

Г. Г. Мартинович

АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА
В РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИЙ
И СВОЙСТВ КЛЕТОК:
ЯВЛЕНИЯ И МЕХАНИЗМЫ

Мартинovich, Г. Г. Активные формы кислорода в регуляции функций и свойств клеток: явления и механизмы / Г. Г. Мартинovich. – Минск : БГУ, 2021. – 239 с. : ил. – ISBN 978-985-881-022-1.

В монографии обобщены современные представления о регуляторных механизмах в клетках, протекающих с участием молекулярного кислорода и его метаболитов. Детально рассмотрены структура и функционирование основных ферментативных систем, участвующих в продукции и метаболизме свободно-радикальных форм кислорода, роль метаболитов кислорода в реализации механизмов действия физических факторов и наноматериалов в биологических системах. Освещены механизмы трансдукции сигнала в клетках, протекающие с участием активных форм кислорода и антиоксидантов, вопросы участия редокс-активных соединений в патофизиологических процессах, современные методы коррекции редокс-свойств клеток при патологии.

Табл. 10. Ил. 58. Библиогр. 994 назв.

*Печатается по решению
Редакционно-издательского совета
Белорусского государственного университета*

Рецензенты:

профессор кафедры медицинской и биологической физики
Гомельского государственного медицинского университета,
доктор биологических наук *М. Н. Стародубцева*;
заведующий кафедрой общей и медицинской биофизики
медико-биологического факультета Российского национального
исследовательского медицинского университета имени Н. И. Пирогова,
член-корреспондент РАН, доктор биологических наук *А. Н. Осипов*

Мир не просто удивительнее, чем мы себе представляем, – он удивительнее, чем мы можем себе представить.

Джон Бердон Холдейн

ПРЕДИСЛОВИЕ

В течение последних десятилетий человечество вплотную подошло к осознанию исключительной важности явлений, которые обусловлены наноразмерными эффектами. Упорядочивание атомных или молекулярных структур на расстояниях порядка нанометров создает принципиально новые эффекты как квантовой, так и механической природы. В рамках современных представлений живой организм можно рассматривать как упорядоченную совокупность высокоорганизованных наноструктур, осуществляющих реализацию всех жизненных функций. Интенсивное развитие физико-химических областей биологии создало основы для развития технологий управления свойствами биосистем в нанометровом масштабе и инициировало переход исследований от молекулярных к субмолекулярным механизмам, в которых главным участником является не отдельная молекула, а электрон.

В настоящее время редокс-регуляция, или регуляция процессов жизнедеятельности на основе механизмов межмолекулярного переноса электронов, является одним из активно изучаемых типов управления функционированием живых систем. Многочисленные исследования направленных потоков электронов в живых системах и их распределения в норме и при патологии привели к формированию новой области биологии – редокс-биологии [1; 2]. Редокс-технологии, или технологии управления функциональными свойствами живых систем на основе регуляции клеточных электрон-транспортных процессов, представляют собой новую группу биотехнологий, ориентированных на решение проблем старения, лечения онкологических и нейродегенеративных заболеваний [3; 4]. Научную основу для биомедицинского применения редокс-технологий формируют достижения в области редокс-медицины [4–6]. Установление закономерностей фармакологической и физико-химической регуляции клеточных редокс-процессов является необходимым этапом развития таких технологий.

В монографии обобщены современные представления о регуляторных механизмах, протекающих с участием молекулярного кислорода и его ме-

таболитов. Данные механизмы стали в последнее время предметом самого пристального внимания исследователей, поскольку они лежат в основе ключевых биохимических и биофизических процессов, но также являются составляющими развития многих патологических процессов и стрессовых ответов организма. Неудивительно, что участники свободнорадикальных процессов, их синтез, распространение и утилизация – центральные объекты исследований сотен лабораторий медико-биологического профиля во всем мире.

Монография состоит из пяти глав. В первой главе детально рассмотрены структура и функционирование основных ферментативных систем, участвующих в продукции и метаболизме свободнорадикальных и других активных форм кислорода.

Во второй главе представлены данные об участии метаболитов кислорода в реализации механизмов действия физических факторов на биологические системы. Особое внимание уделяется обсуждению механизмов регуляции уровня активных форм кислорода при действии наноматериалов на клетки. Освещены зависимости механизмов регуляции редокс-свойств биосистем от типа и физико-химических свойств искусственных наноматериалов.

В третьей главе описаны биологические процессы и явления, протекающие с участием активных форм кислорода. Рассмотрены явления редокс-регуляции и редокс-сигнализации в биологических системах. Основное внимание в работе уделяется механизмам трансдукции сигнала в клетках, реализующимся с участием активных форм кислорода и антиоксидантов.

В четвертой главе обобщены молекулярные и физико-химические основы, определяющие специфичность действия активных форм кислорода в разнообразных внутриклеточных процессах.

В пятой главе рассмотрены вопросы участия редокс-активных соединений в патофизиологических процессах, проанализированы новые методы коррекции редокс-свойств клеток при онкологических заболеваниях.

Автор выражает глубокую признательность и особую благодарность своему учителю академику НАН Беларуси, доктору биологических наук, профессору С. Н. Черенкевичу, который во многом способствовал становлению автора как специалиста.

Результаты исследований последних лет, отраженные в данной книге, были выполнены при частичной финансовой поддержке БРФФИ (гранты № M16P-022 и № B20Y-001), за которую автор также благодарен.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФК	– активные формы кислорода
МПО	– миелопероксидаза
НАД ⁺	– никотинамидадениндинуклеотид, окисленная форма
НАДН	– никотинамидадениндинуклеотид, восстановленная форма
НАДФ ⁺	– никотинамидадениндинуклеотидфосфат, окисленная форма
НАДФН	– никотинамидадениндинуклеотидфосфат, восстановленная форма
СОД	– супероксиддисмутаза
ФАД	– флавинадениндинуклеотид, окисленная форма
ФАДН ₂	– флавинадениндинуклеотид, восстановленная форма
ФМН	– флавиномононуклеотид, окисленная форма
ФМНН ₂	– флавиномононуклеотид, восстановленная форма
ТС-13	– 3-(3'- <i>трет</i> -бутил-4'-гидроксифенил)пропилтиосульфат натрия
AIF	– apoptosis inducing factor (фактор, индуцирующий апоптоз)
APAF	– apoptosis protease activating factor (фактор, активирующий протеазы апоптоза)
ANT	– adenine nucleotide transporter (адениннуклеотидный транспортер)
AMPK	– adenosine monophosphate-activated protein kinase (АМФ-активируемая протеинкиназа)
ARE	– antioxidant respons(iv)e element (антиоксидант-респонс(ив)ный элемент)
Atg	– autophagy-related genes (гены, связанные с аутофагией)
ATM	– ataxia telangiectasia mutated protein (мутантный при атаксии-телеангиэктазии белок)
Bcl-2	– B-cell-lymphoma protein 2 (белок 2 лимфоидных В-клеток)
Cdk	– cyclin-dependent kinase (циклинзависимая киназа)
Duox	– Dual oxidase (двойная оксидаза)
FoxO	– forkhead box transcription factor class O (транскрипционный фактор семейства FOXO)
GPx-1	– глутатионпероксидаза 1
Grx	– глутаредоксин
GSH	– глутатион
GSSG	– глутатион-дисульфид

ERK	– extracellular signal-regulated kinase (регулируемая внеклеточными сигналами киназа)
HIF	– hypoxia-inducible factor (фактор, индуцируемый гипоксией)
HSF	– heat shock factor (фактор теплового шока)
HSP	– heat shock protein (белок теплового шока)
Keap1	– Kelch-like ECH-associating protein 1 (Kelch-подобный ECH-ассоциированный протеин 1)
Klf9	– Kruppel-like factor 9 (Kruppel-подобный фактор 9)
MAPK	– mitogen-activating protein kinase (митоген-активируемая протинкиназа)
mTOR	– mammalian target of rapamycin (мишень для рапамицина у млекопитающих)
mTORC	– mammalian target of rapamycin complex (комплекс mTOR)
mPTP	– mitochondrial permeability transition pore (митохондриальная пора высокой проницаемости)
NAC	– N-ацетил-L-цистеин
Q	– убихинон
Q ^{•-}	– семихиноновый анион-радикал
QH ₂	– убихинол
Nrf2	– NF-E2-related factor 2 (транскрипционный фактор 2 семейства NFE)
NOS	– NO-синтаза
Nox	– NADPH oxidase (НАДФН-оксидаза)
phox	– phagocyte oxidase (оксидаза фагоцитов)
PI3K	– phosphatidylinositol 3-kinase (фосфатидилинозитол-3-киназа)
Prx	– пероксиредоксин
VDAC	– voltage dependent anion channel (потенциал-зависимый анионный канал)
Trx	– тиоредоксин
TrxR	– тиоредоксинредуктаза
UCP	– uncoupling protein (разобщающий белок)
WGA	– wheat germ agglutinin (агглютинин зародышей пшеницы)

Глава 1

АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА – ПРОДУКТЫ КЛЕТОЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА

1.1. Активные формы кислорода: основные представители и их физико-химические свойства

Важным явлением при клеточном дыхании является образование активных форм кислорода (АФК), обладающих широким спектром физиологического и патофизиологического действия. В настоящее время термин «активные формы кислорода» объединяет целый ряд образующихся в организме промежуточных продуктов метаболизма кислорода, таких как синглетный кислород ($^1\text{O}_2$), супероксидный ($\text{O}_2^{\cdot-}$) и гидроксильный ($\text{HO}^{\cdot}$) радикалы, монооксид ($^{\cdot}\text{NO}$) и диоксид азота ($^{\cdot}\text{NO}_2$), пероксинитрит-ион (ONOO^-), гипохлорит (ClO^-), пероксид водорода (H_2O_2) и др. К этому классу высокореакционных соединений относят различные химические соединения: свободные радикалы, бирадикалы, ионы и кислоты. В некоторых случаях $^{\cdot}\text{NO}$, $^{\cdot}\text{NO}_2$ и ONOO^- выделяют в отдельную группу веществ, объединяемую термином «активные формы азота». Наряду с термином «активные формы кислорода» для обозначения высокореакционных соединений кислорода в литературе также используются следующие: «активные метаболиты кислорода» [7], «низкомолекулярные кислородные интермедиаты» [8] и др. Однако из-за сходства строения и механизмов действия в биологических системах целесообразно использовать одну дефиницию. И хотя с физико-химической точки зрения термин «активные формы кислорода» не вполне удачен [9], широкое использование его не вызывает сомнений.

Время жизни, химическая активность и, следовательно, расстояние, которое успевают пройти молекулы АФК до взаимодействия с мишенью, зависит от их типа. Вследствие высокой химической активности время жиз-

ни $\text{HO}^\bullet$ радикалов в клетке составляет около 10^{-9} с, а расстояние, которое они успевают пройти от места их образования, не превышает 3 нм. Поэтому действие гидроксильного радикала обычно рассматривается только лишь на те мишени, в непосредственной близости к которым они образованы. С другой стороны, H_2O_2 , являясь наиболее стабильной формой АФК, может вступать в реакции с мишенями, удаленными на расстояние в несколько клеточных диаметров от места образования окислителя. Основные формы АФК и время их жизни при физиологических условиях среды представлены в табл. 1.1.

Таблица 1.1

АФК и время их жизни при физиологических условиях

Название	Обозначение	Время жизни, с
Синглетный кислород	$^1\text{O}_2$	10^{-6}
Супероксидный анион-радикал	$\text{O}_2^{\bullet -}$	10^{-6}
Гидроксильный радикал	$\text{HO}^\bullet$	10^{-9}
Гидропероксильный радикал	$\text{HO}_2^\bullet$	10^{-8}
Пероксид водорода	H_2O_2	10–100
Моноксид азота	$^\bullet\text{NO}$	1–100
Диоксид азота	$^\bullet\text{NO}_2$	10^{-7} – 10^{-8}
Пероксинитрит-ион	ONOO^-	0,05–1

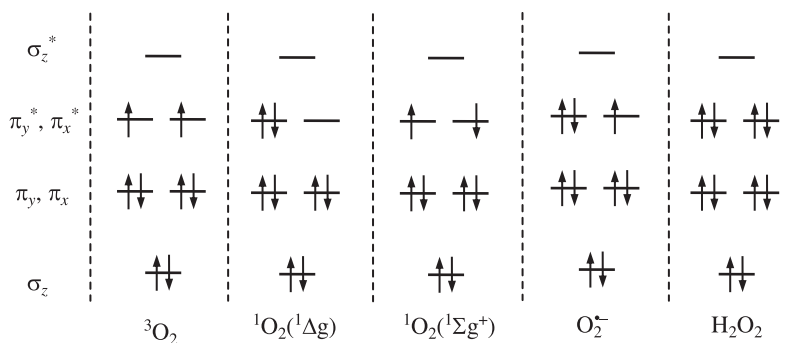
АФК подразделяются на первичные и вторичные. Первичные АФК – это те АФК, которые образуются непосредственно в ферментативных реакциях, протекающих в клетках. Вторичные АФК – это те АФК, которые образуются в результате взаимодействия АФК между собой или другими молекулами. В табл. 1.2 представлены некоторые первичные и вторичные АФК и возможные механизмы их образования. Принципиальное различие в физиологической роли первичных и вторичных АФК состоит в том, что первичные АФК выполняют прежде всего регуляторные функции и участвуют в процессах внутриклеточной и внеклеточной сигнализации, в то время как вторичные АФК вызывают повреждение биомолекул и способствуют развитию многих заболеваний.

На рис. 1.1 представлена схема электронного строения $2p$ -подуровней молекулярного кислорода и некоторых АФК. Молекулярный кислород в основном триплетном состоянии содержит два неспаренных электрона с одинаковым спином на различных π^* -разрыхляющих орбиталях.

Таблица 1.2

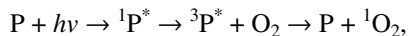
Первичные и вторичные АФК

Первичные АФК	Ферменты, участвующие в образовании АФК	Вторичные АФК	Реакции образования АФК
O_2^-	НАДФН-оксидаза, НАДН-убихинон оксидоредуктаза, убихинол-цитохром с оксидоредуктаза, ксантиноксидаза и др.	1O_2	$O_2^- + O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + ^1O_2$
H_2O_2	Супероксиддисмутаза, моноаминоксидаза, тирозингидроксилаза, фумаратредуктаза, сукцинатдегидрогеназа, аспаргатовоксидаза и др.	$ONOO^-$	$^*NO + O_2^- \rightarrow ONOO^-$
NO	NO-синтаза	$HO^, ^*NO_2$	$ONOOH \rightarrow ^*NO_2 + HO^*$

Рис. 1.1. Схема электронного строения $2p$ -подуровней молекулярного кислорода и его восстановленных форм

Молекула в этом состоянии обладает меньшей свободной энергией, чем в синглетном состоянии, где электроны имеют противоположно направленные спины и находятся на одной ($^1\Delta_g$) или на разных ($^1\Sigma_g^+$) $2p$ - π^* -орбиталях. Энергия молекулы в синглетном состоянии $^1\Delta_g$ больше энергии молекулы в основном триплетном состоянии на 96,3 кДж/моль, а энергия молекулы в синглетном состоянии $^1\Sigma_g^+$ – на 159,6 кДж/моль. В водных растворах кислород в синглетном состоянии $^1\Sigma_g^+$ не встречается, так как за время 10^{-12} с переходит в состояние $^1\Delta_g$. В отличие от молекулы кислорода в основном триплетном состоянии синглетный кислород (1O_2) обладает высокой химической активностью по отношению к ненасыщенным жирным кислотам,

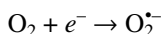
ароматическим аминокислотам и азотистым основаниям. Основными реакциями образования синглетного кислорода в живых системах являются фотоиндуцированные процессы, в которых происходит взаимодействие молекулы кислорода с находящейся в возбужденном состоянии молекулой фотосенсибилизатора:



где P , ${}^1P^*$, ${}^3P^*$ – молекула фотосенсибилизатора в основном, возбужденном синглетном и возбужденном триплетном состоянии.

Для присоединения пары электронов к молекуле кислорода в основном состоянии необходимо, чтобы спин одного из электронов изменил направление. Обращение спина электрона – процесс медленный по сравнению со временем жизни комплексов, образующихся в момент соударения реагирующих частиц. В результате спинового запрета окисление по одноэлектронному механизму протекает предпочтительнее, чем по двухэлектронному [10].

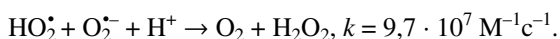
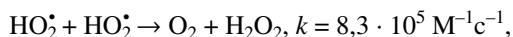
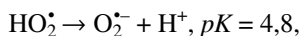
Продукт одноэлектронного восстановления кислорода в реакции



называют *супероксидным анион-радикалом* (сокращенно супероксидом) в его ионизированной форме и *гидропероксильным радикалом* в его протонированной форме. Супероксидный анион-радикал $O_2^{\bullet -}$ является первичным свободным радикалом в большинстве биологических систем. Одноэлектронное восстановление кислорода в клетках осуществляется с участием ряда ферментов, включая НАДФН-оксидазу (см. разд. 1.2).

Протонированная форма радикала $HO_2^{\bullet}$ является более сильным окислителем, чем супероксидный анион-радикал, и может непосредственно реагировать с линолевой, линоленовой и арахидоновой кислотами с образованием гидропероксидов. Гидропероксильный радикал является слабой кислотой с $pK_a = 4,8$ и подобно другим кислотам диссоциирует в воде. При физиологических pH (7,4) количество $HO_2^{\bullet}$ в среде составляет лишь незначительную часть (~0,25 %) от концентрации $O_2^{\bullet -}$. Супероксид обладает электрическим зарядом, и его движение через мембрану клеток осуществляется по анионным каналам. В отличие от $O_2^{\bullet -}$ его протонированная форма $HO_2^{\bullet}$ не несет заряда и поэтому сравнительно легко проникает через биологические мембраны.

Образование $O_2^{\bullet -}$ в любой биологической или модельной системе сопровождается образованием *пероксида водорода* в результате реакции дисмутации супероксида:

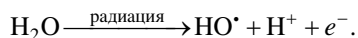


Скорость реакции дисмутации $O_2^{\bullet -}$ зависит от pH и определяется соотношением концентраций $O_2^{\bullet -}$ и $HO_2^{\bullet}$ [11]. В биологических системах скорость дисмутации супероксидных анион-радикалов существенно ускоряется в присутствии ключевого фермента метаболизма супероксида – супероксиддисмутазы (см. разд. 1.4).

Восстановление H_2O_2 в присутствии несвязанных ионов металлов переменной валентности (главным образом Fe^{2+} и Cu^+) приводит к образованию *гидроксильных радикалов*. Образование гидроксильных радикалов в присутствии ионов переходных металлов описывается реакцией Фентона:



Гидроксильные радикалы образуются также при действии ионизирующего излучения в процессе радиолиза воды (см. разд. 2.1)



Гидроксильный радикал относится к вторичным АФК и является наиболее высокореакционной формой АФК. Скорость реакции $HO^{\bullet}$ с большинством органических соединений близка к диффузионному пределу, и его образование в живых системах приводит к повреждению биомолекул.

Важным метаболитом кислорода, участвующим во многих физиологических процессах, является *монооксид азота*. Молекулы монооксида азота содержат неспаренный электрон на π^* -разрыхляющей орбитали $2p$ -подуровня и поэтому обладают парамагнитными свойствами. Из всех активных форм кислорода, содержащих азот (см. табл. 1.1), только $^{\bullet}NO$ синтезируется цитохром P_{450} -подобными гемопротеинами, относящимися к семейству NO-синтаз (см. разд. 1.5).

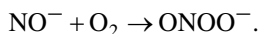
Оксид азота является газом, коэффициент диффузии которого в воде при температуре 37 °C в 1,4 раза выше, чем кислорода [12; 13]. Предполагается, что взаимодействие $^{\bullet}NO$ с биологическими мишенями зависит от электронной конфигурации его $2p-\pi^*$ -разрыхляющей орбитали [14]. Схема электронного строения $2p$ -подуровня молекулы оксида азота и его редокс-форм представлена на рис. 1.2.

Восстановление $^{\bullet}NO$ приводит к образованию нитроксильного аниона (нитроксила) NO^- . Нитроксил в основном триплетном состоянии ($^3NO^-$) содержит два неспаренных электрона с одинаковым спином на различных $2p-\pi^*$ -разрыхляющих орбиталях. В возбужденном синглетном состоянии электроны имеют противоположно направленные спины и находятся на одной ($^1\Delta g$) или на различных ($^1\Sigma g^+$) $2p-\pi^*$ -орбиталях.

σ_z^*	—	—	—	—	—
π_y^*, π_x^*	— —	$\uparrow$ —	$\uparrow\downarrow$ —	$\uparrow$ $\downarrow$	$\uparrow$ $\uparrow$
π_y, π_x	$\uparrow\downarrow$ $\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$ $\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$ $\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$ $\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$ $\uparrow\downarrow$
σ_z	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$
	NO^+	$\cdot\text{NO}$	${}^1\text{NO}^-({}^1\Delta_g)$	${}^1\text{NO}^-({}^1\Delta_g^+)$	${}^3\text{NO}^-$

Рис. 1.2. Схема электронного строения 2p-подуровней монооксида азота и его редокс-форм

Оксид азота и нитроксил могут оказывать противоположные эффекты на свойства клеток. Например, показано, что NO^- обладает токсическим действием в сердечно-сосудистой системе, тогда как $\cdot\text{NO}$ оказывает протекторное действие при тех же условиях [15]. В аэробном окружении NO^- быстро вступает в реакцию с кислородом с образованием пероксинитрита-иона ($k = 5,7 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [16]:



Следует отметить, что процесс восстановления $\cdot\text{NO}$ требует большого количества энергии ($E^0(\cdot\text{NO}/{}^3\text{NO}^-) = -700 \text{ мВ}$; $E^0(\cdot\text{NO}/{}^1\text{NO}^-) = -1700 \text{ мВ}$), т. е. при физиологических условиях восстановление $\cdot\text{NO}$ самопроизвольно не протекает.

Наличие энергетического барьера для восстановления $\cdot\text{NO}$ приводит к тому, что в отличие от молекулярного кислорода в живых системах химические преобразования оксида азота протекают преимущественно по механизму окисления (рис. 1.3). В результате окисления $\cdot\text{NO}$ в организме образуются диоксид азота ($\cdot\text{NO}_2$), нитрит (NO_2^-) и нитрат (NO_3^-).

Потеря электрона с внешней орбитали, приводящая к образованию нитрозония (NO^+), увеличивает реакционность оксида азота по отношению к тиоловым группам. При физиологических pH нитрозилирование белков осуществляется посредством действия таких соединений, как S-нитрозотилолы и S-нитрозоамины [17]. В биологических системах возможно протекание серий реакций транснаитрозилирования с переходом NO^+ -групп от одного носителя к другому.

Одновременное образование $\text{O}_2^{\cdot-}$ и $\cdot\text{NO}$ в клетке приводит к формированию высокотоксичного пероксинитрита-иона (ONOO^-), который при протонировании образует пероксиазотистую кислоту (ONOOH).

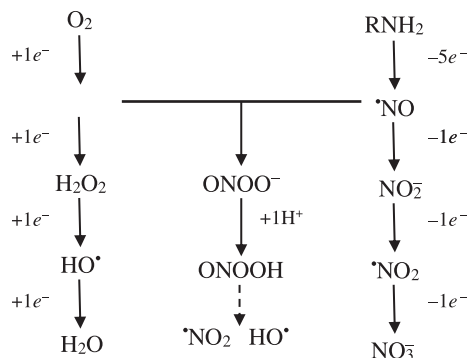
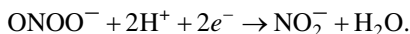
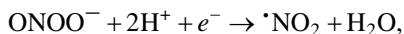


Рис. 1.3. Пути восстановления кислорода и окисления оксида азота

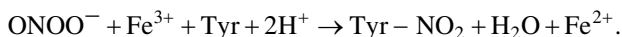
Скорость реакции между O_2^- и $\cdot\text{NO}$ близка к диффузионному пределу и в щелочных растворах может достигать $(1,9 \pm 0,2) \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ [18; 19]. Коэффициент проницаемости пероксинитрита в биологических мембранах $(8,0 \cdot 10^{-4} \text{ см c}^{-1})$ в несколько раз меньше коэффициента проницаемости воды и в 400 раз больше коэффициента проницаемости супероксида [20; 21]. С учетом времени жизни пероксинитрита при физиологических условиях и его высокой проницаемости через клеточные мембраны предполагается, что дистанция диффузии пероксинитрита в биологических системах может составлять несколько клеточных диаметров [22].

Время жизни пероксинитрит-иона в растворе зависит от pH среды и достигает 116 дней при $\text{pH} = 14$ [23]. При физиологических pH время полураспада для пероксинитрита составляет примерно 1 с [24]. Уменьшение концентрации ONOO^- происходит в результате протекания реакций окисления биомолекул или разложения пероксинитрит-иона с образованием нитритов и нитратов [25].

Показано, что в присутствии O_2^- и $\cdot\text{NO}$ происходит нитрирование аминокислотных остатков тирозина в белках. Считается, что ONOO^- играет ключевую роль в данном процессе [26]. Пероксинитрит-ион может вступать в реакции окисления, протекающие по одноэлектронному или двухэлектронному механизму:



Аминокислотные остатки тирозина нитрируются с образованием 3-нитротирозина. Эта реакция катализируется свободными металлами и металлосодержащим ферментами, такими как супероксиддисмутазы [27]:



Для ONOO^- доминирующим типом реакций являются реакции окисления. Пероксинитрит, как любой другой окислитель, может вступать в реакции с клеточными тиолами. В результате этих реакций образуются тиоловые радикалы или производные сульфениковой кислоты (RSOH), которые вступают в реакции с другими тиолами с образованием дисульфидных связей.

Одним из важнейших аспектов химии пероксинитрит-иона является его высокая скорость реакции с диоксидом углерода, образование которого в живом организме происходит в процессах клеточного дыхания. При взаимодействии ONOO^- и CO_2 образуются пероксикарбонат, который распадается на карбонатный анион-радикал ($^-\text{CO}_3$), и диоксид азота. Вместе с тем в живых системах пероксинитрит может служить источником гидроксильных радикалов (см. рис. 1.3).

Образование гидроксильного радикала в клетке может также происходить при взаимодействии хлорноватистой кислоты с ионами железа и супероксидом. *Хлорноватистая*, или *гипохлорная, кислота* (HOCl) наряду с пероксинитритом является одним из наиболее сильных окислителей в живых системах. HOCl образуется в нейтрофилах при участии гем-содержащего цитоплазматического фермента миелопероксидазы (см. разд. 1.7). Депротонированная форма хлорноватистой кислоты (ClO^-) называется *гипохлоритом*. Гипохлорит участвует в реакциях окисления и хлорирования биологических мишеней. Окисление тиолов протекает с наибольшей скоростью по сравнению с другими реакциями гипохлорита. Константа скорости реакции ClO^- с глутатионом около $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [28].

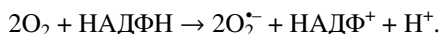
Следует отметить, что АФК взаимодействуют не только с мишенями, но и между собой. Например, известно, что ^-NO может активировать гуанилатциклазу в результате обратимого связывания с двухвалентным железом ее гема. Однако в присутствии $\text{O}_2^{\cdot-}$ и ^-NO в результате реакции между ними образуется ONOO^- . Одновременное образование $\text{O}_2^{\cdot-}$ и ^-NO обнаружено во многих типах клеток, включая нервные, эндотелиальные и иммунокомпетентные клетки [29; 30]. Константа скорости реакции образования пероксинитрит-иона ($\sim 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) в несколько раз превышает константу скорости реакции дисмутации $\text{O}_2^{\cdot-}$ ферментом супероксиддисмутазой ($\sim 2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) и на несколько порядков превышает константу реакций связывания ^-NO с гемовым железом ($\sim 3 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), поэтому образование пероксинитрита в клетке является наиболее вероятным.

Предполагается, что различные клеточные состояния зависят от соотношения концентраций ^-NO и $\text{O}_2^{\cdot-}$ [31]. В состоянии покоя наблюдается высокое соотношение $^-\text{NO}/\text{O}_2^{\cdot-}$ (>10), а преобладающим интермедиатом является ^-NO . Активация клеток будет наблюдаться при отношении $^-\text{NO}/\text{O}_2^{\cdot-}$ около 2–3,

когда преобладающим интермедиатом будет NO^+ . Максимальной активации соответствует отношение NO/O_2^- , равное 1, при котором преимущественно образуется ONOO^- , а при отношении NO/O_2^- менее 0,5 будет происходить повреждение клеточных мишеней в результате образования NO_2 и $\text{HO}^\bullet$.

1.2. Супероксидный анион-радикал и семейство НАДФН-оксидаз

Генерация O_2^- в клетке осуществляется с участием ряда ферментов, наиболее изученным из которых является НАДФН-оксидаза (ЕС 1.6.3.1). НАДФН-оксидаза катализирует одноэлектронное восстановление кислорода в реакции, в которой кофермент никотинамидадениндинуклеотид фосфат (НАДФН) используется как донор электронов:



Фермент НАДФН-оксидаза – это мультикомпонентный мембранный комплекс, обеспечивающий трансмембранный перенос электронов. То есть структурные компоненты НАДФН-оксидазы организуют трансмембранную электрон-транспортную цепь, обеспечивающую перенос электронов между субстратами (НАДФН и O_2), располагающимися по разным сторонам клеточной мембраны. НАДФН-оксидаза относится к семейству супероксид генерирующих оксидаз (обозначаемых как Nox семейство оксидаз), состоящему из семи членов: Nox 1 (NADPH oxidase 1), Nox2, Nox3, Nox4, Nox5, Duox1 (Dual oxidase 1) и Duox2 [32]. Наиболее изученным из них является НАДФН-оксидаза фагоцитов, которая в активированных нейтрофилах обеспечивает «дыхательный взрыв» (состояние фагоцитирующих клеток, характеризующееся повышением поглощения кислорода и метаболической активности). Этот фермент состоит из двухсубъединичного интегрального белка – флавоцитохрома b_{558} – и водорастворимых регуляторных белковых субъединиц p40^{phox} (phox от phagocyte oxidase), p47^{phox} , p67^{phox} . Флавоцитохром b_{558} представляет собой мембранный комплекс, состоящий из двух субъединиц – большого гликопротеина $\text{gp91}^{\text{phox}}$, составляющего каталитическую часть НАДФН-оксидазы фагоцитов и известного как Nox2, и малого белка p22^{phox} . Гликопротеин $\text{gp91}^{\text{phox}}$ содержит флавинадениндинуклеотид (ФАД) и два гема (рис. 1.4). В не активированных клетках комплекс из трех субъединиц – p40^{phox} , p47^{phox} и p67^{phox} – находится в цитоплазме.

При активации клеток (при фагоцитозе, адгезии клеток, при действии хемотоксинов и других стимулов) происходит фосфорилирование субъединицы p47^{phox} протеинкиназой С, и цитозольный комплекс из водорастворимых субъединиц НАДФН-оксидазы, перемещаясь из цитозоля к мембране,

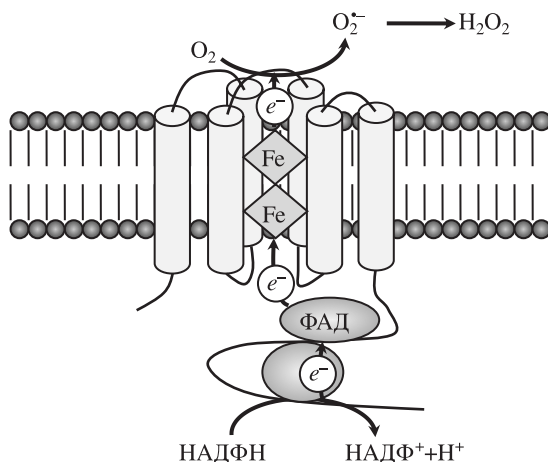


Рис. 1.4. Топология $gp91^{phox}$ -комплекса

связывается с мембранным комплексом. Взаимодействие цитозольного комплекса с цитохромом сопровождается изменением конформационного состояния последнего, что необходимо для связывания НАДФН с цитозольной стороны мембраны. Электроны от НАДФН переносятся в комплексе через ФАД и гемовые группы на другую сторону мембраны (в фагосомы или наружу клетки) к молекулярному кислороду.

Можно выделить несколько этапов трансмембранного переноса электронов, осуществляемого НАДФН-оксидазой (рис. 1.5) [33]. Первый шаг – это перенос двух электронов на ФАД. Следующим этапом является перенос электрона с $ФАДН_2$ (E^0 ($ФАДН^*/ФАДН_2$) = -304 мВ) на внутренний гем (E^0 (Fe^{3+}/Fe^{2+}) = -225 мВ) с образованием семихинонового радикала $ФАДН^*$. Затем (рис. 1.5, 3, 4) электрон переносится через внешний гем (E^0 (Fe^{3+}/Fe^{2+}) = -225 мВ) на кислород (E^0 ($O_2/O_2^{\cdot-}$) = -137 мВ). В результате последующих этапов на кислород переносится электрон с $ФАДН^*$ (E^0 ($ФАД/ФАДН^*$) = -256 мВ). Наличие кислорода является необходимым условием для переноса электронов по простетическим группам фермента. Поскольку редокс-потенциал внешнего гема ниже, чем внутреннего (см. рис. 1.5), в отсутствие молекулярного кислорода электроны будут оставаться на внутреннем геме. Таким образом, движущую силу процесса определяет разность редокс-потенциалов кислорода и НАДФН.

Трансмембранный перенос электронов, осуществляемый НАДФН-оксидазой, приводит к повышению концентрации супероксида снаружи клетки или внутри фагосом. При этом скорость генерации супероксидного анионрадикала внутри фагосом может достигать $5\text{--}10$ мМ/с [34].

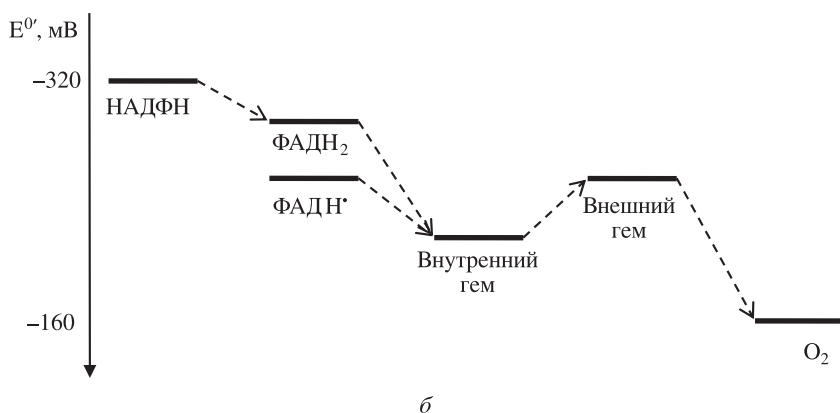
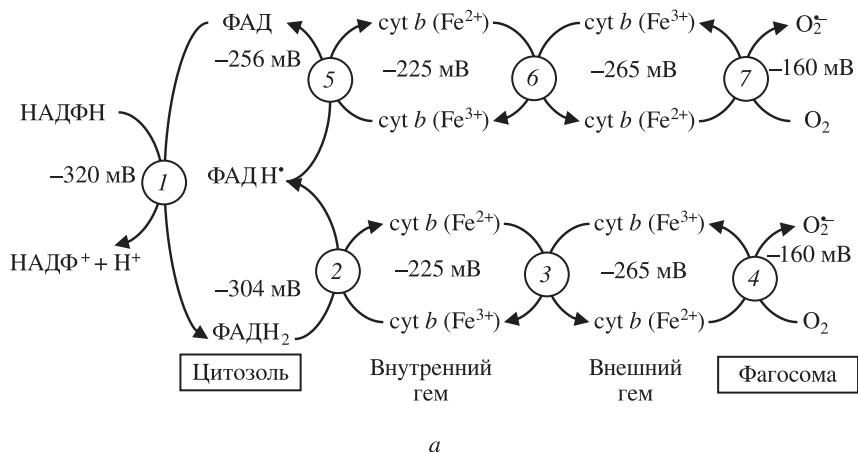


Рис. 1.5. Электрон-транспортные пути в флавоцитохроме b_{558} (а) и диаграмма изменений редокс-потенциалов участников транспорта электронов (б)

В фагоцитах скорость генерации АФК на два порядка выше скорости генерации в остальных типах клеток.

Оксидазы Nox-семейства подразделяются на три группы, в соответствии с имеющимися в их структуре дополнительными к $gp91^{phox}$ -доменами [35]. Первую группу образуют Nox1, Nox2, Nox3 и Nox4; Nox1, Nox3 и Nox4 структурно подобны гликопротеину $gp91^{phox}$ и содержат аналогичные редокс-активные простетические группы (ФАД и два гема). Полипептидная цепь Nox1, Nox2, Nox3 и Nox4 содержит шесть трансмембранных α -спиральных участков, образующих мембранный домен фермента. В этой области Nox-белков находится пять консервативных остатков гистидина, четыре из кото-

рых обеспечивают места связывания для двух гемов. Цитозольный домен полипептидной цепи со стороны карбоксильного окончания содержит ФАД и место связывания НАДФН (см. рис. 1.4). У оксидазы второй группы Nox5 в отличие от оксидаз предыдущей группы имеется цитозольный участок пептидной цепи со стороны аминогруппы, содержащий Ca^{2+} -связывающий домен. Полипептидная цепь Duo1 и Duo2, образующих третью группу ферментов семейства Nox, в отличие от Nox5 содержит дополнительный транс-мембранный α -спиральный участок и внеклеточный пероксидазный домен со стороны N-окончания, являющийся гомологом миелопероксидазы. Несмотря на то что все члены семейства Nox генерируют O_2^- (а Nox4, Duo1 и Duo2 – преимущественно H_2O_2), биологические функции и тканевое распределение данных ферментов существенно различаются.

Высокий уровень экспрессии Nox1 наблюдается в клетках эпителия толстой кишки [36]. Фермент также обнаружен в клетках гладкой мышечной ткани, эндотелиальных клетках, остеокластах, нейронах, астроцитах и клетках микроглии [37; 38]. Nox1 локализована в плазматической мембране клеток, преимущественно в кавеолах [39]. В клетках эпителия толстой кишки и микроглии Nox1 участвует в механизмах иммунной защиты подобно Nox2 фагоцитов [40; 41]. В гладкой мышечной ткани Nox1 участвует в процессах внутриклеточной сигнализации, инициированных действием ангиотензина II [42; 43].

Генерация АФК с участием Nox2 в фагосомах необходима для уничтожения различных типов микроорганизмов. При этом разрушение патогенов происходит не только в результате окислительного повреждения биомолекул, но и включает активацию дополнительных ферментативных механизмов. Установлено, что супероксид, продуцируемый Nox2, приводит к деполяризации фагосомальных мембран, что сопровождается индуцированным компенсаторным входом ионов калия и водорода в фаголизосомы [44]. Увеличение ионной силы в этих структурах ведет к высвобождению микробицидных протеаз из анионного протеогликанного матрикса, с которым эти ферменты связаны. Протеолитическое расщепление структурных компонентов микроорганизмов ведет к их гибели. Таким образом, разрушение патогенов при активации НАДФН-оксидазы происходит в результате окислительных (окисление липидов, белков и нуклеиновых кислот, углеводов) и протеолитических процессов.

Высвобождаемые во внеклеточную среду АФК активируют металлопротеиназы, выходящие из фагоцитов, и инактивируют ингибиторы серинпротеинкиназ в жидкостях тела. В результате эти протеиназы могут действовать на компоненты ткани и разрушать нежелательный материал. Однако при хронических воспалениях эти реакции могут вести к существенным повреждениям тканей и поэтому должны подавляться.

Кроме фагоцитов Nox2 обнаружена также в клетках поперечно-полосатых и гладких мышц, кардиомиоцитах, эндотелиоцитах, фибробластах, гепатоцитах и гемопоэтических стволовых клетках [45]. В фагоцитирующих клетках Nox2 преимущественно (95 %) локализована в мембране фагосом, а в эндотелиальных клетках Nox2 содержится в кавеолах мембран ламеллоподий [46]. В гладкомышечных клетках Nox2 располагается вблизи перинуклеарного цитоскелета, а в нейронах – в мембране синапсов [47].

В эндотелиоцитах активация Nox2 происходит при механотрансдукции и действии эндотелина-1, фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), фактора некроза опухоли альфа (TNF- α) [48; 49]. Нарушение функционирования Nox2 приводит к дисфункции эндотелия и развитию гипертензии [50].

Оксидаза Nox3 является супероксид генерирующей оксидазой клеток внутреннего уха и экспрессируется в кохлеарном и вестибулярном сенсорном эпителии, а также в спиральном ганглии [51]. Nox3 выполняет ключевую роль в образовании отолитов (отоконий) – кристаллов бикарбоната кальция, являющихся компонентами отолитового аппарата в вестибулярном анализаторе, адекватными раздражителями для которого являются изменения положения головы, воздействие на организм гравитационных сил, прямолинейных и центростремительных ускорений [52]. Предполагается, что Nox3 является конститутивно активным ферментом [44]. Усиление продукции АФК в клетках внутреннего уха происходит при действии ототоксических агентов и шума [53].

Оксидаза Nox4 обнаружена в многих типах клеток, включая эндотелиальные клетки [54], фибробласты [55], кератиноциты [56], остеокласты [57], нейроны [58] и гепатоциты [59]. Высоким содержанием Nox4 характеризуются клетки почек [60]. В клетках Nox4 локализуется в плазматической мембране (в областях фокальных контактов), в мембранах эндоплазматического ретикула и ядерных мембранах [61; 62]. В кардиомиоцитах Nox4 обнаружена в митохондриях [63], однако точная локализация и ориентация фермента в мембранах митохондрий неизвестна [64]. Продуцируемые Nox4 АФК являются участниками процессов внутриклеточной сигнализации. Например, в адипоцитах активация Nox4 и последующая генерация АФК необходима для усиления процессов фосфорилирования путем ингибирования фосфатазы PTP1B, что является одной из стадий инсулин-индуцируемой трансдукции сигнала в клетках [65].

Nox5 локализована в плазматической мембране и экспрессируется в клетках селезенки [66], гладкомышечных клетках [67], эндотелиоцитах [68] и других типах клеток. Предполагается, что оксидаза Nox5 играет важную роль в регуляции пролиферации клеток [67]. Высокий уровень экспрессии данного фермента наблюдается во многих типах опухолевых клеток [69–71].

Двойные оксидазы Duox1 и Duox2 первоначально были обнаружены в клетках щитовидной железы, в которых они участвуют в биосинтезе тиреоидных гормонов [72]. Duox1 и Duox2 также экспрессируются в клетках эпителия дыхательных путей [73] и предстательной железы [74].

В одних и тех же клетках могут экспрессироваться разные типы Nox оксидаз. Скорость продукции супероксида различными оксидазами также различается. Различные гомологи Nox семейства активируются разными стимулами и, следовательно, вызывают разные клеточные отклики. С другой стороны, одни и те же ферменты в разных типах клеток могут выполнять различные функции. Например, в гладкомышечных клетках при действии ангиотензина II и тромбоцитарного фактора роста (PDGF) активируется Nox1 [75], а при действии фактора некроза опухоли – Nox4 [76]. Активация Nox1 стимулирует пролиферацию, а Nox4 – дифференцировку клеток. В отличие от гладкомышечных клеток в мезангиальных клетках ангиотензин II активирует Nox4 и вызывает развитие гипертрофии [77]. В экспериментах на животных сверхэкспрессия Nox1 в гладкомышечных клетках приводит к повышению давления [78], а сверхэкспрессия Nox4 в эндотелиальных клетках – к снижению [79]. Таким образом, биологические функции членов семейства НАДФН-оксидаз зависят от ряда факторов. Среди основных факторов, определяющих специфичность действия продуктов Nox, следует отметить субклеточную колокализацию фермента и мишени действия его продуктов, а также внутриклеточные редокс-условия (см. гл. 4).

1.3. Продукция активных форм кислорода в дыхательной цепи митохондрий

Оксидоредуктазы митохондрий являются основным источником образования АФК для большинства клеток млекопитающих. Около 3–5 % от поступающего в митохондрии O_2 используется для образования АФК. Основными источниками митохондриальной продукции АФК являются компоненты электрон-транспортной (дыхательной) цепи митохондрий [80]. В организме человека, вес которого составляет 80 кг, за счет перехода электронов с компонентов митохондриальной электрон-транспортной цепи на кислород в сутки образуется около 215–430 мМ супероксидных анион-радикалов [81].

Электрон-транспортная цепь митохондрий является одним из основных преобразователей энергии в клетках животных, обеспечивая трансформацию химической энергии в электрическую энергию путем сопряжения процессов переноса электронов с процессами трансмембранного переноса протонов [82].

Дыхательная цепь митохондрий образована комплексом ферментов внутренней мембраны митохондрий, катализирующих сопряженный с формированием трансмембранного градиента электрохимического потенциала протонов перенос электронов от НАДН на O_2 (рис. 1.6). Окисленная форма никотинамидадениндинуклеотида ($НАД^+$) является своеобразным «коллектором» электронов от основной части катаболических процессов [82]. Источником электронов для восстановления $НАД^+$ могут служить различные органические соединения, однако окисление НАДН осуществляется молекулярным кислородом только в дыхательной цепи. Именно митохондрии представляют собой универсальный для большинства организмов «топливный элемент», в котором топливом служит одно и то же соединение. Трансмембранный градиент электрохимического потенциала протонов, генерируемый данным преобразователем энергии, является движущей силой для процессов фосфорилирования АДФ ферментом H^+ -АТФ-синтазой.

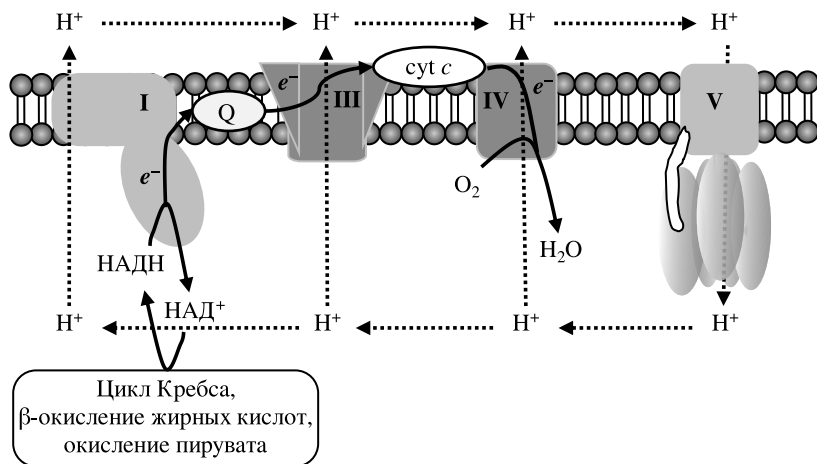


Рис. 1.6. Ключевые участники сопряжения внутримолекулярного переноса электронов с трансмембранным переносом протонов во внутренней мембране митохондрий:

I – комплекс I; III – комплекс III; IV – комплекс IV;
V – H^+ -АТФ-синтаза; Q – кофермент Q; cyt c – цитохром c

Компонентами дыхательной цепи митохондрий (см. рис. 1.6) являются три белковых комплекса (комплексы I, III и IV), встроенные во внутреннюю митохондриальную мембрану, и две подвижные молекулы-переносчики – убихинон (кофермент Q) и цитохром c. Комплексы дыхательной цепи являются интегральными белками, построенными из большого числа поли-

пептидов и содержащими ряд простетических групп (ФМН и ФАД, железосерные центры и группы гемов) [82]. Сукцинатдегидрогеназа, относящаяся к компонентам цикла Кребса, иногда рассматривается как комплекс II дыхательной цепи. Однако сукцинатдегидрогеназа переносит электроны от сукцината на кофермент Q без трансмембранного переноса протонов и, таким образом, не является молекулярным преобразователем энергии.

Электроны, передаваемые от НАДН, не переносятся непосредственно на кислород. Они проходят через полтора десятка промежуточных окислительно-восстановительных систем, большинство из которых – простетические группы в комплексах I, III и IV. При окислении НАДН в комплексе I электроны переносятся на убихинон через ФМН и железосерные центры. При этом окисленная форма кофермента Q восстанавливается до убихинола. Убихинол переносит электроны к комплексу III, который поставляет их через Fe_2S_2 -центр и гем c_1 на цитохром c . От цитохрома c электроны поступают к комплексу IV, в котором через медьсодержащие центры (Cu_A и Cu_B) и гемы a и a_3 наконец поступают на O_2 . Поток электронов происходит в направлении участников с более высоким редокс-потенциалом и сопровождается образованием комплексами I, III и IV трансмембранного градиента электрохимического потенциала протонов.

Если редокс-потенциал окисляемого субстрата значительно ниже, чем редокс-потенциал пары $\text{НАД}^+/\text{НАДН}$, то электроны с такого субстрата поступают на уровне комплекса III или комплекса IV. Так, образующиеся при окислении сукцината ($E^0 = +31$ мВ) электроны переносятся на убихинон сукцинатдегидрогеназой через связанный с ферментом ФАД и железосерные кластеры. Электроны от сукцината поступают в дыхательную цепь, минуя комплекс I.

В очень редких случаях редокс-потенциал окисляемого субстрата выше, чем у пары убихинон/убихинол. Тогда электроны входят в цепь на уровне цитохрома c и в трансформации энергии принимает участие только комплекс IV. Именно комплекс IV (ферроцитохром $c:\text{O}_2$ оксидоредуктаза, цитохром c -оксидаза, ЕС 1.9.3.1) электрон-транспортной цепи митохондрий катализирует заключительную стадию многоступенчатого окисления различных органических субстратов в клетке, осуществляя перенос электронов непосредственно на кислород. Более 90 % поступающего в митохондрии O_2 восстанавливается до H_2O в результате переноса четырех электронов в гем-медном биядерном центре комплекса IV, образованном медьсодержащим центром Cu_B и гемом a_3 . Однако в дыхательной цепи митохондрий также возможно одноэлектронное восстановление молекулярного кислорода в результате переноса электронов от промежуточных элементов цепи. Такое восстановление осуществляется с участием комплекса I и комплекса III [83].

Факторы, регулирующие продукцию АФК компонентами электрон-транспортной цепи *in vivo*, полностью не установлены. Тем не менее выделяют ряд параметров дыхательной цепи, величина которых влияет на скорость образования АФК. Наиболее важным фактором является редокс-состояние компонентов дыхательной цепи. Ингибирование транспорта электронов в цепи, ведущее к увеличению содержания промежуточных переносчиков в восстановленном состоянии, усиливает образование АФК. Другим важным фактором регуляции продукции АФК дыхательной цепью является величина градиента электрохимического потенциала протонов на внутренней мембране митохондрий, или протондвижущая сила. Величина трансмембранного градиента электрохимического потенциала протонов зависит от разности электрических потенциалов и разности величины рН. С ростом протондвижущей силы продукция АФК увеличивается.

К настоящему времени структура комплексов дыхательной цепи полностью установлена, что позволяет детализировать механизмы образования АФК с участием комплекса I и комплекса III.

Комплекс I (НАДН : убихинон оксидоредуктаза, НАДН-дегидрогеназа, ЕС 1.6.5.3) митохондрий млекопитающих состоит из 44 субъединиц и имеет молекулярную массу 980 кДа [84]. Простетическими группами белка являются ФМН и железосерные кластеры. Комплекс I содержит два домена – мембранный и гидрофильный, ориентированный в матрикс митохондрий. В сопряжении транспорта электронов и протонов участвуют 14 субъединиц (7 гидрофильных и 7 гидрофобных) общей массой ~ 550 кДа, состав которых постоянен для разных видов организмов – от бактерий до человека [85]. Гены, кодирующие эти 14 субъединиц, в геномах большинства прокариот объединены в один оперон и обозначаются *nuo* (NADH:ubiquinone oxidoreductase). Альтернативная номенклатура использует сокращение *nqo* (NADH:quinone oxidoreductase).

В состав митохондриального комплекса I входит 28 атомов железа, упакованных в 8 железосерных кластерах (2 Fe_2S_2 , 6 Fe_4S_4). В составе бактериальных комплексов I содержится от 9 (*Thermus thermophilus*, *Escherichia coli*) до 10 (*Aquifex aeolicus*) железосерных кластеров. Структура бактериального комплекса I из *Thermus thermophilus*, установленная в исследованиях под руководством профессора Л. Сазанова, представлена на рис. 1.7.

Гидрофильный домен фермента содержит место связывания НАДН и все простетические группы фермента, включая ФМН, 8 железосерных кластеров (N1a, N1b, N3, N4, N5, N6a, N6b, N2), консервативных для ферментов всех видов, и 1 дополнительный центр (N7), обнаруженный в комплексе I некоторых бактерий. Кластер N7 расположен на расстоянии более 20 Å от остальных редокс-активных центров и не вовлечен во внутрибелковый электронный

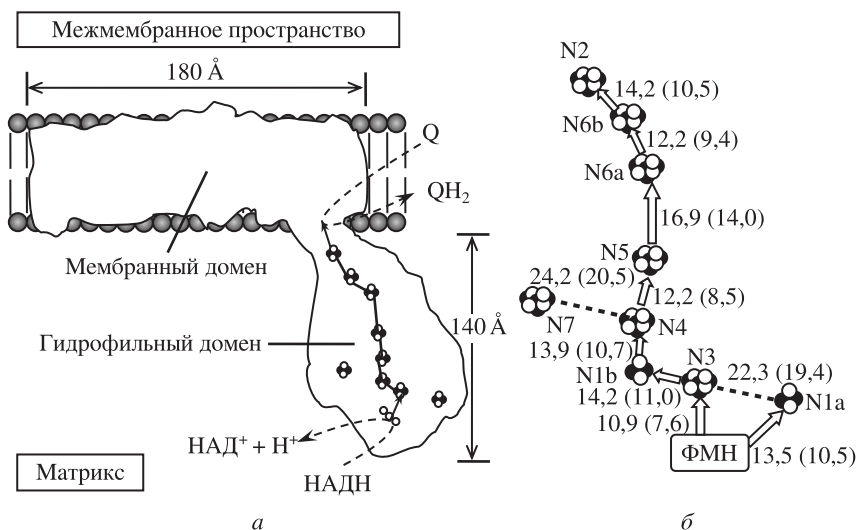


Рис. 1.7. Структура бактериального комплекса I из *Thermus thermophilus* (а) и расположение его простетических групп (расстояние между центрами кластеров, а также (в скобках) между их краями указано в ангстремах) (б)

транспорт. Железосерные кластеры N1a и N1b являются кластерами Fe₂S₂ типа, остальные – Fe₄S₄ типа. Два электрона, поступающие от НАДН, переносятся через ФМН и железосерные центры на убихинон, который связывается с активным центром, расположенным внутри гидрофобной фазы мембраны.

Путь переноса электронов от НАДН к убихинону в комплексе I, проходящий через ФМН и железосерные кластеры, составляет более 100 Å. ФМН присоединяет сразу два электрона от НАДН и затем по одному электрону последовательно переносит их на кластер N3. Дальнейший перенос электронов осуществляется в последовательности N3 → N1b → N4 → N5 → N6a → → N6b → N2. Расстояние между редокс-центрами в электрон-транспортной цепи фермента составляет около 14 Å и соответствует максимально возможному расстоянию для переноса электрона в биологических системах путем туннелирования [86]. У большинства железосерных кластеров фермента редокс-потенциал составляет около –250 мВ. Наиболее высокий редокс-потенциал у Fe₄S₄ центра N2 ($E^0 = -100$ мВ). Именно через этот центр осуществляется передача электронов на убихинон (см. рис. 1.7). Перенос электронов с железосерных кластеров на убихинон ингибируется хиноноподобными ингибиторами – пестицидом ротеноном и антибиотиком пирицидином А.

Образование АФК в комплексе I происходит как при транспорте электронов от НАДН к убихинону (прямой электронный перенос), так и при

транспорте от убихинола к НАД⁺ (обратный электронный перенос). Обратный электронный перенос наблюдается при высоком мембранном потенциале митохондрий и сопровождается большим выходом АФК [87]. Скорость генерации H₂O₂ изолированными митохондриями нейронов крысы при прямом электронном переносе в комплексе I составляет 0,06–0,4 нМ H₂O₂/мин на мг белка, а при обратном – 1,0–3,0 нМ H₂O₂/мин на мг белка [88]. Образование АФК при обратном переносе зависит от величины мембранного потенциала и увеличивается с ростом потенциала [89]. Показано, что ротенон усиливает продукцию АФК в комплексе I при прямом электронном переносе и снижает образование АФК при обратном переносе [90].

В комплексе I компонентами, с которых возможен перенос электронов на кислород, являются флаavin, семиубихинон и не относящийся к основной цепи внутрибелкового переноса электронов железосерный центр N1a ($E^0 = -370$ мВ) в флавинодержавной субъединице. Железосерный центр N1a выполняет функцию временного депо для электронов при интенсивном переносе с ФМН [91; 92]. Перенос электрона с железосерного кластера N1a на кислород приводит к образованию O₂⁻. Продуктами взаимодействия флавинового кофермента с молекулярным кислородом являются O₂⁻ и H₂O₂ [93].

Следует отметить, что флавиновые коферменты (ФМН, ФАД) являются простетическими группами, входящими в состав многих дегидрогеназ, оксидаз и монооксигеназ. Ряд данных оксидоредуктаз, также как и комплекс I, являются источниками образования АФК в клетке [93]. Активной группой обоих коферментов является флаvin (изоаллоксазин), имеющий сопряженную систему из трех колец (рис. 1.8). В ФМН к флаvinу присоединен фосфорилированный полиол рибит. ФАД состоит из ФМН и связанного с ним АМФ. Редокс-свойства флавинов определяются способностью атомов азота в изоаллоксазиновом кольце принимать от окисляемого субстрата электроны и протоны. Флавины могут участвовать в одно- или двухэлектронном переносе. Принимая один электрон, флавины переходят в полувосстановленную семихинонную форму (ФМН[•] или ФАДН[•]) и, принимая два электрона, переходят в полностью восстановленную форму (ФМНН₂ или ФАДН₂). Это позволяет им служить «переключателями» (посредниками) между системами двухэлектронного (НАД(Ф)⁺/НАД(Ф)Н) и одноэлектронного переноса (Fe³⁺/Fe²⁺).

Окисление флавина кислородом также может осуществляться по одно- или двухэлектронному механизму (рис. 1.9). Восстановленный депротонированный флаvin отдает один электрон кислороду, в результате чего образуется радикальная пара (стадия 1, рис. 1.9). Гомолитический распад пары приводит к образованию O₂⁻ и флавинового радикала (стадия 2, рис. 1.9), а гетероциклический – к образованию H₂O₂ и окисленного флавина (стадия 3, рис. 1.9). Последняя реакция может протекать через образование промежуточного C(4a)-(гидро)пероксифлавина (стадии 4 и 5, рис. 1.9).

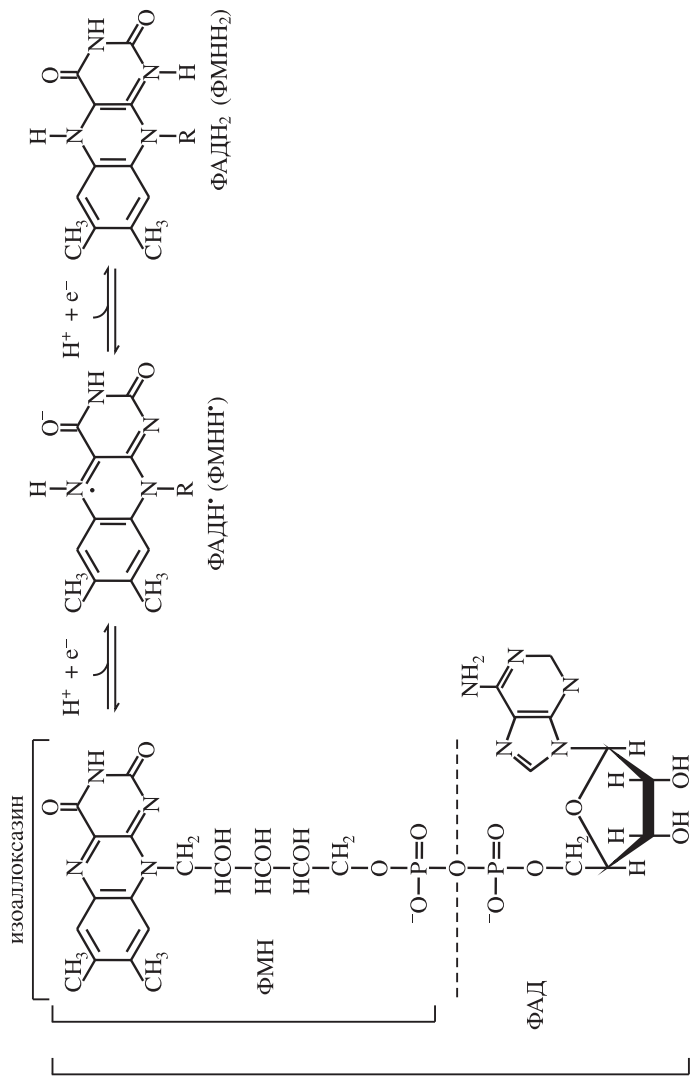


Рис. 1.8. Структура флавиновых кофакторов

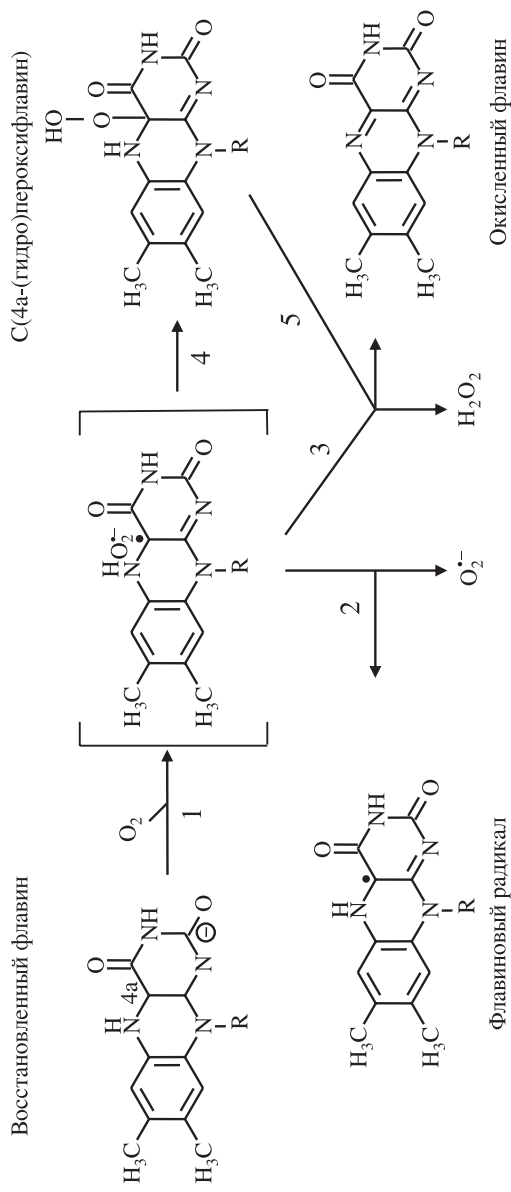
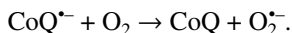


Рис. 1.9. Схема окисления флавина кислородом

Скорости образования АФК митохондриями и изолированным комплексом I линейно зависят от концентрации кислорода [94]. Величина константы скорости первого порядка одно- или двухэлектронного восстановления кислорода определяется его диффузией к редокс-активным простетическим группам, участвующим в образовании АФК, через «полуканалы», возникающие в результате динамики структуры белка.

Генерация $O_2^{\bullet-}$ в комплексе I происходит также с участием семихинонового радикала ($CoQ^{\bullet-}$), образующегося при переносе электрона с железосерного кластера N2 на хинон:



В изолированном комплексе I основным донором электронов для восстановления кислорода выступает ФМН [95]. В комплексе I, функционирующем в митохондриальной мембране, генерация супероксида происходит с участием семихиноновых радикалов, образующихся при одноэлектронном восстановлении хинонов в активном центре фермента [90]. Экзогенные «редокс-циклирующие» соединения также могут усиливать продукцию АФК с участием комплекса I. Одним из возможных проявлений кардиотоксичности противоопухолевого агента доксорубина может служить участие последнего в окислительно-восстановительном цикле между комплексом I и кислородом, в результате чего происходит увеличение генерации АФК [96].

Донорами электронов для одноэлектронного восстановления кислорода в электрон-транспортной цепи митохондрий являются также семиубихиноны, генерируемые в комплексе III [80].

Комплекс III (убихинол : цитохром с оксидоредуктаза, комплекс bc_1 , ЕС 1.10.2.2) является димером двух идентичных мономеров, каждый из которых состоит из 11 субъединиц и имеет молекулярную массу 250 кДа. Редокс-активные центры мономера расположены в трех субъединицах: цитохроме b , железосерном белке Риске и цитохроме c_1 (рис. 1.10). Цитохром b содержит два гема группы b : b_L – гем с низким редокс-потенциалом ($E^0 = -40$ мВ), b_H – гем с высоким редокс-потенциалом ($E^0 = +40$ мВ). Белок Рiske – железосерный центр (Fe_2S_2 , $E^0 = +280$ мВ), а цитохром c_1 – гем c_1 ($E^0 = +220$ мВ). Гем b_L , железосерный центр и гем c_1 располагаются вблизи наружной стороны внутренней мембраны, гем b_H – ближе к матриксу. Перенос электронов от убихинола к цитохрому c , который находится в межмембранном пространстве, происходит с участием железосерного кластера и гема c_1 . Гемы цитохрома b участвуют в переносе электронов в направлении матрикса.

Комплекс III может находиться в двух различных конформациях. В одной из них железосерный центр белка Рiske располагается вблизи гема c_1 , в другой – вблизи гема b_L . При окислении и восстановлении железосерного центра происходят переходы белка между двумя этими конформациями.

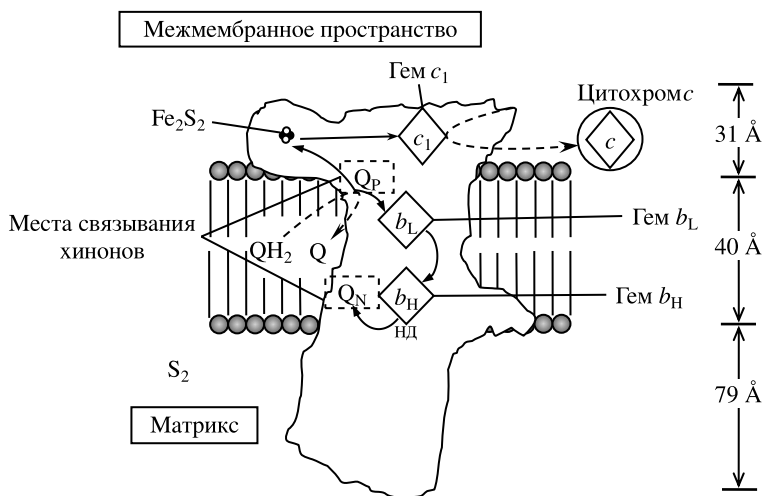


Рис. 1.10. Структура и расположение простетических групп в мономере комплекса III

Каждый мономер комплекса III содержит два отдельных центра связывания с хинонами. Один из них расположен вблизи матрикса митохондрий (центр связывания убихинона Q_N), другой – ближе к наружной стороне внутренней мембраны (центр связывания убихинола Q_P). В функциональной димерной форме комплекса III мономерные структуры формируют два внутренних кармана, каждый из которых содержит участок связывания убихинола Q_P от одного мономера и участок связывания убихинона Q_N от другого мономера. Хиноновые производные перемещаются внутри этих разделенных карманов.

На основе изучения структуры комплекса и редокс-реакций, протекающих с участием простетических групп фермента, для описания механизма трансформации энергии окисления убихинола цитохромом c в энергию электрохимического градиента протонов при функционировании комплекса III дыхательной цепи предложена модель, получившая название Q -цикла [97].

Согласно данной модели убихинон в полувосстановленной форме ($\cdot QH$) присоединяет электрон от комплекса I и протон из матрикса с образованием убихинола (на рис. 1.11 стадия 1). Незаряженный убихинол (QH_2) диффундирует к противоположной стороне мембраны. У границы мембраны с межмембранным пространством в центре связывания Q_P восстановленный убихинон отдает два электрона, при этом два протона высвобождаются в межмембранное пространство. Один электрон переходит на железосерный кластер (Fe_2S_2) белка Риске, второй электрон – на ион железа гема b_L (на рис. 1.11 стадия 2 и 3).

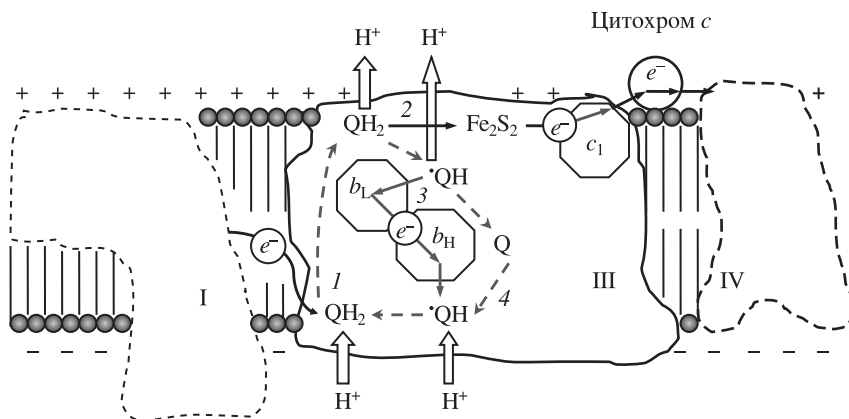


Рис. 1.11. Стадии окисления-восстановления хинонов
в Q-цикле с участием комплекса III:

QH_2 – убинол; $\cdot\text{QH}$ – семиубихинон; Q – убинон (пояснения в тексте)

Редокс-потенциал пары $\text{Q}^{\cdot-}/\text{QH}_2$ ($E^0 = +280$ мВ) равен редокс-потенциалу железосерного центра белка Риске, тогда как редокс-потенциал пары Q/QH_2 ($E^0 = +45$ мВ) значительно ниже. Поэтому одноэлектронное окисление убинола происходит с меньшими тепловыми потерями, чем двухэлектронное. От железосерного кластера электрон передается далее на ион железа цитохрома c_1 , а затем на окислитель убинола – цитохром c .

Редокс-потенциал пары $\text{Q}/\text{Q}^{\cdot-}$ ($E^0 = -40$ мВ) значительно ниже, чем редокс-потенциал Fe_2S_2 центра, тем не менее электрон от семиубихинонового радикала переносится на гем b_L , а не на железосерный центр. Связано это с конформационными перестройками белка: присоединение электрона группой Fe_2S_2 вызывает конформационный переход белка, в результате которого железосерный центр удаляется от центра связывания Q_R на расстояние около $20 \text{ \AA}$, перемещаясь к гему c_1 . Это смещение протекает за время менее 1 мс.

В отсутствие альтернативы для перехода электрон от $\text{Q}^{\cdot-}$ переносится на ион железа в геме b_L . Редокс-потенциал пары $\text{Q}/\text{Q}^{\cdot-}$ равен редокс-потенциалу гема b_L , поэтому тепловые потери при переходе электрона семиубихинонового радикала на гем b_L минимальны. Электрон от гема b_L переносится в мембране на гем b_H , расположенному ближе к матриксу митохондрий, а затем на убинон.

Окисленный убинон, образовавшийся у границы с межмембранным пространством, диффундирует назад к той стороне мембраны, которая обращена к матриксу. Здесь убинон получает электрон от гема b_H , поступивший от другого убинола, и протон из водной фазы матрикса (на рис. 1.11

стадия 4). Редокс-потенциал гема b_H выше, чем у редокс-пары Q/Q^+ , поэтому такой переход электрона кажется маловероятным. Однако связывание убихинона с центром Q_R вызывает смещение редокс-потенциала хинона к более высоким значениям, что и определяет переход электрона. В центре Q_R образуется полувосстановленный убихинон ($^{\bullet}QH$), который затем принимает электрон от комплекса I и протон из матрикса, формируя восстановленный убихинол, и весь процесс начинается заново. Таким образом, передача одного электрона от комплекса I к цитохрому c сопровождается переносом двух протонов из матрикса в межмембранное пространство митохондрий. Перенос двух электронов через комплекс III к цитохрому c сопровождается, соответственно, трансмембранным переносом четырех протонов. В результате окисления QH_2 цитохромом c высвобождаемая энергия запасается, таким образом, в виде разности электрохимических потенциалов протонов.

Семиубихиноны, генерируемые в комплексе III при протекании Q-цикла, являются донорами электронов для одноэлектронного восстановления кислорода. Скорость образования семихинонов (а следовательно, и скорость образования АФК) зависит при этом от места их образования в комплексе III [80].

Перенос электронов в комплексе III блокируется антимицином А и миксотиазолом. Антимицин А блокирует перенос электронов от гема b_L к убихинону в центре связывания убихинона Q_N . Миксотиазол ингибирует передачу электрона от убихинола к железосерному белку вблизи наружной стороны внутренней мембраны (Q_R). Антимицин и миксотиазол ингибируют транспорт электронов в комплексе III, но оказывают различное действие на процессы генерации супероксидных анион-радикалов. Антимицин блокирует переход электрона с гема b_H , вызывая увеличение генерации супероксида в комплексе III примерно в десять раз [80]. Ингибирование миксотиазолом образования убисемихинонов с цитозольной стороны внутренней митохондриальной мембраны приводит к незначительному увеличению выхода супероксида. Таким образом, наиболее интенсивная продукция супероксида дыхательной цепью при физиологических условиях наблюдается на внутренней мембране со стороны митохондриального матрикса.

Регуляция скорости окисления гидрохинонов является одним из ключевых этапов регуляции скорости переноса электронов в электрон-транспортной цепи и скорости генерации супероксида комплексом III. Показано, что образование супероксида максимально, если убихинол окислен на 25–30 % [98].

Стадия окисления убихинолов является самой медленной стадией переноса электронов от НАДН к O_2 , и ее скорость зависит от градиента pH на внутренней мембране митохондрий. Чем выше концентрация протонов в межмембранном пространстве митохондрий, тем медленнее происходит

окисление QH_2 . В процессе окисления убихинола можно выделить следующие этапы:



Стадиям переноса электронов от убихинола и убисемихинона к реакционным центрам комплекса III (реакции (1.2) и (1.4)) предшествуют стадии диссоциации протона в межмембранное пространство митохондрий (реакции (1.1) и (1.3)). Несущие заряд формы убихинола QH^- и убисемихинона $\text{Q}^{\bullet-}$ являются непосредственными донорами электрона для простетических групп комплекса III. В свою очередь, скорости реакций диссоциации (1.1) и (1.3), в ходе которых образуются формы восстановленного убихинона QH^- и $\text{Q}^{\bullet-}$, зависят от концентрации протонов в межмембранном пространстве митохондрий. По мере снижения pH в межмембранном пространстве вероятность диссоциации протона уменьшается, так как в этом случае равновесие в реакциях (1.1) и (1.3) сдвигается в сторону образования неактивных протонированных форм QH_2 и $\text{QH}^\bullet$.

Скорость генерации АФК электрон-транспортной цепью при физиологических условиях зависит также от метаболического состояния митохондрий и внутримитохондриальной концентрации NO [99]. В состоянии 4 (классификация по Б. Чансу), характеризующемся относительно низкой скоростью дыхания и отсутствием АДФ, наблюдается высокая скорость образования $\text{O}_2^{\bullet-}$ и H_2O_2 . С другой стороны, при окислительном фосфорилировании в состоянии 3, характеризующемся высокой скоростью поглощения кислорода, скорость образования $\text{O}_2^{\bullet-}$ и H_2O_2 значительно снижена [100]. Скорость генерации H_2O_2 митохондриями млекопитающих в состоянии 4 составляет 0,3–0,8 нМ H_2O_2 /мин на 1 мг белка и 0,05–0,15 нМ H_2O_2 /мин на 1 мг белка в состоянии 3. Генерация АФК митохондриями модулируется оксидом азота посредством обратимого связывания NO с гемовыми группами комплексов III и IV [101]. Следует также отметить, что митохондрии разных тканей сильно различаются по относительным и абсолютным активностям участвующих в метаболизме АФК ферментов, а также по локальным концентрациям кислорода (печень, почки, эндотелий сосудов, легкие) [88].

В митохондриях наряду с комплексами электрон-транспортной цепи образование АФК может также протекать с участием ряда ФАД-содержащих оксидоредуктаз, включая сукцинатдегидрогеназу, дегидролипоамиддегидрогеназу, глицерол-3-фосфат дегидрогеназу, цитохром b_5 редуктазу, моноаминоксидазу и др. [83; 102]. Однако вклад в суммарную клеточную

продукцию АФК не входящих в дыхательную цепь оксидоредуктаз до конца не выяснен. Некоторые из вышеупомянутых ферментов характеризуются более высокой скоростью генерации АФК, чем оксидоредуктазы дыхательной цепи. Например, скорость генерации H_2O_2 моноаминоксидазой при окислительном деаминировании катехоламинов на два порядка выше, чем скорость генерации H_2O_2 электрон-транспортной цепью [81; 103]. Однако вклад дыхательных комплексов в суммарную продукцию АФК выше вследствие их более высокого содержания в митохондриях.

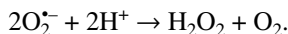
Наиболее интенсивная продукция супероксида в митохондриях наблюдается на внутренней мембране со стороны митохондриального матрикса [104]. При нормальных условиях образование супероксидных анион-радикалов невелико и не вызывает повреждений биомолекул в основном вследствие эффективного удаления супероксида ферментом Мн-супероксиддисмутазой (Мн-СОД), присутствующим в митохондриальном матриксе. Однако изменения условий функционирования клетки, вызванные рядом причин (применение некоторых медикаментов в периоды реперфузии тканей во время ишемии и т. п.), может приводить к значительному увеличению скорости образования супероксида.

На протяжении многих лет доминировала точка зрения об исключительной патогенной роли митохондриальных АФК, образование которых связывали с развитием хронических и дегенеративных заболеваний. Однако многочисленные работы, выполненные в течение последних лет, указывают на то, что образование АФК в митохондриях является важным регуляторным фактором, необходимым для поддержания гомеостаза и адаптации к стрессу [105]. Изменение скорости генерации АФК митохондриями может выступать в качестве одного из механизмов переключения функциональной активности клеток. В последние годы интенсивно исследуется роль митохондриальных АФК при адаптации к гипоксии и в регуляции иммунитета, аутофагии, дифференцировки, апоптоза [106]. Увеличение продукции АФК в митохондриях при возрастных изменениях рассматривается в качестве ключевого фактора, инициирующего запуск дегенеративных процессов при старении [107]. Более подробно регуляторные явления с участием митохондриальных АФК будут рассмотрены в гл. 3.

1.4. Пероксид водорода и супероксиддисмутазы

Согласно современным представлениям основным соединением группы АФК, участвующим в регуляторных процессах, является пероксид водорода [108]. В биологических системах наиболее высокая скорость образования H_2O_2 наблюдается в реакции дисмутации $\text{O}_2^{\bullet -}$, катализируемой ферментом

супероксиддисмутазой (СОД, ЕС 1.15.1.1) [109]. В результате катализируемой СОД реакции происходит протон-зависимое диспропорционирование двух молекул супероксида с образованием пероксида водорода и молекулярного кислорода:



Супероксиддисмутаза относится к компонентам антиокислительной системы (см. разд. 3.2), поскольку участвует в детоксикации $\text{O}_2^{\cdot-}$. При этом супероксиддисмутаза является основным генератором наиболее стабильной активной формы кислорода – пероксида водорода, поскольку в катализируемой ею реакции H_2O_2 является основным (а не побочным) продуктом ферментативной реакции.

Суперсемейство СОД подразделяется на три группы ферментов, различающихся по величине скорости реакции, строению и содержанию металлов переменной валентности.

Первая группа ферментов включает семейство СОД, содержащих ионы меди и ионы цинка, и обозначается как Cu,Zn-СОД. Семейство ферментов, содержащих в активном центре ион железа или ион марганца, составляет второе семейство СОД и его члены обозначаются как Fe-СОД и Mn-СОД. К третьей группе ферментов относятся супероксиддисмутазы, содержащие ион никеля (Ni-СОД).

Cu,Zn-СОД встречается во всех клетках эукариот и представляет собой гомодимер с молекулярной массой 32 кДа, состоящий из двух β -баррельных мономеров, активные центры которых располагаются на внешних петлях (рис. 1.12, *а*). Ион меди активного центра координирован четырьмя связями с атомами азота гистидинов боковых цепей (рис. 1.12, *б*) [110]. Один из лигандов Cu^{2+} (His61) совместно с двумя другими аминокислотными остатками гистидина и остатком аспарагиновой кислоты координирует ион цинка.

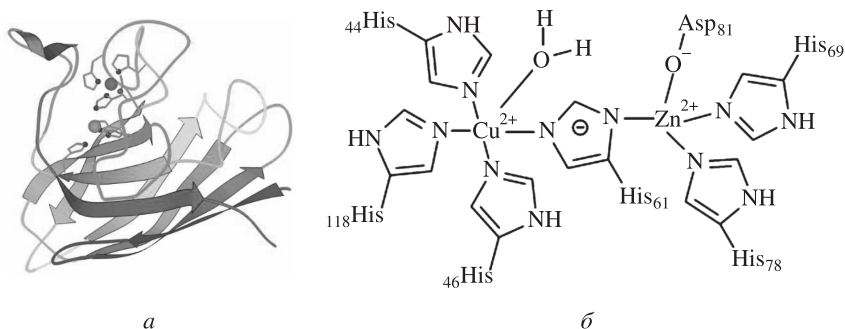


Рис. 1.12. Структура мономера Cu,Zn-СОД (*а*) и ее активного центра (*б*)

Считается, что атом меди обеспечивает каталитическую активность фермента, а атом цинка придает ему стабильность. Консервативный остаток аргинина в активном центре, вероятно, играет важную роль в электростатическом взаимодействии с субстратом фермента и переносе протона на конечный продукт.

Для описания каталитического действия фермента предложен двухстадийный механизм, согласно которому на первой стадии происходит восстановление иона меди супероксидом, на втором – окисление:

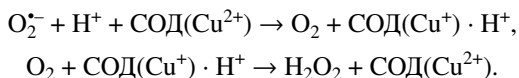


Схема последовательных реакций в активном центре фермента при катализе показана на рис. 1.13. На первой стадии $\text{O}_2^{\cdot -}$ присоединяется к Cu^{2+} и восстанавливает его в результате внутрисферного переноса электрона [111]. Затем протон присоединяется к остатку гистидина через образование связи с азотом, освободившимся после восстановления меди. Вторая молекула $\text{O}_2^{\cdot -}$ связывается с восстановленной Cu, Zn-COD за счет электростатического взаимодействия с остатком аргинина в активном центре фермента и восстанавливается в результате внешнесферного переноса электрона. Перенос электрона сопровождается переносом протона с остатка гистидина на кислород. Последующее связывание гистидина с Cu^{2+} способствует высвобождению пероксида из активного центра фермента.

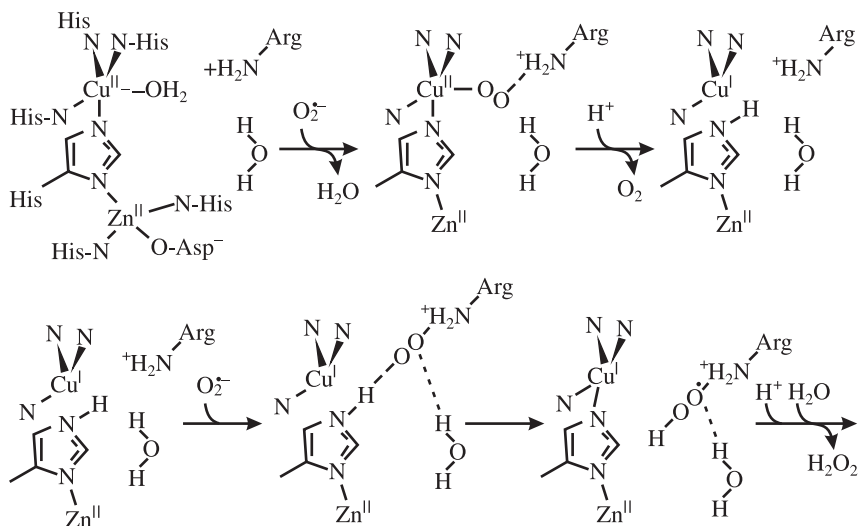


Рис. 1.13. Механизм катализа в активном центре Cu, Zn-COD

Супероксиддисмутаза является одним из наиболее активных ферментов, описанных к настоящему времени. Для Cu,Zn-COD константа скорости катализа равна $4,6 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ и постоянна в диапазоне pH от 4,8 до 9,5.

Cu,Zn-COD у человека и животных является в основном внутриклеточным ферментом. Только небольшие количества фермента присутствуют в плазме крови и цереброспинальной жидкости. У человека внеклеточная Cu,Zn-COD (в отличие от внутриклеточной) является тетрамером, построенным из четырех одинаковых субъединиц. В клетках Cu,Zn-COD преимущественно локализована в цитозоле и в межмембранном пространстве митохондрий [112].

Супероксиддисмутаза, содержащая ион марганца, обнаружена как у прокариот, так и у эукариот. У высших животных основным местом локализации Mn-COD является матрикс митохондрий. Железосодержащая форма СОД содержится в прокариотах и в хлоропластах растительных клеток [113]. Fe-COD и Mn-COD у одноклеточных являются гомодимерами. Mn-COD человека – гомотетрамер с молекулярной массой 88 кДа.

Каждый мономер фермента Mn-COD содержит активный центр с ионом марганца, который координирован тремя аминокислотными остатками гистидина и остатком аспарагиновой кислоты (рис. 1.14). В активном центре ион марганца также образует водородную связь с молекулой растворителя.

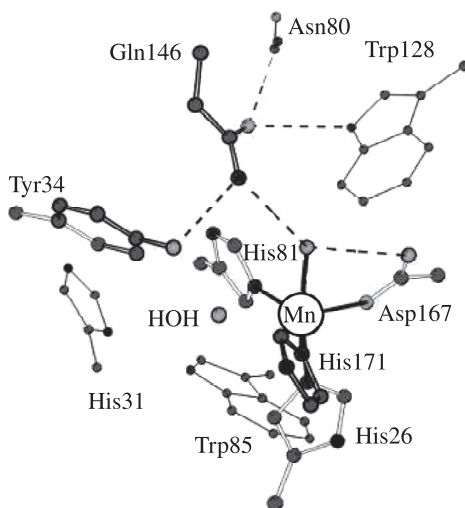
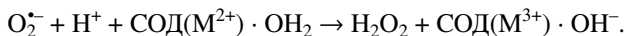


Рис. 1.14. Структура активного центра мономера Mn-COD

Строение мономера Fe-СОД сходно со строением мономера Mn-СОД. Полипептидные цепи обоих мономеров содержат 43 % одинаковых аминокислотных остатков, включая консервативные остатки активного центра [114]. В активном центре мономера Fe-СОД ион железа образует координационные связи с тремя аминокислотными остатками гистидина и остатком аспарагиновой кислоты, а также водородную связь с молекулой воды. Основное различие в строении членов данной группы супероксиддисмутаз связано с содержанием разных ионов переменной валентности в активном центре.

Согласно теории эволюции организмов считается, что фермент Mn-СОД появился позже, чем Fe-СОД. Замена иона железа на ион марганца в активном центре фермента обеспечила дополнительные энергетические преимущества ферменту.

При катализе в активном центре ферментов Fe-СОД и Mn-СОД ион металла переменной валентности (М) будет первоначально восстанавливаться, затем – окисляться:



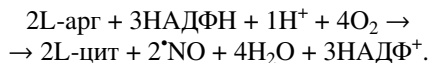
При восстановлении иона Mn^{3+} заполняется $5d$ -уровень, а при восстановлении иона Fe^{3+} – $6d$ -уровень. $5d$ электрон заполняет сводную d -орбиталь, тогда как $6d$ электрон разделяет орбиталь с другим электроном. Таким образом, восстановление Mn^{3+} до Mn^{2+} энергетически более выгодно, чем восстановление Fe^{3+} до Fe^{2+} . Количественно данное свойство выражается более высоким значением редокс-потенциала для Mn-СОД ($E^0 \approx 300$ мВ) в сравнении с Fe-СОД ($E^0 \approx 100$ мВ) [115].

Ni-СОД обнаружена только у бактерий семейства *Streptomyces* и поэтому является наименее распространенной формой СОД [116]. Ni-SOD является гексамером, состоящим из 6 α -спиралальных пучков, каждый из которых соединяет Ni на N-конце первой спирали [117]. Ион Ni координирован концевым амидом и двумя депротонированными цистеинами ($-\text{S}^-$). Каталитический цикл фермента, так же как и других СОД, протекает в две стадии.

В организме человека распределение и содержание различных форм СОД зависит от типа ткани и изменяется при патологии. В клетках опухолевых тканей в несколько раз снижена активность Mn-СОД и в несколько раз увеличена активность Cu,Zn-СОД в сравнении с активностью этих ферментов в клетках нормальных тканей [3; 118].

1.5. Оксид азота и NO-синтазы

Оксид азота синтезируется семейством ферментов, обозначаемых как NO-синтазы. Синтазы оксида азота (NOS, EC 1.14.13.39) катализируют образование $\cdot\text{NO}$ и L-цитруллина (L-цит) из L-аргинина (L-арг) в реакции



Образование оксида азота протекает в две стадии. На первой стадии происходит гидроксилирование L-аргинина с образованием N-гидрокси-L-аргинина, на второй – окисление N-гидрокси-L-аргинина с образованием L-цитруллина и $\cdot\text{NO}$. При отсутствии L-аргинина и избытке НАДФН NO-синтазы способны генерировать $\text{O}_2^{\cdot-}$ [119].

Наиболее изучены три изоформы NO-синтазы: нейрональная NO-синтаза (nNOS, или NOS1), индуцибельная (индуцируемая) NO-синтаза (iNOS, или NOS2) и эндотелиальная NO-синтаза (eNOS, или NOS3) [120]. Изоформы NOS различаются локализацией в клетках, нуклеотидной последовательностью ответственных за их синтез генов и, соответственно, аминокислотной последовательностью пептидной части фермента, механизмами посттрансляционной модификации и активации, а также наличием или отсутствием связи с внутриклеточными мембранами.

Нейрональная и эндотелиальная NO-синтазы были впервые описаны соответственно в нейронах и эндотелиальных клетках, индуцибельная NO-синтаза – в макрофагах. Кроме нейронов nNOS экспрессируется также в клетках гладкой и скелетной мышечной ткани, в клетках почек, в эндотелиоцитах и в островковых клетках поджелудочной железы [121]. Эндотелиальная NO-синтаза обнаружена в эндотелиоцитах, кардиомиоцитах, тромбоцитах и эпителиальных клетках почек [122]. При действии стимулов экспрессия iNOS может индуцироваться практически во всех типах клеток млекопитающих [122]. Нейрональная NO-синтаза и iNOS являются растворимыми ферментами и локализованы преимущественно в цитозоле. Эндотелиальная NO-синтаза является мембранным белком.

В настоящее время выделяют также митохондриальную NO-синтазу (mtNOS), локализованную в матриксе митохондрий [123; 124]. Митохондриальная NO-синтаза является мембранносвязанной α -изоформой nNOS [125]. Структурные отличия mtNOS от nNOS формируются в результате посттрансляционной модификации белка и включают ацетилирование сериновых или треониновых аминокислотных остатков и фосфорилирование С-концевых участков [126]. Как отмечалось ранее (разд. 1.3), внутримитохондриальная концентрация $\cdot\text{NO}$ является важным фактором регуляции продукции АФК электрон-транспортной цепью митохондрий. Скорость генерации оксида азота

митохондриальной NO-синтазой зависит от метаболического состояния митохондрий. В состоянии 4 скорость генерации NO ($0,62 \text{ нМ NO/мин}$ на 1 мг белка) на 40% выше, чем в состоянии 3 ($0,37 \text{ нМ NO/мин}$ на 1 мг белка) [127].

По характеру индукции и действия NO-синтазы подразделяются на два вида: конститутивные (постоянно экспрессируемые клетками и активирующиеся при высоком содержании ионов Ca^{2+}) и индуцибельные (Ca^{2+} -независимые, экспрессируемые в клетках под влиянием цитокинов и не претерпевающие посттрансляционной модификации) [128].

Конститутивные формы фермента (nNOS и eNOS) постоянно продуцируют умеренные количества оксида азота. Индуцибельная форма NO-синтазы проявляет свою активность через $4\text{--}8 \text{ ч}$ (время, необходимое для синтеза фермента) после внешнего воздействия на клетки и продуцирует NO в субмикромольных концентрациях, что в $100\text{--}1000$ раз выше продуцируемого конститутивными формами фермента количества NO [129]. Поскольку оксид азота в высоких концентрациях является токсичным для клеток, индуцибельная форма фермента считается «патофизиологической» в отличие от конститутивной [130].

Каталитически активная NO-синтаза представляет собой гомодимер, состоящий из двух идентичных гемопротеинов. Молекулярный вес каждого мономера изменяется от 110 до 160 кДа в зависимости от изоформы [131]. Между тем всем формам NO-синтаз присуща высокая степень гомологичности их аминокислотной последовательности и необходимость в одних и тех же коферментах: НАДФН, ФАД, ФМН, (6R)-5,6,7,8-тетрагидро-L-биоптерин (BH_4), железо-протопорфирин IX (наличие этой гемовой группы обуславливает сходство с митохондриальным мембранным ферментом цитохром c-оксидазой) [132]. Все изоформы NOS связывают кальмодулин. С конститутивными формами фермента (nNOS и eNOS) кальмодулин связывается при повышении концентрации Ca^{2+} (полумаксимальная активность между 200 нМ и 400 нМ). Из-за отличий в аминокислотной последовательности кальмодулин-связывающего участка iNOS образует комплекс с кальмодулином уже при базальной концентрации Ca^{2+} (ниже 40 нМ) [133]. Димеры NOS содержат также ион цинка, необходимый для эффективного связывания BH_4 и L-аргинина [134]. Ион цинка связан четырьмя координиционными связями с цистеинами мономеров (по два с каждым).

Каждый мономер NO-синтазы содержит домен оксигеназы со стороны N-окончания и домен редуктазы со стороны карбоксильной группы. Домен редуктазы содержит ФМН и ФАД, как простетические группы, и связывает НАДФН, как субстрат. Домен оксигеназы является местом генерации NO и в активированной форме связывает гемовую группу, BH_4 , L-аргинин и O_2 . Электроны переходят от НАДФН через ФМН и ФАД к домену окси-

геназы [135]. Перенос электронов от ФМН к гему происходит между доменом оксигеназы и доменом редуктазы, локализованными в разных субъединицах [136]. Движущую силу для переноса электронов между коферментами обеспечивает разность их редокс-потенциалов (рис. 1.15).

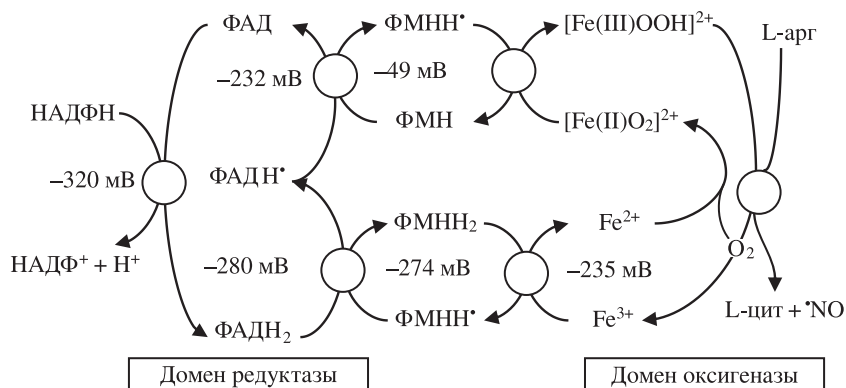


Рис. 1.15. Электрон-транспортные пути NO-синтазы

Гемовое железо в свободном от субстратов домене оксигеназы находится в низкоспиновом состоянии с редокс-потенциалом -347 мВ и не может восстанавливаться электронами редуктазного домена [137]. Связывание субстратов (L-аргинина и ВН₄) индуцирует переход гемового железа из низкоспинового состояния в высокоспиновое с редокс-потенциалом -235 мВ, что создает необходимые термодинамические условия для катализа [138]. Восстановление гемового железа электроном, поступающим от редуктазного домена, инициирует связывание кислорода с образованием оксикомплекса. На этой стадии может происходить разобщение комплекса в случае переноса электронов на кислород, и после диссоциации комплекса возможно образование супероксидного анион-радикала (см. ниже). Для продолжения монооксигеназного цикла необходимо восстановление оксикомплекса вторым электроном и образование пероксикомплекса [Fe(III)-OOH]²⁺, что происходит в результате переноса электрона от флавинового радикала (ФМНН[•]) через ВН₄ [122]. Затем идет гетеролитический разрыв связи О-О с освобождением воды и дальнейшее преобразование комплекса.

При отсутствии L-аргинина NO-синтаза будет образовывать супероксидный анион-радикал. Количество генерируемого O₂⁻ и механизм генерации определяются типом NO-синтазы. Образование O₂⁻ ферментом iNOS происходит в основном рядом с флаavin-связывающим участком в домене редуктазы [139], в то время как генерация O₂⁻ в nNOS и eNOS происходит

в домене оксигеназы [140; 141]. Обнаружено, что в домене редуктазы нейрональной NO-синтазы также происходит образование $O_2^{\cdot-}$ [142].

Для образования $O_2^{\cdot-}$ нейрональной NO-синтазой необходимо, чтобы гемовая группа не связывала L-аргинин [141]. С другой стороны, процесс образования $O_2^{\cdot-}$ в индуцибельной NO-синтазе происходит в присутствии больших концентраций L-аргинина [139]. Это указывает на то, что процессы образования $O_2^{\cdot-}$ и $\cdot NO$ ферментом могут протекать одновременно.

Исследования в модельных системах с использованием эндотелиальной NO-синтазы показали, что генерация $O_2^{\cdot-}$ зависит от присутствия Ca^{2+}/CaM комплекса [140]. Образование $O_2^{\cdot-}$ эндотелиальной и нейрональной NO-синтазой определяется в большей степени не концентрацией субстрата L-аргинина, а концентрацией кофактора BH_4 [140]. Показано, что L-аргинин контролирует образование супероксида в результате уменьшения скорости окисления НАДФН, тогда как тетрагидроптерин контролирует образование супероксида, увеличивая формирование гем-пероксильных метаболитов [142].

В процессе NOS-индуцированного катализа L-аргинин и тетрагидроптерин связываются с птерин-свободной pNOS, индуцируя переход гемового железа из низкоспинового состояния в высокоспиновое (рис. 1.16 (1)). Это способствует восстановлению трехвалентного железа ($[Fe(III)_H]^{3+}$) до двухвалентного ($[Fe(II)]^{2+}$) (рис. 1.16 (2)). Кислород связывается с двухвалентным железом в геме, образуя комплекс $[Fe(II)O_2]^{2+}$ (рис. 1.16 (3)). Этот комплекс является «изoeлектрическим» с комплексом $[Fe(III)O_2^{\cdot-}]^{2+}$. При отсутствии BH_4 и L-аргинина комплекс $[Fe(III)O_2^{\cdot-}]^{2+}$ диссоциирует с образованием супероксида (рис. 1.16 (5)).

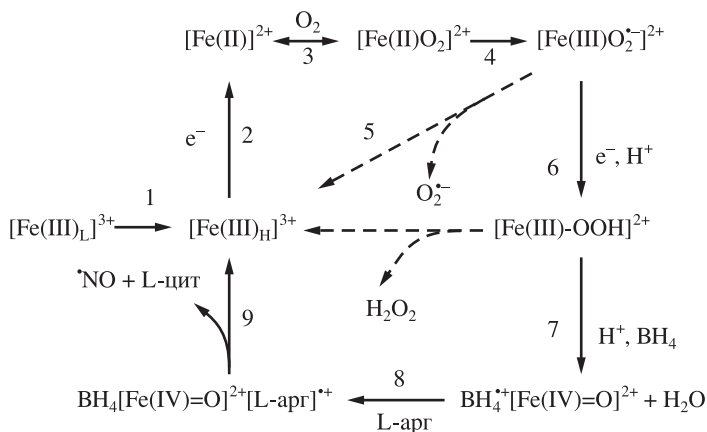


Рис. 1.16. Механизм NOS-опосредованного образования АФК

Механизм влияния BH_4 на образование супероксида, возможно, опосредован увеличением скорости разложения комплекса $[\text{Fe(III)}\text{O}_2^{\bullet-}]^{2+}$ с образованием железопероксильного комплекса $[\text{Fe(III)}\text{--OOH}]^{2+}$ (рис. 1.16 (6)) [142]. Диссоциация $[\text{Fe(III)}\text{--OOH}]^{2+}$ может происходить с образованием пероксида водорода, что указывает на существование двух возможных механизмов образования H_2O_2 ферментом nNOS в зависимости от концентрации BH_4 . Показано, что L-аргинин контролирует образование супероксида в результате уменьшения скорости окисления НАДФН, тогда как тетрагидроптерин контролирует образование супероксида, увеличивая формирование гем-пероксильных метаболитов [142]. В присутствии как тетрагидроптерина, так и L-аргинина будет происходить образование оксоферрилов (рис. 1.16 (7)), что способствует окислению L-аргинина с образованием N-гидрокси-L-аргинина (рис. 1.16 (9)).

Одновременное образование $\text{O}_2^{\bullet-}$ и $\bullet\text{NO}$ в клетке приводит к формированию цитотоксичных ионов пероксинитрита (ONOO^-). Предполагается, что фермент NOS может играть роль ONOO^- -синтазы в клетке [143]. Таким образом, из данных литературы следует, что в зависимости от концентрации ряда кофакторов NO-синтаза потенциально способна к образованию таких продуктов, как $\text{O}_2^{\bullet-}$, $\bullet\text{NO}$ и ONOO^- .

1.6. Ксантиноксидаза как источник АФК в условиях окислительного стресса и воспаления

Образование АФК ферментами может усиливаться в условиях окислительного стресса. Пример такого механизма обеспечивается системой ксантиндегидрогеназа – ксантиноксидаза, обозначаемой как ксантиноксидоредуктаза. Ксантиноксидоредуктаза существует в двух взаимопревращающихся формах: в форме ксантиндегидрогеназы (ЕС 1.1.1.204) и в форме ксантиноксидазы (ЕС 1.1.3.22).

Ксантиноксидоредуктаза является сложным молибденофлавопротеином, обнаруженным во многих организмах. Наиболее изученным типом ксантиноксидоредуктазы является фермент, выделенный из коровьего молока [144]. Ксантиноксидоредуктаза представляет собой гомодимер с молекулярным весом около 300 кДа, каждая субъединица которого содержит четыре редокс-центра: простетическую группу, содержащую молибден, ФАД, и два железо-серных центра [145].

Фермент катализирует окисление ксантина с образованием мочевой кислоты. Мочевая кислота является одним из антиоксидантов, вследствие этого данный фермент можно рассматривать как один из ферментов антиокислительной системы клетки. Перенос электронов от ксантина к конеч-

ному акцептору происходит по электрон-транспортной цепи белка, образованной Мо, двумя железосерными кластерами и ФАД.

При функционировании ксантиндегидрогеназы в нормальных условиях акцептором электронов от ФАД является растворимый кофермент НАД⁺. В условиях окислительного стресса и воспаления происходит модификация функциональной формы фермента – ксантиндегидрогеназа превращается в ксантиноксидазу. В ксантиноксидазе конечным акцептором электронов является молекулярный кислород. Одноэлектронное восстановление кислорода приводит к образованию супероксидного анион-радикала, двухэлектронное – пероксида водорода. Количественный анализ показал, что при комнатной температуре и pH 7,4 более 70 % генерируемых ксантиноксидазой АФК приходится на H₂O₂ [146].

Соотношение различных форм окислителей среди продуктов ксантиноксидазы изменяется при изменении концентрации субстратов. При 10 % O₂ ксантиноксидаза генерирует 74 % H₂O₂ и 26 % O₂^{•-}, при 1 % O₂ – 90 % H₂O₂ и 10 % O₂^{•-}. Двухэлектронное восстановление кислорода также усиливается при увеличении содержания пуринов. При нормальных физиологических условиях содержание гипоксантина и ксантина в крови составляет несколько мкМ, однако в условиях гипоксии и воспаления поднимается до 50–100 мкМ [147; 148]. В условиях насыщения субстратом (*k_m* для гипоксантина и ксантина составляет 6,5 мкМ) формируется постоянный поток электронов на кислород, способствующий его восстановлению по двухэлектронному механизму [149]. Таким образом, при переходе от дегидрогеназной формы к оксидазной фермент вместо антиокислительной начинает выполнять прооксидантную функцию.

У высших животных ксантиноксидоредуктаза содержится в основном в печени и кишечнике. При гипоксии и действии воспалительных цитокинов в тканях и эндотелиоцитах сосудов индуцируется синтез и последующий экзоцитоз в кровеносную систему ксантиндегидрогеназы [150]. Циркулирующая в крови ксантиноксидоредуктаза быстро (<1 мин) трансформируется в форму ксантиноксидазы и в результате ионного взаимодействия связывается с отрицательно заряженными гликозаминогликанами на апикальной поверхности сосудистых эндотелиальных клеток [151]. Адсорбция фермента на поверхности клеток увеличивает локальную концентрацию фермента и усиливает генерацию АФК [152]. Повреждающее действие генерируемых ксантиноксидазой АФК способствует развитию сосудистых и сердечно-легочных заболеваний, включая сердечную недостаточность, хроническую обструктивную болезнь легких и легочную гипертензию [153; 154]. При ишемии-реперфузии вклад ксантиноксидазы в продукцию АФК является основным [155].

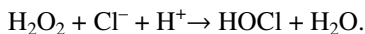
В норме в печени содержится преимущественно дегидрогеназная форма фермента (D-форма), а оксидазная форма (О-форма) составляет около 9–20 % от суммарной концентрации фермента [156; 157]. Дегидрогеназной формой восстанавливается НАД⁺, а оксидазной – молекулярный кислород. Существует также промежуточная, или смешанная, D/O-форма, которая использует в качестве субстрата и НАД⁺, и O₂ [158]. Ключевую роль в определении типа функционирования ксантиноксидазы (по дегидрогеназному, оксидазному или смешанному типу) играет концентрация дисульфидных мостиков в белке. При окислении SH-групп фермента наблюдается его переход из D-формы в О-форму. При восстановлении SH-групп происходит обратный переход. Сульфгидрильные реагенты вызывают обратимые переходы между D- и О-формами, тогда как протеолитическая модификация фермента, связанная с действием кислых протеаз, вызывает необратимый переход фермента в О-форму [159; 160].

Следует отметить, что ксантиноксидоредуктаза также может катализировать восстановление нитритов и нитратов с образованием *NO [162, 162]. Одновременное образование ферментом оксида азота и супероксидного анион-радикала ведет к образованию пероксинитрит-иона. Исследования показали, что катализируемая генерация пероксинитрита протекает с различной скоростью для разных форм фермента [163].

Генерация пероксинитрита ферментом зависит от концентрации кислорода. Для ксантиноксидазы максимальная скорость генерации пероксинитрита наблюдается в присутствии 1 % O₂, дальнейший рост концентрации кислорода приводит к снижению скорости образования ONOO⁻. С другой стороны, генерация пероксинитрита ксантиндегидрогеназой достигает максимальной скорости при 10 % O₂ и поддерживается постоянной при дальнейшем росте концентрации кислорода. Таким образом, ксантиноксидаза вносит существенный вклад в генерацию АФК, причем скорость генерации зависит от физиологических условий и усиливается при ряде заболеваний.

1.7. Хлорноватистая кислота и миелопероксидаза

Наиболее сильным окислителем, генерируемым в живых системах с участием ферментов, является хлорноватистая кислота. Ферментом, катализирующим образование HOCl, является миелопероксидаза (МПО, ЕС 1.11.1.7), субстратами – анион хлора и пероксид водорода:



Миелопероксидаза принадлежит к суперсемейству пероксидаз и на 68,9 % гомологична остальным членам суперсемейства [164]. МПО явля-

ется катионным димерным белком с молекулярным весом 146 кДа [165]. Каждый мономер белка содержит гликозилированную тяжелую α -субъединицу (58,5 кД) с ковалентно связанным гемом и негликозилированную легкую β -субъединицу (14,5 кД) [166]. Мономеры связаны между собой через дисульфидную связь, формируемую остатками цистеина Cys153. Отличительная структурная особенность МПО в сравнении с другими гемовыми белками состоит в том, что гемы фермента связаны с апоферментом не двумя, а тремя связями: двумя эфирными связями (с остатком аспарагина Asp94 и остатком глутамата Glu242) и одной сульфониевой ионной связью (с остатком метионина Met243) [167].

Миелопероксидаза является основным белком в пероксисомах нейтрофилов, моноцитов, эозинофилов и субпопуляциях тканевых макрофагов и играет ключевую роль в защитном и воспалительном отклике организма. Эта роль обеспечивается рядом активных интермедиатов, образующихся в реакциях окисления, катализируемых гемом фермента [168]. Пероксид водорода, генерируемый при дисмутации супероксида, утилизируется МПО для окисления галидов с образованием гипогалогеновых кислот. В нейтрофилах при физиологических условиях хлорид является наиболее вероятным субстратом фермента, а гипохлорная кислота (HOCl) – главным конечным продуктом дыхательного взрыва нейтрофилов [169].

Схема основных реакций миелопероксидазы представлена на рис. 1.17. В нативном состоянии гемовое железо находится в ферриформе. При взаимодействии фермента с субстратами образуются активированные состояния фермента, называемые соединением I и соединением II, а при реакции с O_2^- – соединением III, которое вовлекается в реакции гидроксирования ароматических соединений [170]. Двухэлектронное окисление нативного фермента пероксида водорода приводит к образованию соединения I (реакция 1 на рис. 1.17):



Связывание и ориентация молекулы H_2O_2 в активном центре фермента осуществляется с участием аминокислотных остатков гистидина His95 и аргинина Arg239. Гистидин His95 присоединяет протон от одного атома кислорода и передает его на другой атом кислорода, тогда как аргинин Arg239 способствует как ионизации гистидина, понижая pK_a для азота имидазольного кольца, так и поляризации O–O связи, повышая нуклеофильную атаку со стороны гема и последующий гетерелитический разрыв связи [171]. Один атом кислорода покидает активный центр фермента в составе воды, второй остается координационно связанным с железом. Оставшийся атом кислорода содержит шесть валентных электронов и является потенциальным окислителем.

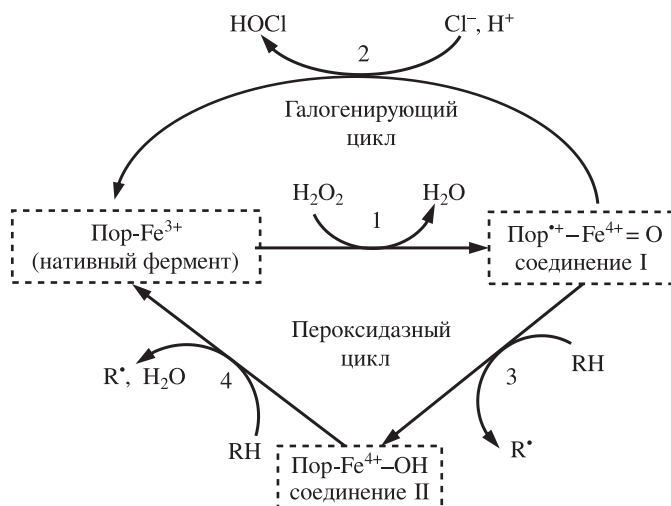
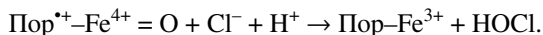


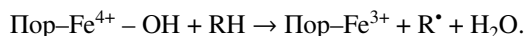
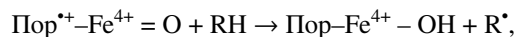
Рис. 1.17. Схема основных реакций миелопероксидазы:
Пор – протопорфирин IX; RH – субстрат миелопероксидазы

Один электрон на кислород переносится от железа, формируя оксиферрил $\text{Fe}^{4+} = \text{O}$, второй электрон – с порфирина, образуя катионный π -радикал порфирина (Пор^+) [172]. Фермент в данном активированном состоянии является сильным окислителем и характеризуется высоким редокс-потенциалом ($E^0 = +1160 \text{ мВ}$) [173]. Окисление ионов Cl^- соединением I приводит к образованию гипохлорной кислоты (реакция 2 на рис. 1.17), а фермент восстанавливается до нативного состояния:

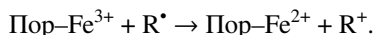


Таким образом, синтез HOCl обеспечивается в цикле реакций 1–2, который принято называть галогенирующим циклом.

Миелопероксидаза действует так же, как и классическая пероксидаза, участвуя в окислении множества субстратов с образованием свободнорадикальных интермедиатов (реакции 3 и 4, составляющие пероксидазный цикл реакций):

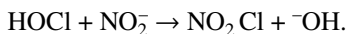
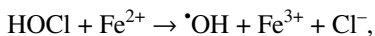
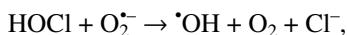
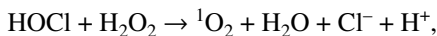


Соединение I восстанавливается к нативному состоянию МПО через две одноэлектронные стадии с формированием интермедиата – соединения II. Нативный фермент может реагировать также и с образующимся радикалом R^* :



Среди наиболее изученных реакций МПО – реакции фермента в ферри-форме с оксидом азота и супероксидом, фермента в форме соединения I – с тирозином, нитритом, сульфгидрильными реагентами и некоторыми другими органическими веществами, которые рассматриваются как субстраты фермента в клетках при физиологических условиях.

Образующаяся гипохлорная кислота реагирует с большим числом ионов и малых молекул в клетках:



Таким образом, образование HOCl в реакциях с участием МПО сопровождается образованием новых АФК, в частности синглетного кислорода и гидроксильного радикала – мощных окислителей, а также соединения NO₂Cl – участвующего в реакциях хлорирования и нитрирования веществ в клетке.

МПО является важной составной частью антимикробной активности фагоцитов, обеспечивающей врожденный неспецифический иммунитет. В нейтрофилах фермент является наиболее распространенным белком и его содержание составляет до 5 % сухого веса клетки [174]. Миелопероксидаза, как и NO-синтаза, локализована в пероксисомах. После активации фагоцитов происходит дегрануляция и МРО секретируется либо внутрь фагосомы, либо во внеклеточное пространство [175]. Биосинтез МПО осуществляется во время дифференциации миелоцитов в костном мозге и заканчивается ко времени выхода зрелых гранулоцитов и моноцитов в кровеносное русло [176].

Содержание миелопероксидазы в крови повышается при воспалительных процессах. Являясь катионным белком, МРО может связываться с отрицательно заряженной клеточной мембраной, в частности эндотелиальной, и при наличии субстрата может вызывать окислительные повреждения тканей организма в очагах воспаления [177]. В частности, МПО может вызывать разрушение жировых атеросклеротических отложений в стенке сосуда и последующий тромбоз. Поэтому содержание миелопероксидазы в крови является одним из наиболее точных диагностических параметров риска инфаркта или инсульта.

Миллионы видели падение яблока, но
Ньютон был тем, кто спросил почему.
Бернард Барух

Глава 2

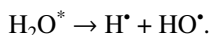
АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА – КЛЮЧЕВОЙ КОМПОНЕНТ КЛЕТОЧНОГО ОТКЛИКА ПРИ ДЕЙСТВИИ ФИЗИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ И НАНОМАТЕРИАЛОВ

2.1. Образование активных форм кислорода при действии электромагнитных излучений

Образование активных форм кислорода при действии радиации.

Изменение концентрации АФК – ключевое событие, регулирующее ответ клеток на действие многих физических и химических факторов, включая ионизирующие и неионизирующие излучения. В биологическом действии ионизирующего излучения выделяют механизмы прямого и непрямого (опосредованного) воздействия на биомолекулы. В живых системах около 25 % поглощенной энергии приходится на долю биомолекул, а остальная часть поглощается водой, что сопровождается процессами ее радиолиза. При прямом действии радиации повреждение биомолекул происходит в результате непосредственного поглощения ими энергии излучения. Изменение структуры и активности биомолекул при взаимодействии с гидроксильным радикалом и другими АФК, образующимися при радиолизе воды, является важнейшей стадией непрямого действия ионизирующего излучения на клетки и организм в целом.

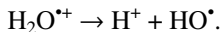
Радиационно-химические превращения молекул воды происходят в результате двух конкурирующих путей – диссоциации и ионизации. Около 60 % всех первичных событий, происходящих без ионизации, сопровождаются образованием сверхвозбужденного состояния молекул воды (H_2O^*) [178]. Сверхвозбужденные молекулы H_2O^* могут диссоциировать с образованием двух свободных радикалов:



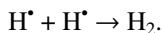
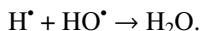
Передача молекуле H_2O энергии большей, чем потенциал ионизации (12,6 эВ), с высокой вероятностью приводит к ее ионизации:



В результате концентрации колебательной энергии на определенных связях часть катионов H_2O^{*+} может распадаться с образованием гидроксильного радикала:

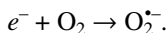


Свободные радикалы $\text{H}^\bullet$ и $\text{HO}^\bullet$ пространственно не разобщены, поэтому могут рекомбинировать с образованием молекулярных продуктов:



Количественно действие ионизирующего излучения на вещество связывают с величиной линейной передачи энергии, которая определяет величину средних потерь энергии первичной заряженной частицы на единицу ее пути. Чем выше величина линейной передачи энергии излучения, тем больше свободных радикалов возникает на единицу пути частицы и тем, соответственно, выше вероятность их рекомбинации с образованием молекулярных продуктов.

При нейтральном значении pH в наибольшем количестве образуются гидроксильные радикалы и гидратированные электроны. В присутствии молекулярного кислорода, характеризующегося высокой электроотрицательностью, гидратированные электроны будут приводить к образованию супероксида:



Таким образом, на химической стадии действия ионизирующего излучения образуются такие АФК, как $\text{HO}^\bullet$, $\text{O}_2^{\bullet-}$ и H_2O_2 .

Следует отметить, что процесс образования АФК не является необходимым условием для проявления повреждающего действия ионизирующих излучений. Как уже неоднократно отмечалось, АФК участвуют в регуляции многих физиологических функций. Поэтому в зависимости от внутриклеточных физико-химических условий, количества образующихся АФК и их субклеточной локализации могут наблюдаться как повреждающие, так и регуляторные эффекты действия ионизирующего излучения. Естественный радиационный фон, действию которого подвергается организм, обуславливает образование АФК в водной фазе, которая, как известно, составляет примерно 70 % от общей массы организма. Вероятно, образующиеся в условиях естественного радиационного фона АФК являются факторами функциональной регуляции клеточных процессов [179]. Выяснение механизмов от-

ветных реакций клетки на действие ионизирующего излучения до сих пор остается одной из основных проблем радиобиологии.

Неионизирующие излучения и электрические поля в живых системах. Действие неионизирующих излучений на биологические системы зависит от диапазона частоты используемого сигнала, также как от интенсивности, модуляции сигнала, формы волны и поляризации [180]. Электромагнитные излучения, не вызывающие ионизацию атомов и молекул вещества, характеризуются частотой ниже 300 ГГц. В зависимости от частотных характеристик неионизирующие электромагнитные излучения разделяют на три группы [181]. Первая группа включает постоянные электрические и магнитные поля (которые, строго говоря, не являются излучениями), вторая группа – сверхслабые низкочастотные электромагнитные поля (от 1 Гц до 100 кГц), третья – высокочастотные электромагнитные излучения, включающие радиочастотный (от 100 кГц до 3 ГГц) и микроволновой (выше 3 ГГц) диапазон.

Эффект и механизм действия электромагнитных излучений на биосистемы определяется уровнем передаваемой энергии. При действии электромагнитных излучений третьей группы из-за их высокой частоты не происходит смещения зарядов и важной составляющей механизма действия является тепловой эффект. При относительно низком уровне электромагнитного поля, характерного для факторов первой и второй группы, принято говорить о не-тепловом или информационном характере воздействия на организм. Механизмы действия электромагнитного поля в этом случае еще мало изучены.

Действие внешних низкоинтенсивных электромагнитных сигналов характеризуется широким спектром биологических ответов. На клеточном уровне организации живых систем показано, что внешними электромагнитными сигналами осуществляется регуляция основных клеточных программ, включая пролиферацию, дифференцировку и апоптоз, что открывает возможности для развития новых технологий с использованием электромагнитных излучений для биомедицинских приложений. Однако универсальные закономерности действия электромагнитных излучений до сих пор не установлены, и это является существенным препятствием для технологического прорыва в данной области. Также важно отметить, что эффект действия низкоинтенсивных электромагнитных сигналов зависит не только от параметров излучения, но и от типов клеток. Одни и те же электромагнитные сигналы могут индуцировать различные эффекты в разных типах клеток. С другой стороны, разные по характеристикам электромагнитные сигналы могут индуцировать сходные клеточные ответы. Электрические явления являются неотъемлемым аспектом существования живых систем, что и обуславливает наличие способности клеток отвечать на изменение электрических полей.

В многоклеточных организмах эндогенные электрические поля генерируются при протекании физиологических процессов и могут выступать в качестве управляющих сигналов для регуляции миграции и свойств клеток [182]. В ион-транспортирующем эпителии за счет неравновесного распределения ионных каналов и насосов в мембране апикальной и базальной частей клеток формируется трансэпителиальная разность потенциалов, величина которой может достигать 100 мВ. Показано, что в процессе эмбрионального развития в результате формирования трансэпителиальной разности потенциалов между различными отделами возникают электрические поля с напряженностью 1–5 В/см, энергии которых достаточно для индуцирования ориентации и миграции эмбриональных клеток [183]. Эндогенные электрические поля также существуют в непосредственной близости от ран, где они формируются из-за нарушения трансэпителиальной разности потенциалов в эпителиальном слое. На рис. 2.1 показана эквивалентная электрическая схема эпителия. При повреждении эпителия возникает путь утечки ионов с низким сопротивлением, что приводит к возникновению больших токов. Сопротивление раны (R_p) является переменным; R_p выше в сухой ране в сравнении с влажной. В коже, в которой внешний слой эпителия постоянно омывается проводящей жидкостью, сопротивление пути возврата тока ($R_{\text{ж}}$) является низким по сравнению с сопротивлением внутри ткани (R_t). В результате большая часть бокового падения потенциала находится внутри слоя субэпидермальной ткани; поэтому в области вблизи раны существует боковое электрическое поле.

Например, эпителиальные раны могут генерировать поле в 1,5 В/см чуть ниже рогового слоя, а эпидермальные раны роговицы формируют поле 0,4 В/см в поперечном направлении к ранам [184]. На концах разреза регенерирующих конечностей были обнаружены большие токи (10–100 мкА/см² с падением напряжения примерно 0,6 В/см в пределах первых 125 мкм внеклеточного пространства) [185]. При этом если для деполяризации нейронов

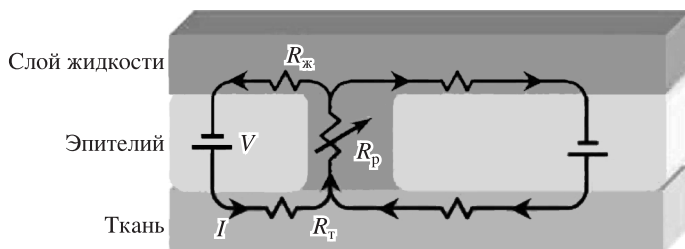


Рис. 2.1. Эквивалентная электрическая схема трансэпителиальных токов при повреждении (пояснения в тексте)

и генерации потенциалов действия с использованием поверхностных электродов требуется стимуляция полем с напряженностью 10–20 В/см, то величина напряженности электрических полей, выполняющих физиологическую роль в развитии и регенерации, на несколько порядков меньше (0,01–1 В/см).

Эндогенные электрические поля возникают при движении мышц и сухожилий, а также при деформации костной ткани. Механическая деформация сухой кости вызывает генерацию разности потенциалов в несколько сот милливольт, опосредованную пространственными градиентами постоянных диполей в молекулах коллагена при деформации изгиба [186]. В физиологических условиях генерируемые механическим напряжением потенциалы находятся в пределах нескольких микровольт и формируются благодаря электрокинетическим явлениям, включая потенциал течения и др. [187].

Движения мышц человека вызывают механические деформации и токи определенных частот. Например, токи с частотой 5–20 Гц были обнаружены во время постуральной мышечной активности и токи с частотой 10 Гц – во время ходьбы [188]. Эти токи растут с увеличением мощности и частоты механических деформаций, и напряженность поля при этом достигает величин от 0,1 до 100 мВ/м. При максимальном физиологическом напряжении вокруг костной ткани наблюдалось поле с напряженностью 1 В/м и соответствующей плотностью тока 1–10 мкА/см² [189].

Следует отметить, что мышечные колебания очень хорошо коррелируют с частотой (8–12 Гц) резонанса Шумана. Этот резонанс возникает при отражении зарядов между земной поверхностью и ионосферой и приводит к образованию стоячих электромагнитных волн низких и сверхнизких частот. Вероятно, и живые организмы используют эти природные частоты. Показано, что в стволе мозга и в симпатической части автономной нервной системы возникают электрические сигналы с частотой около 10 Гц [190]. Кроме того, аналогичную частоту имеет альфа-ритм мозга человека. Таким образом, различные физиологические процессы в организме создают условия для формирования градиентов электрических полей, что может использоваться клетками в качестве управляющего сигнала.

Двигательная активность клеток. При действии внешних электрических полей с напряженностью в диапазоне физиологических значений наблюдается ориентация и миграция различных типов клеток [189; 191]. Данное явление называется электротаксисом (или гальванотаксисом). В условиях *in vitro* при действии электрических полей с напряженностью 0,1–10 В/см чаще всего клетки мигрируют в направлении катода. К данной группе клеток относятся клетки различных типов, включая эпителиальные клетки, нейроны, фибробласты, кератиноциты, хондроциты, остеобласты и многие другие [189; 192–194]. Показано, что клетки некоторых типов (гранулоциты, остеокласты и эндотелиоциты) в электрическом поле ориентируются и движутся

к аноду [195–197]. Направление электротаксиса зависит от вида организма и типа клеток. Эпителиальные клетки хрусталика глаза быка во внешнем электрическом поле движутся в направлении анода, а эпителиальные клетки хрусталика глаза человека – к катоду [198]. Человеческие эндотелиоциты сосудов мигрируют к аноду [199], а эндотелиальные клетки быка – к катоду [200]. Направление электротаксиса зависит также от параметров электрического сигнала. Клетки эпителия хрусталика глаза быка во внешнем электрическом поле с напряженностью 0,5 В/см движутся к катоду, а во внешнем электрическом поле с напряженностью 1,5–2,5 В/см – к аноду [201].

На уровне отдельной клетки в электрическом поле наблюдается удлинение тела клетки и ориентация ее длинной оси перпендикулярно силовым линиям поля. Это явление было впервые описано для миобластов *Xenopus* и после этого наблюдалось для многих типов клеток, включая фибробласты, кератиноциты, хондроциты, остеобласты, эндотелиальные и эпителиальные клетки [189; 202]. Кроме этого, электрические поля также влияют на процессы роста нейритов и тем самым играют важную роль как в онтогенезе, так и работе мозга в течение взрослой жизни [203–205].

Эффекты электрических полей на рост нейритов разнообразны и многоуровневые [205]. На клеточном уровне электрические поля изменяют число и направление роста нейритов и филоподий. Обнаружено, что нейриты растут в направлении к катоду и в некоторых случаях при необходимости поворачиваются на 180°, чтобы сориентироваться в направлении катода; кроме этого, число нейритов со стороны катода увеличивается по сравнению с числом нейритов со стороны анода [206; 207]. Аналогично действие электрического поля на конусы роста вызывает асимметричный рост филоподий: число филоподий увеличивается в направлении отрицательно заряженного полюса [207; 208]. Электрическое поле также увеличивает число ветвлений со стороны катода [208] и скорость роста нейритов [209]. Следует отметить, что во время движения клеток при электротаксисе формирование ламеллоподий и филоподий также происходит преимущественно в направлении предполагаемой миграции [210].

Различные виды двигательной активности клеток (миграция, ориентация в пространстве, направленный рост нейритов и др.) основываются на генерации необходимых для движения сил при взаимодействии поверхности клеток с субстратом, на котором осуществляется движение, и именно ламеллоподии и филоподии выполняют ключевую роль в этом процессе. Филоподии, которые представляют собой тонкие (диаметром от 0,2 до 0,5 мкм) клиноподобные образования длиной до 10 мкм, вырастающие со скоростью до 12 мкм/мин [211], определяют направление вытягивания плоскообразных ламеллоподий [212; 213]. Филоподии и ламеллоподии вызывают прикрепление клеток к поверх-

ности и могут генерировать необходимую силу для движения клеток или их частей (конусы роста у нейритов) вперед [214]. Возникающее при этом движение цитоплазмы к филоподиям зависит от специфических паттернов их прикрепления к субстрату [213]. Показано, что сжатие филоподий первично ответственно за силу тяги при движении клеток [212]. Изометрическое напряжение филоподий может создать значительную силу сдвига в вентральных областях конуса роста, вызывая переходы типа «гель – золь» суспензии актина и цитоплазмы [215]. Такие переходы «гель – золь» характеризуются пороговым значением силы сдвига, при превышении которого цитоплазма из нейрита двигается в конус роста. Таким образом, механизм движения включает развитие натяжения в клетках и результирующий вектор натяжения определяет направление движения и роста клеток.

Натяжение в клетках возникает в результате их адгезии к субстрату и работы актин-миозинового аппарата. В настоящее время известно, что механизмы образования и движения филоподий и ламеллоподий основываются на трех основных процессах: полимеризации актина в районе мембраны, деполимеризации актина со стороны центральной части клеток и транслокации актиновых филаментов в результате актин-миозиновых взаимодействий [211; 216]. Когда внеклеточные сигналы взаимодействуют с клеточными рецепторами, происходит прерывание потока актиновых филаментов в результате связывания внутриклеточных доменов рецепторов с актиновой сетью. Задержка потока актина относительно субстрата при продолжающейся полимеризации актина и работе миозина вызывает протракцию ламеллы в направлении, определяемом филоподиями, прикрепленными к субстрату.

В качестве примера на рис. 2.2 показаны этапы протракции ламеллы в конусах роста нейритов [205]. Поток актиновых филаментов от периферии к центру конуса роста поддерживается за счет сокращения белков миозинового типа (рис. 2.2, *а*). Полимеризация актиновых филаментов происходит у мембраны, тогда как деполимеризация актина имеет место у центра конуса роста (рис. 2.2, *б*). Когда лиганды интегринподобных рецепторов связываются с внеклеточным матриксом, образующиеся при этом мультимолекулярные комплексы в результате связывания актина приводят к задержке потока актина (рис. 2.2, *в*). Продолжающаяся полимеризация актина и работа белков миозинового типа приводят к протракции мембраны вперед.

Мультимолекулярные комплексы, осуществляющие взаимодействие актиновых филаментов с плазматической мембраной, содержат ряд белков, включая такие белки, связывающие актин, как винкулин, талин, альфа-актинин, паксиллин, тензин, а также киназу фокальной адгезии, которая является нерецепторной тирозинкиназой, фосфорилирующей компоненты мультимолекулярного комплекса [217]. Важно обратить внимание на то, что

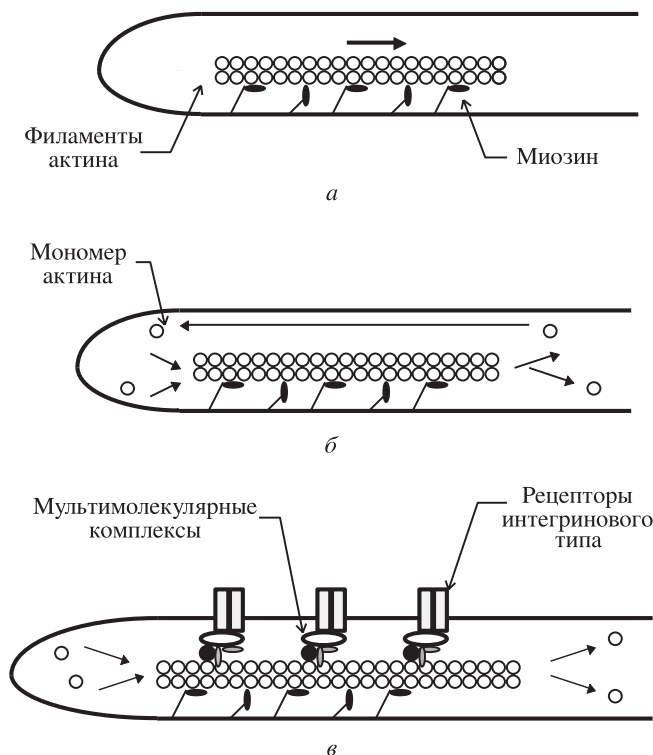


Рис. 2.2. Протракция ламеллы в результате ингибирования потока F-актина (пояснения в тексте)

для образования фокальных мультимолекулярных комплексов требуется активация белков Rho семейства малых ГТФаз. Обнаружено, что ингибирование таких ГТФаз, как Rac или Rho, даже если лиганды интегринподобных рецепторов связаны с молекулами внеклеточного матрикса, блокирует образование интегриновых кластеров и фокальных комплексов [218].

На субклеточном уровне воздействия электрических полей вызывают перераспределение цитоскелетных структур [219], митохондрий и рибосом [208] и изменяют заряд мембраны. На молекулярном уровне электрические поля вызывают перераспределение мембранных интегральных белков, рецепторов [220], цитоплазматических ионов и заряженных макромолекул [221]. Перераспределение рецепторов ацетилхолина, мембранного табулина, различных молекул адгезии, рецепторов факторов роста и других белков под действием поля может быть существенным в процессах управления двигательной активностью клеток. Изменение числа филоподий и ветвление нейритов могут быть

вызваны перераспределением и перестройкой микротрубочек под действием электрических полей [209; 222]. При собирании микротрубочек их «+»-концы направлены к конусам роста, и такая ориентация (которая может определяться внешними электрическими полями) является существенной при формировании конусов роста [223]. Фокальная аккумуляция мембранного табулина вдоль нервного волокна, опосредованная полем, может влиять на цитоскелетную организацию и морфологию нервов. Показано, что нейриты могут расти без участия обычного актин-зависимого механизма роста [224]. В этом случае механизм роста основывается на структурных перестройках микротрубочек. Увеличение скорости роста нейритов под воздействием электрических полей, вероятно, опосредованы регуляцией микротрубочек внешними электрическими сигналами. Показано, что микротрубочки также участвуют в регуляции миграции клеток под действием электрических полей [192].

Ориентация клеток перпендикулярно силовым линиям электрического поля в рамках описанного выше молекулярного механизма клеточного движения может быть обусловлена направленным распределением интегриновых рецепторов [189; 225]. Для достижения перпендикулярного удлинения вдоль оси требуется определенное натяжение цитоскелета, которое возникает при образовании комплексов актиновых филаментов с интегриновыми рецепторами после активации рецепторов лигандами. В электрическом поле свободные интегриновые рецепторы дрейфуют в направлении к электроду и накапливаются там. Через некоторое время происходит разборка фокальных комплексов на противоположной данному дрейфу стороне и возникает направленное движение другой группы интегриновых рецепторов, в результате чего клетка может образовать контакты фокальной адгезии в двух местах и увеличивать напряжение между ними, только если они находятся на оси, перпендикулярной дрейфу [189]. Таким образом, электрофоретическая подвижность заряженных молекул в клеточной мембране является важной составляющей возможного механизма «восприятия» направления электрических полей [226].

Пролиферация и дифференцировка клеток. Внешние электромагнитные сигналы могут также влиять на процессы пролиферации и дифференцировки клеток и тем самым регулируют экспрессию специфических белков [227]. Одним из ключевых биофизических параметров, величина которого влияет на процессы пролиферации и дифференцировки и изменяется при действии внешних электромагнитных полей, является мембранный потенциал [228].

Соматические клетки характеризуются высоким мембранным потенциалом (являются гиперполяризованными) и низкой митотической активностью. С другой стороны, клетки-предшественники и раковые клетки имеют низкий мембранный потенциал (деполяризованные) и обладают высокой митотиче-

ской активностью [229]. Для лимфоцитов, астроцитов, фибробластов и шванновских клеток показано, что деполяризация мембраны ингибирует переход клеток из фазы начального роста G_1 клеточного цикла в фазу репликации ДНК S [230; 231]. Данные наблюдения позволили предположить важную роль гиперполяризации мембраны в инициации S фазы клеточного цикла [232]. В свою очередь, деполяризация мембраны является необходимым этапом для перехода клеток из фазы роста G_2 клеточного цикла в фазу клеточного деления M. Таким образом, текущая модель взаимосвязи мембранного потенциала и фаз клеточного цикла включает периодические изменения величины потенциала при протекании цикла: наблюдающаяся перед синтезом ДНК гиперполяризация сменяется длительным периодом деполяризации, необходимым для митоза [233]. Величина порогового значения мембранного потенциала, необходимая для перехода между стадиями клеточного цикла, не определена и, вероятно, зависит от типа клеток и изменяется при дифференцировке.

Дифференцировка клеток сопровождается снижением их пролиферативной активности и ростом величины трансмембранного потенциала [234]. Индуцированная деполяризация мембраны мезенхимальных стволовых клеток ингибирует их дифференцировку, гиперполяризация – ускоряет [235]. Внутриклеточная передача сигнала от мембраны к геному клеток может осуществляться с участием ионов Ca^{2+} . В зависимости от амплитуды и длительности внутриклеточных кальциевых сигналов активируются различные паттерны генной экспрессии [236].

С другой стороны, остается открытым вопрос о том, как электромагнитные сигналы регулируют величину мембранного потенциала. В последние годы стало ясно, что работа различных типов ионных каналов и насосов модулируется АФК [237], что позволяет рассматривать эти соединения в качестве важных регуляторов электрических свойств клеток.

Активные формы кислорода – ключевые участники «программирования» клеточных свойств при действии электромагнитных сигналов. С точки зрения термодинамики передаваемая клеткам при действии низкоинтенсивных электромагнитных излучений энергия не достаточна для реализации наблюдаемых клеточных эффектов. Поэтому действие низкоинтенсивных электромагнитных излучений должно сопровождаться активацией специфических систем, осуществляющих усиление и преобразование информационного сигнала. Процесс трансдукции внешних сигналов является многоступенчатым, и действие электромагнитных полей может проявляться на разных стадиях данного процесса.

Универсальными участниками многочисленных клеточных процессов, активность которых регулируется электромагнитными полями (изменение мембранного потенциала, перестройка цитоскелета, трансдукция митоген-

ных сигналов, регенерация, апоптоз и ряд других клеточных процессов) являются активные формы кислорода, что позволяет предполагать важную роль оксидоредуктаз в детектировании и преобразовании электромагнитных сигналов. Конкретные компоненты биосистем, участвующие в первичных процессах взаимодействия со слабыми электромагнитными полями, до сих пор не установлены. Тем не менее важная роль АФК в процессах реализации отклика биологических систем на действие электромагнитных излучений достаточно хорошо документирована.

Установлена важная роль АФК в процессах электротаксиса клеток. Показано, что при увеличении напряженности электрического поля повышается скорость внутриклеточной продукции АФК и скорость миграции клеток [238]. В свою очередь, ингибирование продукции АФК снижает скорость миграции клеток в электрическом поле.

Эффекты электромагнитных сигналов на процессы внутриклеточной продукции АФК, а следовательно, и на клеточные функции, зависят от параметров сигнала. Показано, например, что при воздействии одиночными электрическими импульсами (500 В/м в течение 60 с) стимулируется рост клеток опухоли предстательной железы посредством кратковременного повышения внутриклеточных концентраций АФК и несвязанных ионов Ca^{2+} [239]. С другой стороны, экспозиция раковых клеток слизистой оболочки рта в течение 24 ч к постоянному электрическому полю напряженностью 4 В/м индуцирует апоптоз в результате длительного усиления генерации АФК [240].

Важно подчеркнуть, что индуцирование одинаковых АФК-опосредованных сигналов при действии разных по природе физических стимулов приводит к одному и тому же результату. Обнаружено, что АФК, продуцируемые с участием НАДФН-оксидаз, являются ключевыми участниками процесса трансдукции и усиления сигнала при кардиоваскулярной дифференцировке эмбриональных стволовых клеток [241; 242]. В свою очередь, физические и химические факторы, которые повышают продукцию АФК с участием НАДФН-оксидаз, также стимулируют и дифференцировку клеток в кардиомиоциты. Так, показано, что дифференцировка эмбриональных стволовых клеток в кардиомиоциты повышается при действии механических сигналов [243; 244], электрических [245] и магнитных полей [246]. Ингибирование опосредованной НАДФН-оксидазой продукции АФК снижает кардиомиоцит-направленную дифференцировку стволовых клеток при действии разных по природе физических стимулов. Следует отметить, что стимуляция дифференцировки эмбриональных стволовых клеток наблюдается при действии такого важного антиоксиданта, как аскорбиновая кислота [247]. Механизм активации программы кардиоваскулярной дифференцировки при действии аскорбата в концентрации 100 мкМ также включает

активацию внутриклеточных сигнальных путей с участием продуцируемых НАДФН-оксидазой АФК [248].

Показано, что АФК, генерируемые с участием НАДФН-оксидазы, являются ключевыми участниками активации регенеративных процессов [249]. Известно, что изменения плотности тока, регулируемые трансэпителиальным потенциалом, являются важными управляющими сигналами на разных стадиях регенерации [250; 251]. Обнаружено, что продуцируемые АФК регулируют необходимую для регенерации динамику мембранного потенциала, трансэпителиальный потенциал и возникающие электрические токи [252]. Ключевой мишенью действия пероксида водорода при активации регенеративных процессов являются потенциалзависимые Na^+ -каналы. Ингибирование НАДФН-оксидазы, аквопоринопосредованной диффузии H_2O_2 или применение антиоксидантов блокирует АФК-индуцируемые изменения электрических свойств клеток и процессы регенерации. С другой стороны, добавление экзогенного H_2O_2 индуцирует увеличение трансэпителиального потенциала и изменение плотности тока, необходимые для регенерации [252].

Следует также отметить, что внешние электрические поля также могут активировать НАД(Ф)Н-оксидазу. Показано, что в качестве связующего элемента между первичным действием электрического поля на клетку и активацией сигнальных путей, регулирующих перестройку и поляризацию цитоскелета при направленной миграции, выступает супероксидный анион-радикал [253]. Активация плазматической НАДН-оксидазы является начальной стадией запуска внутриклеточной трансдукции сигнала через МАПК-каскад при действии низкоинтенсивного электромагнитного излучения радиочастотного диапазона [254]. Авторы показали, что при действии электромагнитного излучения с частотой 875 МГц ($0,2 \text{ мВт/см}^2$) в течение 5–10 мин на изолированные мембраны клеток линии HeLa активность НАДН-оксидазы увеличивалась в три раза. Механизм преобразования электромагнитного сигнала с участием НАДН-оксидазы включает АФК-индуцированную активацию мембранно-ассоциированных матриксных металлопротеиназ, которые приводят к высвобождению гепаринсвязанного эпидермального фактора роста [254]. Взаимодействие эпидермального фактора роста со своим рецептором запускает ферментативный путь усиления и передачи сигнала к ядру клетки, основными участниками которого являются члены семейства митогенактивируемых киназ [255]. С другой стороны, длительная экспозиция (в течение нескольких часов) мононуклеарных клеток периферической крови человека к электромагнитному излучению с частотой 900 МГц приводила к усилению продукции АФК электрон-транспортной цепью митохондрий и последующему запуску апоптоза [256].

Активным формам кислорода отводится также важная роль в реализации биологических эффектов действия магнитных полей. Скорость продукции АФК при действии магнитных полей зависит от времени, что свидетельствует об участии АФК в реализации биологических эффектов как сигнальных молекул [257; 258].

В основе любого механизма биологического действия электромагнитных полей лежит взаимодействие поля с веществом, с атомными ядрами и электронами. Возможный механизм действия слабых магнитных полей на биохимические процессы на молекулярно-атомарном уровне включает процессы с участием спин-коррелированных радикальных пар [259; 260]. Процессы магниточувствительной рекомбинации радикальных пар могут лежать в основе рецепции слабых магнитных полей при навигации птиц и насекомых [261; 262]. Показано, что слабые магнитные поля влияют на состояния такой спин-коррелированной радикальной пары, как ФАДН[•] и O₂^{-•} [263; 264]. Магниточувствительные процессы активации кислорода флавином, протекающие в криптохроме сетчатки глаз птиц, позволили выделить данный белок в качестве возможного магниторецептора при ориентации в магнитном поле [265; 266].

Как отмечалось в разд. 1.3, окисление флавина кислородом может осуществляться по одно- или двухэлектронному механизму (см. рис. 1.9). При распаде радикальной пары из триплетного состояния образуется флавиновый радикал и O₂^{-•}, а при распаде пары из синглетного состояния – окисленный флавин и H₂O₂ (рис. 2.3). Магнитное поле взаимодействует со спиновыми магнитными моментами и, следовательно, влияет на эволюцию спинового состояния пары, т. е. вызывает синглет-триплетные переходы.

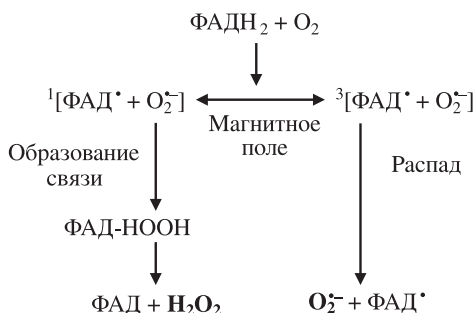


Рис. 2.3. Схема влияния магнитного поля на синглет-триплетные переходы спин-коррелированной радикальной пары при окислении флавина кислородом

В культуре гладкомышечных клеток показано, что радиочастотные (7 МГц) и статические (45 мкТ) магнитные поля увеличивают образование синглетного состояния спин-коррелированной радикальной пары и тем самым влияют на выход разных форм АФК [264]. При действии магнитного поля выход O_2^- уменьшался, а H_2O_2 – увеличивался. Таким образом, изменение внутриклеточного содержания АФК может выступать важным механизмом в реализации биологического действия магнитных полей. Внутриклеточная локализация ФАД-содержащих ферментов вблизи специфических мишеней является одним из факторов, определяющих конкретный тип клеточного ответа.

Образование активных форм кислорода при действии электромагнитного излучения видимого диапазона. В связи с широким использованием таких мощных источников света, как лазеры, в медицине следует отдельно отметить важную роль активных форм кислорода в реализации биологических эффектов электромагнитного излучения видимого диапазона.

Низкоинтенсивная лазерная терапия (в современной терминологии – фотобиомодуляция [267]) используется в клинической практике уже более 50 лет [268]. Уместно отметить, что данный метод, который ныне используется в различных областях медицины во всем мире, зародился в СССР в середине 60-х годов [269]. Интенсивные исследования механизмов фотобиомодуляции на молекулярном и клеточном уровне позволили обосновать ключевую роль АФК в реализации стимулирующих эффектов света [270].

Показано, что электромагнитное излучение (780 нм, 0,45–0,95 Дж/см²), источником которого является лазер, усиливает образование АФК в клетках [271]. Повышенный уровень АФК в клетках наблюдается также после их облучения электромагнитным излучением видимого диапазона (380–500 нм, 5–60 Дж/см²) [272]. Главным источником АФК при действии света красного и ближнего ИК диапазона являются митохондрии [273]. Согласно гипотезе Т. Й. Кару, именно усиление генерации АФК с участием митохондрий является одним из первичных молекулярно-клеточных механизмов действия низкоинтенсивной лазерной терапии [274; 275].

Величина и тип биологического эффекта лазерного облучения зависит от длины волны, интенсивности облучения и функционального состояния биологического объекта [276; 277]. Значительные стимулирующие эффекты как на клеточном, так и организменном уровне характерны для электромагнитного излучения видимого диапазона с длиной волны от 600 до 700 нм [278; 279]. Поскольку согласно законам фотохимии свет может действовать только на те компоненты клеток, которые это излучение поглощают, стимулирующее действие красного света определяется типом и расположением соответствующих акцепторов.

Многочисленные эксперименты на клеточных культурах позволили выделить компоненты митохондриальных цепей переноса электронов в качестве первичных акцепторов квантов электромагнитного излучения с длинами волн, характерными для красного света [280–282]. В последние годы термин «митохондриальные механизмы фотобиомодуляции» широко используется при описании молекулярно-клеточных механизмов действия света [283]. Предложенная Т. Й. Карой в конце прошлого века гипотеза о роли цитохром *c*-оксидазы в качестве первичного акцептора квантов красного цвета [284] в настоящее время успешно подтверждена [285; 286]. Показано, что функции основных хромофоров при лазерной биостимуляции в цитохром *c*-оксидазе выполняют ионы меди Cu_A и Cu_B , которые вместе с ионами железа гемов образуют внутрибелковую цепь переноса электронов [287]. Поглощение квантов света ионами меди увеличивает скорость переноса электронов по цепи и стимулирует окислительный метаболизм [288]. Одним из возможных следствий действия излучения на митохондриальный комплекс IV также является высвобождение NO из активного центра фермента [276]. Таким образом, при фотобиомодуляции осуществляется регуляция продукции АФК митохондриями и с их участием состояния клеток. Скорость продукции АФК митохондриями и вызываемые ими эффекты зависят от дозы излучения. Показано, что при высоком уровне продукции АФК митохондриями, характерном для интенсивного лазерного излучения, индуцируется АФК-зависимый механизм клеточной гибели [289; 290].

Следует отметить, что роль активных форм кислорода в реализации биологических эффектов лазерного излучения отмечается также в ряде других гипотез, объясняющих механизмы действия низкоинтенсивного лазерного излучения. Ю. А. Владимиров с коллегами предложил три гипотезы о механизмах действия низкоинтенсивного лазерного излучения [291]. Согласно первой гипотезе регуляция свойств биологических систем происходит в результате фотодинамического действия лазерного излучения на биологические мембраны. В качестве первичных акцепторов света и фотосенсибилизаторов в данном механизме рассматриваются порфирины. Фотодинамическое действие света реализуется с участием синглетного кислорода, инициирующего процессы перекисного окисления липидов. В результате процессов перекисного окисления происходит изменение физико-химических свойств мембраны и, в частности, изменение проницаемости для ионов Ca^{2+} [292]. Повышение внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} приводит к активации внутриклеточных процессов (стимуляция фагоцитов, клеточного деления и др.).

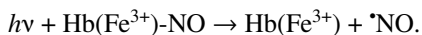
Содержание порфиринов в тканях увеличивается при многих патологических процессах, что повышает эффективность поглощения ими лазерного излучения. Мишенями лазерного излучения могут служить содержащие

порфирины клетки, в частности лейкоциты, фибробласты и др., а также липопротеины крови. Предполагается, что количество эндогенных фотосенсибилизаторов как в составе клеток, так и в составе липопротеинов плазмы крови является важным фактором, определяющим порог активации фагоцитов при фотосенсибилизированном прайминге клеток [293; 294].

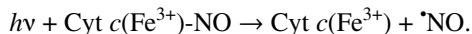
Согласно второй гипотезе, предложенной Ю. А. Владимировым, важную роль в механизмах биологического действия лазеров выполняет фотореактивация Cu,Zn-СОД. Показано, что при облучении светом гелий-неонового лазера (638,8 нм) происходит полная реактивация Cu,Zn-СОД, инактивированной при инкубации в среде с низким значением рН [295; 296].

В каталитически активной Cu, Zn-СОД, как отмечалось в разд. 1.4, остаток гистидина His61 депротонирован и образует связь с ионом Zn^{2+} . При снижении рН происходит протонирование остатка His61 и разрыв связи N-Zn; ферментативная активность при этом утрачивается. При поглощении квантов света в области 600–700 нм происходит $d-d$ электронный переход в ионе Cu^{2+} активного центра Cu, Zn-СОД, что, вероятно, изменяет pK_a Cu-His комплекса и приводит к депротонированию гистидина и восстановлению активности фермента. Показано также, что при действии лазерного излучения активность Cu, Zn-СОД в макрофагах увеличивается в результате синтеза фермента *de nova* [297].

На молекулярном уровне механизм биологического действия низкоинтенсивного лазерного излучения может также включать фотолиз соединений, содержащих $\cdot NO$. Показано, что облучение гелий-кадмиевым лазером (441 нм) нитрозильных комплексов гемоглобина (Hb-NO), как выделенных, так и в составе эритроцитов, индуцирует распад комплексов [298; 299]:



Нитрозильные комплексы, находящиеся в крови, усиливают фотоиндуцированное расслабление сосудов в несколько раз. Также показано, что при действии излучения гелий-кадмиевого лазера происходит распад нитрозильных комплексов цитохрома c, сопровождаемый высвобождением $\cdot NO$ [300]:



Оксид азота, в свою очередь, посредством модуляции активности комплекса III и комплекса IV регулирует продукцию АФК митохондриальной электрон-транспортной цепи (см. разд. 1.3). Таким образом, в основе действия низкоинтенсивного лазерного излучения в биосистемах лежат процессы с участием АФК, характер, выраженность и направленность которых во многом определяются содержанием и распределением акцепторов энергии электромагнитного излучения видимого диапазона.

2.2. Образование активных форм кислорода при холодовой адаптации и тепловом стрессе

Регуляция термогенеза при адаптации к холоду. Стадии активации ряда жизненно необходимых для клеток физиологических и биохимических процессов включают процессы генерации АФК с участием компонентов дыхательных цепей. Одним из таких физиологических процессов является усиленная теплопродукция в клетках, активируемая при адаптации к холоду.

В процессах окислительного фосфорилирования основным результатом использования запасенной на митохондриальной мембране энергии протонов является синтез АТФ. При использовании АТФ для совершения работы (биосинтез веществ, мышечное сокращение и внутриклеточное движение, транспорт ионов через внешнюю мембрану клетки и т. д.) значительная часть энергии высвобождается в виде теплоты.

Скорость и интенсивность метаболических процессов в различных органах и тканях значительно различаются, поэтому вклад в общую теплопродукцию организма отдельных органов и тканей неравнозначен. Наибольшее количество тепла образуется в скелетных мышцах при их тоническом напряжении или сокращении. Выделение тепла, наблюдающееся в мышцах при этих условиях, получило название *сократительного термогенеза (сократительной теплопродукции)* и является наиболее значимым механизмом теплообразования у взрослого человека.

В процессе адаптации к холоду происходит разобщение дыхания и фосфорилирования и запускается *несократительный термогенез*. В этом физиологическом процессе энергия, запасенная на мембране, расходуется в результате не сопряженного с эндергоническими процессами переносом протонов в матрикс. Этот процесс аналогичен короткому замыканию в электрической цепи и сопровождается значительными тепловыми потерями [82].

При адаптации к холоду происходит повышение проводимости митохондриальной мембраны для протонов. Причиной повышения протонной проводимости мембраны служит резкое возрастание концентрации свободных жирных кислот, прежде всего пальмитиновой и стеариновой, которые образуются при липолизе [301]. Активация липазы – одна из стадий механизма запуска адаптации к холоду. При охлаждении из симпатических нервных окончаний высвобождается норадреналин, который при связывании с β -адренорецепторами запускает механизм активации липазы в жировой ткани [302; 303]. Образующиеся в результате липолиза жирные кислоты оказываются не только «топливом», но и важнейшим регулятором разобщения тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования, участвуя в транспорте протонов через митохондриальную мембрану [304].

Клеточная теплопродукция с участием митохондриальных мембран включает несколько стадий (рис. 2.4). Первоначально в результате трансмембранного переноса протонов комплексами дыхательной цепи происходит запасание энергии на внутренней мембране митохондрий. Затем на внешней поверхности митохондриальной мембраны анион жирной кислоты (RCOO^-) присоединяет H^+ . Получающаяся при этом протонированная форма жирной кислоты (RCOOH) диффундирует к внутренней поверхности мембраны, где происходит ее диссоциация с высвобождением протона в матрикс. Образующийся анион RCOO^- возвращается на наружную сторону мембраны с помощью АДФ/АТФ-транслоказы. Главная функция АДФ/АТФ-транслоказы состоит в обмене цитозольного аниона АДФ³⁻ на внутримитохондриальный анион АТФ⁴⁻, образованный H^+ -АТФ-синтазой. Транслоказа специфична в отношении гидрофильных анионов, однако в отношении гидрофобных анионов такой избирательности не наблюдается. Поэтому АДФ/АТФ-транслоказа способна также транспортировать анионы жирных кислот.

В организме млекопитающих содержится бурый жир – особая ткань, специализирующаяся на теплопродукции посредством разобщения дыхания и фосфорилирования [305]. Бурый жир составляет не более 1–2 % массы тела. Тем не менее при адаптации к холоду теплопродукция в этой ткани достигает трети всей дополнительно образованной теплоты. В этих условиях величина удельной теплопродукции составляет 400 Вт на 1 кг массы (человек в состоянии покоя образует 1 Вт теплоты на 1 кг массы).

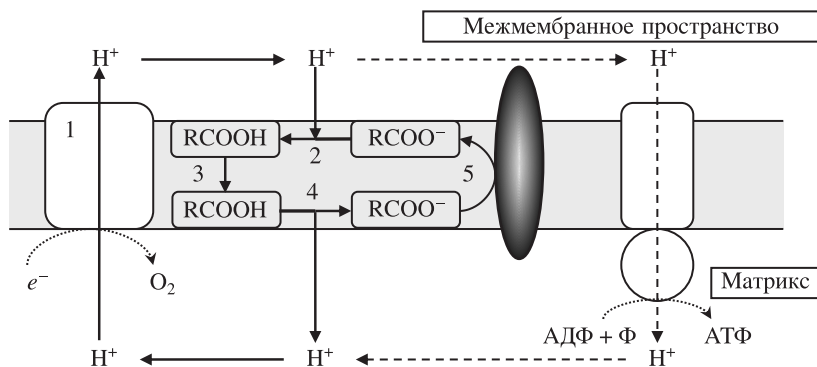


Рис. 2.4. Механизм разобщающего действия жирных кислот во внутренней мембране митохондрий:

1 – перенос протонов с участием компонентов дыхательной цепи; 2 – протонирование аниона жирной кислоты RCOO^- ; 3 – диффузия протонированной жирной кислоты RCOOH к внутренней поверхности мембраны; 4 – диссоциация RCOOH с образованием RCOO^- и H^+ ; 5 – перенос RCOO^- с участием АДФ/АТФ-транслоказы или разобщающего белка UCP к наружной поверхности мембраны

В буром жире содержится много митохондрий, на внутренней мембране которых имеется большой избыток дыхательных ферментов по сравнению с H^+ -АТФ-синтазой. Около 10 % всех белков приходится на разобщающий белок UCP1 (uncoupling protein 1), также называемый термогенином. Белок UCP1 млекопитающих является димером, каждый мономер которого имеет молекулярную массу около 33 кДа и содержит 6 трансмембранных α -спиралей [306]. Термогенин является переносчиком анионов жирных кислот, служащих разобщителями, но в отличие от АТФ/АДФ-антипортера не способен к транспорту нуклеотидов.

UCP1 выполняет функции ключевого эффекторного белка в термогенезе клеток жировой ткани, и его активация является необходимым этапом диссипации энергии градиента электрохимического потенциала протонов на внутренней мембране митохондрий [307]. При кратковременном холодом воздействии увеличивается активность UCP1, а при длительном холодом воздействии – количество белка UCP1 [308].

Хорошо изученными регуляторами активности UCP1 являются жирные кислоты и пуриновые нуклеотиды [309]. Пуриновые нуклеотиды (ингибируют трансмембранный транспорт протонов с участием UCP1, тогда как свободные жирные кислоты в микромолярных концентрациях необходимы для активации транспорта [310]. Результаты недавних исследований свидетельствуют о важной роли АФК в механизме активации разобщающего белка UCP1 [311–313]. Показано, что с участием АФК активируется не только разобщающий белок UCP1, но и его гомологи UCP2 и UCP3, встречающиеся в других тканях. Из-за низкого содержания белков UCP2 и UCP3 в митохондриях других тканей в сравнении с содержанием UCP1 в митохондриях бурого жира вклад гомологов термогенина в процессы термогенеза не учитывается [314]. Разобщающие белки UCP2 и UCP3, вероятно, выполняют функции в механизме обратной связи при генерации АФК митохондриями [315]. В результате снижения градиента электрохимического потенциала протонов на внутренней мембране митохондрий при активации разобщающих белков скорость продукции АФК митохондриями также уменьшится.

Клеточная адаптация при тепловом шоке. Общим механизмом ответа клеток на гипертермию является активация синтеза специфического набора белков, называемых белками теплового шока (HSP, heat shock protein). Повышение активности и внутриклеточного синтеза HSP происходит также и при других стрессирующих воздействиях, включая гипоксию, ультрафиолетовое излучение, тяжелые металлы и др. [316; 317]. Разнообразие патологических и физиологических факторов, индуцирующих синтез белков теплового шока, позволяет рассматривать данный тип клеточного отклика в качестве универсального неспецифического ответа клетки на стресс [318].

В основном HSP выполняют функции молекулярных шаперонов, регулируя процессы фолдинга белков и белок-белковые взаимодействия [319].

В состоянии покоя HSP присутствуют в цитоплазме в комплексе со специальным транскрипционным фактором теплового шока (HSF от англ. heat shock factor – фактор теплового шока). При стрессовом воздействии HSF отделяется от HSP и формирует тримеры, обладающие ДНК-связывающей активностью. Накопление фактора теплового шока в ядре активирует транскрипцию дополнительных шаперонов и подавляет транскрипцию других генов. По окончании стрессового воздействия освободившиеся HSP связываются с HSF и переходят в исходное состояние. Детальный механизм, по которому тепловой шок и другие стрессоры активируют экспрессию генов белков теплового шока, не выяснен. Однако одним из охарактеризованных внутриклеточных событий, активирующих экспрессию генов белков теплового шока, является повышение внутриклеточной концентрации АФК [320].

Основным внутриклеточным источником АФК при гипертермии является электрон-транспортная цепь митохондрий (см. разд. 1.3). При тепловом шоке в митохондриях повышается продукция супероксидного анион-радикала и пероксида водорода [321]. Предполагается, что при тепловой денатурации комплекса I увеличивается скорость одноэлектронного восстановления молекулярного кислорода флавинами [322]. Рост продукции АФК митохондриями также обусловлен повышением величины митохондриального мембранного потенциала в результате усиления окисления субстратов [323].

Участие АФК в активации HSP и HSF предполагает наличие редокс-зависимого механизма регуляции этих белков. В настоящее время описаны сотни белков, активность которых регулируется в результате посттрансляционных окислительно-восстановительных модификаций цистеиновых остатков белков [324; 325]. Важно отметить, что одним из первых обнаруженных редокс-зависимых белков является Hsp33 [326]. Hsp33 – это белок с молекулярной массой 33 кДа, встречающийся в бактериях, эукариотических паразитах и зеленых водорослях [326].

Редокс-сенсор Hsp33 содержит четыре консервативных остатка цистеина. В состоянии покоя остатки цистеина с высокой аффинностью связывают ион цинка, предохраняющий их от окисления. В связывающем ион цинка состоянии остатки цистеина находятся в форме тиолата, характеризующегося более высокой константой скорости реакции с окислителями в сравнении с протонированными тиолами. Активация белка при стрессовых условиях сопровождается высвобождением иона цинка и окислением тиолатов с формированием дисульфидных связей [327]. Аналогичные координированные цинком структурные цистеиновые мотивы, выполняющие функции редокс-переключателей при физиологических уровнях АФК, содержатся также в ряде других белков [328].

Фактор теплового шока также активируется с участием АФК. Семейство факторов теплового шока включает 4 члена, из которых HSF1, HSF2 и HSF4 охарактеризованы в млекопитающих, HSF3 – в птицах [329]. HSF2 и HSF4 экспрессируются только в определенных тканях [330; 331]. HSF1 в отличие от HSF2 и HSF4 не обладает тканеспецифичностью и экспрессируется в большинстве тканей организма. Показано, что АФК играют ключевую роль в активации HSF1, регулирующего экспрессию белков Hsp70 и Hsp90 [332; 333].

На посттрансляционном уровне регуляция активности белка HSF1 осуществляется путем фосфорилирования аминокислотных остатков серина. Фосфорилирование основной части сериновых остатков приводит к ингибированию [334]. Только фосфорилирование остатков Ser 230 и Ser 326 активирует белок [335; 336]. Показано, что фосфорилирование Ser 230 осуществляется CAMK II [335], а фосфорилирование Ser 326 – киназами mTOR [337], MEK [338] и p38 MAPK [339]. АФК могут запускать фосфорилирование белков путем регуляции киназ и фосфатаз и тем самым активировать HSF1.

С другой стороны, тримеризация HSF1 и связывание с ДНК зависят от редокс-состояния цистеиновых остатков. Показано, что активность мышечного HSF1 повышается при формировании дисульфидного мостика между аминокислотными остатками Cys35 и Cys105 [340]. Аналогичную роль в человеческом HSF1 выполняют цистеины Cys36 и Cys103 [341]. Таким образом, активность HSF1 может стимулироваться электрофилами и АФК, образующимися при физиологических и патофизиологических условиях.

2.3. Образование активных форм кислорода при механотрансдукции

Механические воздействия влияют на рост и форму практически каждой ткани и органа в организме человека. Напряжение сдвига, формируемое при токе крови, является одним из ключевых факторов регуляции тонуса сосудов и кровотока в организме [342]. Механическое натяжение необходимо для развития мышечной и костной ткани [343]. Эмбриональное развитие также зависит от механических сил, возникающих на разных стадиях эмбриогенеза [344]. Слух и осязание основаны на преобразовании механических сигналов в электрические [345]. Циклические механические деформации, которые возникают при растягивании и сокращении легких, имеют решающее значение для развития, роста и обмена веществ в дыхательной системе [346]. Силы тяги, возникающие при адгезии клеток, являются важным фактором регуляции пролиферации и дифференцировки негемопоэтических типов клеток [347].

Процесс, на основе которого отдельные клетки воспринимают механические сигналы и трансформируют их в изменения структуры и свойств клеток, называется механотрансдукцией. Функции сенсоров и преобразователей механических воздействий в биохимические процессы в основном выполняют белки внеклеточного матрикса, мембранные белки и компоненты цитоскелета [347]. Молекулярные механизмы трансдукции механических сигналов зависят от типа клеток и величины стимула. Например, в бактериях при изменении осмотического давления активация механочувствительных каналов происходит при натяжении мембраны величиной 10^{-3} Н/м [348], тогда как эндотелиальный ответ на изменение скорости кровотока происходит при напряжении сдвига величиной $1-3$ Н/м² [347]. При этом функциональный ответ эндотелиоцитов зависит от паттерна механического воздействия.

Механические стимулы в сосудистом эндотелии зависят от скорости и типа кровотока, который бывает ламинарным, колебательным и турбулентным. Однако несмотря на разнообразие механических стимулов, ключевым участником внутриклеточной передачи сигнала являются активные формы кислорода.

Производство АФК при механотрансдукции в эпителии осуществляется с участием белков семейства NOX [349]. Механические воздействия могут стимулировать трансдукцию сигнала через интегриновые рецепторы, включающую образование фосфатидилинозитолтрифосфата и активацию ГТФазы Rac1, необходимых для активации Nox1 и Nox2 [350]. Кроме того, реорганизация цитоскелета в ответ на механические воздействия способствует связыванию цитозольных активаторов Nox с каталитической субъединицей фермента. Разным паттернам механических воздействий соответствуют свои режимы генерации АФК.

В экспериментах *in vitro* показано, что растяжение эпителиальных клеток увеличивает продукцию АФК и индуцирует повышение экспрессии Nox [351; 352]. При миогенном ответе артерий также продемонстрировано, что увеличение растяжения приводит к усилению продукции АФК [349]. АФК активируют RhoA и увеличивают внутриклеточное содержание ионов Ca^{2+} , что способствует повышению тонуса сосудов [353; 354]. Рост внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} , в свою очередь, активирует Nox5 и приводит к дальнейшему росту АФК [355]. Растяжение также индуцирует повышение активности и экспрессии компонентов НАДФН-оксидазы в гладкомышечных клетках [356] и клетках скелетных мышц [357]. В кардиомиоцитах растяжение повышает Nox2-опосредованную генерацию АФК вблизи с рианодиновыми рецепторами и тем самым индуцирует выход ионов Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума и дальнейшую трансдукцию сигнала [358]. Растяжение стимулирует дифференцировку эмбриональных ство-

ловых клеток посредством увеличения продукции АФК с участием Nox1 и Nox4 [243]. Сигнальная система регуляции клеточного объема наряду с ионными каналами, активируемыми растяжением, и интегринами также включает НАДФН-оксидазу [359].

Важным физическим стимулом, регулирующим физиологические процессы эпителиальных клеток, является напряжение сдвига, величина которого зависит от тока внеклеточной жидкости. При ламинарном токе и равномерном напряжении сдвига протекают вазопротекторные процессы, при турбулентном или колебательном течении крови происходит активация клеток, ведущая к дисфункции эндотелия и атеросклерозу [360; 361].

На клеточном уровне колебательный или турбулентный поток жидкости из-за постоянного изменения направления напряжения сдвига приводит к непрерывному движению апикальной клеточной мембраны. Это, в свою очередь, вызывает колебательные деформации цитоскелета, базальной мембраны и боковых клеточных контактов и в конечном счете активацию клеточных сигнальных каскадов [362]. В эндотелиальных клетках колебания потока жидкости приводят к быстрому росту клеточного содержания АФК, уровень которых впоследствии остается повышенным в течение времени воздействия напряжения сдвига [363; 364]. Этот процесс, по крайней мере частично, является следствием непрерывной активации Nox2 и индукции нескольких других компонентов семейства NOX [363]. Активация НАДФН-оксидаз, вероятно, опосредована увеличением внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} и продолжительной активацией Rac1, что является следствием неспособности интегриноопосредованных сигнальных каскадов адаптироваться к постоянно изменяющемуся растяжению матрикса [365]. Индуцированное массивное образование АФК увеличивает активность провоспалительных факторов транскрипции, таких как AP-1 и NF- κ B, которые, в свою очередь, усиливают экспрессию молекул клеточной адгезии и индукцию циклооксигеназы 2 [366].

При переходе к ламинарному току жидкости, для которого характерно равномерное напряжение сдвига, наблюдается кратковременное повышение уровня АФК [367]. При стационарных условиях в эндотелиицитах увеличивается экспрессия eNOS и Cu, Zn-СОД. Образующийся оксид азота, в свою очередь, снижает экспрессию Nox2 и Nox4 [368]. Вазопротекторные процессы при ламинарном потоке наблюдаются только при невысокой скорости течения крови. Превышение определенного порога скорости течения жидкости приводит к увеличению экспрессии НАДФН-оксидазы и росту продукции АФК в эндотелии [369].

На основании существующих к настоящему времени данных можно заключить, что образующиеся при действии механических сил активные фор-

мы кислорода являются участниками как регуляторных, так и повреждающих процессов. Связь между величиной механического воздействия и уровнем продукции АФК, как правило, характеризуется нелинейной зависимостью U-образного типа [370].

2.4. Активные формы кислорода и наноматериалы

Интенсивное развитие искусственных наноматериалов создало широкие возможности для их биомедицинского применения и поставило вопрос о механизмах взаимодействия искусственных наноматериалов и биологических систем. В области наномедицины искусственные наноматериалы используются в диагностике и для адресной доставки лекарственных соединений. Наряду с этим биологически активные наноматериалы предлагается использовать в качестве лекарственных соединений [371]. Искусственные биологически активные наноматериалы, обладая электронодонорными или электроноакцепторными свойствами, способны изменять баланс между окислительными и восстановительными процессами в биологических системах. Значительное усиление продукции АФК в клетках рассматривается как основной фактор цитотоксичности наночастиц [372]. С другой стороны, наночастицы с восстановительными свойствами могут использоваться как антиоксиданты при окислительном стрессе [373].

Значительная часть используемых в настоящее время искусственных наночастиц приводит к усилению окислительных процессов в клетках. Механизмы генерации АФК зависят от типа и свойств наночастиц. Показано, что наночастицы золота диаметром 1,4 нм (наиболее токсичные среди золотых наночастиц в диапазоне размеров от 0,8 до 15 нм) индуцируют повреждение митохондрий и окислительный стресс в клетках [374]. В сыворотке крови золотые наночастицы катализируют высвобождение $\cdot\text{NO}$ из S-нитрозотиолов [375]. Наночастицы диоксида титана (TiO_2), которые широко используются в косметике, могут усиливать образование АФК как при фотоактивации, так и в темноте. При действии света наночастицы TiO_2 образуют O_2^- , а в темноте – $\text{HO}^\cdot$ [376]. Прооксидантные свойства серебрянных наночастиц определяют их антимикробные свойства [377]. Углеродные нанотрубки путем усиления генерации АФК индуцируют провоспалительные ответы макрофагов [378]. Функционализация поверхности углеродных нанотрубок полиэтиленгликолем приводит к снижению продукции АФК и токсичности наноматериалов [379]. Следует отметить, что продукция АФК при действии углеродных нанотрубок осуществляется в результате их взаимодействия

с биологическими системами, поскольку в растворах при протекании окислительных процессов нанотрубки проявляют свойства антиоксидантов [380].

Характер взаимодействия искусственных и биологических наноматериалов в основном определяется физико-химическими свойствами взаимодействующих поверхностей. Наиболее важными характеристиками, определяющими поверхностную активность наночастиц, являются химический состав частицы, наличие функциональных химических групп на поверхности, поверхностный заряд, ее размеры и гидрофобность [381].

Наночастицы одинаковых размеров, но различающиеся химическим составом, продуцируют разное количество АФК. Более высокий уровень генерации внутриклеточной генерации АФК наблюдается для наночастиц ZnO, CuO и CdS в сравнении с наночастицами TiO₂, MgO, SiO₂, Fe₃O₄ и углеродными нанотрубками [382–385]. Продукция АФК с участием наночастиц зависит от размеров и площади поверхности. Более мелкие наночастицы, имеющие большую площадь поверхности на единицу массы, генерируют АФК больше, чем более крупные наночастицы с меньшей удельной площадью поверхности [386]. Углеродные частицы с поверхностью, модифицированной заряженными группами, также различаются скоростью внутриклеточной продукции АФК. Для положительно заряженных наночастиц наблюдается наибольшая скорость продукции АФК в сравнении с нейтральными и отрицательно заряженными наночастицами [387]. Золотые наночастицы, функционализированные длинноцепочечными углеводородными цепями, продуцируют больше внутриклеточных АФК в сравнении с золотыми наночастицами, покрытыми короткоцепочечными углеводородами [388].

Продукция АФК зависит также от физико-химических условий. Показано, что продукция АФК с участием агрегатов фуллерена C₆₀ приводит к повреждению клеточной мембраны и гибели клеток в экспериментах *in vitro* [389]. Поскольку цитотоксические свойства фуллерены проявляют только при действии света, предполагается, что повреждение мембран осуществляется с участием синглетного кислорода, генерируемого в результате фотосенсибилизации [390]. Способность фуллеренов и их производных с порфиринами генерировать ¹O₂ делает их перспективными материалами для разработки новых типов фотосенсибилизаторов в фотодинамической терапии [391; 392]. С другой стороны, в *in vivo* модели окислительного стресса при интоксикации мышей тетрахлоридом углерода фуллерен C₆₀ проявляет свойства антиоксиданта [393].

Фуллерены и их водорастворимые производные способны утилизировать различные типы АФК, включая супероксидный и гидроксильный радикалы, монооксид азота и пероксид водорода [394–396]. Свойства фуллеренов утилизировать АФК базируются на двух возможных механизмах (рис. 2.5):

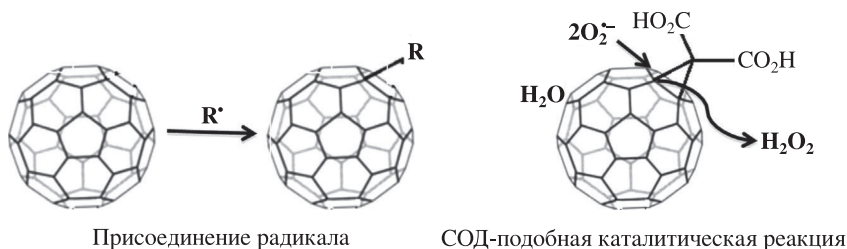


Рис. 2.5. Типы реакций фуллеренов с АФК

1) присоединение свободных радикалов к двойной $C = C$ связи с формированием $C_{60}-RH$ аддукта [396]; 2) в результате протекания каталитической реакции (подобно супероксиддисмутазе или каталазе) без химической модификации поверхности фуллерена. Показано, что фуллерен C_{60} , модифицированный малоновой кислотой, является миметиком супероксиддисмутазы с высокой константой скорости реакции $k = 2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [397]. В экспериментах *in vivo* фуллерены проявляют защитные свойства при терапии ряда свободнорадикальных патологий, включая нейродегенеративные заболевания, инсульт и ишемию [398–400].

Антиоксидантные свойства обнаружены также у наночастиц диоксида церия (CeO_2), способных защищать клетки от окислительного повреждения и проявляющих противовоспалительные свойства [401; 402]. Антиоксидантные эффекты наночастиц диоксида церия определяются редокс-свойствами пары $\text{Ce}^{3+}/\text{Ce}^{4+}$. Допинирование диоксида церия самарием, приводящее к снижению содержания Ce^{3+} без изменения вакансии кислорода (дефекты в оксидах), уменьшает антиоксидантные эффекты в моноцитах, индуцированные наночастицами [403]. Механизм антиоксидантного действия наночастиц диоксида церия основывается на циклических редокс-реакциях, осуществляющих переход ионов церия от восстановленного (Ce^{3+}) к окисленному (Ce^{4+}) состоянию и обратно к восстановленному (Ce^{3+}) [404]. Ионы Ce^{3+} при окислении до Ce^{4+} восстанавливают супероксид до пероксида водорода, осуществляя характерную для супероксиддисмутазы реакцию [405; 406]. Аналогично при окислении ионов Ce^{3+} происходит утилизация $\text{HO}^\bullet$ [407], $^\bullet\text{NO}$ [408], ONOO^- [409]. Восстановление ионов Ce^{4+} до Ce^{3+} может осуществляться в результате окисления пероксида водорода с образованием молекулярного кислорода аналогично катализируемой каталазой реакции [410]. В результате протекания комплексного цикла, включающего супероксиддисмутазную и пероксидазную активность, наночастицы CeO_2 утилизируют 2 молекулы $\text{O}_2^{\bullet-}$ и 1 молекулу H_2O_2 (рис. 2.6) [411].

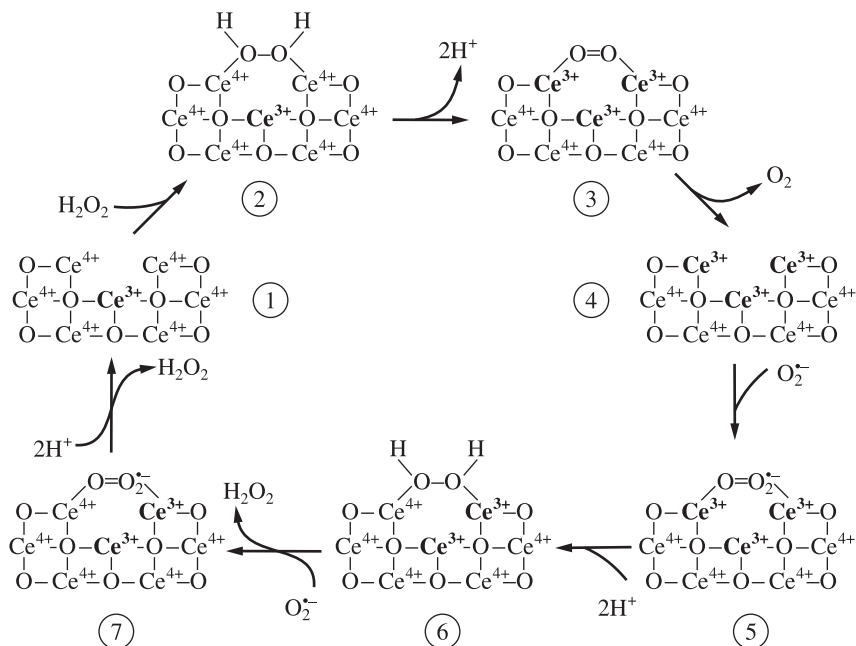


Рис. 2.6. Редокс-реакции с участием ионов Ce^{3+} и Ce^{4+} в каталитических процессах с участием наночастицах диоксида церия (адаптировано по [411]):
восстановление Ce^{4+} при окислении H_2O_2 (стадии 1–3);
окисление Ce^{3+} при восстановлении O_2^- (стадии 4–7)

Наночастицы оксида церия способны преодолевать гематоэнцефалический барьер, что совместно с выраженными антиоксидантными свойствами создает возможность для применения данных наночастиц в терапии ряда нейродегенеративных заболеваний, включая болезнь Альцгеймера [412; 413]. Наряду с этим результаты экспериментов на дрозофилах, в которых использование обогащенной наночастицами CeO_2 пищи позволило увеличить на 30 % продолжительность жизни плодовых мушек, создали потенциал для использования наночастиц в геронтологических технологиях [414].

Антиоксидантные свойства в растворе и в клетках проявляют наночастицы такого металла, как платина [415]. Каталитические свойства наночастиц Pt (также как и наночастиц CeO_2) позволяют их отнести к новому типу наноматериалов, называемому «нанозимы» (nanozymes), – миметикам антиоксидантных ферментов на основе искусственных наноматериалов [416–420].

Платиновые наночастицы катализируют реакции, характерные для пероксидаз, каталаз и супероксиддисмутаз. Скорость реакции платиновых на-

ночастиц зависит от формы и размеров частиц [421]. Константа скорости утилизации супероксида, генерируемого ксантиноксидазой, для платиновых наночастиц достигает $k = 5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [422]. Способность утилизировать супероксид у частиц с размером 1 нм выше, чем у частиц 5 нм [422]. Скорость пероксидазноподобной реакции кубических наночастиц платины в 200 раз превышает скорость реакции пероксидазы [421]. Однако механизм каталитического антиоксидантного действия наночастиц Pt (в отличие от наночастиц CeO_2) до сих пор не установлен.

Платиновые наночастицы не высвобождают ионы Pt в раствор, в результате чего характеризуются отсутствием цитотоксических эффектов при применении в концентрациях до 100 мкг мл^{-1} [423; 425]. Из-за выраженных антиоксидантных свойств и низкой токсичности платиновые частицы предлагается использовать при антиоксидантной терапии заболеваний, в этиологии которых участвует окислительный стресс [423; 425–427].

Всё есть яд и всё есть лекарство; тем или иным его делает только доза.

Парацельс

Глава 3

МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНЫХ ФУНКЦИЙ С УЧАСТИЕМ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА

3.1. Регуляция клеточных функций с участием активных форм кислорода: от пролиферации до апоптоза

На протяжении многих лет в биохимии и медицине доминировала точка зрения об исключительно патологической роли окислителей, образование которых в организме связывали с развитием хронических и дегенеративных заболеваний. Однако данные многочисленных работ, выполненных в течение последних десятилетий, указывают на то, что образование окислителей в организме является неотъемлемым фактором нормального функционирования клеток, отсутствие которого может приводить к гибели клеток так же, как и их чрезмерное образование.

АФК участвуют в регуляции физиологических процессов практически у всех клеток организма, что является их главным отличием от большинства сигнальных молекул, действующих лишь на те клетки, которые обладают соответствующими рецепторами. Наиболее стабильной формой АФК является H_2O_2 , поэтому при изучении физиологических и патофизиологических эффектов АФК в экспериментах *in vitro* чаще всего используют пероксид водорода.

Физиологические эффекты пероксида водорода. На протяжении многих лет H_2O_2 рассматривали как возникающее в процессе метаболизма кислорода цитотоксическое соединение, концентрация которого в клетках и тканях поддерживается антиокислительными системами на очень низком уровне [428]. Концентрация H_2O_2 в клетках и тканях организма оценивалась в пределах 10^{-9} – 10^{-7} М [428; 429]. Однако пероксид водорода является наиболее стабильным интермедиатом одноэлектронного восстановления кислорода и концен-

трация H_2O_2 в клетках и тканях различных организмов может достигать более высоких значений, чем считалось ранее. Концентрация H_2O_2 в плазме крови составляет 2–3 мкМ в норме и повышается до 6 мкМ при раке [430]. Некоторые исследователи утверждают, что базальная концентрация H_2O_2 в крови может достигать 35 мкМ [431–433]. Показано, что концентрация H_2O_2 в стекловидном теле глаза может быть выше 10^{-5} М [434–436]. Концентрация H_2O_2 в тканях мозга также может достигать значений 10^{-5} М [437; 438]. Таким образом, концентрация H_2O_2 в различных тканях поддерживается на достаточно высоком (выше, чем концентрация других окислителей) уровне.

Согласно исследованиям, проведенным *in vitro*, биологические эффекты внеклеточного H_2O_2 во многом определяются типом клеток и могут варьировать в широком диапазоне [439]. Например, H_2O_2 стимулирует деление клеток грудной железы линии NMuMG в концентрациях от 10 до 200 мкМ [115], тогда как в фибробластах линии HFL-1 пероксид водорода в концентрациях от 10 до 100 мкМ индуцирует апоптоз [440]. Гибель клеток при действии H_2O_2 по механизму апоптоза наблюдается во многих клеточных системах, включая лимфоциты [441], тироциты [442] и гепатоциты [443]. Концентрации пероксида водорода, при которых наблюдается активация апоптоза, в разных типах клеток различаются более, чем в 20 раз [444]. Наряду с этим обнаружено стимулирующее действие H_2O_2 на рост клеток линии HeLa [445], мезенхимальных стволовых клеток и эпителиальных клеток аорты [446] и ряда других типов клеток [439]. Показано, что пероксид водорода участвует в регуляции тонуса сосудов [447; 448], синаптической активности [449], мышечного сокращения [450] и клеточного цикла [451]. Ряд физиологических эффектов действия внеклеточного H_2O_2 на биологические системы суммирован в табл. 3.1.

Таблица 3.1

Физиологические эффекты пероксида водорода

Тип объекта	Концентрация H_2O_2 , мкМ	Физиологический эффект
Фибробласты почек сибирского хомячка линии ВНК-21	3–15	Увеличение пролиферативной активности [458, 459]
Клетки Гензена свиньи	80	Ингибирование образования щелевых контактов [460]
Фибробласты легких китайского хомячка линии V79	100	Увеличение пролиферативной активности [461]
Гладкомышечные клетки сосудов крысы	100–200	Стимуляция роста клеток [462]
Гладкомышечные клетки сосудов крысы	200	Стимуляция синтеза инсулиноподобного фактора роста I [463]

Тип объекта	Концентрация H_2O_2 , мкМ	Физиологический эффект
Одиночные скелетные мышечные волокна мыши	100–300	Увеличение сократительной способности мышечных волокон [464]
Гладкомышечные клетки сосудов человека	10–1000	Гиперполяризация плазматической мембраны [465]
Почечная артерия крысы	1–1000	Кратковременное сжатие сосуда [466]
Эпителиальные клетки аорты быка и фибробласты кожи человека	200	Ингибирование роста [462]
Фибробласты почек сибирского хомячка линии ВНК-21	120–150	Ингибирование роста [467]
Коронарная артерия свиньи	300	Расслабление гладких мышц сосуда [468]
Клетки опухолевой ткани предстательной железы	500	Апоптоз [469]
Фибробласты почек сибирского хомячка линии ВНК-21	500–1000	Апоптоз [470]
Клетки глиомы крысы линии С6	500–5000	Активация выхода Ca^{2+} из внутриклеточных депо [471]
Нейроны гиппокампа крысы	1500–2000	Ингибирование синаптической передачи [472]
Тромбоциты человека	1500–5000	Стимуляция агрегации [473]
Пучки мышечных волокон диафрагмы крысы	10–10000	Увеличение мышечного напряжения [474]
Ансамбли нейронов улитки <i>Lymnaea stagnalis</i>	50–10000	Стимуляция электрической активности [475]
Ансамбли нейронов улитки <i>Lymnaea stagnalis</i>	>10000	Ингибирование электрической активности [475]

В культуре даже одного типа клеток H_2O_2 при различных концентрациях может стимулировать пролиферацию, вызывать задержку роста и индуцировать апоптоз. В некоторых типах тканей H_2O_2 индуцирует процессы дифференцировки. Например, обнаружено, что H_2O_2 является необходимым участником дифференцировки эмбриональных стволовых клеток в кардиомиоциты [452] и клеток – предшественников линии HD-11ЕМ в остеокласты [453].

В клетках линии PC12 H_2O_2 участвует в процессах дифференцировки клеток в симпатические нейроны [454; 455]. Более того, АФК участвуют в модуляции основных информационных потоков при эмбриогенезе. Было отмечено, что клетки и ткани на разных этапах эмбрионального развития претерпевают дискретные изменения в параметрах генерации и утилизации АФК. Эти наблюдения послужили основанием для выдвижения «свободнорадикальной теории развития», в соответствии с которой формообразование и его временная зависимость определяются дифференциальной оксигенацией и/или связанными с содержанием АФК меж- и внутриклеточными градиентами редокс-потенциалов [456]. Благодаря тому, что АФК стимулируют митоз и способствуют клеточной дифференцировке, их называют «сигналы жизни» [457]. Далее подробно рассмотрены молекулярные механизмы регуляции таких клеточных программ, как пролиферация, дифференцировка, апоптоз и аутофагия.

Редокс-регуляция пролиферации. В процессе деления клетки проходят несколько фаз – фазу начального роста (G_1), фазу удвоения ДНК (S), фазу роста (G_2) и фазу клеточного деления (M). Образовавшиеся дочерние клетки могут сразу войти в новый митотический цикл или временно выйти из него в фазу покоя (G_0). Регуляция клеточного цикла осуществляется последовательной активацией циклинзависимых киназ [476; 477]. Каждая из циклинзависимых киназ представляет собой комплекс, состоящий из каталитической субъединицы Cdk (Cdk – cyclin-dependent kinase) и регуляторной субъединицы – циклина. Циклин увеличивает активность Cdk и определяет локализацию и субстратную специфичность киназы. Уровень экспрессии различных типов циклинов и Cdk направленно изменяется в определенные фазы клеточного цикла [478].

В разд. 2.2 отмечалось, что электрические поля могут стимулировать пролиферацию, регулируя продукцию АФК в клетках. Многочисленные исследования отмечают важную роль окислителей и восстановителей в регуляции фаз клеточного цикла [479]. При протекании клеточного цикла аналогично периодическим изменениям величины мембранного потенциала наблюдаются периодические изменения редокс-свойств клеток. Обнаружено, что внутриклеточная концентрация антиоксиданта глутатиона повышается при митозе и G_2 -фазе клеточного цикла в сравнении с другими фазами цикла [480]. С другой стороны, продукция АФК в митотических клетках в несколько раз выше, чем в клетках, находящихся в стадии G_1 [481]. Вероятно, повышение внутриклеточной концентрации окислителей – сигнал для вступления клетки в новый митотический цикл. Показано, что кратковременное увеличение внутриклеточной продукции АФК является необходимым этапом для перехода клетки из G_1 -фазы в S-фазу [482]. Применение антиокси-

данта N-ацетил-L-цистеина (NAC) блокирует переход клеток из фазы клеточного цикла G_1 [483]. Ингибирование перехода в S-фазу сопровождается повышением активности Mn-COD. Mn-COD является ключевым компонентом митохондриального «АФК-переключателя» («ROS-switch»), в котором сигнализация, опосредованная супероксидом, приводит к увеличению пролиферации, а сигнализация с участием пероксида водорода – к сохранению состояния покоя (G_0 -фаза) [484].

Основными субстратами комплексов циклин D – Cdk4 и циклин D – Cdk6, регулирующих пресинтетическую фазу деления клетки G_1 , являются продукты опухолевых супрессоров – белок ретинобластомы pRb и pRb-подобные белки p105 и p103 [485]. В неделящихся клетках pRb и его гомологи не фосфорилированы и связывают факторы транскрипции E2F, которые состоят из димеров белка E2F (E2F-1, ..., E2F-5) и димеризованного партнера белка DP (DP-1, ..., DP-5) [486]. После фосфорилирования pRb циклинзависимой киназой происходит диссоциация комплекса. Несвязанный с pRb фактор транскрипции E2F-DP регулирует активность ряда генов, среди которых гены циклинов E, A, Cdk1, Cdk2, ДНК-полимеразы α , и др. [487]. Модулируя активность фактора транскрипции E2F-DP и регулируемых им генов, pRb играет ключевую роль в контроле последовательности событий, обеспечивающих переход клетки из G_1 -фазы в S-фазу. Инактивация гена Rb была обнаружена в ретиноблостомах, остеосаркомах, при остром лейкозе, при раке мочевого пузыря, простаты и др. [487; 488]. Ингибирование NAC перехода клетки из G_1 -фазы в S-фазу сопровождается снижением содержания циклина D1 и гиперфосфорилированием pRb [483]. С другой стороны, H_2O_2 , наоборот, приводит к накоплению циклина D1 в клетках [489].

Продукция АФК запускается при активации рецепторов факторов роста, являющихся рецепторами с тирозинкиназной активностью [490]. Связывание рецепторов клетки с факторами роста и белками внеклеточного матрикса индуцирует аутофосфорилирование внутриклеточных доменов рецепторов и активацию внутриклеточных сигнальных механизмов, приводящих к запуску ферментативного пути усиления и передачи сигнала к ядру клетки, основными участниками которого являются члены семейства митоген-активируемых протеинкиназ MAPK (mitogen-activating protein kinase) [205; 255]. Конечные ферменты данного каскада – серин-треониновые киназы ERK 1/2, JNK, и p38 – транслицируются в ядро, где в результате фосфорилирования факторов транскрипции активируют гены раннего ответа, продуктами которых являются компоненты фактора транскрипции c-Fos и c-Jun [491]. Белки c-Fos и c-Jun через формирование молекулы-димера фактора транскрипции AP-1 регулируют экспрессию генов позднего ответа, среди продуктов которых Cdk и циклины, инициирующие вход клетки в G_1 -фазу.

Передача внутриклеточного сигнала посредством фосфорилирования определяется не только активностью тирозинкиназ, но и активностью тирозинфосфатаз. Без активации рецепторов активность тирозинфосфатаз на 2–3 порядка выше, чем активность тирозинкиназ. Степень и продолжительность фосфорилирования, опосредованного рецепторными тирозинкиназами, могут быть значительно увеличены в результате ингибирования тирозинфосфатаз [492]. Поэтому запуск сигнальных систем с участием рецепторных тирозинкиназ сопровождается также активацией супероксид-синтазной системы вторичных мессенджеров. Рецептор-опосредованное усиление продукции АФК происходит с участием таких НАДФН-оксидаз, как Nox1 и Nox4 [493]. Супероксидный анион-радикал и образующийся в результате супероксидной дисмутации пероксид водорода приводят к инактивации тирозинфосфатаз.

SH-группа цистеина в белках является главной мишенью действия H_2O_2 . Пероксид водорода вступает в реакции в основном с депротонированными цистеинами в форме тиолат-аниона ($-S^-$). Для большинства цистеинов, входящих в состав белков, значение pK_a равно 8,5. При физиологических условиях тиольные группы этих цистеинов находятся в протонированной форме (RSH). В некоторых белках цистеины, расположенные вблизи положительных зарядов аминокислотных групп, имеют значения pK_a , равные 5,0, и при физиологических pH их тиольные группы находятся в депротонированном состоянии и могут окисляться пероксидом водорода [494; 495]. Тирозинфосфатазы содержат подобные «реакционные» цистеины в активном центре [496]. Механизм переходной активации тирозинфосфатаз основывается на окислении реакционных цистеинов до формы сульфеновой кислоты (R-SOH) и является важным механизмом регуляции внутриклеточной трансдукции сигнала. В форме сульфената активность фосфатазы значительно снижена или полностью отсутствует [497]. Восстановление сульфеновой кислоты может происходить через образование дисульфидных связей между SH-группами белка и низкомолекулярными тиолами (прежде всего глутатионом) [498]. Дисульфиды восстанавливаются до исходной формы в результате действия ферментов глуторедоксина или тиоредоксина [499; 500]. В результате образования сульфенатов инактивируются фосфатаза Cdc25 [501], фосфатазы VHR, LAR и PTP1 [502] и ряд других белков [503].

Фосфатаза Cdc25, продукт генов клеточного деления cdc (cell division control), является ключевой молекулой, регулирующей клеточный цикл [504; 505]. С участием Cdc25 происходит дефосфорилирование каталитической субъединицы Cdk и образование комплекса с циклином [506]. Показано, что инактивация фосфатазы Cdc25 при действии H_2O_2 происходит в результате формирования дисульфидной связи между остатками цистеина Cys377 и Cys330 [507]. С другой стороны, ингибирование других тирозинфосфатаз

при действии АФК может привести к увеличению фосфорилирования Cdc25 и активации циклинзависимых киназ [508]. Таким образом, эффекты АФК на процессы пролиферации зависят от внутриклеточных условий, включая концентрацию окислителей и внутриклеточную локализацию их мишеней.

Редокс-регуляция дифференцировки. В настоящее время теория развития организмов, признавая факты генетического детерминирования процессов онтогенеза, допускает влияние эпигенетических факторов на процессы дифференцировки тканей. Несмотря на то что идентифицированы многие генетические составляющие программ развития, относительно мало известно о внеклеточных участниках процессов развития. В 90-х годах прошлого века выдвинута свободнорадикальная теория развития, в которой кислородные радикалы рассматриваются в качестве регуляторных молекул [456; 509]. Согласно свободнорадикальной теории развития тканевая дифференцировка определяется различиями в оксигенации и связана с содержанием АФК в клетках и внеклеточном пространстве [456]. Показано, что в условиях гипероксии морфологическая и биохимическая дифференцировка стимулируется во многих тканях различных организмов [456]. С другой стороны, гипоксия ингибирует дифференцировку тканей [510]. Изменение содержания кислорода, как известно, может влиять на экспрессию генов [511]. Однако предполагается, что эффекты кислорода на дифференцировку тканей не связаны с аэробным метаболизмом [512]. Показано, что гипероксия индуцирует дифференцировку клеток нейробластомы даже в присутствии цианида, ингибирующего аэробный метаболизм [513]. Р. Аллен с коллегами предположил, что кислородзависимая регуляция генной экспрессии осуществляется с участием АФК. При тканевой дифференцировке изменяется активность супероксиддисмутазы (преимущественно Mn-SOD), что увеличивает концентрацию H_2O_2 [512]. Обнаружено, что введение Cu,Zn-SOD с помощью липосом в клетки эритролейкемии Фрейда стимулирует дифференцировку клеток [514]. Низкомолекулярные антиоксиданты (аскорбиновая кислота, глутатион, β -каротин и α -токоферол) не способны вызывать дифференцировку клеток эритролейкемии Фрейда, а наоборот, ингибируют ее [514]. С другой стороны, экзогенно добавленные оксиданты стимулируют дифференцировку клеток. Таким образом, развитие организмов может регулироваться меж- и внутриклеточными градиентами редокс-свойств.

Фенотипические изменения, которым клетки подвергаются в течение развития, осуществляются со значительными энергетическими затратами, необходимыми для биосинтеза и функционирования специфических клеточных компонент. Увеличение активности клеток сопровождается стимуляцией метаболизма митохондрий, а следовательно, и изменением продукции АФК. В результате градиенты метаболической активности развивающегося организ-

ма могут сформировать градиенты редокс-свойств, необходимые для реализации определенного клеточного ответа [515; 516]. Другим важным фактором формирования концентрационных градиентов АФК являются различия в экспрессии НАДФН-оксидазы и ферментов антиоксидантной системы [517].

Роль АФК как сигнальных молекул в процессах дифференцировки подтверждается многочисленными исследованиями на клеточных культурах. Как отмечалось ранее (разд. 2.2), ключевым этапом механизма действия различных по природе физических сигналов (электрические, магнитные и механические) при стимулировании кардиоваскулярной дифференцировки стволовых клеток является активация НАДФН-оксидазы [243–246]. Показано, что АФК, продуцируемые Nox4, активируют MAPK каскад и регулируют транслокацию фактора транскрипции MEF2C (*myocyte enhancer factor 2C*) из цитоплазмы в ядро клетки [518]. Продукция АФК и процессы дифференцировки в эмбриональных стволовых клетках блокируются ингибиторами фосфатидилинозитол-3-киназы (PI 3-киназы) [452]. В экспериментах на клеточных линиях Caco-2, HEK293T и Cos-7 показано, что стимуляция НАДФН-оксидазы при действии факторов роста происходит с участием PI 3-киназы и белка Rac1 [519].

Изменение экспрессии генов при активации дифференцировки клеток осуществляется в результате трансдукции сигнала в ядро клетки с участием тирозинкиназного каскада, степень и продолжительность фосфорилирования в котором регулируется АФК посредством модуляции активности фосфатаз. Тирозинкиназный каскад является общим путем передачи информации от мембраны клетки к ядру как для митогенных сигналов, так и для сигналов, стимулирующих дифференцировку. Однако разные внешние сигналы, регулирующие клеточное поведение через активацию одних и тех же сигнальных киназ, вызывают разные клеточные ответы. Обнаружено, что NGF (*nerve growth factor*) и EGF (*epidermal growth factor*) вызывают активацию MAPK-каскада в клетках феохромцитомной линии PC12 [520]. Однако NGF индуцирует в клетках PC12 рост нейритов, а EGF – клеточную пролиферацию. Различие ответов клетки на действие факторов роста, вероятно, вызвано тем, что NGF вызывает более длительную активацию MAPK [521]. Можно предположить, что при дифференцировке клеток происходит более высокая продукция АФК, в результате чего ингибирование большего числа фосфатаз приводит к более длительной активации MAPK. При более высоком уровне продукции АФК, чем при пролиферации, также может блокироваться активность тирозинфосфатазы Cdc25, регулирующей клеточный цикл. Таким образом, пространственно-временной профиль активации одних и тех же белков сигнальных путей может приводить к различным паттернам экспрессии генов и, следовательно, к различным физиологическим ответам [522–524].

Редокс-регуляция апоптоза. В регуляции процессов дифференцировки и пролиферации ключевую роль играют АФК, продуцируемые Nox. Регуляция запрограммированных форм клеточной гибели, таких как апоптоз и аутофагия, происходит с участием митохондриальных АФК.

Регуляция апоптоза является одной из важнейших функций митохондрий [525]. В организме человека ежедневно путем апоптоза погибает порядка 50–70 млрд клеток. Суммарная масса клеток, которые на протяжении 1 года жизни подвергаются разрушению, сопоставима с массой тела человека.

Процесс апоптоза можно разделить на три стадии: сигнальную (индукторную) стадию, эффекторную стадию и стадию деструкции. Первая стадия включает механизмы инициации апоптоза при действии внешних (внеклеточных) или внутриклеточных факторов. В течение эффекторной стадии происходит активация каскада белков-эффекторов и регулирующих их белков-модуляторов. Основными участниками этой стадии являются иницирующие и эффекторные каспазы.

Каспазы являются цистеиновыми протеазами, расщепляющими полипептидные цепи вблизи остатка аспарагиновой кислоты [526]. В процессе активации они запускают каспазный каскад – систему взаимодействующих иницирующих и эффекторных каспаз. Каспазы образуются при протеолитическом расщеплении прокаспаз (неактивных предшественников каспаз) на три домена: регуляторный N-концевой домен (продомен), большую (17–21 кДа) и малую (10–13 кДа) субъединицы. Продомен отделяется, а образующиеся в результате протеолиза большая и малая субъединицы соединяются в гетеродимер. Два гетеродимера в дальнейшем формируют тетрамер – активную каспазу с двумя каталитическими участками.

Конечным этапом развития программы клеточной гибели вне зависимости от изначального иницирующего воздействия является деградация клетки путем фрагментации на отдельные апоптотические тельца, ограниченные плазматической мембраной. Фрагменты погибшей клетки в течение 1–3 ч фагоцитируются клетками иммунной системы либо соседними клетками, не приводя к развитию воспалительной реакции.

Программируемая клеточная гибель клеток растений имеет морфологические и биохимические сходства с апоптозом животных. Однако особенности строения и функционирования растительной клетки обуславливают и ряд отличий. Например, наличие клеточной стенки препятствует фагоцитозу, поэтому в растительных клетках продукты апоптоза ликвидируются за счет аутофагии и автолиза. Функцию гидролитических отсеков в клетках растений выполняют вакуоли.

Несмотря на разнообразие иницирующих факторов, выделяются два основных пути передачи сигналов апоптоза: рецепторзависимый (внешний) сигнальный путь с участием рецепторов гибели клетки и митохондриально-

опосредованный (внутренний) путь. Большинство форм апоптоза у позвоночных реализуется по митохондриальному пути, а не через рецепторы клеточной гибели.

Активация митохондриально-опосредованного апоптоза происходит в результате выхода апоптогенных белков из межмембранного пространства в цитоплазму клетки [527]. В цитоплазму клеток высвобождаются цитохром *c*, прокаспазы 2, 3 и 9, а также белок AIF (AIF – apoptosis inducing factor) – флавопротеин с молекулярной массой 57 кДа. Цитохром *c* в цитоплазме клетки участвует в формировании апоптосомы вместе с белком APAF-1 (APAF – apoptosis protease activating factor) и прокаспазой-9 [528]. Образованная апоптосома активирует каспазу-9 и приводит к запуску эффекторной стадии апоптоза. Высвобождающийся из межмембранного пространства митохондрий флавопротеин AIF является эффектором апоптоза, действующим независимо от каспаз. AIF траслоцируется в ядро клетки, в котором с его участием запускаются процессы конденсации хроматина и фрагментации ДНК [529].

Митохондриальный путь апоптоза регулируется белками семейства Bcl-2 (Bcl-2 – B-cell-lymphoma protein 2) [530]. Белки семейства Bcl-2 подразделяются на антиапоптотические (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-W, Bcl-B, Mcl-1 и др.) и проапоптотические белки (Bax, Bid, Bak, Bok и др.) [531]. Проапоптотические белки семейства Bcl-2 – Bax и Bak участвуют в формировании во внешней мембране митохондрий каналов, достаточно больших для выхода апоптогенных белков из межмембранного пространства в цитозоль [532]. В свою очередь, активация и функционирование Bax и Bak может блокироваться антиапоптотическими белками семейства Bcl-2: Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 и др. [533].

Высвобождение апоптогенных белков осуществляться также путем разрыва внешней мембраны митохондрий. Разрыв внешней мембраны митохондрий объясняется увеличением объема митохондриального матрикса. Ключевым событием данного процесса является формирование митохондриальных пор высокой проницаемости, приводящее к снижению мембранного потенциала и набуханию митохондрий вследствие разницы осмотического давления в матриксе и межмембранном пространстве.

Митохондриальная пора высокой проницаемости mPTP (mPTP – mitochondrial permeability transition pore) представляет собой надмолекулярную структуру, образованную комплексом белков внешней и внутренней мембраны [534]. В состав данного комплекса входят АДФ/АТФ-транслоказа ANT (ANT – adenine nucleotide transporter) внутренней мембраны митохондрий и потенциалзависимый анионный канал VDAC (VDAC – voltage dependent anion channel) внешней мембраны митохондрий, а также несколько вспомогательных белков (рис. 3.1) [535; 536]. Образованный комплекс формирует пору диаметром 2,6–2,9 нм, способную пропускать низкомолекулярные вещества с молекулярной массой до 1,5 кДа.

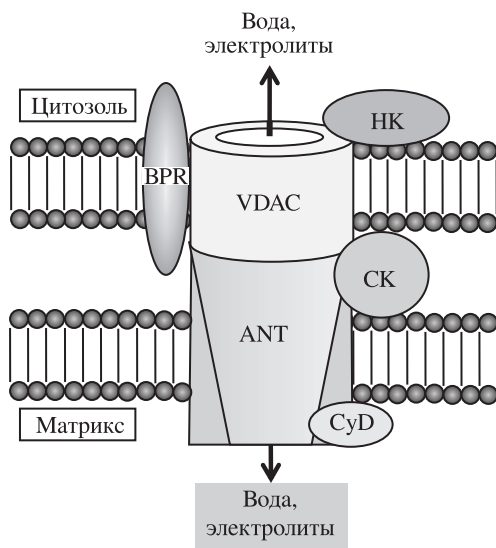


Рис. 3.1. Основные компоненты
митохондриальной поры
высокой проводимости:

VDAC – потенциалзависимый анионный канал;
ANT – адениннуклеотидный транспортер;
CyD – циклофилин D; BPR – периферический
бензодиазепиновый рецептор;
CK – креатинкиназа; HK – гексокиназа

Образование mPTP зависит от редокс-состояния сульфгидрильных групп ANT, поэтому одним из факторов индукции апоптоза являются митохондриальные АФК [537]. Повышение продукции АФК в митохондриях вызывает окисление сульфгидрильных групп ANT внутренней мембраны митохондрий, что приводит к образованию поры высокой проницаемости в результате формирования комплекса с участием циклофилина D, ANT и VDAC внешней мембраны митохондрий [538]. Открытие пор высокой проницаемости сопровождается деполяризацией внутренней мембраны митохондрий и приводит к высвобождению цитохрома *c* и апоптоз-индуцирующего фактора AIF, что является начальной стадией апоптоза [525].

Процессы образования АФК митохондриями усиливаются при действии различных фармакологических препаратов и физиологических стимулов. Известно, что антрациклины индуцируют апоптоз благодаря продукции АФК в ходе их метаболизма. Проапоптотическое действие доксорубицина и дру-

гих антрациклинов в клетках блокируется циклоспорином, ингибитором митохондриальной Ca^{2+} -зависимой mPTP, и увеличенной экспрессией митохондриальных антиапоптотических белков семейства Bcl-2, что указывает на участие mPTP в механизме действия противоопухолевых средств группы антрациклинов [539].

В качестве сигнальных молекул АФК участвуют в регуляции метаболизма, дифференцировки и апоптоза клеток. Функциональный ответ клетки на повышение концентрации АФК зависит от типа активных форм кислорода, их концентрации и длительности концентрационного стимула АФК. Таким образом, митохондрии являются многофункциональными органеллами, мембраны которых участвуют в кислородзависимых процессах обработки информации, преобразования энергии и вещества.

Редокс-регуляция аутофагии. Аутофагия является основным катаболическим процессом удаления из клеток поврежденных органелл, агрегированных белков и внутриклеточных патогенов. Термин «аутофагия» (от др.-греч. αὐτός – сам и φαγεῖν – есть) был введен в 1963 году бельгийским цитологом и биохимиком, лауреатом Нобелевской премии Кристианом де Дювом для описания процесса получения питательных веществ в результате катаболизма внутриклеточных компартментов лизосомами [540]. Выделяют макроаутофагию (формирование фагофора с двойной изолирующей мембраной, захватывающего внутриклеточные структуры для слияния с лизосомами), микроаутофагию (захват содержимого цитоплазмы путем инвагинации мембраны лизосом) и шаперон-опосредованную аутофагию (поврежденные молекулы доставляются в лизосомы белками-шаперонами) (рис. 3.2). Макроаутофагия может быть неселективной, когда определенная область цитоплазмы окружается мембраной, или селективной, направленной на удаление белковых агрегатов (агрефагия), поврежденных митохондрий (митофагия), рибосом (рибофагия), пероксисом (пексофагия), эндоплазматического ретикулаума (ретикулофагия), секреторных гранул (кринофагия), липидных капель (липофагия), а также различных внутриклеточных патогенов, бактерий и вирусов (ксенофагия) [541].

Аутофагия является важным механизмом защиты при окислительном и карбонильном стрессе [542; 543]. Посредством аутофагии удаляются поврежденные митохондрии и пероксисомы, являющиеся ключевыми внутриклеточными источниками АФК, а также белковые и липидные агрегаты, образование которых является главной причиной цитотоксического действия карбонильных соединений [544; 545]. Кроме того, индукция аутофагии приводит к активации сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE и усилению антиоксидантной защиты клеток [546; 547].

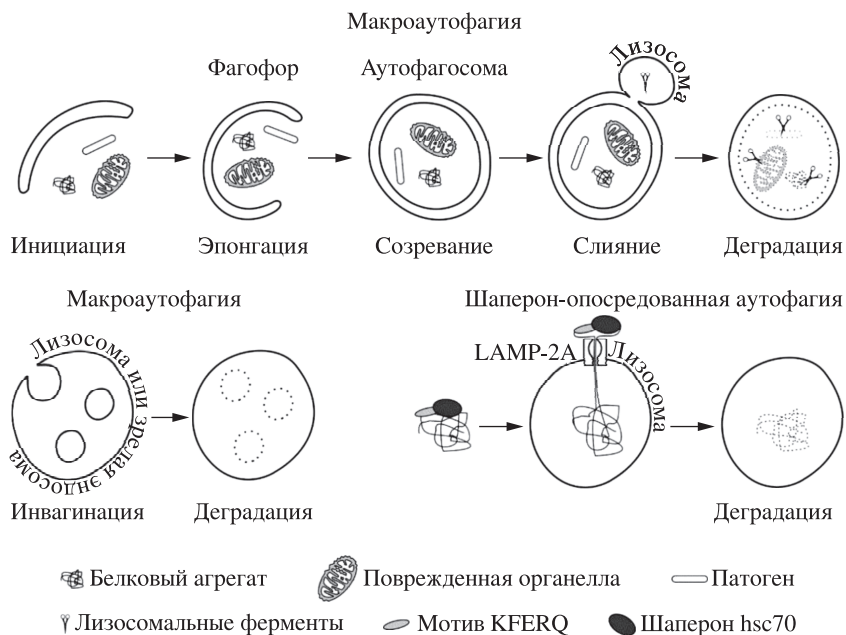


Рис. 3.2. Основные типы аутофагии (адаптировано по [550])

Интенсивность аутофагии регулируется рядом индукторов, к которым могут относиться как внутренние (нехватка питательных веществ, наличие поврежденных органелл, денатурировавших белков и их агрегатов, окислительный или токсический стресс), так и внешние, например бактерии или вирусы, интерферон γ или фенолы [548]. После действия стимула индукция аутофагии происходит в течение 1 ч, а ее ингибирование – через 24 ч. Главным внутриклеточным ингибитором аутофагии является серин/треониновая протеинкиназа mTOR (*mammalian target of rapamycin*) с молекулярной массой 289 кДа, состоящая из 2549 аминокислот [549]. В клетках mTOR функционирует в составе белковых комплексов mTORC1 (*mammalian target of rapamycin complex 1*) и mTORC2. Регулятором аутофагии выступает mTORC1, функциональная активность которого контролируется рядом сигнальных каскадов, прежде всего AMPK/ERK/TSC2/mTOR (ингибирует mTORC1 и активирует аутофагию) и JAK/PI3K/Akt/mTOR (поддерживает активность mTORC1 и ингибирует аутофагию), в результате чего регулируется баланс анаболических и катаболических процессов. Исследования на клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* позволили выделить 35 генов, необходимых для аутофагии, которые объединили в общую группу Atg (*autophagy-related genes*), при этом многие аналоги дрожжевых белков Atg выявлены у млекопитающих.

В процессе аутофагии выделяется несколько стадий: инициации, элонгации, завершающейся формированием аутофагосомы с изолирующей двойной мембраной, слияния фагофора с лизосомами с образованием аутофаголизосомы и деградации содержимого фагофора (рис. 3.3). Инициация формирования аутофагосом осуществляется комплексом ULK1/2 (Unc51-like kinase 1/2), активность которого негативно регулируется mTORC1 и стимулируется киназой AMPK (adenosine monophosphate-activated protein kinase) [551].

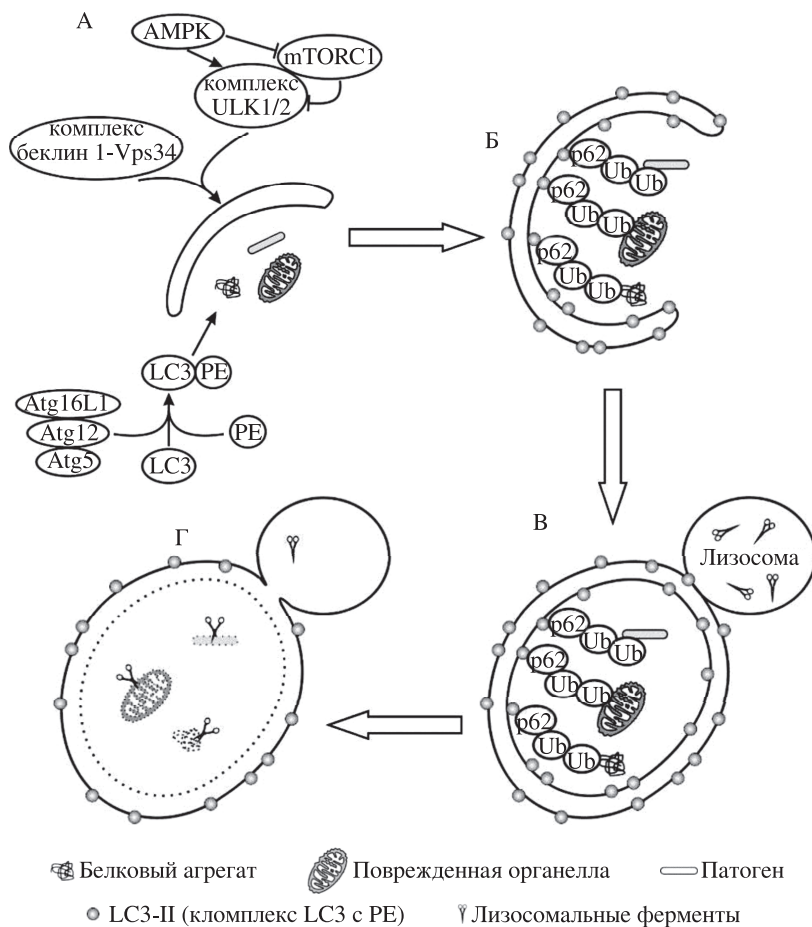


Рис. 3.3. Схематическое изображение процесса аутофагии:
 А – инициация; Б – элонгация; В – образование аутофаголизосомы; Г – деградация содержимого фагофора; PE – фосфатидилэтаноламин; Ub – убиквитин

Этот комплекс располагается на мембране эндоплазматического ретикулума, где он, в свою очередь, активирует киназный комплекс, состоящий из беклина 1 (Atg6 у дрожжей) и киназы Vps34 [552], а также инициирует участие других белков в формировании аутофагосомы [553; 554]. Среди них белки Atg12, Atg5 и Atg16L1, формирующие комплекс, который конъюгирует убиквитин-подобные белки LC3 (в клетках млекопитающих присутствуют изоформы А, В и С) и GABARAP (*gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein*) с фосфатидилэтаноламином [555]. Оба белка необходимы для элонгации мембраны формирующейся аутофагосомы, а также для секвестрирования цитоплазматического материала, устранимого в аутофагосомах [556].

Упаковке в аутофагосомы подвергается цитоплазматический материал (белковые агрегаты, поврежденные органеллы и даже патогены), содержащий один или несколько типов специфических рецепторов. По завершении процесса упаковки деградируемого материала мембрана аутофагосом схлопывается и далее может сливаться с поздними эндосомами и лизосомами. Нарушение функционирования любого из этапов аутофагии может привести к фатальным последствиям как для развивающихся эмбрионов, так и для зрелых организмов. Многие нейродегенеративные заболевания ассоциированы с мутациями генов аутофагии, участвующих в ее реализации на различных этапах [557]. Нарушения процессов регуляции аутофагии играют важную роль в этиологии онкологических заболеваний [558].

При индуцировании аутофагии химиотерапевтическими агентами выделяют несколько форм аутофагии, среди которых две диаметрально противоположные по действию на гибель клеток – «цитотоксичная» и «цитозащитная» аутофагия [559]. Цитозащитная аутофагия является более частым случаем клеточного ответа на действие противоопухолевых агентов [560]. Поэтому изучение механизмов модуляции аутофагии и поиск эффективных регуляторов данных механизмов является необходимым этапом для повышения эффективности противоопухолевой терапии.

Цитотоксическая аутофагия запускает гибель клеток или в результате значительного увеличения аутофаготического потока (смерть клеток через аутофагию), или в результате активации апоптоза или некроза (смерть клеток с аутофагией) [561]. В организме млекопитающих наиболее вероятным механизмом гибели клеток с участием аутофагии является усиление апоптоза. В аутофагии, как и при апоптозе, важную роль в сигнальных механизмах выполняют АФК.

Установлена взаимосвязь окислительных процессов с участием АФК и аутофагии: повышение концентрации АФК запускает аутофагию, а ауто-

фагия, в свою очередь, снижает окислительный стресс [562–564]. Митохондрии являются основным источником АФК при активации стресс-индуцированной аутофагии и митофагии [565; 566]. В качестве одной из мишеней действия пероксида водорода выступает протеаза ATG4, активность которой блокируется при окислении тиолов [567]. Это, в свою очередь, стабилизирует встроенные в липидный бислой белки LC3. Формирование комплекса между VDAC1, белком p62 и LC3 регулирует доставку поврежденных митохондрий в аутофагосомы [568].

Другим возможным АФК-зависимым механизмом активации аутофагии является редокс-регуляция серин/треониновой протеинкиназы ATM (*ataxia telangiectasia mutated*). Активность белка ATM увеличивается при появлении двунитевых разрывов ДНК в результате радиотерапии или химиотерапии [569]. ATM фосфорилирует несколько ключевых белков, регулирующих репарацию ДНК, клеточный цикл и аутофагию. Среди субстратов ATM – эффекторная протеинкиназа Chk2 и белок p53 [570]. Активированная протеинкиназа Chk2 фосфорилирует фосфатазу Cdc25, что приводит к остановке клеточного цикла. Фосфорилирование p53 приводит к ингибированию комплекса mTORC1 и активации аутофагии [571]. Активация ATM может происходить в результате дисульфид-зависимой димеризации, индуцированной АФК [572]. Активация ATM при окислительном стрессе индуцирует аутофагию через сигнальный каскад AMPK/ERK/TSC2/mTOR [573].

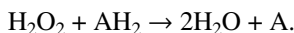
Предполагается, что редокс-зависимые белки, регулирующие аутофагию, активируются при более низких концентрациях АФК, чем факторы, регулирующие апоптоз [561]. При умеренной продукции АФК в клетке процессы аутофагии являются защитным механизмом от окислительного стресса. Дальнейшее увеличение продукции АФК может вызвать переключение аутофагии на апоптоз. Например, показано, что хроматинсвязывающий фактор HMGB1 (*high mobility group box 1*) регулирует аутофагию через редокс-зависимый механизм [574]. Увеличение концентрации АФК индуцирует транслокацию фактора из ядра в цитозоль и его последующее связывание с беклином 1. Образование внутримолекулярной дисульфидной связи между Cys23 и Cys45 индуцирует перестройки конформации фактора HMGB1, необходимые для взаимодействия с беклином 1 и активации аутофагии. HMGB1, в котором Cys106 окислен до сульфоновой кислоты ($-\text{SO}_3\text{H}$), ингибирует аутофагию и индуцирует апоптоз [575]. Однако для установления деталей механизмов редокс-зависимого переключения аутофагии на апоптоз требуются дальнейшие исследования.

3.2. Антиокислительная система клеток в механизмах сопряженного функционирования активных форм кислорода

Клетки животных и растительных организмов обладают многоуровневой антиокислительной системой (АОС) – системой защиты от повреждающего действия окислителей. По молекулярному строению в составе АОС выделяют белки и низкомолекулярные восстановители (их часто называют *антиоксидантами*), выполняющие в биохимических редокс-процессах функции доноров электронов. По локализации в клеточных структурах компоненты АОС разделяют на мембранные, внутриклеточные и внеклеточные. Регуляция концентрации внутриклеточных антиоксидантов осуществляется в результате сопряженного функционирования специализированных белков. Белковый компонент АОС включает такие ферменты, как супероксиддисмутазы, пероксидазы и каталазы, а также ряд белков тиолзависимых антиоксидантных систем.

Супероксиддисмутазы (см. разд. 1.4). В организме человека экспрессируются три группы супероксиддисмутаз (СОД), различающихся по локализации и содержанию металлов переменной валентности. Первая группа ферментов включает локализованные в цитозоле СОД, содержащие ионы меди и ионы цинка, и обозначается как СОД1. Группа СОД, содержащих в активном центре ион марганца и локализованных в матриксе митохондрий, обозначается как СОД2. К группе СОД3 относятся внеклеточные Cu,Zn-СОД. Увеличение экспрессии СОД наблюдается при диабете [576], онкологических [577; 578], нейродегенеративных [579] и сердечно-сосудистых заболеваниях [580].

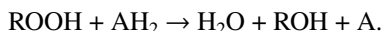
Пероксидазы и каталазы. К пероксидазам относятся оксидоредуктазы, катализирующие окислительно-восстановительные реакции, в которых акцептором электронов является пероксид водорода или органические пероксиды. В качестве доноров электронов для пероксидаз могут выступать глутатион, аскорбат, восстановленные хиноны и другие вещества. Суммарный процесс, катализируемый пероксидазой, можно изобразить следующей схемой:



К подклассу пероксидаз относятся и каталазы. Каталаза катализирует реакцию переноса электронов с одной молекулы H_2O_2 на другую, в результате чего одна молекула пероксида восстанавливается до воды, а вторая окисляется до молекулярного кислорода:



В реакциях с метанолом, этанолом, фенолами или муравьиной кислотой каталаза проявляет пероксидазную активность:



Каталазы и пероксидазы локализованы преимущественно в пероксисомах и митохондриях. Каталазы обнаружены практически у всех аэробных организмов. Однако большинство бактерий не содержат каталазу.

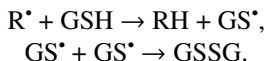
В настоящее время пероксидазная активность обнаружена у многих гемсодержащих белков, включая такой белок, как гемоглобин [581]. Пероксидазная активность гемсодержащих белков может активироваться в результате ковалентной модификации или при связывании определенных лигандов. Например, пероксидазная активность цитохрома *c* усиливается при связывании последнего с кардиолипином [582; 583]. Ключевыми пероксидазами антиокислительной системы клеток являются глутатионпероксидаза и пероксиредоксины, которые входят в состав тиолзависимых систем. К тиолзависимым антиоксидантным системам относятся система глутатиона, тиоредоксина, глутаредоксина и пероксиредоксинов.

Антиоксидантная система глутатиона. В состав антиоксидантной системы глутатиона входят трипептид L-γ-глутамил-L-цистеинилглицин, известный как глутатион, и комплекс ферментов, участвующих в регуляции метаболизма глутатиона. Глутатион является одним из основных участников внутриклеточных редокс-процессов. Концентрация глутатиона в клетках тканей людей, животных, растений и в аэробных бактериях достигает миллимолярных значений [584]. Глутатион участвует в процессах антиокислительной защиты, метаболизме ксенобиотиков и эйкозаноидов, в регуляции агрегации клеток, клеточного цикла и генной экспрессии [585–587].

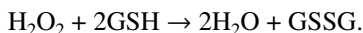
Глутатион синтезируется преимущественно в цитозоле и затем транспортируется в другие компартменты клеток и во внеклеточное пространство [588]. Синтез глутатиона из глутамата, цистенина и глицина осуществляется с участием γ-глутамилцистеинсинтазы и глутатионсинтазы [589]. В метаболизме глутатиона участвуют такие ферменты, как глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, глутатионтрансфераза [590].

С участием тиольной группы цистеинового остатка глутатиона восстанавливаются многие окислители, образующиеся в организме, в том числе пероксид водорода и гидропероксиды липидов. Две молекулы восстановленной формы глутатиона (GSH) при окислении образуют глутатиондисульфид (GSSG) – окисленную форму глутатиона.

Восстановленный глутатион может вступать в прямые реакции с $^1\text{O}_2$, $\text{HO}^\bullet$, ONOO^- и другими окислителями, выступая в роли антиоксиданта:



Ферментативное восстановление окислителей катализируется глутатионпероксидазой. Глутатионпероксидаза относится к семейству ферментов, катализирующих восстановление пероксида водорода и липидных гидропероксидов путем переноса электронов от глутатиона. Существует несколько изоферментов, которые кодируются разными генами. Изоферменты отличаются по локализации в клетке и субстратной специфичности. В тканях человека идентифицированы восемь изоформ глутатионпероксидазы [591]. Наиболее распространенной формой фермента является глутатионпероксидаза 1 (GPx-1), которая содержится в цитоплазме клеток практически всех тканей млекопитающих. Акцептором электронов в GPx-1 является пероксид водорода. GPx-1 удаляет H_2O_2 , окисляя 2 молекулы GSH с образованием GSSG:



В свою очередь, глутатиондисульфид восстанавливается при переносе электронов от НАДФН в реакции, катализируемой флавопротеином глутатионредуктазой:



Глутатионпероксидаза 1 (EC 1.11.1.9) является селенсодержащим гликопротеином, состоящим из трех одинаковых субъединиц с молекулярной массой 22 кДа. В активном центре фермента находится остаток аминокислоты селеноцистеина, содержащей атом селена.

На рис. 3.4 приведена схема реакции, катализируемой глутатионпероксидазой. На первой стадии реакции остаток селеноцистеина, ионизированная форма которого стабилизируется остатками триптофана Trp148 и глутамина Gln70, окисляется под действием пероксида водорода до селенильной кислоты E-SeOH. Следующие две стадии реакции заключаются в регенерации

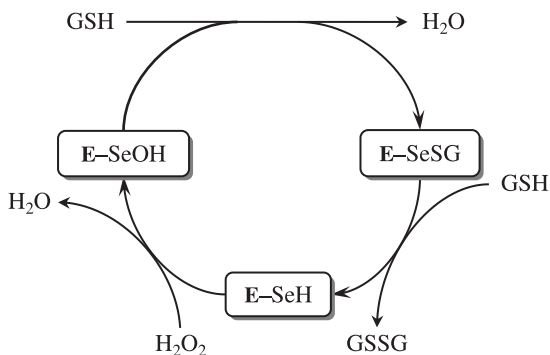


Рис. 3.4. Схема реакции, катализируемой глутатионпероксидазой 1

селеноцистеина двумя молекулами глутатиона с образованием промежуточного продукта селенилсульфида (E-SeSG).

GPx-1 является одним из ферментов, участвующих в регуляции клеточного редокс-состояния. Уменьшение активности GPx-1 может индуцировать развитие окислительного стресса, тогда как рост активности фермента – развитие восстановительного стресса, изменяющего процессы клеточного роста и апоптоза.

Глутатион также является кофактором для таких антиокислительных ферментов, как глутаредоксинредуктаза, дисульфидизомераза и дегидроаскорбатредуктаза [592].

Антиоксидантная система тиоредоксина. Компонентами антиоксидантной системы тиоредоксина являются низкомолекулярный белок тиоредоксин (EC 1.8.4.8), фермент тиоредоксинредуктаза (EC 1.8.1.9) и донор электронов НАДФН. Благодаря наличию дитиольного участка в активном центре тиоредоксин (Trx) способен восстанавливать внутри- и межмолекулярные дисульфидные связи в белках, в том числе и в пероксиредоксинах (тиоредоксинпероксидазах). Несмотря на то что концентрация Trx в клетках млекопитающих (~1 мкМ) значительно меньше концентрации глутатиона, данные белки играют жизненно важную роль. Показано, что мыши, нокаутированные по Trx, погибают на стадиях раннего эмбрионального развития [593].

В настоящее время семейство Trx включает более 10 белков. Основными изоформами Trx являются цитозольный тиоредоксин 1 (Trx1) и митохондриальный тиоредоксин 2 (Trx2) [594]. При восстановлении дисульфидсодержащего субстрата в активном центре Trx2 окисляются Cys90 и Cys93 (у человека). В отличие от митохондриального Trx2 цитозольный Trx1 помимо двух цистениновых остатков Cys32 и Cys35, локализованных в активном центре, содержит еще три остатка цистеина, которые могут окисляться и образовывать дисульфидные связи [595]. Образующиеся в активных центрах Trx1 и Trx2 дисульфиды восстанавливаются тиоредоксинредуктазой (TrxR) (рис. 3.5), которая является НАДФН-зависимым селенофлавопротеином, состоящим из двух одинаковых субъединиц (у млекопитающих с молекулярной массой 55–65 кДа) [596; 597]. Выявлены и охарактеризованы три изоформы TrxR млекопитающих: цитозольная (TrxR1), митохондриальная (TrxR2) и TrxR, катализирующая восстановление как тиоредоксина, так и глутатиондисульфида и называемая тиоредоксинглутатионредуктазой (thioredoxine glutathione reductase, TGR) [598]. У млекопитающих все три изоформы обладают одинаковой структурой каталитического домена и характеризуются наличием селеноцистеина (Sec) в С-концевом активном центре (Gly–Cys–Sec–Gly–COOH).

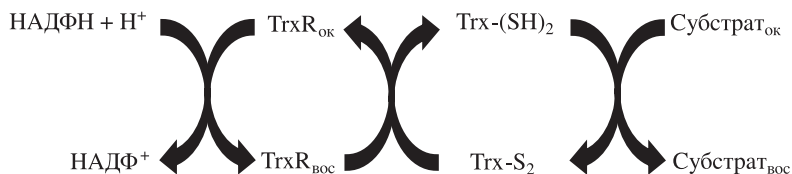


Рис. 3.5. Схема переноса электронов от НАДФН к субстрату в антиоксидантной системе тиоредоксина

Механизм восстановления TrxR с участием НАДФН сходен с аналогичным процессом для глутатионредуктазы и липоамиддегидрогеназы [599]. Вначале осуществляется перенос электрона с НАДФН через ФАД на дисульфид в активном центре, образованный остатками цистенина Cys59 и Cys64 в N-концевом домене. Затем электроны переносятся от образовавшегося дитиола одной субъединицы в димерном ферменте на селенилсульфид в С-концевой последовательности другой субъединицы. Перенос электронов на другую субъединицу имеет место также и при восстановлении GSSG глутатионредуктазой [599]. Важной характеристикой тиоредоксинредуктаз млекопитающих является широкий спектр субстратов восстановления, который не ограничивается только серосодержащими соединениями.

Антиоксидантные свойства тиоредоксина определяются не только их способностью восстанавливать каталитическую активность пероксиредоксинов и глутатионпероксидаз, разлагающих органические гидроперексиды и H_2O_2 [600], но и способностью Trx1 непосредственно восстанавливать H_2O_2 и GSSG [601].

При ряде патологических процессов содержание тиоредоксина в тканях и сыворотке крови значительно возрастает, что может быть использовано для диагностики заболеваний [602]. Существенное повышение уровня Trx1 в сыворотке крови наблюдается при сердечно-сосудистой патологии, включая обострение ишемической болезни сердца [603] и хроническую сердечную недостаточность [604]. В плазме крови больных с острым инфарктом миокарда наблюдается увеличение содержания тиоредоксина в 6 раз по отношению к группе сравнения (люди с болевым синдромом грудной клетки) [605]. При ревматоидном артрите концентрация тиоредоксина в сыворотке больных в 3 раза выше, чем у здоровых, а в синовиальной жидкости – в 4 раза [606]. Предполагается, что рост концентрации тиоредоксинов в тканях опосредован индукцией его синтеза в клетках в ответ на рост образования АФК, хотя конкретные механизмы этого увеличения недостаточно изучены [7].

Антиоксидантная система глутаредоксинов. Глутаредоксины (Grx, ЕС 1.20.4.1) являются глутатионзависимыми тиолтрансферазами с низкой молекулярной массой (9–14 кДа), относящиеся по своей структуре к супер-

семейству тиоредоксинов. В отличие от тиоредоксинов, восстановление которых осуществляется с участием специфических ферментов – тиоредоксинредуктаз, глутаредоксины восстанавливаются глутатионом и фактически являются переносчиками электронов от системы глутатиона на белки. Таким образом, компонентами антиоксидантной системы глутаредоксина являются глутаредоксин, глутатион, глутатионредуктаза и НАДФН.

В активном центре глутаредоксинов, аналогично тиоредоксинам, содержится цистеновый домен [607]. У млекопитающих и человека обнаружены три изоформы Grx: цитозольный Grx1 с аминокислотной последовательностью в активном центре Cys-Pro-Tyr-Cys и два митохондриальных – Grx2 и Grx5, активный центр которых содержит аминокислотные последовательности Cys-Ser-Tyr-Cys и Cys-Gly-Phe-Ser соответственно [594]. Таким образом, Grx1 и Grx2 являются дитиольными изоформами и содержат по два остатка цистеина в активном центре, тогда как в изоформе Grx5 имеется лишь один остаток цистеина. Изоформы Grx3 и Grx4 обнаружены только у низших эукариот.

В антиоксидантной системе глутаредоксина перенос электронов происходит от НАДФН с участием глутатионредуктазы на окисленный глутатион с образованием GSH, который, в свою очередь, восстанавливает окисленный глутаредоксин (рис. 3.6). Субстратами для Grx являются дисульфиды и смешанные дисульфиды. Восстановление дисульфидов, катализируемое Grx, может идти двумя путями – монотиольным и дитиольным с участием соответственно одного или двух остатков Cys в активном центре [608].

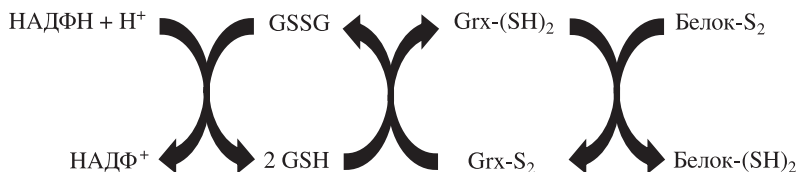


Рис. 3.6. Схема переноса электронов от НАДФН к субстрату в антиоксидантной системе глутаредоксина

При дитиольном механизме N-концевой остаток цистеина в активном центре осуществляет реакцию нуклеофильного замещения с образованием смешанного дисульфида между глутаредоксином и субстратом – белком, имеющим дисульфидную связь. Второй свободный С-концевой остаток цистеина депротонируется и взаимодействует с N-концевым атомом серы с образованием окисленного фермента Grx-S₂ и восстановленного субстрата. Окисленная форма фермента восстанавливается при взаимодействии с глутатионом, образуя смешанный дисульфид (между GSH и N-концевым остатком цистеина в активном центре), который, в свою очередь, восстанавливает

ливается второй молекулой глутатиона. По дитиольному механизму Grx восстанавливает как низкомолекулярные дисульфиды, так и дисульфиды белков.

По монотиольному механизму, получившему название «деглутатионилирование», происходит восстановление смешанных дисульфидов белков или глутатионилированных белков, при этом Grx использует только N-концевой остаток цистеина [608]. В этой реакции GSH смешанного дисульфида белка переносится на тиолтрансферазу с образованием интермедиата Grx-S-SG, который восстанавливается глутатионом. Образующийся GSSG восстанавливается до GSH глутатионредуктазой. Так как для восстановления глутатионилированных белков требуется узнавание только GS-остатков, а не субстрата в целом, монотиольный механизм, приводящий к деглутатионилированию, является, по-видимому, наиболее общей функцией Grx. В отличие от Grx для Trx характерна крайне низкая активность или полное ее отсутствие по отношению к смешанным дисульфидам.

Антиоксидантная система пероксиредоксинов. Пероксиредоксины (Prx (Prdx), EC 1.11.1.15) относятся к суперсемейству сульфгидрилсодержащих пероксидаз. Prx осуществляют восстановление H_2O_2 , органических гидропероксидов и пероксинитрита.

По числу активных остатков цистеина пероксиредоксины млекопитающих подразделяются на типичные двухцистеиновые (Prx1 – Prx4), атипичные двухцистеиновые (Prx5) и одноцистеиновые (Prx6). Все они содержат остатки цистенина на N-концевых участках молекул, а изоформы Prx1 – Prx4 имеют еще дополнительно аналогичные остатки цистенина на C-конце молекул [609].

Prx1 – Prx5 в качестве донора электронов используют Trx, тогда как Prx6 использует GSH [610]. Кроме того, Prx6 восстанавливает гидроперекиси фосфолипидов и обладает активностью фосфолипазы A_2 . Восстановление H_2O_2 всеми Prx проходит через стадию образования сульфеновой кислоты (Cys – SOH) в результате окисления SH-группы остатка цистеина, однако механизм пероксидазной реакции у разных изоформ Prx несколько различается [611].

Типичные двухцистеиновые Prx1 – Prx4 являются гомодимерами и их взаимодействие с H_2O_2 приводит к образованию сульфеновой кислоты в одной из субъединиц белка (рис. 3.7). Взаимодействие окисленного цистеина с тиольной группой цистеина другой субъединицы приводит к формированию межпептидной дисульфидной связи, восстанавливаемой Trx [612]. Аналогичный механизм установлен для Prx5, однако последний является мономером и образует внутримолекулярную дисульфидную связь между Cys47 и Cys151 [613]. Механизм восстановления H_2O_2 при действии Prx6 включает окисление в сульфеновую кислоту активного Cys47, который в дальнейшем S-глутатионируется с участием глутатионтрансферазы. Образовавшийся дисульфид восстанавливается глутатионом, что приводит к восстановлению функциональной активности Prx6.

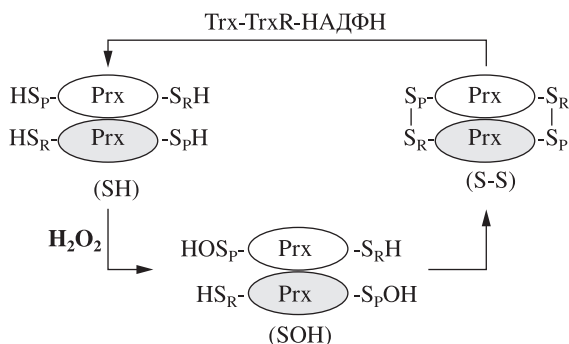


Рис. 3.7. Окислительно-восстановительные переходы
тиолов пероксинов при катализе

Экспрессия генов различных изоформ Prx характеризуется клеточной, тканевой и органной специфичностью [594; 612]. Так оказалось, что Prx1 является наиболее широко представленным и высоко экспрессируемым членом семейства пероксиредоксинов практически во всех органах и тканях человека как в нормальных тканях, так и в злокачественных опухолях [612]. Для печени, семенников, яичников и мышц характерна высокая экспрессия гена PRDX4, тогда как в тонком кишечнике, плаценте, легких, почках, селезенке и тимусе наблюдается низкая экспрессия гена [594].

Prx присутствуют во всех субклеточных компартментах, где также наблюдается определенная специфичность экспрессии генов разных изоформ фермента [612]. Prx1 и Prx2 наиболее широко представлены в цитозоле и ядре клетки. К основным областям локализации Prx5 относятся цитозоль, пероксисомы и митохондрии. Другие изоформы имеют более ограниченную субклеточную локализацию. Так, Prx3 присутствует в митохондриях, Prx4 – в эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи, Prx6 – в цитозоле [612].

Регуляция экспрессии генов PRDX может осуществляться как на уровне транскрипции, так и за счет посттранскрипционной модификации. На экспрессию генов пероксиредоксинов влияет большое число стресс-индуцирующих факторов, стимулирующих окислительный стресс. Основная роль в стресс-опосредованной регуляции экспрессии гена пероксинов принадлежит транскрипционному фактору Nrf2. Посттрансляционные механизмы регуляции активности Prx включают фосфорилирование, редокс-зависимую олигомеризацию и связывание лиганда.

Обнаружено, что фосфорилирование Prx по остатку Тре90 циклинзависимой киназой Cdc2 приводит к снижению активности фермента [614]. Олигомеризация Prx наблюдается при изменении состояния редокс-активного

дисульфидного центра и зависит от внутриклеточных физико-химических условий, включая ионную силу и значения pH [615]. Ргх могут образовывать димеры, декамеры и додекамеры [611]. Показано, что высокомолекулярные олигомеры Ргх не обладают пероксидазной активностью и функционируют, как шапероны [616].

Антиокислительная система клеток – ключевой компонент редокс-метаболизма. В живых организмах в отличие от модельных систем существуют многочисленные взаимосвязи между компонентами антиоксидантной системы. Одни и те же вещества в зависимости от локализации и функциональной активности клетки могут усиливать или уменьшать образование АФК. Например, НАД(Ф)Н – важный компонент антиоксидантной системы клеток – восстанавливает аскорбиновую кислоту, глутатион и тиоредоксин с помощью клеточных редуктаз. Кроме того, НАД(Ф)Н может также вступать в прямые неферментативные реакции с большинством окислителей [617]. С другой стороны, пиридиннуклеотиды, выступая донорами электронов для ферментов НАДФН-оксидаза и НАДН:убихинол оксидоредуктаза, усиливают образование АФК в клетке. В свою очередь, АФК могут повышать внутриклеточное содержание антиоксидантов и антиоксидантных ферментов через редокс-зависимую регуляцию экспрессии последних.

На рис. 3.8. представлена упрощенная схема редокс-метаболизма кислорода с участием компонентов антиокислительной системы. Несопряженное с окислительным фосфорилированием восстановление кислорода происходит за счет электронов, поступающих при катаболизме углеводов. Одноэлектронное восстановление молекулярного кислорода ферментом НАДФН-оксидазой приводит к образованию $O_2^{\cdot -}$, который, в свою очередь, восстанавливается

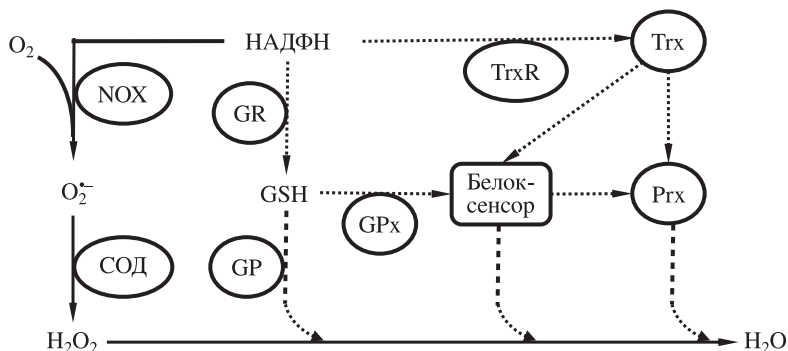


Рис. 3.8. Пути поступления электронов при восстановлении молекулярного кислорода с участием компонентов редокс-сигнальных путей и антиоксидантной системы (пояснения в тексте)

СОД до H_2O_2 . Восстановление пероксида водорода до воды возможно несколькими путями.

Электроны на H_2O_2 поступают от тиолов белковых редокс-сенсоров, компонентов редокс-сигнальных путей, или от НАДФН через тиолзависимые антиоксидантные системы. Окисление тиолов редокс-сенсоров белков может ускоряться с участием пероксиредоксинов. В свою очередь, окисленные тиолы белков восстанавливаются антиоксидантными системами глутаредоксинов и тиоредоксинов, которые функционируют за счет электронов, поступающих от НАДФН. Восстановление НАДФ⁺ осуществляется глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой – ферментом гексомонофосфатного пути метаболизма углеводов. Увеличение содержания глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы является также механизмом усиления антиоксидантной системы. Таким образом, регуляция редокс-процессов – это регуляция потоков электронов, которая осуществляется с участием оксидаз и белков антиоксидантной системы клеток. Изменение экспрессии данных белков приведет к изменению редокс-метаболизма и внутриклеточной сигнализации.

Регуляция антиокислительной защиты клеток. Изменение содержания компонентов антиоксидантной системы клеток индуцируется рядом внутренних и внешних факторов и осуществляется путем активации экспрессии генов белкового компонента АОС. Одним из основных регуляторов экспрессии генов ферментов и белковых факторов, участвующих в антиокислительной защите клеток млекопитающих, является фактор транскрипции Nrf2 (nuclear E2-related factor 2) [618].

Редокс-зависимая сигнальная система Keap1/Nrf2/ARE. Фактор транскрипции Nrf2 играет ключевую роль в поддержании клеточного редокс-гомеостаза при стрессовых воздействиях и рассматривается как потенциальная мишень для терапии широкого спектра заболеваний, в патогенезе которых окислительный стресс играет важную роль [619; 620]. Nrf2 контролирует экспрессию генов, в промоторных областях которых содержится регуляторная последовательность антиоксидант-респонсивного элемента ARE (antioxidant respons(iv)e element) [621]. Среди генов-мишеней Nrf2 для функционирования антиокислительной систем клеток важное значение имеют гены каталазы, глутаматцистеинлигазы, глутатионпероксидазы 2, глутатион-S-трансфераз, глутатионредуктазы, тиоредоксинов, глутаредоксинов, пероксиредоксинов, тиоредоксинредуктазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы [622–624]. Под контролем системы Keap1/Nrf2/ARE находятся также ключевые белки метаболизма глутатиона, увеличение концентрации которого способствует выживанию клеток в стрессовых условиях [625].

В неактивном состоянии фактор транскрипции Nrf2 нековалентно связан со специфическим редокс-зависимым белком Keap1 (Kelch-like

UCH-associating protein 1). В отсутствие активаторов Nrf2 находящийся в комплексе с адаптерным белком Keap1 подвергается ферментативному убиквитинированию лизиновых остатков с последующей деградацией в 26S-протеасомах [626]. Время жизни Nrf2 ($t_{1/2}$) в клетках при нормальных условиях составляет около 20 мин [627].

Ключевую роль в снятии репрессии транскрипционного фактора Nrf2 посредством убиквитинирования играют процессы модификации сульфгидрильных групп остатков цистеина в Keap1. Модификация SH-групп остатков цистеина в Keap1 за счет их окисления или электрофильного присоединения приводит к нарушению убиквитинирования и стабилизации Nrf2, его транспорту в клеточное ядро и связыванию с ARE [628].

У человека полипептид Keap1 содержит 27 цистеинов (4,3 % всех аминокислот), которые могут подвергаться окислительной модификации. Критическими для формирования комплекса Nrf2–Keap1 являются цистеины Cys273 и Cys288, которые могут образовывать межмолекулярную дисульфидную связь в гомодимере Keap1 [629]. Еще одним необходимым остатком для нормального функционирования сигнальной системы Nrf2/Keap1/ARE является Cys151 в домене BTV (Broad-complex, Tramtrack, Bric-a-brac) репрессорного белка. В условиях окислительного стресса и при действии электрофилов к этому остатку ковалентно присоединяется множество различных низкомолекулярных соединений, образующих устойчивые к действию восстановителей модификации Keap1, что нарушает взаимодействие с Cul3-E3-лигазой [630]. Последовательности из 6–9 аминокислот, включающие Cys151, Cys273 и Cys288, идентичны у мыши, крысы и человека, что свидетельствует об их физиологической важности [618]. Еще одним физиологически значимым сайтом окислительной модификации Keap1 является цистеиновый остаток Cys23, образующий при взаимодействии с окисленным глутатионом внутримолекулярную дисульфидную связь с Cys38, что сопровождается снижением взаимодействия Keap1 и Nrf2 [631]. Неразрывная связь таких молекулярных структур, как Keap1, Nrf2 и ARE, при передаче внутриклеточных сигналов позволяет объединить их в единую редокс-зависимую сигнальную систему Keap1/Nrf2/ARE, главным назначением которой является защита клеток от токсических соединений – окислителей и ксенобиотиков [632]. Нарушения в функционировании данной системы играют важную роль в патогенезе многих хронических заболеваний, включая аутоиммунные, респираторные, сердечно-сосудистые и нейродегенеративные [620; 633]. Поиск эффективных регуляторов системы Keap1/Nrf2/ARE относится к актуальным задачам современной фармакологии [634; 635].

Большинство известных индукторов системы Keap1/Nrf2/ARE содержат электрофильные группы (прямые активаторы) или после метаболиче-

ских превращений становятся электрофилами (метаболические активаторы). К прямым активаторам относятся такие группы соединений, как акцепторы Михаэля, изотиоцианаты, геминальные дитиолы, сероорганические и селенсодержащие соединения, электрофилы с уходящей группой, соединения трехвалентного мышьяка, атомы тяжелых металлов, гидропероксиды и нитрозирующие агенты [632; 636]. Активация Nrf2 осуществляется также при действии многих природных (эллаговая кислота, флавоноиды, полифенолы зеленого чая) и синтетических (*трет*-бутилгидрохинон, бутилгидроксанизол, пробукол) фенольных антиоксидантов. Непрямое защитное действие фенольных антиоксидантов при окислительном стрессе, реализующееся с участием системы Keap1/Nrf2/ARE, наблюдается при более низких концентрациях соединений, чем те, которые необходимы для эффективного перехвата свободных радикалов в биологической среде [637]. Предполагается, что активация экспрессии ARE-регулируемых генов происходит в результате двухэлектронного окисления-восстановления, в котором могут участвовать полифенолы со взаимным *орто*- и *пара*-, но не *мета*-расположением гидроксильных групп [638]. Именно благодаря тому, что большинство индукторов ARE относится к группе фенольных антиоксидантов, последний получил название «антиоксидант-респонсивный элемент».

Следует отметить, что уровень повышения активности антиоксидантной системы клетки ограничен наличием отрицательной обратной связи в системе Keap1/Nrf2/ARE. Показано, что Nrf2 наряду с регуляцией компонентов антиоксидантной системы также усиливает продукцию АФК, опосредованную митохондриями и НАДФН-оксидазой [639]. При превышении определенного порога активации Nrf2 запускается экспрессия генов, продукты которых способствуют развитию окислительного стресса. При высокой транскрипционной активности Nrf2 повышается содержание фактора транскрипции Klf9 [640]. Klf9 принадлежит к семейству Kruppel-подобных факторов транскрипции (KLF) и играет важную роль в онкогенезе, дифференцировке и гибели клеток [640; 641]. Взаимодействие Klf9 с сайтами связывания ДНК изменяет экспрессию ряда белков, участвующих в регуляции метаболизма АФК [640]. Вместе с тем фактор транскрипции Klf9 подавляет экспрессию антиоксидантных генов, включая ген пероксиредоксина 6 (PRDX6). Низкая активность Prx6 в митохондриях приводит к смещению редокс-баланса в пользу окислителей и к последующей АФК-индуцированной гибели клеток. Передача сигнала через Nrf2/Klf9/Prx6 путь рассматривается как молекулярный механизм переключения от редокс-регуляции к сверхпродукции АФК и гибели клеток [642; 643]. С использованием эпителиальных клеток хрусталика в качестве модельной системы было показано, что сульфорафан, один из самых «сильных» природных индукторов

транскрипционной активности Nrf2, в низких микромолярных концентрациях (3–6 мкМ) стимулировал рост клеток и обеспечивал цитопротекцию при действии пероксида водорода и ультрафиолетовом облучении за счет усиления активности Nrf2, а в концентрациях выше 10 мкМ вызывал гибель клеток [643; 644]. В условиях действия более высокой дозы сульфорафана избыточное количество Nrf2 приводило к активации программы клеточной гибели через активацию Klf9 и последующему увеличению продукции АФК. Ингибирование Klf9 уменьшало продукцию АФК и способствовало выживанию клеток [643]. Таким образом, фактор транскрипции Nrf2 является важным регулятором редокс-гомеостаза клеток, способным усиливать как восстановительные, так и окислительные процессы в клетках.

Экспрессия некоторых антиоксидантных ферментов может также повышаться с участием других факторов транскрипции. Например, активация транскрипционного фактора FoxO (forkhead box, class O) (чаще всего через фосфорилирование киназой Akt) увеличивает экспрессию ряда антиоксидантных ферментов митохондрий (СОД2, Prx3 и Prx5) и пероксисом (каталаза) [645]. Активация HIF (hypoxia-inducible factor) увеличивает синтез глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, регулирующей образование низкомолекулярного компонента антиоксидантной системы НАДФН [646]. Однако наиболее комплексная перестройка антиоксидантной системы клеток осуществляется при активации Nrf2. Многочисленные исследования последних лет свидетельствуют о ключевой роли системы Keap1/Nrf2/ARE в сохранении здоровья [647]. Фактор транскрипции Nrf2 рассматривается как потенциальная мишень для терапии широкого спектра заболеваний, в патогенезе которых окислительный стресс играет важную роль [619; 633]. Ключевым вопросом регуляции системы является вопрос о детектировании и преобразовании системой различных внутриклеточных окислительных и электрофильных стимулов.

3.3. Редокс-регуляция и редокс-сигнализация в клетках

С начала 1990-х годов стали появляться обзоры экспериментальных работ, посвященных изучению сигнальной роли АФК (см., напр.: [648–653]). В них приводятся многочисленные данные об участии АФК в регуляции общих и специализированных клеточных функций, таких как пролиферация, рост, экспрессия генов, иммунный ответ, синаптическая пластичность, а также контроль метаболизма и гибели клеток. Поскольку АФК участвуют в регуляции практически всех метаболических процессов, включая регуляцию экспрессии генов, их стали относить по аналогии с внутриклеточными

сигнальными молекулами и частицами, выполняющими информационные функции (цАМФ, Ca^{2+} и др.), к категории вторичных мессенджеров.

Трансдукция сигнала в животных и растительных клетках основана на общих принципах. Ключевую роль в процессах приема, обработки и передачи информации играют биологические мембраны [255]. Передача сигналов между клетками осуществляется с помощью первичных мессенджеров (посредников). В качестве первичных мессенджеров выступают различные химические соединения (факторы роста, гормоны, нейротрансмиттеры и др.) и физические факторы (свет, электрическое поле и др.). Рецепция первичной информации осуществляется в основном специфическими белками-рецепторами, активация которых приводит к образованию в клетке вторичных мессенджеров, таких как циклические нуклеотиды, диацилглицерол, инозитол-1,4,5-трифосфат и др., которые обеспечивают дальнейшую передачу сигнала внутри клетки на эффекторы и усиление сигнала путем включения ферментативных каскадов [255; 654].

Вторичные мессенджеры участвуют в передаче информации от плазматической мембраны клеток к внутриклеточным мишеням и обладают двумя основными свойствами: во-первых, имеют относительно небольшую по сравнению с биополимерами молекулярную массу; во-вторых, после образования вторичный мессенджер быстро (при сопоставлении со временем передачи сигнала) расщепляется, а в случае Ca^{2+} откачивается [655]. Поскольку группа вторичных мессенджеров (в отличие от первичных) немногочисленна, кодирование специфической информации осуществляется на основе регуляции их внутриклеточной концентрации. Различия в амплитуде, кинетике и пространственной организации участников внутриклеточной трансдукции сигналов играют важную роль в реализации биологических ответов [471; 656].

Передача сигнала с участием АФК существенно отличается от передачи сигнала с участием вторичных мессенджеров. Во-первых, у всех классических мессенджеров существуют белковые мишени, имеющие специфические центры связывания, при взаимодействии с которыми мессенджеры и осуществляют свое регуляторное действие за счет изменения конформации белков-мишеней. Во-вторых, скорости образования и утилизации молекулярных мессенджеров гораздо ниже, чем скорости образования и утилизации АФК, что обеспечивает надежное взаимодействие лиганда (мессенджера) с активным центром мишени.

В настоящее время на смену концепции, в которой АФК рассматривались как вторичные мессенджеры, приходит концепция «редокс-регуляции», в которой совокупность эффектов АФК рассматривается как определенный «редокс-сигнал» [657–659]. При этом основным нерешенным вопросом остается то, как редокс-сигнал рецептируется и передается внутри клетки [660].

В рамках концепции редокс-регуляции выдвинуто две модели для объяснения регуляторного действия АФК: 1) согласно одной из них АФК непосредственно модифицируют белки, окисляя их; 2) согласно другой – изменение внутриклеточной концентрации АФК вызывает изменение редокс-состояния внутриклеточной среды, что сопровождается изменением состояния белков.

В рамках первой модели предполагается наличие специальных редокс-сенсоров, которые избирательно активируются при определенном редокс-сигнале. Сторонники этой модели основываются на экспериментальных данных о том, что лишь небольшая часть белковых тиолов окисляется при различных стрессовых воздействиях, при этом различные наборы белков окисляются при различных типах стрессов [661; 662]. Однако в рамках данного подхода остается не ясным механизм избирательности действия редокс-сигнала и способ оценки вклада различных компонентов группы АФК в соответствующий редокс-сигнал.

В качестве одного из критериев отбора сенсорных мишеней предлагается использовать «длину свободного пробега» окислителя и доступность мишени для окислителя [660]. Длина свободного пробега или расстояние, которое пройдет окислитель до взаимодействия с субстратом, определяется концентрацией всех субстратов ($[S]$) и константой скорости реакции с этими субстратами (k) на основе выражения [663]:

$$\ln\left(\frac{C}{C_0}\right) = l \left(\frac{\sum_{i=1}^n k_i [S_i]}{D} \right)^{1/2}, \quad (3.1)$$

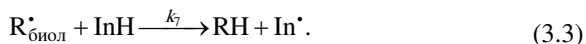
где l – расстояние, на котором концентрация окислителя C_0 уменьшается до величины C ; D – коэффициент диффузии окислителя. Так, в среде, содержащей 2 мМ GSH, расстояние, на котором концентрация окислителя уменьшается в 10 раз, для H_2O_2 составляет 1600 мкм, для $ONOO^-$ – 60 мкм, для $HOCl$ – 0,3 мкм, а для $HO^\bullet$ – 0,02 мкм.

В растворах, содержащих один восстановитель, для окислителей не существует альтернативы для единственного субстрата. В биологических системах для АФК существует множество мишеней для окисления. Предполагается, что дополнительным критерием избирательности мишени к окислителю может выступать количественный параметр (r_1), учитывающий конкуренцию между субстратами и определяющийся на основе выражения [660]:

$$r_1 = \frac{k_1 [S_1]}{\sum_{i=2}^n k_i [S_i]}, \quad (3.2)$$

где k_i – константа скорости реакции второго порядка между окислителем и i -м субстратом; $[S]$ – концентрация i -го субстрата. В рамках данного подхода низкая концентрация для мишени является ограничением избирательности, даже если константа скорости реакции достаточно высокая.

Биологическая активность антиоксидантов также определяется их физико-химическими характеристиками. Например, показано, что биологическая активность антиоксидантов зависит от антирадикальной активности (k_7), которая определяется как константа обменной реакции радикалов ($R^\bullet$) и свободнорадикальных ингибиторов (InH) [664]:



Установлена следующая закономерность: вводимые в организм антиоксиданты должны обладать такой антирадикальной активностью k_7 , чтобы произведение $k_7[S]$ для вводимого экзогенного ингибитора было сравнимо с величиной $k_7[S]$ для природного, эндогенного ингибитора ($[S]$ – концентрация антиоксиданта) [665]. Если произведение $k_7[S]$ для экзогенного антиоксиданта ниже величины $k_7[S]$ для эндогенного, то в свободнорадикальных реакциях, протекающих в условиях *in vitro* и *in vivo*, в первую очередь расходуется собственный, а не вводимый антиоксидант. Однако механизм избирательности мишени с использованием ее константы скорости реакции с окислителем и внутриклеточной концентрации до сих пор не обоснован.

Несмотря на то что *in vitro* супероксид окисляет редокс-чувствительный железосодержащий центр белка SoxR *E. coli* [2Fe-2S], ответственный за его промотарную активность, концентрация супероксидного анион-радикала *in vivo* никогда не достигает таких уровней, при которых эта реакция может осуществляться [666]. Теоретические оценки, выполненные для ключевых участников редокс-регуляции – тирозинфосфатаз, показывают, что для инактивации фермента необходимо использовать пероксид водорода в миллимолярных концентрациях [660; 667]. В кинетической модели тирозинфосфатазы не способны конкурировать в качестве мишени с глутатионом, который, согласно вышеуказанным критериям, будет выступать главной мишенью для окислителей. При этом механизм передачи информации от глутатиона к белкам не обоснован.

Экспериментально показано, что *in vivo* тирозинфосфатазы инактивируются АФК, образующимися после активации рецепторов факторами роста [668; 669]. По теоретическим оценкам, внутриклеточная концентрация пероксида водорода, образующегося в процессах трансдукции сигнала, не превышает 10^{-6} М [661]. Таким образом, окисление тирозинфосфатаз пероксидом водорода, образующимся при стимуляции клеток факторами роста, является маловероятным.

The diagram illustrates the glutathione redox cycle. At the top, a protein (R) is shown in its oxidized state (RSSR) and reduced state (RSH). The reduced protein (RSH) is oxidized to RSSR, releasing electrons. These electrons are used by glutathione reductase (GR) to reduce oxidized glutathione (RSSG) back to reduced glutathione (GSH). The reduced glutathione (GSH) then reduces the oxidized protein (RSSR) back to its reduced state (RSH), becoming oxidized glutathione (RSSG) in the process. The diagram also shows the formation of reactive oxygen species (O₂^{•-}, H₂O₂) and the role of catalase (CAT) in breaking down H₂O₂ into H₂O and O₂. The glutathione cycle is coupled with the reduction of the protein, and the overall reaction is: RSSR + GSH + NADPH + H⁺ → RSH + RSSG + NADP⁺ + H₂O.

108

Непосредственным окислением молекулярных компонентов клетки АФК можно объяснить их токсическое действие, но этого недостаточно для понимания причин, из-за которых АФК выступают весьма специфичными модуляторами столь широкого спектра нормальных регуляторных биологических процессов. Одним из новых подходов объяснения регуляторных функций АФК является «энергетический механизм», учитывающий энергетические особенности реакций с участием АФК [671].

АФК и, в частности, свободные радикалы могут участвовать в двух принципиально разных классах реакций. К первому классу относятся реакции свободных радикалов с молекулами, когда неспаренный электрон переносится с одного его носителя на другой, который сам становится свободным радикалом, а также реакции рекомбинации неспецифичных радикалов, при которых энергия электронов может легко диссипировать в тепловую. Эти реакции малоспецифичны, и, по-видимому, вносят основной вклад в токсическое действие АФК. Ко второму классу относятся реакции, при которых высвобождаются порции энергии, эквивалентные энергиям квантов электромагнитного излучения от УФ- до ближнего ИК-диапазона, что соответствует электронно-возбужденному состоянию частиц. Известно, что при протекании многих реакций с участием свободных радикалов и других АФК высвобождаются кванты энергии, достаточные для генерации электронно-возбужденных состояний [672]. Под термином «энергетический механизм» авторы подразумевают, что энергия в форме электронного возбуждения, генерируемая во втором классе реакций с участием АФК, может быть функционально важна для процессов жизнедеятельности – и как энергия активации биохимических реакций, и как специфичный сигнал.

Специфичность биологического действия АФК определяется структурой процессов, в которых они участвуют [673; 674]. Под «структурой процессов» В. Л. Воейков понимает частотно-амплитудные характеристики и степень фазовой согласованности процессов генерации и релаксации электронно-возбужденных состояний, сопровождающих реакции взаимодействия АФК друг с другом или с другими молекулами. Порождаемые «электромагнитные импульсы» могут активировать специфические молекулярные акцепторы, и структура процессов генерации электронно-возбужденных состояний определяет ритмы биохимических, а на более высоком уровне структурной и функциональной организации и физиологических процессов. В зависимости от частоты рождения и гибели АФК структура процессов генерации электронно-возбужденных состояний должна меняться, а значит, будет меняться и набор акцепторов этой энергии, поскольку различные акцепторы – низкомолекулярные биорегуляторы, белки, нуклеиновые кислоты – могут поглощать лишь кванты энергии с определенной частотой. Однако способов

количественного описания и измерения частотно-амплитудных характеристик процессов генерации электронно-возбужденных состояний авторами данного подхода не предлагается. Также остается открытым вопрос о том, какие свойства АФК будут определять характерную «структуру процесса».

При описании механизмов действия редокс-активных соединений важны не столько их пространственная структура или химический состав молекул, сколько их физико-химические свойства. Показано, что даже в искусственных системах (развитие amino-карбонильной реакции в водных растворах или реакции Майяра) колебания люминесценции строго коррелируют с колебаниями окислительно-восстановительного потенциала [675]. Однако прямое определение окислительно-восстановительного потенциала в клетках с помощью электродов представляет собой достаточно сложную техническую задачу, не решенную до сих пор (см. разд. 4.1).

Для объяснения регуляторного действия АФК предлагается рассматривать внутриклеточное редокс-состояние как своего рода преобразователь («трансдюсер»), регулирующий передачу сигналов на различные внутриклеточные эффекторы [658; 676–678]. Сенсорные системы внутри клеток чувствительны к изменениям параметров внутриклеточного редокс-состояния и с помощью белков-посредников формируют функциональный клеточный ответ. Ключевым вопросом данного подхода является выбор адекватного способа физико-химического описания редокс-состояния (см. разд. 4.2).

Несмотря на то что в настоящее время механизмы регуляции специфических клеточных ответов АФК не ясны, предполагается, что концентрация, локализация и активность внутриклеточных антиоксидантов – это факторы, играющие важную роль в реализации биологических эффектов АФК [679].

АФК и антиоксиданты следует рассматривать как группу функционально связанных редокс-активных соединений [680]. Основными отличительным свойством этих биорегуляторных соединений является широкий спектр клеточных ответов и отсутствие специфических молекулярных мишеней внутри клетки [678; 681]. Несмотря на различия в строении и химической активности данная группа соединений обладает общим свойством, которым является их способность участвовать в транспорте электронов в клетке.

Многочисленные данные, полученные к настоящему времени, позволили доказать участие АФК и антиоксидантов в процессах трансдукции сигналов в клетках и привели к формированию концепции «редокс-сигнализации». Концепция «редокс-сигнализации» объединяет внутриклеточные процессы трансдукции сигнала, в которых интегративным элементом выступает серия электрон-транспортных реакций с участием редокс-активных соединений (включая АФК и антиоксиданты) [682; 683].

В отличие от вторичных мессенджеров редокс-активные соединения функционируют как мессенджеры, переносящие электроны, или редокс-мессенджеры [683; 684]. Биологический эффект действия редокс-активных соединений определяется не конкретной молекулой, а группой взаимодействующих участников, образующих электрон-транспортные цепи (рис. 3.10). Состояние взаимодействующих редокс-активных соединений, при котором их концентрации не меняются со временем, определяет стационарное редокс-состояние клетки (см. разд. 4.1). Таким образом, передача сигнала с участием редокс-мессенджеров регулируется также редокс-состоянием клетки. То есть образующиеся в редокс-сигнальных путях мессенджеры будут взаимодействовать не только с белком-мишенью, но и между собой.

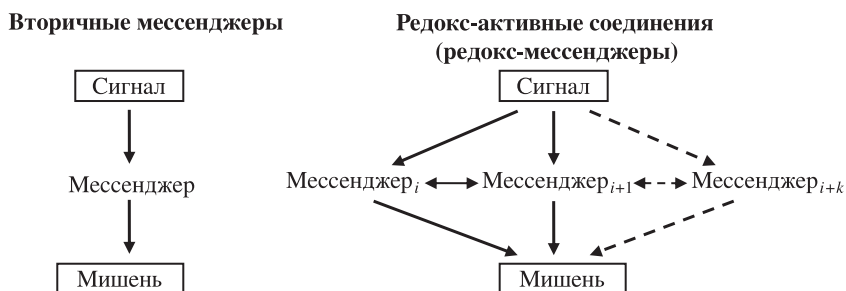


Рис. 3.10. Механизмы сигнализации с участием вторичных мессенджеров и редокс-активных соединений ($i, k = 0, 1, \dots, n$)

Молекулярные участники различных путей трансдукции сигнала, как правило, выполняют сходные функции. Путь трансдукции внешнего сигнала включает «рецептор», «трансдюсер», «усилитель», «клеточный мессенджер», «белок-эффектор» и «белок-мишень». В некоторых механизмах передачи сигнала функции рецептора, трансдюсера и усилителя выполняются одним белком. Трансдукция сигнала с участием редокс-активных соединений является особой системой передачи информации внутри клетки, существенно отличающейся от других. Рассмотрим более подробно этапы передачи информации в аденилатциклазной системе и НАДФН-оксидазной системе (рис. 3.11) [82]. Передача сигнала до уровня клеточных мессенджеров в обеих системах осуществляется сходным образом.

Первичный мессенджер взаимодействует с соответствующим рецептором, что приводит к изменению конформации белка. Это повышает вероятность взаимодействия активированного рецептора с преобразователем сигнала, роль которого в аденилатциклазном пути передачи информации выполняют G-белки. G-белки – это семейство гетеротримерных белков, обладающих ГТФазной активностью [685]. G-белки являются своеобразными

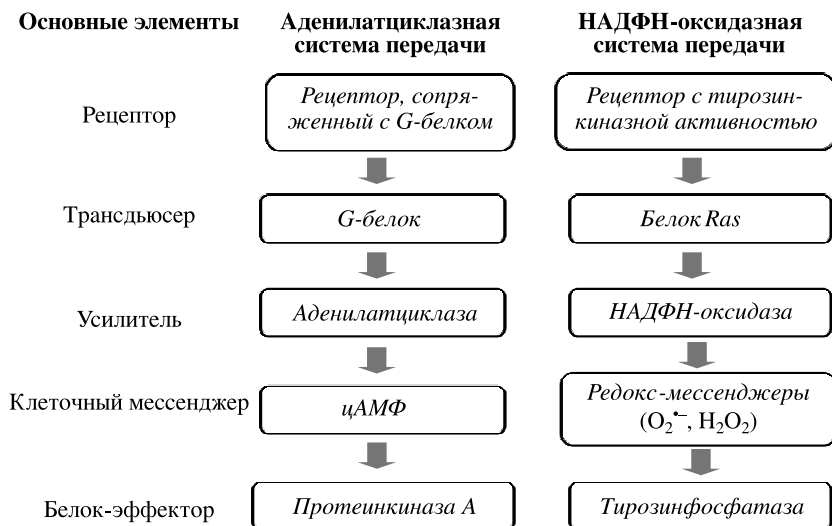


Рис. 3.11. Основные элементы аденилатциклазной и НАДФН-оксидазной систем трансдукции сигнала

«переключателями» в процессе передачи сигнала в клетку. Функционирование этих переключателей основывается на циклических переходах между связыванием и гидролизом ГТФ, что переводит их из активного в неактивное состояние и обратно. Активированный в результате взаимодействия с рецептором G-белок передает сигнал на специальный фермент-усилитель. В аденилатциклазном пути усиление сигнала осуществляется с помощью фермента аденилатциклазы, который катализирует образование цАМФ из АТФ. Взаимодействие G-белка с ферментом – усилителем сигнала приводит к изменению свойств фермента и, соответственно, к изменению его активности. В результате активации аденилатциклазы увеличивается концентрация вторичного мессенджера цАМФ, белком-эффектором которого является протеинкиназа А. Активация протеинкиназы А осуществляет дальнейшую передачу сигналов через ферментативные каскады.

Молекулярным механизмом, регулирующим функционирование белков при передаче сигналов в ферментативных каскадах, является фосфорилирование белков. Селективное введение фосфатных групп в сериновые, треониновые и тирозиновые остатки белковых молекул, осуществляемое протеинкиназами, существенно изменяет заряд и конформацию макромолекулы, приводя к изменениям ферментативной активности белков и метаболизма клетки в целом. Субстратами протеинкиназ служат разнообразные ферменты, ионные каналы, сократительные белки, факторы транскрипции и другие типы

белков. В результате фосфорилирования факторов транскрипции изменяется экспрессия различных генов, и тогда внешний информационный сигнал реализуется в изменении набора белков, которые синтезирует данная клетка.

В передаче сигнала от тирозинкиназных рецепторов на фермент-усилитель – НАДФН-оксидазу – участвует белок Ras, обладающий так же, как и G-белки, ГТФазной активностью. Активированная НАДФН-оксидаза катализирует перенос электронов от НАДФН к кислороду с образованием супероксидного анион-радикала. Образующийся в результате супероксидной дисмутации пероксид водорода приводит к инактивации тирозинфосфатаз. Следует отметить, что инактивация тирозинфосфатазы может осуществляться и другими АФК, т. е. белок-эффектор не проявляет специфичности в отношении различных окислителей. Поэтому важным элементом для регуляции активности белков-мишеней при редокс-сигналикации является их клеточная колокализация с ферментом-услителем (см. разд. 4.5).

Молекулярным механизмом регуляции функционирования белков в редокс-сигнальных каскадах является неферментативное окисление депротонированных тиоловых групп цистеиновых остатков в молекулах белков-мишеней, приводящее к изменению их каталитических или сигнальных функций. Данный механизм не является специфическим для ряда редокс-активных соединений и запускается как эндогенными, так и экзогенными акцепторами электронов. Так, рианодинсвязывающие Ca^{2+} -каналы внутриклеточных Ca^{2+} -депо, которые рассматриваются как универсальные редокс-сенсоры клеток [686], активируются путем образования внутримолекулярных дисульфидов в результате взаимодействия с различными типами АФК, включая H_2O_2 [687], O_2^- [688], HOCl [689], $^{\bullet}\text{NO}$ [690] и ONOOH [691]. Таким образом, если в аденилатциклясной системе регуляция клеточного функционирования осуществляется путем присоединения/отсоединения фосфатных групп, то при передаче редокс-сигнала – путем переноса электронов между белком-мишенью и мессенджером. Регуляцию функционирования внутриклеточных мишеней путем изменения их редокс-состояния в результате межмолекулярного переноса электронов называют редокс-регуляцией [82]. Редокс-регуляция – это тип физико-химической регуляции, который может осуществляться не только с участием окислителей и восстановителей, но и при действии различных модуляторов (химических, физических) активности систем, генерирующих и утилизирующих АФК [683]. Следует также отметить, что редокс-регуляция клеточной активности может осуществляться не только при непосредственном действии на клетки окислителей либо восстановителей, но также и при действии молекул, модифицированных окислителями. Важно отметить различия понятий «редокс-сигналикация» и «редокс-регуляция». Обобщенная схема, иллюстрирующая процессы редокс-сигналикации и редокс-регуляции в клетке, показана на рис. 3.12.

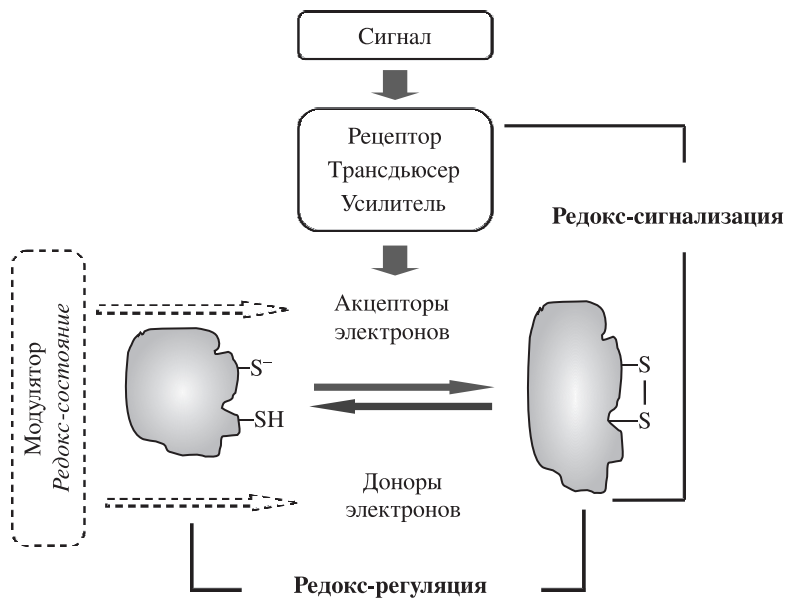


Рис. 3.12. Процессы редокс-сигнализации и редокс-регуляции в клетке

В процессах редокс-сигнализации с участием редокс-мессенджеров осуществляется передача информации между внутриклеточными компонентами. В процессах редокс-регуляции осуществляется модулирование функционирования белков путем изменения окислительно-восстановительного состояния тиоловых групп, т. е. в процессах редокс-регуляции происходит взаимодействие редокс-мессенджеров и белков. Редокс-регуляция белков может осуществляться как в результате локального изменения редокс-состояния (что имеет место при редокс-сигнальных процессах), так и в результате изменения редокс-состояния клетки в целом (что имеет место при изменении редокс-гомеостаза). Таким образом, важным элементом нормального функционирования редокс-сигнальных процессов является поддержание определенного редокс-гомеостаза (см. разд. 4.1).

Все существующее есть проявление соотношения различных видов энергий, которое может быть описано в рамках законов и формул термодинамики.

Вильгельм Оствальд

Глава 4

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ РЕГУЛЯЦИИ РЕДОКС-ПРОЦЕССОВ В КЛЕТКЕ

4.1. Редокс-гомеостаз, редокс-состояние и их количественная характеристика

Функционирование живой системы основывается на поддержании характерного для данной системы постоянства ряда внутренних параметров, или гомеостаза. Термин «гомеостаз» используется для характеристики способности организма в процессе взаимодействия с внешней средой сохранять значения функционально значимых параметров внутренней среды в заданных пределах. У млекопитающих и птиц гомеостаз включает поддержание постоянства концентрации протонов (рН) и состава крови, осмотического давления, температуры тела, кровяного давления и многих других функций.

Благодаря адаптационным механизмам физические и химические параметры, определяющие жизнедеятельность организма, меняются в сравнительно узких пределах даже при значительных изменениях внешних условий. Поддержание определенных параметров гомеостаза является результатом сложных регуляторных взаимоотношений, осуществляемых как в целостном организме, так и на органном и клеточном уровнях. Среди основных составляющих клеточного гомеостаза в настоящее время выделяют мембранный потенциал покоя, ионный гомеостаз, объемный гомеостаз и рН-гомеостаз [692]. Установлены молекулярные механизмы регуляции этих составляющих и определены диапазоны их значений, поддержание которых необходимо для нормального функционирования клеток. В последнее время в научной литературе обсуждается также роль в жизнедеятельности клетки редокс-гомеостаза, характеризующего определенный баланс между процессами окисления и восстановления [693–695].

Поддержание редокс-гомеостаза является основой нормальной жизнедеятельности клеток и осуществляется в результате сопряженного функционирования систем генерации АФК и антиокислительной защиты, а также систем трансмембранного транспорта редокс-активных соединений [695]. Сопряженное функционирование систем реализуется через взаимодействия между молекулярными компонентами регуляции гомеостаза.

Система регуляции редокс-гомеостаза включает различные белки и низкомолекулярные редокс-активные соединения [695; 696]. Изменение активности макромолекулярных структур, к которым относятся белки, регулирующие образование, утилизацию и трансмембранный транспорт молекул, вызывает изменение концентрации низкомолекулярных редокс-активных соединений.

Регуляция гомеостаза (клеточного или организменного) осуществляется путем обратной связи (отрицательной или положительной). В результате положительной обратной связи происходит адаптация организма к стрессовым факторам и формирование нового редокс-состояния [696]. Сохранение устойчивого стационарного состояния осуществляется с помощью отрицательной обратной связи (рис. 4.1). Стационарное редокс-состояние, или баланс между окислительными и восстановительными процессами, выражается постоянством концентраций редокс-активных соединений в клетке. Поэтому обратная связь должна осуществляться через изменение состояния редокс-активных соединений (их концентраций).

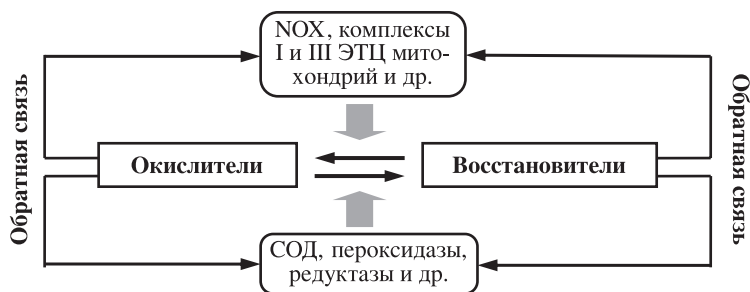


Рис. 4.1. Регуляция редокс-гомеостаза

Поскольку группа редокс-активных молекул включает в себя различные типы соединений, возникает вопрос о том, какие из них могут обеспечивать обратную связь. Регулируется ли активность макромолекулярных участников каким-то одним типом редокс-активных молекул или группой молекул, не является принципиальным, поскольку редокс-активные соединения связаны между собой: изменение концентрации одного соединения вызовет изменение концентраций других соединений. Допустим, активность макромолекул регулируется концентрацией пероксида водорода. В свою очередь, концен-

трация пероксида водорода зависит от концентрации других редокс-активных соединений. Таким образом, получается, что активность макромолекул зависит от состояния группы взаимодействующих между собой соединений. В случае редокс-гомеостаза физико-химический параметр, количественно характеризующий состояние группы взаимодействующих редокс-активных молекул, и будет выполнять роль гомеостатируемого параметра. Поиск и обоснование универсальных физико-химических параметров клеточного редокс-гомеостаза является актуальной задачей современной клеточной биофизики. Мониторинг изменений редокс-гомеостаза при откликах клетки осуществляют путем измерения концентраций отдельных редокс-активных соединений. Для количественной характеристики окислительно-восстановительного равновесия в тканях используется электродный редокс-потенциал.

Электродный редокс-потенциал в тканях. Электродный редокс-потенциал определяется величиной электродвижущей силы, выраженной в вольтах, между потенциалом измерительного электрода, погруженного в данную среду, и потенциалом водородного электрода.

Для определения величины редокс-потенциала в тканях с помощью электрометрического метода чаще всего используют платиновые электроды, а также электроды из золота и палладия [697]. В зависимости от окислительно-восстановительных свойств изучаемой среды электрод может выступать в роли донора или акцептора электронов. Редокс-потенциалы внутренних сред организма человека, измеренные с помощью платинового электрода относительно хлорсеребряного электрода сравнения, в норме всегда меньше нуля, т. е. имеют отрицательные значения, которые обычно находятся в пределах от -100 до -200 мВ [698; 699].

Электродный редокс-потенциал формируется в чрезвычайно сложном по химическому строению биосубстрате, и его величина зависит от баланса многих факторов, среди которых парциальное давление кислорода, концентрации окисленных и восстановленных форм органических соединений в среде, концентрация ионов водорода (рН), концентрация электролитов, активность ферментов (оксидаз, определяющих высокие значения потенциала, и дегидрогеназ, снижающих потенциал). По определению Г. В. Сумарукова, в тканевых жидкостях существует стационарный редокс-потенциал, который отражает соотношение суммарных концентраций окисленных и восстановленных форм и служит мерой тенденции системы становиться окисленной или восстановленной [700]. В. И. Прилуцкий и В. М. Бахир считают, что значение редокс-потенциала в тканях организма в биологических жидких средах отражает суммарное соотношение электронодонорных или электроноакцепторных свойств биологических сред относительно их собственных эндогенных компонент и веществ экзогенного происхождения [699].

Накоплено достаточно много данных, указывающих на то, что изменение окислительно-восстановительного состояния в тканях (индикатором которых является величина электродного редокс-потенциала) действительно является общим признаком, характеризующим разнообразные физиологические процессы [701; 702]. Однако механизмы, лежащие в основе этих явлений, до сих пор полностью не изучены. Все авторы, изучающие редокс-потенциал в живых системах, подчеркивают сложность его интерпретации и отмечают, что причины, обуславливающие установление его величины, далеко не ясны. Так как колебания значений редокс-потенциала во внутренних средах организма, составляющие всего лишь десятки мВ, физиологически существенны, то ряд авторов считают, что измеряемый электродный редокс-потенциал должен занять свое место в ряду актуальных гомеостатических характеристик [703].

Наряду с этим следует отметить, что технические возможности измерения редокс-потенциала в живом организме с помощью электрометрического метода крайне ограничены. При внесении жидких биологических сред в камеру измерительной системы неизбежна модификация редокс-потенциала в результате контакта биологических сред с чужеродными материалами и с атмосферными газами (особенно с кислородом). Измерение редокс-потенциалов тканей осуществляется только инвазивным методом путем введения игольчатых электродов в организм. В результате измерение редокс-потенциала указанным способом всегда производится в зоне раневого дефекта, связанного с внедрением электродов в живой организм, вследствие чего неизбежно искажение биологических показателей. При измерениях потенциала электрода, погруженного в биологическую среду, необходимо учитывать также окислительно-восстановительную активность биологической среды, влияние на потенциал электрода адсорбции растворенного кислорода, клеток крови, белков, ферментов и других природных веществ, способных взаимодействовать с поверхностью электрода [704].

Однако основное ограничение электрометрического метода характеристики редокс-состояния – невозможность измерять редокс-потенциал в клетке. Малые размеры клетки и развитая внутриклеточная компартментализация не позволяют использовать электроды для измерения внутриклеточного редокс-потенциала. Наряду с этим существует множество физико-химических методов анализа, позволяющих проводить мониторинг изменений внутриклеточной концентрации основных окислителей и восстановителей, в том числе пероксида водорода, окиси азота, глутатиона, НАД(Ф)Н и др. [705–708].

Величина отношения концентраций НАД(Ф)⁺/НАД(Ф)Н и регуляция метаболизма. В клетках млекопитающих электроны, высвобождаемые при гидролизе жиров и углеводов, транспортируются в дыхательную цепь митохондрий с помощью НАДН. Окисленная форма динуклеотида НАД⁺ состоит из 5'-АМФ и нуклеотида, содержащего в качестве основа-

ния амид никотиновой кислоты (рис. 4.2). Структурно (но не функционально) похожим коферментом является НАДФ⁺, в котором через 2'-ОН-группу рибозы аденозина присоединен фосфат. Средняя суммарная концентрация НАД⁺ + НАДН в большинстве тканей составляет 10⁻⁵ М, а концентрация НАДФ⁺ + НАДФН составляет 10⁻⁶ М. Несмотря на близкое структурное родство, НАДН и НАДФН осуществляют различные функции в обмене веществ. НАДН переносит электроны из катаболических путей в дыхательную цепь и таким образом участвует в энергетическом обмене. НАДФН, напротив, является основным восстановителем при биосинтезе.

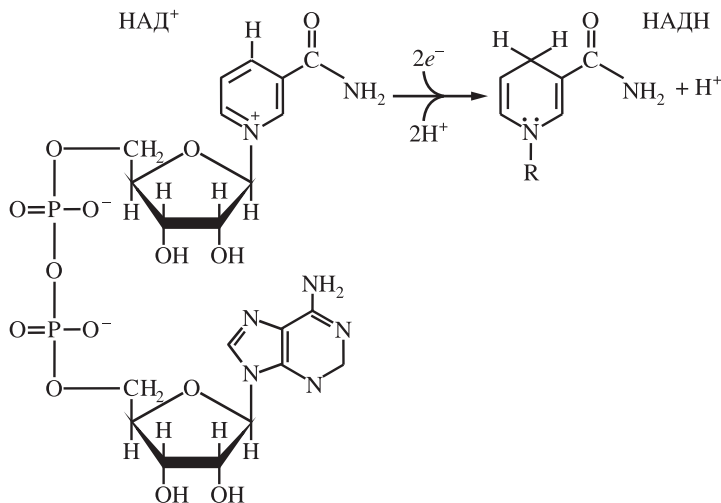


Рис. 4.2. Структура НАД⁺ и НАДН

Процессы катаболизма сопровождаются повышением концентрации восстановленных форм НАДН и НАДФН (рис. 4.3). Например, при гликолизе электроны переносятся на НАД⁺. При β-окислении жирных кислот электроны переносятся на убихинон и НАД⁺, а в гексозомонофосфатном пути – на НАДФ⁺. В растительных клетках восстановление НАДФ⁺ происходит при фотосинтезе.

С другой стороны, НАДН является донором электронов при синтезе глюкозы в процессах глюконеогенеза. НАДФН является донором электронов при синтезе жирных кислот в клетках млекопитающих и при синтезе гексоз в клетках растений. Таким образом, при активации анаболизма внутриклеточные концентрации НАДН и НАДФН понижаются. В табл. 4.1 представлен ряд ферментов основных метаболических путей клеток, активность которых зависит от отношения концентраций НАД⁺ и НАДН в среде.

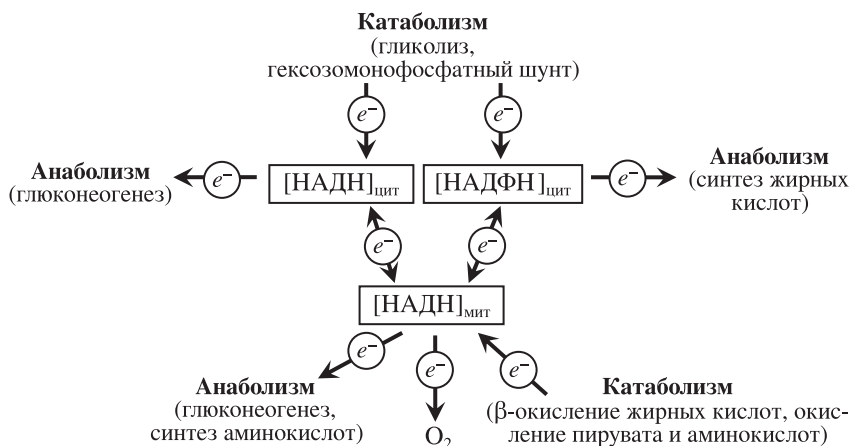


Рис. 4.3. Схема переноса электронов в процессах метаболизма с участием пиридиннуклеотидов:
[НАДН]_{цит}, [НАДФН]_{цит} – концентрации коферментов в цитоплазме;
[НАДН]_{мит} – в митохондриях

Таблица 4.1

**Изменение соотношения концентраций НАДН к НАД⁺
и активность дегидрогеназ в основных метаболических путях**

Название фермента	Метаболический путь	Низкое отношение [НАДН]/[НАД ⁺]	Высокое отношение [НАДН]/[НАД ⁺]
Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа	Аэробный и анаэробный гликолиз	+	–
Лактатдегидрогеназа	Анаэробный гликолиз	–	+
Дигидролипоамиддегидрогеназа	Окисление пирувата в ацетил-СоА	+	–
3-Оксиацил-СоА-дегидрогеназа	β-Окисление жирных кислот	+	–
Изоцитратдегидрогеназа	Цикл лимонной кислоты	+	–
Малатдегидрогеназа	Цикл лимонной кислоты	+	–
Глицерол-3-фосфатдегидрогеназа	Глюконеогенез	–	+
Лактатдегидрогеназа	Глюконеогенез	+	–

Название фермента	Метаболический путь	Низкое отношение [НАДН]/[НАД ⁺]	Высокое отношение [НАДН]/[НАД ⁺]
Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа	Глюконеогенез	–	+
Глутаматдегидрогеназа	Окислительное дезаминирование	+	–
Глутаматдегидрогеназа	Биосинтез аминокислот	–	+

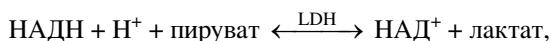
Примечание: «+» – активность повышается, «–» – активность понижается.

Для активного протекания процессов катаболизма в цитоплазме и митохондриальном матриксе клетке необходимо поддерживать высокое отношение концентрации НАД⁺ к концентрации НАДН. Повышение концентрации НАДН при недостатке кислорода приводит к переключению аэробного гликолиза на анаэробный (см. табл. 4.1). При интенсивной мышечной работе повышение внеклеточной концентрации лактата активирует глюконеогенез в клетках печени и клетках почечных канальцев. Показано, что в почках кролика при активации глюконеогенеза наблюдается рост величины отношения внутриклеточных концентраций GSH/GSSG и НАДФН/НАДФ⁺ [709].

Величина отношения концентраций НАДН/НАД⁺ является одним из факторов регуляции цикла лимонной кислоты. Если клетка не расходует АТФ, то в митохондриях наблюдается недостаток АДФ. В отсутствие АДФ энергия протонного градиента на внутренней митохондриальной мембране не используется для синтеза АТФ. Это, в свою очередь, тормозит электронный перенос в дыхательной цепи, вследствие чего НАДН не окисляется до НАД⁺. Образующееся в результате высокое значение величины отношения концентраций НАДН/НАД⁺ вызывает торможение цикла лимонной кислоты и, как следствие, замедление потребления субстрата.

Рядом авторов развивается концепция о том, что величина концентрации цитозольного НАДН является сенсором потока крови [710]. Для оценки внутриклеточного отношения концентраций НАДН/НАД⁺ используется метод метаболических индикаторов [711]. В основе метода лежат два предположения:

1) между отношением концентраций НАДН/НАД⁺ и лактат/пируват в цитозоле существует равновесие, которое поддерживается ферментом лактатдегидрогеназой (LDH) ($k_{LDH} = 1,11 \cdot 10^{-4}$ при pH 7,0):



$$[\text{НАДН}]_{\text{цит}} / [\text{НАД}^+]_{\text{цит}} = [\text{лактат}]_{\text{цит}} / [\text{пируват}]_{\text{цит}} \cdot k_{LDH};$$

2) между цитозольной и внеклеточной концентрациями лактата и пирувата поддерживается равновесие с помощью монокарбоксильных переносчиков [710].

В состоянии покоя величина отношения концентраций НАДН/НАД⁺ в тканях составляет $(10-20) \cdot 10^{-4}$, поэтому изменения величины этого отношения в основном опосредованы изменением концентрации НАДН [712]. Концентрация НАДН в цитозоле увеличивается при росте концентрации лактата в крови и уменьшается при росте концентрации пирувата. Показано, что во многих тканях при увеличении концентрации лактата в крови в результате инъекций увеличивается скорость потока крови [710; 712]. Предполагается, что при увеличении отношения концентраций лактат/пируват увеличивается скорость потока крови в результате изменения отношения цитозольных концентраций НАДН/НАД⁺ [710]. При повышении концентрации НАДН усиливается генерация супероксидного анион-радикала, вызывающего повышение внутриклеточной концентрации несвязанного кальция, и в результате активируется eNOS [713].

Пиридиннуклеотиды НАДН и НАДФН являются важными регуляторами клеточного редокс-состояния. В зависимости от типа ферментов, использующих в качестве коферментов НАДН и НАДФН, с участием этих пиридиннуклеотидов осуществляется образование как окислителей, так и восстановителей (рис. 4.4). Например, НАДФН является донором электронов при генерации НАДФН-оксидазой супероксидного анион-радикала. С другой стороны, перенос электронов от НАДФН к глутатион-дисульфиду, катализируемый глутатионредуктазой, увеличивает концентрацию глутатиона. В свою очередь, НАДН выступает донором электронов для НАДН-оксидазы и НАДН-дегидроаскорбатредуктазы. Таким образом, НАДН и НАДФН являются участниками метаболических процессов, регулирующих редокс-состояние. Следовательно, процессы переноса электронов от НАДН и НАДФН к внутриклеточным глутатиону, витамину С или молекулярному кислороду следует рассматривать как дополнительный (наряду с механизмом энергетического сопряжения) механизм регуляции метаболизма – механизм редокс-сопряжения [678; 695].

Из представленных данных следует, что различные метаболиты могут модифицировать редокс-состояние клетки. Показано, что глюкоза в высоких концентрациях повышает выход АФК в эпителиальных клетках [714]. Наряду с этим глюкоза повышает экспрессию эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) и усиливает процесс генерации оксида азота в клетках [715]. Экспрессия eNOS повышается при действии пероксида водорода, тогда как супероксидный анион-радикал не оказывает влияние на величину экспрессии этого белка [716]. Показано, что в гладкомышечных и эпителиальных клетках образование АФК при повышении концентрации глюкозы и жирных кислот происходит с участием НАДФН-оксидазы [717].

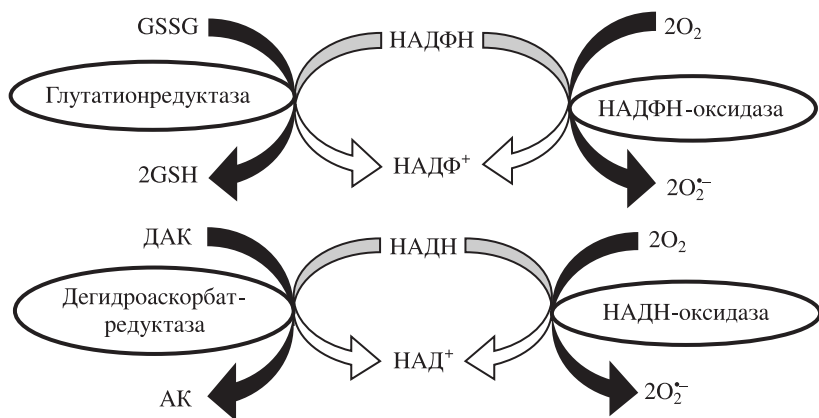


Рис. 4.4. Регуляция редокс-состояния клеток с участием НАДН и НАДФН

Следует также отметить, что редокс-состояние клетки зависит от концентрации молекулярного кислорода. Гипоксия в результате активации фактора транскрипции HIF приводит к изменению экспрессии ряда белков в клетке [718; 719]. Показано, что активация HIF происходит с участием АФК [720; 721]. Таким образом, можно заключить, что клеточное редокс-состояние зависит от концентрации кислорода и от концентрации окисляемых им субстратов в метаболических процессах.

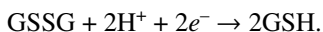
Редокс-потенциал глутатиона в клетках и тканях. Учитывая то обстоятельство, что практически все известные заболевания сопровождаются усилением внутриклеточных процессов окисления и ослаблением активности антиокислительной системы, количественная оценка редокс-состояния с целью ранней диагностики и лечения заболеваний остается весьма актуальной на протяжении многих лет. Ряд исследователей считают, что ведущую роль в функционировании антиокислительной системы играют низкомолекулярные и высокомолекулярные тиоловые соединения [722–726].

Еще в 1936 году Г.Селье отметил снижение уровня глутатиона в крови животных в ответ на введение адренокортикотропного гормона и предложил использовать это явление как тест на стрессовое воздействие. В 60-е годы прошлого века было выполнено большое количество клинических исследований, которые показали, что при самых различных заболеваниях регистрируется один и тот же факт – снижение концентрации восстановленных тиолов в сыворотке крови больных, причем степень снижения концентрации восстановленных тиолов зависела от тяжести заболевания: чем тяжелее клинически выражено заболевание, тем ниже уровень восстановленных SH-групп в сыворотке крови.

Аналогичные по характеру изменения были выявлены при изучении влияния различных факторов на организм животных и человека (холод, эмоциональное напряжение, магнитное поле, физическая нагрузка и др.). В 1979 году В. В. Соколовский выдвинул предположение, что поскольку тиолы существуют в клетке в двух формах – восстановленной и окисленной, они представляют собой единую тиолдисульфидную систему, а тиолдисульфидное соотношение может служить интегральным показателем адаптивных возможностей организма, или показателем его неспецифической резистентности [727].

Многие заболевания, такие как ишемическая болезнь сердца и инфаркт миокарда, бронхиальная астма, хронический гастродуоденит, ангина, дифтерия, инфекционный мононуклеоз, вирусный гепатит, а также неблагоприятные факторы окружающей среды, приводят к синхронному изменению уровня восстановленных и окисленных тиоловых групп в сыворотке крови [728]. Для оценки тиолдисульфидного соотношения требуется определение содержания SH- и SS-групп в белковой и белковой фракциях крови или тканей с дальнейшим расчетом их соотношения. В настоящее время наиболее доступным и чувствительным методом является метод амперометрического титрования [729]. Несмотря на то что тиолдисульфидное соотношение может служить объективным показателем ранних патологических изменений, данный подход не применим к изучению внутриклеточного редокс-состояния.

Количественные изменения внутриклеточного редокс-состояния часто связывают с изменением величины редокс-потенциала глутатиона [730]. Одним из основных методов определения внутриклеточных и внеклеточных концентраций GSH и GSSG является высокоэффективная жидкостная хроматография. С использованием измеренных концентраций GSH и GSSG редокс-потенциал глутатиона определяется на основании уравнения Нернста для реакции



Учитывая, что редокс-потенциал глутатиона при стандартных условиях ($T = 298 \text{ K}$, $\text{pH} = 7$) равен -240 мВ , и переходя к десятичному логарифму, уравнение Нернста для данной реакции можно записать в виде

$$E_{\text{GSSG}/2\text{GSH}} = \left(-240 + \frac{59,1}{2} \lg \frac{[\text{GSSG}]}{[\text{GSH}]^2} \right) \text{ мВ}. \quad (4.1)$$

Различным тканям в организме соответствуют свои значения редокс-потенциала глутатиона. В табл. 4.2 представлены значения редокс-потенциала в тканях мыши. Согласно представленным данным наиболее низкое значение редокс-потенциала глутатиона наблюдается для печени (-229 мВ) и почек (-221 мВ), наиболее высокое – для сердца (-93 мВ) и плазмы крови (-35 мВ).

Можно предположить, что отличия в редокс-состояниях этих тканей связаны с различиями тканевого метаболизма. В организме млекопитающих активный метаболизм углеводов, включая процессы гликолизогенеза, протекает в основном в печени и почках и сопряжен с образованием дополнительных молекул НАД(Ф)Н в цитоплазме клеток. Повышение содержания доноров электронов в результате метаболизма способствует поддержанию более высокого восстановленного состояния в цитоплазме клеток и, следовательно, более высокого значения $E_{GSSG/2GSH}$. Более выраженное окисленное состояние тканей сердца по сравнению с другими тканями, по-видимому, опосредовано высоким аэробным метаболизмом. Энергетические потребности в постоянно работающей сердечной мышце обеспечиваются за счет процессов окислительного фосфорилирования. Поэтому обязательным условием успешной работы сердечной мышцы является достаточное снабжение клеток кислородом.

Таблица 4.2

Редокс-потенциалы глутатиона в тканях мыши

Тип ткани	[GSH], мМ	[GSSG], мМ	$E_{GSSG/2GSH}$, мВ
Печень	7,942	0,149	–229
Почка	5,269	0,091	–221
Поджелудочная железа	1,414	0,059	–162
Легкие	1,528	0,114	150
Селезенка	1,56	0,11	–150
Сердце	0,47	0,086	–93
Эритроциты	0,303	0,04	–90
Плазма	0,075	0,019	–35

Примечание: в таблице использованы данные работы [731]. Концентрации GSH и GSSG в тканях измерены с помощью флуоресцентной пробы *o*-фталальдегида.

В норме в тканях животных содержание GSH составляет примерно 99 % от общей концентрации глутатиона, а при развитии окислительного стресса содержание GSH снижается до 75 % от общей концентрации глутатиона. С учетом этих данных был рассчитан средний клеточный редокс-потенциал пары GSSG/2GSH, который для цитоплазмы клеток изменяется в пределах от –140 до –260 мВ и для митохондрий – от –180 до –290 мВ [732]. Внутренняя среда эндоплазматического ретикулума в сравнении с внутренней средой митохондрий и ядра является более окисленной по отношению к цитозолю. Отношение концентраций восстановленной формы глутатиона к окисленной внутри эндоплазматического ретикулума изменяется в диапазоне от 1 : 1

до 3 : 1 [733]. Согласно уравнению (1.8) редокс-потенциал пары GSSG/2GSH в эндоплазматическом ретикулуме изменяется в диапазоне от –60 до –180 мВ. Редокс-потенциал глутатиона в плазме крови человека значительно отличается от клеточного и равен -137 ± 9 мВ [734].

Следует отметить, что величина $E_{\text{GSSG/2GSH}}$ в тканях с возрастом увеличивается. Чем старше организм, тем выше значение редокс-потенциала глутатиона. Подобная корреляция значений редокс-потенциала глутатиона с возрастом обнаружена в плазме крови людей [735]. В экспериментах, проведенных с группой людей в возрасте от 19 до 85 лет, показано, что редокс-потенциал пары цистеин/цистин (концентрация цистеина почти в 20 раз выше концентрации глутатиона в плазме крови) линейно растет со скоростью 0,2 мВ в год. Величина же редокс-потенциал глутатиона в крови людей увеличивается только после 45 лет. При этом скорость изменения величины $E_{\text{GSSG/2GSH}}$ составляет 0,7 мВ в год.

Обнаружено также, что повышение значений редокс-потенциала глутатиона в цитоплазме клеток наблюдается в течение жизненного цикла при переходе от пролиферации к дифференцировке и апоптозу. В пролиферирующих клетках $E_{\text{GSSG/2GSH}}$ изменяется в диапазоне от –260 до –230 мВ [736]. Показано, что в не дифференцированных клетках линии HT29 значение редокс-потенциала глутатиона составляет примерно –260 мВ [736]. После дифференцировки редокс-потенциал глутатиона изменяется до значения –200 мВ. В результате контактного ингибирования или перехода клеток к стадии дифференцировки пул глутатиона в клетках становится более окисленным (от –220 до –190 мВ) [736]. Обнаружено, что в фибробластах при контактном ингибировании пролиферации редокс-потенциал глутатиона в цитоплазме изменяется на +34 мВ по сравнению с пролиферирующими клетками [737]. В клетках фибросаркомы при увеличении плотности культуры $E_{\text{GSSG/2GSH}}$ не изменяется и не наблюдается контактного ингибирования роста [737]. При апоптозе в клетках активируется транспорт GSH из клетки наружу, что сопровождается дальнейшим снижением $E_{\text{GSSG/2GSH}}$ (до –170 мВ и ниже) [738]. В клетках линии HL60 процессам пролиферации соответствует значение величины редокс-потенциала глутатиона, равное –240 мВ [739]. С переходом к апоптозу в клетках линии HL60 происходит изменение потенциала на +72 мВ (с –239 до –167 мВ), а в клетках линии HT29 – изменение потенциала на +86 мВ.

Следует отметить, что скорость клеточной пролиферации зависит также от внеклеточного $E_{\text{GSSG/2GSH}}$. В исследованиях, проведенных на клетках аденокарциномы человека линии Сасо-2, показано, что максимальная скорость клеточной пролиферации наблюдалась при $E_{\text{GSSG/2GSH}}$ во внеклеточной среде, равном –150 мВ, а минимальная – при $E_{\text{GSSG/2GSH}}$, равном 0 мВ [740]. Обнаружено, что факторы роста IGF-1 и EGF стимулируют пролиферацию

при значениях внеклеточного $E_{\text{GSSG}/2\text{GSH}}$ в диапазоне от 0 до -80 мВ. При $E_{\text{GSSG}/2\text{GSH}} = -150$ мВ факторы роста IGF-1 и EGF не изменяют скорость роста [741]. Агрегация тромбоцитов также регулируется внеклеточным $E_{\text{GSSG}/2\text{GSH}}$. При значениях внеклеточного $E_{\text{GSSG}/2\text{GSH}}$ в диапазоне от -250 до 0 мВ наблюдается снижение WGA-индуцированной агрегации клеток с ростом восстановительного потенциала [586].

Следует отметить, что использование различных подходов для описания изменений редокс-процессов в клетке может приводить к противоречивым выводам относительно величины и направления изменений редокс-состояния клетки. Показано, что величина изменений редокс-потенциалов пар $\text{GSSG}/2\text{GSH}$, $\text{НАДФ}^+/\text{НАДФН}$, $\text{НАД}^+/\text{НАДН}$ в процессах пролиферации и контактного ингибирования значительно различается, что затрудняет использование только одной редокс-пары для описания изменений редокс-состояния [742]. При увеличении скорости пролиферации эпителиальных клеток линии ИЕС-6 наблюдалось смещение значения $E_{\text{GSSG}/2\text{GSH}}$ от -180 до -215 мВ, величина $E_{\text{НАДФ}/\text{НАДФН}}$ при этом изменялась от -340 до -300 мВ [742]. Контактное ингибирование сопровождалось изменением величины $E_{\text{GSSG}/2\text{GSH}}$ от -215 до -170 мВ, величина $E_{\text{НАДФ}/\text{НАДФН}}$ при этом не изменялась, а величина $E_{\text{НАД}/\text{НАДН}}$ увеличивалась от -280 до -310 мВ. Таким образом, количественная характеристика редокс-состояния на основе использования редокс-потенциала только одной редокс-пары недостаточно адекватно отображает окислительно-восстановительный баланс в клетках и его изменение в процессах сигнализации и при окислительном стрессе.

В биологической среде редокс-состояние зависит от взаимодействия многих редокс-пар и не может быть охарактеризовано на основе классического уравнения Нернста. Для установления биофизических механизмов редокс-регуляции клеточных процессов необходима разработка новых способов количественного описания как редокс-состояния клетки, так и процессов трансдукции сигналов с участием редокс-активных молекул (редокс-сигнализации). В новых подходах необходимо учитывать вклад всех участников окислительно-восстановительных процессов.

4.2. Термодинамические параметры редокс-процессов: от «редокс-окружения» к редокс-потенциалу клетки

Задача поиска гомеостатируемого параметра сводится к поиску параметра, описывающего состояние группы взаимодействующих соединений и позволяющего обосновать связь между редокс-состоянием отдельного соединения и редокс-состоянием группы. С точки зрения некоторых авторов, это одна из основных проблем современной редокс-биологии [743].

Для количественной характеристики стационарного состояния группы взаимодействующих (функционально взаимосвязанных) редокс-активных соединений используются различные подходы [744]. В 2001 году для количественного описания набора связанных между собой редокс-пар Ф. Шаффер и Г. Бюттнер предложили использовать термин «редокс-окружение» (redox environment) [677]. Согласно данному определению редокс-окружение является суммой восстановительных потенциалов редокс-пар, обнаруженных в биологических жидкостях, органеллах, клетках или тканях, умноженных на концентрацию восстановленных форм в редокс-парах. В математических терминах «редокс-окружение» представлено выражением

$$\text{редокс-окружение} = \sum_{i=1}^k c_i E_i, \quad (4.2)$$

где c_i – концентрация восстановленной формы редокс-пары; E_i – восстановительный потенциал редокс-пары. Однако единицы результатов расчета в выражении (4.2) не позволяют интерпретировать полученные результаты относительно известных единиц измерения.

При таком определении «редокс-окружение» является расчетной величиной. Ее принципиально нельзя измерить. Если известны концентрации всех участников и их редокс-потенциалы, то данный параметр может быть рассчитан. В экспериментальных исследованиях величину «редокс-окружения» связывают с редокс-потенциалом глутатиона $E_{\text{GSSG}/2\text{GSH}}$, который рассчитывается с помощью уравнения Нернста на основе измеренных концентраций окисленного и восстановленного глутатиона. Считается, что при изменении редокс-состояния глутатиона изменяется редокс-состояние белковых тиолов [677]. При этом предполагается, что белковые тиолы являются нанопереклечателями в процессах трансдукции сигналов с участием глутатиона [677]. Нанопереклечатели могут быть двух типов и характеризуются следующими реакциями:



где PSH – тиол белка; PSSG – смешанный дисульфид белка; PSS – дисульфид белка. При изменении редокс-потенциала глутатиона величина отношения $[\text{PSSH}]/[\text{PSH}]$ для переключателя типа I будет в два раза меньше, чем величина изменения отношения $[\text{PSS}]/[\text{P}(\text{SH})_2]$ для переключателя типа II [677]. Предполагается, что в разных клеточных состояниях активируются различные наборы нанопереклечателей [677]. Передача информации от глутатиона на белковые тиолы в описанном выше механизме возможна при условии, что все тиол/дисульфидные редокс-пары клетки находятся в состоя-

нии термодинамического равновесия [660; 677]. Однако обнаружено, что изменение окислительного состояния белковых тиолов может происходить без изменения редокс-состояния глутатиона [745]. Наряду с этим показано, что внутриклеточные и внеклеточные тиол/дисульфидные редокс-пары CysSS/Cys и GSSG/GSH не находятся в состоянии равновесия друг с другом [743; 746]. Например, в клетках линии HT29 величина редокс-потенциала для редокс-пары GSSH/2GSH ($E_{\text{GSSH/2GSH}}$) составляет -250 мВ ($3,2 \text{ мМ GSH}$), а величина редокс-потенциала для редокс-пары CysSS/2Cys ($E_{\text{CysSS/2Cys}}$) составляет -140 мВ ($0,15 \text{ мМ Cys}$) [746]. В плазме крови $E_{\text{GSSH/2GSH}}$ равен -140 мВ ($0,003 \text{ мМ GSH}$), а $E_{\text{CysSS/2Cys}}$ составляет -80 мВ ($0,03 \text{ мМ Cys}$) [734].

Тиол/дисульфидные редокс-пары участвуют в окислительно-восстановительных реакциях как между собой, так и в реакциях с другими окислителями и восстановителями. В результате чего предположение о том, что редокс-состояние пары GSSG/2GSH может регулировать состояние белковых тиолов, подвергается критике со стороны ряда исследователей [658; 747; 748]. Таким образом, механизм передачи информации от глутатиона к белкам является более сложным по сравнению с (4.3) и (4.4).

Как уже отмечалось выше, изменение редокс-состояния мишени в сигнальных путях является результатом взаимодействия с группой взаимосвязанных соединений, а не результатом воздействия одного типа соединения. Для учета вклада всех участников окислительно-восстановительных процессов теоретически и экспериментально обосновано применение новых физико-химических параметров – эффективного редокс-потенциала ($E^{\text{эфф}}$) и редокс-буферной емкости (r) [678; 749]. Эффективный редокс-потенциал характеризует «суммарную» способность многокомпонентной внутриклеточной среды отдавать электроны и определяется уравнением [657; 658]:

$$E^{\text{эфф}} = \frac{\sum_{i=1}^k z_i c_i E_i^{0r}}{\sum_{j=1}^k c_j z_j}, \quad (4.5)$$

где $E^{\text{эфф}}$ – эффективный редокс-потенциал среды; E_i^{0r} – стандартный восстановительный потенциал i -й редокс-пары при pH 7,0; c_i – концентрация вещества восстановленной формы i -й редокс-пары; z_i – число электронов, которые присоединяет молекула окисленной формы вещества, переходя в восстановленную форму; k – число различных типов редокс-пар, участвующих в формировании редокс-состояния.

Физико-химический параметр «редокс-буферная емкость» используется для количественной характеристики способности клеток противодействовать

изменению величины эффективного редокс-потенциала внутриклеточной среды при изменении концентраций окислителей или восстановителей [750; 751]. Зависимость величины редокс-буферной емкости от концентрации редокс-активных молекул выражается

$$r = \frac{\sum_{i=1}^k c_i z_i}{z_{\text{ок}} \cdot (E_{\text{ок}}^{0'} - E^{\text{эфф}})}, \quad (4.6)$$

где $E_{\text{ок}}^{0'}$ – редокс-потенциал окислителя при pH 7,0; $z_{\text{ок}}$ – число электронов, которые присоединяет молекула окислителя, переходя в восстановленную форму. Редокс-буферная емкость используется для количественной характеристики способности клеток противодействовать изменению величины $E^{\text{эфф}}$ внутриклеточной среды при изменении концентрации окислителей или восстановителей.

Величина $E^{\text{эфф}}$, так же как и величина редокс-окружения, определяет редокс-потенциалами и концентрациями участников окислительно-восстановительных процессов. Однако в отличие от расчетного параметра «редокс-окружение» параметр $E^{\text{эфф}}$ имеет конкретный физический смысл, и его можно измерить.

Редокс-потенциал соединения, как известно, является главной физико-химической характеристикой, используемой при рассмотрении процессов межмолекулярного переноса электронов. Значение стандартного редокс-потенциала соединения E^0 (в случае биологических систем при pH 7,0) определяет величину изменения свободной энергии (ΔG^0) в реакции перехода из восстановленной в окисленную форму:

$$\Delta G^{0r} = -zeE^{0r},$$

где e – элементарный заряд; z – число электронов, которые присоединяет частица окисленной формы, переходя в восстановленную форму вещества.

Работа, выполняемая по окислению n молей вещества, будет определяться выражением

$$\Delta G^{0r} = -znFE^{0r},$$

где n – количество вещества в молях.

В внутриклеточном растворе, содержащем набор редокс-активных соединений, работа по окислению k веществ будет

$$\Delta G^{0r} = \sum_i^k G_i^{0r} = -F \sum_i^k z_i n_i E_i^{0r}.$$

Эквивалентная по величине электрическая работа при переносе заряда

$$Q = F \sum_i^k z_i n_i$$

на электрод приведет к появлению разности потенциалов (ЭДС), величина которой количественно характеризует клеточный редокс-потенциал

$$\Delta E^{\text{кл}} = \frac{\sum_i^k z_i n_i E_i^{0r}}{\sum_i^k z_i n_i} . \quad (4.7)$$

В выражении (4.7) количество вещества n_i можно заменить молярной концентрацией вещества, используя соотношение $c_i = n_i/V_{\text{кл}}$, где $V_{\text{кл}}$ – объем клетки:

$$\Delta E^{\text{кл}} = \frac{\sum_i^k z_i n_i E_i^{0r}}{\sum_i^k z_i n_i} \cdot \frac{V_{\text{кл}}}{V_{\text{кл}}} = \frac{\sum_i^k z_i \left(\frac{n_i}{V_{\text{п}}} \right) E_i^{0r}}{\sum_i^k z_i \left(\frac{n_i}{V_{\text{п}}} \right)} = \frac{\sum_i^k z_i c_i E_i^{0r}}{\sum_i^k z_i c_i} = E^{\text{эф}}. \quad (4.8)$$

Таким образом, редокс-потенциал клетки пропорционален работе по окислению содержащихся в ней редокс-активных соединений. При таком определении редокс-потенциал, подобно pH или осмотическому давлению, является физико-химической характеристикой внутриклеточного окружения.

Величина клеточного редокс-потенциала определяется в основном глутатионом и аскорботом, концентрации которых в клетках значительно превышают содержание других редокс-активных соединений [658; 749]. С учетом средних концентраций этих редокс-активных соединений рассчитанные редокс-потенциалы некоторых типов клеток представлены в табл. 4.3.

Таблица 4.3

**Концентрации основных восстановителей в клетках
и значения клеточного редокс-потенциала**

Тип клеток	GSH ¹ , mM	AK ² , mM	Расчитанное значение $\Delta E^{\text{кл}}$, мВ (pH 7,0)
Цитоплазма β-клеток крысы	1,5	4	–23
Цитоплазма нейронов человека	2,5	5	–41
Цитоплазма гепатоцитов крысы	7	1	–203

¹Для GSH использовано значение $E_{\text{GSSG}/2\text{GSH}}^{0r} = -240$ мВ ($z = 2$) (pH 7,0).

²Для АК использовано значение $E_{\text{ДАК}/\text{АК}}^{0r} = +58$ мВ ($z = 2$) (pH 7,0).

Установленная зависимость величины клеточного редокс-потенциала от концентрации и редокс-потенциалов отдельных участников трансдукции внутриклеточного редокс-сигнала может быть использована для обоснования методов измерения данного параметра.

Согласно выражению (4.5) изменение концентрации окислителя в системе вызовет изменение начальной величины эффективного редокс-потенциала ($E^{\text{эф}}$). Рассмотрим раствор, в котором концентрация восстановителя равна $c_{\text{вос}}$. При добавлении в раствор окислителя эффективный редокс-потенциал системы согласно (4.7) изменится до значения

$$E^{\text{эф}} + \Delta E^{\text{эф}} = \frac{c_{\text{вос}} z_{\text{вос}} E^{\text{эф}} + c_{\text{ок}} z_{\text{ок}} E_{\text{ок}}^{0'}}{c_{\text{вос}} z_{\text{вос}} + c_{\text{ок}} z_{\text{ок}}}, \quad (4.9)$$

где $c_{\text{вос}}$ – концентрация восстановителя; $z_{\text{вос}}$ – число электронов, переносимых при окислении одной молекулы восстановителя.

Найдем приращение $\Delta E^{\text{эф}}$, используя соотношение (4.9):

$$\begin{aligned} \Delta E^{\text{эф}} &= \frac{c_{\text{вос}} z_{\text{вос}} E^{\text{эф}} + c_{\text{ок}} z_{\text{ок}} E_{\text{ок}}^{0'}}{c_{\text{вос}} z_{\text{вос}} + c_{\text{ок}} z_{\text{ок}}} - E^{\text{эф}}, \\ \Delta E^{\text{эф}} &= \frac{c_{\text{ок}} z_{\text{ок}} (E_{\text{ок}}^{0'} - E^{\text{эф}})}{c_{\text{вос}} z_{\text{вос}} + c_{\text{ок}} z_{\text{ок}}}. \end{aligned} \quad (4.10)$$

В случае многокомпонентной среды, содержащей k восстановителей в концентрациях $c_1, c_2, \dots, c_k$, выражение (4.10) примет вид

$$\Delta E^{\text{эф}} = \frac{c_{\text{ок}} z_{\text{ок}} (E_{\text{ок}}^{0'} - E^{\text{эф}})}{c_{\text{ок}} z_{\text{ок}} + \sum_{i=1}^k c_i z_i}. \quad (4.11)$$

Из (4.11) можем записать

$$\Delta E^{\text{эф}} = \frac{E_{\text{ок}}^{0'} - E_0^{\text{эф}}}{1 + \frac{\sum_{i=1}^n z_i c_i}{z_{\text{ок}} c_{\text{ок}}}}. \quad (4.12)$$

Введем следующие обозначения:

$$\Delta E_{\text{max}}^{\text{эф}} = E_{\text{ок}}^{0'} - E^{\text{эф}} \text{ и } k_{\text{ем}} = \frac{\sum_{i=1}^k c_i z_i}{z_{\text{ок}}}. \quad (4.13)$$

Тогда уравнение (4.12) примет вид

$$\Delta E^{\text{эф}} = \frac{\Delta E_{\text{max}}^{\text{эф}}}{1 + \frac{k_{\text{ем}}}{c_{\text{ок}}}}, \quad (4.14)$$

где $\Delta E_{\text{max}}^{\text{эф}}$ – максимальное изменение величины эффективного редокс-потенциала, возможное при условии $c_{\text{ок}} \gg c_{\text{вос}}$. Константа $k_{\text{ем}}$ имеет размерность концентрации. Из уравнения (4.14) также видно, что при $k_{\text{ем}} = c_{\text{ок}}$ изменение величины эффективного редокс-потенциала равно $\Delta E_{\text{max}}^{\text{эф}}/2$. Таким образом, константа $k_{\text{ем}}$ численно равна концентрации окислителя, при которой изменение величины эффективного редокс-потенциала составляет половину своего максимального значения.

Выражение (4.14) является следствием закона сохранения энергии. Справедливость этого выражения также может быть доказана на основе следующих рассуждений. Согласно закону сохранения энергии в процессе восстановления окислителя работа по восстановлению окислителя (ΔG_1) равна работе по окислению восстановителей (ΔG_2), т. е. $\Delta G_1 = \Delta G_2$.

$$\Delta G_1 = G_1^{\text{кон}} - G_1^{\text{нач}}, \Delta G_2 = G_2^{\text{кон}} - G_2^{\text{нач}},$$

где начальная свободная энергия окислителя будет

$$G_1^{\text{нач}} = -z_{\text{ок}} n_{\text{ок}} F E_{\text{ок}}^{0'},$$

а конечная свободная энергия окислителя

$$G_1^{\text{кон}} = -z_{\text{ок}} n_{\text{ок}} F E^{\text{эф}}.$$

Для восстановителей начальная и конечная свободная энергия будет определяться выражениями

$$G_2^{\text{нач}} = -\sum_{i=1}^k z_i n_i F E_0^{\text{эф}},$$

$$G_2^{\text{кон}} = -\sum_{i=1}^k z_i n_i F E^{\text{эф}}.$$

Таким образом, согласно закону сохранения энергии

$$z_{\text{ок}} n_{\text{ок}} F E^{0'} - z_{\text{ок}} n_{\text{ок}} F E^{\text{эф}} = \sum_{i=1}^k z_i n_i F E^{\text{эф}} - \sum_{i=1}^k z_i n_i F E_0^{\text{эф}}. \quad (4.15)$$

В выражении (4.15) вместо количества вещества можно перейти к молярным концентрациям вещества, используя соотношение $c_i = n_i/V_p$, где V_p – объем раствора:

$$z_{\text{ок}} c_{\text{ок}} F E^{0'} - z_{\text{ок}} c_{\text{ок}} F E^{\text{эф}} = \sum_{i=1}^k z_i c_i F E^{\text{эф}} - \sum_{i=1}^k z_i c_i F E_0^{\text{эф}}.$$

Используя $E^{\text{эф}} = E_0^{\text{эф}} + \Delta E^{\text{эф}}$, получим

$$z_{\text{ок}} c_{\text{ок}} E_{\text{ок}}^{0'} - z_{\text{ок}} c_{\text{ок}} E_0^{\text{эф}} - z_{\text{ок}} c_{\text{ок}} \Delta E^{\text{эф}} = \sum_{i=1}^k z_i c_i (E_0^{\text{эф}} + \Delta E^{\text{эф}}) - \sum_{i=1}^k z_i c_i E_0^{\text{эф}},$$

$$z_{\text{ок}} c_{\text{ок}} \Delta E_{\text{max}} - z_{\text{ок}} c_{\text{ок}} \Delta E^{\text{эф}} = \sum_{i=1}^k z_i c_i \Delta E^{\text{эф}}. \quad (4.16)$$

Из выражения (4.16) следует выражение (4.14).

Уравнение (4.14) в обратных координатах представляет собой уравнение прямой с наклоном $k_{\text{ем}}/\Delta E_{\text{max}}^{\text{эф}}$ и пересечениями: по оси ординат в точке $1/\Delta E_{\text{max}}^{\text{эф}}$ и по оси абсцисс в точке $-1/k_{\text{ем}}$:

$$\frac{1}{\Delta E^{\text{эф}}} = \frac{1}{\Delta E_{\text{max}}^{\text{эф}}} + \frac{k_{\text{ем}}}{\Delta E_{\text{max}}^{\text{эф}}} \frac{1}{c_{\text{ок}}}. \quad (4.17)$$

Проведем численный эксперимент. Пусть в β -клетках поджелудочной железы (табл. 4.3) концентрация глутатиона изменяется от 1,5 до 8 мМ. Зависимость величины $\Delta E^{\text{кл}}$ от Δc_{GSH} в обратных координатах будет линейной, как показано на рис. 4.5. Аналогично зависимости для аскорбата и пероксида водорода описываются уравнением прямой. Точка пересечения с осью абсцисс одинакова для всех трех прямых и определяется суммарной концентрацией всех редокс-активных соединений ($k_{\text{ем}}$). Величина константы $k_{\text{ем}}$ определяет редокс-буферную емкость, характеризующую способность клетки сохранять величину клеточного редокс-потенциала при изменении концентрации редокс-активных соединений [751; 752]:

$$r(E^{\text{кл}}) = \frac{\partial c_p}{\partial E^{\text{кл}}} = \frac{\sum_{i=1}^k c_i z_i}{z_p (\Delta E_p^{0'} - \Delta E_0^{\text{кл}})} = \frac{k_{\text{ем}}}{\Delta E_{\text{max}}^{\text{кл}}}.$$

Для разных типов клеток (разные $\Delta E_0^{\text{кл}}$) угол наклона прямой $1/\Delta E^{\text{кл}}$ ($1/\Delta c_p$) будет различаться. На рис. 4.6 представлена зависимость величины $\Delta E^{\text{кл}}$ ($[\text{H}_2\text{O}_2]$) в обратных координатах для разных типов клеток.

Следует отметить, параметры $\Delta E^{\text{кл}}$ и r используются для характеристики стационарного редокс-состояния в клетках. В стационарном редокс-состоянии концентрации основных редокс-агентов с течением времени не изменяются. Переход из одного стационарного состояния в другое наблюдается при изменении концентрации восстановителей или окислителей. Поэтому в экспериментальных условиях переход из одного стационарного редокс-состояния в другое, индуцированный увеличением концентрации, например окислителя, можно определить по изменению концентрации окисленной формы редокс-активного соединения $R_{\text{ок}}/R_{\text{вос}}$.

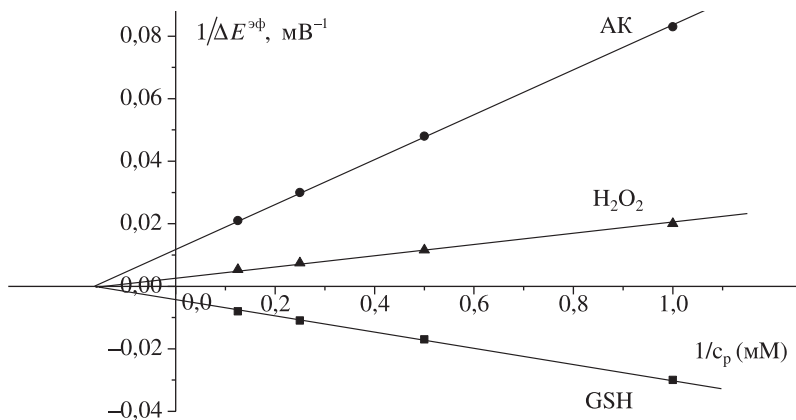


Рис. 4.5. Зависимость изменения редокс-потенциала клетки ($\Delta E^{\text{кл}}$) от концентрации редокс-активных соединений в двойных обратных координатах

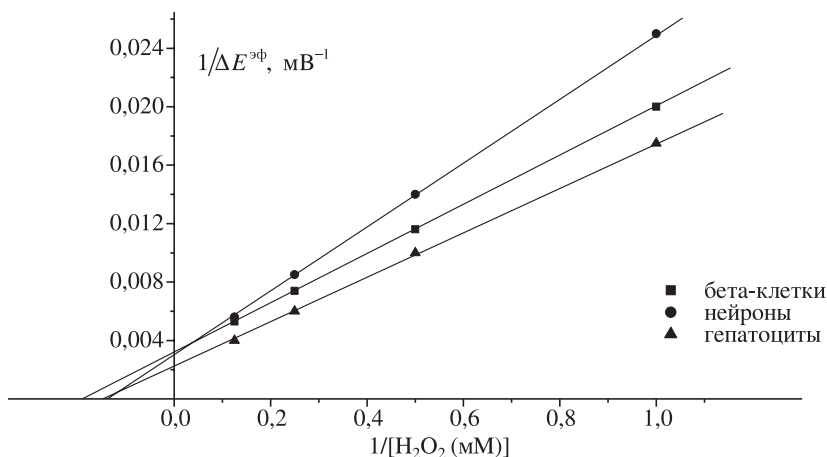


Рис. 4.6. Зависимость изменения редокс-потенциала клеток ($\Delta E^{\text{кл}}$) от концентрации пероксида водорода в двойных обратных координатах

Величина концентрации $[R_{\text{ок}}]$, образующегося при данном переходе, зависит от внутриклеточной концентрации восстановителей. Молекулы окислителя могут взаимодействовать как с молекулами восстановленной формы $R_{\text{вос}}$, приводя к образованию $R_{\text{ок}}$, так и с молекулами других восстановителей, при этом концентрация $[R_{\text{вос}}]$ не изменяется. При увеличении концентрации восстановителей будет уменьшаться концентрация $[R_{\text{ок}}]$,

образующегося при переходе клетки из одного стационарного состояния в другое. Таким образом, концентрация $[R_{ок}]$, образующегося при переходе клетки из одного стационарного состояния в другое, зависит от редокс-параметров клеток. Теоретическое обоснование зависимости редокс-состояния сенсора от величин концентрации окислителя и редокс-параметров клеток можно провести на основе следующей модели [751].

В первом приближении можно считать, что количество молекул $R_{ок}$ пропорционально количеству электронов ($Q_{ок}$), переносимых с молекул $R_{вос}$ на молекулы окислителя. С другой стороны, количество молекул $R_{вос}$ пропорционально количеству электронов ($Q_{вос}$), переносимых с молекул восстановителя на молекулы окислителя. Математически данное предположение может быть записано следующим образом:

$$[R_{ок}] = A Q_{ок} = A z_{ок} c_{ок}, \quad (4.18)$$

$$[R_{вос}] = A Q_{вос} = A \sum_{i=1}^k z_i c_i, \quad (4.19)$$

где $[R_{ок}]$ – концентрация окисленной формы сенсора; $[R_{вос}]$ – концентрация восстановленной формы сенсора; A – коэффициент пропорциональности. Таким образом, редокс-состояние сенсора может быть определено на основе выражения

$$\frac{[R_{ок}]}{[R_{вос}]} = \frac{z_{ок} c_{ок}}{\sum_{i=1}^n z_i c_i}.$$

Полагаем, что общая концентрация сенсора (R_0) в процессе измерения не изменяется, т. е.

$$[R_{ок}] + [R_{вос}] = R_0 = \text{const.}$$

Тогда при переходе между стационарными состояниями концентрация окисленной формы изменится на величину

$$[R_{ок}] = R_0 \frac{1}{1 + \frac{\sum_{i=1}^n z_i c_i}{z_{ок} c_{ок}}}. \quad (4.20)$$

Из выражения (4.20) с учетом (4.12) следует, что редокс-сенсоры являются сенсорами изменений величины эффективного редокс-потенциала

$$[R_{ок}] \sim \Delta E^{кл}. \quad (4.21)$$

Согласно (4.21) концентрация окисленной формы сенсора пропорциональна изменению клеточного редокс-потенциала, поэтому клеточные ре-

докс-буферная емкость и редокс-потенциал могут быть определены на основе анализа построенной на основании экспериментальных исследований зависимости $[R_{ок}]$ от $c_{ок}$ в обратных координатах. В качестве сенсора изменений редокс-состояния могут выступать различные соединения, включая глутатион, редокс-зависимые флуоресцентные белки и искусственные редокс-зонды. Показано, что в качестве такого редокс-сенсора может быть использован флуоресцентный зонд 2,7-дихлордигидрофлуоресцеин [751; 752]. Сравнение данных, полученных с использованием разных сенсорных систем, возможно после соответствующей калибровки.

Таким образом, с одной стороны, редокс-потенциал клетки может быть рассчитан на основе измеренных концентраций основных участников внутриклеточных редокс-процессов. С другой стороны, редокс-потенциал клетки может быть измерен на основе описанного выше метода «редокс-титрования». Кроме этого, если отдельные редокс-активные молекулы и редокс-зависимые белки являются сенсорами клеточного редокс-потенциала, то его величину можно определить с помощью термодинамических параметров состояния редокс-активных групп отдельных молекул.

4.3. Биофизическая модель редокс-цепи

Основой редокс-регуляторных механизмов является межмолекулярный перенос электронов. В транспорте электронов от начального донора к конечному акцептору могут участвовать несколько посредников (редокс-активных соединений), создавая цепи направленного переноса электронов, или редокс-цепи. Установление основных закономерностей функционирования подобных цепей является важным этапом исследований в области редокс-биологии. Нами показано, что процессы, протекающие с участием редокс-цепей, могут быть количественно охарактеризованы по аналогии с электрическими цепями [678; 681].

Аналоговые электрические схемы используются для модельного описания ряда биофизических процессов, включая перенос ионов через мембраны при формировании потенциала покоя [82; 753]. При этом единые закономерности, проявляемые в различных биофизических процессах, могут описываться на основе сходных эквивалентных электрических цепей. Применение метода эквивалентных электрических цепей к описанию закономерностей функционирования взаимосвязанной сети АФК и антиоксидантов основывается на выполнении фундаментальных физических законов (закона сохранения энергии и закона сохранения заряда) в редокс-цепях [678].

Эквивалентная электрическая схема представляет собой графическое изображение электрической цепи. Электрические цепи – это совокупности

соединенных определенным образом элементов и устройств, образующих пути прохождения электрического тока (пути прохождения электронов). Совокупность молекул, взаимодействующих между собой с помощью редокс-реакций, также образует пути переноса электронов. Таким образом, физико-химическое описание редокс-гомеостаза является сходным с характеристикой мембранного потенциала, величина которого определяется (так же как и величина клеточного редокс-потенциала) концентрациями ряда соединений.

Выполнение закона сохранения заряда в процессах трансмембранного переноса ионов и внутриклеточных редокс-процессах (электрон-транспортных процессах) позволяет моделировать эти процессы сходными эквивалентными электрическими цепями (рис. 4.7). Рассмотрим эквивалентную схему, моделирующую трансмембранный перенос различных типов ионов через ионные каналы и изображенную на рис. 4.7, *а*. Связь между мембранным потенциалом покоя (V_M^n) и проводимостью i -го канала (g_i), рассчитанную с помощью данной эквивалентной электрической схемы, определяет выражение

$$V_M^n = \sum_{i=1}^k \frac{g_i}{g_{\text{сум}}} V_i, \quad (4.22)$$

где V_i – равновесный потенциал Нернста для иона i -го типа; $g_{\text{сум}} = \sum_{i=1}^k g_i$ – суммарная проводимость.

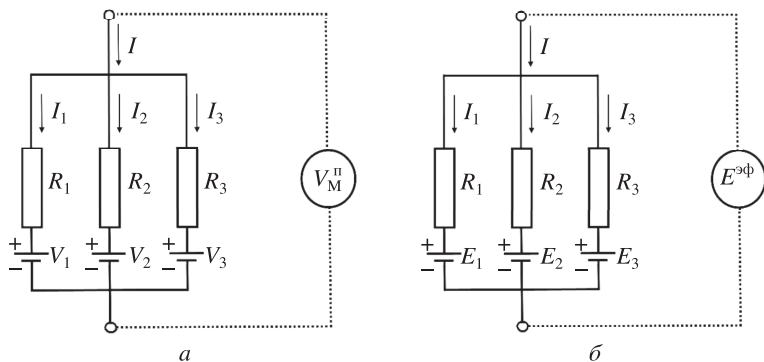


Рис. 4.7. Эквивалентная электрическая схема:

- а* – пассивного транспорта ионов через мембрану (три типа ионных каналов);
- б* – переноса электронов с участием трех взаимодействующих редокс-активных соединений (пояснения в тексте)

Таким образом, мембранный потенциал покоя (4.22) представляет собой взвешенную сумму равновесных потенциалов Нернста для всех ионов. Взвешивающий фактор для каждого иона представляет собой отношение

проводимости иона g_i к суммарной мембранной ионной проводимости g . Зависимость проводимости мембраны от концентрации ионов в мембране (c_i) может быть выражена следующим образом:

$$g_i = \frac{z_i c_i F u_{ei} S}{d},$$

где z_i – заряд иона; u_{ei} – электрическая подвижность иона; S – площадь поперечного сечения проводника; d – длина проводника. Тогда выражение (4.22) может быть переписано в виде

$$V_M^n = \frac{\sum_{i=1}^k z_i c_i u_{ei} V_i}{\sum_{i=1}^n z_i c_i u_{ei}}.$$

Если предположить, что для одного типа ионов $u_{ei} = \text{const}$, тогда

$$V_M^n = \frac{\sum_{i=1}^k z_i c_i V_i}{\sum_{i=1}^n z_i c_i}. \quad (4.23)$$

Выражение (4.23) для мембранного потенциала покоя V_M^n и выражение (4.5) для эффективного редокс-потенциала E^{Φ} имеют одинаковый вид. Согласно (4.5) эффективный редокс-потенциал, характеризующий стационарное редокс-состояние, представляет собой взвешенную сумму равновесных редокс-потенциалов для всех редокс-активных молекул. Таким образом, для объяснения механизма формирования суммарной ЭДС в многокомпонентной редокс-системе также можно применять метод эквивалентных схем.

Направленный перенос электронов в клеточных окислительно-восстановительных процессах можно рассматривать как аналог электрического тока. В клеточных окислительно-восстановительных процессах электроны переносятся между различными редокс-активными молекулами (элементами цепи), но при этом количество электронов, необходимых для восстановления (окисления) k молекул, не изменяется. Например, пероксид водорода может восстанавливаться молекулами различных типов в клетке (аскорбатом, глутатионом, цистеином и т. д.), но общее число электронов, которые необходимы для восстановления k молекул окислителя, является величиной постоянной: число электронов, присоединяемых молекулами пероксида водорода, равно числу электронов, теряемых молекулами восстановителей. Аналогичная ситуация наблюдается в узле электрической цепи. Согласно первому закону Кирхгофа алгебраическая сумма токов в узле цепи равна нулю, т. е. число входящих в узел электронов будет равно числу выходящих из узла электронов. Поэтому результат взаимодействия нескольких типов редокс-активных молекул можно изобразить с помощью эквивалентной электрической цепи

с параллельно соединенными проводниками (см. рис. 4.7, б). Представление редокс-цепей на основе эквивалентных электрических цепей отображает выполнение закона сохранения заряда в системе. Таким образом, для расчета величин параметров стационарного редокс-состояния (концентрации редокс-молекул сохраняются постоянными) может быть использована эквивалентная электрическая схема, изображенная на рис. 4.7, б, где источники ЭДС задаются стандартными редокс-потенциалами участников реакций (E_i).

В результате выполнения первого закона Кирхгофа соотношение величин силы тока между участками указанной схемы будет

$$I = I_1 + I_2 + I_3, \quad (4.24)$$

где I_1 – плотность тока 1-го участника; I – общая плотность тока.

Согласно второму закону Кирхгофа для данной схемы можно записать следующие равенства:

$$\begin{aligned} E^{\text{эф}} - IR_{\text{сум}} &= 0, \\ E_1 - I_1 R_1 &= 0, \\ E_2 - I_2 R_2 &= 0, \\ E_3 - I_3 R_3 &= 0, \end{aligned} \quad (4.25)$$

где R_i – сопротивление i -го элемента цепи; $R_{\text{сум}}$ – суммарное сопротивление цепи. Из (4.24)–(4.25) следует, что

$$\frac{E^{\text{эф}}}{R_{\text{сум}}} = \frac{E_1}{R_1} + \frac{E_2}{R_2} + \frac{E_3}{R_3},$$

или

$$E^{\text{эф}} = \sum_{i=1}^k \frac{g_i}{g_{\text{сум}}} E_i, \quad (4.26)$$

где g_i – проводимость i -го элемента цепи; $g_{\text{сум}} = \sum_{i=1}^k g_i$ – суммарная проводимость цепи.

Согласно выражению (4.26), которое является следствием выполнения законов Кирхгофа для данной схемы, эффективный восстановительный потенциал является взвешенной суммой редокс-потенциалов участников редокс-процессов, а коэффициент

$$a_i = \frac{g_i}{g_{\text{сум}}}$$

представляет собой «удельную проводимость» i -го элемента цепи. Из (4.5) и (4.26) следует, что проводимость i -го элемента цепи g_i связана с концентрацией редокс-активного соединения (c_i) следующим соотношением:

$$g_i \sim z_i c_i. \quad (4.27)$$

Таким образом, эффективный редокс-потенциал представляет собой суммарную ЭДС для цепи взаимодействующих редокс-активных соединений.

Приведенная выше эквивалентная электрическая схема иллюстрирует связь между эффективным редокс-потенциалом и редокс-потенциалами участников окислительно-восстановительных реакций в клетке и может быть использована для расчета параметров стационарного редокс-состояния.

Добавление окислителя (или восстановителя) в клетку вызывает переход из одного стационарного состояния в другое. В теории электрических цепей процесс изменения электрических величин в цепи при ее переходе из одного установившегося режима в другой называется переходным. При анализе переходных процессов ток, напряжение или заряд в некоторой точке цепи обычно представляются в виде зависящей от времени функции. Переходный процесс, индуцированный в клетке окислителем, может быть промоделирован замыканием ключа в эквивалентной электрической схеме, изображенной на рис. 4.8, где C_0 – электрическая емкость конденсатора

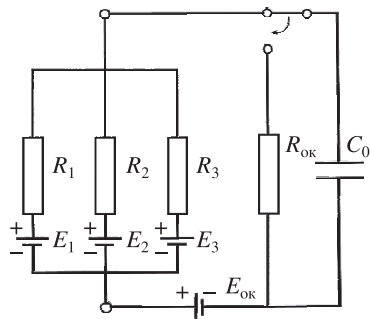


Рис. 4.8. Эквивалентная электрическая схема для расчета величин изменения параметров редокс-состояния среды при переходных процессах

$$C_0 = \frac{q}{U} \sim \frac{\sum_{i=1}^n z_i c_i}{E_{\text{ок}} - E^{\text{эф}}}. \quad (4.28)$$

С учетом (4.6) получаем, что электрическая емкость связана с редокс-буферной емкостью системы

$$C_0 \sim r.$$

После замыкания ключа мгновенные значения напряжения на резисторе ($iR_{\text{ок}}$) и конденсаторе (u_c) связаны соотношением

$$iR_{\text{ок}} = -u_c. \quad (4.29)$$

Поскольку $i = C_0 du/dt$, уравнение (4.29) можно переписать в виде дифференциального уравнения

$$R_{\text{ок}} C_0 \frac{du_c}{dt} = -u_c,$$

решение которого с учетом начальных условий (при разрядке конденсатора $u(0) = E_{\text{ок}} - E^{\text{эф}}$ имеет вид

$$u_c = (E_{\text{ок}} - E^{\text{эф}})e^{-t/R_{\text{ок}}C_0}.$$

Соответствующий ток

$$i = C_0 \frac{du_c}{dt} = -\frac{E_{\text{ок}} - E^{\text{эф}}}{R_{\text{ок}}} e^{-t/R_{\text{ок}}C_0}.$$

Заряд на конденсаторе изменяется по закону

$$q = C_0(E_{\text{ок}} - E^{\text{эф}})e^{-t/R_{\text{ок}}C_0}.$$

В начальный момент времени ($t = 0$) величина заряда пропорциональна разности напряжений

$$q = C_0(E_{\text{ок}} - E^{\text{эф}}).$$

Изменение активности редокс-сенсора вследствие его окисления фактически характеризует изменение заряда (происходит перенос электронов). В рамках используемой модели предположим, что скорость окисления сенсора пропорциональна силе тока в боковой цепи. В начальный момент времени сила тока в боковой цепи была равна 0 (цепь разомкнута). После подключения и зарядки конденсатора сила тока в цепи изменилась до значения (ток идет только через нагрузку, см. рис. 4.8)

$$I = \frac{E_{\text{ок}} - E^{\text{эф}}}{R_{\text{ок}}}.$$

С другой стороны, входящий в цепь ток

$$I = \frac{\Delta E^{\text{эф}}}{R},$$

где $R = \frac{R_{\text{ок}}R_{\text{сум}}}{R_{\text{ок}} + R_{\text{сум}}}$ – общее сопротивление цепи; $R_{\text{ок}}$ – сопротивление на боковом резисторе, $R_{\text{сум}}$ – сопротивление остальной части (см. схему на рис. 4.8).

Согласно первому закону Кирхгофа входящий и выходящий токи в цепи

$$\frac{\Delta E^{\text{эф}}}{R} = \frac{E_{\text{ок}} - E^{\text{эф}}}{R_{\text{ок}}},$$

или

$$\Delta E^{\text{эф}} = R \frac{E_{\text{ок}} - E^{\text{эф}}}{R_{\text{ок}}},$$

$$\Delta E^{\text{эф}} = \frac{R_{\text{ок}} R_{\text{сум}}}{R_{\text{ок}} + R_{\text{сум}}} \frac{E_{\text{ок}} - E^{\text{эф}}}{R_{\text{ок}}},$$

$$\Delta E^{\text{эф}} = \frac{E_{\text{ок}} - E^{\text{эф}}}{\frac{R_{\text{ок}} + R_{\text{сум}}}{R_{\text{сум}}}},$$

$$\Delta E^{\text{эф}} = \frac{E_{\text{ок}} - E^{\text{эф}}}{1 + \frac{R_{\text{ок}}}{R_{\text{сум}}}}.$$

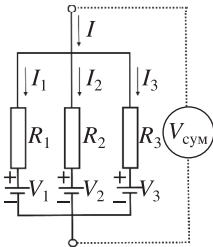
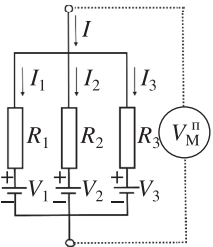
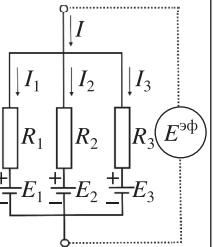
Используя обратную сопротивлению величину «проводимость», можем записать

$$\Delta E^{\text{эф}} = \frac{E_{\text{ок}} - E^{\text{эф}}}{1 + \frac{G_{\text{сум}}}{G_{\text{ок}}}}, \quad (4.30)$$

где $G_{\text{ок}}$ – проводимость бокового резистора. С учетом (4.8), (4.13) и (4.27) выражение (4.30) можно преобразовать в (4.14), линеаризованная форма которого (4.17) использовалась нами при определении редокс-буферной емкости. Таким образом, эквивалентные электрические схемы могут быть использованы для анализа взаимосвязанных клеточных редокс-процессов. Аналогия между электрическими цепями, ионными токами в мембране и редокс-цепями проиллюстрирована данными, представленными в табл. 4.4.

Таблица 4.4

Сходство и различия электрических и редокс-цепей

Параметр	Электрические цепи	Ионные токи в мембране	Редокс-цепи
Эквивалентная электрическая схема			
Носители заряда	Электроны или ионы	Ионы	Электроны
Проводимость элемента цепи	g_i	$g_i = \frac{z_i c_i F u_{ei} A}{d}$	$g_i \sim z_i c_i$

Параметр	Электрические цепи	Ионные токи в мембране	Редокс-цепи
Суммарная проводимость цепи	$g_{\text{сум}} = \sum_{i=1}^k g_i$	$g_{\text{сум}} = \sum_{i=1}^k g_i$	$g_{\text{сум}} = \sum_{i=1}^k g_i$
Физико-химический параметр состояния покоя	Электродвижущая сила (ЭДС) цепи $V_{\text{сум}}(\text{ЭДС}) = \sum_{i=1}^k \frac{g_i}{g_{\text{сум}}} V_i$	Мембранный потенциал покоя ($V_M^{\text{п}}$) $V_M^{\text{п}} = \sum_{i=1}^k \frac{g_i}{g_{\text{сум}}} V_i$	Редокс-потенциал клетки ($\Delta E^{\text{ккл}}$) $\Delta E^{\text{ккл}} = \sum_{i=1}^k \frac{g_i}{g_{\text{сум}}} \Delta E_i^{0'}$
Клеточные сенсоры	—	Сенсор напряжения – лизиновые и аргининовые группы белков	Сенсор напряжения – цистеиновые группы белков
Трансмембранная разность на плазматической мембране*	—	–30 мВ	–15 мВ
Трансмембранная разность на внутренней мембране митохондрий*	—	–180 мВ	–90 мВ

*Для гепатоцитов.

Направление движения электронов в электрической цепи задается напряжением (разностью электрических потенциалов). Направление движения электронов в редокс-реакциях задается разностью редокс-потенциалов, которая характеризует энергию, необходимую для перемещения заряда между молекулами. Концентрация редокс-активных соединений определяет «проводимость» редокс-цепи так же, как и проводимость мембраны для ионов зависит от концентрации носителей заряда. Чем больше молекул участвует в передаче заряда по редокс-цепи, тем больший по величине заряд они могут перенести от начального донора к конечному акцептору.

С учетом проводимости величина редокс-потенциала клетки представляет собой взвешенную сумму равновесных редокс-потенциалов. Взвешивающий фактор для каждого редокс-активного соединения представляет собой отношение «проводимости» соединения g_i к суммарной «проводимости» системы $g_{\text{сум}}$. Так же, как и мембранный потенциал покоя представляет со-

бой взвешенную сумму равновесных редокс-потенциалов Нернста для всех ионов, а взвешивающий фактор для каждого иона – отношение проводимости иона g_i к суммарной мембранной ионной проводимости $g_{\text{сум}}$.

Величины параметров редокс-свойств молекул и клеток, выражаемые с помощью потенциала Нернста (для однокомпонентных систем – молекул) и эффективного редокс-потенциала (для многокомпонентных систем – клеток), являются важными характеристиками биосистем, взаимосвязь которых со многими свойствами клеток остается не изученной до сих пор. Редокс-потенциал можно рассматривать как «электрондвижущую силу» (по аналогии с протондвижущей силой), которая определяется концентрацией отдаваемых или принимаемых системой электронов и характеризует затрачиваемую на их перенос энергию.

Анализ редокс-свойств участников внутриклеточных окислительно-восстановительных реакций позволяет увидеть сходство с параметром pH и рассматривать параметры редокс-состояния клетки как новые параметры клеточного гомеостаза. Известно, что активность многих белков зависит от величины pH окружающей среды. Аналогично активность ряда белков зависит от редокс-условий в клетке. Например, усиление процессов окисления в цитоплазме инициирует образование дисульфидных связей в ксантиноксидоредуктазе, что переводит фермент из дегидрогеназной формы в оксидазную.

Редокс-активные соединения являются важными участниками механизмов межклеточной и внутриклеточной сигнализации. Важными характеристиками процессов обработки информации с участием редокс-активных соединений являются редокс-параметры клеток в целом и отдельных органеллах, различия в величинах которых указывают на важность компартментализации в процессах сигнализации (важно не только, какие молекулярные структуры участвуют в передаче сигнала, важно также, где в клетке реализуется данный процесс). Например, показано, что на плазматической и внутренней митохондриальной мембранах сохраняется градиент эффективного редокс-потенциала [658]. Как показано на рис. 4.9, величина разности эффективного редокс-потенциала на митохондриальной мембране гепатоцитов ($\Delta E_{3,2}^{\text{эф}}$) примерно в пять раз выше, чем величина разности эффективного редокс-потенциала на плазматической мембране гепатоцитов ($\Delta E_{2,1}^{\text{эф}}$).

Следует отметить, что величина разности электрического потенциала на внутренней митохондриальной мембране гепатоцитов ($\Delta \varphi_{3,2}$) также примерно в пять раз выше, чем величина разности электрического потенциала на плазматической мембране гепатоцитов ($\Delta \varphi_{2,1}$) [754]. Вероятно, величина трансмембранного градиента эффективного редокс-потенциала является формой запасаения энергии в клетке так же, как и величина трансмембранного градиента электрического потенциала. Наряду с этим формой запасаения энергии в клетках выступают макроэргические фосфатные

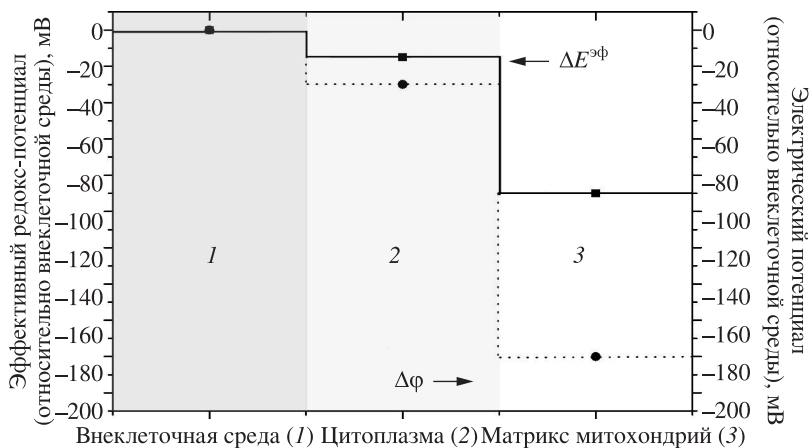


Рис. 4.9. Градиент эффективного редокс-потенциала и электрического потенциала на плазматической и внутренней митохондриальной мембранах

связи ряда соединений (АТФ и др.) [755]. Наиболее высокая концентрация АТФ наблюдается, как известно, в митохондриях, поэтому для этой органеллы характерны наибольшие отрицательные значения для эффективного редокс-потенциала и электрического потенциала. Таким образом, эффективный редокс-потенциал можно рассматривать как показатель запасенной энергии для процессов восстановления в клетке.

4.4. Механизм трансдукции сигналов в клетках с участием редокс-активных соединений

Редокс-сенсоры, в качестве которых могут рассматриваться внутриклеточные редокс-пары и тиолы белка, являются сенсорами изменений интегральных параметров редокс-состояния клетки (E^{Φ}), а не сенсорами изменений редокс-состояния одной редокс-пары ($E_{GSSH/2GSH}$). То есть тиолсодержащие соединения стремятся к равновесию со всем окружением, а не к равновесию с отдельными редокс-парами (рис. 4.10, а).

Величина работы (количество переносимого заряда) редокс-окружения над изменением состояния редокс-групп сенсора определяется концентрацией и редокс-потенциалом сенсора. В рамках модели эквивалентных электрических цепей можно обосновать зависимость, согласно которой чем больше концентрация редокс-чувствительных элементов сенсора, тем больше его редокс-потенциал смещается в направлении величины клеточного редокс-потенциала [678; 681].

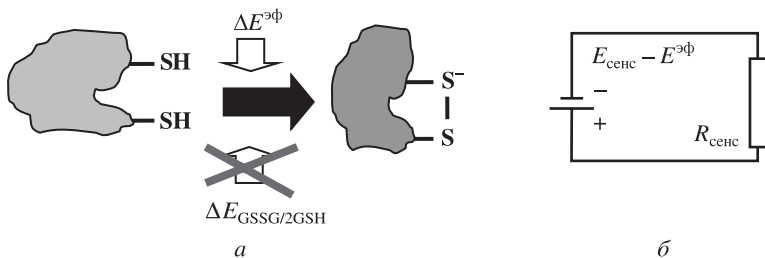


Рис. 4.10. Внутриклеточный сенсор интегральных изменений редокс-состояния клетки (*a*) и его эквивалентная электрическая схема (*б*)

Отдельный редокс-сенсор клетки характеризуется более высоким сопротивлением ($R_{\text{сенс}}$) по сравнению с суммарным сопротивлением цитоплазмы ($R_{\text{сум}}$), поскольку его концентрация значительно ниже, чем концентрации редокс-активных соединений в цитоплазме. Поскольку $R_{\text{сенс}} \gg R_{\text{сум}}$, то собственное сопротивление источника ЭДС можно не учитывать. Тогда для определения параметров состояния конкретного редокс-сensors можно использовать эквивалентную электрическую схему, изображенную на рис. 4.10, *б*.

При заданном эффективном редокс-потенциале величина силы тока, текущего через сенсор, является величиной постоянной и определяется

$$I = G_{\text{сенс}}(E_{\text{сенс}} - E^{\text{эф}}) = G_{\text{сенс}} \Delta E_{\text{сенс}}, \quad (4.31)$$

где $G_{\text{сенс}}$ – проводимость сенсора; $E_{\text{сенс}}$ – редокс-потенциал (ЭДС) сенсора.

Из соотношения (4.31) следует, что для каждого сенсора при одинаковом $E^{\text{эф}}$ величина изменения $\Delta E_{\text{сенс}}$ зависит от $G_{\text{сенс}}$. Чем больше $G_{\text{сенс}}$, тем меньше $\Delta E_{\text{сенс}}$. Для клеточных и внеклеточных тиолов, концентрации которых различаются, величины $\Delta E_{\text{сенс}}$ также будут различаться. Таким образом, величина ответа (реакции) редокс-системы на изменение величины эффективного редокс-потенциала при действии редокс-активных соединений определяется величиной передаваемого (принимаемого) заряда (количеством электронов).

Зависимость (4.31) можно интерпретировать в терминах изменения свободной энергии. В стационарном состоянии концентрации редокс-активных соединений не изменяются. То есть изменение свободной энергии мессенджеров в результате их взаимодействия является постоянной величиной

$$\begin{aligned} \Delta G_i &= z_i n_i F (\Delta E_i^{0'} + \Delta E_i - \Delta E^{\text{кл}}) = \text{const}, \\ z_1 c_1 (\Delta E_1^{0'} + \Delta E_1 - \Delta E^{\text{кл}}) &= z_2 c_2 (\Delta E_2^{0'} + \Delta E_2 - \Delta E^{\text{кл}}). \end{aligned} \quad (4.32)$$

Таким образом, в стационарном состоянии разность редокс-потенциалов сенсора и среды есть величина постоянная.

Рассмотрим изменения редокс-потенциалов отдельных редокс-пар в зависимости от величины редокс-потенциала окружения (внутриклеточная

среда и плазма крови). Пусть концентрации редокс-активных соединений в клетке и в плазме крови различаются, как показано в табл. 4.5. Концентрации глутатиона и цистеина в клетке и плазме соответствуют содержанию данных редокс-активных соединений в цитоплазме клеток линии HT29 [746] и в плазме крови человека [734]. Согласно (4.32) в клетке редокс-потенциал глутатиона должен быть на 90 мВ выше в сравнении с редокс-потенциалом цистеина, что соответствует данным, полученным в работе [746]. В плазме крови концентрация цистеина выше, чем глутатиона. В результате чего значение $\Delta E_{\text{CysSS}/2\text{Cys}}$ ближе к редокс-потенциалу окружения, чем $\Delta E_{\text{GSSG}/2\text{GSH}}$. На основе измеренных в плазме крови концентраций окисленной и восстановленной форм редокс-молекул величина $E_{\text{GSSH}/2\text{GSH}}$ равна –140 мВ, а величина $E_{\text{CysSS}/2\text{Cys}}$ составляет –80 мВ [734], что согласуется с данными численного эксперимента.

Таблица 4.5

**Средние концентрации восстановителей
и значения редокс-потенциала клетки и сенсоров**

Тип биологической жидкости	GSH, мМ	Cys*, мМ	AK, мМ	Рассчитанное значение $\Delta E^{\text{кл}}$, мВ	Рассчитанное значение $\Delta E_{\text{GSSG}/2\text{GSH}}$, мВ	Рассчитанное значение $\Delta E_{\text{CysSS}/2\text{Cys}}$, мВ
Цитоплазма клетки	3,6	0,19	0,1	–245 (pH 7,2)	–240	–150
Плазма крови	0,003	0,09	0,155	–78 (pH 7,4)	–140	–80

*Для Cys использовано значение $E_{\text{CysSS}/2\text{Cys}}^{0'} = -240$ мВ ($z = 2$) (pH 7,0) [746].

Измеряя редокс-потенциалы отдельных молекул, можно определить клеточный редокс-потенциал. Согласно (4.32) если известны редокс-потенциалы двух взаимодействующих пар, то клеточный редокс-потенциал можно определить на основе выражения

$$\Delta E^{\text{кл}} = \frac{z_1 c_1 (\Delta E_1^{0'} + \Delta E_1) - z_2 c_2 (\Delta E_2^{0'} + \Delta E_2)}{z_1 c_1 - z_2 c_2}.$$

Таким образом, измеряемые величины $\Delta E_{\text{CysSS}/2\text{Cys}}$ и $\Delta E_{\text{GSSG}/2\text{GSH}}$ являются индикаторами величины редокс-потенциала окружения, т. е. находятся в равновесии с редокс-потенциалом окружения, а не в равновесии друг с другом. Поскольку концентрации тиолсодержащих соединений различаются, то согласно (4.32) величина изменения их редокс-состояния в одном и том же редокс-окружении также будет различаться (что служит основой для объяснения избирательной активации тиолсодержащих белков). В рамках предложенного выше подхода механизм редокс-сигналикации может быть описан схемой, изображенной на рис. 4.11.

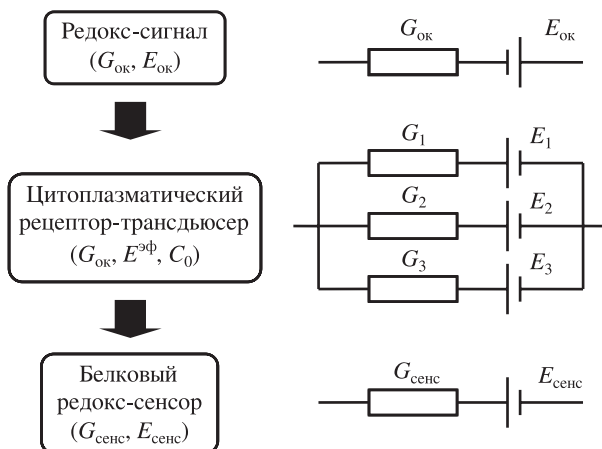


Рис. 4.11. Схематическое представление механизмов редокс-сигнализации (пояснения в тексте)

Трансдукция внешнего редокс-сигнала на белковый редокс-сенсор происходит с участием цитоплазматического «рецептора-трансдюсера». Редокс-сигнал (в рассматриваемом случае окислитель) характеризуется $G_{ок}$ и $E_{ок}$, а цитоплазматический рецептор-трансдюсер — $G_{сум}$ и $E^{эф}$ (для переходных процессов — емкостью $C_0 = f(G_{сум})$). Цитоплазматический рецептор-трансдюсер представляет собой разветвленную цепь взаимосвязанных редокс-активных соединений, состояние которой количественно характеризуется параметрами $E^{эф}$ и C_0 (см. рис. 4.7, б). Поступление нового типа редокс-активных соединений в клетку («рецепция») описывается через подключение дополнительной ветви (см. рис. 4.8) или изменением проводимости для присутствующих в клетке редокс-активных молекул. Согласно (4.31) изменение величины $E^{эф}$ вызовет изменение величины редокс-потенциала внутриклеточного сенсора $\Delta E_{сенси}$, что приведет к формированию определенного биологического ответа.

Чем выше проводимость для цитоплазматического рецептора-трансдюсера $G_{сум}$ (емкость C_0), тем меньше изменения величины $E^{эф}$ при действии редокс-сигнала. С другой стороны, для более сильного окислителя (более высокое значение $E_{ок}$) характерно меньшее значение $G_{ок}$, т. е. меньшая концентрация агента [681]. Из выражения (4.31) следует, что при $G_{сум} \gg G_{ок}$:

$$G_{сум} \Delta E^{эф} \approx G_{ок} (E_{ок} - E^{эф}). \quad (4.33)$$

В рамках предложенной модели биологический ответ клетки запускается, когда величина редокс-потенциала сенсора достигает некоторого по-

рогового значения $E_{\text{сенси}}$. Из (4.31) и (4.33) следует, что величина биологического ответа ($E_{\text{сенси}}$) является линейной функцией $G_{\text{ок}}$ и $E_{\text{ок}}$:

$$E_{\text{сенси}} = \alpha + \beta G_{\text{ок}}(E_{\text{ок}} - E^{\text{эф}}), \quad (4.34)$$

где α и β – константы для данного типа сенсора в определенном типе клеток. Таким образом, один и тот же результат может быть достигнут различными добавляемыми компонентами, но обладающими одним и тем же физико-химическим свойством – способностью отдавать электроны, количественной характеристикой которой является величина редокс-потенциала. Из выражения (4.34) следует, что при запуске одинакового клеточного ответа для двух различных веществ должна наблюдаться обратно пропорциональная зависимость между концентрациями агента и разностью величин редокс-потенциала агента и клетки:

$$\frac{G_{\text{ок1}}}{G_{\text{ок2}}} = \frac{E_{\text{ок2}} - E^{\text{эф}}}{E_{\text{ок1}} - E^{\text{эф}}}. \quad (4.35)$$

Для ряда групп синтетических и природных веществ обнаружена взаимосвязь между их физико-химическими свойствами и биологической активностью. Для описания способности веществ отдавать электроны используются различные физико-химические параметры, такие как окислительный потенциал [756], константа скорости реакции второго порядка для тушения образования синглетного кислорода фотосенсибилизаторами k_{Δ} [757], энергия высшей занятой молекулярной орбитали $E_{\text{ВЗМО}}$ [758] и др. Обнаружена линейная корреляция между способностью флавонов ингибировать рост клеток карциномы (IC_{50}) и значением их k_{Δ} : более высокое значение k_{Δ} (более отрицательное значение редокс-потенциала) соответствует агенту с более высокой токсичностью [757]. Исследование большой группы растительных фенолпропеноидов и их синтетических аналогов выявило наличие обратной пропорциональной зависимости между способностью соединений (CD_{50}) индуцировать синтез НАД(Ф)Н:хиноноксидоредуктазы (NQO1, EC 1.6.99.2) и вычисленной для них $E_{\text{ВЗМО}}$ [759]. Запуском экспрессии фермента NQO1, который играет важную роль в защите клетки от токсического действия окислителей и ксенобиотиков, служит связывание фактора транскрипции Nrf2 с антиоксидант-реактивным элементом ARE после диссоциации комплекса Keap1-Nrf2 в результате образования дисульфидных связей в сенсорном белке Keap1 [760]. Показано, что индуцируемая дифенолами и флавоноидами активность NQO1 также линейно зависит от их способности отдавать электроны [761]. Противовоспалительная активность и способность тритерпеноидов индуцировать синтез NQO1 определяются величиной их индекса электрофильности ω [762]. Как было отмечено ранее (см. разд. 3.2), биологическая активность антиоксидантов также определяется их физико-химическими характеристиками [664].

Таким образом, параметры редокс-свойств соединений могут выступать в качестве дескрипторов молекулярной структуры, которые могут использоваться для определения количественного соотношения между заданным видом активности органических соединений и их структурой.

В представленной модели биологический эффект редокс-активных соединений зависит от величины выполняемой работы по переносу электронов, определяемой произведением заряда (величина которого зависит от концентрации соединения) на напряжение (разности редокс-потенциалов соединения и среды), а не концентрацией лиганда, как принято в рамках традиционных представлений о природе биохимической специфичности. В рамках описанного механизма выполняются следующие закономерности: 1) для одного и того же вещества, действующего на разные клетки (разные r и $E^{\text{эф}}$) или одни и те же клетки, но различающиеся r , биологический ответ будет разным; 2) одинаковые по величинам изменения параметров внутриклеточного редокс-состояния, индуцируемые различными факторами, сопровождаются одинаковыми биологическими ответами.

В качестве сенсоров изменений редокс-гомеостаза клетки могут выступать различные редокс-зависимые белки, включая участвующие в регуляции кальциевого и кислотно-основного гомеостаза [681; 763]. Показано, что увеличение концентрации H_2O_2 вызывает смещение величины эффективного редокс-потенциала, которое сопровождается увеличением концентрации ионов кальция в цитозоле [681]. Одинаковая по величине концентрация окислителя при одном и том же значении $E^{\text{эф}}$ и разных r оказывает различные эффекты на образование дисульфидных связей в тиолатах и активность белков, т. е. эффект действия окислителя зависит также от редокс-буферной емкости клетки.

В клетках линии С6 и клетках линии FL величины $E^{\text{эф}}$ совпадают, в то время как величины r значительно различаются [681]. При индуцированном H_2O_2 переходе клеток в новое стационарное редокс-состояние происходит повышение цитозольной концентрации Ca^{2+} , величина которого ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$) обратно пропорциональна величине r (рис. 4.12). В клетках линии С6 редокс-буферная емкость выше, чем в клетках линии FL, в результате величина $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ в клетках линии С6 меньше, чем в клетках линии FL. Увеличение редокс-буферной емкости клеток линии FL путем инкубирования с 5 мМ GSH приводило к тому, что H_2O_2 в той же концентрации вызывал уже меньшее смещение величины эффективного редокс-потенциала и, следовательно, меньшее по величине увеличение $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ (см. рис. 4.12).

В рамках предложенного механизма роль связующего фактора между отдельными ионтранспортирующими системами при редокс-регуляции Ca^{2+} -гомеостаза выполняют редокс-активные соединения жидкой фазы,

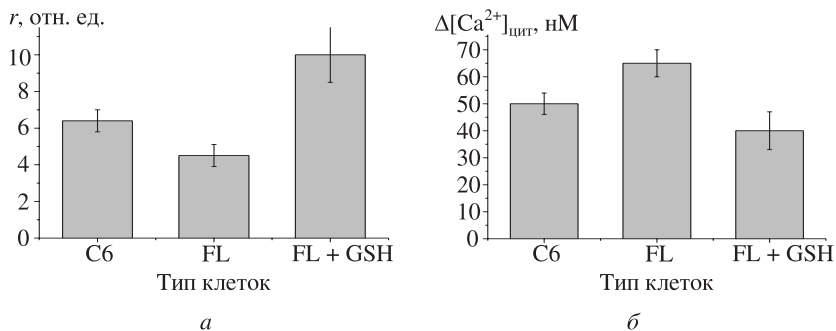


Рис. 4.12. Редокс-буферная емкость клеток (а) и изменение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} (б), индуцированное действием H_2O_2 в концентрации 1 мМ:

C6 – клетки линии C6; FL – клетки линии FL;

FL + GSH – клетки линии FL после инкубирования с 5 мМ GSH [681]

редокс-состояние которых определяется редокс-состоянием цитозоля. При передаче внешнего сигнала первоначально выполняется работа по изменению редокс-состояния цитозоля ($\Delta E^{\text{эФ}}$), величина которой зависит от редокс-буферной емкости системы (r). Затем (при достижении определенной «критической точки», которая характеризуется $E_{\text{сенс}}$) выполняется работа по изменению редокс-состояния соответствующих сенсоров – белковых титолов в Ca^{2+} -транспортирующих системах. В результате при изменении концентрации окислителя (совершается химическая работа) наблюдается изменение ионного гомеостаза клеток. Таким образом, передача редокс-сигнала в клетке регулируется сетью взаимодействующих АФК и антиоксидантов.

4.5. Редокс-цепи как структурно-функциональные единицы (модули) сигнальных процессов

Специфичность действия АФК определяется рядом факторов, среди которых одним из основных является колокализация фермента, генерирующего АФК, и белка-мишени. Клеточная антиоксидантная система ограничивает эффективность действия АФК на удаленные от источника белки-мишени. Высокая концентрация АФК, необходимая для активации мишени, формируется только вблизи источника генерации окислителей. В связи с этим источники генерации АФК, АФК и белки-мишени образуют единую цепь передачи информации, специфичность действия которой определяется типом мишени (рис. 4.13). В настоящее время в литературе обсуждается ряд регуляторных механизмов, функционирование которых обеспечивается специализированными редокс-цепями.

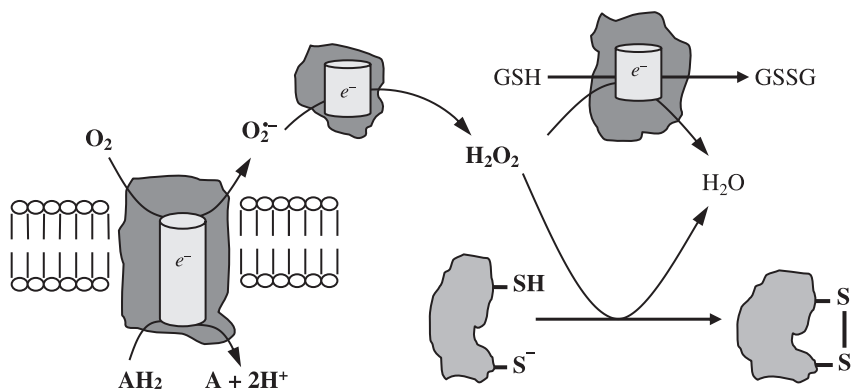


Рис. 4.13. Взаимодействие компонентов клеточной редокс-цепи

Рецепторы кислорода. Кислород-чувствительные рецепторы сосредоточены в нейроэпителиальных тельцах легкого и каротидных тельцах. Одним из ключевых компонентов молекулярного механизма отклика на изменение концентрации кислорода нейроэндокринными клетками являются O_2 -чувствительные K^+ -каналы [764]. Первоначально предполагалось три возможных модели регуляции активности K^+ -каналов молекулярным кислородом: а) ионный канал является сенсором кислорода; б) активность канала модулируется независимым O_2 -сенсором посредством диффундируемого мессенджера и в) ионный канал ассоциирован с мембранной O_2 -чувствительной оксидазой, такой как Nox [765]. Экспериментальные данные, полученные к настоящему времени, свидетельствуют в пользу двух последних механизмов, которые являются тканеспецифичными. Таким образом, сенсоры кислорода являются комплексной молекулярной структурой, образованной группой взаимодействующих макромолекулярных и низкомолекулярных соединений.

Функциональное состояние K^+ -каналов кислородного сенсора регулируется посредством редокс-зависимого механизма: образование дисульфидов приводит к открытию канала, тогда как их восстановление – к закрытию [766]. Таким образом, K^+ -каналы O_2 -сенсора являются H_2O_2 -чувствительными K^+ -каналами. В. П. Скулачев также полагает, что сигналом к уменьшению потребления кислорода в тканях является повышение концентрации H_2O_2 , а не кислорода, и рассматривает K^+ -каналы как неотъемлемый компонент H_2O_2 -сенсоров высших животных, один из которых расположен в нейроэпителиальных тельцах легкого и отвечает за сужение дыхательных путей при повышении уровня H_2O_2 , а второй выполняет ту же функцию применительно к кровеносным сосудам, находясь в каротидных тельцах [767]. Повышение концентрации H_2O_2 увеличивает число открытых K^+ -каналов, что приводит

к гиперполяризации клеточной мембраны и ингибированию секреции нейротрансмиттеров. Гипоксия, наоборот, приводит к снижению концентрации H_2O_2 в нейроэндокринных клетках, что индуцирует закрытие K^+ -каналов, деполяризацию мембраны, активацию потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов и последующую секрецию нейротрансмиттеров [766]. Следует отметить, что механизмы функционирования кислородного сенсора зависят от типа клеток.

Функцию рецепции кислорода в каротидных тельцах выполняют гломусные клетки, окруженные поддерживающими клетками и имеющими синаптоподобные связи с окончаниями афферентных волокон языкоглоточного нерва. При гипоксии гломусные клетки выделяют допамин, который вызывает генерацию афферентных нервных импульсов и повышение активности инспираторных нейронов. Последние увеличивают вентиляцию легких в основном за счет учащения дыхания.

В гломусных клетках каротидных телец источником H_2O_2 для регуляции активности K^+ -каналов являются оксидоредуктазы митохондрий [768]. Ключевую роль в работе хеморецептора кислорода выполняет митохондриальный комплекс I [769]. Клетки каротидных телец содержат большое количество митохондрий, расположенных вблизи содержащей K^+ -каналы плазматической мембраны, в результате чего формируются « O_2 -чувствительные микродомены» [769; 770]. Редокс-цепь в этом случае образована колокализированным митохондриальным комплексом I и H_2O_2 -чувствительным K^+ -каналом плазматической мембраны, связь между которыми осуществляется с участием АФК.

В нейроэпителиальных тельцах легких O_2 -чувствительным компонентом хеморецептора кислорода является НАДФН-оксидаза, а именно Nox2 [771–773]. Показано, что в нейроэндокринных клетках нейроэпителиальных телец легких происходит коэкспрессия мРНК для НАДФН-оксидазы и H_2O_2 -чувствительного K^+ -канала [771]. У мышей, нокаутированных по $\text{gp91}^{\text{phox}}$, наблюдается нарушение ответа на гипоксию [772; 774]. Таким образом, структурной основой хеморецептора кислорода в нейроэпителиальных тельцах является редокс-цепь, включающая колокализированные в плазматической мембране белки НАДФН-оксидазу и H_2O_2 -чувствительный K^+ -канал.

Регуляция вазомоторной функции организма. Редокс-цепи, содержащие оксидазы семейства Nox, являются важными элементами трансдукции сигнала при регуляции вазомоторной функции организма. В гладкомышечных клетках сосудов активация Nox1 происходит при передаче сигнала, индуцированного действием вазоконстрикторов. Наиболее изучен путь трансдукции сигнала ангиотензина II. Лиганд-рецепторный комплекс, образованный при взаимодействии ангиотензина II и AT1-рецепторов гладкомышечных клеток сосудов, через G-белок активирует фермент-усилитель фосфолипазу C [775]. Активация фосфолипазы C приводит к гидролизу мембранного фосфолипи-

да фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата (PIP₂) на два соединения, служащие внутриклеточными мессенджерами: водорастворимый инозитол-1,4,5-трифосфат (IP₃) и липидорастворимый диацилглицерол (DAG). Гидрофильный инозитолтрифосфат диффундирует в цитоплазму и в результате взаимодействия с IP₃-рецепторами на мембране внутриклеточных Ca²⁺-депо вызывает освобождение ионов кальция (Ca²⁺). DAG и Ca²⁺ активируют протеинкиназу C, которая фосфорилирует gp91^{phox} [776]. АФК, продуцируемые Nox1, приводят к ингибированию Т-типа Ca²⁺-каналов плазматической мембраны гладкомышечных клеток, что уменьшает частоту кальциевых колебаний и усиливает артериальное сужение [777]. Эффективное ингибирование именно Т-типа Ca²⁺-каналов обеспечивается близкой колокализацией белков в пределах клеточной мембраны. Показано, что фермент Nox1 и мишень действия его продуктов Ca²⁺-канал (Ca_v3.2) располагаются в кавеолах плазматической мембраны в пределах 40 нм [777; 778]. Таким образом, вазоконстрикция при действии ангиотензина II обеспечивается редокс-цепью, включающей колокализованные в кавеолах плазматической мембраны гладкомышечных клеток белки Nox1 и H₂O₂-чувствительный Ca²⁺-канал.

Рецепторные тирозинкиназы и трансмембранная передача сигнала. Редокс-цепи, содержащие колокализованные в мембране ферменты семейства Nox и тирозинфосфатазы, играют важную роль при передаче сигналов, опосредованных активацией рецепторов с тирозинкиназной активностью. Типичные рецепторные тирозинкиназы – это рецепторы инсулина, эпидермального фактора роста и тромбоцитарного фактора роста [779].

Активация рецепторных тирозинкиназ при связывании лигандов осуществляется путем димеризации рецепторов. Образовавшийся димер запускает процессы аутофосфорилирования, в результате которых происходит активация рецептора. Наличие фосфорилированных остатков тирозина является сигналом для связывания адаптерных белков и дальнейшей передачи сигнала в клетку путем тирозинового фосфорилирования белков-субстратов тирозинкиназных рецепторов [255]. Степень и продолжительность фосфорилирования, опосредованного рецепторными тирозинкиназами, могут быть значительно увеличены в результате ингибирования активности тирозинфосфатаз [780]. Поэтому запуск сигнальных систем с участием рецепторных тирозинкиназ сопровождается также активацией супероксид-синтазной системы вторичных мессенджеров (см. разд. 3.3). АФК приводят к усилению фосфорилирования субстратов на начальных стадиях трансдукции сигналов в клетку, обеспечивая таким образом положительную обратную связь. Тип клеточного ответа при активации рецепторных тирозинкиназ определяет набор белков-субстратов, фосфорилируемых киназой.

Одним из первых был описан путь передачи сигналов с участием АФК, инициируемый рецепторами инсулина [781]. Инсулин увеличивает транс-

порт глюкозы в жировых и мышечных клетках в результате стимулирования транслокации транспортера GLUT к плазматической мембране [782]. Сигналом увеличения эндоцитоза GLUT-содержащих везикул является активация рецепторов инсулина. Фосфорилирование инсулиновых рецепторов активирует соответствующие белки-субстраты (insulin receptor substrate (IRS) proteins), которые через ряд эффекторов увеличивают транслокацию, докинг и слияние GLUT-содержащих везикул [783]. При действии инсулина усиление фосфорилирования происходит путем ингибирования тирозинфосфатазы PTP1B с участием H_2O_2 , продуцируемого Nox4 [784; 785]. PTP1B, так же как и Nox4, является ассоциированным с инсулиновым рецептором белком [786], в результате чего обеспечивается эффективное функционирование редокс-цепи и достигается адресная инактивация тирозинфосфатазы H_2O_2 .

Показано также участие PTP1B при передаче сигналов, опосредованных активацией рецепторов эпидермального фактора роста и тромбоцитарного фактора роста [787]. Активация Nox4 является необходимым этапом при стимуляции ангиогенеза в эндотелиальных клетках [788]. В этом случае усиление фосфорилирования при трансмембранной передаче сигнала рецепторами фактора роста эндотелия сосудов активирует МАПК-киназный каскад [789].

Регуляция стрессовых ответов в клетках растений. Сопряженное функционирование НАДФН-оксидаз и ионных каналов в плазматической мембране клеток является важным элементом трансдукции стрессовых и регуляторных сигналов в организмах высших растений [790]. Увеличение продукции АФК в растениях наблюдается при многих стрессах, включая засуху, высокие и низкие температуры, избыток солей в почве, гипоксию, ультрафиолетовую радиацию, ионы тяжелых металлов и многие другие [791]. Рост катионной проводимости плазматической мембраны является сопутствующим фактором данных стрессов [792].

Впервые АФК-зависимые катионные каналы в листьях высших растений были описаны в замыкающих клетках устьиц [793]. Активация АФК-зависимых Ca^{2+} -каналов в плазматической мембране замыкающих клеток необходима для снижения тургорного давления при закрытии устьиц во время засухи. Повышение внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} активирует Ca^{2+} -зависимые анионные каналы, приводя к оттоку анионов и воды из замыкающих клеток [794].

Открытие Ca^{2+} -каналов замыкающих клеток инициируют АФК, генерируемые НАДФН-оксидазой, в то время как НАДФН-оксидаза, в свою очередь, активируется фосфорилированием при действии абсцизовой кислоты, фитогормона засухи [795]. В настоящее время АФК-зависимые ионные каналы обнаружены во многих типах растений, включая харофиты *Nitella flexilis*, двудольные растения *Arabidopsis thaliana*, *Pyrus pyrifolia* и *Pisum sativum*,

и однодольный *Lilium longiflorum* [790]. В. В. Демидчиком предложена концепция взаимодействия АФК и ионных каналов в плазматической мембране высших растений [790; 796]. Согласно данной концепции стрессовые и регуляторные стимулы при взаимодействии с рецепторами-протеинкиназами плазматической мембраны активируют НАДФН-оксидазу. H_2O_2 , образующийся в результате дисмутации $\text{O}_2^{\cdot-}$, является источником $\text{HO}^\bullet$ радикалов, которые, в свою очередь, активируют Ca^{2+} -каналы или K^+ -каналы плазматической мембраны. Повышение внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} активирует сигнальные каскады, регулирующие экзоцитоз, рост или программируемую клеточную гибель. Выход ионов K^+ из клетки стимулирует программируемую клеточную гибель, аутофагию и изменения метаболизма, необходимые для репаративных и адаптационных процессов.

Редокс-цепи при регуляции апоптоза. Внутриклеточная локализация структур, продуцирующих АФК, является важным фактором, определяющим специфичность действия окислителей при апоптозе. Нами показано, что механизм аскорбатзависимой регуляции Ca^{2+} -сигналикации при апоптозе клеток включает усиление локальной продукции АФК за счет участия таких оксидоредуктаз, как НАДН : убихинон оксидоредуктаза и убихинолцитохром с оксидоредуктаза [797; 798]. Аскорбатиндуцированный выход Ca^{2+} из внутриклеточных Ca^{2+} -депо происходит с участием АФК, образующихся в электрон-транспортной цепи митохондрий. Антимитин А активирует образование H_2O_2 комплексом III, приводящее к увеличению аскорбатиндуцированного кальциевого ответа клеток. Ротенон, в свою очередь, блокирует перенос электронов в комплексе I дыхательной цепи и ингибирует образование H_2O_2 комплексом III [799], что снижает увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$, вызванное действием аскорбата и антимитина А. В предложенном механизме действия аскорбиновой кислоты, кроме редокс-активных соединений и их мишеней, в редокс-регуляторных процессах участвуют также белки-ферменты – оксидоредуктазы, локализация которых вблизи белков-мишеней определяет специфический отклик клеток (рис. 4.14).

Многочисленные данные литературы, а также результаты собственных исследований позволяют предположить, что генерация АФК митохондриями является одним из универсальных механизмов ответа клеток на действие ряда факторов, включая противоопухолевые препараты. Согласно данному механизму повышение генерации АФК митохондриями индуцирует открытие пор высокой проводимости в митохондриальных мембранах, в результате чего происходит высвобождение апоптозиницирующих факторов в цитозоль. На основании собственных и литературных данных можно построить схему, иллюстрирующую ключевые элементы данного механизма.

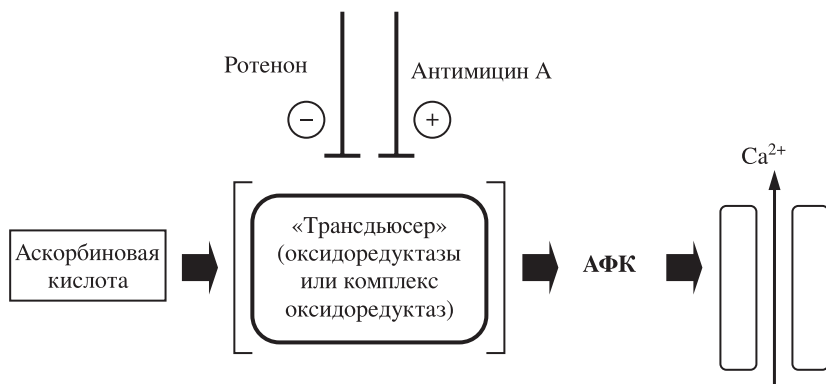


Рис. 4.14. Схема механизма аскорбатиндуцированной редокс-регуляции высвобождения Ca^{2+} из внутриклеточных депо

Преобразование внутриклеточного сигнала митохондриями можно разделить на три этапа (рис. 4.15). На первом этапе осуществляется рецепция и преобразование внутриклеточного сигнала, в результате которого усиливается генерация АФК митохондриями. На втором этапе с участием АФК осуществляется трансдукция сигнала на соответствующий редокс-сенсор. Третий этап – это активация редокс-сенсора, в результате которой запускается клеточный ответ.

Образование АФК в митохондриях протекает с участием различных оксидоредуктаз (см. разд. 1.3). Предполагается также, что образование АФК может осуществляться с участием проапоптотического белка p66^{Shc} , который расположен в межмембранном пространстве митохондрий и в результате редокс-циклирования с цитохромом c приводит к образованию H_2O_2 [800]. Увеличение выхода АФК в электрон-транспортной цепи митохондрий происходит при увеличении трансмембранного потенциала на внутренней мембране митохондрий [89]. Активация генерации АФК митохондриями также происходит при действии различных химических агентов, включая ряд противоопухолевых и сердечно-сосудистых препаратов. В области химиотерапии растущее число исследований посвящено изучению нового класса противоопухолевых препаратов, местом действия которых является митохондрия. Такие соединения получили название «митоканы» [801; 802]. Несмотря на то что данные соединения различаются по химической структуре, молекулярные механизмы их действия имеют много общего. Данные соединения, являясь ингибиторами различных митохондриальных ферментов, усиливают образование АФК в митохондриях [803].

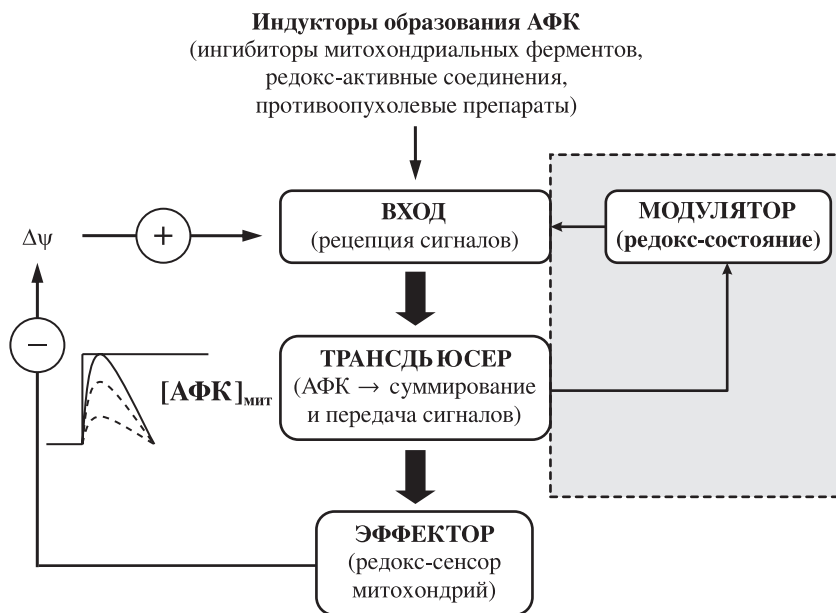


Рис. 4.15. Схема трандукции внутриклеточного сигнала в митохондриях

Трансдукция сигнала на митохондриальный эффектор осуществляется только при достижении определенного уровня генерации АФК, необходимого для активации соответствующего редокс-сенсора. При активации митохондриального апоптоза сенсором повышения концентрации АФК (изменения митохондриального редокс-состояния) выступают сульфгидрильные группы адениннуклеотидного транспортера ANT внутренней мембраны митохондрий. Падение трансмембранного потенциала приводит к снижению генерации АФК, что, вероятно, выполняет роль обратной связи в данном механизме (см. рис. 4.15).

Нами показано, что тимохинон, инициирующий более низкий выход АФК в сравнении с 1,4-бензохиноном, более токсичен в отношении опухолевых клеток [804]. Высокая в сравнении с 1,4-бензохиноном токсичность тимохинона обусловлена активацией редокс-сигнального механизма запуска апоптоза, ключевым элементом которого является колокализация митохондриальных оксидоредуктаз, участвующих в продукции окислителей, и соответствующего редокс-сенсора – АДФ/АТФ-транслоказы [805; 806]. Таким образом, методы направленной индукции АФК в клетках с использованием редокс-активных соединений и регуляторов активности АФК-про-

дуцирующих ферментов могут быть использованы для регуляции ряда клеточных функций, включая программы клеточной гибели.

Разнообразие входных сигналов для данного механизма позволяет рассматривать митохондрии в качестве «сумматора» физико-химических сигналов: в рамках предложенного механизма активация трансдукции сигнала может происходить как при действии одного фактора, так и при действии комплекса факторов. Существенным элементом предложенного нами механизма является также зависимость работы данного трансдьюсера сигналов от величины параметров редокс-состояния клетки (см. разд. 5.2).

Редокс-состояние как фактор сигнализации. Для функционирования специфических редокс-сигнальных механизмов необходимы соответствующие внутриклеточные редокс-условия. Поскольку на каждой фазе клеточного цикла активируются специфические сигнальные механизмы, внутриклеточные редокс-условия изменяются на протяжении всего цикла. Нами оценено изменение значения эффективного редокс-потенциала в фибробластах при индуцировании смены стадий жизненного цикла H_2O_2 [657]. Полученные данные схематически представлены на рис. 4.16.

Различным функциональным состояниям клетки соответствует свой диапазон значений эффективного редокс-потенциала. В фибробластах процессам пролиферации соответствует диапазон значений эффективного

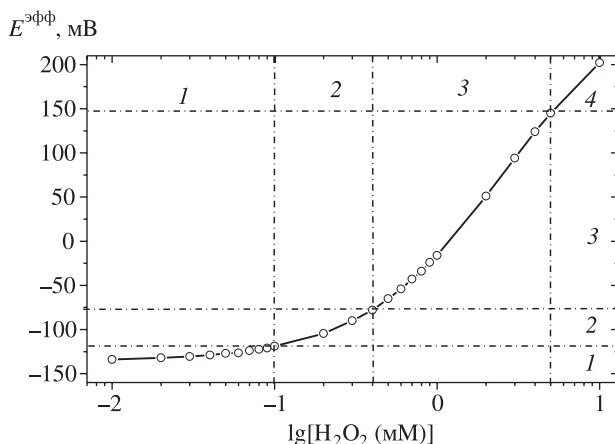


Рис. 4.16. Зависимость эффективного редокс-потенциала фибробластов от концентрации H_2O_2 :

- 1 – область протекания процессов пролиферации;
- 2 – область протекания процессов дифференцировки;
- 3 – область протекания процессов апоптоза;
- 4 – область протекания процессов некроза

редокс-потенциала от -150 до -120 мВ, процессам дифференцировки – от -120 до -75 мВ, процессам апоптоза – от -75 до $+150$ мВ, процессам некроза – от $+150$ мВ и выше. Таким образом, электронодонорная способность клетки уменьшается при переходах от пролиферации к дифференцировке и при переходах от дифференцировки к программируемой гибели.

Нами показано, что различным типам клеток, тканей и органелл соответствуют свои значения эффективного редокс-потенциала и редокс-буферной емкости [658; 678; 749]. Поэтому диапазон значений эффективного редокс-потенциала, характерный процессам пролиферации, дифференцировки и апоптоза, может существенно различаться в разных типах клеток. Следует обратить внимание на тот факт, что если рост концентрации окислителей инициирует переход клеток от пролиферации к дифференцировке, то увеличение концентрации восстановителей в клетке может индуцировать обратный переход – от дифференцировки к пролиферации [3; 749]. Значительное повышение концентрации восстановителей индуцирует нарушение клеточного функционирования и приводит к восстановительному стрессу, участие которого в развитии сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний рассмотрено в гл. 5.

На основании приведенных выше данных можно заключить, что различия величины окислительно-восстановительного баланса в биологических структурах, количественным выражением которых являются эффективный редокс-потенциал и редокс-буферная емкость, – это общий признак, характеризующий самые разнообразные процессы и структуры в организме.

Вводимые физико-химические параметры – важные характеристики многоклеточных организмов, тканей, клеток и клеточных органелл. Изменения параметров редокс-состояния наблюдаются:

- в течение жизненного цикла клеток (пролиферация, дифференцировка, апоптоз);
- при патологии, включая рак;
- в процессе старения организма.

Стресс – это не то, что с вами случилось,
а то, как вы это воспринимаете.

Ганс Селье

Глава 5

АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА ПРИ СТРЕССЕ И ПАТОЛОГИИ

5.1. Окислительный и восстановительный стресс. Гормезис и митогормезис

История изучения свободнорадикальных процессов в живых системах началась в середине прошлого века, когда образование окислителей в организме начали связывать с развитием хронических и дегенеративных заболеваний. В 1954 году Р. Гершман с соавторами высказал предположение о том, что известные токсические эффекты кислорода обусловлены образованием его активных радикальных интермедиатов [807]. В том же году Б. Н. Тарусов высказал гипотезу о том, что развитие лучевой болезни вызвано индукцией цепной разветвленной реакции окисления липидов, продукты которой являются для клетки токсичными [808]. В 1963 году Н. М. Эмануэль предположил, что не только радикалы липидов, но и радикалы других веществ (ДНК, белков, углеводов и др.), образующиеся при воздействии радиоактивного излучения, могут вызывать многочисленные повреждения в клетке [809]. В последующем интерес ученых к исследованию роли свободных радикалов и других активных форм кислорода при различной патологии все более возрастал. Развитие исследований в данной области значительно расширило список заболеваний и патологических процессов, объединяемых понятием «свободнорадикальные» [7; 810].

В настоящее время нарушения функционирования биосистем в живых системах связывают не столько со свободнорадикальным повреждением, сколько с нарушением процессов переноса электронов между макромолекулами и редокс-активными соединениями. Под влиянием многочисленных работ в области редокс-регуляции сегодня происходит переоценка роли свободнорадикальных процессов в функционировании организмов и изменя-

ется понимание ряда основных терминов свободнорадикальной медицины, включая понятие «окислительный стресс».

Термин «окислительный стресс» был введен Х. Зисом в 1985 году. Согласно этому определению «окислительный стресс – это нарушение баланса про- и антиоксидантов в пользу первых» [811]. В 1991 году появилась новая редакция термина [812], по ней окислительный стресс – это нарушение баланса про- и антиоксидантов в пользу первых, которое может привести к повреждению. Полученные данные о регуляторной роли окислителей, с одной стороны, и неэффективность антиоксидантной терапии в борьбе с последствиями окислительного стресса, с другой стороны, привели к тому, что в 2006 году Д. Джонс определил окислительный стресс как нарушение редокс-сигналикации и контроля [813]. В противовес свободнорадикальной гипотезе повреждения биосистем в 2008 году Д. Джонс выдвинул «редокс-гипотезу», основанную на 4 постулатах [814]: 1) «Все биологические системы содержат редокс-элементы, которые функционируют в клеточной сигнализации, движении макромолекул и физиологической регуляции; 2) организация и координация редокс-активности этих элементов осуществляется через редокс-цепи, включающие общие контролируемые узлы (т. е. тиоредоксин, GSH); 3) редокс-чувствительные элементы пространственно и “кинетически” изолированы, так что вентильные (ключевые) редокс-цепи могут быть активированы транслокацией/агрегацией и/или каталитическими механизмами; 4) окислительный стресс представляет собой нарушение функционирования этих цепей, вызванное конкретной реакцией с тиольными редокс-чувствительными элементами при изменении путей переноса электронов или разрывом “вентильных” механизмов, контролирующих поток через эти пути». Таким образом, в рамках новых представлений об окислительном стрессе патологические нарушения в организме могут возникать не только в результате прямого повреждения биомолекул окислителями (что уже изучается на протяжении многих лет), но и в результате нарушения процессов сигнализации с участием АФК и антиоксидантов.

Еще Г. Селье выделял два вида стресса: эустресс и дистресс [815]. Эустресс определяется как положительный стресс, мобилизующий организм, а дистресс – вредоносный для организма стресс. В настоящее время окислительный стресс также разделяется на два типа [816]. Физиологический уровень окислителей, необходимый для реализации жизненно важных процессов редокс-сигналикации, называется окислительным эустрессом. В этом случае взаимодействие окислителей происходит только со специфическими мишенями. Более высокий уровень окислителей, когда они взаимодействуют также и с неспецифическими мишенями, обозначается как окислительный дистресс.

В соответствии с современным определением окислительный стресс – это дисбаланс между оксидантами и антиоксидантами в пользу оксидантов, ведущий к нарушению редокс-сигналикации и контроля и/или к поврежде-

нию макромолекул [817]. Важным аспектом современного понимания проблемы редокс-регуляции в биологических системах является обоснование того факта, что нарушение редокс-сигнальных процессов может происходить не только в результате повышения концентрации окислителей, но и в результате накопления восстановителей в клетке, что характеризуется как восстановительный стресс [749; 818]. При высоком содержании восстановителей в клетке окислители, продуцируемые в физиологических процессах, уже не могут активировать специфические мишени. Восстановительный стресс следует рассматривать как дисбаланс между окислителями и восстановителями в пользу восстановителей, ведущий к нарушению редокс-сигнализации и функционирования клеток.

К настоящему времени получены многочисленные экспериментальные данные, свидетельствующие об участии восстановительного стресса в развитии ряда заболеваний. Например, показано, что усиление восстановительных процессов играет важную роль в этиологии сердечно-сосудистых заболеваний.

Ключевым молекулярным событием, связанным с восстановительным стрессом в патофизиологии сердечно-сосудистых заболеваний, вероятно, является нарушение пространственной структуры белков, вызванное снижением числа внутримолекулярных дисульфидных связей в присутствии высоких концентраций восстановителей. В результате изменения редокс-потенциала цистениновых остатков боковых цепей усиливается агрегация белков, что способствует развитию кардиомиопатии [819; 820]. В экспериментах на линии трансгенных мышей R120GCryAB с мутацией белка теплового шока α B-кристаллина показано, что развитие кардиомиопатии, обусловленной агрегацией белков, сопровождается восстановительным стрессом [821].

α B-Кристаллин относится к белкам-шаперонам, регулирующим фолдинг белков и белок-белковые взаимодействия [822]. В кардиомиоцитах трансгенных мышей линии R120GCryAB развитие восстановительного стресса обусловлено высокой активностью Nrf2 и повышенной экспрессией каталазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и GPx-1 [823]. Повышение внутриклеточного содержания белков теплового шока также способствует восстановительному стрессу. У мышей с повышенной экспрессией Hsp27 наблюдалось развитие сердечной гипертрофии и снижение сократительной функции. Развитие гипертрофии сопровождалось ростом величины отношения GSH/GSSG, экспрессии и активности глутатионпероксидазы-1 и снижением продукции АФК [824]. Ингибирование GPx-1 снижало гипертрофию и улучшало сократительные функции сердечной мышцы. В модельных экспериментах на животных показано, что сверхэкспрессия белков антиокислительной системы может индуцировать развитие патологических состояний, характерных и для других заболеваний [825]. Так, глобальная сверхэкспрессия Gpx1 у не страдающих ожирением мышей вызывает гипергликемию, инсулинорезистентность

и гипертрофию β -клеток поджелудочной железы [826]. Лауреат Нобелевской премии Д. Уотсон предположил, что нарушение пространственной структуры белков, обусловленное восстановительным стрессом, способствует развитию диабета второго типа, деменции, сердечно-сосудистых заболеваний и некоторых форм рака [827]. В качестве возможного профилактического средства данных заболеваний Д. Уотсон рассматривает физические упражнения, поскольку их выполнение сопровождается повышением продукции АФК.

Физические упражнения индуцируют повторяющееся воздействие острого метаболического, терморегуляторного, гипоксического, окислительного и механического стресса. Именно это воздействие стимулирует компенсаторную физиологическую адаптацию, которая улучшает толерантность организма к последующим аналогичным стрессорам [828]. Процесс, посредством которого организм приспосабливается к определенному стрессу в стремлении восстановить нормальный гомеостаз, первоначально назывался «общий адаптационный синдром» [829], а в настоящее время характеризуется понятием «гормезис» [830]. Термин «гормезис» используется для описания явлений, в которых физические или химические факторы индуцируют противоположно направленные биологические ответы при разных дозах: стимулирующие и защитные эффекты при низких дозах и токсические при высоких [831]. Гормезис отличается от традиционной линейной реакции, когда увеличение воздействия потенциально вредных факторов стресса приводит к увеличению уровня повреждения, и лучше всего представлено J- или колоколообразной кривой, указывающей, что очень низкая или очень высокая экспозиция вредна, а умеренная – полезна или даже необходима (рис. 5.1). Таким образом, гормезис – это процесс, при котором воздействие низкой дозы стрессора способствует адаптивным изменениям в клетке, что позволяет ей лучше переносить последующий стресс.

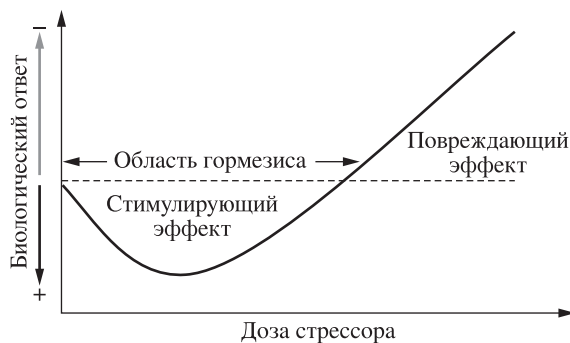


Рис. 5.1. Зависимость адаптивного ответа клетки при действии стрессора

Ключевая роль митохондрий в регуляции адаптационного ответа клетки привела к концепции митогормезиса, согласно которой изменения митохондриального гомеостаза координируют ядерный и цитозольный ответ клетки при адаптации [832–834]. Для формирования ответа клетки на изменения митохондриального функционирования необходима передача информации от митохондрий к ядру клетки. Наиболее вероятным носителем информации при активации адаптационных процессов выступают митохондриальные АФК [105; 106]. АФК, продуцируемые митохондриями, являются ключевыми участниками путей трансдукции сигнала от митохондрий к ядру при активации клеточного ответа на действие стрессирующих факторов и ряда регуляторов [105; 835]. Показано, что генерируемые электрон-транспортной цепью митохондрий АФК участвуют в регуляции экспрессии генов [836] и апоптоза [837]. Специфичность ответа при этом зависит от количественных параметров митохондриального сигнала.

Повышение митохондриальной продукции АФК запускает адаптационный ответ клеток при гипоксии, холодовой адаптации и тепловом стрессе [309]. В настоящее время молекулярные механизмы, объясняющие благоприятное действие физических нагрузок в продлении жизни и профилактике многих заболеваний, также связывают с кратковременным усилением продукции АФК в митохондриях скелетных мышц [838]. В экспериментах *in vivo* показано, что использование антиоксидантных препаратов после физических нагрузок блокирует развитие адаптационных метаболических изменений [839]. Таким образом, направленная коррекция редокс-метаболизма клеток открывает новые возможности регуляции свойств клеток в норме и при патологии.

5.2. Восстановительный стресс при онкологических заболеваниях

Поиск эффективных методов лечения и профилактики онкологических заболеваний, несмотря на достигнутые в последние десятилетия успехи, остается одной из наиболее актуальных задач в медицине. Смертность от онкологических заболеваний занимает в мире второе место после заболеваний сердечно-сосудистой системы. Между тем до сих пор не существует общепринятой теории канцерогенеза.

В современном понимании канцерогенез представляет многоэтапный процесс трансформации клеток здоровой ткани, приводящий к злокачественным образованиям. Большинство исследователей считают, что в основе образования любой опухоли лежат необратимые изменения генома в определенной популяции клеток. Согласно теории онкогенов ключевую роль в процессе трансформации нормальной клетки в опухолевую играют

нарушения функции протоонкогенов и опухолевых супрессоров. В последние годы достигнут значительный прогресс в идентификации генов и выяснении роли продуктов этих генов в процессах развития опухолей. Это позволило выделить ряд важнейших свойств, характерных для клеток опухолевых тканей. Среди этих свойств следует отметить высокую пролиферативную активность, иммортализацию и ослабление индукции апоптоза [487].

Наряду с геномными нарушениями важную роль в канцерогенезе отводят изменениям метаболизма кислорода [840], что является современным развитием концепции О. Варбурга [841]. При увеличении скорости пролиферации клеток происходит перестройка метаболизма, в результате которой метаболиты из катаболических процессов перенаправляются в анаболические процессы. Полное окисление аминокислот, углеводов и жирных кислот до H_2O и CO_2 осуществляется ферментами митохондрий. Поэтому для усиления процессов биосинтеза в процессах клеточного деления необходимо снижение активности ряда митохондриальных ферментов. Показано, что в опухолевых клетках наблюдается снижение активности ферментов цикла трикарбоновых кислот в результате выхода из митохондрий цитрата, который затем используется в синтезе жирных кислот и холестерина [842]. С использованием различных типов опухолевых клеток установлено, что их скорость деления зависит от активности ферментов дыхательной цепи [843]. В быстро делящихся клетках активность ферментов дыхательной цепи ниже, чем в медленно делящихся клетках. С. Галли с коллегами показал, что активность электрон-транспортных комплексов I-IV, Mn-COD и mtNOS в клетках аденокарциномы линий M3, MM3 и P07 в несколько раз ниже, чем активность этих ферментов в гепатоцитах [844]. Для многих типов опухолей модификации митохондриального аппарата клеток включают также уменьшение числа митохондрий [845], ингибирование пируватдегидрогеназного комплекса [846], изменения формы и размеров митохондрий [847], снижение экспрессии β -субъединицы H^+ -АТФ-синтазы [848] и накопление мутаций митохондриальной ДНК [849].

Нарушение в работе митохондриального аппарата клетки приводит к снижению окислительного фосфорилирования, в результате восполнение недостатка энергии компенсируется стимуляцией метаболизма глюкозы путем анаэробного гликолиза. Феномен повышенного окисления глюкозы до лактата, наблюдающийся в опухолевых клетках, получил название эффекта Варбурга [850]. Интенсификация гликолиза в опухолевых клетках подтверждена исследованиями, проводимыми на уровнях генома, протеома и метаболическом уровне [851]. Способность опухолевых клеток накапливать глюкозу в настоящее время используется при диагностике онкологических заболеваний с помощью позитронно-эмиссионной томографии [852].

Высокая пролиферативная активность, ослабление индукции апоптоза, иммортализация, лекарственная резистентность и другие свойства опухолевых клеток могут быть опосредованы изменением метаболизма, что позволяет некоторым авторам рассматривать рак как метаболическое заболевание [853]. Ключевым сигналом в изменении метаболизма клеток может служить усиление генерации АФК митохондриями, в результате которого наблюдаются изменения активности ферментов и экспрессии генов [854]. Эффект Варбурга вызывает изменение редокс-потенциала митохондрий, необратимо приводящее к изменениям в генерации АФК [855]. Интенсификация метаболизма глюкозы является важным шагом в детоксикации АФК посредством увеличения переноса электронов на НАДФН (через пентозофосфатный путь) и GSH (с участием глутатионредуктазы). В результате измененный редокс-гомеостаз опухолевых клеток характеризуется повышенным содержанием восстановителей (антиоксидантов) [695; 749]. Из-за высокого (по сравнению с клетками тканей в норме) содержания глутатиона опухолевые клетки обладают повышенной резистентностью к индукторам апоптоза [856; 857]. Снижение внутриклеточной концентрации глутатиона и повышение внутриклеточной генерации АФК является одним из способов активации апоптоза клеток различных опухолей [858; 859].

Ввиду сложности и многообразия процессов с участием редокс-активных молекул возникла парадоксальная ситуация. Повышение внутриклеточной концентрации АФК рассматривается и как индуктор канцерогенеза [860], и как способ индуцирования гибели опухолевых клеток [3; 861]. Окислительный стресс индуцируется многими канцерогенами и индукторами апоптоза [860]. С одной стороны, синтетические и природные антиоксиданты рекомендуются в качестве протекторов канцерогенеза, с другой – окислительный стресс является необходимым этапом действия ряда противоопухолевых агентов и может усиливаться некоторыми антиоксидантами. Наряду с этим сами противоопухолевые агенты (адриамицин, дауномицин, 1,4-бензохинон и др.) могут также инициировать канцерогенез [860; 862].

Кажущееся противоречие о ключевой роли АФК в канцерогенезе и методах противоопухолевой терапии снимается в рамках концепции редокс-сигнализации, согласно которой эффект регуляции функциональной активности клеток определяется не только типом и величиной концентрации АФК, но и типом и величиной концентрации клеточных антиоксидантов, а также местом образования АФК. Так, образование АФК вблизи ядра может вызывать повреждения ДНК и инициировать канцерогенез (рис. 5.2). Генерация АФК вблизи ядра, вероятно, опосредована действием канцерогенов.

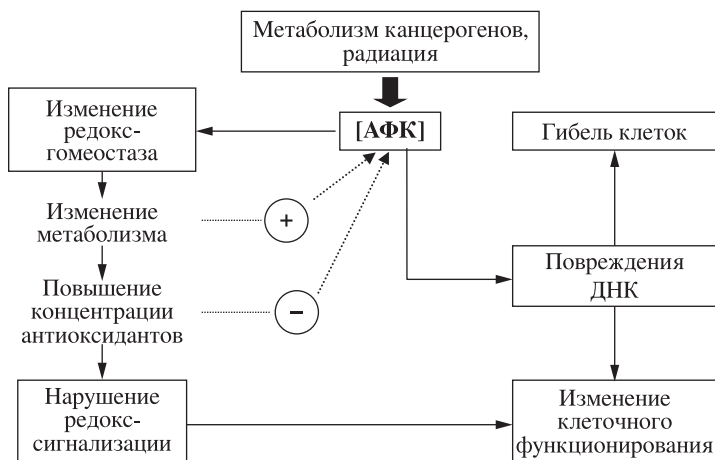


Рис. 5.2. Схема АФК-индуцированного канцерогенеза

Известно, что образование АФК происходит в результате метаболизма многих канцерогенов, протекающего с участием цитохрома Р450, который располагается на мембране гладкого эндоплазматического ретикулума, локализованной вблизи ядра.

С другой стороны, повышение уровня АФК в клетках вызовет ответ систем регуляции редокс-гомеостаза, направленный на его снижение путем увеличения концентрации антиоксидантов («редокс-адаптация»). Изменение метаболизма клетки путем переключения с окислительного на субстратное фосфорилирование можно рассматривать как один из способов повышения концентрации основных клеточных антиоксидантов. Редокс-адаптация клеток путем повышения уровня антиоксидантов усиливает резистентность клеток к ионизирующей радиации и к действию ряда лекарственных соединений. В результате повышения концентрации антиоксидантов нарушается редокс-сигналикация, что способствует изменению клеточного функционирования и возникновению рака.

Данные литературы позволяют сделать вывод о значительных отличиях величин параметров редокс-состояния нормальных и опухолевых тканей. Определенные нами количественные показатели редокс-состояния ($E^{\text{эФ}}$ и r) для печени в норме, карциномы печени, фибробластов и клеток фибросаркомы представлены в табл. 5.1. Из представленных данных видно, что в опухолевых тканях в сравнении с тканями в норме наблюдается снижение величины $E^{\text{эФ}}$ и повышение r . В результате изменения величины параметров редокс-гомеостаза функциональный ответ трансформированных клеток на

внеклеточные сигналы отличается от реакции нормальных клеток: внеклеточный сигнал, индуцирующий достаточное для активации процессов апоптоза повышение внутриклеточной концентрации окислителей в нормальных клетках, в трансформированных клетках будет индуцировать повышение концентрации окислителей, характерное лишь для процессов пролиферации (рис. 5.3). Дальнейший рост концентрации восстановителей будет способствовать формированию резистентности опухолевых клеток.

Таблица 5.1

Эффективный редокс-потенциал и редокс-буферная емкость нормальных и опухолевых клеток

Тип объекта	$E^{\text{эф}}$, мВ (pH 7,2)	Редокс-буферная емкость по H_2O_2 , мМ/В (pH 7,0)	Редокс-буферная емкость по $\text{HO}^{\cdot}$, мМ/В (pH 7,0)
Печень человека	-210	27	5,9
Карцинома печени человека	-230	48	11
Клетки линии Chang (гепатоциты человека)	-208	26	5,6
Клетки линии Нер G2 (клетки гепатомы человека)	-220	36	7,7
Фибробласты кожи человека	-135	11,4	2,2
Клетки фибросаркомы человека	-180	16,6	3,4

Примечание. При расчетах использованы данные [863–866].

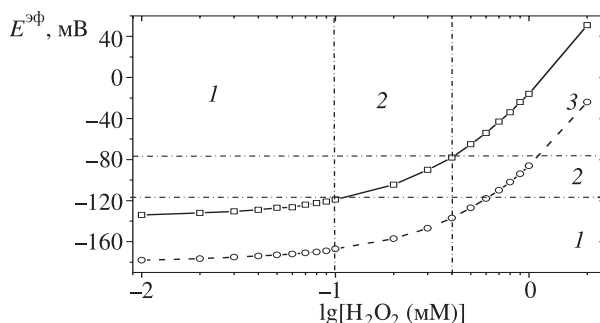


Рис. 5.3. Зависимость эффективного редокс-потенциала фибробластов (непрерывная линия) и эффективного редокс-потенциала клеток фибросаркомы (прерывистая линия) от концентрации H_2O_2 :

1 – область пролиферации; 2 – область дифференцировки;
3 – область апоптоза

Нами показано, что антиоксиданты могут вызывать противоположно направленные изменения редокс-свойств и химиорезистентности опухолевых клеток [867–869]. В экспериментах с клетками карциномы гортани человека линии НЕР-2 некоторые антиоксиданты в низких микромолярных концентрациях стимулировали пролиферацию клеток. Так, значительное (примерно в 1,5 раза) увеличение скорости роста клеток наблюдалось при действии аскорбата и 3,5-диметил-4-гидроксibenзилтиоэтанoата калия (БЭК-11-К), тогда как НАС не вызывал изменения скорости, а 3-(3'-трет-бутил-4'-гидроксифенил)-пропилтиосульфoнат натрия (ТС-13) индуцировал ее снижение. Изменения скорости роста сопровождаются изменениями редокс-гомеостаза клеток. Установлено, что БЭК-11-К увеличивает редокс-буферную емкость и резистентность опухолевых клеток к доксорубину. При действии ТС-13 наблюдается уменьшение редокс-буферной емкости, что приводит к снижению химиорезистентности опухолевых клеток.

Изменения внутриклеточного редокс-состояния влияют на процессы взаимодействия окислителя и мишени, что можно зарегистрировать с применением флуоресцентного зонда 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеина (H_2DCF) [751; 752]. Нами показано, что кинетика интенсивности флуоресценции DCF, образующегося после окисления H_2DCF пероксидом водорода, существенно различается в клетках, культивируемых с антиоксидантами ТС-13, БЭК-11-К и без них (рис. 5.4) [867; 870].

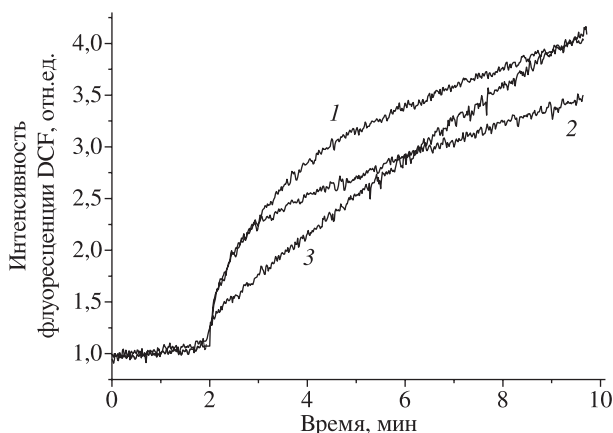
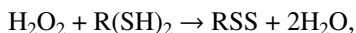


Рис. 5.4. Влияние H_2O_2 (100 мкМ) на интенсивность флуоресценции DCF в суспензии клеток линии НЕР-2:
1 – контроль; 2 – клетки культивировали в присутствии БЭК-11-К (60 мкМ); 3 – клетки культивировали в присутствии ТС-13 (60 мкМ)

Уменьшение величины редокс-буферной емкости, наблюдаемое в клетках, культивируемых с антиоксидантом ТС-13, приводит к увеличению скорости окисления зонда H_2DCF . Введение антиоксиданта БЭК-11-К в культуру опухолевых клеток запускает компенсаторный адаптационный ответ, в результате которого изменяется внутриклеточное содержание редокс-активных соединений, в первую очередь восстановителей. В клетках линии НЕР-2, культивируемых с антиоксидантом БЭК-11-К, рост концентрации восстановителей в сравнении с немодифицированными клетками приводит к снижению количества окисляемого пероксидом водорода зонда, что отражается в уменьшении интенсивности флуоресценции DCF, образующегося в клетках при окислении H_2DCF пероксидом водорода. Аналогичный эффект наблюдается и при трансдукции сигнала в клетках с участием АФК. Увеличение содержания восстановителей в клетке вызывает снижение числа АФК, взаимодействующих с белком-мишенью, в результате изменяется функциональный отклик клеток.

Для обоснования концепции редокс-регуляции химиорезистентности опухолевых клеток, учитывающей роль физико-химических механизмов в ингибировании программы клеточной гибели, нами была разработана биофизическая модель редокс-зависимого механизма активации апоптоза [867].

В рамках данной модели белковые тиолы рассматриваются как нанопереклюватели в процессах трансдукции сигналов с участием пероксида водорода, что описывается следующей реакцией:



где $\text{R}(\text{SH})_2$ – восстановленная форма белковых тиолов; RSS – белковый дисульфид.

Для запуска механизма апоптоза необходимо окисление определенного числа SH-групп (мишеней), что является порогом активации для данного процесса. Поскольку пероксид водорода может также участвовать в реакциях с восстановителями, содержание и тип которых определяют редокс-свойства внутриклеточного окружения, то величина концентрации окисленных SH-групп сенсора, образующихся при действии пороговой концентрации индуктора, зависит от внутриклеточной концентрации восстановителей.

Молекулы H_2O_2 могут взаимодействовать как с SH-группами сенсора, приводя к образованию активной (окисленной) формы сенсора (RSS), так и с молекулами восстановителей, при этом концентрация восстановленных SH-групп сенсора ($\text{R}(\text{SH})_2$) не изменяется. С ростом концентрации восстановителей количество окисленных SH-групп сенсора будет уменьшаться, и наоборот, при уменьшении концентрации восстановителей количество окисленных пероксидом водорода SH-групп сенсора будет увеличиваться. Таким образом, трансдукция сигнала с участием пероксида водорода при актива-

ции апоптоза будет зависеть от редокс-условий внутриклеточного окружения сенсора. Используя модель, рассмотренную в разд. 4.2, можно показать, что

$$[\text{RSS}] = c_0 \frac{1}{\sum_{i=1}^n z_i c_i + \frac{z_{\text{ок}} c_{\text{ок}}}{1}}, \quad (5.1)$$

где $[\text{RSS}]$ – концентрация окисленных SH-групп сенсора; $z_{\text{ок}}$ – число электронов, которые присоединяет молекула окислителя, переходя в восстановленную форму; $c_{\text{ок}}$ – концентрация окислителя; z_i – число электронов, которые переносятся с молекулы восстановителя при окислении; c_i – концентрация i -го восстановителя; n – число различных типов редокс-пар, участвующих в формировании редокс-состояния.

В рамках термодинамического описания процесса имеем

$$\Delta E^{\text{эф}} = \frac{\Delta E_{\text{max}}^{\text{эф}}}{\sum_{i=1}^n z_i c_i + \frac{z_{\text{ок}} c_{\text{ок}}}{1}}. \quad (5.2)$$

Из выражения (5.1) с учетом (5.2) следует, что редокс-сенсоры являются сенсорами изменений величины эффективного редокс-потенциала

$$[\text{RSS}] \sim \Delta E^{\text{эф}}. \quad (5.3)$$

Изменение концентрации пероксида водорода вызывает изменение величины эффективного редокс-потенциала, что, в свою очередь, приводит к изменению редокс-потенциала сенсора и запуску клеточного ответа. При действии окислителя (пероксида водорода) величина индуцированного им изменения эффективного редокс-потенциала зависит от редокс-буферной емкости.

Из (5.2) с учетом (4.6) следует, что при низких концентрациях окислителя $c_{\text{ок}} \left(c_{\text{ок}} \ll \sum_{i=1}^k c_i z_i \right)$ зависимость $\Delta E^{\text{эф}}(c_{\text{ок}})$ выражается как

$$\Delta E^{\text{эф}} \approx \frac{c_{\text{ок}}}{r}. \quad (5.4)$$

Активация редокс-сенсора (а следовательно, и активация апоптоза) осуществляется при достижении определенной величины внутриклеточного эффективного редокс-потенциала и зависит от редокс-буферной емкости. Согласно предложенной модели повышение редокс-буферной емкости клеток должно приводить к ослаблению апоптоза. В свою очередь, снижение редокс-буферной емкости, наоборот, будет способствовать усилению апоптоза.

При действии индукторов, активирующих запуск апоптоза по редокс-зависимому механизму, увеличение редокс-буферной емкости клеток на 50 %, согласно (5.3) и (5.5), приведет к увеличению числа выживших клеток примерно на 50 %. В субпопуляции клеток карциномы гортани, модифицированных БЭК-11-К, количество выживших при действии доксорубина и тимохинона клеток было в 1,5 раз выше, чем в культуре немодифицированных клеток (рис. 5.5) [867; 868]. С другой стороны, индуцируемые при действии ТС-13 изменения редокс-гомеостаза способствуют снижению резистентности опухолевых клеток к доксорубину.

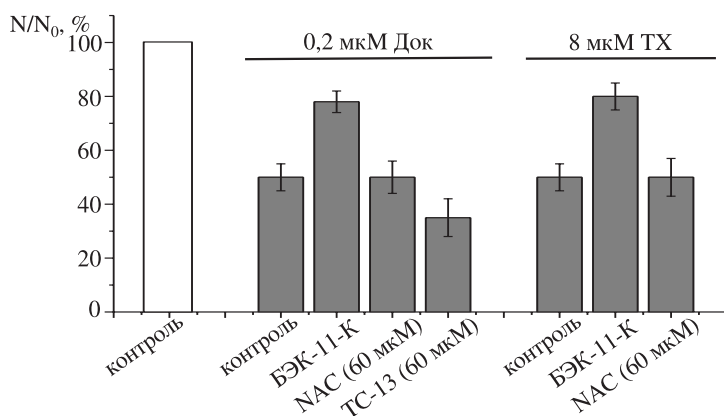


Рис. 5.5. Изменение числа клеток линии НЕР-2 при культивировании с доксорубином (Док) и тимохиноном (ТХ):

БЭК-11-К – клетки до пересева культивировали с 60 мкМ; БЭК-11-К, NAC (60 мкМ) – клетки до пересева культивировали с 60 мкМ; NAC, ТС-13 (60 мкМ) – клетки до пересева культивировали с 60 мкМ ТС-13

Таким образом, выявленная способность антиоксидантов направленно регулировать химиорезистентность опухолевых клеток открывает новые возможности в разработке методов противоопухолевой терапии.

5.3. Фармакологическая коррекция редокс-свойств опухолевых клеток в противоопухолевой терапии

В методах противоопухолевой терапии (химиотерапия, фотодинамическая терапия, радиотерапия и др.) применяются подходы, основанные на индуцировании гибели клеток путем повышения внутриклеточной концентрации АФК [871; 872]. Поскольку АФК образуются в клетках не только в ре-

зультате действия внешних физико-химических факторов, но и в процессах клеточного метаболизма, фармакологическая коррекция редокс-свойств опухолевых клеток является перспективным подходом для повышения эффективности противоопухолевой терапии.

В химиотерапии онкологических заболеваний широко используются препараты, усиливающие генерацию АФК клетками. В последние десятилетия показано, что генерация АФК является важным этапом в процессе индуцирования апоптоза раковых клеток такими широко используемыми химиотерапевтическими агентами, как цисплатин, блеомицин и этопозид [873–875]. Генерация АФК в опухолевых клетках усиливается также при действии моноклонального антитела ритуксимаба [876], протеасомного ингибитора бортезомиба [877], а также противоопухолевых антибиотиков – ингибиторов гистон-диацилаз SAHA (suberoylanilide hydroxamic acid) [878] и адафостины [879]. Участие АФК в механизмах действия многих противоопухолевых препаратов позволяет выделить отдельную область противоопухолевой терапии – «редокс-направленную терапию рака» [880].

Для увеличения эффективности противоопухолевых соединений предлагаются подходы, направленные на индуцирование окислительного стресса в опухолевых клетках [3; 881; 882]. В рамках современных представлений регуляция окислительных процессов может осуществляться не только редокс-активными соединениями, но и регуляторами активности АФК-генерирующих и антиоксидантных ферментов. Так, наряду с препаратами, способными генерировать АФК в биохимических и фотохимических реакциях, разрабатываются препараты, действие которых включает ингибирование ферментов антиокислительной системы. Например, в качестве перспективных противоопухолевых соединений рассматриваются природные и синтетические ингибиторы тиоредоксинредуктазы [883] и супероксиддисмутазы [884]. Тем не менее в разработке методов редокс-направленной терапии необходимо учитывать тот факт, что молекулярные и клеточные изменения, индуцируемые АФК, могут способствовать развитию резистентности опухолевых клеток к повреждающим факторам. Таким образом, регуляция внутриклеточной продукции АФК является комплексным процессом, требующим учета вклада всех участников клеточного редокс-метаболизма. Для повышения селективности действия лекарственных препаратов в стратегиях противоопухолевой терапии, направленных на фармакологическую коррекцию редокс-свойств, необходимо учитывать особенности редокс-метаболизма опухолевых клеток [558].

Фенольные антиоксиданты в регуляции свойств клеток. Важными модуляторами редокс-свойств клеток выступают природные и синтетические антиоксиданты, способные индуцировать перестройки редокс-метаболизма в результате регуляции экспрессии генов белков антиоксидантной системы

клеток. Выявленные отличия экспрессии генов белков антиоксидантной системы в нормальных и опухолевых клетках позволяют рассматривать использование природных и синтетических антиоксидантов для сенсibilизации опухолевых клеток в качестве перспективного подхода повышения эффективности современной противоопухолевой терапии.

Регуляция экспрессии генов белков антиоксидантной системы клеток осуществляется с участием фактора транскрипции Nrf2 (см. разд. 3.2.). При этом фактор транскрипции Nrf2 является важным регулятором редокс-гомеостаза клеток, способным усиливать как восстановительные, так и окислительные процессы в клетках.

Наличие порога для активации защитного действия через фактор транскрипции Nrf2 позволяет предположить, что зависимости доза – эффект для модуляторов системы Keap1/Nrf2/ARE будут характеризоваться гормезисом (рис. 5.6). Поскольку антиоксидантный эффект, который индуцируется при действии модуляторов Keap1/Nrf2/ARE в клетках, опосредован активацией соответствующего сигнального пути, можно предположить отличие регуляторных ответов опухолевых и нормальных клеток на действия антиоксидантных модуляторов (см. рис. 5.6).

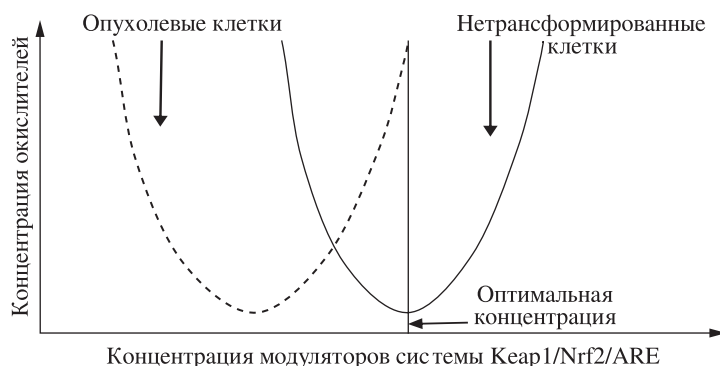


Рис. 5.6. Изменения редокс-гомеостаза нормальных и опухолевых клеток, индуцированные модуляторами системы Keap1/Nrf2/ARE

Мутации Keap1, ведущие к нарушению его функционирования, обнаружены в карциномах различных органов [885]. В результате во многих опухолевых тканях и клеточных линиях опухолей наблюдается конститутивная активация Nrf2 [886], что во многом обуславливает изменения эффектов действия экзогенных регуляторов сигнального пути Keap1/Nrf2/ARE и приводит к сдвигу зависимости доза – эффект в направлении более низких концентраций. Наличие аутопротекторной сверхэкспрессии Nrf2 в опухолевых

клетках позволяет предположить, что при действии антиоксидантов превышение порога экспрессии Nrf2 будет приводить к усилению окислительных процессов в результате активации фактора Klf9 и повышения экспрессии АФК-продуцирующих белков. U-образная зависимость уровня внутриклеточных окислителей от концентрации модуляторов системы Keap1/Nrf2/ARE также будет наблюдаться для нетрансформированных клеток. Однако в нормальных клетках защитный эффект, проявляющийся в снижении концентрации окислителей и обусловленный ростом содержания антиоксидантных ферментов, будет проявляться при тех концентрациях антиоксидантов, при которых индуцируется окислительный стресс в опухолевых клетках.

В силу специфичности регуляции Keap1/Nrf2/ARE в опухолевых клетках можно предположить, что антиоксидантные модуляторы данной системы будут сенсibilизировать действие АФК-продуцирующих противоопухолевых агентов только в трансформированных клетках. При определенных концентрациях антиоксидантов в опухолевых клетках будет наблюдаться прооксидантный эффект, тогда как в нормальных клетках – защитный. Таким образом, антиоксидантные модуляторы системы Keap1/Nrf2/ARE являются биологически активными соединениями бинарного действия, которые могут использоваться для повышения эффективности современной противоопухолевой терапии.

Активация Nrf2 осуществляется при действии многих природных (кумарин, ресвератрол, эпигаллокатехин-3-галлат и др.) и синтетических (3-(3'-*трет*-бутил-4'-гидроксифенил)пропилтиосульфат натрия, *трет*-бутилгидрохинон и др.) фенольных антиоксидантов (рис. 5.7). Ввиду большого количества и разнообразия фенольных соединений противоопухолевые свойства многих из них не исследованы. В последние годы наиболее активно исследуются регуляторные свойства эпигаллокатехин-3-галлата – основного катехина зеленого чая, ресвератрола – одного из основных полифенолов, содержащихся в кожуре ягод винограда и красных винах, и куркумина – основного куркуминоида, входящего в состав корня куркумы *Curcuma longa* L. [887].

Действие эпигаллокатехин-3-галлата, ресвератрола и куркумина, как и других полифенолов, на клетки описывается гормезисом, характеризующимся U-образной зависимостью [888]. Фенолы при низких микромолярных концентрациях вызывают защитный антиоксидантный эффект. При высоких концентрациях фенолы проявляют прооксидантные и цитотоксические свойства [889; 890]. При одинаковых концентрациях в опухолевых и нормальных клетках фенолы могут индуцировать противоположно направленные эффекты.

Эпигаллокатехин-3-галлат. Одним из наиболее изученных природных индукторов системы Keap1/Nrf2/ARE, проявляющим антиканцерогенные свойства, является полифенол эпигаллокатехин-3-галлат (см. рис. 5.7) – эфир эпигаллокатехина и галловой кислоты.

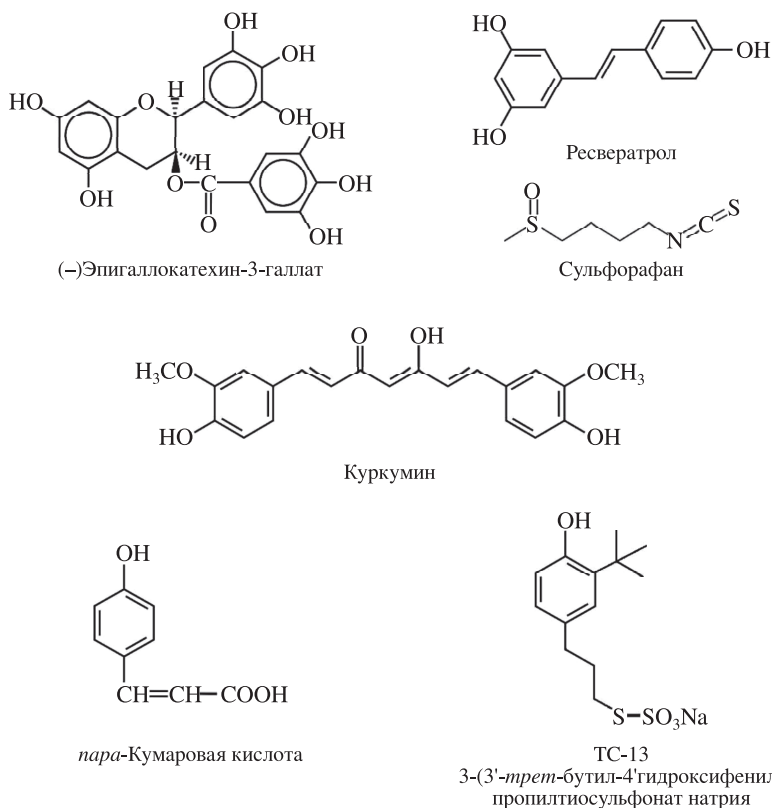


Рис. 5.7. Химическая структура некоторых природных и синтетических индукторов системы Keap1/Nrf2/ARE

Защитное действие полифенола, связанное со стимуляцией антиоксидантной системы клеток, наблюдается при многих стрессовых и повреждающих воздействиях. Эпигаллокатехин-3-галлат ингибирует образование АФК в нормальных эпителиальных клетках, но индуцирует генерацию АФК в опухолевых клетках [891]. В трансформированных В-клетках эпигаллокатехин-3-галлат активирует митохондриально-опосредованный путь клеточной гибели, сопровождающийся генерацией АФК, снижением трансмембранного митохондриального потенциала и высвобождением апоптотических белков [892]. Аналогичные результаты были получены в клеточных линиях рака поджелудочной железы [893], рака легкого [894], рака толстой кишки [895] и меланомы [896], а также на животных моделях ксенотрансплантата рака молочной железы [897]. В концентрациях 5–20 мкМ эпигаллокатехин-3-гал-

лат вызывал апоптоз только в клетках меланомы, не оказывая токсического действия на нормальные меланоциты [896]. В концентрациях 10–80 мг/мл эпигаллокатехин-3-галлат вызывал апоптоз клеток гепатоцеллюлярной карциномы линии LM6, но не раковых клеток печени (HL-7702) [898].

Сенсибилизация опухолевых клеток эпигаллокатехин-3-галлатом к действию ряда противоопухолевых препаратов показана в исследованиях как *in vitro*, так *in vivo* [899]. Эпигаллокатехин-3-галлат усиливает действие доксорубина [900], 5-фторурацила (5-флюороурацила) [901], цисплатина [902], тризенокса (As_2O_3) [903], бортезомиба [904] и этопозиды [905]. Среди предложенных механизмов хемосенсибилизации опухолевых клеток ключевую роль играет редокс-модуляция в результате усиления внутриклеточной продукции АФК [899; 906]. В раковых клетках яичников линий SKOV3, CAOV3, и C200 эпигаллокатехин-3-галлат увеличивал токсичность цисплатина от 3 до 6 раз, включая резистентные к цисплатину клетки [902]. Однако избирательность действия соединения в отношении опухолевых клеток не обоснована. Как обсуждалось ранее, сверхэкспрессия Nrf2 в опухолевых клетках может обуславливать прооксидантный эффект при более низких концентрациях агента, чем в нормальных клетках.

Показано, что через активацию фактора транскрипции Nrf2 эпигаллокатехин-3-галлат повышает чувствительность раковых клеток толстой кишки к радиационному воздействию [907]. С другой стороны, в нетрансформированных клетках при совместном действии эпигаллокатехин-3-галлата и противоопухолевых препаратов снижается токсичность последних. Эпигаллокатехин-3-галлат снижает радиационно-индуцированное метастазирование [908], оказывает защитный эффект при кардиотоксичности доксорубина [909; 910], нейротоксичности и ототоксичности цисплатина [911; 912], снижает развитие индуцированного блеомицином фиброза легких [913]. Молекулярный механизм протекторного действия эпигаллокатехин-3-галлата включает активацию системы Keap1/Nrf2/ARE [914; 915].

Куркумин. Куркумин (1,7-бис-(4-гидрокси-3-метоксифенил)-1,6-гептадиен-3,5-дион) (см. рис. 5.7) является высокоактивным биорегулятором, обладающим антиоксидантными, противовоспалительными, иммуномодулирующими и противоопухолевыми свойствами [916; 917]. Многие биологические эффекты куркумина связаны с его способностью активировать систему антиоксидант-респонсивного элемента Keap1/Nrf2/ARE и индуцировать экспрессию генов антиоксидантной защиты [918]. Для активации системы Keap1/Nrf2/ARE куркумином важна электрофильная группировка с *a*, *b*-ненасыщенными карбонильными связями, которая, будучи акцептором Михаэля, взаимодействует с цистеиновыми остатками Keap1 [46].

В многочисленных исследованиях *in vitro* и *in vivo* показана высокая противоопухолевая активность куркумина [919; 920]. В клинических иссле-

дованиях II фазы куркумин тестируется в отношении миеломы, рака кожи, рака шейки матки, рака поджелудочной железы [880; 921]. Биологическое действие куркумина в низких микромолярных концентрациях в опухолевых и нормальных клетках характеризуется селективностью. Например, куркумин в концентрациях 50 мкМ вызывает апоптоз в клетках гепатоцеллюлярной карциномы человека линии HepG2, не оказывая токсического действия на нормальные гепатоциты [922]. В опухолевых клетках куркумин усиливает действие радиации [923], гемцитабина [924], капецитабина [925], 5-фторурацила [926; 927], этопозиды [928], паклитаксела [929; 930], цисплатина [931], тамоксифена [932] и иринотекана [933]. Обнаружено, что куркумин в сочетании с кверцетином снижает количество и размер аденом у пациентов с семейным аденоматозным полипозом, аутомно-доминантным расстройством, характеризующимся развитием колоректальных аденом и, в конечном итоге, колоректального рака [934].

Показано, что противоопухолевые свойства куркумина реализуются с участием АФК [935; 936]. Предполагается, что куркумин вызывает АФК-индуцируемое снижение трансмембранного митохондриального потенциала, в результате активируется апоптоз [937; 938]. В ряде работ показана способность куркумина через усиление внутриклеточной продукции АФК активировать аутофагию, при этом NAC снижал, а H_2O_2 повышал аутофагию [939; 940]. При активации аутофагии основным источником АФК являются митохондрии [941; 942]. Функциональные отношения между апоптозом и аутофагией комплексны: в некоторых случаях аутофагия является частью клеточного адаптационного механизма, защищающего клетки от апоптоза, в то время как в других условиях аутофагия может вызывать гибель клеток или инициировать апоптоз [943].

Следует отметить, что усиление внутриклеточной продукции АФК при действии куркумина может реализоваться через Nrf2-зависимый механизм. Показано, что ингибирование пролиферативной активности клеток аденокарциномы молочной железы линии MCF-7 при действии куркумина происходит в результате Nrf2-индуцированного снижения сверхэкспрессии эндонуклеазы Fen1 (Flap endonuclease-1, флэп-эндонуклеаза-1), участвующей в развитии рака молочной железы [944]. Недавно обнаружено, что молекулярный механизм сенситизации клеток линии MCF-7 к действию паклитаксела и аденомицина растительными полифенолами включает ингибирование эндонуклеазы Fen1 с участием АФК и Nrf2 [945].

Эксперименты на крысах показали, что куркумин снижает потерю веса и повреждения слизистой оболочки кишечника при химиотерапии 5-фторурацилом [946]. Показано, что куркумин защищает клетки печени от цисплатин-индуцированного повреждения [947], снижает окислительный стресс и апоптоз в костном мозге после химиотерапии цисплатином и карбопла-

тином [948; 949]. Молекулярные механизмы защитных эффектов куркумина в отношении нетрансформированных клеток также могут реализоваться с участием Nrf2 [950]. В экспериментах на мышах с лимфомой показано, что куркумин приводит к профилактике рака, индуцируя антиоксидантные ферменты II фазы посредством активации передачи сигналов через Keap1/Nrf2/ARE, восстановления опухолевого супрессора p53 и модуляции медиаторов воспаления, таких как TGF- β и COX2 [951]. В результате активации Nrf2 куркумин ингибирует апоптоз клеток мочевого пузыря у крыс и улучшает цистопатию, вызванную цисплатином [952].

Ресвератрол. К природным биорегуляторам с противоопухолевыми свойствами относится также полифенольный фитоалексин ресвератрол (*транс*-3,5,4'-тригидроксистильбен) (см. рис. 5.7) [953]. Эпидемиологические исследования показали, что у женщин, употребляющих богатый ресвератролом виноград, риск развития рака молочной железы снижается почти на 50 % [954]. Ресвератрол проявляет цитотоксичность и подавляет жизнеспособность клеток при раке кожи, раке предстательной железы, раке полости рта, немелкоклеточном раке легкого, но обладает низкой токсичностью в нормальных клетках [955–958]. Показано, что ресвератрол в результате увеличения продукции АФК в опухолевых клетках индуцирует аутофагию и апоптоз [959; 960]. Активация механизмов клеточной гибели при действии ресвератрола протекает с участием Nrf2 [961].

При химиотерапии ресвератрол сенситизирует опухолевые клетки к действию радиации [962; 963], цисплатина [964; 965], доцетаксела [966], доксорубина [967; 968], паклитаксела [969], 5-фторурацила [970], сорафениба [971], карфилзомиба [972] и бортезомиба [973]. Синергизм действия наблюдается при совместном использовании ресвератрола и куркумина в отношении рака молочной железы, рака толстой кишки, рака легкого и гепатоцеллюлярного рака [974–976]. Ключевую роль в механизме сенситизации клеток при действии ресвератрола играет увеличение внутриклеточной продукции АФК [977; 978]. Показано, что ресвератрол повышает чувствительность раковых клеток поджелудочной железы в результате активации Nrf2 и увеличения продукции АФК [979]. Важно отметить, что при радиотерапии и химиотерапии ресвератрол защищает нормальные клетки от радиационного повреждения и токсического действия химиотерапевтических препаратов [980; 981]. Защитные биологические эффекты ресвератрола связаны с его способностью индуцировать экспрессию генов антиоксидантной защиты в результате активации системы антиоксидант-реактивного элемента Keap1/Nrf2/ARE [982–984].

Синтетические монофенольные серосодержащие антиоксиданты. Наряду с природными индукторами системы Keap1/Nrf2/ARE в настоящее время активно ведется поиск синтетических регуляторов антиоксидантной системы клетки.

Исследования структурно взаимосвязанного ряда бифункциональных монофенольных соединений, содержащих разное количество *орто-трет*-бутильных заместителей, а также сульфонатные и тиосульфонатные группы в *пара*-алкильных заместителях, позволили выявить новые регуляторы антиоксидантной системы клетки с выраженными противовоспалительными свойствами *in vivo* [985]. Показано, что одним из активных синтетических индукторов сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE является фенольный антиоксидант 3-(3'-*трет*-бутил-4'-гидроксифенил)пропилтиосульфонат натрия (ТС-13), содержащий тиосульфонатную группу с лабильной S-S связью (см. рис. 5.7) [985]. Обнаружено защитное действие ТС-13 при остром [986] и хроническом воспалении *in vivo* [987]. Показано также, что ТС-13 увеличивает выживаемость разных линий *Drosophila melanogaster* в условиях окислительного стресса, индуцированного H₂O₂ и паракватом [988]. При этом в нормальных условиях введение в диету фенольного антиоксиданта ТС-13 повышает продолжительность жизни у самцов и самок долгоживущей линии *D. melanogaster Canton S*, но снижает среднюю продолжительность жизни самцов *D. melanogaster* линии *Igl⁵⁵⁸OR/Cy*, содержащей в гетерозиготном состоянии рецессивную летальную мутацию опухолевого супрессора [988]. Неоднозначность действия антиоксиданта в различных экспериментальных условиях может быть опосредована особенностями клеточного редокс-гомеостаза, который определяет протекание ряда метаболических и регуляторных процессов и может влиять на биологическое действие редокс-активных соединений.

Нами показано, что синтетические монофенольные серосодержащие антиоксиданты с различной структурой боковых радикалов могут разнонаправленно регулировать редокс-свойства и химиорезистентность опухолевых клеток [867; 868]. Установлено, что при использовании 3,5-диметил-4-гидроксibenзилтиоэтаноата калия редокс-буферная емкость и резистентность опухолевых клеток к доксорубину увеличивается. При действии ТС-13 наблюдается уменьшение редокс-буферной емкости, что приводит к снижению лекарственной устойчивости опухолевых клеток [867]. При более высоких концентрациях ТС-13 индуцирует кратковременное повышение продукции АФК и активацию митохондриально-опосредованной гибели клеток [989].

В экспериментальной модели мышей с лимфолейкозом (Р-388) ТС-13 усиливал химиотерапевтическую активность цитостатика циклофосфана, используемого в субтерапевтической дозе, увеличивая индекс средней продолжительности жизни мышей с лейкемией со 196 до 283 % по отношению к контролю [990]. При моделировании роста перевиваемой карциномы легких Льюис у мышей ТС-13 усиливал действие противоопухолевого агента доксорубина и снижал воспалительные процессы [991].

Исследования синтетических водорастворимых серосодержащих монофенолов, отличающихся от ТС-13 длиной углеводородной цепи алкилтиосульфатного заместителя, находящегося в *para*-положении по отношению к гидроксильной группе, количеством *трет*-бутильных *орто*-заместителей и варьированием фрагмента «S–S», показали, что активация аутофагии и системы Keap1/Nrf2/ARE зависят от структуры соединения [992]. Показано, что структурные особенности, определяющие противоопухолевую активность гидрофильных серосодержащих фенольных антиоксидантов, связаны с наличием тиосульфатной группы в *para*-пропильном заместителе соединения [993; 994]. При этом фенольные антиоксиданты, содержащие тиосульфатную группу, проявляют не только противоопухолевую активность, но также повышают структурную устойчивость эритроцитов в условиях индуцированного окислительного стресса [994].

Таким образом, исследования модуляторов системы Keap1/Nrf2/ARE открывают новые возможности для развития методов противоопухолевой терапии. Специфичность редокс-регуляции в опухолевых клетках позволяет рассматривать антиоксиданты направленного действия в качестве потенциальных корректоров свойств опухолевых клеток, включая их устойчивость к противоопухолевым препаратам. В сравнении с другими хемосенсибилизаторами важным преимуществом антиоксидантов – индукторов системы Keap1/Nrf2/ARE являются протекторные свойства этих соединений, проявляемые по отношению к нетрансформированным клеткам в условиях патологии и стресса.

Только неглубокие люди знают себя
до самых глубин.

Оскар Уайльд

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Окончание XX века ознаменовалось бурным развитием биологической науки. Биология претерпела революционные изменения подобно революционным изменениям в физике в первой половине прошлого столетия и, по всей видимости, будет определять судьбу человечества в ближайшее столетие. В первую очередь прогресс затронул физико-химические направления биологической науки, на основе достижений которых во многом стали понятны процессы обработки и хранения информации в клетках и субклеточных структурах.

Самым удивительным открытием последних лет является доказательство участия активных форм кислорода в процессах передачи информации в клетках. Не вызывает сомнения тот факт, что АФК являются универсальными носителями информации, участвующими в многочисленных физиологических процессах практически всех организмов. Однако принципы записи и считывания информации в клетках, реализующиеся с участием АФК, еще до конца не изучены. Во многом это обусловлено грандиозной сложностью информационных процессов, в которые вовлечены активные формы кислорода и антиоксиданты. В настоящее время ясно, что функционирование каждой клетки организма сложнее, чем работа самого сложного компьютера.

Живая система – это не структура, состоящая из определенных элементов, а сеть взаимодействующих элементов. Уникальная структура взаимодействий определяет характерные видовые и индивидуальные черты организма. Функционирование АФК и антиоксидантов в клетках также представляет собой сложную сеть взаимодействий, определяющую специфичность ответа той или иной системы.

Грандиозная сложность сетевых информационных процессов, протекающих в клетке, создает труднопреодолимые препятствия на пути к по-

лучению целостной картины жизнедеятельности клеток, наверное, одной из самых важных фундаментальных задач современной биологии. Но уже сейчас очевидно, что именно движение по этому пути по мере заполнения белых пятен на карте внутриклеточной информационной сети обеспечит решение наиболее насущные проблемы современной медицины. Среди них рак, старение, заболевания сердечно-сосудистой системы и многие другие, в той или иной мере связанные с нарушением процессов передачи информации внутри клеток.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ ССЫЛКИ

1. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life // *Plant physiol.* 2006. Vol. 141. P. 312–322.
2. Herrmann J. M., Dick T. P. Redox biology on the rise // *Biol. Chem.* 2012. Vol. 393. P. 999–1004.
3. Редокс-биотехнологии как основа для новой стратегии в противоопухолевой терапии / Г. Г. Мартинович [и др.] // *Изв. НАН Беларуси. Сер. мед. наук.* 2012. № 2. С. 85–104.
4. Electrochemically stimulating developments in bioelectronic medicine / P. Sanjuan-Alberte [et al.] // *Bioelectronic Medicine.* 2018. Vol. 4. P. 1.
5. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine // *Redox biol.* 2015. Vol. 4. P. 180–183.
6. Sies H., Berndt C., Jones D. P. Oxidative stress // *Annu. Rev. Biochem.* 2017. Vol. 86. P. 715–748.
7. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты / Е. Б. Меньщикова [и др.]. М. : Слово, 2006.
8. Черенкевич С. Н., Мартинович Г. Г. Роль низкомолекулярных кислородных интермедиатов в регуляции клеточной активности // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : междунар. научн. конф. ; Шестой съезд Белорус. обществ. об-ния фотобиологов и биофизиков : сб. ст. : в 2 ч. / редкол.: И. Д. Вологовский [и др.]. Минск, 2004. Ч. I. С. 218–220.
9. Осипов А. Н., Азизова О. А., Владимиров Ю. А. Активные формы кислорода и их роль в организме // *Успехи биол. химии.* 1990. Т. 31. С. 108–208.
10. Fridovich I. Oxygen radicals, hydrogen peroxide, and oxygen toxicity // *Free radicals in biology.* New York : Acad. Press, 1976. Vol. 1. P. 239–277.
11. Green M., Hill H. Chemistry of dioxygen // *Meth. Enzymol.* 1984. Vol. 105. P. 59–61.
12. Meulemans A. Diffusion coefficients and half-lives of nitric oxide and N-nitroso-L-arginine in rat cortex // *Neurosci. Lett.* 1994. Vol. 171. P. 89–93.
13. Wise D. L., Houghton G. Diffusion of nitric oxide // *Chem. Eng. Sci.* 1968. Vol. 23. P. 1211–1216.
14. Stamler J., Singel D., Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms // *Science.* 1992. Vol. 258. P. 1898–1902.
15. Opposite effects of nitric oxide and nitroxyl on postischemic myocardial injury / X. Ma [et al.] // *PNAS.* 1999. Vol. 96. P. 14617–14622.

16. Kirsch M., de Groot H. Formation of Peroxynitrite from Reaction of Nitroxyl Anion with Molecular Oxygen // J. Biol. Chem. 2002. Vol. 277. P. 13379–13388.
17. Hughes M. Relationships between nitric oxide, nitroxyl ion, nitrosonium cation and peroxynitrite // Bioch. Bioph. Acta. 1999. Vol. 1411. P. 263–272.
18. Pryor W., Squadrito G. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide // Am. J. Physiol. 1995. Vol. 268. P. L699–L722.
19. Formation and properties of peroxynitrite as studied by laser flash photolysis, high-pressure stopped-flow technique, and pulse radiolysis / R. Kissner [et al.] // Chem. Res. Toxicol. 1998. Vol. 10. P. 1285–1292.
20. Denicola A., Souza J., Radi R. Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membrane // PNAS. 1998. Vol. 95. P. 3566–3571.
21. Marla S., Lee J., Groves J. Peroxynitrite rapidly permeates phospholipid membrane. // PNAS. 1997. Vol. 94. P. 14243–14248.
22. Groves J. Peroxynitrite: reactive, invasive and enigmatic // Curr. Opin. Chem. Biol. 1999. Vol. 3. P. 226–235.
23. Scott Bohle D. Pathophysiological chemistry of nitric oxide and its oxygenation by-products // Curr. Opin. Chem. Biol. 1998. Vol. 2. P. 194–200.
24. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite / J. Beckman [et al.] // PNAS. 1990. Vol. 87. P. 1620–1624.
25. Metabolic fate of peroxynitrite in aqueous solution / S. Pfeiffer [et al.] // J. Biol. Chem. 1997. Vol. 272, № 6. P. 3465–3470.
26. Biological aspects of reactive nitrogen species / R. Patel [et al.] // Bioch. Bioph. Acta. 1999. Vol. 1411. P. 385–400.
27. Kinetics of superoxide dismutase- and iron-catalyzed nitration of phenolics by peroxynitrite / J. Beckman [et al.] // Arch. Biochem. Biophys. 1992. Vol. 298. P. 438–445.
28. Folkes L. K., Candeias L. P., Wardman P. Kinetics and mechanisms of hypochlorous acid reactions // Arch. Biochem. Biophys. 1995. Vol. 323. P. 120–126.
29. Kinetics of nitric oxide and hydrogen peroxide production and formation of peroxynitrite during the respiratory burst of human neutrophils / M. C. Carreras [et al.] // FEB letters. 1994. Vol. 341. P. 65–68.
30. Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria / R. Radi [et al.] // Free Radic. Biol. Med. 2002. Vol. 33, № 11. P. 1451–1464.
31. Ullrich V., Kissner R. Redox Signaling: Bioinorganic Chemistry at its Best // J. Inorg. Bioch. 2006. Vol. 100. P. 2079–2086.
32. Lambeth J. D. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen // Nat. Rev. Immunol. 2004. Vol. 4. P. 181–189.
33. Cross AR, Segal AW. The NADPH oxidase of professional phagocytes – prototype of the NOX electron transport chain systems // Biochim. Biophys. Acta. 2004. Vol. 1657, № 1. P. 1–22.
34. Hampton M. B., Kettle A. J., Winterbourn C. C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing // Blood. 1998. Vol. 92. P. 3007–3017.
35. Novel homologs of gp91phox / J. D. Lambeth [et al.] // Trends Biochem. Sci. 2000. Vol. 25. P. 459–461.
36. Nox enzymes and oxidative stress in the immunopathology of the gastrointestinal tract / K. Rokutan [et al.] // Semin. Immunopathol. 2008. Vol. 30. P. 315–327.
37. A crucial role for reactive oxygen species in RANKL-induced osteoclast differentiation / N. K. Lee [et al.] // Blood. 2005. Vol. 106. P. 852–859.

38. *Sorce S., Krause K. H.* NOX enzymes in the central nervous system: from signaling to disease // *Antioxid. Redox Signal.* 2009. Vol. 11. P. 2481–2504.
39. Identification of structural elements in Nox1 and Nox4 controlling localization and activity / *I. Helmcke [et al.]* // *Antioxid. Redox Signal.* 2008. Vol. 11. P. 1279–1287.
40. NADPH oxidases in the gastrointestinal tract: a potential role of Nox1 in innate immune response and carcinogenesis / *K. Rokutan [et al.]* // *Antioxid. Redox Signal.* 2006. Vol. 8. P. 1573–1582.
41. Neurotoxic activation of microglia is promoted by a nox1-dependent NADPH oxidase / *C. Cheret [et al.]* // *J. Neurosci.* 2008. Vol. 28. P. 12039–12051.
42. Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells: nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways / *B. Lassegue [et al.]* // *Circ. Res.* 2001. Vol. 88. P. 888–894.
43. Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators / *P. N. Seshiah [et al.]* // *Circ. Res.* 2002. Vol. 91. P. 406–413.
44. Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux / *E. P. Reeves [et al.]* // *Nature.* 2002. Vol. 416. P. 291–297.
45. *Brown D. I., Griendling K. K.* Nox proteins in signal transduction // *Free Radic. Biol. Med.* 2009. Vol. 47. P. 1239–1253.
46. *Ushio-Fukai M.* Localizing NADPH oxidase-derived ROS // *Sci. STKE.* 2006. Vol. 2006. P. re8.
47. Synaptic localization of a functional NADPH oxidase in the mouse hippocampus / *M. V. Tejada-Simon [et al.]* // *Mol. Cell Neurosci.* 2005. Vol. 29. P. 97–106.
48. *Dworakowski R., Alom-Ruiz S. P., Shah A. M.* NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in the regulation of endothelial phenotype // *Pharmacol. Rep.* 2008. Vol. 60. P. 21.
49. *Ushio-Fukai M.* VEGF signaling through NADPH oxidase-derived ROS // *Antioxid. Redox Signal.* 2007. Vol. 9. P. 731–739.
50. gp91phox-containing NADPH oxidase mediates endothelial dysfunction in renovascular hypertension / *O. Jung [et al.]* // *Circulation.* 2004. Vol. 109. P. 1795–1801.
51. NOX3: a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear / *B. Banfi [et al.]* // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279. P. 46065–46072.
52. *Bedard K., Krause K. H.* The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology // *Physiol. Rev.* 2007. Vol. 87. P. 245–313.
53. Direct detection of ototoxicant-induced reactive oxygen species generation in cochlear explants / *W. J. Clerici [et al.]* // *Hear Res.* 1996. Vol. 98. P. 116–124.
54. Nox4 as the major catalytic component of an endothelial NAD(P)H oxidase / *T. Ago [et al.]* // *Circulation.* 2004. Vol. 109. P. 227–233.
55. NAD(P)H oxidase 4 mediates transforming growth factor-beta1-induced differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts / *I. Cucoranu [et al.]* // *Circ. Res.* 2005. Vol. 97. 900–907.
56. A constitutive NADPH oxidase-like system containing gp91phox homologs in human keratinocytes / *W. Chamulitrat [et al.]* // *J. Invest. Dermatol.* 2004. Vol. 122. P. 1000–1009.
57. A new superoxide-generating oxidase in murine osteoclasts / *S. Yang [et al.]* // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276. P. 5452–5458.
58. Neuronal expression of the NADPH oxidase NOX4, and its regulation in mouse experimental brain ischemia / *P. Vallet [et al.]* // *Neuroscience.* 2005. Vol. 132. P. 233–238.

59. EGF blocks NADPH oxidase activation by TGF-beta in fetal rat hepatocytes, impairing oxidative stress, and cell death / I. Carmona-Cuenca [et al.] // *J. Cell Physiol.* 2006. Vol. 207. P. 322–330.
60. Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney / M. Geiszt [et al.] // *PNAS.* 2000. Vol. 97. P. 8010–8014.
61. Distinct subcellular localizations of Nox1 and Nox4 in vascular smooth muscle cells / L. L. Hilenski [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004. Vol. 24. P. 677–683.
62. The superoxide-producing NAD(P)H oxidase Nox4 in the nucleus of human vascular endothelial cells. / J. Kuroda [et al.] // *Genes Cells.* 2005. Vol. 10. P. 1139–1151.
63. NADPH oxidase 4 (Nox4) is a major source of oxidative stress in the failing heart / J. Kuroda [et al.] // *PNAS.* 2010. Vol. 107. P. 15565–15570.
64. Regulation of myocardial growth and death by NADPH oxidase / Y. Maejima [et al.] // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2011. Vol. 50. P. 408–416.
65. The NAD(P)H oxidase homolog Nox4 modulates insulin-stimulated generation of H₂O₂ and plays an integral role in insulin signal transduction / K. Mahadev [et al.] // *Mol. Cell. Biol.* 2004. Vol. 24. P. 1844–1854.
66. Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5 / G. Cheng [et al.] // *Gene.* 2001. Vol. 269. P. 131–140.
67. Nox5 mediates PDGF-induced proliferation in human aortic smooth muscle cells / D. B. Jay [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* 2008. Vol. 45. P. 329–335.
68. NOX5 variants are functionally active in endothelial cells / R. S. BelAiba [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* 2007. Vol. 42. P. 446–459.
69. NOX5 NAD(P)H oxidase regulates growth and apoptosis in DU 145 prostate cancer cells / S. S. Brar [et al.] // *Am. J. Physiol.* 2003. Vol. 285. P. C353–C369.
70. Expression and activity of NOX5 in the circulating malignant B cells of hairy cell leukemia / A. S. Kamiguti [et al.] // *J. Immunol.* 2005. Vol. 175. P. 8424–8430.
71. STAT5 mediates PAF-induced NADPH oxidase NOX5-S expression in Barrett's esophageal adenocarcinoma cells / J. Si [et al.] // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2008. Vol. 294. P. G174–G183.
72. Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase. Cloning of the porcine and human cdnas / C. Dupuy [et al.] // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274. P. 37265.
73. Regulated hydrogen peroxide production by Duox in human airway epithelial cells / R. Forteza [et al.] // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2005. Vol. 32. P. 462–469.
74. Identification of a novel partner of duox: EFP1, a thioredoxin-related protein / D. Wang [et al.] // *J. Biol. Chem.* 2005. Vol. 280. P. 3096–3103.
75. Nox1 is involved in angiotensin II-mediated hypertension: a study in Nox1-deficient mice / K. Matsuno [et al.] // *Circulation.* 2005. Vol. 112. P. 2677–2685.
76. Transforming growth factor-beta1 induces Nox4 NAD(P)H oxidase and reactive oxygen species-dependent proliferation in human pulmonary artery smooth muscle cells / A. Sturrock [et al.] // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2006. Vol. 290. P. L661–L673.
77. Nox4 mediates angiotensin II-induced activation of Akt/protein kinase B in mesangial cells. / Y. Gorin [et al.] // *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2003. Vol. 285. P. F219–F229.

78. Nox1 overexpression potentiates angiotensin II-induced hypertension and vascular smooth muscle hypertrophy in transgenic mice / A. Dikalova [et al.] // *Circulation*. 2005. Vol. 112. P. 2668–2676.
79. Endothelial Nox4 NADPH oxidase enhances vasodilatation and reduces blood pressure *in vivo* / R. Ray [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011. Vol. 31. P. 1368–1376.
80. Raha S., Robinson B. Mitochondria, oxygen radicals, disease and ageing // *Trends Biochem. Sci.* 2000. Vol. 25. P. 502–508.
81. Cadenas E., Davies K. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging. // *Free Radic. Biol. Med.* 2000. Vol. 29. P. 222–230.
82. Мартинович Г. Г., Сазанов Л. А., Черенкевич С. Н. Клеточная биоэнергетика: физико-химические и молекулярные основы. М. : ЛЕНАНД, 2017.
83. Brand M. D. The sites and topology of mitochondrial superoxide production // *Exp. Gerontol.* 2010. Vol. 45. P. 466–472.
84. Atomic structure of the entire mammalian mitochondrial complex I / K. Fiedorczuk [et al.] // *Nature*. 2016. Vol. 538, № 7625. P. 406–410.
85. Efremov R. G., Baradaran R., Sazanov L. A. The architecture of respiratory complex I // *Nature*. 2010. Vol. 465. P. 441–445.
86. Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation–reduction. / C. C. Page [et al.] // *Nature*. 1999. Vol. 402, № 6757. P. 47–52.
87. Scialo F., Fernandez-Ayala D. J., Sanz A. Role of Mitochondrial Reverse Electron Transport in ROS Signaling: Potential Roles in Health and Disease // *Front. Physiol.* 2017. Vol. 8. P. 428.
88. Starkov A. A. The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling // *Ann. N Y Acad. Sci.* 2008. Vol. 1147. P. 37–52.
89. Korshunov S. S., Skulachev V. P., Starkov A. A. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria // *FEBS Lett.* 1997. Vol. 416. P. 15–18.
90. A possible site of superoxide generation in the complex I segment of rat heart mitochondria / S. T. Ohnishi [et al.] // *J. Bioenerg. Biomembr.* 2005. Vol. 37. P. 1–15.
91. Sazanov L. A., Hinchliffe P. Structure of the hydrophilic domain of respiratory complex I from *Thermus thermophilus* // *Science*. 2006. Vol. 311, № 5766. P. 1430–1436.
92. Sazanov L. A. The mechanism of coupling between electron transfer and proton translocation in respiratory complex I // *J. Bioenerg. Biomembr.* 2014. Vol. 46. P. 247–253.
93. Massey V. Activation of molecular oxygen by flavins and flavoproteins // *J. Biol. Chem.* 1994. Vol. 269. P. 22459–22462.
94. Гривенникова В. Г., Виноградов А. Д. Генерация активных форм кислорода митохондриями // *Успехи биол. химии*. 2013. Т. 53. С. 245–296.
95. Galkin A., Brandt U. Superoxide radical formation by pure complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) from *Yarrowia lipolytica* // *J. Biol. Chem.* 2005. Vol. 280. P. 30129–30135.
96. Berthiaume J. M., Wallace K. B. Adriamycin-induced oxidative mitochondrial cardiotoxicity // *Cell Biol. Toxicol.* 2007. Vol. 23. P. 15–25.
97. Trumpower B. L. The protonmotive Q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bc1 complex // *J. Biol. Chem.* 1990. Vol. 265. P. 11409–11412.

98. *Drose S., Brandt U.* The Mechanism of Mitochondrial Superoxide Production by the Cytochrome bc₁ Complex // *J. Biol. Chem.* 2008. Vol. 283. P. 21649–21654.
99. *Cadenas E.* Mitochondrial free radical production and cell signaling // *Mol. Asp. Med.* 2004. Vol. 25. P. 17–26.
100. *Boveris A., Chance B.* The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: general properties and effect of hyperbaric oxygen // *Biochem. J.* 1973. Vol. 134. P. 707–716.
101. *Boveris A., Cadenas E.* Mitochondrial production of hydrogen peroxide. Regulation by nitric oxide and the role of ubisemiquinone // *IUBMB Life.* 2000. Vol. 50. P. 1–6.
102. *Andreyev A. Y., Kushnareva Y. E., Starkov A. A.* Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species // *Biochemistry (Moscow).* 2005. Vol. 70. P. 200–214.
103. The metabolism of tyramine by monoamine oxidase A/B causes oxidative damage to mitochondrial DNA / *N. Hauptmann [et al.] // Arch. Biochem. Biophys.* 1996. Vol. 335. P. 295–304.
104. *Lenaz G., Genova M. L.* Structure and organization of mitochondrial respiratory complexes: a new understanding of an old subject // *Antioxid. Redox Signal.* 2010. Vol. 12. P. 961–1008.
105. *Sena L. A., Chandel N. S.* Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species // *Mol Cell.* 2012. Vol. 48. P. 158–167.
106. *Shadel G. S., Horvath T. L.* Mitochondrial ROS signaling in organismal homeostasis // *Cell.* 2015. Vol. 163, № 3. P. 560–569.
107. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer / *A. V. Kudryavtseva [et al.] // Oncotarget.* 2016. Vol. 7, № 29. P. 44879.
108. *Sies H.* Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: oxidative eustress // *Redox Biol.* 2017. Vol. 11. P. 613–619.
109. *McCord J., Fridovich I.* Superoxide dismutase. An enzymic function of erythrocyte (hemocuprein) // *J. Biol. Chem.* 1969. Vol. 244, № 60. P. 6049–6055.
110. *Holm R. H., Kennepohl P., Solomon E. I.* Structural and Functional Aspects of Metal Sites in Biology // *Chem. Rev.* 1996. Vol. 96. P. 2239–2314.
111. A structure-based mechanism for copper-zinc superoxide dismutase / *P. J. Hart [et al.] // Biochemistry.* 1999. Vol. 38. P. 2167–2178.
112. Intracellular localization of the copper-zinc and manganese superoxide-dismutase in rat liver parenchymal cells / *J. Slot [et al.] // Lab. Invest.* 1986. Vol. 55. P. 363–371.
113. *Hopkin K. A., Papazian M. A., Steinman H. M.* Functional differences between manganese and iron superoxide dismutases in *Escherichia coli* K-12 // *J. Biol. Chem.* 1992. Vol. 267. P. 24253–24258.
114. *Miller A. F.* Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights // *FEBS Lett.* 2012. Vol. 586. P. 585–595.
115. *Yikilmaz E., Rodgers D. W., Miller, A. -F.* The crucial importance of chemistry in the structure-function link: manipulating hydrogen bonding in iron-containing superoxide dismutase // *Biochemistry.* 2006. Vol. 45. P. 1151–1161.
116. A novel nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces* spp. / *H-D. Youn [et al.] // Biochemistry.* 1996. Vol. 318. P. 889–896.
117. Crystal structure of nickel-containing superoxide dismutase reveals another type of active site / *J. Wuerger [et al.] // PNAS.* 2004. Vol. 101. P. 8569–8574.
118. Decreased mitochondrial nitric oxide synthase activity and hydrogen peroxide relate persistent tumoral proliferation to embryonic behavior / *S. Galli [et al.] // Cancer Res.* 2003. Vol. 63. P. 6370–6377.

119. *Li H., Förstermann U.* Uncoupling of endothelial NO synthase in atherosclerosis and vascular disease // *Curr. Opin. Pharmacol.* 2013. Vol. 13. P. 161–167.
120. *Tejero J., Shiva S., Gladwin M. T.* Sources of vascular nitric oxide and reactive oxygen species and their regulation // *Physiol. rev.* 2019. Vol. 99, № 1. P. 311–379.
121. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions / *U. Förstermann [et al.]* // *Hypertension.* 1994. Vol. 23. P. 1121–1131.
122. *Förstermann U., Sessa W. C.* Nitric oxide synthases: regulation and function // *Eur. Heart. J.* 2012. Vol. 33. P. 829–837.
123. Mitochondrial nitric oxide synthase: a ubiquitous regulator of oxidative phosphorylation / *T. E. Bates [et al.]* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996. Vol. 218. P. 40–44.
124. *Tatoyan A., Giulivi C.* Purification and characterization of a nitric-oxide synthase from rat liver mitochondria // *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273. P. 11044–11048.
125. Mitochondrial nitric-oxide synthase: enzyme expression, characterization, and regulation / *V. Haynes [et al.]* // *J. Bioenerg. Biomembr.* 2004. Vol. 36. P. 341–346.
126. Mitochondrial nitric-oxide synthase: role in pathophysiology / *V. Haynes [et al.]* // *IUBMB Life.* 2003. Vol. 55. P. 599–603.
127. Heart mitochondrial nitric oxide synthase. Effects of hypoxia and aging / *L. Valdez [et al.]* // *Mol. Asp. Med.* 2004. Vol. 25. P. 49–59.
128. *Michel T., Feron O.* Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? // *J. Clin. Invest.* 1997. Vol. 100. P. 2146–2152.
129. Brain iNOS: current understanding and clinical implications / *J. Licino [et al.]* // *Mol. Med. Today.* 1999. Vol. 5. P. 225–232.
130. *Nathan C.* Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? // *J. Clin. Invest.* 1997. Vol. 100. P. 2417–2423.
131. *Groves J., Wang C.* Nitric oxide synthase: models and mechanisms // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2000. Vol. 4. P. 687–695.
132. *Poulos T., Li H., Raman C.* Heme-mediated oxygen activation in biology: cytochrome *c* oxidase and nitric oxide synthase // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1999. Vol. 3. P. 131–137.
133. *Hemmens B., Mayer B.* Enzymology of nitric oxide synthases // *Methods Mol. Biol.* 1998. Vol. 100. P. 1–32.
134. Role of bound zinc in dimer stabilization but not enzyme activity of neuronal nitric-oxide synthase / *B. Hemmens [et al.]* // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275. P. 35786–35791.
135. Potentiometric analysis of the flavin cofactors of neuronal nitric oxide synthase / *M. A. Noble [et al.]* // *Biochemistry.* 1999. Vol. 38. P. 16413–16418.
136. *Sharp R., Chapman S.* Mechanisms for regulation electron transfer in multi-center redox proteins // *Bioch. Biophys. Acta.* 1999. Vol. 1432. P. 143–158.
137. Comparative effects of substrates and pterin cofactor on the heme midpoint potential in inducible and neuronal nitric oxide synthases / *A. Presta [et al.]* // *J. Am. Chem. Soc.* 1998. Vol. 120. P. 9460–9465.
138. *Alderton W. K., Cooper C. E., Knowles R. G.* Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition // *Biochem. J.* 2001. Vol. 357. P. 593–615.
139. Inducible nitric-oxide synthase generate superoxide from reductase domain / *Y. Xia [et al.]* // *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273, № 35. P. 22635–22639.

140. Superoxide generation from endothelial nitric-oxide synthase / Y. Xia [et al.] // *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273, № 40. P. 25804–25808.
141. Mechanism of superoxide generation by neuronal nitric-oxide synthase / S. Pou [et al.] // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274, № 14. P. 9573–9580.
142. Tetrahydrobiopterin-dependent inhibition of superoxide generation from neuronal nitric oxide synthase / J. Vasquez-Viver [et al.] // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274. P. 26736.
143. Gorren A., Mayer B. The versatile and complex enzymology of nitric oxide synthase // *Biochemistry (Moscow)*. 1998. Vol. 63. P. 734–744.
144. Massey V., Harris C. M. Milk xanthine dehydrogenase: the first one hundred years // *Biochem. Soc. Trans.* 1997. Vol. 25. P. 750–755.
145. Harrison R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? // *Free Radic. Biol. Med.* 2002. Vol. 33, № 6. P. 774–797.
146. Hydrogen peroxide is the major oxidant product of xanthine oxidase / E. E. Kelley [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* 2010. Vol. 48. P. 493–498.
147. Plasma and blood assay of xanthine and hypoxanthine by gas chromatography–mass spectrometry: physiological variations in humans / C. Lartigue-Mattei [et al.] // *J. Chromatogr.* 1990. Vol. 529. P. 93–101.
148. Circulating xanthine oxidase and neutrophil activation during human liver transplantation / E. J. Pesonen [et al.] // *Gastroenterology*. 1998. Vol. 114. P. 1009–1015.
149. Cantu-Medellin N., Kelley E. E. Xanthine oxidoreductase-catalyzed reactive species generation: A process in critical need of reevaluation // *Redox Biology*. 2013. Vol. 1. P. 353–358.
150. Moderate hypoxia induces xanthine oxidoreductase activity in arterial endothelial cells / E. E. Kelley [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* 2006. Vol. 40. P. 952–959.
151. Binding of xanthine oxidase to vascular endothelium. Kinetic characterization and oxidative impairment of nitric oxide-dependent signaling / M. Houston [et al.] // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274. 4985–4994.
152. Binding of xanthine oxidase to glycosaminoglycans limits inhibition by oxypurinol / E. E. Kelley [et al.] // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279. P. 37231–37234.
153. Allopurinol improves endothelial dysfunction in chronic heart failure / C. A. Farquharson [et al.] // *Circulation*. 2002. Vol. 106. P. 221–226.
154. Xanthine oxidase is involved in exercise-induced oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease / L. Heunks [et al.] // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 1999. Vol. 277. P. R1697–R1704.
155. Granger D. N., Rutili G., McCord J. M. Superoxide radicals in feline intestinal ischemia // *Gastroenterology*. 1981. Vol. 81. P. 22–29.
156. Frederiks W. M., Bosch K. S., Kooij A. Quantitative in situ analysis of xanthine oxidoreductase activity in rat liver // *J. Histochem. Cytochem.* 1995. Vol. 43. P. 723–726.
157. Hattori Y. Localization of xanthine dehydrogenase in chicken liver // *Acta Histochem. Cytochem.* 1989. Vol. 22. P. 617–624.
158. Sarnesto A., Linder N., Raivio K. O. Organ distribution and molecular forms of human xanthine dehydrogenase, xanthine oxidase protein // *Lab. Invest.* 1996. Vol. 74. P. 48–56.
159. Hille R., Nishino T. Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase // *FASEB J.* 1995. Vol. 9. P. 995–1003.

160. *Rasmussen J. T., Rasmussen M. S., Petersen T. E.* Cysteines involved in the interconversion between dehydrogenase and oxidase forms of bovine xanthine oxidoreductase // *J. Dairy Sci.* 2000. Vol. 83. P. 499–506.

161. Reduction of nitrite to nitric oxide catalysed by xanthine oxidoreductase / B. Godber [et al.] // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275. P. 7757–7763.

162. Xanthine oxidoreductase catalyses the reduction of nitrates and nitrite to nitric oxide under hypoxic conditions / T. M. Millar [et al.] // *FEBS Lett.* 1998. Vol. 427. P. 225–228.

163. A new route to peroxynitrite: a role for xanthine oxidoreductase / B. Godber [et al.] // *FEBS Lett.* 2000. Vol. 475. P. 93–96.

164. Molecular cloning and characterization of a chromosomal gene for human eosinophil peroxidase / K. Sakamaki [et al.] // *J. Biol. Chem.* 1989. Vol. 264. P. 16828–16836.

165. *Nauseef W. M., Malech H. L.* Analysis of the peptide subunits of human neutrophil myeloperoxidase // *Blood.* 1986. Vol. 67. P. 1504–1507.

166. *Fiedler T. J., Davey C. A., Fenna R. E.* X-ray crystal structure and characterization of halide-binding sites of human myeloperoxidase at 1.8 Å resolution // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275. P. 11964–11971.

167. Active site structure and catalytic mechanisms of human peroxidases / P. G. Furtmüller [et al.] // *Arch. Biochem. Biophys.* 2006. Vol. 445. P. 199–213.

168. *Arnold J.* Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase // *Biochemistry (Moscow).* 2004. Vol. 69. P. 4–9.

169. *Van Dalen C. J., Whitehouse M., Kettle A. J.* Thiocyanate and chloride as competing substrates for myeloperoxidase // *Biochem. J.* 1997. Vol. 327. P. 487–492.

170. *Davies M. J.* Myeloperoxidase-derived oxidation: mechanisms of biological damage and its prevention // *J. Clin. Biochem. Nutr.* 2011. Vol. 48. P. 8–19.

171. Mechanism of reaction of hydrogen peroxide with horseradish peroxidase: identification of intermediates in the catalytic cycle / J. N. Rodriguez-Lopez [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* 2001. Vol. 123. P. 11838–11847.

172. Compounds I of catalase and horse radish peroxidase: π -cation radicals / D. Dolphin, [et al.] // *PNAS.* 1991. Vol. 68. P. 614–618.

173. Redox properties of the couple compound I/native enzyme of myeloperoxidase and eosinophil peroxidase / J. Arnhold [et al.] // *Eur. J. Biochem.* 2001. Vol. 268. P. 5142–5148.

174. *Schultz J., Kaminker K.* Myeloperoxidase of the leucocyte of normal human blood. I. Content and localization // *Arch. Biochem. Biophys.* 1962. Vol. 96. P. 465–467.

175. *Klebanoff S. J.* Myeloperoxidase: friend and foe // *J. Leukoc. Biol.* 2005. Vol. 77. P. 598–625.

176. *Nichols B. A., Bainton D. F.* Differentiation of human monocytes in bone marrow and blood. Sequential formation of two granule populations // *Lab. Invest.* 1973. Vol. 29. P. 27.

177. Endothelial transcytosis of myeloperoxidase confers specificity to vascular ECM proteins as targets of tyrosine nitration / S. Baldus [et al.] // *J. Clin. Invest.* 2001. Vol. 108. P. 1759–1770.

178. *Кудряшов Ю. Б.* Радиационная биофизика (ионизирующие излучения). М. : Физматлит, 2004.

179. Черенкевич С. Н., Мартинович Г. Г. Молекулярные механизмы редокс-регуляции клеточных процессов // Химия, структура и функции биомолекул : материалы III Междунар. конф. Минск : Право и экономика, 2008. С. 273–274.
180. Bioengineering and Biophysical Aspects of Electromagnetic Fields // CRC press, 2006.
181. Guidelines for limiting exposure to time-varying electric, magnetic, and electromagnetic fields / A. Ahlbom [et al.] // Health Physics. 1998. Vol. 74. P. 494–521.
182. Controlling cell behavior electrically: current views and future potential / C. D. McCaig [et al.] // Physiol Rev. 2005. Vol. 85. P. 943–978.
183. Hotary K. B., Robinson K. R. Endogenous electrical currents and the resultant voltage gradients in the chick embryo // Dev. Biol. 1990. Vol. 140. P. 149–160.
184. Nuccitelli R. A role for endogenous electric fields in wound healing // Curr. Top. Dev. Biol. 2003. Vol. 58. P. 1–26.
185. McGinnis M. E., Venable J. W. Wound epithelium resistance controls stump currents // Dev. Biol. 1986. Vol. 116. P. 174–183.
186. Hastings G. W., Mahmud F. A. Electrical effects in bone // J. Biomed. Eng. 1988. Vol. 10. P. 515–521.
187. Otter M. W., McLeod K. J., Rubin C. T. Effects of electromagnetic fields in experimental fracture repair // Clin. Orthop. Relat. Res. 1998. Vol. 355. P. 90–104.
188. Antonsson E. K., Mann R. W. The frequency content of gait // J. Biomech. 1985. Vol. 18. P. 39–47.
189. Funk R. H., Monsees T. K. Effects of electromagnetic fields on cells: physiological and therapeutical approaches and molecular mechanisms of interaction // Cells Tiss Org. 2006. Vol. 182. P. 59–78.
190. Differential patterns of spinal sympathetic out flow involving a 10-Hz rhythm / G. L. Gebber [et al.] // J. Neurophysiol. 1999. Vol. 82. P. 841–854.
191. Funk R. H. Endogenous electric fields as guiding cue for cell migration // Front. Physiol. 2015. Vol. 6. P. 143.
192. Roles of microtubules, cell polarity and adhesion in electric-field-mediated motility of 3T3 fibroblasts / E. Finkelstein [et al.] // J. Cell Sci. 2004. Vol. 117. P. 1533–1545.
193. DC electric fields induce rapid directional migration in cultured human corneal epithelial cells / B. Farboud [et al.] // Exp. Eye Res. 2000. Vol. 70. P. 667–673.
194. Chondrocyte translocation response to direct current electric fields / P. H. Chao [et al.] // J. Biomech. Eng. 2000. Vol. 122. P. 261–267.
195. Rapp B., de Boissel eury-Chevance A., Gruler H. Galvanotaxis of human granulocytes. Dose-response curve // Eur. Biophys. J. 1988. Vol. 16. P. 313–319.
196. Osteoclasts and osteoblasts migrate in opposite directions in response to a constant electrical field / J. Ferrier [et al.] // J. Cell Physiol. 1986. Vol. 129. P. 283–288.
197. Galvanotropic and galvanotaxic responses of corneal endothelial cells / P. C. Chang [et al.] // J. Formos Med. Assoc. 1996. Vol. 95. P. 623–627.
198. Bi-directional migration of lens epithelial cells in a physiological electrical field / E. Wang [et al.] // Exp. Eye Res. 2003. Vol. 76. P. 29–37.
199. Electrical stimulation directly induces pre-angiogenic responses in vascular endothelial cells by signaling through VEGF receptors / M. Zhao [et al.] // J. Cell Sci. 2004. Vol. 117. P. 397–405.

200. *Li X., Kolega J.* Effects of direct current electric fields on cell migration and actin filament distribution in bovine vascular endothelial cells // *J. Vasc. Res.* 2002. Vol. 39. P. 391.
201. Re-orientation and faster, directed migration of lens epithelial cells in a physiological electric field / *E. Wang [et al.]* // *Exp. Eye Res.* 2000. Vol. 71. P. 91–98.
202. *Hinkle L., McCaig C. D., Robinson K. R.* The direction of growth of differentiating neurons and myoblasts from frog embryos in an applied electric field // *J. Physiol.* 1981. Vol. 314. P. 121–135.
203. *Borgens R. B., Ruederer E., Cohen M. J.* Enhanced spinal cord regeneration in Lamprey by applied electrical fields // *Science.* 1981. Vol. 213. P. 611–617.
204. *McCaig C. D., Rajnicek A. M.* Electrical fields, nerve growth and nerve regeneration // *Exp. Physiol.* 1991. Vol. 76. P. 473–494.
205. *Черенкевич С. Н., Мартинович Г. Г.* Регуляция роста нейритов // *Успехи физиол. наук.* 2001. Том 32, № 3. С. 23–39.
206. *McCaig C. D.* Dynamic aspects of amphibian neurite growth and the effects of an applied electric field // *J. Physiol. (Lond).* 1986. Vol. 375. P. 55–69.
207. *Patel N., Poo M. M.* Orientation of neurite growth by extracellular electric fields // *J. Neurosci.* 1982. Vol. 2. P. 483–496.
208. *McCaig C. D.* Nerve growth in the absence of growth cone filopodia and the effects of a small applied electric field // *J. Cell Sci.* 1989. Vol. 93. P. 715–721.
209. *McCaig C. D.* Nerve branching is induced and oriented by a small applied electric field // *J. Cell Sci.* 1990. Vol. 95. P. 605–615.
210. Membrane lipids, EGF receptors, and intracellular signals colocalize and are polarized in epithelial cells moving directionally in a physiological electric field / *M. Zhao [et al.]* // *FASEB J.* 2002. Vol. 16. P. 857–859.
211. *Tanaka E., Soibray J.* Making the connection: cytoskeletal rearrangements during growth cone guidance // *Cell.* 1995. Vol. 83. P. 171–176.
212. *Heidemann S., Lamourex P., Buxbaum R.* Growth cone behaviour and production of traction force // *J. Cell Biol.* 1990. Vol. 111. P. 1949–1951.
213. *Smith C. L.* Cytoskeletal movements and substrate interactions during initiation of neurite outgrowth by sympathetic neurons in vitro // *J. Neurosci.* 1994. Vol. 14. P. 384–398.
214. *Lamourex P., Buxbaum R., Heidemann S.* Direct evidence that growth cones pull // *Nature.* 1989. Vol. 340. P. 159–162.
215. Liquid crystal domains and thixotropy of filamentous actin suspensions / *A. Kerst [et al.]* // *PNAS.* 1990. Vol. 87. P. 4241–4245.
216. *Lauffenburger D. A., Horwitz A. F.* Cell migration: a physically integrated molecular process // *Cell.* 1996. Vol. 84. P. 359–369.
217. *Schmidt A., Hall M.* Signaling to actin cytoskeletal // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1998. Vol. 14. P. 305–338.
218. *Hotchin N., Hall A.* The assembly of integrin adhesion complexes requires both extracellular matrix and intracellular rho/rac GTPases // *J. Cell Biol.* 1995. Vol. 131. P. 1857.
219. *Luther P. W., Peng H. B., Lin J.* Changes in cell shape and actin distribution induced by constant electric fields // *Nature.* 1983. Vol. 303. P. 61–64.
220. *Poo M., Robinson K.* Electrophoresis of concanavalin A receptors along embryonic muscle cell membrane // *Nature.* 1977. Vol. 265. P. 602–605.

221. Valberg P. A., Kavet R., Rafferty C. N. Can low-level 50/60 Hz electric and magnetic fields cause biological effects? // *Radiat. Res.* 1997. Vol. 148. P. 2–21.
222. McCaig C. D. Nerve growth in a small applied electric field and the effects of pharmacological agents on rate and orientation // *J. Cell Sci.* 1990. Vol. 95. P. 617–622.
223. Baas P., White L., Heidemann S. Microtubule polarity reversal accompanies regrowth of amputated neurites // *PNAS.* 1987. Vol. 84. P. 5272–5276.
224. Marsh L., Letourneau P. Growth of neurites without filapodial or lamellopodial activity in the presence of cytochalasin B // *J. Cell Biol.* 1984. Vol. 99. P. 2041–2047.
225. Dynamic changes in traction forces with DC electric field in osteoblast-like cells / S. Curtze [et al.] // *J. Cell Sci.* 2004. Vol. 117. P. 2721–2729.
226. Poo M. In situ electrophoresis of membrane components // *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 1981. Vol. 10. P. 245–276.
227. Effects of electrical fields on cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells / H. Sauer [et al.] // *J. Cell. Biochem.* 1999. Vol. 75. P. 710–723.
228. Sundelacruz S., Levin M., Kaplan D. L. Role of membrane potential in the regulation of cell proliferation and differentiation // *Stem Cell Rev. Rep.* 2009. Vol. 5, № 3. P. 231–246.
229. Binggeli R., Weinstein R. C. Membrane potentials and sodium channels: hypotheses for growth regulation and cancer formation based on changes in sodium channels and gap junctions // *J. theor. biol.* 1986. Vol. 123, № 4. P. 377–401.
230. Freedman B. D., Price M. A., Deutsch C. J. Evidence for voltage modulation of IL-2 production in mitogenstimulated human peripheral blood lymphocytes // *J. Immunol.* 1992. Vol. 149. P. 3784–3794.
231. Wilson G. F., Chiu S. Y. Mitogenic factors regulate ion channels in Schwann cells cultured from newborn rat sciatic nerve // *J. Physiol.* 1993. Vol. 470. P. 501–520.
232. Blackiston D. J., McLaughlin K. A., Levin M. Bioelectric controls of cell proliferation: ion channels, membrane voltage and the cell cycle // *Cell cycle.* 2009. Vol. 8. P. 3527–3536.
233. Bregestovski P., Medina I., Goyda E. Regulation of potassium conductance in the cellular membrane at early embryogenesis // *J. Physiol. Paris.* 1992. Vol. 86. P. 109–115.
234. Bauer C. K., Schwarz J. R. Physiology of EAG K⁺ channels // *J. Membr. Biol.* 2001. Vol. 182. P. 1–15.
235. Sundelacruz S., Levin M., Kaplan D. L. Membrane potential controls adipogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells // *PLoS ONE.* 2008. Vol. 3. P. e3737.
236. Buonanno A., Fields R. D. Gene regulation by patterned electrical activity during neural and skeletal muscle development // *Curr. Opin. Neurobiol.* 1999. Vol. 9. P. 110–120.
237. Redox regulation of calcium ion channels: chemical and physiological aspects / I. Bokesi [et al.] // *Cell calcium.* 2011. Vol. 50. P. 407–423.
238. Correlation between cell migration and reactive oxygen species under electric field stimulation / S. Y. Wu [et al.] // *Biomicrofluidics.* 2015. Vol. 9. P. 054120.
239. Wartenberg M., Hescheler J., Sauer H. Electrical fields enhance growth of cancer spheroids by reactive oxygen species and intracellular Ca²⁺ // *Am. J. Physiol.* 1997. Vol. 272. P. 1677–1683.
240. Direct current electrical fields induce apoptosis in oral mucosa cancer cells by NADPH oxidase-derived reactive oxygen species / M. Wartenberg [et al.] // *Bioelectromagnetics.* 2008. Vol. 29. P. 47–54.

241. *Sauer H., Wartenberg M.* Reactive oxygen species as signaling molecules in cardiovascular differentiation of embryonic stem cells and tumor-induced angiogenesis // *Antioxid. Redox Signal.* 2005. Vol. 7. P. 1423–1434.
242. Stimulation of ES-cell-derived cardiomyogenesis and neonatal cardiac cell proliferation by reactive oxygen species and NADPH oxidase / M. Buggisch [et al.] // *J. Cell Sci.* 2007. Vol. 120. P. 885–894.
243. Embryonic stem cells utilize reactive oxygen species as transducers of mechanical strain-induced cardiovascular differentiation. / M. Schmelter [et al.] // *FASEB J.* 2006. Vol. 20. P. 1182–1184.
244. Reactive oxygen species and upregulation of NADPH oxidases in mechanotransduction of embryonic stem cells / H. Sauer [et al.] // *Advanced Protocols in Oxidative Stress I.* Humana Press, 2008. P. 397–418.
245. Static electromagnetic fields induce vasculogenesis and chondro-osteogenesis of mouse embryonic stem cells by reactive oxygen species-mediated up-regulation of vascular endothelial growth factor / M. Bekhite [et al.] // *Stem Cells Dev.* 2009. Vol. 19. P. 731–743.
246. Static magnetic fields increase cardiomyocyte differentiation of Flk-1+ cells derived from mouse embryonic stem cells via Ca^{2+} influx and ROS production / M. Bekhite [et al.] // *Int. J. Cardiol.* 2013. Vol. 167. P. 798–808.
247. Ascorbic acid enhances differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes / T. Takahashi [et al.] // *Circulation.* 2003. Vol. 107. P. 1912–1916.
248. NADPH oxidase and eNOS control cardiomyogenesis in mouse embryonic stem cells on ascorbic acid treatment / C. Bartsch [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* 2011. Vol. 51. P. 432–443.
249. Amputation-induced reactive oxygen species are required for successful *Xenopus* tadpole tail regeneration / N. R. Love [et al.] // *Nat. Cell Biol.* 2013. Vol. 15. P. 222–228.
250. *Levin M.* Large-scale biophysics: ion flows and regeneration // *Trends Cell Biol.* 2007. Vol. 17. P. 261–270.
251. *Reid B., Song B., Zhao M.* Electric currents in *Xenopus* tadpole tail regeneration // *Dev. Biol.* 2009. Vol. 335. P. 198–207.
252. Early bioelectric activities mediate redox-modulated regeneration / F. Ferreira [et al.] // *Development.* 2016. Vol. 143, № 24. P. 4582–4594.
253. Superoxide Mediates Direct Current Electric Field-Induced Directional Migration of Glioma Cells through the Activation of AKT and ERK / F. Li [et al.] // *PLoS ONE.* 2013. Vol. 8. P. e61195.
254. Mechanism of short-term ERK activation by electromagnetic fields at mobile phone frequencies / J. Friedman [et al.] // *Biochem. J.* 2007. Vol. 405. P. 559–568.
255. *Черенкевич С. Н., Мартинович Г. Г., Хмельницкий А. И.* Биологические мембраны. Минск : БГУ, 2009.
256. *Lu Y. S., Huang B. T., Huang Y. X.* Reactive oxygen species formation and apoptosis in human peripheral blood mononuclear cell induced by 900 MHz mobile phone radiation // *Oxid. Med. Cell Longev.* 2012. Vol. 2012. P. 740280.
257. NADPH oxidase-produced superoxide mediated a 50-Hz magnetic field-induced epidermal growth factor receptor clustering / B. Feng [et al.] // *Int. J. Radiat. Biol.* 2016. Vol. 92. P. 596–602.
258. Exposure to a 50-Hz magnetic field induced mitochondrial permeability transition through the ROS/GSK-3 β signaling pathway / B. Feng [et al.] // *Int. J. Radiat. Biol.* 2016. Vol. 92. P. 148–155.

259. *Бинзу В. Н.* Принципы электромагнитной биофизики. М. : Физматлит, 2011.
260. *Grissom C. B.* Magnetic-field effects in biology – a survey of possible mechanisms with emphasis on radical-pair recombination // *Chem. Rev.* 1995. Vol. 95. P. 3–24.
261. *Ritz T., Adem S., Schulten K.* A model for photoreceptor-based magnetoreception in birds // *Biophys. J.* 2000. Vol. 78. P. 707–718.
262. Cryptochrome mediates light-dependent magnetosensitivity in *Drosophila* / *R. J. Gegear [et al.]* // *Nature.* 2008. Vol. 454. P. 1014–1061.
263. *Solov'yov I. A., Schulten K.* Magnetoreception through cryptochrome may involve superoxide // *Biophys. J.* 2009. Vol. 96. P. 4804–4813.
264. Spin biochemistry modulates reactive oxygen species (ROS) production by radio frequency magnetic fields / *R. J. Usselman [et al.]* // *PloS one.* 2014. Vol. 9. P. e93065.
265. *Ritz T., Adem S., Schulten K.* A model for photoreceptor-based magnetoreception in birds // *Biophys. J.* 2000. Vol. 78. P. 707–718.
266. *Solov'yov I. A., Mouritsen H., Schulten K.* Acuity of a cryptochrome and vision-based magnetoreception system in birds // *Biophys. J.* 2010. Vol. 99. P. 40–49.
267. *Anders J. J., Lanzafame R. J., Arany P. R.* Low-level light/laser therapy versus photobiomodulation therapy // *Photomed. Laser Surg.* 2015. Vol. 33. P. 183–184.
268. *Karu T.* Is it time to consider photobiomodulation as a drug equivalent? // *Photomed. Laser Surg.* 2013. Vol 31, № 5. P. 189–191.
269. *Кару Т. Й.* Универсальный клеточный механизм лазерной биостимуляции: фотоактивация фермента дыхательной цепи цитохром-с-оксидазы // *Современные лазерно-информационные и лазерные технологии : сб. тр. ИПЛИТ РАН.* 2005. С. 131–143.
270. Role of reactive oxygen species in low level light therapy / *A. C. -H. Chen [et al.]* // *Proc. SPIE.* 2009. Vol. 7165. P. 716502–716501.
271. 780 nm Low Power Diode Laser Irradiation Stimulates Proliferation of Keratinocyte Cultures: Involvement of Reactive Oxygen Species / *N. Grossman [et al.]* // *Lasers Surg. Med.* 1998. Vol. 22. P. 212–218
272. Intra- and extracellular reactive oxygen species generated by blue light / *Y. Omata [et al.]* // *Inc. J Biomed. Mater. Res.* 2006. Vol. 77. P. 470–477.
273. Low-level laser therapy activates NF-kB via generation of reactive oxygen species in mouse embryonic fibroblasts / *A. C. Chen [et al.]* // *PLoS ONE.* 2011. Vol. 6. P. e22453.
274. *Karu T. I.* Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells // *J. Photochem. Photobiol.* 1999. Vol. 49. P. 1–17.
275. *Karu T. I.* Cellular mechanisms of low-power laser therapy // *Proceed. SPIE.* 2003. Vol. 5149. P. 60–66.
276. *Кару Т. Й.* Клеточные механизмы низкоинтенсивной лазерной терапии // *Успехи совр. биол.* 2001. Т. 121. С. 110–120.
277. *Владимиров Ю. А., Осипов А. Н., Клебанов Г. И.* Фотобиологические основы терапевтического применения лазерного облучения // *Биохимия.* 2004. Т. 69. С. 103–113.
278. *Karu T. I., Kolyakov S. F.* Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy // *Photomed. Laser Ther.* 2005. Vol. 23, № 4. P. 355–361.

279. *AlGhandi A., Kumar A., Moussa N. A.* Low level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells // *Lasers Med. Sci.* 2012. Vol. 27. P. 237–249.
280. Cellular response to infrared radiation involves retrograde mitochondrial signaling / P. Schroeder [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* 2007. Vol. 43. P. 128–135.
281. *Karu T. I.* Mitochondrial signaling in mammalian cells activated by red and near-IR radiation // *Photochem. Photobiol.* 2008. T. 84, № 5. С. 1091–1099.
282. *Hamblin M. R.* Mechanisms and mitochondrial redox signaling in photobiomodulation *Photochem. Photobiol.* 2018. Vol. 94, № 2. P. 199–212.
283. *Karu T. I.* Mitochondrial mechanisms of photobiomodulation in context of new data about multiple roles of ATP // *Photomed. Laser Surg.* 2010. Vol. 28. P. 159–160.
284. *Karu T. I.* Molecular mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser radiation // *Lasers Life Sci.* 1988. Vol. 2, № 1. P. 53–74.
285. *Karu T. I.* Multiple roles of cytochrome c oxidase in mammalian cells under action of red and IR-A radiation // *IUBMB Life.* 2010. Vol. 62. P. 607–610.
286. *Hamblin M. R.* Introduction to experimental and clinical studies using low level laser (light) therapy (LLLT) // *Lasers Surg. Med.* 2010. Vol. 42. P. 447–449.
287. *Кару Т. И., Афанасьева Н. И.* Цитохром с оксидаза как первичный фото-акцептор при лазерном воздействии света видимого и ближнего ИК-диапазона на культуру клеток // Доклады АН. 1995. Т. 342. С. 693–695.
288. The Activation of Yeast Metabolism with He Ne Laser Radiation²I. Protein Synthesis in Various Cultures / G. E. Fedoseyeva [et al.] // *Lasers Life Sci.* 1988. Vol. 2. P. 137–146.
289. High fluence low-power laser irradiation induces mitochondrial permeability transition mediated by reactive oxygen species / S. Wu [et al.] // *J. Cell. Physiol.* 2009. Vol. 218. P. 603–611.
290. Manipulating the mitochondria activity in human hepatic cell line Huh7 by low-power laser irradiation / A. Lynnyk [et al.] // *Biomed. Opt. Express.* 2018. Vol. 9. P. 1283–1300.
291. Молекулярно-клеточные механизмы действия низкоинтенсивного лазерного излучения. / Ю. А. Владимиров [и др.] // *Биофизика.* 2004. Т. 49. С. 339–350.
292. Роль продуктов перекисного окисления липидов в механизме действия лазерного облучения на лейкоциты крови человека / Г. И. Клебанов [и др.] // *Биофизика.* 2005. Т. 50. С. 862–866.
293. Low-power laser irradiation induces leukocyte priming / G. I. Klebanov [et al.] // *Gen. Physiol. Biophys.* 1998. Vol. 17. P. 365–376.
294. Роль порфиринов плазмы в стимулирующем действии излучения He-Ne-лазера на лейкоциты человека / Г. И. Клебанов [и др.] // *Биофизика.* 2005. Т. 50. С. 713–718.
295. Photoreactivation of superoxide dismutase by intensive red (laser) light / Y. A. Vladimirov [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* 1988. Vol. 5. P. 281–286.
296. *Горбатенкова Е. А., Азизова О. А., Владимиров Ю. А.* Реактивация супероксиддисмутазы излучением гелий-неонового лазера // *Биофизика.* 1988. Т. 33. С. 717–718.
297. *Клебанов Г. И., Полтанов Е. А., Владимиров Ю. А.* Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения красного диапазона на активность супероксиддисмутазы макрофагов // *Биофизика.* 2003. Т. 48. С. 462–473.

298. NO-hemoglobin may be a light-sensitive source of nitric oxide both in solution and in red blood cells / Y. Vladimirov [et al.] // J. Photochem. Photobiol. B. 2000. Vol. 59. P. 115–122.
299. Blue laser light increases perfusion of a skin flap via release of nitric oxide from hemoglobin / R. Mittermayr [et al.] // Mol. Med. 2007. Vol. 13, № 1–2. P. 22–29.
300. Effects of Laser Radiation on Mitochondria and Mitochondrial Proteins Subjected to Nitric Oxide / A. N. Osipov [et al.] // Front. Med. 2018. Vol. 5. P. 112.
301. Metabolic relationships between lipolysis and respiration in rat brown adipocytes. The role of long chain fatty acids as regulators of mitochondrial respiration and feedback inhibitors of lipolysis / L. J. Bukowiecki [et al.] // J. Biol. Chem. (1981). Vol. 256. P. 12840–12848.
302. Oxidative metabolism in cells isolated from brown adipose tissue. 2. Catecholamine regulated respiratory control / S. B. Prusiner [et al.] // Eur. J. Biochem. 1968. Vol. 7. P. 51–57.
303. Пастухов Ю. Ф., Хаскин В. В. Адренергический контроль термогенеза при экспериментальной адаптации животных к холоду // Успехи физиол. наук. 1979. Т. 10, № 3. С. 121–144.
304. Skulachev V. P. Fatty acid circuit as a physiological mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation // FEBS Lett. 1991. Vol. 294. P. 158–162.
305. Cannon B., Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance // Physiol. Rev. 2004. Vol. 84. P. 277–359.
306. Jezek P., Garlid K. D. Mammalian mitochondrial uncoupling proteins // Int. J. Biochem. Cell Biol. 1998. Vol. 30, № 11. P. 1163–1168.
307. Nicholls D. G. The physiological regulation of uncoupling proteins // BBA-Bioenergetics. 2006. Vol. 1757. P. 459–466.
308. Lowell B. B., Spiegelman B. M. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis // Nature. 2000. Vol. 204. P. 652–660.
309. Fatty acids as acute regulators of the proton conductance of hamster brown-fat mitochondria / R. M. Locke [et al.] // Eur. J. Biochem. 1982. Vol. 129. P. 373–380.
310. Rial E., Poustie A., Nicholls D. G. Brown-adipose-tissue mitochondria: the regulation of the 32000-Mr uncoupling protein by fatty acids and purine nucleotides // Eur. J. Biochem. 1983. Vol. 137. P. 197–203.
311. Mitochondrial ROS regulate thermogenic energy expenditure and sulfenylation of UCP1 / E. T. Chouchani [et al.] // Nature. 2016. Vol. 532. P. 112–116.
312. Chouchani E. T., Kazak L., Spiegelman B. M. Mitochondrial reactive oxygen species and adipose tissue thermogenesis: bridging physiology and mechanisms // J. Biol. Chem. 2017. Vol. 292, № 41. P. 16810–16816.
313. Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins / K. S. Echtay [et al.] // Nature. 2002. Vol. 415. P. 96–99.
314. Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production / D. Arsenijevic [et al.] // Nature Genet. (2000). Vol. 26. P. 435–439.
315. Casteilla L., Rigoulet M., Penicaud L. Mitochondrial ROS metabolism: Modulation by uncoupling proteins // IUBMB Life. 2001. Vol. 52. P. 181–188.
316. Benjamin I. J., Kroger B., Williams R. S. Activation of the heat shock transcription factor by hypoxia in mammalian cells // PNAS. 1990. Vol. 87. P. 6263–6267.

317. *Anckar J., Sistonen L.* Regulation of HSF1 function in the heat stress response: implications in aging and disease // *Annu. Rev. Biochem.* 2011. Vol. 80. P. 1089–1115.
318. *Никитин К. Д.* Белки теплового шока: биологические функции и перспективы применения // *Клин. онкогематология.* 2008. Т. 1, № 2. С. 125–130.
319. *Voth W., Jakob U.* Stress-activated chaperones: a first line of defense // *Trends Biochem. Sci.* 2017. Vol. 42. P. 899–913.
320. *Liebtal M., Dietz K. J.* The Fundamental Role of Reactive Oxygen Species in Plant Stress Response // *Plant Stress Tolerance. Methods in Molecular Biology*, vol 1631. Humana Press, New York, 2017.
321. *Sato K., Akiba Y., Toyomizu M.* Acute heat stress stimulates mitochondrial superoxide production in broiler skeletal muscle, possibly via downregulation of uncoupling protein content / A. Mujahid [et al.] // *Poult. Sci.* 2006. Vol. 85. P. 1259–1265.
322. *Davidson J. F., Schiestl R. H.* Mitochondrial respiratory electron carriers are involved in oxidative stress during heat stress in *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol. Cell Biol.* 2001. Vol. 21. P. 8483–8489.
323. *Kikusato M., Toyomizu M.* Crucial role of membrane potential in heat stress-induced overproduction of reactive oxygen species in avian skeletal muscle mitochondria // *PLoS One.* 2013. Vol. 8. P. e64412.
324. Quantifying changes in the thiol redox proteome upon oxidative stress in vivo / L. I. Leichert [et al.] // *PNAS.* 2008. Vol. 105. P. 8197–8202.
325. The expanding landscape of the thiol redox proteome / J. Yang [et al.] // *Mol. Cell. Proteomics.* 2016. Vol. 15. P. 1–11.
326. Chaperone activity with a redox switch / U. Jakob [et al.] // *Cell.* 1999. Vol. 96. P. 341–352.
327. The crystal structure of the reduced, Zn^{2+} -bound form of the *B. subtilis* Hsp33 chaperone and its implications for the activation mechanism / I. Janda [et al.] // *Structure.* 2004. Vol. 12. P. 1901–1907.
328. *Maret W.* Zinc coordination environments in proteins as redox sensors and signal transducers // *Antioxid. Redox Signal.* 2006. Vol. 8. P. 1419–1441.
329. *Naidu S. D., Dinkova-Kostova A. T.* Regulation of the mammalian heat shock factor 1 // *FEBS J.* 2017. Vol. 284, № 11. P. 1606–1627.
330. *Akerfelt M., Morimoto R. I., Sistonen L.* Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2010. Vol. 11. P. 545–555.
331. HSF4 is required for normal cell growth and differentiation during mouse lens development / M. Fujimoto [et al.] // *EMBO J.* 2004. Vol. 23. P. 4297–4306.
332. Reactive oxygen species play an important role in the activation of heat shock factor 1 in ischemic-reperfused heart / J. Nishizawa [et al.] // *Circulation.* 1999. Vol. 99, № 7. P. 934–941.
333. Reactive oxygen species (ROS) and the heat stress response of *Daphnia pulex*: ROS-mediated activation of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and heat shock factor 1 (HSF-1) and the clustered expression of stress genes / E. Klumpen [et al.] // *Biol. Cell.* 2017. Vol. 109. P. 39–64.
334. Uncoupling stress-inducible phosphorylation of heat shock factor 1 from its activation / M. A. Budzynski [et al.] // *Mol. Cell Biol.* 2015. Vol. 35. P. 2530–2540.
335. Phosphorylation of serine 230 promotes inducible transcriptional activity of heat shock factor 1 / C. I. Holmberg [et al.] // *EMBO J.* 2001. Vol. 20. P. 3800–3810.

336. Analysis of phosphorylation of human heat shock factor 1 in cells experiencing a stress / T. Guettouche [et al.] // BMC Biochem. 2005. Vol. 6. P. 4.
337. mTOR is essential for the proteotoxic stress response, HSF1 activation and heat shock protein synthesis / S. D. Chou [et al.] // PLoS One. 2012. Vol. 7. P. e39679.
338. MEK guards proteome stability and inhibits tumor-suppressive amyloidogenesis via HSF1 / Z. Tang [et al.] // Cell. 2015. Vol. 160. P. 729–744.
339. Heat shock factor 1 is a substrate for p38 mitogen-activated protein kinases / S. Dayalan Naidu [et al.] // Mol. Cell Biol. 2016. Vol. 36. P. 2403–2417.
340. Ahn S. G., Thiele D. J. Redox regulation of mammalian heat shock factor 1 is essential for Hsp gene activation and protection from stress // Genes Dev. 2003. Vol. 17. P. 516–528.
341. Two distinct disulfide bonds formed in human heat shock transcription factor 1 act in opposition to regulate its DNA binding activity / M. Lu [et al.] // Biochemistry. 2008. Vol. 47. P. 6007–6015.
342. Hahn C., Schwartz M. A. Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2009. Vol. 10, № 1. P. 53.
343. Burger E. H., Klein-Nulend J. Mechanotransduction in bone – role of the lacuno-canalicular network // FASEB J. 1999. Vol. 13. S. 101–112.
344. Beloussov L. V., Lakirev A. V., Naumidi I. I. The role of external tensions in differentiation of *Xenopus laevis* embryonic tissues // Cell Differ. Dev. 1988. Vol. 25. P. 165–176.
345. Hamill O. P., Martinac B. Molecular basis of mechanotransduction in living cells // Physiol. Rev. 2001. Vol. 81, № 2. P. 685–740.
346. Wirtz H. R., Dobbs L. G. The effects of mechanical forces on lung functions // Respir. Physiol. 2000. Vol. 119. P. 1–17.
347. Mechanisms of mechanotransduction / A. W. Orr [et al.] // Dev. Cell. 2006. Vol. 10. P. 11–20.
348. Martinac B. Mechanosensitive ion channels: molecules of mechanotransduction // J. Cell Sci. 2004. Vol. 117. P. 2449–2460.
349. Brandes R. P., Weissmann N., Schröder K. Nox family NADPH oxidases in mechano-transduction: mechanisms and consequences // Antioxid. Redox Signal. 2014. Vol. 20. P. 887–898.
350. Brandes R. P., Kreuzer J. Vascular NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation // Cardiovasc Res. 2005. Vol. 65. P. 16–27.
351. Mechanical stretch enhances mRNA expression and proenzyme release of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) via NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species / K. Grote [et al.] // Circ. Res. 2003. Vol. 92. P. e80–e86.
352. Lehoux S. Redox signalling in vascular responses to shear and stretch // Cardiovasc. Res. 2006. Vol. 71. P. 269–279.
353. Oxygen activates the Rho/Rho-kinase pathway and induces RhoB and ROCK-1 expression in human and rabbit ductus arteriosus by increasing mitochondria-derived reactive oxygen species: a newly recognized mechanism for sustaining ductal constriction / H. Kajimoto [et al.] // Circulation. 2007. Vol. 115. P. 1777–1788.
354. Amberg G. C., Earley S., Glapa S. A. Local regulation of arterial L-type calcium channels by reactive oxygen species // Circ. Res. 2010. Vol. 107. P. 1002–1010.
355. Calcium-dependent NOX5 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase contributes to vascular oxidative stress in human coronary artery disease / T. J. Guzik [et al.] // J. Am. Coll. Cardiol. 2008. Vol. 52. P. 1803–1809.

356. Synergistic effect of mechanical stretch and angiotensin II on superoxide production via NADPH oxidase in vascular smooth muscle cells / H. Hitomi [et al.] // *J. Hypertens.* 2006. Vol. 24. P. 1089–1095.
357. Skeletal muscle NADPH oxidase is increased and triggers stretch-induced damage in the mdx mouse / N. P. Whitehead [et al.] // *PLoS One*. 2010. Vol. 5. P. e15354.
358. *Prosser B. L., Ward C. W., Lederer W. J.* X-ROS signaling: rapid mechano-chemo transduction in heart // *Science*. 2011. Vol. 333. P. 1440–1445.
359. *Browe D. M., Baumgarten C. M.* EGFR kinase regulates volume-sensitive chloride current elicited by integrin stretch via PI-3K and NADPH oxidase in ventricular myocytes // *J. Gen. Physiol.* 2006. Vol. 127. P. 237–251.
360. *Brooks A. R., Lelkes P. I., Rubanyi G. M.* Gene expression profiling of human aortic endothelial cells exposed to disturbed flow and steady laminar flow // *Physiol. Genomics*. 2002. Vol. 9. P. 27–41.
361. Pulsatile flow and atherosclerosis in the human carotid bifurcation. Positive correlation between plaque location and low oscillating shear stress / D. N. Ku [et al.] // *Arteriosclerosis*. 1985. Vol. 5. P. 293–302.
362. *Chiu J. J., Chien S.* Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives // *Physiol. Rev.* 2011. Vol. 91. P. 327–387.
363. Oscillatory and steady laminar shear stress differentially affect human endothelial redox state: role of a superoxide-producing NADH oxidase / G. W. De Keulenaer [et al.] // *Circ. Res.* 1998. Vol. 82. P. 1094–1101.
364. Flow pulsatility is a critical determinant of oxidative stress in endothelial cells / P. Silacci [et al.] // *Hypertension*. 2001. Vol. 38. P. 1162–1166.
365. *Helmlinger G., Berk B. C., Nerem R. M.* Pulsatile and steady flow-induced calcium oscillations in single cultured endothelial cells // *J. Vasc. Res.* 1996. Vol. 33. P. 360–369.
366. Altered shear stress stimulates upregulation of endothelial VCAM-1 and ICAM-1 in a BMP-4- and TGFbeta1-dependent pathway / P. Sucosky [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2009. Vol. 29. P. 254–260.
367. Increase of reactive oxygen species (ROS) in endothelial cells by shear flow and involvement of ROS in shearinduced c-fos expression / H. J. Hsieh [et al.] // *J. Cell Physiol.* 1998. Vol. 175. P. 156–162.
368. Pulsatile versus oscillatory shear stress regulates NADPH oxidase subunit expression: implication for native LDL oxidation / J. Hwang [et al.] // *Circ. Res.* 2003. Vol. 93. P. 1225–1232.
369. Reactive oxygen species cause endothelial dysfunction in chronic flow overload / X. Lu [et al.] // *J. Appl. Physiol.* 2011. Vol. 110. P. 520–527.
370. *Powers S. K., Nelson W. B., Hudson M. B.* Exercise-induced oxidative stress in humans: cause and consequences // *Free Radic. Biol. Med.* 2011. Vol. 51. P. 942–950.
371. Mechanism of ROS scavenging and antioxidant signalling by redox metallic and fullerene nanomaterials: Potential implications in ROS associated degenerative disorders / M. J. Akhtar [et al.] // *BBA-General Subjects*. 2017. Vol. 1861. P. 802–813.
372. Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm / T. Xia [et al.] // *Nano letters*. 2006. Vol. 6. P. 1794–1807.

373. Redox-active radical scavenging nanomaterials / A. Karakoti [et al.] // *Chem. Soc. Rev.* 2010. Vol. 39. P. 4422–4432.
374. Gold nanoparticles of diameter 1.4 nm trigger necrosis by oxidative stress and mitochondrial damage / Y. Pan [et al.] // *Small*. 2009. Vol. 5. P. 2067–2076.
375. Potential oxidative stress of gold nanoparticles by induced-NO releasing in serum / H. Y. Jia [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. Vol. 131. P. 40–41.
376. Non-UV-induced radical reactions at the surface of TiO₂ nanoparticles that may trigger toxic responses / I. Fenoglio [et al.] // *Chem. Eur. J.* 2009. Vol. 15. P. 4614–4621.
377. Rai M., Yadav A., Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials // *Biotechnol. Adv.* 2009. Vol. 27. P. 76–83.
378. Long, needle-like carbon nanotubes and asbestos activate the NLRP3 inflammasome through a similar mechanism / J. Palomaki [et al.] // *ACS nano*. 2011. Vol. 5. P. 6861–6870.
379. Mechanistic toxicity evaluation of uncoated and PEGylated single-walled carbon nanotubes in neuronal PC12 cells / Y. Zhang [et al.] // *ACS nano*. 2011. Vol. 5. P. 7020–7033.
380. Reactivity of carbon nanotubes: free radical generation or scavenging activity? / I. Fenoglio [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* 2006. Vol. 40. P. 1227–1233.
381. Chemical basis of interactions between engineered nanoparticles and biological systems / Q. Mu [et al.] // *Chem. Rev.* 2014. Vol. 114. P. 7740–7781.
382. Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes / H. L. Karlsson [et al.] // *Chem. Res. Tox.* 2008. Vol. 21. P. 1726–1732.
383. Cytotoxicity and oxidative DNA damage by nanoparticles in human intestinal Caco-2 cells / K. Gerloff [et al.] // *Nanotoxicolog.* 2009. Vol. 3. P. 355–364.
384. Cytotoxicity and oxidative stress induced by different metallic nanoparticles on human kidney cells / I. Pujalté [et al.] // *Part. Fibre Toxicol.* 2011. Vol. 8. P. 10.
385. Toxicological aspects of long-term treatment of keratinocytes with ZnO and TiO₂ nanoparticles / P. Kocbek [et al.] // *Small*. 2010. Vol. 6. P. 1908–1917.
386. Oxidative stress and proinflammatory effects of carbon black and titanium dioxide nanoparticles: role of particle surface area and internalized amount / S. Hussain [et al.] // *Toxicology*. 2009. Vol. 260. P. 142–149.
387. Role of surface charge and oxidative stress in cytotoxicity of organic monolayer-coated silicon nanoparticles towards macrophage NR8383 cells / S. Bhattacharjee [et al.] // *Part. Fibre Toxicol.* 2010. Vol. 7. P. 25.
388. The role of surface functionality on acute cytotoxicity, ROS generation and DNA damage by cationic gold nanoparticles / A. Chompoosor [et al.] // *Small*. 2010. Vol. 6. № 20. P. 2246–2249.
389. Nano-C60 cytotoxicity is due to lipid peroxidation / C. M. Sayes [et al.] // *Biomaterials*. 2005. Vol. 26. P. 7587–7595.
390. Oxidative damage induced by the fullerene C60 on photosensitization in rat liver microsomes / J. P. Kamat [et al.] // *Chem. Biol. Interact.* 1998. Vol. 114. P. 145–159.
391. Porphyrinfullerene [60 C] dyads with high ability to form photoinduced charge-separated state as novel sensitizers for photodynamic therapy / M. E. Milanese [et al.] // *Photochem. Photobiol.* 2005. Vol. 81. P. 891–897.
392. Photodynamic therapy with fullerenes / P. Mroz [et al.] // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2007. Vol. 6. P. 1139–1149.

393. [60] Fullerene is a powerful antioxidant in vivo with no acute or subacute toxicity / N. Gharbi [et al.] // *Nano Letters*. 2005. Vol. 5. P. 2578–2585.
394. Nitric oxide-scavenging activity of polyhydroxylated fulleranol, C₆₀(OH)₂₄ / S. M. Mirkov [et al.] // *Nitric Oxide*. 2004. Vol. 11. P. 201–207.
395. The scavenging of reactive oxygen species and the potential for cell protection by functionalized fullerene materials / J. J. Yin [et al.] // *Biomaterials*. 2009. Vol. 30. P. 611–621.
396. Antioxidant properties and hypothetical radical mechanism of fullerol C₆₀(OH)₂₄ / A. Djordjevic [et al.] // *Oxid. Commun.* 2005. Vol. 27. P. 806–812.
397. A biologically effective fullerene (C₆₀) derivative with superoxide dismutase mimetic properties / S. S. Ali [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* 2004. Vol. 37. P. 1191–1202.
398. Fullerene-based antioxidants and neurodegenerative disorders / L. L. Dugan [et al.] // *Parkinsonism Relat. Disord.* 2001. Vol. 7. P. 243–246.
399. Carboxyfullerene prevents iron-induced oxidative stress in rat brain / A. M. Lin [et al.] // *J. Neurochem.* 1999. Vol. 72. P. 1634–1640.
400. Local carboxyfullerene protects cortical infarction in rat brain / A. M. Lin [et al.] // *Neurosci. Res.* 2002. Vol. 43. P. 317–321.
401. Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties / T. Xia [et al.] // *ACS nano*. 2008. Vol. 2, № 10. P. 2121–2134.
402. Anti-inflammatory properties of cerium oxide nanoparticles / S. M. Hirst [et al.] // *Small*. 2009. Vol. 5. P. 2848–2856.
403. Ce³⁺ ions determine redox-dependent anti-apoptotic effect of cerium oxide nanoparticles / I. Celardo [et al.] // *ACS nano*. 2011. Vol. 5. P. 4537–4549.
404. *Thakur N., Manna P., Das J.* Synthesis and biomedical applications of nanoceria, a redox active nanoparticle // *J. Nanobiotechnol.* 2019. Vol. 17. P. 84.
405. Superoxide dismutase mimetic properties exhibited by vacancy engineered ceria nanoparticles / C. Korsvik [et al.] // *Chem. Commun. (Camb)*. 2007. Vol. 10. P. 1056–1058.
406. The role of cerium redox state in the SOD mimetic activity of nanoceria / E. G. Heckert [et al.] // *Biomaterials*. 2008. Vol. 29. P. 2705–2709.
407. Direct evidence for hydroxyl radical scavenging activity of cerium oxide nanoparticles / Y. Xue [et al.] // *J. Phys. Chem. C*. 2011. Vol. 115. P. 4433–4438.
408. Cerium oxide nanoparticles scavenge nitric oxide radical (*NO) / J. M. Dowding [et al.] // *Chem. Commun. (Camb)*. 2012. Vol. 48. P. 4896–4898.
409. *Dowding J. M., Seal S., Self W. T.* Cerium oxide nanoparticles accelerate the decay of peroxynitrite (ONOO⁻) // *Drug Deliv. Transl. Res.* 2013. Vol. 3. P. 375–379.
410. Nanoceria exhibit redox state-dependent catalase mimetic activity / T. Pirmohamed [et al.] // *Chem. Commun. (Camb)*. 2010. Vol. 46. P. 2736–2738.
411. Pharmacological potential of cerium oxide nanoparticles / I. Celardo [et al.] // *Nanoscale*. 2011. Vol. 3. P. 1411–1420.
412. *Estevez A. Y., Erlichman J. S.* Cerium oxide nanoparticles for the treatment of neurological oxidative stress diseases // *Oxidative stress: diagnostics, prevention and therapy*. 2011. P. 255–328.
413. Ceria nanoparticles reduce disease severity in a mouse model of multiple sclerosis / W. DeCoteau [et al.] // *Nanotech*. 2012. Vol. 3. P. 265–268.
414. Cerium oxide nanoparticles reduce free radical-mediated toxicity in drosophila melanogaster / C. A. Cohen [et al.] // *FASEB J*. 2008. Vol. 22. P. 624–631.

415. Platinum nanoparticles in nanobiomedicine / D. Pedone [et al.] // *Chem. Soc. Rev.* 2017. Vol. 46. P. 4951–4975.
416. Wei H., Wang E. Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): next-generation artificial enzymes // *Chem. Soc. Rev.* 2013. Vol. 42. P. 6060–6093.
417. Caputo F., De Nicola M., Ghibelli L. Pharmacological potential of bioactive engineered nanomaterials // *Biochem. pharmacol.* 2014. Vol. 92. P. 112–130.
418. Lin Y., Ren J., Qu X. Catalytically active nanomaterials: a promising candidate for artificial enzymes // *Acc. Chem. Res.* 2014. Vol. 47. P. 1097–1105.
419. Wang X., Hu Y., Wei H. Nanozymes in bionanotechnology: from sensing to therapeutics and beyond // *Inorg. Chem. Front.* 2016. Vol. 3. P. 41–60.
420. Enzyme mimics: advances and applications / E. Kuah [et al.] // *Chem. Eur. J.* 2016. Vol. 22. P. 8404–8430.
421. Polyvinylpyrrolidone (PVP)-Capped Pt Nanocubes with Superior Peroxidase-Like Activity / H. Ye [et al.] // *Chem. Nano Mat.* 2017. Vol. 3. P. 33–38.
422. Kinetic analysis of superoxide anion radical-scavenging and hydroxyl radical-scavenging activities of platinum nanoparticles / T. Hamasaki [et al.] // *Langmuir.* 2008. Vol. 24. P. 7354–7364.
423. Platinum nanozymes recover cellular ROS homeostasis in an oxidative stress-mediated disease model / M. Moglianetti [et al.] // *Nanoscale.* 2016. Vol. 8. P. 3739–3752.
424. Evaluation of cellular influences of platinum nanoparticles by stable medium dispersion / M. Horie [et al.] // *Metallomics.* 2011. Vol. 3. P. 1244–1252.
425. Palladium and platinum nanoparticles attenuate aging-like skin atrophy via antioxidant activity in mice / S. Shibuya [et al.] // *PLoS One.* 2014. Vol. 9. P. e109288.
426. Platinum nanoparticle antioxidants inhibit pulmonary inflammation in mice exposed to cigarette smoke / S. Onizawa [et al.] // *Pulm. Pharmacol. Ther.* 2009. Vol. 22. P. 340–349.
427. Cerium oxide and platinum nanoparticles protect cells from oxidant-mediated apoptosis / A. Clark [et al.] // *J. Nanopart. Res.* 2011. Vol. 13. P. 5547.
428. Chance B., Sies H., Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs // *Physiol. Rev.* 1979. Vol. 59. P. 527–605.
429. The role of H₂O₂ generation in perfused rat liver and the reaction of catalase compound I and hydrogen donors / N. Oshino [et al.] // *Arch. Biochem. Biophys.* 1973. Vol. 154. P. 117–131.
430. Urinary hydrogen peroxide: a probable marker of oxidative stress in malignancy / D. Banerjee [et al.] // *Clin. Chim. Acta.* 2003. Vol. 334. P. 205–209.
431. Varma S. D., Devamanoharan P. S. Hydrogen peroxide in human blood // *Free Radic. Res. Commun.* 1991. Vol. 14. P. 125–131.
432. Exercise-induced increase in H₂O₂ plasma levels is diminished by endurance training after myocardial infarction / E. Deskur [et al.] // *Int. J. Cardiol.* 1998. Vol. 67. P. 219–224.
433. Lacy F., O'Connor D., Schmid-Schonbein G. Plasma H₂O₂ production in hypertensive and normotensive subjects at genetic risk of hypertension // *J. Hypertens.* 1998. Vol. 16. P. 291–303.
434. The effects of ascorbate, 3-aminotriazole, and 1,3-bis-(2-chloroethyl)-1-nitrosourea on hydrogen peroxide levels in the rabbit aqueous humor / A. Costarides [et al.] // *Lens and Eye Tox. Res.* 1989. Vol. 6. P. 167–173.

435. *Devamanoharan P. S., Ramachandran S., Varma S. D.* Hydrogen peroxide in the eye lens: radioisotopic determination // *Curr. Eye Res.* 1991. Vol. 10. P. 831–838.
436. *Spector A., Ma W., Wang R. R.* The aqueous humor is capable of generating and degrading H_2O_2 // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1998. Vol. 39. P. 1188–1197.
437. *Chen B., Avshalumov M., Rice M.* H_2O_2 is a novel, endogenous modulator of synaptic dopamine release // *J. Neurophysiol.* 2001. Vol. 85. P. 2468–2476.
438. Hydrogen peroxide as a potent bacteriostatic antibiotic: implications for host defense / P. Hyslop [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* 1995. Vol. 19. P. 31–37.
439. *Davis K.* The broad spectrum of responses of oxidant in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress // *IUBMB Life.* 1999. Vol. 48. P. 41–47.
440. Hydrogen peroxide-induced apoptosis and necrosis in human lung fibroblasts: protective roles of glutathione / S. Teramoto [et al.] // *Jpn. J. Pharmacol.* 1999. Vol. 79. P. 33–40.
441. *Hampton M., Orrenius S.* Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis // *FEBS Lett.* 1997. Vol. 414. P. 552–556.
442. H_2O_2 induces apoptosis of pig thyrocytes in culture / C. Riou [et al.] // *J. Endocr.* 1998. Vol. 156. P. 315–322.
443. Characterization of hydrogen peroxide-induced apoptosis in mouse primary cultured hepatocytes / S. Kanno [et al.] // *Biol. Pharm. Bull.* 2000. Vol. 23. P. 37–42.
444. *Veal E. A., Day A. M., Morgan B. A.* Hydrogen peroxide sensing and signaling // *Mol. Cell.* 2007. Vol. 26, № 1. P. 1–14.
445. *Burdon R., Gill V.* Cellularly generated active oxygen species and HeLa cell proliferation // *Free Radic. Res. Commun.* 1993. Vol. 19. P. 203–213.
446. Reactive oxygen species induce proliferation of bovine aortic endothelial cells / J. Ruiz-Gines [et al.] // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2000. Vol. 35. P. 109–113.
447. *Beny J. L., von der Weid P. Y.* Hydrogen peroxide: an endogenous smooth muscle cell hyperpolarizing factor // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991. Vol. 176. P. 378–384.
448. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice / T. Matoba [et al.] // *J. Clin. Invest.* 2000. Vol. 106. P. 1521–1530.
449. *Kamsler A., Segal M.* Hydrogen peroxide modulation of synaptic plasticity // *J. Neuroscience.* 2003. Vol. 23, № 1. P. 269–276.
450. *Reid M. B., Michael B.* Redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't // *J. Appl. Physiol.* 2001. Vol. 90. P. 724–731.
451. *Takahashi Y., Ogra Y., Suzuki K. T.* Synchronized generation of reactive oxygen species with the cell cycle // *Life Sciences.* 2004. Vol. 75. P. 301–311.
452. Role of reactive oxygen species and phosphatidylinositol 3-kinase in cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells / H. Sauer [et al.] // *FEBS Lett.* 2000. Vol. 476. P. 218–223.
453. Involvement of hydrogen peroxide in the differentiation of clonal HD-11EM cells into osteoclast-like cells / M. Steinbeck [et al.] // *J. Cell Physiol.* 1998. Vol. 176. P. 574–587.
454. Hyperoxia induces the differentiated neuronal phenotype of PC12 cells by producing reactive oxygen species / S. Katoh [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997. Vol. 241. P. 347–351.
455. Hyperoxia induces the neuronal differentiated phenotype of PC12 cells via a sustained activity of mitogen-activated protein kinase induced by Bcl-2 / S. Katoh [et al.] // *Biochem. J.* 1999. Vol. 338. P. 465–470.

456. Allen R. G., Balin A. K. Oxidative influence on development and differentiation: an overview of a free radical theory of development // *Free Radic. Biol. Med.* 1989. Vol. 6. P. 631–661.
457. Sauer H., Wartenberg M., Hescheler J. Reactive Oxygen Species as Intracellular Messengers During Cell Growth and Differentiation // *Cell Physiol. Biochem.* 2001. Vol. 11. P. 173–186.
458. Burdon R., Rice-Evans C. Free radicals and the regulation of mammalian cell proliferation // *Free Radic. Res. Commun.* 1989. Vol. 6. P. 345–358.
459. Burdon R., Alliangana D., Gill V. Hydrogen peroxide and the proliferation of BHK-21 cells // *Free Radic. Res.* 1995. Vol. 23. P. 471–486.
460. Hydrogen peroxide inhibits gap junctional coupling and modulates intracellular free calcium in cochlear hensen cells / I. Todt [et al.] // *J. Membrane Biol.* 2001. Vol. 181. P. 107–114.
461. Kim B. Y., Han M. J., Chung A. S. Effects of reactive oxygen species on proliferation of Chinese hamster lung fibroblast (V79) cells // *Free Radic. Biol. Med.* 2001. Vol. 30, № 6. P. 686–698.
462. Rao G. Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression // *Circ. Res.* 1992. Vol. 70. P. 593–599.
463. Delafontaine P., Ku L. Reactive oxygen species stimulate insulin-like growth factor I synthesis in vascular smooth muscle cells // *Cardiovasc Res.* 1997. Vol. 33. P. 216–222.
464. Effect of hydrogen peroxide and dithiothreitol on contractile function of single skeletal muscle fibres from mouse / F. H. Andrade [et al.] // *J. Physiol. (Lond.)*. 1998. Vol. 509. P. 565–575.
465. Role for Hydrogen Peroxide in Flow-Induced Dilation of Human Coronary Arterioles / Hiroto Miura [et al.] // *Circul. Res.* 2003. Vol. 92. P. 31–40.
466. Gao Y. J., Lee R. M. Hydrogen peroxide is an endothelium-dependent contracting factor in rat renal artery // *Br. J. Pharmacol.* 2005. Vol. 146, № 8. P. 1061–1068.
467. Wiese A., Pacifici R., Davies K. Transient Adaptation to Oxidative Stress in Mammalian Cells // *Arch. Biochem. Biophys.* 1995. Vol. 318. P. 231–240.
468. Barlow R. S., White R. E. Hydrogen peroxide relaxes porcine coronary arteries by stimulating BKCa channel activity // *Am. J. Physiol.* 1998. Vol. 275. P. H1283–H1289.
469. Growth stimulation versus induction of cell quiescence by hydrogen peroxide in prostate tumor spheroids is encoded by the duration of the Ca^{2+} response / M. Wartenberg [et al.] // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274. P. 27759–27767.
470. Burdon R., Gill V., Alliangana D. Hydrogen peroxide in relation to proliferation and apoptosis in BHK-21 hamster fibroblasts // *Free Radic. Res.* 1996. Vol. 24. P. 81–93.
471. Мартинович Г. Г., Мартинович И. В., Черенкевич С. Н. Трансдукция сигнала с участием ионов кальция в клетках линий BGM и С6 при действии пероксида водорода // *Вестн. ГрГУ им. Я. Купалы*. Сер. 2. 2008. № 3. С. 150–155.
472. Avshalumov M. V., Chen B. T., Rice M. E. Mechanisms underlying H_2O_2 -mediated inhibition of synaptic transmission in rat hippocampal slices // *Brain Res.* 2000. Vol. 882. P. 86–94.
473. Лойко Е. Н., Самаль А. Б., Шуляковская С. М. H_2O_2 -индуцированная агрегация тромбоцитов и увеличение внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} блокируется ингибиторами внутриклеточной сигнализации // *Биохимия*. Т. 69. С. 1506–1513.

474. Reid M. B., Khawli F. A., Moody M. R. Reactive oxygen in skeletal muscle. III. Contractility of unfatigued muscle // J. Appl. Physiol. 1993. Vol. 75. P. 1081–1087.
475. Электрическая активность изолированных ганглиев моллюска *Lymnaea stagnalis* при действии пероксида водорода / Г. Г. Мартинович [и др.] // Вестн. Белорус. гос. ун-та. Сер. 2. 2003. № 3. С. 17–23.
476. Grana X., Reddy E. P. Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs) // Oncogene. 1995. Vol. 11. P. 211–219.
477. Menon S. G., Goswami P. C. A redox cycle within the cell cycle: ring in the old with the new // Oncogene. 2007. Vol. 26. P. 1101.
478. Sherr C. J., Roberts J. M. Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases // Genes Dev. 2004. Vol. 18. P. 2699–2711.
479. Redox control of the cell cycle in health and disease / E. H. Sarsour [et al.] // Antioxid. Redox Signal. 2009. Vol. 11. P. 2985–3011.
480. Conour J. E., Graham W. V., Gaskin H. R. A combined in vitro/bioinformatic investigation of redox regulatory mechanisms governing cell cycle progression // Physiol. Genomics. 2004. Vol. 18. P. 196–205.
481. Cell cycle-coupled variation in topoisomerase IIalpha mRNA is regulated by the 3'-untranslated region: possible role of redox-sensitive protein binding in mRNA accumulation. / P. C. Goswami [et al.] // J. Biol. Chem. 2000. Vol. 275. P. 38384–38392.
482. Redox regulation of the G₁ to S phase transition in the mouse embryo fibroblast cell cycle / S. G. Menon [et al.] // Cancer Res. 2003. Vol. 62. P. 2109–2117.
483. Superoxide signaling mediates N-acetyl-L-cysteine-induced G1 arrest: regulatory role of cyclin D1 and manganese superoxide dismutase / S. G. Menon [et al.] // Cancer Res. 2007. Vol. 67. P. 6392–6399.
484. Manganese superoxide dismutase activity regulates transitions between quiescent and proliferative growth / E. H. Sarsour [et al.] // Aging Cell. 2008. Vol. 7. P. 405–417.
485. Murphree A. L., Benedict W. F. Retinoblastoma: clues to human oncogenesis. // Science. 1984. Vol. 223, № 4640. P. 1028–1033.
486. In vivo association of E2F and DP family proteins. / C. L. Wu [et al.] // Mol. Cell. Biology. 1995. P. 2536–2546.
487. Копнин Б. П. Мишени действия онкогенов и опухолевых супрессоров: ключ к пониманию базовых механизмов канцерогенеза // Биохимия. 2000. Т. 65. С. 5–33.
488. Vogelstein B., Kinzler K. W. Cancer genes and the pathways they control // Nat. Med. 2004. Vol. 10. P. 789–799.
489. The effect of hydrogen peroxide on the cyclin D expression in fibroblasts / C. Martinez Munoz [et al.] // Cell. Mol. Life Sci. 2001. Vol. 58. P. 990–996.
490. Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation / Y. S. Bae [et al.] // J. Biol. Chem. 1997. Vol. 272. P. 217–221.
491. Curran T., Franze B. R. Fos and Jun: the AP-1 connection // Cell. 1988. Vol. 55. P. 395–397.
492. Tonks N. K. Redox redux: revisiting PTPs and the control of cell signaling // Cell. 2005. Vol. 121. P. 667–670.
493. NAD(P)H oxidase 4 mediates transforming growth factor-beta1-induced differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts / I. Cucoranu [et al.] // Circ. Res. 2005. Vol. 97. P. 900–907.

494. Reth M. Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation // *Nat. Immunol.* 2002. Vol. 3. P. 1129–1134.
495. Redox regulation of PTEN and protein tyrosine phosphatases in H_2O_2 mediated cell signaling / S. H. Cho [et al.] // *FEBS Lett.* 2004. Vol. 560. P. 7–13.
496. Hecht D., Zick Y. Selective inhibition of protein tyrosine phosphatase activities by H_2O_2 and vanadate in vitro // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992. Vol. 188. P. 773–779.
497. Fischer E., Charbonneau H., Tonks N. Protein tyrosine phosphatase: a diverse family of intracellular and transmembrane enzymes // *Science.* 1991. Vol. 253. P. 401–406.
498. Protein-sulfenic acids: diverse roles for an unlikely player in enzyme catalysis and redox regulation / A. Claiborne [et al.] // *Biochemistry.* 1999. Vol. 38. P. 15407–15416.
499. Barford D. The role of cysteine residues as redox-sensitive regulatory switches // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2004. Vol. 14. P. 679–686.
500. Biswas S., Chida A. S., Rahman I. Redox modifications of protein-thiols: emerging roles in cell signaling // *Biochem. Pharmacol.* 2006. Vol. 71. P. 551–564.
501. Sohn J., Rudolph J. Catalytic and chemical competence of regulation of cdc25 phosphatase by oxidation/reduction // *Biochemistry.* 2003. Vol. 42. P. 10060–10070.
502. Denu J. M., Tanner K. G. Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation // *Biochemistry.* 1998. Vol. 37. P. 5633–5642.
503. Poole L., Karplus P., Claiborne A. Protein sulfenic acids in redox signaling // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2004. Vol. 44. P. 325–347.
504. The Cdc25B phosphatase is essential for the G2/M phase transition in human cells / C. Lammer [et al.] // *J. Cell Sci.* 1998. Vol. 111. P. 2445–2453.
505. Functional Cdc25C dual-specificity phosphatase is required for S-phase entry in human cells / P. Turowski [et al.] // *Mol. Biol. Cell.* 2003. Vol. 14. P. 2984–2998.
506. Sebastian B., Kakizuka A., Hunter T. Cdc25M2 activation of cyclin-dependent kinases by dephosphorylation of threonine-14 and tyrosine-15 // *PNAS.* 1993. Vol. 90. P. 3521–3524.
507. Savitsky P. A., Finkel T. Redox regulation of Cdc25C // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277. P. 20535–20540.
508. Verbon E. H., Post J. A., Boonstra J. The influence of reactive oxygen species on cell cycle progression in mammalian cells // *Gene.* 2012. Vol. 511. P. 1–6.
509. Allen R. G. Oxygen-reactive species and antioxidant responses during development: the metabolic paradox of cellular differentiation // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1991. Vol. 196. P. 117–129.
510. Superoxide dismutase activity during the plasmodial life cycle of *Physarum polycephalum* / C. Nations [et al.] // *Experientia.* 1986. Vol. 42. P. 64–66.
511. Haddad J. Oxygen-sensing mechanisms and the regulation of redox-responsive transcription factors in development and pathophysiology // *Respir. Res.* 2002. Vol. 3. P. 26.
512. Allen R. G., Venkatraj V. S. Oxidants and Antioxidants in Development and Differentiation // *J. Nutr.* 1992. Vol. 122. P. 631–635.
513. Erkell L. J. Differentiation of mouse neuroblastoma under increased oxygen tension // *Exp. Cell. Biol.* 1980. Vol. 48. P. 374–380.
514. Beckman B. S., Balin A. K., Allen R. G. Superoxide dismutase induces differentiation in Friend erythroleukemia cells // *J. Cell. Physiol.* 1989. Vol. 139. P. 370–376.

515. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish / P. Niethammer [et al.] // *Nature*. 2009. Vol. 459. P. 996–999.
516. Reactive oxygen species: a radical role in development? / D. Hernández-García [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* 2010. Vol. 49. P. 130–143.
517. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish / P. Niethammer [et al.] // *Nature*. 2009. Vol. 459. P. 996–999.
518. The NADPH oxidase NOX4 drives cardiac differentiation: role in regulating cardiac transcription factors and MAP kinase activation / J. Li [et al.] // *Mol. Biol. Cell*. 2006. Vol. 17. P. 3978–3988.
519. Sequential activation of phosphatidylinositol 3-kinase, beta Pix, Rac1, and Nox1 in growth factor-induced production of H₂O₂ / H. S. Park [et al.] // *Mol. Cell. Biol.* 2004. Vol. 24. P. 4384–4394.
520. *Chao M. V.* Growth factor signalling: Where is specificity? // *Cell*. 1992. Vol. 68. P. 995.
521. *Marshall C. J.* Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation // *Cell*. 1995. Vol. 80. P. 179–185.
522. The I κ B–NF- κ B signaling module: temporal control and selective gene activation / A. Hoffmann [et al.] // *Science*. 2002. Vol. 298. P. 1241–1245.
523. Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products / L. O. Murphy [et al.] // *Nature Cell Biol.* 2002. Vol. 4. P. 556–564.
524. *Kholodenko B. N.* Cell-signalling dynamics in time and space // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006. Vol. 7. P. 165–176.
525. *Kroemer G., Reed J. C.* Mitochondrial control of cell death // *Nature Med.* 2000. Vol. 6. P. 513–519.
526. Old, new and emerging functions of caspases / S. Shalini [et al.] // *Cell Death Differ.* 2015. Vol. 22. P. 526–539.
527. *Gogvadze V., Orrenius S., Zhivotovsky B.* Multiple pathways of cytochrome c release from mitochondria in apoptosis // *BBA-Bioenergetics*. 2006. Vol. 1757. P. 639–647.
528. *Redza-Dutordoir M., Averill-Bates D. A.* Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species // *BBA-Molecular Cell Research*. 2016. Vol. 1863. P. 2977–2992.
529. *Orrenius S., Gogvadze V., Zhivotovsky B.* Calcium and mitochondria in the regulation of cell death // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015. Vol. 460. P. 72–81.
530. *Luna-Vargas M. P. A., Chipuk J. E.* Physiological and pharmacological control of BAK, BAX, and beyond // *Trends Cell Biol.* 2016. Vol. 26, № 12. P. 906–917.
531. The BCL-2 family reunion / J. E. Chipuk [et al.] // *Mol Cell*. 2010. Vol. 37. P. 299–310.
532. *Martinou J. C., Youle R. J.* Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics // *Dev. Cell*. 2011. Vol. 21. P. 92–101.
533. *Luna-Vargas M. P., Chipuk J. E.* The deadly landscape of pro-apoptotic BCL-2 proteins in the outer mitochondrial membrane // *FEBS J.* 2015. Vol. 283. P. 2676–2689.
534. *Halestrap A. P.* What is the mitochondrial permeability transition pore? // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2009. Vol. 46. P. 821–831.
535. Complexes between kinases, mitochondrial porin and adenylate translocator in rat brain resemble the permeability transition pore / G. Beutner [et al.] // *FEBS Lett.* Vol. 1996. Vol. 396. P. 189–195.

536. Regulation and pharmacology of the mitochondrial permeability transition pore / D. B. Zorov [et al.] // *Cardiovasc. Res.* 2009. Vol. 83. P. 213–225.
537. Halestrap A. P., Woodfield K. Y., Connern C. P. Oxidative stress, thiol reagents, and membrane potential modulate the mitochondrial permeability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase // *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272. P. 3346–3354.
538. Batandier C., Leverve X., Fontaine E. Opening of the mitochondrial permeability transition pore induces reactive oxygen species production at the level of the respiratory chain complex I // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279. P. 17197–17204.
539. Effects of permeability transition inhibition and decrease in cytochrome c content on doxorubicin toxicity in K562 cells / F. De Oliveira [et al.] // *Oncogene*. 2006. Vol. 25, № 18. P. 2646–2655.
540. De Duve C. The lysosome // *Sci. Am.* 1963. Vol. 208. P. 64–72.
541. Пархитько А. А., Фаворова О. О., Хенске Э. П. Аутофагия: механизмы, регуляция и роль в развитии опухоли // *Биохимия*. 2013. Vol. 78. P. 466–480.
542. Wible D. J., Bratton S. B. Reciprocity in ROS and autophagic signaling // *Curr. Opin. Toxicol.* 2018. Vol. 7. P. 28–36.
543. Аутофагия как механизм защиты при окислительном стрессе / Н. К. Зенков [и др.] // *Бюл. сибир. медицины*. 2019. Том 18, № 2. С. 195–214.
544. Giordano S., Darley-Usmar V., Zhang J. Autophagy as an essential cellular antioxidant pathway in neurodegenerative disease // *Redox Biol.* 2014. Vol. 2. P. 82–90.
545. Fedorova M., Bollineni R. C., Hoffmann R. Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies // *Mass Spectrom. Rev.* 2014. Vol. 33. P. 79–97.
546. Filomeni G., De Zio D., Cecconi F. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs // *Cell Death Differ.* 2015. Vol. 22. P. 377–388.
547. Rhee S. G., Bae S. H. The antioxidant function of sestrins is mediated by promotion of autophagic degradation of Keap1 and Nrf2 activation and by inhibition of mTORC1 // *Free Radic. Biol. Med.* 2015. Vol. 88. P. 205–211.
548. Plant phenols and autophagy / N. K. Zenkov [et al.] // *Biochemistry (Moscow)*. 2016. Vol. 81, № 4. P. 297–314.
549. Beevers C. S., Zhou H., Huang S. Hitting the golden TORget: curcumin's effects on mTOR signaling // *Anticancer Agents Med. Chem.* 2013. Vol. 13. P. 988–994.
550. Ding Y., Choi M. E. Autophagy in diabetic nephropathy // *J. Endocrinol.* 2015. Vol. 224, № 1. P. R15–R30.
551. Stolz A., Ernst A., Dikic I. Cargo recognition and trafficking in selective autophagy // *Nat. Cell Biol.* 2014. Vol. 16. P. 495–501.
552. Sanchez-Wandelmer J., Ktistakis N. T., Reggiori F. ERES: sites for autophagosome biogenesis and maturation? // *J. Cell. Sci.* 2015. Vol. 128. P. 185–192.
553. ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase / R. C. Russell [et al.] // *Nat. Cell Biol.* 2013. Vol. 15. P. 741–750.
554. WIPI2 links LC3 conjugation with PI3P, autophagosome formation, and pathogen clearance by recruiting Atg12-5-16L1 / H. C. Dooley [et al.] // *Mol. Cell.* 2014. Vol. 55. P. 238–252.
555. Nakatogawa H. Two ubiquitin-like conjugation systems that mediate membrane formation during autophagy // *Essays Biochem.* 2013. Vol. 55. P. 39–50.

556. Ubiquitination and selective autophagy / S. Shaid [et al.] // *Cell Death Differ.* 2013. Vol. 20. P. 21–30.
557. *Nixon R. A.* The role of autophagy in neurodegenerative disease // *Nat. Med.* 2013. Vol. 19. P. 983–997.
558. Особенности редокс-регуляции в опухолевых клетках / Н. К. Зенков [и др.] // *Сибир. науч. мед. журн.* 2019. Том 39, № 9. С. 11–26.
559. Gewirtz D. A. The four faces of autophagy: implications for cancer therapy // *Cancer Res.* 2014. Vol. 74. P. 647–651.
560. Autophagy: shaping the tumor microenvironment and therapeutic response / H. Maes [et al.] // *Trends Mol. Med.* 2013. Vol. 19. P. 428–446.
561. Redox signaling: Potential arbitrator of autophagy and apoptosis in therapeutic response / L. Zhang [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* 2015. Vol. 89. P. 452–465.
562. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4 / R. Scherz-Shouval [et al.] // *EMBO J.* 2007. Vol. 26. P. 1749–1760.
563. *Scherz-Shouval R., Elazar Z.* Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology // *Trends Biochem. Sci.* 2011. Vol. 36, № 1. P. 30–38.
564. *Kawagishi H., Finkel T.* Unraveling the truth about antioxidants: ROS and disease: finding the right balance // *Nature Med.* 2014. Vol. 20. P. 711.
565. Mitochondrial electron-transport-chain inhibitors of complexes I and II induce autophagic cell death mediated by reactive oxygen species / Y. Chen [et al.] // *J. Cell Sci.* 2007. Vol. 120. P. 4155–4166.
566. Regulation of autophagy by reactive oxygen species (ROS): implications for cancer progression and treatment / M. B. Azad [et al.] // *Antioxid. Redox Signal.* 2009. Vol. 11. P. 777–790.
567. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4 / R. Scherz-Shouval [et al.] // *EMBO J.* 2007. Vol. 26. P. 1749–1760.
568. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1 / S. Geisler [et al.] // *Nat. Cell Biol.* 2010. Vol. 12. P. 119–131.
569. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage / S. Matsuoka [et al.] // *Science.* 2007. Vol. 316. P. 1160–1166.
570. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53 / C. E. Canman [et al.] // *Science.* 1998. Vol. 281. P. 1677–1679.
571. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells / Z. Feng [et al.] // *PNAS.* 2005. Vol. 102. P. 8204–8209.
572. ATM activation by oxidative stress. / Z. Guo [et al.] // *Science.* 2010. Vol. 330. P. 517.
573. *Kubli D. A., Gustafsson A. B.* Mitochondria and mitophagy: the yin and yang of cell death control // *Circ. Res.* 2012. Vol. 111, № 9. P. 1208–1221.
574. Endogenous HMGB1 regulates autophagy / D. Tang [et al.] // *J. Cell Biol.* 2010. Vol. 190. P. 881–892.
575. HMGB1 release and redox regulates autophagy and apoptosis in cancer cells / D. Tang [et al.] // *Oncogene.* 2010. Vol. 29. P. 5299.
576. Polymorphic differences in the SOD-2 gene may affect the pathogenesis of nephropathy in patients with diabetes and diabetic complications / A. Houldsworth [et al.] // *Gene.* 2015. Vol. 569. P. 41–45.
577. Manganese-superoxide dismutase (Mn-SOD) overexpression is a common event in colorectal cancers with mitochondrial microsatellite instability / S. Govatati [et al.] // *Tumour Biol.* 2016. Vol. 37. P. 10357–10364.

578. SOD therapeutics: latest insights into their structure-activity relationships and impact on the cellular redox-based signaling pathways / I. Batinic-Haberle [et al.] // *Antioxid. Redox Signal*. 2014. Vol. 20. P. 2372–2415.

579. Overexpression of SOD-2 reduces hippocampal superoxide and prevents memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease / C. A. Massaad [et al.] // *PNAS*. 2009. Vol. 106. P. 13576–13581.

580. Effect of SOD-1 over-expression on myocardial function during resuscitated murine septic shock / K. Baumgart [et al.] // *Intensive Care Med*. 2009. Vol. 35. P. 344–349.

581. *Vlasova I. I.* Peroxidase activity of human hemoproteins: keeping the fire under control // *Molecules*. 2018. Vol. 23, № 10. P. 2561.

582. Peroxidase activity and structural transitions of cytochrome c bound to cardiolipin-containing membranes / N. A. Belikova [et al.] // *Biochemistry*. 2006. Vol. 45. P. 4998–5009.

583. *Vladimirov Y. A., Proskurnina E. V., Alekseev A. V.* Molecular mechanisms of apoptosis. Structure of cytochrome c-cardiolipin complex // *Biochemistry (Moscow)*. 2013. Vol. 78, № 10. P. 1086–1097.

584. Intracellular glutathione pools are heterogeneously concentrated / D. Montero [et al.] // *Redox biology*. 2013. Vol. 1, № 1. P. 508–513.

585. *Watson W. H., Chen Y., Jones D. P.* Redox state of glutathione and thioredoxin in differentiation and apoptosis // *Biofactors*. 2003. Vol. 17. P. 307–314.

586. Redox regulation of morphology, cell stiffness, and lectin-induced aggregation of human platelets / E. V. Shamova [et al.] // *Eur Biophys J*. 2011. Vol. 40, № 2. P. 195–208.

587. *Lushchak V. I.* Glutathione homeostasis and functions: Potential targets for medical interventions // *J. Amino Acids*. 2012. Vol. 2012. P. 736837.

588. *Meyer A. J., Hell R.* Glutathione homeostasis and redox-regulation by sulfhydryl groups // *Photosyn. Res*. 2005. Vol. 86, № 3. P. 435–457.

589. *Lu S. C.* Regulation of glutathione synthesis // *Mol. Aspects Med*. 2009. Vol. 30. P. 42.

590. *Lu S. C.* Glutathione synthesis // *BBA-General Subjects*. 2013. Vol. 1830. P. 3143–3153.

591. Evolutionary and structural insights into the multifaceted glutathione peroxidase (Gpx) superfamily / S. Toppo [et al.] // *Antioxid. Redox. Signal*. 2008. Vol. 10. P. 1501–1514.

592. Mammalian thioltransferase (glutaredoxin) and protein disulfide isomerase have dehydroascorbate reductase activity / W. Wells [et al.] // *J. Biol. Chem*. 1990. Vol. 265, № 26. P. 15361–15364.

593. Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse thioredoxin gene / M. Matsui [et al.] // *Dev. Biol*. 1996. Vol. 178. P. 179–185.

594. *Калинина Е. В., Чернов Н. Н., Саприн А. Н.* Участие тио-, перокси- и глутаредоксинов в клеточных редокс-зависимых процессах // *Успехи биол. химии*. 2008. Т. 48. С. 319–358.

595. Redox potential of human thioredoxin 1 and identification of a second dithiol/disulfide motif / W. H. Watson [et al.] // *J. Biol. Chem*. 2003. Vol. 278. P. 33408–33415.

596. *Arnér E., Holmgren A.* Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase // *Eur J Biochem*. 2000. Vol. 267, № 20. P. 6102–6109.

597. *Holmgren A.* Antioxidant function of thioredoxin and glutaredoxin systems // *Antioxid. Redox Signal*. 2000. Vol. 2, № 4. P. 811–820.

598. Redox regulation of cell signaling by selenocysteine in mammalian thioredoxin reductases / Q. A. Sun, [et al.] // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274. P. 24522–24530.
599. *Zhong L., Arnér E., Holmgren A.* Structure and mechanism of mammalian thioredoxin reductase: the active site is a redox-active selenolthiol/selenenylsulfide formed from the conserved cysteine-selenocysteine sequence // *PNAS*. 2000. Vol. 97. P. 5854–5859.
600. Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases / S. G. Rhee [et al.] // *IUBMB life*. 2001. Vol. 52. P. 35–41.
601. *Nordberg J., Arnér E.* Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system // *Free Radic. Biol. Med.* 2001. Vol. 31. P. 1287–1312.
602. *Nakamura H., Masutani H., Yodoi J.* Redox imbalance and its control in HIV infection // *Antioxid. Redox Signal.* 2002. Vol. 4. P. 455–464.
603. Increased plasma levels of thioredoxin in patients with coronary spastic angina. / S. Miyamoto [et al.] // *Antioxid. Redox Signal.* 2004. Vol. 6. P. 75–80.
604. *Rundlöf A. K., Arnér E. S.* Regulation of the mammalian selenoprotein thioredoxin reductase 1 in relation to cellular phenotype, growth, and signaling events // *Antioxid. Redox Signal.* 2004. Vol. 6. P. 41–52.
605. Increased plasma thioredoxin in patients with acute myocardial infarction / H. Soejima [et al.] // *Clin. Cardiol.* 2003. Vol. 26. P. 583–587.
606. Involvement of thioredoxin in rheumatoid arthritis: its costimulatory roles in the TNF- α -induced production of IL-6 and IL-8 from cultured synovial fibroblasts / S. Yoshida [et al.] // *J. Immunol.* 1999. Vol. 163. P. 351–358.
607. *Lillig C., Berndt C., Holmgren A.* Glutaredoxin systems // *BBA-General Subjects*. 2008. Vol. 1780. P. 1304–1317.
608. *Fernandes A. P., Holmgren A.* Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system // *Antioxid. Redox Signal.* 2004. Vol. 6. P. 63–74.
609. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins / Z. A. Wood [et al.] // *Trends Biochem. Sci.* 2003. Vol. 28. P. 32–40.
610. *Manevich Y., Fisher A. B.* Peroxiredoxin 6, a 1-Cys peroxiredoxin, functions in antioxidant defense and lung phospholipid metabolism // *Free Radic. Biol. Med.* 2005. Vol. 38. P. 1422–1432.
611. Structure-based insights into the catalytic power and conformational dexterity of peroxiredoxins / A. Hall [et al.] // *Antioxid. Redox Signal.* 2011. Vol. 15. P. 795–815.
612. Peroxiredoxins in Cancer and Response to Radiation Therapies / T. Forshaw [et al.] // *Antioxidants*. 2019. Vol. 8. P. 11.
613. *Fujii J., Ikeda Y.* Advances in our understanding of peroxiredoxin, a multifunctional, mammalian redox protein // *Redox Report*. 2002. Vol. 7. P. 123–130.
614. Regulation of peroxiredoxin I activity by Cdc2-mediated phosphorylation / T. S. Chang [et al.] // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277. P. 25370–25376.
615. Peroxiredoxin is a versatile self-assembling tecton for protein nanotechnology / A. J. Phillips [et al.] // *Biomacromolecules*. 2014. Vol. 15. P. 1871–1881.
616. Irreversible oxidation of the active-site cysteine of peroxiredoxin to cysteine sulfonic acid for enhanced molecular chaperone activity / J. C. Lim [et al.] // *J. Biol. Chem.* 2008. Vol. 283. P. 28873–28880.
617. *Kirsch M., De Groot H.* NAD(P)H, a directly operating antioxidant? // *FASEB J.* 2001. Vol. 15. P. 1569–1574.

618. Mazes of Nrf2 Regulation / N. K. Zenkov [et al.] // *Biochemistry (Moscow)*. 2017. Vol. 82, № 5. P. 556–564.
619. Меньщикова Е. Б., Ткачев В. О., Зенков Н. К. Редокс-чувствительная сигнальная система Nrf2/ARE и ее роль при воспалении // *Молек. биол.* 2010. Т. 44. С. 389–404.
620. Therapeutic targeting of the NRF2 and KEAP1 partnership in chronic diseases / A. Cuadrado [et al.] // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2019. Vol. 18. P. 295–317.
621. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. / K. Itoh [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997. Vol. 236, № 2. P. 313–322.
622. Modulation of gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones through the Keap1-Nrf2 pathway. Identification of novel gene clusters for cell survival / M. K. Kwak [et al.] // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278. P. 8135–8145.
623. Wu K. C., Cui J. Y., Klaassen C. D. Beneficial role of nrf2 in regulating NADPH generation and consumption // *Toxicol. Sci.* 2011. Vol. 123. P. 590–600.
624. Nrf2 redirects glucose and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming / Y. Mitsuishi [et al.] // *Cancer Cell.* 2012. Vol. 22. P. 66–79.
625. Sun E., Erb H., Murphy T. H. Coordinate regulation of glutathione metabolism in astrocytes by Nrf2 // *Bioch. Biophys. Res. Com.* 2005. Vol. 326. P. 371–377.
626. Canning P., Sorrell F. J., Bullock A. N. Structural basis of Keap1 interactions with Nrf2 // *Free Radic. Biol. Med.* 2015. Vol. 88. P. 101–107.
627. Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles / K. Itoh [et al.] // *Genes Cells* 8: 379–391, 2003.
628. The antioxidant defense system Keap1-Nrf2 comprises a multiple sensing mechanism for responding to a wide range of chemical compounds / M. Kobayashi [et al.] // *Mol. Cell. Biol.* 2009. Vol. 29. P. 493–502.
629. Mechanisms of activation of the transcription factor Nrf2 by redox stressors, nutrient cues, and energy status and the pathways through which it attenuates degenerative disease / L. E. Tebay [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* 2015. Vol. 88. P. 108–146.
630. An overview of chemical inhibitors of the Nrf2-ARE signaling pathway and their potential applications in cancer therapy / J. Zhu [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* 2016. Vol. 99. P. 544–556.
631. Prospective type 1 and type 2 disulfides of Keap1 protein / R. Holland [et al.] // *Chem. Res. Toxicol.* 2008. Vol. 21. P. 2051–2060.
632. Зенков Н. К., Меньщикова Е. Б., Ткачев В. О. Редокс-чувствительная сигнальная система Keap1/Nrf2/ARE как фармакологическая мишень // *Биохимия*. 2013. Т. 78, № 1. С. 27–47.
633. Transcription factor NRF2 as a therapeutic target for chronic diseases: a systems medicine approach. / A. Cuadrado [et al.] // *Pharmacol. Rev.* 2018. Vol. 70. P. 348–383.
634. Crunkhorn S. Abbott boosts investment in NRF2 activators for reducing oxidative stress // *Nat. Rev. Drug Discov.* (2012). Vol. 11. P. 96.
635. The Keap1–Nrf2 pathway: promising therapeutic target to counteract ROS-mediated damage in cancers and neurodegenerative diseases / P. Deshmukh [et al.] // *Biophys. Rev.* 2017. Vol. 9. P. 41–56.
636. The Keap1-Nrf2-ARE pathway as a potential preventive and therapeutic target: An update / M. C. Lu [et al.] // *Med. Res. Rev.* 2016. Vol. 36. P. 924–963.

637. *Saso L., Firuzi O.* Pharmacological applications of antioxidants: lights and shadows // *Curr. Drug Targets.* 2014. Vol. 15, № 13. P. 1177–1199.
638. *Dinkova-Kostova A. T., Fahey J. W., Talalay P.* Chemical structures of inducers of nicotinamide quinone oxidoreductase 1 (NQO1) // *Meth. Enzymol.* 2004. Vol. 382. P. 423–448.
639. Nrf2 regulates ROS production by mitochondria and NADPH oxidase / S. Kovac [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* 2015. Vol. 1850. P. 794–801.
640. Nrf2 amplifies oxidative stress via induction of Klf9 / S. N. Zucker [et al.] // *Mol. Cell.* 2014. Vol. 53. P. 916–928.
641. Kruppel-like factor-9 (KLF9) inhibits glioblastoma stemness through global transcription repression and integrin alpha6 inhibition / M. Ying [et al.] // *J. Biol. Chem.* 2014. Vol. 289. P. 32742–32756.
642. XBP1-KLF9 axis acts as a molecular rheostat to control the transition from adaptive to cytotoxic unfolded protein response / E. E. Fink [et al.] // *Cell Rep.* 2018. Vol. 25. P. 212–223.
643. *Chhunchha B., Kubo E., Singh D. P.* Sulforaphane-induced Klf9/Prdx6 axis acts as a molecular switch to control redox signaling and determines fate of cells // *Cells.* 2019. Vol. 8, № 10. P. 1159.
644. Sulforaphane reactivates cellular antioxidant defense by inducing Nrf2/ARE/Prdx6 activity during aging and oxidative stress. / E. Kubo [et al.] // *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7. P. 14130.
645. Redox regulation of FoxO transcription factors / L. O. Klotz [et al.] // *Redox Biol.* 2015. Vol. 6. P. 51–72.
646. *Samanta D., Semenza G. L.* Maintenance of redox homeostasis by hypoxia-inducible factors // *Redox Biol.* 2017. Vol. 13. P. 331–335.
647. *Yamamoto M., Kensler T. W., Motohashi H.* The KEAP1-NRF2 system: a thiol-based sensor-effector apparatus for maintaining redox homeostasis // *Physiol. Rev.* 2018. Vol. 98, № 3. P. 1169–1203.
648. *Saran M., Bors W.* Oxygen radicals acting as chemical messengers: a hypothesis // *Free Radic. Res. Commun.* 1989. Vol. 7. P. 213–220.
649. *Droge W.* Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function // *Physiol. Rev.* 2002. Vol. 82. P. 47–95.
650. *Nathan C.* Specificity of a third kind: reactive oxygen and nitrogen intermediates in cell signaling // *J. Clin. Invest.* 2003. Vol. 111. P. 769–778.
651. *Forman H. J., Fukuto J. M., Torres M.* Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2004. Vol. 287. P. C246–C256.
652. *Stone J. R., Yang S.* Hydrogen peroxide: a signaling messenger // *Antioxid Redox Signal.* 2006. Vol. 8. P. 243–270.
653. *Черенкевич С. Н., Мартинович Г. Г.* Активные формы кислорода и регуляция клеточных функций // *Вестн. ГрГУ им. Я. Купалы.* Сер. 2. 2008. № 1. С. 109–117.
654. *Berridge M. J.* Cell signalling biology. Portland Press, 2012.
655. *Berridge M. J., Lipp P., Bootman M. D.* The versatility and universality of calcium signalling // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2000. Vol. 1, № 1. P. 11–21.
656. *Forman H. J., Torres M., Fukuto J. M.* Redox signaling // *Mol. Cell Biochem.* 2002. Vol. 234–235. P. 49–62.

657. *Мартинович Г. Г., Черенкевич С. Н.* Внутриклеточный эффективный редокс-потенциал – новый фактор регуляции клеточных процессов // Вестн. Белорус. гос. ун-та. Сер. 1. 2004. № 1. С. 28–36.
658. *Martinovich G. G., Cherenkevich S. N., Sauer H.* Intracellular redox state: towards quantitative description // Eur. Biophys. J. 2005. Vol. 34, № 7. P. 937–942.
659. Redox-based regulation of signal transduction: Principles, pitfalls, and promises / Y. M. Janssen-Heininger [et al.] // Free Rad. Biol. Med. 2008. Vol. 45. P. 1–17.
660. *Winterbourn C. C., Hampton M. B.* Thiol chemistry and specificity in redox signaling // Free Rad. Biol. Med. 2008. Vol. 45. P. 549–561.
661. *Baty J. W., Hampton M. B., Winterbourn C. C.* Proteomic detection of hydrogen peroxide-sensitive thiol proteins in Jurkat cells // Biochem. J. 2005. Vol. 389. P. 785–795.
662. The *Saccharomyces cerevisiae* proteome of oxidized protein thiols: contrasted functions for the thioredoxin and glutathione pathways / N. Le Moan [et al.] // J. Biol. Chem. 2006. Vol. 281. P. 10420–10430.
663. *Lancaster J. R.* Diffusion of free nitric oxide // Methods Enzymol. 1996. Vol. 268. P. 31.
664. *Бурлакова Е. Б.* Биоантиоксиданты // Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д. И. Менделеева). 2007. Т. LI, № 1. С. 3–12.
665. Особенности антиокислительного действия токоферолов как природных антиоксидантов / Е. Н. Кухтина [и др.] // Докл. АН СССР. 1983. Т. 272, № 3. С. 729–732.
666. *Marshall H. E., Merchant K., Stamler J. S.* Nitrosation and oxidation in the regulation of gene expression // FASEB J. 2000. Vol. 13. P. 1889–900.
667. *Stone J. R.* An assessment of proposed mechanisms for sensing hydrogen peroxide in mammalian systems // Arch. Biochem. Biophys. 2004. Vol. 422. P. 119–124.
668. Reversible inactivation of protein tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor / S. R. Lee [et al.] // J. Biol. Chem. 1998. Vol. 273. P. 15366.
669. Reversible oxidation and inactivation of the tumor suppressor PTEN in cells stimulated with peptide growth factors / J. Kwon [et al.] // PNAS. 2004. Vol. 101. P. 16419–16424.
670. *Peskin A. V., Winterbourn C. C.* Kinetics of the reactions of hypochlorous acid and amino acid chloramines with thiols, methionine, and ascorbate // Free Radic. Biol. Med. 2001. Vol. 30. P. 572–579.
671. *Воейков В. Л.* Регуляторные функции активных форм кислорода в крови и в водных модельных системах : дис. ... д-ра биол. наук : 03.00.02. М., 2003.
672. *Владимиров Ю. А., Арчаков А. И.* Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М. : Наука, 1972.
673. *Voeikov V. L.* The scientific basis of the new biological paradigm // 21st Century Science and Technology. 1999. Vol. 12. P. 18–33.
674. *Voeikov V. L.* Reactive oxygen species (ROS): pathogens or sources of vital energy? Part 2. Bioenergetic and bioinformational functions of ROS // J. Altern. Complement. Med. 2006. Vol. 12. P. 265–270.
675. *Воейков В. Л., Колдунов В. В., Кононов Д. С.* Новый колебательный процесс в водных растворах соединений, содержащих карбонильные и аминокгруппы // Кинетика и катализ. 2001. Т. 42. С. 670–672.

676. Redox state is a central precursor cell modulator of the balance between self-renewal and differentiation in a dividing glial / J. Smith [et al.] // PNAS. 2000. Vol. 97. P. 10032–10037.

677. *Schafer F. Q., Buettner G. R.* Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple // Free Rad. Biol. Med. 2001. Vol. 30. P. 1191–1212.

678. *Мартинович Г. Г.* Биофизические механизмы редокс-регуляции функциональной активности клеток : дис. ... д-ра биол. наук : 03.01.02. Минск, 2014.

679. *Veal E. A., Day A. M., Morgan B. A.* Hydrogen peroxide sensing and signaling // Mol. Cell. 2007. Vol. 26. P. 1–14.

680. Механизм трансдукции сигналов в клетках с участием редокс-активных молекул: теория и эксперимент / Г. Г. Мартинович [и др.] // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация : сб. ст. / под ред. В. П. Зинченко [и др.]. М. : ООО «ИД В. Ема», 2011. Т. 2. С. 586–692.

681. *Martinovich G. G., Martinovich I. V., Cherenkevich S. N.* Redox regulation of cellular processes: A biophysical model and experiment // Biophysics. 2011. Vol. 56, № 3. P. 444–451.

682. *Jones D. P.* Redox sensing: orthogonal control in cell cycle and apoptosis signaling // J. Intern. Med. 2010. Vol. 268. P. 432–448.

683. Редокс-регуляция клеточной активности: концепции и механизмы / С. Н. Черенкевич [и др.] // Изв. НАН Беларуси. Сер. биол. наук. 2013. № 1. С. 92–108.

684. *Мартинович Г. Г., Мартинович И. В., Черенкевич С. Н.* Биофизические аспекты редокс-сигнализации в клетках // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация : сб. ст. / под ред. В. П. Зинченко [и др.]. М., 2013. Т. 2. С. 556–561.

685. *Gilman A. G.* G proteins: transducers of receptor-generated signals // Annu. Rev. Biochem. 1987. Vol. 56, № 1. P. 615–649.

686. *Pessah I. N., Kim K. H., Feng W.* Redox sensing properties of the ryanodine receptor complex // Front. Biosci. 2002. Vol. 7. P. a72–a79.

687. *Favero T., Zable A., Abramson J.* Hydrogen Peroxide Stimulates the Ca^{2+} Release Channel from Skeletal Muscle Sarcoplasmic Reticulum // J. Biol. Chem. 1995. Vol. 270, № 43. P. 25557–25563.

688. *Kawakami M., Okabe E.* Superoxide anion radical-triggered Ca^{2+} release from cardiac sarcoplasmic reticulum through ryanodine receptor Ca^{2+} channel // Mol. Pharmacol. 1998. Vol. 53. P. 497–503.

689. Hypochlorous acid modifies calcium release channel function from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum / T. Favero [et al.] // J. Appl. Physiol. 2003. Vol. 94. P. 1387–1394.

690. *Aghdasi B., Reid M. B., Hamilton S. L.* Nitric oxide protects the skeletal muscle Ca^{2+} release channel from oxidation induced activation // J. Biol. Chem. 1997. Vol. 272. P. 25462–25467.

691. Regulation of ryanodine receptors by reactive nitrogen species / J. P. Eu [et al.] // Biochem. Pharmacol. 1999. Vol. 57. P. 1079–1084.

692. *Romero M. F.* In the beginning, there was the cell: cellular homeostasis // Advan. Physiol. Educ. 2004. Vol. 28. P. 135–138.

693. *Burlakova E. B., Mikhailov V. F., Azurik V. K.* The redox homeostasis system in radiation-induced genomic instability // Radiat. Biol. Radioecol. 2001. Vol. 41. P. 489–499.

694. Strategies to maintain redox homeostasis during photosynthesis under changing conditions / R. Scheibe [et al.] // J. Exp. Bot. 2005. Vol. 56. P. 1481–1489.
695. *Мартинович Г. Г., Черенкевич С. Н.* Редокс-гомеостаз клеток // Успехи физиол. наук. 2008. Т. 39, № 3. С. 29–44.
696. *Ursini F., Maiorino M., Forman H. J.* Redox homeostasis: The Golden Mean of healthy living // Redox Biol. 2016. Vol. 8. P. 205–215.
697. Измерения потенциала платинового электрода в крови, плазме и сыворотке крови / М. Ш. Хубутия [и др.] // Электрохимия. 2010. Т. 46, № 5. С. 569–573.
698. *Grosz H. J., Farmer B. B.* Reduction-Oxidation Potential of Blood as a Function of Partial Pressure of Oxygen // Nature. 1967. Vol. 213, № 239. P. 717–718.
699. *Прилуцкий В. И., Бахир В. М.* Электрохимически активированная вода: Аномальные свойства, механизм биологического действия. М. : ВНИИИМТ, 1997.
700. *Сумаруков Г. В.* Окислительное равновесие и радиочувствительность организмов. М. : Атомиздат, 1970.
701. *Puppi A., Dely M.* Tissue redox-state potential ($E'0$) – as regulator of physiological processes // Acta Biol. Hung. 1983. Vol. 34. P. 323–350.
702. Диагностические и прогностические возможности электрохимических измерений редокс-потенциала плазмы крови / В. И. Сергиенко [и др.] // Вестн. РАМН. 2015. Т. 70, № 6. С. 627–632.
703. *Леонов Б. И., Прилуцкий В. И., Бахир В. М.* Физико-химические аспекты действия электрохимически активированной воды. М. : ВНИИИМТ, 1999.
704. *Евсеев А. К.* Электрохимические технологии для диагностики и коррекции нарушений гомеостаза : дис. ... д-ра хим. наук : 05.17.03. М., 2015.
705. *Senft A. P., Dalton T. P., Shertzer H. G.* Determining Glutathione and Glutathione Disulfide Using the Fluorescence Probe o-Phthalaldehyde // Anal. Biochem. 2000. Vol. 280. P. 80–86.
706. *Tarpey M., Fridovich I.* Methods of Detection of Vascular Reactive Species Nitric Oxide, Superoxide, Hydrogen Peroxide, and Peroxynitrite // Circ. Res. 2001. Vol. 89. P. 224–236.
707. *Kalyanaraman B.* Detection of nitric oxide by electron spin resonance in chemical, photochemical, cellular, physiological, and pathophysiological systems // Methods Enzymol. 1996. Vol. 268. P. 168–187.
708. *Camera E., Picardo M.* Analytical methods to investigate glutathione and related compounds in biological and pathological processes // J. Chromatogr. B. 2002. Vol. 781. P. 181.
709. Relationship between gluconeogenesis and glutathione redox state in rabbit kidney-cortex tubules / K. Winiarska [et al.] // Metabolism. 2003. Vol. 52. P. 739–746.
710. NADH: sensor of blood flow need in brain, muscle, and other tissues / Y. Ido [et al.] // FASEB J. 2001. Vol. 15. P. 1419–1421.
711. *Williamson D. H., Lund P., Krebs H. A.* The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver // Biochem. J. 1967. Vol. 103. P. 514–527.
712. *Ido Y., Chang K., Williamson J. R.* NADH augments blood flow in physiologically activated retina and visual cortex // PNAS. 2004. Vol. 101. P. 653–658.
713. *Wolin M. S.* Reactive oxygen species and vascular signal transduction mechanisms // Microcirculation. 1996. Vol. 3. P. 1–17.

714. Short-term exposure of high glucose concentration induces generation of reactive oxygen species in endothelial cells: implication for the oxidative stress associated with postprandial hyperglycemia / M. Yano [et al.] // *Redox Rep.* 2004. Vol. 9. P. 111–116.

715. High glucose increases nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation in human aortic endothelial cells / F. Cosentino [et al.] // *Circulation.* 1997. Vol. 96. P. 25–28.

716. Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression by Hydrogen Peroxide / G. Drummond [et al.] // *Circ. Res.* 2000. Vol. 86. P. 347–354.

717. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells / T. Inoguchi [et al.] // *Diabetes.* 2000. Vol. 49. P. 1939–1945.

718. *Semenza G. L.* HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia // *J. Appl. Physiol.* 2000. Vol. 88. P. 1474–1480.

719. *Wenger R. H.* Cellular adaption to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression // *FASEB J.* 2002. Vol. 16. P. 1151–1162.

720. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription / N. S. Chandel [et al.] // *PNAS.* 1998. Vol. 95. P. 11715–11720.

721. Intracellular signaling by reactive oxygen species during hypoxia in cardiomyocytes / J. Duranteau [et al.] // *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273. P. 11619–11624.

722. Флуктуации состояния биохимических систем / под ред. В. В. Соколовского. Л., 1986.

723. *Соколовский В. В.* Тиоловые антиоксиданты в молекулярных механизмах неспецифической реакции организма на экстремальное воздействие // *Вопр. мед. химии.* 1988. № 34. С. 2–11.

724. *Santangelo F.* Intracellular Thiol Concentration Modulating Inflammatory Response: Influence on the Regulation of Cell Functions Through Cysteine Prodrug Approach // *Curr. Med. Chem.* 2003. Vol. 10. P. 2599–2610.

725. Cystine levels, cystine flux, and protein catabolism in cancer cachexia, HIV/SIV infection, and senescence / V. Hack [et al.] // *FASEB. J.* 1997. Vol. 11. P. 84–92.

726. *Droge W., Holm E.* Role of cysteine and glutathione in HIV infection and other diseases associated with muscle wasting and immunological dysfunction // *FASEB. J.* 1997. Vol. 11. P. 1077–1089.

727. Тиоловые соединения в биохимических механизмах патологических процессов / под ред. В. В. Соколовского. Л., 1979.

728. Антиоксиданты и адаптация / под ред. В. В. Соколовского. Л., 1984.

729. *Соколовский В. В.* Тиолдисульфидное соотношение крови как показатель состояния неспецифической резистентности организма. СПб., 1996.

730. *Jones D. P.* Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance // *Methods Enzymol.* 2002. Vol. 348. P. 93–112.

731. Genetically altered mice to evaluate glutathione homeostasis in health and disease / T. M. Dalton [et al.] // *Free Rad. Biol. Med.* 2004. Vol. 37. P. 1511–1526.

732. *Rebrin I., Kamzalov S., Sonal R. S.* Effects of age and caloric restriction on glutathione redox state in mice // *Free Rad. Biol. Med.* 2003. Vol. 35. P. 626–635.

733. *Hwang C., Sinsky A. J., Lodish H. F.* Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum // *Science.* 1992. Vol. 257, № 5076. P. 1496–1502.

734. Redox state of glutathione in human plasma / D. Jones [et al.] // *Free Rad. Biol. Med.* 2000. Vol. 28. P. 625–635.
735. Redox analysis of human plasma allows separation of pro-oxidant events of aging from decline in antioxidant defenses / D. P. Jones [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* 2002. Vol. 33. P. 1290–300.
736. Glutathione redox potential in response to differentiation and enzyme inducers / W. Kirlin [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* 1999. Vol. 27. P. 1208–1218.
737. *Hutter D. E., Till B. G., Greene J. J.* Redox state changes in density-dependent regulation of proliferation // *Exp. Cell. Res.* 1997. Vol. 232. P. 435–438.
738. Cytochrome c-mediated apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. Signaling pathway involving release and caspase 3 activation is conserved / S. Jiang [et al.] // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274. P. 29905–29911.
739. *Cai J., Jones D.* Superoxide in apoptosis. Mitochondrial generation triggered by cytochrome c loss // *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273. P. 11401–11404.
740. Extracellular thiol/disulfide redox state affects proliferation rate in a human colon carcinoma (Caco2) cell line / C. R. Jonas [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* 2002. Vol. 33. P. 1499–506.
741. Glutamine and KGF each regulate extracellular thiol/disulfide redox and enhance proliferation in Caco-2 cells / C. R. Jonas [et al.] // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2003. Vol. 285. P. R1421–R1429.
742. Temporal changes of multiple redox couples from proliferation to growth arrest in IEC-6 intestinal epithelial cells / M. Attene-Ramos [et al.] // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2005. Vol. 289. P. C1220–C1228.
743. *Kemp M., Go Y. M., Jones D. P.* Nonequilibrium thermodynamics of thiol/disulfide redox systems: a perspective on redox systems biology // *Free Radic. Biol. Med.* 2008. Vol. 44, № 6. P. 921–937.
744. From top-down to bottom-up: computational modeling approaches for cellular redoxin networks / C. S. Pillay [et al.] // *Antioxid. Redox Signal.* 2013. Vol. 18. P. 2075–2086.
745. H_2O_2 -dependent activation of GCLC-ARE4 reporter occurs by mitogen-activated protein kinase pathways without oxidation of cellular glutathione or thioredoxin-1 / Y. M. Go [et al.] // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279. P. 5837–5845.
746. Cysteine/cystine couple is a newly recognized node in the circuitry for biologic redox signaling and control / D. P. Jones [et al.] // *FASEB J.* 2004. Vol. 18. P. 1246–1248.
747. New equations for redox and nano-signal transduction / J. T. Hancock [et al.] // *J. Theor. Biol.* 2004. Vol. 226. P. 65–68.
748. *Flohé L.* The fairytale of the GSSG/GSH redox potential // *BBA-General Subjects.* 2013. Vol. 1830, № 5. P. 3139–3142.
749. *Мартинович Г. Г., Черенкевич С. Н.* Окислительно-восстановительные процессы в клетках. Минск : БГУ, 2008.
750. *Мартинович Г. Г., Черенкевич С. Н.* Редокс-буферная емкость биосистем // *Вестн. Белорус. гос. ун-та.* Сер. 1. 2004. № 3. С. 14–19.
751. Redox buffer capacity of the cell: theoretical and experimental approach / G. G. Martinovich [et al.] // *Cell Biochem. Biophys.* 2010. Vol. 58, № 2. P. 75–83.
752. *Мартинович Г. Г., Мартинович И. В., Черенкевич С. Н.* Количественная характеристика редокс-состояния эритроцитов // *Биофизика.* 2008. Т. 53, № 4. С. 618–623.

753. Черенкевич С. Н., Хмельницкий А. И. Транспорт веществ через биологические мембраны. Минск : БГУ, 2007.
754. The energetics of ion distribution: the origin of the resting electric potential of cells / R. L. Veech [et al.] // *IUBMB Life*. 2002. Vol. 54. P. 241–252.
755. Skulachev V. P. The laws of cell energetics / V. P. Skulachev // *Eur. J. Biochem*. 1992. Vol. 208. P. 203–209.
756. Estimation of the antioxidant activities of flavonoids from their oxidation potentials / B. Yang [et al.] // *Anal. Sci*. 2001. Vol. 17. P. 599–604.
757. Redox regulation of tumor cell toxicity by flavones from *Lethedon tannaensis* / R. V. Bensasson [et al.] // *Free Radic. Biol. Med*. 1999. Vol. 27. P. 95–99.
758. Molecular orbital theory applied to the study of nonsteroidal anti-inflammatory drug efficiency / V. Zoete [et al.] // *Free Radic. Biol. Med*. 1999. Vol. 26. P. 1261–1266.
759. Redox ranking of inducers of a cancerprotective enzyme via the energy of their highest occupied molecular orbital / V. Zoete [et al.] // *Free Radic. Biol. Med*. 2004. Vol. 36. P. 1418–1423.
760. Kobayashi M., Yamamoto M. Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation // *Antioxid. Redox Signaling*. 2005. Vol. 7. P. 385–394.
761. Two-step mechanism of induction of the gene expression of a prototypic cancer-protective enzyme by diphenols / R. V. Bensasson [et al.] // *Chem. Res. Toxicol*. 2008. Vol. 21. P. 805–812.
762. Potency ranking of triterpenoids as inducers of a cytoprotective enzyme and as inhibitors of a cellular inflammatory response via their electron affinity and their electrophilicity index / R. V. Bensasson [et al.] // *Chem. Biol. Interact*. 2010. Vol. 186. P. 118–126.
763. Роль ионов водорода в регуляции редокс-состояния эритроцитов / Г. Г. Мартинович [и др.] // *Биофизика*. 2009. Т. 54, № 5. С. 846–851.
764. Chemotransduction in the carotid body: K⁺ current modulated by PO₂ in type I chemoreceptor cells / J. Lopez-Barneo [et al.] // *Science*. 1988. Vol. 241, № 4865. P. 580–582.
765. López-Barneo J., Pardal R., Ortega-Sáenz P. Cellular mechanism of oxygen sensing // *Annu. Rev. Physiol*. 2001. Vol. 63, № 1. P. 259–287.
766. Oxygen sensing in mammalian pulmonary neuroepithelial bodies. / E. Cutz [et al.] // *Airway Chemoreceptors in Vertebrates*. CRC Press, 2019. P. 269–291.
767. Скулачев В. П. H₂O₂-сенсоры легких и кровеносных сосудов и их роль в антиоксидантной защите организма // *Биохимия*. 2001. Т. 66. С. 7–8.
768. Redox signaling in acute oxygen sensing / L. Gao [et al.] // *Redox biology*. 2017. Vol. 12. P. 908–915.
769. Oxygen sensing by arterial chemoreceptors depends on mitochondrial complex I signaling / M. C. Fernandez-Aguera [et al.] // *Cell Metab*. 2015. Vol. 22. P. 825–837.
770. An O₂-sensitive glomus cell-stem cell synapse induces carotid body growth in chronic hypoxia / A. Platero-Luengo [et al.] // *Cell*. 2014. Vol. 156. P. 291–303.
771. NADPH-oxidase and a hydrogen peroxide-sensitive K⁺ channel may function as an oxygen sensor complex in airway chemoreceptors and small cell lung carcinoma cell lines / D. Wang [et al.] // *PNAS*. 1996. Vol. 93, № 23. P. 13182–13187.
772. NADPH oxidase is an O₂ sensor in airway chemoreceptors: evidence from K⁺ current modulation in wild-type and oxidase-deficient mice / X. W. Fu [et al.] // *PNAS*. 2000. Vol. 97, № 8. P. 4374–4379.

773. NOX2 (gp91phox) is a predominant O₂ sensor in a human airway chemoreceptor cell line: biochemical, molecular, and electrophysiological evidence / J. Buttigieg [et al.] // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2012. Vol. 303, № 7. P. L598–L607.
774. Respiratory control in neonatal mice with NADPH oxidase deficiency / P. Kazemian [et al.] // *Respir. Physiol.* 2001. Vol. 126. P. 89–101.
775. Reactive oxygen species mediate the activation of Akt/protein kinase B by angiotensin II in vascular smooth muscle cells / M. Ushio-Fukai [et al.] // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274. P. 22699–22704.
776. Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II / R. M. Touyz [et al.] // *Circ. Res.* 2002. Vol. 90. P. 1205–1213.
777. Reactive Oxygen Species Mediate the Suppression of Arterial Smooth Muscle T-type Ca²⁺ Channels by Angiotensin II / A. M. Hashad [et al.] // *Sci. Rep.* 2018. Vol. 8. P. 3445.
778. CaV3. 2 channels and the induction of negative feedback in cerebral arteries / O. F. Harraz [et al.] // *Circ. Res.* 2014. Vol. 115. P. 650–661.
779. Östman A., Böhmer F. D. Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatases // *Trends in cell biology.* 2001. Vol. 11. P. 258–266.
780. Goldstein B. J. Protein-tyrosine phosphatases: emerging targets for therapeutic intervention in type 2 diabetes and related states of insulin resistance // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002. Vol. 87. P. 2474–2480.
781. Krieger-Brauer H. I., Kather H. Human fat cells possess a plasma membrane-bound H₂O₂-generating system that is activated by insulin via a mechanism bypassing the receptor kinase // *J. Clin. Investig.* 1992. Vol. 89. P. 1006–1013.
782. Saltiel A. R., Kahn. C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism // *Nature.* 2001. Vol. 414. P. 799–806.
783. Petersen M. C., Shulman G. I. Mechanisms of insulin action and insulin resistance // *Physiol. Rev.* 2018. Vol. 98, № 4. P. 2133–2223.
784. The NAD(P)H oxidase homolog Nox4 modulates insulin-stimulated generation of H₂O₂ and plays an integral role in insulin signal transduction / K. Mahadev [et al.] // *Mol. Cell. Biol.* 2004. Vol. 24, № 5. P. 1844–1854.
785. Wu X., Williams K. J. NOX4 pathway as a source of selective insulin resistance and responsiveness // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2012. Vol. 32. P. 1236–1245.
786. Protein tyrosine phosphatase 1B interacts with the activated insulin receptor / B. L. Seely [et al.] // *Diabetes.* 1996. Vol. 45, № 10. P. 1379–1385.
787. Liu F., Chernoff J. Protein tyrosine phosphatase 1B interacts with and is tyrosine phosphorylated by the epidermal growth factor receptor // *Biochem. J.* 1997. Vol. 327. P. 139.
788. Ushio-Fukai M., Urao N. Novel role of NADPH oxidase in angiogenesis and stem/progenitor cell function // *Antioxid. Redox Signal.* 2009. Vol. 11. P. 2517–2533.
789. Important role of Nox4 type NADPH oxidase in angiogenic responses in human microvascular endothelial cells in vitro / S. R. Datla [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007. Vol. 27. P. 2319–2324.
790. Demidchik V. ROS-activated ion channels in plants: Biophysical characteristics, physiological functions and molecular nature // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. Vol. 19, № 4. P. 1263.
791. Demidchik V. Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology // *Environ. Exp. Bot.* 2015. Vol. 109. P. 212–228.

792. Stress-induced electrolyte leakage: The role of K⁺-permeable channels and involvement in programmed cell death and metabolic adjustment / V. Demidchik [et al.] // J. Exp. Bot. 2014. Vol. 65. P. 1259–1270.

793. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. / Z. M. Pei [et al.] // Nature. 2000. Vol. 406. P. 731–734.

794. Mori I. C., Schroeder J. I. Reactive oxygen species activation of plant Ca²⁺ channels. a signaling mechanism in polar growth, hormone transduction, stress signaling, and hypothetically mechanotransduction // Plant Physiol. 2004. Vol. 135, № 2. P. 702–708.

795. Murata Y., Mori I. C., Munemasa S. Diverse stomatal signaling and the signal integration mechanism // Annu. Rev. Plant Biol. 2015. Vol. 66. P. 369–392.

796. Демидчик В. В. Основные закономерности функционирования неселективных катионных каналов плазматической мембраны клеток корня высших растений : дис. ... д-ра биол. наук : 03.01.02; 03.01.05. Минск, 2010.

797. Martinovich G. G., Martinovich I. V., Cherenkevich S. N. Effects of ascorbic acid on calcium signaling in tumor cells // Bull Exp. Biol. Med. 2009. Vol. 147, № 4. P. 469–472.

798. Redox regulation of calcium signaling in cancer cells by ascorbic acid involving the mitochondrial electron transport chain / G. G. Martinovich [et al.] // J. of Biophysics. 2012. Vol. 2012. P. 921653.

799. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III / Q. Chen [et al.] // J. Biol. Chem. 2003. Vol. 278. P. 36027–36031.

800. Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis / M. Giorgio [et al.] // Cell. 2005. Vol. 122. P. 221–233.

801. Classification of mitocans, anti-cancer drugs acting on mitochondria / J. Neuzil [et al.] // Mitochondrion. 2013. Vol. 13, № 3. P. 199–208.

802. Mitocans: mitochondrial targeted anti-cancer drugs as improved therapies and related patent documents / S. J. Ralph [et al.] // Recent Pat. Anticancer Drug Discov. 2006. Vol. 1. P. 327–346.

803. Anticancer Drugs Targeting the Mitochondrial Electron Transport Chain / J. Rohlena [et al.] // Antioxid. Redox Signal. 2011. Vol. 15. P. 2951–2974.

804. Дифференциальная регуляция продукции активных форм кислорода и механизмов гибели опухолевых клеток пара-бензохинонами / Г. Г. Мартинович [и др.] // Докл. НАН Беларуси. 2016. Т. 60, № 5. С. 96–100.

805. Thymoquinone, a biologically active component of *Nigella sativa*, induces mitochondrial production of reactive oxygen species and programmed death of tumor cells / G. G. Martinovich [et al.] // Biophysics. 2016. Vol. 61. P. 963–970

806. Изучение механизмов противоопухолевого действия тимохинона с применением спектроскопии комбинационного рассеяния света / А. В. Вчерашняя [и др.] // Журн. прикл. спектроскопии. 2020. Т. 87, № 3. С. 488–492.

807. Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common / R. Gerschman [et al.] // Science. 1954. Vol. 119, № 3097. P. 623–626.

808. Тарусов Б. Н. Основы биологического действия радиоактивных излучений. М. : Медиздат, 1954.

809. Эмануэль Н. М. Труды Московского общества испытателей природы. М. : Наука, 1963.

810. Окислительный стресс при старении / Н. К. Зенков [и др.] // Успехи геронтол. 2020. Т. 33, № 1. С. 10–22.
811. *Sies H.* Oxidative Stress. London : Academic Press. 1985.
812. *Sies H.* Oxidative Stress. London : Academic Press. 1991.
813. *Jones D. P.* Redefining oxidative stress // *Antioxid. Redox Signal.* 2006. Vol. 8. P. 1865–1879.
814. *Jones D. P.* Radical-free biology of oxidative stress // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2008. Vol. 295. P. C849–C868.
815. *Selye H.* Stress and distress // *Comprehensive Therapy.* 1975. Vol. 1. P. 9–13.
816. *Sies H.* Oxidative eustress and oxidative distress: Introductory remarks // *Oxidative Stress.* Academic Press, 2020. P. 3–12.
817. *Sies H., Jones D. P.* Oxidative stress // *Encyclopedia of Stress.* Elsevier, San Diego. 2007.
818. *Narasimhan M., Rajasekaran N. S.* Reductive potential – a savior turns stressor in protein aggregation cardiomyopathy // *BBA–Mol. Basis Dis.* 2015. Vol. 1852. P. 53–60.
819. Nrf2 deficiency prevents reductive stress-induced hypertrophic cardiomyopathy / S. Kannan [et al.] // *Cardiovasc. Res.* 2013. Vol. 100. P. 63–73.
820. *Handy D. E., Loscalzo J.* Responses to reductive stress in the cardiovascular system // *Free Radic. Biol. Med.* 2017. Vol. 109. P. 114–124.
821. Human alpha B-crystallin mutation causes oxidoreductive stress and protein aggregation cardiomyopathy in mice / N. S. Rajasekaran [et al.] // *Cell.* 2007. Vol. 130. P. 427–439.
822. *Nicholl I. D., Quinlan R. A.* Chaperone activity of α -crystallins modulates intermediate filament assembly // *EMBO J.* 1994. Vol. 13. P. 945–953.
823. Sustained activation of nuclear erythroid 2-related factor 2/antioxidant response element signaling promotes reductive stress in the human mutant protein aggregation cardiomyopathy in mice / N. S. Rajasekaran [et al.] // *Antioxid. Redox Signal.* 2011. Vol. 14. P. 957.
824. Involvement of reductive stress in the cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of heat shock protein 27 / X. Zhang [et al.] // *Hypertension.* 2010. Vol. 55. P. 1412–1417.
825. Paradoxical roles of antioxidant enzymes: basic mechanisms and health implications / X. G. Lei [et al.] // *Physiol. Rev.* 2016. Vol. 96. P. 307–364.
826. Development of insulin resistance and obesity in mice overexpressing cellular glutathione peroxidase / J. P. McClung [et al.] // *PNAS.* 2004. Vol. 101. P. 8852–8857.
827. *Watson J. D.* Type 2 diabetes as a redox disease // *The Lancet.* 2014. Vol. 383, № 9919. P. 841–843.
828. *Egan B., Zierath J. R.* Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation // *Cell Metab.* 2013. Vol. 17. P. 162–184.
829. *Selye H.* A syndrome produced by diverse nocuous agents // *Nature.* 1936. Vol. 138. P. 32.
830. *Merry T. L., Ristow M.* Mitohormesis in exercise training // *Free Radic. Biol. Med.* 2016. Vol. 98. P. 123–130.
831. Biological stress response terminology: Integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose-response framework / E. J. Calabrese [et al.] // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2007. Vol. 222. P. 122–128.

832. *Ristow M., Zarse K.* How increased oxidative stress promotes longevity and metabolic health: the concept of mitochondrial hormesis (mitohormesis) // *Exp. Gerontol.* 2010. Vol. 45. P. 410–418.
833. *Ristow M.* Unraveling the truth about antioxidants: mitohormesis explains ROS-induced health benefits // *Nature medicine.* 2014. Vol. 20. P. 709–711.
834. *Ristow M., Schmeisser K.* Mitohormesis: promoting health and lifespan by increased levels of reactive oxygen species (ROS) // *Dose-Response.* 2014. Vol. 12. P. 288–341.
835. *Yun J., Finkel T.* Mitohormesis // *Cell metabolism.* 2014. Vol. 19. P. 757–766.
836. *Chandel N. S.* Mitochondrial regulation of oxygen sensing // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2010. Vol. 661. P. 339–354.
837. *Bras M., Queenan B., Susin S. A.* Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying // *Biochemistry (Moscow).* 2005. Vol. 70, № 2. P. 231–239.
838. *Warburton D. E., Nicol C. W., Bredin S. S.* Health benefits of physical activity: the evidence // *CMAJ.* 2006. Vol. 174. P. 801–809.
839. Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans / *M. Ristow [et al.] // PNAS.* 2009. Vol. 106. P. 8665–8670.
840. *Lopez-Lazaro M.* A new view of carcinogenesis and an alternative approach to cancer therapy // *Mol. Med.* 2010. Vol. 16. P. 144–153.
841. *Warburg O.* On the Origin of Cancer Cells // *Science.* 1956. Vol. 123. P. 309–314.
842. ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth / *G. Hatzivassiliou [et al.] // Cancer Cell.* 2005. Vol. 8. P. 311–321.
843. Low mitochondrial respiratory chain content correlates with tumor aggressiveness in renal cell carcinoma / *H. Simonnet [et al.] // Carcinogenesis.* 2002. Vol. 23. P. 759–768.
844. Decreased mitochondrial nitric oxide synthase activity and hydrogen peroxide relate persistent tumoral proliferation to embryonic behavior / *S. Galli [et al.] // Cancer Res.* 2003. Vol. 63. P. 6370–6377.
845. Mitochondrial biogenesis in the liver during development and oncogenesis / *J. M. Cuezva [et al.] // J. Bioenerg. Biomembr.* 1997. Vol. 29. P. 365–377.
846. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia / *J. Kim [et al.] // Cell Metab.* 2006. Vol. 3. P. 177.
847. *Arismendi-Morillo G. J., Castellano-Ramirez A. V.* Ultrastructural mitochondrial pathology in human astrocytic tumors: potentials implications pro-therapeutics strategies // *J. Electron. Microsc.* 2008. Vol. 57. P. 33–39.
848. The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression / *J. M. Cuezva [et al.] // Cancer Res.* 2002. Vol. 62. P. 6674–6681.
849. *Chatterjee A., Mambo E., Sidransky D.* Mitochondrial DNA mutations in human cancer // *Oncogene.* 2006. Vol. 25. P. 4663–4674.
850. *Liberti M. V., Locasale J. W.* The Warburg effect: how does it benefit cancer cells? // *Trends Biochem. Sci.* 2016. Vol. 41, № 3. P. 211–218.
851. *Ristow M., Cuezva J. M.* Oxidative Phosphorylation and Cancer: The Ongoing Warburg Hypothesis // *Cellular Respiration and Carcinogenesis / Humana Press,* 2009. P. 1–19.

852. *Gambhir S. S.* Molecular imaging of cancer with positron emission tomography // *Nat. Rev. Cancer.* 2002. Vol. 2. P. 683–693.
853. *Seyfried T. N., Shelton L. M.* Cancer as a metabolic disease // *Nutr. Metab. (Lond).* 2010. Vol. 7. P. 7.
854. *López-Lázaro M.* Excessive superoxide anion generation plays a key role in carcinogenesis // *Int. J. Cancer.* 2007. Vol. 120. P. 1378–1380.
855. *Locasale J. W., Cantley L. C.* Metabolic flux and the regulation of mammalian cell growth // *Cell Metab.* 2011. Vol. 14. P. 443–451.
856. *Friesen C., Kiass S., Debatin K.* A critical role of glutathione in determining apoptosis sensitivity and resistance in leukemia cells // *Cell Death. Differ.* 2004. Vol. 11. P. S73–S85.
857. *Hedley D., Chow S.* Glutathione and cellular resistance to anti-cancer drugs // *Methods Cell Biol.* 1994. Vol. 42. P. 31–44.
858. Role of glutathione depletion and reactive oxygen species generation in apoptotic signaling in a human B lymphoma cell line / J. S. Armstrong [et al.] // *Cell Death. Differ.* 2002. Vol. 9. P. 252–263.
859. GSH depletion enhances adenoviral bax-induced apoptosis in lung cancer cells / T. Honda [et al.] // *Cancer Gene Ther.* 2004. Vol. 11. P. 249–255.
860. *Kovacic P., Jacintho J. P.* Mechanisms of Carcinogenesis: Focus on Oxidative Stress and Electron Transfer // *Curr. Med. Chem.* 2001. Vol. 8. P. 773–796.
861. *Engel R. H., Evens A. M.* Oxidative stress and apoptosis: a new treatment paradigm in cancer // *Front. Biosci.* 2006. Vol. 11. P. 300–312.
862. *Kovacic P., Osuna J.* Mechanisms of anti-cancer agents: emphasis on oxidative stress and electron transfer // *Curr. Pharm. Design.* 2000. Vol. 6. P. 277–309.
863. Mechanism and significance of increased glutathione level in human hepatocellular carcinoma and liver regeneration / Z. Huang [et al.] // *FASEB J.* 2001. Vol. 15. P. 19–21.
864. Activities of antioxidant and redox enzymes in human normal hepatic and hepatoma cell lines / Y. Lee [et al.] // *Mol. Cells.* 2002. Vol. 14. P. 305–311.
865. *Zatorska A., Maszewski J., Jozwiak Z.* Changes in GSH-antioxidant system induced by daunorubicin in human normal and diabetic fibroblasts // *Acta Biochim. Pol.* 2003. Vol. 50. P. 825–836.
866. *Shrieve D., Bump E., Rice G.* Heterogeneity of cellular glutathione among cells derived from a murine fibrosarcoma or a human renal cell carcinoma detected by flow cytometric analysis // *J. Biol. Chem.* 1988. Vol. 263. P. 14107–14114.
867. Mechanisms of redox regulation of chemoresistance in tumor cells by phenolic antioxidants / G. G. Martinovich [et al.] // *Biophysics.* 2017. Vol. 62, № 6. P. 942–949.
868. Регуляция химиорезистентности опухолевых клеток фенольными антиоксидантами / Г. Г. Мартинович [и др.] // *Актуал. вопр. биол. физики и химии.* 2017. Т. 2, № 1. С. 411–415.
869. Регуляция пролиферативной активности и химиорезистентности опухолевых клеток аскорбатом натрия / Г. Г. Мартинович [и др.] // *Докл. НАН Беларуси.* 2018. Т. 62, № 1. С. 93–100.
870. Редокс-свойства опухолевых клеток и их пролиферативная активность при действии фенольных антиоксидантов / Г. Г. Мартинович [и др.] // *Докл. НАН Беларуси.* 2015. Т. 59, № 3. С. 82–87.

871. *Pelicano H., Carney D., Huang P.* ROS stress in cancer cells and therapeutic implications // *Drug Resist. Updat.* 2004. Vol. 7, № 2. P. 97–110.
872. *Wang J., Yi J.* Cancer cell killing via ROS: to increase or decrease, that is the question // *Cancer Biol. Ther.* 2008. Vol. 7, № 12. P. 1875–1884.
873. Apoptosis by cisplatin requires p53 mediated p38 α MAPK activation through ROS generation / *P. Bragado [et al.]* // *Apoptosis.* 2007. Vol. 12. P. 1733–1742.
874. N-acetyl-L-cysteine inhibits bleomycin induced apoptosis in malignant testicular germ cell tumors / *E. Kucuksayan [et al.]* // *J. Cell. Bioch.* 2013. Vol. 114. P. 1685–1694.
875. Selective cell death of oncogenic Akt-transduced brain cancer cells by etoposide through reactive oxygen species-mediated damage / *S. Y. Oh [et al.]* // *Mol. Cancer Ther.* 2007. Vol. 6. P. 2178–2187.
876. Complement-mediated cell death induced by rituximab in B-cell lymphoproliferative disorders is mediated in vitro by a caspase-independent mechanism involving the generation of reactive oxygen species / *B. Bellosillo [et al.]* // *Blood.* 2001. Vol. 98. P. 2771–2777.
877. Synergistic induction of oxidative injury and apoptosis in human multiple myeloma cells by the proteasome inhibitor bortezomib and histone deacetylase inhibitors / *X. Y. Pei [et al.]* // *Clin. Cancer Res.* 2004. Vol. 10. P. 3839–3852.
878. Role of thioredoxin in the response of normal and transformed cells to histone deacetylase inhibitors / *J. S. Ungerstedt [et al.]* // *PNAS.* 2005. Vol. 102. P. 673–678.
879. Adaphostin-induced apoptosis in CLL B cells is associated with induction of oxidative stress and exhibits synergy with fludarabine / *T. D. Shanafelt [et al.]* // *Blood.* 2005. Vol. 105. P. 2099–2106.
880. *Wondrak G. T.* Redox-directed cancer therapeutics: molecular mechanisms and opportunities // *Antioxid. Redox Signal.* 2009. Vol. 11. P. 3013–3069.
881. *Trachootham D., Alexandre J., Huang P.* Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2009. Vol. 8. P. 579.
882. *Gorrini C., Harris I. S., Mak T. W.* Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2013. Vol. 12. P. 931–947.
883. *Корман Д. Б., Островская Л. А., Кузьмин В. А.* Индукция оксидативного стресса в опухолевых клетках – новый подход к лекарственному лечению злокачественных опухолей // *Биофизика.* 2019. Т. 64, № 3. С. 552–562.
884. Mitochondrial superoxide dismutase: a promising target for new anticancer therapies / *G. Pani [et al.]* // *Curr. Med. Chem.* 2004. Vol. 11. P. 1299–1308.
885. Nrf2 and Keap1 abnormalities in non-small cell lung carcinoma and association with clinicopathologic features / *L. M. Solis [et al.]* // *Clin. Cancer Res.* 2010. Vol. 16. P. 3743.
886. *Sporn M. B., Liby K. T.* Nrf2 and cancer: the good, the bad and the importance of context // *Nat. Rev. Cancer.* 2012. Vol. 12. P. 564–571.
887. Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases / *D. Del Rio [et al.]* // *Antioxid. Redox Signal.* 2013. Vol. 18. P. 1818–1892.
888. *Son T. G., Camandola S., Mattson M. P.* Hormetic dietary phytochemicals // *Neuromolecular Med.* 2008. Vol. 10. P. 236–246.
889. *Vargas A. J., Burd R.* Hormesis and synergy: pathways and mechanisms of quercetin in cancer prevention and management // *Nutr. Rev.* 2010. Vol. 68. P. 418–428.

890. Selected attributes of polyphenols in targeting oxidative stress in cancer / V. Stepanic [et al.] // *Curr. Top. Med. Chem.* 2015. Vol. 15. P. 496–509.
891. Green tea polyphenol causes differential oxidative environments in tumor versus normal epithelial cells / T. Yamamoto [et al.] // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2003. Vol. 307. P. 230–236.
892. Green tea component, catechin, induces apoptosis of human malignant B cells via production of reactive oxygen species / T. Nakazato [et al.] // *Clin. Cancer Res.* 2005. Vol. 11. P. 6040–6049.
893. Epigallocatechin-3-gallate induces mitochondrial membrane depolarization and caspase-dependent apoptosis in pancreatic cancer cells / S. Qanungo [et al.] // *Carcinogenesis*. 2005. Vol. 26. P. 958–967.
894. Pro-oxidative activities and dose-response relationship of (-)-epigallocatechin-3-gallate in the inhibition of lung cancer cell growth: a comparative study *in vivo* and *in vitro* / G. X. Li [et al.] // *Carcinogenesis*. 2010. Vol. 31. P. 902–910.
895. Epigallocatechin-3-gallate-induced stress signals in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. / C. Chen [et al.] // *Carcinogenesis*. 2003; 24(8):1369–1378.
896. Anti-proliferative and proapoptotic effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on human melanoma: possible implications for the chemoprevention of melanoma / M. Nihal [et al.] // *Int. J. Cancer*. 2005. Vol. 114. P. 513–521.
897. Baliga M. S., Meleth S., Katiyar S. K. Growth inhibitory and antimetastatic effect of green tea polyphenols on metastasis-specific mouse mammary carcinoma 4T1 cells *in vitro* and *in vivo* systems // *Clin. Cancer Res.* 2005. Vol. 11. P. 1918–1927.
898. Epigallocatechin-3-gallate induces the apoptosis of hepatocellular carcinoma LM6 cells but not non-cancerous liver cells / Y. Zhang [et al.] // *Int. J. Mol. Med.* 2015. Vol. 35. P. 117.
899. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate (EGCG) as adjuvant in cancer therapy / E. Lecumberri [et al.] // *Clin. Nutr.* 2013. Vol. 32. P. 894–903.
900. Combination therapy with epigallocatechin-3-gallate and doxorubicin in human prostate tumor modeling studies: inhibition of metastatic tumor growth in severe combined immunodeficiency mice / M. E. Stearns [et al.] // *Am. J. Pathol.* 2010. Vol. 177. P. 3169e79.
901. Effect of green tea on pharmacokinetics of 5-fluorouracil in rats and pharmacodynamics in human cell lines *in vitro* / J. Qiao [et al.] // *Food Chem. Toxicol.* 2011. Vol. 49. P. 1410e5.
902. Epigallocatechin-3-gallate delivers hydrogen peroxide to induce death of ovarian cancer cells and enhances their cisplatin susceptibility / Chan M. M. [et al.] // *J. Cell Physiol.* 2006. Vol. 207. P. 389e96.
903. Cytotoxicity of arsenic trioxide is enhanced by (-)-epigallocatechin-3-gallate via suppression of ferritin in cancer cells / T. C. Lee [et al.] // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2011. Vol. 250. P. 69e77.
904. Preclinical evaluation of the antitumor activity of bortezomib in combination with vitamin C or with epigallocatechin gallate, a component of green tea / B. Bannerman [et al.] // *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2011. Vol. 68. P. 1145e54.
905. Apoptotic effect of EGCG in HT-29 colon cancer cells via AMPK signal pathway / J. T. Hwang [et al.] // *Cancer Lett.* 2007. Vol. 247. P. 115e21.
906. Lambert J. D., Elias R. J. The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: a role in cancer prevention // *Arch. Biochem. Biophys.* 2010. Vol. 501. P. 65e72.

907. Epigallocatechin-3-gallate enhances radiation sensitivity in colorectal cancer cells through nrf2 activation and autophagy / T. Enkhbat [et al.] // *Anticancer Res.* 2018. Vol. 38. P. 6247–6252.

908. Radiation induced tubulogenesis in endothelial cells is antagonized by the antiangiogenic properties of green tea polyphenol (-) epigallocatechin-3-gallate / B. Annabi [et al.] // *Cancer Biol. Ther.* 2003. Vol. 2. P. 642e9.

909. A major green tea component, (-)-epigallocatechin-3-gallate, ameliorates doxorubicin-mediated cardiotoxicity in cardiomyocytes of neonatal rats / W. Li [et al.] // *J. Agric. Food Chem.* 2010. Vol. 58. P. 8977e82.

910. Cardioprotective effects of epigallocatechin-3-gallate against doxorubicin-induced cardiomyocyte injury / J. Zheng [et al.] // *Eur. J. Pharmacol.* 2011. Vol. 652. P. 82e8.

911. Studies on the protective effect of green tea against cisplatin induced nephrotoxicity / S. A. Khan [et al.] // *Pharmacol. Res.* 2009. Vol. 60. P. 382e91.

912. Schmitt N. C., Rubel E. W., Nathanson N. M. Cisplatin-induced hair cell death requires STAT1 and is attenuated by epigallocatechin gallate // *J. Neurosci.* 2009. Vol. 29. P. 3843e51.

913. Sriram N., Kalayarasan S., Sudhandiran G. Epigallocatechin-3-gallate exhibits anti-fibrotic effect by attenuating bleomycin-induced glycoconjugates, lysosomal hydrolases and ultrastructural changes in rat model pulmonary fibrosis // *Chem. Biol. Interact.* 2009. Vol. 180. P. 271e80.

914. Epigallocatechin-3-gallate activates Nrf2/HO-1 signaling pathway in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats / K. Sahin [et al.] // *Life sciences.* 2010. Vol. 87. P. 240–245.

915. Sriram N., Kalayarasan S., Sudhandiran G. Epigallocatechin-3-gallate augments antioxidant activities and inhibits inflammation during bleomycin-induced experimental pulmonary fibrosis through Nrf2-Keap1 signaling // *Pulm. Pharmacol. Ther.* 2009. Vol. 22. P. 221e36.

916. Cellular and molecular mechanisms of curcumin in prevention and treatment of disease / S. S. Patel [et al.] // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2019. P. 1–53.

917. The therapeutic potential of curcumin: A review of clinical trials / B. Salehi [et al.] // *Eur. J. Med. Chem.* 2019. Vol. 163. P. 527–545.

918. Neuroprotection by curcumin in ischemic brain injury involves the Akt/Nrf2 pathway / J. Wu [et al.] // *PLoS One.* 2013. Vol. 8. P. e59843.

919. Vinod B. S., Maliekal T. T., Anto R. J. Phytochemicals as chemosensitizers: from molecular mechanism to clinical significance // *Antiox. Redox Sign.* 2013. Vol. 18. P. 1307.

920. Curcumin: new insights into an ancient ingredient against cancer / E. Willenbacher [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. Vol. 20, № 8. P. 1808.

921. Rapid reactive oxygen species (ROS) generation induced by curcumin leads to caspase-dependent and-independent apoptosis in L929 cells / F. Thayyullathil [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* 2008. Vol. 45. P. 1403–1412.

922. Syng-ai C., Kumari A. L., Khar A. Effect of curcumin on normal and tumor cells: role of glutathione and bcl-2 // *Mol. Cancer Ther.* 2004. Vol. 3, № 9. P. 1101–1108.

923. The chemopreventive agent curcumin is a potent radiosensitizer of human cervical tumor cells via increased reactive oxygen species production and overactivation of the mitogen-activated protein kinase pathway / P. Javvadi [et al.] // *Mol. Pharm.* 2008. Vol. 73. P. 1491–1501.

924. Curcumin augments gemcitabine cytotoxic effect on pancreatic adenocarcinoma cell lines / S. Lev-Ari [et al.] // *Cancer Invest.* Vol. 25. 2007. P. 411–418.
925. Curcumin sensitizes human colorectal cancer to capecitabine by modulation of cyclin D1, COX-2, MMP-9, VEGF and CXCR4 expression in an orthotopic mouse model / A. B. Kunnumakkara [et al.] // *Int. J. Cancer.* 2009. Vol. 125. P. 2187–2197.
926. Curcumin enhances cytotoxicity of chemotherapeutic agents in prostate cancer cells by inducing p21(WAF1/CIP1) and C/EBP β expressions and suppressing NF- κ B activation / T. C. Hour [et al.] // *Prostate.* 2002. Vol. 51. P. 211–218.
927. Synergistic inhibitory effects of curcumin and 5-fluorouracil on the growth of the human colon cancer cell line HT-29 / B. Du [et al.] // *Chemotherapy.* 2006. Vol. 52. P. 23–28.
928. Curcumin enhances the cytogenotoxic effect of etoposide in leukemia cells through induction of reactive oxygen species / M. A. Papieź [et al.] // *Drug Des. Devel. Ther.* 2016. Vol. 10. P. 557.
929. Sensitization of taxol-induced apoptosis by curcumin involves down-regulation of nuclear factor- κ B and the serine/threonine kinase Akt and is independent of tubulin polymerization / S. V. Bava [et al.] // *J. Biol. Chem.* 2005. Vol. 280. P. 6301–6308.
930. Molecular evidences for the chemosensitizing efficacy of liposomal curcumin in paclitaxel chemotherapy in mouse models of cervical cancer / C. N. Sreekanth [et al.] // *Oncogene.* 2011. Vol. 30. P. 3139–3152.
931. Curcumin potentiates antitumor activity of cisplatin in bladder cancer cell lines via ROS-mediated activation of ERK1/2 / B. H. Park [et al.] // *Oncotarget.* 2016. Vol. 7, № 39. P. 63870–63886.
932. Chatterjee S., Pandey S. Chemo-resistant melanoma sensitized by tamoxifen to low dose curcumin treatment through induction of apoptosis and autophagy // *Cancer Biol. Ther.* 2011. Vol. 11. P. 216–228.
933. Curcumin enhances the effects of irinotecan on colorectal cancer cells through the generation of reactive oxygen species and activation of the endoplasmic reticulum stress pathway / Y. F. Huang [et al.] // *Oncotarget.* 2017. Vol. 8, № 25. P. 40264–40275.
934. Combination treatment with curcumin and quercetin of adenomas in familial adenomatous polyposis / M. Cruz-Correa [et al.] // *Clin. Gastr. Hepatol.* 2006. Vol. 4. P. 1035–1038.
935. Cytotoxicity, ROS-generation activity and radical-scavenging activity of curcumin and related compounds / S. Fujisawa [et al.] // *Anticancer Res.* 2004. Vol. 24. P. 563–569.
936. Mechanisms of apoptosis modulation by curcumin: Implications for cancer therapy / K. Mortezaee [et al.] // *J. Cell. Physiol.* 2019. Vol. 234, № 8. P. 12537–12550.
937. Curcumin induces apoptosis in human lung adenocarcinoma A549 cells through a reactive oxygen species-dependent mitochondrial signaling pathway / Q. Chen [et al.] // *Oncol. Rep.* 2010. Vol. 23. P. 397–403.
938. Chang Z., Xing J., Yu X. Curcumin induces osteosarcoma MG63 cells apoptosis via ROS/Cyto-C/Caspase-3 pathway // *Tumor Biology.* 2014. Vol. 35. P. 753–758.
939. Curcumin-induced autophagy contributes to the decreased survival of oral cancer cells, / J. Y. Kim [et al.] // *Arch. Oral. Biol.* 2012. Vol. 57. P. 1018–1025.
940. Involvement of ROS in curcumin-induced autophagic cell death / Y. J. Lee [et al.] // *Korean J. Physiol. Pharmacol.* 2011. Vol. 15. P. 1–7.

941. Mitochondrial electron-transport-chain inhibitors of complexes I and II induce autophagic cell death mediated by reactive oxygen species / Y. Chen [et al.] // *J. Cell Sci.* 2007. Vol. 120. P. 4155–4166.
942. Regulation of autophagy by reactive oxygen species (ROS): implications for cancer progression and treatment / M. B. Azad [et al.] // *Antioxid. Redox Signal.* 2009. Vol. 11. P. 777–790.
943. Self-eating and selfkilling: crosstalk between autophagy and apoptosis. / M. C. Maiuri [et al.] // *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.* 2007. Vol. 8. P. 741–752.
944. Curcumin inhibits proliferation of breast cancer cells through Nrf2-mediated down-regulation of Fen1 expression / B. Chen [et al.] // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2014. Vol. 143. P. 11–18.
945. Artichoke Polyphenols Sensitize Human Breast Cancer Cells to Chemotherapeutic Drugs via a ROS-Mediated Downregulation of Flap Endonuclease 1 / A. M. Mileo [et al.] // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2020. Vol. 2020. P. 7965435.
946. Protective effect of curcumin on chemotherapy-induced intestinal dysfunction / Q. Yao [et al.] // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2013. Vol. 6. P. 2342–2349.
947. Hepatoprotective effect of curcumin and alpha-tocopherol against cisplatin-induced oxidative stress / S. Palipoch [et al.] // *Tract. BMC Complement. Altern. Med.* 2014. Vol. 14. P. 111.
948. Curcumin activates DNA repair pathway in bone marrow to improve carboplatin-induced myelosuppression / X. Chen [et al.] // *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7. P. 17724.
949. Said Salem N. I., Noshay M. M., Said A. A. Modulatory effect of curcumin against genotoxicity and oxidative stress induced by cisplatin and methotrexate in male mice // *Food Chem. Toxicol.* 2017. Vol. 105. P. 370–376.
950. Curcumin activates the Nrf2 pathway and induces cellular protection against oxidative injury / M. Ashrafizadeh [et al.] // *Curr. Mol. Med.* 2020. Vol. 20. P. 116–133.
951. Das L., Vinayak M. Long term effect of curcumin in restoration of tumour suppressor p53 and phase-II antioxidant enzymes via activation of NRF2 signalling and modulation of inflammation in prevention of cancer. // *PLoS ONE.* 2015. Vol. 10. P. e0124000.
952. Curcumin ameliorates cisplatin-induced cystopathy via activating NRF2 pathway / Y. P. Shao [et al.] // *Neurourol. Urodynam.* 2018. Vol. 37. P. 2470–2479.
953. Singh C., Ndiaye M., Ahmad N. Resveratrol and cancer: Challenges for clinical translation // *BBA-Molecular Basis of Disease.* 2015. Vol. 1852, № 6. P. 1178–1185.
954. Resveratrol and breast cancer risk / F. Levi [et al.] // *Eur. J. Cancer. Prev.* 2005. Vol. 14. P. 139–142.
955. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. / M. Jang [et al.] // *Science.* 1997. Vol. 275. P. 218–220.
956. Resveratrol-induced autophagy and apoptosis in cisplatin-resistant human oral cancer CAR cells: A key role of AMPK and Akt/mTOR signaling / C. H. Chang [et al.] // *Int. J. Oncol.* 2017. Vol. 50. P. 873–882.
957. Resveratrol promotes apoptosis through the induction of dual specificity phosphatase 1 and sensitizes prostate cancer cells to cisplatin / D. Martinez-Martinez [et al.] // *Food Chem. Toxicol.* 2019. Vol. 124. P. 273–279.
958. Resveratrol enhanced anticancer effects of cisplatin on non-small cell lung cancer cell lines by inducing mitochondrial dysfunction and cell apoptosis / L. J. Ma [et al.] // *Int. J. Oncol.* 2015. Vol. 47. P. 1460–1468.

959. Apoptotic cell death induced by resveratrol is partially mediated by the autophagy pathway in human ovarian cancer cells / F. F. Lang [et al.] // PLoS One. 2015. Vol. 10. P. e0129196.
960. Resveratrol as a natural regulator of autophagy for prevention and treatment of cancer / Y. Tian [et al.] // OncoTargets Ther. 2019. Vol. 12. P. 8601.
961. The relevance of Nrf2 pathway and autophagy in pancreatic cancer cells upon stimulation of reactive oxygen species / L. Zhang [et al.] // Oxid. Med. Cell. Longev. 2016. Vol. 2016. P. 3897250.
962. Resveratrol enhances radiosensitivity of human non-small cell lung cancer NCI-H838 cells accompanied by inhibition of nuclear factor-kappa B activation / H. F. Liao [et al.] // J. Rad. Res. 2005. Vol. 46. P. 387–393.
963. Wang L., Schulte B. A., Yang A., Tang S., & Wang G. Y. Resveratrol enhances ionizing radiation-induced premature senescence in lung cancer cells. / H. Luo [et al.] // Int. J. Oncol. 2013. Vol. 43. P. 1999–2006.
964. Resveratrol promotes the sensitivity of small-cell lung cancer H446 cells to cisplatin by regulating intrinsic apoptosis / W. P. Li [et al.] // Int. J. Oncol. 2018. Vol. 53. P. 2123–2130.
965. Resveratrol decreases Rad51 expression and sensitizes cisplatin-resistant MCF-7 breast cancer cells. / I. Leon-Galicia [et al.] // Oncol. Rep. 2018. Vol. 39. P. 3025–3033.
966. Resveratrol induces cell cycle arrest and apoptosis with docetaxel in prostate cancer cells via a p53/p21(WAF1/CIP1) and p27(KIP1) pathway / S. K. Singh [et al.] // Oncotarget. 2017. Vol. 8. P. 17216–17228.
967. Resveratrol-mediated reversal of doxorubicin resistance in acute myeloid leukemia cells via downregulation of MRP1 expression / S. H. Kweon [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Comm. 2010. Vol. 395. 104–110.
968. Proteomic profiling reveals that resveratrol inhibits HSP27 expression and sensitizes breast cancer cells to doxorubicin therapy / J. Díaz-Chávez [et al.] // PLoS One. 2013. Vol. 8. P. e64378.
969. Jazirehi A. R., Bonavida B. Resveratrol modifies the expression of apoptotic regulatory proteins and sensitizes non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma cell lines to paclitaxel-induced apoptosis // Mol. Cancer Ther. 2004. Vol. 3. P. 71–84.
970. Resveratrol displays converse dose-related effects on 5-fluorouracil-evoked colon cancer cell apoptosis: the roles of caspase-6 and p53 / Chan J. Y. [et al.] // Cancer Biol. Ther. 2008. Vol. 7. P. 1305–1312.
971. Mondal A., Bennett L. Resveratrol enhances the efficacy of sorafenib mediated apoptosis in human breast cancer MCF7 cells through ROS, cell cycle inhibition, caspase 3 and PARP cleavage // Biomed. Pharmacother. 2016. Vol. 84. P. 1906–1914.
972. Resveratrol sensitizes carfilzomib-induced apoptosis via promoting oxidative stress in multiple myeloma cells / Q. Li [et al.] // Front. Pharmacol. 2018. Vol. 9. P. 334.
973. A phase 2 study of SRT501 (resveratrol) with bortezomib for patients with relapsed and or refractory multiple myeloma / R. Popat [et al.] // Br. J. Haematol. 2013. Vol. 160. P. 714–717.
974. Potential of curcumin and resveratrol as biochemical and biophysical modulators during lung cancer in rats / D. C. Liu [et al.] // Drug Chem. Toxicol. 2019. Vol. 42. P. 328–334.

975. Talero E., Avila-Roman J., Motilva V. Chemoprevention with phytonutrients and microalgae products in chronic inflammation and colon cancer // *Curr. Pharm. Design*. 2012. Vol. 18. P. 3939–3965.

976. Synergistic anticancer effects of curcumin and resveratrol in Hepa1-6 hepatocellular carcinoma cells / Q. Du [et al.] // *Oncol. Rep*. 2013. Vol. 29. P. 1851–1858.

977. Resveratrol potentiates the cytotoxic oxidative stress induced by chemotherapy in human colon cancer cells / F. M. Santandreu [et al.] // *Cell. Physiol. Biochem*. 2011. Vol. 28. P. 219–228.

978. Resveratrol induces premature senescence in lung cancer cells via ROS-mediated DNA damage / H. Luo [et al.] // *PLoS One*. 2013. Vol. 8. P. e60065.

979. Resveratrol-induced downregulation of NAF-1 enhances the sensitivity of pancreatic cancer cells to gemcitabine via the ROS/Nrf2 signaling pathways / L. Cheng [et al.] // *Oxid. Med. Cell. Longev*. 2018. Vol. 2018. P. 9482018.

980. Resveratrol as an adjuvant for normal tissues protection and tumor sensitization / K. Mortezaee [et al.] // *Curr. Cancer Drug Targets*. 2020. Vol. 20, № 2. P. 130–145.

981. A review of resveratrol as a potent chemoprotective and synergistic agent in cancer chemotherapy / Q. Xiao [et al.] // *Front. Pharmacol*. 2019. Vol. 9. P. 1534.

982. Resveratrol confers endothelial protection via activation of the antioxidant transcription factor Nrf2 / Z. Ungvari [et al.] // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 2010. Vol. 299, № 1. P. H18–H24.

983. Resveratrol represses estrogen-induced mammary carcinogenesis through NRF2-UGT1A8-estrogen metabolic axis activation / X. Zhou [et al.] // *Biochem. Pharmacol*. 2018. Vol. 155. P. 252–263.

984. Truong V. L., Jun M., Jeong W. S. Role of resveratrol in regulation of cellular defense systems against oxidative stress // *Biofactors*. 2018. Vol. 44, № 1. P. 36–49.

985. Антиоксидантные и противовоспалительные свойства новых водорастворимых серосодержащих фенольных соединений / Н. К. Зенков [и др.] // *Биохимия*. 2007. Т. 72. С. 790–798.

986. Противовоспалительная активность индуцирующего систему антиоксидант-рецептивного элемента (ARE) фенольного антиоксиданта ТС-13 / Е. Б. Меньщикова [и др.] // *Бюл. эксперимент. биологии и медицины*. 2013. Т. 155. С. 344–348.

987. Защитное действие ARE-индуцирующего фенольного антиоксиданта ТС-13 при хроническом воспалении / Е. Б. Меньщикова [и др.] // *Бюл. эксперимент. биологии и медицины*. 2013. Т. 155. С. 305–309.

988. Влияние индуцирующего антиоксидант-рецептивный элемент фенола на продолжительность жизни *Drosophila melanogaster* / Н. Я. Вайсман [и др.] // *Успехи геронтологии*. 2011. Т. 24. С. 591–600.

989. Phenolic antioxidant TS-13 regulating ARE-driven genes induces tumor cell death by a mitochondria-dependent pathway / G. G. Martinovich [et al.] // *Biophysics*. 2015. Vol. 60, № 1. P. 94–100.

990. Серосодержащие фенольные антиоксиданты в повышении противоопухолевой эффективности циклофосфана и его комбинации с донором оксида азота / Т. Н. Богатыренко [и др.] // *Изв. АН. Сер. хим*. 2018. № 4. С. 700–704.

991. Synthetic phenolic antioxidant TS-13 suppresses the growth of Lewis lung carcinoma and potentiates oncolytic effect of doxorubicin / E. B. Men'shchikova [et al.] // *Bull. Exp. Biol. Med*. 2019. Vol. 166, № 5. P. 646–650.

992. Activation of Autophagy and Nrf2 Signaling in Human Breast Adenocarcinoma MCF-7 Cells by Novel Monophenolic Antioxidants / E. B. Menshchikova [et al.] // Cell Tiss. Biol. 2019. Vol. 13, № 2. P. 85–92.

993. Обратная зависимость между антиоксидантной активностью синтетических монофенолов структурно взаимосвязанного ряда и их токсичностью в отношении опухолевых клеток / П. И. Гайнутдинов [и др.] // Сибир. науч. мед. журн. 2018. Т. 38, № 1. С. 22–31.

994. Антиоксидантная и противоопухолевая активность новых синтетических серосодержащих монофенолов / Г. Г. Мартинович [и др.] // Актуал. вопр. биол. физики и химии. 2019. Т. 4, № 2. С. 253–258.

СОДЕРЖАНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ	3
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
Глава 1. АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА – ПРОДУКТЫ КЛЕТОЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА.....	7
1.1. Активные формы кислорода: основные представители и их физико-химические свойства.....	7
1.2. Супероксидный анион-радикал и семейство НАДФН-оксидаз	15
1.3. Продукция активных форм кислорода в дыхательной цепи митохондрий	20
1.4. Пероксид водорода и супероксиддисмутазы	33
1.5. Оксид азота и NO-синтазы	38
1.6. Ксантиноксидаза как источник АФК в условиях окислительного стресса и воспаления	42
1.7. Хлорноватистая кислота и миелопероксидаза	44
Глава 2. АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА – КЛЮЧЕВОЙ КОМПОНЕНТ КЛЕТОЧНОГО ОТКЛИКА ПРИ ДЕЙСТВИИ ФИЗИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ И НАНОМАТЕРИАЛОВ	48
2.1. Образование активных форм кислорода при действии электромагнитных излучений.....	48
2.2. Образование активных форм кислорода при холодовой адаптации и тепловом стрессе	64
2.3. Образование активных форм кислорода при механотрансдукции.....	68
2.4. Активные формы кислорода и наноматериалы	71
Глава 3. МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНЫХ ФУНКЦИЙ С УЧАСТИЕМ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА	76
3.1. Регуляция клеточных функций с участием активных форм кислорода: от пролиферации до апоптоза	76

3.2. Антиокислительная система клеток в механизмах сопряженного функционирования активных форм кислорода.....	92
3.3. Редокс-регуляция и редокс-сигнализация в клетках	104
Глава 4. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ РЕГУЛЯЦИИ РЕДОКС-ПРОЦЕССОВ В КЛЕТКЕ	115
4.1. Редокс-гомеостаз, редокс-состояние и их количественная характеристика	115
4.2. Термодинамические параметры редокс-процессов: от «редокс-окружения» к редокс-потенциалу клетки.....	127
4.3. Биофизическая модель редокс-цепи	137
4.4. Механизм трансдукции сигналов в клетках с участием редокс-активных соединений	146
4.5. Редокс-цепи как структурно-функциональные единицы (модули) сигнальных процессов.....	152
Глава 5. АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА ПРИ СТРЕССЕ И ПАТОЛОГИИ	162
5.1. Окислительный и восстановительный стресс. Гормезис и митогормезис.....	162
5.2. Восстановительный стресс при онкологических заболеваниях	166
5.3. Фармакологическая коррекция редокс-свойств опухолевых клеток в противоопухолевой терапии	174
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	184
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ ССЫЛКИ	186

Научное издание

Мартинovich Григорий Григорьевич

**АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА
В РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИЙ И СВОЙСТВ КЛЕТОК:
ЯВЛЕНИЯ И МЕХАНИЗМЫ**

Ответственный за выпуск *Е. А. Логвинович*

Художник обложки *Т. Ю. Таран*

Технический редактор *В. П. Явуз*

Компьютерная верстка *С. Н. Егоровой*

Корректор *Е. И. Бондаренко*

Подписано в печать 26.03.2021. Формат 60×84/16. Бумага офсетная.
Печать цифровая. Усл. печ. л. 13,95. Уч.-изд. л. 20,07. Тираж 35 экз. Заказ 186.

Белорусский государственный университет.

Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/270 от 03.04.2014.

Пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск.

Республиканское унитарное предприятие

«Издательский центр Белорусского государственного университета».

Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 2/63 от 19.03.2014.

Ул. Красноармейская, 6, 220030, г. Минск.