

Мартинович Г.Г., Черенкевич С.Н.

**ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ
ПРОЦЕССЫ В КЛЕТКАХ**

МИНСК
БГУ
2008

УДК 577.3'32/. '36:577.334

Рецензенты:

доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент НАНБ

Слобожанина Е.И.;

кандидат биологических наук *Коваленко Е.И.*

Мартинович Г.Г., Черенкевич С.Н.

Окислительно-восстановительные процессы в клетках: Монография.—
Мн.: БГУ, 2008.- с. 159: ил

В монографии обобщены и систематизированы современные представления об окислительно-восстановительных процессах, протекающих в клетках. Рассмотрены механизмы регуляторного и повреждающего действия биологических окислителей и восстановителей, физико-химические и биологические основы поддержания внутриклеточного и тканевого окислительно-восстановительного баланса. Введены новые физико-химические параметры, характеризующие окислительно-восстановительный баланс в живых системах. Авторами с использованием собственных и литературных данных обосновывается ключевая роль редокс-процессов в регуляции фаз активности клеток: пролиферации, дифференцировки и апоптоза.

Монография адресована студентам, аспирантам и специалистам биофизического, биологического и медицинского профиля, интересующихся физико-химическими основами редокс-регуляции процессов жизнедеятельности клеток.

ОГЛАВЛЕНИЕ

СОКРАЩЕНИЯ И УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ	5
ВВЕДЕНИЕ	9

ГЛАВА 1

ОКИСЛИТЕЛИ И ВОССТАНОВИТЕЛИ В ЖИВЫХ СИСТЕМАХ: ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ

1.1. Окислительно-восстановительные реакции	11
1.2. Восстановительный потенциал. Уравнение Нернста	12
1.3. Редокс-молекулы	17
1.4. Активные формы кислорода	18
1.5. Антиокислительная система клеток	27
1.6. Низкомолекулярные антиокислители	28
1.7. Редокс-состояние клеток. Окислительный и восстановительный стресс.....	33

ГЛАВА 2

МЕХАНИЗМЫ ОБРАЗОВАНИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

2.1. Дыхательная цепь митохондрий	34
2.2. НАДФН-оксидаза	36
2.3. NO-синтаза	40
2.4. Миелопероксидаза.....	43
2.5. Ксантинооксидаза.....	46
2.6. Супероксиддисмутаза	47

ГЛАВА 3

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ РЕДОКС-МОЛЕКУЛ С ОСНОВНЫМИ КЛАССАМИ ВЕЩЕСТВ В КЛЕТКЕ

3.1. Перекисное окисление липидов.....	50
3.2. Окисление белков.....	53
3.3. Нитрозилирование белков	56
3.4. S-глутатиолирование белков	59
3.5. Окисление нуклеиновых кислот	62

ГЛАВА 4

МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ РЕДОКС-МОЛЕКУЛ

4.1. Трансмембранный транспорт электронов и редокс-молекул	63
4.2. Утилизация пероксида водорода клетками. Градиент концентраций окислителей	69
4.3. Механизмы регуляции редокс-гомеостаза.....	76
4.4. Содержание редокс-молекул в клетках и тканях в норме и при патологиях ..	78

ГЛАВА 5

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ РЕДОКС-СОСТОЯНИЯ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ

5.1. Электродный редокс-потенциал в тканях	83
5.2. Редокс-потенциал глутатиона в клетках и тканях	85
5.3. Восстановительный потенциал редокс-пары НАД(Ф) ⁺ /НАД(Ф)Н и регуляция метаболизма	91
5.4. Эффективный восстановительный потенциал в клетках и тканях.....	94
5.6. Определение антиокислительной активности биологических жидкостей.....	100
5.7. Редокс-буферная емкость клеток.....	104

ГЛАВА 6

РЕДОКС-СОСТОЯНИЕ И ПЕРЕДАЧА СИГНАЛОВ В КЛЕТКАХ

6.1. Редокс-регуляция процессов внутриклеточной сигнализации	110
6.2. Редокс-регуляция кальциевого гомеостаза	117
6.3. Редокс-потенциал белков	121
6.4. Механизмы регуляции активности белков редокс-молекулами.....	124
6.5. Физико-химические параметры редокс-состояния и функциональная активность клеток	128
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	136
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ ИСТОЧНИКИ	138

СОКРАЩЕНИЯ И УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ

АК	аскорбиновая кислота	AA	ascorbic acid
АК̇	аскорбиновый радикал	АА̇	ascorbate radical
RȮ	алкоксильный радикал	RȮ	alkoxyl radical
АФК	активные формы кислорода	ROS	reactive oxygen species
АОС	антиокислительная система	AOS	antioxidant system
[H ₂ O ₂] _{цит}	внутриклеточная концентрация пероксида водорода	[H ₂ O ₂] _{in}	intracellular hydrogen peroxide concentration
OḢ	гидроксильный радикал	OḢ	hydroxyl radical
ClO ⁻	гипохлорид	ClO ⁻	hypochloride
GSH	глутатион восстановленный	GSH	reduced glutathione
GSSG	глутатион окисленный	GSSG	oxidized glutathione
GPx	глутатионпероксидаза	GPx	glutathione peroxidase
GR	глутатион-S-редуктаза	GR	glutathione-S- reductase
ДАК	дегидроаскорбиновая кислота	DAA	dehydroascorbic acid
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота	DNA	deoxyribonucleic acid
NO ₂ ̇	диоксид азота	NO ₂ ̇	nitrogen dioxide
ДХФ	2,7-дихлорофлуоресцеин	DCF	2,7-dichlorofluorescein
H ₂ ДХФ	2,7-дихлородигидрофлуоресцеин	H ₂ DCF	2,7-dichlorodihydrofluorescein
RhoGDI	ингибитор диссоциации RhoGDP	RhoGDI	RhoGDP-dissociation inhibitor
ИФ ₃	инозит-1,4,5-трифосфат	IP ₃	inositol-1,4,5-triphosphate
ИФР	инсулинподобный фактор роста	IGF	insulin-like growth factor
ИЛ	интерлейкин	IL	interleukin
ЖРБ	железерегулирующий белок	IRP	iron regulatory protein
Ca ²⁺	кальций ионизированный	Ca ²⁺	ionized calcium
CaM	кальмодулин	CaM	calmodulin
САТ	каталаза	CAT	catalase
МАПК	митогенактивируемая протеинкиназа	MAPK	mitogen-activating protein

	инкиназа		kinase
БМК	большая МАПК	БМК	Big MAPK
JNK	c-Jun N-концевая киназа	JNK	c-Jun N-terminal kinase
$[Ca^{2+}]_{цит}$	концентрация цитозольного кальция	$[Ca^{2+}]_{in}$	cytosol calcium concentration
\dot{NO}	монооксид азота (оксид азота)	\dot{NO}	nitrogen monoxide (nitric oxide)
CO	монооксид углерода	CO	carbone monoxide
UH ₂	мочевая кислота	UH ₂	uric acid
НКАДФ	никотиновая кислота адениндинуклеотидфосфат	NAADP	nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate
НАД ⁺	никотинамидадениндинуклеотид, окисленная форма	NAD ⁺	nicotinamide adenine dinucleotide, oxidized form
НАДН	никотинамидадениндинуклеотид, восстановленная форма	NADH	nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form
НАДФ ⁺	никотинамидадениндинуклеотидфосфат, окисленная форма	NADP ⁺	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, oxidized form
НАДФН	никотинамидадениндинуклеотидфосфат, восстановленная форма	NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form
NMDA	N-метил-D-аспарагиновая кислота	NMDA	N-methyl-D-aspartic acid
NOS	NO-синтаза	NOS	NO synthase
iNOS	индуцибельная NO-синтаза	iNOS	inducible NO synthase
cNOS	конститутивная NO-синтаза	cNOS	constitutive NO synthase
NOX	НАДФН оксидаза	NOX	NADPH oxidase
NEM	N-этилмалеимид	NEM	N-ethylmaleimide
O ₃	озон	O ₃	ozone
H ₂ O ₂	пероксид водорода	H ₂ O ₂	hydrogen peroxide
\dot{HO}_2	гидропероксильный радикал	\dot{HO}_2	hydroperoxyl radical
ПОЛ	перекисное окисление липидов	LPO	lipide peroxidation
ГЛУТ	переносчик глюкозы	GLUT	glucose transporter
\dot{RO}_2	пероксильный радикал	\dot{RO}_2	peroxyl radical
ONOO ⁻	пероксинитрит	ONOO ⁻	peroxynitrite
PKC	протеинкиназа C	PKC	protein kinase C
PBCK	регулируемая внеклеточными сигналами киназа	ERK	extracellular signal-regulated kinase
PCPM	редокс-системы плазматиче-	PMRS	plasma membrane redox sys-

	ской мембраны		tems
r	редокс-буферная емкость	r	redox buffer capacity
SERCA	сарко/эндоплазматический Ca ²⁺ -насос	SERCA	sarco/endoplasmic Ca ²⁺ pump
СБСР	сбалансированный буферный солевой раствор	BBSS	balanced buffer salt solution
¹ O ₂	синглетный кислород	¹ O ₂	synglet oxygen
E ^{0'}	стандартный восстановительный потенциал при pH 7,0	E ^{0'}	standart reduction potential at pH 7,0
\dot{O}_2^-	супероксид	\dot{O}_2^-	superoxide
СОД	супероксиддисмутаза	SOD	superoxide dismutase
СЭА	суммарная электрическая активность	TEA	total electrical activity
H ₄ B	6R-тетрагидро-L-биоптерин	H ₄ B	6R-tetrahydro-L-biopterin
ТОН	α-токоферол	ТОН	α-tocopherol
НПВС	натрийзависимый переносчик витамина С	SVCT	sodium-dependent vitamin C transporter
PDGF	тромбоцитарный фактор роста	PDGF	platelet-derived growth factor
TNF	фактор некроза опухоли	TNF	tumor necrosis factor
ФАД	флавинадениндинуклеотид	FAD	flavine adenine dinucleotide
ФМН	флавинмононуклеотид	FMN	flavine mononucleotide
ФИ ₃ К	фосфатидилинозит 3-киназа	PI ₃ К	phosphatidylinositol 3-kinase
ЦНС	центральная нервная система	CNS	central nervous system
цГМФ	циклический гуанозин-5'-монофосфат	cGMP	cyclic guanosine 5'-monophosphate
CoQ	убихинон, коэнзим Q окисленный	CoQ	ubiquinone, oxidized coenzyme Q
CoQH ₂	убихинол, коэнзим Q восстановленный	CoQH ₂	ubiquinol, reduced coenzyme Q
E1	убиквитинактивируемый фермент	E1	ubiquitin-activating enzyme
E2	убиквитинсопряженный фермент	E2	ubiquitin-conjugating enzyme
E ^{эфф}	эффективный восстановительный потенциал	E ^{eff}	effective reduction potential
EGF	эпидермальный фактор роста	EGF	epidermal growth factor
FGF	фактор роста фибробластов	FGF	fibroblast-derived growth factor

цАДФР циклическая АДФ рибоза
NGF фактор роста нервов
GEF фактор обмена гуаниновых
нуклеотидов
NF-κB ядерный фактор κB

cADPR cyclic ADP-ribose
NGF nerve growth factor
GEF guanine-nucleotide exchange
factor
NF-κB nuclear factor κB

«...то, с чем мы имеем дело при наблюдении, это не сама природа, но природа, доступная нашему методу задавать вопросы»

Вернер Гейзенберг

ВВЕДЕНИЕ

Достижения клеточной биофизики последних лет привели к существенным изменениям представлений о роли окислительно-восстановительных процессов в функционировании клетки. Известно, что процессы переноса электронов в мембранах митохондрий составляют физико-химическую основу механизмов запасания энергии в клетке. В настоящее время предполагается, что перенос электронов между компонентами жидкой фазы в клетке и внутриклеточными белками регулирует активность белков и клетки в целом [1–3].

На протяжении многих лет биологическую роль образующихся в клетках окислителей видели лишь в их токсическом действии. С увеличением уровня окислителей в организме связывают развитие многих заболеваний человека, включая атеросклероз, цирроз печени, катаракту, артриты, ишемическую болезнь сердца, бронхиальную астму, гепатит, диабет. Вместе с тем патологические изменения в клетках могут индуцироваться не только при повышении концентрации окислителей, но и при увеличении концентрации восстановителей или антиоксидантов.

Наряду с этим сегодня считается обоснованной также регуляторная роль этих соединений во внутриклеточных процессах. Обнаружено, что при рецепторной активации сигнальных путей, вызванной действием ростовых факторов, в клетках образуются окислители, что позволило выдвинуть предположение о посреднической роли окислителей в передаче сигнала от рецепторов фактора роста к внутриклеточным мишеням [4]. Показано, что ферментативный механизм образования окислителей обеспечивается также и у нефагоцитирующих клеток, включая стволовые [5]. Повышение внутриклеточного уровня окислителей является необходимым процессом в механизме запуска дифференцировки в различных типах клеток [6]. С другой стороны, недавно показано, что аскорбиновая кислота индуцирует дифференцировку стволовых клеток в кардиомиоциты [7].

Однако механизмы, регулирующие эти процессы, до сих пор неизвестны. Сведения о мишенях действия редокс-молекул неоднозначны и противоречивы. Одни и те же концентрации внеклеточных окислителей индуцируют различные типы клеточных ответов (регуляторный, токсический) в разных модельных условиях. Кроме того, окислители и восстановители могут вызвать однотипный функциональный ответ клетки.

Многочисленные исследования указывают на ключевую роль в поддержании жизнедеятельности клеток редокс-состояния внеклеточной и внутриклеточной среды, которое характеризует определенное равновесие между донорами и акцепторами электронов (или восстановителями и окислителями). Важность поддержания окислительно-восстановительного равновесия для жизнедеятельности организма была отмечена многими исследователями еще в середине прошлого века. Лауреат Нобелевской премии Альберт Сент-Дьёрдьи писал, что равновесие между донорами и акцепторами электронов, обладающими различными биопотенциалами, – один из основных параметров жизни; изменение этого равновесия используется для регуляции как различных функций, так и физического состояния клетки [8]. Термин «редокс-состояние» в настоящее время широко используется в областях свободнорадикальной биологии и медицины. Несмотря на то, что роль редокс-состояния в жизнедеятельности клеток была отмечена еще в середине прошлого века, четкого представления о редокс-состоянии и его количественных характеристиках до сих пор нет.

В данной работе обобщены и систематизированы современные представления об окислительно-восстановительных процессах, протекающих в клетках. Рассмотрены механизмы регуляторного и повреждающего действия биологических окислителей и восстановителей, физико-химические и биологические основы поддержания внутриклеточного и тканевого окислительно-восстановительного баланса. Введены новые физико-химические параметры, характеризующие окислительно-восстановительный баланс в живых системах. Авторами с использованием собственных и литературных данных обосновывается ключевая роль редокс-процессов в регуляции фаз активности клеток: пролиферации, дифференцировки и апоптоза.

Авторы отчетливо понимают, что в данной работе не нашли отражения все аспекты сложной и многообразной проблемы редокс-регуляции клеточных процессов. Однако авторы надеются, что данная работа сможет пробудить интерес исследователей к дальнейшему изучению окислительно-восстановительных процессов, протекающих в живых системах.

ОКИСЛИТЕЛИ И ВОССТАНОВИТЕЛИ В ЖИВЫХ СИСТЕМАХ: ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ

1.1. Окислительно-восстановительные реакции

В биологических системах большое число функционально значимых процессов происходит на основе физических механизмов, обеспечивающих перенос электронов. С точки зрения химии межмолекулярный перенос электрона представляет собой окислительно-восстановительную реакцию.

Окислительно-восстановительные реакции являются одним из наиболее распространенных видов биохимических реакций, протекающих в организме человека в процессе его жизнедеятельности. Основное количество энергии, необходимое для организма, в аэробных условиях обеспечивается процессами ферментативного окисления углеводов, жиров и аминокислот. Приблизительно 90 % всей потребности взрослого мужчины в энергии покрывается за счет энергии, вырабатываемой в тканях при окислении углеводов и жиров. Остальная часть энергии (~10 %) выделяется в результате окислительного расщепления аминокислот. Таким образом, окислительно-восстановительные реакции являются основным типом химических реакций в биоэнергетических процессах. Наряду с этим, в настоящее время активно изучается роль окислительно-восстановительных реакций во внутриклеточных и внеклеточных процессах трансдукции сигнала и патогенеза.

Взаимодействующие в окислительно-восстановительной реакции вещества образуют сопряженные пары, которые принято называть окислительно-восстановительными парами (или редокс-парами). Оба компонента редокс-пары различаются суммарным числом электронов. Богатый электронами компонент называется восстановленной формой, а бедный электронами – окисленной формой соответствующего соединения. В ходе редокс-реакции восстановленная форма одной редокс-пары (восстановитель) отдает электроны на окисленную форму (окислитель) другой па-

ры. При этом восстановитель окисляется, а окислитель восстанавливается.

Например, рассмотрим реакцию одноэлектронного восстановления кислорода НАДФН оксидазой:



В этой реакции принимают участие две сопряженные пары НАДФ⁺/НАДФН (окисленная форма – НАДФ⁺, восстановленная форма – НАДФН) и O₂/ $\dot{\text{O}}_2^-$ (окисленная форма – O₂, восстановленная форма – $\dot{\text{O}}_2^-$). Окислителем в этой реакции является кислород, а восстановителем никатинамидадениндинуклеотид фосфат (НАДФН).

1.2. Восстановительный потенциал. Уравнение Нернста

Одним из наиболее значимых параметров, характеризующих конкретную редокс-пару, участвующую в окислительно-восстановительной реакции, является ее окислительно-восстановительный потенциал. Окислительно-восстановительный потенциал (или восстановительный потенциал, поскольку он характеризует реакцию восстановления) является мерой способности элементов отдавать или принимать электроны в окислительно-восстановительных реакциях. Восстановительный потенциал называют также редокс-потенциалом (от английского RedOx – Reduction/Oxidation). В дальнейшем в основном будем использовать термины «восстановительный потенциал» и «редокс-потенциал» как синонимы.

Восстановительный потенциал определяют с помощью электрохимической ячейки, применяемой для изучения процессов переноса электронов между двумя редокс-парами, находящимися в разных сосудах. Окислительно-восстановительная реакция, протекающая в приэлектродном пространстве, сопровождается возникновением разности потенциалов, называемой электродным редокс-потенциалом, на границе раздела физически и химически разнородных материалов – металла и раствора. Металл принимает лишь косвенное участие в потенциалоопределяющей реакции, являясь посредником в передаче электронов от восстановителя к окислителю. При возникновении разности потенциалов на границе раздела металл-раствор на окисленную форму вещества с определенной скоростью переносятся электроны от металла, на который, в свою очередь, переходят электроны от восстановленной формы вещества.

Скорость переноса электронов из металла в раствор к молекулам окисленной формы вещества постепенно уменьшается по мере роста величины положительного заряда поверхности металла, а скорость переноса электронов в обратном направлении – от молекул окисленной формы вещества к металлу – возрастает. И наоборот, скорость переноса электронов из раствора от молекул восстановленной формы вещества к металлу постепенно уменьшается по мере роста величины отрицательного заряда поверхности металла, а скорость переноса электронов в обратном направлении возрастает. В результате, при равенстве скоростей прямого и обратного процессов в зависимости от преобладания процессов окисления или восстановления устанавливается характерный для данной редокс-пары скачок потенциала.

При определении редокс-потенциала с помощью высокоомного вольтметра измеряют электрическое напряжение между двумя электродами, погруженными в растворы, содержащие редокс-пары. Восстановительный потенциал системы определяют как ЭДС в вольтах (В), измеренную относительно известного потенциала. В качестве стандарта принят восстановительный потенциал системы $2\text{H}^+/\text{H}_2$ (водородный электрод), который при определенных условиях принято считать равным нулю. Чтобы редокс-потенциалы отдельных пар можно было сопоставлять, их определяют при стандартных условиях (концентрации окисленных и восстановленных форм редокс-пары равны единице, температура $T=298\text{ K}$, $pH\ 0$ или, в случае биологических систем, $pH\ 7,0$).

Количественная зависимость величины восстановительного потенциала от химической природы редокс-пары, температуры, отношения концентраций окисленной и восстановленной форм вещества устанавливается уравнением Нернста:

$$E = E^0 + \frac{R T}{z F} \ln \frac{[A_{\text{ок}}]}{[A_{\text{вос}}]}, \quad (1.2)$$

где E – восстановительный потенциал редокс-пары; E^0 – стандартный восстановительный потенциал; R – универсальная газовая постоянная ($R=8,314\text{ Дж К}^{-1}\text{ М}^{-1}$); T – температура (К); F – постоянная Фарадея ($F=9,6485 \times 10^4\text{ Кл М}^{-1}$); z – число электронов, которые присоединяет частица окисленной формы $A_{\text{ок}}$, переходя в восстановленную форму вещества $A_{\text{вос}}$; $[A_{\text{ок}}]$ – концентрация окисленной формы вещества; $[A_{\text{вос}}]$ – концентрация восстановленной формы вещества.

Вывод данного уравнения и его физический смысл могут быть получены на основе следующих рассуждений. Электрическая работа по

созданию потенциала равна убыли свободной энергии Гиббса в системе (следствие 2-го начала термодинамики), т. е.

$$A_{\text{эл}} = -G. \quad (1.3)$$

Электрическая работа обратимого перевода 1 моля электронов из металла в раствор или из раствора в металл будет равна

$$A_{\text{эл}} = zFE, \quad (1.4)$$

то есть

$$zFE = -G, \quad (1.5)$$

или

$$G = -zFE. \quad (1.6)$$

Энергия Гиббса редокс-пары определяется следующим образом:

$$G = G^0 + RT \ln \frac{[A_{\text{вос}}]}{[A_{\text{ок}}]} = -RT \ln K_p + RT \ln \frac{[A_{\text{вос}}]}{[A_{\text{ок}}]}. \quad (1.7)$$

Константа равновесия реакции $A_{\text{ок}} + ze^- \rightarrow A_{\text{вос}}$ будет

$$K_p = \frac{[A_{\text{вос}}]}{[A_{\text{ок}}][e^-]^z}. \quad (1.8)$$

Получаем, что

$$-zFE = -RT \ln K_p + RT \ln \frac{[A_{\text{вос}}]}{[A_{\text{ок}}]}, \quad (1.9)$$

или

$$E = \frac{RT}{zF} \ln K_p + \frac{RT}{zF} \ln \frac{[A_{\text{ок}}]}{[A_{\text{вос}}]}. \quad (1.10)$$

Введя обозначение

$$E^0 = \frac{RT}{zF} \ln K_p, \quad (1.11)$$

определим восстановительный потенциал редокс-пары (или редокс-потенциал) как

$$E = E^0 + \frac{RT}{zF} \ln \frac{[A_{\text{ок}}]}{[A_{\text{вос}}]}. \quad (1.12)$$

Выражение (1.11) можно записать в виде

$$E^0 = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[A_{\text{вос}}]}{[A_{\text{ок}}][e^-]^z}, \quad (1.13)$$

$$E^0 = -\frac{RT}{zF} \ln \frac{[A_{\text{ок}}][e^-]^z}{[A_{\text{вос}}]} = -\frac{RT}{zF} \ln \frac{[A_{\text{ок}}]}{[A_{\text{вос}}]} - \frac{RT}{zF} \ln [e^-]^z. \quad (1.14)$$

Используя выражение (1.12) и (1.14), получаем следующее выражение для восстановительного потенциала редокс-пары

$$E = -\frac{RT}{F} \ln [e^-]. \quad (1.15)$$

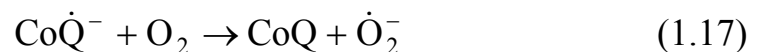
Таким образом, восстановительный потенциал можно рассматривать как «электрондвижущую силу» (по аналогии с протондвижущей силой), которая определяется концентрацией отдаваемых или принимаемых системой электронов и характеризует затрачиваемую на их перенос энергию. Выражение (1.15) описывает логарифмическую зависимость E от концентрации электронов, что позволяет увидеть аналогию с pH и рассматривать уравнение Нернста как аналог уравнения Гендерсона-Гассельбаха:

$$pH = pK_a + \lg \frac{[A^-]}{[HA]}. \quad (1.16)$$

Стандартные редокс-потенциалы участников основных биохимических реакций при pH 7,0 располагаются в диапазоне от -420 мВ ($2H^+/H_2$) до $+820$ мВ (O_2/H_2O). Эти значения можно рассматривать как два крайних состояния воды при стандартных условиях: предельная оксигенация с $E = +820$ мВ и деоксигенация с предельным насыщением газообразным водородом с $E = -420$ мВ. Стандартные восстановительные потенциалы некоторых участников биохимических реакций в организме представлены в табл. 1.1.

Восстановители или вещества, являющиеся донорами электронов в биологических системах, имеют высокое отрицательное значение восстановительного потенциала (см. табл. 1.1). Окислители или акцепторы электронов имеют высокие положительные значения восстановительного потенциала.

Установление величины восстановительного потенциала редокс-реакции позволяет определить преимущественное направление переноса электронов между участниками реакции. В любой окислительно-восстановительной реакции участвует две пары веществ. Например, в реакции



первая редокс-пара состоит из восстановленной формы $Co\dot{Q}^-$ (анион-радикала семихинона) и окисленной формы CoQ (убихинона), вторая ре-

докс-пара состоит из восстановленной формы \dot{O}_2^- и окисленной формы O_2 .

Таблица 1.1

Редокс-пары и их стандартные восстановительные потенциалы (при $pH\ 7,0$)

Редокс-пара	$E^{0'}$ (мВ)
$\dot{O}H, H^+/H_2O$	+2180
$\dot{O}H/HO^-$	+1900
$O_3, H^+/HO_3$	+1800
$RO\dot{O}, H^+/ROH$	+1600
$NO^+/N\dot{O}$	+1200
O_3/\dot{O}_3^-	+1040
$RO\dot{O}, H^+/ROOH$	+1000
$\dot{O}_2^-, 2H^+/H_2O_2$	+940
$G\dot{S}, H^+/GSH$	+900
$O_2, 2H^+/H_2O$	+820
$UH, H^+/UH_2$	+590
$T\dot{O}, H^+/TOH$	+500
$H_2O_2, H^+/H_2O, \dot{O}H$	+320
$A\dot{K}, H^+/AK$	+282
$CoQ, 2H^+/CoQH_2$	+100
$ДАК, H^+/AK$	+58
$CoQ/Co\dot{Q}^-$	-40
O_2/\dot{O}_2^-	-137
$ДАК/A\dot{K}$	-174
$GSSG/2GSH$	-240
$НАД^+/НАДН$	-320
$НАДФ^+/НАДФН$	-320
$2H^+/H_2$	-420
$N\dot{O}/^3NO^-$	-700
$N\dot{O}/^1NO^-$	-1700

Примечание. При составлении таблицы использованы данные работ [9–12].

Стандартное значение редокс-потенциала для пары $CoQ/Co\dot{Q}^-$ при $pH\ 7,0$ составляет -40 мВ. Стандартное значение редокс-потенциала для пары O_2/\dot{O}_2^- при $pH\ 7,0$ составляет -137 мВ. Значение разности редокс-потенциалов ($\Delta E = E^{0'}_{\text{кислорода}} - E^{0'}_{\text{убихинона}} = -97$ мВ < 0) между этими

двумя редокс-парами указывает на то, что при стандартных условиях в соответствии с уравнением (1.17) будет протекать обратная реакция, т. е. перенос электронов будет происходить с кислорода на убихинон.

Анализ уравнения Нернста указывает на то, что изменение концентрации окисленной или восстановленной форм участников окислительно-восстановительных реакций может существенно изменить скорость и направление переноса электронов. Следует отметить, что знание значений восстановительных потенциалов позволяет предсказать направление переноса электронов в системах только при стандартных условиях.

Редокс-потенциал представляет собой меру свободной энергии реакции окисления-восстановления для любой замкнутой окислительно-восстановительной системы, находящейся в состоянии равновесия. Живой организм принципиально отличается от такой системы. В организме протекают не отдельные, изолированные окислительно-восстановительные реакции, которые рассматриваются в классической физической химии, а существует система таких реакций. Однако, хотя организм и является открытой системой, поскольку он постоянно обменивается веществом и энергией с окружающей средой, по ряду показателей он характеризуется постоянством ряда своих свойств во времени, т. е. находится в стационарном состоянии. Ниже будет показано, что величина окислительно-восстановительного потенциала в нормально функционирующих клетках и тканях поддерживается на постоянном уровне и изменяется только при определенных воздействиях.

Отличия живой системы от простой физико-химической системы побуждали исследователей искать иное название измеряемому в живых системах потенциалу. Так, например, предлагалось использовать такие термины, как «стационарный окислительно-восстановительный потенциал» или «моментальная электронная активность». Так как почти на протяжении века основным способом измерения редокс-потенциалов в живых системах был электродметрический, некоторые авторы называли измеряемый потенциал электродным. Большинство же исследователей в наше время пользуется термином «редокс-потенциал».

1.3. Редокс-молекулы

В дальнейшем для обозначения всех низкомолекулярных органических и неорганических соединений, участвующих в окислительно-восстановительных реакциях, будем использовать термин «редокс-молекулы». К редокс-молекулам относятся как окислители, так и восстановители.

Вещества, атомы или ионы которых принимают электроны, называются окислителями. К окислителям в биологических системах преимущественно относятся различные продукты метаболизма кислорода или активные формы кислорода (АФК).

Вещества, атомы или ионы которых отдают электроны, называются восстановителями. В живых системах восстановительные свойства проявляют полярные и неполярные антиоксиданты, некоторые из них участвуют в реакциях метаболизма в качестве переносчиков электронов.

1.4. Активные формы кислорода

Во всех живых клетках, которые используют кислород для дыхания, образуются активные формы кислорода, обладающие высокой биологической активностью. 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 ($\dot{\text{O}}_2^-$), гидроксильный ($\dot{\text{O}}\text{H}$), гидропероксильный ($\text{H}\dot{\text{O}}_2$), пероксильный ($\text{R}\dot{\text{O}}_2$) и алкоксильный ($\text{R}\dot{\text{O}}$) радикалы, монооксид ($\text{N}\dot{\text{O}}$) и диоксид азота ($\text{N}\dot{\text{O}}_2$), пероксинитрит-ион (ONOO^-), гипохлорит (ClO^-), озон (O_3), пероксид водорода (H_2O_2), монооксид углерода (CO) и другие. К этому классу высокореакционных соединений относят различные химические соединения: свободные радикалы, бирадикалы, ионы и кислоты. В некоторых случаях $\text{N}\dot{\text{O}}$, $\text{N}\dot{\text{O}}_2$ и ONOO^- выделяют в отдельную группу веществ, объединяемую термином «активные формы азота». Однако, из-за сходства строения и механизмов действия в биологических системах целесообразно использовать один термин. И хотя с физико-химической точки зрения термин АФК не вполне удачен [13], широкое использование его не вызывает сомнений. Основные формы АФК и их времена жизни при физиологических условиях среды представлены в табл. 1.2.

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 жизни $\dot{\text{O}}\text{H}$ 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 от которых они образованы. С другой стороны, H_2O_2 , являясь наиболее стабильной формой АФК, может вступать в реакции с мишенями, удаленными на рас-

тояние в несколько клеточных диаметров от места образования окислителя.

Среди различных АФК можно выделить две группы: 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. 1.3 представлены некоторые первичные и вторичные АФК и их возможные механизмы образования. Принципиальная разница в биологическом действии 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 несут ответственность за развитие многих заболеваний.

Таблица 1.2

АФК и время их жизни при физиологических условиях

Название	Обозначение	Время жизни, с
Молекулярный кислород	O ₂	>100
Синглетный кислород	¹ O ₂	10 ⁻⁶
Супероксидный анион-радикал	\dot{O}_2^-	10 ⁻⁶
Гидроксильный радикал	$\dot{O}H$	10 ⁻⁹
Гидропероксильный радикал	H \dot{O}_2	10 ⁻⁸
Пероксид водорода	H ₂ O ₂	10–100
Монооксид азота	N \dot{O}	1–100
Диоксид азота	N \dot{O}_2	10 ⁻⁷ -10 ⁻⁸
Нитрозоний (нитрозильный катион)	NO ⁺	10 ⁻¹⁰
Нитроксил (нитроксильный анион)	NO ⁻	10 ⁻³
Пероксинитрит-ион	ONOO ⁻	0,05–1
Карбонатный анион-радикал	C \dot{O}_3^-	10 ⁻⁷ -10 ⁻⁸
Монооксид углерода	CO	10

Молекулярный кислород в основном триплетном состоянии содержит два неспаренных электрона с одинаковым спином на различных π*-разрыхляющих орбиталях. Молекула в этом состоянии обладает меньшей свободной энергией, чем в синглетном состоянии, где электроны имеют противоположно направленные спины и находятся на одной (¹Δg) или на разных (¹Σg⁺) 2p-π*-орбиталях. В отличие от молекулы кислорода в основном триплетном состоянии синглетный кислород (¹O₂)

обладает высокой химической активностью по отношению к ненасыщенным жирным кислотам, ароматическим аминокислотам и основаниям. Основными реакциями образования синглетного кислорода в живых системах являются реакции фотосенсибилизированного окисления биологических молекул. Схема электронного строения 2p-подуровня молекулярного кислорода и его производных представлена на рис. 1.1.

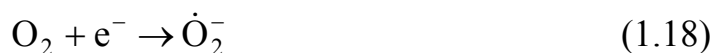
Таблица 1.3

Первичные и вторичные АФК

Первичные АФК	Ферменты, участвующие в образовании АФК
\dot{O}_2^-	НАДФН-оксидаза, NO-синтаза, НАДН-убихинон оксидоредуктаза, убихинол-цитохром c оксидоредуктаза, ксантиноксидаза и др.
H_2O_2	Супероксиддисмутаза, NO-синтаза, моноаминоксидаза, тирозингидроксилаза, фумаратредуктаза, сукцинатдегидрогеназа, аспаратоксидаза и др.
$NO\dot{O}$	NO-синтаза
ClO^-	Миелопероксидаза
CO	Гемоксигеназа
Вторичные АФК	Реакции образования АФК
\dot{OH}	$HOONO \rightarrow \dot{OH} + NO_2$
$NO_2\dot{O}$	$HOONO \rightarrow \dot{OH} + NO_2$
CO_3^-	$ONOO^- + CO_2 \rightarrow NO_2 + CO_3^-$

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 [14].

Продукт одноэлектронного восстановления кислорода в реакции



называют супероксидным анион-радикалом (сокращенно супероксидом) в его ионизированной форме и гидропероксильным радикалом в его протонированной форме. Гидропероксильный радикал \dot{HO}_2 является слабой кислотой с $pK_a=4,8$ и подобно другим кислотам диссоциирует в воде. Гидропероксильный радикал является более сильным окислителем, чем супероксидный анион-радикал и может непосредственно реагировать с

линолевой, линоленовой и арахидоновой кислотами с образованием гидроперекисей. При физиологических pH (7,4) количество HO_2 в среде составляет лишь незначительную часть ($\sim 0,25\%$) от концентрации $\dot{\text{O}}_2^-$. Супероксидный анион-радикал обнаружен практически во всех клеточных структурах, хотя в ряде случаев источники его возникновения не ясны. Супероксид обладает электрическим зарядом и его движение через мембрану клеток осуществляется по анионным каналам. Наличие проницаемых для $\dot{\text{O}}_2^-$ каналов продемонстрировано на эритроцитарной мембране [15]. В отличие от $\dot{\text{O}}_2^-$ его протонированная форма HO_2 не несет заряда и поэтому сравнительно легко проникает через биологические мембраны.

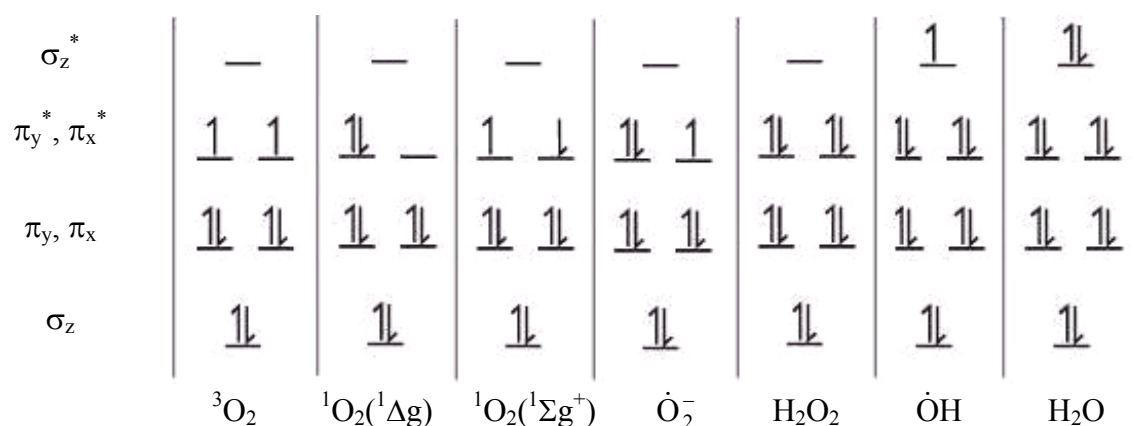
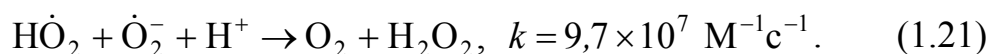
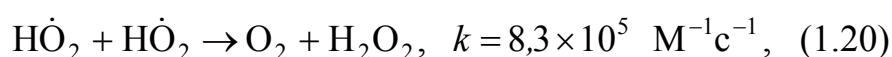


Рис.1.1. Схема электронного строения 2р-подуровня молекулярного кислорода и его производных

Супероксидный анион-радикал $\dot{\text{O}}_2^-$ является первичным свободным радикалом в большинстве биологических систем. Образование $\dot{\text{O}}_2^-$ в любой биологической или модельной системе сопровождается образованием H_2O_2 в результате реакции дисмутации супероксида. Скорость реакции дисмутации $\dot{\text{O}}_2^-$ сильно зависит от pH и определяется соотношением концентраций $\dot{\text{O}}_2^-$ и HO_2 [16]. Для описания некатализируемой дисмутации супероксида используются следующие реакции:



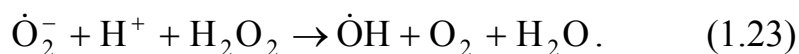
В присутствии супероксиддисмутазы (СОД) скорость дисмутации супероксидных анион-радикалов приближается к диффузионному пределу. Для Cu-Zn СОД константа скорости катализа равна $4,6 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ и постоянна в диапазоне рН от 4,8 до 9,5.

Основными мишенями H_2O_2 в клетке являются тиолы белков, константа скорости реакции с которыми для пероксида водорода достигает $10^2 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ [17]. Константа скорости реакции пероксида водорода с тиолатом бактериального белка OxyR составляет $\sim 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ [18].

Являясь стабильным продуктом восстановления кислорода, H_2O_2 обладает свойством слабого окислителя, которое проявляется, в частности, в присутствии ионов металлов переменной валентности в восстановленной форме. На протяжении многих лет общепринятым считался тот факт, что разложение H_2O_2 в присутствии ионов металлов переменной валентности служит основным путем образования $\dot{\text{O}}\text{H}$ в клетке. Образование гидроксильных радикалов в присутствии ионов переходных металлов описывается реакцией Фентона:

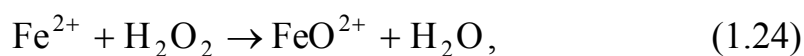


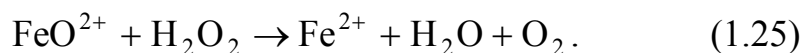
Наряду с этим в качестве возможного механизма образования гидроксильных радикалов в клетке в литературе обсуждалась реакция Хабера – Вайса:



Однако еще в 70-х гг. прошлого столетия показано, что скорость реакции Хабера – Вайса крайне низкая ($0,005\text{--}0,1 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$) [19, 20]. Поэтому использование реакции Хабера – Вайса для объяснения возможного механизма токсичности кислорода, встречающееся в биохимической литературе, считается не обоснованным [21].

Наряду с этим, рядом авторов развивается концепция о том, что взаимодействие пероксида водорода с металлами переменной валентности происходит без образования свободных радикалов в качестве промежуточных продуктов [22, 23]. Реакция Фентона названа именем ученого, который в 1894 г. обнаружил способность Fe^{2+} катализировать реакцию окисления винной кислоты пероксидом водорода [24]. Однако механизм реакции, представленный уравнением (1.22) и часто используемый в биохимической литературе, был впервые предложен в 1951 г. [25]. Следует отметить, что в 1932 г. впервые предложен механизм, согласно которому разложение пероксида водорода железом протекает по следующей схеме [26]:





Скорости реакции (1.22) и (1.24) практически одинаковые ($(53 \pm 0,7) \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ и $(55 \pm 0,4) \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ соответственно). Однако результаты экспериментальных исследований, полученные в конце прошлого века, свидетельствуют в пользу второго механизма [27-30]. Таким образом, разложение пероксида водорода в присутствии ионов переходных металлов не является основным механизмом образования гидроксильных радикалов в биологических системах.

Биологической активностью обладают также активные формы кислорода, содержащие азот (см. табл. 1.2). В организме из этих форм только оксид азота синтезируется семейством энзимов, обозначаемых как NO-синтазы (NOS). При определенных условиях NOS могут также формировать ONO_2^- (см. гл. 2).

Оксид азота является газом, коэффициент диффузии которого в воде при температуре 37°C в 1,4 раза выше, чем кислорода [31, 32]. Предполагается, что взаимодействие $\dot{\text{N}}\text{O}$ с биологическими мишенями зависит от электронной конфигурации его $2\text{p}-\pi^*$ -разрыхляющей орбитали [33]. Схема электронного строения 2p -подуровня молекулы оксида азота и его редокс-форм представлена на рис. 1.2.

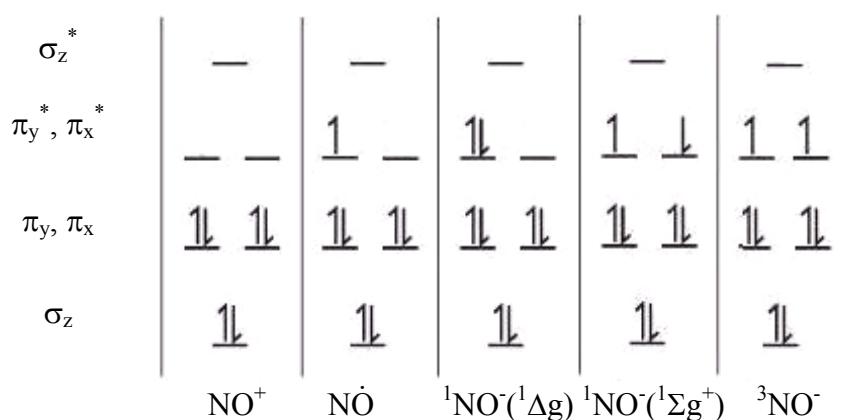
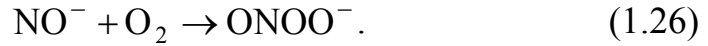


Рис. 1.2. Схема электронного строения 2p -подуровня молекулы оксида азота и его редокс-форм

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

Оксид азота и нитроксил могут оказывать противоположные эффекты на свойства клеток. Например, показано, что NO^- обладает токсическим действием в сердечно-сосудистой системе, тогда как NO оказывает протекторное действие при тех же условиях [34]. В аэробном окружении NO^- быстро вступает в реакцию с кислородом с образованием пероксинитрит-иона ($k = 5,7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$) [35]:



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

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

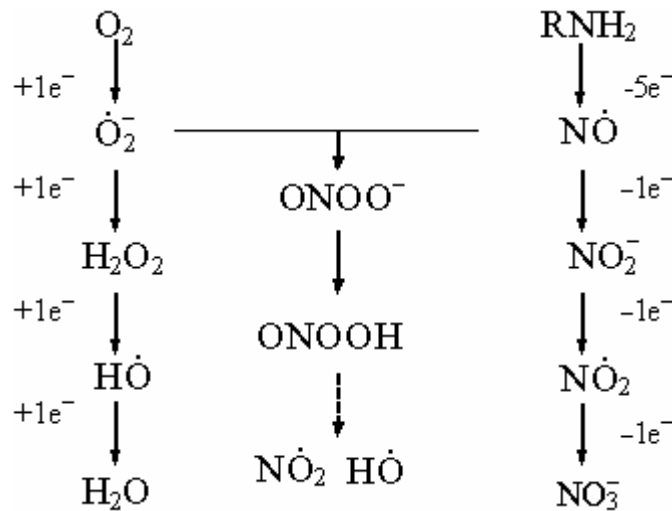


Рис. 1.3. Пути восстановления кислорода и окисления оксида азота

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 биологических веществ, как S-нитрозотиолы и S-нитрозоамины [36]. В биологических системах возможно протекание серий реакций транснаитрозилирования с переходом NO^+ -групп от одного носителя к другому.

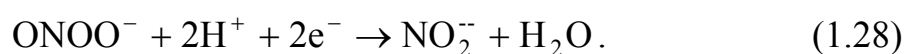
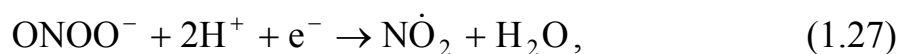
В организме семейством гемоксигеназ (HOs) синтезируется еще один газообразный мессенджер – монооксид углерода (CO), обладающий многими свойствами NO [37]. Монооксид углерода представляет собой бесцветный и не имеющий запаха газ, малорастворимый в воде. CO не является свободным радикалом и механизм его регуляторного действия основывается на взаимодействии с гемовыми группами белков [38]. В частности, CO активирует гуанилатциклазу и регулирует уровень цГМФ в клетке [39].

Между NO и O_2^- протекает реакция со скоростью близкой к диффузионно-контролируемому пределу ($k = (4,3-6,7) \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$), приводящая к образованию пероксинитрит-иона [40]. С помощью флэш-фотолиза показано, что в щелочных растворах константа скорости образования ONOO⁻ достигает $(1,9 \pm 0,2) \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ [41]. Одновременное образование NO и O_2^- обнаружено во многих типах клеток, включая нервные, эндотелиальные и иммунокомпетентные клетки.

Следует отметить, что пероксинитрит обладает высокой проницаемостью через биологические мембраны [42]. Коэффициент проницаемости пероксинитрита ($8,0 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$) близок к коэффициенту проницаемости воды и в 400 раз больше коэффициента проницаемости супероксида [43]. С учетом времени жизни пероксинитрита при физиологических условиях и его высокой проницаемости через клеточные мембраны предполагается, что дистанция диффузии пероксинитрита может составлять 5–6 клеточных диаметров [44].

Время жизни пероксинитрит-иона в растворе зависит от pH среды и достигает 116 дней при pH 14,0 [45]. При физиологических pH время полураспада для пероксинитрита составляет примерно 1 с [46]. В настоящее время в организме не обнаружено ферментативных систем, разлагающих пероксинитрит-ион. Уменьшение концентрации ONOO⁻ происходит в результате протекания реакций окисления биомолекул или разложения пероксинитрит-иона с образованием нитритов и нитратов [47].

В настоящее время показано, что в присутствии NO и O_2^- происходит нитрирование аминокислотных остатков тирозина в белках. Считается, что ONOO⁻ играет ключевую роль в данном процессе [48]. Пероксинитрит-ион может вступать в реакции окисления, протекающие по одноэлектронному или двухэлектронному механизму:



Аминокислотные остатки тирозина нитрируются с образованием 3-нитротирозина. Эта реакция катализируется ионами свободных металлов и металлсодержащими ферментами, такими как CuZnSOD и MnSOD [49]:



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

Диоксид углерода в физиологических концентрациях усиливает нитрирование биологических мишеней и ингибирует окисление, индуцируемое пероксинитритом [50, 51].

Пероксинитрит-ион не является свободным радикалом, однако считается одним из сильнейших окислителей, образующихся в живых системах. Пероксинитрит может служить источником свободных радикалов в биологических системах (рис. 1.4).

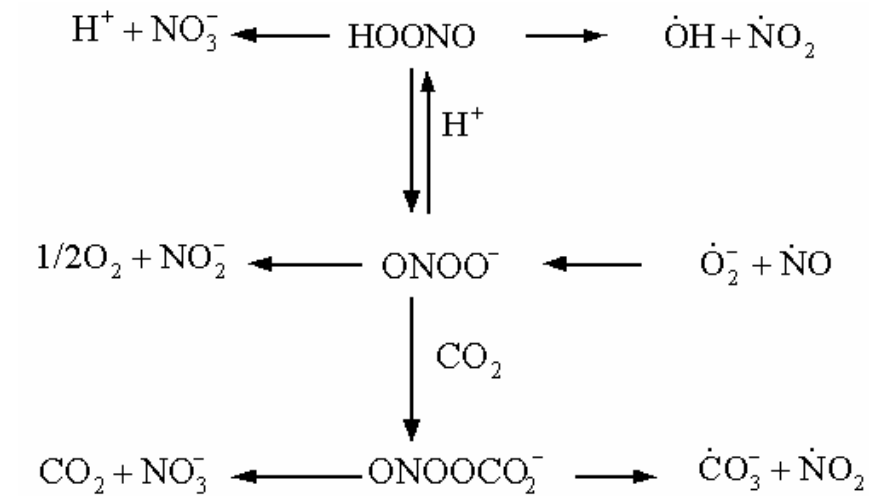


Рис. 1.4. Схема возможных реакций с участием пероксинитрита при физиологических условиях

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 и диоксид азота. Вместе

с тем в живых системах пероксинитрит может служить источником гидроксильных радикалов.

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 (МПО). Гипохлорит участвует в реакциях окисления и хлорирования биологических мишеней. Окисление тиолов протекает с наибольшей скоростью по сравнению с другими реакциями гипохлорита. Константа скорости реакции гипохлорита с глутатионом превышает $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ [52].

1.5. Антиокислительная система клеток

Организм человека обладает многоуровневой системой защиты от повреждающего действия окислителей. Существуют различные классификации компонентов антиокислительной системы (АОС). По молекулярному строению в составе АОС выделяют ферменты и органические соединения, не обладающие ферментативной активностью. По отношению к действию в водной или липидной фазе восстановители делят на полярные и неполярные (или водо- и жирорастворимые). По локализации действия относительно клеточных структур компоненты АОС разделяют на мембранные, внутриклеточные и внеклеточные.

Традиционно к ферментам АОС клеток относились только те ферменты, которые принимали непосредственное участие в утилизации окислителей, т. е. супероксиддисмутазы, пероксидазы и каталазы. Следует обратить внимание на то, что при восстановлении супероксиддисмутазой одного окислителя – супероксидного анион-радикала – образуется другой окислитель – пероксид водорода. При утилизации H_2O_2 миелопероксидазой образуется гипохлорид. Восстановление H_2O_2 глутатионпероксидазой увеличивает внутриклеточную концентрацию GSSG. В свою очередь, при восстановлении GSSG глутатионредуктазой увеличивается концентрация НАДФ⁺. Таким образом, в работе АОС клеток участвует целый комплекс ферментов, в который наряду с супероксиддисмутазой, каталазой и пероксидазой необходимо включать различные редуктазы (глутатионредуктазу, метионинсульфоксидредуктазу, диаскорбатредуктазу и т. д.).

Помимо ферментов к АОС относят ряд метаболитов клетки, включая липоевую, аскорбиновую и мочевую кислоты, семейство токоферола,

каротиноиды (около 500 соединений), флавоноиды и полифенолы (около 4000–5000 соединений), ураты и другие соединения. Следует отметить также антиокислительные свойства аминокислоты таурина, присутствующей в большинстве клеток эукариот и в жидких средах организма [53]. В настоящее время внимание исследователей привлекают антиокислительные свойства гистидинсодержащего дипептида карнозина, который способен нейтрализовать практически все активные формы кислорода [54]. Жирорастворимый продукт катаболизма гемсодержащих белков – билирубин также является эффективным антиокислителем при физиологических условиях [55]. Важным полифункциональным антиокислителем является мелатонин (N-ацетил-5-метокситриптамин) – индольный гормон эпифиза [56, 57].

Следует отметить, что отдельные элементы АОС в клетке действуют комплексно, часто усиливая эффекты друг друга. Представления об этих взаимодействиях и об АОС в целом в настоящее время окончательно не сформированы и постоянно расширяются. В кратком обзоре невозможно рассмотреть свойства и функции всех компонентов сложной АОС, поэтому рассмотрим только свойства и функции основных низкомолекулярных участников процессов редокс-регуляции в клетках, концентрации которых на несколько порядков превышают концентрации других антиокислителей. Ниже рассмотрены химические и биологические свойства таких низкомолекулярных антиокислителей, как глутатион, аскорбиновая кислота, пиридиннуклеотиды (НАДН и НАДФН) и мочева кислота.

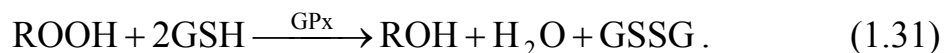
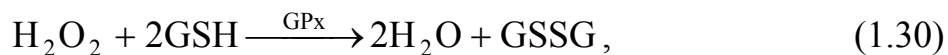
1.6. Низкомолекулярные антиокислители

Тиолсодержащие компоненты являются центральными участниками многих биохимических реакций. Однако следует отметить, что в большинстве случаев цистеины не вступают в прямые реакции с гидропероксидами при физиологических рН. Трипептид глутатион, содержащий глутаминовую кислоту, цистеин и глицин, является одним из основных участников внутриклеточных редокс-процессов. Концентрация глутатиона в клетках тканей людей, животных, растений и в аэробных бактериях достигает миллимолярных значений. Показано, что глутатион участвует в процессах антиокислительной защиты, метаболизма ксенобиотиков и эйкозаноидов, в регуляции клеточного цикла и генной экспрессии [58–61].

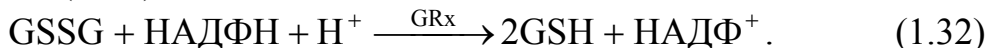
С участием тиольной группы цистеинового остатка глутатиона восстанавливаются многие окислители, образующиеся в организме, в том числе пероксид водорода и гидропероксиды липидов. Две молекулы вос-

становленной формы глутатиона (GSH) при окислении образуют глутатиондисульфид (GSSG) – окисленную форму глутатиона.

GSH является кофактором для глутатионпероксидазы (GPx) – фермента, катализирующего восстановление гидропероксидов до воды:



Восстановление глутатион-дисульфида происходит с помощью глутатионредуктазы (GRx):



Глутатион также является кофактором для таких антиоксидательных ферментов, как глутаредоксин, дисульфидизомераза и дегидроаскорбат-редуктаза [62–64]. Наряду с этим, восстановленный глутатион может вступать в прямые реакции с $\dot{\text{O}}\text{H}$, NO_3^- , ONOO^- и другими окислителями, выступая в роли антиоксидателя:



Константы скоростей реакций взаимодействия GSH с окислителями представлены в табл. 1.4.

Следует отметить, что ковалентная модификация белков, индуцированная присоединением GSH к цистеиновым остаткам белка (S-глутатиолирование), является важным регуляторным механизмом для многих ферментов, включая тирозинфосфатазы, глутаредоксины и тиоредоксины.

Наряду с глутатионом многие клетки содержат в миллимолярных концентрациях аскорбиновую кислоту. Аскорбиновая кислота является водорастворимым восстановителем, который синтезируется в растениях и некоторых животных из D-глюкозы или D-галактозы. Витамин С представляет собой γ -лактон 2,3-дегидрогулоновой кислоты. Организм человека не содержит фермент гулонолактонооксидазу, катализирующий последнюю стадию конверсии глюкозы в аскорбат, и полностью зависит от его поступления извне. Концентрация аскорбиновой кислоты в плазме крови человека достигает 0,1 мМ, внутриклеточная концентрация аскорбиновой кислоты зависит от типа клеток и изменяется в широком диапазоне (0,2–10 мМ) [65, 66].

В последние годы получен ряд новых данных о регуляторной функции аскорбиновой кислоты. Аскорбиновая кислота является кофактором восьми ферментов, выступая в качестве донора электронов в таких процессах, как гидроксигирование коллагена, биосинтез карнитина и норад-

ренина, метаболизм тирозина и аминирование гормонов [67–70]. Показана способность аскорбиновой кислоты вызывать дифференцировку эмбриональных стволовых клеток в кардиомиоциты [7]. Наряду с этим в экспериментах *in vitro* показано, что аскорбиновая кислота в миллимолярных концентрациях вызывает апоптоз клеток [71, 72].

Таблица 1.4

Константы скоростей реакций с участием основных низкомолекулярных клеточных антиоксидантов

Окислители	GSH ($M^{-1} c^{-1}$), (pH 7,4)	АК ($M^{-1} c^{-1}$), (pH 7,4)	НАДН ($M^{-1} c^{-1}$), (pH 7,4)	Витамин Е ($M^{-1} c^{-1}$), (pH 7,4)
$\dot{O}H$	$1,1 \times 10^{10}$	$1,1 \times 10^{10}$		
$R\dot{O}$		$1,6 \times 10^9$	$1,9 \times 10^8$ (pH 7,0)	
$R\dot{O}_2$		1×10^6	$2,4 \times 10^9$ (pH 7,0)	
HO_2/\dot{O}_2^-	$6,7 \times 10^5$ (pH 7,8)	1×10^5	$9,8 \times 10^4$	2×10^5 (pH 4,5)
$T\dot{O}$		2×10^5		
$U\dot{H}$		1×10^6		
$A\dot{K}$		2×10^5	1×10^4 (pH 7,0)	
$C\dot{O}_3$	$5,3 \times 10^6$ (pH 7,0)	$1,4 \times 10^9$ (pH 11,0)	7×10^8	
$G\dot{S}$		6×10^8 (pH 5,4)		
N_2O_3/N_2O_4		$1,2 \times 10^9$		
1O_2	$2,4 \times 10^6$	$8,3 \times 10^6$	$4-8 \times 10^7$	5×10^6
$ONOO^-$	$\sim 10^2$	235		
O_3	7×10^6 (pH 7,0)	$4,8 \times 10^8$ (pH 7,0)		$7,5 \times 10^5$ (pH 7,0)

При физиологических pH аскорбиновая кислота находится в среде в форме основания, которое выступает в качестве акцептора электронов. В качестве антиоксиданта аскорбат может отдавать 2 электрона на восстановление окислителей. После потери одного электрона образуется промежуточный радикал семидегидроаскорбат:



Радикал аскорбиновой кислоты дисмутирует с образованием дегидроаскорбиновой кислоты. Восстановление семидегидроаскорбата катализируется НАДН-семидегидроаскорбат-редуктазой [73-75]. Восстановление в клетках дегидроаскорбиновой кислоты происходит при участии глутатиона и ферментов дегидроаскорбат редуктазы, тиоредоксин редуктазы и глутаредоксина [76, 77].

Показано, что аскорбиновая кислота может усиливать окислительные реакции [78]. Скорость окисления аскорбиновой кислоты зависит от

pH и концентрации металлов. В присутствии кислорода окисление АК может происходить с образованием пероксида водорода [79]:



Пиридиннуклеотиды – никотинамидадениндинуклеотид (НАДН) и никотинамидадениндинуклеотид фосфат (НАДФН) – широко распространены в живой природе как коферменты дегидрогеназ.

НАДН состоит из 5'-АМФ и нуклеотида, содержащего в качестве основания амид никотиновой кислоты. Структурно (но не функционально) похожим коферментом является НАДФН, в котором 2'-ОН-группа рибозы аденина дополнительно связана с фосфатом. Несмотря на близкое структурное родство НАДН и НАДФН осуществляют различные функции в обмене веществ. НАДН передает восстановительный эквивалент из катаболического пути в дыхательную цепь и тем самым участвует в энергетическом обмене. НАДФН, напротив, является самым важным восстановителем в процессах биосинтеза.

В окислительно-восстановительных реакциях пиридиннуклеотидных коферментов участвует только никотинамидное кольцо. В окисленной форме кольцо имеет ароматический характер и несет положительный заряд. По этой причине кофермент в окисленном состоянии обозначают как НАД⁺. При окислении субстрата дегидрогеназа отщепляет от субстрата два атома водорода (2e⁻ и 2H⁺). Однако на НАД⁺ переносится только гидрид-ион (H⁻, 2e⁻ и H⁺). Акцептором гидрид-иона является атом углерода в пара-положении относительно атома азота никотинамидного кольца НАД⁺. При окислении или восстановлении никотинамидного кольца изменяются спектральные характеристики кофермента. Поэтому за реакцией можно легко следить с использованием спектрофотометрических методов. Второй протон высвобождается в среду.

Низкий восстановительный потенциал НАДФН указывает на то, что он является конечным восстановителем для окисленных форм других антиоксидантов. Свободнорадикальные формы тиолов, аскорбиновой и мочевой кислот, образующиеся при взаимодействии этих антиокислителей со свободными радикалами, могут восстанавливаться аскорбиновой кислотой, которая, в свою очередь, восстанавливается НАДФН или НАДН.

Наряду с этим НАДФН и НАДН могут также вступать в прямые неферментативные реакции с большинством окислителей [80]. НАДН является субстратом для ферментов, обеспечивающих такие модификации белков, как диацетилирование и моно- и поли-АДФ-рибозилирование [81–83]. Окисленные формы НАД⁺ и НАДФ⁺ являются предшественни-

ками синтеза двух Ca^{2+} -высвобождающих вторичных сигнальных молекул – цАДФР (сADPR) и НКАДФ (NAADP) [84, 85].

Низкомолекулярные неполярные антиокислители представлены также семейством токоферола (4 соединения токоферола – α -, β -, γ - и δ -токоферолы и 4 соединения токотриенолов), каротиноидами и убихинолом, восстановленной формой кофермента Q. В мембранах клеток млекопитающих основным восстановителем пероксильных радикалов липидов, образующихся при протекании процессов перекисного окисления, является α -токоферол или витамин E. В результате переноса атома водорода с витамина E на радикал образуется относительно стабильный хроманоксильный радикал ($\text{T}\dot{\text{O}}$):



Восстановление витамина E происходит в результате переноса восстановительных эквивалентов с аскорбата, а гидропероксид липида восстанавливается глутатионом с помощью глутатионпероксидазы.

Наряду с антиокислительными свойствами α -токоферол проявляет свойства ингибитора по отношению к протеинкиназе C [86]. Снижение активности протеинкиназы C в моноцитах, вызванное α -токоферолом, приводит к замедлению сборки НАДФН-оксидазы и снижает выход супероксидных анион-радикалов [87]. Показано, что α -токоферол активирует фосфолипазу A_2 [88].

1.7. Редокс-состояние клеток. Окислительный и восстановительный стресс

В настоящее время не вызывает сомнения факт образования различных АФК при нормальных физиологических условиях. В большинстве работ, посвященных изучению регуляторной и токсической роли АФК, термин «окислительный стресс» используется для обозначения «чрезмерного» образования АФК в клетке. Однако практически нигде в литературе не обсуждается величина «нормы» образующихся АФК.

В клетке постоянно протекают процессы и образования и утилизации АФК. В результате сопряженного функционирования систем генерации АФК и антиокислительной защиты, а также мембранных систем транспорта различных типов окислителей и восстановителей, в клетке устанавливается определенный окислительно-восстановительный баланс или редокс-состояние. Поддержание этого баланса является жизненно необходимым для как для отдельных клеток, так и для организма в целом. Параметры этого баланса, определяемые типом и концентрацией

различных АФК и антиоксидантов, для разных клеток и тканей организма значительно различаются.

При окислительном стрессе концентрация АФК повышается и может поддерживаться на новом уровне постоянно. Такое повышение концентрации АФК может быть вызвано активацией систем генерации АФК или снижением активности АОС.

АФК в высоких концентрациях играют важную роль в развитии старения и многих заболеваний человека, в том числе кардиомиопатии, атеросклероза, нейродегенеративных заболеваний, инфаркта и инсульта и многих других. В литературе описано свыше 200 заболеваний, при которых окислительный стресс наблюдается на начальных стадиях или имеет место в течение всего периода протекания заболевания.

Становится очевидным, что кратковременное повышение концентрации АФК может иметь различные сигнальные функции, как, например, индуцирование изменения концентрации несвязанных ионов кальция. Постоянно повышенный уровень внутриклеточной концентрации несвязанных ионов кальция может приводить к гибели клеток. С другой стороны, кратковременные скачки концентрации ионов кальция в цитоплазме выполняют сигнальную функцию и регулируют многие клеточные процессы. Следует отметить, что процессы изменения внутриклеточной концентрации свободных ионов кальция и концентрации АФК могут быть взаимосвязанными [89]. Тип функционального ответа клеток, опосредованного изменениями амплитуды и продолжительности внутриклеточного кальциевого сигнала, может кодироваться амплитудой и временным интервалом увеличения внутриклеточной концентрации окислителей.

В свою очередь, постоянно высокое значение концентрации восстановителей или восстановительный стресс также может иметь драматические последствия для жизнедеятельности клеток. Показано, что антиоксидант L-ацетилцистеин вызывает апоптоз гладкомышечных клеток мыши и человека [90]. В настоящее время получен ряд данных, указывающих на увеличение концентрации глутатиона в крови онкологических больных и в клетках опухолевой ткани [91–93]. Также показано повышение содержания аскорбиновой кислоты в раковых клетках [94].

Таким образом, функции окислителей и восстановителей в организме разнообразны и определяются их концентрацией. Весь набор окислителей и восстановителей формирует редокс-состояние клеток и тканей, для количественной характеристики которого необходимо введение определенных физико-химических параметров.

МЕХАНИЗМЫ ОБРАЗОВАНИЯ АФК В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

2.1. Дыхательная цепь митохондрий

Первичным свободным радикалом в большинстве биологических систем является супероксидный анион-радикал, основным источником которого в неактивированных клетках служат митохондрии. В организме человека, вес которого составляет 80 кг, за счет перехода электронов в митохондриальной электротранспортной цепи на кислород образуется 215–430 мМ супероксидных анион-радикалов в сутки [95]. Наряду с этим внешняя мембрана митохондрий содержит источник генерации H_2O_2 , не относящийся к дыхательной цепи, – фермент моноаминоксидазу, катализирующий окислительное деаминирование биогенных аминов [95]. Следует отметить, что скорость генерации H_2O_2 моноаминоксидазой при окислительном дезаминировании катехоламинов на 2 порядка выше, чем скорость генерации H_2O_2 электротранспортной цепью ($4,5 \times 10^{-5} \text{ M c}^{-1}$ и $2,8 \times 10^{-7} \text{ M c}^{-1}$ соответственно) [96].

Образование $\dot{\text{O}}_2^-$ обычно происходит в цепях переноса электронов в результате «утечки» электронов из промежуточных элементов цепи на кислород [97]. Показано, что генерация $\dot{\text{O}}_2^-$ в митохондриях происходит в двух комплексах электротранспортной цепи – НАДН-СoQ-редуктазе (комплекс I) и СoQH₂-цитохром-с-редуктазе (комплекс III) [97]. Семихиноны, генерируемые внутри комплекса I, идентифицированы как вероятные доноры электронов для молекулы кислорода. Точный механизм образования семихинонов в комплексе I до сих пор не обоснован.

Комплекс III принимает электроны от комплекса I и комплекса II и передает их цитохрому с. Выделяют 2 типа генерации семихинонов в комплексе III [98]. Убихинол отдает один электрон железосерному белку (место связывания для ингибитора – миксатиазола), образуя семихинон у наружной стороны внутренней мембраны; семихинон затем восстанавливает первый гем цитохрома b (b_I). Второй гем цитохрома b (b_{II}), расположенный ближе к поверхности мембраны со стороны матрикса, прини-

мает электрон от первого гема и восстанавливает убихинон до формы семиубихинона (место связывания для ингибитора – антимицина А). Антимицин и миксатиазол ингибируют транспорт электронов в комплексе III, но оказывают различное действие на процессы генерации супероксидных анион-радикалов.

Антимицин блокирует переход электрона от цитохрома b_{II} , вызывая увеличение выхода супероксида в комплексе III в десять раз [97]. Ингибирование миксатиазолом образования убисемихинонов с цитозольной стороны внутренней митохондриальной мембраны приводит к незначительному усилению генерации супероксида. Исследования последних лет указывают на то, что большая часть супероксида, генерируемая при физиологических условиях дыхательной цепью, образуется на внутренней мембране со стороны митохондриального матрикса [97]. При нормальных условиях уровень образующихся супероксидных анион-радикалов не высок и они не вызывают повреждений биомолекул, в основном, вследствие эффективного удаления супероксида ферментом Mn-супероксиддисмутазой (MnСОД), присутствующим в митохондриальном матриксе. Однако изменения условий функционирования клетки, вызванные рядом причин (применение некоторых медикаментов, при реперфузии тканей и т. п.), могут приводить к значительному увеличению скорости образования супероксида.

Скорость генерации H_2O_2 электрон-транспортной цепью при физиологических условиях зависит от метаболического состояния митохондрий и внутримитохондриальной концентрации $\dot{N}O$ [99]. Состояние 4 (классификация по Б. Чансу), связанное с относительно низкой скоростью дыхания и с отсутствием АДФ, характеризуется высокой скоростью образования \dot{O}_2^- и H_2O_2 . С другой стороны, при окислительном фосфорилировании в состоянии 3, характеризующимся высокой скоростью поглощения кислорода, скорость образования \dot{O}_2^- 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 мг белка и 0,05–0,15 нМ H_2O_2 /мин на мг белка в состоянии 3. Генерация АФК митохондриями модулируется окисью азота посредством обратимого связывания NO с гемовыми группами комплексов III и IV [101].

В последние годы интенсивно исследуется роль митохондрий в регуляции процессов пролиферации, дифференцировки и апоптоза. Изменение скорости генерации АФК митохондриями может выступать в качестве одного из механизмов переключения функциональной активности клеток.

2.2. НАДФН-оксидаза

Ферменты группы оксидоредуктаз, называемые оксидазами, обеспечивают перенос электронов от молекулы донора на молекулярный кислород. Генерация \dot{O}_2^- в клетке осуществляется с участием ряда ферментов, наиболее изученным из них является НАДФН оксидаза (ЕС 1.6.3.1) фагоцитов, которая в активированных нейтрофилах обеспечивает «дыхательный взрыв». НАДФН оксидаза катализирует одноэлектронное восстановление кислорода в реакции, в которой НАДФН используется как донор электронов:



Ферментативный комплекс НАДФН оксидаза – мультикомпонентный мембранный комплекс, обеспечивающий трансмембранный перенос электронов. Этот фермент состоит из двухсубъединичного интегрального белка – флавоцитохрома (цитохрома) b_{558} и водорастворимых регуляторных белковых субъединиц $p40^{phox}$ (phox от phagocyte oxidase), $p47^{phox}$, $p67^{phox}$, локализованных в цитоплазме (рис. 2.1). Цитохром представляет собой комплекс, состоящий из двух субъединиц – большого гликопротеина $gp91^{phox}$, известного как бета-субъединица и составляющего каталитическую часть НАДФН оксидазы фагоцитов, и малого белка $p22^{phox}$ (альфа-субъединица), локализованных в мембранах секреторных везикул (95 % суммарной активности фермента в клетке) и в меньшей степени в плазматической мембране фагоцитов. Гетеродимерный белок цитохром b_{558} содержит также ФАД и два гема.

В неактивированных клетках комплекс из трех субъединиц – $p40^{phox}$, $p47^{phox}$ и $p67^{phox}$ – находится в цитоплазме. При активации клетки, например, при фагоцитозе, адгезии клеток на подложку, при действии хемотоксинов, других стимулов происходит фосфорилирование субъединицы $p47^{phox}$ протеинкиназой С и цитозольный комплекс из водорастворимых субъединиц НАДФН оксидазы, перемещаясь из цитозоля к мембране, связывается с мембранным комплексом. Взаимодействие цитозольного комплекса с цитохромом сопровождается изменением конформационного состояния последнего, что необходимо для связывания НАДФН с цитозольной стороной мембраны. Электроны от НАДФН переносятся в комплексе через ФАД и гемовые группы на другую сторону мембраны (в фагосомы или на поверхность клетки) к молекулярному кислороду. Таким образом, образуется супероксид, который последовательно конвертируется в пероксид водорода и другие типы АФК.

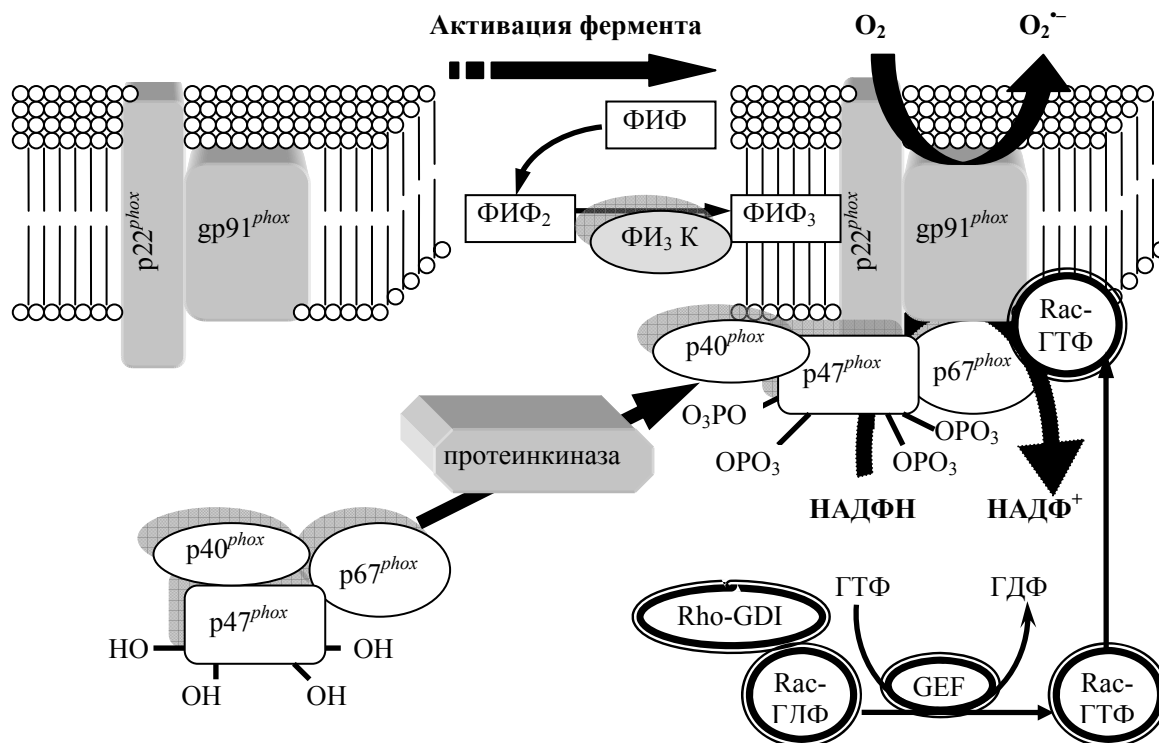


Рис. 2.1. Активация NOX-2 фагоцитов

Активация НАДФН оксидазы происходит с участием ГТФ-связывающих белков (ГТФазных белков): Rac1, Rac2 или Rap1A [102]. У нейтрофилов содержится Rac2, а у моноцитов – Rac1.

Сборка субъединиц НАДФН оксидазы с формированием активного фермента, то есть с активацией $gp91^{phox}$, обеспечивается, по крайней мере, тремя триггерными сигнальными системами. Эти триггерные системы включают белки, метаболизирующие липиды мембран, цитоплазматические протеинкиназы и нуклеотидобменные белки, которые активируют ГТФазу Rac (рис. 2.1). Протеинкиназы, включая протеинкиназу C и Akt [103], катализируют множественное фосфорилирование аминокислот в автоингибиторной области белка $p47^{phox}$, высвобождая в нем два SRC-гомологичных домена 3 (бис-SH3) – места связывания с мембранным белком $p22^{phox}$, что в итоге и позволяет белку $p47^{phox}$ связываться с содержащим богатую пролином последовательность карбоксильным окончанием этого мембранного белка. При этом прекращается также ингибирование домена с Phox-гомологией (домена PX) белка $p47^{phox}$, к которому при его связывании с мембранным белком $p22^{phox}$ присоединяются липиды, высвобождаемые ферментами в мембране при действии стимула. В частности, при связывании микроорганизмов или воспалительных медиаторов с цитохромом b_{558} фосфатидилинозитол 3-киназа и фосфолипаза D продуцируют соответственно 3-фосфорили-

фосфатидилинозитолы и фосфатидиловую кислоту – липиды, с которыми связываются РХ домены как $p47^{phox}$, так и $p40^{phox}$ [104, 105]. Так как $p47^{phox}$ связывается при этом не только с $p40^{phox}$, но и с $p67^{phox}$, то его называют белком-организатором.

Rac посттрансляционно модифицируется гидрофобной геранилгераниловой группой у карбоксильного окончания. В комплексе Rac-ГДФ эта группа маскируется ингибиторным белком RhoGDI – ингибитором диссоциации RhoГДФ, что и обеспечивает сохранение Rac в цитозоле (в виде комплекса Rac-ГДФ с RhoGDI). Активация фактора обмена гуаниннуклеотидами GEF запускает связывание ГТФ с Rac, индуцируя конформационные изменения последнего. Измененный Rac диссоциирует из комплекса с RhoGDI и ассоциирует с мембраной через геранилгераниллипиды. Конформационные изменения Rac обеспечивают его связывание также с трикодекапептидной областью белка $p67^{phox}$ [106, 107], а также с белком $gp91^{phox}$, способствуя в итоге формированию активного комплекса [108, 109].

В настоящее время показано, что у нефагоцитирующих клеток, включая фибробласты, эндотелий, клетки гладкой мышцы, хондроциты и нейроны и др., экспрессируются компоненты НАДФН оксидазной системы [110]. В кортикальных нейронах и астроцитах активация НАДФН оксидазы регулируется протеинкиназой С (PKC) при увеличении внутриклеточной концентрации ионов цинка [111]. Активация НАДФН оксидазы в нервных клетках может выступать сигналом к апоптозу клеток при протекании ряда заболеваний нервной системы [112].

У всех этих оксидаз (обозначаемых как NOX семейство оксидаз) супероксид генерирующие структуры являются гомологами $gp91^{phox}$ и имеют конкретные клеточные функции, связанные с врожденным иммунитетом, трансдукцией сигнала и модификацией экстраклеточного матрикса. NOX семейство оксидаз состоит из семи членов: NOX1 (НАДФН оксидаза 1), NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 и DUOX2 [113]. НАДФН оксидазы фагоцитов – это NOX2. NOX ферменты NOX1 – NOX4 содержат аминотерминальный, локализованный в мембране, гидрофобный домен, сформированный шестью трансмембранными α -спиралями. В этой области NOX белков находится пять консервативных остатков гистидина, четыре из которых обеспечивают места связывания для двух гемов. Гемы – железосодержащие простетические группы – способны подвергаться восстановлению и реокислению, то есть могут функционировать как переносчики электронов. Два гема локализованы в пределах монослоев липидного бислоя и вместе обеспечивают создание канала для прохождения электронов через мембрану. Часть карбоксиль-

ного окончания молекул свернута в отдельный цитоплазматический домен, содержащий места связывания для кофактора фермента флавинадениндинуклеотида и НАДФН. В каталитической оболочке NOX5 содержится в белок, подобный gp91^{phox}, а у аминокончания – кальций-связывающий домен. NOX ферменты катализируют НАДФН-зависимое восстановление кислорода с образованием супероксида, который дисмутирует с образованием пероксида водорода. Пероксид водорода является субстратом миелопероксидазы, не контактирующей с НАДФН оксидазой. Ферменты типа дуальных оксидаз – DUOX1 и DUOX2 – содержат в качестве структурной основы NOX5 с добавлением у аминокончания дополнительной трансмембранной α -спирали, к которой у внешней стороны мембраны добавлен домен, являющийся гомологом миелопероксидазы. Функции этого миелопероксидазоподобного домена DUOX заключаются в утилизации пероксида водорода у внешней поверхности клеток с генерацией более мощных, чем пероксид водорода, оксидантов, которые окисляют внеклеточные субстраты.

В последние годы ведется поиск гомологов других субъединиц НАДФН оксидаз. В эпителиальных клетках толстой кишки найдены гомолог p47^{phox} (обозначаемый NOXO1 – NOX organizer 1 и отличающийся от p47^{phox} отсутствием автоингибиторного домена) и гомолог p67^{phox} (NOXA1 – NOX activator 1 и отличающийся от p67^{phox} отсутствием одного из двух SH3 доменов).

Сборка НАДФН оксидазного комплекса регулируется большим количеством внутренних и внешних стимулов. Например, на уровне рецепторов роль активаторов фермента играют интегрины и TLR (toll-like receptors): так, связывание β 2 интегринна с иммобилизованными лигандами на поверхности фагоцита вызывает явление клеточного «праймирования» – своего рода преактивацию клетки, которая ведет к усилению ответа на последующие активирующие сигналы (лиганды Fc рецептора, хемокины, фрагменты комплемента). TLRs на поверхности клетки или фагосомальной мембраны могут «чувствовать» микроорганизмы и регулировать глубину клеточной активации, необходимую для эффективной, но не чрезмерной защитной реакции.

Генерация АФК в фагосомах необходима для уничтожения различных типов микроорганизмов. Установлено, что синтез супероксида при активации оксидазы приводит к деполяризации мембран (в том числе фагосомальных мембран), что сопровождается индуцированным компенсаторным входом ионов калия и водорода в фаголизосомы [114]. Увеличение ионной силы в этих структурах ведет к высвобождению микробицидных протеаз из анионного протеогликанного матрикса, с ко-

торым эти ферменты связаны. Протеолитическое расщепление структурных компонентов микроорганизмов ведет к их гибели. Таким образом, разрушение патогенов при активации НАДРН оксидазы происходит в результате окислительных (окисление липидов, белков и нуклеиновых кислот, углеводов) и протеолитических процессов.

Высвобождаемые АФК во внеклеточную среду также функциональны: они активируют металлопротеиназы, выходящие из фагоцитов, и инактивируют ингибиторы серинпротеиназ 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.

Трансмембранный перенос электронов, осуществляемый НАДФН-оксидазой, приводит к повышению концентрации акцепторов электронов снаружи клетки или внутри фагосом. При этом скорость генерации супероксидного анион-радикала внутри фагосом может достигать 5–10 мМ/с [115]. В фагоцитах скорость генерации АФК на два порядка выше скорости генерации в остальных типах клеток.

2.3. NO-синтаза

В настоящее время показано, что генерация \dot{O}_2^- может осуществляться NO-синтазами (NOS, EC 1.14.13.39). NO-синтазы подразделяются на две принципиально различающиеся формы – конститутивные (cNOS), постоянно экспрессируемые клетками и активирующиеся, как правило, при высоком содержании комплекса Ca^{2+} /кальмодулин (Ca^{2+}/CaM), и индуцибельные (iNOS), экспрессируемые в клетках под влиянием цитокинов и некоторых других лигандов и не претерпевающие посттрансляционной модификации (в частности, их активность обычно не зависит от уровня Ca^{2+}/CaM) [116].

Конститутивные формы фермента постоянно продуцируют умеренные количества окиси азота. Индуцибельные формы NO-синтазы проявляют свою активность через 4–8 часов (время, необходимое для синтеза фермента) после внешнего воздействия на клетки и продуцируют наномолярные концентрации NO, что в 100–1000 раз выше количества окиси азота, продуцируемого cNOS [117]. Поскольку высокие концентрации окиси азота являются токсичными для клеток, эта форма фермента считается «патофизиологической» в отличие от конститутивной [118].

Выделяют три основные изоформы NOS (нейрональную – nNOS, индуцибельную – iNOS и эндотелиальную – eNOS), различающиеся ло-

кализацией 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.

Каталитически активная NO-синтаза представляет собой гомодимер, состоящий из гемопротеинов. Молекулярный вес каждого мономера колеблется от 110кДа до 160кДа в зависимости от изоформы [119]. Между тем всем формам NO-синтаз присуща высокая степень гомологичности их аминокислотной последовательности и необходимость в одних и тех же кофакторах и простетических группах: НАДФН, ФАД, ФМН, H_4B , железо-протопорфирин IX (наличие этой гемовой группы лежит в основе сходства с мембранным ферментом цитохром с-оксидазой), так же как и в связи с Ca^{2+}/CaM [120].

Каждый мономер NO-синтазы содержит домен оксигеназы – со стороны пептидного окончания, содержащего аминокислотную группу, 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, тетрагидроптерин, L-аргинин и O_2 . Электроны переходят от НАДФН через ФМН и ФАД к домену оксигеназы [119]. Перенос электронов от ФМН к гему происходит между доменом оксигеназы и доменом редуктазы, локализованными в разных субъединицах [121].

При отсутствии L-аргинина NO-синтаза способна генерировать супероксидный анион-радикал. Количество генерируемого \dot{O}_2^- и механизм генерации определяется типом NO-синтазы. Образование \dot{O}_2^- ферментом iNOS происходит в основном рядом с флавин-связывающим участком в домене редуктазы [122], в то время как генерация \dot{O}_2^- в nNOS и eNOS происходит в домене оксигеназы [123, 124]. Обнаружено, что в домене редуктазы нейрональной NO-синтазы также происходит образование \dot{O}_2^- [125].

Для образования \dot{O}_2^- нейрональной NO-синтазой необходимо, чтобы гемовая группа не связывала L-аргинин [124]. С другой стороны, процесс образования \dot{O}_2^- в индуцибельной NO-синтазе происходит в присутствии больших концентраций L-аргинина [122]. Это указывает на то, что процессы образования \dot{O}_2^- и NO ферментом могут протекать одновременно.

Исследования в модельных системах с использованием эндотелиальной NO-синтазы показали, что генерация \dot{O}_2^- зависит от присутствия Ca^{2+}/CaM комплекса [123]. Образование \dot{O}_2^- эндотелиальной и нейрональной NO-синтазами определяется в большей степени не концентрацией субстрата L-аргинина, а концентрацией кофактора H_4B [123]. Показано, что L-аргинин контролирует образование супероксида в результате уменьшения скорости окисления НАДФН, тогда как тетрагидроптерин контролирует образование супероксида, увеличивая формирование гем-пероксильных метаболитов [125].

В процессе NOS-индуцированного образования АФК L-аргинин и тетрагидроптерин связываются с птерин-свободной nNOS, индуцируя переход гемового железа из низкоспинового состояния $Fe(III)_{H/L}$ в высокоспиновое $Fe(III)_H$ (рис. 2.2 (1)). Это способствует восстановлению трехвалентного железа ($[Fe(III)_H]^{3+}$) до двухвалентного ($[Fe(II)]^{2+}$) (рис. 2.2 (2)). Кислород связывается с двухвалентным железом в геме, образуя комплекс $[Fe(II)O_2]^{2+}$ (рис. 2.2 (3)). Этот комплекс является «изоэлектрическим» с комплексом $[Fe(III)\dot{O}_2^-]^{2+}$. При отсутствии H_4B и L-аргинина комплекс $[Fe(III)\dot{O}_2^-]^{2+}$ диссоциирует с образованием супероксида (рис. 2.2 (5)). Механизм влияния H_4B на образование супероксида, возможно, опосредован увеличением скорости разложения комплекса $[Fe(III)\dot{O}_2^-]^{2+}$ с образованием железопероксильного комплекса $[Fe(III)^-OON]^{2+}$ (рис. 2.2 (6)). [125]. Диссоциация $[Fe(III)^-OON]^{2+}$ может происходить с образованием пероксида водорода, что указывает на существование двух возможных механизмов образования H_2O_2 ферментом nNOS в зависимости от концентрации H_4B . Показано, что L-аргинин контролирует образование супероксида в результате уменьшения скорости окисления НАДФН, тогда как тетрагидроптерин контролирует образование супероксида, увеличивая формирование гем-пероксильных метаболитов [125]. В присутствии как тетрагидроптерина, так и L-аргинина будет происходить образование оксоферрилов (рис. 2.2 (7)), что способствует окислению L-аргинина с образованием N-гидрокси-L-аргинина (рис. 2.2 (9)).

В настоящее время выделяют также митохондриальную NO-синтазу (mtNOS), локализованную в матриксе митохондрий [126, 127]. Скорость генерации окиси азота mtNOS зависит от метаболического состояния митохондрий. В состоянии 3 скорость генерации \dot{NO} (0,37 нМ \dot{NO} /мин на

мг белка) на 40 % ниже, чем в состоянии 4 (0,62 нМ $\dot{\text{N}}\text{O}$ /мин на мг белка) [128].

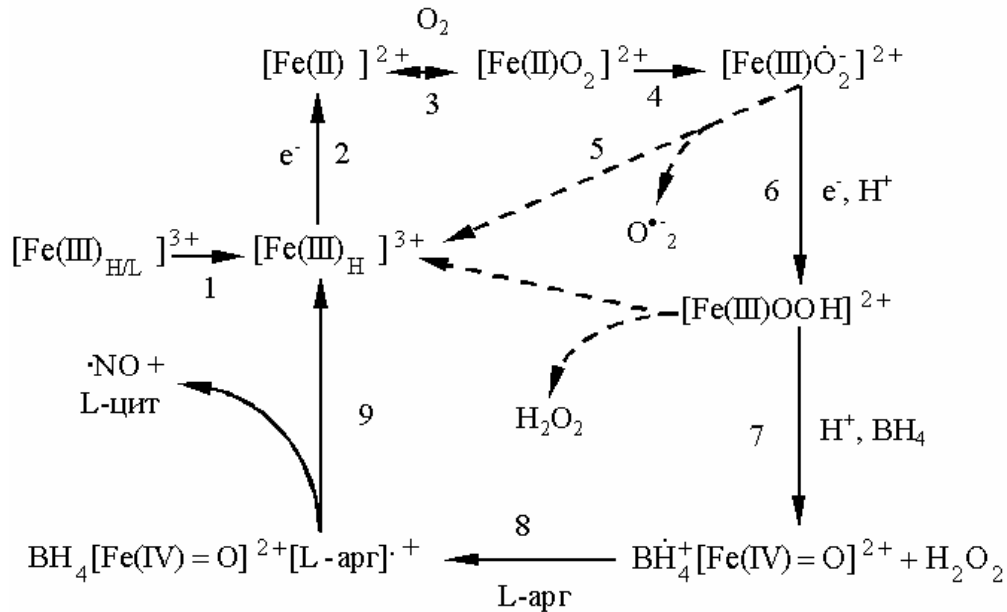


Рис. 2.2. Механизм NOS-опосредованного образования АФК

Одновременное образование $\dot{\text{O}}_2^-$ и $\dot{\text{N}}\text{O}$ в клетке приводит к формированию цитотоксичного иона пероксинитрита (ONOO^-). Предполагается, что фермент NOS может играть роль ONOO^- -синтазы в клетке [129]. Таким образом, из данных литературы следует, что в зависимости от концентрации ряда кофакторов NO -синтаза потенциально способна к образованию таких продуктов, как $\dot{\text{O}}_2^-$, $\dot{\text{N}}\text{O}$ и ONOO^- .

2.4. Миелопероксидаза

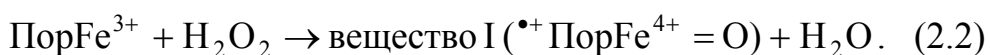
Миелопероксидаза (МПО, пероксид водорода оксидоредуктаза, ЕС 1.11.1.7) принадлежит к суперсемейству пероксидаз и на 68,9 % гомологична остальным членам суперсемейства [130]. МПО имеет молекулярный вес 144 кДа и состоит из 2 одинаковых димеров, связанных дисульфидными мостиками [131]. Каждый димер содержит легкую и тяжелую субъединицу, в последней находится гем: протопорфирин IX с ионом железа в центре. Строение и функции обоих димеров одинаково. Отличительная особенность МПО в сравнении с другими гемовыми белками состоит в том, что гемы димеров фермента связаны с апоферментом не двумя, а тремя связями: двумя эфирными связями и одной сульфониевой ионной связью [132]. В нейтрофилах МПО составляет 5 % общего веса

всех белков, в моноцитах миелопероксидазы в несколько раз меньше. Миелопероксидаза, как и NO-синтаза, локализована в пероксисомах.

Миелопероксидаза является главным 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. 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 [133]. Схема основных реакций миелопероксидазы (2.2–2.6) представлена на рис. 2.3. [134]. Пор означает протопорфирин IX, ПорFe³⁺ и ПорFe²⁺ – ферри- и ферроформы фермента, RH – субстрат миелопероксидазы, например тирозин, окисляющийся в двух одноэлектронных стадиях до \dot{R} и до R⁺.

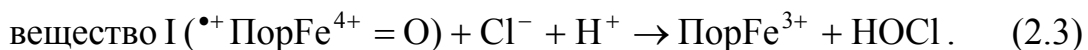
В нативном состоянии гемовое железо находится в ферриформе. При взаимодействии фермента с пероксидом водорода образуются активированные состояния фермента, называемые вещество I и вещество II, а при реакции вещества II с \dot{O}_2^- – вещество III, которое вовлекается в реакции гидроксирования ароматических соединений.

Пероксид водорода, как и различные органические пероксиды, восстанавливается нативным ферментом с образованием воды и вещества I (2.2).



В геме вещества I находятся железо в феррильном состоянии и порфирил-радикал, то есть это вещество может рассматриваться как феррильный катионный π -радикал с железом, связанным двойной связью с атомом кислорода [135].

Синтез гипохлорной кислоты происходит с участием мощного оксиданта – вещества I и ионов H⁺ и Cl⁻ (2.3):



Таким образом, синтез HOCl обеспечивается в цикле реакций (2.2) и (2.3) (цикл окисления – хлорирования, назовем его циклом А).

Миелопероксидаза действует так же, как и классическая пероксидаза, участвуя в окислении множества субстратов с образованием свобод-

норадикальных интермедиатов (реакции 2.4 и 2.5, составляющие цикл реакций Б – цикл окисления):

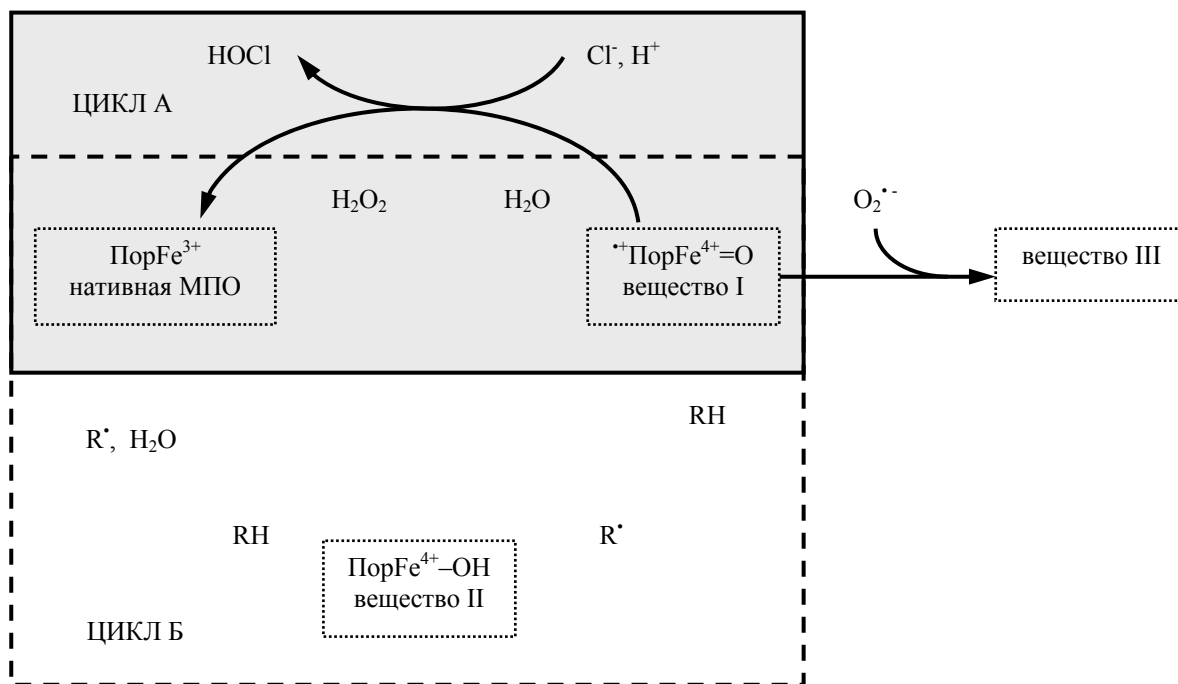
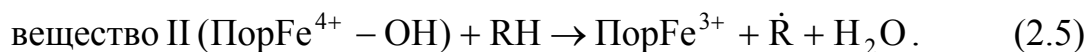
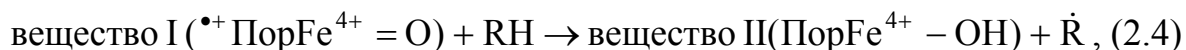
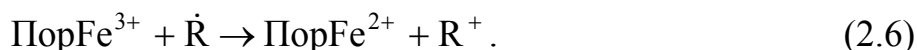


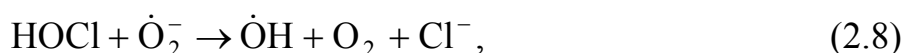
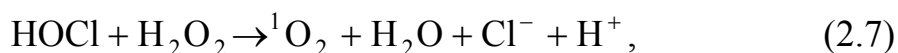
Рис. 2.3. Схема основных реакций миелопероксидазы

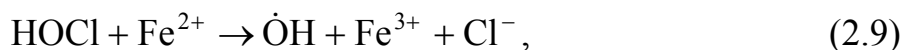
Вещество I восстанавливается к нативному состоянию МПО через две одноэлектронные стадии с формированием интермедиата – вещества II. Нативный фермент может реагировать также и с образующимся радикалом $\dot{\text{R}}$ (реакция 2.6):



Среди наиболее изученных реакций МПО – реакции фермента в ферриформе с монооксидом азота и супероксидом, фермента в форме вещества 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 (реакции 2.7–2.10):





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.

Стандартный редокс-потенциал редокс-пары вещество I/нативная МПО при pH 7,0 равен 1,16 В [136], а редокс-пары вещество II/нативная МПО – 0,97 В [137]. Следовательно, стандартный редокс-потенциал пары вещество I/вещество II составляет 1,35 В, то есть является одним из наиболее высоких по величине редокс-потенциалов веществ, присутствующих в клетках. Иными словами, МПО способна окислять различные биологические молекулы с высокой скоростью.

2.5. Ксантиноксидаза

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. У высших животных ксантиноксидоредуктаза содержится в основном в печени и кишечнике. Наиболее изученным типом ксантиноксидоредуктазы является фермент, выделенный из коровьего молока [138]. Ксантиноксидоредуктаза представляет собой гомодимер с молекулярным весом около 300 кДа, каждая субъединица которого содержит 4 редокс-центра: простетическую группу, содержащую молибден, простетическую группу, содержащую ФАД, и 2 неидентичных железо-серных редокс-центра [139].

При нормальных условиях ксантин в клетке под действием ксантиндегидрогеназы превращается в гипоксантин, а затем в мочевую кислоту. Мочевая кислота является одним из антиоксидантов, вследствие этого данный фермент можно рассматривать как один из ферментов АОС. В условиях окислительного стресса происходит модификация функциональной формы фермента – ксантиндегидрогеназа превращается в ксантиноксидазу. Реакции последнего фермента с ксантином протекают по измененной схеме: в реакции участвует кислород и дополнительным ее

продуктом является супероксидный анион-радикал. Таким образом, при переходе от дегидрогеназной формы к оксидазной фермент вместо антиокислительной начинает выполнять прооксидантную функцию.

В норме в печени содержится преимущественно дегидрогеназная форма фермента (D-форма), а оксидазная форма (O-форма) составляет около 9–20 % от суммарной концентрации фермента [140, 141]. Дегидрогеназной формой восстанавливается НАД⁺, а оксидазной – кислород. Существует также промежуточная или смешанная D/O-форма, в которой используется в качестве субстратов НАД⁺ и O₂ [142]. 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 O-форму. При восстановлении SH-групп происходит обратный переход. Сульфгидрильные реагенты вызывают обратимые переходы между D- и O-формами, тогда как протеолитическая модификация фермента, связанная с действием кислых протеаз, вызывает необратимый переход фермента в O-форму [143, 144].

Следует отметить, что ксантиноксидоредуктаза также может катализировать восстановление нитритов и нитратов с образованием NO [145, 146]. Одновременное образование ферментом окиси азота и супероксидного анион-радикала ведет к образованию пероксинитрит-иона. Исследования показали, что катализируемая генерация пероксинитрита протекает с различной скоростью для разных форм фермента [147].

Генерация пероксинитрита ферментом зависит от концентрации кислорода. Для ксантиноксидазы максимальная скорость генерации пероксинитрита наблюдается в присутствии 1 %-ной концентрации O₂, дальнейший рост концентрации кислорода приводит к снижению скорости генерации ONOO⁻. С другой стороны, генерация пероксинитрита ксантиндегидрогеназой достигает максимальной скорости при 10 %-ой концентрации O₂ и поддерживается постоянной при дальнейшем росте концентрации кислорода.

Таким образом, ксантиноксидаза вносит существенный вклад в генерацию АФК в клетке, причем скорость генерации зависит от физиологических условий и изменяется в процессе функционирования клеток.

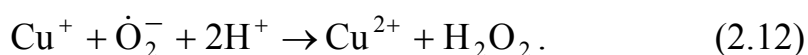
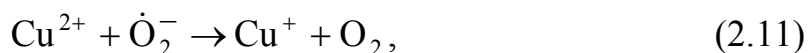
2.6. Супероксиддисмутаза

Образование \dot{O}_2^- в любой биологической или модельной системе сопровождается образованием H₂O₂ в результате реакции дисмутации \dot{O}_2^- . В присутствии супероксиддисмутазы (СОД, ЕС 1.15.1.1) скорость дис-

мутации супероксидных анион-радикалов приближается к диффузионной. СОД относится к антиокислительным ферментам и участвует в детоксикации супероксидных анион-радикалов. С другой стороны, СОД – один из ферментов, катализирующих образование пероксида водорода. Скорость этой реакции более чем в 10 000 раз выше скорости спонтанной дисмутации \dot{O}_2^- при физиологических условиях.

Супероксиддисмутаза была открыта Дж. Мак-Кордам и И. Фридовичем, которые показали, что белок эритрокупреин катализирует превращение супероксидных радикалов в пероксид водорода [148].

Супероксиддисмутаза клеток высших животных и человека состоит из двух субъединиц, содержащих один атом меди и один атом цинка, и обозначается как Cu,Zn-СОД. Она представляет собой встречающийся во всех клетках эукариот димер с молекулярной массой 32 кДа. Считается, что атом меди обеспечивает каталитическую активность фермента, а атом цинка придает ему стабильность. Каталитическая реакция протекает в два этапа. На первой стадии происходит восстановление иона меди супероксидом, на втором – окисление:



Cu,Zn-СОД у человека и животных – преимущественно внутриклеточный фермент. Только небольшие количества фермента присутствуют в плазме крови и цереброспинальной жидкости. В клетках Cu,Zn-СОД преимущественно локализована в цитозоле и в межмембранном пространстве митохондрий [149].

Кроме Cu,Zn-СОД существует супероксиддисмутаза, содержащая ион марганца (Mn-СОД). Mn-СОД обнаружена как у прокариот, так и у эукариот. У высших животных Mn-СОД присутствует в цитозольной фракции печени и матриксе митохондрий. Кроме того, описана железосодержащая форма СОД, которая имеется у прокариот и содержится в растительных клетках [150].

Образование супероксидного радикала и других АФК происходит в ферментативных реакциях с участием ряда других ферментов, среди которых моно- и диаминооксидазы, альдегидоксидаза, уратоксидаза, L-гулонолактонооксидаза, D-галактозооксидаза, циклооксигеназа, липоксигеназа, НАДФН-цитохром P450-редуктаза и др. Источниками АФК в организме могут быть также процессы аутоокисления таких биомолекул, как аскорбиновая кислота, биогенные амины, восстановленный глутатион, фенольные соединения, катехоламины, флавины, тетрагидроптерины

и др. К основным экзогенным факторам, индуцирующим образование АФК в организме, относят ионизирующую радиацию, ультрафиолетовое излучение, табачный дым, компоненты смога, нитрозоамины, пищевые консерванты, пестициды и ряд других химических веществ. Рассмотреть механизмы образования АФК эндогенными и экзогенными источниками в коротком обзоре не представляется возможным. На основании многочисленных данных можно заключить, что образование АФК в организме осуществляется в результате протекания многочисленных ферментативных и неферментативных процессов.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ РЕДОКС-МОЛЕКУЛ С ОСНОВНЫМИ КЛАССАМИ ВЕЩЕСТВ В КЛЕТКЕ

3.1. Перекисное окисление липидов

Регуляторное и повреждающее действие редокс-молекул реализуется через их взаимодействие с такими биомолекулами, как липиды, белки и ДНК. Редокс-молекулы являются инициаторами перекисного окисления липидов (ПОЛ), окисления белков и ДНК, S-глутатиолирования и нитрозилирования белков.

Под перекисным окислением липидов традиционно понимают свободнорадикальное окисление полиненасыщенных жирных кислот в биологических системах. ПОЛ является одним из основных процессов повреждения биологических мембран и происходит при многих патологических процессах [151]. Процесс ПОЛ протекает в три стадии: инициирования, развития и обрыва. Инициирование первой цепочки последовательного окисления полиненасыщенных жирных кислот мембранных липидов происходит в результате взаимодействия кислоты со свободными радикалами, способными отщепить атом водорода от метиленовой группы ($-\text{CH}_2-$). К свободнорадикальным молекулам, способным инициировать ПОЛ, относятся $\dot{\text{O}}\text{H}$, $\text{H}\dot{\text{O}}_2$, $\text{R}\dot{\text{O}}$ и $\text{R}\dot{\text{O}}_2$, но не $\dot{\text{O}}_2^-$ или $\text{N}\dot{\text{O}}$ [152]. Взаимодействие свободных радикалов с липидами приводит к появлению липидных радикалов, которые в присутствии кислорода образуют пероксидные радикалы:



Перроксидные радикалы иницируют отрыв атома водорода в α -положении атома углерода по отношению к двойной связи у полиненасыщенных жирных кислот, входящих в состав фосфолипидов:



Развитие процессов перекисного окисления липидов схематически представлено на рис. 3.1. Считается, что образование пероксидов липидов осуществляется двумя путями: неферментативным и ферментатив-

ным. Под ферментативным ПОЛ понимают генерацию липидных пероксидов в активном центре фермента. Образующиеся при этом гидропероксиды и эндпероксиды являются стереоспецифическими и выполняют важные биологические функции. Особенности протекания цепного неферментативного окисления в биологических мембранах заключается в том, что оно практически не происходит в отсутствие металлов переменной валентности, в частности ионов железа [151].

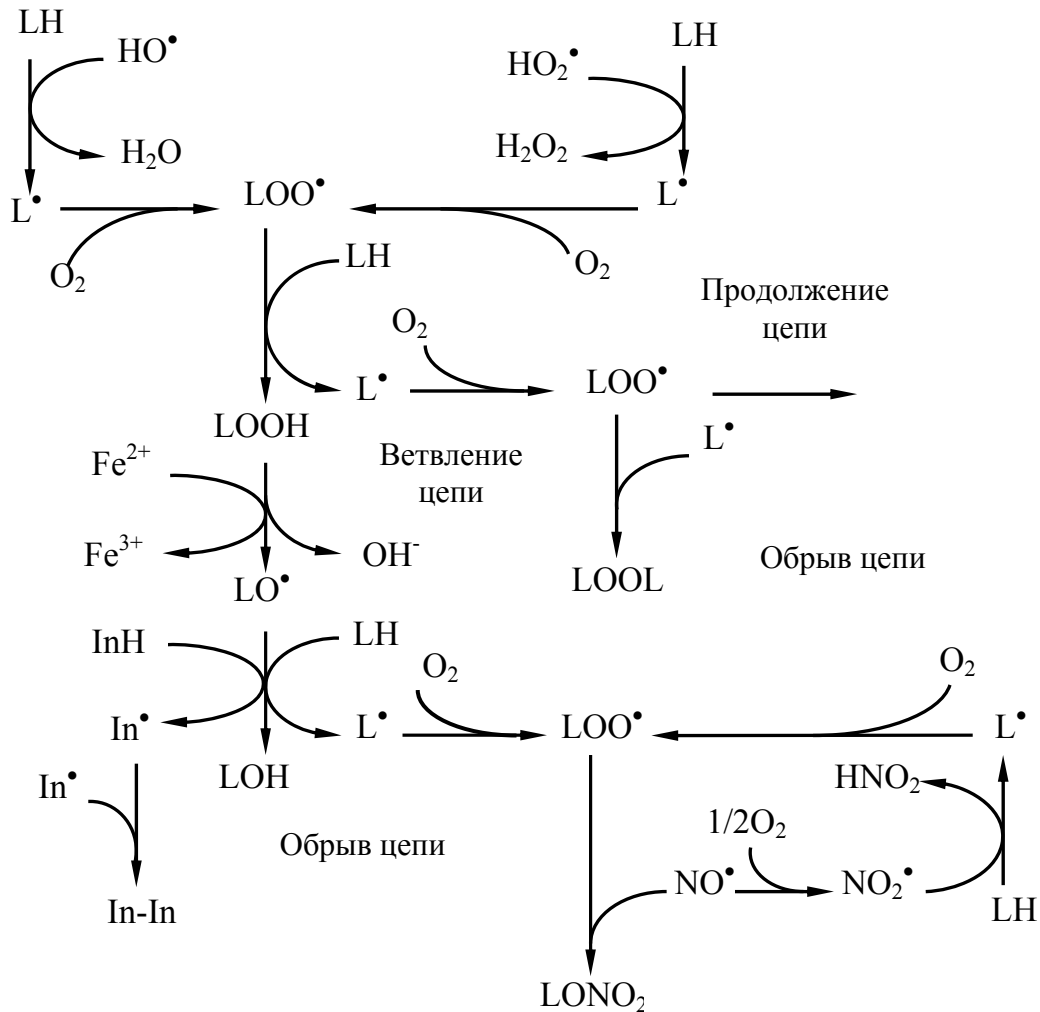
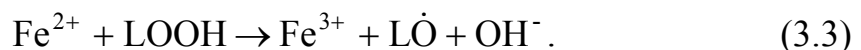


Рис. 3.1. Участие редокс-молекул в процессах цепного перекисного окисления фосфолипидов

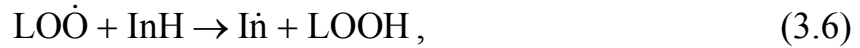
Основная реакция, которая определяет участие железа в активации перекисного окисления липидов, – это реакция разложения гидропероксидов, которая приводит к ветвлению цепи:



Радикал $\dot{L}O$ вступает в дальнейшие реакции цепного окисления:



Обрыв цепи происходит в результате взаимодействия свободных радикалов с антиоксидантами (InH), ионами металлов переменной валентности или друг с другом:



Обнаружено, что процессы перекисного окисления липидов ингибируются $\text{N}\dot{\text{O}}$ [153]. В реакции обрыва цепи перекисного окисления липидов в результате взаимодействия $\text{N}\dot{\text{O}}$ и $\text{LO}\dot{\text{O}}$ происходит образование органического нитрата – LONO_2 [153, 154]. При гидролизе LONO_2 образуются нерадикальные продукты: липидный алкоксид и нитрит-ион [155]. Способность окиси азота ингибировать процесс перекисного окисления в 10^4 – 10^5 раз выше, чем у α -токоферола [154].

Помимо гидропероксидов ненасыщенных жирных кислот, продукты ПОЛ включают также вторичные соединения, образующиеся при биотрансформации пероксидов. Среди продуктов ПОЛ обнаружены альдегиды, наиболее распространенным из которых является малоновый альдегид. К числу конечных продуктов ПОЛ также следует отнести продукты полимеризации липидов – флуоресцирующие Шиффовы основания, а также пигменты, накапливающиеся в жировой ткани по мере старения организма [156].

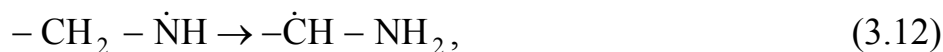
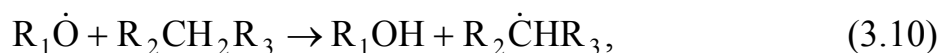
В норме образование пероксидов липидов происходит лишь в количествах, необходимых для жизнедеятельности организма. При физиологических условиях ПОЛ протекает при обновлении биологических мембран, регуляции активности мембраносвязанных ферментов и в других физиологических процессах. Пероксиды жирных кислот образуются при синтезе простагландинов с участием циклооксигеназы. При этом арахидоновая кислота превращается в соответствующий гидропероксид, получивший название простагландин G. При интенсивном действии химических и физических факторов свойственные физиологическим условиям процессы ПОЛ многократно усиливаются и при недостатке антиоксидантов в организме развивается окислительный стресс. При этом усиление перекисного окисления липидов приводит к развитию патологических процессов.

3.2. Окисление белков

Основным радикалом, вызывающим окислительные модификации белков, является гидроксильный радикал [157]. Реакции, инициируемые этим радикалом, приводят к образованию межбелковых сшивок и разрыву полипептидной цепи [158].

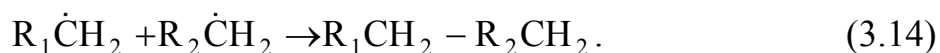
В результате реакций $\dot{\text{O}}\text{H}$ с молекулой белка в полипептидной цепи образуются углеродцентрированные радикалы. Взаимодействие молекулы $\dot{\text{O}}\text{H}$ с полипептидной цепью приводит к отрыву водорода от C–H-связей или присоединению радикала к ароматическому кольцу.

Углеродцентрированные радикалы могут также образовываться в результате вторичных реакций алкоксильных (3.9, 3.10), пероксильных (3.11), азотцентрированных радикалов (3.12) или в результате декарбок-силирования карбоксильной группы (3.13):



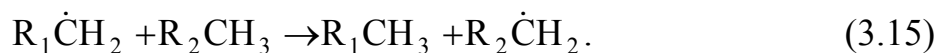
В присутствии кислорода углеродцентрированные радикалы вступают в реакции образования пероксильных радикалов, которые в результате цепи последовательных реакций могут приводить к образованию гидропероксидов, алкоксильных радикалов и гидроксильных белковых производных (или спиртов).

В отсутствие кислорода углеродцентрированные радикалы могут вступать в реакции друг с другом, образуя межбелковые связи (3.14):



Реакции углеродцентрированных радикалов с кислородом протекают со скоростями, близкими к диффузионно-контролируемому пределу ($k \approx (10^9 - 10^{10}) \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$), тогда как димеризация радикалов является более медленным процессом, скорость которого во многом определяется структурными особенностями белковой молекулы [159].

Углеродцентрированные радикалы способны отрывать атомы водорода от соответствующих доноров (3.15):



Этот тип радикальных процессов может быть доминирующим в белковых молекулах, когда концентрация кислорода в среде низкая и димеризация радикалов ограничена стереоскопическими факторами.

Реакции отрыва атома водорода протекают предпочтительнее с мишенями, содержащими слабые X-H связи, например, с тиолами (3.16):

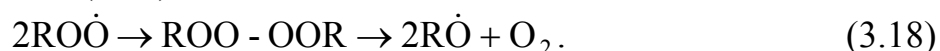


Как упоминалось выше, углеродцентрированные радикалы вступают в реакцию с кислородом с образованием пероксильных радикалов (3.17):



Пероксильные радикалы могут генерироваться в отсутствие кислорода при разложении гидропероксидов, катализируемого ионами металлов переменной валентности.

В результате протекания ряда химических реакций, в которые могут вступать пероксильные радикалы, образуются альдегиды, спирты и гидропероксиды. Пероксильные радикалы могут вступать в реакции димеризации с другими пероксильными радикалами с образованием алкоксильных радикалов (3.18).



Алкоксильные радикалы образуются также при одноэлектронном восстановлении алкилгидроперексидов. Генерация алкоксильных радикалов служит начальным этапом разрыва полипептидной цепи [160].

В настоящее время показано, что первоначальное образование радикалов полипептидной цепи в результате протекания реакций переноса электрона заканчивается окислением цистеиновых групп [159].

Вместе с тем установлено, что определенные аминокислотные остатки являются более чувствительными к необратимым окислительным повреждениям [161]. Эта чувствительность зависит от конформации домена, в котором они находятся [162].

Первичными мишенями окисления активными формами кислорода и азота являются серосодержащие аминокислоты цистеин и метионин [160]. При окислении цистеиновых остатков образуются дисульфиды, а при окислении метиониновых остатков образуется метионинсульфоксид (MeSOX). Большинство биологических систем содержат дисульфидредуктазу и метионинсульфоксидредуктазу, которые восстанавливают окисленные формы цистеина и метионина. Циклические переходы между окисленной и восстановленной формами цистеиновых и метиониновых остатков могут служить механизмом редокс-регуляции процессов

внутриклеточной трансдукции сигнала. Подробнее механизмы такой регуляции будут рассмотрены в гл. 6.

SH-группы цистеина, входящего в состав белков, являются главной мишенью действия H_2O_2 . Следует обратить внимание на то, что H_2O_2 вступает в реакции в основном с депротонированными цистеинами в форме тиолата ($-S^-$). Для большинства цистеинов 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 окисленном состоянии [163]. Тирозинфосфатазы содержат подобные «реакционные» цистеины в активном центре [164].

Механизм переходной активации тирозинфосфатаз основывается на окислении реакционных цистеинов до формы сульфениковой кислоты (R-SOH). В этой форме активность фосфатаз значительно снижена или полностью отсутствует [165]. Восстановление сульфениковой кислоты может происходить через образование дисульфидных связей между SH-группами белка и низкомолекулярными тиолами (прежде всего, глутатионом) [166]. Смешанные дисульфиды восстанавливаются до исходной формы в результате действия глутаредоксина или тиоредоксина. Некоторые исследователи полагают, что такое ковалентное присоединение глутатиона может иметь в клетках функцию, сходную с процессами фосфорилирования.

Другими продуктами окисления SH-групп цистеина могут быть сульфениковая ($R-SO_2H$) или сульфониновая ($R-SO_3H$) кислоты (табл. 3.1). Сульфонаты являются относительно стабильными окислительными состояниями аминокислотных остатков цистеина и не восстанавливаются до цистеина при физиологических условиях. Однако необратимый переход тиольной группы цистеина к форме сульфениковой или сульфониновой кислоты индуцируется более сильными, чем H_2O_2 , окислителями такими как гидроксильный радикал или пероксинитрит-ион [163].

Следует отметить, что от степени окисления редокс-чувствительных функциональных групп зависит активность не только тирозинфосфатаз, но и активность серин/треониновых фосфатаз. Для серин/треониновых фосфатаз активность зависит от степени окисления ионов железа, расположенных в активном центре фермента [167].

Многочисленные исследования последних лет изменили представление о функциональной роли Fe-S-кластеров в белковых молекулах. Обнаружено, что изменение окислительно-восстановительного состоя-

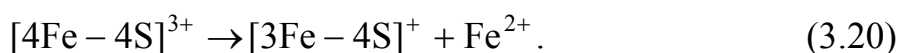
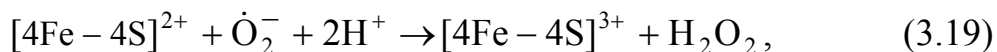
ния Fe–S-кластеров влияет на регуляторные свойства белков, в состав которых они входят [168].

Таблица 3.1.

Степени окисления сульфгидрильных групп

Степень окисления	Формула	Название
0		Тиол
+1, -1		Дисульфид
+2		Сульфениковая кислота
+4		Сульфениковая кислота
+6		Сульфениковая кислота

Окисление $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+}$ -кластеров супероксидными анион-радикалами приводит к высвобождению ионов железа и инактивации белков, таких как аконитаза (аконитатгидрогеназа), сукцинатдегидрогеназа и митохондриальная НАДН-убихинон-оксидоредуктаза [169]:



При инактивации митохондриальной аконитазы в результате окисления кластера $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+}$ изменяется протекание реакций в цикле трикарбоновых кислот [161]. Окисление $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+}$ -кластера цитоплазматической аконитазы способствует переходу фермента к форме IRPs (iron regulatory proteins) [170]. IRPs регулируют синтез ферритина и трансферрина. Обнаружено, что изменение редокс-состояния кластера $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ регулирует активность белка Sox R [171]. Sox R является активатором гена sox S, ответственного за синтез белка Sox R [172]. Белок Sox R регулирует экспрессию ряда генов, продукты функционирования которых служат для защиты клетки от действия АФК.

3.3. Нитрозилирование белков

В настоящее время показано, что обратимые окислительные модификации белков играют важную роль в их функционировании [173]. Как было отмечено выше, ковалентное присоединение глутатиона к продуктам окисления белков – сульфенатам может иметь в клетках сходную с фосфорилированием функцию.

Важными этапами в процессах трансдукции сигнала являются реакции модификации белков азотсодержащими АФК. Ковалентное или нековалентное присоединение оксида азота к белкам является одним из механизмов регуляции активности многих белков, включая гемовые и негемовые белки [174]. В биологических системах $\dot{\text{N}}\text{O}$ вступает в реакции с O_2 , $\dot{\text{O}}_2^-$ и металлами переменной валентности. Основными мишенями $\dot{\text{N}}\text{O}$ в клетке являются металлсодержащие и тиолсодержащие белки [175, 176].

Присоединение молекулы NO^+ к цистеиновому остатку белка называется S-нитрозилированием. Оксид азота может удаляться из S-нитрозилированных белков как неферментативным [177], так и ферментативным путями [178, 179]. Кроме того, показано, что GSH может конвертировать S-нитрозилированные цистеины в более стабильные дисульфиды [180].

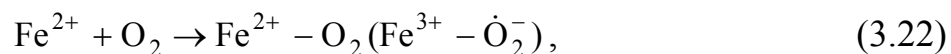
Оксид азота может связываться с различными металлами переменной валентности (Fe, Cu, Co, Zn, Ni, Cr) [181]. Наиболее изученной среди реакций $\dot{\text{N}}\text{O}$ с металлами является взаимодействие с железом (рис. 3.2). Введение радикала $\dot{\text{N}}\text{O}$ в состав белка называют нитрозированием (в отличие от нитрозилирования – введение нитрозония). Использование в биохимической литературе терминов нитрозирование и нитрозилирование как синонимов является не точным.

Константа скорости обратимого связывания оксида азота с двухвалентным железом зависит от вида организма, типа и состояния белка, с которым взаимодействует $\dot{\text{N}}\text{O}$ и достигает $k \approx (10^7-10^8) \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$. Посредством протекания реакции обратимого связывания $\dot{\text{N}}\text{O}$ с двухвалентным железом осуществляется активация гуанилатциклазы и ингибирование цитохромоксидазы.

Распад стабильных комплексов $\text{Fe}^{2+}-\text{NO}$ может протекать с участием кислорода:



В результате конкуренции между кислородом и оксидом азота за связывание с гемовой группой возможно протекание следующих реакций:



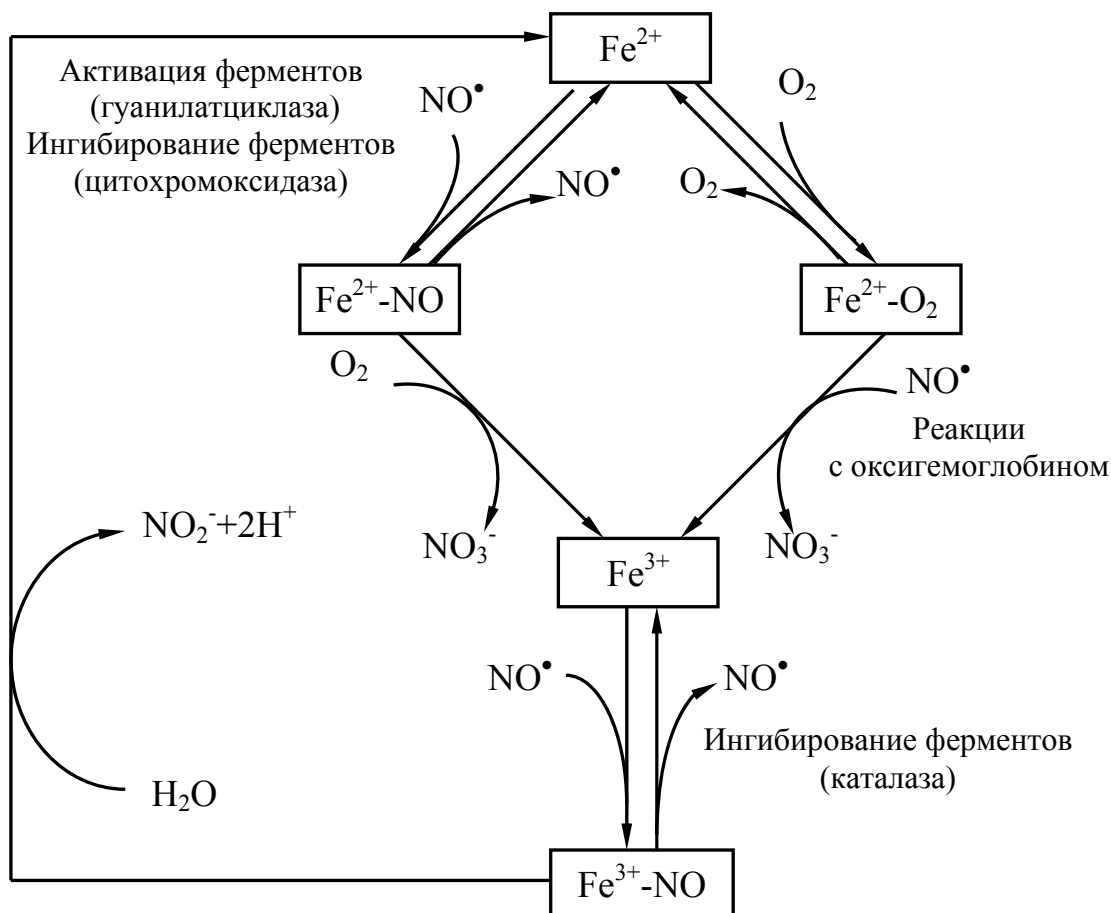
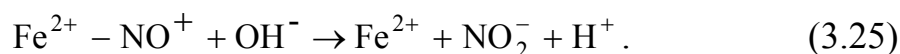
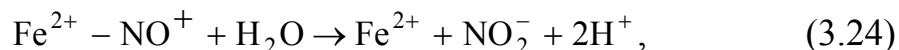


Рис. 3.2. Основные реакции оксида азота с гемовым железом

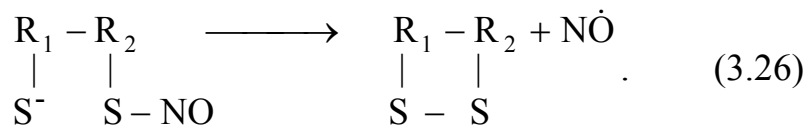
Оксид азота также может вступать в реакции обратимого связывания с трехвалентным железом. Взаимодействие NO[•] с Fe³⁺ в гемовой группе каталазы приводит к ингибированию фермента [181].

Реакции восстановления комплекса Fe³⁺-NO (или комплекса Fe²⁺-NO⁺) могут протекать при взаимодействии с водой и гидроксид-ионом:



Предполагается, что взаимодействие NO[•] с биологическими мишенями зависит от его степени окисления-восстановления. Восстановление NO[•] приводит к образованию нитроксильного аниона NO⁻. Образование NO⁻ может происходить при диссоциации комплексов Fe²⁺-NO⁻. Кроме взаимодействия с трехвалентным железом образование нитроксила может катализироваться ферментом СОД [182]. Окисление NO[•] приводит к формированию нитрозольного катиона NO⁺, способного нитрозировать биологические мишени с образованием S-нитрозотиолов. Нитрози-

лирование тиоловых групп (RS^-) и образование S-нитрозотиолов может приводить к гомолизу S–N-связей с освобождением NO , при этом образуются S–S-связи и изменяется конформация соответствующего клеточного эффектора.



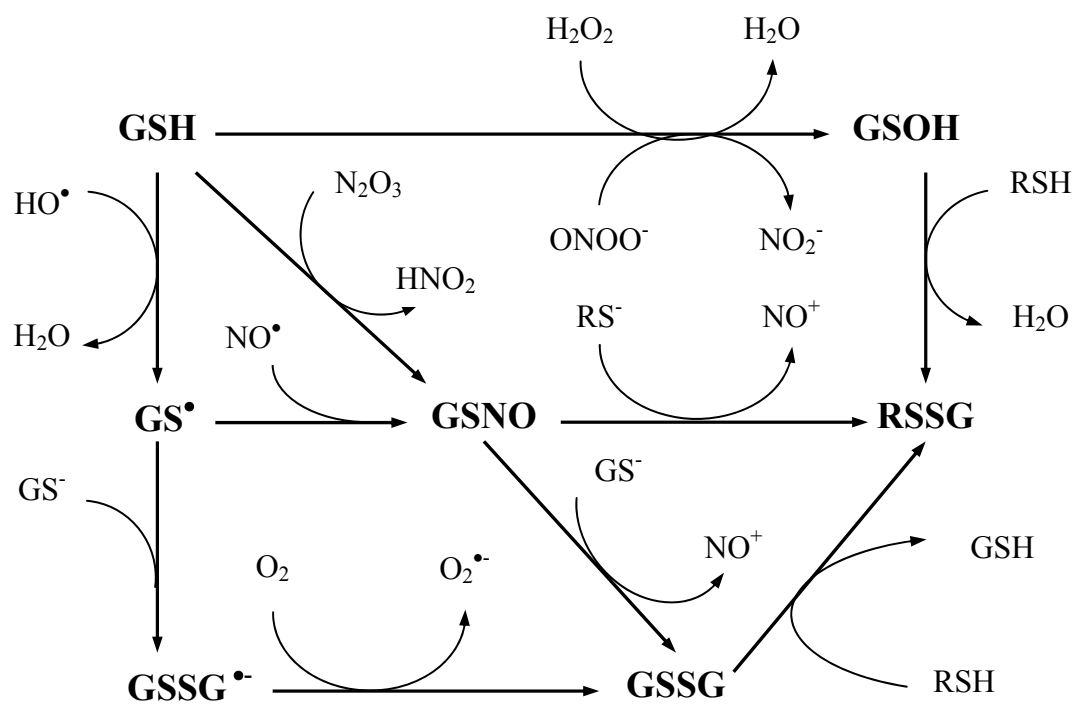
Предполагается, что нитрозилирование сульфгидрильных групп белков может выступать аналогом серин/треонинового и тирозинового фосфорилирования в клетках [176].

3.4. S-глутатиолирование белков

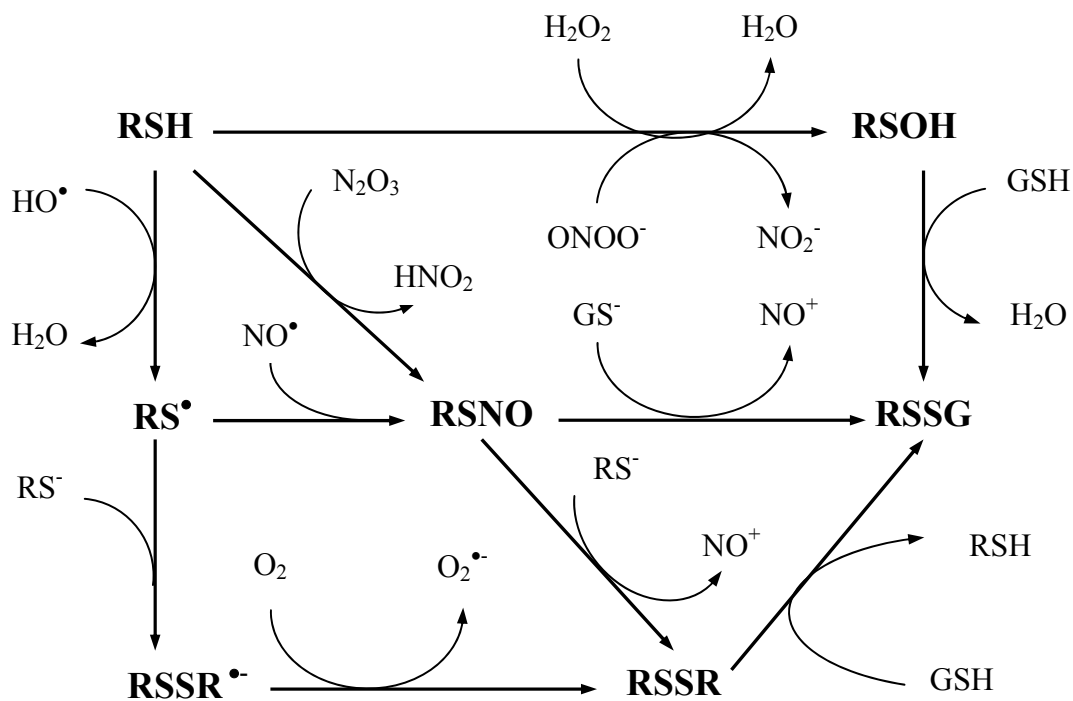
Большое число работ, выполненных в течение последних 20 лет, свидетельствует о накоплении смешанных дисульфидов в интактных тканях или клетках в культуре при воздействии окислителей. Литературные данные позволяют предположить, что редокс-пара GSH/GSSG динамически регулирует функционирование белков на основе обратимого формирования смешанных дисульфидов между цистеинами белка и глутатионом [183–185].

Формирование смешанных дисульфидов, осуществляемое в результате взаимодействия окисленных SH-групп белка как с глутатионом, так и с цистеином и другими тиолами, в литературе принято обозначать термином «S-тиолирование». С использованием методов высокоэффективной жидкостной хроматографии показано, что основная часть (>85 %) белок-тиольных связей в смешанных дисульфидах образована глутатионом [186–188]. Термин «S-глутатиолирование» используется для того, чтобы отметить роль глутатиона в формировании смешанных дисульфидов. К настоящему времени уже показано, что мишенями редокс-зависимого S-глутатиолирования являются многие клеточные белки, включая протеинкиназы, протеинфосфатазы, белки цитоскелета, транспортные белки, факторы транскрипции и другие (см. главу 6).

Белковые тиолы могут образовывать смешанные дисульфиды по двум фундаментально различным механизмам. Предполагается, что присоединение GSH может осуществляться в результате реакции восстановленных цистеинов с окислительно активированными формами GSH или в результате реакции окислительно активированных белковых тиолов с GSH (рис. 3.3).



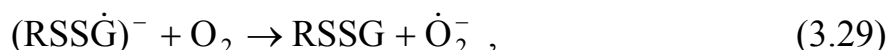
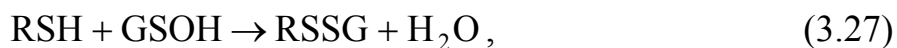
a



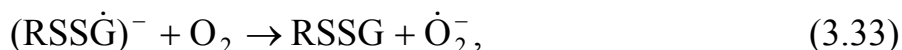
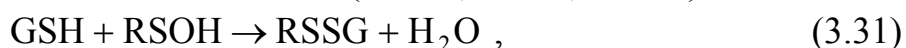
б

Рис. 3.3. Механизмы S-глутатиолирования: *а* – взаимодействие GSH с окислительно активированными формами белковых тиолов; *б* – взаимодействие восстановленных цистеинов (RSH) с окислительно активированными формами GSH

S-глутатиолирование белков может осуществляться в результате взаимодействия восстановленных цистеинов (RSH) с окислительно активированными формами GSH (GSNO, GSSG, GSOH) в процессе реакций с продуктами двухэлектронного окисления (3.27), в результате одноэлектронного окисления (3.28 – 3.29) или на основании тиол-дисульфидного обмена (3.30):



Аналогично, образование S-глутатиолированных белков может осуществляться в результате взаимодействия GSH с окислительно активированными формами белковых тиолов (RSNO, RSSR, RSOH):



Восстановление белковых тиолов может осуществляться в результате реакции детиолирования:



Детиолирование S-глутатиолированных белков осуществляется в результате неферментативного восстановления или в результате ферментативного расщепления дисульфидных связей такими ферментами, как тиоредоксинредуктаза, глутаредоксин или дисульфидизомераза [189]. Показано, что глутаредоксин восстанавливает белковые дисульфиды S-глутатиолированных белков, выделенных из гепатоцитов, более эффективно, чем другие ферменты [190].

По какому из двух вышеуказанных механизмов будет осуществляться S-глутатиолирование зависит от строения белка. Показано, что гемоглобин человека имеет только по одному реакционному цистеину (в позиции β^{93}) в каждой β -субъединице [191]. Эти цистеины имеют pK_a , аналогичное pK_a глутатиона, однако их взаимодействие с окислителями происходит медленнее, чем глутатиона. С другой стороны, гемоглобин крысы содержит реакционные цистеины (α^{13} , β^{93} и β^{125}) в α - и β -субъединицах [192]. Цистеины (β^{125}) в тридцать раз быстрее взаимодействует с окислителями, чем глутатион. В результате таких особенностей

строения окисление цистеинов гемоглобина крысы будет протекать быстрее, чем окисление глутатиона, тогда как окисление цистеинов гемоглобина человека – медленнее, чем окисление глутатиона [193].

3.5. Окисление нуклеиновых кислот

Свободнорадикальные реакции, протекающие в клетке, могут вызывать структурные изменения молекул ДНК. При окислительном стрессе повреждения митохондриальной ДНК происходят в несколько раз чаще, чем ядерной ДНК [194, 195]. Такая «чувствительность» митохондриальной ДНК обусловлена рядом причин, включая близость расположения к внутриклеточному источнику АФК (митохондриальной дыхательной цепи) и повреждения ДНК конечными продуктами перекисного окисления липидов. Повреждения ДНК могут способствовать мутациям, которые накапливаются с возрастом в митохондриальной ДНК с большей скоростью, чем в ядерной [196].

На основе экспериментальных исследований предполагается, что \dot{O}_2^- и H_2O_2 не взаимодействуют с молекулами ДНК [197]. Главная роль в окислительной модификации нуклеотидов принадлежит гидроксильному радикалу, а также синглетному кислороду. В реакциях \dot{OH} с молекулой ДНК индуцируется образование множества продуктов повреждения всех четырех оснований и дезоксирибозы. [198, 199]. Взаимодействие \dot{OH} с дезоксирибозой индуцирует отрыв атома водорода, формируя углеродцентрированные радикалы. Углеродцентрированные радикалы в присутствии кислорода образуют пероксильные радикалы, которые вступают в дальнейшие реакции с биомолекулами. В отсутствие кислорода \dot{OH} вызывает одноцепочечные разрывы молекулы ДНК, сопровождающиеся высвобождением оснований и формированием модифицированных сахаров. Взаимодействие \dot{OH} с гетероциклическими основаниями происходит на основе реакции присоединения по двойным связям, индуцируя образование радикалов оснований, обладающих свойствами как окислителей, так и восстановителей [200].

МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ РЕДОКС-МОЛЕКУЛ

4.1. Трансмембранный транспорт электронов и редокс-молекул

Многочисленные данные, полученные к настоящему времени, свидетельствуют о существенных различиях в концентрациях биологических восстановителей снаружи и внутри клеток. В цитоплазме клетки формируется редокс-состояние с повышенной по отношению к внеклеточному пространству концентрацией доноров электронов. Поддержание постоянного внутриклеточного редокс-состояния или редокс-гомеостаза основывается на работе внутриклеточных оксидантгенерирующих систем, антиоксидантсинтезирующих систем, оксидантутилизирующих систем и трансмембранном транспорте электронов и редокс-молекул.

Трансмембранный транспорт электронов и редокс-молекул через плазматическую мембрану регулирует редокс-состояние клетки. Наряду с этим перенос электронов через плазматическую мембрану может приводить к формированию акцепторов (восстановление кислорода НАДФН-оксидазой) и доноров электронов (восстановление дегидроаскорбата и радикала аскорбата НАДН-редуктазой) во внеклеточной среде. Явление трансмембранного транспорта электронов в биологических системах исследуется уже на протяжении многих лет. Перенос электронов через внутреннюю мембрану митохондрий происходит при формировании протондвижущей силы, необходимой для синтеза АТФ. Наряду с этим в последние годы активно изучаются механизмы трансмембранного транспорта электронов через плазматическую мембрану клеток [201].

Впервые данные о возможном существовании редокс-систем в плазматической мембране клеток были получены еще в 1925 г. [202]. В 1965 году было установлено, что эритроциты способны восстанавливать феррицианид – окислитель, неспособный проникать в клетки [203]. Электронтранспортная активность плазматических мембран в настоящее

время показана для ряда типов клеток [204]. Идентифицированы несколько мембранных ферментов, участвующих в транспорте электронов через плазматическую мембрану [205], для обозначения которых используется термины «оксидоредуктазы плазматической мембраны» [206, 207] и «редокс-системы плазматической мембраны» (РСММ) [208, 209]. «РСММ» является более общим термином, т. к. охватывает ферментативные и неферментативные механизмы трансмембранного переноса электронов.

Механизмы переноса электронов через плазматическую мембрану зависят от типа клеток и строения РСММ. В табл. 4.1 представлены некоторые механизмы трансмембранного переноса электронов, описанные к настоящему времени. Наиболее изучен перенос электронов с помощью трансмембранных оксидоредуктаз, к которому, в общем случае, можно отнести и восстановление кислорода НАДФН-оксидазой. В ряде случаев обнаружено, что активность РСММ зависит от концентрации убихинола и α -токоферола в плазматической мембране [210]. В основе механизмов переноса электронов в таких системах лежит окисление гидрофобных восстановителей внеклеточными окислителями.

Таблица 4.1

Механизмы переноса электронов в плазматической мембране

Тип донора электронов	Механизм переноса электронов	Тип акцептора электронов
НАДН, НАДФН, АК	С участием простетических групп трансмембранной оксидоредуктазы	O ₂ , феррицианид, семидегидроаскорбат, углеродцентрированные и кислородные радикалы
НАДН, НАДФН	С участием α -токоферола, убихинола и гемовых групп цитохром b ₅ редуктазы	Семидегидроаскорбат
НАДН, НАДФН	С участием простетических групп убихинонредуктазы, убихинола и простетических групп убихинолоксидазы	Семидегидроаскорбат
АК	С помощью α -токоферола	Свободные радикалы
GSH	Через тиолы интегрального белка	Свободные радикалы

Восстановление фенольных радикалов осуществляется по двум механизмам [211]. В первом случае восстановление происходит с участием редуктазы, расположенной с цитоплазматической стороны плазматической мембраны, во втором случае – с участием аскорбата (АК). Также

предполагается, что перенос электронов может происходить с помощью цистеиновых групп интегральных белков [212], однако данный способ переноса электронов недостаточно изучен и требует дальнейших исследований.

В настоящее время также описаны электронтранспортные цепи плазматической мембраны, осуществляющие транспорт электронов от цитоплазматического НАДН к молекулярному кислороду или дисульфидам [213]. Такая электрон-транспортная цепь состоит из убихинон-редуктазы, убихинола и убихинолоксидазы. Окисление субстратов конечным акцептором электронов – убихинолоксидазой может происходить как по одноэлектронному, так и по четырехэлектронному механизму. Однако механизм такого переключения в настоящее время еще не выяснен. Стимуляция активности электрон-транспортной цепи в клетках наблюдается при действии гормонов и факторов роста [214]. Вероятно, это связано с участием электронтранспортной цепи в механизме регуляции роста клеток.

Повышенная активность данной системы наблюдается также в клетках с поврежденными митохондриями. В клетках лимфобластной линии rho 0 процессы окислительного фосфорилирования не протекают, а энергетические потребности клеток обеспечиваются в результате процессов гликолиза. В этих клетках НАД⁺ образуется в основном при функционировании электронтранспортной системы плазматической мембраны, в которой для восстановления молекулярного кислорода используется образующийся в процессе гликолиза НАДН [215]. Считается, что повышенная активность данной электронтранспортной цепи лежит в основе механизма накопления окислительных повреждений макромолекул в процессе старения и обусловлена нарушениями митохондриальной ДНК [213].

Концентрация доноров и акцепторов электронов внутри и снаружи клетки изменяется также в результате прямого переноса редокс-молекул через мембрану. Механизм трансмембранного переноса редокс-молекул зависит от их типа. Перенос окислителей и восстановителей через мембрану происходит в результате простой диффузии (H_2O_2 , O_2 , $\dot{N}O$), облегченной диффузии через анионные каналы ($ONOO^-$, \dot{O}_2^-), или с помощью специальных переносчиков (для GSH, GSSG, АК, ДАК и т. д.).

В настоящее время в клетках обнаружены два типа транспортеров глутатиона: каналикулярный (RcGshT) и синусоидальный (RsGshT) [216]. Синусоидальный транспортер переносит глутатион преимущественно наружу, в результате чего в условиях клеточной культуры наблюдается выход GSH из клеток наружу [217]. Активность синусоидального

транспортера регулируется тиолами [218]. Дитиотреитол (ДТТ) увеличивает скорость выхода глутатиона наружу клетки в пять раз [219]. Показано, что в условиях окислительного стресса в мозгу астроциты выбрасывают наружу значительное количество GSH и GSSG [220].

Наряду с этим показано, что в клетках млекопитающих глутатион способен переноситься внутрь клетки благодаря экспрессируемому в них каналикулярному транспортеру глутатиона [221, 222]. Установлено, что RsGshT является основным переносчиком глутатиона в органах и тканях крысы и человека, тогда как RcGshT экспрессируется только в специализированных типах клеток, таких как гепатоциты или астроциты [216]. В некоторых типах клеток транспорт глутатиона в клетки зависит от внеклеточной концентрации ионов Na^+ [223, 224]. Данный эффект обусловлен присутствием в тканях Na^+ -зависимого переносчика GSH [225]. Следует отметить, что молекулярная структура переносчиков глутатиона до сих пор не установлена. Предполагается, что АТФ-зависимый транспорт GSH может осуществляться белками семейства Mrp (multidrug resistance-associated proteins) [226]. Показано, что белки семейства Oatp (organic anion transporter polypeptide) транспортируют глутатион наружу клетки по механизму «антипорта» [227].

Немаловажную роль в поддержании клеточного редокс-гомеостаза играют процессы синтеза глутатиона в клетках. Однако в организме млекопитающих синтез глутатиона в основном протекает в печени, в результате чего транспорт глутатиона в клетки других тканей также может оказывать значительное влияние на клеточный и тканевый редокс-гомеостаз. При этом редокс-гомеостаз клетки будет зависеть от типов транспортеров глутатиона, экспрессируемых клеткой.

Аскорбиновая кислота в отличие от глутатиона не синтезируется в организме человека и ее внутриклеточная концентрация поддерживается только за счет транспорта в клетки с помощью специальных переносчиков. В организме аскорбиновая кислота присутствует в виде аскорбат-аниона (АК) и дегидроаскорбата (ДАК). В настоящее время предложены два механизма переноса аскорбиновой кислоты в клетки (рис. 4.1). Окисленная форма аскорбиновой кислоты транспортируется в клетку транспортерами глюкозы GLUT1, GLUT3 и GLUT4 [228, 229]. Однако физиологические концентрации ДАК (2–5 мкМ) в крови на три порядка меньше концентрации глюкозы (5–6 мМ), в результате чего при физиологических условиях переносчики GLUT1, GLUT3, GLUT4 транспортируют в основном глюкозу. Кроме того, в настоящее время во многих типах клеток обнаружены натрий-зависимые транспортеры витамина С – SVCT1 и SVCT2 [230, 231].

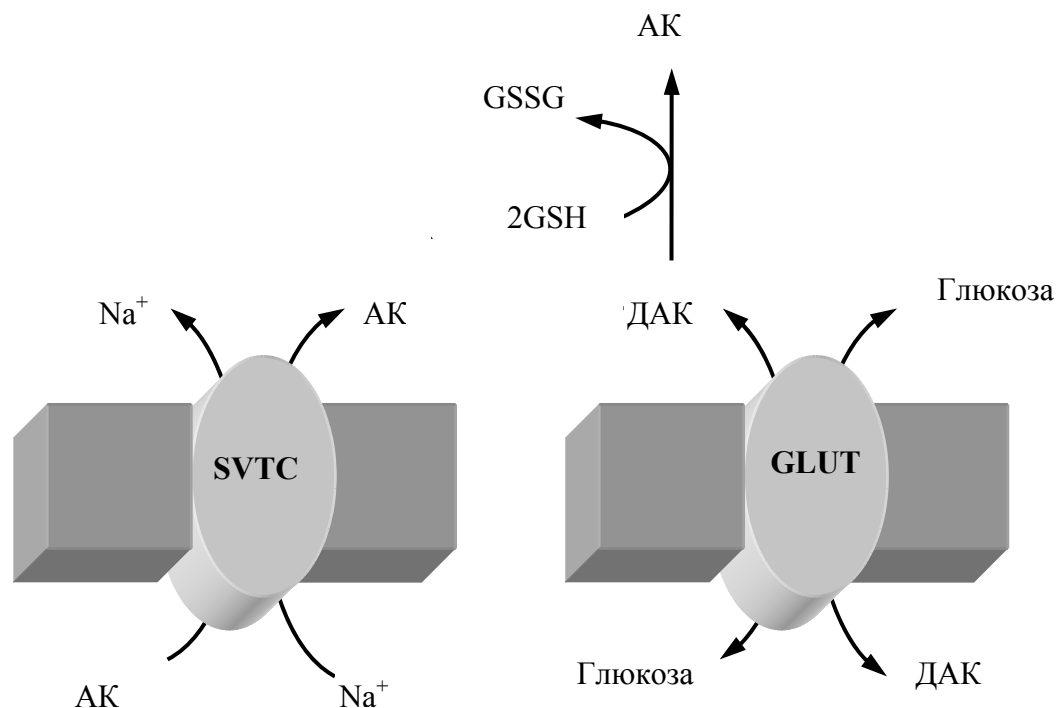


Рис. 4.1. Обобщенная схема транспорта аскорбиновой кислоты в клетках

SVCT1 и SVCT2 переносят в клетку восстановленную форму аскорбата. SVCT1 экспрессируется в основном в эпителиальных клетках, а также в клетках печени, почек, кишечника, яичников и предстательной железы [232]. SVCT2 более широко представлен в тканях организма человека и экспрессируется во многих тканях, включая клетки мозга (нейроны), сетчатки глаза, селезенки, предстательной железы и др. [233]. В некоторых тканях, включая опухолевые, накопление АК осуществляется только с помощью переносчиков глюкозы семейства GLUT [234, 235]. Усиление транспорта АК с помощью данного механизма происходит при повышении концентрации окислителей во внеклеточной среде.

Внутриклеточная концентрация АК в различных типах клеток изменяется в широком диапазоне и зависит от типа экспрессируемых в них переносчиков АК. Например, в мозге АК (до 10 мМ) преимущественно накапливается в нейронах, которые содержат SVCT2 [236]. С другой стороны, в астроцитах внутриклеточная концентрация АК не превышает 1 мМ, а транспорт АК в клетки осуществляется в основном с помощью переносчиков глюкозы [237]. При этом астроциты принимают активное участие в восстановлении ДАК, образующейся в нейронах при окислительном стрессе [238].

Некоторые типы окислителей, образующиеся в клетках, также перемещаются через плазматическую мембрану внутрь клетки или за ее

пределы. Движущей силой при этом является трансмембранный градиент концентраций окислителя. В результате диффузии через плазматическую мембрану в клетке может изменяться концентрация молекулярного кислорода, пероксида водорода, пероксинитрита, окиси азота и супероксидного анион-радикала.

Для различных окислителей скорость диффузии через клеточные мембраны различается, что является важным фактором для создания отличий в редокс-гомеостазе тканей. Коэффициенты проницаемости через плазматические мембраны и фосфолипидные слои для некоторых АФК представлены в табл. 4.2.

Как видно из представленных данных, среди окислителей наибольшим коэффициентом проницаемости через мембраны обладает H_2O_2 . С учетом относительно большого времени жизни H_2O_2 при физиологических рН не удивительно, что многие исследователи рассматривают его как сигнальную молекулу, участвующую в процессах внутриклеточной и внеклеточной передачи сигнала. Подробнее транспорт H_2O_2 рассмотрен в следующем разделе.

Таблица 4.2.

Значения коэффициента проницаемости для воды и некоторых АФК

Тип вещества	Объект	Коэффициент проницаемости, P (см с ⁻¹)	Ссылка
H ₂ O	Бислойные липидные мембраны	$2,3 \times 10^{-3}$	[239]
ONOOH	Бислойные липидные мембраны	$8,0 \times 10^{-4}$	[240]
\dot{O}_2^-	Бислойные липидные мембраны	$2,1 \times 10^{-6}$	[241]
H ₂ O ₂	Эритроциты	$6,0 \times 10^{-4}$	[242]
H ₂ O ₂	<i>Escherichia coli</i>	$1,6 \times 10^{-3}$	[243]
H ₂ O ₂	Лимфоциты линии Jurkat	$2,0 \times 10^{-4}$	[244]
H ₂ O ₂	Эпителиальные клетки линии FL	$2,1 \times 10^{-4}$	[245]
H ₂ O ₂	Астроциты линии C6	$2,3 \times 10^{-4}$	[245]
H ₂ O ₂	<i>Chara coralline</i>	$3,6 \times 10^{-4}$	[246]

Скорость переноса редокс-молекул внутрь клетки и наружу зависит от многих факторов, в том числе и от наличия специальных белков-переносчиков, трансмембранного градиента концентраций редокс-молекул, редокс-состояния клетки и окружающей среды.

4.2. Утилизация пероксида водорода клетками. Градиент концентраций окислителей

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 [247]. Определенная с использованием каталазы концентрация H_2O_2 в клетках и тканях организма составляла 10^{-9} – 10^{-7} М [247, 248]. Однако пероксид водорода является наиболее стабильной АФК и его концентрация H_2O_2 в клетках и тканях различных организмов может быть значительно выше, чем считалось ранее.

В настоящее время показано, что ткани организма человека в процессе еды подвергаются воздействию H_2O_2 в более высоких концентрациях, чем это было принято ранее [249]. Общеупотребляемые напитки, такие как чай, кофе или какао, содержат H_2O_2 в концентрациях 0,1–0,5 мМ [250–252]. При употреблении этих напитков H_2O_2 диффундирует в клетки ротовой полости и желудочно-кишечного тракта [253]. Базальная концентрация H_2O_2 , регистрируемая в моче, иногда превышает 0,1 мМ [254–256]. Высокий уровень H_2O_2 в моче может быть благоприятным для уменьшения инфекции в мочевом пузыре и мочевыводящих путях [249]. Некоторые исследователи утверждают, что базальная концентрация H_2O_2 в крови может достигать 0,035 мМ [257–259]. Одним из ферментов, вовлеченных в образование H_2O_2 в крови, может выступать ксантиноксидаза [260].

Показано, что концентрация H_2O_2 в стекловидном теле глаза может быть выше 0,1 мМ [261–263]. Источник образования H_2O_2 в тканях глаза не установлен. Возможно, аскорбиновая кислота может содействовать образованию H_2O_2 в тканях глаза [264].

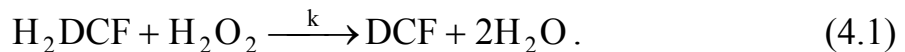
Концентрация H_2O_2 в тканях мозга также может достигать значений 10^{-4} М [265]. Высокая концентрация H_2O_2 в мозге опосредована определенными особенностями строения и функционирования центральной нервной системы. Несмотря на то, что мозг по массе составляет небольшой процент (у людей около 2 %) от массы всего тела, он потребляет непропорционально большое количество (у людей около 20 %) вдыхаемого кислорода. Наряду с этим в мозге обнаружен низкий уровень важнейших антиоксидантных ферментов [266]. Мозг также содержит, по крайней мере, в некоторых частях высокие концентрации железа и аскорбиновой кислоты. Несвязанное железо в отдельности и в комбинации с аскорбиновой кислотой активно участвует в процессах генерации АФК [267].

Концентрация H_2O_2 в мышинном стриатуме, измеренная микродиализным методом, достигает 0,1 мМ [268].

Таким образом, концентрация пероксида водорода в различных тканях поддерживается на достаточно высоком (выше, чем концентрация других окислителей) уровне. Наличие в клетке механизмов быстрой генерации H_2O_2 и специальных соединений ферментного и неферментного ряда для ее уничтожения позволяет рассматривать H_2O_2 как молекулу, способную выполнять роль вторичного мессенджера. Необходимо отметить, что источником кислорода (водорода) при фотосинтезе, скорее всего, служит не вода, а пероксид водорода экзо- и эндогенного происхождения [269]. Регуляция изменения концентрации пероксида водорода может также выступать одним из механизмов поддержания клеточного и тканевого редокс-гомеостаза.

Различия в механизмах генерации и утилизации пероксида водорода внутри клетки и во внеклеточной среде приводят к появлению градиента концентраций окислителя на плазматической мембране клеток, возникновение которого показано нами с помощью флуоресцентного зонда 2,7-дихлородигидрофлуоресцеина (H_2DCF) [245, 270].

При инкубации различных типов клеток с внеклеточным H_2O_2 наблюдается увеличение интенсивности флуоресценции внутриклеточного DCF. Интенсивность флуоресценции DCF зависит от внеклеточной концентрации H_2O_2 (в диапазоне концентраций от 0,1 до 5 мМ) и времени экспозиции. Интенсивность флуоресценции DCF увеличивается со временем вследствие следующей реакции превращения H_2DCF в флуоресцирующую форму DCF:



Скорость образования DCF зависит от концентрации H_2DCF и H_2O_2 в цитоплазме:

$$\frac{d[\text{DCF}]}{dt} = k \times [\text{H}_2\text{DCF}]_{\text{цит}} \times [\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{цит}} , \quad (4.2)$$

где k – константа скорости реакции. Было обнаружено, что реакция окисления H_2DCF пероксидом водорода протекает в клетке значительно медленнее, чем в сбалансированном буферном солевом растворе (СБСР) (рис. 4.2). Скорость реакции между H_2DCF и H_2O_2 значительно ниже, чем скорость реакции между H_2DCF и другими внутриклеточными окислителями ($\dot{\text{O}}_2^-$, NO и ONOO^-) [271]. Так как внутри клетки скорость окисления H_2DCF ниже, чем в СБСР, то можно предположить, что концентрации образующихся вторичных радикалов (гидропероксидов, гидроксильного радикала и др.) значительно меньшие, чем концентрация H_2O_2 ,

вошедшего в клетку. Поэтому их вклад в изменение интенсивности флуоресценции можно не учитывать.

Из-за низкой скорости реакции (4.1) внутриклеточная концентрация H_2DCF и H_2O_2 с течением времени в результате реакции изменяется незначительно. Наблюдаемые отличия в скоростях окисления H_2DCF свидетельствуют об утилизации H_2O_2 внутриклеточными компонентами.

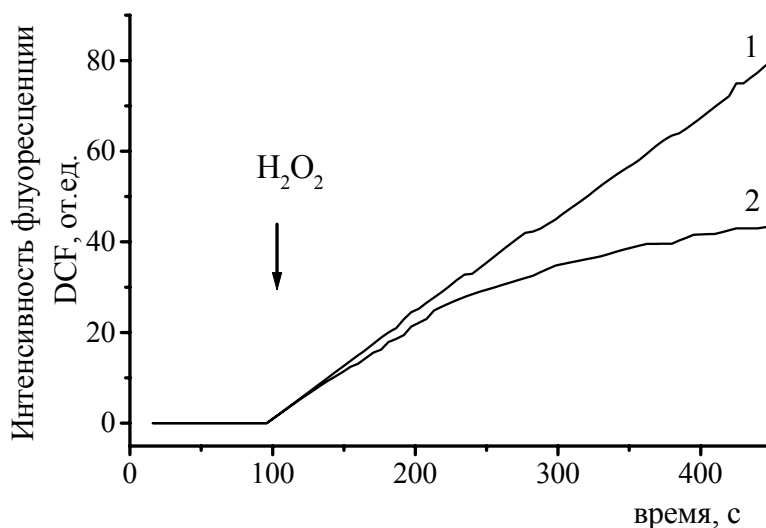


Рис. 4.2. Влияние пероксида водорода на интенсивность флуоресценции DCF в СБСР (1) и в клетках (2). Число клеток амниона человека линии FL в суспензии – 10^6 в 1 мл. Концентрация H_2O_2 в СБСР – 1 мМ. Концентрация H_2DCF в СБСР – 50 мкМ

Так как скорости реакций H_2O_2 с внутриклеточными компонентами (например, с пероксидазами или каталазами) превышают скорость реакции (4.1) на 4–6 порядков, можно считать, что скорость изменения интенсивности флуоресценции DCF, находящегося внутри клетки, пропорциональна внутриклеточной концентрации H_2O_2 :

$$\frac{dI(t)}{dt} = k_p \cdot [H_2O_2]_{цит}(t), \quad (4.3)$$

где $I(t)$ – интенсивность флуоресценции DCF, k_p – константа, определяемая экспериментально.

Для нахождения кинетических характеристик процесса утилизации пероксида водорода клеточными антиокислительными системами необходимо анализировать скорость образования DCF или скорость изменения интенсивности флуоресценции DCF. Согласно уравнению (4.3) скорость изменения интенсивности флуоресценции DCF характеризует изменение величины внутриклеточной концентрации H_2O_2 с течением времени инкубирования клеток в СБСР, содержащем пероксид водорода. Экспериментально установлено, что зависимость начальной скорости

изменения интенсивности флуоресценции DCF от концентрации пероксида водорода линейна в диапазоне концентраций 0,1–1 мМ. Используя уравнение (4.3) и зависимость начальной скорости изменения интенсивности флуоресценции DCF от концентрации H_2O_2 , легко определить коэффициент k_p , который связывает скорость изменения интенсивности флуоресценции красителя с концентрацией пероксида водорода и в наших исследованиях был равен $k_p = 0,25 \pm 0,01 \text{ мМ}^{-1} \text{ с}^{-1}$ [270]. Таким образом, в результате дифференцирования зависимостей, характеризующих изменение интенсивности флуоресценции DCF со временем, можно определить изменения концентрации H_2O_2 внутри клетки со временем.

На рис. 4.3 представлены зависимости внеклеточной и внутриклеточной концентрации H_2O_2 от времени при экспозиции клеток к окислителю. Внутри клеток концентрация H_2O_2 уменьшается со временем инкубирования. После добавления окислителя во внеклеточную среду в течение нескольких минут на клеточной мембране устанавливается постоянный градиент концентрации пероксида водорода.

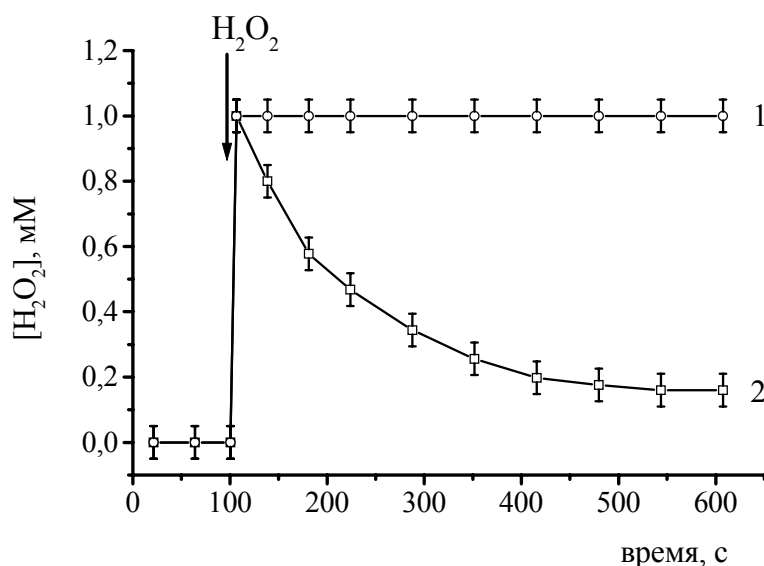


Рис. 4.3. Зависимости концентрации пероксида водорода в СБСР (1) и в клетках (2) от времени. Концентрация H_2O_2 в СБСР – 1 мМ

Для нахождения констант, характеризующих процесс переноса пероксида водорода через плазматическую мембрану в клетки и процесс утилизации внутриклеточными антиокислительными системами, нами построена следующая математическая модель.

В основе модели использовано предположение о том, что скорость изменения внутриклеточной концентрации $[H_2O_2]_{цит}(t)$ будет определяться разностью между скоростью поступления H_2O_2 в клетку (v_1) и скоро-

стью утилизации H_2O_2 внутриклеточными компонентами (v_2). Скорость изменения внутриклеточной концентрации пероксида водорода определяется следующим уравнением:

$$\frac{d c(t)}{dt} = v_1 - v_2, \quad (4.4)$$

где

$$v_1 = k_1 \times (c_0 - c(t)), \quad (4.5)$$

$$v_2 = k_2 \times c(t), \quad (4.6)$$

$c_0 = [H_2O_2]_{нар}$ – концентрация пероксида водорода в СБСР, $c(t) = [H_2O_2]_{цит}(t)$ – концентрация пероксида водорода в клетке, k_1 – коэффициент, характеризующий скорость трансмембранного переноса H_2O_2 в клетку (числовые значения определяются для 10^6 клеток), k_2 – коэффициент, характеризующий скорость утилизации H_2O_2 внутри клеток (числовые значения определяются для 10^6 клеток).

Преобразуем (4.4) с учетом уравнений (4.5) и (4.6):

$$\frac{d c(t)}{dt} = k_1 \cdot c_0 - (k_1 + k_2) \cdot c(t). \quad (4.7)$$

Решением данного уравнения будет функция

$$c(t) = c_0 \cdot \frac{k_1 + k_2 \cdot e^{-(k_1+k_2)t}}{k_1 + k_2}. \quad (4.8)$$

На основании данной модели можно определить изменение концентрации внутриклеточного H_2O_2 с течением времени. Теоретические зависимости, полученные в соответствии с уравнением (4.8), хорошо коррелируют с экспериментальными данными [270].

Выражение (4.8) можно преобразовать в результате введения концентрации внутриклеточного пероксида водорода для равновесного состояния: $c(t) \rightarrow c_p$ при $t \rightarrow \infty$, где

$$c_p = c_0 \cdot \frac{k_1}{k_1 + k_2}. \quad (4.9)$$

Тогда (4.8) можно привести к следующему виду:

$$\frac{c(t) - c_p}{c_0 - c_p} = e^{-(k_1+k_2)t}. \quad (4.10)$$

При экспозиции клеток к 1 мМ H_2O_2 (c_0) значение внутриклеточной концентрации пероксида водорода в состоянии равновесия будет

$c_p = 0,16$ мМ. С использованием выражения (4.9) можно определить отношение констант k_2/k_1 :

$$\frac{c_0 - c_p}{c_p} = \frac{k_2}{k_1} \quad (4.11)$$

На основании выражения (4.11) и с учетом экспериментальных данных, полученных для эпителиальных клеток, получили, что $k_2/k_1 = 6,25$. Для определения констант k_1 и k_2 необходимо построить логарифмическую анаморфозу для зависимости (4.8). Из выражения (4.10) получаем:

$$\ln \frac{c(t) - c_p}{c_0 - c_p} = -(k_1 + k_2) \cdot t. \quad (4.12)$$

Зная значения тангенса угла наклона логарифмической анаморфозы для зависимости изменения величины внутриклеточной концентрации пероксида водорода от времени при экспозиции клеток к 1 мМ H_2O_2 , можно определить сумму констант k_2 и k_1 ($k_2 + k_1 = 0,0095$). Зная сумму и отношение констант, легко получить значения констант $k_1 = 0,0015$ с⁻¹ и $k_2 = 0,008$ с⁻¹ для 10^6 клеток.

Для характеристики процессов переноса пероксида водорода через мембрану и его утилизации в отдельных клетках нами пересчитаны коэффициенты k_1 и k_2 на клеточный объем с использованием следующих выражений [272]:

$$k_1^{кл} = k_1 \cdot \frac{V_p}{V_{кл} \cdot N}, \quad (4.13)$$

$$k_2^{кл} = k_2 \cdot \frac{V_p}{V_{кл} \cdot N}, \quad (4.14)$$

где N – число клеток (10^6 клеток), V_p – объем реакционной смеси (1 см³), $V_{кл}$ – объем клетки ($1,766 \times 10^{-9}$ см³). В пересчете коэффициентов на клеточный объем получены значения: $k_1^{кл} = 0,85$ с⁻¹ и $k_2^{кл} = 4,53$ с⁻¹.

Коэффициент $k_1^{кл}$ связан с коэффициентом проницаемости для пероксида водорода выражением (на основе определения коэффициента проницаемости и выражении (4.5)):

$$P = k_1^{кл} \cdot \frac{V_{кл}}{S_{кл}}. \quad (4.15)$$

Для клеток радиусом $7,5 \times 10^{-4}$ см значение коэффициента проницаемости будет равно $P = (2,1 \pm 0,2) \times 10^{-4}$ см · с⁻¹. Коэффициент $k_2^{кл}$ пред-

ставляет собой суммарную характеристику утилизации пероксида водорода внутриклеточными компонентами, среди которых ферменты каталаза (CAT) и пероксидаза (Px), восстанавливающие агенты глутатион (GSH), аскорбиновая кислота и др.:

$$k_2^{kl} = k_{CAT} \cdot [CAT]_{цит} + k_{Px} \cdot [Px]_{цит} + k_{GSH} \cdot [GSH]_{цит} + \dots \quad (4.16)$$

где k_{CAT} – константа скорости реакции утилизации пероксида водорода каталазой, $[CAT]_{цит}$ – внутриклеточная концентрация каталазы, k_{Px} – константа скорости реакции утилизации пероксида водорода глутатион пероксидазой, $[Px]_{цит}$ – внутриклеточная концентрация глутатион пероксидазы, k_{GSH} – константа скорости реакции пероксида водорода с глутатионом, $[GSH]_{цит}$ – внутриклеточная концентрация глутатиона. Коэффициент k_2^{kl} можно рассматривать как псевдоконстанту скорости реакции первого порядка для утилизации пероксида водорода внутриклеточными восстановительными компонентами, то есть характеризующую скорость утилизации клеточными компонентами 1 моля пероксида водорода в единицу времени.

Значение коэффициента проницаемости H_2O_2 через плазматическую мембрану для эпителиальных клеток линии FL и астроцитов, определенное в результате наших исследований (табл. 4.2), оказалось ниже, чем значение коэффициента проницаемости для эритроцитов и бактерий *E. coli*, но близкое по значению к коэффициенту проницаемости H_2O_2 для лимфоцитов линии Jurkat. Возможно, имеющийся в литературе разброс данных для P связан с неучетом размеров клеток. С другой стороны, различия в значениях коэффициента проницаемости через клеточную мембрану могут быть связаны с наличием дополнительных транспортных систем в мембранах различных клеток. Некоторые исследователи полагают, что транспорт пероксида водорода в клетки может осуществляться через аквапорины [246].

Таким образом, трансмембранный транспорт в клетки и внутриклеточная утилизация H_2O_2 приводят к установлению определенного градиента концентрации пероксида водорода через плазматическую мембрану, величина которого зависит от типа клеток. Аналогичным образом устанавливается градиент концентраций и для других типов редокс-молекул. Отметим, что в результате трансмембранного транспорта аскорбиновой кислоты в клетки ее внутриклеточная концентрация почти на три порядка превышает внеклеточную.

4.3. Механизмы регуляции редокс-гомеостаза

На основании рассмотрения многочисленных данных литературы можно утверждать о существовании тканевого и клеточного редокс-гомеостаза, в поддержании которого участвуют многочисленные механизмы, обладающие тканеспецифичностью. Основные механизмы регуляции редокс-гомеостаза, представленные в большинстве тканей, иллюстрируются рис. 4.4.

Свободные радикалы (R^\cdot), образовавшиеся во внеклеточной среде, вступают в реакции с внеклеточными водорастворимыми восстановителями (АК) или с мембранными жирорастворимыми α -токоферолом (ТОН) и убихинолом (QH_2). Восстановление окисленных форм восстановителей происходит за счет электронов внутриклеточных окислителей в результате прямых реакций или катализируется ферментами (1 – РСПМ). Концентрация аскорбиновой кислоты в клетке поддерживается за счет транспорта окисленной (ДАК – дегидроаскорбиновая кислота) или восстановленной (АК – аскорбиновая кислота) форм с помощью специализированных переносчиков (SVCT (2) и/или GLUT (3)). Свободные радикалы и другие формы окислителей в клетке образуются в результате ферментативных реакций, протекающих в различных внутриклеточных органеллах (5 – митохондрии, пероксисомы, лизосомы), или поступают извне (4 – супероксиддисмутаза, ксантиноксидаза и др.). Восстановление дегидроаскорбата в клетке осуществляется путем переноса электронов различными редуктазами (6 – НАДН-дегидроаскорбат-редуктаза, 7 – GSH-дегидроаскорбат-редуктаза) от НАДН или GSH. При этом образуются окисленные $НАД^+$ и GSSG, восстановление которых происходит различными путями. $НАД^+$ восстанавливается в процессе гликолиза или переноса электронов с НАДФН (10 – трансдегидрогеназы, обмен электронами между НАДН и НАДФН может происходить в обоих направлениях). Восстановление $НАДФ^+$ может также происходить в гексозомонофосфатном метаболическом пути. Окисленный глутатион восстанавливается глутатионредуктазой (8) за счет электронов НАДФН или глутаредоксином (9) за счет электронов белковых цистеинов (RSH). Наряду с этим активное участие в поддержании отношения GSH/GSSG внутри клетки принимает трансмембранный транспорт глутатиона (11 – синусоидальный транспортер, 12 – каналикулярный транспортер). Быстрая (в течение секунд и до нескольких минут) регуляция активности ферментов, принимающих участие в поддержании редокс-гомеостаза, может осуществляться в результате аллостерической регуляции (изменение концентрации продуктов и субстратов) или ковалентной модификации белков

(глутатиолирование, фосфорилирование, образование дисульфидных сшивок).

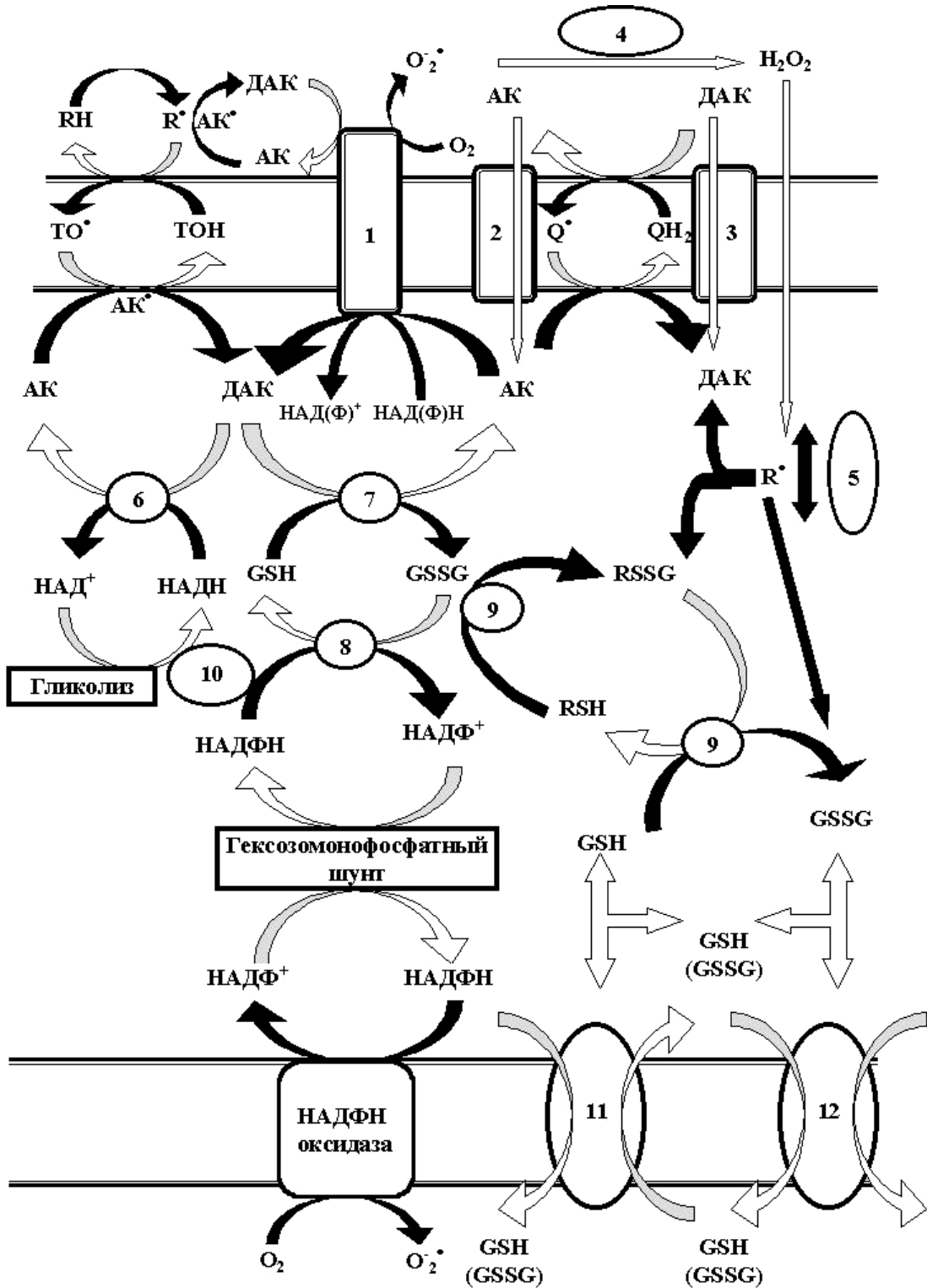


Рис. 4.4. Механизмы регуляции редокс-гомеостаза

Медленная (в течение десятков минут и нескольких часов) регуляция обеспечивается за счет изменения экспрессии основных ферментов и восстановителей.

Характерный для конкретной ткани тканевый и клеточный редокс-гомеостаз поддерживается в результате вклада различных механизмов. Даже сильно упрощенная схема, изображенная на рис. 4.4, указывает на сложный характер взаимодействий между различными механизмами редокс-регуляции. Поэтому для характеристики редокс-гомеостаза в организме необходимо введение универсальных физико-химических параметров, которые позволяют охарактеризовать конкретное редокс-состояние клеток или тканей без детального рассмотрения механизмов редокс-регуляции. Подробнее этот вопрос будет рассмотрен в гл. 5.

4.4. Содержание редокс-молекул в клетках и тканях в норме и при патологиях

В результате поддержания определенного редокс-гомеостаза концентрации основных восстановителей и окислителей в клетках и тканях существенно различаются. В этом разделе систематизированы литературные данные, связанные с определением содержания различных редокс-агентов в клетках и тканях.

В табл. 4.3. представлены данные о величинах концентрации аскорбиновой кислоты в различных тканях и клетках.

Из представленных данных следует, что наблюдается перераспределение витамина С в органах и тканях организма человека. Концентрация аскорбиновой кислоты во внеклеточной жидкости мозга и спинномозговой жидкости на порядок выше, чем в плазме крови. Все клетки, за исключением эритроцитов (эритроциты только в искусственных условиях при повышенной концентрации дегидроаскорбиновой кислоты способны накапливать аскорбиновую кислоту до концентраций 1–2 мМ [273]), способны накапливать аскорбиновую кислоту до концентраций, в 100 раз (а для нейронов в 1000 раз) превышающих концентрацию витамина С в крови. Различное распределение аскорбиновой кислоты наблюдается не только для тканей, но и для разных типов клеток одной ткани и одного органа. Так, для клеток крови значения внутриклеточной концентрации витамина С изменяются в диапазоне от 50 мкМ (в эритроцитах) до 8 мМ (в моноцитах); для клеток мозга от 1 мМ (в астроцитах) до 10 мМ (в нейронах). Уровень аскорбиновой кислоты в ряде типов клеток зависит от ее внеклеточной концентрации. Повышение концентрации аскорбиновой кислоты в крови вызывает соответствующее повышение внутриклеточ-

ной концентрации в гранулоцитах (эозинофилах и базофилах), тромбоцитах и эритроцитах (в моноцитах концентрация аскорбиновой кислоты практически не зависит от внеклеточной концентрации).

Следует отметить, что уровень аскорбата в тканях зависит не только от вида организма, но также и от пола. Для тканей мозга мужского организма характерно более высокое содержание аскорбиновой кислоты, чем для женского [274]. Наряду с этим отмечаются суточные колебания концентрации аскорбиновой кислоты в мозге. В ночное время суток концентрация аскорбиновой кислоты в стриатуме мозга крыс (животные, которые более активны ночью) в среднем на 20–60 % выше, чем в дневное время [275]. Показано, что функции поведения крыс зависят от концентрации витамина С в стриатуме мозга [276]. Колебания концентрации аскорбиновой кислоты в мозге крысы могут достигать 500 % [277].

Таблица 4.3

Содержание аскорбиновой кислоты в биологических жидкостях и тканях

Тип объекта	АК, мМ	Ссылка
Мозг мыши	3,0	[278]
Почка мыши	1,4	[278]
Печень мыши	1,7	[278]
Легкие мыши	3,0	[278]
Легкие человека	3,0	[279]
Мышцы мыши	0,9	[278]
Сердце мыши	1,4	[278]
Глазная жидкость	0,9	[280]
Хрусталик глаза	1,1	[280]
Стекловидное тело глаза	2,0	[280]
Надпочечная железа человека	1,9	[279]
Внеклеточная жидкость эпителия легких человека	0,05	[281]
Плазма крови человека	0,05 – 0,1	[282]
Цереброспинальная жидкость крысы	0,5	[283]
Внеклеточная жидкость мозга крысы	0,4	[284]
Цитоплазма эритроцитов человека	0,05 – 0,1	[285]
Цитоплазма тромбоцитов человека	2,0 – 4,0	[285]
Цитоплазма гранулоцитов человека	1,2 – 2,5	[285]
Цитоплазма моноцитов человека	6,0 – 8,0	[286]
Цитоплазма β-клеток крысы	4,0	[287]
Цитоплазма астроцитов человека	1,0	[288]
Цитоплазма нейронов человека	10,0	[288]
Хромаффинные гранулы клеток надпочечников	22,0	[289]

Концентрация аскорбата в мозге крыс повышается при травме, ишемии и реперфузии [290, 291]. Показано, что концентрация аскорбиновой кислоты в лимфоцитах больных лейкемией в 2 раза превышает концентрацию витамина в клетках здоровых людей [292].

В организмах млекопитающих наблюдается также неравновесное распределение глутатиона в тканях и жидкостях. Ряд современных исследователей используют восстановительный потенциал глутатиона в качестве универсального индикатора редокс-состояния клеток и тканей. Однако следует отметить, что значения восстановительного потенциала глутатиона будут различаться не только при изменении отношения концентраций окисленных и восстановленных форм глутатиона (GSH/GSSG), а будут также различаться при одном и том же значении отношения GSH/GSSG, но при различных концентрациях GSH. Значение восстановительного потенциала глутатиона в клетках и тканях зависит от концентрации GSH и данный факт необходимо учитывать при сравнении восстановительных потенциалов в клетках и тканях. В данном разделе важно обратить внимание на различия в величинах концентрации глутатиона в клетках и тканях, существующие в организме человека и других млекопитающих. Данные о величинах концентрации глутатиона в различных тканях и клетках представлены в табл. 4.4.

Как видно из представленных данных в табл. 4.3. и 4.4, некоторые типы клеток преимущественно накапливают аскорбиновую кислоту, другие – глутатион. Различия в концентрациях восстановителей наблюдаются не только в разных тканях, но и в одних и тех же тканях, относящихся к разным видам организмов. Например, содержание глутатиона в плазме крови мыши значительно выше, чем в плазме крови людей.

Для многих заболеваний характерным является понижение концентрации глутатиона в тканях и биологических жидкостях, исключением являются только онкологические заболевания, при которых концентрация глутатиона в тканях повышается. В клетках карциномы печени содержится в 2 раза больше глутатиона, чем в гепатоцитах в норме [293]. Следует отметить, что концентрация глутатиона в опухолевых клетках может значительно превышать концентрацию глутатиона в нормальных клетках. В клетках эпидермальной карциномы (epidermoid carcinoma) концентрация глутатиона (24,36 нМ/мг белка) в 8 раз превышает норму (3,04 нМ/мг белка) [294]. Увеличение концентрации восстановителей в клетках при раке сопровождается повышением концентрации окислителей во внеклеточной среде. У больных раком содержание глутатиона в эритроцитах в 2 раза превышает норму (9,3 мг/г глутатиона против

4,4 мг/г глутатиона соответственно), а концентрация пероксида водорода в крови выше нормальной в 2,5 раза (6,2 мкМ против 2,5 мкМ) [295].

Содержание других восстановителей в тканях и биологических жидкостях также различается. Например, концентрация мочевой кислоты (основной водорастворимый восстановитель в крови, концентрация в плазме крови около 300 мкМ) в клетках на несколько порядков ниже, чем во внеклеточной среде.

Таблица 4.4

Содержание глутатиона в биологических жидкостях и тканях

Тип объекта	GSH, мМ	Ссылка
Мозг мыши	2,5	[278]
Печень мыши	6,6 – 7,9	[278, 296]
Почка мыши	5,3 – 6,0	[293, 278]
Легкие мыши	1,2 – 1,5	[278, 293]
Поджелудочная железа мыши	1,4	[293]
Селезенка мыши	1,6	[293]
Сердце мыши	0,5 – 1,4	[293, 278]
Мышцы мыши	0,9	[278]
Плазма крови мыши	0,075	[293]
Кровь человека	0,9	[297]
Плазма крови человека	0,003	[282]
Внеклеточная жидкость эпителия легких человека	0,3 – 0,4	[298]
Внеклеточная жидкость эпителия легких человека (идиопатический легочный фиброз)	0,1	[299]
Внеклеточная жидкость эпителия легких ВИЧ-инфицированного человека	0,17	[300]
Эпителиоподобная линия клеток человека HT29	3,0	[301]
Цитоплазма β-клеток крысы	1,5	[287]
Желчь крысы	1,9	[302]
Цитоплазма гепатоцитов крысы	8,2	[303]
Матрикс митохондрий гепатоцитов крысы	11,0	[300]
Цитоплазма эритроцитов человека	2,1	[304]
Цитоплазма эритроцитов человека (малярия)	1,4	[301]
Цитоплазма нейронов человека	2,5	[288]
Цитоплазма астроцитов человека	8,0	[288]

Существенны также различия в концентрациях окислителей и, в частности, H₂O₂ в тканях в норме и при патологиях (табл. 4.5). Как видно из представленных данных, значения концентрации пероксида водорода в различных клетках и биологических жидкостях изменяются в широком диапазоне, при этом внеклеточные концентрации окислителя выше внут-

риклеточных. Как было отмечено в разделе 4.2, на плазматической мембране клетки поддерживается определенный градиент концентрации пероксида водорода. Следует обратить внимание на тот факт, что значения концентрации пероксида водорода, представленные в табл. 4.5, значительно выше, чем считалось ранее (на протяжении многих лет считалось, что концентрация пероксида водорода в клетках и тканях в норме не превышает 10^{-9} – 10^{-7} М).

Таким образом, из представленных в данном разделе данных следует, что в тканях, клетках и органеллах различных организмов поддерживается определенный редокс-гомеостаз, в результате чего концентрации клеточных и тканевых окислителей и восстановителей различаются.

Таблица 4.5

Содержание пероксида водорода в биологических жидкостях и тканях

Тип объекта	H ₂ O ₂ , мкМ	Ссылка
Плазма крови человека (норма)	2 – 3	[304]
Плазма крови человека (рак)	6	[304]
Глазная жидкость (норма)	20	[305]
Глазная жидкость (катаракта)	200	[305]
Хрусталик глаза	100	[306]
Моча (норма)	15	[304]
Моча (рак)	56	[304]
Цитоплазма <i>Escherichia coli</i> (логарифмическая фаза роста)	0,25	[307]
Цитоплазма <i>Escherichia coli</i> (стационарная фаза роста)	0,15	[307]
Цитоплазма клеток меланомы человека (логарифмическая фаза роста)	3,3	[308]
Цитоплазма клеток меланомы человека (стационарная фаза роста)	2,1	[308]
Корешки проростков риса	1000 – 2000	[309]
Листья проростков кукурузы	1000 – 2000	[310]
Листья <i>Arabidopsis</i>	60 – 7000	[311, 312]

Для понимания механизмов регуляции редокс-гомеостаза необходимы дальнейшие исследования, центральное место в которых должно занимать развитие новых методов измерения внутриклеточной и внеклеточной концентрации окислителей и восстановителей, развитие интегральных методов количественного описания редокс-гомеостаза, определение интегральных параметров редокс-гомеостаза.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ РЕДОКС-СОСТОЯНИЯ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ

5.1. Электродный редокс-потенциал в тканях

Новые представления о роли окислительно-восстановительных процессов в регуляции активности клеток и многоклеточных организмов, появившиеся в последние годы, поставили вопрос о количественном определении физико-химических параметров, характеризующих редокс-состояние клетки и тканей.

На протяжении многих лет для количественной характеристики окислительно-восстановительного равновесия в живых системах использовался электродный редокс-потенциал. Электродный редокс-потенциал обозначает различия в величине 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. В зависимости от окислительно-восстановительных условий 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 [313].

Редокс-потенциал измеряется в чрезвычайно сложном по химическому строению биосубстрате. По мнению ряда авторов, величина электродного редокс-потенциала в тканях животных (в межклеточной жидкости) зависит от сложного баланса многих факторов, среди которых парциальное давление кислорода, концентрации окисленных и восстановленных форм органических соединений в среде, концентрация водородных катионов (или pH), концентрация электролитов, активность ферментов (оксидаз, определяющих высокие значения потенциала, и дегид-

рогеназ, снижающих потенциал). По определению Сумарукова Г. В., 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 [314]. Прилуцкий В. И. и Бахир В. М. считают, что значение редокс-потенциала в тканях организма в биологических средах отражает суммарное соотношение электронодонорных или электроноакцепторных свойств биологических сред относительно их собственных эндогенных компонент и веществ экзогенного происхождения [313].

К концу прошлого столетия было накоплено много данных, указывающих на то, что изменения в окислительно-восстановительных процессах организма (индикатором которых является величина электродного редокс-потенциала крови) наблюдаются в различных состояниях организма [315]. Однако механизмы, лежащие в основе этих явлений, до сих пор полностью не изучены. Авторы, изучающие редокс-потенциал в живых системах, подчеркивают сложность его интерпретации и отмечают, что причины, обуславливающие установление его величины, не ясны. Так как колебания значений редокс-потенциала во внутренних средах организма, составляющие всего лишь десятки мВ, физиологически существенны, то ряд авторов считает, что измеряемый электродный редокс-потенциал должен занять свое место в ряду актуальных гомеостатических характеристик [216].

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.

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 в настоящее

время существует множество физико-химических методов анализа, позволяющих проводить мониторинг изменений внутриклеточной концентрации основных окислителей и восстановителей, в том числе пероксида водорода, окиси азота, окисленной и восстановленной форм глутатиона, окисленной и восстановленной форм никотинамидадениндинуклеотида и др. [317–320].

В настоящее время представляется перспективным оценивать изменения редокс-потенциала клетки, используя значения концентраций основных внутриклеточных окислителей и восстановителей. Достижения, преимущества и недостатки этих подходов рассмотрены в разд. 5.2 и 5.3.

5.2. Редокс-потенциал глутатиона в клетках и тканях

Учитывая то обстоятельство, что практически все известные заболевания сопровождаются усилением внутриклеточных процессов окисления и ослаблением активности АОС, количественная оценка редокс-состояния с целью ранней диагностики и лечения заболеваний является весьма актуальной на протяжении многих лет. Ряд исследователей считают, что ведущую роль в функционировании АОС играют низкомолекулярные и высокомолекулярные тиоловые соединения [321–325].

Еще в 1936 г. Г. Селье отметил снижение уровня глутатиона в крови животных в ответ на введение адренокортикотропного гормона (АКТГ) и предложил использовать это явление как тест на стрессовое воздействие. В 60-е гг. прошлого века было выполнено большое количество клинических исследований, которые показали, что самые разные заболевания вызывают одну и ту же реакцию – 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 г. 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 (ТДС) может служить интегральным показателем адаптивных возможностей организма или показателем его неспецифической резистентности [326].

Как показали многочисленные клинические и экспериментальные исследования, выполненные с 1970 г., многие заболевания, такие как ишемическая болезнь сердца и инфаркт миокарда, бронхиальная астма, хронический гастродуоденит и язвенная болезнь двенадцатиперстной кишки, поздние токсикозы беременных, ангина, дифтерия, инфекционный мононуклеоз, брюшной тиф, вирусный гепатит, черепно-мозговая травма, а также неблагоприятные факторы окружающей среды (лазерное излучение, магнитное поле, физическая нагрузка, токсические вещества, аллергены, шум) действительно приводят к синхронному изменению уровня восстановленных и окисленных тиоловых групп в сыворотке крови [321, 322, 326, 327]. Для оценки ТДС требуется определение содержания SH- и SS-групп в небелковой и белковой фракциях крови или тканей с дальнейшим расчетом их соотношения. В настоящее время наиболее доступным и чувствительным методом является метод амперометрического титрования [328]. Несмотря на то, что ТДС может служить объективным показателем ранних патологических изменений, данный подход не применим к изучению внутриклеточного редокс-состояния.

В настоящее время широкое использование для количественной характеристики внутриклеточного редокс-состояния получил такой параметр, как восстановительный потенциал глутатиона или редокс-потенциал глутатиона. По мнению ряда исследователей, глутатион является основным восстановителем клеток [329]. Основным методом определения внутриклеточных и внеклеточных концентраций GSH и GSSG является высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖК).

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 ($T=298 \text{ K}$, $\text{pH } 7,0$) равен -240 мВ , и переходя к десятичному логарифму, уравнение Нернста для данной реакции можно записать в виде:

$$E_{\text{GSSG}/2\text{GSH}} = \left(-240 + \frac{59,1}{2} \lg \frac{[\text{GSSG}]}{[\text{GSH}]^2} \right) \text{ мВ} . \quad (5.2)$$

Различным тканям в организме соответствуют свои значения редокс-потенциала глутатиона. В табл. 5.1 представлены значения редокс-потенциала в различных тканях мыши.

Согласно этим данным наименьшее значение редокс-потенциала глутатиона наблюдается в печени (-229 мВ) и почках (-221), наибольшее – в сердце (-93 мВ) и плазме 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 глюконеогенеза, протекает в основном в печени и почках и сопряжен с образованием дополнительных молекул НАДН в цитоплазме клеток. Повышение содержания доноров электронов в результате метаболизма углеводов способствует поддержанию более высокого значения $E_{GSSG/2GSH}$. Более низкое значение $E_{GSSG/2GSH}$ в тканях сердца по сравнению с другими тканями, по-видимому, опосредовано высоким аэробным метаболизмом, ведущим к усилению окислительных процессов. 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 5.1

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	1,560	0,110	-150
Сердце	0,470	0,086	-93
Эритроциты	0,303	0,040	-90
Плазма крови	0,075	0,019	-35

Примечание. В таблице использованы данные работы [296]. Концентрации GSH и GSSG в тканях измерены с помощью флуоресцентной пробы о-фталалдегида.

Между внутримитохондриальным пространством и цитоплазмой клетки существует разность значений восстановительных потенциалов. $E_{GSSG/2GSH}$ имеет более высокие значения в митохондриях, чем в цитоплазме. При этом наблюдается различие значений $E_{GSSG/2GSH}$ для митохондрий, выделенных из различных тканей (табл. 5.2). Как и для тканей в целом (см. табл. 5.1), редокс-потенциал глутатиона имеет наибольшее значение в митохондриях клеток сердца.

Следует отметить, что величина $E_{GSSG/2GSH}$ в тканях с возрастом увеличивается. Чем старше организм, тем выше значение редокс-потенциала глутатиона. Из представленных в табл. 5.2 данных следует, что быстрее и больше всего «стареют» митохондрии сердца, а медленнее – митохондрии мозга.

Подобная корреляция значений редокс-потенциала глутатиона с возрастом обнаружена в плазме крови людей [330]. 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-потенциала глутатиона в крови людей увеличивается только после 45 лет. При этом скорость изменения величины $E_{GSSG/2GSH}$ в плазме крови с возрастом составляет 0,7 мВ в год.

Таблица 5.2

Изменение редокс-потенциала глутатиона в митохондриях различных тканей мышцы с возрастом

Тип ткани	Возраст мышцы, мес.			
	4	10	22	26
	$E_{GSSG/2GSH}$, мВ			
Мозг	-305±4	-307±2	-302±2	-302±2
Семенники	-297±1	-295±2	-290±1	-286±1
Глаз	-297±1	-296±1	-286±1	-287±2
Печень	-295±5	-290±6	-284±2	-283±4
Почка	-283±2	-281±2	-277±2	-272±2
Сердце	-262±2	-261±1	-249±1	-248±1

Примечание. Таблица составлена с использованием данных [331]. Концентрации GSH и GSSG в тканях измерены методом ВЭЖХ в комбинации с электрохимическим мониторингом. В расчетах использовано значение $E^0 = -288$ мВ (при pH 7,8).

Следует отметить, что распределение значений редокс-потенциала глутатиона в тканях зависит от вида исследуемого организма. Показано, что значения $E_{GSSG/2GSH}$ в гомогенатах одних и тех же тканей эмбрионов кролика и крысы различны [332]. Значительные отличия в редокс-состояниях наблюдаются как для различных отделов эмбриона одного вида, так и для одинаковых отделов эмбрионов разных видов. В тканях эмбриона кролика окислительные процессы протекают более интенсивно, чем в тканях эмбриона крысы.

Крыса и кролик являются наиболее используемыми видами животных в лабораторных экспериментах в исследованиях механизма действия тератогенов. Обнаружено, что эффекты тератогенов зависят от вида организма. Так как многие тератогены вызывают окислительный стресс, предполагается, что видовые отличия в редокс-состоянии могут лежать в основе механизма повышенной чувствительности организма к тератогенам [333].

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 – в пределах от -180 до -290 мВ [296]. Внутренняя среда эндоплазматического ретикула в сравнении с внутренней средой митохондрий и ядра является более окисленной по отношению к цитозолю. Отношение концентраций восстановленной формы глутатиона к окисленной внутри эндоплазматического ретикула изменяется в диапазоне от 1:1 до 3:1 [334]. Согласно уравнению (5.2) редокс-потенциал пары GSSG/2GSH в эндоплазматическом ретикуле изменяется в диапазоне от -160 мВ до -180 мВ. Редокс-потенциал глутатиона в плазме крови человека значительно отличается от клеточного и равен (-137 ± 9) мВ [282].

Результаты экспериментальных исследований указывают на то, что редокс-состояние пулов глутатиона в плазме крови отдельных людей отличаются незначительно [335]. Показано также, что в культурах клеток в результате метаболизма внеклеточное редокс-состояние поддерживается постоянным [335]. Таким образом, многочисленные экспериментальные данные указывают на существование механизма регуляции редокс-состояния не только в клетках, но и во внеклеточных жидкостях.

В настоящее время обнаружено, что в течение жизненного цикла клеток наблюдаются изменения значений редокс-потенциала глутатиона в цитоплазме при переходе от пролиферации к дифференцировке и апоптозу. В пролиферирующих клетках величина $E_{GSSG/2GSH}$ изменяется в диапазоне от -260 мВ до -230 мВ [298, 335]. Показано, что в недифференцированных клетках линии HT29 значение редокс-потенциала глутатиона составляет примерно -260 мВ [298]. 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 мВ до -190 мВ) [298, 336]. Обнаружено, что у фибробластов в норме при контактном ингибировании пролиферации редокс-потенциал глутатиона в цитоплазме изменяется на $+34$ мВ по сравнению с пролиферирующими клетками [336]. В клетках фибросаркомы при увеличении плотности культуры $E_{GSSG/2GSH}$ не изменяется и не наблюдается контактного ингибирования роста [336]. При апоптозе в клетках активируется транспорт GSH из клетки наружу, что сопровождается дальнейшим снижением $E_{GSSG/2GSH}$ (до -170 мВ и ниже) [337]. В клетках линии HL60

процессам пролиферации соответствует значение величины редокс-потенциала глутатиона, равное -240 мВ [338]. С переходом к апоптозу в клетках линии HL60 происходит изменение потенциала на $+72$ мВ (с -239 до -167 мВ), а в клетках линии HT29 потенциал изменяется на $+86$ мВ.

Следует отметить, что скорость клеточной пролиферации зависит также от внеклеточного $E_{GSSG/2GSH}$. В исследованиях, проведенных на клетках аденокарциномы человека линии Сасо-2, показано, что максимальная скорость клеточной пролиферации наблюдалась при $E_{GSSG/2GSH}$ во внеклеточной среде, равном -150 мВ, а минимальная – при $E_{GSSG/2GSH} = 0$ мВ [339]. Значительных изменений внутриклеточной концентрации GSH при этом не наблюдалось.

Обнаружено, что факторы роста IGF-1 (insulin-like growth factor 1) и EGF (epidermal growth factor) стимулируют пролиферацию при значениях внеклеточного $E_{2GSH/GSSG}$ в диапазоне от 0 до -80 мВ. При $E_{GSSG/2GSH} = -150$ мВ факторы роста IGF-1 и EGF не изменяют скорость роста [340]. Наряду с этим показано, что факторы роста IGF-1, EGF и KGF (keratinocyte growth factor) вызывают изменения внеклеточного редокс-состояния в направлении к тем значениям, которые обнаружены в плазме [340]. При контактном ингибировании роста клеток в культуре также наблюдалось смещение значений параметров внеклеточного редокс-состояния к более высоким значениям [341].

Несмотря на широкое использование изменений величины восстановительного потенциала редокс-пары GSSG/GSH в качестве индикатора изменений редокс-состояния биологической среды данный метод обладает рядом ограничений. Во-первых, глутатион не всегда является основным антиоксидантом биологической среды. Например, в крови концентрация аскорбиновой кислоты и цистеина на порядок выше, чем концентрация глутатиона. Поэтому ряд исследователей для количественной характеристики редокс-состояния крови предпочитают использовать редокс-пару цистин/цистеин (CysSS/Cys) [342]. При этом изменения редокс-состояния плазмы крови, количественно отображаемые значением редокс-потенциала пары CysSS/Cys, не всегда сопровождаются изменением значения редокс-потенциала глутатиона. Показано, что редокс-потенциал пары CysSS/Cys в плазме крови и цитоплазме клетки не зависит от редокс-потенциала пары GSSG/2GSH [342]. Наряду с этим следует отметить, что значения концентраций GSH и GSSG могут быть модифицированы в течение процедуры изоляции клеток из-за искусственного окисления GSH [282].

5.3. Восстановительный потенциал редокс-пары НАД(Ф)⁺/НАД(Ф)Н и регуляция метаболизма

Пиридиннуклеотиды НАД⁺ и НАДФ⁺ являются кофакторами дегидрогеназ различных метаболических путей. НАДН служит донором электронов для дыхательной цепи и, следовательно, участвует в энергетическом обмене. НАДФН является самым важным восстановителем при биосинтезе. НАД⁺ является акцептором электронов в процессах окисления жирных кислот, углеводов и аминокислот. В таблице 5.3 представлен ряд ферментов основных метаболических путей клеток млекопитающих, активность которых зависит от отношения концентраций НАД⁺ и НАДН в среде.

Таблица 5.3

Отношение НАД⁺/НАДН и активность дегидрогеназ в основных метаболических путях

Название фермента	Метаболический путь	Высокое отношение НАД ⁺ /НАДН	Низкое отношение НАД ⁺ /НАДН
Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа	Аэробный и анаэробный гликолиз	+	–
Лактатдегидрогеназа	Анаэробный гликолиз	–	+
Дигидролипоамид-дегидрогеназа	Окисление пирувата в ацил-СоА	+	–
3-оксиацил-СоА-дегидрогеназа	β-окисление жирных кислот	+	–
Изоцитратдегидрогеназа	Цикл лимонной кислоты	+	–
2-оксоглутарат-дегидрогеназа	Цикл лимонной кислоты	+	–
Малатдегидрогеназа	Цикл лимонной кислоты	+	–
Глицерол-3-фосфат-дегидрогеназа	Глюконеогенез	–	+
Лактатдегидрогеназа	Глюконеогенез	+	–
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 может привести к переключению аэробного гликолиза на анаэробный. Повышение концентрации НАДН является необходимым для переключения клеточного метаболизма с процессов гликолиза на процессы глюконеогенеза (см. табл. 5.3). Таким образом, можно предположить, что отношение НАД⁺/НАДН регулирует в клетке баланс процессов катаболизма и анаболизма.

Отношение НАД⁺/НАДН является одним из факторов регуляции цикла лимонной кислоты. Если клетка не расходует АТФ, то в митохондриях наблюдается недостаток АДФ. В отсутствие АДФ АТФ-синтаза не в состоянии использовать протонный градиент на внутренней митохондриальной мембране. Это, в свою очередь, тормозит электронный перенос в дыхательной цепи, вследствие чего НАДН не может быть вновь окислен в НАД⁺. Возникающее в результате низкое соотношение НАД⁺/НАДН тормозит цикл лимонной кислоты и замедляет тем самым потребление субстрата. В цикле лимонной кислоты НАДН наряду с пируватдегидрогеназным и оксоглутаратдегидрогеназным комплексами ингибирует также цитратсинтазу и изоцитратдегидрогеназу.

Вероятно, процесс передачи электронов от НАД(Ф)Н к внутриклеточным глутатиону и витамину С следует рассматривать как один из механизмов регуляции метаболизма, альтернативный механизму энергетического сопряжения.

Рядом авторов развивается концепция о том, что величина концентрации цитозольного НАДН является сенсором потока крови [343]. Для оценки внутриклеточного отношения концентраций НАД⁺/НАДН используется метод метаболических индикаторов, впервые описанный в 1967 г. [344]. В основе метода лежат два предположения: (1) между отношением концентраций НАД⁺/НАДН и лактат/пируват в цитозоле существует равновесие, которое поддерживается в результате активности фермента лактатдегидрогеназы (LDH) ($k_{LDH} = 1,11 \times 10^{-4}$ при pH 7,0):



$$\frac{[\text{НАДН}]_{\text{цит}}}{[\text{НАД}^+]_{\text{цит}}} = \frac{[\text{лактат}]_{\text{цит}}}{[\text{пируват}]_{\text{цит}}} \times k_{LDH}; \quad (5.4)$$

(2) между цитозольной и внеклеточной концентрациями лактата и пирувата поддерживается равновесие с помощью монокарбокисильных переносчиков [345].

В состоянии покоя отношение НАДН/НАД⁺ в тканях составляет $(10 - 20) \times 10^{-4}$, поэтому изменения величины отношения в основном

опосредованы изменением концентрации НАДН [346]. 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 [346]. Предполагается, что увеличение отношения лактат/пируват увеличивает скорость потока крови в результате изменения отношения цитозольного НАДН/НАД⁺ [346]. Повышение концентрации НАДН увеличивает генерацию \dot{O}_2^- [347], который через повышение цитозольного кальция активирует eNOS.

В быстро делящихся раковых клетках гликолиз идет со скоростью, значительно превышающей возможности цикла лимонной кислоты. В результате скорость образования пирувата превосходит скорость его потребления, что приводит к повышенному образованию лактата и локальному повышению кислотности в опухолевых тканях.

При интенсивной мышечной работе повышение внеклеточной концентрации лактата активирует глюконеогенез в клетках печени и клетках почечных канальцев. Показано, что в почках кролика активация глюконеогенеза приводит к росту отношений внутриклеточных концентраций GSH/GSSG и НАДФН/НАДФ⁺ [348].

В митохондриях млекопитающих обмен восстановленными эквивалентами между цитоплазматическим и митохондриальным НАДН и НАД⁺ осуществляется в основном при помощи челночного механизма, использующего пару малат-оксалоацетат. Обмен восстановленными эквивалентами между цитоплазматическим НАДФН и НАДФ⁺ и митохондриальным НАД⁺ и НАДН осуществляется НАДФН:НАДН-трансдегидрогеназой. Следует отметить, что перенос электронов от НАДФН к GSSG катализирует фермент глутатионредуктаза.

Однако использование редокс-потенциалов GSSG/2GSH и НАДФ⁺/НАДФН в качестве индикаторов изменения редокс-состояния тканей приводит к неоднозначным результатам. В таблице 5.4 представлены результаты измерения редокс-потенциалов GSSG/2GSH и НАДФ⁺/НАДФН в трех отделах мозга двухмесячных мышей в норме и при окислительном стрессе.

Как видно из представленных данных, при окислительном стрессе наибольшее изменение величины редокс-потенциала наблюдается для редокс-пары GSSG/2GSH. Значения $E_{GSSG/2GSH}$ в стриатуме и среднем мозге указывают на различие редокс-состояний в этих отделах, тогда как на основе анализа величин $E_{НАДФ/НАДФН}$ этих различий не обнаруживается. Согласно данным табл. 5.4, наибольшие изменения величины

$E_{GSSG/2GSH}$ наблюдаются в коре головного мозга, тогда как наибольшие изменения величины $E_{НАДФ^+/НАДФН}$ наблюдаются для стриатума.

Таблица 5.4

Редокс-потенциалы GSSG/2GSH и НАДФ⁺/НАДФН в тканях мозга мыши в норме и при окислительном стрессе [по данным 349]

	Контроль	5 мин*	Контроль	5 мин*
	$E_{GSSG/2GSH}$, мВ		$E_{НАДФ^+/НАДФН}$, мВ	
Кора головного мозга	-225	-146	-323	-308
Стриатум	-223	-153	-327	-299
Средний мозг	-212	-176	-327	-320

* Время после инъекции трет-бутила гидропероксида.

Таким образом, количественная характеристика редокс-состояния на основе использования редокс-потенциала только одной редокс-пары недостаточно адекватно отображает окислительно-восстановительный баланс в тканях и его изменение при окислительном стрессе.

5.4. Эффективный восстановительный потенциал в клетках и тканях

При варьировании концентрации внутриклеточных окислителей и восстановителей может существенно изменяться скорость и направление переноса электронов между цитозольными низкомолекулярными соединениями и белками, что может сопровождаться изменением активности белков и клетки в целом.

Низкомолекулярные внутриклеточные окислители и восстановители, выступая в роли переносчиков электронов, являются важными регуляторами активности белков. При взаимодействии низкомолекулярных цитозольных редокс-молекул с белками изменяется состояние белковых тиолов и таким образом регулируется активность многих внутриклеточных белков. В биологической среде редокс-состояние зависит от взаимодействия многих редокс-пар и не может быть охарактеризована на основе классического уравнения Нернста.

Для характеристики «суммарной» способности многокомпонентной среды в стандартных условиях отдавать или принимать электроны нами предлагается использовать такой физико-химический параметр, как эффективный восстановительный потенциал [3, 350].

При выводе формулы для расчета эффективного восстановительного потенциала рассмотрим среду, содержащую большое количество редокс-пар, концентрации восстановленных форм которых равны c_1, c_2, \dots, c_k . Перенос заряда в клетках может происходить между компонентами нескольких типов редокс-пар. Не представляется возможным определить суммарное значение редокс-потенциалов всех редокс-пар, присутствующих в биологической среде, т. к. редокс-потенциал не является функцией состояния. Однако условие аддитивности выполняется для такой функции состояния как энергия Гиббса.

При изобарно-изотермических условиях работа, которая может быть осуществлена системой ($A_{эл}$) в обратимом процессе, равна убыли свободной энергии Гиббса ($-\Delta G$) в системе. Работа, выполняемая по переносу заряда при восстановлении n молей вещества в окислительно-восстановительной реакции, будет определяться выражением:

$$A_{эл} = -\Delta G = QE = znFE, \quad (5.5)$$

где Q – перенесенный заряд, n – количество вещества в молях, E – восстановительный потенциал данного вещества.

Воспользуемся выражением (5.5) для определения эффективного редокс-потенциала многокомпонентной среды. Свободная энергия Гиббса системы, соответствующая установлению равновесия между компонентами среды, будет определяться суммой равновесных значений энергии Гиббса всех реакций:

$$\Delta G_{\text{сист}}^0 = \sum_i^k G_i^0. \quad (5.6)$$

При восстановлении k типов веществ в окислительно-восстановительных реакциях переносится заряд, равный

$$Q = \sum_i^k z_i n_i F, \quad (5.7)$$

где z_i – число электронов, переносимых в i -й реакции, n_i – количество вещества восстановленной формы i -й редокс-пары в молях. Работа по переносу электронов ($A_{эл}$), выполняемая при протекании всех внутриклеточных окислительно-восстановительных реакций при pH 7,0, будет равна:

$$A_{эл} = -\sum_i^k G_i^0 = \sum_i^k z_i n_i FE_i^{0'}, \quad (5.8)$$

$E_i^{0'}$ – стандартный восстановительный потенциал i -й редокс-пары при pH 7,0. Тогда эффективный восстановительный потенциал системы $E^{\text{эфф}}$ можно определить как

$$E^{\text{эфф}} = \frac{A_{\text{эл}}}{Q} = \frac{\sum_i^k z_i n_i F E_i^{0'}}{\sum_i^k z_i n_i F} = \frac{\sum_i^k z_i n_i E_i^{0'}}{\sum_i^k z_i n_i}. \quad (5.9)$$

В выражении (5.9) вместо количества вещества можно перейти к молярным концентрациям вещества, используя соотношение $c_i = n_i / V_p$, где V_p – объем раствора:

$$E^{\text{эфф}} = \frac{\sum_i^k z_i n_i E_i^{0'}}{\sum_i^k z_i n_i} \cdot \frac{V_p}{V_p} = \frac{\sum_i^k z_i \left(\frac{n_i}{V_p} \right) E_i^{0'}}{\sum_i^k z_i \left(\frac{n_i}{V_p} \right)} = \frac{\sum_i^k z_i c_i E_i^{0'}}{\sum_i^k z_i c_i}. \quad (5.10)$$

Используя формулу (5.10) можно получить следующее выражение для эффективного редокс-потенциала среды:

$$E^{\text{эфф}} = \sum_{i=1}^k a_i \cdot E_i^{0'}, \quad (5.11)$$

где коэффициент

$$a_i = \frac{c_i z_i}{\sum_{j=1}^k c_j z_j} \quad (5.12)$$

представляет собой «удельный заряд», переносимый в реакции i -й редокс-парой, т. е. отношение заряда, перенесенного i -й редокс-парой, к суммарному заряду, перенесенному во всех реакциях.

В частном случае для одноэлектронных редокс-реакций коэффициент a_i является мольной долей вещества, тогда

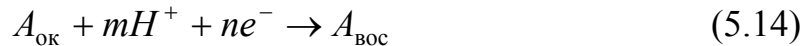
$$E^{\text{эфф}} = \sum_{i=1}^k x_i \cdot E_i^{0'}, \quad (5.13)$$

где x_i – мольная доля вещества.

При таком определении эффективный редокс-потенциал можно рассматривать как интегральную характеристику биологической среды, аналогичную pH .

В окислительно-восстановительных процессах, протекающих в биологических системах, перенос электронов часто сопряжен с переносом

протона. Поэтому значение редокс-потенциала ряда редокс-пар зависит от pH . Для окислительно-восстановительной реакции типа



редокс-потенциал при $t=37^{\circ}\text{C}$ может быть определен с помощью выражений:

$$E_{pH} = E^0 + \frac{61,5}{n} \lg \frac{[A_{\text{ок}}][H^+]^m}{[A_{\text{вос}}]} = E^0 + \frac{61,5}{n} \lg \frac{[A_{\text{ок}}]}{[A_{\text{вос}}]} + \frac{61,5}{n} \lg [H^+]^m. \quad (5.15)$$

Тогда зависимость редокс-потенциала от pH с учетом формулы (1.12) определяется с помощью выражения:

$$E_{pH} = E + \frac{61,5}{n} \lg [H^+]^m \text{ (мВ)}, \quad (5.16)$$

или

$$E_{pH} = E - \frac{61,5 \cdot m}{n} \cdot pH \text{ (мВ)}, \quad (5.17)$$

где n – число переносимых электронов в редокс-реакции, m – число переносимых протонов в редокс-реакции.

В организме человека значение pH для различных жидкостей изменяется в довольно широких пределах в зависимости от их природы. Так, например, pH сыворотки крови равно 7,4, тогда как pH желудочного сока близко к 1. Различие в pH следует учитывать при определении эффективного восстановительного потенциала в различных биологических жидкостях. В условиях равновесия при pH 7,0 выражение (5.17) примет вид:

$$E^{0'} = E^0 - \frac{61,5 \cdot m}{n} \cdot 7,0 \text{ (мВ)}. \quad (5.18)$$

С учетом pH выражение для эффективного восстановительного потенциала в биологических жидкостях может быть преобразовано к виду:

$$E_{pH}^{\text{эфф}} = \sum_{i=1}^k a_i \cdot E_i^{0'} - 61,5 \cdot \sum_{i=1}^l a_i \cdot \frac{m_i}{n_i} (pH - 7,0) \text{ (мВ)}, \quad (5.19)$$

где l – число окислительно-восстановительных реакций, протекающих с переносом протонов.

В биологических средах значение эффективного восстановительного потенциала ($E^{\text{эфф}}$) зависит от концентрации внутриклеточных окислителей и восстановителей. При определении $E^{\text{эфф}}$ учитывается значение редокс-потенциала для каждого переносчика электронов в цитоплазме со своим «весовым коэффициентом». Вклад таких переносчиков в величину $E^{\text{эфф}}$ определяется концентрацией переносчика. При практическом при-

менении параметра $E^{\text{эфф}}$ для количественного описания редокс-состояния достаточно учитывать вклад основных клеточных редокс-молекул.

При использовании редокс-потенциала глутатиона в качестве индикатора изменений редокс-состояния считается, что глутатион является преобладающим восстановителем в системе. Однако, как показывают многочисленные исследования, в биологических жидкостях концентрации различных восстановителей изменяются в широком диапазоне. При этом концентрация глутатиона в некоторых биологических жидкостях может быть значительно ниже концентраций других восстановителей. В таблице 5.5 представлены данные о значениях концентраций основных восстановителей в различных биологических жидкостях.

Таблица 5.5

Концентрации основных восстановителей в некоторых биологических жидкостях

Тип объекта	GSH, мМ	АК, мМ	НАДФН, мМ	UH ₂ , мМ
Плазма крови человека	0,003	0,1	0,001	0,3
Внеклеточная жидкость эпителия легких человека	0,3	0,05	0,001	0,2
Внеклеточная среда стриатума мозга крысы	0,001	0,07	0,001	0,01
Цитоплазма β-клеток крысы	1,5	4	0,04	0,01
Цитоплазма моноцитов человека	2	5	0,03	0,01
Цитоплазма нейронов человека	2,5	5	0,03	0,001
Цитоплазма фибробластов мышцы	1,5	1	0,03	0,001
Желчь печени крысы	1	0,05	0,001	0,1
Цитоплазма гепатоцитов крысы	7	1	0,03	0,01
Цитоплазма астроцитов человека	8	0,8	0,03	0,001
Цитоплазма эритроцитов человека	2	0,2	0,1	0,01
Матрикс митохондрий гепатоцитов крысы	10	1	6	0,01

Как видно из представленных данных, в цитоплазме нейронов, β-клеток поджелудочной железы, моноцитов и во внеклеточной жидкости в мозге преобладает по содержанию аскорбиновая кислота, тогда как в других типах биологических жидкостях – глутатион или другие антиокислители. Таким образом, при оценке редокс-состояния биологических сред важно учитывать концентрацию не одного восстановителя, а ряда восстановителей, концентрации которых преобладают в данной среде.

Из представленных в табл. 5.5 данных следует, что значения концентраций восстановителей в различных биологических средах существенно различаются. Следствием этого являются различия в значениях величины эффективного потенциала.

В таблице 5.6 представлены значения рассчитанных эффективных восстановительных потенциалов для различных биологических жидкостей. Из представленных данных следует, что каждый тип клеток характеризуется своим значением $E^{\text{эфф}}$. В матриксе митохондрий преобладают восстановительные процессы в сравнении с цитоплазмой и внеклеточной средой.

Таблица 5.6

Эффективный восстановительный потенциал некоторых биологических жидкостей

Тип объекта	$E^{\text{эфф}}$, мВ при pH 7,0	$E^{\text{эфф}}$ (pH), мВ при pH 7,2
Плазма крови человека	+367	+354
Внеклеточная среда стриатума мозга крысы	+84	+71
Внеклеточная жидкость эпителия легких человека	-23	-35
Цитоплазма β -клеток крысы	-25	-37
Цитоплазма моноцитов человека	-28	-40
Цитоплазма нейронов человека	-42	-55
Цитоплазма фибробластов мышцы	-123	-135
Желчь печени крысы	-189	-213
Цитоплазма гепатоцитов крысы	-203	-215
Цитоплазма астроцитов человека	-213	-225
Цитоплазма эритроцитов человека	-215	-228
Матрикс митохондрий гепатоцитов крысы	-250	-291 (pH 7,8)
<i>Примечание.</i> При расчетах значения $E_{\text{GSSG}/2\text{GSH}}^0$, $E_{\text{НАДФ}/\text{НАДФН}}^0$, $E_{\text{ДАК}/\text{АК}}^0$, $E_{\text{НУ}/\text{НН}_2}^0$ взяты из табл. 1.1, а средние концентрации восстановителей – из табл. 5.5.		

При этом следует отметить ряд преимуществ использования $E^{\text{эфф}}$ для количественного описания редокс-состояния биологических систем. Редокс-состояние клеток формируется с участием многих переносчиков электронов в цитоплазме, поэтому изменения внутриклеточного редокс-состояния не всегда сопровождаются изменением $E_{\text{GSSG}/2\text{GSH}}$. Показано, что генерация АФК в эндотелиальных клетках человека приводит к уменьшению концентрации аскорбиновой кислоты, концентрация глутатиона при этом не изменяется [351]. Во внеклеточной жидкости легких снижение концентрации мочевого и аскорбиновой кислот при действии

диоксида азота также не сопровождается изменением концентрации глутатиона [352]. Такие изменения редокс-состояния системы будут отражаться в изменениях величины $E^{\text{эфф}}$, тогда как величина $E_{\text{GSSG}/2\text{GSH}}$ при этом не изменяется.

С другой стороны, изменение концентрации глутатиона не всегда отображается изменением величины $E_{\text{GSSG}/2\text{GSH}}$. Например, предположим, что в эритроцитах человека $E_{\text{GSSG}/2\text{GSH}} = -240$ мВ ($[\text{GSH}]_{\text{цит}} = 2$ мМ, $[\text{GSSG}]_{\text{цит}} = 4$ мкМ). Если при уменьшении концентрации GSH до 1 мМ концентрация GSSG уменьшится до 1 мкМ, то $E_{\text{GSSG}/2\text{GSH}}$ в клетках останется равным -240 мВ. Эффективный восстановительный потенциал в эритроцитах в данном случае изменится на 19 мВ (с -228 мВ до -209 мВ, при pH 7,2).

Кроме этого, диапазон изменений значений $E^{\text{эфф}}$ намного шире, чем диапазон изменений значений $E_{\text{GSSG}/2\text{GSH}}$ (см. табл. 5.6, 5.2, 5.1). Это связано с тем, что параметр $E^{\text{эфф}}$ обладает большей «чувствительностью» к изменениям редокс-состояния, чем $E_{\text{GSSG}/2\text{GSH}}$.

Рассмотрим, как изменятся величины $E_{\text{GSSG}/2\text{GSH}}$ и $E^{\text{эфф}}$ при окислительном стрессе, индуцированном повышением концентрации пероксида водорода. Величина $E_{\text{GSSG}/2\text{GSH}}$ в тканях печени мыши при pH 7,2 составляет -229 мВ ($[\text{GSH}] = 7,942$ мМ; $[\text{GSSG}] = 0,149$ мМ) [296], величина $E^{\text{эфф}} = -215$ мВ (табл. 5.6). При окислительном стрессе, индуцированном 0,2 мМ H_2O_2 , величина $E_{\text{GSSG}/2\text{GSH}}$ в тканях печени изменится до значения -222 мВ ($[\text{GSH}] = 7,742$ мМ; $[\text{GSSG}] = 0,249$ мМ), величина $E^{\text{эфф}}$ при этом изменится до -202 мВ. То есть, окислительный стресс в результате повышения концентрации H_2O_2 на 0,2 мМ вызывает в 2 раза большее изменение величины $E^{\text{эфф}}$, чем $E_{\text{GSSG}/2\text{GSH}}$.

Таким образом, интегральный подход, учитывающий вклад всех участников окислительно-восстановительных процессов в клетке, является более информативным, чем использование для количественного описания изменений редокс-состояния восстановительных потенциалов отдельных участников редокс-реакций.

5.5. Определение антиокислительной способности биологических жидкостей

Для характеристики способности биологических жидкостей противостоять внешнему воздействию окислителей используется понятие «антиокислительная способность» [353, 354]. К настоящему времени описано множество различных способов измерения антиокислительной способности биологической среды. Методики определения антиокислитель-

ной способности среды, как правило, основаны на использовании модельной системы, состоящей из двух основных компонентов: источника свободных радикалов и измерительного блока, позволяющего определять концентрацию свободных радикалов [355, 356]. Принцип определения антиокислительной способности исследуемой биологической среды основан на оценке изменения количества свободных радикалов после их внесения в модельную систему исследуемой жидкости. Использование различных модельных систем позволяет определить вклад в антиокислительную способность среды как жирорастворимых, так и водорастворимых компонентов АОС [357].

Следует отметить, что в настоящее время нет строгого определения термина «антиокислительная способность». При оценке антиокислительной способности определяются такие параметры, как общая антиоксидантная емкость (ТАС – total antioxidant capacity), общий антиоксидантный параметр захвата радикалов (TRAP – total radical trapping antioxidant parameter), общая антиоксидантная активность (ТАА – total antioxidant activity), способность поглощать радикалы кислорода (ORAC – oxygen radical absorbance capacity), общий антиоксидантный ответ (ТАR – total antioxidant response), эквивалентная «Trolox» антиоксидантная емкость (ТЕАС – trolox equivalent antioxidant capacity), способность плазмы восстанавливать железо (FRAP – ferric reducing ability of plasma), общая способность утилизировать оксиданты (ТОСC – total oxidant scavenging capacity) и другие [358–362]. Использование различных методических подходов при определении этих параметров приводит в результате к различающимся данным о вкладе восстановителей в антиокислительную способность плазмы крови человека (табл. 5.7).

Таблица 5.7

Вклад различных восстановителей в антиокислительную способность плазмы крови человека, определенный на основе различных методических подходов

Восстановитель плазмы	Концентрация в плазме (мкМ)	TRAP, цит. по [363], %	TAR, цит. по [364], %	ТЕАС, цит. по [365], %	FRAP, цит. по [366], %
Белки	600–1000	24,2	48,9	28,0	10
Мочевая кислота	150–450	57,8	3,8	19,3	60
Аскорбиновая кислота	30–150	8,9	5,0	3,1	15
Токоферолы	20–50	9,1	1,9	1,7	5
Каротеноиды	0,5–3	-	-	-	-
Другие восстановители		0	40,4	47,9	10

Для определения вклада водорастворимых восстановителей в антиокислительную активность крови в настоящее время используется два основных подхода. В первом случае используется проокислитель (индуктор радикалов) и окисляемый субстрат (проба). В данном подходе предполагается, что окисление пробы ингибируется восстановителями, присутствующими в плазме.

Наиболее широко используемыми в данном подходе являются методики определения TRAP и ORAC [367]. Для образования радикалов часто используется гидрофильный индуктор радикалов AAPH (2'-azobis(2,4-amidinopropane)dihydrochloride). AAPH спонтанно распадается при температуре 37 °С с определенной константой скорости реакции, приводя к образованию углеродцентрированных радикалов. Углеродцентрированные радикалы в реакции с кислородом приводят к образованию пероксильных радикалов. В методике для определения TRAP в качестве окисляемой пробы часто используется 2,7-дихлородигидрофлуоресцеин, который при окислении пероксильными радикалами приводит к образованию сильно флуоресцирующего продукта – дихлорфлуоресцеина. В ряде модифицированных методик TRAP и ORAC в качестве субстрата окисления используется также фикоэритреин, флуоресцирующий белок, изолированный из *Corallina officinalis* [368, 369]. При образовании пероксильных радикалов наблюдается тушение флуоресценции белка.

Во втором подходе измерение антиокислительной способности основывается на определении способности антиоксидантов восстанавливать стабильные радикалы, а не проокислитель. В методе для TEAC определение антиокислительной способности плазмы осуществляется на основе определения утилизации катиона радикала ABTS (2,2'-azinobis(3-ethylbenthothiazoline-6-sulfonate)) [370].

С использованием этих подходов обнаружено, что антиокислительная способность крови обусловлена в основном вкладом белков (10–48 %), мочевой кислоты (7–60 %), аскорбиновой кислоты (3–15 %) и витамином Е (<10 %) (табл. 5.7).

Измерение антиокислительной способности липидной фракции плазмы основывается на определении способности изолированных липопротеинов низкой плотности окисляться с использованием гидрофильных (AAPH) или гидрофобных (AMVN – 2,2'-azinobis(2,4-dimethylvaleronitrite) индукторов радикалов. Мониторинг перекисного окисления липидов осуществляется в результате измерения концентрации диеновых конъюгатов, степени окисления 2,7 – дихлородигидрофлуоресцеина и другими способами [371]. С использованием AMVN и люминола показано, что процентный вклад гидрофобных восстановите-

лей в антиокислительную активность изолированных липопротеинов низкой плотности составляет более 70 % (токоферол – 73 %, убихинон – 2,5 %) [372].

Несмотря на разнообразие подходов, предложенных для определения антиокислительной способности, ни один из вышеуказанных подходов не подходит для определения общей антиокислительной способности плазмы. В большинстве методов определяется не антиокислительная способность, а реакционная способность восстановителей по отношению к конкретным типам радикалов. При этом вклад восстановителей в измеряемую «реакционную способность» зависит от концентрации и типа восстановителя.

Для определения суммарной антиокислительной способности среды может быть использован метод циклической вольтамперометрии (ЦВА). Данный подход основывается на том факте, что суммарная восстановительная способность среды отражает суммарную способность среды утилизировать радикалы [373]. В методе ЦВА измеряется зависимость силы тока между референтным и регистрирующим электродами от прикладываемого напряжения. Получаемая в результате циклическая вольтамперограмма содержит информацию о типе (пиковый потенциал) и концентрации (величина силы тока) восстановителя в среде. С помощью данного метода можно определять концентрации как гидрофильных, так и гидрофобных восстановителей [374]. В гомогенатах тканей величина антиокислительной активности, определяемая с помощью метода ЦВА, зависит от типа ткани [375].

Антиокислительная способность является важным показателем, характеризующим состояние биологических жидкостей и поддерживающимся в организме на определенном уровне. Изменение величины антиокислительной активности характерно при протекании ряда заболеваний.

Тем не менее главным ограничением всех описанных методов является то, что они позволяют определять антиокислительную способность только в биологических жидкостях или тканевых гомогенатах. К определению общей антиокислительной способности клеток данные подходы не применимы. Проблему можно решить, изучая физико-химические основы, лежащие в основе антиокислительной способности клеток и тканей.

5.6. Редокс-буферные свойства раствора. Редокс-буферная емкость

Совокупность восстановителей в клетке представляет собой своего рода восстановительный буфер, емкость которого определяет способность клетки ликвидировать окислитель. Концентрация доноров электронов в клетке значительно выше, чем во внеклеточной среде.

Как было отмечено выше, определяемые показатели антиокислительной способности системы зависят от набора восстановителей и от типа окислителя, используемого при измерениях, что делает невозможным как количественное сравнение измеряемых значений, так и изучение механизмов, лежащих в их основе. Наряду с этим данные подходы неприменимы к характеристике антиокислительной способности клеток. С другой стороны, для количественной характеристики способности клеток противостоять внешнему воздействию окислителей используются такие понятия, как «редокс-буферные свойства» и «редокс-буферная емкость» клетки [376, 377], выступающие аналогами понятий «рН-буферные свойства» и «рН-буферная емкость».

Редокс-буферные свойства раствора определяются способностью раствора удерживать заданное эффективное значение редокс-потенциала раствора при небольших добавках в раствор окислителей или восстановителей. Параметр «редокс-буферная емкость» характеризует способность раствора противодействовать изменению величины эффективного восстановительного потенциала среды при добавлении окислителей или восстановителей.

Для среды, которая содержит один тип редокс-пары, эффективный восстановительный потенциал при pH 7,0 будет равен стандартному значению восстановительного потенциала для данной пары ($E^{0'}$). При сравнении кривой титрования для обычного буфера (зависимость концентрации основания от разности pH) и кривой титрования для данной редокс-пары (зависимость концентрации восстановленной формы вещества от разности редокс-потенциалов) (рис. 5.1) видно, что буферные системы работают наиболее эффективно в областях значений pH или ΔE , близких к pK_a или $E^{0'}$, соответственно, где pK_a – отрицательный десятичный логарифм константы диссоциации кислоты, $E^{0'}$ – стандартный восстановительный потенциал пары при pH 7,0.

Наименьшее изменение pH при добавлении определенного количества кислоты или основания происходит в области pK_a . То есть, рН-буферная емкость системы максимальна при pK_a . Аналогично и для редокс-буфера редокс-буферная емкость системы максимальна при $E^{0'}$.

pH-буфер, который подвергается протонированию или депротонированию, будет буферизовать в области примерно ± 1 pH от pK_a . По аналогии с pH-буфером редокс-буфер, который подвергается одноэлектронному окислению-восстановлению согласно уравнению Нернста, будет буферизовать в области отклонений на $\pm 59,1$ мВ от значений $E^{0'}$.

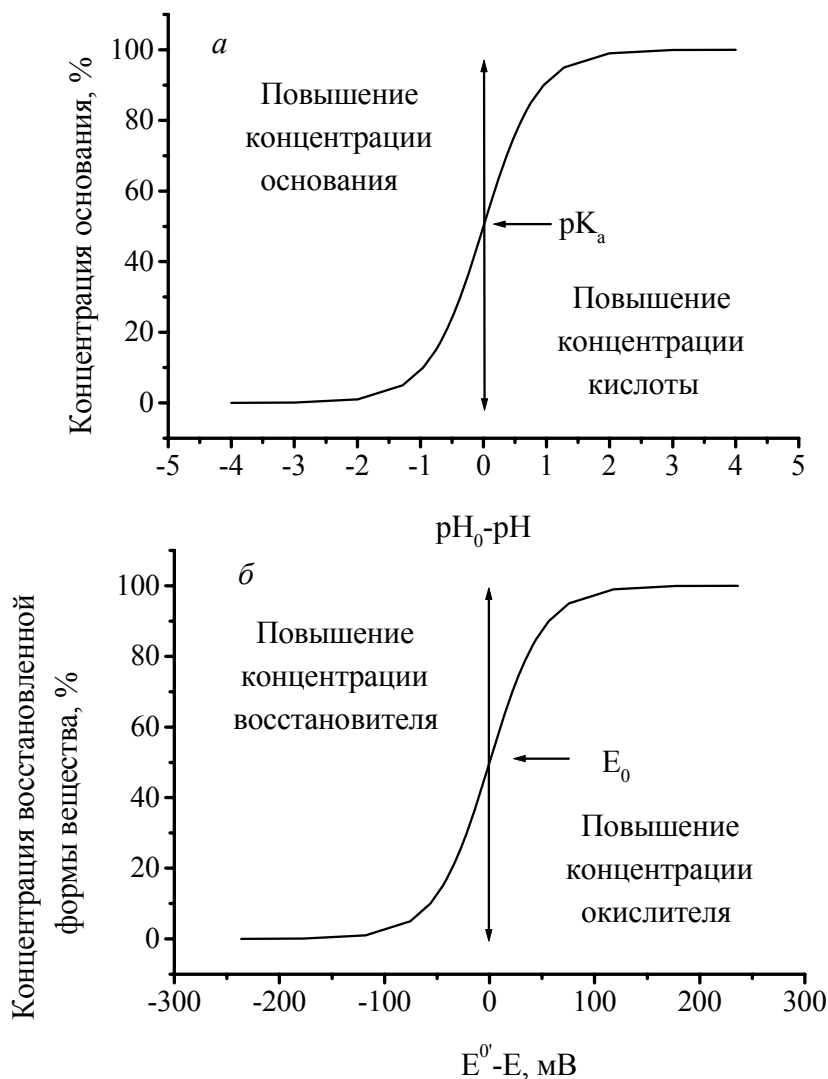


Рис. 5.1. Вид кривых титрования pH-буфера (а) и редокс-пары (б)

Редокс-буферной емкостью системы назовем величину изменения значения концентрации добавленного к раствору окислителя (или восстановителя), который восстанавливается (или окисляется), при изменении эффективного восстановительного потенциала на единицу. Таким образом, редокс-буферную емкость можно определить как

$$r = \frac{\partial c_{\text{ок}}}{\partial E^{\text{эфф}}}, \quad (5.19)$$

где $c_{\text{ок}}$ – концентрация добавленного окислителя, $E^{\text{эфф}}$ – эффективный восстановительный потенциал системы [377].

Рассмотрим раствор, в котором концентрация восстановителя равна $c_{\text{вос}}$. При начальных условиях эффективный редокс-потенциал раствора будет $E_{\text{р}}^{\text{эфф}}$, равный $E_{\text{вос}}^{0'}$. При добавлении в раствор окислителя эффективный восстановительный потенциал системы согласно (5.11) и (5.12) изменится до значения:

$$E^{\text{эфф}} = \frac{c_{\text{вос}} z_{\text{вос}} E_{\text{р}}^{\text{эфф}} + c_{\text{ок}} z_{\text{ок}} E_{\text{ок}}^{0'}}{c_{\text{вос}} z_{\text{вос}} + c_{\text{ок}} z_{\text{ок}}}, \quad (5.20)$$

где $c_{\text{вос}}$ – концентрация восстановителя, $z_{\text{вос}}$ – число электронов, переносимых при окислении одной молекулы восстановителя, $c_{\text{ок}}$ – концентрация добавленного окислителя, $z_{\text{ок}}$ – число электронов, переносимых при восстановлении одной молекулы окислителя, $E_{\text{ок}}^{0'}$ – восстановительный потенциал окислителя при рН 7,0. Из (5.20) выразим зависимость $c_{\text{ок}}$ от $E^{\text{эфф}}$:

$$c_{\text{ок}}(E^{\text{эфф}}) = \frac{c_{\text{вос}} z_{\text{вос}} (E^{\text{эфф}} - E_{\text{р}}^{\text{эфф}})}{z_{\text{ок}} (E_{\text{ок}}^{0'} - E^{\text{эфф}})}. \quad (5.21)$$

Согласно определению (5.19) редокс-буферная емкость раствора, содержащего окислитель, будет:

$$r = r(E^{\text{эфф}}) = \frac{\partial c_{\text{ок}}}{\partial E^{\text{эфф}}} = \frac{c_{\text{вос}} z_{\text{вос}} (E_{\text{ок}}^{0'} - E_{\text{р}}^{\text{эфф}})}{z_{\text{ок}} (E_{\text{ок}}^{0'} - E^{\text{эфф}})^2}. \quad (5.22)$$

Выражение для редокс-буферной емкости раствора, до добавления окислителя, получается из выражения (5.22) при условии, что $c_{\text{ок}} = 0$. При данном условии, согласно (5.20) $E^{\text{эфф}} = E_{\text{р}}^{\text{эфф}}$, т.е.

$$r_{\text{р}} = \frac{c_{\text{вос}} z_{\text{вос}}}{z_{\text{ок}} (E_{\text{ок}}^{0'} - E_{\text{р}}^{\text{эфф}})}. \quad (5.23)$$

Аналогичным образом можно получить выражение для редокс-буферной емкости раствора по отношению к восстановителю:

$$r_{\text{в}} = \frac{c_{\text{ок}} z_{\text{ок}}}{z_{\text{вос}} (E_{\text{р}}^{\text{эфф}} - E_{\text{вос}}^{0'})}, \quad (5.24)$$

где $z_{\text{вос}}$ – число электронов, переносимых при окислении одной молекулы восстановителя, $E_{\text{вос}}^{0'}$ – восстановительный потенциал восстановителя при рН 7,0.

Для раствора, который содержит два различных восстановителя в концентрациях c_1 и c_2 и эффективный редокс-потенциал которого равен

$$E_p^{\text{эфф}} = \frac{c_1 z_1 E_1^{0'} + c_2 z_2 E_2^{0'}}{c_1 z_1 + c_2 z_2}, \quad (5.25)$$

получим следующее выражение для редокс-буферной емкости раствора по окислителю

$$r_p = \frac{c_1 z_1 + c_2 z_2}{z_{\text{ок}} (E_{\text{ок}}^{0'} - E_p^{\text{эфф}})}. \quad (5.26)$$

Редокс-буферная емкость раствора, содержащего восстановители в концентрациях c_1, c_2, \dots, c_k , будет определяться выражениями

$$r_p = \frac{\sum_{i=1}^k c_i z_i}{z_{\text{ок}} \cdot (E_{\text{ок}}^{0'} - E_p^{\text{эфф}})}, \quad (5.27)$$

$$\frac{1}{r_p} = \sum_{i=1}^k \left(a_i^2 \cdot \frac{1}{r_i} \right), \quad (5.28)$$

где r_i – редокс-буферная емкость i -го восстановителя, которая определяется выражением

$$r_i = \frac{c_i z_i}{z_{\text{ок}} (E_{\text{ок}}^{0'} - E_i^{0'})}, \quad (5.29)$$

а коэффициенты a_i определяются выражением (5.12).

В таблице 5.8 представлены рассчитанные нами значения редокс-буферной емкости для различных восстановителей в клетке по отношению к пероксиду водорода (H_2O_2) и гидроксильному радикалу ($\dot{\text{O}}\text{H}$).

Из представленных данных видно, что редокс-буферная емкость зависит от типа восстановителя и типа окислителя. Чем меньше разность между редокс-потенциалом восстановителя и окислителя (разность свободных энергий), тем больше редокс-буферная емкость восстановителя по отношению к данному типу окислителя.

Таблица 5.8

Редокс-буферная емкость клеточных восстановителей

Тип и концентрация восстановителя	Редокс-потенциал восстановителя, $E_i^{0'}$, мВ	Редокс-буферная емкость по H_2O_2 , мМ/В (рН 7,0)	Редокс-буферная емкость по $\dot{\text{O}}\text{H}$, мМ/В (рН 7,0)
НАДФН, 10 мМ	-320	31,2	8,0
GSH, 10 мМ	-240	35,7	8,2
AscH, 10 мМ	+58	76,2	9,4

Введенное понятие «редокс-буферная емкость» позволяет сравнивать антиокислительную активность различных сред и типов клеток при действии редокс-молекул. Определив концентрации основных редокс-компонентов клетки, можно рассчитать редокс-буферную емкость каждого элемента и системы в целом.

Редокс-буферная емкость клеток зависит от типа и концентрации восстановителей, которые содержатся в клетке. Следствием существующих различий в значениях концентраций восстановителей в тканях являются отличия в их редокс-буферных емкостях. Рассчитанные значения редокс-буферных емкостей для некоторых типов тканей представлены в табл. 5.9.

Таблица 5.9

Значения редокс-буферной емкости некоторых биологических жидкостей

Тип объекта	Редокс-буферная емкость по H_2O_2 , мМ/В (рН 7,0)	Редокс-буферная емкость по $\dot{O}H$, мМ/В (рН 7,0)
Внеклеточная жидкость эпителия легких человека	2,6	0,2
Внеклеточная среда стриатума мозга крысы	0,6	0,07
Цитоплазма β -клеток крысы	32,1	5,0
Цитоплазма моноцитов человека	40,4	6,4
Цитоплазма нейронов человека	40,2	6,7
Цитоплазма фибробластов мышцы	11,4	2,2
Желчь печени крысы	4,4	0,9
Цитоплазма гепатоцитов крысы	30,4	6,7
Цитоплазма астроцитов человека	33,2	7,4
Цитоплазма эритроцитов человека	8,6	1,9
Матрикс митохондрий гепатоцитов крысы	59,6	14,0
Примечание. Значения эффективного восстановительного потенциала, использованные при расчетах, взяты из табл. 5.6, средние концентрации восстановителей – из табл. 5.5.		

Из данных, представленных в табл. 5.6 и 5.9, видно, что наибольшее значение эффективного восстановительного потенциала не обязательно соответствует наибольшей редокс-буферной емкости системы. Редокс-буферная емкость системы зависит как от концентрации восстановителей, так и от их типа. Причем редокс-буферная емкость не является простой суммой концентраций восстановителей. В зависимости от набора

восстановителей некоторые типы клеток более эффективно противостоят окислению, вызываемому пероксидом водорода (имеют более высокое значение редокс-буферной емкости по H_2O_2 , например нейроны), другие – окислению, индуцируемому гидроксильным радикалом (имеют более высокое значение редокс-буферной емкости по $\dot{O}H$, например, астроциты).

Введение термина «редокс-буферная емкость» позволяет получить дополнительную информацию о поведении системы при действии редокс-молекул. Знание величины редокс-буферной емкости системы позволяет предсказать направление и величину изменения введенного ранее нами параметра среды – эффективного восстановительного потенциала.

Таким образом, можно заключить, что эффективный восстановительный потенциал и редокс-буферная емкость являются параметрами, адекватно характеризующими редокс-гомеостаз биологических систем.

На основании приведенных выше данных можно заключить, что различия величины окислительно-восстановительного баланса в биологических структурах, количественным выражением которых являются эффективный восстановительный потенциал и редокс-буферная емкость, являются общим признаком, характеризующим самые разнообразные процессы и структуры в организме. Вводимые физико-химические параметры являются важными характеристиками многоклеточных организмов, тканей, клеток и клеточных органелл. Изменения параметров редокс-состояния наблюдаются:

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

Таким образом, эффективный восстановительный потенциал и редокс-буферная емкость являются новыми параметрами клеточного и тканевого гомеостаза.

РЕДОКС-СОСТОЯНИЕ И ПЕРЕДАЧА СИГНАЛОВ В КЛЕТКАХ

6.1. Редокс-регуляция процессов внутриклеточной сигнализации

Исследование механизмов формирования клеточного ответа на стимул – одна из наиболее активно развивающихся областей клеточной биофизики. В последнее время достигнут значительный прогресс в понимании механизмов активации клетки, в которых роль основного вторичного посредника выполняют активные формы кислорода. Непосредственным участием АФК в окислительно-восстановительных реакциях обусловлена их роль в запуске и регуляции общих и специализированных клеточных функций, таких как пролиферация, рост, экспрессия генов, иммунный ответ и синаптическая пластичность. Кроме того, многие окислители и восстановители участвуют в синтезе ряда медиаторов воспаления, хемотаксических пептидов, в процессах обновления клеточных мембран.

Тип функционального ответа клетки при действии редокс-молекул зависит от многих факторов, включая концентрацию агента, тип клеток, количество клеток в культуре и внутриклеточное редокс-состояние.

Гибель клеток при действии H_2O_2 по механизму апоптоза или некроза наблюдается во многих клеточных системах, включая лимфоциты [378], тироциты [379], гепатоциты [380] и многие другие типы клеток. Дозозависимые эффекты H_2O_2 во многом определяются типом клеток и могут варьировать в широком диапазоне. Например, для эпителиальных клеток летальной дозой H_2O_2 являются концентрации выше 0,3 мМ, тогда как для нейтрофилов летальной дозой являются концентрации около 50 мМ [381]. Внеклеточный глутатион в концентрациях от 0,1 до 1 мМ защищает легочные фибробласты человека от апоптоза и некроза, индуцированных миллимолярными концентрациями H_2O_2 [382].

Наряду с этим обнаружено стимулирующее действия H_2O_2 на скорость деления для гладкомышечных клеток сосудов [383], клеток линии

HeLa [384], мезенхимальных стволовых клеток и эпителиальных клеток аорты [385] и ряда других типов клеток [386]. В некоторых типах тканей H_2O_2 индуцирует процессы дифференцировки. Например, обнаружено, что H_2O_2 индуцирует дифференцировку клеток-предшественников линии HD-11EM в остеокласты [387]. В клетках линии PC12 H_2O_2 участвует в процессах дифференцировки клеток в симпатические нейроны [388, 389]. В гиппокампе H_2O_2 выполняет роль регулятора глутаматэргической трансмиссии [390]. Таким образом, диапазон клеточных ответов на изменение концентрации H_2O_2 очень широкий.

Повышение концентрации АФК в клетках вызывается множеством внеклеточных сигналов, среди которых важное место занимают факторы роста и цитокины. Показано, что фактор некроза опухоли ($TNF-\alpha$) усиливает генерацию пероксида водорода митохондриями и НАДФН-оксидазой [391, 392]. Взаимодействие факторов роста PDGF и EGF с рецепторами плазматической мембраны вызывает кратковременное повышение внутриклеточной концентрации H_2O_2 [393, 394]. Генерация АФК в фагоцитирующих клетках наблюдается при стимуляции интерлейкином- 1β [395], интерлейкином 6 [396], интерлейкином 3 [397], фактором роста нервов (NGF) [398], трансформирующим фактором роста ($TGF-\beta 1$) [399] и рядом других лигандов.

В настоящее время показано, что повышение внутриклеточной концентрации окислителей изменяет активность практически всех классов сигнальных эффекторных белков, участвующих в передаче сигнала от клеточной поверхности к ядру. Активность ряда протеинкиназ, фосфатаз, фосфолипаз, факторов транскрипции, ионных каналов и насосов клеточных мембран зависит от внутриклеточной концентрации окислителей и восстановителей.

Протеинкиназы. Фосфорилирование является одним из основных способов ковалентной модификации белков, приводящих к изменению их активности в клетке. Получены многочисленные данные, указывающие на то, что при действии редокс-молекул на клетки изменяется активность многих протеинкиназ. Действие окислителей на клетку стимулирует активность таких протеинкиназ MAPK-семейства, как ERK, JNK, киназа p38, BMK1 [400, 401]. Обнаружено, что АФК активируют серин/треониновые протеинкиназы MAPK-каскада через активацию G-белка Ras [402]. Малый G-белок Ras служит связующим звеном между рецепторными тирозинкиназами и протеинкиназами MAPK-каскада. Показано, что связывание NO с остатком цистеина (Cys 118) на поверхности белковой молекулы Ras ведет к активации белка [403]. Следует отметить, что активированный Ras через активацию PI_3 -киназы [404] стиму-

лирует активность малой ГТФ-азы Rac2, которая регулирует сборку НАДФН-оксидазы [405].

Окислители также стимулируют активность PI_3 -киназы, протеинкиназы В (Akt) и протеинкиназы С (PKC) [406, 407]. Изменение редокс-состояния клетки модулирует активность протеинкиназ с помощью различных механизмов, включая прямую окислительную модификацию фермента, фосфорилирование фермента и перекисное окисление липидов. Обнаружено, что H_2O_2 стимулирует фосфорилирование PKC по тирозину [408, 409]. Активация PKC *in vitro* происходит в результате окислительной модификации регуляторного домена фермента со стороны конца, содержащего аминокислотную группу [410]. Напротив, окислительная модификация каталитического домена с конца, содержащего карбоксильную группу, ведет к полной инактивации фермента [411]. Показано, что активация PKC может осуществляться окисленными диацилглицеролами [412, 413]. В результате наличия нескольких редокс-механизмов, ведущих к регуляции активности PKC, наблюдается дозозависимое действие АФК на PKC. Низкие концентрации окислителей стимулируют активность PKC, тогда как высокие концентрации – ингибируют [414].

Фосфатазы. Активация процессов фосфорилирования в клетке может осуществляться не только в результате стимуляции протеинкиназ, но также в результате ингибирования фосфатаз. Фосфатазы катализируют дефосфорилирование белков и в нестимулированной клетке активность фосфатаз выше, чем активность протеинкиназ. Показано, что обратимая регуляция активности фосфатаз внутриклеточными окислителями является механизмом динамической регуляции процессов фосфорилирования белков при клеточном ответе на внеклеточные стимулы [415]. Стимуляция клеток эпидермальным фактором роста индуцирует рост цитозольной концентрации окислителей и обратимую инактивацию тирозинфосфатазы изоформы PTP-1B [416]. Исследования показали, что редокс-механизм, на основании которого окислители регулируют активность PTP-1B, базируется на окислении аминокислотного остатка Cys²¹⁵ [417]. Обработка тирозинфосфатазы PTP-1B H_2O_2 вызывает необратимую инактивацию фермента, тогда как \dot{O}_2^- индуцирует обратимое окисление Cys²¹⁵ до производной сульфениковой кислоты, которая при взаимодействии с клеточным глутатионом приводит к образованию смешанных дисульфидов [418]. Показано, что PTP-1B, содержащая S-глутатиолированные цистеины, может реактивироваться с помощью фермента глутаредоксина [419]. В настоящее время получены экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что процесс S-глутатиолирования PTP-1B индуцируется не только супероксидом, но и в результате изме-

нения редокс-потенциала глутатиона внутриклеточной среды [420]. Окислители вызывают обратимое ингибирование тирозинфосфатаз и серин/треониновых фосфатаз (механизм подробно рассмотрен в гл. 3). Таким образом, усиление процессов фосфорилирования в клетках при действии окислителей осуществляется двумя различными путями: (1) через активацию протеинкиназ и (2) через инактивацию фосфатаз.

Наряду с этим показано, что окислители стимулируют экспрессию серин/треониновой фосфатазы CL 100 [421]. Этот фермент участвует в дефосфорилировании ERK, и активация его экспрессии, возможно, осуществляется по механизму обратной связи в индуцируемой окислителем трансдукции сигнала.

Фосфолипазы. Показано, что окислители могут активировать некоторые типы фосфолипаз. Пероксид водорода и ванадат активируют фосфолипазу C- γ , что приводит к образованию IP₃ [422, 423]. Окислители также могут активировать фосфолипазы A₂ и D [424–426]. Механизм активации фосфолипаз не установлен. Считается, что продукты перекисного окисления липидов, РКС, повышение цитозольного кальция и белок Ras могут быть вовлечены в активацию фосфолипазы A₂ [427, 428], а рецепторные тирозинкиназы и повышение внутриклеточной концентрации цитозольного кальция регулируют активность фосфолипазы D [429, 430].

Факторы транскрипции. В настоящее время идентифицировано более 100 генов млекопитающих, активность которых регулируется внутриклеточным редокс-состоянием [431–433]. Промоторный участок большинства таких генов содержит последовательность нуклеотидов, обозначаемую как ARE (antioxidant respond element) или EpRE (electrophile respond element) [434–436]. В качестве примеров генов, регулируемых ARE, можно указать ген НАДФН-хинон-оксидоредуктазы [437], тиоредоксина [438], ферритина [439], гемоксигеназы 1 [440], глутатион-S-трансферазы [441].

Множество факторов транскрипции регулируются внутриклеточным редокс-состоянием, включая AP-1, AP-2, CREB, HIF-1, NF- κ B, Oct-2, STAT-3, p53, Nrf-2, c-Myc и многие другие [442–445]. Наиболее изученными редокс-зависимыми факторами транскрипции являются NF- κ B и AP-1.

Следует отметить, что действие АФК на клеточные мишени определяется не только типом мишени, но и местом действия АФК. В цитоплазме окислители активируют фактор транскрипции NF- κ B в результате фосфорилирования и отщепления ингибиторной субъединицы I- κ B [446]. Активированный фактор транскрипции NF- κ B транслицируется в ядро, где связывается с κ B-регуляторной последовательностью в генах-

мишенях. Повышение концентрации окислителей в ядре ингибирует связывание фактора NF-κB с ДНК [447].

Ионные каналы. Действие внеклеточных окислителей на клеточные функции в большой степени опосредованы процессами взаимодействия с транспортными белками и фосфолипидами мембран. Чувствительность различных мембран к действию окислителей зависит от числа и типа транспортных белков, содержащихся в них. Обнаружено, что Ca^{2+} -АТФаза плазматической мембраны менее чувствительна к действию АФК, чем Ca^{2+} -АТФаза саркоплазматического ретикулума [448]. Показано, что концентрации АФК, приводящие к ингибированию ионных насосов, меньше, чем концентрации АФК, вызывающие тот же эффект у ионных каналов [449].

При действии окислителей на транспортные белки клеточной мембраны нейронов изменяются мембранный потенциал и параметры процессов генерации потенциалов действия. С помощью разработанных нами аппаратно-программных комплексов для регистрации внеклеточной электрической активности показано, что пероксид водорода регулирует электрическую активность нейронов [450–456].

На рис. 6.1 (а) и представлены фрагменты типичной суммарной электрической активности (СЭА) нейронов моллюска *Lymnaea stagnalis*, не подвергавшихся обработке пероксидом водорода.

СЭА обуславливается несколькими нейронами, находящимися на различном расстоянии от электрода. На рис. 6.1 видны спайки, имеющие различную амплитуду и частоту следования. Амплитуда спайков изменяется в диапазоне от 10 до 60 мкВ, частота спайков изменяется в диапазоне от 0,1 до 10 Гц. Средняя частота спайков, регистрируемая в нейронах, не подвергавшихся обработке пероксидом водорода, составляла 5-6 Гц, средняя амплитуда – 20 мкВ. В условиях окислительного стресса активность нейронов изменялась. На рис. 6.1 (б) и представлены фрагменты СЭА нейронов моллюска в СБСР, содержащем 2 мМ H_2O_2 . При воздействии H_2O_2 средняя частота спайков возрастала в несколько раз.

Нами также показано, что пероксид водорода изменяет параметры синаптической передачи между коллатеральными Шаффера и базальными дендритами пирамидальных нейронов поля СА1 гиппокампа крысы. Вид регистрируемого постсинаптического потенциала и его изменение под действием пероксида водорода показаны на рис. 6.2.

Таким образом, H_2O_2 , наряду с NO и CO , может выступать посредником в процессах внеклеточной сигнализации в мозге. Возможным молекулярным механизмом регуляции электрической активности клеток является Ca^{2+} -зависимая регуляция активности K^+ -каналов плазматиче-

ской мембраны. Многочисленные данные литературы позволяют рассматривать Ca^{2+} -зависимые K^+ -каналы в качестве универсальных сенсоров плазматической мембраны колебаний цитозольного кальция. Следует отметить также тот факт, что системы регуляции внутриклеточной концентрации несвязанного кальция являются первичными мишенями окислителей в клетке.

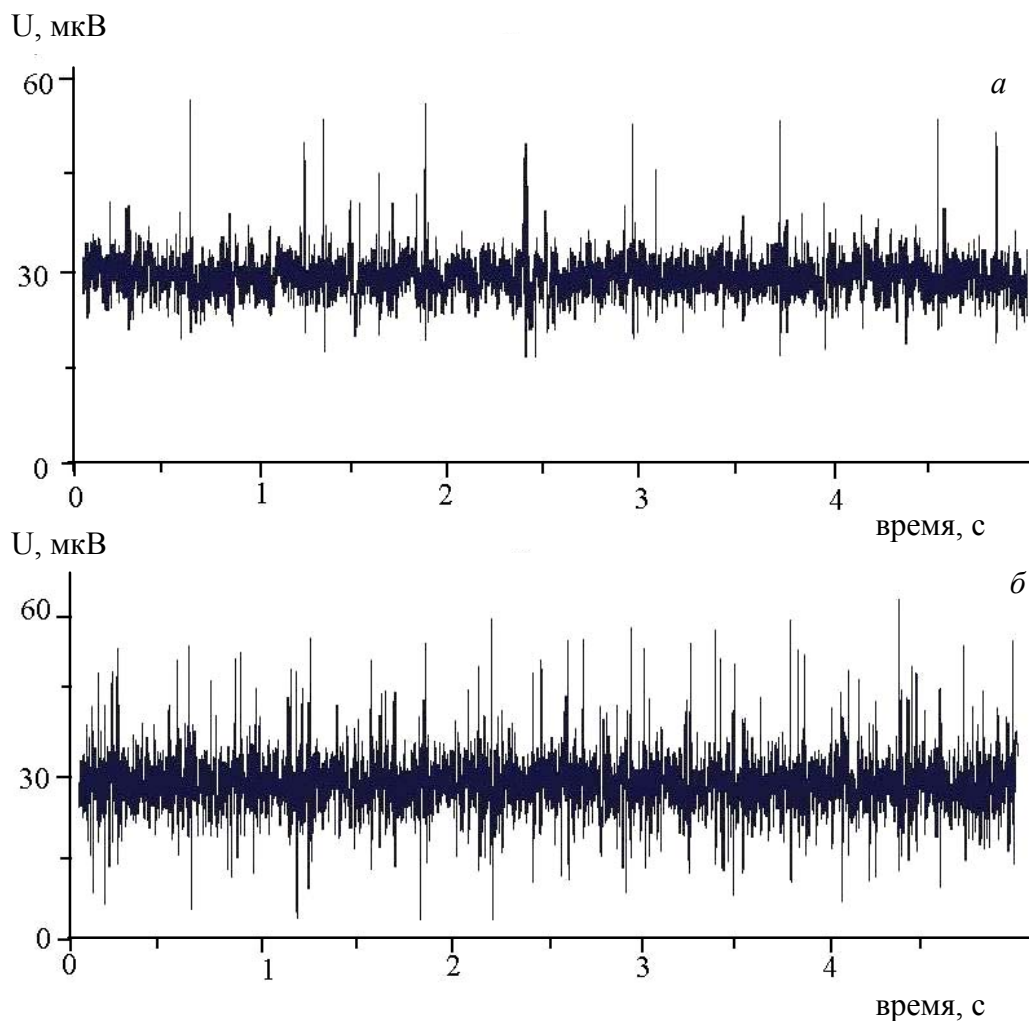


Рис. 6.1. Фрагменты типичной СЭА нейронов *Lymnaea stagnalis* в секундном интервале регистрации: *a* – нейроны в СБСР, не содержащем H_2O_2 ; *б* – нейроны в СБСР, содержащем 2 мМ H_2O_2

В клетках эндотелия H_2O_2 в концентрациях выше 0,5 мМ вызывает изменения потенциала клеточной мембраны посредством модификации тока ионов K^+ через Ca^{2+} -зависимые K^+ -каналы [457]. Наряду с этим установлено, что Ca^{2+} -зависимые K^+ -каналы широко представлены в тканях мозга [458, 459]. Показано, что H_2O_2 посредством Ca^{2+} -зависимой акти-

вазии фосфолипазы A_2 и митогенактивируемой протеинкиназы увеличивает высвобождение арахидоновой кислоты в нейронах [460]. В свою очередь, установлено, что арахидоновая кислота увеличивает проводимость K^+ -каналов в нейронах [461].

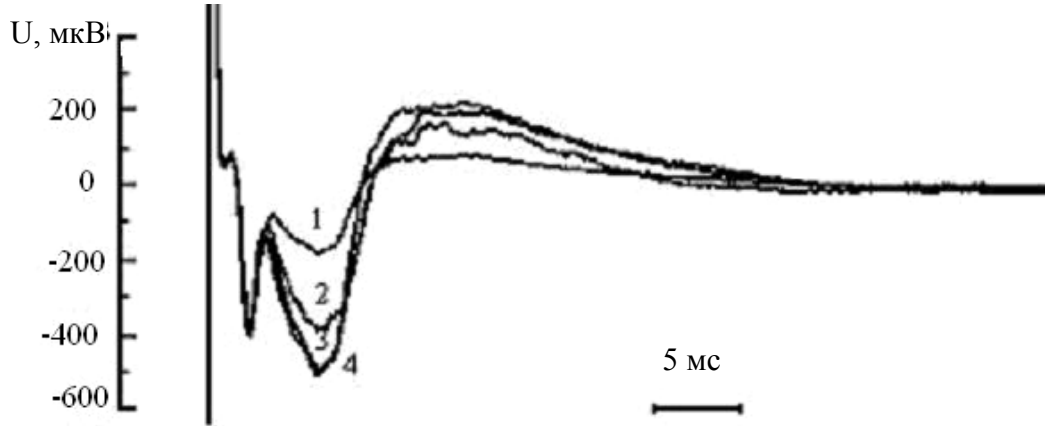


Рис. 6.2. Постсинаптический потенциал поля CA1 при концентрации пероксида водорода в СБСР:
1 – контроль, 2 – 1,5 мМ, 3 – 2,5 мМ, 4 – 3,5 мМ

Регуляция активности Ca^{2+} -зависимых K^+ -каналов имеет два основных функциональных значения. Во-первых, открытие каналов может приводить к изменению формы и длительности потенциалов действия [462]. Во-вторых, локализованные в нервных окончаниях Ca^{2+} -зависимые K^+ -каналы модулируют пресинаптическую активность и высвобождение нейротрансмиттеров [463]. Ca^{2+} -зависимые K^+ -каналы в ряде типов клеток ограничивают поступление ионов Ca^{2+} в клетку, ингибируя потенциалзависимые Ca^{2+} -каналы [464, 465]. При снижении поступления ионов Ca^{2+} в клетку уменьшается высвобождение нейротрансмиттеров и секреция нейропептидов [466]. Показано, что паттерны электрической активности, имеющие различную длительность и частоту следования, вследствие изменения амплитуды и продолжительности внутриклеточного кальциевого сигнала оказывают различные эффекты на экспрессию генов [467].

Редокс-регуляция Ca^{2+} -зависимых K^+ -каналов в гладких миоцитах сосудов рассматривается как один из механизмов регуляции вазомоторной функции организма [468]. Показано, что \dot{O}_2^- и H_2O_2 стимулируют активность K^+ -каналов, а $ONOO^-$ – ингибирует K^+ -каналы [469, 470].

Общепринятая точка зрения состоит в том, что как нейроэпителиальные тельца легкого, так и каротидные тельца кровеносных сосудов, являются сенсором концентрации O_2 [471]. Скулачев В. П. полагает, что сигналом к уменьшению потребления кислорода в тканях является по-

вышение 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 [472].

6.2. Редокс-регуляция кальциевого гомеостаза

Результаты наших исследований, а также многочисленные данные литературы позволяют предположить, что одним из ранних ответов сигнальных систем на изменение концентрации окислителей во многих типах клеток является повышение внутриклеточной концентрации несвязанного кальция.

Все клетки млекопитающих за исключением эритроцитов содержат органеллы, способные аккумулировать Ca^{2+} . При соответствующих условиях Ca^{2+} выходит из депо медленно (из митохондрий и секреторных гранул) или быстро (из саркоплазматического ретикулула мышечных клеток и Ca^{2+} -депо немышечных клеток). Увеличение цитозольной концентрации Ca^{2+} опосредовано также открытием кальциевых каналов. Открытие и проницаемость кальциевых каналов может контролироваться мембранным потенциалом, химическими реагентами (модуляторами, гормонами, вторичными посредниками) или же комбинацией этих факторов.

Окислители вызывают как кратковременное, так и длительное повышение цитозольной концентрации Ca^{2+} . Вид функциональной зависимости кальциевого ответа клетки во многом определяется типом клетки. Например, H_2O_2 в концентрациях выше 0,5 мМ вызывает кратковременный скачок концентрации кальция в эндотелиальных клетках [473]. В культуре мезенхимальных клеток H_2O_2 при концентрациях 0,01 – 10 мМ вызывает медленный подъем внутриклеточной концентрации кальция с выходом на плато [474]. В эндотелиальных клетках аорты H_2O_2 в концентрациях 0,1–1 мМ индуцирует кальциевые колебания [475]. В гладкомышечных клетках кишечника H_2O_2 (2,7 мМ) индуцирует длительное повышение внутриклеточной концентрации кальция [476]. Электрофизиологическими методами определено, что H_2O_2 увеличивает ток через потенциалзависимые Ca^{2+} -каналы в ооцитах [477]. В инсулинсекретирующей линии CRI-G1 H_2O_2 увеличивает внутриклеточную концентрацию кальция посредством активации неспецифических катионных каналов плазматической мембраны [478]. Активация катионных каналов

плазматической мембраны лежит в основе повышения $[Ca^{2+}]_{цит}$ и гибели нейронов [479]. В остеоцитах и эндотелиальных клетках H_2O_2 индуцирует выход Ca^{2+} из внутриклеточных депо [480, 481].

Нами обнаружено, что H_2O_2 вызывает дозозависимое увеличение уровня внутриклеточного несвязанного кальция ($[Ca^{2+}]_{цит}$) в клеточных линиях PC12, C6, FL, Rin-m и β -клетках поджелудочной железы кролика [482–485]. На рис. 6.3 представлены типичные зависимости изменения внутриклеточной концентрации свободного Ca^{2+} от времени инкубирования клеток линии C6 с различными концентрациями H_2O_2 .

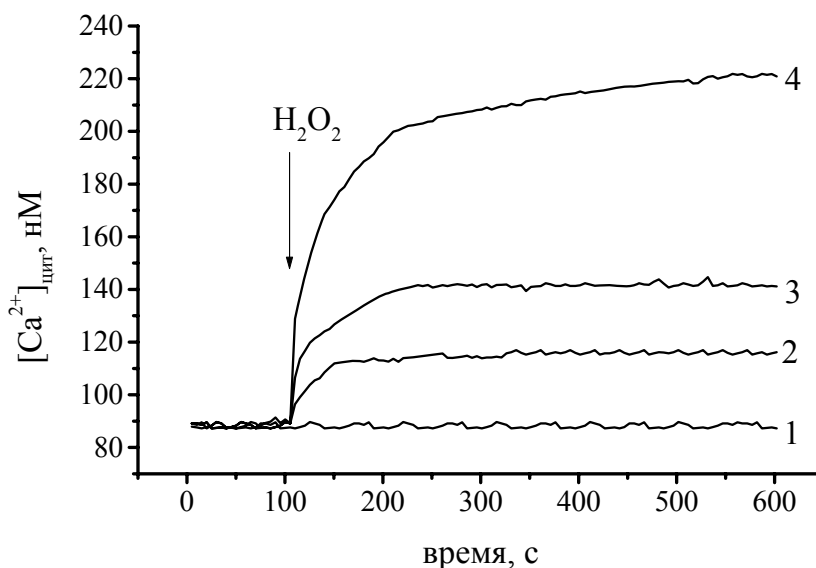


Рис. 6.3. Зависимость концентрации цитозольного Ca^{2+} от времени инкубирования клеток C6 с H_2O_2 : 1 – контроль, 2 – 0,5 мМ H_2O_2 , 3 – 1 мМ H_2O_2 , 4 – 2 мМ H_2O_2 . Число клеток линии C6 в суспензии – $1,5 \times 10^6$ в 1 мл

Нами показано, что повышение цитозольной концентрации кальция опосредовано в основном выходом кальция из внутриклеточных депо [245, 482]. При инкубировании клеток с H_2O_2 наблюдается быстрый подъем $[Ca^{2+}]_{цит}$ с последующим выходом на плато. Следует отметить, что выход величины концентрации цитозольного кальция на плато происходит в результате поддержания градиента концентраций H_2O_2 через плазматическую мембрану клеток. При удалении внеклеточного H_2O_2 концентрация свободного Ca^{2+} в цитозоле снижается до начального уровня.

Одновременная регистрация изменений внутриклеточных концентраций H_2O_2 и Ca^{2+} позволила обнаружить наличие корреляции между концентрацией H_2O_2 в клетках и скоростью изменения внутриклеточной концентрации несвязанного кальция. На рис. 6.4 представлены зависи-

мости изменения внутриклеточной концентрации H_2O_2 и скорости изменения внутриклеточной концентрации несвязанных ионов кальция от времени инкубирования клеток с внеклеточным пероксидом водорода. Полученные нами данные указывают на то, что уровень внутриклеточного H_2O_2 определяет величину повышения цитоплазматического Ca^{2+} . Процессы, приводящие к изменению внутриклеточной концентрации H_2O_2 , сопровождаются процессами, которые повышают концентрацию цитозольного кальция.

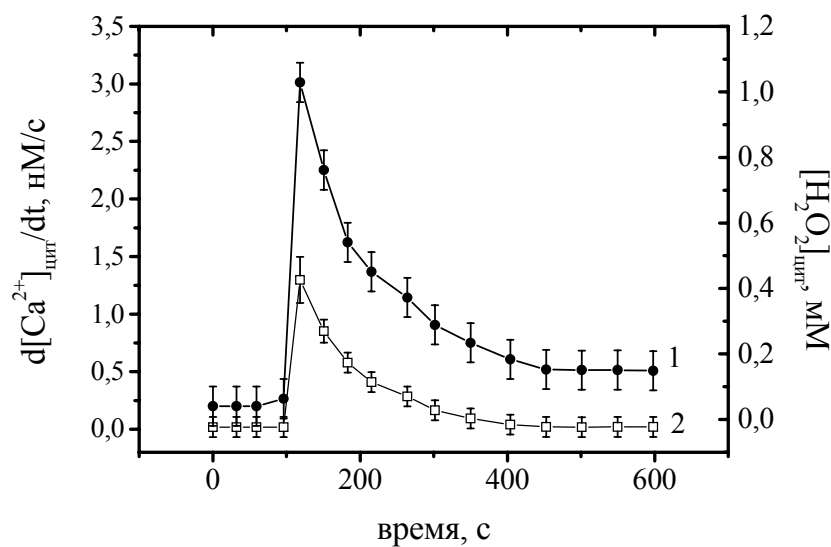


Рис. 6.4. Влияние внеклеточного пероксида водорода на внутриклеточную концентрацию H_2O_2 (1) и скорость изменения концентрации цитозольного Ca^{2+} (2). Число клеток амниона человека линии FL в суспензии — 10^6 в 1 мл. Концентрация H_2O_2 в СБСР — 1 мМ

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что механизм повышения $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ при инкубировании клеток с H_2O_2 опосредован модификацией свойств кальций-транспортных систем внутриклеточных кальциевых депо. Мы предполагаем, что ведущую роль в высвобождении Ca^{2+} из внутриклеточных депо выполняют рианодинсвязывающие и IP_3 -связывающие Ca^{2+} -каналы кальциосом, активация которых происходит при повышении внутриклеточной концентрации окислителей. Активация каналов конкретного типа происходит при превышении специфической для каждого типа ткани величины внутриклеточной концентрации окислителей.

При высоких концентрациях окислителей может индуцироваться выход ионов Ca^{2+} из митохондрий через образование мембранных пор [486]. Выход Ca^{2+} из митохондрий является одним из этапов механизма апоптоза клетки [487]. В свою очередь, показано, что вход Ca^{2+} через

мембранные поры митохондрий усиливает генерацию АФК в цепи переноса электронов [488]. Повышение внутриклеточной концентрации окислителей вследствие генерации АФК митохондриями индуцирует дальнейшее повышение концентрации несвязанного Ca^{2+} посредством описанных выше механизмов и запускает процессы, приводящие к гибели клеток.

Высвобождение Ca^{2+} из кальциосом при действии окислителей может иметь регуляторное значение и протекать при физиологических условиях. Выход Ca^{2+} из митохондрий при действии окислителей происходит при патологических условиях и служит важным звеном в механизмах гибели клеток.

Следует отметить, что мишенями действия окислителей внутри клетки могут являться также фосфатазы, протеинкиназы и другие регуляторные белки. Однако, например, активация тирозинкиназ в клетках наблюдается при высоких концентрациях H_2O_2 (3–5 мМ) [489, 490]. С другой стороны, рианодинсвязывающие Ca^{2+} -каналы содержат 80–100 остатков цистеина в каждой из 4 субъединиц [491]. Высокая чувствительность Ca^{2+} -каналов внутриклеточных депо к незначительным изменениям редокс-состояния окружающей среды [492, 493] позволяет рассматривать их как универсальные редокс-сенсоры клетки [494].

Обнаружено, что редокс-состояние специфических SH-групп на цитоплазматическом домене определяет чувствительность рианодиновых рецепторов к изменениям концентрации кальция в цитозоле [495]. Образование смешанных дисульфидных связей между SH-группами цистеинов рианодинсвязывающих Ca^{2+} -каналов, индуцированные 4,4'-дитиодипиридином и 2,2'-дитиодипиридином, вызывают мобилизацию Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума [496, 497]. В мышечных клетках оксид азота в низких концентрациях ингибирует окисление реакционных сульфгидрильных групп рианодинсвязывающих рецепторов, при высоких концентрациях NO , наоборот, индуцируется окисление реакционных сульфгидрильных групп [498].

В модельных экспериментах с везикулами саркоплазматического ретикулума из мышечной ткани обнаружено, что H_2O_2 в концентрациях 0,1–10 мМ активирует рианодинсвязывающие Ca^{2+} -каналы внутриклеточных депо [499]. Позже было показано, что NEM в концентрациях 0,02–0,2 мМ также активирует рианодинсвязывающие Ca^{2+} -каналы саркоплазматического ретикулума клеток мышечной ткани [500]. Супероксидный анион-радикал индуцирует выход Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума кардиомиоцитов через рианодинсвязывающие Ca^{2+} -каналы, при этом показано, что активность Ca^{2+} -АТФазы не изменяется [501].

Недавно было показано, что рианодинсвязывающие Ca^{2+} -каналы саркоплазматического ретикулула активируются хлорноватистой кислотой [502].

Активность IP_3 -рецептора также модулируется сульфгидрильными реагентами. Обнаружено, что тимеразол и окисленный глутатион повышают чувствительность IP_3 -рецептора к IP_3 и способствуют мобилизации Ca^{2+} из IP_3 -чувствительных депо [503, 504]. В эндотелиальных клетках кровеносных сосудов H_2O_2 снижает концентрацию Ca^{2+} в IP_3 -чувствительных депо [505]. В ацинарных клетках поджелудочной железы 1 мМ H_2O_2 ингибирует Ca^{2+} -АТФазу и индуцирует выход Ca^{2+} из митохондрий [506]. В нейронах выход Ca^{2+} из митохондрий индуцирует NO в концентрациях 4–10 мкМ [507].

Регуляция внутриклеточной концентрации несвязанного кальция представляет один из способов передачи внеклеточной информации на внутриклеточные эффекторы. Внутриклеточные Ca^{2+} -сигналы с различной амплитудой и длительностью изменений $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ активируют различные факторы транскрипции, и таким образом модулируют активность клеток [508–510]. Установленная в наших исследованиях связь между величинами внутриклеточной концентрации несвязанного Ca^{2+} и концентрации H_2O_2 отображает механизм кодировки, посредством которого внеклеточные сигналы с различной амплитудой и длительностью изменений концентрации окислителей могут передаваться с участием ионов Ca^{2+} на внутриклеточные эффекторы.

Несмотря на обилие литературных данных, посвященных изучению регуляторной роли редокс-молекул в клетке, молекулярно-клеточные механизмы, лежащие в основе данных процессов, пока не установлены. Также остро стоит проблема количественного определения физико-химических параметров, характеризующих редокс-свойства клетки и их взаимосвязи с функциональной активностью клеток. Для установления детальных биофизических механизмов редокс-регуляции клеточных процессов необходима разработка способов количественного описания и экспериментального определения зависимости активности белков от изменений величины параметров редокс-состояния клетки.

6.3. Редокс-потенциал белков

В настоящее время сформированы определенные представления о редокс-потенциале и его роли в регуляции активности белков. В качестве индикатора редокс-состояния белков используется редокс-потенциал сульфгидрильных групп белков и редокс-потенциал гемовых групп.

Величина параметров редокс-состояния клетки играет важную роль в регуляции активности ряда белков. Например, усиление процессов окисления в цитоплазме инициирует образование дисульфидных связей в ксантиноксидоредуктазе, что переводит фермент из дегидрогеназной формы в оксидазную.

Окисление-восстановление сульфгидрильных групп является одним из механизмов регуляции рианодинсвязывающих Ca^{2+} -каналов. Экспозиция везикул саркоплазматического ретикулума к восстановленному глутатиону ингибирует выход кальция через рианодинсвязывающие Ca^{2+} -каналы, с другой стороны, окисленный глутатион активирует рианодинсвязывающие рецепторы [511]. Наряду с рианодинсвязывающими Ca^{2+} -каналами эндоплазматического и саркоплазматического ретикулума в клетке существует огромное количество белков, содержащих сульфгидрильные группы (RSH). Концентрация RSH в белках в несколько раз выше концентрации GSH в клетках [512].

Изменение параметров клеточного редокс-состояния влияет на активность внутриклеточных сигнальных путей в результате модуляции активности ферментов, участвующих в трансдукции сигнала. Показано, что изменение отношения GSSG/GSH с 0,02 до 0,5 (что соответствует изменению редокс-потенциала глутатиона с -230 мВ до -190 мВ) регулирует активность убиквитинактивируемого фермента (E1) и убиквитин-сопряженного фермента (E2), которые участвуют в протеолизе белков [513]. Регуляция активности ферментов E1 и E2 осуществляется в результате обратимого S-глутатиолирования [514].

При увеличении концентрации окисленного глутатиона и уменьшение концентрации восстановленного глутатиона изменяется величина отношения GSH/GSSG и, следовательно, изменяется редокс-статус клетки. В модельных системах показано, что смещение величины отношения GSH/GSSG от 30 к 10 коррелирует с изменением содержания белковых смешанных дисульфидов [515]. Формирование смешанных дисульфидов происходит в результате изменения отношения GSH/GSSG через тиолдисульфидобменный механизм. Специфические взаимодействия глутатиона с клеточными белками смещают равновесие между образованием дисульфидов и тиолов (для большинства белков константа равновесия $k_{\text{mix}} \approx 1$). В настоящее время обнаружено, что фактор транскрипции c-Jun содержит остатки цистеина с $k_{\text{mix}}=13$, т. е. 50 % белковых цистеинов становятся S-глутатиолированными при отношении концентраций восстановленной формы глутатиона к окисленной, равным 13 [516].

Показано, что негемовые белки можно охарактеризовать собственным редокс-потенциалом, оцениваемым по степени окисления-

восстановления остатков цистеина. Редокс-потенциал для тирозинфосфатазы семейства VHR (vaccinia H1-related) составляет -331 мВ [517].

Редокс-сенсоры внутриклеточных сигнальных путей с участием ионов кальция – ионотропные рианодин-связывающие рецепторы саркоплазматического и эндоплазматического ретикулума – обладают наибольшей активностью при потенциале тиоловых групп белка, равном -175 мВ [518]. Возможно, реакционные сульфгидрильные группы белка располагаются с внутренней стороны мембраны эндоплазматического ретикулума, внутренняя среда которого более окислена в сравнении с цитозолем [519]. Показано, что мембрана микросом непроницаема для GSSG в отличие от GSH, что вызывает накопление GSSG внутри эндоплазматического ретикулума [520].

В настоящее время также показано, что изменения клеточного редокс-потенциала модулируют экспрессию генов в результате редокс-регуляции факторов транскрипции. Для фактора транскрипции OxyR, который регулирует активность ряда генов бактерий *Escherichia coli*, редокс-потенциал сульфгидрильных групп равен -185 ± 5 мВ [521]. В неактивированной клетке фактор транскрипции OxyR находится в неактивном, восстановленном состоянии. Показано, что активация фактора транскрипции OxyR может осуществляться двумя различными путями: в результате действия пероксида водорода или в результате изменения редокс-потенциала глутатиона в клетке (с -260 мВ до -180 мВ) [522]. Обнаружено, что ингибирование связывания фактора транскрипции NF-κB с ДНК происходит в результате S-глутатиолирования субъединицы p50 при изменении отношения GSH/GSSG с 100 до 1 (что соответствует изменению редокс-потенциала глутатиона с -210 мВ до -150 мВ) [523]. Аналогичное изменение активности при изменении редокс-потенциала наблюдается для фактора транскрипции c-Jun [516]. Изменение состояния сульфгидрильных групп регулирует активность многих других факторов транскрипции, включая p53, AP-1 и т.п. [524, 525].

Как отмечалось выше, восстановление S-глутатиолированных белков осуществляется в результате ферментативного расщепления дисульфидных связей такими ферментами, как тиоредоксин, глутаредоксин или дисульфидизомеразы. Глутаредоксин относится к тиоредоксиновому семейству структурно подобных тиолдисульфидоксидоредуктаз, стандартный редокс-потенциал которых изменяется в диапазоне от -124 мВ [526] до -270 мВ [527, 528]. Редокс-потенциал для глутаредоксина 1 и 3 составляет -233 мВ и -198 мВ соответственно [529]. Стандартный редокс-потенциал для изоформ дисульфидизомеразы изменяется в диапазоне от -110 мВ [530] до -190 мВ [531].

К редокс-активным белкам относятся также белки, содержащие гемовые группы. Показано, что цитохром *c* содержит одну гемовую группу с восстановительным потенциалом +260 мВ [532], а цитохром b_{245} содержит два гема с восстановительными потенциалами –225 мВ и –265 мВ [533]. В процессе функционирования в клетке редокс-потенциал гемовых групп белков изменяется при связывании с различными лигандами. При связывании 6R-тетрогидро-L-биоптерина и L-аргинина индуцибельной NO-синтазой потенциал восстановления гемовой группы изменяется от –350 мВ до –240 мВ, тогда как потенциал восстановления гемовой группы нейрональной NO-синтазы (–240 мВ) остается неизменным при тех же условиях [534].

Для некоторых гемовых белков значение редокс-потенциала определяет их участие в регуляторных процессах в клетке. Обнаружено, что одним из ключевых событий апоптоза является высвобождение цитохрома из митохондрий [535]. Предполагается, что цитохром *c* вызывает активацию ферментов семейства гаспаз только в окисленном состоянии [536].

6.4. Механизмы регуляции активности белков редокс-молекулами

В настоящее время в литературе обсуждаются несколько механизмов переключения активности белков с участием редокс-молекул. Взаимодействие вторичных мессенджеров с белками-мишенями вызывает у них как обратимые, так и необратимые структурные модификации. Ниже будут обсуждаться в основном обратимые механизмы регуляции активности белков. Необратимые модификации белков редко встречаются в механизмах внутриклеточной сигнализации. Например, переход фактора транскрипции NF-κB в активное состояние происходит в результате деградации ингибирующей субъединицы протеазами. Сигналом к протеолизу субъединицы I-κB может служить фосфорилирование субъединицы протеинкиназами или окислительное повреждение в результате изменения внутриклеточного редокс-состояния. Различные типы обратимого переключения активности белков с участием редокс-молекул представлены в табл. 6.1.

Наиболее изученным механизмом обратимого переключения активности фермента является активация гуанилатциклазы в результате связывания NO с гемовой группой белка. Связывание NO с гемом вызывает инактивацию таких ферментов, как цитохромоксидаза, каталаза и др.

(подробно рассмотрено в гл. 3). Активность гем-содержащих белков также изменяется при связывании с CO [39].

Железо-серные кластеры белков активно участвуют в редокс-реакциях, протекающих в клетке, и могут участвовать в процессах трансдукции сигнала в качестве редокс-сенсоров. Показано, что одно-электронное окисление $[\text{Fe}_2\text{S}_2]^{2+}$ -кластера фактора транскрипции SoxR в *Escherichia coli* приводит к активации белка и инициации транскрипции soxS-зависимых генов [537, 538]. С другой стороны, окисление $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ -кластера бактериального регулятора транскрипции FNR (fumarate nitrate reduction) ведет к его инаktivации и переключению активности *Escherichia coli* с анаэробного на аэробный метаболизм [539].

Таблица 6.1

Механизмы переключения активности белков

Тип модификации белка	Редокс-молекулы, передающие сигнал	Белки-мишени
Связывание с гемовой группой	NO , CO	Гуанилатциклаза, цитохромоксидаза и др.
Окисление-восстановление Fe-S-кластеров	H_2O_2 , NO , O_2 , O_2^-	SoxR, FNR и др.
Нитрозилирование цистеинов	NO , ONOO^-	NMDA-рецепторы, рианодинчувствительные Ca^{2+} -каналы и др.
S-глутатиолирование	GSH, RSH, NO , H_2O_2	Протеинкиназа C, рианодинчувствительные Ca^{2+} -каналы и др.
Формирование сульфенатов (окисление тиолатов)	H_2O_2 , NO , O_2^-	Тирозинфосфатазы, Orp1 и др.
Образование дисульфидных связей	H_2O_2 , O_2^- , NO	OxyR, Yap 1, рианодинчувствительные Ca^{2+} -каналы и др.
Окисление метионинов	H_2O_2 , ONOO^-	Кальмодулин, фософоламбан и др.

Нитрозилирование цистеиновых остатков белка также является важным механизмом регуляции активности белков (более подробно см. гл. 3). Нитрозилирование белков может активировать или инаktivировать ряд ферментов, участвующих в трансдукции сигнала (табл. 6.2). Например, нитрозилирование тиоловых групп NMDA-рецепторов или рианодиновых рецепторов ведет к активации белков [540, 541]. Нитрозилирование тиоловых групп гаспазы-3 инаktivировывает фермент [542]. Предпо-

лагается, что регуляторный эффект NO на активность белков опосредован числом сформированных дисульфидных связей (см. гл. 3). Следует отметить, что нитрозилирование инактивирует ферменты метаболизма глутатиона, такие как γ -глутамилцистеинсинтаза, глутатион-S-трансфераза [543], глутатионредуктаза [544] и глутатионпероксидаза [545] и тем самым снижает антиокислительную способность клеток.

Таблица 6.2

Примеры белков-мишеней в реакциях обратимого S-нитрозилирования (RSNO) и S-глутатиолирования (RSSG)

Белки-мишени	RSNO	RSSG	Ссылка
	Регуляция активности		
Протеинкиназа С	(-)	(-)	[546]
Убиквитинактивируемый и сопряженный ферменты (E1 и E2)		(+)	[547]
Глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа	(-)	(-)	[548]
Креатинкиназа	(-)	(-)	[549, 550]
Матриксметаллопротеиназа	(+)	(+)	[551, 552]
cAMF-зависимая протеинкиназа		(-)	[553]
Протеинфосфатазы 1B и 2A		(-)	[554, 555]
Каспазы 3,8 и 9	(-)		[556, 557]
JNK	(-)		[558, 559]
Глутатион-S-трансфераза	(-)	(+)	[560, 561]
Na ⁺ -каналы	(-)		[562]
NMDA-рецепторы	(+)		[563]
Рианодинсвязывающие Ca ²⁺ -каналы	(+)	(+)	[564]
H-ras	(+)	(+)	[565]
Примечание. (-) – модификация индуцирует уменьшение активности белка, (+) – модификация индуцирует усиление активности белка.			

Ковалентной модификацией белка, регулирующей его активность, является S-глутатиолирование (см. табл. 6.2). Активность белков после их S-глутатиолирования может как увеличиваться, так и снижаться. Например, S-глутатиолирование рианодинсвязывающих Ca²⁺-каналов увеличивает выход ионов кальция в цитозоль, тогда как S-глутатиолирование протеинкиназы С ингибирует активность фермента.

Обратимое ингибирование фосфатаз в результате образования сульфениковой кислоты является важным механизмом регуляции внутриклеточной трансдукции сигнала. В результате образования сульфенатов инактивируются фосфатазы Cdc25B и Cdc25C [566], тирозинфосфатазы VHR, LAR и PTP1 [567] и ряд других белков [568].

Взаимодействие редокс-молекул, сульфенатов, нитрозилированных и S-глутатиолированных аминокислотных остатков с тиолами белков может приводить к образованию внутрибелковых и межбелковых дисульфидных связей. Следует отметить, что образование и расщепление дисульфидных связей регулируется рядом тиолзависимых ферментов, включая тиоредоксин, глутаредоксин, дисульфидизомераза и другие [569, 570]. Образование дисульфидных связей активирует фактор транскрипции OxyR [521]. Окисление тиолов с образованием дисульфидов и их восстановление регулирует переходы между активным и неактивным состоянием таких белков, как рибонуклеотидредуктаза [571], метионинсульфоксидредуктаза [572], RB60 [573], Yap1 (yeast AP1) [574], Orp1 (oxidant receptor peroxidase 1 или Gpx3) [575].

Образование дисульфидных связей представляет собой способ функционирования специфического внутрибелкового «переключателя» активности фермента [576]. Например, трансмембранный сенсор сахара BglF бактерии *Escherichia coli* обладает различной ферментативной активностью в зависимости от концентрации β -гликозида. В нестимулированном состоянии BglF функционирует как BglG фосфорилаза [577]. В присутствии β -гликозида во внеклеточной среде BglF проявляет активность BglG-дефосфорилазы и β -гликозид фосфотрансферазы. BglF состоит из трех доменов: двух гидрофильных и одного гидрофобного. Показано, что стимуляция BglF запускает формирование дисульфидных связей между остатками цистеинов, расположенными в активном центре цитозольного домена, и остатками цистеинов домена, связанного с мембраной [578].

Наряду с цистеинами мишенью действия различных редокс-молекул в белке является также аминокислотная группа метионина. Окисление метионинов, как правило, вызывает дестабилизацию α -спирали и регулирует конформационную подвижность полипептидной цепи белка [579]. Дестабилизация спирали кальмодулина (CaM) в результате окисления Met¹⁴⁴ и Met¹⁴⁵ вызывает связывание белка со специфическими мишенями [580]. Следует отметить, что кальмодулин является одним из основных Ca²⁺-зависимых белков, через активацию которого регулируется активность более 50 белков в процессах Ca²⁺-сигнализации [581]. Связывание CaM с Ca²⁺-АТФазой вызывает активацию насоса, тогда как связывание окисленного CaM стабилизирует насос в «выключенном» состоянии [582]. Окисленные метионины восстанавливаются метионинсульфоксидредуктазой, которая присутствует во всех организмах [583, 584].

Описанные выше модификации можно рассматривать в качестве различных типов «переключателей» активности белка, работа которых

зависит от редокс-состояния клетки. Изменение редокс-состояния в клетке индуцирует «включение активности» одних белков и «выключение» других в процессах передачи сигнала.

6.5. Физико-химические параметры редокс-состояния и функциональная активность клеток

В каждом типе клеток поддерживается редокс-состояние, которое характеризуется определенным значением эффективного восстановительного потенциала и редокс-буферной емкости. Одинаковая по величине концентрация окислителя или восстановителя в среде будет вызывать различные по величине смещения восстановительного потенциала в разных типах клеток. Поэтому в разных типах клеток при действии одной и той же редокс-молекулы будут «включаться» и/или «выключаться» различные типы белков. Таким образом, редокс-состояние клеток можно рассматривать как тип своего рода преобразователя («трансдюсера»), передающего сигналы на различные внутриклеточные переключатели. Специальные сенсоры внутри клеток регистрируют изменения внутриклеточного редокс-состояния и с помощью белков-посредников формируют функциональный клеточный ответ.

На основании существующих данных можно предположить, что в клетках существуют два класса редокс-сенсоров. Первый класс редокс-сенсоров регистрирует сигнал и затем передает его на специальный преобразователь, второй класс – совмещает в себе функции сенсора и преобразователя. В качестве примера первого класса сенсоров можно привести систему Ogr1-Yap1, функционирующую в микроорганизмах. Повышение концентрации окислителей в клетке индуцирует формирование сульфениковой кислоты в Cys³⁶ белка Ogr1 [575]. Данная форма белка посредством формирования внутрибелковых дисульфидных связей между Cys³⁶ и Cys⁵⁹⁸ активирует фактор транскрипции Yap1, регулирующий экспрессию многих генов [585].

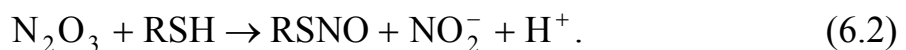
Фосфоламбан также может выступать сенсором первого класса. Фосфоламбан в нефосфорилированном состоянии связывает Ca²⁺-АТФазу эндоплазматического ретикулума (SERCA2a). Фосфорилирование фосфоламбана протеинкиназой А или CaM-зависимой киназой II инициирует отсоединение фосфоламбана от Ca²⁺-АТФазы и ее активацию [586]. Окисление Met²⁰ в фосфоламбране блокирует активацию насоса с участием протеинкиназы А или CaM-зависимой киназы II [587].

Второй класс сенсоров является и сенсором и преобразователем редокс-сигнала. Например, активация рианодинчувствительных Ca²⁺-

каналов в результате изменения редокс-состояния увеличивает концентрацию кальция в цитозоле и запускает многие Ca^{2+} -зависимые процессы. Активация SoxR редокс-сигналом индуцирует изменение генной экспрессии в *E. coli*.

Наличие нескольких классов переключателей составляет молекулярную основу дозозависимых эффектов окислителей на клетки. В зависимости от величины изменения параметров внутриклеточного редокс-состояния тиолы белка могут образовать дисульфиды, нитротиолы, сульфенаты, сульфинаты и сульфонаты. Взаимодействие нитротиолов и сульфенатов с другими тиолами приводит к образованию дисульфидов. Сульфениковая и сульфониновая кислоты, образование которых наблюдается в условиях сильно выраженного окислительного стресса, являются продуктами необратимой модификации тиолов.

Малые по величине смещения внутриклеточного редокс-состояния в сторону окислительного стресса вызывают модификации белка с переносом одного электрона. Для образования дисульфидов в активном месте редокс-сенсора необходим перенос двух электронов на акцепторы, что наблюдается при существенных изменениях редокс-состояния. Например, активацию белка Opr1 с формированием сульфениковой кислоты вызывают малые концентрации окислителей. Дальнейший рост концентрации окислителей индуцирует формирование дисульфидных связей в белке Opr1. Форма белка Opr1, содержащая дисульфидные связи, не способна активировать фактор транскрипции Yap1 [588]. В зависимости от изменения редокс-состояния тиолы белка могут подвергаться также S-глутатиолированию и S-нитрозилированию. Скорость образования нитротиолов увеличивается с ростом концентрации молекулярного кислорода:



S-глутатионирование и S-нитрозилирование белка могут оказывать различные эффекты на активность белка. Например, S-нитрозилирование глутатион-S-трансферазы ингибирует активность белка, а S-глутатиолирование белка увеличивает активность белка [560, 561]. Таким образом, редокс-сенсоры обладают избирательной чувствительностью. Показано, что рост внутриклеточной концентрации H_2O_2 практически не вызывает окисления метиониновых остатков в кальмодулине, тогда как ONOO^- избирательно окисляет Met^{144} и Met^{145} и изменяет активность сенсора [589].

Как было отмечено выше, переходы клеток в различные фазы жизненного цикла сопровождаются изменением редокс-состояния. Изменение концентрации окислителей в среде может инициировать переходы клеток от пролиферации к дифференцировке, от дифференцировки к апоптозу. В фибробластах млекопитающих митогенное действие H_2O_2 наблюдается при инкубировании клеток с окислителем в концентрациях 3–15 мкМ [590, 591], при инкубировании клеток с H_2O_2 в концентрациях 120–150 мкМ наблюдается временная задержка роста [592]. H_2O_2 при более высоких концентрациях индуцирует апоптоз (0,5–1 мМ) и некроз (5–10 мМ) [593].

С помощью предложенного метода нами оценено изменение среднего значения эффективного восстановительного потенциала в фибробластах при изменении концентрации H_2O_2 . Полученные данные схематически представлены на рис. 6.5.

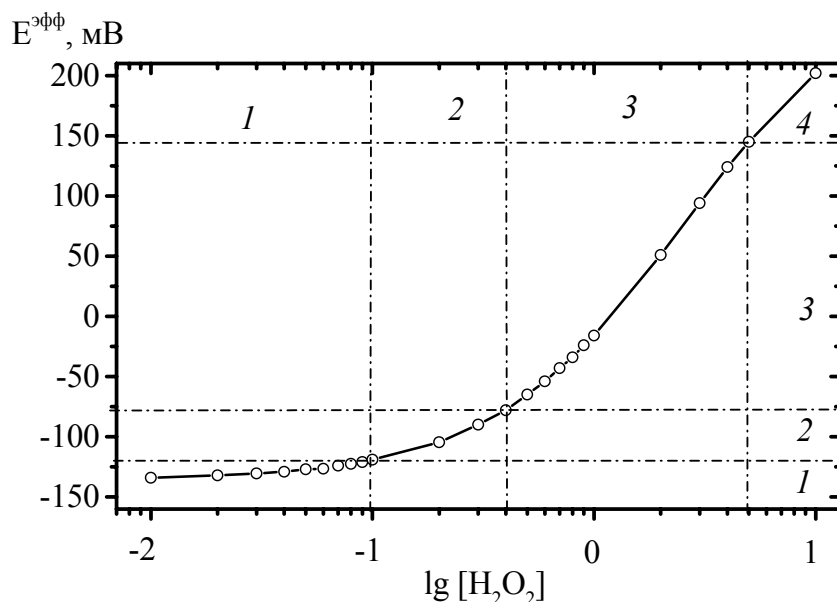


Рис. 6.5. Зависимость эффективного восстановительного потенциала фибробластов от концентрации H_2O_2 (в мМ): 1 – область пролиферации; 2 – область дифференцировки; 3 – область апоптоза; 4 – область некроза

Различным функциональным состояниям клетки соответствует свой диапазон значений эффективного восстановительного потенциала. В фибробластах процессам пролиферации соответствует диапазон значений эффективного восстановительного потенциала от -150 мВ до -125 мВ, процессам дифференцировки – от -125 мВ до -90 мВ, процессам апоптоза – от -90 мВ до +75 мВ, процессам некроза – от +75 мВ и выше.

Смещение значений внутриклеточного эффективного редокс-потенциала к положительным значениям сопровождается переключени-

ем клеточной активности: от процессов пролиферации к процессам дифференцировки, от процессов дифференцировки к процессам апоптоза, от процессов апоптоза к процессам некроза. Поддержание определенного редокс-гомеостаза на разных этапах жизненного цикла также важно для клетки, как и поддержание ионного гомеостаза. Показано, что для инициации процессов дифференцировки в клетках необходимо повышение базальной концентрации цитозольного кальция на 50–100 нМ [594], тогда как повышение базальной концентрации цитозольного кальция на 300–400 нМ вызывает гибель клеток [595].

Как было отмечено выше, цитозольная концентрация кальция зависит от внутриклеточного редокс-состояния и изменения параметров редокс-состояния сопровождаются изменениями в процессах кальциевой сигнализации. Таким образом, есть все основания предположить, что изменение редокс-состояния клетки может выступать одним из основных факторов переключения клеточной активности, в том числе и при иницировании процессов пролиферации, дифференцировки и апоптоза.

Следует отметить, что эффект действия окислителя зависит также от редокс-буферной емкости клетки. Одинаковая по величине концентрация окислителя при разных эффективных восстановительных потенциалах и редокс-буферных емкостях должна оказывать различные эффекты на активность белков и образование дисульфидных связей в тиолах.

Нами показано, что изменение внутриклеточной концентрации цитозольного кальция при действии H_2O_2 зависит от редокс-буферной емкости клеток [245, 485]. Среднее значение внутриклеточного эффективного восстановительного потенциала для эпителиальных клеток в условиях эксперимента составляет $-(240 \pm 10)$ мВ. (В эпителиальных клетках концентрация глутатиона равна примерно 1 мМ. При культивировании клеток без аскорбиновой кислоты во внеклеточном растворе внутриклеточная концентрация аскорбиновой кислоты значительно снижена и близка к нулевому значению.)

H_2O_2 в концентрации 0,1 мМ вызывает смещение значения $E^{\text{эфф}}$ на величину 25 мВ, тогда как 1 мМ H_2O_2 – на величину 180 мВ. Добавление восстановленного глутатиона не вызывает изменений среднего значения эффективного восстановительного потенциала, но вызывает изменение редокс-буферной емкости клетки. Согласно формуле (5.28) увеличение внутриклеточной концентрации глутатиона с 1 до 10 мМ приведет к увеличению редокс-буферной емкости клетки в 10 раз (с 3,6 мМ/В до 36 мМ/В). Увеличение внутриклеточной концентрации глутатиона до 10 мМ приведет к тому, что величина смещения эффективного восстановительного потенциала при действии 1 мМ H_2O_2 будет 25 мВ, что соот-

ветствует изменению значения $E^{\text{эфф}}$ при действии 0,1 мМ H_2O_2 в клетках, не нагруженных глутатионом.

Увеличение редокс-буферной емкости клеток в экспериментальных условиях осуществляли в результате инкубирования клеток с восстановленным глутатионом. Вход глутатиона в клетки из внеклеточной среды наблюдается только при концентрациях GSH выше физиологических [596]. Инкубирование клеток с GSH в концентрациях выше 1 мМ приводит к изменению направления градиента концентраций глутатиона и способствует увеличению внутриклеточной концентрации глутатиона и внутриклеточной редокс-буферной емкости. Увеличение редокс-буферной емкости клеток приводит к тому, что пероксид водорода в той же концентрации вызывает уже меньшее смещение величины эффективного редокс-потенциала и, следовательно, меньшее по величине увеличение цитозольной концентрации кальция.

Эксперименты с использованием GSH показали, что инкубирование клеток линии FL с GSH не вызывает изменения внутриклеточной концентрации несвязанного Ca^{2+} [597]. Однако повышение концентрации свободного кальция, индуцированное H_2O_2 в клетках после инкубирования с GSH (после инкубирования клетки дважды отмывались в СБСР), значительно ниже, чем в контрольных (рис. 6.6).

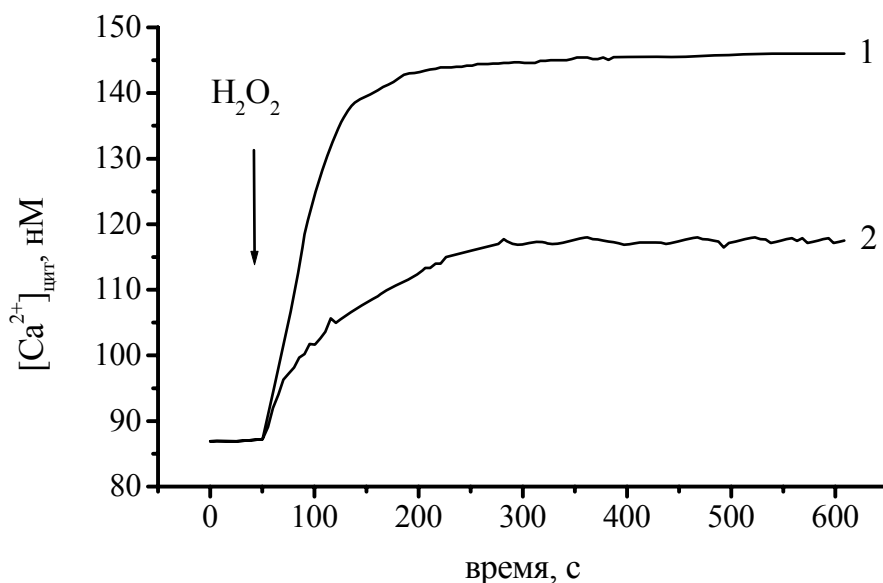


Рис. 6.6. Зависимость концентрации цитозольного кальция от времени при инкубировании с H_2O_2 : 1 – клетки без дополнительной загрузки GSH; 2 – клетки инкубировали в течение 1 часа с 10 мМ GSH. Число клеток линии FL в суспензии – 2×10^6 в 1 мл. Концентрация H_2O_2 во внеклеточном растворе – 1 мМ

Нами показано, что повышение цитозольного Ca^{2+} , индуцированное 1 мМ H_2O_2 в загруженных глутатионом клетках, совпадает с величиной повышения внутриклеточного несвязанного Ca^{2+} , индуцированным 0,1 мМ H_2O_2 в не загруженных глутатионом клетках. Т.е., использование параметров описания клеточного редокс-состояния (эффективный восстановительный потенциал и редокс-буферная емкость) позволяет предсказать изменение клеточных ответов при действии различных редокс-факторов. Однако, несмотря на наличие зависимости жизненной фазы клетки от редокс-состояния молекулярные механизмы, лежащие в основе этого явления, еще не установлены.

Дальнейшие исследования в этой области помогут понять биофизические механизмы, лежащие в основе процессов клеточного развития, а также причины нарушений, ведущих к возникновению злокачественных новообразований. Сейчас установлена связь между фазами жизненного цикла клетки и редокс-состоянием. Усиление окислительных процессов в цитоплазме клеток инициирует переход клеток от пролиферации к дифференцировке и далее к апоптозу. Сторонники свободнорадикальной теории старения считают, что активация окислительных процессов с возрастом ответственна за старение организма. Многие антиоксиданты или восстановители используются в медицинских технологиях профилактики и лечения заболеваний, связанных со старением организма.

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. Мы предполагаем, что именно чрезмерное накопление восстановителей в тканях ответственно за возникновение и развитие рака.

Известно, что клетки опухолевых тканей характеризуются повышенной резистентностью к индукторам апоптоза. Немецкие исследователи установили, что регуляция апоптоза в клетках лейкемии и нейробластомы зависит от редокс-состояния [598]. Многочисленные данные литературы указывают на то, что резистентность опухолевых клеток к антираковым препаратам связана с высокой (по сравнению с клетками тканей в норме) внутриклеточной концентрацией глутатиона [599–601]. Показано, что при увеличении концентрации восстановленного глутатиона в фибробластах повышается активность теломеразы, при снижении концентрации GSH активность фермента снижается [602]. Обнаружено также, что внутриклеточная концентрация GSH повышается при митозе и G_2 -фазе клеточного цикла в сравнении с другими фазами цикла [603]. С другой стороны, для перехода клетки из G_1 -фазы в S-фазу необходимо

повышение внутриклеточной концентрации окислителей [604]. Вероятно, повышение внутриклеточной концентрации окислителей является сигналом для вступления клетки в новый митотический цикл. Снижение внутриклеточной концентрации глутатиона и повышение активности процессов внутриклеточной генерации АФК являются одним из способов активации апоптоза клеток различных опухолей [605–607].

Данные литературы позволяют сделать вывод о значительных отличиях в редокс-состоянии нормальных и опухолевых тканях. Определенные нами количественные показатели редокс-состояния – величины эффективного восстановительного потенциала и редокс-буферной емкости – для печени в норме, карциномы печени, фибробластов и клеток фибросаркомы представлены в табл. 6.3. Во внеклеточной среде опухолевых тканей наблюдается понижение величины рН [608, 609]. Однако при этом величина внутриклеточного рН изменяется незначительно [610], поэтому при расчетах параметров редокс-состояния трансформированных клеток использовалось то же значение внутриклеточного рН, что и для нормальных клеток.

Из представленных данных видно, что величина эффективного восстановительного потенциала и редокс-буферной емкости в трансформированных клетках отличаются от величины параметров редокс-состояния в нормальных клетках.

Таблица 6.3.

Эффективный восстановительный потенциал и редокс-буферная емкость в нормальных и опухолевых клетках

Тип объекта	$E^{\text{эфф}}$, мВ при рН 7,2	Редокс-буферная емкость по H_2O_2 , мМ/В (рН 7,2)	Редокс-буферная емкость по $\dot{O}H$, мМ/В (рН 7,2)
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
При расчетах использованы данные работ [611–614]			

В опухолевых тканях в сравнении с тканями в норме наблюдаются снижение величины эффективного восстановительного потенциала и повышение редокс-буферной емкости. В результате изменения величины редокс-состояния функциональный ответ трансформированных клеток

на внеклеточные сигналы отличается от реакции нормальных клеток. Зависимость величины эффективного восстановительного потенциала нормальных и опухолевых клеток от концентрации H_2O_2 показана на рис. 6.7.

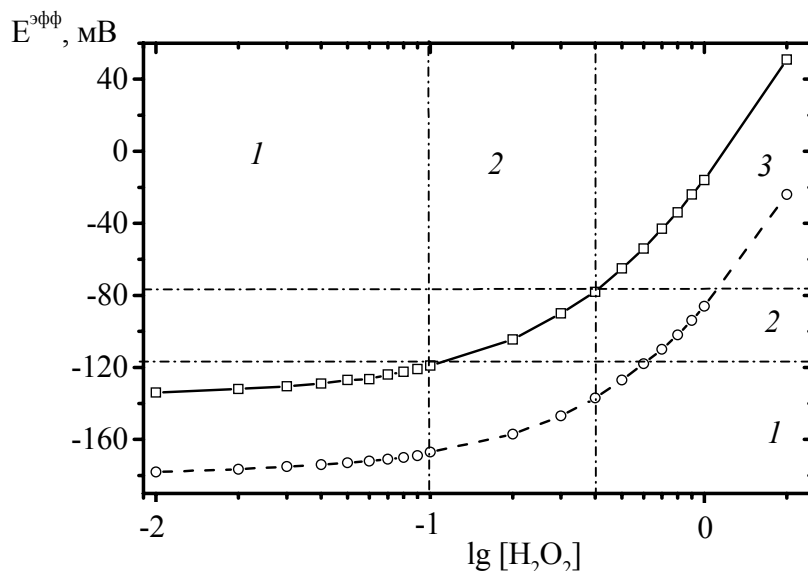


Рис. 6.7. Зависимость эффективного восстановительного потенциала фибробластов (непрерывная линия) и эффективного восстановительного потенциала клеток фибросаркомы (прерывистая линия) от концентрации H_2O_2 : 1 – область пролиферации; 2 – область дифференцировки; 3 – область апоптоза

Из представленных данных видно, что в нетрансформированных фибробластах повышение концентрации пероксида водорода выше 0,5 мМ будет вызывать изменение значения эффективного восстановительного потенциала до величин, характерных для апоптоза. С другой стороны, в клетках фибросаркомы аналогичное повышение концентрации окислителя характерно лишь для процессов пролиферации, т. е., редокс-сигнал, индуцирующий апоптоз в нормальных тканях, в трансформированных тканях может только усиливать пролиферацию клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Многочисленные исследования последних лет значительно расширили существующие представления о механизмах редокс-регуляции клеточных процессов. Отмечается существенный прогресс в изучении молекулярно-клеточных событий, ведущих к изменению функциональной активности клеток при действии редокс-молекул. Наряду с участием в развитии патологических процессов в организме обоснована регуляторная роль для многих типов редокс-веществ. Образующиеся в организме окислители и восстановители участвуют в защитных механизмах, процессах внутриклеточной и внеклеточной сигнализации, регуляции метаболизма, детоксикации ксенобиотиков и ряде других процессов.

Известно, что действие окислителей и восстановителей на клетки организма определяется внутриклеточным окислительно-восстановительным балансом или редокс-состоянием. Несмотря на широкое использование термина «редокс-состояние» в области свободно-радикальной биологии и медицины четкого представления о редокс-состоянии и его количественных характеристиках до сих пор нет.

Авторы данной работы надеются привлечь внимание исследователей к проблеме количественного описания редокс-состояния. Необходимо перевести термин «редокс-состояние» из области описательного в область научно-практического использования, что невозможно без определения характерных физико-химических параметров, позволяющих рассматривать редокс-состояние клетки в качестве объекта исследования.

Введенные нами параметры, такие как редокс-буферная емкость и эффективный восстановительный потенциал, можно рассматривать как новые характеристики клеточного и тканевого гомеостаза. Многие метаболические процессы зависят от параметров редокс-состояния, изменение величины которых вызывает перестройку внутриклеточных механизмов передачи сигнала. Знание характеристик редокс-состояния позволяет предсказывать механизмы действия многих фармакологических препаратов, и тем самым снижать вероятность побочных эффектов при их использовании.

Следует также подчеркнуть, что новые представления о процессах переноса протонов и электронов в оксидоредуктазах, сформированные к

настоящему времени, позволяют рассматривать эти белки не только как «химические машины» – катализаторы химических реакций, но и как молекулярные «физические машины», являющимися генераторами электрического тока в клетках.

Наряду с этим «электрические цепи» или цепи переноса электронов, формирующиеся в цитоплазме клетки с помощью определенных редокс-молекул и ферментов, по-видимому, являются определяющим фактором регуляции процессов в фазах пролиферации, дифференцировки и апоптоза.

Новая роль физических процессов переноса электрона и протона в регуляции функциональной активности клеток требует разработки новых подходов к описанию молекулярно-клеточных событий с участием редокс-молекул. Описательный подход, не учитывающий физические закономерности взаимодействия реагирующих молекул и ионов, усложняет картину регуляции внутриклеточных процессов, создаваемую многочисленными участниками процессов внутриклеточной сигнализации.

Центральное место в дальнейших исследованиях окислительно-восстановительных процессов в биологических системах должны занимать физические закономерности, определяющие свойства взаимодействующих редокс-молекул и направление переноса электронов и протонов. Введенный нами эффективный восстановительный потенциал является формой описания свободной энергии системы, которую она способна затратить на совершение электрической работы, т. е. работы по перемещению заряженных частиц. Применение этого понятия наряду с понятием «редокс-буферной емкости» позволят не только описать соответствующие редокс-состояния клеток, но и количественно оценить изменения в них активности биомакромолекул под действием редокс-факторов.

Не вызывает сомнения, что дальнейшие исследования редокс-свойств клеток позволят получить новые данные, важные для понимания общих закономерностей функционирования клетки и регуляции ее функциональной активности, что помимо фундаментального значения внесет существенный вклад в решение ряда практических вопросов, таких как разработка новых биомедицинских технологий клеточной терапии, новых методов диагностики заболеваний, новых технологий культивирования клеток, новых подходов к фармакологическому контролю функциональной активности клеток.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ ИСТОЧНИКИ

1. *Schafer F. Q., Buettner G. R.* // Free Radic. Biol. Med. 2001. Vol. 30. P. 1191–1212.
2. *Cooper C., Patel R. P., Brookes P. S., Darley-Usmar V. M.* // Trends Biochem. Sci. 2002. Vol. 27. P. 489–492.
3. *Мартинювич Г. Г., Черенкевич С. Н.* // Вестн. Белорус. ун-та. Сер. 1. 2004. № 1. С. 28–36.
4. *Droge W.* // Physiol. Rev. 2002. Vol. 82. P. 47–95.
5. *Sauer H., Rahimi G., Hescheler J., Wartenberg M.* // FEBS Lett. 2000. Vol. 476. P. 218–223.
6. *Sauer H., Wartenberg M., Hescheler J.* // Cell Physiol. Biochem. 2001. Vol. 11. P. 173–186.
7. *Takahashi T., Lord B., Schulze P. et al.* // Circulation. 2003. Vol. 107. P. 1912–1916.
8. *Сент-Дьердьи А.* Биоэлектроника. Исследования в области клеточной регуляции, защитных механизмов и рака. М.: Мир, 1971.
9. *Petlicki J., Van de Ven T.* // J. Chem. Soc. 1998. Vol. 94. P. 2763–2767.
10. *Bartberger M. D., Liu W., Ford E. et al.* // PNAS. 2002. Vol. 99. P. 10958–10963.
11. *Miranda K. M., Paolucci N., Katori T. et al.* // PNAS. 2003 Vol. 100. P. 9196–9201.
12. *Bonini M. G., Augusto O.* // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276. P. 9749–9754.
13. *Осипов А. Н., Азизова О. А., Владимиров Ю. А.* // Успехи биол. химии. 1990. Т. 31. С. 108–208.
14. *Fridovich I.* Free radicals in biology // New York: Acad. Press, 1976.
15. *Mao G. D., Poznansky M. J.* // FEBS Lett. 1992. Vol. 305. P. 233–236.
16. *Green M., Hill H.* // Meth. Enzymol. 1984. Vol. 105. P. 59–61.
17. *Winterbourn C. C., Metodiewa D.* // Free Radic. Biol. Med. 1999. Vol. 27. P. 322–328.
18. *Aslund F., Zheng M., Beckwith J., Storz G.* // PNAS. 1999. Vol. 96. P. 6161–6165.
19. *Rigo A., Stevanato R., Finazzi-Agro A., Rotilio G.* // FEBS Lett. 1977. Vol. 80. P. 130.
20. *Weinstein J., Bielski B.* // J. Am. Chem. Soc. 1979. Vol. 101. P. 58–62.
21. *Koppenol W. H.* // Redox Report. Vol. 6. № 4. 2001. P. 299–233.
22. *Dunford H. B.* // Coord. Chem. Rev. 2002. Vol. 233–234. P. 311–318.
23. *Kremer M.L.* // J. Inorg. Biochem. 2000. Vol. 78. P. 255.
24. *Fenton H.* // J. Chem. Soc. Proc. 1894. Vol. 10. P.157–158.
25. *Barb W. G., Baxendale J. H., George P., Hargrave K. R.* // Trans. Faraday Soc. 1951. Vol. 47. P. 591–616.
26. *Bray W. C., Gorin M. H.* // J. Am. Chem. Soc. 1932. Vol. 54. P. 2124.
27. *Sawyer D. T., Sobkowiak A., Matsushita T.* // Acc. Chem. Res. 1996. Vol. 29. P. 409.
28. *Sheu C., Richert S. A., Cofre P. et al.* // J. Am. Chem. Soc. 1990. Vol. 112. P. 1936.
29. *Sawyer D. T., Kang C., Llobet A., Redman C.* // J. Am. Chem. Soc. 1993. Vol. 115. P. 5817.
30. *Goldstein S., Meyerstein D.* // Acc. Chem. Res. 1999. Vol. 32. P. 547.

31. *Meulemans A.* // *Neurosci. Lett.* 1994. Vol. 171. P. 89–93.
32. *Wise D. L., Houghton G.* // *Chem Eng Sci.* 1968. Vol. 23. P. 1211–1216.
33. *Stamler J., Singel D., Loscalzo J.* // *Science.* 1992. Vol. 258. P. 1898–1902.
34. *Ma X., Gao F., Liu G.* et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. Vol. 96. P. 14617.
35. *Kirsch M., de Groot H.* // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277. P. 13379–13388.
36. *Hughes M.* // *Bioch. Bioph. Acta.* 1999. Vol. 1411. P. 263–272.
37. *Tenhunen R., Marver H. S., Schmid R.* // *J. Biol. Chem.* 1969. Vol. 244. P. 6388–6394.
38. *Piantadosi C. A.* // *Antioxid Redox Signal.* 2002. Vol. 4. P. 259–270.
39. *Brune B., Schmidt K. U., Ullrich V.* // *Eur. J. Biochem.* 1990. Vol. 192. P. 683–688.
40. *Pryor W., Squadrito G.* // *Am. J. Physiol.* 1995. Vol. 268. L699–L722.
41. *Kissner R., Nauser T., Bugnon P.* et al. // *Chem. Res. Toxicol.* 1998. Vol. 10. P. 1285.
42. *Denicola A., Souza J., Radi R.* // *PNAS.* 1998. Vol. 95. P. 3566–3571.
43. *Marla S., Lee J., Groves J.* // *PNAS.* 1997. Vol. 94. P. 14243–14248.
44. *Groves J.* // *Curr. Op. Chem. Biol.* 1999. Vol. 3. P. 226–235.
45. *Scott Bohle D.* // *Curr. Op. Chem. Biol.* 1998. Vol. 2. P. 194–200.
46. *Beckman J., Beckman T., Chen J.* et al. // *PNAS.* 1990. Vol. 87. P. 1620–1624.
47. *Pfeiffer S., Gorren A., Schmidt K.* et al. // *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272. P. 3465–3470.
48. *Patel R., McAndrew J., Sellak H.* et al. // *Bioch. Bioph. Acta.* 1999. Vol. 1411. P. 385–400.
49. *Beckman J., Ischiropoulos H., Zhu L.* et al. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1992. Vol. 298. P. 438–445.
50. *Denicola A., Freeman B., Trujillo M., Radi R.* // *Arch. Biochem. Biophys.* 1996. Vol. 333. P. 49–58.
51. *Berlett S., Levine R., Stadtman E.* // *PNAS.* 1998. Vol. 95. P. 2784–2789.
52. *Folkes L., Candeias L., Wardman P.* // *Arch. Biochem. Biophys.* 1995. Vol. 323. P. 120–126.
53. *Wright C. E., Tallan H. H., Lin Y. Y.* // *Ann. Rev. Biochem.* 1986. Vol. 55. P. 427–453.
54. *Болдырев А. А.* Карнозин. Биологическое значение и возможности применения в медицине. М.: МГУ. 1998.
55. *Stocker R., Yamamoto Y., McDonagh A.* et al. // *Science.* 1987. Vol. 235. P. 1043–1054.
56. *Reiter R. J.* // *Adv. Pharmac.* 1997. Vol. 38. P. 103–117.
57. *Reiter R. J., Tan D., Poeggeler B.* et al. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1994. Vol. 719. P. 1–12.
58. *Meister A., Anderson M. E.* // *Ann. Rev. Biochem.* 1983. Vol. 52. P. 711–760.
59. *Reed D. J.* // *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1990. Vol. 30. P. 603–631.
60. *Sies H.* // *Free Radic Biol Med.* 1999. Vol. 27. P. 916–921.
61. *Pastore A., Federici G., Bertini E., Piemonte F.* // *Clin. Chim. Acta.* 2003. Vol. 333. P. 19–39.
62. *Freedman R.* // *Cell.* 1989. Vol. 57. P. 1069–1072.
63. *Holmgren A.* // *J. Biol. Chem.* 1989. Vol. 264. P. 13963–13966.
64. *Wells W., Xu D., Yang Y., Rocque P.* // *J. Biol. Chem.* 1990. Vol. 265. P. 15361–15364.
65. *Chaudiere J., Ferrari-Iliou R.* // *Food Chem. Toxicol.* 1999. Vol. 37. P. 949–962.
66. *May J. M.* // *FASEB J.* 1999. Vol. 13. P. 995–1006.
67. *Levine M., Dhariwal K., Washko P.* et al. // *Asia Pacific. J. Clin. Nutr.* 1993. Vol. 2. P. 5–13.
68. *Dhariwal K., Black C., Levine M.* // *J. Biol. Chem.* 1991. Vol. 266. P. 12908–12914.

69. *Houglum K., Brenner D., Chojkier M.* // *Am. J. Clin. Nutr.* 1991. Vol. 54. P. 1141S–1143S.
70. *Rebouche C.* // *Am. J. Clin. Nutr.* 1991. Vol. 54. P. 1147S–1152S.
71. *Arakawa N., Nemoto S., Suzuki E., Otsuka M.* // *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*. 1994. Vol. 40. P. 219–227.
72. *Sakagami H., Satoh K.* // *Anticancer Res.* 1997. Vol. 17. P. 3513–3520.
73. *Kern M., Racker E.* // *Arch. Biochem. Biophys.* 1954. Vol. 48. P. 235–236.
74. *Nason A., Wosilait W., Terrell A.* // *Arch. Biochem. Biophys.* 1954. Vol. 48. P. 233–235.
75. *Green R. C., O'Brien P. J.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1973. Vol. 293. P. 334–342.
76. *May J., Mendiratta S., Hill K., Burk R.* // *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272. P. 22607–22610.
77. *May J., Qu Z., Neel D., Li X.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 2003. Vol. 1640. P. 153–161.
78. *Buettner G. R.* // *Free Rad. Res. Commun.* 1986. Vol. 1. P. 349–353.
79. *Scarpa M., Stevanato R., Viglino P., Rigo A.* // *J. Biol. Chem.* 1983. Vol. 258. P. 6695–6697.
80. *Kirsch M., De Groot H.* // *FASEB J.* 2001. Vol. 15. P. 1569–1574.
81. *Ueda K., Hayaishi O.* // *Annu. Rev. Biochem.* 1985. Vol. 54. P. 73–100.
82. *Ludden, P. W.* // *Mol. Cell. Biochem.* 1994. Vol. 138. P. 123–129.
83. *Zolkiewska A., Nightingale M., Moss J.* // *PNAS.* 1992. Vol. 89. P. 11352–11356.
84. *Lee H. C.* // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2001. Vol. 41, P. 317–345.
85. *Lee H. C., Walseth T. F., Bratt G. T., et al.* // *J. Biol. Chem.* 1989. Vol. 270. P. 1608–15.
86. *Boscoboinik D., Szewczyk A., Azzi A.* // *Arch. Biochem. Biophys.* 1991. Vol. 286. P. 264–269.
87. *Cachia O., El Benna J., Pedruzzi E. et al.* // *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273. P. 32801–32805.
88. *Tran K., Wong J., Lee E. et al.* // *Biochem. J.* 1996. Vol. 319. P. 385–391.
89. *Мартинович Г. Г., Черенкевич С. Н.* // *Рецепция и внутриклеточная сигнализация: Мат. междунар. конф. / Ред.: В. П. Зинченко и др. Пушино, 2003. С. 94–96.*
90. *Tsai J., Jain M., Hsieh C. et al.* // *J. Biol. Chem.* 1996. Vol. 271. P. 3667–3370.
91. *Abou Ghalia A. H., Fouad I. M.* // *Clin. Biochem.* 2000. Vol. 33. P. 657–662.
92. *Navarro J., Obrador E., Carretero J. et al.* // *Free Radic Biol. Med.* 1999. Vol. 26. P. 410–418.
93. *Engin A.* // *Tumori.* 1995. Vol. 81. P. 132–134.
94. *Agus D. B., Vera J. C., Golde D. W.* // *Cancer Res.* 1999. Vol. 59. P. 4555–4558.
95. *Hauptmann N., Grimsby J., Shih J., Cadenas E.* // *Arch. Biochem. Biophys.* 1996. Vol. 335. P. 295–304.
96. *Cadenas E., Davies K.* // *Free Rad. Biol. Med.* 2000. Vol. 29. P. 222–230.
97. *Raha S., Robinson B.* // *Trends in Biochem. Sci.* 2000. Vol. 25. P. 502–508.
98. *Trumpower B. L.* // *J. Biol. Chem.* 1990. Vol. 265. P. 11409–11412.
99. *Cadenas E.* // *Mol. Asp. of Med.* 2004. Vol. 25. P. 17–26.
100. *Boveris A., Chance B.* // *Biochem. J.* 1973. Vol. 134. P. 707–716.
101. *Boveris A., Cadenas E.* // *IUBMB Life.* 2000. Vol. 50. P. 1–6.
102. *Babior B.* // *Blood.* 1999. Vol. 93. P. 1464–1476.
103. *Hoyal C. R., Gutierrez A., Young B. M. et al.* // *PNAS.* 2003. Vol. 100. P. 5130–5135.
104. *Kanai F., Liu H., Field S.J. et al.* // *Nat. Cell Biol.* 2001. Vol. 3. P. 675–678.
105. *Yaffe M.B.* // *Structure (Camb).* 2002. Vol. 10. P. 1288–1290.

106. Koga H., Terasawa H., Nunoi H. et al. // J. Biol. Chem. 1999. Vol. 274. P. 25051–25060.
107. Lapouge k., Smith S. J., Walker P. A. et al. // Mol. Cell. 2000. Vol. 6. P. 899–907.
108. Bo A., Pick E., Hall A. et al. // Nature. 1991. Vol. 353. P. 668–670.
109. Knaus U. G., Heyworth P. G., Evans T. et al. // Science. 1991. Vol. 254. P. 1512–1515.
110. Krause K. H. // Jpn. J. Infect. Dis. Vol. 57. P. 28–29.
111. Kyung-Min Noh, Jae-Young Koh. // J. of Neuroscience. 2000. Vol. 20. P. 111–115.
112. Tammariello S. P., Quinn M. T., Estus S. // J. of Neuroscience. 2000. Vol. 20. P. 531–535.
113. Lambeth J. D. // Nat. Rev. Immunol. 2004. Vol. 4. P. 181–189.
114. Reeves E. P., Lu H., Jacobs H. et al. // Nature. 2002. Vol. 416. P. 291–297.
115. Hampton M. B., Kettle A. J., Winterbourn C. // Blood. 1998. Vol. 92. P. 3007–3017.
116. Michel T., Feron O. // J. Clin. Invest. 1997. Vol. 100. P. 2146–2152.
117. Licino J., Prolo P., McCann S., Wong M. // Mol. Med. Today. 1999. Vol. 5. P. 225–232.
118. Nathan C. // J. Clin. Invest. 1997. Vol. 100. P. 2417–2423.
119. Groves J., Wang C. // Cur. Op. Chem. Biol. 2000. Vol. 4. P. 687–695.
120. Poulos T., Li H., Raman C. // Cur. Op. Chem. Biol. 1999. Vol. 3. P. 131–137.
121. Sharp R., Chapman S. // Bioch. Biophys. Acta. 1999. Vol. 1432. P. 143–158.
122. Xia Y., Roman L., Masters B., Zweier J. // J. Biol. Chem. 1998. Vol. 273. P. 22635–22639.
123. Xia Y., Tsai A., Berka V., Zweier J. // J. Biol. Chem. 1998. Vol. 273. P. 25804–25808.
124. Pou S., Keaton L., Surichamorn W., Rosen G. // J. Biol. Chem. 1999. Vol. 274. P. 9573–9580.
125. Vasquez-Viver J., Hogg N., Martasek P. et al. // J. Biol. Chem. 1999. Vol. 274. P. 26736–26742.
126. Bates T. E., Loesch A., Burnstock G., Clark J. B. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1996. Vol. 218. P. 40–44.
127. Tatoyan A., Giulivi C. // J. Biol. Chem. 1998. Vol. 273. P. 11044–11048.
128. Valdez L., Zaobornyj T., Alvarez S. et al. // Mol. Asp. Med. Vol. 25. P. 49–59.
129. Gorren A., Mayer B. // Biochemistry (Moscow). 1998. Vol. 63. P. 734–744.
130. Sakamaki K., Tomonaga M., Tsukui K., Nagata S. // J. Biol. Chem. 1989. Vol. 264. P. 16828–16836.
131. Nauseef W. M., Malech H. L. // Blood. 1986. Vol. 67. P. 1504–1507.
132. Fiedler T. J., Davey C. A., Fenna R. E. // J. Biol. Chem. 2000. Vol. 275. P. 11964–11971.
133. Van Dalen C. J., Whitehouse M., Kettle A. J. // Biochem. J. 1997. Vol. 327. P. 487–492.
134. Arnold J. // Biochemistry (Moscow). 2004. Vol. 69. P. 4–9.
135. Dolphin D., Felton R. H. // Acc. Chem. Res. 1974. Vol. 7. P. 26.
136. Arnhold J., Furtmuller P. G., Regelsberger G., Obinger C. // Eur. J. Biochem. 2001. Vol. 268. P. 5142–5148.
137. Furtmueller P. G., Arnold J., Jantschko W. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2003. Vol. 301. P. 551–557.
138. Massey V., Harris C. M. // Biochem. Soc. Trans. 1997. Vol. 25. P. 750–755.
139. Harrison R. // Free Rad. Biol. Med. 2002. Vol. 33. P. 774–797.

140. *Frederiks W. M.; Bosch K. S., Kooij A.* // *J. Histochem. Cytochem.* 1995. Vol. 43. P. 723–726.
141. *Hattori Y.* // *Acta Histochem. Cytochem.* 1989. Vol. 22. P. 617–624.
142. *Sarnesto A., Linder N., Raivio K. O.* // *Lab. Invest.* 1996. Vol. 74. P. 48–56.
143. *Hille R., Nishino T.* // *FASEB J.* 1995. Vol. 9. P. 995–1003.
144. *Rasmussen J. T., Rasmussen M. S., Petersen T. E.* // *J. Dairy Sci.* 2000. Vol. 83. P. 499–506.
145. *Godber B., Doel J., Sapkota G. et al.* // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275. P. 7757–7763.
146. *Millar T., Stevens C., Benjamin N. et al.* // *FEBS Lett.* 1998. Vol. 427. P. 225–228.
147. *Godber B., Doel J., Durgan J. et al.* // *FEBS Lett.* 2000. Vol. 475. P. 93–96.
148. *McCord J., Fridovich I.* // *J. Biol. Chem.* 1969. Vol. 244. P. 6049–6055.
149. *Slot J., Gauze H., Freeman B., Grapo J.* // *Lab. Invest.* 1996. Vol. 55. P. 363–371.
150. *Hopkin K. A., Papazian M. A., Steinman H. M.* // *J. Biol. Chem.* 1992. Vol. 267. P. 24253–24258.
151. *Владимеров Ю. А., Арчаков А. И.* Перекисное окисление липидов в биомембранах. / М.: Наука, 1972.
152. *Gutteredge J. M.* // *Clin. Chemistry.* 1995. Vol. 41. P. 1819–1828.
153. *Hogg N., Kalyanaraman B.* // *Bioch. Bioph. Acta.* 1999. Vol. 1411. P. 378–384.
154. *O'Donnell V., Chumley P., Hogg N. et al.* // *Biochemistry.* 1997. Vol. 36. P. 15216–15223.
155. *Pryor W., Castle L., Church D.* // *J. Am. Chem. Soc.* 1985. Vol. 107. P. 211–217.
156. *Хавинсон В. Х., Баринов В. А., Арутюнян А. В., Малинин В. В.* Свободнорадикальное окисление и старение. / СПб: Наука. 2003.
157. *Davies K. J.* // *J. Biol. Chem.* 1987. Vol. 262. P. 9895–9901.
158. *Dean R., Fu S., Stocker R., Davies M.* // *Biochem. J.* 1997. Vol. 324. P. 1–18.
159. *Hawkins C., Davies M.* // *Bioch. Bioph. Acta.* 2001. Vol. 1504. P. 196–219.
160. *Berlett S., Stadtman E. S.* // *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272. P. 20313–20316.
161. *Valentine J., Wertz D., Lyons T. et al.* // *Cur. Op. Chem. Biol.* 1998. Vol. 2. P. 253–252.
162. *Rauk A., Yu D., Armsrong D.* // *J. Am. Chem. Soc.* 1997. Vol. 119. P. 208–217.
163. *Finkel T.* // *FEBS letters.* 2000. Vol. 476. P. 52–54.
164. *Hecht D., Zick Y.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992. Vol. 188. P. 773–779.
165. *Fischer E., Charbonneau H., Tonks N.* // *Science.* 1991. Vol. 253. P. 401–406.
166. *Claiborne A., Yeh J., Mallett T. et al.* // *Biochemistry.* 1999. Vol. 38. P. 15407–15416.
167. *Rusnak F., Reiter T.* // *TIBS.* 2000. Vol. 25. P. 527–529.
168. *Beinert H., Kiley P.* // *Cur. Op. Chem. Biol.* 1999. Vol. 3. P. 152–157.
169. *Cassarino D., Bennett J.* // *Brain Res. Rew.* 1999. Vol. 29. P. 1–25.
170. *Cairo G., Pietrangelo A.* // *Biochem. J.* 2000. Vol. 352. P. 241–250.
171. *Wu J., Dunham W., Weiss B.* // *J. Biol. Chem.* 1995. Vol. 270. P. 10323–10327.
172. *Pomposiello P., Demple B.* // *Trends in Biotechnol.* 2001. Vol. 19. P. 109–114.
173. *Cotgreave I. A., Gerdes R. G.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998. Vol. 242. P. 1–9.
174. *Stamler J. S.* // *Cell.* 1994. Vol. 78. P. 931–936.
175. *Schmidt H., Walter U.* // *Cell.* 1994. Vol. 78. P. 919–925.
176. *Gaston B.* // *Bioch. Bioph. Acta.* 1999. Vol. 1411. P. 323–333.
177. *Stubauer G., Giuffre A., Sarti P.* // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274. P. 28128–28133.
178. *Hausladen A., Gow A., Stamler J.* // *PNAS.* 1998. Vol. 95. P. 14100–14105.

179. *Zai A., Rudd M., Scribner A., Loscalzo J.* // J. Clin. Invest. 1999. Vol. 103. P. 393–399.
180. *Padgett C. M., Whorton A. R.* // Arch. Biochem. Biophys. 1998. Vol. 358. P. 232–242.
181. *Cooper C.* // Biochem. Biophys. Acta. 1999. Vol. 1411. P. 290–309.
182. *Murphy M., Seis H.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. Vol. 88. P. 10860–10864.
183. *Gilbert H. F.* // Methods Enzymol. 1984. Vol. 107. P. 330–351.
184. *Ziegler D. M.* // Annu. Rev. Biochem. 1985. Vol. 54. P. 305–329.
185. *Thomas J. A., Poland B., Honzatko R.* // Arch. Biochem. Biophys. 1995. Vol. 319. P. 1–9.
186. *Chai Y. C., Hendrich S., Thomas J. A.* // Arch. Biochem. Biophys. 1994. Vol. 310. P. 264–272.
187. *Schuppe-Koistinen I., Gerdes R., Moldeus P., Cotgreave I. A.* // Arch. Biochem. Biophys. 1994. Vol. 315. P. 226–234.
188. *Seres T., Ravichandran V., Moriguchi T.* et al. // J. Immunol. 1996. Vol. 156. P. 1973–1980.
189. *Prinz W., Aslund F., Holmgren A., Beckwith J.* // J. Biol. Chem. 1997. Vol. 272. P. 15661–15667.
190. *Jung C., Thomas J.* // Arch. Biochem. Biophys. 1996. Vol. 335. P. 61–72.
191. *Di Simplicio P., Cacace M., Lusini L.* et al. // Arch. Biochem. Biophys. 1998. Vol. 355. P. 145–152.
192. *Rossi R., Barra D., Bellelli A.* et al. // J. Biol. Chem. 1998. Vol. 273. P. 19198–19206.
193. *Rossi R., Milzani A., Dalle-Donne I.* et al. // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276. P. 7004–7010.
194. *Agarwal S., Sohal R.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. Vol. 91. P. 12332–12335.
195. *Shigenaga M., Hagen T., Ames B.* // PNAS. 1994. Vol. 91. P. 10771–10778.
196. *Arnheim N., Cortopassi G.* // Mutat. Res. 1992. Vol. 275. P. 157–167.
197. *Halliwell B., Aruoma O.* // FEBS Lett. 1991. Vol. 281. P. 9–19.
198. *Wiseman H., Halliwell B.* // Biochem. J. 1996. Vol. 313. P. 17–29.
199. *Aust A., Eveleigh J.* // P.S.E.B.M. 1999. Vol. 222. P. 246–252.
200. *Vieira A., Steenken S.* // J. Am. Chem. Soc. 1990. Vol. 112. P. 6986–6994.
201. *Kennett E. C., Kuchel P. W.* // IUBMB Life. 2003. Vol. 55. P. 375–385.
202. *Voegtlin C., Johnson J., Dyer H.* // J. Pharmacol. Exp. Ther. 1925. Vol. 24. P. 305.
203. *Dormandy, T. L., Zarday Z.* // J. Physiol. 1965. Vol. 180. P. 684–707.
204. *Baker M. A., Lawen A.* // Antioxid. Redox Signal. 2000. Vol. 2. P. 197–212.
205. *Choury D., Wajcman H., Boissel J. P., Kaplan J. C.* // FEBS Lett. 1981. Vol. 126. P. 172–174.
206. *Schipfer W., Neophytou B., Trobisch R.* et al. // Int. J. Biochem. 1985. Vol. 17. P. 819–823.
207. *Grebing C., Crane F. L., Low H., Hall K.* // J. Bioenerg. Biomembr. 1984. Vol. 16. P. 517–533.
208. *de Grey A. D.* // Protoplasma. 2003. Vol. 221. P. 3–9.
209. *Cherry J. M., Mackellar W., Morre D. J.* et al. // Biochim. Biophys. Acta. 1981. Vol. 634. P. 11–18.
210. *Sun I. L., Sun E. E., Crane F. L.* et al. // PNAS. 1992. Vol. 89. P. 11126–11130.
211. *May J. M.* // FASEB J. 1999. Vol. 13. P. 995–1006.
212. *Ciriolo M. R., Paci M., Sette M.* et al. // Eur. J. Biochem. 1993. Vol. 215. P. 711–718.
213. *Morre D. M., Lenaz G., Morre D. J.* // J. Exp. Biol. 2000. Vol. 203. P. 1513–1521.

214. *Brightman A. O., Wang J., Miu R. K. et al. // Biochim. Biophys. Acta. 1992. Vol. 1105. P. 109-117.*
215. *Larm J. A., Vaillant F., Linnane A. W., Lawen A. // J. Biol. Chem. 1994. Vol. 269. P. 30097-30100.*
216. *Lu S. C., Sun W. M., Yi J. et al. // J. Clin. Invest. 1996. Vol. 97. P. 1488-1496.*
217. *Sagara J., Makino N., Bannai S. // J. Neurochem. 1996. Vol. 66. P. 1876-1881.*
218. *Lu S. C., Kuhlenkamp J., Ge J. L. et al. // Mol. Pharmacol. 1994. Vol. 46. P. 578-585.*
219. *Lu S. C., Ge J. L., Huang H. Y. et al. // J. Clin. Invest. 1993. Vol. 92. P. 1188-1197.*
220. *Dringen R., Hirrlinger J. // Biol. Chem. 2003. Vol. 384. P. 505-516.*
221. *Garcia-Ruiz C., Fernandez-Checa J. C., Kaplowitz N. // J. Biol. Chem. 1992. Vol. 267. P. 22256-22264.*
222. *Lu S. C., Sun W. M., Nagineni C. N. et al. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1995. Vol. 36. P. 2523-2530.*
223. *Hagen T. M., Aw T. Y., Jones D. P. // Kidney Int. 1988. Vol. 34. P. 74-81.*
224. *Lash L. H. Jones D. P. // J. Biol. Chem. 1984. Vol. 259. P. 14508-14514.*
225. *Kannan R., Yi J. R., Tang D. et al. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1996. Vol. 37. P. 2269-2275.*
226. *Rebbeer J. F., Connolly G. C., Henson J.H. et al. // Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol. 2000. Vol. 279. P. 417-425.*
227. *Li L. Q., Lee T. K., Meier P. J. // J. Biol. Chem. 1998. Vol. 273. P. 16184-16191.*
228. *Agus D. B., Gambhir S. S., Pardridge W. M. et al. // J. Clin. Invest. 1997. Vol. 100. P. 2842-2848.*
229. *Rumsey S. C., Kwon O., Xu G. W. et al. // J. Biol. Chem. 1997. Vol. 272. P. 18982-18989.*
230. *Tsukaguchi H., Tokui T., Mackenzie B. et al. // Nature. 1999. Vol. 399. P. 70-75.*
231. *Liang W. J., Johnson D., Jarvis S. M. // Mol. Membr. Biol. 2001. Vol. 18. P. 87-95.*
232. *Wang Y., Mackenzie B., Tsukaguchi H. et al. // Bioch. Bioph. Res. Commun. 2000. Vol. 267. P. 488-494.*
233. *Rajan D. P., Huang W., Dutta B. et al. // Bioch. Bioph. Res. Commun. 1999. Vol. 262. P. 762-768.*
234. *Yamamoto T., Seino Y., Fukumoto H. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1990. Vol. 170. P. 223-230.*
235. *Younes M., Brown R. W., Stephenson M. et al. // Cancer. 1997. Vol. 80. P. 1046-1051.*
236. *Grünewald R. A. // Brain Res. Rev. 1993. Vol. 18. P. 123-133.*
237. *Siushansian R., Wilson J. X. // J. Neurochem. 1995. Vol. 65. P. 41-49.*
238. *Astuya A., Caprile T., Castro M. et al. // J. Neurosci. Res. 2005. Vol. 79. P. 146-56.*
239. *Finkelstein A., Cass A. // Nature. 1967. Vol. 216. P. 717-718.*
240. *Marla S. S., Lee J., Groves J. T. // PNAS. 1997. Vol. 94. P. 14243-14248.*
241. *Mao G. D., Poznansky M. J. // FEBS Lett. 1992. Vol. 305. P. 233-236.*
242. *Nicholls P. // Biochim. Biophys. Acta. 1965. Vol. 99. P. 286-297.*
243. *Seaver L., Imlay J. // J. Bacteriology. 2001. Vol. 183. P. 7182-7189.*
244. *Antunesa F., Cadenasa E. // FEBS Lett. 2000. Vol. 475. P. 121-126.*
245. *Мартинович Г. Г. Дис. ...кан. биол. наук: 03.00.02. Минск, ИФ НАНБ 2004. 151 с.*
246. *Henzler T., Steudle E. // J. Exp. Bot. 2000. Vol. 51. P. 2053-2066.*
247. *Chance B., Sies H., Boveris A. // Physiol. Rev. 1979. Vol. 59. P. 527-605.*

248. *Oshino N., Chance B., Sies H., Bucher T.* // Arch. Biochem. Biophys. 1973. Vol. 154. P. 117–131.
249. *Halliwell B., Clement M. V., Long L. H.* // FEBS Lett. 2000. Vol. 486. P. 10–13.
250. *Fujita Y., Wakabayashi K., Nagao M., Sugimura T.* // Mutat. Res. 1985. Vol. 144. P. 227–230.
251. *Hiramoto K., Li X., Makimoto M.* et al. // Mutat. Res. 1998. Vol. 419. P. 43–51.
252. *Long L. H., Lan A., Hsuan F., Halliwell B.* // Free Radic. Res. 1999. Vol. 31. P. 67–71.
253. *Halliwell B., Zhao K., Whiteman M.* // Free Radic. Res. 2000. Vol. 33. P. 819–830.
254. *Varma S. D., Devamanoharan P. S.* // Free Radic. Res. Commun. 1990. Vol. 8. P. 73–79.
255. *Kuge N., Kohzuki M., Sato T.* // Free Radic. Res. 1999. Vol. 30. P. 119–123.
256. *Long L. H., Evans P. J., Halliwell B.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999. Vol. 262. P. 605–609.
257. *Varma S. D., Devamanoharan P. S.* // Free Radic. Res. Commun. 1991. Vol. 14. P. 125–131.
258. *Deskur E., Przywarska I., Dylewicz P.* et al. // Int. J. Cardiol. 1998. Vol. 67. P. 219–224.
259. *Lacy F., O'Connor D., Schmid-Schonbein G.* // J. Hypertens. 1998. Vol. 16. P. 291–303.
260. *Lacy F., Gough D. A., Schmid-Schonbein G. W.* // Free Radic. Biol. Med. 1998. Vol. 25. P. 720–727.
261. *Costarides A., Recasens J., Riley M., Green K.* // Lens and Eye Tox. Res. 1989. Vol. 6. P. 167–173.
262. *Devamanoharan P. S., Ramachandran S., Varma S. D.* // Curr. Eye Res. 1991. Vol. 10. P. 831–838.
263. *Spector A., Ma W., Wang R. R.* // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1998. Vol. 39. P. 1188–1197.
264. *Giblin F., McCready J., Kodama T., Reddy V. N.* // Exp. Eye Res. 1984. Vol. 38. P. 87.
265. *Chen B., Avshalumov M., Rice M.* // J. Neurophysiol. 2001. Vol. 85. P. 2468–2476.
266. *Rietel R. J.* // Progress in neurobiology. 1998. Vol. 56. P. 359–584.
267. *Sadrzadeh S., Anderson D., Panter S.* et al. // J. Clin. Invest. 1987. Vol. 79. P. 662–664.
268. *Hyslop P., Hinshaw D., Scraufstatter I.* et al. // Free Rad. Biol. Med. 1995. Vol. 19. P. 31–37.
269. *Комиссаров Г. Г.* Фотосинтез: физико-химический подход. М.: Едиториал УРСС, 2003.
270. *Мартинович Г. Г., Черенкевич С. Н.* // Биомедицинская химия. 2005. Т. 51. № 6. С. 626–633.
271. *Possel H., Noacka H., Augustin W.* et al. // FEBS Letters. 1997. Vol. 416. P. 175–178.
272. *Antunes F., Cadenas E.* // FEBS Letters. 2000. Vol. 475. P. 121–126.
273. *Mendiratta S., Qu Z., May J. M.* // Free Rad. Biol. Med. 1998. Vol. 24. P. 789–797.
274. *Kume-Kick J., Rice M. E.* // Brain Res. 1998. Vol. 803. P. 105–113.
275. *O'Neill R. D., Fillenz M., Albery W. J.* // Neurosci. Lett. 1983. Vol. 42. P. 105–110.
276. *Rebec G. V., Wang Z.* // J. Neurosci. 2001. Vol. 21. P. 668–675.
277. *Yusa T.* // Brain Res. 2001. Vol. 897. P. 104–113.
278. *Ibrahim W., Lee U., Yen H.* et al. // Free Rad. Biol. Med. 2000. Vol. 28. P. 397–402.
279. *Rose R. C., Bode A. M.* // FASEB J. 1993. Vol. 7. P. 1135–1142.

280. *Varma S. D.* // NY Acad Sci. USA. 1987. Vol. 498. P. 280–306.
281. *Van der Vliet A., O'Neill C., Cross C.* et al. // Am. J. Physiol. 1999. Vol. 276. P. L289–L296.
282. *Jones D., Carlson J., Mody V.* et al. // Free Rad. Biol. Med. 2000. Vol. 28. P. 625–635.
283. *Stamford J. A., Kruk Z. L., Millar J.* // Brain Res. 1984. Vol. 299. P. 289–295.
284. *Miele M., Fillenz M.* // J. Neurosci. Meth. 1996. Vol. 70. P. 15–19.
285. *Evans R. M., Currie L., Campbell A.* // Br. J. Nutr. 1982. Vol. 47. P. 473–482.
286. *Bergsten P., Amitai G., Kehrl J.* et al. // J. Biol. Chem. 1990. Vol. 265. P. 2584–2587.
287. *Steffner R. J., Wu L., Powers A., May J. M.* // Free Rad. Biol. Med. 2004. Vol. 37. P. 1612–1621.
288. *Rice M. E., Russo-Menna I.* // Neuroscience. 1998. Vol. 82. P. 1213–1223.
289. *Ingebretsen O. C., Terland O., Flatmark T.* // BBA. 1980. Vol. 628. P. 182–189.
290. *Hillered L., Nilsson P., Ungerstedt U., Ponten U.* // Neurosci Lett. 1990. Vol. 113. P. 328–332.
291. *Yusa T.* // Neurosci. Lett. 2000. Vol. 293. P. 123–126.
292. *Liebes L., Krigel R., Kuo S.* et al. // PNAS. 1981. Vol. 78. P. 6481–6484.
293. *Huang Z., Chen C., Zeng Z.* et al. // FASEB J. 2001. Vol. 15. P. 19–21.
294. *Wong D. Y., Hsiao Y. L., Poon C. K.* et al. // Cancer Lett. 1994. Vol. 81. P. 111–116.
295. *Banerjee D., Madhusoodanan U. K., Nayak S., Jacob J.* // Clin. Chim. Acta. 2003. Vol. 334. P. 205–209.
296. *Dalton T. M., Ghen Y., Schneider S. N.* et al. // Free Rad. Biol. Med. 2004. Vol. 37. P. 1511–1526.
297. *Andersson A., Lindgren A., Arnadottir M.* et al. // Clin. Chem. 1999. Vol. 45. P. 1084–1086.
298. *Cantin A. M., North S. L., Hubbard R. C., Crystal R. G.* // J. Appl. Physiol. 1987. Vol. 63. P. 152–157.
299. *Cantin A. M., Hubbard R. C., Crystal R. G.* // Am. Rev. Respir. Dis. 1989. Vol. 139. P. 370–372.
300. *Buhl R., Jaffe H. A., Holroyd K. J.* et al. // Lancet. 1989. Vol. 2. P. 1294–1298.
301. *Kirlin W., Cai J., Thompson S.* et al. // Free Rad. Biol. Med. 1999. Vol. 27. P. 1208–1218.
302. *Eberle D., Clarke R., Kaplowitz N.* // J. Biol. Chem. 1981. Vol. 256. P. 2115–2117.
303. *Wahllander A., Soboll S., Sies H.* et al. // FEBS Lett. 1979. Vol. 97. P. 138–140.
304. *Becker K., Gui M., Traxler A.* et al. // Histochemistry. 1994. Vol. 102. P. 389–395.
305. *Ramachandran S., Morris S. M., Devamanoharan P.* et al. // Exp. Eye Res. 1991. Vol. 53. P. 503–506.
306. *Devamanoharan P. S., Varma S. D.* // Ophthalmic. Res. 1995. Vol. 27. P. 39–43.
307. *González-Flecha B., Demple B.* // J. Bacteriol. 1997. Vol. 179. P. 382–388.
308. *Bustamante J., Guerra L., Bredston L.* et al. // Exp. Cell Res. 1991. Vol. 196. P. 172–176.
309. *Lin C. C., Kao C. H.* // Plant Sci. 2001. Vol. 160. P. 323–329.
310. *Jiang M., Zhang J.* // Plant Cell Physiol. 2001. Vol. 42. P. 1265–1273.
311. *Veljovic-Jovanovic S. D., Pignocchi C., Noctor G., Foyer C. H.* // Plant Physiol. 2001. Vol. 127. P. 426–435.
312. *Karpinski S., Reynolds H., Karpinska B.* et al. // Science. 1999. Vol. 284. P. 654–657.
313. *Прлуцкий В. И., Бахур В. М.* Электрохимически активированная вода: Аномальные свойства, механизм биологического действия. М: ВНИИИМТ, 1997.

314. Сумаруков Г. В. Окислительное равновесие и радиочувствительность организмов. М: Атомиздат, 1970.
315. Pappi A., Dely M. // Acta Biol. Hung. 1983. Vol. 34. P. 323–350.
316. Леонов Б. И., Прилуцкий В. И., Бахур В. М. Физико-химические аспекты действия электрохимически активированной воды. М: ВНИИИМТ, 1999.
317. Senft A. P., Dalton T. P., Shertzer H. G. // Anal. Biochem. 2000. Vol. 280. P. 80–86.
318. Tarpey M., Fridovich I. // Circ. Res. 2001. Vol. 89. P. 224–236.
319. Kalyanaraman B. // Meth. Enzymol. 1996. Vol. 268. P. 168–187.
320. Camera E., Picardo M. // J. Chromatography B. 2002. Vol. 781. P. 181–206.
321. Флуктуации состояния биохимических систем /Под ред. В. В. Соколовского. Л., 1986.
322. Соколовский В. В. // Вопр. мед. химии. 1988. № 34. С. 2–11.
323. Santangelo F. // Curr. Med. Chem. 2003. Vol. 10. P. 2599–2610.
324. Hack V., Schmid D., Breitkreutz R. et al. // FASEB. J. 1997. Vol. 11. P. 84–92.
325. Droge W., Holm E. // FASEB. J. 1997. Vol. 11. P. 1077–1089.
326. Тиоловые соединения в биохимических механизмах патологических процессов / Под ред. В. В. Соколовского. Л., 1979.
327. Антиоксиданты и адаптация / Под ред. В. В. Соколовского. Л., 1984.
328. Соколовский В. В. Тиолдисульфидное соотношение крови как показатель состояния неспецифической резистентности организма. СПб., 1996.
329. Jones D. P. // Methods Enzymol. 2002. Vol. 348. P. 93–112.
330. Jones D. P., Mody V. C., Carlson J. L. et al. // Free Rad. Biol. Med. 2002. Vol. 33. P. 1290–1300.
331. Rebrin I., Kamzalov S., Sonal R. S. // Free Rad. Biol. Med. 2003. Vol. 35. P. 626–635.
332. Hansen J. M., Choe H., Carney E. W., Harris C. // Free Rad. Biol. Med. 2001. Vol. 30. P. 1078–1088.
333. Juchau M. R., Fantel A. G., Harris C., Beyer B. K. // Environ. Health. Perspect. 1986. Vol. 74. P. 131–136.
334. Hwang C., Sinskey A. J., Lodish H. F. // Science. 1992. Vol. 257. P. 1496–1502.
335. Moriarty-Craige S. E., Jones D. P. // Annu. Rev. Nutr. 2004. Vol. 24. P. 481–509.
336. Hutter D. E., Till B. G., Greene J. J. // Exp. Cell Res. 1997. Vol. 232. P. 435–438.
337. Jiang S., Cai J., Wallace D. C., Jones D. P. // J. Biol. Chem. 1999. Vol. 274. P. 29905–29911.
338. Cai J., Jones D. // J. Biol. Chem. 1998. Vol. 273. P. 11401–11404.
339. Jonas C. R., Ziegler T. R., Gu L. H., Jones D. P. // Free Radic. Biol. Med. 2002. Vol. 33. P. 1499–1506.
340. Jonas C. R., Gu L. H., Nkabyo Y. et al. // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2003. Vol. 285. P. 1421–1429.
341. Nkabyo Y. S., Ziegler T. R., Gu L. H. et al. // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 2002. Vol. 283. P. G1352–G1359.
342. Jones D. P., Go Y. M., Anderson C. L. et al. // FASEB J. 2004. Vol. 18. P. 1246–1248.
343. Ido Y., Chang K., Woolsey T. A., Williamson J. R. // FASEB J. 2001. Vol. 15. P. 1419–1421.
344. Williamson D. H., Lund P., Krebs H. A. // Biochem J. 1967. Vol. 103. P. 514–527.
345. Poole R. C., Halestrap A. P. // Am. J. Physiol. 1993. Vol. 264. P. C761–C782.
346. Ido Y., Chang K., Williamson J. R. // PNAS. 2004. Vol. 101. P. 653–658.
347. Wolin M. S. // Microcirculation. 1996. Vol. 3. P.1–17.

348. *Winiarska K., Drozak J., Wegrzynowicz M. et al. // Metabolism. 2003. Vol. 52. P. 739–746.*
349. *Adams, J., Klaidman, L., Chang, M., Yang, J. // Curr. Top. Med. Chem. 2001. Vol. 1. P. 473–482.*
350. *Martinovich G. G., Cherenkevich S. N., Sauer H. // Eur. Biophys. J. 2005. Vol. 34. P.937–942.*
351. *May J. M., Qu Z. // Arch. Biochem. Biophys. 2004. Vol. 429. P. 106–113.*
352. *Kelly F. J., Tetley, T. D. // Biochem. J. 1997. Vol. 325. P. 95–99.*
353. *Ghiselli A., Serafini M., Natella F., Scaccini C. // Free Radic. Biol. Med. 2000. Vol. 29. P. 1106–1114.*
354. *Malliaraki N., Mpliamplias D., Kampa M. et al. // BMC Nephrol. 2003. Vol. 4. P. 4–12.*
355. *Черенкевич С. Н., Мирончик А. В., Говорун А. К. Способ определения антиокислительной активности вещества. А. с. № 1045127, 1983.*
356. *Prior R. L., Cao G. // Free Radic. Biol. Med. 1999. Vol. 27. P. 1173–1181.*
357. *Lewin G., Popov I. // Med. Hypotheses. 1994. Vol. 42. P.269–275.*
358. *Cao G., Alessio H., Cutler R. G. // Free Radic. Biol Med. 1993. Vol. 14. P. 303–311.*
359. *Regoli F., Winston G. W. // Toxicol. Appl. Pharmacol. 1999. Vol. 156. P. 96–105.*
360. *Prior R. L., Cao G. // Free Radic. Biol. Med. 1999. Vol. 27. P. 1173–1181.*
361. *Rice-Evans C., Miller N. // Meth. Enzymol. 1994. Vol. 234. P. 279–293.*
362. *Niki E., Noguchi N. // IUBMB Life. 2000. Vol. 50. P. 323–329.*
363. *Valkonen M., Kuusi T. // J. Lipid Res. 1997. Vol. 38. P. 823–833.*
364. *Erel O. // Clin. Biochem. 2004. Vol. 37. P. 112–119.*
365. *Cao G., Prior R. L. // Clin. Chem. 1999. Vol. 45. P. 574–576.*
366. *Benzie I. F., Strain J. J. // Anal. Biochem. 1996. Vol. 239. P. 70–76.*
367. *Yeum K., Russel R., Krinsky N., Aldini G. // Arch. Bioch. Biophys. 2004. Vol. 430. P. 97–103.*
368. *Cao G., Prior R. L. // Methods Enzymol. 1999. Vol. 299. P. 50–62.*
369. *Ghiselli A., Serafini M., Maiani G. et al. // Free Radic. Biol. Med. 1995. Vol. 18. P. 29–36.*
370. *Miller N., Rice-Evans C., Davies M. et al. // Clin. Sci. (Lond). 1993. Vol. 84. P. 407–412.*
371. *Okimoto Y., Warabi E., Wada Y. et al. // Free Radic. Biol. Med. 2003. Vol. 35. P. 576–585.*
372. *Alho H., Leinonen J. // Methods Enzymol. 1999. Vol. 299. P. 3–15.*
373. *Kohen R., Vellaichamy E., Hrbac J. et al. // Free Radic. Biol. Med. 2000. Vol. 28. P. 871–879.*
374. *Chevion S., Roberts M. A., Chevion M. // Free Radic. Biol. Med. 2000. Vol. 28. P. 860–870.*
375. *Dubnov G., Kohen R., Berry E. M. // Eur. J. Nutr. 2000. Vol. 39. P. 18–30.*
376. *Мартинович Г. Г., Черенкевич С. Н., Мартинович И. В. // Медико-социальная экология личности: состояние и перспективы: Мат. II междунар. конф. / Редкол.: В. А. Прокашева (отв. ред.) и др. Мн.: БГУ, 2004. С. 101–103.*
377. *Мартинович Г. Г., Черенкевич С. Н. // Вестн. Белорус. ун-та. Сер. 1. 2004. № 3. С. 14–19.*
378. *Hampton M., Orrenius S. // FEBS Lett. 1997. Vol. 414. P. 552–556.*
379. *Riou C., Remy C., Rabilloud R. et al. // J. Endocr. 1998. Vol. 156. P. 315–322.*

380. *Kanno S., Ishikawa M., Takayanagi M. et al. // Biol. Pharm. Bull. 2000. Vol. 23. P. 37–42.*
381. *Puchnina-Artushenko E., Ledenev A. et al. // Agents Actions. 1993. Vol. 39. P. C192–C194.*
382. *Teramoto S., Tomita T., Matsui H. et al. // Jpn. J. Pharmacol. 1999. Vol. 79. P. 33–40.*
383. *Rao G., Berk B. // Circ. Res. 1992. Vol. 70. P. 593–599.*
384. *Burdon R., Gill V. // Free Radic. Res. Commun. 1993. Vol. 19. P. 203–213.*
385. *Ruiz-Gines J., Lopez-Ongil S., Gonzalez-Rubio M. et al. // J. Cardiovasc. Pharmacol. 2000. Vol. 35. P. 109–113.*
386. *Davis K. // IUBMB Life. 1999. Vol. 48. P. 41–47.*
387. *Steinbeck M., Kim J., Trudeau M. et al. // J. Cell Physiol. 1998. Vol. 176. P. 574–587.*
388. *Katoh S., Mitsui Y., Kitani K., Suzuki T. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1997. Vol. 241. P. 347–51.*
389. *Katoh S., Mitsui Y., Kitani K., Suzuki T. // Biochem. J. 1999. Vol. 338. P. 465–470.*
390. *Avshalumov M. V., Chen B. T., Rice M. E. // Brain Res. 2000. Vol. 882. P. 86–94.*
391. *Garcia-Ruiz C., Colell A., Mari M. et al. // J. Biol. Chem. 1997. Vol. 272. P. 11369–11377.*
392. *Lo Y. Y., Cruz T. F. // J. Biol. Chem. 1995. Vol. 270. P. 11727–11730.*
393. *Sundaresan M., Yu Z. X., Ferrans V. J. et al. // Science. 1995. Vol. 270. P. 296–299.*
394. *Bae Y. S., Kang S. W., Seo M. S. et al. // J. Biol. Chem. 1997. Vol. 272. P. 217–221.*
395. *Tolando R., Jovanovic A., Brigelius-Flohe R. et al. // Free Radic. Biol. Med. 2000. Vol. 28. P. 979–986.*
396. *Sung J. Y., Hong J. H., Kang H. S. et al. // Immunopharmacology. 2000. Vol. 47. P. 35–44.*
397. *Sattler M., Winkler T., Verma S. et al. // Blood. 1999. Vol. 93. P. 2928–2935.*
398. *Suzukawa K., Miura K., Mitsushita J. et al. // J. Biol. Chem. 2000. Vol. 275. P. 13175–13178.*
399. *Thannickal V. J., Hassoun P. M., White A. C., Fanburg B. L. // Am. J. Physiol. 1993. Vol. 265. P. L622–L626.*
400. *Tobiume K., Matsuzawa A., Takahashi T. et al. // EMBO Rep. 2001. Vol. 2. P. 222–228.*
401. *Suzaki Y., Yoshizumi M., Kagami S. et al. // J. Biol. Chem. 2002. Vol. 277. P. 9614–9621.*
402. *Lander H., Tauras J., Ogiste J. et al. // J. Biol. Chem. 1997. Vol. 272. P. 17810–17814.*
403. *Lander H., Hajjar D., Hempstea B. et al. // J. Biol. Chem. 1997. Vol. 272. P. 4323–4326.*
404. *Rodriguez-Viciano P., Warne P. et al. // Nature. 1994. Vol. 370. P. 527–532.*
405. *Akasaki T., Koga H., Sumimoto H. // J. Biol. Chem. 1999. Vol. 274. P. 18055–18059.*
406. *Shaw M., Cohen P., Alessi D. R. // Biochem J. 1998. Vol. 336. P. 241–246.*
407. *Wang X., McCullough K. D., Franke T. F., Holbrook N. J. // J. Biol. Chem. 2000. Vol. 275. P. 14624–14631.*
408. *Konishi H., Tanaka M., Takemura Y. et al. // PNAS. 1997. Vol. 94. P. 11233–11237.*
409. *Ghafourifar P., Schenk U., Klein S., Richter C. // J. Biol. Chem. 1999. Vol. 274. P. 31185–31188.*
410. *Gopalakrishna R., Anderson W. B. // PNAS. 1989. Vol. 86. P. 6758–6762.*
411. *Gopalakrishna R., Anderson W. B. // FEBS Lett. 1987. Vol. 225. P. 233–237.*

412. O'Brian C., Ward N., Weinstein, I. B. et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988. Vol. 155. P. 1374–1380.
413. Takekoshi S., Kambayashi Y., Nagata H. et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995. Vol. 217. P. 654–660.
414. Gopalakrishna R., Anderson W. B. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1991. Vol. 285. P. 382–387.
415. Rusnak F., Reiter T. // *TIBS.* 2000. Vol. 25. P. 527–529.
416. Lee S. R., Kwon K. S., Kim S. R., Rhee S. G. // *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273. P. 15366–15372.
417. Denu J. M., Tanner K. G. // *Biochemistry.* 1998. Vol. 37. P. 5633–5642.
418. Barrett W. C., DeGnore J. P., Keng Y. F. et al. // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274. P. 34543–34546.
419. Barrett W. C., DeGnore J. P., Konig S. et al. // *Biochemistry.* 1999. Vol. 38. P. 6699–6705.
420. Degl'Innocenti D., Caselli A., Rosati F. et al. // *IUBMB Life.* 1999. Vol. 48. P. 505–511.
421. Keyse S. M., Emslie E. A. // *Nature.* 1992. Vol. 359. P. 644–647.
422. Bianchini L., Todderud G., Grinstein S. // *J. Biol. Chem.* 1993. Vol. 268. P. 3357–3363.
423. Blake R. A., Walker T. R., Watson S. P. // *Biochem. J.* 1993. Vol. 290. P. 471–475.
424. Chakraborti S., Michael J. R. // *FEBS Lett.* 1991. Vol. 281. P. 185–187.
425. Chakraborti S., Michael J. R., Patra S. K. // *FEBS Lett.* 1991. Vol. 285. P. 104–107.
426. Natarajan V., Taher M., Roehm B. et al. // *J. Biol. Chem.* 1993. Vol. 268. P. 930–937.
427. Chakraborti S., Chakraborti T. // *Cell. Signal.* 1995. Vol. 7. P. 75–83.
428. Chakraborti S., Michael J. R. // *Mol. Cell. Biochem.* 1993. Vol. 122. P. 9–15.
429. Ito Y., Nakashima S., Nozawa Y. // *J. Neurochem.* 1997. Vol. 69. P. 729–736.
430. Natarajan V., Vepa S., Verma R. S., Scribner W. M. // *Am. J. Physiol.* 1996. Vol. 271. P. 400–408.
431. Adler V., Yin Z., Tew K. D., Ronai Z. // *Oncogene.* 1999. Vol. 18. P. 6104–6111.
432. Allen R. G., Tresini M. // *Free Radic. Biol. Med.* 2000. Vol. 28. P. 463–499.
433. Morel Y., Barouki R. // *Biochem. J.* 1999. Vol. 342. P. 481–496.
434. Friling R., Bensimon A., Tichauer Y., Daniel V. // *PNAS.* 1990. Vol. 87. P. 6258–6262.
435. Li Y., Jaiswal A. K. // *J. Biol. Chem.* 1992. Vol. 267. P. 15097–15104.
436. Rushmore T. H., Pickett C. B. // *J. Biol. Chem.* 1990. Vol. 265. P. 14648–14653.
437. Favreau L. V., Pickett C. B. // *J. Biol. Chem.* 1991. Vol. 266. P. 4556–4561.
438. Kim Y. C., Masutani H., Yamaguchi Y. et al. // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276. P. 18399–18406.
439. Tsuji Y., Ayaki H., Whitman S. et al. // *Mol. Cell. Biol.* 2000. Vol. 20. P. 5818–5827.
440. Inamdar N. M., Ahn Y. I., Alam J. // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1996. Vol. 221. P. 570–576.
441. Rushmore T. H., King R. G., Paulson K. E., Pickett C. B. // *PNAS.* 1990. Vol. 87. P. 3826–3830.
442. Bergeron M., Yu A., Solway K. et al. // *Eur. J. Neurosci.* 1999. Vol. 11. P. 4159–4170.
443. Huang Y., Domann F. // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1998. Vol. 249. P. 307–312.
444. Iwata E., Asanuma M., Nishibayashi S. et al. // *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1997. Vol. 50. P. 213–220.

445. *Rigoni P., Xu L., Harshman K. et al.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1993. Vol. 1173. P. 141–146.
446. *Perkins N.* // *TIBS.* 2000. Vol. 25. P. 434–440.
447. *Morel Y., Barouki R.* // *Biochem. J.* 1999. Vol. 342. P. 481–496.
448. *Grover A., Samson S., Fomin V.* // *Am. J. Physiol.* 1992. Vol. 263. P. H537–H543.
449. *Kourie J. I.* // *Am. J. Physiol.* 1998. Vol. 275. P. C1–C24.
450. *Мартинович Г. Г., Дранеза А. И., Черенкевич С. Н.* // *Известия Белорусской инженерной академии.* 1997. № 1(3)/3. С. 152–155.
451. *Денисов А. А., Мартинович Г. Г., Молчанов П. Г. и др.* // *Докл. АН Бел.* 2000. Т. 44. № 6. С. 53–55.
452. *Мартинович Г. Г., Черенкевич С. Н.* // *Молекулярно-клеточные основы функционирования биосистем: Междунар. научн. конф.; пятый съезд Бел. общ. объедин. фотобиологов и биофизиков: Мат. докл., / Ред. кол.: И. Д. Волоотовский и др. Мн.: Тонпик, 2002. С. Т-79.*
453. *Денисов А. А., Булай П. М., Мартинович Г. Г., Молчанов П. Г.* // *Молекулярно-клеточные основы функционирования биосистем: Междунар. научн. конф.; пятый съезд Бел. общ. объедин. фотобиологов и биофизиков: Мат. докл. / Ред. кол.: И. Д. Волоотовский и др. Мн.: Тонпик, 2002. С. Т-137.*
454. *Денисов А. А., Булай П. М., Мартинович Г. Г. и др.* // *Медэлектроника-2002. Средства медицинской электроники и новые медицинские технологии: Труды междунар. научно-технической конф., / Ред.: С. К. Дик и др. Мн.: Изд. Н.Б. Киреев, 2002. С. 47–49.*
455. *Питлик Т. Н., Булай П. М., Афанасенков Д. С., Мартинович Г. Г.* // *Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: Междунар. научн. конф.; VI съезд Бел. общ. объедин. фотобиологов и биофизиков: Сб. статей в 2-х частях. Часть I. / Под ред. И. Д. Волоотовского и др. Мн.: 2004. С. 242–244.*
456. *Мартинович Г. Г., Черенкевич С. Н., Денисов А. А. и др.* // *Вестн. Белорус. ун-та. Сер. 2.* 2003. № 3. С. 17–23.
457. *Bychkov R., Pieper K., Ried C. et al.* // *Circulation.* 1999. Vol. 13. P. 1719–1725.
458. *Knaus H. G., Schwarzer C., Koch R. et al.* // *J. Neurosci.* 1996. Vol. 16. P. 955–963.
459. *Sah P.* // *Trends Neurosci.* 1996. Vol. 4. P. 150–154.
460. *Samanta S., Perkinson M., Morgan M., Williams R.* // *J. of Neurochemistry.* 1998. Vol. 70. P. 2082–2090.
461. *Casavant R., Xu Z., Dryer S.* // *J. Neurochem.* 2000. Vol. 74. P. 1026–1033.
462. *Zhang L., McBain C. J.* // *J. Physiol (Lond.).* 1995. Vol. 488. P. 661–672.
463. *Robitaille R., Charlton M. P.* // *J. Neurosci.* 1992. Vol. 12. P. 297–305.
464. *Gola M., Crest M.* // *Neuron.* 1993. Vol. 10. P. 689–699.
465. *Wisgirda M. E., Dryer S. E.* // *PNAS.* 1994. Vol. 91. P. 2858–2862.
466. *Bielefeldt K., Jackson M. B.* // *J. Neurophysiol.* 1993. Vol. 458. P. 41–67.
467. *Buonanno A., Douglas Fields R.* // *Curr. Opin. Neurobiol.* 1999. Vol. 9. P. 110–120.
468. *Liu Y., Gutterman D.* // *Clin. Exp. Pharm. Physiol.* 2002. Vol. 29. P. 305–311.
469. *Sobey C. G., Heistad D. D., Faraci F. M.* // *Stroke.* 1997. Vol. 28. P. 2290–2294.
470. *Brzezinska A. K., Gebremedhin D., Chilian W. M. et al.* // *Am. J. Physiol.* 2000. Vol. 278. P. H1883–H1890.
471. *Wang D., Youngson C., Wong V. et al.* // *PNAS.* 1996. Vol. 93. P. 13182–13187.
472. *Скулачев В. П.* // *Биохимия.* 2001. Т. 66. С. 7–8.

473. Volk T., Hensel M., Cox W. // *Mol. Cell Biochem.* 1997. Vol. 171. P.11–21.
474. Meyer T., Gloy J., Hug M. et al. // *Kidney Int.* 1996. Vol. 49. P. 388–395.
475. Hu Q., Corda S., Zweier J. et al. // *Circulation.* 1998. Vol. 97. P. 268–275.
476. Bielefeldt K., Whiteis C., Sharma R. // *Am. J. Physiol.* 1997. Vol. 272. P. G1439.
477. Li A., Segui J., Heinemann S., Hoshi T. // *J. Neurosci.* 1998. Vol. 18. P. 6740–6747.
478. Herson P., Lee K., Pinnock R. et al. // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274. P. 833–841.
479. Smith M., Herson P., Lee K. et al. // *J. Physiol.* 2003. Vol. 547. P. 417–425.
480. Nam S., Jung S., Yoo C. et al. // *Yonsei Med. J.* 2002. P. 229–235.
481. Doan T., Gentry D., Taylor A., Elliott S. // *Biochem. J.* 1994. Vol. 297. P. 209–215.
482. Мартинович Г. Г., Черенкевич С. Н., Денисов А. А. и др. // *Весці НАН Беларусі. Сер. мед.-біял. навук.* 2002. № 4. С. 70–76.
483. Глеб С. П., Мартинович Г. Г., Черенкевич С. Н., Горанов В. А. // *Медико-социальная экология личности: состояние и перспективы: Мат. II междунар. конф. / Ред.: В. А. Прокашева (отв. ред.) и др. Мн.: БГУ, 2004. С. 72–74.*
484. Мартинович Г. Г., Черенкевич С. Н. // *Межд. конф. «Рецепция и внутриклеточная сигнализация»: Мат. междунар. конф. / Ред.: В. П. Зинченко и др., Пушкино, 2003. С. 94–96.*
485. Мартинович Г. Г., Мартинович И. В., Черенкевич С. Н. // *Рецепция и внутриклеточная сигнализация: Мат. междунар. конф. / Под ред. В. П. Зинченко, Пушкино, 2005. С. 20–23.*
486. Duchen M. // *J. Physiol.* 1999. Vol. 516. P. 1–17.
487. Duchen M. // *J. Physiol.* 2000. Vol. 529. P. 57–68.
488. Jacobson J., Duchen M. R. // *J. Cell Sci.* 2002. Vol. 115. P. 1175–1188.
489. Zick Y., Sagi-Eisenberg R. // *Biochemistry.* 1990. Vol. 29. P. 10240–10245.
490. Hardwick J. S., Sefton B. M. // *PNAS.* 1995. Vol. 92. P. 4527–4531.
491. Dulhunty A., Haarmann C., Green D., Hart J. // *Antioxid. Redox. Signal.* 2000. Vol. 2. P. 27–34.
492. Pessah I. N., Feng W. // *Antioxid. Redox. Signal.* 2000. Vol. 2. P. 17–25.
493. Pessah I. N., Kim K. H., Feng W. // *Front. Biosci.* 2002. Vol. 7. P. a72–a79.
494. Pessah I. N. // *Pest. Manag. Sci.* 2001. Vol. 57. P. 941–945.
495. Marengo J., Hidalgo C., Bull R. // *Biophys. J.* 1998. Vol. 74. P. 1263–1277.
496. Zaidi N. F., Lagenaur C. F., Abramson J. J. et al. // *J. Biol. Chem.* 1989. Vol. 264. P. 21725–21736.
497. Aghdasi B., Zhang J., Wu Y. et al. // *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272. P. 3739–3748.
498. Aghdasi B., Reid M., Hamilton S. // *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272. P. 25462–25467.
499. Favero T., Zable A., Abramson J. // *J. Biol. Chem.* 1995. Vol. 270. P. 25557–25563.
500. Menshikova E., Cheong E., Salama G. // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275. P. 36775–80.
501. Kawakami M., Okabe E. // *Mol. Pharmacol.* 1998. Vol. 53. P.497–503.
502. Favero T., Webb J., Papiez M. et al. // *J. Appl. Physiol.* 2003. Vol. 94. P.1387–1394.
503. Missiaen L., Taylor C., Berridge M. // *Nature.* 1991. Vol. 352. P.241–244.
504. Parekh A., Penner R. // *J. Physiol.* 1995. Vol. 489. P. 377–382.
505. Wesson D., Elliott S. // *Microcirculation.* 1995. Vol. 2. P. 195–203.
506. Pariente J. A., Camello C., Camello P. J., Salido G. M. // *J. Membr. Biol.* 2001. Vol. 179. P. 27–35.
507. Horn T. F., Wolf G., Duffy S. et al. // *FASEB J.* 2002. Vol. 16. P. 1611–1622.
508. Berridge M., Lipp P., Bootman M. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2000. Vol. 1. P. 11–21.

509. *Berridge M., Bootman M., Roderick H.* // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003. Vol. 4. P. 517–529.
510. *Carafoli E., Santella L., Branca D., Brini M.* // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2001. Vol. 36. P. 107–260.
511. *Favero T., Zable A., Abramson J.* // *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272. P. 7069–7077.
512. *Gilbert H. F.* // *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 1990 Vol. 63. P. 69–172.
513. *Obin M., Shang F., Gong X. et al.* // *FASEB J.* 1998. Vol. 12. P. 561–569.
514. *Jahngen-Hodge J., Obin M., Gong X. et al.* // *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272. P. 28218–28226.
515. *Gilbert H. F.* // *Methods Enzymol.* 1995. Vol. 251. P. 8–28.
516. *Klatt P., Molina E., De Lacoba M. et al.* // *FASEB J.* 1999. Vol. 13. P. 1481–1490.
517. *Kim J., Cho H., Ryu S., Choi M.* // *Arch. Biochem. Biophys.* 2000. Vol. 382. P. 72–80.
518. *Xia R., Stangler T., Abramson J.* // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275. P. 36556–36561.
519. *Oba T., Ishikawa T., Yamaguchi M.* // *Am. J. Physiol.* 1998. Vol. 274. P. C914–C921.
520. *Banhegyi C., Lusini L., Puskas F. et al.* // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274. P. 12213–16.
521. *Zheng M., Aslund F., Storz G.* // *Science.* 1998. Vol. 279. P. 1718–1721.
522. *Aslund F., Zheng M., Beckwith J., Storz G.* // *PNAS.* 1999. Vol. 96. P. 6161–6165.
523. *Pineda-Molina E., Klatt P., Vazquez J. et al.* // *Biochemistry.* 2001. Vol. 40. P. 14134–14142.
524. *Wu H., Sherman M., Yuan Y., Momand J.* // *Gene Ther. Mol. Biol.* 1999. Vol. 4. P. 119–132.
525. *Marshall H. E., Merchant K., Stamler J. S.* // *FASEB J.* 2000. Vol. 14. P. 1889–1900.
526. *Zapun A., Bardwell J. C., Creighton T. E.* // *Biochemistry.* 1993. Vol. 32. P. 5083–5092.
527. *Krause G., Lundstrom J., Barea J. et al.* // *J. Biol. Chem.* 1991. Vol. 266. P. 9494–9500.
528. *Mossner E., Huber-Wunderlich M., Rietsch A. et al.* // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274. P. 25254–25259.
529. *Aslund F., Berndt K., Holmgren A.* // *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272. P. 30780–30786.
530. *Hawkins H. C., de Nardi M., Freedman R. B.* // *Biochem J.* 1991. Vol. 275. P. 341–348.
531. *Lundstrom J., Holmgren A.* // *Biochemistry.* 1993. Vol. 32. P. 6649–6655.
532. *Hancock J. T., Desikan R., Neill S. J.* // *Free Radic Biol Med.* 2001. Vol. 31. P. 697–703.
533. *Cross A., Rae J., Curnutte J.* // *J. Biol. Chem.* 1995. Vol. 270. P. 17075–17077.
534. *Sharp R., Chapman S.* // *Bioch. Biophys. Acta.* 1999. Vol. 1432. P. 143–158.
535. *Cai J.; Yang J.; Jones D. P.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1999. Vol. 1366. P. 139–149.
536. *Hampton M., Zhivotovsky B., Slater A. et al.* // *Biochem. J.* 1998. Vol. 329. P. 95–99.
537. *Gaudu P, Weiss B.* // *PNAS.* 1996. Vol. 93. P. 10094–10098.
538. *Ding H. G., Demple B.* // *PNAS.* 1997. Vol. 94. P. 8445–8449.
539. *Khoroshilova N., Popescu C., Munck E. et al.* // *PNAS.* 1997. Vol. 94. P. 6087–6092.
540. *Xu L., Eu J. P., Meissner G., Stamler J. S.* // *Science.* 1998. Vol. 279. P. 234–237.
541. *Choi Y. B., Lipton S. A.* // *Cell. Mol. Life Sci.* 2000. Vol. 57. P. 1535–1541.
542. *Rossig L, Fichtlscherer B, Breitschopf K. et al.* // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274. P. 6823–6826.
543. *Becker K., Gui M., Schirmer R. H.* // *Eur. J. Biochem.* 1995. Vol. 234. P. 472–478.
544. *Clark A. G., Degnam P.* // *Biochem. Pharmacol.* 1988. Vol. 37. P. 3199–3201.

545. *Asahi M. J., Fujii K., Suzuki H. et al. // J. Biol. Chem. 1995. Vol. 270. P. 21035–21039.*
546. *Ward N., Chu F., O'Brian C. // Methods Enzymol. 2002. Vol. 353. P. 89–100.*
547. *Jahngen-Hodge J., Obin M., Gong X. et al. // J. Biol. Chem. 1997. Vol. 272. P. 28218–28226.*
548. *Cotgreave I. A., Gerdes R., Schuppe-Koistinen I., Lind C. // Methods Enzymol. 2002. Vol. 348. P. 175–182.*
549. *Konorev E. A., Kalyanaraman B., Hogg N. // Free Radic. Biol. Med. 2000. Vol. 28. P. 1671–1678.*
550. *Reddy S., Jones A., Cross C. et al. // Biochem. J. 2000. Vol. 347. P. 821–827.*
551. *Gu Z., Kaul M., Yan B. et al. // Science. 2002. Vol. 297. P. 1186–1190.*
552. *Okamoto T., Akaike T., Sawa T. et al. // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276. P. 29596.*
553. *Humphries K., Juliano C., Taylor S. // J. Biol. Chem. 2002. Vol. 277. P. 43505–43511.*
554. *Barrett W., DeGnore J., Konig S. et al. // Biochemistry. 1999. Vol. 38. P. 6699–6705.*
555. *Rao R., Clayton L. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002. Vol. 293. P. 610–616.*
556. *Kim Y. M., Kim T. H., Chung H. T. et al. // Hepatology. 2000. Vol. 32. P. 770–778.*
557. *Tomita H., Nakazawa T., Sugano E. et al. // Eur. J. Pharmacol. 2002. Vol. 452. P. 263.*
558. *Park H., Huh S., Kim M. // PNAS. 2000. Vol. 97. P. 14382–14387.*
559. *So H. S., Park R. K., Kim M. S. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1998. Vol. 247. P. 809–813.*
560. *Ji Y., Toader V., Bennett B. // Biochem. Pharmacol. 2002. Vol. 63. P. 1397–1404.*
561. *Dafre A., Sies H., Akerboom T. // Arch. Biochem. Biophys. 1996. Vol. 332. P. 288–294.*
562. *Renganathan M., Cummins T. R., Waxman S. G. // J. Neurophysiol. 2002. Vol. 87. P. 761–775.*
563. *Choi Y., Tenneti L., Le D. et al. // Nat. Neurosci. 2000. Vol. 3. P. 15–21.*
564. *Xu L., Eu J., Meissner G., Stamler J. // Science. 1998. Vol. 279. P. 234–237.*
565. *Mallis R., Buss J., Thomas J. // Biochem. J. 2001. Vol. 355. P. 145–153.*
566. *Sohn J., Rudolph J. // Biochemistry. 2003. Vol. 42. P. 10060–10070.*
567. *Denu J. M., Tanner K. G. // Biochemistry. 1998. Vol. 37. P. 5633–5642.*
568. *Poole L., Karplus P., Claiborne A. // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2004. Vol. 44. P. 325–347.*
569. *Wood Z. A., Schroder E., Harris J. R., Poole L. B. // Trends Biochem. Sci. 2003. Vol. 28. P. 32–40.*
570. *Gilbert H. F. // Methods Enzymol. 1998. Vol. 290. P. 26–50.*
571. *Jordan A., Reichard P. // Annu. Rev. Biochem. 1998. Vol. 67. P. 71–98.*
572. *Bessette P. H., Aslund F., Beckwith J., Georgiou G. // PNAS. 1999. Vol. 96. P. 13703.*
573. *Danon A., Mayfield S. P. // Science. 1994. Vol. 266. P. 1717–1719.*
574. *Delaunay A., Isnard A., Toledano M. // EMBO J. 2000. Vol. 19. P. 5157–5166.*
575. *Delaunay A., Pflieger D., Barrault M. et al. // Cell. 2002. Vol. 111. P. 471–481.*
576. *Park P., Raines R. // Protein Engineering. 2001. Vol. 14. P. 939–942.*
577. *Chen Q., Arents J. C., Bader R. et al. // EMBO J. 1997. Vol. 16. P. 4617–4627.*
578. *Chen Q., Nussbaum-Shochat A., Amster-Choder O. // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276. P. 44751–44756.*
579. *Watson A. A., Fairlie D. P., Craik D. J. // Biochemistry. 1998. Vol. 37. P. 12700–12706.*
580. *Gao J., Yin D., Yao Y. et al. // Biophys. J. 1998. Vol. 74. P. 1115–1134.*
581. *Yap K. L., Kim J., Truong J. K. et al. // J. Struct. Funct. Gen. 2000. Vol. 1. P. 8–14.*

582. Gao J., Yao Y., Squier T. C. // *Biophys. J.* 2001. Vol. 80. P. 1791–1801.
583. Sun H., Gao J., Ferrington D. A. et al. // *Biochemistry.* 1999. Vol. 38. P. 105–112.
584. Hoshi T., Heinemann S. H. // *J. Physiol.* 2001. Vol. 531. P. 1–11.
585. Lee J., Godon C., Lagniel G. et al. // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274. P. 16040–16046.
586. Jackson W. A., Colyer J. // *Biochem. J.* 1996. Vol. 316. P. 201–207.
587. Bigelow D. J., Squier T. C. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2005. Vol. 1703. P. 121–134.
588. Toledano M., Delaunay A., Monceau L., Tacnet F. // *Trends Biochem. Sci.* 2004. Vol. 29. P. 351–357.
589. Yin D., Kuczera K., Squier T. C. // *Chem. Res. Toxicol.* 2000. Vol. 13. P. 103–110.
590. Burdon R., Rice-Evans C. // *Free Radic. Res. Commun.* 1989. Vol. 6. P. 345–358.
591. Burdon R., Alliangana D., Gill V. // *Free Radic. Res.* 1995. Vol. 23. P. 471–486.
592. Wiese A., Pacifici R., Davies K. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1995. Vol. 318. P. 231–240.
593. Burdon R., Gill V., Alliangana D. // *Free Radic. Res.* 1996. Vol. 24. P. 81–93.
594. Starikova A. M., Pogorelova N. C., Kostyuk P. G. // *Neuroscience.* 2000. Vol. 95. P. 923–926.
595. Trump B. F., Berezsky I. K. // *FASEB J.* 1995. Vol. 9. P. 219–228.
596. Van Klaveren R. J., Hoet P. H., Demedts M., Nemery B. // *Free Radic. Res.* 1999. Vol. 30. P. 371–381.
597. Мартинович Г. Г., Черенкевич С. Н., Мартинович И. В. // Медико-социальная экология личности: состояние и перспективы: В 2 ч. Мат. III междунар. конф., Часть 1 / Ред.: В. А. Прокашева (отв. ред.) и др. Мн.: БГУ, 2005. С. 211–214.
598. Friesen C., Fulda S., Debatin K. // *Cell Death Differ.* 1999. Vol. 6. P. 471–480.
599. Friesen C., Kiass S., Debatin K. // *Cell Death Differ.* 2004. Vol. 11. P. S73–S85.
600. Chiba T., Takahashi S., Sato N. et al. // *Eur. J. Immunol.* 1996. Vol. 26. P. 1164–1169.
601. Hedley D., Chow S. // *Methods Cell Biol.* 1994. Vol. 42. P. 31–44.
602. Borrás C., Esteve J., Vina J. et al. // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279. P. 34332–34335.
603. Conour J., Graham W., Gaskin H. // *Physiol. Genomics.* 2004. Vol. 18. P. 196–205.
604. Menon S. G., Sarsour E., Spitz D. R. et al. // *Cancer Res.* 2003. Vol. 62. P. 2109–2117.
605. Honda T., Coppola S., Ghibelli L. et al. // *Cancer Gene Ther.* 2004. Vol. 11. P. 249.
606. Armstrong J. S., Steinauer K. K., Hornung B. et al. // *Cell Death Differ.* 2002. Vol. 9. P. 252–263.
607. Meurette O., Lefeuvre-Orfila L., Rebillard A. et al. // *Clin. Cancer Res.* 2005. Vol. 11. P. 3075–3083.
608. Vaupel P., Kallinowski F., Okunieff P. // *Cancer Res.* 1989. Vol. 49. P. 6449–6465.
609. Okunieff P., Urano M., Kallinowski F. et al. // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1991. Vol. 21. P. 667–673.
610. McLean L., Roscoe J., Jorgensen N. et al. // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2000. Vol. 278. P. C676–C688.
611. Huang Z., Chen C., Zeng Z. et al. // *FASEB J.* 2001. Vol. 15. P. 19–21.
612. Lee Y., Kim H., Jung H. et al. // *Mol. Cells.* 2002. Vol. 14. P. 305–311.
613. Zatorska A., Maszewski J., Jozwiak Z. // *Acta Biochim. Pol.* 2003. Vol. 50. P. 825–836.
614. Shrieve D., Bump E., Rice G. // *J. Biol. Chem.* 1988. Vol. 263. P. 14107–14114.