

## ОБЗОРЫ

УДК 577.344

© Е.Е. ДУБИНИНА

### РОЛЬ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В КАЧЕСТВЕ СИГНАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ В МЕТАБОЛИЗМЕ ТКАНЕЙ ПРИ СОСТОЯНИЯХ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

Е.Е. ДУБИНИНА

Психоневрологический институт им. В.М. Бехтерева

193019 г. Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, 3.

Факс: (812) 567-71-27; Эл. почта: spbinstb@infopro.spb.su

Обобщены литературные данные, отражающие роль активных форм кислорода (АФК) в качестве вторичных посредников в процессах жизнедеятельности клеток. АФК включаются в сигнальную трансдукцию, влияя на ключевые звенья метаболических процессов: фосфорилирование, метаболизм кальция, модуляция факторов транскрипции, гидролиз фосфолипидов. При любых стрессорных реакциях организма, сопровождающихся состоянием окислительного стресса, АФК участвуют в передаче сигнала от первичных посредников для запуска каскада реакций, необходимых для приспособления и выживания в экстремальных условиях.

Окислительный стресс является одним из патогенетических звеньев многих заболеваний, при которых АФК проявляют свое токсическое действие в связи с их интенсивной генерацией и истощением антиоксидантной защиты.

**Ключевые слова:** окислительный стресс, активные формы кислорода, антиоксидантная защита, прооксидантная система, вторичные мессенджеры.

**ВВЕДЕНИЕ.** Развитие окислительного стресса (ОС) обусловлено нарушением сбалансированности антиоксидантной (АОС) и прооксидантной систем (ПОС). В организме в результате окислительно-восстановительных реакций постоянно происходит генерация активных форм кислорода (АФК), которые обладают высокой реакционной способностью, вызывая, в частности, окислительную модификацию биополимеров: белков, липидов, нуклеиновых кислот, углеводов. Системы, участвующие в образовании АФК, и процессы,

связанные с окислительной деструкцией биологически активных соединений, можно условно объединить в понятие прооксидантная система.

В организме токсическое действие АФК предотвращается за счет функционирования антиоксидантной защиты (АОЗ), которая представлена ферментативными и неферментативными компонентами. К первым относят супероксиддисмутазу (СОД), каталазу, глутатионпероксидазу, фосфолипид-гидропероксид-глутатионпероксидазу, глутатион-S-трансферазу, тиол-специфическую пероксидазу, тиоредоксинредуктазу, глутатионредуктазу [1]. Действия ферментов-антиоксидантов тесно связаны друг с другом и четко сбалансированы между собой. Нарушение соотношения ферментативных компонентов АОЗ может приводить к дополнительной генерации АФК и являться одним из проявлений ОС. Так, при ряде психических состояний (болезнь Дауна, маниакально-депрессивные психозы, паранойя, галлюцинации) на первое место выступает дисбаланс ферментативных компонентов АОЗ в связи с увеличением активности СОД в тканях [2, 3].

В организме существует определенное равновесие между ферментативными и неферментативными элементами АОЗ, так как последние могут при ряде патологических состояний выступать в качестве прооксидантов. Так, аскорбиновая кислота и восстановленные тиолы функционируют в качестве основных антиоксидантов цитозоля. Высокий уровень аскорбиновой кислоты обнаружен в сером и белом веществе головного мозга и особенно в гиппокампе и гипоталамусе, в спинномозговой жидкости [4]. В отсутствие металлов с переменной валентностью аскорбиновая кислота обладает выраженным антиоксидантным действием. Высокая концентрация аскорбиновой кислоты важна для регенерации окисленного токоферола. Сам аскорбат реагирует с АФК с образованием дегидроаскорбатного радикала, который восстанавливается за счет глутатионового цикла. Однако при поражениях мозга, когда повышается уровень "активной формы" железа, аскорбиновая кислота может стимулировать образование ОН радикала, выступая в роли прооксиданта. Тиолы в восстановленной форме в присутствии "активных форм" металлов переменной валентности могут образовывать реакционноспособные соединения типа RS (тиоловый радикал) и ОН [5].

Каждая ткань обладает определенной буферной емкостью АОЗ. Она зависит от состояния АОЗ межклеточной жидкости и самой клетки, отдельных ее компонентов. Некоторые ткани в силу особенностей своей функциональной и метаболической активности обладают высокой чувствительностью к состоянию ОС, что связано с высокой потенциальной мощностью ПОС и низкой буферной емкостью АОЗ. К таким тканям относятся мозг, сетчатка, легкие. Это обусловлено, как нам представляется, той важной регуляторной функцией, которую выполняют генерируемые АФК и радикальные метаболиты в этих тканях. В мозговой ткани это может быть связано с передачей сигналов возбуждения, возникновения потенциала действия и включения в работу синапсов.

#### **АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА – ВТОРИЧНЫЕ МЕССЕНДЖЕРЫ**

Метаболический фон любой клетки зависит от характера информации, поступающей из окружающей среды. Носителями этой информации являются первичные мессенджеры: гормоны, цитокины, нейротрансмиттеры. Этот процесс осуществляется за счет клеточной сигнализации или сигнальной трансдукции. В передачу сигнала через клеточную мембрану включаются вторичные



мессенджеры. В качестве вторичных посредников принимают активное участие АФК ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH\cdot$  и гидроперекиси липидов), осуществляя регулируемую роль в процессах роста клеток, апоптозе, клеточной адгезии, свертывания крови и т.д. [6–17]. Имеются прямые доказательства, основанные на наблюдениях, что низкие (микромольные) концентрации АФК могут увеличивать рост или усиливать ответ на стимуляцию роста во многих типах клеток млекопитающих, а антиоксиданты подавляют нормальную клеточную пролиферацию [18–21]. Так низкие концентрации  $H_2O_2$  стимулируют рост фибробластов животных [20].  $H_2O_2$  (100 мкМ) усиливает пролиферацию фибробластов легких хомяков. Ингибирование СОД или глутатионпероксидазы увеличивает клеточную пролиферацию. Авторы считают, что  $OH\cdot$ , генерируемый в реакции Фентона, может также являться фактором, усиливающим клеточную пролиферацию и активность митоген-активируемой протеинкиназы (МАР-киназа). Это основано на том, что ловушки  $OH\cdot$  (маннитол, диметилсульфоксид) и хелаторы железа тормозят стимулируемую  $H_2O_2$  пролиферацию клеток.

Если рассматривать АФК с позиций их действия в физиологических концентрациях в качестве вторичных посредников, то их образование при передаче сигнала должно быть опосредовано лиганд-рецепторными взаимодействиями. В качестве таких лигандов могут выступать гормоны (инсулин, ангиотензин, паратиреоидный гормон, витамин  $D_3$ ), цитокины, факторы роста. Образование лиганд-рецепторных комплексов сопровождается образованием АФК, которые активно включаются в сигнальную трансдукцию, влияя на ключевые звенья метаболических процессов в клетке.

Действительно, имеются экспериментальные подтверждения участия АФК в передаче сигнала, связанного с действием первичных мессенджеров. Первичные мессенджеры осуществляют регуляцию уровня АФК в клетке за счет активации процессов их генерации с одной стороны и снижения активности отдельных звеньев АОЗ с другой. В этом процессе активное участие принимают цитокины. Цитокины стимулируют освобождение АФК из многих типов клеток, включая фибробласты человека, эпителиальные и эндотелиальные клетки [19, 23]. С АФК связана передача сигнала от тромбоцитарного фактора роста [24], эпидермального фактора роста [25], трансформирующего фактора роста  $\beta$ -1 [26], фактора некроза опухолей (ФНО- $\alpha$ ) [27, 28]. Участие интерлейкина-1 и интерферона в сигнальной трансдукции связывают с образованием  $O_2^{\cdot-}$  [29], ФНО- $\alpha$  - с  $H_2O_2$  [30]. В астроцитах интерлейкин-1 $\beta$  повышает генерацию  $H_2O_2$ , что приводит к снижению фосфатазной активности и активации МАР-киназы. [31]. ФНО- $\alpha$  через повышение образования АФК активирует факторы транскрипции NF- $\kappa B$  и AP-1, процессы апоптоза [32–34]. Многие низкомолекулярные АО могут блокировать активацию NF- $\kappa B$ , вызванную ФНО- $\alpha$  [15, 35–38]. Хотя представлены многочисленные экспериментальные данные, подтверждающие участие АФК в цитокин-опосредованной реакции активации NF- $\kappa B$ , имеются и возражения против этой точки зрения [39–41]. Считают, что этот процесс может происходить не во всех клетках. Вероятно, это противоречие обусловлено различными методическими подходами к изучению данной проблемы, использованием разных типов клеток.

Прослежено участие в сигнальной трансдукции АФК как вторичных мессенджеров в клетках костной ткани. ФНО- $\alpha$ , интерлейкин-1, паратиреоидный

гормон и витамин Д стимулируют образование АФК за счет присутствующей в остеокластах НАДФН-оксидазы [42-45].

Вазоактивный пептид (ангиотензин II) проявляет свое действие на процессы мышечного сокращения и клеточный рост гладких мышц сосудов через генерацию внутриклеточного  $O_2^-$  [46]. Источником  $O_2^-$ , по-видимому, являлись НАДН и НАДФН-оксидазы, так как оба фермента активируются ангиотензином. Другие авторы [47] считают, что  $H_2O_2$ , а не  $O_2^-$ , ответственна за рост клеток гладкой мускулатуры сосудов, так как СОД не влияет на этот процесс.

Получены данные в пользу участия  $H_2O_2$  в сигнальной трансдукции тромбоцитарного фактора роста (PDGF) и трансформирующего фактора роста TGF- $\beta$ 1. Каталаза блокировала вызванное PDGF и TGF- $\beta$ 1 фосфорилирование тирозина, активацию MAP-киназ, хемотаксис [15, 48, 49]. Предполагают, что  $H_2O_2$  действует через инактивацию протеинтирозинфосфатаз [50]. Эпидермальный фактор роста, связываясь с эпидермальными клетками, также приводит к инактивации протеинтирозинфосфатазы [51].

Таким образом, имеются определенные экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что действие ряда первичных мессенджеров осуществляется либо через активацию процессов генерации АФК и повышение их уровня в тканях, либо через ингибирование компонентов АОЗ. Это позволяет рассматривать АФК в качестве вторичных мессенджеров, участвующих в передаче сигналов в физиологических условиях за счет регуляции обмена  $Ca^{2+}$ , стимуляции фосфорилирования белков, активации факторов транскрипции.

В литературе активно обсуждается возможная физиологическая роль оксидантов в регуляции  $Ca^{2+}$ -сигнала и фосфорилирования белков, с которыми связаны многочисленные биохимические процессы в клетке [15]. Оксидантопосредованная индукция  $Ca^{2+}$ -сигнала и его регуляция обусловлены увеличением его концентрации в цитозоле. В присутствии оксидантов увеличивается транспорт  $Ca^{2+}$  через кальциевые каналы и ингибируется АТФ-зависимый  $Ca^{2+}$ -насос.

Имеются экспериментальные данные о непосредственном влиянии физиологических концентраций оксидантов ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^-$ ) на состояние  $Ca^{2+}$ -каналов, что сопровождается освобождением  $Ca^{2+}$  из эндотелиальных клеток сосудов, саркоплазматического ретикулума скелетных и сердечной мышц, вентрикулярных миоцитов животных [52-56].  $O_2^-$  и  $H_2O_2$  ингибируют активность  $Ca^{2+}$ -насоса саркоплазматического ретикулума. Ингибирование  $Ca^{2+}$ -насоса саркоплазматического ретикулума приводит к пассивному движению  $Ca^{2+}$  в цитозольное пространство и увеличению цитозольного  $Ca^{2+}$  [57-60].

Оксиданты, генерируемые в системе ксантин/ксантинооксидаза, обладают способностью освобождать  $Ca^{2+}$  из инозитол-3-фосфатчувствительных депо клеток. Гипоксантин/ксантинооксидазная система стимулирует освобождение  $Ca^{2+}$  из саркоплазматического ретикулума гладкой мускулатуры сосудов и этот эффект блокируется СОД, но не каталазой [61, 62].

Таким образом, увеличение концентрации  $Ca^{2+}$  в цитозоле обусловлено в первую очередь изменением проницаемости мембран органелл. Однако эти изменения не связаны с пероксидацией мембранных липидов, приводящих к генерализованному увеличению проницаемости мембран.

Сами продукты ПОЛ могут вызывать повышение цитозольного  $Ca^{2+}$  по тому же механизму, что и другие оксиданты. Предполагают, что действие оксидантов обусловлено окислением тиоловых группировок инозитол-3-



фосфатных рецепторов без участия инозитол-3-фосфата [63,64]. Показано, что повышение окисленного глутатиона приводит к освобождению  $\text{Ca}^{2+}$  из инозитол-3-фосфатчувствительного депо в эндотелиальных клетках легочной ткани телят [65,66].

Renard и соавт. [64] считают, что способность гидроперекисей, в частности, *tert*-бутил гидропероксида (tBOOH) увеличивать концентрацию внутри-клеточного  $\text{Ca}^{2+}$  связана с окислением глутатиона и других тиолов, которые взаимодействуют с инозитол-трифосфатным рецептором. В эндотелиальных клетках аорты кролика гидропероксид линолевой кислоты в дозе  $0,1-0,4 \text{ моль}/10^6$  клеток быстро повышал уровень  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле. Способность гидроперекисей окислять клеточный GSH и увеличивать образование дисульфидов приводит к освобождению  $\text{Ca}^{2+}$  без образования инозитол-3-фосфата [67]. Временной и концентрационнозависимый эффект гидроперекисей липидов на внутриклеточную концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  коррелирует с интенсивностью «дыхательного взрыва» в клетках, что свидетельствует о возможной регуляции этого процесса продуктами ПОЛ.

Источником цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  помимо эндогенных депо может являться и внеклеточный  $\text{Ca}^{2+}$ . Показано, что  $\text{H}_2\text{O}_2$  влияет на транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  через плазматическую мембрану [56]. Роль внеклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  в оксидант-стимулируемом сигнале изучена на примере индуцирования экспрессии протоонкогенов за счет  $\text{O}_2^-$  в проксимальных тубулярных эпителиальных клетках [68]. Экспрессию гена *c-fos*, стимулированную  $\text{O}_2^-$ , который генерировала система ксантин/ксантиноксидаза, блокирует СОД, а не каталаза. Возможно, этот процесс связан с состоянием тиоловых структур мембран, соотношением их окисленных и восстановленных форм [69].

Оксидант-опосредованное освобождение  $\text{Ca}^{2+}$  может осуществляться и за счет других источников. Ими могут быть митохондрии,  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающие белки. В случае с митохондриями очень трудно отдифференцировать физиологическую роль оксидантов (в частности t-BOOH) в клеточной сигнализации от их токсического действия [70-72].

Источником вызванного оксидантами повышения внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  за счет оксидантов могут быть  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающие белки. Аннексин - белок цитоскелета (его концентрация составляет около 0,5% клеточных белков), - является представителем семейства  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих белков [15]. Действие t-BOOH на альвеолярные макрофаги приводит к увеличению внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ , что сопровождается перемещением аннексина от мембраны к цитозолу.

Другим важным звеном действия оксидантов в передаче сигнальной информации является фосфорилирование белков. Известно, что большая группа белков, включающая ферменты, рецепторы, факторы транскрипции, сократительные белки, может активироваться или инактивироваться за счет фосфорилирования аминокислотных остатков. Процессы фосфорилирования зависят от действия двух классов ферментов: протеинкиназ, катализирующих сам процесс фосфорилирования, и протеинфосфатаз (ПрФаз), участвующих в отщеплении фосфатной группы. Наиболее хорошо изучены серин/треонин киназы/фосфатазы и тирозинкиназы/фосфатазы. Оксидант-стимулируемое фосфорилирование может быть обусловлено или ингибированием ПрФаз, или активацией протеинкиназ.

Фосфорилирование/дефосфорилирование белков является важным регуляторным звеном в процессе деления клеток, их дифференциации, пролиферации, трансформации и секреции.

При изучении процессов фосфорилирования остатков тирозина белков показано, что оксиданты могут активировать протеинтирозинкиназы [73-77] или могут действовать как ингибиторы ПрФаз в разных типах клеток [78-81]. Vера и соавторы [82] показали, что оксиданты индуцируют фосфорилирование остатков тирозина в кавеолине - белке эндотелиальных клеток сосудов. В эндотелиальных клетках, обработанных оксидантами, повышается активность тирозинкиназы и снижается активность фосфатазы. Генерация АФК приводит к активации протеинтирозинкиназы и протеинкиназы С (РКС), что сопровождается стимуляцией, в частности, МАР-киназ. Существует 3 подкласса МАР-киназ. Регулируемая внеклеточными сигналами МАР-киназа участвует в процессах пролиферации [83]. Использование ингибиторов протеинтирозинкиназ и РКС снижает активность МАР-киназы и пролиферацию клеток [19, 65, 84, 85]. Киназы 2-х других подклассов (с-Jun-N-терминальная киназа и р38) связаны с состоянием ОС и процессов апоптоза. Через первичные мессенджеры (ФНО- $\alpha$ , интерлейкины 6 и 2) при участии оксидантов идет процесс активации МАР-киназ за счет их фосфорилирования. Активированные МАР-киназы перемещаются к ядрам, где они фосфорилируют белки-мишени, связанные с функционированием факторов транскрипции. Оксиданты увеличивают активность МАР-киназы в нейтрофилах, участвуя в регуляции иммунного ответа организма [86].

Имеются экспериментальные данные об ингибировании тирозинфосфатазы под действием  $H_2O_2$  [79, 80]. Возможно, действие оксидантов связано с их влиянием на состояние серосодержащих аминокислотных остатков, так как все ПрФазы содержат в активном центре цистеиновые остатки [81].

Оксиданты также регулируют серин/треонин-зависимое фосфорилирование, катализируемое протеинкиназами. Протеинкиназа С представлена семейством более чем из 11 фосфолипид-зависимых серин/треонинкиназ, которые вовлечены в регуляцию роста клеток, их ответ на состояние стресса, гибель клеток. Традиционные РКС являются  $Ca^{2+}$ -зависимыми и стимулируются вторичными мессенджерами, в частности, диацилглицеролом. Малоизученными являются  $Ca^{2+}$ -независимые, но диацилглицерол-стимулируемые РКС и атипичные РКС, которые для своей активности не требуют ни диацилглицерола, ни ионов кальция [84,87,88].

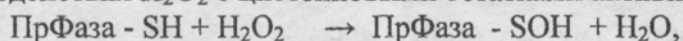
Имеются экспериментальные данные об увеличении активности  $Ca^{2+}$ -фосфолипидзависимой цитозольной РКС за счет действия  $O_2^-$  [87,89]. Используя очищенный препарат РКС, Gopalakrishna и Anderson [87,88] показали, что  $H_2O_2$  регулирует активность  $Ca^{2+}$ -зависимой и  $Ca^{2+}$ -независимой РКС. Все РКС имеют N-терминальный регуляторный домен и С-терминальный каталитический домен. Оба домена содержат в большом количестве остатки цистеина, с которыми связана редокс-регуляция активности фермента. Показано, что регуляторный домен РКС очень чувствителен к действию оксидантов. Селективная модификация некоторых цистеиновых остатков этого домена приводит к активации фермента, в то время как модификация цистеиновых остатков каталитического домена может привести к инактивации фермента. Именно тиолы регуляторного домена являются до некоторой степени ответственными за модулирующее действие физиологических концентраций оксидантов, в частности, пероксидов [84, 91].



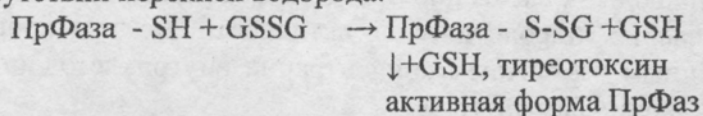
Таким образом, оксиданты, увеличивая активность различных протеинкиназ, участвуют в регуляции многочисленных клеточных процессов, таких как митогенез, клеточная адгезия, апоптоз и т.д. [92-94].

Оксидант-стимулированное фосфорилирование может быть связано с инактивацией редокс-чувствительных ПрФаз [84, 85]. Окисление тиоловых группировок активного центра протеинфосфатаз может приводить к их инактивации [31, 96]. Так, связывание тромбоцитарного фактора роста [97], эпидермального фактора роста [50] со своими рецепторами в клетках приводит к образованию  $H_2O_2$ , которая усиливает процессы фосфорилирования через транзиторную инактивацию ПрФаз. Каталаза ингибирует передачу сигнала от первичных посредников.

Инактивация ПрФаз может происходить либо за счет непосредственного взаимодействия  $H_2O_2$  с цистеиновыми остатками активного центра фермента [31]:



либо через образование смешанного глутатионового промежуточного соединения в присутствии перекиси водорода:



Неактивная окисленная форма фосфатаз может переходить в активную форму через восстановление тиоловых группировок активного центра в результате реакции с GSH, тиреодоксином. [84]. Инактивация ПрФаз сопровождается стимуляцией фосфорилирования, катализируемого РКС. Фактически нарушается процесс сбалансированности фосфорилирования белков за счет снятия фосфатазного контроля.

Следующим звеном действия оксидантов в качестве вторичных мессенджеров является фосфолипаза  $A_2$  (Фл $A_2$ ). Активация Фл $A_2$  оксидантами сопряжена с вовлечением многих путей передачи сигнала. Арахидоновая кислота, как продукт Фл $A_2$ , является важным медиатором таких процессов как воспаление [98], иммунные процессы [99], НАДФН-оксидазная активность [100], свертывание крови [17].

Известно, что пероксидация мембранных фосфолипидов (Фл) приводит к образованию гидропероксидов, которые могут не только инактивировать белки, но и изменять физические свойства мембраны. Изменение мембранных структур является существенным фактором для активации внеклеточных фосфолипаз. Этот процесс происходит очень быстро, так как гидролиз Фл может наблюдаться практически сразу же после обработки клеток или искусственных мембран оксидантами [15].

Активация Фл $A_2$  оксидантами в культивируемых клетках (91) предотвращается антиоксидантами, в частности, витамином Е [101]. Хорошо известно, что мобилизация  $\text{Ca}^{2+}$  и деградация Фл тесно связаны между собой [15, 102].

Выделяют 3 возможных пути действия продуктов ПОЛ в качестве вторичных мессенджеров на процессы в клетке, связанные с образованием сигнальных молекул:

1. Влияние на структуру клеточных мембран.
2. Влияние на состояние депо  $\text{Ca}^{2+}$ , что сопровождается его мобилизацией из депо и поступлением в цитозоль.
3. Активация Фл $A_2$ .

ПОЛ изменяет гомеостаз  $\text{Ca}^{2+}$ , что служит первичным сигналом для активации ФлА<sub>2</sub> [103]. Это приводит к освобождению таких сигнальных молекул как арахидоновая кислота, диацилглицерол, фосфоинозитид. Оксидант-опосредованный гидролиз Фл связан с освобождением через G-белки вторичных посредников, которые способствуют освобождению  $\text{Ca}^{2+}$  из своих депо и активации РКС.

Все типы (1-IV) ФлА<sub>2</sub> являются  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимыми и соответственно чувствительными к его колебаниям в цитозоле.  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимые реакции, приводящие к гидролизу Фл, после действия  $\text{H}_2\text{O}_2$  реализуют важный и быстрый путь изменений метаболических процессов при состояниях ОС [102, 103].

Регуляция активности IV типа цитозольной высокомолекулярной ФлА<sub>2</sub> (ц-ФлА<sub>2</sub>) осуществляется за счет ее фосфорилирования. Процесс фосфорилирования ц-ФлА<sub>2</sub> происходит с участием РКС и МАР-киназы [104]. С фосфорилированием связано перемещение фермента к мембране. Можно наблюдать прямую взаимосвязь между продуктами пероксидации липидов и активностью РКС, что приводит к активации процесса фосфорилирования ФлА<sub>2</sub>, ее перемещение и проявление гидролитической активности. Но этот процесс не сопровождается выраженным изменением концентрации внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ , т.е. это, фактически,  $\text{Ca}^{2+}$ -независимый путь.

Таким образом, ПОЛ способна стимулировать гидролиз мембранных Фл двумя путями:

1.  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимый путь за счет сигнального выхода на плазматическую или внутриклеточную мембраны. В этот процесс вовлекаются сигнальные трансдукционные белки или мембранные мессенджеры.
2.  $\text{Ca}^{2+}$ -независимый путь, когда не происходит выраженного изменения структуры мембран и утечки  $\text{Ca}^{2+}$  из депо, но структурные перестройки в мембране могут способствовать повышению чувствительности Фл к гидролизу, для которого не требуются высокие концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ . Высокомолекулярная ц-ФлА<sub>2</sub>, обнаруженная во многих клетках, может осуществлять этот гидролиз, так как для ее активации требуются микромолярные концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  [105]. Действие оксидантов реализуется через РКС, МАР-киназу или тирозинкиназу.

$\text{H}_2\text{O}_2$ , гидропероксиды [106] и 4-гидроксиноненаль [107] активируют фосфолипазу Д (ФлД) в эндотелиальных клетках. Данные об участии РКС в активации  $\text{H}_2\text{O}_2$ -стимулируемой ФлД довольно противоречивы [106,108]. Показано, что фосфорилирование тирозинового остатка фермента является важным шагом в оксидант-опосредованной активации ФлД.

Оксиданты в качестве вторичных мессенджеров активируют некоторые факторы транскрипции (AP-1, NF- $\kappa$ B) [83]. Активация факторов транскрипции связана с процессами фосфорилирования, катализируемого оксидант-активированными киназами [109]. В настоящее время известно, что оксиданты могут непосредственно модулировать редокс-статус цистеиновых остатков факторов транскрипции, что играет большую роль в процессе их связывания с ДНК [110-113].

Известно, что AP-1 контролирует экспрессию клеточных медиаторов роста, включающих гетеродимер *fos* и *jun* белков, которые являются белковыми продуктами протоонкогенов *c-fos* и *c-jun* [114]. Оксиданты участвуют в регуляции активности AP-1. Имеется ряд экспериментальных данных, подтверждающих участие  $\text{H}_2\text{O}_2$  [47],  $\text{O}_2^-$  [115,116] в процессах индукции гена *c-fos*. В клетках



гладкой мускулатуры сосудов  $H_2O_2$  (200 мкмоль) индуцировала гены *c-fos* [117] и *c-jun* [118] и в этот процесс вовлекались ФлА<sub>2</sub>, арахидоновая кислота, липооксигеназа, РКС. Использование ингибиторов перечисленных ферментов приводит к торможению  $H_2O_2$ -индуцированной экспрессии генов. Ингибирование РКС только частично блокировало экспрессию *c-fos/c-jun*, вызванную  $H_2O_2$  и арахидоновой кислотой. Авторы считают, что в этот процесс вовлекаются РКС-зависимый и РКС-независимый механизмы. В эндотелиальных клетках  $H_2O_2$  – индуцирование AP-1 связано с фосфорилированием тирозина и треонина [119]. Стимуляция протоонкогенов оксидантами может отражать их влияние в качестве вторичных посредников на клеточную пролиферацию. Действительно, Гамалей и сотр. [6,16] показали, что оксиданты стимулируют клеточную пролиферацию.

Оксиданты участвуют и в активации целого семейства фактора транскрипции NF-κB. Неактивная форма NF-κB существует в виде тримера, состоящего из p65, p50 и IκBα субъединиц [120,121]. В ответ на сигнал со стороны различных цитокинов IκBα субъединица отделяется и активный NF-κB (p65/p50 димер) мигрирует в ядро для связывания с ДНК [122].

Показано, что  $H_2O_2$  и гидроперекиси липидов активируют NF-κB. Участок связывания NF-κB был обнаружен в генах, кодирующих различные хемокины и молекулы клеточной адгезии, включая эндотелиальную лейкоцитарную адгезивную молекулу 1 человека [123], моноцитарный хемотактический белок 1 (MCP-1) [124].

Последнее позволяет предположить, что оксиданты таким путём регулируют лейкоцитарную миграцию и адгезию. Считают, что через NF-κB или *c-fos/jun* оксиданты могут участвовать в регуляции процессов апоптоза, индуцируя экспрессию апоптотических генов смерти [35,110,118,125]. ФНО-α, интерлейкин-6 и -2 активируют при участии оксидантов фосфорилирование MAP-киназ, которые, в свою очередь, усиливают активность NF-κB, регулируя как деградацию I-κB, так и транскрипцию активного NF-κB в ядре. Таким образом, ядерный фактор NF-κB играет важную роль в регуляции иммунных и воспалительных генов, в регуляции апоптоза и клеточной пролиферации [83].

В последнее время появились доказательства об активации внутриклеточной сигнализации окисленными липопротеинами низкой плотности (о-ЛПНП) [126]. о-ЛПНП могут действовать как лиганды, запускающие каскад внутриклеточных сигналов через цАМФ или инозитолтрифосфатный путь.

о-ЛПНП увеличивают концентрацию цитозольного  $Ca^{2+}$  в культивируемых эндотелиальных клетках гладких мышц сосудов [127, 128], являются активаторами фосфолипаз С и Д [129], индуцируют фосфорилирование остатков тирозина и активацию рецептора эпителиального фактора роста [130], активируют MAP-киназу в макрофагах и клетках гладкой мускулатуры сосудов [131,132], стимулируют AP-1 ДНК-связывающую способность в фибробластах гладкой мускулатуры сосудов, эндотелиальных клетках [133]. о-ЛПНП проявляют ряд биохимических эффектов, что обеспечивает их вовлечение в процессы атерогенеза, липидного метаболизма, экспрессии генов адгезивных молекул, белков теплового шока, цитокинов, факторов роста, клеточную миграцию, сокращение, локальный иммунный ответ и вазомоторный тонус.

Итак, действие вторичных мессенджеров идет по общепринятой схеме. Первичные посредники образуют лиганд-рецепторные комплексы. Это приводит к образованию оксидантов, которые выступают в качестве вторичных

посредников, осуществляя передачу сигнальной информации за счет влияния на ключевые метаболические звенья: фосфорилирование белков, ферментативный гидролиз Фл, метаболизм кальция, регуляцию факторов транскрипции. Если анализировать цепочку передачи сигнала с участием мессенджеров, то самым неизученным и до конца непонятным является стимуляция образования оксидантов под влиянием первичных посредников.

Многие исследователи считают, что образование АФК связано с НАДФН-оксидазой. В 90-х годах было обнаружено, что во многих тканях присутствует НАДФН-оксидаза, не совсем идентичная классической НАДФН-оксидазе макрофагов [134,135].

Известно, что перенос электронов в фагоцитарной НАДФН-оксидазе связан с 2-мя субъединицами: p22phox и gp91phox, которые содержат гемсвязывающую, пиридиннуклеотидсвязывающую и флавинсвязывающую поверхности [136, 137]. В настоящее время во многих клетках выявлен НАДФН-оксидазоподобный комплекс, не связанный с фагоцитозом. Так, НАДФН-оксидаза присутствует в фибробластах человека [138], мезангиальных клетках почек [139], в гладкомышечных [140], жировых [141] и тиреоидных клетках [142], остеокластах [143], тромбоцитах [144]. Особенностью нефагоцитарного НАДФН-оксидазного комплекса является отсутствие большой субъединицы gp91phox. Фактически pх-1 идентична gp91phox и p22phox. [145].

Показано, что генерация  $O^{\cdot -}$  за счет ксантин/ксантинооксидазы, нитритоксидазы, липооксигеназы, циклооксигеназы, системы тканевого дыхания не может обеспечить сигнальную передачу в клетках гладких мышц сосудов [135, 146]. Параллельно было выявлено, что ангиотензин II, тромбоцитарный фактор роста и ФНО- $\alpha$  стимулируют генерацию  $O^{\cdot -}$  в культивируемых клетках гладкой мускулатуры сосудов только за счет активации НАДФН-оксидазы. Именно НАДФН-оксидаза как эндогенный источник АФК играет важную роль в клеточном сигнальном механизме, приводящим к росту клеток гладкой мускулатуры сосудов.

Возможно, физиологическая роль НАДФН-оксидазы связана с действием первичных посредников. В настоящее время этот вопрос является предметом обширной дискуссии и существует много противоречий. Многие исследователи считают, что НАДФН-оксидаза является основным источником АФК при проведении сигнала и генерируемые в физиологических концентрациях оксиданты активируют многие клеточные функции (рост, пролиферацию, секрецию, локомоцию, фагоцитоз, синтез белков) [134, 135].

Однако очень трудно в условиях целостного организма определить ту грань, когда АФК начинают проявлять свое патологическое действие и НАДФН-оксидаза будет вовлечена в патологический процесс. Так, высокая активность НАДФН-оксидазы является одним из факторов риска развития коронарных заболеваний у человека [146]. Гипертония, атеросклероз, диабет сопровождаются увеличением генерации АФК. Не исключено, что в этот процесс включается НАДФН-оксидаза, активируемая, в частности, ангиотензином [147, 148].

Таким образом, анализ роли АФК в процессах внутриклеточной сигнализации далек от разрешения. Полученные данные противоречивы и неоднозначны. Только комплексный подход с учетом специфики и особенности функционирования конкретных клеток, исследования на уровне генома позволят с новых позиций оценить роль АФК в механизмах регуляции функции клеток.



## ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС КАК РЕАКЦИЯ АДАПТАЦИИ ОРГАНИЗМА К ЭКСТРЕМАЛЬНЫМ УСЛОВИЯМ.

Соотношение АОС и ПОС в тканях может меняться в зависимости от состояния организма, влияния различных факторов внешней среды. В здоровом организме поддерживается сбалансированное соотношение между ПОС и АОС и самих компонентов АОЗ. В тканях происходит постоянная генерация АФК, которые, являясь сигнальными молекулами, обеспечивают сохранение нормального метаболического фона, необходимого для функциональной активности клеток. Любая стрессорная реакция организма сопровождается кратковременным подъемом АФК и развитием ОС. Стрессорная реакция организма в норме может сопровождаться кратковременным подъемом АФК. Это обусловлено реакцией адаптации организма к экстремальным условиям, в которых АФК выполняют роль вторичных мессенджеров, участвуя в передаче сигнальной трансдукции, в экспрессии ряда генов [149, 150]. В этих условиях очень важна своевременная мобилизация АОЗ, которая участвует в снижении уровня реакционноспособных соединений, препятствуя тем самым проявлению их токсического действия в тканях. АФК участвуют в передаче сигналов от первичных мессенджеров, направленных на запуск каскада реакций, необходимых для приспособления и выживания организма в экстремальных условиях. Генерируемые АФК, с одной стороны, влияют на процессы мобилизации компонентов АОЗ, с другой – на синтез соединений, стимулирующих генерацию оксидантов. Таким образом, это способствует поддержанию сбалансированного соотношения между АОС и ПОС на более высоком уровне и обеспечивает функциональную активность тканей.

На схеме 1 представлены возможные пути изменения АОС и ПОС в условиях стресса. В момент перестройки организма к изменившимся условиям окружающей среды происходит повышение образования АФК, которые выполняют роль сигнальных молекул в адаптивных реакциях организма. При состояниях ОС наблюдается увеличение уровня цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$ , что сопровождается активацией протеолитических ферментов, фосфолипаз. Это приводит к быстрому устранению поврежденных биомолекул и усилению их обновления за счет синтеза. Освобождение арахидоновой кислоты сопряжено с дополнительной генерацией сигнальных молекул, которые могут являться активаторами протеинкиназ, GTP-связывающих белков и т.п.

Возможно, в норме при стрессорных ситуациях, сопряженных с кратковременным подъемом АФК, наблюдается небольшое повышение ПОЛ, которое обеспечивает изменение проницаемости клеточных мембран, функции ионных каналов и насосов, рецепторов за счет влияния на конформацию белковых молекул.

Известно, что одной из функций липидов мембран является обеспечение оптимальной конформации белков через межмолекулярное взаимодействие для проявления их функциональной активности: каталитической, транспортной, рецепторной, иммунологической. Липидный слой мембраны влияет на ориентацию белков и через фазовые переходы выполняет своего рода регуляторную функцию относительно белков. Именно липиды в зависимости от их фазового состояния определяют вращательную и диффузную свободу интегральных белков, их способность к конформационным изменениям при разных условиях, контролируют взаимоотношение между субъединицами внутри олигомерных комплексов белков [151, 152]. Липиды, участвуя в организации

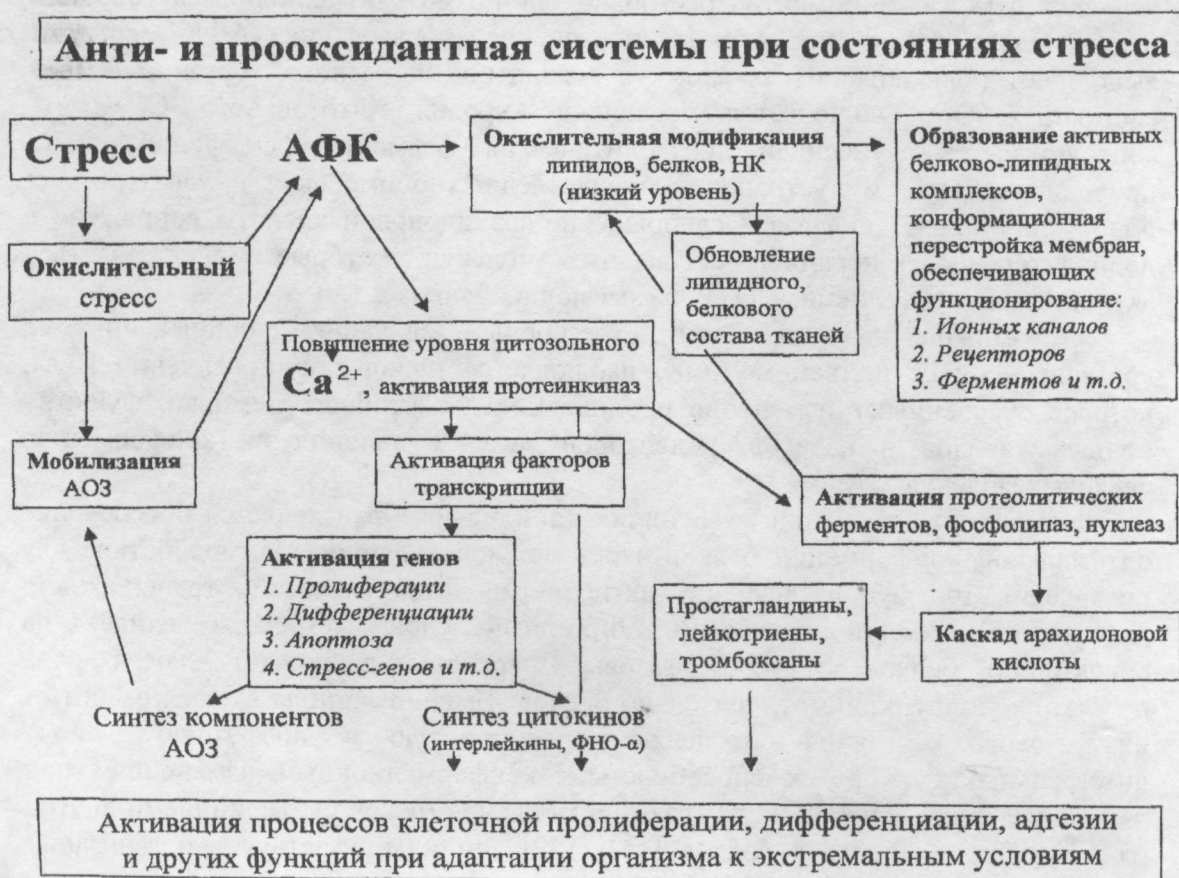
мембранного бислоя, играют важную роль в поддержании нативной конформации мембранных ферментов, контролируют взаимоотношения между субъединицами внутри олигомерных комплексов белков.

Наиболее быстрой причиной, приводящей к изменению фазового состояния липидов *in vivo*, является их пероксидация. Известно, что ПОЛ увеличивает содержание воды в бислое, что обеспечивает переход липидов в жидко-кристаллическое состояние. А это, в свою очередь, приводит к изменению конформации белков и, соответственно, к изменению проницаемости клеточных мембран, функции ионных каналов и насосов, рецепторов.

Мы предполагаем, что ПОЛ в физиологических условиях играет роль одного из инициирующих факторов в передаче сигнала, что сопровождается фазовыми переходами бислоя мембран и изменением конформации белков, обеспечивающих физиологический ответ на изменившуюся ситуацию в организме.

Если оценивать ПОЛ с позиций их роли в качестве вторичных мессенджеров, то в клетке должны существовать соответствующие механизмы, обеспечивающие регуляцию содержания продуктов пероксидации липидов: быстрый подъем при прохождении сигнала и быстрое снижение при отсутствии возбуждения. Быстрое повышение ПОЛ связано с интенсивной генерацией АФК в ответ на поступление сигнала. Возможно, одну из ключевых позиций в этом процессе играет НАДФН-оксидаза тканей. Поступление сигнала из внешней и внутренней среды организма сопряжено с активацией НАДФН-оксидазы и быстрой генерацией на поверхности клеток АФК, которые могут вызвать инициацию ПОЛ.

Схема 1





На начальных стадиях идет образование комплекса окисленных липидов и белков, обладающих АОА. Продукты ПОЛ (МДА, 4-гидрокси-2-алкенали, 4,5-эпокси-2-алкенали) при взаимодействии с белками образуют Шиффовы основания или дигидропиридины [153]. Связывание образующихся высокотоксических альдегидов ПОЛ за счет образования их комплексов с белками защищает последние от токсического окислительного повреждения, усиливает мощность АОС. Образование такого АО комплекса сопровождается конформационными перестройками белков и изменением состояния липидного слоя, что связано с его интенсивным обновлением. В этих комплексах белки слегка модифицированы, но они сохраняют свою функциональную активность. Это создает оптимальные условия для функционирования белков-ферментов, ионных каналов, насосов, рецепторов, обеспечивает перемещение белковых молекул и, в частности, рецепторов по мембране [151, 154]. Детоксикация гидропероксидов фосфолипидов осуществляется при участии 3-х ферментов: глутатионпероксидазы, фосфолипид-гидропероксид-глутатионпероксидазы и селен-независимой глутатион-S-трансферазы [2]. Таким образом, мы предполагаем, что ПОЛ может выступать в качестве вторичного мессенджера, участвуя в трансформации сигналов из внешней и внутренней среды организма, обеспечивая их внутри- и внеклеточную передачу.

#### **ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС ПРИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ.**

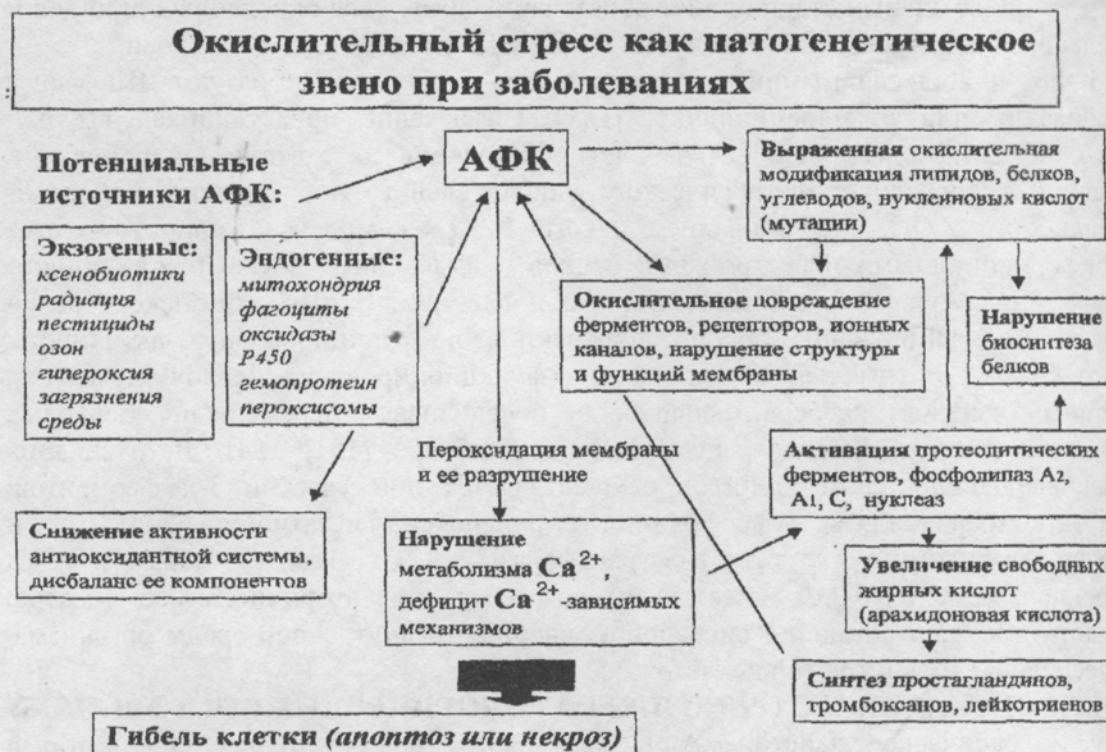
Токсическое действие АФК проявляется при состояниях ОС, который сопровождается резкой интенсификацией свободнорадикальных процессов в тканях.

Усиление свободнорадикальных процессов и развитие состояния ОС являются одним из патогенетических звеньев неврологических и психических поражений ЦНС, воспалительных процессов любого генеза, радиационных поражений, онкозаболеваний, сердечно-сосудистой и бронхо-легочной патологий, химических интоксикаций и т.д. Процессы старения организма также протекают на фоне окислительного стресса и, соответственно, свободно-радикальные процессы вовлекаются в патофизиологию всех сопутствующих заболеваний мозга, в частности, нейродегенеративных заболеваний.

Механизм генерации АФК при всех этих заболеваниях носит общий характер (схема 2). Некоторые отличительные особенности можно выявить только на начальных стадиях. Так, при воспалительных процессах пусковым фактором интенсификации свободнорадикальных процессов является дыхательный взрыв, при гипоксии - нарушение в первую очередь системы тканевого дыхания, при химических поражениях - активация системы митохондриального окисления. Таким образом, причины, вызывающие интенсификацию свободнорадикальных процессов, могут быть разными, но изменения на молекулярном уровне носят однотипный характер и процессы генерации АФК тесно переплетены между собой. Общим для всех заболеваний является усиление свободнорадикальных процессов и снижение буферной емкости АОЗ, нарушение мобилизации ее в ответ на повышение активности ПОС.

Снижение активности ферментов -антиоксидантов может быть связано с мутацией и окислительной деструкцией соответствующих форм ДНК. Показано, что АФК ингибируют активность ферментов-антиоксидантов. Так,  $H_2O_2$  тормозит активность СОД, а  $O^{\cdot -}$  - активность каталазы. Снижение активности ферментов может быть обусловлено и структурными изменениями, в частности, гликированием СОД [155].

Схема 2



Наблюдается истощение компонентов неферментативной АОЗ, которые при нейтрализации радикальных продуктов переходят в неактивное состояние или образуют радикальные продукты разной степени токсичности. Процесс восстановления антирадикальной способности этих соединений снижен.

Следует отметить, что некоторые антиоксиданты в условиях ОС могут выступать в качестве прооксидантов. При состояниях ОС возрастает восстановительный потенциал клеток за счет субстратов, коферментов в восстановленном состоянии, что приводит к снижению рН в очагах ишемии до 5,0. Это создает условия для повышения пула "активных форм" металлов переменной валентности. В условиях повышенной генерации АФК они могут участвовать в реакциях, связанных с генерацией радикальных продуктов. Так, в присутствии Fe/Cu и  $O_2$  тиолы (RSH) являются источниками радикалов  $RS\cdot$ ,  $O_2\cdot^-$ ,  $H_2O_2$  и  $OH\cdot$ , НАД(Ф)Н – радикала НАД(Ф) $\cdot$ ,  $O_2\cdot^-$ ,  $OH\cdot$ , аскорбиновая кислота – семидегидроаскорбат радикала,  $OH\cdot$ ,  $H_2O_2$  [156]. Повышение уровня АФК сопряжено с интенсификацией процессов окислительной деструкции липидов, белков, нуклеиновых кислот, углеводов. Именно интенсификация этих процессов является основной причиной поражения тканей. Так, окислительная деструкция белков приводит к инактивации ряда ферментов, нарушению структуры и функции клеточной мембраны, ее рецепторного аппарата, ионных каналов. Показано снижение активности  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТФазы, аденилатциклазы,  $Ca^{2+}$ -АТФазы клеточных мембран при свободнорадикальной патологии, что приводит к деполяризации мембран и нарушению водноэлектролитного обмена [151]. С окислительной деструкцией белков связывают деградацию миелина, демиелинизацию, разрушение миелиновых белков [35, 157].



При состояниях ОС окислительное нарушение структуры ДНК приводит к появлению мутантных форм белков. Считают, что мутантные формы протеолипидов миелина играют важную роль в развитии демиелинизации мозговой ткани [158].

Пероксидация ненасыщенных жирных кислот сопровождается образованием высокотоксичных промежуточных соединений, оказывающих разрушающее действие на окружающие ткани. В результате ПОЛ образуется группа токсических альдегидов типа 4-гидрокси-2-алкенали, 4,5-эпокси-2-алкенали, которые ингибируют синтез белков, активность многих ферментов, способствуют повышению свертываемости крови, вызывают окислительную деструкцию белков. ПОЛ изменяет также текучесть и проницаемость клеточных мембран [159].

Нарушение структурной организации мембран приводит к повышению уровня цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  и неконтролируемому запуску каскада  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых реакций. В первую очередь - это активация протеолитических ферментов, липаз, эндонуклеаз. В условиях гипоксии наблюдается солиubilизация и активация лизосомальных ферментов, что приводит к интенсивному перевариванию собственных тканей. Активация фосфолипазы  $\text{A}_2$  сопровождается отщеплением арахидоновой кислоты и включением ферментов каскада арахидоновой кислоты. По ходу этих реакций образуются не только биологически активные соединения, но и АФК. Активация цикло- и липооксигеназного путей в различных тканях сопровождается накоплением лейкотриенов, тромбоксанов, простагландинов, которые могут способствовать спазму сосудов, особенно мозговых, с последующим кровоизлиянием.

Высокая концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  приводит к разобщению окислительного фосфорилирования, что сопровождается увеличением коферментов и субстратов в восстановленной форме и создает условия для дополнительной генерации АФК.

Таким образом, при состояниях ОС наблюдаются глубокие изменения в метаболизме белков, жиров, НК, углеводов, водно-электролитном обмене, которые могут являться причиной тяжелых поражений тканей при ряде патологических состояний, таких как атеросклероз, сердечно-сосудистая патология, деструктивные изменения мозга, воспалительные процессы, онкозаболевания и многие другие.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Girotti A.W.* (1998). *J. Lipid. Research*, **39**, 1529-1542.
2. *Gotz M. E., Kuning G., Riederer P., Youdim M.B.H* (1994) *Pharmacol. Ther.* **63**, 37-122.
3. *Sinet P.M., Ceballos- Picot I.* (1992) In: *Free Radicals in the Brain . Aging, Neurological and Mental Disorders*, Springer-Verlag, Berlin., N.Y., London, pp.91-98.
4. *Brown L.A.S., Jones D.P.* (1996) In: *Handbook of Antioxidants*, N.Y.-Basel-Hong Kong, p.p.117-154.
5. *Halliwel B.* (1992). In: *Free Radical in the Brain. Aging, Neurological and Mental Disorders*, Springer-Verlag, Berlin., N.Y., London, pp.21-40.
6. *Гамалей И.А., Клубин И.В.* (1996) *Цитология*, **38**, 1233-1247.

7. Sorescu D., Somers M.J., Lassegue B., Grant S., Harrison, D.G., Griendling K.K. (2001). *Free Radic. Biol. Med.*, **30**, 1603-1612.
8. Brar S.S., Kennedy T.P., Whorton A.R., Murphy T.M., Chitan, P., Hoidal J.R. (1999). *J. Biol. Chem.*, **274**, 20017-20026.
9. De Keulenaer G.W., Alexander R.W., Ushio-Fukai M., Ishizaka N., Griendling K.K. (1998). *J. Biochem*, **329**, 653-657.
10. Suh Y., Arnold R.S., Lassegue B., Shi J., Xu X., Sorescu D., Chung A.B., Griendling K.K., Lambeth J.D. (1999). *Nature*, **401**, 79-82.
11. Sundarescen M., Zu-Xi Y., Ferrans V.J., Irani K., Finkel T. (1995). *Science*, **270**, 296-299.
12. Brown M.R., Miller F.J. Jr., Li W.G., Ellingson A.N., Mozena J.D., Chatterjee P., Engelhardt J.F., Zwacka R.M., Oberley L.W., Fang X., Spector A.A., Weintraub N.L. (1999). *Circ. Res.*, **85**, 524-533.
13. Lee A.C., Fenster B.E., Iton H., Takeda K., Bal N.S., Hirai T., Yu Z.X., Ferrans V.J., Howard B.H., Finkel T. (1999). *J. Biol. Chem.*, **274**, 7936-7940.
14. Moldovan L., Moldovan N.J., Sohn R.H., Parikh S.A., Goldsehmiedt-Clermont P.J. (2000). *Circ. Res.*, **86**, 549-557.
15. Suzuki Y.I., Forman H.J., Sevanian A. (1997). *Free Radic. Biol. Med.*, **22**, 269-285.
16. Gamaley I.A., Klyubin I.V. (1999). *Int. Rev. Cytol.*, **188**, 203-255.
17. Safa O., Hensley K., Smirnov M.D., Esmon C.T. (2001). *J. Biol. Chem.*, **276**, N3, 1829-1836.
18. Rutault K., Alderman C., Chan B.M., Katz D.R. (1999). *Free Radic. Biol. Med.*, **26**, 232-238.
19. Kim B.-Y., Han M.-J., Chung A.-S. (2001). *Free Radic. Biol. Med.*, **30**, 686-698.
20. Burdon R.H., Rice Evans C. (1989). *Free Radic. Res. Commun.*, **6**, 345-352.
21. Murrell G.A., Francis M.J., Bromley L. (1990). *Biochem. J.*, **265**, 659-665.
22. Pluthero F.G., Axelrod A.A. (1991). *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **628**, 222-232.
23. Burdon R.H., Gill V., Rice-Evans C. (1989). *Free Radic. Res. Commun.*, **7**, 149-159.
24. Sundaesan M., Yu Z.X., Ferrans V.J., Irani K., Finkee T. (1995). *Science*, **270**, 296-299.
25. Bae Y.S., Kang S.W., Seo M.S., Baines J.C., Tekle E., Choen P.B., Rhee S.G. (1997). *J. Biol. Chem.*, **272**, 217-221.
26. Thannickal V.J., Fanburg B.L. (1995). *J. Biol. Chem.*, **270**, 30334-30338.
27. Meier B., Radeke H.H., Selle S., Younes M., Siese H., Resch K., Habermehl G.G. (1989). *Biochem. J.*, **263**, 539-545.
28. Lo Y.Y., Cruz T.F. (1995). *J. Biol. Chem.*, **270**, 11727-11730.
29. Meier B., Radeke H.H., Selle S., Younes M., Sies H., Resch K., Habermehl G.G. (1989). *Biochem. J.*, **263**, 539-545.
30. Kang S.W., Chae H.Z., Seo M.S., Kim K., Baines J.C. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 6297-6302.
31. Hensley K., Robinson K.A., Gabbita S.P., Salsman S., Floyd R.A. (2000). *Free Radic. Biol. Med.*, **28**, 1456-1462.
32. Hockenbery D.M., Oltvai Z.N., Yin X-M., Milliman C.J., Korsmeyer S.J. (1993). *Cell.*, **75**, 241-251.
33. Rothstein J.D., Bristol L.A., Hosler B., Brown R.H., Jr. Kuncl R.W. (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **91**, 4155-4159.
34. Troy C.M., Shelansky M.L. (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **91**, 6384-6387.



35. Schreck R., Albermann K., Baeuerle P.A. (1992). *Free Radic. Res. Commun.*, **17**, 221-237.
36. Schreck R., Meier B., Mannel D.N., Droge W., Baeuerle P.A. (1992). *J. Exp. Med.*, **175**, 1181-1194.
37. Matthews N., Neale M.L., Jackson S.K., Stark J.M. (1987). *Immunology*, **62**, 153-155.
38. Yamauchi N., Kuriyama H., Watanabe N., Neda H., Maeda M., Niitsu Y. (1989). *Cancer Res.*, **49**, 1671-1675.
39. Israel N., Cougerot-Pocidallo M.-A., Aillet F., Virelizier J.-L. (1992). *J. Immunol.*, **149**, 3386-3393.
40. Brennan P., O'Neill L.A.J. (1995). *Biochim. Biophys. Acta*, **1260**, 167-175.
41. Anderson M.T., Staal F.J.T., Gitler C., Herzenberg L.A., (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 11527-11531.
42. Garrett R.I., Boyce B.F., Oreffo R.O.C., Bonewald L., Poser J., Mundy G.R. (1990). *J. Clin. Invest.*, **85**, 632-639.
43. Suda N., Morita I., Kuroda T., Murota S. (1993). *Biochim. Biophys. Acta*, **1157**, 318-323.
44. Bax B.E., Alam A.S.M.T., Banerji B., Bax C.M.R., Bevis P.J.R., Stevens C.R., Moonga B.S., Blake D.R., Zaidi K. (1992). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **183**, 1153-1158.
45. Steinbeck M.J., Appel W.H.Jr., Verhoeven A.J., Karnovsky M.J. (1994). *J. Cell. Biol.*, **126**, 765-772.
46. Griendling K.K., Minieri C.A., Ollerenshaw J.D., Alexander R.W. (1994). *Circ. Res.*, **74**, 1141-1148.
47. Rao G.N., Berk B.C. (1992). *Circ. Res.* **70**, 593-599.
48. Sundaresan M., Yu Z.-X., Ferrans V.J., Irani K., Finkel T. (1995). *Science*, **270**, 296-299.
49. Ohba M., Shibamura V., Kuroki T., Nose K. (1994) *J. Cell Biol.* **126**, 1079-1088
50. Lee S.R., Kwon K.S., Kim S.R., Rhee S.G. (1998). *J. Biol. Chem.*, **273**, 15366-15372.
51. Denu J.M., Tanner K.G. (1998). *Biochemistry*, **37**, 5633-5642.
52. Boraso A., Williams A.J. (1994). *Am. J. Physiol.*, **267**, H1010-1016.
53. Stoyanovsky D.A., Salama G., Kagan V.E. (1994). *Arch. Biochem. Biophys.*, **308**, 214-221.
54. Xiong H., Buck E., Stuart J., Pessah I.N., Salama G., Abramson J.J. (1992). *Arch. Biochem. Biophys.*, **292**, 522-528.
55. Doan T.N., Gentry D.L., Taylor A.A., Elliott S.J. (1994). *Biochem. J.* **297**, 209-215.
56. Roveri A., Coassin M., Maiorino M., Zamburlini A., van Amsterdam F. Th. M., Ratti E., Ursini F. (1992). *Arch. Biochem. Biophys.* **297**, 265-270.
57. Grover A.K., Samson S.E. (1988). *Am. J. Physiol.*, **255**, C297-C303.
58. Grover A.K., Samson S.E. (1989). *Am. J. Physiol.*, **256**, C666-C673.
59. Suzuki Y.J., Ford G.D. (1991). *Am. J. Physiol.*, **261**, H568-H574.
60. Grover A.K., Samson S.E., Fomin V.P. (1992). *Am. J. Physiol.*, **263**, H537-H543.
61. Suzuki Y.J., Ford G.D. (1992). *Am. J. Physiol.*, **262**, H114-H116.
62. Dreher D., Jornot L., Junod A.F. (1995). *Circ. Res.*, **76**, 388-395.
63. Rooney T.A., Renard D.C., Sass E.J., Thomas A.P. (1991). *J. Biol. Chem.*, **266**, 12272-12282.

64. Renard D.C., Seitz M.B., Thomas A.P. (1992). *Biochem. J.*, **284**, 507-512.
65. Henschke P.N., Elliott S.J. (1995). *Biochem. J.*, **312**, 485-489.
66. Missiaen L., Taylor C.W., Berridge M.J. (1991). *Nature*, **352**, 241-244.
67. Sweetman L.L., Zhang N.Y., Peterson H., Gopalakrishna R., Sevanian A. (1995). *Arch. Biochem. Biophys.*, **323**, 97-107.
68. Maki A., Berezesky I.K., Fargnoli J., Holbrook N.J., Trump B.F. (1992). *FASEB J.*, **6**, 919-924.
69. Reeves J.P., Bailey C.A., Hale C.C. (1986). *J. Biol. Chem.*, **261**, 4948-4955.
70. Lotscher H.R., Winterhalter K.H., Carafoli E., Richter C. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **76**, 4340-4344.
71. Moore G.A., Jewell S.A., Bellomo G., Orrenius S. (1983). *FEBS Lett.*, **153**, 289-292.
72. Richter C., Frei B. (1988). *Free Radic. Biol. Med.*, **4**, 365-375.
73. Zick Y., Sagi-Eisenberg R. (1990). *Biochemistry*, **29**, 10240-10245.
74. Schieven G.L., Mittler R.S., Nadler S.G., Kirihara J.M., Bolen J.B., Kanner S.B., Ledbetter J.A. (1994). *J. Biol. Chem.*, **269**, 20718-20726.
75. Schieven G.L., Kirihara J.M., Burg D.L., Geahler R.L., Ledbetter J.A. (1993). *J. Biol. Chem.*, **268**, 16688-16692.
76. Yang D.C., Brown A.B., Chan T.M. (1989). *Arch. Biochem. Biophys.*, **274**, 659-662.
77. Staal F.J.T., Anderson M.T., Staal G.E.J., Herzenberg L.A., Gitler C., Herzenberg L.A. (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **91**, 3619-3622.
78. Garcia-Morales P., Minami Y., Luong E., Klausner R.D., Samelson L.E. (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **87**, 9255-9259.
79. Hadari Y.R., Geiger B., Nadiv O., Sabanay I., Roberts C.T. Jr., LeRoith D., Zick Y. (1993). *Mol. Cell. Endocrinol.*, **97**, 9-17.
80. Sullivan S.G., Chiu D. T.-Y., Errasfa M., Wang J.M., Qi J.-S., Stern A. (1994). *Free Radic. Biol. Med.*, **16**, 399-403.
81. Fischer E.H., Charbonneau H., Tonks N.K. (1991). *Science*, **253**, 401-406.
82. Vepa S., Scribner W.M., Natarajan V. (1997). *Free Radic. Biol. Med.*, **22**, 25-35.
83. Janssen-Heininger Y.M.W., Poynter M.E., Baeuerle P.A. (2000). *Free Radic. Biol. Med.*, **28**, 1317-1327.
84. Gopalakrishna R., Jaken S. (2000). *Free Radic. Biol. Med.*, **28**, 1349-1361.
85. Boscoboinik D., Szewczyk A., Hensey C., Azzi A. (1991). *J. Biol. Chem.*, **266**, 6188-6194.
86. Rincon V., Flavell R.A., Davis R.A. (2000). *Free Radic. Biol. Med.*, **28**, 1328-1337.
87. Gopalakrishna R., Anderson W.B. (1991). *Arch. Biochem. Biophys.*, **285**, 380-387.
88. Gopalakrishna R., Anderson W.B. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 6758-6762.
89. Larsson R., Cerutti P. (1989). *Cancer. Res.*, **49**, 5627-5632.
90. Gopalakrishna R., Chen Z.H., Gundimeda U. (1995). *Meth. Enzymol.*, **252**, 134-148.
91. Gopalakrishna R., Gundimeda U., Chen Z.H. (1997). *Arch. Biochem. Biophys.*, **348**, 25-36.
92. Schieven G.L., Kirihara J.M., Burg D.L., Geahlen R.L., Ledbetter J.A. (1993). *J. Biol. Chem.*, **268**, 16688-16692.



93. *Lui Y., Gorospe M., Yang C., Holbrook N.J.* (1995). *J. Biol. Chem.*, **270**, 8377-8380.
94. *Fialkow L.C., Chan K., Rotin D., Grinsten S., Downey G.P.* (1994). *J. Biol. Chem.*, **269**, 31234-31242.
95. *Guy G.R., Cairns J., Ng S., Tan Y.H.* (1993). *J. Biol. Chem.*, **268**, 2141-2148.
96. *Nemani R., Lee E.Y. C.* (1993). *Arch. Biochem. Biophys.*, **300**, 24-29.
97. *Sundaresan M., Yu Z., Ferrans V.J., Irani K., Finkel T.* (1995). *Science*, **270**, 296-299.
98. *Axelrod J.* (1990). *Biochem. Soc. Trans.*, **18**, 503-507.
99. *Shimidzu T., Wolfe L.S.* (1990). *J. Neurol.*, **55**, 1-15.
100. *Dana R., Malech H.L., Levy R.* (1994). *Biochem. J.*, **297**, 217-223.
101. *Douglas C.E., Chan A.C., Choy P.C.* (1986). *Biochim. Biophys. Acta*, **876**, 639-645.
102. *Rice K.L., Duane P.G., Archer S.L., Gilboe S.L., Niewoehner D.E.* (1992). *Am. J. Physiol.* **263**, L430-L438.
103. *Elliott S.J., Meszaros G., Schilling W.P.* (1992). *Free Radic. Biol. Med.*, **13**, 635-650.
104. *Nemenoff R.A., Winitz S., Qian N.-X., van Putten V., Johnson G.L., Heasley L.E.* (1993). *J. Biol. Chem.*, **268**, 1960-1964.
105. *Clark J.D., Lin L.-L., Kriz R.W., Ramesha C.S., Sultzman L.A., Lin A.Y., Milona N., Knopf J.L.* (1991). *Cell*, **65**, 1043-1051.
106. *Natarajan V., Taher M.M., Roehm B., Parinandi N.L., Schmid H.H., Kiss Z., Garcia J.G.* (1993). *J. Biol. Chem.*, **268**, 930-937.
107. *Natarajan V., Scribner W.M., Taher M.M.* (1993). *Free Radic. Biol. Med.*, **15**, 365-375.
108. *Kiss Z., Anderson W.H.* (1994). *Arch. Biochem. Biophys.*, **311**, 430-436.
109. *Karin M.* (1998). *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **851**, 139-146.
110. *Abate C., Patel L., Rauscher F.J.III., Curran T.* (1990). *Science*, **249**, 1157-1161.
111. *Anderson M.T., Staal F.J.T., Gitler C., Herzenberg L.A.*, (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **91**, 11527-11531.
112. *Toledano M.B., Leonard W.J.* (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **88**, 4328-4332.
113. *Flohe L., Brigelius-Flohe R., Salioui L., Traber M.G., Packer L.* (1997). *Free Radic. Biol. Med.*, **22**, 1115-1126.
114. *Rivera V.M., Greenberg M.E.* (1990). *New Biol.*, **2**, 751-758.
115. *Crawford D., Zbinden I., Amstad P., Cerutti P.* (1988). *Oncogene*, **3**, 27-32.
116. *Shibanuma M., Kuroki T., Nose K.* (1988). *Oncogene*, **3**, 17-22.
117. *Rao G.N., Lassegue B., Griendling K.K., Alexander R.W.* (1993). *Nucleic Acids Res.*, **21**, 1259-1263.
118. *Rao G.N., Lassegue B., Griendling K.K., Alexander R.W.* (1993). *Oncogene*, **8**, 2759-2764.
119. *Barchowsky A., Munro S.R., Morana S.J., Vincenti M.P., Treadwell M.* (1995). *Am. J. Physiol.*, **269**, L829-L836.
120. *Flohe L., Briigeliu-Flohe R., Saliou C., Traber M.G., Packer L.* (1997). *Free Radic. Biol. Med.*, **22**, 1115-1126.
121. *Ginn-Pease M.E., Whisler R.L.* (1998). *Free Radic. Biol. Med.*, **25**, 346-361.
122. *Baeuerle P.A.* (1991). *Biochim. Biophys. Acta*, **1072**, 63-80.

123. Collins T., Williams A., Johnson G.I., Kim J., Eddy R., Show T., Gimbrone M.A. Jr., Bevilacqua M.P. (1991). *J. Biol. Chem.*, **266**, 2466-2473.
124. Shvy Y.-J., Li Y.-J., Kolattukudy P.E. (1990). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **169**, 346-351.
125. Gardner A.M., Xu F.-H., Fady C., Jacoby F.J., Duffey D.C., Tu Y., Lichtenstein A. (1997). *Free Radic. Biol. Med.*, **22**, 73-83.
126. Leonarduzzi G., Arkan M.C., Basaga H., Chiarpotto E., Sevanian A., Poli G. (2000). *Free Radic. Biol. Med.*, **28**, 1370-1378.
127. Negre-Salvayre A., Fitoussi G., Reaud V., Pieraggi M.T., Thiers J.C., Salvayre R. (1992). *FEBS Lett.*, **299**, 60-65.
128. Wells K.E., Alexander J.J., Miguel R. (1996). *Surgery*, **120**, 337-344.
129. Natarajan V., Sribner W.M., Hart C.M., Parthasarathy S. (1995). *J. Lipid. Res.*, **36**, 2005-2016.
130. Suc I., Meilhac O., Lajoie-Mazenc I., Vavdaele J., Jurgens G., Salvayre R., Negre-Salvayre A. (1998). *FASEB J.*, **12**, 665-671.
131. Deigner H.P., Claus R. (1996). *FEBS Lett.*, **385**, 149-153.
132. Jing Q., Xin S.M., Cheng Z.J., Zhang R., Qin Y.W., Pei G. (1999). *Circ. Res.*, **84**, 831-839.
133. Maziere C., Djavaheri-Margny M., Frey-Fressart V., Delattre J., Maziere J.C. (1997). *FEBS Lett.* **409**, 351-356.
134. Клубин И.В., Гамалей И.А. (1999). *Цитология* **39**, 320-340.
135. Sorescu D., Somers V.J., Lassegue B., Grant S., Harrison D.G., Griendling K.K. (2001) *Free Radic. Biol. Med* **30**, 603-612/
136. Kleinberg M.E., Mital D., Rotrosen D., Malech H.L. (1992). *Biochemistry.*, **31**, 2686-2690.
137. Dinauer M.C., Pierce E.A., Erickson R.W., Muhleback T.J., Messner H., Ornin S.H., Seger R.A., Curnutte J.T. (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 11231-11235.
138. Meier B., Cross A.R., Nancock J.T., Kaup F.J., Jones O.T. (1991). *Biochem. J.*, **275**, 241-245.
139. Singhal P.C., Pamarthi M., Shah R., Chandra D., Gibbons N. (1994). *Inflammation*, **18**, 293-299.
140. Ushiofukai M., Zafari A.M., Fukui T., Ishizaka N., Griendling K.K. (1996). *J. Biol. Chem.*, **271**, 23317-23321.
141. Krieger-Brauer H.J., Kather H. (1995). *Biochem. J.*, **307**, 543-548.
142. Deme D., Doussiere J., De Sandro V., Dupuy C., Pommier J., Virion A. (1994). *Biochem. J.*, **301**, 75-81.
143. Steinbeck M.J., Appel W.H., Verhoeven A.J., Karnovsky M.J. (1994). *J. Cell. Biol.*, **126**, 765-772.
144. Leoncini G., Maresca M., Colao C. (1991). *Biochem. Int.*, **25**, 645-655.
145. Suh Y., Arnold R.S., Lassegue B., Shi J., Xu X., Sorescu D., Chung A.B., Griendling K.K., Lambeth J.D. (1999). *Nature*, **401**, 79-82.
146. Guzik T.J., West N.E., Black E., McDonald D., Ratnatunga C., Pillai R., Channon K.M. (2000). *Circ. Res.*, **86**, E85-E90.
147. Rajagopalan S., Kurz S., Munzel T., Tarpey M., Freeman B.A., Griendling K.K., Harrison D.G. (1996). *J. Clin. Invest.*, **97**, 1916-1923.
148. Griendling K.K., Sorecu D., Ushio-Fukai M. (2000). *Circ. Res.*, **86**, 494-501.
149. Саприн А.Н., Калинина Е.В. (1999). *Успехи биологич. химии.* **39**, 289-326.



150. Дубинина Е.Е. (1998). В сб. 'Фундаментальные и прикладные аспекты современной биохимии', Санкт-Петербург, **2**, 386-398.
151. Болдырев А.А. (1990). Введение в биомембранологию, Изд-во МГУ, Москва.
152. Туманова С.Ю. (1999). В кн. Биохимия мозга (под. ред. Ашмарина И.П., Стукалова П.В., Ещенко Н.Д.), С.-Петербургский университет, С.-Петербург, с.81-123.
153. Zamora R., Alaiz M., Hidalgo F.J. (1997). *Biochemistry*, **36**, 15765-15771.
154. Тимошенко А.В., Черенкевич С.Н. (1990) Успехи современной биологии, **109**, 206-218.
155. Katsura A., Shiro M., Shigeru F. (1987). *J. Biol. Chem.*, **262**, 16969-16972.
156. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (1990). *Methods in Enzymology*, **186**, 1-85.
157. Mickel H.S., Oliver C.N., Starke-Reed P.E. (1990). *Biochem. Biophys. Resear. Comm.*, **172**, 92-97.
158. Gow A., Friedrich V.L., Lazzarini R.A. (1994). *J. Neurosci. Res.*, **37**, 574-583.
159. Esterbauer H., Schaur R.J., Zollner H. (1991). *Free Radic. Biol. Med.*, **11**, 81-128.

Поступила 04.07.01.

# THE ROLE OF REACTIVE OXYGEN SPECIES AS SIGNAL MOLECULES IN TISSUE METABOLISM UNDER CONDITIONS OF OXIDATIVE STRESS

E.E. DUBININA

Psychoneurological Bekhterev Institute  
Russia, 193019, St. Petersburg, 3, Bekhterev Str.,  
Fax: (812) 567-71-27

This review deals with literature data on the functioning of the reactive oxygen species (ROS) as second messengers. ROS induce various biological processes such as stimulation of protein phosphorylation,  $Ca^{2+}$ -signaling, phospholipid hydrolysis and transcription factor activation.

Physiological significance of the role of biological oxidants in the regulation of signal transduction and the mechanisms of the adaptation of organism to extremal conditions are discussed. Oxidative stress is a common step for the development of many diseases characterized by the intensive ROS generation.

**Key words:** oxidative stress, reactive oxygen species, antioxidant defence, prooxidant system, second messengers.