

## СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ БЕЛКОВ И ЕГО СВЯЗЬ С ФУНКЦИОНАЛЬНЫМ СОСТОЯНИЕМ ОРГАНИЗМА

### Обзор

© 2007 г. В.И. Лушак

*Кафедра биохимии, Прикарпатский национальный университет  
им. В. Стефаника, 76025 Ивано-Франковск, ул. Шевченко, 57, Украина;  
факс: (38-034)223-1574, электронная почта: lushchak@pu.if.ua*

Поступила в редакцию 15.01.07  
После доработки 04.05.07

В живых организмах основная масса активных форм кислорода (АФК) образуется как вторичный продукт многих окислительных процессов. Имея высокую активность, АФК взаимодействуют практически со всеми клеточными компонентами, приводя к изменению свойств последних. В обзоре дается подробный анализ известных на данный момент химических превращений белков в результате их взаимодействия с АФК, в частности пути разрыва полипептидной цепи, а также окисления боковых частей аминокислотных остатков. Особое внимание уделено способам идентификации продуктов свободнорадикальной модификации белков с акцентом на образование дополнительных карбонильных групп, которые чаще всего и используются в качестве маркеров данных процессов. Функциональные последствия модификации белков АФК зависят как от природы АФК и самого белка, так и от конкретных условий взаимодействия. Особое место занимает анализ связи между окислением белков и функциональным состоянием организма, как-то: старение, гипероксия и гипоксия, повышение температуры, а также разного рода патологиям. Заключительная часть посвящена возможным путям защиты белков от окисления в живой клетке.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** свободные радикалы, окисление белков, окислительный стресс, старение, диабет, атеросклероз, нейродегенеративные болезни.

Хотя изучением свободнорадикальных реакций в живых системах занимаются давно, интерес к проблеме не только не падает, а наоборот — она привлекает все больше и больше исследователей. Это свидетельствует о важности проблемы с фундаментальной точки зрения, а также связано с особой ролью данных процессов в ряде патологических состояний. Лишь в редких случаях доказано, что активные формы кислорода (АФК), азота (АФА) и/или серы (АФС) являются первопричиной заболеваний, но повышение их уровня сопровождается целый ряд болезней, среди которых особенно много с данной точки зрения известно о сердечно-сосудистых и нейродегенеративных патологиях, сахарном диабете и т.д. Больше всего внимания уделено

АФК, но с конца 70-х — начала 80-х годов прошлого столетия, когда стала известна роль оксида азота ( $\cdot\text{NO}$ ) как соединения, регулирующего многие клеточные функции, количество исследований в этой области возрастает в геометрической прогрессии. Активные формы серы и углерода начали изучать относительно недавно — здесь мы находимся только в начале пути, но уже сейчас нет сомнения в их важности для функционирования клетки.

К АФК относят супероксид-анион ( $\text{O}_2^-$ ), пероксиды водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) и других соединений ( $\text{ROOH}$ ), гидроксильный радикал ( $\cdot\text{OH}$ ) и т.д. К АФА относят оксид азота ( $\cdot\text{NO}$ ) и ряд его производных, например, пероксинитрит ( $\text{OONO}^-$ ). К АФС относят тиольный радикал ( $\text{RS}\cdot$ ) и его производные. Для всех названных выше соединений характерна высокая реакционная способность. Разнообразны пути их генерации в живых системах, и они достаточно подробно описаны многими авторами [1–4]. Отечественной школе исследователей принадлежит выдающаяся роль в характеристике процессов свободнорадикаль-

Принятые сокращения: АФК — активные формы кислорода; АФА — активные формы азота; АФС — активные формы серы; ГАФД — глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа; ГНЕ — 4-гидрокси-2-ноненаль; ГС — глутаминсинтетаза; МДА — малоновый диальдегид; MetSox — метионинсульфоксид; ОКДГ — дегидрогеназы 2-оксикислот; ТБКАП — тиобарбитуратреактивные продукты.

ной модификации липидов. Достаточно хорошо исследованы повреждения ДНК, вызываемые активными формами кислорода и азота. Еще одному типу биополимеров, белкам, также подвергаемым атаке активными формами, начали уделять серьезное внимание только в последние 15–20 лет. Поскольку в отечественной литературе эта проблема недостаточно освещена, то мы попытаемся привлечь к ней внимание читателя. На первый взгляд может показаться, что свободнорадикальная модификация белков не столь важна для выживания клеток, как окисление липидов (может вызвать лизис клетки) или ДНК (может служить причиной мутаций). Но это не совсем так. Оказывается важно не только то, что свободнорадикальная модификация может привести к потере функции белка, но и то, что такого рода модификацию белков живые организмы используют для сигнализации, межклеточной коммуникации и получения информации из внешней среды.

В данном обзоре обобщаются современные знания об изменении первичной структуры белков вследствие их непосредственного взаимодействия с АФК, АФС, АФА, а также взаимодействии продуктов свободнорадикального окисления липидов с белками, и функциональным последствиям таких взаимодействий, как на уровне отдельных ферментов, так и на уровне клеток, тканей и целых организмов. Некоторое внимание будет уделено белкам, функциональная роль которых изменяется вследствие их окисления, так, например, цитозольная форма аконитазы превращается в белок, регулирующий обмен железа.

### ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ ПОЛИПЕПТИДНОЙ ЦЕПИ

При взаимодействии активных форм со сложными белками следует различать химическую модификацию полипептидной цепи и небелкового компонента. В свою очередь, изменение структуры белковой части может касаться как пептидной связи, так и боковых частей аминокислотных остатков. Модификация небелковой части лучше всего исследована для белков, имеющих в своем составе негемовое железо, входящее в состав Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub>-кластеров. При их окислении ионы железа диссоциируют от белка, что приводит к потере его ферментативной активности. Представителями данной группы белков являются, например, некоторые ферменты цикла Кребса: аконитаза, сукцинатдегидрогеназа, изоцитратдегидрогеназа, фумараза и малатдегидрогеназа [5–7]. Более подробно механизм

преобразований, а также их функциональные последствия проанализированы в одном из последующих разделов. А сейчас мы остановимся на процессе свободнорадикальной модификации полипептидной части, причем отдельно проанализируем результат взаимодействия свободных радикалов с пептидной связью и боковыми частями аминокислотных остатков [8, 9].

**Атака и разрыв пептидной связи.** На рис. 1 представлены предполагаемые пути окисления компонентов, принимающих участие в образовании пептидной связи [8–11]. Как видно, последовательность реакций начинается с извлечения гидроксил-радикалом водородного атома от  $\alpha$ -атома углерода любого из аминокислотных остатков, что приводит к образованию производного алкильного радикала и воды (а). В результате последующего присоединения молекулы кислорода к алкильному радикалу образуется алкилпероксильный радикал (б), реагирующий далее с протонированным супероксид-анионом (НО<sub>2</sub><sup>-</sup>) или с Fe<sup>2+</sup> и H<sup>+</sup> (в). Образованный алкилпероксид опять же может прореагировать либо с НО<sub>2</sub><sup>-</sup>, либо с Fe<sup>2+</sup> и H<sup>+</sup>, превращаясь в алкоксирадикал [2]. На этой стадии возможен либо разрыв пептидной связи, либо еще одно окисление за счет протонированного супероксида или Fe<sup>2+</sup> и H<sup>+</sup> до гидроксилпроизводного пептида (г). Следует заметить, что алкил-, пероксил- и алкоксильные радикалы пептидов также могут абстрагировать атомы водорода из аминокислотных остатков, генерируя таким образом новые радикалы, способные вступать в аналогичные превращения. В отсутствие O<sub>2</sub> или при его недостатке два алкильных производных полипептидов могут провзаимодействовать между собой с образованием внутри- и/или межпептидных сшивок.

На сегодняшний день описаны, по меньшей мере, четыре механизма разрыва пептидной связи, вызванного активными формами: (а) расщепление алкоксильных производных пептидов через  $\alpha$ -амидный путь, (б) расщепление алкоксильных производных пептидов через диамидный путь, (в) окисление боковых частей глутамильных и аспартильных остатков и, наконец, (г) окисление боковой части остатка пролина [8, 9]. На рис. 2 схематически представлены механизмы (а) и (б). По механизму (а) из N-конца исходного пептида образуется диамидное и азотноцианидное производные. Путь (б) приводит к образованию из бывшего N-конца диамида и  $\alpha$ -кетоацильного производного.

Если в составе полипептида есть остатки моноаминодикарбоновых кислот, то по ним также возможно опосредованное окислением специфическое расщепление пептидной связи. На

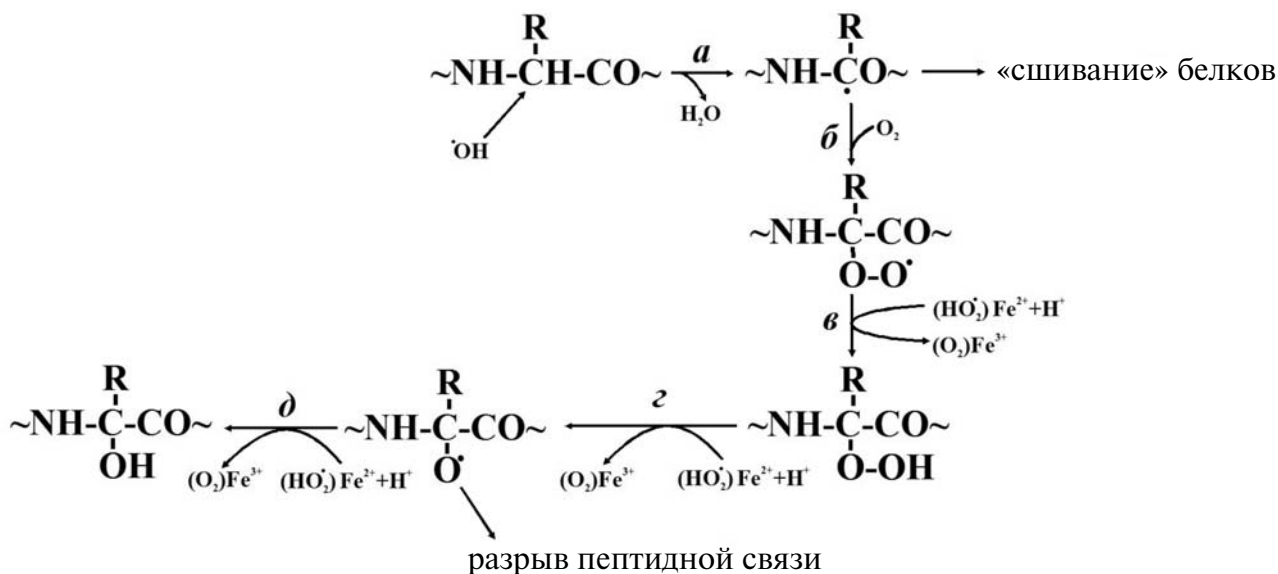


Рис. 1. Возможные пути окисления пептидной цепи (модифицировано с [8–11])

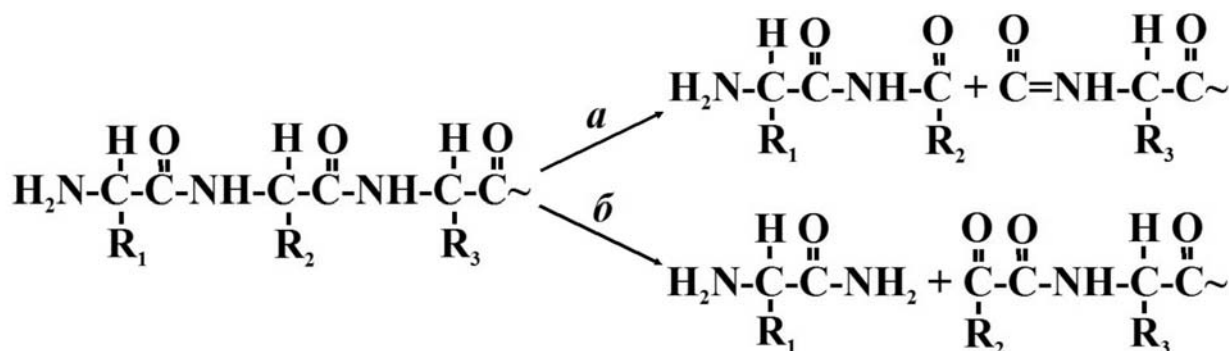


Рис. 2. Возможные пути окисления пептидной цепи, приводящие к ее разрыву (модифицировано с [8–11])

рис. 3 схематически приведен механизм расщепления пептидной связи через окисление глутамата (аналогично и аспартата) — путь (в). Расщепление пептидной связи по этому пути начинается с извлечения гидроксильным радикалом атома водорода от  $\gamma$ -атома углерода глутаминового остатка. Далее следует серия превращений, аналогичных приведенным на рис. 1. В конечном итоге это приводит к образованию щавелевой кислоты и расщеплению пептидной связи. При этом фрагмент, образованный из N-концевой части исходного полипептида, представлен амидом, а из С-концевой — пирувильной частью.

При изучении воздействия ионизирующей радиации на белки Г. Шусслер и К. Шиллинг установили, что количество образующихся пепти-

дов сопоставимо с числом остатков пролина (цит. по [10]). Позже было выявлено, что окисление пролиновых остатков приводит к образованию 2-пирролидиновых производных и расщеплению пептидной связи [11]. Предложенный механизм приведен на рис. 4. В результате кислотного гидролиза 2-пирролидон превращается в 4-аминобутиловую кислоту. Поэтому считается, что наличие 4-аминобутиловой кислоты в кислых гидролизатах белков является надежным доказательством расщепления пептидов по 2-пирролидиноному пути.

Хотелось бы здесь обратить внимание читателя на один очень важный аспект протекания свободнорадикальных реакций в биологических системах. Огромное значение в протекании свободнорадикального окисления белков имеют

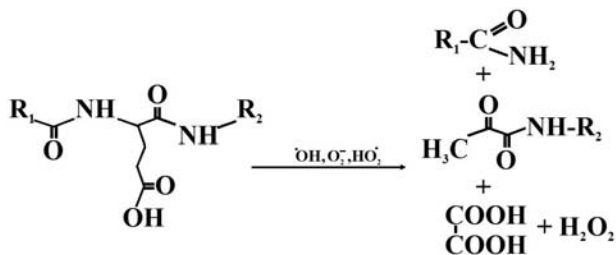


Рис. 3. Возможный механизм разрыва пептидной связи в месте локализации остатка глутаминовой кислоты. Аналогично полипептидная цепь может разрываться и в месте локализации остатка аспарата (модифицировано из [8–11])

ионы железа. Они могут выступать донорами электронов и, таким образом, инициировать данные процессы. Поскольку ионы железа относительно легко поддаются окислению/восстановлению и их содержание в клетке достаточно высокое, то именно они играют огромную роль в окислительном повреждении биологических структур, в частности белков. Правда, свободных ионов железа в клетке практически нет, поскольку здесь имеются специальные системы их связывания. В ряде патологических состояний ионы железа могут высвобождаться из клеточных депо, что приводит к интенсификации свободнорадикальных процессов с вытекающими отсюда последствиями.

**Окисление боковых частей аминокислотных остатков.** Практически все аминокислотные остатки в пептидах могут подвергаться окислению гидроксильными радикалами. Однако только в ряде случаев установлена природа образуемых продуктов. В таблице обобщены известные на сегодняшний день данные по окислительной

модификации аминокислотных остатков в составе белков. Для удобства анализа в таблице можно выделить следующие группы: ароматические аминокислоты, аминокислоты, при окислении которых образуются карбоксильные группы, и содержащие серу аминокислоты.

Остатки ароматических аминокислот особенно чувствительны к окислению АФК. Так, при этом фенилаланин может превращаться в моно- и дигидроксипроизводные, а тирозин — в 3,4-дигидроксипроизводное. Эти вещества вызывают особый интерес, поскольку соединению данного типа могут подвергаться обратному окислению/восстановлению и генерировать АФК. Образующиеся при окислении тирозина радикалы могут также взаимодействовать между собой с образованием дитирозинов, что может приводить к внутри- и межмолекулярным сшивкам пептидов. Поэтому наличие 2,2'-бифенильных производных считается надежным маркером индуцированных АФК повреждений белков [12]. Атака тирозиновых остатков активными формами азота и хлора является причиной образования соответственно нитро- и хлорпроизводных. Триптофан высокочувствителен к  $\gamma$ -радиации, и такое облучение приводит к образованию разных гидроксилпроизводных, формилкинуруенинов и 3-гидроксикинуруенинов. При УФ-облучении, в присутствии озона,  $\text{Fe}^{2+}$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$ , а также пероксинитрита, триптофан может превращаться в кинуруенин и N-формилкинуруенин. В то же время обнаружено, что тирозин и триптофан не являются основными мишенями для окисления в системах с физиологическими концентрациями ионов переходных металлов. Это связывают с тем, что остатки названных аминокислот обычно отсутствуют в участках связывания данных ионов. В противо-

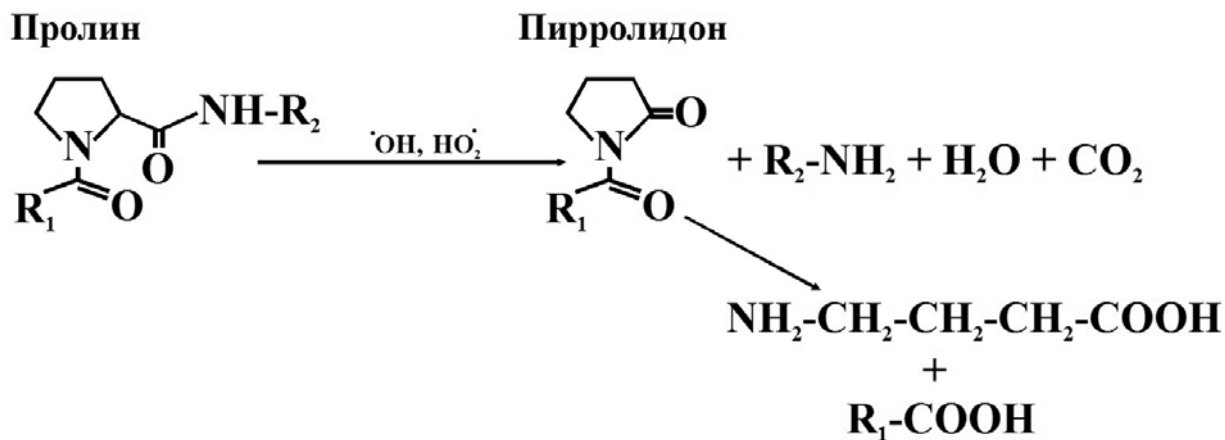


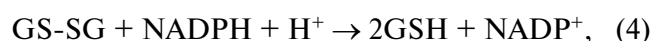
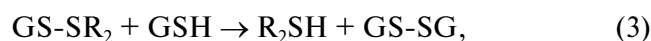
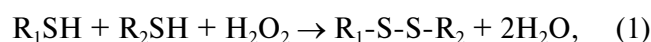
Рис. 4. Предполагаемый путь окислительного разрыва пептидной связи в месте локализации остатка пролина. В результате образуется стабильный продукт 4-аминобутиловая кислота (модифицировано из [8–11])

положность остаткам тирозина и триптофана, остатки гистидина, аргинина и лизина особенно чувствительны к АФК, генерированным в системах, в состав которых входят катионы с переменной валентностью. Остатки названных аминокислот часто находятся в местах связывания ионов переходных металлов, и именно они часто задействованы в образовании координационных связей с ними [8, 9].

Особый интерес представляет окисление аминокислотных остатков с последующим образованием карбонильных групп. Из таблицы видно, что названные группы образуются при окислении лизина, аргинина, гистидина, пролина, треонина, глутаминовой и аспарагиновой кислот. Окисление остатков первых четырех аминокислот прямо ведет к образованию альдегидных или кетонных производных, а двух последних – к разрыву полипептидной цепи с образованием пирувильной группы из N-концевой

аминокислоты (рис. 2). Окислительный разрыв полипептидной цепи по пути  $\alpha$ -амидирования также может приводить к образованию 2-кетонацильного производного из N-концевой аминокислоты. Вдобавок, карбонильные группы могут быть введены в белки в результате их взаимодействия с углеводами-восстановителями и/или продуктами окисления углеводов (реакции гликозилирования и гликооксидации) или продуктами окисления липидов (малоновый диальдегид, 2- и 3-ненасыщенные альдегиды, в частности 4-гидрокси-2-ноненаль). На образовании дополнительных карбонильных групп в результате окислительной модификации белков основан наиболее распространенный метод определения продуктов окисления белков с динитрофенилгидразином [13, 14]. Получаемые гидразоны определяются фотометрически и считаются надежным показателем свободнорадикальной модификации белков.

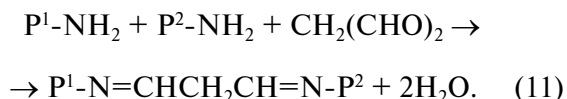
Остатки цистеина и метионина в белках особенно чувствительны к окислению всеми активными формами кислорода, азота, серы и хлора. В то же время, в отличие от окисления остатков остальных аминокислот, окисленные формы цистеина и метионина могут быть восстановлены. Данные процессы обеспечиваются специальными ферментными системами. Именно названная особенность – циклическое окисление-восстановление – составляет основу их функционирования в качестве регуляторов клеточных процессов или в качестве антиоксидантов. В ходе окисления цистеинового остатка, последовательно образуются производные сульфеновой, сульфиновой и сульфоновой кислот [10]. Сульфеновые производные могут либо окисляться дальше до сульфиновых, либо образовывать смешанные эфиры с цистеином или глутатионом. Сульфиновые производные могут также восстанавливаться до цистеина неферментативным (в эксперименте обработкой дитиотрептолом) или ферментативным путем под действием глутатионспецифической тиолтрансферазы – глутаредоксина. Полагают, что образование смешанных эфиров сульфеновой кислоты с глутатионом может препятствовать дальнейшему необратимому окислению серы [10]. Примеры некоторых реакций с участием остатка цистеина представлены на схемах 1–5 [10].



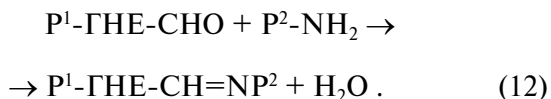
Идентифицированные продукты свободнорадикального окисления аминокислотных остатков белков [модифицировано из [10, 11]]

Остаток	Продукты
Фенилаланин	2,3-дигидрокси-фенилаланин 2-,3-, и 4-гидроксифенилаланин
Тирозин	3,4-дигидроксифенилаланин, дитирозин (2,2'-бифенил-производные), 3-нитротирозин, хлортирозин
Триптофан	кинуренин, 3-гидроксикинуренин, гидропирилиндол, оксииндол, N-формилкинуренин, 3-гидроксикинуренин
Гистидин	2-оксогистидин, 4-ОН-глутамат, аспарат, аспарагин
Лизин	2-аминоадипиновый полуальдегид
Аргинин	глутаминовый полуальдегид
Пролин	глутаминовый полуальдегид
Треонин	2-амино-3-кетобутиловая кислота
Глутаминовая кислота	пировиноградная кислота
Аспарагиновая кислота	пировиноградная кислота
Цистеин	нитрозотиилы, тиоловые радикалы, цистин, конъюгаты с глутатионом
Метионин	метионинсульфоксид, метионинсульфон

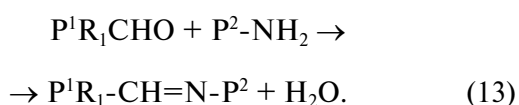




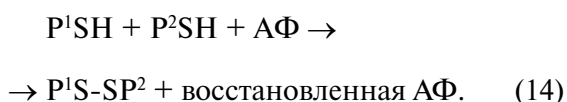
4. Реакция присоединения Михаэля (продукта взаимодействия 4-гидрокси-2-ноненаль (ГНЕ) с каким-либо белком) с аминогруппой остатка лизина другого белка:



5. Взаимодействие карбонильной группы продуктов гликирования одного белка с аминогруппой остатка лизина другого белка:



6. Окисление активными формами остатков цистеина двух молекул белка:



Последствия образования комплексов сшитых белков изучены недостаточно. Известно, например, что сшитые белки не деградируются мультикаталитическими протеазами и/или протеосомами, что может приводить к аккумуляции окисленных белков при старении и ряде патологий [8–11]. Более того, данные комплексы могут ингибировать деградацию других окисленных белков.

Следует обратить внимание на еще одно следствие свободнорадикального окисления белков. Методом гидрофобной хроматографии на фениловом матриксе было установлено, что окисление глутаминсинтетазы *E. coli* первоначально приводило к образованию более гидрофильной формы фермента, чем исходная; на этой стадии терялась ферментативная активность [19, 20]. Более гидрофильная форма фермента не расщеплялась очищенной протеазой из *E. coli*. Дальнейшее окисление фермента приводило к образованию более гидрофобной формы, которая гидролизировалась указанной выше протеазой, специфически деградирующей окисленную форму глутаминсинтетазы [19]. Используя приведенные результаты, можно предположить, что частичное окисление белков, приводящее к изменению их поверхностного заряда или гидрофобности, может быть одним из механизмов, ответственным за их пространственное распределение в клетке [21, 22].

## МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ ПРОДУКТАМИ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ

Взаимодействие липидов с АФК дает широкий спектр продуктов окисления, среди которых хорошо известные малоновый диальдегид (МДА) и 4-гидрокси-2-ноненаль (ГНЕ). Если первому из них уделено достаточно внимания, то роль второго была исследована только в последнее десятилетие. Действие МДА обусловлено наличием в его структуре двух альдегидных групп, что позволяет ему взаимодействовать с аминогруппами белков и сшивать их за счет бифункциональности – образовывать шиффовы основания. ГНЕ – представитель группы  $\alpha,\beta$ -ненасыщенных альдегидов. Считается, что цитотоксическое действие ГНЕ реализуется вследствие следующих процессов: инактивации ферментов, лизиса эритроцитов, хемотоксической активности нейтрофилов и ингибирования биосинтеза белка и ДНК [23, 24].

Взаимодействие ГНЕ со свободными аминокислотами и их остатками в составе белков получило название присоединения Михаэля (реакция 12). В зависимости от того, с какой аминокислотой взаимодействует ГНЕ, получаются соответствующие продукты. Предполагается, что в ходе реакции ГНЕ с гистидином образуется циклический продукт, который достаточно стабилен и выявляется в составе белков биологических систем, подвергнутых окислительному стрессу [25] (рис. 5). В результате взаимодействия ГНЕ с лизином и цистеином также образуются циклические аддукты, которые могут далее превращаться до карбонильных групп. В результате протекания вторичных взаимодействий продуктов присоединения Михаэля с аминогруппами остатков лизина в белках возможно образование внутри- и межсубъединичных поперечных сшивок [26].

Для идентификации продуктов взаимодействия ГНЕ с белками были разработаны высокочувствительные химические [23, 25, 26] и иммунохимические методы [25–28]. Поликлональные антитела получали к модифицированному ГНЕ гемоцианину путем иммунизации кроликов [25, 28]. Оказалось, что эпитопом, распознаваемым антителами, выступает 2- $CH_3(CH_2)_4$ -5-гидрокситетрагидрофуран [28]. В атеросклеротических бляшках аорты человека эти антитела взаимодействовали с гранулярными цитоплазматическими элементами «пенящихся» клеток и слабо взаимодействовали с окружающей склеротической стромой [28]. Поликлональные антитела также позволили выявить специфичес-

кие модифицированные белки в гепатоцитах, обработанных ГНЕ, или подвергнутых действию окислительного стресса, индуцированного трет-бутилгидропероксидом, смесями ионов железа и аскорбата или ионов железа и 15-гидропероксиэкозотетраеновой кислоты [25]. Инкубация ферментов с ГНЕ инактивирует их. Так, обработка ГНЕ глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД) из *Leuconostoc mesenteroides* приводила к потере ферментативной активности, причем скорость этого процесса зависела как от концентрации реагента, так и от времени действия [29]. Параллельно с уменьшением активности происходило увеличение содержания карбонильных групп. Обработка фермента 2 мМ ГНЕ при 36° в течение 12 ч приводила к модификации 74% цистеиновых остатков, 16% – лизиновых и 50% – гистидиновых. Субстрат фермента, глицеральдегид-3-фосфат, не влиял на изменение количества остатков цистеина и гистидина, но защищал от модификации один гистидиновый остаток на мономер. Кофермент NAD<sup>+</sup> не влиял на модификацию лизиновых остатков, но защищал один остаток цистеина и два остатка гистидина [26].

Возможное участие ГНЕ в инактивации митохондриального фермента цитохромоксидазы было показано в экспериментах с ишемией/реперфузией сердца крысы [30]. Реперфузия, следовавшая за пятнадцатиминутной ишемией, приводила к достоверному снижению активности фермента, что сопровождалось увеличением концентрации ГНЕ в митохондриях. Методом иммуноблоттинга было показано увеличение содержания в гомогенатах подверженных ишемии/реперфузии сердец крыс аддуктов ГНЕ–цитохромс-оксидаза. Полученные на ткани сердца результаты были подтверждены *in vitro* с очищенным ферментом, подвергнутым действию ГНЕ, причем восстановленный глутатион защищал фермент от инактивации ГНЕ. Таким образом, становится понятным, что взаимодействие ГНЕ, как и других активных продуктов свободнорадикального окисления липидов, может приводить к образованию соответствующих аддуктов. Во многих случаях при этом ферменты теряют каталитическую активность. При инактивации ГАФДФ или других гликолитических ферментов это может привести к ингибированию гликолиза и в результате – к ухудшению обеспечения клетки энергией. Если же модификации продуктами свободнорадикального окисления липидов подвергаются компоненты электронно-транспортной цепи, то вдобавок к снижению продукции АТФ, может увеличиться генерация АФК. Последнее обстоятельство может существенным образом усугубить состояние клетки вплоть до ее гибели.

## ВЛИЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ НА СВОЙСТВА ФЕРМЕНТОВ

Модификация ферментов активными формами часто приводит к их инактивации или изменению регуляторных свойств. Конечный результат действия активных форм на ферменты зависит от природы обоих участников реакции, наличия ингибиторов и активаторов. Для ознакомления с химическими принципами и возможными функциональными последствиями взаимодействия белков/ферментов с активными формами обратимся к хорошо исследованной системе, на которой были впервые установлены многие основополагающие положения. Речь идет об глутаминсинтетазе (ГС) из *Escherichia coli*. Фермент изучается более 20 лет докторами Э. Стадтманом и Р. Левиным и их коллегами (Национальные институты здоровья, США), и это служит хорошей базой для систематического анализа влияния свободных радикалов на ферменты [31]. В начале 80-х годов прошлого столетия было установлено, что внутриклеточная дегградация ГС осуществляется в две стадии [32–37]. На первой происходит окислительная модификация, которая приводит к инактивации фермента. Далее инактивированный фермент гидролизуеться специфической для данной его формы протеазой [38]. Как выяснилось, скорость окисления ГС существенно зависела от доступности субстрата и степени аденилирования фермента, что позволяет точно контролировать количество активных молекул. В опытах *in vitro* установили, что для инактивации ГС достаточно окисления только одного из шестнадцати остатков гистидина в мономере. При этом количество карбонильных групп в мономере увеличивалось на одну. Содержание остатков других аминокислот, которые могли подвергаться окислению, а именно цистеина, метионина, фенилаланина, тирозина и триптофана не изменялось. Окислительная модификация осуществлялась перекисью водорода, аскорбатом и дитиотрейтолом в присутствии ионов железа [34]. Инактивация ГС в системах, генерирующих супероксид-анион, стимулировалась белками, в состав которых входили негемовые Fe,S-кластеры, и частично замедлялась антиоксидантами супероксиддисмутазой, гистидином, маннитолом, диметилсульфоксидом и полностью блокировалась Mn(II), ЭДТА или каталазой [35].

В составе глутаминсинтетазы находится катионсвязывающий участок. Было установлено, что именно этот участок в полипептиде является мишенью для атаки АФК [36]. До определенных концентраций ионов металлов с перемен-



ной валентностью свободнорадикальное окисление приводит к образованию пептидных фрагментов с четко воспроизводимой структурой. Так, при секвенировании образованных фрагментов была выявлена последовательность Met-His-Cys-His-Met, где был окислен именно гистидин [37]. Если для инактивации фермента было достаточно окисления одного остатка гистидина, то для того, чтобы его «узнала» специфическая протеаза, было необходимо окислить два остатка гистидина [38, 39]. В процессе окисления происходит изменение физико-химических свойств фермента. На первом этапе окисления образуется более гидрофильный белок [19]. Эта форма не является субстратом протеазы. Однако, дальнейшее окисление приводит к образованию более гидрофобной формы белка, чем исходная, которая уже может подвергаться протеолитической деградации [36]. Окисление ГС также приводило к снижению термостабильности и изменению изоэлектрической точки, силы межсубъединичных взаимодействий, что было непосредственно связано с потерей остатков гистидина и появлением новых карбонильных групп [40]. Анализ продуктов окисления ГС позволил установить, что His269 при этом превращается в аспарагин, а Arg344 — в  $\gamma$ -глутамилполуальдегид [41]. Окисление приводило к изменению структуры активного центра и незначительному снижению силы межсубъединичных взаимодействий и упаковки молекулы [42]. Именно с последними двумя параметрами связывают снижение термостабильности ГС.

Глутаминсинтетаза может инактивироваться не только АФК. Ее обработка пероксинитритом приводит к нитрованию некоторых остатков тирозина и превращению метионина в метионинсульфоксид [43]. Комплекс Fe-ЭДТА стимулировал только первый процесс. Без стимуляции нитровался только один остаток тирозина на субъединицу неаденилированной ГС, что изменяло потребность фермента в двухвалентных катионах, рН-чувствительность, сродство к АДФ и чувствительность к ингибированию конечными продуктами — триптофаном, АМР и СТР. В то же время, нитрование второго остатка тирозина на субъединицу аденилированной ГС приводило к полной потере ферментативной активности. В присутствии Fe-ЭДТА нитрование носит более случайный характер — модификация пяти-шести тирозиновых остатков на субъединицу необходима для имитации превращения неаденилированной формы ГС в аденилированную. Авторы заключили, что поскольку нитрование — необратимый процесс, то оно может серьезно влиять на каскады передачи сигналов, в которых происходит обратимое фосфорилирование или

аденилирование [43]. Следует заметить, что нитрование может регулироваться не только наличием субстратов. Например, двуокись углерода может ускорять нитрование остатков тирозина [44].

Приведенное выше описание работ позволяет составить следующую схему участия АФК и АФА в модификации белков. В условиях присутствия достаточного количества аммиака в среде фермент активно функционирует, включая аммоний в клеточной метаболизм. Хотя при этом интенсивность метаболизма высокая и, соответственно, продуцируются АФК, присутствующий в среде аммоний защищает ГС от инактивации. При низкой концентрации аммония в среде или его отсутствии потребность в ГС отпадает ввиду отсутствия субстрата. Тут включается механизм деградации ненужного фермента, который запускается свободнорадикальным окислением ГС. Этому способствует отсутствие аммония в среде, вследствие чего фермент легче подвергается окислению. Связывание ионов железа со специфическими участками ГС также способствует окислению. На первой стадии окисления фермент инактивируется, но не подвергается действию протеазы. Эта стадия, видимо, подготовительная к последующему акту окисления, что приводит к изменению конформационного состояния ГС и делает ее субстратом для специфической протеинкиназы.

Выше приводилась информация об окислении метиониновых остатков ГС. Специфическая функция метиониновых остатков в белках неизвестна, но поскольку они могут подвергаться обратимому окислению, то обсуждается их функционирование в качестве антиоксидантов [19, 20]. ГС из *E. coli* содержит 16 остатков метионина на субъединицу, и окисление восьми из них практически не влияет на активность фермента. Окисляемые остатки локализуются на поверхности молекулы, и вполне естественно было предположить их защитную роль [20]. Следует добавить, что ГС из *E. coli* также модифицируется алкилпероксильными радикалами и алкилпероксидами [45]. Обработка названными соединениями приводила к полной инактивации фермента, потере остатков гистидина, тирозина, метионина и триптофана и сопровождалась как фрагментацией полипептида, так и образованием высокомолекулярных агрегатов.

В литературе накопилось достаточно информации об окислительной инактивации ферментов из разных организмов. Среди них следует назвать ацетил-КоА-гидролазу, ацетилхолинэстеразу, щелочную фосфатазу, алкогольдегидрогеназу, каталазу, фруктозо-1,6-бисфосфатазу, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу, глутаминде-

гидрогеназу, гексокиназу, лактатдегидрогеназу и целый ряд других ферментов. Данные работы проанализированы в соответствующем обзоре [46]. Со времени его публикации в этой области было выполнено немало работ. Например, было установлено, что при окислительной модификации глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы из *Leuconostoc mesenteroides* инкубация фермента с пероксидом водорода и  $\text{Fe}^{2+}$  быстро инактивирует фермент. При этом в белке увеличивается содержание карбонильных групп и скорость инактивации при нагревании [47, 48].

Лактатдегидрогеназа, хотя и относительно резистентна, также может быть инактивирована АФК [49]. Мы сравнили два изозима из сердечной ( $\text{H}_4$ ) и скелетной мышц ( $\text{M}_4$ ) быка (неопубликованные данные). Оказалось, что фермент из метаболически более активной сердечной мышцы менее чувствителен к окислительной инактивации.

Выше была проанализирована инактивация ферментов под действием АФК в результате взаимодействия последних с полипептидной частью белков. Значительная часть ферментов реализует свою активность благодаря наличию в их составе небелковых компонентов. С этой точки зрения предметом нашего интереса могут быть белки, имеющие в своем составе так называемые [4Fe-4S]-кластеры, например, дегидратазы. Окислительная инактивация таких ферментов может происходить вследствие освобождения ионов железа из их активных центров. Названный кластер содержат дегидратазы  $\alpha, \beta$ -дигидроксиацетат- и 6-фосфоглюконата, а также аконитаза. У *E. coli*  $\text{O}_2^-$  инактивирует  $\alpha, \beta$ -дигидроксиацетатдегидрогеназу как в условиях *in vivo*, так и *in vitro* [5]. Фумараза также чувствительна к  $\text{O}_2^-$ . В условиях окислительного стресса конститутивная форма этого фермента заменяется другой молекулярной формой, которая не содержит Fe,S-кластера [50]. На *E. coli* также было установлено, что еще один [4Fe-4S]-содержащий фермент – аконитаза, инактивируется  $\text{O}_2^-$  [6]. Такая чувствительность ферментов цикла Кребса к действию АФК может быть выгодной для клетки. В результате функционирования данного цикла образуются восстановительные эквиваленты – NAD(P)H и  $\text{FADH}_2$ , часть энергии которых может использоваться для восстановления молекулярного кислорода до супероксида, что может ухудшить состояние клетки. Защититься от такого развития событий можно либо используя антиоксиданты, либо инактивировав комплекс I электронно-транспортной цепи. Могут быть использованы обе названные возможности. Так, именно инактивация белков активными формами выступает

причиной пониженной жизнеспособности штаммов кишечной палочки *E. coli*, которые не продуцируют супероксиддисмутазы или каталазы [51–53]. В наших работах на пекарских дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* также была выявлена четкая негативная взаимосвязь между активностями каталазы и супероксиддисмутазы и чувствительностью к действию АФК, что отдельно будет проанализировано ниже.

Очень интересное развитие получили работы по аконитазе у эукариотов. Митохондриальная форма фермента, наряду с  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназой и сукцинатдегидрогеназой, очень чувствительна к окислению [54]. Кроме митохондриальной формы, у эукариотов есть и цитозольная форма. Ее [4Fe-4S]-кластер также подвергается окислению с потерей ферментативной активности, а образовавшаяся форма [3Fe-4S] обладает способностью связываться с иРНК белков, задействованных в обмене железа [55, 56]. Связываясь с 3'-нетранслируемой областью иРНК трансферрина, она блокирует ее доступность для РНКазы, увеличивает время ее жизни и, таким образом – количество образуемого трансферрина. С другой стороны, [3Fe-4S] форма может связываться с 5'-нетранслируемой областью иРНК ферритина. В результате – блокируется образование преинициаторного комплекса и снижается уровень трансляции. Следует добавить, что переходы [4Fe-4S]  $\rightarrow$  [3Fe-4S] обратимы и регулируются не только путем окисления/восстановления, но и уровнем железа в клетке [56, 57].

Поскольку митохондрии генерируют более 90% АФК в клетках эукариот, то неудивителен интерес к окислительной модификации митохондриальных ферментов, в частности  $\alpha$ -кетоглутарат- и глутаматдегидрогеназам.  $\alpha$ -Кетоглутаратдегидрогеназа содержит в своем составе необходимый для проявления ферментативной активности остаток липоевой кислоты. Она является сильным гидрофобным нуклеофилом, что делает ее высокочувствительной мишенью для гидрофобных электрофилов. Одним из кандидатов, которые могут атаковать липоат, может быть ГНЕ. Действительно, в опытах *in vitro* ГНЕ инактивировал  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназу [58, 59]. В выделенных митохондриях  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназа инактивировалась также пероксидом водорода [54], и он также терял активность при ишемии/реперфузии изолированного сердца крысы [57]. Окисление АФК также приводит к инактивации дыхательных комплексов I и IV электронно-транспортной цепи [54, 57]. Как уже говорилось выше, инактивация ферментов цикла Кребса в условиях повышения уровня АФК может быть выгодной клетке, пос-

кольку это уменьшает интенсивность образования восстановительных эквивалентов NAD(P)H и FADH<sub>2</sub>, часть которых может быть использована использована для генерации АФК. Ситуация с компонентами электронно-транспортной цепи сложнее. Инактивация комплекса IV может увеличивать продукцию АФК переносчиками электронов, чему в определенной степени может препятствовать инактивация комплекса I, которая может снижать количество электронов, попадающих в электронно-транспортную цепь. Таким образом, конечный результат будет зависеть от многих факторов и инактивация ферментов цикла Кребса и переносчиков электронов транспортной цепью митохондрий может играть не только отрицательную, но и положительную роль.

В серии работ с дегидрогеназами 2-оксикислот (ОКДГ) В. Буник и коллеги установили, что эти ферменты также чувствительны к АФК [58, 59]. В ходе реакции, катализируемой ОКДГ, липоат претерпевает обратимое окисление. Его восстановление катализируется тиоредоксином. Оказалось, что присутствующий в комплексе FAD задействован в генерации АФК, в частности O<sub>2</sub><sup>-</sup>, что приводит к образованию тиильного радикала липоата. Это и вызывало инактивацию фермента. Супероксиддисмутаза не защищала фермент, но тиоредоксин – скавенджер тиильных радикалов – проявлял защитные свойства. Поэтому заключили, что тиильный радикал связанного липоата индуцирует инактивацию путем одноэлектронного окисления каталитического интермедиата ОКДГ. Авторы считают, что двоякий прооксидантный эффект связанного с комплексом дегидролипота контролируется тиоредоксином и клеточным пулом NAD<sup>+</sup> и NADH [58, 59]. Отсюда понятно, что в определенных условиях оксидоредуктазы также могут генерировать активные формы. В данном случае, это, вероятно, супероксид-анион и тиильный радикал. Но для снижения вероятности повреждений в клетках имеется эффективная система защиты, в частности, специальный белок – тиоредоксин. Именно он, будучи зависимым от степени «заряженности» системы NAD<sup>+</sup>/NADH, может защищать как дегидрогеназы, так и другие ферменты, обеспечивая таким образом обратную регуляторную связь.

### ОКИСЛЕНИЕ БЕЛКОВ КАК ПОКАЗАТЕЛЬ СОСТОЯНИЯ ОРГАНИЗМА

В последнее время содержание окисленных белков широко используется для оценки интенсивности окислительного стресса *in vivo*, т.е. состо-

яния, в котором повышается стационарная концентрация АФК. Поскольку белки присутствуют абсолютно во всех организмах, то именно их окисление может служить надежным маркером интенсивности протекания окислительных процессов. По сравнению с продуктами свободно-радикальной модификации липидов и нуклеиновых кислот оценка количества окисленных белков имеет ряд преимуществ. Поскольку белки выполняют специфические биологические функции, то можно регистрировать не только образование продуктов окисления, но и изменение функций белков. Продукты окисления белков достаточно стабильны, и сейчас доступны многие высокочувствительные методы анализа их уровня. Вдобавок анализ продуктов свободно-радикального окисления белков может дать существенную информацию о типе оксидантов, вовлеченных в процесс окисления [60].

Перечисленные выше факторы обусловили широкое применение концентрации окисленных белков как показателя интенсивности окислительного стресса. В качестве наиболее часто применяемого метода используется определение содержания в белках одного из стабильных продуктов – дополнительно образованных карбонильных групп. Например, при проведении операций на сердце было выявлено временное повышение уровня белковых карбонил в сыворотке крови [61]. Выход жаб *Rana ridibunda* из зимнего анабиоза также сопровождался возрастанием содержания белковых карбонил в их тканях [62]. Сейчас мы обратимся к некоторым состояниям организмов, в которых надежно установлена активация свободно-радикальных процессов.

**Старение.** В ходе старения организма происходит аккумуляция окисленных белков, в частности так называемых «пигментов старения», содержащих белки, например липофусцина [63–68]. Здесь, как и при некоторых патологических состояниях, ключевым является вопрос – что первично – окисление белков или старение. Как уже отмечалось выше, характер продуктов окисления белков существенным образом зависит от типа активных форм, принимающих участие в процессе. Поскольку дополнительные карбонильные группы в белках образуются практически при окислении любой из форм АФК, то именно они часто используются в качестве маркера.

В серии работ лаборатории профессора Р. Сохлая изучалось не только накопление карбонильных групп в белках в процессе старения организма, но и связь между их уровнем и продолжительностью жизни. Оказалось, что у комнатной мухи содержание белковых карбонил тес-

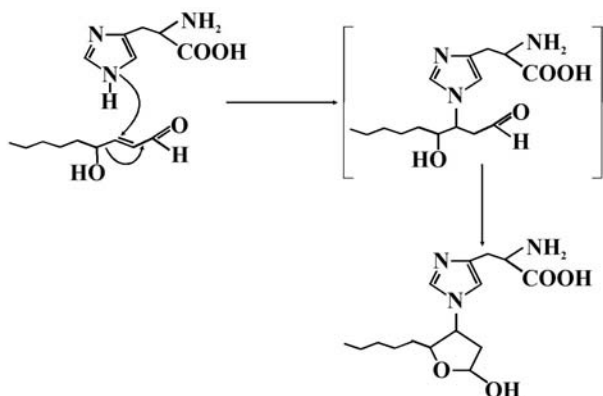
нее связано с физиологическим возрастом, чем с хронологическим [69, 70]. Снижение физиологической активности мух увеличивало не только среднюю продолжительность жизни, но и максимальную. Умеренная гипероксия, увеличивающая концентрацию белковых карбониллов, снижала продолжительность жизни. Эти данные хорошо коррелируют с известным фактом об увеличении генерации АФК митохондриями при старении организма мухи. Поскольку увеличение образования АФК в митохондриях стареющих организмов тесно связано с аккумуляцией в этих органеллах белковых карбониллов, то заключили, что именно окисление белков ответственно за процесс старения [71]. В этой же лаборатории использовали другую модель – песчанку. С возрастом во всех отделах мозга возрастала концентрация белковых карбониллов, но подобного эффекта не обнаружили в сердце, а также в коре мозга животных [72]. Введение песчанкам спиновой ловушки с антиоксидантными свойствами N-трет-бутил- $\alpha$ -фенилнитрона (БФН) снижало уровень белковых карбониллов в коре мозга песчанок [72], что подтвердило более ранние эксперименты [73]. БФН также продлевал длительность жизни комнатной мухи. Авторы пришли к выводу, что, хотя использование антиоксидантов и может защищать ткани от окислительной модификации, их действие имеет как ткане-, так и видоспецифический эффекты. Выяснилось, что изменение когнитивных и моторных функций у мышей также ассоциировано с зависимым от возраста накоплением белковых карбониллов в мозге. Так, увеличение содержания белковых карбониллов в корковом слое мозга происходило одновременно со снижением способности к обучению, а увеличение окисления белков в мозжечке сопровождалось потерей двигательной координации [74].

Старение эритроцитов человека сопровождается не только накоплением белковых карбониллов, но и падением активности ряда ферментов – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, фосфоглицераткиназы и аспартатаминотрансферазы [75]. В фибробластах здоровых людей содержание белковых карбониллов было существенно выше только в клетках, взятых от индивидуумов, возраст которых превышал 60 лет. Однако в фибробластах людей в возрасте до 60 лет, страдающих такими патологиями, как прогерия или синдром Вернера, концентрация белковых карбониллов был примерно вдвое выше, чем у здоровых людей [75]. Накопление окисленных белков происходит во многих органах. Например, в печени крыс с возрастом увеличивается содержание высокоокисленной формы карбангидразы III. Данный фермент имеет три известные ката-

литические активности – карбангидразную, эстеразную и фосфатазную. Если с возрастом первые две активности снижались примерно на 30%, то третья исчезала полностью [76], т.е. окисление фермента приводило к полной потере фосфатазной активности. Ранее уже говорилось, что повышение концентрации белковых карбониллов может быть связано с усиленной генерацией АФК митохондриями. Но, с другой стороны, к подобному результату может приводить и снижение активности протеаз, особенно деградирующих окисленные белки. В печени и других органах крыс выявили мультикатализическую протеазу, которая дискриминирует нативные и окисленные субстраты. В проведенных в одной и той же лаборатории экспериментах на той же линии крыс были получены противоречивые результаты – как существенное снижение активности фермента при старении животных, так и отсутствие изменений [77, 78]. Понятно, что в опытах на целом организме животных практически невозможно учесть все факторы, которые могут влиять на протекание свободно-радикальных процессов. Отсюда и нередко выявляемые несовпадения результатов экспериментов, проведенных как в разных лабораториях, так и в одной и той же. Следует заметить, что личный опыт автора в работе с более простыми модельными объектами: бактериями и дрожжами – также изобилует подобными фактами. А поскольку млекопитающие значительно сложнее организованы, чем упомянутые организмы, то и неудивительно несовпадение результатов подобных экспериментов. Но стремление исследователей работать с млекопитающими вполне обосновано и понятно: они значительно ближе к человеку и нередко помогают решать проблемы его здоровья.

С возрастом в скелетных мышцах происходит увеличение количества продуктов нитрования белков – 3-нитротирозина [79]. Методом иммуноблоттинга удалось идентифицировать основные белки, в которых выявили зависимое от возраста накопление нитротирозина. Ими оказались  $\beta$ -енолаза,  $\alpha$ -фруктозоальдолаза, креатинкиназа, сукцинатдегидрогеназа, триозофосфатизомераза, тропонин I,  $\alpha$ -кристаллин и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа. Поскольку определяемые остатки тирозина в регуляторных белках могут подвергаться обратимому фосфорилированию тирозиновыми киназами и фосфатазами, то их нитрование может выводить данные белки из-под контроля клетки через названный механизм.

Если свободнорадикальная теория старения корректна, а к этому склоняются многие исследователи, то замедление старения можно дос-



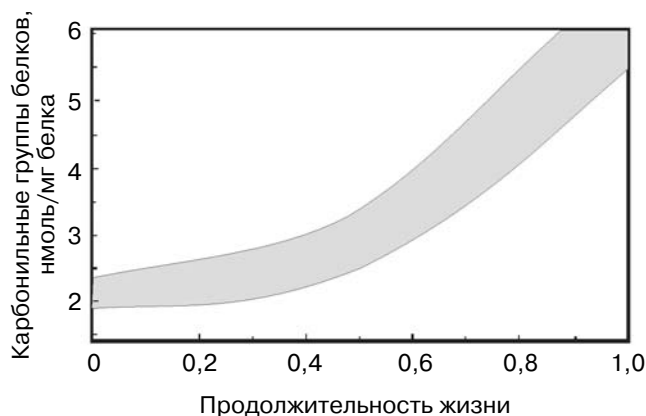
**Рис. 5.** Взаимодействие 4-гидрокси-2-ноненала (ГНЕ) со свободным гистидином. Данная реакция между ГНЕ и свободными или входящими в состав аминокислотами получила название присоединения Михаэля (модифицировано из [8])

тигнуть, или снизив интенсивность генерации, или увеличив скорость деградации АФК. Один из путей достижения названной цели упоминался выше — это использование антиоксидантов. Другой путь — снижение количества потребляемых калорий без ухудшения сбалансированности пищи по микроэлементам и витаминам. Именно данный подход позволил установить, что существует возможность увеличить среднюю продолжительность жизни, а в ряде случаев и максимальную [80, 81]. Содержание белковых карбониллов в мозге 15-месячных мышей, кормленных по стандартной схеме, можно было уменьшить посредством снижения калорийности в течение 5 недель. С другой стороны, концентрация белковых карбониллов в мозге 15-месячных мышей, получавших низкокалорийную диету, возрастала, а в результате введения нормального рациона кормления в течение 5 недель. Поэтому авторы заключили, что окислительный стресс и повреждение мозга мышей носит относительно быстрый и обратимый характер [82]. Вдобавок следует сказать, что описанные патологии и модели ускоренного старения также позволили выявить четкую взаимосвязь между старением и аккумуляцией окисленных форм белков [82, 83].

На рис. 6 приведены обобщенные данные по содержанию карбонильных групп в белках, полученных на разных тканях разных организмов [84]. На нем четко видно, что в течение примерно последней трети жизни происходит существенное увеличение концентрации карбонильных групп белков. Причем, это не зависит ни от вида организма, ни от типа исследуемой ткани, ведь на рисунке приведены данные, полученные при исследовании культуры клеток фиброблас-

тов человека, хрусталика глаза человека, аутопатов мозга человека, печени крысы и целых комнатных мух. Более 80% экспериментальных точек попадали в выделенную область. Это отображает глобальные изменения окислительной модификации белков в процессе старения. Сейчас накапливаются данные о том, что в процессе старения могут преимущественно накапливаться определенные белки, но здесь мы не будем на этом концентрироваться.

**Ишемия-реперфузия.** При ишемии уровень кислорода в ткани ниже нормального. В подавляющем большинстве работ показано, что при этом снижается интенсивность генерации АФК, вероятно, вследствие пониженного содержания кислорода. Одновременно восстановленность внутриклеточной среды повышается, что проявляется в большей восстановленности компонентов электронно-транспортной цепи, что стимулирует образование супероксид-аниона и его метаболитов вследствие неполного восстановления молекулярного кислорода компонентами электронно-транспортной цепи. При изучении воздействия ишемии-реперфузии на мозг монгольской песчанки было установлено, что после 10-минутной ишемии, вызванной окклюзией двух общих каротидных артерий, уровень белковых карбониллов довольно быстро возрастал в ходе реперфузии [85]. При этом выявили значительную обратную корреляцию между со-



**Рис. 6.** Содержание карбонильных групп в белках разных тканей нескольких организмов в зависимости от возраста, представленное в полулогарифмических координатах. На оси абсцисс приведен логарифм продолжительности жизни, где максимальная продолжительность принята за единицу. В качестве примера приведены результаты, полученные на культуре тканей фибробластов кожи человека, хрусталика глаза человека, аутопатов мозга человека, печени крысы и целых комнатных мух. Более 80% экспериментальных данных находится в затененной области графика (модифицировано из [84])

держанием белковых карбониллов и активностью глутаминсинтетазы (ГС), т.е. — чем выше содержание белковых карбониллов, тем ниже активность названного фермента. Спиновый зонд БФН препятствовал аккумуляции белковых карбониллов и падению активности ГС. Инактивация ГС под действием АФК может приводить к увеличению содержания глутамата, что, по мнению авторов, и может быть критическим фактором, приводящим к нейротоксичности и разрушению мозга при ишемии-реперфузии [85].

При проведении операций на сердце человека также имеет место контролируемая ишемия с последующей реперфузией. Наступающий окислительный стресс может вызывать разные заболевания, включая аритмии. В течение операции на сердце из коронарного синуса отбирали пробы крови и определяли в них концентрацию глутатиона, малонового диальдегида и белковых карбониллов [61]. Все три показателя были очень сильно увеличены при реперфузии, и рассчитанные коэффициенты корреляции между содержанием белковых карбониллов и малонового диальдегида имели очень высокие значения ( $R^2 > 0,8$ ). Но поскольку только уровень белковых карбониллов был достаточно стабилен в процессе реперфузии, оставаясь постоянным не менее четырех часов, то авторы заключили, что именно он лучше всего подходит для определения интенсивности окислительного стресса [61]. В разделе II уже говорилось об увеличении содержания ГНЕ в сердцах крыс, подвергнутых действию ишемии с последующей реперфузией. Одновременно концентрация глутатиона в сердце снижалась на 38% и примерно также снижалась активность цитохром-*c*-оксидазы — комплекса IV [30]. Естественно, имеется еще много работ, посвященных ишемии/реперфузии, но и приведенные здесь исследования позволяют понять суть процессов в этом случае. Независимо от того, какой орган подвергается действию ишемии/реперфузии последовательность событий следующая. При ограничении или прекращении кровоснабжения органа существенным образом изменяется протекание многих процессов, ухудшается энергообеспечение вследствие ингибирования работы митохондрий, активируется гликолиз и, скорее всего, снижается продукция АФК. Правда, ситуация может частично улучшиться за счет интенсификации образования оксида азота и аденозина, которые действуют как вазодилаторы, что может частично улучшить кровоснабжение критически важных для выживания органов. Способность переживать ограничение притока крови в значительной степени зависит от способности производить энергию. Следует заметить, что в

состоянии ишемии возрастает восстановительный потенциал клеток — уровень NAD(P)H, GSH и восстановленность переносчиков электронно-транспортной цепи. Последнее обстоятельство может оказать «медвежью услугу» при реоксигенации. Основная проблема периода реоксигенации — резкое увеличение концентрации АФК, что многократно было отмечено исследователями по возрастанию содержания продуктов свободно-радикального окисления липидов (малоновый диальдегид и 4-гидроксиноненаль) и белков (карбонильные группы белков) и снижению содержания глутатиона. Губительному эффекту ишемии/реперфузии могут препятствовать разного рода антиоксиданты, а также предварительное действие более слабой ишемии/реперфузии (preconditioning). С очень сходными проблемами встречаются врачи и исследователи в случаях пересадки органов, поскольку пересаживаемый орган часто находится в условиях гипоксии, а «подключение» его к кровеносному руслу резко увеличивает поступление кислорода с сопутствующей интенсификацией образования активных форм кислорода.

**Нейродегенеративные болезни.** К особой группе нейродегенеративных болезней, связанных с возрастом, относят болезни Альцгеймера, Паркинсона и амиотрофный латеральный склероз. Болезнь Паркинсона — дегенеративная болезнь нервной системы, которая характеризуется произвольными треморными движениями и сниженной силой мышц. При этом ум и интеллект не страдают. Болезнь возникает в середине жизни и постепенно прогрессирует с возрастом. Данное нарушение характеризуется повышенным содержанием железа в *substantia nigra pars compacta*. Считается, что первопричиной нарушений является окислительный стресс, сопровождаемый интенсификацией перекисного окисления липидов, [4, 86]. Выше говорилось, что при старении происходит увеличение содержания белковых карбониллов в тканях человека. В мозге степень увеличения содержания белковых карбониллов зависит от исследуемого отдела [87]. Увеличение содержания белковых карбониллов с возрастом связано со снижением активности ферментов, чувствительных к АФК: ГС и креатинкиназы. Если у пациентов, страдающих болезнью Альцгеймера, содержание белковых карбониллов не отличалось от контрольного, то активность ГС у больных была ниже [87]. Это является хорошим подтверждением точки зрения о полезности оценки содержания чувствительных к окислению белков в качестве маркеров окислительного стресса.

К настоящему времени много стало ясно о путях генерации АФК при болезни Паркинсона.

В данных процессах задействованы ионы металлов с переменной валентностью (в первую очередь железа), нарушения функционирования электронно-транспортной цепи, конечные продукты гликозилирования, реактивная микроглия и  $\beta$ -амилоид [88]. Именно последнему как прооксиданту сейчас отводится ведущая роль в развитии этой патологии. Амилоидные пептиды, состоящие из 39–43 аминокислотных остатков, образуются из предшественника — трансмембранного гликопротеида. В растворе амилоидные пептиды агрегируют в структуры с молекулярной массой выше 15 кДа и после этого начинают проявлять нейротоксичность. Данный комплекс, кроме всего прочего, нарушает гомеостаз ионов кальция, приводит к их накоплению в клетке и, по-видимому, также задействован в аккумуляции ионов железа. Накопление окисленных белков (как цитозольных, так и мембранных) является еще одним показателем индуцированного окислительного стресса при болезни Альцгеймера [88]. В связи с серьезностью и широкой распространенностью нейродегенеративных болезней им уделяется особое внимание. Неудивительно, что механизмы многих болезней хорошо исследованы на молекулярном уровне. По самым разным причинам активируются свободнорадикальные процессы. В результате окисляются определенные белки, в частности  $\beta$ -амилоид, как в случае болезни Паркинсона. Окисленные в незначительной степени белки могут расщепляться под действием протеосом и/или других протеолитических систем. Более окисленные белки не расщепляются протеазами, а накапливаются в клетке и могут образовывать агрегаты. Последние, в свою очередь, могут стать генераторами свободных радикалов, а также ингибировать протеолитические системы, например, протеосомы [89]. Протеосомы, как и другие протеолитические системы, также инактивируются АФК. Вся перечисленная цепочка событий носит характер «автокаталитического процесса», усугубляя состояние ткани, приводит к развитию болезни и, в конечном счете, может вызвать ее гибель.

**Диабеты.** Сахарный диабет является одной из наиболее распространенных болезней. Он вызывается или недостаточным образованием инсулина  $\beta$ -клетками поджелудочной железы (тип I) и/или сниженной чувствительностью к инсулину клеток-мишеней (тип II). Недостаточному образованию инсулина  $\beta$ -клетками нередко предшествует развитие в них окислительного стресса, который может приводить к повреждению, а в крайних случаях и гибели данных клеток. В результате концентрация циркулирующей в крови глюкозы хронически возрастает,

что приводит к основным осложнениям диабета — слепоте, гангрене, разрушению почек и кровеносных сосудов и т.д. Считается, что критическим моментом в развитии патологии является взаимодействие глюкозы с белками и/или другими биомолекулами, названное реакцией Майларда (образование продуктов коричневого цвета). Важным моментом является аутоокислительное гликозилирование, включающее аутоокисление глюкозы, образование дикарбонильных интермедиатов и связывание окисленных углеводов с белками [90].

Аутоокисление углеводов и продуктов гликозилирования белков, которое катализируется ионами металлов с переменной валентностью, может приводить к генерации АФК, которое, в свою очередь, может инициировать разрушение белков. Обработка белков в системе, где происходит аутоокисление глюкозы, приводит к образованию в них окисляющих и восстанавливающих групп, таких как гидропероксиды, а также гидроксидов алифатических аминокислот, дитиозинов и продуктов гидроксилирования фенилаланина. 2-Глиоксаль и арабиноза являются основными продуктами аутоокисления глюкозы. При взаимодействии с белками первый образует N-(карбоксиметил)лизин, а второй может участвовать в генерации флуоресцирующих пентозидиновых поперечных сшивок в белках. Аскорбат и дикарбонильные углеводы, такие как метилглиоксаль и 3-деоксиглюкозон, могут вовлекаться в аутоокислительные реакции, что приводит к образованию коричневого пигмента. Углеводные интермедиаты Амадори, связанные с белками, часто легче аутоокисляются, чем свободные, что может усугублять повреждения. N- $\epsilon$ (карбоксиметил)лизин и пептозидин *in vivo* накапливаются с возрастом, и их уровень повышен у диабетиков. Именно аутоокислению свободных или связанных с белками углеводов сейчас отводится значительную роль в развитии осложнений диабета [90].

**Атеросклероз.** При атеросклерозе на стенках сосудов образуются агрегаты липидов и клеток, которые формируют своеобразные бляшки из так называемых «пенящихся клеток». Это приводит к пролиферации клеток, уменьшению толщины сосудов, отложению кальция и т.д. [1]. В результате стенки сосудов становятся тонкими и хрупкими, а их просветы сужаются. Надежно установлено, что с развитием атеросклероза тесно связано окисление макромолекул. Около 30% отложенного в бляшках холестероллинолата находится в окисленном состоянии.

Большая часть аккумулялированных липидов образуется из липопротеидов низкой плотности. При этом модификация их белковой апоформы

альдегидами и окисление липидов считается ключевым моментом в образовании бляшек при атеросклерозе. Апобелок может легко окисляться и фрагментироваться под действием радиолита или окисления, катализированного ионами металлов. В белках бляшек *in vivo* обнаружено повышенное по сравнению с апоформой содержание 3-нитротирозина. Здесь также обнаружены продукты окисления белков гипохлорной кислотой [60]. Опять же непонятно, что является первичным, а что вторичным — свободнорадикальное окисление белков и липидов или образование атеросклеротических бляшек, но участие активированных форм в этой патологии — несомненно.

Свободнорадикальное окисление белков связано еще с рядом патологий. Например, окисление плазматического белка фибриногена приводит к его неспособности образовывать каркас сгустков крови, причем его способность образовывать тромбы обратно коррелирует со степенью окисления [91]. Окисление иммуноглобулинов синовиальной жидкости вызывает их агрегацию, что связывают с развитием ревматоидного артрита [92]. Окисление ингибиторов протеаз, таких как  $\alpha$ -1-антитрипсин, имеет несколько физиологических последствий. Так, окисление критического остатка метионина в  $\alpha$ -1-антитрипсине приводит к потере функции, а поскольку ингибиторный белок отвечает за ингибирование протеаз в таких тканях, как легкие и хрящи, то этот процесс связывают с разрушением тканей при эмфиземе [93]. Полагают, что функцию окислителя может выполнять гипохлорная кислота, которую образуют активированные воспалительные нейтрофилы [94]. Окисление белков хрусталика глаза может быть вовлечено в катарактогенез [95–97]. Увеличенное содержание окисленных белков выявлено и в ряде других патологий, но в большинстве случаев специфические белки не идентифицированы.

**Окислительный стресс — бактерии и низшие позвоночные.** После чтения предыдущих разделов может сложиться ложное представление, что окислительное повреждение белков характерно, для млекопитающих и человека или исследуется только на них. Это не совсем так. Например, первые детальные исследования механизмов ответа на окислительный стресс — повышение стационарной концентрации АФК [1, 3] — проводились на бактериях *E. coli*. Было показано, что в ответ на действие окислительного стресса повышается мощность защитных систем, в частности, активность антиоксидантных и связанных с ними ферментов. Эта проблема детально проанализирована нами ранее [53]. Здесь мы сфокусируемся только на отдельных

работах, в которых в качестве маркера окислительного стресса были использованы карбонильные группы белков.

В нашей лаборатории в течение ряда лет наряду с другими в качестве маркера окислительного стресса используется уровень карбонильных групп белков. Так, на *E. coli* было установлено, что добавление в среду инкубации бактерий пероксида водорода приводило к постепенному накоплению белковых карбониллов [98]. При этом возрастание их концентрации было постоянным в течение 60 мин, а уровень другого показателя окислительного стресса — так называемых тиобарбитуратреактивных продуктов (ТБКАП) вначале возрастал, а впоследствии снижался. Поэтому пришли к заключению, что при исследовании окислительного стресса следует анализировать несколько возможных показателей, и только содержание белковых карбониллов не может быть единственным параметром. В качестве дополнительных маркеров окислительного стресса используются уровни пероксидов липидов, соотношение окисленного и восстановленного глутатиона, активность ферментов, непосредственно или опосредованно принимающих участие в защите и детоксикации АФК или продуктов их взаимодействия с компонентами клетки, а также в репарации повреждений и т.д. Следует добавить, что степень проявления окислительного стресса в значительной мере зависела от типа используемого штамма бактерий. Так, некоторые показатели, как-то активности ферментов, в клетках отдельных штаммов могли и не изменяться в результате действия стресса [98]. Как видим, концентрация окисленных белков является надежным маркером окислительного стресса у бактерий. Сама реакция на такой стресс помогает бактериям переживать неблагоприятные условия, непереносимым элементом которых нередко выступает окислительный стресс — то ли при изменении температуры, то ли под действием антибиотиков, или при атаке клетками иммунной системы.

Низшие позвоночные также подвержены действию окислительного стресса. Он может являться компонентом любого стресса, индуцированного изменением температуры или доступности кислорода, физической нагрузкой, действием токсикантов и т.д. Именно поэтому около 10 лет мы исследуем влияние внешних факторов на свободнорадикальные процессы у рыб и лягушек. В работах на животных уровень белковых карбониллов также оказался хорошим маркером окислительного стресса, но и здесь приведенные только что замечания оказались правильными. Лягушек *Rana ridibunda*, отловленных осенью при низких температурах среды, вы-



держивали в условиях гибернации при температуре 2–4°. Затем температуру среды повышали до 20°, и при этом определяли ряд показателей окислительного стресса — уровень белковых карбониллов, ТБКАП, а также активность ряда антиоксидантных и связанных с ними ферментов [62]. Следует заметить, что при повышении температуры окружающей среды в физиологических пределах интенсивность метаболизма холоднокровных животных возрастает пропорционально росту температуры. Поскольку хорошо известно, что интенсификация метаболизма приводит к повышению образования побочных продуктов — АФК, то следовало ожидать развития окислительного стресса при переходе от гибернации к активному способу жизни. Действительно, увеличивался не только уровень карбонильных групп в белках, но и содержание ТБКАП и активность ряда антиоксидантных и связанных с ними ферментов — супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионредуктазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы [62]. На другом широко используемом в исследованиях холоднокровном объекте серебряном карасе *Carassius auratus* мы исследовали влияние повышения температуры с 20 до 35° и установили, что содержание белковых карбониллов также изменялось, но, как наличие эффекта, так и степень его выраженности, сильно зависели от типа исследуемой ткани [99].

На серебряном карасе исследовали также влияние повышенного содержания кислорода в среде (гипероксии) на показатели окислительного стресса в разных тканях [100]. Оказалось, что это влияние имело четко выраженную тканевую специфичность, но во всех исследованных тканях — мозге, печени, почках и мышцах уровень окисленных белков в той или иной степени возрастал. Интересно отметить, что удалось выявить определенную динамическую связь между уровнем карбонильных групп в белках и содержанием пероксидов липидов и ТБКАП. В ходе эксперимента выявили постепенное накопление белковых карбониллов [100]. Полученные результаты можно интерпретировать в свете приведенных ранее путей образования карбонильных групп в белках. Как пероксиды липидов, так и продукты их метаболизма (среди которых есть, например, альдегиды, определяемые в качестве ТБКАП) могут быть ответственными за появление дополнительных карбонильных групп в белках.

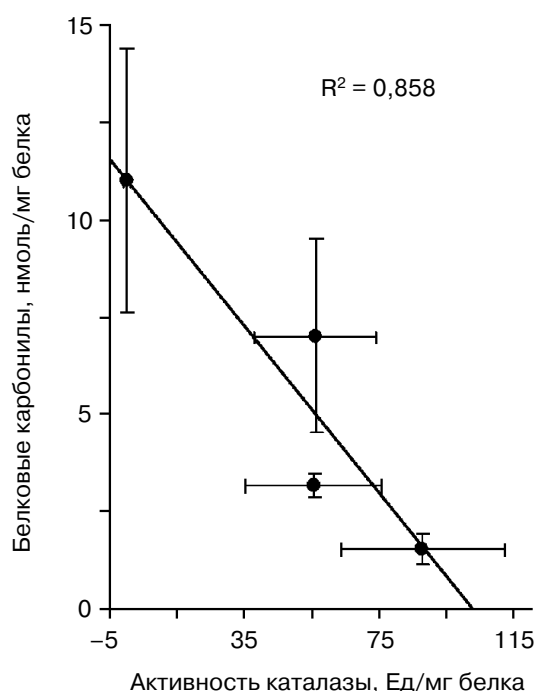
На первый взгляд, противоположностью гипероксии может выступать гипоксия. Но, как оказалось, картина на самом деле более сложная. На карпах *Cyprinus carpio* мы исследовали влияние гипоксии и реоксигенации на ряд показателей окислительного стресса [101]. Опять же, это

воздействие имело тканеспецифический характер. Поскольку в данном обзоре мы концентрируем наше внимание на окислении белков, то скажем, что при гипоксии содержание белковых карбониллов в мозге и печени не изменялось, а в почках и мышцах даже несколько снижалось. Уровень пероксидов липидов снижался в мозге и печени, но был неизменным в почках и мышцах, а содержание ТБКАП изменилось только в печени, где оно существенно возрастало. При реоксигенации в течение 14 ч возросла концентрация белковых карбониллов в печени, а в почках и мышцах была выявлена тенденция к восстановлению исходного содержания. Следует подчеркнуть, что окисленные формы липидов могут не только метаболизироваться соответствующими ферментативными системами, но некоторые из них могут взаимодействовать с белками, приводя к образованию дополнительных карбонильных групп. Активности антиоксидантных ферментов в ходе гипоксии или снижались, или оставались неизменными [101]. Таким образом, можно заключить, что в наших условиях при гипоксии интенсивность генерации свободных радикалов снижалась, что соответствует большинству проведенных исследований. Более того, не исключено, что снижение уровня показателей окислительного стресса при гипоксии может приводить к развитию редуцированного стресса — состояния, противоположного окислительному стрессу. Но эта точка зрения требует дальнейшей разработки.

### НЕКОТОРЫЕ ПРИМЕРЫ ЗАЩИТЫ БЕЛКОВ ОТ ОКИСЛЕНИЯ *in vivo*

В данном разделе мы очень кратко остановимся на некоторых примерах возможности защиты белков от свободнорадикального окисления в целостных клетках. Как правило, такие примеры лучше всего демонстрируются на моделях микроорганизмов. При изучении роли митохондриальной NAD<sup>+</sup>-киназы *S. cerevisiae* было показано, что инактивация гена *POS5*, кодирующего упомянутый фермент, приводила к увеличению в 28 раз количества карбонильных групп белков в митохондриях [102] и многократно меньшей по сравнению с исходным штаммом активности чувствительных к окислению ферментов: аконитазы и сукцинатдегидрогеназы [103]. В нашей лаборатории изучались некоторые показатели окислительного стресса у этого же вида дрожжей, причем использовались разные штаммы: исходный и его изогенные производные, дефектные по одной из двух, а также по обоим присутствующим в дрожжах каталазам [104]. Оказалось, что чем выше активность ката-

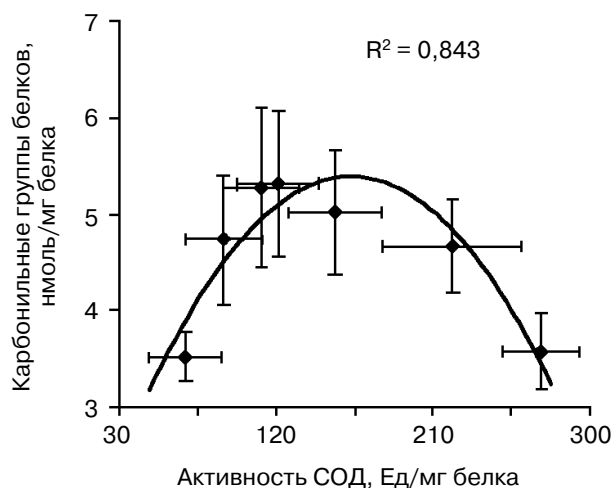
лазы, тем ниже уровень карбонильных групп в белках (рис. 7). Между активностями каталазы и ферментов, чувствительных к окислению: глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и глутатионредуктазы, была обнаружена сильная положительная корреляция. То есть выходит, что чем выше активность каталазы, тем ниже уровень белковых карбониллов, но в то же время выше активность чувствительных к окислению ферментов. Очень сильная негативная взаимосвязь между активностью каталазы и содержанием карбонильных групп в белках, похожая на ту, которая несколько выше была описана для дрожжей, была выявлена нами и в мозге серебряного караса при ингибировании каталазы гербицидом аминотриазолом [105]. Хотя данные корреляционного анализа и нельзя принимать как однозначное доказательство защитной роли каталазы в отношении клеточных белков, при многократном подтверждении описанных выше результатов можно с определенной уверенностью говорить, что каталаза в условиях *in vivo* может защищать клеточные белки от свободнорадикального окисления. В качестве подкрепления данного положения можно привести результаты наших опытов с



**Рис. 7.** Взаимосвязь между активностью каталазы и содержанием карбонильных групп в общей фракции белков бесклеточных экстрактов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* у исходного и дефектных по какой-либо из присутствующих у данного вида двух каталаз, либо по обоим каталазам (модифицировано из [101])

глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой из пекарских дрожжей [106]. В условиях *in vitro* пероксид водорода инактивировал частично очищенный фермент, что хорошо подтвердило наши данные, полученные *in vivo*, о возможном участии каталаз в регуляции активности фермента в цельной клетке. При этом модификация фермента происходила последовательно: сначала получалась частично инактивированная форма, кинетические характеристики которой отличались от таковых нативного фермента, а позже фермент полностью терял активность.

На пекарских дрожжах мы также исследовали возможную защитную роль супероксиддисмутаза. Было использовано несколько разных методических подходов, но во всех случаях анализировали взаимосвязь между активностью супероксиддисмутаза и содержанием карбонильных групп в белках. В одной из серий экспериментов использовали штаммы дрожжей, у которых экспрессировались обе изоформы: Cu,Zn- и Mn-содержащая, дефектные по одной из двух форм, – и штамм, дефектный по обоим супероксиддисмутазам [107]. Изучаемая зависимость оказалась достаточно близкой к параболической. Выглядит так, будто бы в зависимости от активности супероксиддисмутаза может выступать как про-, так и антиоксидантом. Проксидантная роль супероксиддисмутаза была обнаружена ранее в модельных исследованиях *in vitro* Дж. Маккорда и коллег [108]. В только что процитированной нашей работе [107] был обнаружен еще один интересный факт – значительная положительная корреляция между активностями каталазы и супероксиддисмутаза, что, по-видимому, свидетельствует о координированном поведении антиоксидантной системы в данных условиях. В следующей работе использовали дефектный по Mn-содержащей супероксиддисмутазае штамм дрожжей и ингибировали Cu,Zn-содержащую супероксиддисмутазау диэтилдитиокарбаматом [109]. Условия здесь несколько отличались от использованных в предыдущей работе, а результаты оказались на первый взгляд вообще противоположными. Зависимость содержания карбонильных групп в белках от активности супероксиддисмутаза имела куполообразную форму (рис. 8). Здесь также была выявлена хорошая положительная корреляция между активностями каталазы и супероксиддисмутаза [109]. Похожие результаты были снова недавно получены нами при изучении влияния перекиси водорода на активность супероксиддисмутаза и каталаз у дрожжей [110]. Поэтому мы пришли к выводу, что в условиях *in vivo* в нескольких различных экспериментальных моделях каталазы и супероксиддисмутаза могут



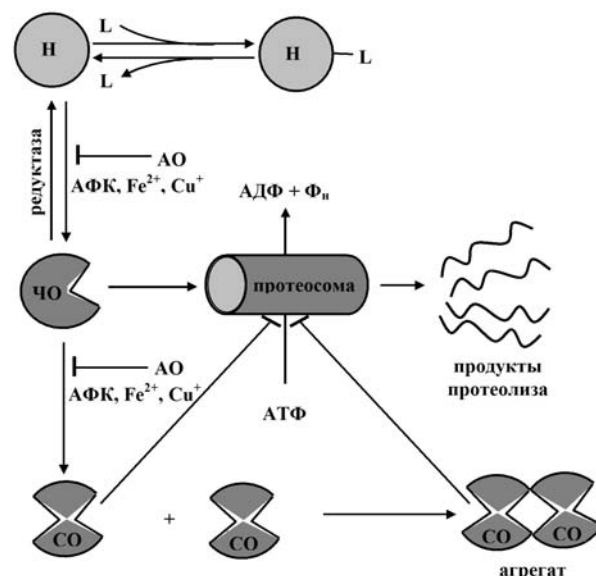
**Рис. 8.** Взаимосвязь между активностью супероксиддисмутазы и содержанием карбонильных групп в общей фракции белков безклеточного экстракта дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

защищать белки от свободнорадикального окисления, хотя, видимо, связь между ними не всегда линейная. Более детально свободнорадикальное окисление белков в пекарских дрожжах проанализировано нами в специальном обзоре [111].

На рис. 9 обобщены современные представления об участии АФК в окислении клеточных белков. Так, окисление белка может зависеть от его взаимодействия с определенными лигандами, например субстратами или кофакторами, которые могут частично препятствовать окислительной модификации. С другой стороны, разные антиоксиданты также могут защищать белок от окисления. Возможны, по меньшей мере, три сценария, по которым могут происходить события после окисления белка. Первый: он может быть репарирован с превращением в исходную форму, если окислению подверглись остаток цистеина (образование остатка сульфеновой кислоты, цистина или смешанного дисульфида) или метионина (образование метилсульфоксида); второй: он может деградироваться зависимым от АТФ образом, то ли протеосомой, то ли специальной протеазой, с образованием соответствующих пептидов; и третий: дальнейшее окисление частично окисленного белка, которое может вызывать агрегацию продуктов, причем последние могут не только накапливаться в клетке, но и существенным образом влиять на клеточные процессы, например, ингибировать протеосому [89]. Таким образом, формируется обратная связь перечисленных процессов, которая может существенным обра-

зом ухудшить состояние клетки, подвергнутой действию окислительного стресса. Так, в последние несколько лет было показано, что свободнорадикальное окисление определенных клеточных белков может индуцировать апоптоз [112–116].

Очень интересную серию работ по свободнорадикальному окислению белков в связи с состоянием организма или отдельных клеток провели Т. Нистром с коллегами. Так, при исследовании почкующихся дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* они установили, что вне зависимости от «возраста» материнской клетки, от содержания в ней карбонильных групп белков в новой отпочковывающейся клетке концентрация окисленных белков всегда достаточно низка [117]. Используя классический растительный объект — *Arabidopsis thaliana*, было выявлено, что по мере развития растения содержание карбонильных групп в белках возрастало более, чем в пять раз, но в начале цветения (на 16–18 день) оно резко снизилось до уровня в восьмидневных растениях и оставалось таковым по меньшей мере до 36-го дня. [118]. Содержание хлорофилла практически не изменялось с пятнадцатого дня и до конца эксперимента. При исследовании эмбриональных стволовых клеток ES теми же исследователями неожиданно было выявлено, высокое содержание в них белковых карбониллов и конечных продуктов гликолизирования



**Рис. 9.** Образование и внутриклеточная «судьба» окисленных АФК белков. Объяснения в тексте. Обозначения: Н — нормальный белок, L — лиганд, СО и ЧО — сильно и частично окисленные белки, АО — антиоксиданты

белков [119]. Основными белками, подвергнутыми окислительной модификации, оказались шапероны и белки цитоскелета. Дифференциация клеток вызывала резкое снижение концентрации белковых карбониллов. Авторы считают, что описали часть ранее неизвестного процесса реювинализации на уровне белков, которая происходит на ранних стадиях эмбрионального развития. В прекрасном обзоре по роли свободнорадикального окисления белков Т. Нистром, обобщая разные сценарии динамики уровня окисленных белков в клетках разных организмов, пришел к выводу, что существует несколько вариантов развития в процессе раннего развития, созревания, произведения потомства и старения, но для получения целостной картины пока не хватает информации [120].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ

На данном этапе наших знаний о процессах свободнорадикального окисления белков становится понятно, что наряду с негативными последствиями оно задействовано в регуляции многих клеточных процессов. Открытие путей специфической деградации окислительно модифицированных белков, в частности зависимого от АТФ гидролиза специальными протеазами или протеосомой, в корне изменило наши представления о данных процессах. Оказалось, что, хотя окисление белков носит «случайный» характер, оно вовлечено в регуляцию их обмена. Нечто подобное ранее было установлено и для липидов. Способность клетки восстанавливать окисленные остатки серосодержащих аминокислот: цистеина и метионина — используется в регуляции многих клеточных процессов. Существует целая система специальных регуляторных белков, которые «чувствуют» АФК, и их обратимое окисление задействовано в регуляции экспрессии генов. Окисление белков может быть также вовлечено в регуляцию пространственно-временного распределения белков в клетке.

Если в исследовании химии окисления белков достигнуты немалые успехи, то этого пока нельзя сказать о функциональных последствиях, хотя и здесь проведено достаточное количество работ. Так, в условиях *in vitro* надежно установлено, что окисление может изменять каталитические и регуляторные свойства вплоть до полной инактивации. На уровне целостной клетки что-нибудь определенное сказать достаточно сложно. Определенный прогресс в области исследования окисления и защиты белков *in*

*in vivo* может быть достигнут благодаря использованию корреляционного анализа взаимосвязей между активностью определенных ферментов, содержанием в них продуктов свободнорадикальной модификации и активностью антиоксидантных систем. Однако и здесь требуются дальнейшие разработки.

Несомненной кажется взаимосвязь между уровнем продуктов окисления белков и рядом функциональных состояний организмов. Так, старение, гипер- и гипоксия, повышение температуры, ряд патологических состояний, как-то: сердечно-сосудистые заболевания, ишемия/реперфузия, диабеты, нейродегенеративные патологии, четко связаны с увеличенным уровнем окисленных белков. Однозначно утверждать, что именно модификация белков служит первопричиной отмеченных изменений сложно, но в ряде случаев для этого существуют серьезные основания. Имеется достаточно примеров, когда снижение степени окисленности белков коррелировало с улучшением состояния организма. Поэтому считается, что уровень окисленных белков по меньшей мере может служить маркером названных изменений и быть полезным для разработки защитных мероприятий. Изучение динамики состояния организма и уровня продуктов окисления белков, липидов и нуклеиновых кислот поможет ответить на вопрос о первичности и взаимосвязях названных процессов. Так, в наших опытах данный подход позволил установить, что при окислительном стрессе в ряде случаев сначала повышается уровень продуктов окисления липидов, а далее — белков. Это кажется логичным, поскольку, как отмечалось ранее, определенные продукты окисления липидов могут взаимодействовать с белками с образованием в последних дополнительных карбонильных групп. Изучение характера и динамики продуктов свободнорадикального окисления белков может иметь также прогностическое значение при ряде заболеваний человека или животных, а также использоваться для профилактики и лечения.

Автор выражает искреннюю благодарность к.б.н. Г.Н. Семчишин и Т.В. Багнюковой за критические замечания при чтении рукописи, О.В. Луцкаку за помощь в подготовке рисунков, а также коллегам, приславшим отписки своих статей — докторам: Д.А. Баттерфилду, А.А. Болдыреву, В.И. Бунник, Р. Веиндруху, К.Дж.А. Девису, Р.Л. Левину, Дж. М. Маккорду, К. Пантопоулосу, Л.И. Сзведе, В.П. Скулачеву, Р.С. Сохалю, Э.Р. Стадтману, Д. Тоуати, И. Фридовичу и С. Язвински.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C. (1989) *Free Radicals in Biology and Medicine*, Clarendon Press, Oxford.
2. Skulachev, V.P. (1996) *Quart. Rev. Biophys.*, **29**, 169–202.
3. Johnson, P., and Boldyrev, A.A. (2002) *Oxidative Stress at Molecular, Cellular and Organ Levels*, Research Signpost, India.
4. Болдырев, А.А. (1995) *Биохимия*, **60**, 1536–1542.
5. Kuo C.F., Mashino T., and Fridovich, I. (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 4724–4727.
6. Gardner, P.R., and Fridovich, I. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 19328–19333.
7. Brown, N.M., Kennedy, M.C., Antholine, W.E., Eisenstein, R.S., and Walden, W.E. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 7246–7254.
8. Stadtman, E.R. (1993) *Annu. Rev. Biochem.*, **62**, 797–821.
9. Dean, R.T., Fu, S., Stocker, R., and Davies, M.J. (1997) *Biochem. J.*, **324**, 1–18.
10. Stadtman, E.R. (1998) in: *Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants*. Ed. Ozben, Acad. Plenum Press, N.Y, 51–64.
11. Stadtman, E.R., and Levin, R.L. (2003) *Amino Acids*, **25**, 207–218.
12. Schuessler, H., and Giesseg, S.P. (1984) *Int. J. Radiat. Biol.*, **45**, 267–281.
13. Levine, R.L., Wehr, N., Williams, J.A., Stadtman, E.R., and Shacter, E. (2000) *Methods Mol. Biol.*, **99**, 15–24.
14. Лушак В.И., Багнокова Т.В., Лушак О.В. (2004) *Укр. биохим. журн.*, **76**, 136–141.
15. Levine, R.L., Moskovitz, J., and Stadtman, E.R. (2000) *Life*, **50**, 301–307.
16. Thomas, J.A., and Mallis, R.J. (2001) *Exp. Gerontol.*, **36**, 519–526.
17. Stadtman, E.R., Moskovitz, J., and Levine, R.L. (2003) *Antioxidants & Redox Signaling*, **5**, 577–582.
18. Moskovitz, J., Berlett, B.S., Poston, J.M., and Stadtman, E.R. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 9585–9589.
19. Cervera, J., and Levine, R. L. (1988) *FASEB J.*, **2**, 2591–2595.
20. Levine, R.L., Mosoni, L., Berlett, B.S., and Stadtman, E.R. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 15036–15040.
21. Лушак, В.И. (2002) *Вопр. биол. мед. фармак. химии*, **1**, 27–31.
22. Лушак В.И. (1996) *Биохимия*, **61**, 195–211.
23. Uchida, K., and Stadtman, E.R. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 5611–5615.
24. Uchida, K., and Stadtman, E.R. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 4544–4548.
25. Uchida, K., Szwed, L.I., Chae H.-Z., and Stadtman, E.R. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 8742–8746.
26. Uchida, K., and Stadtman, E.R. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 6388–6393.
27. Uchida, K., and Stadtman, E.R. (1994) *Methods Mol. Biol. Stress Response: Methods and Protocols*, ed. Keyse. **99**, 25–34.
28. Uchida, K., Itakura, K., Kawakishi, S., Hiari, H., Toyokuni, S., and Stadtman, E.R. (1995) *Arch. Biochem. Biophys.*, **324**, 241–248.
29. Szwed, L.I., Uchida, K., Tsai, L., and Stadtman, E. R. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 3342–3347.
30. Chen, J., Henderson, G.I., and Freeman, G.L. (2001) *J. Mol. Cell. Cardiol. Nov*; **33**, 1919–1927.
31. Stadtman, E.R. (1991) *XXXV Chemistry at the Frontiers of Medicine*, Houston, TX, 182–203.
32. Levine, R. L. (1983) *J. Biol. Chem.*, **258**, 11823–11827.
33. Levine, R.L., Oliver, C.N., Fulks, R.M., and Stadtman, E.R. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 2120–2124.
34. Levine, R.L. (1983) *J. Biol. Chem.*, **258**, 11828–11833.
35. Stadtman, E.R., and Wittenberger, M.E. (1985) *Arch. Biochem. Biophys.*, **239**, 379–387.
36. Kim, K., Rhee, S.G., and Stadtman, E.R. (1985) *J. Biol. Chem.*, **260**, 15394–15397.
37. Farber, J.M., and Levine, R.L. (1986) *J. Biol. Chem.*, **261**, 4574–4578.
38. Roseman, J.E., and Levine, R.L. (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 2101–2110.
39. Levine, R.L., and Rivett, A.J. (1989) *Medical, Biochemical and Chemical Aspects of Free Radicals*. eds. Hayaishi O., Kondo M., Yoshikawa T. Elsevier Science Publishers. 1195–1202.
40. Rivett, A.J., and Levine, R.L. (1990) *Arch. Biochem. Biophys.*, **278**, 26–34.
41. Climent, I., and Levine, R.L. (1991) *Arch. Biochem. Biophys.*, **289**, 371–375.
42. Fisher, M.T., and Stadtman, E.R. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 1872–1880.
43. Berlett, B.S., Friguete, B., Yim, M.B., Chock, P.B., and Stadtman, E.R. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 1776–1780.
44. Berlett, B.S., Levine, R.L., and Stadtman, E.R. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 2784–2789.
45. Ma, Y.-S., Chao, C.-C., and Stadtman, E.R. (1999) *Arch. Biochem. Biophys.*, **363**, 129–134.
46. Stadtman, E.R., Oliver, C.N., and Starke-Reed, P.E. (1991) *Korean J. Biochem.*, **23**, 49–54.
47. Szwed, L.I., and Stadtman, E.R. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 3096–100.
48. Szwed, L.I., and Stadtman, E.R. (1993) *Arch. Biochem. Biophys.*, **301**, 391–395.
49. Nelson, S. R., Pazdernik, T.L., and Samson, F.E. (1992) *Proc. West. Pharmacol. Soc.*, **35**, 37–41.
50. Liochev, S.I., Benov, L., Touati, D., and Fridovich, I. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 9479–9481.
51. Imlay, J.A. (2003) *Annu. Rev. Microbiol.*, **57**, 395–418.
52. Touati, D., Jacques, M., Tardat, B., Bouchard, L., and Despied, S. (1995) *J. Bacteriol.*, **177**, 2305–2314.
53. Лушак, В.И. (2001) *Биохимия*, **66**, 592–609.
54. Nulton-Person, A.C., and Szwed, L.I. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 23357–23361.
55. Haile, D.J., Rouault, T.A., Harford, J.B., Kennedy, M.C., Blondin, G.A., Beinert, H., and Klausner, R.D. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 11735–11739.
56. Fillebeen, C., and Pantopoulos, K. (2002) *Redox Report.*, **7**, 15–22.
57. Lucas, D.T., and Zweda, L.I. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 6689–6693.
58. Bunik, V.I., and Sievers, C. (2002) *Eur. J. Biochem.*, **269**, 5004–5015.
59. Bunik, V.I. (2003) *Eur. J. Biochem.*, **270**, 1036–1042.
60. Shacter, E.Y. (2000) *Drug Metabol. Rev.*, **32**, 307–326.
61. Pantke, U., Volk, T., Schmutzler, M., Kox, W.J., Sitte, N., and Grune, T. (1999) *Free Rad. Biol. Med.*, **27**, 1080–1086.
62. Bagnyukova, T.V., Storey, K.B., and Lushchak, V.I. (2003) *J. Therm. Biol.*, **28**, 21–28.
63. Stadtman, E.R. (1995) *Mol. Aspects Aging*. eds. Esser K., Martin G.M. John Wiley & Sons Ltd. 129–143.
64. Stadtman, E.R., and Berlett, B.S. (1999) in *Reactive Oxygen Species in Biological Systems*, eds. Gilbert & Colton, Kluwer Academic/Plenum Publishers, N.Y. **27**, 657–675.
65. Stadtman, E.R., Oliver, C.N., Starke-Reed, P.E., and Rhee, S.G. (1993) *Toxicol. Ind. Health.*, **9**, 187–196.
66. Stadtman, E.R. (1988) *J. Gerontology: Biological Sciences*, **43**, B112–120.
67. Sohal, R.S. (2002) *Free Rad. Biol. Med.*, **33**, 37–44.
68. Stadtman, E.R., and Berlett, B.S. (1998) *Drug Metabol. Rev.*, **30**, 225–243.

69. Sohal, R.S., Agarwal, S., Dubey, A., Orr, W.C. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 7255–7259.
70. Farmer, K.J., and Sohal, R.S. (1989) *Free Rad. Biol. Med.*, **7**, 23–29.
71. Sohal, R.S., and Dubey, A. (1994) *Free Rad. Biol. Med.*, **16**, 621–626.
72. Dubey, A., Forster, M.J., and Sohal, R.S. (1995) *Arch. Biochem. Biophys.*, **324**, 249–254.
73. Carney, J.M., Starke-Reed, P.E., Oliver, C.N., Landum, R.W., Cheng, M.S., Wu, J.F., and Floyd, R.A. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 3633–3636.
74. Forster, M.J., Dubey, A., Dawson, K.M., Stutts, W.A., Lal, H., and Sohal, R.S. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 4765–4769.
75. Oliver, C.N., Ahn, B.-W., Moerman, E.J., Goldstein, S., and Stadtman, E.R. (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 5488–5491.
76. Cabiscol, E., and Levine, R. L. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 4170–4174.
77. Sahakian, J.A., Szweda, L.I., Friguet, B., Kitani, K., and Levine, R.L. (1995) *Arch. Biochem. Biophys.*, **318**, 411–417.
78. Starke-Reed, P.E., and Oliver, C.N. (1989) *Arch. Biochem. Biophys.* **275**, 559–567.
79. Kanski, J., Alterman, M.A., and Schoneich, C. (2003) *Free Rad. Biol. Med.*, **35**, 1229–1239.
80. Sohal, R.S., and Weindruch, R., (1996) *Science*, **273**, 59–63.
81. Jazwinski, S.M. (1996) *Science*, **273**, 54–74.
82. Butterfield, D.A., Howard, B.J., Yatin, S., Allen, K.L., and Carney, J.M. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 674–678.
83. Yuneva, M. (2002) *Mechanisms of oxidative stress in senescence accelerated mice in Oxidative Stress at Molecular, Cellular and Organ Levels*, Eds. P. Johnston, A. Boldyrev, Research Singpost, Trivandrum India, 131–142.
84. Levine, R.L., and Stadtman, E.R. (2000) in: *Science of Geriatrics*. Eds. Morley, J.E., Armbrecht, H.J., Coe, R.M., Vellas, B., V. I, Serdi Publisher, Paris, Springer Publishing Company. N.Y, 75–94.
85. Oliver, C.N., Starke-Reed, P.E., Stadtman, E.R., Liu, G.J., Carney, J.M., and Floyd, R.A. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 5144–5147.
86. McCord, J.M. (1998) *Seminars in Hematology*, **35**, 5–12.
87. Smith, C.D., Carney, J.M., Starke-Reed, P.E., Oliver, C.N., Stadtman, E.R., Floyd, R.A., and Markesbery, W.R. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 10540–10543.
88. Butterfield, D.A., Hensley, K., Hall, N., Subramaniam, R., Howard, B.J., Cole, P., Yatin, S., LaFontaine, M., Harris, M.E., Aksenova, M., Aksenov, M., and Carney, J.M. (1996) in *Molecular Mechanisms of Dementia*, eds. Wasco W. & Tanzi R.E. Humana Press Inc. Totowa NJ. 145–167.
89. Grune, T. (2000) *Biogerontology*, **1**, 31–40.
90. Hunt, J.V., Bottoms, M.A., and Mitchinson, M.J., (1993) *Biochem. J.*, **291**, 529–535.
91. Shacter, E., Williams, J.A., and Levine, R.L. (1995) *Free Rad. Biol. Med.*, **18**, 815–821.
92. Jasin, H.E. (1983) *J. Immunol.*, **130**, 1918–1923.
93. Carp, H., Miller, F., Hoidal, J.R., and Janoff, A. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 2041–2045.
94. Matheson, N.R., Wong, P.S., and Travis, J. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **88**, 402–409.
95. Garland, D. (1990) *Exp. Eye Res.*, **50**, 677–682.
96. Davies, K.J.A. (1990) *Adv. Exp. Med. Biol.*, **264**, 503–511.
97. Murakami, K., Jahngen, J.H., Lin, S.W., Davies, K.J., and Taylor, A. (1990) *Free Rad. Biol. Med.*, **8**, 217–22.
98. Семчишин, Г.Н. (2002) *Биохимические особенности штаммов Escherichia coli с разной чувствительностью к кислороду*, Автореф. дисс. канд. биол. наук, Черновицкий государственный университет, Черновцы.
99. Lushchak, V.I., and Bagnyukova, T.V. (2006) *Comp. Biochem. Physiol.*, **144**, 283–289.
100. Lushchak, V.I., Bagnyukova, T.V., Husak, V.V., Luzhna, L.I., Lushchak, O.V., and Storey, K.B. (2005) *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **37**, 1670–1680.
101. Lushchak, V.I., Bagnyukova, T.V., Lushchak, O.V., Storey, J.M., and Storey, K.B. (2005) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37**, 1319–1330.
102. Strand, M.K., Stuart, G.R., Longley, M.J., Graziewicz, M.A., Dominick, O.C., and Copeland W.C. (2003) *Eukaryotic Cell*, **2**, 809–820.
103. Jensen, L.T., Sanchez, R.J., Srinivasan, C., Valentine, J.S., and Culotta, V.C. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 29938–29943.
104. Lushchak, V.I., and Gospodaryov, D.V., (2005) *Cell. Biol. Intern.*, **29**, 187–192.
105. Bagnyukova, T.V., Vasylyk O.Yu., Storey, K.B., and Lushchak, V.I. (2005) *Brain Res.*, **1052**, 180–186.
106. Господарьов, Д.В., Байляк, М.М., Луцшак В.І. (2005) *Укр. біохім. журн.*, **77(1)**, 58–64.
107. Lushchak, V., Semchyshyn, H., Mandryk, S., and Lushchak, O., *Arch. Biochem. Biophys.*, **441**, 35–40.
108. Nelson, K., Bose, S.K., and McCord, J.M., (1994) *Free Rad. Biol. Med.*, **16**, 195–200.
109. Lushchak, V., Semchyshyn, H., Lushchak, O., and Mandryk, S., (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **338**, 1739–1744.
110. Байляк М.М., Семчишин Г.М., Луцшак В.І. (2006) *Биохимия*, **71**, 1243–1252.
111. Lushchak V.I. (2006) *Acta Biochim. Polonica*, **53**, 762–771.
112. Dalle-Donne, I., Aldini, G., Carini, M., Colombo, R., Rossi, R., and Milzani, A. (2006) *J. Cell. Mol. Med.*, **10**, 389–406.
113. England, K., O'Driscoll, C., and Cotter, T.G. (2004) *Cell. Death Differ.*, **11**, 252–260.
114. Powell, S.R., Wang, P., Divald, A., Teichberg S., Haridas, V., McCloskey, T.W., Davies, K.J., and Katzeff, H. (2005) *Free Radic. Biol. Med.*, **38**, 1093–1101.
115. Ding, Q., and Keller, J.N. (2001) *Free Radic. Biol. Med.*, **31**, 574–584.
116. Cahuana, G.M., Tejedro, J.R., Jimenez, J., Ramirez, R., Sobrino, F., and Bedoya, F.J. (2003) *Biochem. Pharmacol.*, **66**, 1963–1971.
117. Aguilaniu, H., Gustafsson, L., Rigoulet, M., and Nystrom, T. (2003) *Science*, **299**, 1751–1753.
118. Johansson, E., Olsson, O., and Nystrom, T. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 22204–22208.
119. Hernebring, M., Brolen, G., Aguilaniu, H., Semb H., and Nystrom, T. (2006) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **103**, 7700–7705.
120. Nystrom, T., (2005) *EMBO J.*, **24**, 1311–1317.

## FREE RADICAL PROTEIN OXIDATION AND ITS RELATIONSHIP WITH FUNCTIONAL STATE OF THE ORGANISM

V. I. Lushchak

*Department of Biochemistry, Vassyl Stefanyk Precarpathian  
National University ul. Shevchenko, 57, Ivano-Frankivsk  
76025, Ukraine; fax: (38034)223-1574,  
E-mail: lushchak@pu.if.ua*

Received January 15, 2007

Revision received May 4, 2007

Most reactive oxygen species (ROS) in living organisms are produced as byproducts of many processes. Being highly active, ROS interact with almost all cellular components, modifying their properties. In this review detailed analysis of protein chemical modifications on their interaction with ROS is given with particular interest in the breakage of polypeptide chain and oxidation of side chains of amino acid residues. Special attention is given to identification of products of free radical modification of proteins with a particular interest in formation of additional carbonyl groups, which are the most frequently used markers of these processes. Functional consequences of protein modification by ROS depend on the nature of the ROS and protein as well as particular conditions of their interaction. Special attention is given to the relationship between protein oxidation and functional state of the organism, particularly aging, hyperoxia and hypoxia, heat shock, as well as different pathologies. The final part of the article is devoted to possible ways of protecting proteins against oxidation *in vivo*.

*Key words:* free radicals, protein oxidation, oxidative stress, aging, diabetes mellitus, atherosclerosis, neurodegenerative diseases