцетина (гидроксильные группы расположены при С3, С5, С7, С3', С4') максимум поглощения (λ_{max}) полосы 1 регистрируется при 375 нм. У морина (гидроксилы в кольце В находятся в положении С2', С3') полоса 1 смещена в длинноволновую область, $\lambda_{max} \approx 392$ нм. У отличающихся от кверцетина отсутствием одной гидроксильной группы кемпферола (при С3') и лютеолина (при С3), напротив, полоса 1 смещена в коротковолновую область, максимум поглощения у кемпферола ≈ 371 нм, а у лютеолина ≈ 365 нм. Особенно сильное смещение в коротковолновую область полосы 1 наблюдается у кризина ($\lambda_{max} \approx 329$ нм), молекула которого имеет только две гидроксильные группы, при С-5 и С-7. Таким образом, спектральные методы, особенно в сочетании с жидкостной хроматографией высокого давления, могут быть использованы для качественного анализа отдельных агликонов внутри групп флавонов и флавонолов. Так как индивидуальные различия в поглощении при λ_{max} у этих соединений относительно невелики, то для количественного определения флавонов и флавонолов может быть использован усредненный коэффициент молярной экстинкции. Например, для расчета содержания флавоноидов в метанольных растворах рекомендуют использовать значение $\epsilon = 14\,500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [14]. Для водных растворов флавонов и флавонолов усредненный коэффициент молярной экстинкции несколько больше, $\epsilon = 15\,800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Кроме полосы 1, в спектре поглощения флавонов и флавонолов выделяют полосу 2. Полоса 2 характеризуется интенсивным поглощением в области 240-285 нм. Сравнивая спектры поглощения, приведенные на рис. 2.2, можно видеть, что наличие или отсутствие гидроксильной группы при С-3, количество и положение гидроксильных групп в кольце В не влияет на положение максимума поглощения полосы 2. Для лютеолина, морина, кемпферола, кверцетина и его 3-гликозида рутина $\lambda_{max} \approx 268$ нм. Однако у этих соединений имеются значительные индивидуальные различия в интенсивности поглощения при λ_{max} (A_{max}). Поскольку величина A_{max} зависит и от концентрации флавоноида, она не может быть непосредственно использована при качественном анализе флавонов и флавонолов, однако с этой целью может быть использована безразмерная и не-

зависящая от концентрации величина $k_{2/1}$, равная отношению $A_{max}(\text{полоса 2})/A_{max}(\text{полоса 1})$. В табл. 2.2 приведены значения $k_{2/1}$ для некоторых флавоноидов.

В спектре поглощения дигидрофлавонолов (рис. 2.3) полоса 2 несколько смещена в длинноволновую область, а поскольку полоса 1 у этих соединений характеризуется противоположным по направлению сдвигом, то в результате полоса 2 у дигидрофлавонолов, в частности у таксифолина (дигидрокверцетина), представляет собой плечо на более выраженной полосе 1. У эпикатехина область поглощения полосы 2 также сдвинута в длинноволновую область и находится при 260-300 нм, $\lambda_{max} \approx 278$ нм (рис. 2.3), а ее интенсивность значительно

Таблица 2.2

Значения $k_{2/1}$, равные отношению $A_{max}(\text{полоса 2})/A_{max}(\text{полоса 1})$ для некоторых флавоноидов *

Флавоноид	$A_{max}(\text{полоса 2})/A_{max}(\text{полоса 1})$
Кверцетин	$1,02 \pm 0,041$
Рутин	$1,50 \pm 0,080$
Морин	$1,11 \pm 0,075$
Лютеолин	$1,26 \pm 0,090$
Кемпферол	$1,29 \pm 0,035$

* - Спектры поглощения флавоноидов регистрировали в 0,1 М фосфатном буфере pH 7,4 против растворителя.

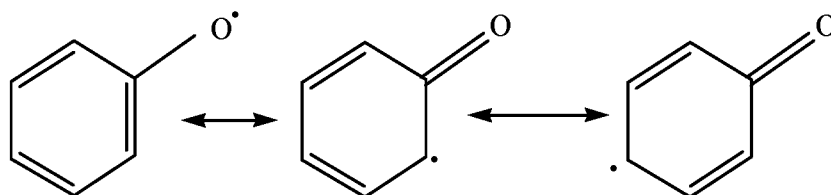
ниже, чем у флавонов и флавононов. Существует мнение, что поглощение флавоноидами УФ излучения в области полосы 2 происходит за счет кольца А ароматического ядра [15]. По-видимому, кольцо А, в определенной степени, действительно обуславливает возникновение полосы 2, но тот факт, что существуют значительные различия в ее положении и интенсивности у флавонола кверцетина, дигидрофлавонола таксифолина и эпикатехина, молекулы которых имеют одинаковые кольца А и Б и различаются только по степени окисленности кольца С, свидетельствует о существенном влиянии данного фактора на поглощение флавоноидами УФ-излучения.

Флавоноиды, благодаря своей полифенольной природе, имеют выраженные электронно-донорные свойства. Термодинамически, способность полифенолов восстанавливать различные сильно окисленные продукты и, в первую очередь, свободные радикалы обусловлена их низким восстановительным потенциалом (E_7). Для большинства флавоноидов E_7 лежит в диапазоне 0,25 – 0,75 в (табл. 2.3), тогда как значения восстановительного потенциала анион-радикала кислорода, алкоксильного, пероксильного и гидроксильного радикала значительно выше – 0,9-2,13 в

(табл.2.4). Благодаря такой высокой разнице в значениях восстановительного потенциала флавоноиды легко вовлекаются в одноэлектронные реакции с различными радикалами в соответствии с уравнением 2.1.



Характерной особенностью образующегося в результате реакции 2.1 ароксильного радикала Fl-O^\bullet является способность к делокализации [11], т.е. передвижению неспаренного электрона в ароматическое кольцо с образованием ряда резонансных структур:



Семихиноновый радикал Fl-O^\bullet может также реагировать с другим свободным радикалом с образованием стабильных хинонов.

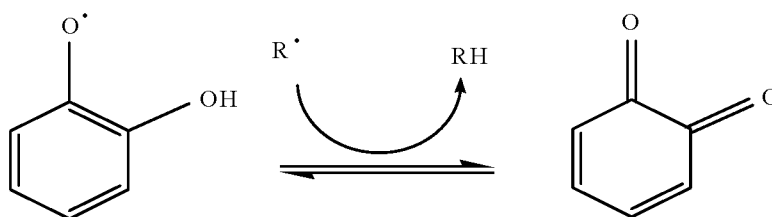


Таблица 2.3

Значения восстановительного потенциала (Fl-O^\bullet , $\text{H}^+/\text{Fl-OH}$) при pH 7,0 (E_7) и потенциала полувольты ($E_p/2$) для некоторых флавоноидов.

Флавоноид	E_7 (e)	$E_p/2$ (e)
Катехин	0,57 ^a	0,16 ^c
Эпигаллокатехин	0,42 ^a	
Эпигаллокатехин галлат	0,43 ^a	
Кверцетин	0,33 ^a ; 0,398 ^b	0,06 ^c
Рутин	0,60 ^a ; 0,295 ^b	0,18 ^c
Таксифолин	0,50 ^a	0,15 ^c
Лютеолин	0,60 ^a ; 0,299 ^b	0,18 ^c
Кемпферол	0,75 ^a ; 0,209 ^b	0,12 ^c
Гесперидин	0,72 ^a	

^a - [16] ^b - [17] ^c - [2]

Окисление флавоноидов сопровождается характерными изменениями в их спектрах поглощения. В частности, у флавонов и флавонолов в процессе окисления наблюдается выцветание и исчезновение полос 1 и 2, при этом в спектре поглощения флавонолов появляется новый максимум при 325 нм (полоса 3), который при дальнейшем окислении сначала уве-

личивается, а затем уменьшается и исчезает (рис. 2.4). Такой характер спектральных изменений позволяет сделать вывод, что при окислении флавонолов образуются промежуточный продукт или продукты, содержащие хромофор с максимумом поглощения при 325 нм. При окислении флавонов и 3-гликозидов флавононов, в частности лютеолина и рутина, образование промежуточных продуктов с максимумом поглощения при 325 нм не наблюдается (рис. 2.5).

Таблица 2.4

Значения восстановительного потенциала при рН 7,0 (E_7) и потенциала полуволны для некоторых окислительно-восстановительных пар.

Окислительно-восстановительная пара	E_7 (в)
$O_2^{\cdot-}, 2H^+ / H_2O_2$	0,94 ^a , 0,92 ^b
$HO_2^{\cdot}, H^+ / H_2O_2$	1,06 ^a
ПНЖК [•] , H^+ / ПНЖКН	0,60 ^b
$RO^{\cdot}, 2H^+ / ROH$	$\approx 1,6^a$
$ROO^{\cdot}, 2H^+ / ROOH$	0,77-1,44 ^a
$HO^{\cdot}, H^+ / HO$	2,31 ^a

^a - [5]; ^b - [18]; ^b - [2]

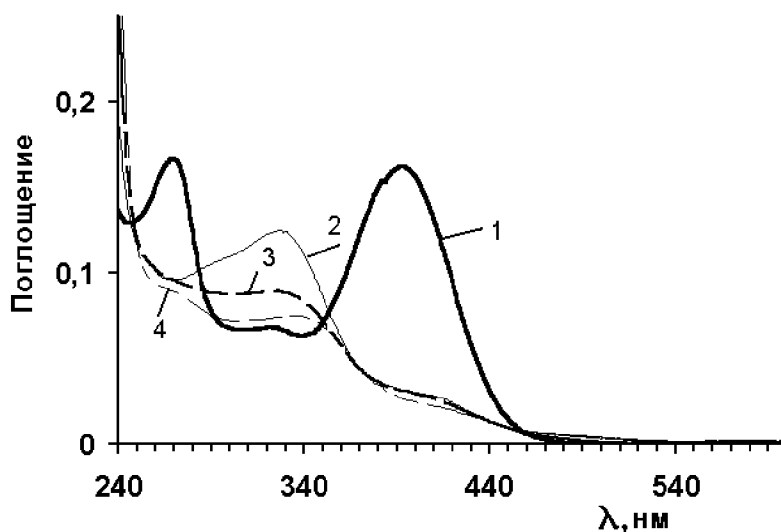


Рис. 2.4 Типичные спектральные изменения при окислении флавонолов

1 – исходный спектр поглощения морина (10 мкМ); 2,3,4 - спектры поглощения морина после добавления 50, 100, 150 мкМ пероксинитрата.

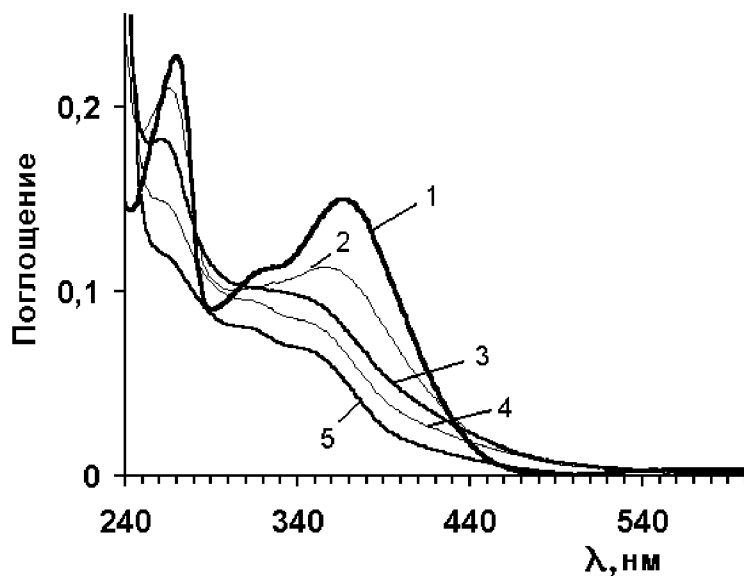


Рис. 2.5 Типичные спектральные изменения при окислении флавонол-гликозидов и флавонов

1 – исходный спектр поглощения рутина (10 мкМ); 2,3,4,5 - спектры поглощения рутина после добавления 50, 100, 150 и 200 мкМ пероксинитрита.

Описанные выше спектральные изменения, а именно исчезновение полос 1 и 2 и появление хромофора с максимумом при 325 нм, наблюдаются при окислении флавонолов самыми различными оксидантами, например, при окислении кверцетина пероксинитритом (рис. 2.6, а), миелопероксидазой в присутствии пероксида водорода (рис. 2.6, б), анион-радикалом кислорода в рибофлавин-содержащей фотосистеме (рис. 2.6, в) и при автоокислении кверцетина (рис. 2.6, г). Различие в действии данных оксидантов заключается в том, что при фото- и автоокислении хромофор с максимумом при 325 нм является конечным продуктом реакции, тогда как при окислении кверцетина пероксинитритом и МПО – это промежуточный продукт, подвергающийся дальнейшему окислению.

Кроме спектральных изменений в области полос 1 и 2, окисление флавонов и флавононов сопровождается появлением полосы поглощения в красной области спектра (500-600 нм), однако величины спектральных изменений в этом случае на порядок ниже, чем спектральные изменения в УФ и желтой области спектра.

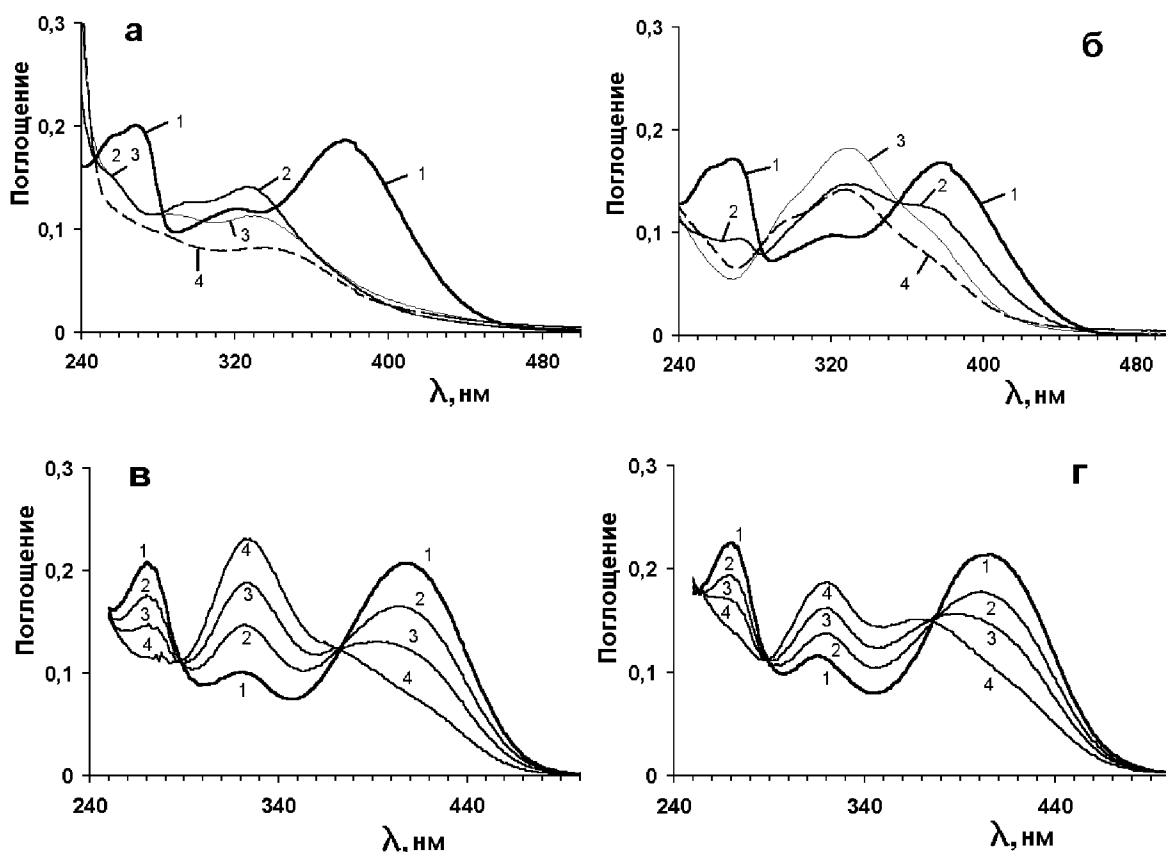


Рис. 2.6 Спектральные изменения при окислении кверцетина пероксинитритом в ФБ, рН 7,4 (а), миелопероксидазой в присутствии пероксида водорода в ФБ, рН 7,4 (б), анион-радикалом кислорода в рибофлавин-содержащей фотосистеме в ФБ+ТМЕДА, рН 10 (в) и автоокислении в ФБ+ТМЕДА, рН 10 (г)

1 – исходный спектр поглощения кверцетина (10 мкМ); 2,3,4 - спектры поглощения кверцетина: а - после добавления 50, 100, 150 мкМ пероксинитрита; б – через 3, 9 и 30 мин окисления; в- через 1,5, 3 и 6 мин окисления; г - через 10, 20 и 40 мин окисления

Характерные спектральные изменения наблюдаются и при окислении других классов флавоноидов. Так, при окислении дигидрофлавонолов уменьшается и исчезает полоса 1 и появляется новая полоса поглощения в области 350-450 нм (рис. 2.7 а, б). При окислении катехинов, растворы которых не окрашены и поглощают только УФ излучение в области 260-300 нм, появляется полоса поглощения в видимой области спектра с максимумом при 430 нм и плечом при 480 - 520 нм (рис. 2.8 а, б).

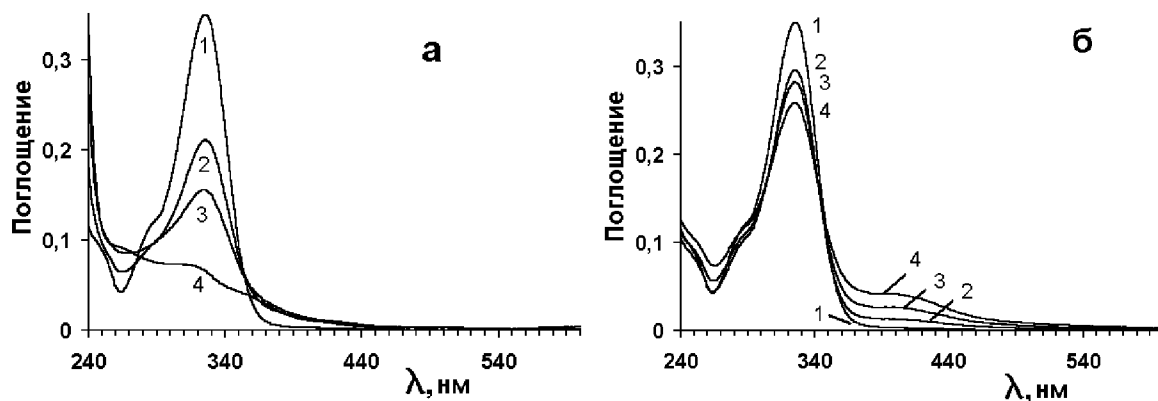


Рис. 2.7 Спектральные изменения при окислении дигидрокверцетина (таксифолина) пероксинитритом в ФБ, рН 7,4 (а), миелопероксидазой в присутствии пероксида водорода и нитрит-ионов в ФБ, рН 7,4 (б)

1 – исходный спектр поглощения дигидрокверцетина (10 мкМ); 2,3,4 - спектры поглощения кверцетина: а - после добавления 50, 100, 150 мкМ пероксинитрита; б – через 6, 15 и 45 мин окисления;

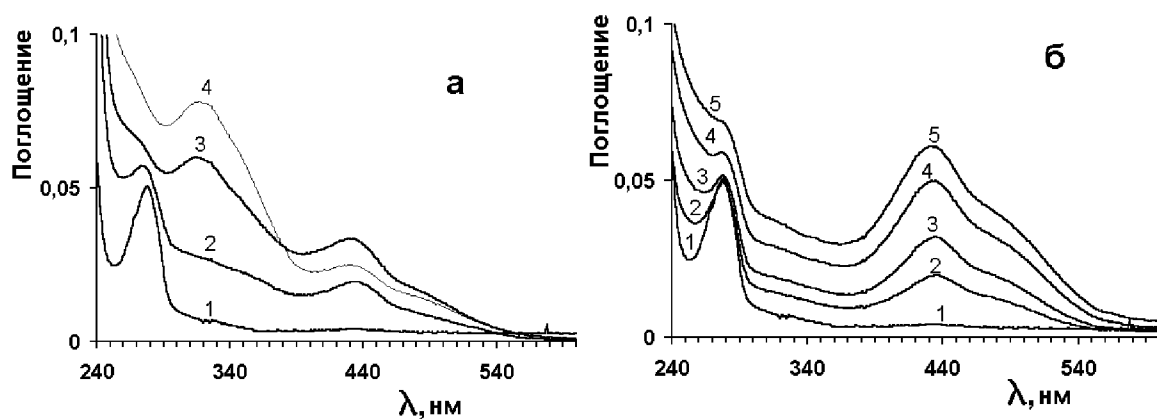


Рис. 2.8 Спектральные изменения при окислении эпикатехина пероксинитритом в ФБ, рН 7,4 (а), миелопероксидазой в присутствии пероксида водорода в ФБ, рН 7,4 (б)

1 – исходный спектр поглощения эпикатехина (10 мкМ); а) 2,3,4 - после добавления 50, 100, 150 мкМ пероксинитрита; б) 2,3,4,5 - через 3, 6, 15 и 45 мин окисления;

Сходные спектральные изменения, наблюдающиеся при окислении флавоноидов различными оксидантами, указывают, что данные оксиданты, по-видимому, воздействуют на одни и те же мишени в ароматической структуре флавоноидов. Другими словами, в структуре флавоноидов имеются определенные заместители, а именно: определенные гидроксильные группы, наиболее легко окисляющиеся при воздействии самых различных агентов с низким восстановительным потенциалом. Селективное (избирательное) окисление по этим группам ведет к образованию

близких по структуре и спектральным свойствам продуктов окисления. Имеются убедительные экспериментальные данные, позволяющие сделать вывод о том, что у большинства флавоноидов первичной мишенью для различных оксидантов являются гидроксильные, (катехольные) группы кольца В [16, 19]. При окислении этих групп образуются короткоживущие семихиноновые анион-радикалы и далее соответствующие орто-хиноны [16, 19]. По-видимому, в результате окисления катехольной группы кольца В увеличивается поглощение в красной области спектра (500-600 нм) у флавонов и флавонолов и в УФ-области спектра у катехинов и дигидрофлавонолов [16]. Однако катехольная группа кольца В – не единственная возможная мишень действия различных оксидантов. Выше указывалось, что окисление агликонов флавонолов, вне зависимости от наличия в кольце В катехольной группы, приводит к появлению промежуточных продуктов, содержащих хромофор с максимумом поглощения при 325 нм. Тот факт, что при окислении флавонов и 3-гликозидов флавонолов, в молекулах которых гидроксильная группа при С-3 отсутствует или замещена, образование таких продуктов не наблюдается, позволяет заключить, что гидроксильная группа в положении С-3 может вовлекаться в сложный процесс внутримолекулярных превращений, инициируемых атакой оксидантов на гидроксильные группы кольца В [16]. Возможный механизм таких превращений приведен на рис. 2.9.

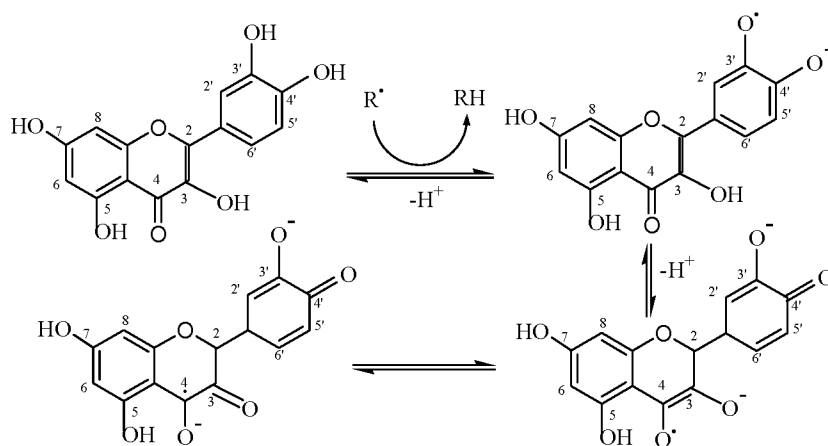


Рис. 2.9 Возможный механизм внутримолекулярных превращений, инициируемых радикальной атакой на катехольную группу кольца В.

Не исключено, что гидроксильная группа в положении С-3 является и первичной мишенью редокс-активных агентов, о чем свидетельствуют результаты исследования автоокисления флавонов и флавонолов. Так, показано, что кверцетин легко окисляется в сильно щелочной среде (рН 10), содержащей N,N,N',N' -тетраметилэтилендиамин (ТМЕДА). Реакция сопровождается типичными спектральными изменениями, харак-

терными для окисления кверцетина различными агентами (см. рис. 2.6 г). В то же время рутин, С-3 гликозид кверцетина, и лютеолин, отличающийся от кверцетина только отсутствием гидроксильной группы при С-3, в тех же условиях практически не окисляются [20]. Аналогичные результаты были получены при исследовании окисления флавоноидов, инициируемого ионами металлов в нейтральной среде. Оказалось, что только флавонол-агликоны, т.е. флавоноиды, имеющие свободную гидроксильную группу при С-3, но не флавонол-гликозиды и флавоны, окисляются при физиологических значениях рН в присутствии микромолярных концентраций ионов двухвалентной меди [15].

Поскольку гидроксильные группы фенолов и полифенолов способны к диссоциации, эти соединения являются слабыми органическими кислотами. Значения pK_a для фенольных соединений варьируются в широком диапазоне от 3,46 у морина [21] до 9,34 у пирокатехина и 10,0 у фенола [22]. Такая вариабельность связана с тем, что включение дополнительных заместителей в ароматическое ядро существенно влияет на степень диссоциации гидроксильных групп. Например, включение двух нитрогрупп (NO_2) в положение С-2 и С-4 фенола резко усиливает способность гидроксильной группы к ионизации ($pK_a=4,1$) и делает данный динитрофенол более сильной кислотой, чем уксусная [11]. Большинство флавоноидов имеют pK_a ниже 7 и при физиологических значениях рН находятся преимущественно в диссоциированной форме. Диссоциировать может не одна, а несколько гидроксильных групп в молекуле флавоноида. Константы диссоциации, характеризующие ионизацию каждой отдельной гидроксильной группы, называют микроскопическими и обозначают соответственно pK_1, pK_2, \dots, pK_n . Выяснение вопроса о том, какие конкретно гидроксильные группы в молекуле полифенола характеризуются теми или иными значениями pK_a , представляет собой весьма сложную экспериментальную задачу и решается с использованием методов ядерного магнитного резонанса (ЯМР) [19]. Исследуя сдвиги в ^{13}C ЯМР спектре при депротонировании отдельных гидроксильных групп в молекулах флавоноидов, было показано, что степень их диссоциации возрастает в следующей последовательности 5-ОН < 4'-ОН < 7-ОН [23]. Однако морин является исключением из этого правила. В его молекуле наиболее легко диссоциирует гидроксильная группа в положении 2' [23]. По-видимому, это обстоятельство и обуславливает аномально низкое значение pK_a для этого флавоноида – 3,46. Диссоциация окрашенных флавоноидов с образованием соответствующих анионов – фенолятов – приводит к характерным изменениям и в спектрах поглощения. Например, ионизация флавонов и флавонолов при повышении рН буферного рас-

твора сопровождается длинноволновым сдвигом полосы 1 (рис. 2.10). Поэтому спектрофотометрическое титрование также может быть использовано для определения pK_a полифенолов. Однако в этом случае получают только так называемые макроскопические pK_a , или константы отдельных стадий титрования, которые не могут быть соотнесены к диссоциации конкретных гидроксильных групп.

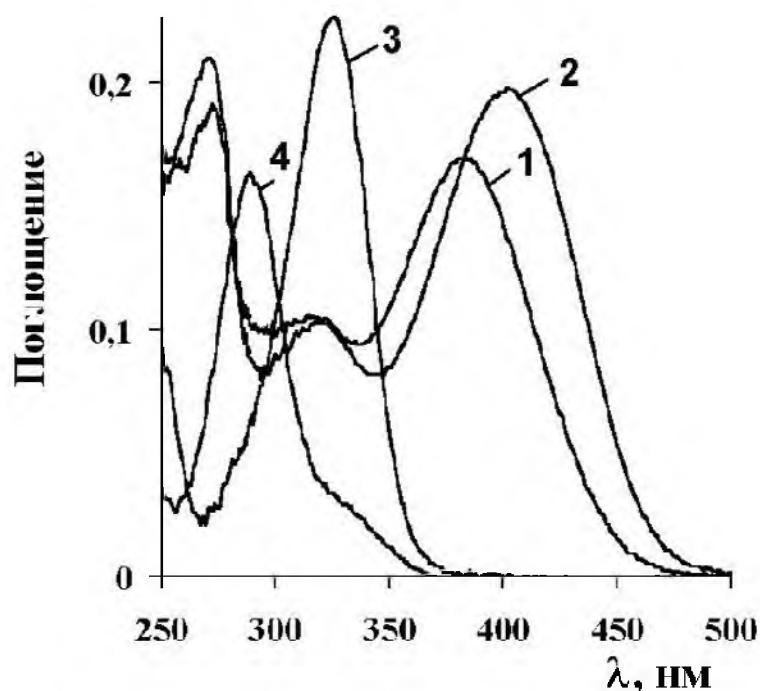


Рис.2.10 Спектры поглощения кверцетина (1,2) и таксифолина (3,4) при различных значениях pH буферного раствора
1,3 – pH 7,4; 2 – pH 9; 4 – pH 5.

Помимо рассмотренных выше восстановительных и кислотных свойств, гидроксильные группы обуславливают способность флавоноидов связывать ионы металлов, образуя хелатные комплексы. Благодаря своим хелатирующим свойствам, полифенолы могут влиять на сорбцию металлов в процессе питания у человека и животных и воздействовать на баланс металлов в организме и клеточный окислительный статус [5, 24]. Образование комплексов с ионами металлов существенно изменяет спектральные характеристики окрашенных флавоноидов, и это обстоятельство играет важную роль в живой природе, обуславливая наличие разнообразной окраски у высших растений. Так, например, лепестки всем известных цветов василька и пурпурно-красной розы имеют практически одинаковый состав основных антоцианидинов. Однако в лепестках розы антоцианидины, большинство которых обладает характерным красным цветом, находятся в свободном состоянии, тогда как в цветках василька

те же лиганды содержатся уже не в свободном виде, а образуют с ионами железа устойчивые хелатные комплексы, имеющие интенсивно-голубой цвет [25, 26].

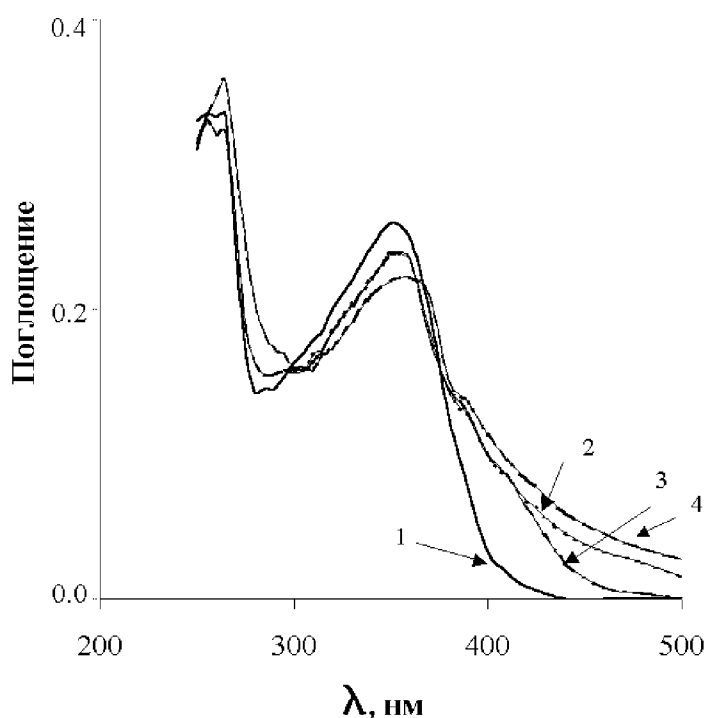


Рис. 2.11 Характерные спектральные изменения при образовании комплексов флавонов и флавонолов с ионами металлов

1 – исходный спектр поглощения рутина (15 мкМ) в 0,9 % NaCl, 2, 3, 4 – спектр поглощения через 5 мин после добавления эквимольных количеств ионов соответственно Fe^{2+} , Fe^{3+} или Cu^{2+} .

Флавоны, флавонолы и их гликозиды (кверцетин, рутин, кемпферол) взаимодействуют с Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , при длительной экспозиции – с Mn^{2+} [24, 27, 28], при этом происходит увеличение длины волны поглощения полосы 1, так называемый батохромный эффект (рис. 2.11). То, что именно процесс комплексообразования обуславливает батохромный эффект, подтверждается методом конкурентного замещения, основанном на способности сильных хелаторов вытеснять менее эффективные в отношении комплексообразования лиганды из их комплексных соединений. Так, добавление двукратного избытка ЭДТА, одного из наиболее сильных хелаторов ионов переходных металлов, к раствору комплекса рутина с ионами Fe^{2+} приводит к практически полному восстановлению исходных спектров поглощения рутина уже через две минуты после добавления (рис. 2.12 а). Аналогичные результаты получаются и при добавлении двукратного избытка ЭДТА к растворам комплексов рутина с

ионами Cu^{2+} и Fe^{3+} . Метод конкурентного замещения может быть использован и для сравнительной оценки эффективности хелаторного действия различных флавонолов. Например, кверцетин, в отличие от рутина, практически не вытесняется из комплекса с Fe^{3+} двукратным избытком ЭДТА (рис. 3.12 б), что позволяет отнести кверцетин к наиболее сильным хелаторам трехвалентного железа среди флавоноидов.

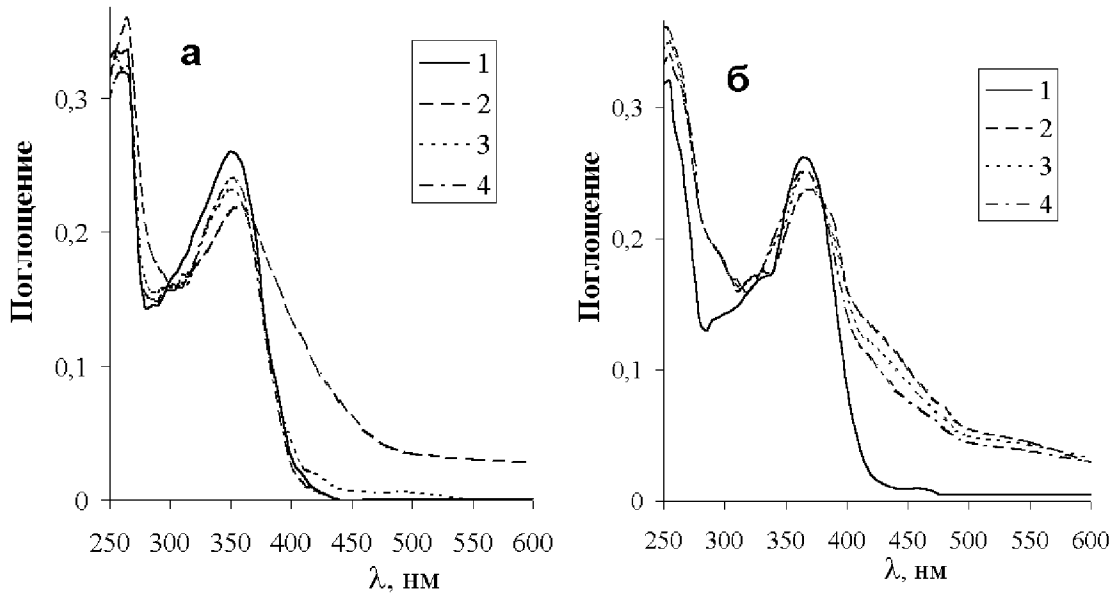


Рис. 2.12 Эффект ЭДТА (30 мкМ) на металлокомплексы рутина (а) и кверцетина (б)

1 – исходный спектр поглощения флавоноида (15 мкМ) в 0,9 % NaCl, 2, – спектр поглощения через 5 мин после добавления эквимольных количеств ионов Fe^{2+} , 3, 4 – тоже, что и 2 через 2 и 5 мин после добавления ЭДТА.

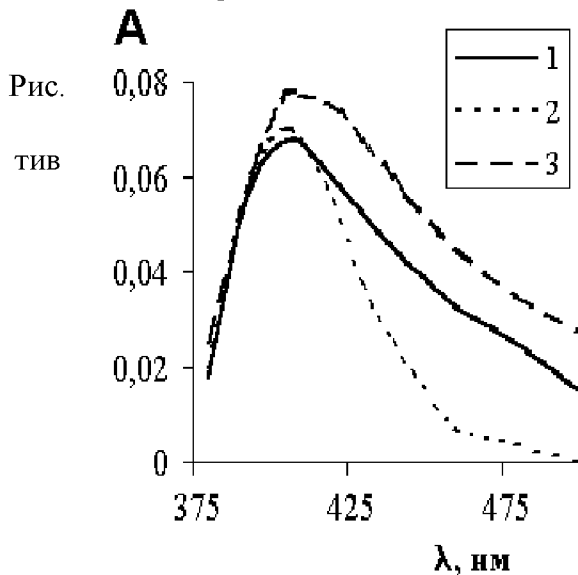


Рис. 2.13

Спектры поглощения комплексов рутина с Fe^{2+} (1), Cu^{2+} (2) и Fe^{3+} (3), раствора свободного лиганда (разностные спектры)

Количественно спектральные изменения при образовании комплексов флавонолов с металлами могут быть охарактеризованы величиной ΔA_{max} , равной разности между поглощением флавонола и поглощением его металлокомплекса при длине волны,

соответствующей максимуму разностного спектра (спектра поглощения раствора металлокомплекса против раствора свободного лиганда). На-

пример, у рутина величина спектральных изменений при образовании комплексов с ионами Cu^{2+} , Fe^{2+} и Fe^{3+} может быть определена при 410 нм – ΔA_{410} (рис. 2.13).

Исследуя зависимость величины ΔA_{410} от относительного содержания различных металлов в комплексе металл:рутин в диапазоне соотношений металл : флавоноид от 0,25:1 до 2:1, можно видеть, что для комплексов рутина с ионами Cu^{2+} , Fe^{2+} и Fe^{3+} величина ΔA_{410} увеличивается с ростом относительного содержания металла в комплексе во всем исследованном диапазоне (рис. 2.14). Эти результаты свидетельствуют о возможности образования не только "клевшевидных" металлокомплексов рутина (соотношение металл : флавоноид = 1:2), но и комплексов, в которых на одну молекулу флавоноида приходится один и даже два и больше ионов металла. Такой вывод вполне согласуется с современными представлениями о механизме хелатирующего действия флавоноидов, в соответствии с которыми считают, что главную роль в хелатировании играет катехольная группа кольца В. Вместе с тем, ионы металлов могут связываться и при участии 4 окси- и 5 и 3 гидроксигрупп колец А и С (рис. 2.15) [2]. Комплексы рутина с металлами в соотношении металл : флавоноид = 1:2 и 1:1 достаточно устойчивы, и их спектр не изменяется на протяжении как минимум 12 часов [27]. Стабильность спектров металлокомплексов рутина свидетельствует также и о том, что лиганд в данных комплексах устойчив к окислению.

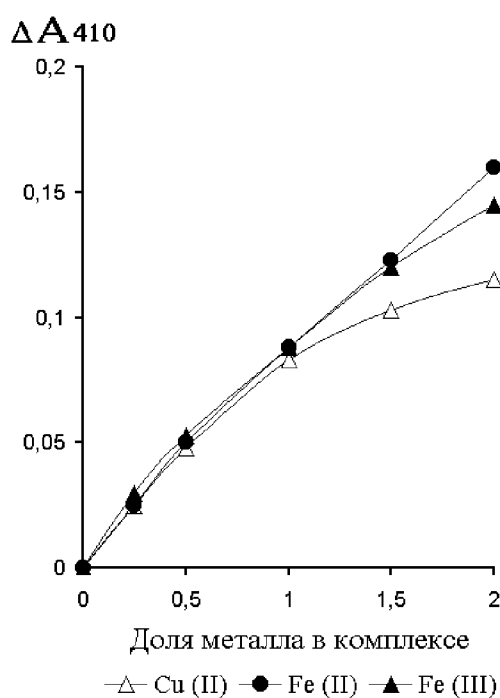


Рис. 2.14 Величины спектральных изменений (ΔA_{410}) при образовании металлокомплексов рутина различной стехиометрии

Взаимодействие дигидрофлавонолов и катехинов с ионами металлов не сопровождается выраженными спектральными изменениями. Однако и в этом случае спектрофотометрия в сочетании с методом конкурентного замещения может быть использована для исследования хелатирующих свойств флавоноидов. В таких экспериментах оценивается способность бесцветных полифенолов

вытеснять флавонолы, в частности рутин, из его комплексов с ионами различных металлов. Относительная эффективность хелатирующего действия флавоноида может быть охарактеризована величиной % вытеснения (уравнение 2.2):

$$\% \text{ вытеснения} = (A_{410} - A_{410}^*) : A_{410} \times 100 \quad (2.2)$$

где A_{410} – поглощение при 410 нм в разностном спектре поглощения: металлокомплекс рутина против рутина;

A_{410}^* – поглощение при 410 нм в разностном спектре поглощения: металлокомплекс рутина + исследуемый флавоноид, против рутина + исследуемый флавоноид.

Таблица 2.5

Эффективность вытеснения (%) некоторыми флавоноидами рутина из его комплексов (1:1) с ионами переходных металлов

Комплекс, 15 мкМ	Флавоноид	
	Дигидрокверцетин, 30 мкМ	ЭГКГ, 30 мкМ
Рутин - Cu^{2+}	50 ± 4	57 ± 5
Рутин - Fe^{2+}	< 5	10 ± 3
Рутин - Fe^{3+}	< 5	86 ± 6

Оказалось, что при равных концентрациях дигидрокверцетин вытеснял рутин из его комплекса с медью (1:1) почти на 25 %, а при двукратном избытке дигидрокверцетин вытеснял рутин на 50 %. В то же время дигидрокверцетин, даже при двукратном избытке, незначительно (менее чем на 5 %) вытеснял рутин из комплексов с Fe^{2+} и Fe^{3+} . ЭГКГ при двукратном избытке эффективно вытеснял рутин из его комплексов с Cu^{2+} и Fe^{3+} , и незначительно (на 10 %) вытеснял рутин из его комплекса с Fe^{2+} (табл. 2.5).

Используя метод конкурентного замещения, было показано [29, 30], что способность к комплексообразованию для некоторых распространенных флавоноидов можно охарактеризовать следующим образом:

Металл	Способность флавоноидов к комплексообразованию
Fe^{2+}	Кверцетин > рутин >> ЭКГ=ЭГКГ > дигидрокверцетин
Fe^{3+}	Кверцетин > ЭГКГ = ЭКГ > рутин >> дигидрокверцетин
Cu^{2+}	Рутин > ЭГКГ = ЭКГ = дигидрокверцетин

Флавоноиды и, в частности, те из них, которые обладают Р витаминной активностью (рутин, кверцетин, эпикатехин, гесперидин и др.) относят к водорастворимым соединениям. Однако следует отметить, что растворимость флавоноидов в воде очень сильно различается. Об этом свидетельствуют коэффициенты распределения некоторых флавоноидов в системе октанол/вода, приведенные в табл.2.6.

Таблица 2.6

Коэффициент распределения ($k_{рас}$) некоторых флавоноидов в системе октанол/вода [15]

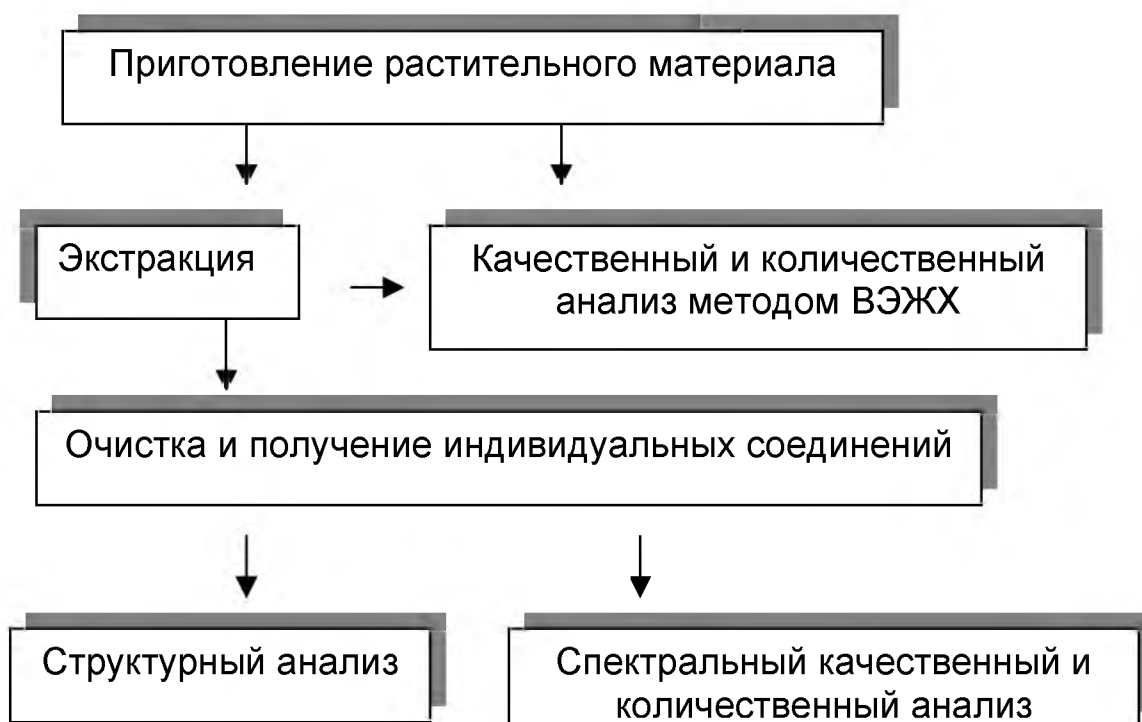
Флавоноид	$k_{рас}$
Рутин	$0,37 \pm 0,06$
Кверцетин	$1,2 \pm 0,13$
Лютеолин	$22,2 \pm 2,5$
Кемпферол	$69,5 \pm 1,32$

Как следует из таблицы, флавоноид-агликоны в большей степени являются гидрофобными, чем гидрофильными соединениями. Даже растворимость кверцетина, у которого в молекуле пять гидроксильных групп, в воде весьма ограничена. Лютеолин и кемпферол, молекулы которых имеют только на одну гидроксильную группу меньше, чем молекула кверцетина, в воде уже практически нерастворимы. Несколько лучше растворяются в воде флавоноид-гликозиды. Так, 1 г рутина растворяется в 8 л, а гесперидина – в 50 л H_2O .

Все флавоноиды достаточно хорошо растворяются в спиртах. 1 г кверцетина можно растворить в 290 мл абсолютного этилового спирта. При нагревании растворов растворимость флавоноидов значительно увеличивается. Например, 1 г рутина можно растворить в 200 мл кипящей воды или в 7 мл кипящего метанола, а грамм кверцетина – в 23 мл кипящего этанола [31]. Очень хорошими растворителями для большинства флавоноидов являются диметилсульфоксид (ДМСО), диметилформамид (ДМФА) и метилгликоль. В практике научных исследований эти растворители обычно используют для приготовления концентрированных растворов (0,1 М) флавоноидов. Флавоноиды в таких растворах достаточно устойчивы, и даже раствор кверцетина, одного из наиболее легко окисляемых флавоноидов, можно хранить при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течении нескольких месяцев без заметного изменения его спектральных характеристик. Следует отметить, что коммерческие растворители, особенно метилгликоль, содержат следовые количество примесей и продуктов окисления, способных вступить в окислительно-восстановительные реакции с флавоноидами. В концентрированных растворах последствия таких реакций незначительны, но при низких концентрациях флавоноидов доля окислительных молекул может быть достаточно большой. Поэтому следует избегать использования метилгликоля для приготовления разбавленных растворов флавоноидов (0,1 мМ и меньше), а если такая необходимость возникла, обязательно оценить состояние флавоноидов в таком растворе с помощью УФ и видимой спектроскопии.

2.3 Краткий обзор методов получения и анализа флавоноидов

Методы получения и анализа флавоноидов достаточно детально изложены в ряде руководств и обзоров [32, 33]. Поэтому в данном разделе основное внимание будет уделено рассмотрению общих вопросов, относящихся к препаративной и аналитической химии флавоноидов. При изложении материала данного раздела целесообразно разделить флавоноиды на три большие группы, существенно различающиеся по условиям экстрагирования из растительного материала и последующей очистки: полярные флавоноид-гликозиды (1), менее полярные флавоноид-агликоны (2) и окрашенные в красный цвет гликозиды антоцианидинов – антоцианы (3). Получение и анализ флавоноидов, относящихся ко всем указанным выше группам, включает следующие основные этапы:



Приготовление растительного материала. Среди флавоноидов есть достаточно нестойкие соединения, кроме того, в сыром растительном материале флавоноиды могут быстро разрушаться под действием различных ферментов. Поэтому максимальную сохранность обеспечивает сушка предварительно размолотых замороженных образцов. Если растительный материал подготавливается для количественного анализа флавоноидов, то желательна его мгновенная заморозка в жидком азоте. Полученный таким образом сухой порошок следует хранить до использования в холодильнике в герметичной упаковке. Если растительный материал не предполагается использовать для анализа или получения антоциа-

нов или танинов, допускается его сушка при 100 °С [14]. Сушка на воздухе является наименее приемлемым вариантом, поскольку в этом случае высока вероятность ферментативной деградации флавоноидов, например превращения гликозидов в агликоны.

Экстракция. Для экстракции может использоваться как предварительно подготовленный материал (высушенный порошок), так и свежеприготовленные измельченные листья, лепестки, ягоды или любые другие части растения. Существующие различия в растворимости флавоноидов определяют и различия в растворителях, которые используются для их экстракции из растительного материала [14]. Флавоноид-гликозиды обычно легко экстрагируются смесью метанол:вода (70:30), хотя для экстракции антоцианов лучше использовать растворители, закисленные муравьиной или уксусной кислотой, например метанол:вода:ацетат (70:23:7). Менее полярные флавоноид-агликоны экстрагируют органическими растворителями, такими как эфир или этилацетат. Для экстракции процианидинов (танинов) используют ацетон или смесь ацетона с водой.

Качественный и количественный анализ с использованием ВЭЖХ. Смесью флавоноидов, экстрагированных из цветочных лепестков, окрашенных чашелистиков и другого растительного материала с высоким содержанием анализируемых продуктов может быть непосредственно использована для качественного и количественного анализа методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Экстракты из листьев и других зеленых частей растения требуют предварительного удаления хлорофилла и по возможности дополнительного фракционирования методом тонкослойной или колоночной хроматографии. Система ВЭЖХ должна быть укомплектована устройством для создания как минимум бинарного градиента, УФ/видимым быстро сканирующим детектором, желательным на фотодиодной матрице, позволяющим регистрировать УФ/видимый спектр поглощения каждого пика в режиме On Line. Анализ результатов ВЭЖХ, основанный на сравнении времени удержания и спектра поглощения каждого пика с известными стандартами, позволяет достаточно точно определять состав исследуемого образца. Однако следует иметь в виду, что основной параметр ВЭЖХ – время удержания – даже при проведении анализа, казалось бы, в совершенно одинаковых условиях, может в разных лабораториях достаточно сильно различаться. Поэтому при проведении систематических аналитических исследований растительных материалов целесообразно создать собственную библиотеку данных о времени удержания наиболее распространенных флавоноидов, используя для этого коммерческие стандарты.

Наибольшее распространение при анализе флавоноидов в настоящее время получила обращенно-фазная ВЭЖХ. Как правило, в этом случае используют колонки RP-C₈ или RP-C₁₈, размером 4,5 (4,6) мм x 125 или 250 мм, размер зерен сорбента 5-7 мкм или меньше. В зависимости от анализируемого материала в качестве элюента используются градиенты на основе воды, метанола и уксусной кислоты; уксусной кислоты и ацетонитрила или тетрагидрофурана; муравьиной кислоты и метанола; уксусной кислоты, ацетонитрила, фосфорной кислоты и воды [14, 34]. Недавно для высокоэффективной жидкостной хроматографии экстрактов лекарственных растений предложены системы растворителей, позволяющие проводить анализ в режиме изократического элюирования [1]. Авторы успешно использовали систему 2-пропанол:тетрагидрофуран:вода для разделения гликозидов и 1-пропанол:тетрагидрофуран:лимонная кислота для разделения агликонов.

Очистка и получение индивидуальных соединений. Для очистки растительных экстрактов и получения индивидуальных соединений с целью изучения их структуры и биологической активности можно также применять метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, а именно так называемую полупрепаративную ВЭЖХ. В этом случае для разделения флавоноидов используют колонки больших размеров и более высокую скорость элюции, чем при аналитической работе. Еще одной особенностью полупрепаративной ВЭЖХ является ограниченное использование в элюирующих системах нелетучих растворителей. Это связано с тем обстоятельством, что производительность полупрепаративных колонок сравнительно невелика, и чтобы получить очищенное вещество в достаточном количестве, его необходимо "нарабатывать", т.е. многократно вводить в хроматограф новые порции растительного экстракта; полученные фракции, содержащие очищенный флавоноид, объединять, а затем упаривать в ротормном испарителе. Чтобы упростить процедуру упаривания и концентрации очищенного вещества, следует, по возможности, использовать элюирующие системы на основе летучих органических растворителей. Других принципиальных различий между аналитической и полупрепаративной ВЭЖХ, по-видимому, нет. Полупрепаративная ВЭЖХ обычно проводится на завершающей стадии очистки после удаления примесей различных углеводов и предварительного разделения общей фракции флавоноидов на основные группы. Для очистки водно-спиртовых растительных экстрактов от углеводов часто используют колонки с крупносетчатыми пористыми синтетическими сорбентами, называемых смолами, например амберлит-ХАД [34], а для предварительного фракционирования можно использовать колонки с полиамидом

или сефадексом LH-20 [35, 36]. Сефадекс LH-20 позволяет разделять органические вещества не только по их молекулярному размеру, но и в зависимости от способности сорбата образовывать с сорбентом водородные связи, а значит, и числа гидроксильных групп в молекулах флавоноидов. Во многих случаях необходимая степень очистки индивидуальных флавоноидов может быть достигнута в результате колоночной хроматографии на этом сорбенте, без дополнительного использования ВЭЖХ. Для очистки небольших количеств (миллиграммы) различных флавоноидов может быть также использована тонкослойная и бумажная хроматография [37].

Спектральный качественный и количественный анализ. Полученные в результате очистки растительных экстрактов индивидуальные флавоноид-агликоны могут быть количественно охарактеризованы с помощью УФ и видимой спектрофотометрии. Спектральные методы целесообразно также использовать для идентификации основных классов флавоноидов и качественного анализа агликонов внутри групп флавонов и флавонолов. Теоретические основы количественного и качественного спектрофотометрического анализа флавоноидов достаточно подробно были изложены в разделе "Физико-химические свойства".

Структурный анализ. Структурный анализ отдельных флавоноидов в качестве первого этапа включает их деградацию до более простых продуктов, например агликонов, сахаров, ацилирующих агентов и т.д. Наиболее часто деградацию флавоноидов проводят посредством кислотного, щелочного или ферментативного гидролиза [14]. Кислотный гидролиз позволяет разделить флавоноид-гликозиды на соответствующие агликоны и сахара. Реакцию обычно проводят в 2 N HCl или 2 N HCl + метанол (1:1) при температуре 100 °C. Для полного гидролиза необходимо от 5 до 120 мин, в зависимости от состава гидролизуемого материала. Частичный гидролиз проводят в более щадящих условиях (например, в 0,2 M HCl). Щелочной гидролиз используют для удаления ацильных групп из ацилированных гликозидов и обычно проводят при комнатной температуре в 2 M NaOH. В этих условиях полный гидролиз проходит за 2 часа. Поскольку флавоноиды легко окисляются в щелочной среде, необходимым условием щелочного гидролиза является создание анаэробных условий, например путем барбатирувания реакционной среды азотом. Флавоноид-гликозиды, образующиеся в результате щелочного гидролиза из ацилированных гликозидов, подвергают затем кислотному гидролизу. В последние годы возрос интерес исследователей к методам ферментативного расщепления флавоноидов. Преимуществом ферментативного гид-

ролиза является короткое время реакции, мягкие условия ее проведения и избирательное отщепление конкретных заместителей в конкретных положениях. Недостаток, ограничивающий распространение данного метода, – высокая стоимость и небольшой выбор гидролизующих ферментов, обладающих достаточной степенью очистки и высокой специфичностью.

Образующиеся в результате гидролитической деградации агликоны, сахара, ацилирующие агенты и другие продукты разделяют и подвергают последующему анализу с помощью методов спектрофотометрии, тонкослойной и бумажной хроматографии. Идентификацию полученных фрагментов проводят, сравнивая их спектральные свойства и хроматографическое поведение с имеющимися коммерческими стандартами. При необходимости, например отсутствию соответствующих стандартов, для выяснения структуры продуктов деградации флавоноидов используют методы ядерного магнитного резонанса и масс-спектроскопии.

2.4 Биологическая активность флавоноидов.

Со времени публикации в середине 30-х годов прошлого века первых работ, касающихся биологической активности флавоноидов, в этой области выполнено огромное количество исследований и опубликованы тысячи экспериментальных и обзорных статей. Установлено, что флавоноиды обладают выраженными антиаллергическими, антиканцерогенными, противовоспалительными и противовирусными свойствами. Наиболее убедительно свидетельствуют о важной биологической роли флавоноидов в организме эпидемиологические исследования. Показано, что включение в диету пожилых людей продуктов с высоким содержанием флавоноидов (яблоки, лук, чай) приводило к снижению встречаемости коронарной болезни сердца. Выявлено также, что флавоноиды зеленого чая снижают риск сердечно-сосудистых заболеваний и уменьшают смертность от рака желудка. Особенно возрос интерес к флавоноидам в последнее время в связи с так называемым "французским парадоксом", суть которого заключается в необычно низком уровне сердечно-сосудистых заболеваний у жителей ряда областей Франции, несмотря на наличие факторов (высокое потребление жиров, курение), провоцирующих сердечно-сосудистые болезни. Оказалось, что объясняется этот феномен значительным потреблением населением этих областей красного вина, содержащего большое количество различных полифенолов. Фундаментальные и прикладные исследования природных полифенолов послужили основой для создания целой области фармацевтической индустрии, выпускающей сотни наименований лекарственных препаратов, пищевых и биологически активных добавок (БАД), основным компонентом

которых являются флавоноиды. Именно в сфере лечебного использования флавоноидов традиционная медицина особенно близко сомкнулась с имеющими тысячелетнюю историю восточными системами лечения, основанными на использовании лекарственных растений.

Одной из особенностей биологического действия флавоноидов является чрезвычайно широкий спектр потенциальных мишеней, на которые они могут воздействовать в организме. С одной стороны, это связано с большим разнообразием самих растительных пигментов, как в отношении их структуры, так и редокс-свойств. Вместе с тем, и каждый конкретный флавоноид способен воздействовать на множество структурных и функциональных систем клетки и организма в целом. В качестве примера можно указать на кверцетин, один из наиболее распространенных и исследованных флавоноидов. Показано, что кверцетин является ингибитором протеинкиназы C [38], митоген-активируемой протеинкиназы (МАР-киназы) [39], фосфолипазы A₂ [40], Mg²⁺-АТФ-азы [41], Ca²⁺-АТФ-азы [42, 43], обратной транскриптазы [44], HIV-1-протеиназы [45], HIV-1-интегразы [46], орнитиндекабоксилазы [47], глутатион-S-трансферазы *in vitro* [48], (но активирует этот фермент *in vivo* [49]), глиоксалазы [50], ксантиндегидрогеназы [51], эстрогенсинтетазы [52], альдозредуктазы [53], малатдегидрогеназы [54], лактатдегидрогеназы и пировуваткиназы [55], 11-β-оксистероиддегидрогеназы [56], ДНК и РНК полимераз [57], различных изоформ NO синтазы и продукции NO [58, 59]. Кверцетин ингибирует образование активных форм кислорода, катализируемое ферментом ксантиноксидазой [51], и катализируемое миелопероксидазой образование активных гипогалитов [60] и нитрит-подобных радикалов [61]. Чрезвычайно разнообразная активность кверцетина на уровне макромолекул обуславливает не менее широкий спектр его эффектов на субклеточном и клеточном уровне как в условиях *in vitro*, так и *in vivo*. Особенно интересными в этом отношении оказались исследования иммунокомпетентных клеток и клеток неспецифической защитной системы. Установлено, что кверцетин влияет на процессы селекции Т-лимфоцитов [62, 63], ингибирует образование цитотоксичных лимфоцитов [64, 65], угнетает цитотоксическую активность натуральных киллеров [66, 67] и экспрессию гена TNF-α в нормальных моноцитах периферической крови [68]. В отношении клеток неспецифического иммунитета показано, что кверцетин подавляет выделение гистамина и пероксида водорода базофилами [69-71], активацию и дегрануляцию нейтрофилов и секрецию этими клетками β-глюкуронидазы и лизосомальных ферментов [72-76], а также секрецию катионных белков эозинофилами [77]. Кроме

того, кверцетин ингибирует агрегацию тромбоцитов [78] и адгезию лимфоцитов на эндотелиальных клетках [79].

Такой необычно широкий спектр биологической активности кверцетина и других флавоноидов реализуется посредством множества различных молекулярных механизмов, которые можно разделить на две группы: специфические и неспецифические. К первой группе следует отнести механизмы биологического действия, обусловленные специфическим взаимодействием с активными центрами ферментов или с различными рецепторами. Например, стереоспецифическое взаимодействие с АТФ-связывающими центрами белков-мишеней, которому способствует наличие двойной связи в положении С2-С3 и катехольной группы в кольце В, по-видимому, обуславливает конкурентное ингибирование флавоноидами различных киназ [80]. В случаях неспецифического ингибирования связывание флавоноидов с ферментами происходит вне активного центра, однако приводит к таким изменениям в пространственной геометрии белковых молекул, которые сильно затрудняют или даже делают невозможным их специфичное взаимодействие с субстратом. Вероятность реализации неспецифических механизмов ингибирования активности ферментов особенно велика у кверцетина, более 98 % которого находится в плазме в виде стабильных комплексов с различными белками [81, 82]. Во многих случаях взаимодействие флавоноидов, особенно катехинов и танинов, с белками ведет к преципитации белка вследствие образования практически нерастворимых в воде комплексов. Данный механизм обуславливает вяжущие свойства и терпкость флавоноидов и лежит в основе технологии дубления кожи. Наряду со способностью модифицировать и денатурировать белки, к неспецифическим механизмам реализации биологической активности флавоноидов следует отнести их антирадикальное действие и способность связывать ионы металлов, т.е. хелатирующее действие. Возможному участию этих механизмов в реализации биологической активности флавоноидов в данном разделе будет уделено наибольшее внимание.

2.4.1 Р-витаминная активность.

Биологическая активность флавоноидов изначально была выявлена как Р-витаминная активность. В середине 30-х годов выдающийся биохимик Сент-Дьердьи и его сотрудники впервые описали витамины группы Р и установили их полифенольную структуру [7, 8]. Термин Р-витаминная активность означает способность природных полифенолов уменьшать проницаемость и хрупкость стенок капилляров. И хотя впоследствии выяснилось, что флавоноиды по ряду параметров не могут

быть отнесены к витаминам, термин "витамин Р" сохранился и достаточно широко употребляется до настоящего времени. Один из первых молекулярных механизмов Р-витаминной активности был предложен Weiler and Martin в 1947 году [83]. Показав, что витамин Р эффективно ингибирует гиалуронидазу, фермент, который катализирует гидролитическое расщепления гиалуроновой кислоты, содержащейся в стенках капилляров и способствует их разрыхлению и увеличению проницаемости, они предположили, что уменьшение сосудистой и тканевой проницаемости под действием витамина Р происходит за счет антигиалуронидазного действия. Несколько позднее появилась антиоксидантная гипотеза Р-витаминной активности. В первоначальном ее варианте предполагалось, что флавоноиды защищают от окисления "истинные" капилляроукрепляющие агенты, к которым относили аскорбиновую кислоту [84] и адреналин [85]. Однако позднее при моделировании воспалительного отека и повышенной проницаемости сосудов не удалось выявить ожидаемого синергетического эффекта при совместном действии флавоноидов с аскорбиновой кислотой и адреналином [86]. Кроме того, было показано, что флавоноиды являются эффективными ловушками активных форм кислорода и азота. Поэтому в настоящее время большинство исследователей считает, что при воспалительных процессах более значительный вклад в Р-витаминный эффект вносит не косвенное, а прямое антиоксидантное действие, защищающее структуры капиллярной стенки от повреждающего действия биорадикалов.

2.4.2 Антиоксидантная активность.

В настоящее время общепризнанны следующие три молекулярных механизма антиоксидантного действия флавоноидов в биологических системах:

- реакции с биорадикалами (антирадикальное действие);
- связывание металлов с переменной валентностью (хелатирующее действие);
- ингибирование прооксидантных ферментов.

Для исследования антирадикального действия природных и синтетических соединений широко используют различные физико-химические и биохимические тест-системы, а также экспериментальные модели на уровне клеток, тканей и целостного организма.

2.4.2.1 Антирадикальная активность флавоноидов в физико-химических системах.

Количественная оценка антирадикальной активности флавоноидов в отношении АФК.

В физико-химических системах свободные радикалы генерируют в результате сонолиза воды [87], фотодинамических процессов [88], окислительно-восстановительных реакций, инициируемых пероксинитритом [89-91] и ионами металлов с переменной валентностью, главным образом железа [92, 93] и меди [15]. Например, в модельной системе, где в качестве источника гидроксильных радикалов использовался сонолиз воды, а в качестве окисляемого субстрата – фосфолипидные липосомы, была исследована антирадикальная активность процианидинов из косточек винограда (*vitis vinefera*) [87]. Оказалось, что процианидины обладают значительно более эффективным антирадикальным действием, чем α -токоферол, не только в отношении инициаторов свободнорадикального (перекисного) окисления липосомальных липидов ($I_{50}=0,1$ мкМ для процианидинов и $I_{50}=1,5$ мкМ для α -токоферола), но и алкоксильных и алкилперекисных радикалов, образующихся на стадии продолжения и терминции цепи ($I_{50}=0,05$ мкМ для процианидинов и $1,25$ мкМ для α -токоферола).

Благодаря сравнительно низкому восстановительному потенциалу, большинство флавоноидов легко вовлекаются в одноэлектронные реакции с различными радикалами. Способность химических соединений взаимодействовать с различными радикалами может быть охарактеризована константой скорости реакции второго порядка. Существуют прямые и непрямые методы определения данного параметра. В первом случае свободные радикалы генерируются методом импульсного радиолиза и с помощью ЭПР-спектроскопии исследуется кинетика их реакции с анализируемым субстратом. Данный подход был успешно использован для определения констант скорости реакции флавоноидов с гидроксильным и некоторыми другими радикалами, характеризующимися высокой химической активностью (табл. 2.7). В отношении менее активного в химическом отношении анион-радикала кислорода также были предприняты попытки определить значения константы скорости реакции с флавоноидами, однако в силу определенных технических сложностей [94] эта задача была решена только в отношении кверцетина и ряда других наиболее эффективных антирадикальных агентов (табл. 2.7).

Для исследования антирадикальных свойства флавоноидов по отношению к анион-радикалу кислорода наряду с прямыми методами широко

применяется метод конкурентной кинетики. В этом случае для создания постоянного уровня анион-радикала кислорода используют химические $O_2^{\bullet-}$ -генерирующие системы и определяют эффективность ингибирования реакций $O_2^{\bullet-}$ -зависимого восстановления (окисления) вещества-детектора, анализируемым соединением в сравнении со стандартом. В

Таблица 2.7

Константы скорости реакции флавоноидов с различными радикалами, полученные прямыми методами с использованием импульсного радиолиза

Флавоноиды	$\bullet OH$ $k, 10^8 M^{-1} \cdot c^{-1}$	$\bullet N_3$ $k, 10^8 M^{-1} \cdot c^{-1}$	$t-BuO\bullet$ $k, 10^8 M^{-1} \cdot c^{-1}$	$O_2^{\bullet-}$ $k, 10^4 M^{-1} \cdot c^{-1}$
Дигидрокверцетин	103 ^a	43	1,0	
Кверцетин	51 ^a	66	6,6	4,7 ^B (pH 10)
(-)-Эпикатехин	64 ^a	51		6,8 ^B (pH 7)
Лютеолин	130 ^a	41	5,7	
Кемпферол	141 ^a	88	6,0	
Эпикатехин-галлат				43,0 ^B (pH 7)
Эпигаллокатехин-галлат				73,0 ^B (pH 7)
Маннитол	27 ^b			

^a - [94], ^b - [5], ^B - [16]

качестве $O_2^{\bullet-}$ -генерирующей системы часто используют ксантин-ксантиноксидазу, а в качестве детектора – цитохром *c*. Однако известно, что флавоноиды являются ингибиторами ксантиноксидазы [51], и кроме того, кверцетин и ряд других флавоноидов способны непосредственно восстанавливать цитохром *c*. В связи с этим, при исследовании антирадикальной активности флавоноидов для генерирования анион-радикала кислорода целесообразно использовать рибофлавин-содержащую фотосистему [95], а в качестве детектора супероксида – паранитротетразолий хлористый (ПНТХ). В этом случае анион-радикал кислорода образуется в результате окисления фотохимически восстановленного рибофлавина, а эффективность антирадикального действия исследуемых соединений и выбранного стандарта оценивается по степени торможения $O_2^{\bullet-}$ -зависимого восстановления ПНТХ в диформаза, и из зависимости доза-эффект определяются величины I_{50} , равные концентрации антирадикального агента, при которой восстановление ПНТХ ингибируется на 50 %. В качестве стандарта удобно использовать фермент супероксиддисмутазу (СОД). В этом случае константы скорости реакции второго порядка для взаимодействия флавоноидов с анион-радикалом кислорода рассчитывают, пользуясь следующими уравнениями:

$$K_{\text{ФЛ}} / K_{\text{СОД}} = I_{50}(\text{СОД}) / I_{50}(\text{ФЛ}),$$

$$K_{\text{ФЛ}} = K_{\text{СОД}} \cdot I_{50}(\text{СОД}) / I_{50}(\text{ФЛ}),$$

$$\text{где } k_{\text{СОД}} = 2 \cdot 10^9 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1} [96].$$

Таблица 2.8

Количественные параметры, характеризующие особенности антирадикального действия флавоноидов в рибофлавин-содержащей фотосистеме (рН 10)

Флавоноиды	I_{50} (мкМ)	k , $10^4 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$	Скорость окисления флавоноидов (v), мкмоль л ⁻¹ мин ⁻¹
Дигидрокверцетин	6	5,0	0,0
Кверцетин	6	5,0	1,5
Морин	30	1,0	0,46
Кемпферол	17	1,8	0,56
Рутин	13,5	2,2	0,28
Лютеолин	11,5	2,3	0,22
Эпикатехин	2,5	12,0	0,12
Эпикатехин-галлат	2,3	13,0	Н/О
Эпигаллокатехин-галлат	1,5	20,0	Н/О

Значения констант скорости реакции флавоноидов с анион-радикалом кислорода, полученные описанным выше методом, приведены в табл. 2.8. Тот факт, что константы скорости реакции ряда флавоноидов с $\text{O}_2^{\cdot-}$ и, в частности кверцетина, определенные с помощью метода конкурентной кинетики, близки к величинам, полученным с использованием импульсного радиолиза и ЭПР-спектрометрии (табл. 2.7), свидетельствует о корректности использования рибофлавин-содержащей фотосистемы в качестве генератора, а паранитротетразолия хлористого (ПНТХ) – в качестве детектора супероксид-аниона, и позволяет рекомендовать указанный метод для количественной оценки антирадикальной активности флавоноидов и других антирадикальных агентов по отношению к $\text{O}_2^{\cdot-}$.

Приведенные в табл. 2.8 данные позволяют сделать вывод о том, что флавоноид-агликоны являются эффективными ловушками анион-радикала кислорода и превосходят в этом отношении важнейший водорастворимый антиоксидант – аскорбиновую кислоту. Весьма интересным представляется использование приведенных значений констант скорости реакции для анализа связи между структурой и антирадикальной активностью флавоноидов. Например, сравнение значений k для рутина, лютеолина, эпикатехина, дигидрокверцетина и кверцетина, имеющих гидроксильные группы в о-положении кольца В, и значений k для мори-на и кемпферола позволяет сделать вывод о том, что наибольший вклад в антирадикальную активность флавоноидов в отношении анион-радикала кислорода вносит катехольная группа кольца В. Сравнение кверцетина с лютеолином и рутином позволяет заключить, что наличие гидроксила в

положении С-3 также значительно повышает антирадикальную активность флавоноидов. Известно, что молекулы флавонолов и дигидрофлавонолов, имеющие гидроксил при С-3, плоские, тогда как у флавонов и дигидрофлавонов кольцо В закручено по отношению к остальной части молекулы [97, 98]. Плоская конфигурация молекулы способствует делокализации неспаренного электрона, повышает стабильность феноксильного радикала и тем самым усиливает антирадикальные свойства [94, 97, 98]. В то же время, наличие (у кверцетина) или отсутствие (у дигидрокверцетина) двойной связи между С-2 и С-3, которая, как полагают, также вовлекается в механизм делокализации неспаренного электрона ароксильного радикала [2], не приводит к существенным различиям в соответствующих значениях k . Антирадикальная активность в отношении анион-радикала кислорода возрастает с увеличением числа гидроксильных групп в структуре флавоноидов. Так, самая высокая антирадикальная активность была выявлена у эпигаллокатехин-галлата (ЭГКГ) и эпигаллокатехин-галлата (ЭКГ), которые в результате галлирования (присоединение по С₃ остатка галловой кислоты) имеют дополнительные гидроксильные группы. Напротив, поскольку гликозилирование блокирует химически активные группы кверцетина, у его гликозида – рутина – наблюдается значительное (более чем в 2 раза) снижение антирадикальной активности.

В разделе "Физико-химические свойства" указывалось, что окисление флавоноидов при взаимодействии с радикалами сопровождается характерными спектральными изменениями. Это свойство позволяет достаточно просто оценивать скорость окисления флавоноидов (v) методом спектрофотометрии. В табл. 2.8 приведены значения v для рибофлавин-содержащей фотосистемы. Как следует из приведенных данных, наибольшая скорость окисления наблюдается у флавонол-агликонов – кверцетина, кемпферола и морина. При этом наблюдается достаточно хорошее соответствие между значениями констант скорости реакции флавонолов с $O_2^{\bullet-}$ (k) и скоростью их окисления (v), т.е. с увеличением k практически пропорционально возрастает v . Вместе с тем, обращает на себя внимание низкая скорость окисления наиболее эффективного антирадикального агента – эпикатехина, и полное отсутствие спектральных изменений при инкубации в рибофлавин-содержащей фотосистеме дигидрокверцетина (таксифолина). Один из наиболее вероятных молекулярных механизмов, объясняющих данный феномен, заключается в возможности взаимодействия ароксильного радикала, образующегося в результате реакции анион-радикала кислорода с молекулой дигидрокверцетина (уравнение 2.3), с другой молекулой $O_2^{\bullet-}$, что ведет к регенерации исходного

флавоноида (уравнение 2.4), и в этом случае молекула дигидрокверцетина функционирует, как истинный СОД-миметик [5].



Скорости реакции 2.3 и 2.4 описываются уравнением скорости реакции второго порядка соответственно:

$$v_{2.3} = k_{2.3}[\text{FIOH}] \cdot [\text{O}_2^{\bullet -}] \text{ и } v_{2.4} = k_{2.4}[\text{FIO}^{\bullet}] \cdot [\text{O}_2^{\bullet -}] \quad (2.5)$$

При условии $v_{2.4} > v_{2.3}$ молекула дигидрокверцетина способна перехватывать образующиеся в рибофлавин-содержащей фотосистеме анион-радикалы кислорода, совершая переход между восстановленной и окисленной формой при отсутствии заметного суммарного окисления, а следовательно, и без изменений в спектре поглощения дигидрокверцетина. По-видимому, реакция 2.4 возможна и в случае антирадикального действия эпикатехина, благодаря этому высокая эффективность ингибирования супероксид-зависимого восстановления ПНТХ сочетается у этого флавоноида с очень низкой скоростью окисления. Можно предположить, что возможность протекания реакции 2.4 у обоих флавоноидов связана с отсутствием двойной связи между вторым и третьим углеродным атомом кольца С, и, как следствие, низкой способностью к делокализации неспаренного электрона в соответствующих ароксильных радикалах.

Тролоксный эквивалент.

Наряду с исследованием антирадикальной активности флавоноидов в отношении супероксид-аниона и других характерных для биосистем кислородных радикалов, многочисленные публикации посвящены их взаимодействию с такими экзотическими оксидантами, как катион-радикал 2,2'-азинобис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты) ($\text{ABTS}^{\bullet +}$). $\text{ABTS}^{\bullet +}$ – это стабильный радикал, который может существовать в водных растворах достаточно продолжительное время, однако внесение в раствор различных антирадикальных агентов приводит к их взаимодействию с $\text{ABTS}^{\bullet +}$ и быстрому расходованию ("тушению") последнего. Расходование $\text{ABTS}^{\bullet +}$ сопровождается характерными спектральными изменениями, позволяющими достаточно просто и с высокой точностью регистрировать скорость реакции. Возможность дозировать начальную концентрацию радикалов в системе и контролировать скорость их "тушения" обусловили широкое использование $\text{ABTS}^{\bullet +}$ для стандартизации антирадикальной активности различных соединений, в том числе флавоноидов [99]. В таких работах сравнивают скорости "тушения" $\text{ABTS}^{\bullet +}$

анализируемым агентом и стандартом, в качестве которого наиболее часто используют полусинтетический водорастворимый аналог витамина Е, имеющий коммерческое название "Тролокс". Использование "Тролокса" позволяет оценить эффективность антирадикального действия через так называемый "тролоксый эквивалент антиоксидантной эффективности", который в англоязычной литературе обозначают аббревиатурой TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), в русской транскрипции ТЕАК. Значения ТЕАК указывают: какое количество тролокса в ммоль/л (мМ) "тушит" $ABTS^{•+}$ с той же эффективностью, как и 1 мМ анализируемого соединения. В табл. 2.9 приведены значения ТЕАК для наиболее распространенных флавоноидов. Анализ связи между структурой и активностью позволяет заключить, что наибольший вклад в антирадикальную активность флавоноидов в отношении $ABTS^{•+}$ вносят катехольная группа кольца В и гидроксил в положении С-3. Кроме того, наличие двойной связи между углеродными атомами С-2 и С-3 также усиливает антирадикальные свойства флавоноидов.

С помощью значений ТЕАК оценили антиоксидантный потенциал наиболее распространенных фруктов, овощей и напитков, и оказалось, что по этому показателю 1 стакан (150 мл) красного вина = 12 стаканам белого вина = 2 чашкам чая = 4 яблокам = 5 порциям лука (1 порция 100 г) = 5,5 порциям баклажан = 3,5 стаканам черносмородинового сока = 3,5 стаканам (500 мл) пива = 7 стаканам апельсинового сока = 20 стаканам яблочного сока [100].

В научных, научно-популярных и рекламных публикациях часто используется и другой показатель, характеризующий антиоксидантную активность растительных экстрактов, пищевых продуктов и биологически-активных добавок – эффективность перехвата кислородных радикалов. В англоязычной литературе этот показатель получил название ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) [101]. ОРАК, как и ТЕАК, обычно определяется с использованием стандартизированного препарата "Тролокс". Показатель антиоксидантной активности пересчитывается на 1 грамм сухого или на 1 миллилитр жидкого вещества и выражается в единицах ОРАК (1 единица ОРАК = 1 мкмоль Trolox ®).

Для стандартизации антиоксидантной активности флавоноидов могут использоваться и системы генерации углерод-центрированных и перекисных радикалов, основанные на термальном гомолизе азоинициаторов, например 2,2'-азобис амидинопропана гидрохлорида (АВАР) [104].

Таблица 2.9

Значения ТЕАК для некоторых наиболее распространенных флавоноидов

Флавоноиды	Позиции ОН групп	ТЕАК, ммоль/л
Флаванолы		
Дигидрокверцетин	3573'4'	1,9 ^{а,б} , 3,09 ^в
Дигидрокемпферол	3573'	1,39 ^а
Флавоны и флавоны		
Мирицетин	3573'4'5'	3,1 ^{а,б,в}
Кверцетин	3573'4'	4,7 ^{а,б} , 4,84 ^в
Рутин (3-рутенозид)	573'4'	2,4 ^{а,б} , 2,67 ^в
Морин	3572'4'	2,55 ^б , 2,60 ^в
Кемпферол	3574'	1,34 ^{а,б} , 1,45 ^в
Лютеолин	573'4'	2,1 ^{а,б} , 2,48 ^в
Флаван-3-олы		
Эпикатехин	3573'4'	2,5 ^{а,б} , 3,16 ^в
Эпикатехингаллат	3573'4'3"4"5"	4,93 ^а
Эпигаллокатехингаллат	3573'4'5'3"4"5"	4,75 ^а , 4,80 ^б
Антоцианидины		
Цианидин	3573'4'	4,4 ^{а,б} , 3,63 ^в
Керацианин(3-рутенозид)	573'4'	3,2 ^а , 3,25 ^б
Пеларгонидин	35734'	1,3 ^{а,б}

^а - [2], ^б - [102], ^в - [103]

Количественный гомолиз азо-инициаторов проводят при стандартной температуре, обычно 39 °С, а мишенями для образующихся при этом радикалов может быть люминол [105], фикобилипротеин *R*-фикоэритрин [106], желтый растительный гликозид кроцин [107, 108]. Образующиеся при термальном разложении азо-инициаторов радикалы обладают достаточной энергией и для инициирования ПОЛ, например линолевой кислоты [106]. В качестве стандарта, с которым сравнивают способность анализируемого образца ингибировать окисление субстрата-мишени, обычно используют тот же "Тролокс".

2.4.2.2 Антирадикальная активность флавоноидов в бесклеточных биологических системах.

Антирадикальная активность флавоноидов в условиях ферментативного окисления микросомальных липидов

Одним из наиболее распространенных биологических объектов при исследовании антиокислительных свойств природных и синтетических химических соединений являются мембраны эндоплазматического ретикулаума клеток печени (микросомальная фракция) [5, 109-111]. В на-

стоящее время известны два механизма вовлечения микросомальных ферментов в процессы инициирования перекисного окисления липидов. Один из них реализуется на уровне НАДФН-цитохром Р-450 редуктазы и, по-видимому, включает перенос электронов от НАДФН к комплексу, способному внедрять активированный кислород в молекулы полиненасыщенных жирных кислот и разрушать образующиеся гидропероксиды [112]. Этот процесс протекает в присутствии ионов железа (или других металлов с переменной валентностью) и полностью подавляется добавлением комплексообразующих агентов, например ЭДТА. Одним из вероятных редокс-активных промежуточных агентов в этом случае может быть анион-радикал кислорода [113]. Второй механизм реализуется на уровне цитохрома Р-450. Показано, что в результате протекающих здесь процессов метаболической активации ряда ксенобиотиков, в частности ССl₄, образуются свободнорадикальные интермедиаты, способные инициировать перекисное окисление липидов без участия ионов железа [114]. В эксперименте перекисное окисление по первому механизму инициируют путем внесения в среду инкубации, содержащую микросомы печени, двухвалентного железа и НАДФН (НАДФН-зависимое ПОЛ). В отсутствие экзогенного железа и при связывании эндогенного железа ЭДТА добавление в среду инкубации четыреххлористого углерода и НАДФН инициирует перекисное окисление липидов по второму механизму (ССl₄-инициируемое ПОЛ). Флавоноид-агликоны и флавоноид-гликозиды эффективно ингибируют как НАДФН-, так и ССl₄-зависимое ПОЛ. Степень ингибирования во всех случаях монотонно возрастает с увеличением концентрации флавоноидов. Это позволяет корректно определять и использовать для сравнительной оценки антиоксидантных свойств индивидуальных химических соединений показатель I₅₀, численно равный концентрации анализируемого антиоксиданта, при которой процессы перекисного окисления липидов ингибируются на 50 %. Значения I₅₀ рассчитываются из зависимости доза–эффект графически или с помощью метода регрессионного анализа. В табл. 2.10 приведены значения I₅₀ для некоторых соединений, относящихся к различным классам флавоноидов, а также значения их антиоксидантной активности (АОА) в условных единицах (усл.ед.). За 1 усл.ед. принимали АОА наиболее эффективного антиоксиданта ЭГКГ, а АОА других соединений рассчитывали по формуле:

$$\text{АОА}_{\text{фл}} = 1 \cdot (I_{50} \text{ ЭГКГ} / I_{50} \text{ Фл}).$$

Таблица 2.10

Эффективность ингибирования микросомального ПОЛ некоторыми флавоноидами

Флавоноиды	НАДФН-зависимое ПОЛ		CCl ₄ -зависимое ПОЛ	
	I ₅₀ , мкМ	АОА, усл.ед.	I ₅₀ , мкМ	АОА, усл.ед.
Рутин	19,0	0,105	160,0	0,0156
Дигидрокверцетин	38,0	0,053	110,0	0,023
Кверцетин	4,5	0,444	6,0	0,417
Эпикатехин-галлат	2,5	0,800	2,5	1,000
Эпигаллокатехин-галлат	2,0	1,000	2,5	1,000
Ионол	1,1	-	1,1	-

Следует подчеркнуть, что эффективность антиоксидантного действия эпикатехин-галлата и эпигаллокатехин-галлата, обладающих наиболее выраженными антиокислительными свойствами, сравнима с эффективностью использованного в качестве стандарта синтетического антиоксиданта из группы затрудненных фенолов – ионола (2,6-ди-трет-бутил-4-метилфенол).

Сравнение и анализ данных, приведенных в табл. 2.8, 2.9 и 2.10, свидетельствует, что АОА флавоноидов в условиях НАДФН-зависимого ПОЛ значительно лучше коррелирует с их антирадикальной активностью по отношению к анион-радикалу кислорода (k) (рис. 2.15 а), чем со значениями тролоксового эквивалента (рис. 2.15 б). Это обстоятельство является косвенным подтверждением участия анион-радикал кислорода в иницировании НАДФН-зависимого ПОЛ в микросомах печени.

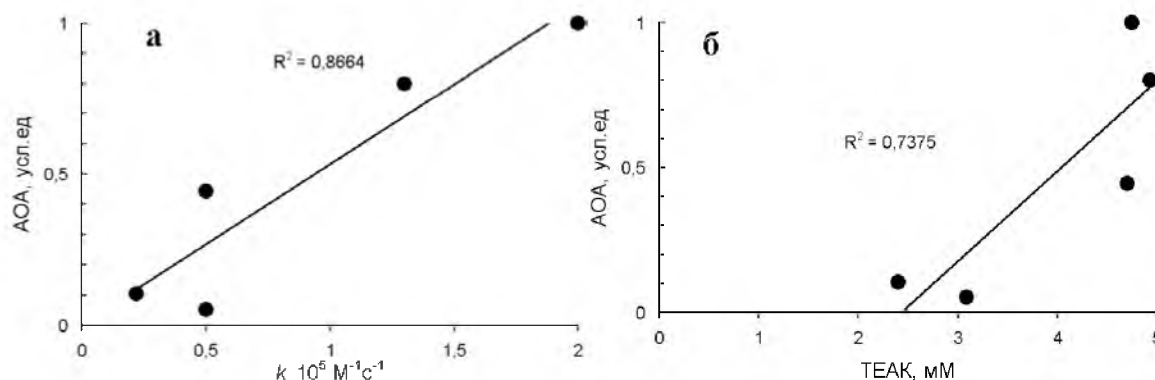
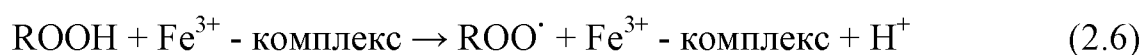


Рис. 2.15. Зависимость между антиоксидантным действием флавоноидов при НАДФН-зависимом ПОЛ в микросомах печени и их антирадикальными свойствами по отношению к $O_2^{\cdot-}$ (k) (а) и $ABTS^{\cdot+}$ (ТЕАК) (б)

Антирадикальная активность флавоноидов в условиях микросомального перекисного окисления липидов может быть направлена как против анион-радикала кислорода и других первичных радикалов, инициаторов ПОЛ, так и против радикальных интермедиатов цепного окисления – ал-

килперекисных и алкоксильных радикалов липидов. Способность флавоноидов взаимодействовать с липидными радикалами исследовалась на примере рутина и кверцетина. Выбор данных соединений обусловлен наличием в их структуре хромофора с максимумом поглощения в видимой области, что позволяет использовать простые спектральные методы для исследования процессов радикального окисления. Радикалы липидов получали путем разложения гидропероксида линолевой кислоты в присутствии цитохрома с. Известно [115], что в этом случае наблюдается каталитический распад гидропероксида в соответствии с механизмом:



При добавлении цитохрома *c* к среде, содержащей кверцетин и гидропероксид линолевой кислоты, происходит окисление флавоноида образующимися в этих условиях алкоксильными (RO^\cdot) и алкилперекисными (ROO^\cdot) радикалами, о чем свидетельствует разрушение хромофора с максимумом поглощения при 377 нм и увеличение оптической плотности в области с максимумом при 334 нм (рис. 2.16). Количество окисленного кверцетина, рассчитанное с использованием коэффициента молярной экстинкции между его восстановленной и окисленной формами при 377 нм, $\epsilon = 8,7 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [116], составляет 5 мкмоль/мл. Таким образом, кверцетин перехватывает практически все свободные радикалы, образующиеся в данной системе при разрушении гидропероксида линолевой кислоты (6 мкмоль/мл).

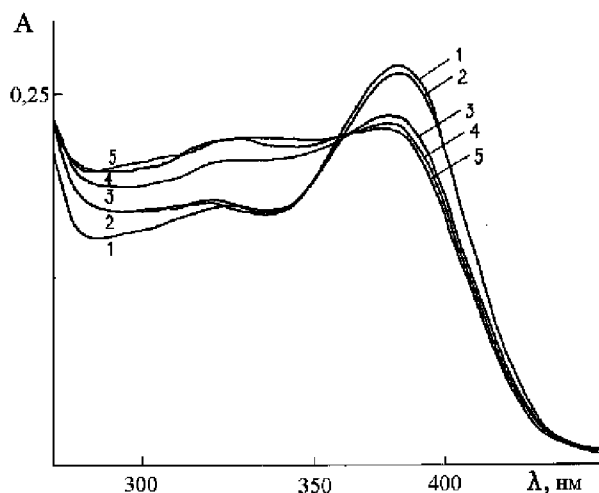


Рис. 2.16. Спектры поглощения кверцетина при действии продуктов, образующихся при радикальном разрушении гидропероксида линолевой кислоты [117]

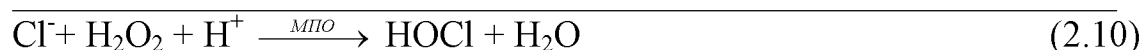
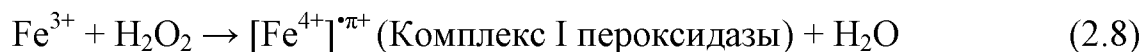
1 - спектр поглощения 0,015 мМ раствора кверцетина в 0,05 М фосфатном буфере, рН 7,4, содержащем 0,1 мМ ЭДТА; 2 - спектр поглощения 0,015 мМ раствора кверцетина через 5 мин инкубации в присутствии 6 мкМ гидропероксида линолевой кислоты; 3, 4, 5 - тот же, что и 2 через 1, 2,5 и 5 мин после добавления 20 мкл раствора цитохрома с (0,4 мг/мл)

Можно сделать вывод, что кверцетин является эффективной ловушкой радикалов липидов. Рутин в присутствии тех же концентраций гидропероксида линолевой кислоты и цитохрома с практически не окисляется, что свидетельствует о незначительной антирадикальной активности рутина в отношении алкилпере-

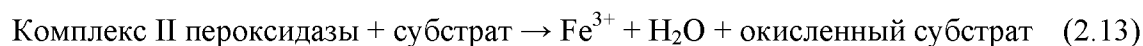
кисных и алкоксильных радикалов. По-видимому, в этом заключается причина низкой антиоксидантной активности рутина в условиях микросомального окисления. В свою очередь, незначительная антирадикальная активность рутина по сравнению с кверцетином в отношении липидных перекисных и алкоксильных радикалов может быть в определенной степени обусловлена гидрофильными свойствами рутина (см. табл. 2.6), затрудняющими его взаимодействие с липофильными радикалами.

Антиоксидантное действие флавоноидов при окислении липопротеидов низкой плотности миелопероксидазой

Рост поступления в организм человека нитритов и нитратов вследствие все большего загрязнения окружающей среды и широкого применения NO_x -содержащих лекарств и пищевых добавок обуславливает актуальность исследования механизмов токсического действия этих соединений и необходимость поиска соответствующих средств фармакотерапии. Известно, что взаимодействие нитритов с различными гемопротеидами ведет к образованию активных форм кислорода и азота (АФА), участвующих в атерогенезе и других патогенетических процессах [5]. В этом плане большой интерес представляет исследование атерогенного действия фермента миелопероксидазы (см. подраздел **1.3.1. Физиологически значимые пути образования биорадикалов**), одного из важнейших функциональных белков в системе неспецифического иммунитета. Миелопероксидаза катализирует образование гипохлорита в результате цикла хлоризации:



Кроме катализа процесса образования активных гипохлоритов в цикле хлоризации, МПО (комплекс I пероксидазы) может окислять различные фенолы, анилины, diketоны через образование комплекса II пероксидазы по классическому одноэлектронному пероксидазному механизму:



Недавно получены экспериментальные данные, свидетельствующие, что субстратам МПО могут быть монооксид азота (NO) [118-121] и нитрит-анион (NO_2^-) [122-125]. Взаимодействие МПО с NO (NO оксидазная

активность) имеет, по-видимому, важное физиологическое значение, обеспечивая регуляцию внутрисосудистого уровня NO в норме и особенно при воспалительных процессах. Напротив, способность МПО катализировать в присутствии физиологических концентраций нитрита образование активных форм азота, так называемых NO₂[•]-подобных радикалов (рис. 2.17), рассматривается как вредный для организма процесс, ведущий к возникновению ранних атеросклеротических изменений в сосудах [118].

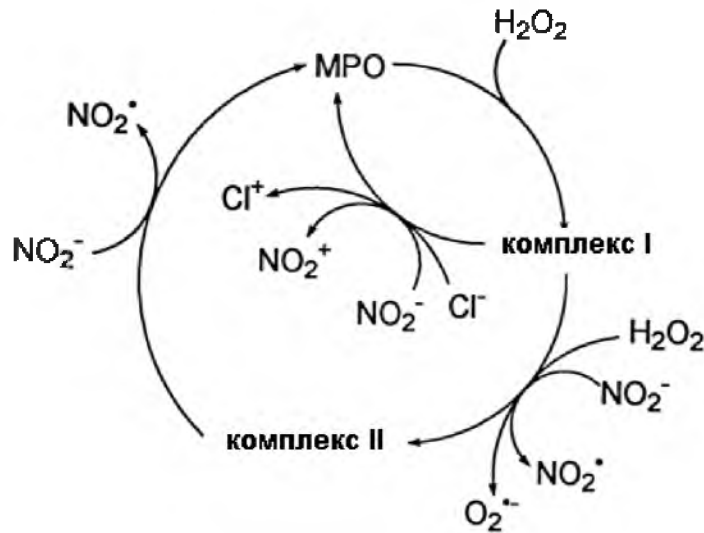


Рис. 2.17. Молекулярный механизм катализа реакции образования NO₂[•]-подобных радикалов из нитрита миелопероксидазой [122]

Рис. 2.17. Молекулярный механизм катализа реакции образования NO₂[•]-подобных радикалов из нитрита миелопероксидазой [122]

Атеросклероз – наиболее распространенная и тяжелая

сосудистая патология, ведущая к ишемической болезни сердца, инфарктам и инсультам. Эти заболевания – самая распространенная причина смертности в экономически развитых странах (примерно 50 % от всех смертей) [126]. В основе атеросклероза лежит атерогенез сложный и длительный процесс дегенеративных изменений стенок крупных артерий, сопровождающийся образованием в просвете сосудов атеросклеротических фиброзных бляшек (атером). Фиброзная бляшка формируется непосредственно под эндотелием и состоит из так называемой покрышки, включающей гладкомышечные клетки (ГМК) и фиброзную ткань, и желтого липидного ядра, которое на поздних стадиях атерогенеза может обызвествляться. В атерогенезе принимают участие надмолекулярные структуры – липопротеиды и, по меньшей мере, пять типов клеток: эндотелиальные клетки (ЭК), ГМК, моноциты и образующиеся из них макрофаги, тромбоциты и лимфоциты [127, 128]. Последовательность и взаимосвязь событий в процессе атерогенеза определяются продуцируемыми этими клетками сигнальными, регуляторными и другими активными молекулами, включая хемоаттрактанты, факторы роста, фактор некроза опухолей (TNF-α), интерферон-γ (IFN-γ) и другие цитокины, ферменты и биорадикалы.

Атерогенез начинается с проникновения в интиму сосудистой стенки ЛПНП. Нарушению целостности эндотелия и прохождению через него липопротеидов способствует целый ряд внутренних и внешних факто-

ров. По-видимому, наиболее важен гидродинамический эффект потока крови. Даже при нормальном артериальном давлении механическое воздействие на эндотелий в крупных сосудах, и особенно – в области разветвления, где возникают турбулентные потоки, весьма значительно. И именно здесь наиболее часто развивается атеросклеротическое повреждение. Повышенное АД – один из факторов риска атеросклероза. Другими факторами, влияющими на состояние эндотелия, является курение, вирусные инфекции (герпес), хронические воспалительные процессы, окислительный стресс, обусловленный воздействием на организм различных физических и химических факторов внешней среды [126].

Таблица 2.11

Параметры МПО-зависимого окисления ЛНП в системе глюкоза:глюкозооксидаза, без и в присутствии различных субстратов

Параметр	- субстрат	+ Нитрит (50 мкМ)	+ нитрат (50 мкМ)	+ хлорид (100 мМ)
Скорость ПОЛ, (моль ДК/моль ЛНП • мин)	1,1 ± 0,25	3,6 ± 1,1	1,1 ± 0,25	1,0 ± 0,25
Количество ДК за 80 мин (моль/моль ЛНП)	43,0 ± 4,0	150 ± 43	44,0 ± 4,0	41,0 ± 4,0

Накопление ЛПНП в матриксе сосудистой стенки является необходимым этапом атерогенеза, но далеко не всегда приводит к возникновению атеросклеротической бляшки, часто процесс ограничивается образованием так называемых липидных пятен. Более того, известно немало случаев спонтанного исчезновения липидных пятен практически в любом возрасте [129]. Атерогенными ЛПНП становятся в результате их химической модификации. Модификация ЛПНП включает окисление липидного и белкового компонентов, липолиз, протеолиз и агрегацию. По-видимому, в окислительной модификации ЛПНП ключевую роль играет МПО. *In vitro* для инициирования перекисного окисления ЛПНП и образования окисленных липидов с сопряженными двойными связями – диеновых конъюгатов (ДК) – достаточно только наличия МПО и H₂O₂-генерирующей системы (глюкоза+глюкозооксидаза) (табл. 2.11). Добавление в модельную систему физиологических концентраций нитрит-ионов (50 мкМ) приводит к многократному усилению интенсивности ПОЛ, тогда как ионы нитрата и хлорида активирующего влияния не оказывают (табл. 2.11, рис. 2.18).

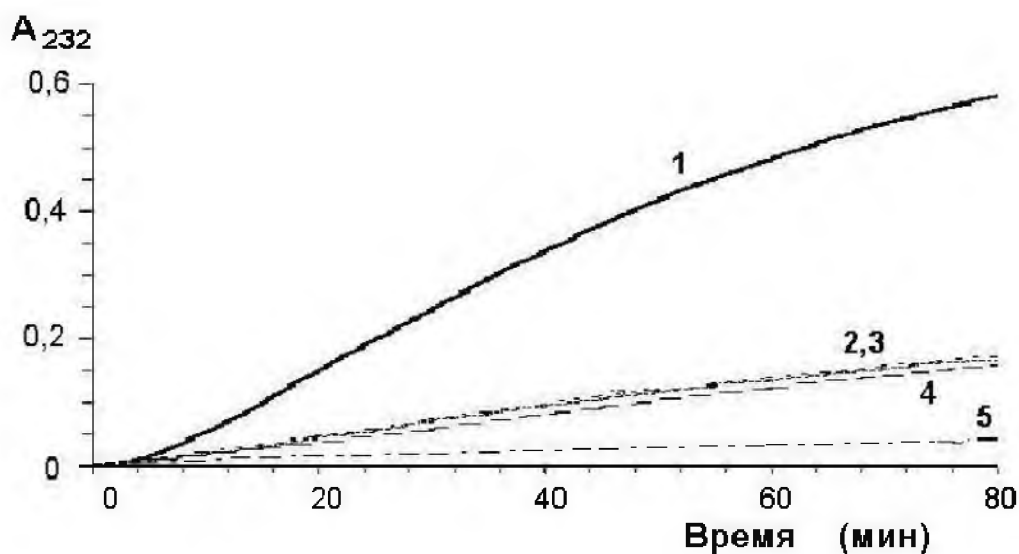


Рис. 2.18. Временная кинетика образования диеновых конъюгатов (ДК) при МПО-зависимом окислении липидов ЛПНП

1 – окисление в системе МПО + (глюкоза+глюкозооксидаза) + нитрит-ионы (50 мкМ); 2 – окисление в системе МПО + (глюкоза+глюкозооксидаза) + нитрат-ионы (50 мкМ); 3 – окисление в системе МПО + (глюкоза+глюкозооксидаза) + хлорид-ионы (100 мМ); 4 – окисление в системе МПО + (глюкоза+глюкозооксидаза); 5 – окисление в системе (глюкоза+глюкозооксидаза) + нитрит-ионы (50 мкМ).

Эффект нитрит-ионов на МПО-зависимое ПОЛ проявляется с небольшой лаг-фазой (рис. 2.18), продолжительность которой при использовании в качестве субстрата ЛПНП, полученных из крови здоровых доноров, варьирует в диапазоне 5 – 10 мин. Скорость окисления ЛПНП в присутствии нитрит-ионов также значительно различается (от 2,23 до 5,43 моль ДК/моль ЛНП • мин). Пока не ясно, в какой степени эти различия связаны с индивидуальными особенностями организма или же они целиком обусловлены диетологическими факторами. Однако есть экспериментальные данные, свидетельствующие, что в целом способность ЛПНП к окислению коррелирует у обследованных пациентов с риском развития сердечно-сосудистых заболеваний [5]. Если допустить, что продолжительность лаг-фазы и скорость МПО-зависимого окисления ЛПНП являются достаточно устойчивой индивидуальной характеристикой, то оба параметра могут представлять интерес как потенциальные критерии при выявлении лиц, предрасположенных к атеросклерозу.

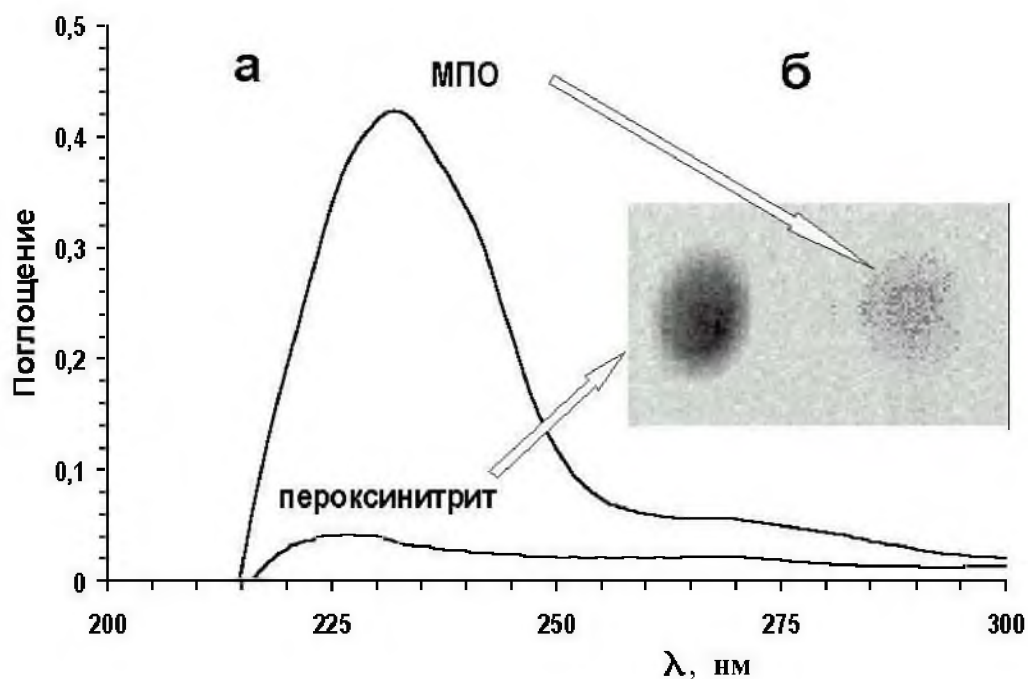
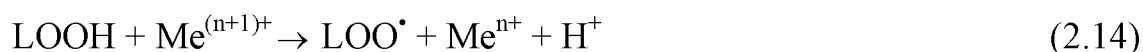


Рис. 2.19. Окислительная модификация ЛПНП системой МПО + (глюкоза+глюкозооксидаза) + нитрит-ионы (50 мкМ) и пероксинитритом (500 мкМ)
 а. УФ-спектры продуктов ПОЛ -диеновых конъюгатов через 40 мин инкубации;
 б. Дот-блоттинг продуктов окислительной модификации апобелкового компонента (нитротирозина) через 40 мин инкубации.

Приведенные экспериментальные данные свидетельствуют, что NO_2^\cdot -подобные радикалы, продуцируемые МПО в присутствии физиологических концентраций нитрит-ионов и пероксида водорода, являются эффективными инициаторами процессов ПОЛ в ЛПНП. Количество продуктов окисления липидов в этом случае значительно (на порядок) выше, чем при иницировании ПОЛ в ЛПНП другим потенциальным атерогенным оксидантом – пероксинитритом (рис. 2.19 а). Кроме иницирования процессов окисления липидов МПО в присутствии пероксида водорода и нитрит-ионов катализирует реакции окислительной модификации апобелкового фрагмента ЛПНП. Интересно, что при действии на ЛПНП пероксинитрита количество нитротирозина, специфического маркера белковой модификации, определяемого с помощью соответствующих антител методом дот-блоттинга, было значительно больше, чем при воздействии МПО (рис. 2.19 б). Таким образом, можно сделать вывод, что генерируемые МПО NO_2^\cdot -подобные радикалы обладают более выраженным прооксидантным действием в отношении липидного компонента ЛПНП, тогда как пероксинитрит наиболее эффективно модифицирует апобелковый фрагмент.

Возможные механизмы окислительной модификации липопротеидов не ограничиваются действием МРО и пероксинитрита. Модифицированные ЛПНП могут образовываться в интиме в результате взаимодействия ЛПНП с гидропероксидами эйкозатетраеновых кислот (НРЕТЕ), продуцируемыми 12/15 липоксигеназой макрофагов [130]. Возможно, роль НРЕТЕ заключается в иницировании процессов ПОЛ в липидах ЛПНП в соответствии с классическим механизмом:



Наличие в области атерогенного воспаления следовых количеств ионов меди, свободного или связанного железа, необходимых для гомолитического разложения пероксидов, показано в ряде исследований [5]. Инициатором ПОЛ могут быть и перекисные группы, присутствующие в липидном компоненте самих ЛПНП. При этом, если процессы окислительной модификации происходят только в зоне воспаления локализованной в интиме сосудистой стенки [5], то область образования "иницирующих" гидропероксидов, по-видимому, значительно шире. В кровяном русле образование липопероксидов может быть следствием побочного действия оксидантов, генерируемых фагоцитирующими клетками и МПО в ответ на проникновение бактериальной или другой инфекцией. В печени, где формируются предшественники ЛПНП – липопротеиды очень низкой плотности (ЛПОНП), существует потенциальная возможность окисления липидов еще до включения их в состав липопротеидов. Она обусловлена тем обстоятельством, что биотрансформация некоторых ксенобиотиков (галогензамещенные углеводороды, спирты) в системе микросомального окисления гепатоцитов приводит к образованию радикальных метаболитов и продукции активных форм кислорода в непосредственной близости от участков эндоплазматического ретикулула, где синтезируются липиды и формируются липопротеиды. Наиболее атерогенными первичными продуктами окисления липидов являются, по-видимому, гидропероксиды полиненасыщенных эфиров холестерина. Этот вывод вытекает из экспериментальных данных, характеризующих устойчивость гидропероксидов свободных ненасыщенных жирных кислот и жирных кислот, входящих в состав фосфолипидов, триацилглицеринов и эфиров холестерина в гомогенате печени (табл. 2.12).

Таблица 2.12

Устойчивость гидропероксидов свободной линоленовой кислоты и линоленовой кислоты, входящей в состав фосфолипидов, триацилглицеринов и эфиров холестерина при инкубации в гомогенате печени*

Время инкубации (мин)	Содержание гидропероксидов в гомогенате печени (нмоль ROOH /мл)**			
	Линолеат	Дилинолеоил-фосфатидилхолин	Трилиноленин	Холестерол-линоленат
0	49,6	65,8	41,5	52,4
1	0,8 ± 0,3	27,4 ± 3,0	19,1 ± 1,6	40,6 ± 4,2
10	0,4 ± 0,3	13,6 ± 1,0	13,7 ± 1,7	36,4 ± 1,3

* - в таблице приведены данные из работы [131].

** - гидропероксид линолевой кислоты получали с помощью липоксигеназы, остальные гидропероксиды путем автоокисления соответствующих липидов, растворяли в изопропиловом спирте и 0,25 мл спиртового раствора добавляли к 5 мл 10 % (вес/объем) гомогената печени.

В отличие от гидропероксидов свободных жирных кислот, фосфолипидов и триацилглицеринов, которые могут легко восстанавливаться до неактивных в отношении инициирования ПОЛ оксигрупп различными глутатионзависимыми пероксидазами [132-136] и поэтому быстро утрачиваются при инкубации, гидропероксиды эфиров холестерина не являются субстратом этих ферментов и сохраняются в гомогенате печени в течение достаточно продолжительного времени. Другими словами, данные, приведенные в табл. 2.12, свидетельствует об отсутствии эффективных механизмов детоксикации гидропероксидов эфиров холестерина в гепатоцитах. Следовательно, существует достаточно высокая вероятность их включения в состав формируемых липопротеидов.

Окисление липидов может происходить и вне организма, например при кулинарной обработке мясных продуктов и особенно при жарке. Пищевые липиды после эмульгации и всасывания в тонком кишечнике поступают в энтероциты, где формируются хиломикроны, с помощью которых липиды через лимфатическую и кровеносную системы разносятся к местам потребления. Часть из них, в том числе жирные кислоты и холестерол, поступают в печень. В процессе всасывания большая часть липопероксидов, в первую очередь гидропероксиды свободных жирных кислот и полиненасыщенных ацилов фосфолипидов, детоксицируется (восстанавливаются) присутствующими в слизистой тонкого кишечника GSH-зависимыми пероксидазами [137]. Тем не менее, показано, что включение в диету здоровых людей сильно окисленного кукурузного масла приводило к значительному увеличению содержания окисленных липидов в хиломикронах [138]. Пока неясно, является ли предварительный липолиз эфиров холестерина необходимым условием их диффузии в

энтероциты и последующего транспорта в составе хиломикронов в печень. Но если при избыточном потреблении жиров или при нарушении системы их кишечного всасывания и транспорта это условие не абсолютно, то гидропероксиды полиеновых эфиров холестерина диетического происхождения вполне могут оказаться в липопротеидах.

Модифицированные ЛПНП (МЛПНП) инициируют два ключевых этапа атерогенеза: воспаление и образование пенистых клеток, – при этом характер атерогенного эффекта МЛПНП зависит от степени их окислительной модификации. Так называемые "минимально окисленные" ЛПНП (МОЛПНП), накапливаясь в интиме сосудистой стенки, способствуют возникновению очага воспаления, являясь сигналом к усиленному проникновению через эндотелий моноцитов и лимфоцитов. Провоспалительный эффект МОЛПНП обусловлен их способностью стимулировать продукцию эндотелиальными клетками хемотаксического протеина моноцитов (MCP-1), других хемоаттрактантов, а также индуцировать экспрессию рецепторных гликопротеинов адгезии на поверхности эндотелия, расположенной непосредственно над формирующимся очагом воспаления. Появление таких рецепторов и, в частности, селектинов Р и Е, факторов межклеточной адгезии ICAM-1, PCAM-1, VCAM-1, приводит к усиленной адгезии на эндотелии иммунокомпетентных клеток. Большую часть, 90 % от всех прикрепившихся клеток, составляют моноциты, остальные 10 % приходятся на Т-лимфоциты [139].

Какая же структурная модификация делает интактные ЛПНП "мало окисленными"? По-видимому, первичного окисления с образованием эндо- и гидропероксидов полиеновых ацилов для этого недостаточно и необходима более глубокая степень окисления. В частности, показано, что свойствами "мало окисленных" обладают ЛПНП, в фосфолипидах которых остаток арахидоновой кислоты окислен до 5-оксивалерьяновой или глутаровой кислот [140].

"Сильно окисленные" ЛПНП (СОЛПНП), но не МОЛПНП, способны связываться со специальными скэвенджер-рецепторами макрофагов, прежнее название – ацетил-ЛПНП рецепторы. В настоящее время выявлено достаточно большое количество таких рецепторов [141], однако только связывание окисленных ЛПНП с SR-A-III и CD36 рецепторами служит сигналом к включению механизмов фагоцитоза и быстрому поглощению СОЛПНП макрофагами [142, 143]. По существу, эта защитная реакция организма. Однако захваченные СОЛПНП по неясным до настоящего времени причинам не могут быть утилизированы лизосомальными ферментными системами, что ведет к превращению фагоцитов в пенистые клетки, то есть макрофаги, переполненные нерасщепленными

до простых молекул липопротеидами. Пенистые клетки очень быстро гибнут, главным образом путем некроза. Их содержимое, в том числе МПО, различные протеолитические и липолитические ферменты, выделяется в матрикс, что в свою очередь приводит к дальнейшему окислению, модификации и агрегации ЛПНП, все более интенсивному образованию и гибели пенных клеток. В результате в области воспаления из продуктов лизиса пенных клеток, главным образом так называемого липидного мусора, начинает формироваться липидное ядро атеросклеротической бляшки [126]. Кроме окисленных липидов, здесь содержатся модифицированные апобелки, остатки тирозина в которых подверглись нитрованию [144]. Параллельно с липидным ядром, вследствие миграции гладкомышечных клеток из меди к эндотелию и образования фиброзной ткани, идет формирование покрышки атеросклеротической бляшки. Процесс атерогенеза может осложняться "надломом" внутренней поверхности сосудистой стенки на границе атеросклеротической бляшки с интактным эндотелием, последующим прилипанием тромбоцитов к сосудистой стенке в области разрыва и образованием пристеночного тромба, создающего реальную угрозу последующего инфаркта или инсульта.

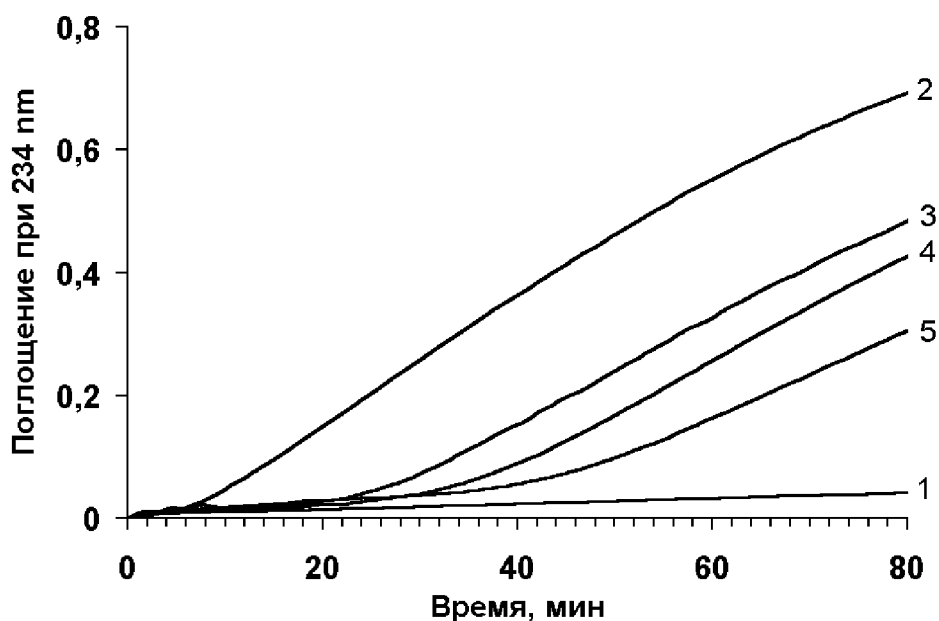


Рис. 2.20. Эффект флавоноидов на временную кинетику МПО-зависимого окисления липидов ЛПНП

1. – Инкубация ЛПНП в системе (глюкоза+глюкозооксидаза) + нитрит-ионы (50 мкМ) без МПО (холостая проба); 2. – окисление ЛПНП в полной системе МПО + (глюкоза+глюкозооксидаза) + нитрит-ионы (50 мкМ); 3. – то же, что и для кривой 2 + рутин (2 мкМ); 4. – то же, что и для кривой 2 + кверцетин (2 мкМ); 5. – то же, что и для кривой 2 + рутин (4 мкМ).

Результаты многочисленных эпидемиологических исследований свидетельствуют, что флавоноиды эффективно снижают риск возникновения у людей сердечно-сосудистых заболеваний [2, 5]. Принимая во внимание важную роль МПО-зависимой окислительной модификации ЛПНП в процессах атерогенеза, логично допустить, что этот фермент может быть одной из наиболее вероятных мишеней биологического действия флавоноидов. Этот вывод подтверждают результаты исследования влияния ряда природных флавоноидов на МПО-зависимое окисление ЛПНП в системе нитрит-ионы:глюкоза:глюкозооксидаза, свидетельствующие об эффективном антиоксидантном действии флавоноидов. В микромолярном диапазоне концентраций они ингибируют окисление ЛПНП, удлиняя продолжительность лаг-периода и снижая скорость окисления ЛПНП (фиг. 2.20). Степень ингибирования для всех флавоноидов монотонно возрастает с увеличением их концентрации, что позволяет рассчитать и корректно использовать для сравнительной оценки эффективности антиоксидантного действия исследованных соединений значения I_{50} , численно равные концентрациям флавоноидов, снижающим скорость окисления ЛПНП в два раза, и значения $ЭД_5$, численно равные концентрациям флавоноидов, удлиняющим продолжительность лаг-периода в 5 раз (табл. 2.13).

Таблица 2.13

Эффективность антиоксидантного действия флавоноидов в условиях перекисного окисления ЛПНП в системе МПО + глюкоза:глюкозооксидаза, + нитрит (50 мкМ)

Флавоноид	I_{50}	АОА, усл.ед	$ЭД_5$	АОА, усл.ед
Кверцетин	2,2	1,00	2,0	1,00
Рутин	3,0	0,73	2,8	0,71
Дигидрокверцетин	3,8	0,58	2,6	0,77
(-) Эпикатехин	4,4	0,50	2,7	0,74
Лютеолин	4,5	0,49	5,8	0,35
Морин	11,1	0,20	10,0	0,20
Кемпферол	>20	<0,05	15,6	0,13

Если проанализировать взаимосвязь между параметрами, характеризующими эффективность антиоксидантного действия флавоноидов при перекисном окислении липидов ЛПНП, инициируемом МПО (табл.2.12), и значениями констант скорости реакции флавоноидов с анион-радикалом кислорода (табл. 2.8), а также значениями ТЕАК (табл.2.9), то можно сделать вывод, что корреляция между эффективностью антиоксидантного действия флавоноидов (АОА) при окислении липопротеидов и значениями тролоксового эквивалента (рис. 2.21 а) значительно выше,

чем корреляция между АОА и антирадикальной активностью флавоноидов по отношению к анион-радикалу кислорода (k) (рис. 2.21 б). Поэтому значения ТЕАК могут быть использованы в качестве предварительного критерия при поиске потенциальных антиатерогенных агентов среди флавоноидов.

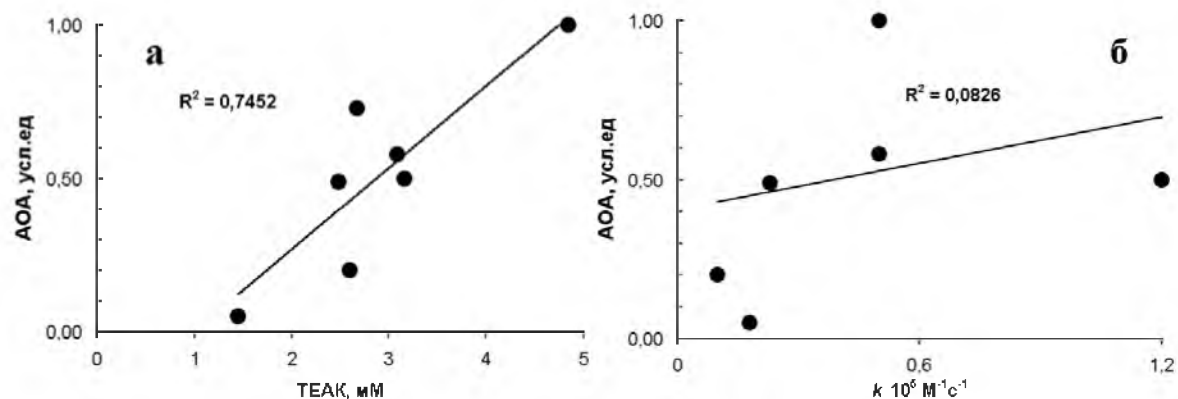


Рис. 2.21. Зависимость между антиоксидантным действием флавоноидов при окислении ЛПНП миелопероксидазой и их антирадикальными свойствами по отношению к ABTS^{*+} (ТЕАК) (а) и $\text{O}_2^{\bullet-}$ (k) (б)

Априори можно предположить, что антиоксидантное действие флавоноидов при окислении ЛПНП миелопероксидазой в системе нитрит-ионы: глюкоза: глюкозооксидаза, обусловлено двумя основными молекулярными механизмами: конкурентным ингибированием пероксидазной активности гемопротеида и прямым антирадикальным действием в отношении образующихся в результате пероксидазных реакций радикалов. Ответ на вопрос, какой из этих механизмов определяет антиоксидантное действие флавоноидов при окислении ЛПНП, позволяет дать анализ приведенных в табл. 2.14 данных.

Таблица 2.14

Скорость окисления некоторых флавоноидов (v_0 , $\mu\text{моль л}^{-1} \text{ мин}^{-1}$) в системе МПО + глюкоза:глюкозооксидаза, без и в присутствии нитрита

Флавоноид, C_0 10 μM	- Нитрит	+ нитрит (50 μM)	Нитрит зависимое окисление
Кверцетин	$0,39 \pm 0,10$	$0,58 \pm 0,10$	0,19
Рутин	0	$0,25 \pm 0,15$	0,25
Лютеолин	$0,51 \pm 0,25$	$0,75 \pm 0,24$	0,24
Морин	$0,14 \pm 0,07$	$0,28 \pm 0,07$	0,14
Кемпферол	$0,96 \pm 0,12$	$0,95 \pm 0,05$	0

В таблице приведены начальные скорости окисления кверцетина, рутина, лютеолина, морина и кемпферола в системе МПО + глюкоза:глюкозооксидаза, без и в присутствии нитрита (50 μM),

а также величины разности этих значений, характеризующие скорость нитрит-зависимого окисления флавоноидов. Выбор данных соединений обусловлен наличием у них типичной полосы поглощения 1, обесцвечивающейся при их окислении, что дает возможность определить начальные скорости окисления (v_0) по изменению величины поглощения при λ_{\max} (ΔA). Пересчет значений ΔA в количество мкмоль окисленных флавоноидов производился в соответствии с законом Ламберта-Бера: $C = \Delta A / \varepsilon$, где ε , коэффициент молярной экстинкции, равный $8,0 \cdot 10^3 \cdot \text{M}^{-1} \text{см}^{-1}$ для рутина и лютеолина, и $11,0 \cdot 10^3 \cdot \text{M}^{-1} \text{см}^{-1}$ для кверцетина, морины и кемпферола. Значения ε получали из уравнения $\varepsilon = \Delta A_{\max} / C$, где ΔA_{\max} – разность поглощения при λ_{\max} полосы 1 до и после полного окисления флавоноида. Для полного окисления флавоноидов использовали пероксинитрит (см. рис. 2.4-2.6).

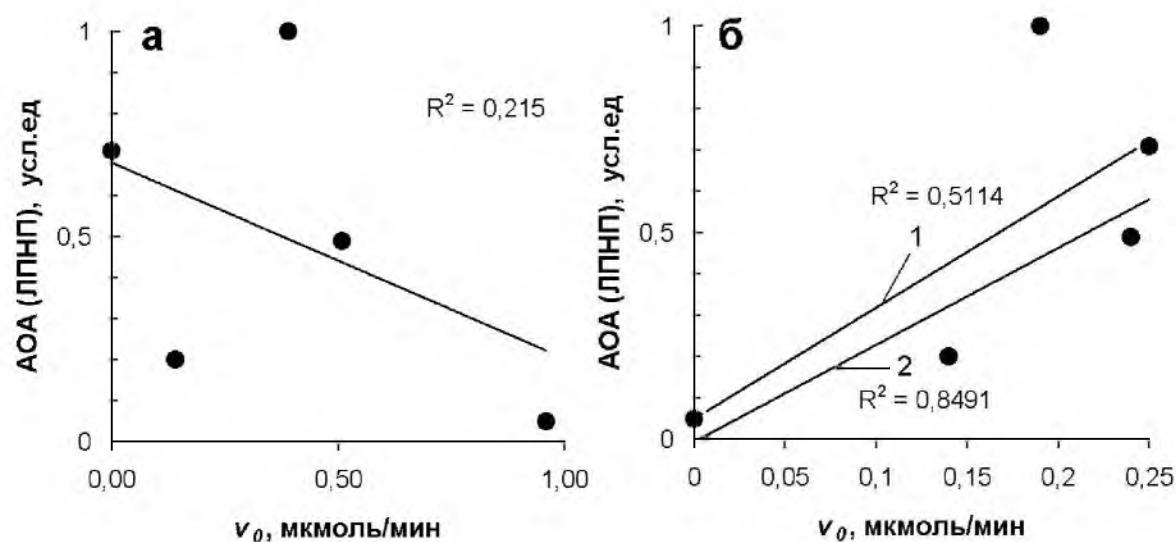


Рис. 2.22. Зависимость между антиоксидантным действием флавоноидов при окислении ЛПНП миелопероксидазой и скоростью их пероксидазного (а) и радикального (б) окисления миелопероксидазой

С большой долей вероятности можно допустить, что скорость пероксидазного окисления флавоноидов в системе МПО + глюкоза: глюкозооксидаза определяет их способность конкурентно ингибировать МПО зависимые редокс-процессы, включая активацию нитритов. Тогда как скорость окисления флавоноидов NO_2^{\cdot} -подобными радикалами, образующимися при активации нитрит ионов миелопероксидазой (нитрит-зависимое окисление), характеризует эффективность антирадикального действия. Анализ зависимости между антиоксидантным действием флавоноидов при окислении ЛПНП миелопероксидазой и скоростью их пероксидазного и радикального окисления миелопероксидазой (рис. 2.22) свидетельствует об отсутствии взаимозависимости между антиоксидант-

ным действием флавоноидов и эффективностью их пероксидазного окисления. Более того, рутин, не окисляющийся МПО по пероксидазному механизму ($v_0=0$), является одним из наиболее эффективных антиоксидантов при окислении ЛПНП. В то же время существует достаточно выраженная корреляция между антиоксидантным действием флавоноидов и скоростью их радикального окисления миелопероксидазой (линия 1 на рис. 2.22б). Достоверность данной корреляции существенно повышается, если не учитываются данные по кверцетину (линия 2 на рис. 2.22б). Следует отметить, что в данном случае исключение кверцетина вполне обоснованно, поскольку его редокс превращения в системе МПО + глюкоза: глюкозооксидаза: ЛПНП принципиально отличается от редокс поведения других исследованных флавоноидов.

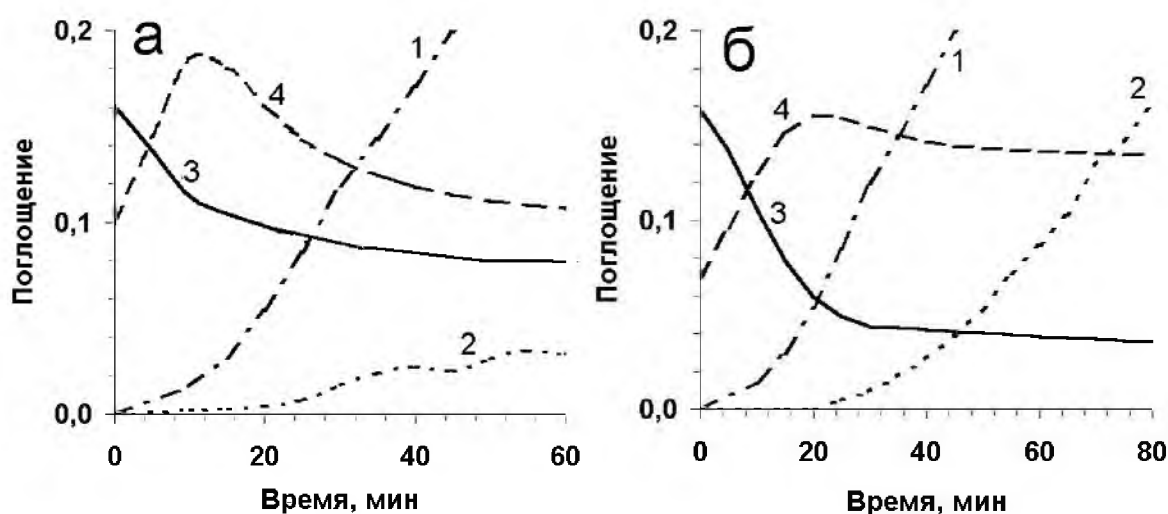


Рис. 2.23. Кинетика образования диеновых конъюгатов в ЛПНП (1,2), расходования флавоноида (3) и образования промежуточного продукта его окисления (4), флавоноид: кверцетин (а) и морин (б).

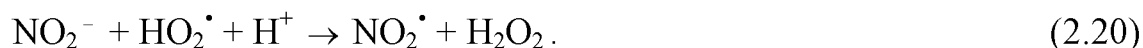
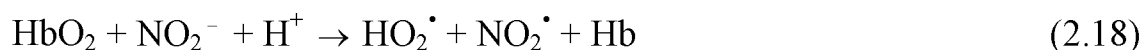
10 мкМ ЛПНП инкубировали в полной системе МПО + (глюкоза+глюкозооксидаза) + нитрит-ионы (50 мкМ) без (1) и в присутствии 10 мкМ флавоноида (2, 3, 4). О накоплении диеновых конъюгатов судили по возрастанию поглощения при 234 нм, о расходовании кемпферола - по исчезновению полосы 1 с максимумом поглощения при 375 нм у кверцетина и 390 нм у морина, промежуточные продукты окисления обоих флавоноидов регистрировали по поглощению при 330 нм.

В частности, при пероксидазном и радикальном окислении кверцетина образуется промежуточный продукт, имеющий новый хромофор с максимумом поглощения 330 нм и обладающий эффективным антиоксидантным действием в отношении МПО-зависимого окисления ЛПНП (рис. 2.23 а). При окислении других флавонол-агликонов также образуются продукты с аналогичными спектральными свойствами. Однако в случае морина образующийся продукт дальнейшему окислению практически не подвергается и антиоксидантным действием не обладает

(рис. 2.23 б), а продукт окисления кемпферола хотя и подвергается дальнейшему окислению, но оказывает при этом не антиоксидантное, а выраженное прооксидантное действие (см. раздел 2.4.3 Прооксидантное действие флавоноидов). В случае рутина и лютеолина промежуточных продуктов пероксидазного и радикального окисления, обладающих антиоксидантным действием, также не выявлено. Таким образом, аномально высокая антиоксидантная активность кверцетина обусловлена суммированием эффектов исходного флавоноида и промежуточного продукта (продуктов) его окисления. Резюмируя рассмотренные выше данные можно сделать вывод, что антиоксидантное действие флавоноидов при окислении ЛППП миелопероксидазой в системе нитрит-ионы: глюкоза: глюкозооксидаза, обусловлено, главным образом, прямым антирадикальным действием в отношении NO_2^\cdot -подобных радикалов.

Эффект флавоноидов на процессы метгемоглобинообразования при взаимодействии нитритов с гемоглобином

Взаимодействие нитритов с гемоглобином является одним из основных путей утилизации нитритов *in vivo*. Однако эта реакция представляет опасность для эритроцитов и организма в целом, поскольку ведет к генерации активных форм азота и метгемоглобинообразованию, вызывая нарушение кислородтранспортной функции крови. Предполагают, что процесс метгемоглобинообразования, инициируемый нитритами, протекает по вырожденно-разветвленному цепному ион-радикальному механизму, где стадия зарождения цепи описывается уравнением 2.18, а стадия продолжения цепи уравнениями 2.19, 2.20 [145].



Хотя детальный механизм нитритного окисления гемоглобина до метгемоглобина полностью не выяснен, тем не менее, методами ингибиторного анализа установлено участие в этом процессе активных форм кислорода и азота [146, 147]. Выше было показано, что флавоноиды являются эффективными ловушками анион-радикала кислорода и NO_2^\cdot -подобных радикалов. Учитывая этот факт, несомненный интерес представляет исследование способности флавоноидов защищать гемоглобин от метгемоглобинообразующего действия нитритов. На рис. 2.24 а представлены спектры поглощения лизатов, полученных из эритроцитов до и после их инкубации с нитритом натрия, без и в присутствии флавоноидов [148].

Для видимой области электронного спектра поглощения оксигемоглобина характерны две Q-полосы в длинноволновой части спектра, имеющие при физиологических условиях среды максимумы при 541 и 577 нм. В спектре поглощения метгемоглобина Q-полосы существенно деформированы, но появляется полоса поглощения при 620 – 630 нм [149, 150]. Как следует из рис. 2.24 а, спектр поглощения лизатов интактных эритроцитов (спектр 1) представляет собой типичный спектр поглощения оксигемоглобина, тогда как спектр поглощения лизатов эритроцитов, инкубированных 5 мин с нитритом натрия (спектр 2), свидетельствует о большом содержании в обработанных лизатах метгемоглобина.

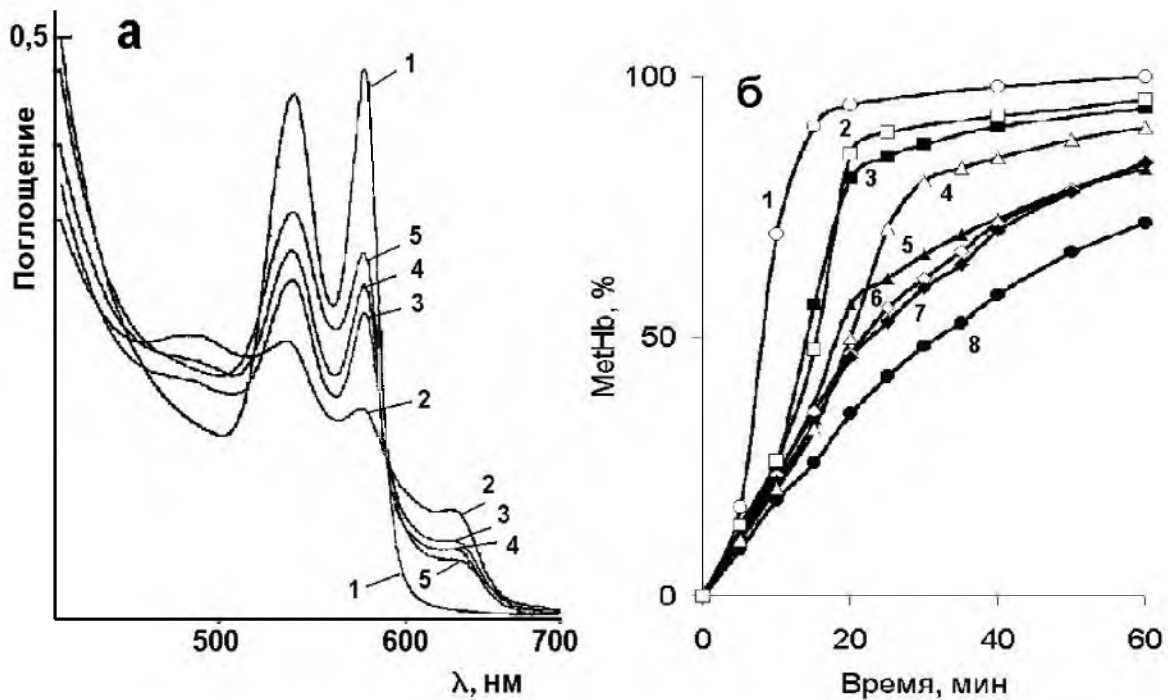


Рис. 2.24. (а)-Спектры поглощения гемоглобина до (1) и после инкубации эритроцитов с 17 мМ нитритом натрия (5 мин) без (2) и в присутствии 160 мкМ дигидрокверцетина (3), рутина (4) и кверцетина (5); (б) Кинетика метгемоглобинообразования, инициируемого в лизатах эритроцитов 4,5 мМ NaNO₂, без (1) и в присутствии флавоноидов (0,5 мкМ): таксифолин (2), рутин (3), эпикатехин (4), кемпферол (5), лютеолин (6), морин (7), кверцетин (8)

На основании полученных спектров рассчитаны исходная концентрация оксигемоглобина в среде инкубации ($36,7 \pm 0,7$ мкМ) и концентрация метгемоглобина, образующегося через 5 мин инкубации суспензии эритроцитов с нитритом натрия ($27,5 \pm 1,2$ мкМ). Флавоноиды дигидрокверцетин (2.24 а, спектр 3), рутин (2.24 а, спектр 4) и кверцетин (2.24 а, спектр 5) в концентрации 160 мкМ ингибируют инициируемый нитритом натрия процесс образования metHb в эритроцитах. Чтобы выяснить, не

является ли эффект флавоноидов на NaNO_2 -инициируемое образование метгемоглобина следствием прямого восстановления ими трехвалентного железа metHb , флавоноиды (160 мкМ) добавляли не перед, а после инкубации эритроцитов с нитритом натрия (10 мМ) и затем инкубировали 60 мин (перед добавлением флавоноидов эритроциты гемолизировались). В момент добавления флавоноидов в среду инкубации гемолизат содержал $10,8 \pm 1,8$ мкМ метгемоглобина, и его содержание практически не изменилось после инкубации с флавоноидами. Таким образом, рутин, кверцетин и дигидрокверцетин не обладают метгемоглобинредуктазной активностью и влияют непосредственно на процесс NaNO_2 -инициируемого метгемоглобинообразования.

Для количественной оценки способности флавоноидов предотвращать NaNO_2 -инициируемое образование метгемоглобина можно использовать не интактные эритроциты, а их лизаты. В этом случае процесс метгемоглобинообразования протекает при значительно более низких концентрациях нитрита натрия (4,5 мМ). На рис. 2.24 б представлены кинетические кривые, характеризующие процесс образования metHb , инициируемого NaNO_2 в лизатах эритроцитов, без и в присутствии флавоноидов. Зависимость метгемоглобинообразования от времени инкубации представляет собой S-образную кривую (линия 1) с достаточно выраженным начальным периодом медленного окисления, продолжительностью около 5 мин, и последующей автокаталитической стадией быстрого окисления, выходящей на плато через 20-25 мин. Все исследованные флавоноиды, уже в концентрациях меньших 1 мкМ, оказывают ингибирующее действие на NaNO_2 -инициируемый процесс метгемоглобинообразования в лизатах эритроцитов (рис. 2.24 б, линии 2-8). Однако ингибирующее действие флавоноидов проявляется только в отношении автокаталитической стадии и даже при высоких концентрациях (20 мкМ) эти соединения не влияли на "медленное" окисление гемоглобина. Например, максимальный ингибирующий эффект кверцетина наблюдался уже при концентрации 0,5 мкМ (рис. 2.24 б, линия 8) и дальнейшее повышение концентрации флавоноида на скорость метгемоглобинообразования не влияло. Чтобы количественно оценить эффективность флавоноидов на основании зависимости доза-эффект, были определены концентрации флавоноидов, предотвращающие процесс metHb -образования на 50 % (I_{50}), и производные от них значения АОА (табл. 2.15). Как свидетельствуют данные таблицы 2.15, по эффективности ингибирования процесса NaNO_2 -инициируемого образования метгемоглобина в лизатах эритроцитов флавоноиды располагаются следующим образом: кверцетин > лютеолин = кемпферол > морин = эпикатехин > дигидрокверцетин = рутин.

Таблица 2.15

Эффективность ингибирования (I_{50}) флавоноидами NaNO_2 -инициируемого процесса метгемоглобинообразования в лизатах эритроцитов

Флавоноиды	Значения I_{50} , мкМ	АОА, усл. ед.
Кверцетин	0,11	1,0
Рутин	0,80	0,138
Дигидрокверцетин	0,77	0,143
(-) Эпикатехин	0,40	0,275
Лютеолин	0,23	0,478
Морин	0,37	0,297
Кемпферол	0,23	0,478

По-видимому, большой вклад в антимергемоглобинообразующее действие флавоноидов вносит реакция с NO_2^\cdot -подобными радикалами, а не анион-радикалом кислорода. Этот вывод вытекает из анализа ряда опубликованных работ, авторы которых не выявили эффекта СОД на процессы нитрит-зависимого образования метгемоглобина, либо этот эффект заключался только в увеличении продолжительности лаг-периода реакции [146, 151]. Кроме того, как можно видеть из рис. 2.25, отсутствует корреляция между антиоксидантным действием флавоноидов в условиях нитритного окисления ферро-форм гемоглобина и образования метгемоглобина (АОА) и их антирадикальными свойствами по отношению к $\text{O}_2^{\cdot-}$.

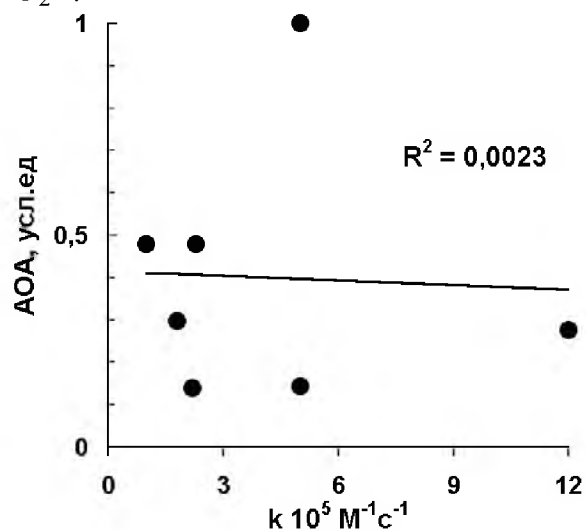


Рис. 2.25 Зависимость между антиоксидантным действием флавоноидов в условиях NaNO_2 -инициируемого образования метгемоглобина (АОА) и их антирадикальными свойствами по отношению к $\text{O}_2^{\cdot-}$ (k)

В целом, основываясь на данных, изложенных в данном разделе, можно сделать вывод, что флавоноиды способны влиять на процессы метгемоглобинообразования, перехватывая NO_2^\cdot -подобные радикалы и анион-радикал кислорода, ингибируя, вследствие этого, реакции 2.19 и 2.20 стадии продолжения цепи.

2.4.2.3 Защитное действие флавоноидов в условиях клеточного окислительного стресса

Окислительный стресс в отдельных клетках и организме в целом характеризуется преобладанием продукции АФК и других биорадикалов над их утилизацией различными антирадикальными системами. Известно, что умеренный окислительный стресс может стимулировать пролиферацию клеток или, напротив, запустить реализацию программы гибели клетки – апоптоз. Сильный окислительный стресс ведет к повреждению цитоскелета и хромосомного аппарата и в итоге – гибели клеток и некрозу ткани. Десятки заболеваний, включая сердечно-сосудистые, СПИД, рак, диабет, ревматоидный артрит, эпилепсию, катаракты и многие другие сопровождаются развитием окислительного стресса. И хотя во многих случаях окислительный стресс является не причиной, а одним из симптомов заболевания, имеются убедительные свидетельства эффективного профилактического и терапевтического применения природных антиоксидантов, в том числе флавоноидов (кверцетин, рутин, катехины зеленого чая) [9, 152, 153].

Одним из примеров, когда клеточный окислительный стресс играет ключевую роль в развитии патогенетических процессов, является гиперпродукция АФК фагоцитирующими клетками при их взаимодействии с так называемыми фиброгенными минеральными волокнами, в первую очередь – волокнами асбеста. Для нейтрофилов, макрофагов и других фагоцитирующих клеток генерация активных форм кислорода и инициирование свободнорадикальных процессов является нормальной физиологической реакцией, сопровождающей фагоцитоз различных инфекционных агентов. Анион-радикал кислорода и другие АФК продуцируются в результате так называемого дыхательного взрыва НАДФН-оксидазным комплексом, локализованным на внешней стороне плазматической мембраны фагоцитирующих клеток. Кроме продукции АФК, дыхательный взрыв характеризуется возрастанием потребления фагоцитирующими клетками кислорода, усилением в них катаболизма глюкозы и образования НАДФН через гексозомонофосфатный шунт. При этом практически весь потребляемый кислород расходуется на образование АФК. Сигналом к инициированию дыхательного взрыва является контакт фагоцита с тем или иным инфекционным агентом или даже нейтральным стимулом, например частицами латекса, и последующая активация НАДФН-оксидазного комплекса протеинкиназой С (рис. 2.26).

Образующиеся АФК, которые наиболее часто определяют с помощью люцегенин-усиленной хемилюминесценции (рис. 2.27), прямо или опосредовано через катализируемые миелопероксидазой реакции (см. урав-

нения 2.8-2.10) осуществляют бактерицидные функции в отношении различных инфекционных агентов. Важное значение АФК, продуцируемых НАДФН-оксидазой для защиты организма от проникающих бактерий, подтверждается тем, что при мутациях, ведущих к инактивации этого ферментного комплекса, возникает хронический септический грануломатоз [5]. В этом случае фагоцитированные микроорганизмы остаются живыми, что приводит к повторным хроническим инфекциям и чревато сепсисом.

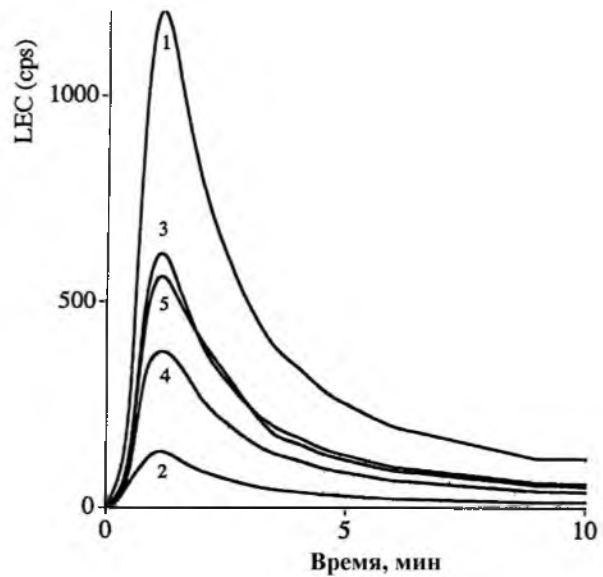
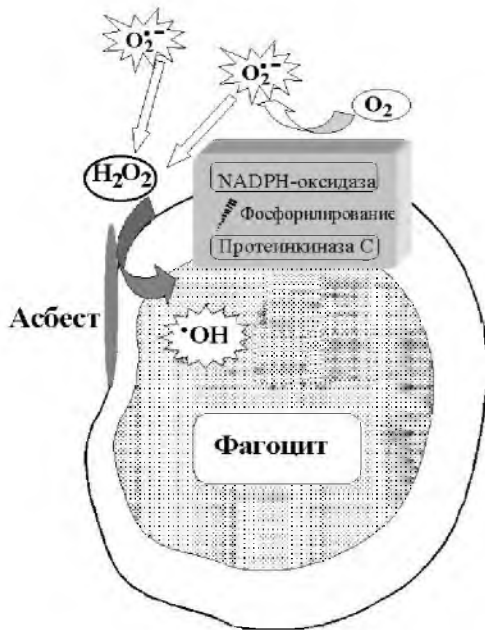


Рис. 2.26. Механизм генерация активных форм кислорода (АФК) фагоцитами в присутствии волокон асбеста

Рис. 2.27. Интенсивность люцегенин – усиленной хемилюминесценции перитонеальных макрофагов индуцированная волокнами хризотила. Клетки $2 \cdot 10^6$ /мл инкубировались с 2 мг/мл асбеста без (1) и в присутствии 10 мкМ (2) и 2 мкМ кверцетина (3), 40 мкМ (4) и 15 мкМ рутина (5).

В норме, после того как инфекционный агент погибает, дыхательный взрыв завершается, при этом повреждающий эффект АФК в отношении самих фагоцитирующих клеток и прилегающих к очагу инфекции тканей минимален. Совершенно другая ситуация складывается в случае фагоцирования нейтрофилами или альвеолярными макрофагами минеральных волокон. Если для патогенных микроорганизмов АФК губительны, то минеральные волокна при воздействии АФК остаются неизменными и продолжают стимулировать активность фагоцитов (гиперпродукция АФК), что приводит к окислительному повреждению, а затем гибели самих фагоцитов, возникновению структурно-функциональных нарушений [154, 155] и мутагенных эффектов [156] в других клетках и близлежащих

тканях. Цитотоксическое действие АФК в отношении собственных клеток существенно усиливается благодаря некоторым физико-химическим особенностям минеральных волокон. Токсичность асбеста, в частности хризотила и крокидолита, зависит от его физических характеристик – растворимости, площади поверхности, заряда, геометрии частиц. Например, неволокнистые частицы представляют значительно меньшую опасность как в отношении фиброзогенного, так и канцерогенного действия в легких, чем химически аналогичные волокна – частицы, имеющие соотношение длины и диаметра более чем 3:1 [157]. Однако особенно важную роль в реализации цитотоксического действия волокон асбеста играют ионы переходных металлов, в первую очередь железа, входящие в состав минералов. Содержание железа в волокнах крокидолита (амфиболы) может составлять 26-36 %, а в волокнах хризотила (серпентины) – 2-6 % [158].

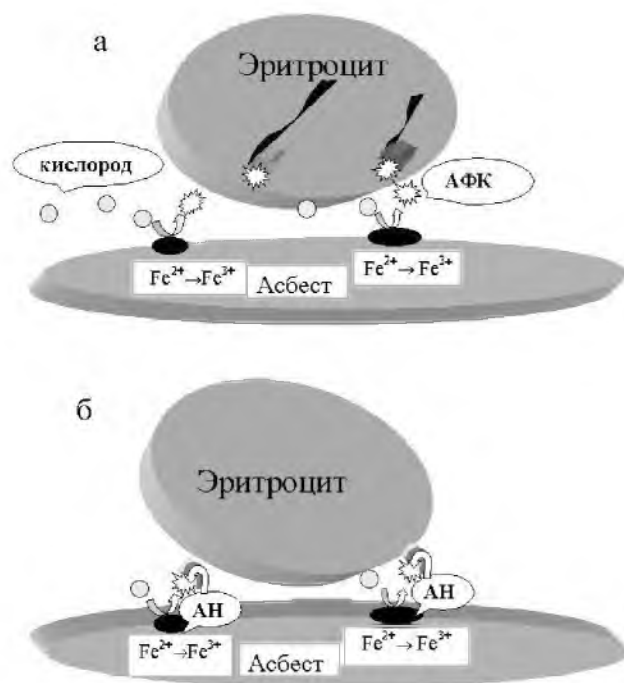


Рис.2.28. Механизм гемолитического действия волокон асбеста (а) и сайт-специфичный эффект молекул потенциального антиоксиданта (АН) (б)

Значительная часть ионов железа, входящего в состав асбестов, редокс-активна и способна катализировать на поверхности волокон железокатализируемую реакцию Хабера-Вейса (см. уравнение 1.14-1.16), в результате которой образуется агрессивный гидроксильный радикал [158, 159]. Более того, ионы железа способны катализировать на поверхности минеральных волокон

реакции одноэлектронного восстановления кислорода и образования супероксида, который затем вовлекаются в реакцию Хабера-Вейса [158], что приводит при инкубации с асбестом к повреждению клеток, лишенных способности к фагоцитозу и дыхательному взрыву, в частности – к гемолизу эритроцитов. Благодаря тому, что гидроксильный радикал и другие цитотоксичные агенты, образующиеся на поверхности асбеста, химически чрезвычайно активны, повреждение клетки мишени происходит только непосредственно в зоне активации молекулярного кислорода, т.е. имеет место так называемый сайт-специфический эффект (рис. 2.28 а). Очевидно, что для того, чтобы фармакологический агент мог эф-

эффективно защищать клетки, недостаточно только высокой антирадикальной активности, то есть способности перехватывать радикалы, он также должен обладать сайт-специфичными свойствами. Сайт-специфическое связывание может быть обусловлено формированием комплекса антирадикального агента с ионами металлов на поверхности волокна асбеста, в частности, с ионами железа (рис. 2.28 б).

Асбест-индуцированный окислительный стресс в фагоцитирующих и нефагоцитирующих клетках *in vitro* является удобной моделью для исследования взаимосвязи между антирадикальной и цитопротекторной активностью различных соединений. В качестве модельных объектов удобно использовать перитонеальные макрофаги. Процедура выделения этих клеток достаточно простая и не требует использования дорогостоящих реактивов. Количество клеток, получаемых от одного животного (25-30 млн.), достаточно для исследования цитопротекторного действия различных агентов с помощью как микроскопических, так и биохимических (по выходу цитоплазматического фермента лактатдегидрогеназы) методов. По своей морфо-функциональной характеристике перитонеальные макрофаги практически не отличаются от альвеолярных макрофагов. Оба типа клеток дифференцировались от моноцитов, относящихся к агранулоцитам, и относятся к свободным макрофагам [160, 161]. Инкубация перитонеальных макрофагов с волокнами хризотил-асбеста приводит к резкому увеличению продукции анион-радикала кислорода, оцениваемому с помощью люцегенин-усиленной хемилюминесценции (см. рис.2.27). Продукция АФК ведет к быстрому расходованию эндогенных антиоксидантов (GSH), иницированию ПОЛ и образованию ТБК-активных продуктов (ТБКАП) в клеточных мембранах, что приводит к их повреждению и выходу цитоплазматических ферментов, а затем – и к лизису клеток (табл. 2.16).

Таблица 2.16

Цитотоксические последствия инкубации перитонеальных макрофагов крыс с волокнами хризотил-асбеста в течение 20 мин при 37 °С^а

Условия эксперимента	Выход ЛДГ, %	Количество клеток, млн./мл	GSH, мкМ	ТБКАП нмоль/мл
Контроль	19 ± 4	7,5 ± 0,6	7,3 ± 2,0	0
+ асбест, 3 мг/мл	86 ± 12*	1,0 ± 0,2*	3,1 ± 1,5*	0.77 ± 0.05*

* - значения достоверны (P < 0,01) по отношению к контролю.

^а – данные из работы [162].

О ключевой роли анион-радикала кислорода в повреждении фагоцитирующих клеток асбестом свидетельствуют результаты ингибиторного анализа с использованием ряда близких по структуре, но различающихся по эффективности антирадикального действия в отношении O₂^{•-}, флаво-

ноидов: рутина, дигидрокверцетина, кверцетина, эпикатехин-галлата (ЭКГ) и эпигаллокатехин-галлата (ЭГКГ).

В этих экспериментах оценивалась способность данных флавоноидов защищать фагоцитирующие клетки от асбест-индуцированного повреждения. Количественно эффективность цитопротекторного действия (ЭЦД) может быть охарактеризована величиной I_{50} , численно равной концентрации флавоноидов, при которой количество поврежденных клеток снижается на 50 %. Однако более удобно ЭЦД оценивать в относительных единицах. В этом случае ЭЦД наиболее эффективного цитопротекторного агента – эпигаллокатехин-галлата принимали за единицу, а ЭЦД других соединений рассчитывали по формуле:

$$\text{ЭЦД}_{\text{фл}} = 1 \cdot (I_{50 \text{ ЭГКГ}} / I_{50 \text{ Фл}})$$

Значения I_{50} и ЭЦД для исследованных соединений приведены в табл. 2.17. Из приведенных в таблице значений следует, что эффективность цитопротекторного действия исследованных флавоноидов возрастает в ряду рутин < дигидрокверцетин < кверцетин < ЭКГ < ЭГКГ, при этом катехины ЭГКГ и ЭКГ защищают клетки от лизиса более чем в 20 раз эффективнее, чем рутин.

Таблица 2.17

Значения I_{50} и эффективность цитопротекторного действия флавоноидов при асбест-индуцированном повреждении перитонеальных макрофагов

Флавоноид	I_{50} , мкМ	ЭЦД*, усл. ед.
Рутин	275	0,036
Дигидрокверцетин	150	0,067
Кверцетин	39	0,26
Эпикатехин галлат	12	0,80
Эпигаллокатехин галлат	10	1,00

- ЭЦД наиболее эффективного цитопротекторного агента ЭГКГ принимали за единицу, а ЭЦД других соединений рассчитывали по формуле: $\text{ЭЦД}_{\text{фл}} = 1 \cdot (I_{50 \text{ ЭГКГ}} / I_{50 \text{ Фл}})$

Сравнение величин ЭЦД и значений констант скорости реакции флавоноидов с анион-радикалом кислорода методом корреляционного анализа позволяет сделать вывод о наличии прямой зависимости между эффективностью цитопротекторного действия флавоноидов в условиях развития окислительного стресса *in vitro* и их антирадикальной активностью по отношению к $\text{O}_2^{\cdot -}$ (рис. 2.29 а). Значительно хуже корреляция у исследованных флавоноидов между величинами ЭЦД и тролоксовым эквивалентом (рис. 2.29 б).

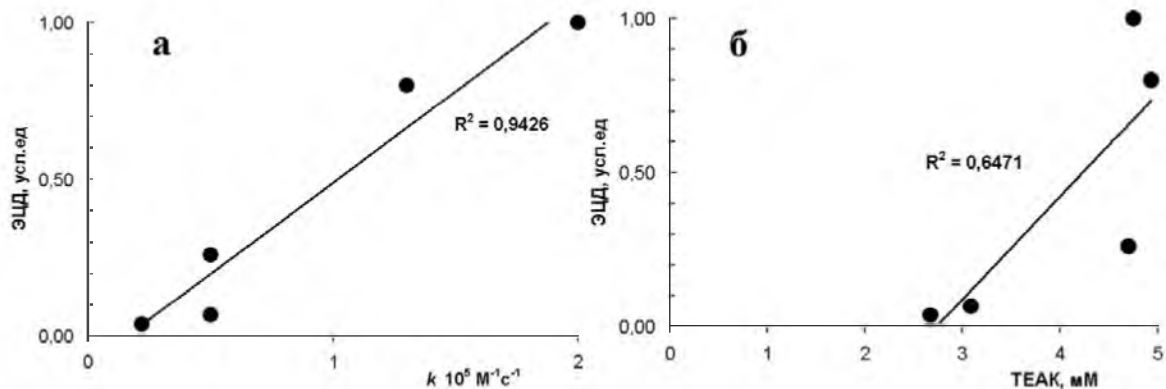


Рис. 2.29. Зависимость между эффективностью цитопротекторного действия флавоноидов и их антирадикальными свойствами по отношению к $\text{O}_2^{\cdot-}$ (k) (а) и $\text{ABTS}^{+\cdot}$ (TEAC) (б)

Выше было показано, что окисление анион-радикалом кислорода флавонолов, в частности кверцетина и рутина, сопровождается характерными изменениями в их спектрах. Аналогичные изменения были зарегистрированы в спектрах кверцетина (рис. 2.30 а) и рутина (рис. 2.30 б) в присутствии активированных асбестом перитонеальных макрофагов. При добавлении в среду инкубации фермента СОД (100 мкг/мл), катализирующего реакцию дисмутации $\text{O}_2^{\cdot-}$, практически полностью ингибировалось окисление рутина, а окисление кверцетина – на 50 %.

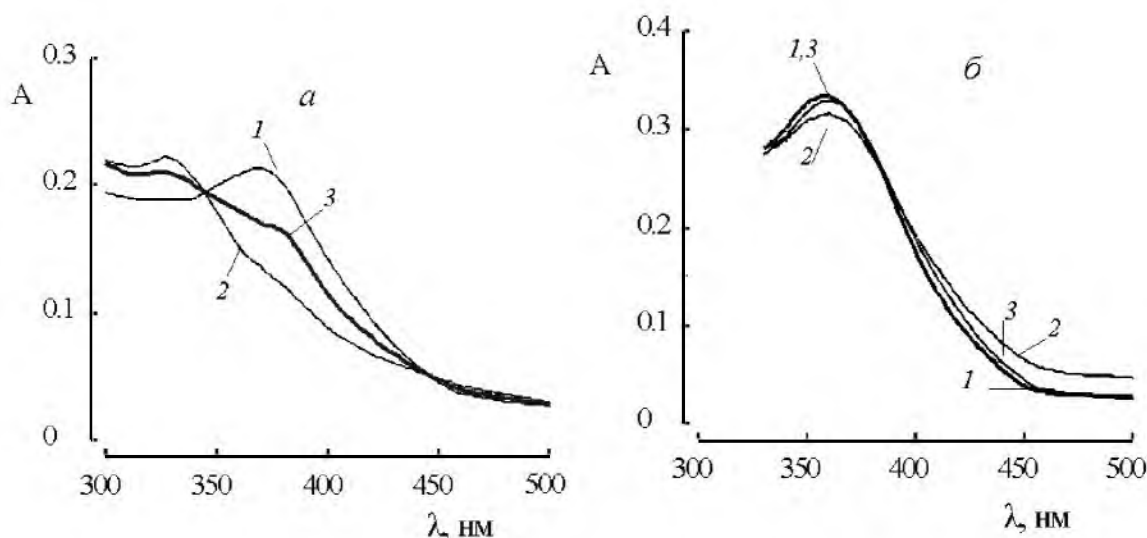


Рис. 2.30. Типичное изменение спектра поглощения при окислении кверцетина (а) и рутина (б) в системе, содержащей перитонеальные макрофаги и асбест

Перитонеальные макрофаги ($2 \cdot 10^6$ клеток/мл) инкубировали при 37°C в изотоническом фосфатном буфере, pH 7,3, содержащем хризотил асбест (2 мг/мл), 60 мкМ кверцетина или рутина. Пробы центрифугировали и регистрировали спектр поглощения супернатанта, разбавленного в 2,5 раза. 1 – исходные спектры флавоноидов; 2 – спектры флавоноидов после 20 мин инкубации; 3 – спектры флавоноидов после 20 мин инкубации в присутствии 100 мкг/мл СОД.

Приведенные в этом разделе экспериментальные данные подтверждают ключевую роль анион-радикала кислорода в механизме повреждения и гибели фагоцитирующих клеток волокнами асбеста и доказывают, что флавоноиды способны перехватывать анион-радикал кислорода, образующийся в процессе асбест-индуцированного дыхательного взрыва в перитонеальных макрофагах. Следствием антирадикального действия флавоноидов является ингибирование реакции Фентона и других процессов с участием $O_2^{\cdot-}$, а на клеточном уровне – выраженный цитопротекторный эффект в отношении фагоцитирующих клеток. Ранее было показано, что флавоноиды ингибируют мутагенное действие минеральных волокон в лимфоцитах *in vitro* [156]. По-видимому, антимуtagenное действие флавоноидов также обусловлено их антирадикальными свойствами.

2.4.3 Прооксидантное действие флавоноидов

Флавоноиды не являются однородной группой соединений со сходными химическими свойствами, некоторые из них при определенных условиях могут окисляться молекулярным кислородом. Например, кверцетин и кемпферол легко окисляются в 0,02 М фосфатном буфере, значение рН которого доведено до 10 путем добавления тетраметилэтилендиамина (ТМЭДА) (см. рис. 2.6 г), тогда как рутин, лютеолин, морин и дигидрокверцетин в этих условиях не аутооксидабельны. Поскольку в силу спиновых ограничений триплетная молекула кислорода не может непосредственно взаимодействовать с флавоноидами, можно предположить, что молекулярный механизм реакции аутоокисления кверцетина и кемпферола включает стадию образования АФК. С целью определения активных форм кислорода, участвующих в процессе аутоокисления кверцетина в присутствии ТМЭДА, в среду инкубации добавляли: СОД – фермент, катализирующий реакцию дисмутации анион-радикала кислорода; азид натрия, используемый как ловушка синглетного кислорода; и каталазу – фермент, разлагающий пероксид водорода и предотвращающий образование гидроксильного радикала в реакции Фентона.

Оказалось (табл. 2.18), что реакция аутоокисления кверцетина тормозится супероксиддисмутазой на 30 % уже при концентрации СОД 0,7 нг/мл и с увеличением концентрации ингибирующее действие этого фермента монотонно возрастает. При содержании СОД 170 нг/мл аутоокисление кверцетина ингибируется более чем на 90 %. Азид натрия и каталаза не оказывают влияния на процесс аутоокисления кверцетина (табл. 2.19).

Таблица 2.18

**Влияние некоторых перехватчиков АФК на реакцию аутоокисления
кверцетина (14 мМ)**

Добавляемый агент		Количество окисленного кверцетина*, %
контроль		100
Азид натрия	6 мМ	100
	60 мМ	100
Каталаза	0,2 мкг/мл	100
	2,0 мкг/мл	100
	20,0 мкг/мл	100
СОД	0,7 нг/мл	70
	1,7 нг/мл	51
	3,4 нг/мл	20
	17,0 нг/мл	8
	170,0 нг/мл	6

* - аутоокисление кверцетина проводили при комнатной температуре в 0,175 М фосфатном буфере, рН 7,8, содержащем 0,07 мМ ЭДТА, 0,7 мМ ТМЭДА в конечном объеме 3,5 мл; время окисления 20 мин; В таблице представлены средние значения трех экспериментов, различия значений не превышали \pm 5% [163];

Эти результаты свидетельствуют, что процесс аутоокисления кверцетина в присутствии ТМЭДА включает стадию образования анион-радикала кислорода (2.21) и, по-видимому, обусловлен цепным свободнорадикальным окислением (чередование свободнорадикальных реакций 2.22 и 2.23) аналогично тому, как это имеет место при окислении гидрохинонов и катехоламинов [164, 165]:



Высокая чувствительность реакций 2.21-2.23 к действию СОД была использована для создания простого и удобного спектрофотометрического метода определения активности этого фермента, основанного на определении скорости аутоокисления кверцетина, без и в присутствии СОД [20, 166].

Образующийся при аутоокислении кверцетина анион-радикал кислорода не только способен в качестве интермедиата участвовать в свободнорадикальном окислении молекулы флавоноида, но может взаимодействовать и с другими субстратами. Об этом свидетельствует восстанов-

ление п-нитротетразолия хлористого (ПНТХ) при совместной инкубации ПНТХ и кверцетина (табл. 2.19).

Таблица 2.19

Восстановление п-нитротетразолия хлористого (0,5 мМ) при аутоокислении кверцетина (14 мМ) при различных экспериментальных условиях*

Добавляемые реагенты	$\Delta D_{515}/10$ мин
ПНТХ	$0,009 \pm 0,002$
Кверцетин	0,000
ПНТХ + Кверцетин	$0,080 \pm 0,005$
ПНТХ + Кверцетин + СОД (170 нг/мл)	$0,008 \pm 0,002$
ПНТХ + Кверцетин (частично анаэробные условия)	$0,046 \pm 0,005$

* - эксперименты проводили при комнатной температуре в 0,175 М фосфатном буфере, рН 7,8, содержащем 0,07 мМ ЭДТА, 0,7 мМ ТМЭДА. Время инкубации 10 мин [20, 163]

ПНТХ часто используется в качестве индикатора образования анион-радикала кислорода [95, 167-170], поскольку продукт его восстановления – диформаза – имеет максимум поглощения при 515 нм и может легко быть определен спектрофотометрически. Образование диформаза при совместной инкубации ПНТХ и кверцетина не может быть обусловлено прямым восстановлением ПНТХ флавоноидом, поскольку эта реакция протекает значительно менее эффективно после удаления кислорода из среды инкубации в результате 5-минутного барбатирования азотом и полностью ингибируется судпероксиддисмутазой (табл. 2.19).

Представляет интерес и исследование способности флавоноидов инициировать процессы образования метгемоглобина в эритроцитах [148]. Полученные в этой работе результаты свидетельствуют, что из всех исследованных флавоноидов: рутина, кверцетин, дигидрокверцетин и эпикатехин-галлата, – только кверцетин инициирует процесс метгемоглобинообразования (табл. 2.20). Установлено, что при концентрации кверцетина 40 мкМ через 3 часа инкубации окисляется 5,5 % гемоглобина эритроцитов. С увеличением концентрации флавоноида количество образующегося метгемоглобина увеличивается, и при концентрации кверцетина 320 мкМ за 3 часа окисляется 42,2 % гемоглобина.

По-видимому, инициирование образования метгемоглобина, как и другие рассмотренные в этом разделе проявления прооксидантного действия кверцетина, связано с наличием подвижного атома водорода в положении 3 хромонового фрагмента. Следует обратить внимание на тот факт, что в отношении процессов метгемоглобинообразования антиоксидантные свойства кверцетина проявляются при значительно более низких концентрациях, чем его прооксидантное действие.

Таблица 2.20

Концентрация метгемоглобина, образующегося при инкубации суспензии эритроцитов с кверцетином *

Кверцетин, мкМ	Концентрация метгемоглобина, мкМ		
	60 мин	120 мин	180 мин
40	0,9 ± 0,9	1,2 ± 1,3	2,0 ± 1,4
80	2,0 ± 1,3	2,7 ± 1,4	3,5 ± 1,5
160	5,1 ± 0,5	6,3 ± 0,6	8,4 ± 0,5
320	9,7 ± 0,4	14,7 ± 0,2	15,5 ± 0,6

* - исходная концентрация оксигемоглобина в среде инкубации $36,7 \pm 0,7$ мкМ

Прооксидантное действие в липосомальной и водной системе выявлено у эпигаллокатехина. Показано, что его окисление пероксильными радикалами ведет к образованию хинон-подобного интермедиата, который при дальнейшем окислении кислородом может продуцировать анион-радикал кислорода [171].

Ауто- и радикальное окисление, ведущее к образованию анион-радикала кислорода, который способен вовлекаться в различные свободнорадикальные процессы, например реакцию Хабера-Веса, может быть потенциальной причиной цито- и генотоксичности флавоноидов. В связи с этим представляет интерес тот факт, что в экспериментах *in vitro* с использованием бактерий, плазмид и бактериофагов мутагенное действие выявлено у кверцетина, тогда как у его неаутооксидабельного гликозида рутина мутагенное действие отсутствовало [172, 173].

Ряд флавоноидов, а именно соединения, имеющие катехольную группу и дополнительный гидроксил в кольце В (эпигаллокатехин-галлат) или в кольце А (кверцетагетин), обладают прооксидантным действием в присутствии NO, вызывая повреждения плазмидной ДНК *in vitro*. При этом, по отдельности ни NO, ни флавоноиды не вызывали существенных повреждений [174].

Благодаря наличию прооксидантных свойств, некоторые флавоноиды и промежуточные продукты их окисления являются потенциальными проатерогенными агентами. Например, при исследовании влияния флавоноидов на процессы перекисного окисления липопротеидов низкой плотности, инициируемые миелопероксидазой в присутствии нитрит-ионов и H₂O₂-генерирующей системы (см. раздел "Антиоксидантное действие флавоноидов при окислении липопротеидов низкой плотности миелопероксидазой"), установлено, что добавление в среду инкубации кемпферола оказывает антиоксидантный эффект, заключающийся в увеличении лаг-периода реакции, однако скорость последующего ПОЛ, оцениваемая по количеству образующихся диеновых конъюгатов (поглощение при 234

нм) в присутствии кемпферола, была значительно больше, чем в контроле (рис. 2.31).

Анализ и сравнение временной кинетики перекисного окисления липидов ЛПНП и окисления кемпферола (рис 2.32) свидетельствуют, что продолжительность лаг-периода ПОЛ в присутствии флавоноида совпадает со временем его полного окисления до промежуточного продукта, имеющего характерный хромофор с максимумом поглощения при 325 нм. В последующем, присутствие промежуточного продукта в среде инкубации приводит к значительному увеличению скорости ПОЛ в стадии развития окисления по сравнению с контролем, при этом интермедиат-прооксидант подвергается дальнейшему окислению, о чем свидетельствует разрушение хромофора с максимумом поглощения при 325 нм.

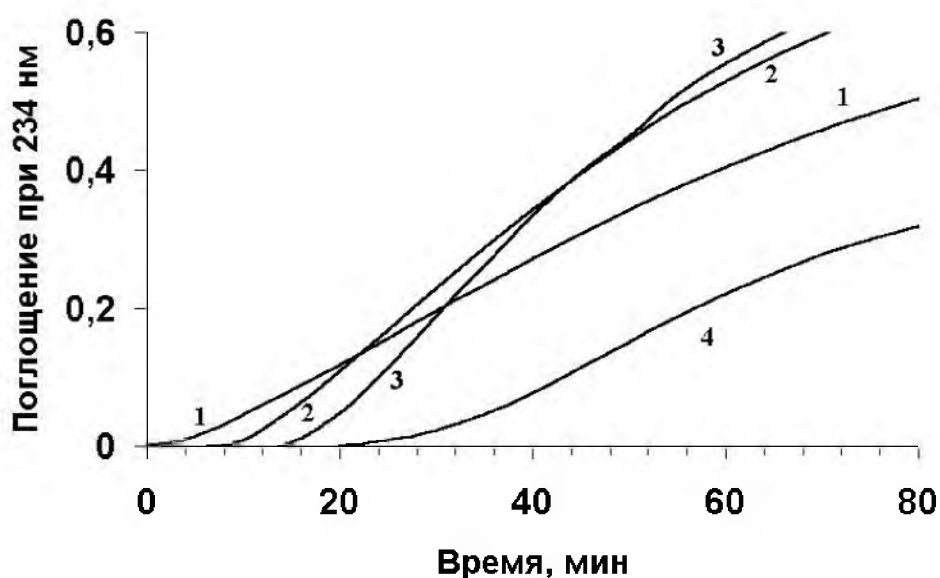


Рис. 2.31 Эффект кемпферола на временную кинетику МПО-зависимого окисления липидов ЛПНП

1. – Инкубация ЛПНП в полной системе МПО + (глюкоза+глюкозооксидаза) + нитрит-ионы (50 мкМ) (контроль); 2 – окисление ЛПНП в полной системе + 5 мкМ кемпферол; 3 – окисление ЛПНП в полной системе + 10 мкМ кемпферол; 4 – окисление ЛПНП в полной системе + 20 мкМ кемпферол.

Таким образом, можно заключить, что сам кемпферол обладает антиоксидантным действием и ингибирует процессы ПОЛ в ЛПНП, однако образующиеся в результате радикального окисления флавоноида промежуточные продукты являются прооксидантами, действие которых суммируется с действием NO_2^\cdot -подобных радикалов и других инициаторов свободнорадикальных реакций, усиливая процессы перекисного окисления липидов.

Прооксидантное действие флавоноидов, содержащих в кольце В катехольную группу и 2,3 двойную связь, может потенцироваться при взаимодействии с аскорбиновой кислотой. Это обусловлено тем, что данные флавоноиды имеют более высокий редокс-потенциал, чем аскорбиновая кислота, и способны окислять ее в аскорбил-радикал. В свою очередь, дальнейшее окисление аскорбил-радикала молекулярным кислородом ведет к образованию АФК [17]. Дигидрокверцетин, не имеющий двойной связи в положении 2,3, напротив, имеет более низкий ОП и способен восстанавливать аскорбил-радикал, выполняя так называемую аскорбат-защитную функцию, которая была постулирована еще Сент-Дьерди [17].

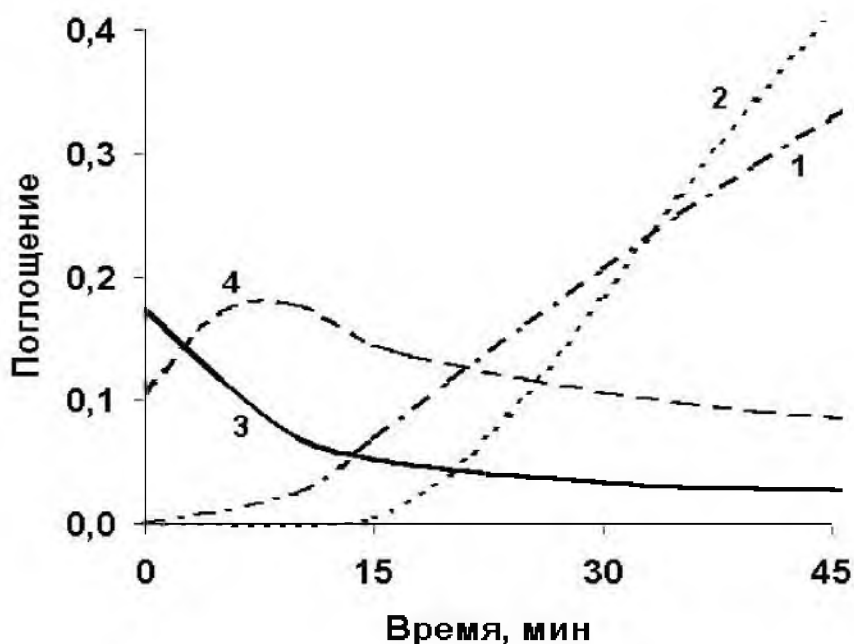


Рис. 2.32 Кинетика образования диеновых конъюгатов в ЛПНП (1,2), расхода кемпферола (3) и образования промежуточного продукта его окисления (4) ЛПНП инкубировали в полной системе МПО + (глюкоза+глюкозооксидаза) + нитрит-ионы (50 мкМ) без (1) и в присутствии 10 мкМ кемпферола (2, 3, 4). О накоплении диеновых конъюгатов судили по возрастанию поглощения при 234 нм, о расходе кемпферола - по исчезновению полосы 1 с максимумом поглощения при 372 нм, концентрацию промежуточного продукта окисления кемпферола оценивали по поглощению при 325 нм.

2.4.4 Влияние ионов металлов на биологическую активность природных флавоноидов

Флавоноиды, в отличие от фенольных антиоксидантов (токоферолов), кроме прямого антирадикального действия способны связывать ионы металлов с переменной валентностью (переходные металлы), образуя стабильные хелатные комплексы (см. рис. 2.11). Известно, что образование такого рода комплексов флавоноидов с ионами переходных металлов приводит к ингибированию свободнорадикальных процессов [27, 175].

Благодаря хелатирующим свойствам поступающие с пищей в организм флавоноиды способны влиять на ионный (металлов) баланс и окислительный статус клеток и тканей. Взаимодействие кверцетина и кемпферола с ионами меди и других переходных металлов сопровождается окислением флавоноидов, тогда как рутин и лютеолин в составе металлокомплексов не подвергаются окислению [15]. Тем не менее в составе комплексов изменяется молекулярная структура и биологическая активность, по-видимому, у всех флавоноидов [29, 30, 175-178]. Например, комплексы ионов переходных металлов с дигидрокверцетином, рутином, лютеолином и эпикатехином оказались более эффективными, а комплексы эпигаллокатехин-галлата с ионами двух- и трехвалентного железа – менее эффективными антирадикальными агентами, чем исходные лиганды. Об этом свидетельствуют результаты исследования эффективности ингибирования флавоноидами и их металлокомплексами реакции восстановления ПНТХ анион-радикалом кислорода, генерируемым в рибофлавин-содержащей фотосистеме (табл. 2.21).

Таблица 2.21

Эффективность ингибирования (I_{50}) некоторыми флавоноидами и их металлокомплексами реакции супероксид-зависимого восстановления ПНТХ в рибофлавинсодержащей фотосистеме

Флавоноид	I_{50} , мкМ			
	Свободный лиганд	Металл в комплексе		
		Cu^{2+}	Fe^{2+}	Fe^{3+}
Рутин	9,0	0,50	2,7	2,5
Дигидрокверцетин	1,9	0,48	0,6	0,55
Лютеолин	14,2	0,80	2,5	2,5
Эпикатехин	1,9	0,40	0,3	0,3
Эпигаллокатехин галлат	1,0	0,20	3,3	4,2
ЭДТА	не ингибирует	3,5	6,5	6,7
- Лиганд	-	0,22	>>10,0	>>10,0

Наиболее эффективными ловушками анион-радикалом кислорода являются медные комплексы флавоноидов. Однако следует отметить, что свободные ионы двухвалентной меди также эффективно ингибируют восстановление ПНТХ в диформазаан в рибофлавин-содержащей фотосистеме ($I_{50} = 0,22$ мкМ). Высокая антирадикальная активность ионов меди по отношению к анион-радикалу кислорода широко известна [5], но следует иметь в виду, что в биологических системах ионы меди связываются с альбумином, другими белками, различными низкомолекулярными хелаторами и в свободном состоянии практически не находятся. Супероксиддисмутазная активность комплексов ионов меди с белками, трилоном Б (ЭДТА), пеницилламином и большинством других низкомо-

лекулярных лигандов значительно меньше, чем у свободных ионов, или отсутствует вообще [5]. Например, концентрация 50 %-ого ингибирования (I_{50}) супероксид-зависимого восстановления ПНТХ в рибофлавин-содержащей фотосистеме для комплекса Cu^{2+} -ЭДТА равна 3,5 мкМ, что значительно больше, чем I_{50} у металлокомплексов флавоноидов, и в 17 больше, чем I_{50} свободных ионов двухвалентной меди. Комплекс двухвалентной меди с альбумином (в концентрации по меди 4 мкМ) ингибировал восстановление ПНТХ всего на $15,6 \pm 9,6$ %. Вместе с тем, известно, что медные комплексы ряда аминокислот (лизин, гистидин, тирозин) обладают высокой супероксиддисмутазной активностью [5]. Однако нельзя исключить, что высокая антирадикальная активность медных комплексов, в том числе комплексов с флавоноидами по отношению к анион-радикалу кислорода, обусловлена частичным высвобождением ионов меди из комплексов и присутствием в среде пула свободных ионов Cu^{2+} . Совершенно другая ситуация имеет место в случае комплексов флавоноидов с ионами двух- и трехвалентного железа. Поскольку свободные ионы Fe^{2+} и Fe^{3+} не обладают заметной антирадикальной активностью и не влияют на супероксид-зависимое восстановление ПНТХ в рибофлавин-содержащей фотосистеме даже в концентрации 10 мкМ, можно заключить, что высокая антирадикальная активность присуща именно железокомплексам флавоноидов. При этом комплексы рутина и дигидрокверцетина были более чем в три, а комплексы эпикатехина и лютеолина – примерно в шесть раз эффективнее в отношении ингибирования реакции восстановления ПНТХ, чем соответствующие лиганды (табл. 2.21). В разделе 2.4.2.1 "Антирадикальная активность флавоноидов в физико-химических системах" было показано, что взаимодействие рутина, лютеолина и эпикатехина с анион-радикалом кислорода, генерируемым в рибофлавин-содержащей фотосистеме, ведет к их окислению, скорость которого можно оценить спектрофотометрически. При исследовании спектральных изменений, обусловленных окислением анион-радикалом кислорода свободных и связанных с ионами металлов молекул данных флавоноидов, оказалось, что скорость окисления металлокомплексов значительно меньше, чем свободных лигандов (табл. 2.22, рис. 2.33). Наибольшее влияние на скорость окисления рутина и лютеолина было выявлено у ионов Cu^{2+} . При инкубации в течение 10 минут рутин в присутствии эквимольного количества ионов меди практически не окислялся. При этом рутин в присутствии эквимольного количества ионов меди перехватывал АФК в 18 раз эффективнее, чем свободный рутин. Скорость окисления рутина, связанного с ионами Fe^{2+} , была в 1,8, а ионами Fe^{3+} – в 1,7 раза меньше, чем скорость окисления свободного лиган-

да. В то же время эффективность антирадикального действия рутина в результате связывания с ионами железа (II) увеличивалась в 3,3, а при связывании с ионами железа (III) – в 3,6 раза (см. подразд. 3.2.2). Практически аналогичные результаты получены при окислении лютеолина и его металлокомплексов. В случае эпикатехина наименьшая скорость окисления была у его комплексов с ионами железа и несколько больше была скорость окисления комплекса эпикатехина с ионами меди (см. табл. 2.22)

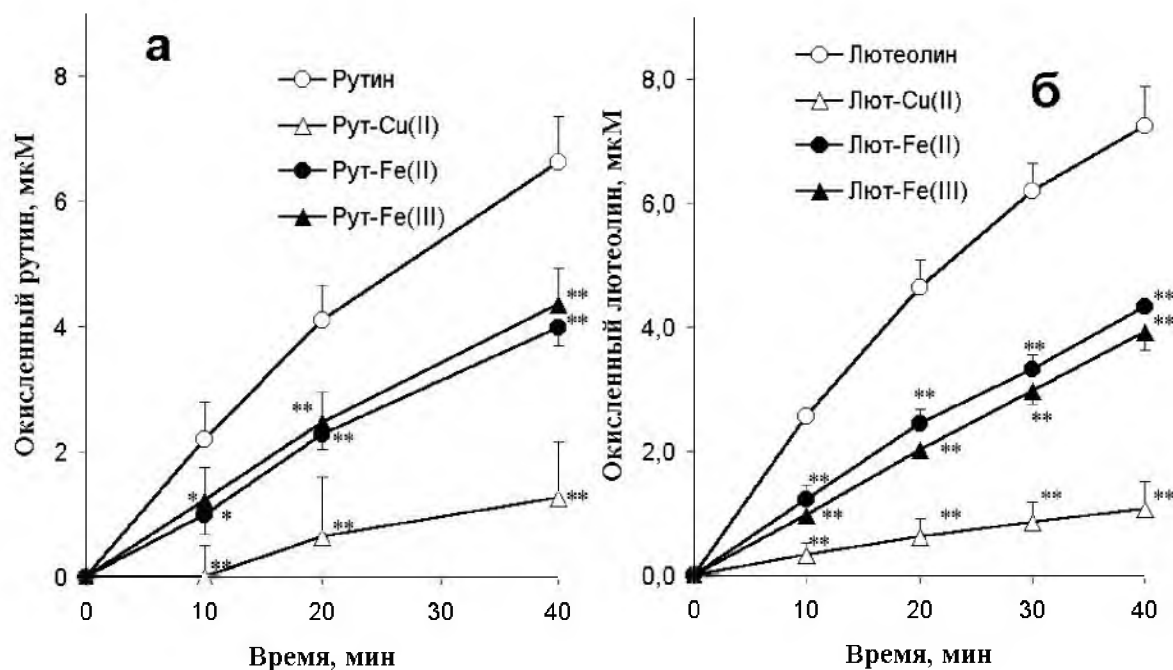


Рис. 2.33 Кинетика окисления свободных лигандов и металлокомплексов рутина (а) и лютеолина (б) в рибофлавин-содержащей фотосистеме

Таблица 2.22

Скорость окисления некоторых флавоноидов ($C_0=10 \text{ мкМ}$) и их металлокомплексов в рибофлавин-содержащей фотосистеме

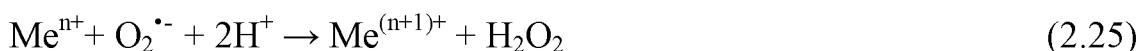
Флавоноид	v , $\mu\text{кмоль/л}$ за 20 мин			
	Свободный лиганд	Металл в комплексе		
		Cu^{2+}	Fe^{2+}	Fe^{3+}
Рутин	$4,11 \pm 0,56$	$0,64 \pm 0,95^*$	$2,28 \pm 0,24^*$	$2,47 \pm 0,48^*$
Лютеолин	$4,64 \pm 0,47$	$0,62 \pm 0,30^*$	$2,45 \pm 0,22^*$	$2,02 \pm 0,10^*$
Эпикатехин	$2,81 \pm 0,08$	$2,13 \pm 0,09^*$	$1,43 \pm 0,09^*$	$1,85 \pm 0,45^*$

* $P < 0.01$ по отношению к v окисления свободного лиганда

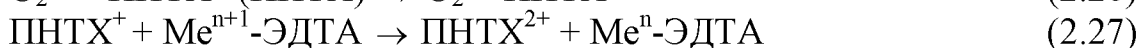
Таким образом, металлокомплексы ряда флавоноидов являются значительно более эффективными перехватчиками анион-радикала кисло-

рода, чем исходные комплексоны. При этом лиганды в составе комплекса окисляются $O_2^{\bullet-}$ значительно медленнее, чем свободные лиганды.

Эти результаты можно объяснить, допустив, что ион металла в комплексе с флавоноидом действует как супероксиддисмутирующий каталитический центр, принимая и отдавая электроны в реакции с анион-радикалом кислорода в соответствии с уравнением 2.24 и 2.25.



Считают, что такой механизм обуславливает супероксиддисмутазную активность комплексов металлов с аминокислотами и некоторыми другими лигандами [179]. Возможно, что ингибирование реакции восстановления ПНТХ в диформаза в рибофлавин-содержащей фотосистеме металлокомплексами ЭДТА (см. табл. 2.21) также обусловлено их супероксиддисмутазной активностью. Однако есть данные, позволяющие сделать противоположный вывод: об отсутствии у металлокомплексов ЭДТА СОД-активности, – поскольку показано, что ингибирование реакции образования моно- и диформаза может быть обусловлено прямым взаимодействием таких комплексов с продуктом одноэлектронного восстановления ПНТХ – тетразоинильным радикалом ($ПНТХ^{\bullet}$) в соответствии с уравнением 2.26 и 2.27 [180].



Нельзя исключить, что ионы металлов в составе комплексов с флавоноидами способны также вовлекаться в реакцию 2.27, благодаря чему может ингибироваться восстановление ПНТХ. Однако тот факт, что хелатирование ионов металлов флавоноидами не только повышает эффективность ингибирования реакции восстановления ПНТХ, но и приводит к ингибированию реакции супероксидзависимого окисления лиганда, дает основание заключить, что определяющая роль в обоих случаях принадлежит супероксиддисмутазной активности.

В разделе 2.4.2.3 "Защитное действие флавоноидов в условиях клеточного окислительного стресса" было показано, что флавоноиды являются хорошими цитопротекторными агентами в условиях асбестиндуцированного повреждения фагоцитирующих и нефагоцитирующих клеток. Ряд экспериментальных данных свидетельствует, что защитный эффект флавоноидов обусловлен их способностью перехватывать АФК и, в первую очередь, анион-радикал кислорода. Принимая во внимание высокую супероксиддисмутирующую активность металлокомплексов

флавоноидов, можно было предположить, что эти низкомолекулярные аналоги СОД будут обладать и эффективным цитопротекторным действием в условиях клеточного окислительного стресса. Защитный эффект металлокомплексов флавоноидов был изучен при окислительном повреждении фагоцитирующих и нефагоцитирующих клеток *in vitro*. Установлено, что металлокомплексы рутина и дигидрокверцетина значительно лучше, чем свободные лиганды, защищают от повреждения хризотил-асбестом перитонеальные макрофаги, нейтрофилы и, особенно, эритроциты (табл. 2.23).

Высокая эффективность цитопротекторного действия металлокомплексов флавоноидов в условиях экспериментального окислительного стресса обусловлена не только их антирадикальными свойствами, но и более высокой (в три раза) способностью сорбироваться на поверхности волокон асбеста. По-видимому, комплексы флавоноидов с металлами связываются с поверхностью волокон асбеста непосредственно в центрах генерации кислородных радикалов, т.е. обладают уникальными "сайт-специфичными" свойствами. Благодаря "сайт-специфичным" свойствам связывание металлокомплексов с хризотил-асбестом приводит к модификации асбеста, и такой модифицированный асбест полностью теряет цитотоксичность по отношению к эритроцитам. Восстановить цитотоксичность модифицированного асбеста можно с помощью ЭДТА, который вытесняет флавоноиды не только из металлокомплексов, но и с поверхности асбеста [29].

Таблица 2.23

Концентрации некоторых флавоноидов и их металлокомплексов, снижающие асбест-индуцированное повреждение перитонеальных макрофагов и эритроцитов на 50 % (значения I_{50})

Флавоноиды и их комплексы с металлами	I_{50} , (мкМ)		
	Макрофаги	Нейтрофилы	Эритроциты
Рутин	280	140	> 100
Рутин- Fe^{2+}	55	23	2,2
Рутин- Cu^{2+}	35	14	2,0
Рутин- Fe^{3+}	60	27	5,8
Дигидрокверцетин	160	85	не защищал
Дигидрокверцетин - Fe^{2+}	35	50	7,0
Дигидрокверцетин - Cu^{2+}	25	36	8,0
Дигидрокверцетин - Fe^{3+}	НО	46	22,0

Следует подчеркнуть, что металлокомплексы флавоноидов могут образовываться непосредственно в крови и тканях, и в этом случае между двумя механизмами, обуславливающими антиоксидантное действие фла-

воноидов – антирадикальным и хелатирующим – будет иметь место положительная обратная связь.



Перспективы использования металлокомплексов флавоноидов в качестве средств терапии «свободнорадикальных» патологий

Существуют экспериментальные доказательства и достаточно широкая клиническая практика, свидетельствующие об эффективности терапевтического использования СОД. В частности показано, что использование препаратов СОД предотвращает инактивацию монооксида азота супероксид-анионом, улучшает микроциркуляцию и нормализует кровоток при развитии синдрома ишемии-реперфузии. Однако использование СОД (как и других белков) в качестве лекарственного препарата осложняется возможностью развития в организме иммунной реакции. Кроме того, молекула СОД, имеющая значительные размеры, не всегда имеет возможность проникнуть в центры генерации активных форм кислорода. Полученные на основе флавоноидов низкомолекулярные аналоги СОД, обладая высокой антирадикальной активностью в отношении анион-радикала кислорода, в значительной степени лишены указанных выше недостатков, присущих макромолекулам. Следует также отметить, что используемые при их создании лиганды, в частности рутин, являются природными соединениями, разрешенными к использованию в качестве лекарственных препаратов. Совокупность указанных свойств позволяет рассматривать металлокомплексы флавоноидов как потенциальные лекарственные средства. Поэтому представляет интерес исследование возможного терапевтического действия этих соединений при моделировании различных "свободнорадикальных" патологий.

Исследование защитного действия медь-рутинового комплекса при моделировании асбестозов

Одним из наиболее опасных и повсеместно распространенных видов загрязнений окружающей среды являются пыли. Однако приходится констатировать, что на протяжении длительного времени этому фактору не уделялось должного внимания. В большой степени это было связано с тем, что санитарными службами при оценке возможного токсического действия пыли на организм учитывается только весовое содержание в воздухе, без оценки ее качественного состава. Однако эпидемиологические и экспериментальные исследования показали, что пыль способна оказывать специфическое повреждающее влияние на организм, вызывая фиброзы, бронхиальные карциномы и злокачественные новообразования плевры и брюшины даже в незначительных количествах, благодаря наличию в ней асбеста и других минеральных волокон. В настоящее время убедительно доказано, что начальным и обязательным звеном всей цепи патогенеза в легких при вдыхании минеральной пыли является чрезмерная активация фагоцитирующих клеток и гиперпродукция активных форм кислорода, ведущие к повреждению или неопластической трансформации эпителиальных и фагоцитирующих клеток. Кроме того, метаболиты, выделяемые активированными макрофагами, и продукты, образующиеся при их разрушении, стимулируют фибробласты, что приводит к избыточному синтезу коллагена в органах дыхания.

В атмосфере, почву и воду асбест попадает в процессе выветривания геологических образований, промышленной добычи и переработки, разрушения асбестосодержащих изделий, в первую очередь стройматериалов и тормозных колодок автомобилей. Особенно большая вероятность асбестовой запыленности имеет место при разрушении крошащихся поверхностей с напыленными асбестосодержащими изоляционными покрытиями в общественных и жилых зданиях. Напыление асбеста широко применялось в период 1940-1970 гг. для термической и акустической изоляции и в декоративных целях. Следует отметить, что в бывшем СССР, являвшимся самым крупным производителем асбеста, его добыча возросла до самого последнего времени. В частности, в 1979-1983 гг. она возросла с 2,02 до 2,25 млн.т, тогда как в Канаде снизилась с 1,50 до 0,82 млн.т, а в США с 0,93 до 0,70 млн.т. Благодаря хорошим аэродинамическим свойствам волокна асбеста переносятся на значительные расстояния от места "запыления" и повсеместно распространены в окружающей среде. В настоящее время содержание волокон асбеста (длиной > 5 мкм) в городском воздухе колеблется от 1 до 10 и более волокон на 1 л.

Приведенные выше результаты, свидетельствующие о высокой эффективности защитного действия металлокомплексов флавоноидов в условиях асбест-индуцированного повреждения клеток *in vitro*, послужили основанием для исследования их действия при развитии экспериментального фиброза *in vivo*. В этих экспериментах использовались белые крысы, разделенные на 4 группы. Каждая группа включала 6 животных. Животным первой (контрольной) группы интратрахеально вводилось по 1 мл 0,9 % раствора NaCl. Животным второй группы интратрахеально вводилось по 20 мг хризотил-асбеста в 1 мл 0,9 % раствора NaCl. Животным третьей группы интратрахеально вводилось по 20 мг хризотил-асбеста, модифицированного комплексом медь-рутин ($0,33 \cdot 10^{-4}$ М), в 1 мл 0,9 % раствора NaCl. Животным четвертой группы интратрахеально вводилось по 20 мг обычного хризотил-асбеста, однако начиная с первого дня введения и в течение месяца они получали питьевую воду, содержащую комплекс медь-рутин (10^{-4} М). Через 30 дней у животных контрольной и опытных групп определяли ряд морфометрических и биохимических параметров, некоторые из которых приведены в табл. 2.24.

Таблица 2.24

Влияние комплекса медь-рутин на изменение некоторых морфометрических и биохимических параметров у белых крыс через тридцать дней после интратрахеального введения асбеста (20 мг)

Экспериментальные группы	Исследуемые параметры		
	Увеличение массы тела, в г	Отношение веса тимуса к массе тела	Содержание в легких ТБКАП, нмоль/г ткани
1 (n=6)	17,5±6,8	1,98±0,52	8,6 ± 2,5
2 (n=6)	11,7±8,9	1,54±0,22	12,4 ± 3,1*
3 (n=6)	23,3±6,1	1,72±0,43	7,6 ± 2,2**
4 (n=6)	23,3±5,9	1,85±0,31	10,2 ± 3,1

* - $P < 0,05$ по отношению к значению группы 1

** - $P < 0,05$ по отношению к значению группы 2

Установлено, что на раннем этапе развития экспериментального фиброза, инициированного волокнами асбеста, в легких крыс наблюдается активация свободнорадикальных процессов, о чем свидетельствуют достоверное увеличение содержания продуктов перекисного окисления липидов (ТБКАП). Наряду с активацией свободнорадикальных процессов в ткани легких, интратрахеальное введение крысам хризотил-асбеста оказывает и общее токсичное действие: отмечено замедление роста массы тела и уменьшение отношения массы тимуса к массе тела опытных животных по сравнению с животными контрольной группы.

Как следует из приведенных данных, комплекс медь-рутин оказывает определенное защитное действие при экспериментальном "запылении"

животных, нормализуя морфометрические показатели и достоверно снижая содержание ТБКАП в легких.

Исследование защитного действия медь-рутинового комплекса при моделировании реперфузионных повреждениях миокарда

Нарушения кровообращения в отдельных органах и тканях (ишемия) и последующее его восстановление (реперфузия) часто встречаются при закупорке и болезнях сосудов, во время операций на сердце и сосудах, при трансплантации органов. Ранее реперфузия рассматривалась практической медициной только как восстановительный процесс, обеспечивающий возвращение органа к нормальному функциональному состоянию. Однако в последнее время эта точка зрения коренным образом пересмотрена. По мнению знаменитого американского кардиолога Браунвальда [181], реперфузия – обоюдоострый меч. Без нее ишемические ткани некротизируются, но, с другой стороны, она может повреждать клетки, пережившие ишемию. Одним из наиболее распространенных последствий реперфузии миокарда является развитие реперфузионных аритмий: тахикардии, экстрасистолии, трепетания и фибрилляции. Наиболее опасные нарушения сердечного ритма – трепетание и фибрилляция – могут полностью выключить насосную функцию сердца и привести к гибели организма. Основным повреждающим фактором в условиях реперфузии считают образование активных форм кислорода и активацию свободнорадикальных процессов. Существуют многочисленные экспериментальные данные, свидетельствующие как о генерации АФК при реперфузии различных органов, в том числе сердца [182], так и о хорошем кардиопротекторном эффекте супероксиддисмутазы [183] и различных по структуре низкомолекулярных антиоксидантов [184].

Определенный вклад в патогенез ишемии-реперфузии органов и тканей вносит, по-видимому, вырабатываемый эндотелием сосудов и клетками крови монооксид азота – радикал, способный с большой скоростью реагировать с анион-радикалом кислорода. Важнейшей физиологической функцией NO является поддержание нормального уровня вазодилатации [185, 186]. В частности, в постокклюзионный период он обуславливает быструю компенсаторную реакцию сосудов [187]. Кроме того, NO участвует в предотвращении тромбозов [186, 188, 189]. Расходование монооксида азота в реакции с супероксидным радикалом, активно продуцируемым в постишемический период, может привести к спазмированию сосудов и развитию вторичной ишемии. В этих условиях комплексная терапия, включающая использование антирадикальных агентов (например, СОД) и NO, может, по-видимому, наиболее эффективно обеспечивать переход от реперфузионного повреждения к реперфузионному вос-

становлению миокарда и нормализовать его ритмическую активность. Проведенные исследования экспериментально подтвердили эту рабочую гипотезу. В частности, установлено, что при внутривенном совместном введении СОД и донора NO реперфузионные аритмии устранялись значительно более эффективно, чем при раздельном использовании каждого препарата [190]. На данной модели реперфузионных повреждениях миокарда была также изучена эффективность антиаритмического действия низкомолекулярного аналога СОД – комплекса медь-рутин. Установлено, что Су-рутин практически полностью предотвращает развитие желудочковых аритмий в миокарде уже на второй минуте реперфузии и действует более эффективно, чем фермент супероксиддисмутаза (табл. 2.25).

Таблица 2.25

Встречаемость желудочковых аритмий (в процентах) в различные сроки реперфузии после 12-минутной ишемии миокарда крыс*

Виды аритмий	Время реперфузии миокарда, мин				
	1	2	3	4	5
Контрольная группа 1					
Экстрасистолия	85,7±5,0	71,4±6,5	85,7±5,9	85,7±5,9	100±1,4
Тахикардия	85,7±5,0	42,9±7,1	28,6±6,5	28,6±6,5	57,1±7,1
Трепетание	42,9±7,1	57,1±7,1	28,6±6,5	28,6±6,5	нет
Фибрилляция	нет	42,9±7,1	14,3±5,0	14,3±5,0	нет
СОД, 4 мг/кг					
Экстрасистолия	55,6±5,5	77,8±4,6	77,8±4,6	37,5±6,1	50,0±6,3
Тахикардия	66,7±5,2	33,3±5,2	28,2±4,6	нет	нет
Трепетание	33,3±5,2	33,3±5,2	28,2±4,6	12,5±4,1	12,5±4,1
Фибрилляция	нет	нет	нет	нет	нет
Контрольная группа 2					
Экстрасистолия	57,1±18,7	71,4±17,1	85,7±13,2	57,1±18,7	28,6±17,1
Тахикардия	85,7±13,2	42,9±18,7	42,9±18,7	14,3±13,2	14,3±13,2
Трепетание	85,7±13,2	85,7±13,2	14,3±13,2	нет	нет
Фибрилляция	57,1±18,7	42,9±18,7	28,6±17,1	14,3±13,2	14,3±13,2
Су-Рутин, 2 мг/кг					
Экстрасистолия	57,1±18,7	28,6±17,1	14,3±13,2	нет	нет
Тахикардия	28,6±17,1	28,6±17,1	нет	нет	нет
Трепетание	57,1±18,7	14,3±13,2	нет	нет	нет
Фибрилляция	14,3±13,2	нет	нет	нет	нет

* – Данные из работы [191]

Исследование защитного действия медь-рутинового комплекса при моделировании эпилепсии

Термин "эпилепсия" объединяет группу заболеваний центральной нервной системы, характеризующихся возникновением повторяющихся припадков. Эпилептический припадок можно определить как кратковременное нарушение в поведении, вызванное избыточной синхронной и

ритмической активностью популяций нейронов в коре, гиппокампе или таламусе. Характер судорог и другие внешние проявления эпилептического припадка определяются нормальной функцией той области мозга, где возник очаг гипервозбудимости. В настоящее время эпилепсией страдает около 2 % населения планеты. У значительной части больных это заболевание является наследственным и обусловлено генетическими нарушениями. Существенный прогресс в выяснении генетической природы эпилепсии достигнут за последнее десятилетие. У человека идентифицированы двенадцать мутаций в отдельных генах, вызывающих различные формы эпилепсии. Часть этих генов кодирует каналообразующие белки [192]. В большинстве случаев генетически обусловленные заболевания характеризуются глубоким нарушением функций мозга. Как правило, эти нарушения максимально выражены в детстве, однако они могут появляться в юности, в период полового созревания. Эпилепсия может возникать и в результате травматического или инфекционного повреждения мозга. Период развития заболевания после повреждения мозга колеблется от нескольких недель до нескольких лет. Имеются убедительные данные, свидетельствующие о важной роли свободнорадикальных процессов в патогенезе травматической эпилепсии [193]. Иницирование и развитие собственно эпилептического припадка обычно происходит внезапно без видимых причин, хотя при некоторых видах эпилепсии припадок может развиваться под воздействием определенных световых, акустических и тактильных раздражителей. Показано, что эпилептическая активность нейронов в ходе припадка связана с образованием в коре мозга активных форм кислорода и азота, в частности NO [194].

Исследование противосудорожного действия медь-рутинового комплекса проводилось на двух экспериментальных моделях эпилепсии [191, 195]. В первом случае (рис. 2.34 *a*) эпилептическая активность в коре больших полушарий у крыс вызывалась комбинированным воздействием амиазина и микроволнового излучения. Амиазин в дозе 5 мг/кг вводился внутривентрикулярно, затем голову животного подвергали низкоинтенсивному микроволновому облучению (частота 42,2 ГГц, плотность потока мощности 150 мкВт/см²) в импульсно-модулированном режиме. Через 7 - 10 мин после начала облучения у крыс регистрировалось развитие эпилептической активности в виде эпилептоформных потенциалов частотой 3 - 5 Гц и амплитудой до 300 мкВ. Неурональная эпилептическая активность не сопровождалась возникновением у крыс мышечных судорог и сохранялась в течение 1 - 2 часов после прекращения микроволнового облучения.

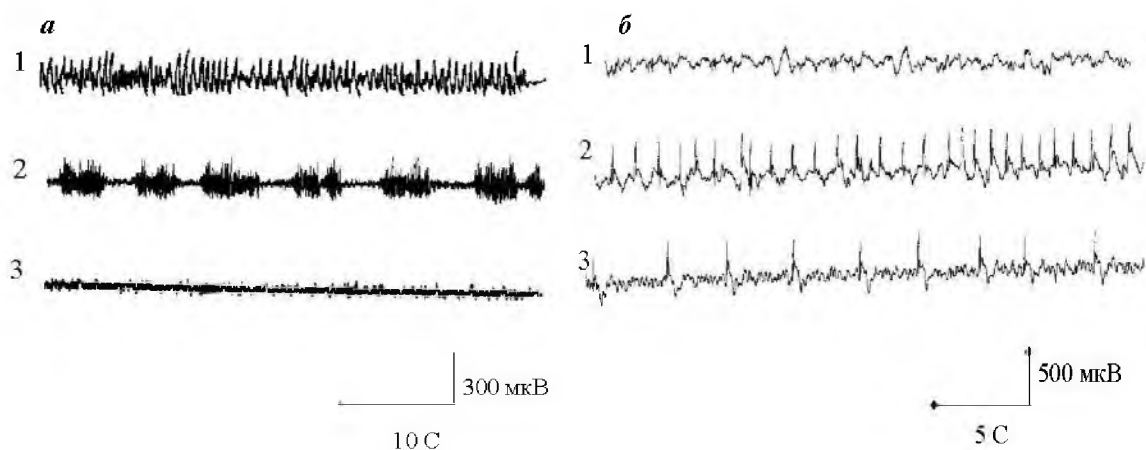


Рис. 2.34. Типичные эффекты комплекса Су-рутин на изменения биоэлектрической активности коры головного мозга крысы (ЭКоГ), вызванные комбинированным воздействием аминазина и микроволнового излучения (*а*) и аппликацией пенициллина на моторную область коры больших полушарий (*б*) [191]

- а* 1 - запись ЭКоГ до комбинированного воздействия
а 2 - запись ЭКоГ через 10 мин после комбинированного воздействия аминазина (5 мг/кг, внутривенно) и микроволнового излучения
а 3 - запись ЭКоГ через 2 мин после внутривенного введения комплекса Су-рутин (2 мг/кг) на фоне комбинированного воздействия аминазина и микроволнового излучения
б 1 - запись ЭКоГ до аппликации пенициллина
б 2 - запись ЭКоГ через 5 мин после аппликации пенициллина (240 единиц)
б 3 - запись ЭКоГ через 2 минуты после внутривенного введения комплекса Су-рутин (2 мг/кг) на фоне аппликации пенициллина

В другой группе животных эпилептический припадок моделировали путем аппликации пенициллина на поверхность коры больших полушарий (рис. 2.34 *б*). В этих экспериментах в сенсомоторную область через стереотаксически установленную канюлю апплицировали 800 ЕД натриевой соли бензилпенициллина в 5 мкл изотонического фосфатного буфера. Через 5 - 10 мин у животных регистрировались эпилептические изменения ЭКоГ в виде возникновения пиковых потенциалов частотой 1 Гц и амплитудой до 500 мкВ. Эпилептический припадок длился 60 мин и более и сопровождался выраженными мышечными сокращениями, совпадающими с частотой пиковых потенциалов. Такой тип эпилептической активности носит название "wet dog shakes". Внутривенное введение комплекса медь-рутин в дозе 2 мг/кг уже через одну - две минуты после введения полностью устраняет эпилептоформные потенциалы, вызванные комбинированным воздействием аминазина и микроволнового излучения (рис. 2.34 *а*). Эффект препарата продолжался 12 - 15 мин, после чего эпилептическая активность клеток мозга возобновлялась. Однако последующее введение комплекса медь-рутин вновь вызывало подавление эпилептической активности.

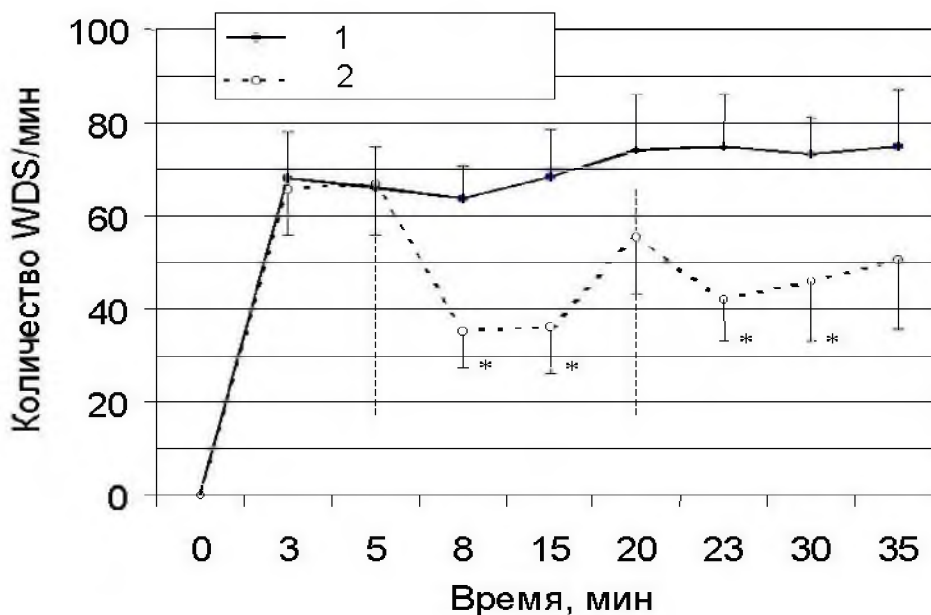


Рис. 2.35. Частота пиковых потенциалов (WDS) в ЭКоГ крыс в различные сроки после аппликации пенициллина на моторную область коры больших полушарий, без (1) и при действии комплекса Cu-рутин, 2 мг/кг (2) [195]
Пунктирной линией отмечено время введения комплекса Cu-рутин. * - $P < 0,05$, по отношению к контролю

При моделировании эпилепсии путем аппликации пенициллина комплекс медь-рутин также обладал выраженным противосудорожным действием (рис. 2.34 б). На рис. 2.35 суммированы результаты 6 отдельных экспериментов, из которых следует, что уже через 3 мин после внутрибрюшинного введения комплекса в дозе 2 мг/кг частота пиковых потенциалов "wet dog shakes" снижается с 67 ± 7 WDS/мин до 35 ± 8 WDS/мин ($P < 0,05$). Через 15 мин после введения эффективность антисудорожного действия комплекса медь-рутин несколько снижается и частота пиковых потенциалов возрастает до 55 ± 12 WDS/мин, однако повторное введение комплекса (2 мг/кг) вновь приводит к достоверному снижению частоты пиковых потенциалов до 42 ± 9 WDS/мин. Принимая во внимание то обстоятельство, что комплекс медь-рутин является эффективным антирадикальным агентом, наличие выраженной противосудорожной активности у этого препарата можно рассматривать в качестве косвенного подтверждения участия свободнорадикальных процессов в электрогенезе эпилептической активности нейронов.

Результаты исследований, в которых экспериментально доказана эффективность терапевтического использования металлокомплексов флавоноидов при моделировании асбестозов, реперфузионных повреждений миокарда и эпилепсии, свидетельствуют о перспективности дальнейших

экспериментальных и технологических работ с этой группой соединений с целью создания новых эффективных лекарственных препаратов.

2.6 Перспективы терапевтического использования флавоноидов при некоторых распространенных заболеваниях

Неврологические патологии. Патогенез многих возрастных неврологических заболеваний, таких как болезнь Паркинсона и болезнь Альцгеймера, а также посттравматической эпилепсии и ишемии связан с возрастанием продукции свободных радикалов и активацией свободнорадикальных процессов. По этой причине в различных странах проводятся многочисленные исследования, направленные на разработку методов терапии нейродегенеративных заболеваний с использованием природных и синтетических антиоксидантов. В такой работе очень важным этапом является поиск и получение соединений, которые будут легко проходить гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). Весьма перспективными в этом отношении оказались катехины, которые проходят через ГЭБ и оказывают хороший антиоксидантный и нейропротекторный эффект при моделировании различных нейродегенеративных заболеваний [196, 197]. При некоторых нейродегенеративных заболеваниях (болезнь Паркинсона) возникновение окислительного стресса, ведущего к повреждению нейронов, обусловлено резко увеличенной продукцией перекиси водорода в результате дезаминирования катехоламинов под действием фермента моноаминоксидазы. Ряд флавоноидов (катехин, таксифолин, морин, рутин) ингибируют окислительное дезаминирование катехоламинов, ингибируя моноаминоксидазу или действуя как свободнорадикальные ловушки, тем самым подавляя продукцию активных форм кислорода [198].

Онкологические заболевания. Многочисленные работы посвящены изучению антиканцерогенного действия флавоноидов как в различных модельных системах, так и непосредственно в клинике [5]. Считают [199], что флавоноиды могут ингибировать процессы канцерогенеза благодаря нескольким механизмам: ингибирование процессов метаболической активации проканцерогенов в реактивные интермедиаты или собственно канцерогены (1), индукция и активация ферментов, катализирующих процессы детоксикации канцерогенов (2) и прямое химическое взаимодействие с активными канцерогенами, препятствующее повреждающему воздействию последних на важнейшие внутриклеточные мишени – молекулы ДНК, РНК и белков (3). В отношении онкологических заболеваний наиболее исследованы, по-видимому, катехины. В частности, показано, что основной компонент зеленого чая эпигаллокатехингаллат ингибирует пролиферацию лейкозных клеточных линий и снижа-

ет синтез ДНК на 50 % уже в концентрации 50 мкМ, не обладая токсичным действием на развитие нормальных клеток [200, 201]. Антиканцерогенный эффект катехинов зеленого чая показан и при злокачественной трансформации, вызванной воздействием ионизирующей радиации. ЭГКГ значительно увеличивает время жизни после летального облучения, оказывая канцеростатическое и антимуtagenное действие [202]. Окисление арахидоновой и других полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), катализируемое циклооксигеназами и липооксигеназами, является ключевым этапом в синтезе простагландинов и лейкотриенов. Вместе с тем, образующиеся в этом случае гидро- и эндопероксиды способны при определенных условиях вовлекаться в различные патологические процессы, включая и канцерогенез. Поэтому способность флаван-3-олов (катехинов) ингибировать ферменты циклооксигеназа 1 и 2 может иметь следствием не только противовоспалительное, но и антикарценогенное действие [203]. Другие классы флавоноидов также влияют на процессы канцерогенеза. Рутин, кверцетин, морин, лютеолин и пеларгонидин оказывают ингибирующее действие на рост раковой клеточной культуры НК-Ly (водянка живота) *in vitro*. Рутин и кверцетин продлевают время жизни мышей, заряженных НК-Ly раковыми клетками [204]. Влияние флавоноидов на процессы канцерогенеза может быть следствием их цитостатического действия. Есть данные, что антипролиферативная активность у этих соединений специфична в отношении клеточной лейкемии, при этом флавоноиды практически не влияют на бластогенез нормальных лимфоцитов. Вероятно, в лейкозных клетках флавоноиды ингибируют синтез белка, репликацию ДНК и РНК [9]. Среди флавоноидов наиболее сильным антипролиферативным агентом *in vitro* является кверцетин. Предполагают, что кверцетин может ингибировать пролиферацию, увеличивая секрецию трансформирующего ростового фактора β_1 , и индуцировать апоптоз в некоторых линиях опухолевых клеток [205, 206]. Индукция апоптоза кверцетином может быть опосредована свободными радикалами, поскольку апоптоз, характеризуемый конденсацией ядерного хроматина, фрагментацией ДНК, потерей мембранной интеграции, признается сейчас как радикал-стимулированный и радикал-регулируемый процесс. Важно, что, в противоположность этим эффектам, флавоноиды защищают ДНК и хромосомы от повреждения кластогенными факторами [9].

В этой главе рассмотрена лишь сравнительно небольшая часть публикаций, посвященных исследованию молекулярных механизмов биологического действия флавоноидов и выяснению целесообразности их использования для профилактики и терапии различных заболеваний. Тем

не менее, анализ представленных материалов убедительно свидетельствует как об очевидной теоретической и практической значимости уже полученных результатов, так и необходимости проведения дальнейших фундаментальных и прикладных работ в обозначенной области медико-биологических исследований. Нет сомнения, что эти работы приведут к открытию новых возможностей медицинского использования флавоноидов, наиболее многочисленной группы природных биоантиоксидантов.

Литература

1. *Pietta P.* Flavonoids in Medicinal Plants // in *Flavonoids in Health and Disease* (C.A.Rice-Evans and L.Packer eds). 1998. Marcel Dekker, Inc. New York. P.61-110.
2. *Pietta P.G.* Flavonoids as antioxidants // *J Nat Prod.* 2000. Vol.63. P.1035-1042.
3. *Havsteen B.* Flavonoids: A class of natural products of high pharmacological potency // *Biochem Pharmacol.* 1983. Vol.32. P.1141-1148.
4. *Landry L.G., Chapple C.C., Last R.L.* Arabidopsis mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced UV-B injury and oxidative damage // *Plant Physiol* 1995, 109, 1159. 1995. Vol.109. P.1159-1166.
5. *Halliwell B., Gutteridge J.M.C.* Free radicals in biology and medicine / University Press. Oxford. 1999.
6. *Alvi N.K., Rizvi R.Y., Hadi S.M.* Interaction of quercetin with DNA // *Bioscience Reports.* 1986. Vol.6. P.861-868.
7. *Benthsath A., Rusznyak S., Szent-Gyurgy A.* Vitamin nature of flavones // *Nature.* 1936. P.798.
8. *Benthsath A., Rusznyak S., Szent-Gyurgy A.* Vitamin P // *Nature.* 1937. P.326.
9. *Korkina LG, Afanas'ev IB* Antioxidant and chelating properties of flavonoids // *Advances in Pharmacology.* 1997. Vol.38. P.151-163.
10. *Harborne J.B.* The Flavonoids: recent advances // in *Plant pigments* (Goodwin T.W. ed). 1988. Academic Press. London. P.299-343.
11. *Waterman P.G., Mole S.* Analysis of Phenolic Plant Metabolites / Blackwell Scientific Publication. London. 1994.
12. *Santos-Buelga C., Scalbert A.* Proanthocyanidins and tannin-like compounds in human nutrition // *J Food Sci Agr.* 2000. Vol.80. P.1094-1117.
13. *Guyot S., Doco T., Souquet J.M., Moutounet M, Drilleau J.F.* Characterization of highly polymerized procyanidins in cider apple (*Malus sylvestris* var *kermerrien*) skin and pulp // *Phytochemistry.* 2003. Vol.44. P.351-357.
14. *Markham K.R., Bloor S.J.* Analysis and identification of flavonoids in practice // in *Flavonoids in Health and Disease* (C.A.Rice-Evans and L.Packer eds). 1998. Marcel Dekker, Inc. New York. P.1-33.
15. *Brown J.E., Khodr H., Hider R., Rice-Evans C.A.* Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties // *Biochem J.* 1998. Vol.330. P.1173-1178.
16. *Jovanovic S.V., Steenken S., Simic M.G., Hara Y.* Antioxidant properties of flavonoids: reduction potentials and electron transfer reactions of flavonoid radicals // in *Flavonoids in Health and Disease* (C.A.Rice-Evans and L.Packer eds). 1998. Marcel Dekker, Inc. New York. P.137-161.

17. *Bors W., Michel C., Schicora S.* Interaction of flavonoids with ascorbate and determination of their univalent redox potentials: A pulse radiolysis study // *Free Rad Biol Med.* 1995. Vol.19. P.45-52.
18. *Sutton H.C., Sangster D.F.* Reactivity of semiquinone radicals and its relation to the biochemical role of superoxide // *J Chem Soc, Faraday Trans.* 1982. Vol.78. P.695-711.
19. *Bors W., Heller W., Michel C.* The Chemistry of Flavonoids // in *Flavonoids in Health and Disease* (C.A.Rice-Evans and L.Packer eds). 1998. Marcel Dekker, Inc. New York. P.111-136.
20. *Kostyuk V.A., Potapovitch A.I.* Superoxide-driven Oxidation of Quercetin and a Simple Sensitive Assay for Determination of Superoxide Dismutase // *Biochem Int.* 1989. Vol.19. P.1117-1124.
21. *Jovanovic S.V., Steenken S., Tosic M., Marjanovic B., Simic M.G.* Flavonoids as antioxidants // *J Am Chem Soc.* 1994. Vol.116. P.4846-4851.
22. *Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К.* Справочник биохимика / Мир. М. 1991.
23. *Argawal P.K., Schmeder H.J.* Deprotonation induced ¹³C NMR shift in phenols and flavonoids // *Tetrahedron Lett.* 1983. Vol.24. P.177-180.
24. *Kuo S.M., Leavitt P.S., Lin C.P.* Dietary flavonoids interact with trace metals and affect metallothionein level in human intestinal cells // *Biol Trace Elem Res.* 1998. Vol.62.3 P.135-153.
25. *Goodwin T.W., Mercer E.I.* Introduction to plant biochemistry / Pergamon. Oxford, 1983.
26. *Morel I., Cillard P., Cillard J.* Flavonoid-metal interactions in biological systems // in *Flavonoids in Health and Disease* (C.A.Rice-Evans and L.Packer eds). 1998. Marcel Dekker, Inc. New York. P.163-177.
27. *Afanas'ev I.B., Dorozhko A.I., Brodskii A.V., Kostyuk V.A., Potapovitch A.I.* Chelating and Free Radical Scavenging Mechanisms of Inhibitory Action of Rutin and Quercetin in Lipid Peroxidation // *Biochem Pharmacol.* 1989. Vol.38. P.1763-1769.
28. *Kostyuk V.A., Potapovich A.I.* Antiradical and Chelating Effects in Flavonoid Protection against Silica-Induced Cell Injury // *Arch Biochem Biophys.* 1998. Vol.355. P.43-48.
29. *Kostyuk V.A., Potapovich A.I., Vladykovskaya E.N., Korkina L.G., Afanas'ev I.B.* Influence of metal ions on flavonoid protection against asbestos-induced cell injury // *Arch Biochem Biophys.* 2001. Vol.385. P.129-137.
30. *Potapovich A.I., Vladykovskaya E.N., Kostyuk V.A., Korkina L.G., Afanas'ev I.B.* Effects of flavonoids and their metal complexes on asbestos-induced injury in vitro and in vivo // *Biomarkers and Environmental.* 2001. Vol.4. P.87-89.
31. *Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals and Drugs / Merck & Co. Inc. Rahway, 1968.*
32. *Mabry T.J.* The systematic identification of flavonoids / Springer-Verlag. Berlin, 1970.
33. *Рудаков О.Б., Селеменев В.Ф.* Физико-химические системы сорбат сорбент элюент в жидкостной хроматографии / РИЦ ЕФ ВГУ. Воронеж, 2003.
34. *Tomas-Barberan F.A., Blazquez M.A., Garcia-Viguera C., Tomas-Lorente F.* A comparative study of different Amberlite XAD resins in flavonoid analysis // *Phytochem Anal.* 1992. Vol.3. P.178-181.

35. *Griesbach R.J., Asen S.* Characterization of the flavonol glycosides in *Petunia*. *Plant Science* 70, 49-56 // *Plant Science*. 1990. Vol.70. P.49-56.
36. *Markham KR.* Isolation techniques for flavonoids // in *The flavonoids* (Harborne J.B., Mabry T.J., Mabry H. eds). 1975. Chapman and Hall. London. P.1-44.
37. *Markham KR.* Techniques of flavonoids identification. London / Academic Press. London, 1982.
38. *Ferriola P.C., Cody V., Middleton E.* Protein kinase C inhibition by plant flavonoids, kinetic mechanism and structure-activity relationships // *Biochem Pharmacol*. 1989. Vol.38. P.1617-1624.
39. *Bird T.A., Schule H.D., Delaney P.B., Sims J.E., Thoma B, Dower S.K.* Evidence that MAP (mitogen-activated protein) kinase activation may be a necessary but not sufficient signal for a restricted subset of responses in IL-1-treated epidermoid cells // *Cytokine*. 1992. Vol.4. P.429-440.
40. *Lee T-P., Matteliano M.L., Middleton E.* Effect of quercetin on human polymorphonuclear leukocyte lysosomal enzyme release and phospholipid metabolism // *Life Sci*. 1982. Vol.31. P.2765-2774.
41. *Long G.D., DeChatelet L.R., O'Flaherty J.T., McCall C.E., Blass D.A., Shirley P.S., Parce J.W.* Effects of quercetin on magnesium-dependent adenosine triphosphatase and the metabolism of human polymorphonuclear leukocytes // *Blood*. 1981. Vol.57. P.561-566.
42. *Shoshan V., Shahak Y., Shavit N.* Quercetin interaction with the chloroplast ATPase complex // *Biochim Biophys Acta*. 1980. Vol.591. P.421-433.
43. *Shoshan V, MacLennan D.H.* Quercetin interaction with the (Ca²⁺+Mg²⁺) ATPase of sarcoplasmic reticulum // *J Biol Chem*. 1981. Vol.256. P.887-892.
44. *Spedding G., Ratty A., Middleton E.* Inhibition of reverse transcriptases by flavonoids // *Antiviral Res*. 1989. Vol.12. P.99-110.
45. *Brinkworth R.I., Stoermer M.J., Fairlie D.P.* Flavones are inhibitors of HIV-1 proteinase // *Biochem Biophys Res Commun*. 1992. Vol.2. P.631-637.
46. *Fesen MR., Kohn K.W., Leteurtre F., Pommier Y.* Inhibitors of human immunodeficiency virus integrase // *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993. Vol.90. P.2399-2403.
47. *Kato R., Nakadate T, Yamamoto S., Sugimura T* Inhibition of 12-O- tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion and ornithine decarboxylase activity by quercetin: Possible involvement of lipoxygenase inhibition // *Carcinogenesis*. 1983. Vol.4. P.1301-1305.
48. *Das N.P., Ratty A.K.* Effects of flavonoids on induced non-enzymic lipid peroxidation // in *Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological, and Structure-Activity Relationships* (Cody V., Middleton E., Harborne J.B. eds). 1986. Alan R.Liss, Inc. New York. P.243-248.
49. *Trela B.A., Carlson G.P.* Effect of flavanone on mixed-function oxidase and conjugation reactions in rats // *Xenobiotica*. 1987. Vol.17. P.11-16.
50. *Klopman G., Dimayuga M.L.* Computer-automated structure evaluation of flavonoids and other structurally related compounds as glyoxalase I enzyme inhibitors // *Mol Pharmacol*. 1988. Vol.34. P.218-222.
51. *Bindoli A., Valente M, Cavallini L.* Inhibitory action of quercetin on xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase // *Pharmacol Res Commun*. 1985. Vol.17. P.831-839.
52. *Kellis J.T, Vickery L.E.* Inhibition of human estrogen synthetase (aromatase) by flavones // *Science*. 1984. Vol.225. P.1032-1034.

53. *Varma S.D.* Inhibition of aldose reductase by flavonoids: Possible attenuation of diabetic complications // in *Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological, and Structure-Activity Relationships* (Cody V., Middleton E., Harborne J.B. eds). 1986. Alan R.Liss, Inc. New York. P.343-358.
54. *Seddon A.P., Douglas K.T.* Photo-induced covalent labelling of malate dehydrogenase by quercetin // *Biochem Biophys Res Commun.* 1981. Vol.102. P.15-21.
55. *Grisiola S., Rubio V., Feijoo B., Mendelson J.* Inhibition of lactic dehydrogenase and of pyruvate kinase by low concentrations of quercetin // *Physiol Chem Phys.* 1975. Vol.7. P.473-475.
56. *Song D.J., Lorenzo B., Reidenberg M.M.* Inhibition of 11--hydroxysteroid dehydrogenase by gossypol and bioflavonoids // *J Lab Clin Med.* 1992. Vol.120. P.792-797.
57. *Nose K.* Inhibition by flavonoids of RNA synthesis in permeable WI-38 cells and of transcription by RNA polymerase II // *Biochem Pharmacol.* 1984. Vol.33. P.3823-3827.
58. *Soliman K.F., Mazzio E.A* *In vitro* attenuation of nitric oxide production in C6 astrocyte cell culture by various dietary compounds // *Proc Exp Biol Med.* 1998. Vol.218. P.390-397.
59. *Chiesi M., Schwaller R.* Inhibition of constitutive endothelial NO-synthase activity by tannin and quercetin // *Biochem Pharmacol.* 1995. Vol.14. P.495-501.
60. *Pincemail J., Deby C., Thirion A., de Bruyn, Dister M., Goutier R.* Human myeloperoxidase activity is inhibited *in vitro* by quercetin. Comparison with three related compounds // *Experientia.* 1988. Vol.44. P.450-453.
61. *Kostyuk V.A., Kraemer T., Sies H., Schewe T.* Myeloperoxidase/nitrite-mediated lipid peroxidation of low-density lipoprotein as modulated by flavonoids // *FEBS Lett.* 2003. Vol.537.1-3 P.146-150.
62. *Glossmann H., Presek P., Eigenbrodt E.* Quercetin inhibits tyrosine phosphorylation by the cyclic nucleotide-independent, transforming protein kinase pp60src // *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 1981. Vol.217. P.100-102.
63. *Levy J., Teuerstein I., Marbach M., Radian S., Sharon Y.* Tyrosine protein kinase activity in the DMBA-induced rat mammary tumor: Inhibition by quercetin // *Biochem Biophys Res Commun.* 1984. Vol.123. P.1227-1233.
64. *Schwartz L.B.* Mediators of human mast cells and human mast cell subsets // *Ann Allergy.* 1987. Vol.58. P.226-235.
65. *Schwartz A., Middleton E.Jr.* Comparison of the effects of quercetin with those of other flavonoids on the generation and effector function of cytotoxic T lymphocytes // *Immunopharmacology.* 1984. Vol.7. P.115-126.
66. *Ng J., Fredholm B.B., Jondal M.* Studies on the calcium dependence of human cell killing // *Biochem Pharmacol.* 1987. Vol.36. P.3943-3949.
67. *Graziani Y., Chayoth R., Karny N., Feldman B., Levy J.* Regulation of protein kinase activity by quercetin in Ehrlich Ascites tumor cells // *Biochim Biophys Acta.* 1981. Vol.714. P.415-421.
68. *Nair M.P.N., Hou J., Sweet A., Kandaswami C., Middleton E., Schwartz S.A.* The flavonoid quercetin induces antiinflammatory cytokine (IL-13) and inhibits proinflammatory cytokine (TNF) gene expression by normal peripheral blood mononuclear cells (PBMC) (Abstract) // *J Allergy Clin Immunol.* 1997. Vol.99. P.S331.
69. *Middleton E., Drzewiecki G., Krishnarao D.* Quercetin: An inhibitor of antigen-induced human basophil histamine release // *J Immunol.* 1981. Vol.127. P.546-550.

70. *Ezeamuzie I.C., Assem E.S.K.* Modulation of the effect of histamine-releasing lymphokine on human basophils // *Agents Actions*. 1984. Vol.14. P.501-505.
71. *Ogasawara H., Fujitani T., Drzewiecki G., Middleton E.* The role of hydrogen peroxide in basophil histamine release and the effect of selected flavonoids // *J Allergy Clin Immunol*. 1986. Vol.78. P.321-328.
72. *Schneider C., Berton G., Spisani S., Traniello S., Romeo D.* Quercetin, a regulator of polymorphonuclear leukocyte (PMNL) functions // *Adv Exp Med Biol*. 1979. Vol.121. P.371-379.
73. *Berton G., Schneider C., Romeo D.* Inhibition by quercetin of activation of polymorphonuclear leukocyte functions: Stimulus-specific effects // *Biochim Biophys Acta*. 1980. Vol.595. P.47-55.
74. *Busse W.W., Kopp D.E., Middleton E.* Flavonoid modulation of human neutrophil function // *J Allergy Clin Immunol*. 1984. Vol.73. P.801-809.
75. *Tordera M., Ferrandiz M.L., Alcaraz M.J.* Influence of anti-inflammatory flavonoids on degranulation and arachidonic acid release in rat neutrophils // *J Biosci*. 1994. Vol.49. P.235-240.
76. *Takemura O.S., Banno Y., Nozawa Y.* Inhibition of N-formylmethionyl-leucylphenylalanine-stimulated tyrosine phosphorylation and phospholipase D activation by quercetin in rabbit neutrophils. // *Biochem Pharmacol*. 1997. Vol.53. P.1503-1510.
77. *Sloan R., Boran-Ragotzy R., Ackerman S.J., Drzewiecki G., Middleton E.* The effect of plant flavonoids on eosinophil degranulation (Abstract). *J. Allergy Clin. Immunol.* 87: 282. // *J Allergy Clin Immunol*. 1991. Vol.87. P.282.
78. *Tomasiak M* The effect of quercetin and lithium ions on platelet aggregation // *Ann Med Univ Biatystok*. 1992. Vol.37. P.38-45.
79. *Tiisala S., Majuri M-L., Carpen O., Renkonen R.* Genistein enhances the ICAM-mediated adhesion by inducing the expression of ICAM-1 and its counter-receptors // *Biochem Biophys Res Commun*. 1994. Vol.203. P.443-449.
80. *Middleton E.Jr., Kandaswami C., Theoharides T.C.* The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer // *Pharmacological Reviews*. 2000. Vol.52. P.673-751.
81. *Gugler R., Leschik M., Dengler H.J.* Disposition of quercetin after single oral and intravenous doses // *Eur J Clin Pharmacol*. 1975. Vol.9. P.229-234.
82. *Manach C., Morand C., Crespy V., Demigne C., Texier O., Texier O., Remesy C.* Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties // *FEBS Lett*. 1975. Vol.24. P.331-336.
83. *Beiler J.M., Martin G.J.* Inhibitory action of vitamin P compounds on hyaluronidase // *J Biol Chem*. 1947. Vol.171. P.507-511.
84. *Parrot J.L., Camu P.* Les facteurs qui elevent la resistance des capillaires // *Arch int Pharmacodyn*. 1964. Vol.152. P.234-248.
85. *Lavollay J., Neumann J.* Problems posed by the activity of certain flavonoids on vascular resistance // in *The Pharmacology of Plant Phenolics* (J.W.Fairbairn ed). 1959. Academic Press Inc. New York. P.103-122
86. *Parmar N.S., Ghosh M.N.* Anti-inflammatory activity of gossypin a bioflavonoid isolated from *Hibiscus vitifolius* Linn // *Ind J Pharmacol*. 1978. Vol.10.4 P.277-293.

87. *Maffei-Facino R., Carini M., Aldini G., Bombardelli E., Morazzoni P., Morelli R.* Free radicals scavenging action and anti-enzyme activities of procyanidines from *Vitis vinifera* // *Arzneim -Forsch /Drug Res.* 1994. Vol.44. P.592-601.
88. *Костюк В.А., Потапович А.И.* Роль анион-радикала кислорода в процессах ауто- и фотосенсибилизированного окисления флавоноидов // *Кислородные радикалы в химии, биологии и медицине.* 1988. Рига. С.45-54
89. *Schroeder P., Klotz L.-O., Buchczyk D.P., Sadik C.D., Schewe T., Sies H.* Epicatechin selectively prevents nitration but not oxidation reactions of peroxynitrite // *Biochemical and biophysical research communications.* 2001. Vol.285. P.782-787.
90. *Rezk B.M., Haenen G.R.M.M., van der Vijgh W.J.F., Bast A.* The antioxidant activity of phloretin: the disclosure of a new antioxidant pharmacophore in flavonoids // *Biochemical and biophysical research communications.* 2001. Vol.295. P.9-13.
91. *Dinis T.C.P., Santos C.L., Almeida L.* The apoprotein is the preferential target for peroxynitrite-induced LDL damage protection by dietary phenolic acids // *Free radical research.* 2002. Vol.36.5 P.531-543.
92. *Uchida S., Edamatsu R., Hiramatsu M., Mori A., Nonaka G., Nishioka I., Niwa M, Ozaki M.* Condensed tannins scavenge active oxygen free radicals // *Med Sci Res.* 1987. Vol.15. P.831-832.
93. *Makris D.P., Rossiter J.T* Heat-induced, metal-catalyzed oxidative degradation of quercetin and rutin (quercetin 3-O-rhamnosylglucoside) in aqueous model systems // *J Agric Food Chem.* 2000. Vol.48. P.3830-3838.
94. *Bors W., Michel C., Saran M* Flavonoid antioxidants: rate constants for reactions with oxygen radicals // *Methods Enzymol.* 1994. Vol.234. P.420-429.
95. *Beauchamp C., Fridovich I.* Superoxide dismutase improved assays assay applicable to acrylamide gels // *Anal Biochem.* 1971. Vol.44. P.276-287.
96. *Фридович И.* Радикалы кислорода, пероксид водорода и токсичность кислорода // *Свободные радикалы в биологии.* 1979. М: Мир. Т.1. С.272-314.
97. *Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J.* Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships // *J Nutr Biochem.* 2002. Vol.13. P.572-584.
98. *van Acker S.A., de Groot M.J., van den Berg D.J., Tromp M.N., Donne-Op den Kelder G., van der Vijgh W.J., Bast A.* A quantum chemical explanation of the antioxidant activity of flavonoids // *Chem Res Toxicol.* 1996. Vol.9. P.1305-1312.
99. *Miller N.J., Rice-Evans C., Davies M.J., Gopinathan V., Milner A.* A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates // *Clin Sci (Lond).* 1993. Vol.84. P.407-412.
100. *Paganga G., Miller N., Rice-Evans C.A.* Paganga G., Miller N., Rice-Evans C.A. The polyphenolic content of fruit and vegetables and their antioxidant activities. What does a serving constitute? // *Free Radic Res.* 1999. Vol.30. P.153-162.
101. *Cao G., Verdon C.P., Wu A.H.B, Wang H., Prior R.L.* Automated oxygen radical absorbance capacity assay using the COBAS FARA II // *Clin Chem.* 1995. Vol.41. P.1738-1744.
102. *Rice-Evans C.A., Miller N.J.* Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and isoflavonoids. 199-219 // in *Flavonoids in Health and Disease* (C.A.Rice-Evans and L.Packer eds). 1998. Marcel Dekker, Inc. New York. P.199-219.
103. *Ishige K., Schubert D., Sagara Y.* Ishige K., Schubert D., Sagara Y. Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms // *Free Radic Biol Med.* 2001. Vol.30.4 P.433-446.

104. *Dugas A.J.Jr., Castaneda-Acosta J., Bonin G.C., Price K.L., Fischer N.H., Winston G.W.* Evaluation of the Total Peroxyl Radical-Scavenging Capacity of Flavonoids: Structure-Activity Relationships // *J Nat Prod.* 2000. Vol.63. P.327-331.
105. *Tsai K., Hsu T., Kong C., Lin K., Lu F.* Is the endogenous peroxyl-radical scavenging capacity of plasma protective in systemic inflammatory disorders in humans? // *Free Radic Biol Med.* 2000. Vol.28. P.926-933.
106. *Ghiselli A., Serafini M, Natella F., Scaccini C.* Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data // *Free Radic Biol Med.* 2000. Vol.29. P.1106-1114.
107. *Tubaro F., Tubaro F., Rapuzzi P., Maiorino M, Maiorino M* Analysis of plasma antioxidant capacity by competitive kinetics. // *Free Radic Biol Med.* 1998. Vol.24. P.1228-1234.
108. *Kampa M, Nistikaki A, Tsaousis V, Maliaraki N., Notas G., Castanas E.* A new automated method for the determination of the Total Antioxidant Capacity (TAC) of human plasma, based on the crocin bleaching assay. *BMC // Clin Pathol.* 2002. Vol.2. P.3.
109. *Kostyuk V.A., Potapovich A.I., Tereshchenko S.M.* 4-(4-R-phenylamino)-5-methoxy-1,2-benzoquinones are New Selective Inhibitors of Carbon Tetrachloride-initiated Free Radical Reactions in Liver // *Biochem Int.* 1991. Vol.25. P.167-172.
110. *Костюк В.А., Лунец Е.Ф.* Ингибирование производными о-бензохинона перекисного окисления липидов в микросомах печени // *Биохимия.* 1983. Т.48. № 9. С.1491-1495.
111. *Костюк В.А.* Влияние производных о-бензохинона на свободнорадикальные процессы, инициируемые в микросомах печени крыс четыреххлористым углеродом // *Биохимия.* 1991. Т.56. № 1. С.109-114.
112. *Svingen B.A., Buege J.A., O'Neal F.O., Aust S.D.* The mechanism of NADPH-dependent lipid peroxidation. The propagation of lipid peroxidation // *J Biol Chem.* 1979. Vol.254. P.5892-5899.
113. *Afanas'ev I.B., Dorozhko A.I., Polozova N.I., Kuprianova N.S., Brodskii A.V., Ostrachovitch E.A., Korkina L.G.* Is superoxide an initiator of microsomal lipid peroxidation? // *Arch Biochem Biophys.* 1993. Vol.302. P.200-205.
114. *Waller R.L., Glende E.A. J, Recknagel R.O.* Waller R.L., Glende E.A., Jr and Recknagel R.O. Carbon tetrachloride and bromotrichloromethane toxicity // *Biochem Pharm.* 1983. Vol.32. P.1613-1617.
115. *Halliwell B., Gutteridge J.M.C.* Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease // *Biochem J.* 1984. Vol.219. P.1-14.
116. *Sorata Y., Takahama U, Takahama U* Protective effect of quercetin and rutin on photosensitized lysis of human erythrocytes in the presence of hematoporphyrin // *Biochim Biophys Acta.* 1984. Vol.799. P.313-317.
117. *Костюк В.А., Потанович А.И., Терещенко С.М., Афанасьев И.Б.* Антиокислительная активность флавоноидов в различных системах перекисного окисления липидов // *Биохимия.* 1988. Т.53, № 8. С.1365-1370.
118. *Podrez E.A., Abu-Soud H.M, Hazen S.L.* Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis // *Free Radic Biol Med.* 2000. Vol.28. P.1717-1725.
119. *Eiserich J.P., Baldus S., Brennan M.L., Ma W, Zhang C., Tousson A., Castro L., Luscis A.J., Nauseef W.M., White C.R., Freeman B.A.* Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase // *Science.* 2002. Vol.296 (5577). P.2391-2394.

120. *Wu C.T., Eiserich J.P., Ansari A.A., Coppel R.L., Balasubramanian S., Bowlus C.L., Gershwin M.E., Van De Water J.* Myeloperoxidase-positive inflammatory cells participate in bile duct damage in primary biliary cirrhosis through nitric oxide-mediated reactions // *Hepatology*. 2003. Vol.38. P.1018-1025.
121. *Baldus S., Heeschen C., Meinertz T., Zeiher A.M., Eiserich J.P., Munzel T., Simoons M.L., Hamm C.W., CAPTURE Investigators* Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes // *Circulation*. 2003. Vol.108. P.1440-1445.
122. *van der Vliet A., Eiserich J.P., Halliwell B., Cross C.E.* Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite. A potential additional mechanism of nitric oxide-dependent toxicity. // *J Biol Chem*. 1997. Vol.272. P.7617-7625.
123. *Byun J., Mueller D.M., Fabjan J.S., Heinecke J.W.* Nitrogen dioxide radical generated by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-nitrite system promotes lipid peroxidation of low density lipoprotein // *FEBS letters*. 1999. Vol.455. P.243-246.
124. *Schmitt D., Shen Z., Zhang R., Colles S.M., Wu W., Salomon R.G., Chen Y., Chisolm G.M., Hazen S.L.* Leukocytes utilize myeloperoxidase-generated nitrating intermediates as physiological catalysts for the generation of biologically active oxidized lipid and sterols in serum // *Biochemistry*. 1999. Vol.38. P.16904-16915.
125. *Brennan M.-L., Wu W., Fu X., Shen Z., Song W., Frost H., Vadseth C., Narine L., Lenkiewicz E., Borchers M.T., Luscis A.J., Lee J.J., Lee N.A., Abu-Soud H.M., Ischiropoulos H., Hazen S.L.* A tale of two controversies: defining both the role of peroxidases in nitrotyrosine formation in vivo using eosinophil peroxidase and myeloperoxidase-deficient mice, and the nature of peroxidase-generated reactive nitrogen species. // *J Biol Chem*. 2002. Vol.277. P.17415-17427.
126. *Luscis A.J.* Atherosclerosis // *Nature*. 2000. Vol.407 (6801). P.233-241.
127. *Климов А. Н., Никульчева Н. Г.* Липиды, липопротеиды и атеросклероз / Изд-во "Питер". Санкт-Петербург. 1995.
128. *Ross R.* The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s // *Nature*. 1993. Vol.362. P.801-809.
129. *Бодрова О.В., Ларионова Г.П.* Атеросклероз / КРОН-Пресс. М., 2000.
130. *Cyrus T., Witztum J.L., Rader D.J., Tangirala R., Fazio S., Linton M.F., Funk C.D.* Disruption of the 12/15-lipoxygenase gene diminishes atherosclerosis in apo E-deficient mice // *J Clin Invest*. 1999. Vol.103. P.1597-1604.
131. *Костюк В.А.* Устойчивость продуктов окисления липидов в печени крыс и пути их утилизации // *Биохимия*. 1986. Т.51. № 8. С.1392-1397.
132. *Little C., O'Brien P.J.* An intracellular GSH-peroxidase interaction with a lipid peroxide substrate // *Biochem Biophys Res Commun*. 1968. Vol.31. P.145-150.
133. *Ursini F., Maiorino M., Gregolin C.* The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase // *Biochim Biophys Acta*. 1985. Vol.839. P.62-70.
134. *Kostyuk V.A., Komura S., Yagi K.* Reduction of Various Lipid Hydroperoxides by Rat Liver Homogenate // *Biochem Int*. 1985. Vol.11. P.803-808.
135. *Duan Y.J., Komura S., Fiszer-Szafarz B., Szafarz D., Yagi K.* Purification and characterization of a novel monomeric glutathione peroxidase from rat liver // *J Biol Chem*. 1988. Vol.263. P.19003-19008.
136. *Костюк В.А.* Возможные пути восстановления пероксидов липидов в печени и их внутриклеточная локализация // *Биохимия*. 1986. Т.51. № 7. С.1059-1065.

137. *Aw T.Y., Williams M.W., Gray L.* Absorption and lymphatic transport of peroxidized lipids by rat small intestine in vivo: role of mucosal GSH // *Am J Physiol.* 1992. Vol.262(1 Pt 1). P.G99-106.
138. *Staprans I., Rapp J.H., Pan X.M., Kim K.Y., Feingold K.R.* Oxidized lipids in the diet are a source of oxidized lipid in chylomicrons of human serum // *Arterioscler Thromb.* 1994. Vol.14. P.1900-1905.
139. *Joris I., Zand T., Nunnari J.J., Krolkowski F.J., Majno G.* Studies on the pathogenesis of atherosclerosis. I. Adhesion and emigration of mononuclear cells in the aorta of hypercholesterolemic rats // *Am J Pathol.* 1983. Vol.113. P.341-358.
140. *Watson A.D., Leitinger N., Navab M., Faull K.F., Horkko S., Witztum J.L., Palinski W., Schwenke D., Salomon R.G., Sha W., Subbanagounder G., Fogelman A.M., Berliner J.A.* Structural identification by mass spectrometry of oxidized phospholipids in minimally oxidized low density lipoprotein that induce monocyte/endothelial interactions and evidence for their presence in vivo // *J Biol Chem.* 1997. Vol.272. P.13597-13607.
141. *Terpstra V., van Amersfoort E.S., van Velzen A.G., Kuiper J., van Berkel T.J.C.* Hepatic and extrahepatic scavenger receptors : function in relation to disease // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000. Vol.20. P.1860-1872.
142. *Nicholson A.C., Han J., Febbraio M., Silverstein R.L., Hajjar D.P.* Role of CD36, the macrophage class B scavenger receptor, in atherosclerosis // *Ann N Y Acad Sci.* 2001. Vol.947. P.224-228.
143. *Kunjathoor V.V., Febbraio M., Podrez E.A., Moore K.J., Andersson L., Koehn S., Rhee J.S., Silverstein R., Hoff H.F., Freeman M.W.* Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages // *J Biol Chem.* 2002. Vol.277. P.49982-49988.
144. *Moore K.P., Darley-Usmar V., Morrow J., Roberts II L.J.* Formation of F2-isoprostanes during oxidation of human low-density lipoprotein and plasma by peroxynitrite // *Circ Res.* 1995. Vol.77. P.335-341.
145. *Целинский И. В., Шугалей И. В., Лукогорская С. А.* Цепные процессы в органической химии и биологии // *Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева),* 2001. т. XLV. № 2. С.35-45.
146. *Kosaka H., Tyuma I.* Production of superoxide anion by N,N-bis(2-hydroxyethyl)-iminotris(hydroxymethyl)methane buffer during oxidation of oxyhemoglobin by nitrite and effect of inositol hexaphosphate on the oxidation // *Biochem Biophys Acta.* 1982. Vol.709. P.187-193.
147. *Tomoda A., Tyuma I., Yoneyama Y.* Tomoda A., Tsujin A., Yoneyama Y. Involvement of superoxide anion in the reaction mechanism of haemoglobin oxidation by nitrite // *Biochem J.* 1981. Vol.193. P.169-179.
148. *Потапович А.И., Стригунова Е. Н., Костюк В.А.* Исследование влияния флавоноидов на процессы метгемоглобинообразования в эритроцитах и их лизатах // *Вестн. Белорус. ун-та.Сер. 2.* 2003 №1 С.36-40.
149. *Brunzel U., Dreybrodt W., Schwitzer-Stenner R.* pH-dependent absorption in the B and Q bands of oxyhemoglobin and chemically modified oxyhemoglobin (BME) at low Cl⁻ concentration // *Biophys J.* 1986. Vol.49. P.1069-1076.
150. *Kampen E.J., Zijlstra W.G.* Spectrophotometry of hemoglobin and hemoglobin derivatives // *Advan Clin Chem.* 1983. Vol.23. P.199-257.

151. *Tomoda A., Tyuma I., Yoneyama Y.* Tomoda A., Tsujin A., Yoneyama Y. Involvement of superoxide anion in the reaction mechanism of haemoglobin oxidation by nitrite // *Biochem J.* 1981. Vol.193. P.169-179.
152. *Ho C.-T., Chen Q., Shi H., Zhang K.-Q., Rozen R.T.* Antioxidative effect of polyphenol extract prepared from various Chinese teas // *Preventive Medicine.* 1992. Vol.21. P.520-525.
153. *Hof K.H., Wiseman S.A., Yang C.S., Tijburg L.B.* Plasma and lipoprotein levels of tea catechins following repeated tea consumption // *Proc Soc Exp Biol Med.* 1999. Vol.220. P.203-209.
154. *Korkina L.G., Suslova T.B., Cheremisina Z.P., Velichkovsky B.T.* Catalytic properties of asbestos fibers and their biological activity // *Stud Biophys.* 1988. Vol.126. P.99-104.
155. *Mossman B.T., Landesman J.M.* Importance of oxygen-free radicals in asbestos-induced injury to airway epithelial cells // *Chest.* 1983. Vol.83 (5 Suppl). P.50S-51S.
156. *Korkina L.G., Durnev A.D., Suslova T.B., Cheremisina Z.P., Dauge-Dauge N.O., Afanas'ev I.B.* Oxygen radical-mediated mutagenic effect of asbestos on human lymphocytes: suppression by oxygen radical scavengers // *Mutat Res.* 1992. Vol.265. P.245-253.
157. *Величковский Б.Т., Черемисина З.П., Сулова Т.Б., Коркина Л.Г., Оленев В.И.* Молекулярный механизм биологической активности асбеста // *Гигиена труда и профессиональные заболевания.* 1986. № 9. С.5-9.
158. *Kamp D.W., Graceffa P., Pryor W.A., Weitzman S.A.* The role of free radicals in asbestos-induced diseases // *Free Radic Biol Med.* 1992. Vol.12.4 P.293-315.
159. *Коркина Л.Г., Величковский Б.Т.* Роль свободных радикалов кислорода в пылевой патологии легких // *Кислородные радикалы в химии, биологии и медицине: Сб. науч. ст. / Рига, 1988.– С. 153–163.*
160. *Гистология, цитология и эмбриология /* Под. ред. Ю.И.Афанасьева, Н.А.Юриной. 5-е изд., перераб. и доп. 1999. М.: Медицина. 744 с.
161. *Карр Я.* Макрофаги. Обзор ультраструктуры и функции. 1978. М.: Медицина. 189 с.
162. *Kostyuk V.A., Potapovich A.I., Speransky S.D., Maslova G.T.* Protective effect of natural flavonoids on rat peritoneal macrophages injury caused by asbestos fibers // *Free Radic Biol Med.* 1996. Vol.21. P.487-493.
163. *Костюк В.А., Потанович А.И.* Роль анион-радикала кислорода в процессах ауто- и фотосенсибилизированного окисления флавоноидов // *Кислородные радикалы в химии, биологии и медицине.-Рига, 1988. С.45-54.*
164. *Misra H.P., Fridovich I.* The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase // *J Biol Chem.* 1972. Vol.247. P.3170-3175.
165. *Cadenas E.* Biochemistry of oxygen toxicity // *Annu Rev Biochem.* 1989. Vol.58. P.79-110.
166. *Костюк В.А., Потанович А.И., Ковалева Ж.В.* Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина // *Вопр.мед.химии.-1990.-Т.36, № 2.- С.88-91.*
167. *Beyer W.F., Jr.and Fridovich I.* Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions // *Anal Biochem.* 1987. Vol.161. P.559-566.

168. *Flohe L., Otting F.* Superoxide dismutase assays // in *Methods in Enzymology* (Packer L. and Board A., eds) 1984. Vol.105. P.93-104.
169. *Чумаков В.Н., Осинская Л.Ф.* Количественный метод определения активности цинк-, медь-зависимой супероксиддисмутазы в биологическом материале // *Вопр. мед. химии.* 1977. № 5. С.712-716.
170. *Van Noorden C.J.F., Butcher R.G.* The involvement of superoxide anions in the nitro blue tetrazolium chloride reduction mediated by NADH and phenazine methosulfate // *Anal Biochem.* 1989. Vol.176. P.170-174.
171. *Kondo K., Kurihara M., Miyata N., Suzuki T., Toyoda M.* Mechanistic studies of catechins as antioxidants against radical oxidation // *Arch Biochem Biophys.* 1999. Vol.362. P.79-86.
172. *Bjeldanes L.F., Chang G.W.* Mutagenic activity of quercetin and related compounds // *Science.* 1977. Vol.197. P.577-578.
173. *Rahman A., Fazal F., Greensill J., Ainley K., Parish J.H., Hadi S.M.* Strand scission in DNA induced by dietary flavonoids: role of Cu(I) and oxygen free radicals and biological consequences of scission // *Mol Cell Biochem.* 1992. Vol.111. P.3-9.
174. *Ohshima H., Yoshie Y., Auriol S., Gilibert I.* Antioxidant and pro-oxidant actions of flavonoids: effects on DNA damage induced by nitric oxide, peroxy nitrite and nitroxyl anion // *Free Radic Biol Med.* 1998. Vol.25. P.1057-1065.
175. *Afanas'ev I.B., Ostrachovich E.A., Abramova N.E., Korkina L.G.* Different antioxidant activities of bioflavonoid rutin in normal and iron-overloading rats // *Biochem Pharmacol.* 1995. Vol.50. P.627-635.
176. *Afanas'ev I.B., Ostrachovich E.A., Korkina L.G.* Effect of rutin and its copper complex on superoxide formation and lipid peroxidation in rat liver microsomes // *FEBS Lett.* 1998. Vol.425. P.256-258.
177. *Bors W., Michel C., Stettmaier K.* Antioxidant effects of flavonoids // *Biofactors.* 1997. Vol.6. P.399-402.
178. *Afanas'ev I.B., Ostrachovich E.A., Mikhal'chik E.V., Ibragimova G.A., Korkina L.G.* Enhancement of antioxidant and anti-inflammatory activities of bioflavonoid rutin by complexation with transition metals // *Biochem Pharmacol.* 2001. Vol.61. P.677-684.
179. *Halliwell B.* The superoxide dismutase activity of iron complexes // *FEBS Lett.* 1975. Vol.56. P.34-38.
180. *Diguiseppi J., Fridovich I.* Putative superoxide dismutase activity of iron-EDTA: a reexamination // *Arch Biochem Biophys.* 1980. Vol.203. P.145-150.
181. *Braunwald E.* On future directions for cardiology // *Circulation.* 1988. Vol.77. P.13-22.
182. *Flaherty J.L., Weisfeldt M.L.* Reperfusion injury // *Free Radic Biol Med.* 1988. Vol.5. P.409-419.
183. *Zweier J.L., Rayburn B.K., Flaherty J.T., Weisfeldt M.L.* Recombinant superoxide dismutase reduces oxygen free radical concentration in reperfused myocardium // *J Clin Invest.* 1987. Vol.80. P.1728-1734.
184. *Полюхович Г.С., Костюк В.А.* О тактике использования некоторых фармакологических препаратов при реперфузии миокарда // *Вестн. Белорус. ун-та. Сер. 2.* 1997. №1. С.34-38.
185. *Stamler J.S., Singel D.J., Loscalzo J.* Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms // *Science.* 1992. Vol.258. P.1898-1902.

186. *Moncada S., Radomski M.W., Palmer R.M.J.* Endothelium-derived relaxing factor. Identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet-function // *Biochemical Pharmacology*. 1988. Vol.37. P.2495-2501.
187. *Unthank J.L., Nixon J.C., Dalsing M.C.* Acute compensation to abrupt occlusion of rat femoral artery is prevented NO synthase inhibitors // *Am J Physiol*. 1995. Vol.268 (Heart Circ. Physiol. 37). P.H2523-H2530.
188. *Radomski M.W., Palmer R.M.J., Moncada S.* The role of nitric oxide and CGMP in platelet adhesion to vascular endothelium // *Biochem Biophys Res Commun*. 1987. Vol.148. P.1482-1489.
189. *Radomski M.W., Palmer R.M.J., Moncada S.* Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium // *Lancet*. 1987. Vol.2. P.1057-1058.
190. *Костюк В.А., Полюхович Г.С.* Влияние СОД и донора NO на реперфузионные нарушения ритма сердца у крыс // *Бюлл.эксп.биол.и мед.* 1999. Т. №.2. С.137-140.
191. *Костюк В.А., Потапович А.И., Владыковская Е.Н., Царюк В.В., Полюхович Г.С.* Биофлавоноиды и их металлокомплексы: биологическая активность и перспективы использования для создания лекарственных препаратов // *Избранные научные труды Белорусского государственного университета: Т 7. Биология. География / Отв.ред. И.И. Пирожник*. 2001. Мн.: БГУ. С.155-174.
192. *McNamara J.O.* Emerging insights into the genesis of epilepsy // *Nature*. 1999. Vol.399 Supp. P.A15-A22.
193. *Willmore L.J., Sypert G.W., Munson J.B., Hurd R.W.* Chronic focal epileptiform discharges induced by injection of iron into rat and cat cortex // *Science*. 1978. Vol.200. P.1501-1503.
194. *Bashkatova V., Vitskova G., Narkevich V., Vanin A., Mikoyan V., Rayevsky K.* Nitric oxide content measured by ESR-spectroscopy in the rat brain is increased during pentylenetetrazole-induced seizures // *J Mol Neurosci*. 2000. Vol.14. P.183-190.
195. *Царюк В.В., Потапович А.И., Костюк В.А.* Защитное действие медь-рутинового комплекса при моделировании эпилепсии у животных // *Бюлл.эксп.биол.и мед.* 2002. Т.133. № 4. С.388-390.
196. *Hiramatsu M., Kumari M.V.R., Yoneda T, Sakamoto M, Toriizuka K.* Free radical-scavenging effect of a designed antioxidant drink: an electron spin resonance study // *in Food factors for cancer prevention*. 1997. Springer-Verlag. Tokyo. P.375-379.
197. *Inanami O., Watanabe Y., Syuto B., Nakano M., Tsuji M., Kuwabara M* Oral administration of (-)catechin protects against ischemia-reperfusion-induced neuronal death in the gerbil // *Free Radic Res*. 1998. Vol.29. P.359-365.
198. *Mazzio E.A., Harris N., Soliman K.F.* Mazzio E.A., Harris N., Soliman K.F. Food constituents attenuate monoamine oxidase activity and peroxide levels in C6 astrocyte cells // *Planta Med*. 1998. Vol.64. P.603-606.
199. *Wattenberg L.W.* Wattenberg L.W. (1985) Chemoprevention of cancer // *Cancer Res*. 1985. Vol.45. P.1-8.
200. *Otsuka T, Ogo T., Eto T., Asano Y., Suganuma M., Niho Y.* Growth inhibition of leukemic cells by (-)-epigallocatechin gallate, the main constituent of green tea // *Life Sci*. 1998. Vol.63. P.1397-1403.
201. *Asano Y., Okamura S., Ogo T., Eto T., Otsuka T., Niho Y.* Effect of (-)-epigallocatechin gallate on leukemic blast cells from patients with acute myeloblastic leukemia // *Life Sci*. 1997. Vol.60. P.135-142.

202. *Uchida S., Ozaki M., Suzuki K., Shikita M.* Radioprotective effects of (-)-epigallocatechin 3-O-gallate (green-tea tannin) in mice // *Life Sci.* 1992. Vol.50. P.147-152.
203. *Noreen Y., Serrano G., Perera P., Bohlin L.* Noreen Y., Serrano G., Perera P., Bohlin L. Flavan-3-ols isolated from some medicinal plants inhibiting COX-1 and COX-2 catalysed prostaglandin biosynthesis // *Planta Med.* 1998. Vol.64. P.520-524.
204. *Molnar J., Beladi I., Domonkos K., Foldeak S., Boda K., Veckenstedt A.* Antitumor activity of flavonoids on NK/Ly ascites tumor cells // *Neoplasma.* 1981. Vol.28.1 P.11-18.
205. *Scambia G., Ranelletti F.O., Panici P.B., DeVincenzo R., Bonanno G, Ferrandina G., Piantelli M., Bussa S., Rumi C., Cianfriglia M, Mancuso S.* Quercetin potentiates the effect of adriamycin in a multidrug-resistant MCF-7 human breast cancer cell line: P-glycoprotein as a possible target // *Cancer Chemother Pharmacol.* 1994. Vol.34. P.459-464.
206. *Scambia G., Benedetti-Panici P., Ranelletti F.O., Ferrandina G., DeVincenzo R., Piantelli M., Masciullo V., Bonanno G., Isola G., Mancuso S.* Quercetin enhances transforming growth factor α_1 secretion by human ovarian cancer cells // *Int J Cancer.* 1994. Vol.57. P.211-215.

Костюк Владимир Андреевич
Потапович Алла Ивановна

БИОРАДИКАЛЫ И БИОАНТИОКСИДАНТЫ

Монография

В авторской редакции.
Технический редактор Костюк В. А.
Корректор Стригунова Е. Н.
Компьютерная верстка Костюк В. А.

Подписано в печать . Формат 60×84/16. Бумага офсетная. Гарнитура Таймс.
Печать офсетная. Усл. печ. л.. Науч.-изд. л. Тираж 200 экз. Зак.

Белорусский государственный университет.
Лицензия ЛВ № 315 от 14.07.2003.
220050, Минск, проспект Франциска Скорины, 4.

Отпечатано с оригинала-макета заказчика.
Республиканское унитарное предприятие
«Издательский центр Белорусского государственного университета»
Лицензия ЛП № 461 от 14.08.2001.
220030, Минск, ул. Красноармейская, 6.