БИОФИЗИКА, 2022, том 67, № 1, с. 5–13

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

УДК 577.32; 57.03

К МЕХАНИЗМУ АКТИВАЦИИ КИСЛОРОДА В ХИМИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

© 2022 г. Т.В. Сирота, Н.П. Сирота

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290, Пущино Московской области, ул. Институтская, 3

E-mail: sirotatv@rambler.ru

Поступила в редакцию 18.10.2021 г.
После доработки 18.10.2021 г.
Принята к публикации 27.10.2021 г.

Показано, что при активации кислорода в модельных химических и биологических системах, связанных с образованием супероксидных анион-радикалов ($O_2^{\bullet-}$), происходит снижение содержания молекулярного кислорода в буфере. Рассмотрены следующие химические и ферментативные реакции: автоокисление адреналина в щелочной среде, система феназинметасульфат/НАДН, а также ксантин-ксантиноксидазная реакция. В процессе химического превращения субстрата в каждой из этих реакций наблюдалось потребление O_2 из буфера, что приводило к созданию временных гипоксических условий. Анион-радикалы $O_2^{\bullet-}$ идентифицировались с помощью нитросинего тетразолия и супероксиддисмутазы. Впервые было установлено образование $O_2^{\bullet-}$ в реакции глюкоза–глюкозооксидаза, которую не называют супероксидгенерирующей. Каталаза в исследуемых реакциях выявляла пероксид водорода – продукт диспропорционирования $O_2^{\bullet-}$, и в буфере появлялся молекулярный кислород. Таким образом, показаны следующие превращения кислорода в исследуемых реакциях: $O_2 \rightarrow O_2^{\bullet-} \rightarrow H_2O_2 \rightarrow O_2$, которые могут происходить и во внутриклеточных системах при участии соответствующих оксидоредуктаз и антиоксидантных ферментов.

Ключевые слова: супероксид, пероксид водорода, полярография, адреналин, феназинметасульфат/НАДН, ксантин–ксантиноксидаза, глюкоза–глюкозооксидаза, супероксиддисмутаза, каталаза.

DOI: 10.31857/S000630292201001X

В семействе активных форм кислорода супероксид анион-радикалам ($O_2^{\bullet-}$) принадлежит особая роль, поскольку это и есть первоначально образующийся активированный кислород, который отличается от молекулярного кислорода, присутствующего в воздухе или растворенного в воде и биологических жидкостях. В биологических системах на клеточном уровне супероксид анионы рассматривались ранее исключительно как токсичные субстанции [1–4]. В настоящее время установлено, что в определенных концентрациях $O_2^{\bullet-}$ являются необходимыми компонентами процесса жизнедеятельности клетки и выполняют важнейшие функции в организме – могут быть праймирующими соединениями, сигнальными молекулами, запускающими каскад биохимических и, как следствие, физиологических процессов [3–9]. Избыток $O_2^{\bullet-}$ и недостаточность системы антиоксидантной защиты вызывают состояние окислительного стресса, воспаление и развитие патологии [4–6]. В клетке необходим баланс между генерацией активных форм кислорода и активностью антиоксидантной защиты. Эти процессы регулируются на молекулярно-генетическом уровне путем экспрессии генов и последующего синтеза соответствующих антиоксидантных белков. Баланс на метаболическом уровне поддерживается также и низкомолекулярными соединениями с антиоксидантными свойствами (аскорбаты, ураты и др.). Процесс образования активных форм кислорода сопряжен с происходящими в клетке окислительно-восстановительными реакциями, которые и обеспечивают окислительно-восстановительный гомеостаз. «Редокс-состояние» клетки, ткани или органа в целом – современный термин. Возникло целое научное направление, изучающее эти процессы [10], где важная роль принадлежит исследованиям сигнальных путей, а именно редокс-чувствительной сигнальной системе Nrf2/Keap1/ARE, участвующей в регуляции пролиферации, дифференцировке и апоптозе клеток (аутофагии) [4–10]. Изучение механизма переда-

Сокращения: СОД – супероксиддисмутаза, НСТ – нитросиний тетразолий, ФМС – феназинметасульфат, PBS – калий-фосфатный буфер.

чи сигнала и роль антиоксидантов в этих процессах – актуальная проблема, поэтому важно знать, что же происходит при активации молекулярного кислорода. В настоящей работе, используя модельные химические и ферментативные реакции, мы показали переход молекулярного кислорода в метаболически активное состояние: образование супероксида и последующие его превращения.

Основной путь активации молекулярного кислорода – одноэлектронное восстановление (уравнение 1):

$$O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet -}. \quad (1)$$

«Поставщиками» электронов являются химические и ферментативные реакции, так называемые супероксидгенерирующие системы, в которых в процессе превращения субстрата образующиеся электроны могут поступать на растворенный в среде кислород, создавая $O_2^{\bullet -}$. Таким путем, как показано в нашей работе [11], могут возникать и другие радикальные соединения – карбонатные анион-радикалы ($CO_3^{\bullet -}$) и радикалы диоксида углерода ($CO_2^{\bullet -}$). В организме активация кислорода происходит с участием ферментов оксидоредуктаз: электроны в основном поставляют электрон-транспортная цепь митохондрий и мембранные НАД(Р)Н-оксидазы [4]. Уровень $O_2^{\bullet -}$ в клетке контролируется ферментом супероксиддисмутазой (СОД), которая в результате реакции диспропорционирования (дисмутации) превращает $O_2^{\bullet}$ в пероксид водорода (H_2O_2), (уравнение 2), являясь, таким образом, первичным звеном антиоксидантной защиты:

$$O_2^{\bullet -} + O_2^{\bullet -} + 2H^+ \xrightarrow{\text{СОД}} H_2O_2 + O_2. \quad (2)$$

Цель настоящего исследования – экспериментально показать «судьбу» молекулярного кислорода, растворенного в буфере и участвующего в химических и ферментативных реакциях, где в процессе превращения субстрата происходит сопряженное образование $O_2^{\bullet -}$. В полярографической кювете были воспроизведены реакции, используемые как супероксидгенерирующие модельные системы для спектрофотометрических методов определения активности СОД [12–14]. В этих реакциях для идентификации супероксид анионов применяется специфический реагент нитросиний тетразолий (НСТ), который под действием $O_2^{\bullet -}$ восстанавливается до цветного диформазана и регистрируется при длине волны 560 нм [12–15]. СОД ингибирует этот процесс, количество образовавшегося диформазана в процентном отношении служит мерой оценки активности фермента. Такой подход является общепринятым и применяется в различных спектрофотометрических методах измерения активности фермента [12–15]. Мы использовали следующие модельные супероксидгенерирующие системы: реакцию автоокисления адреналина в щелочной среде [11, 12, 16–19], систему феназинметасульфат/НАДН (ФМС/НАДН) [13] и ксантин-ксантиноксидазную реакцию [14]. Такой же эксперимент был проведен и с ферментативной реакцией глюкоза–глюкозооксидаза, которую, однако, не называют супероксидгенерирующей, обычно она используется как источник H_2O_2 [20]. Но поскольку пероксид водорода – это продукт реакции дисмутации, образующийся из $O_2^{\bullet -}$, вероятно и в этой оксидазной реакции должен первоначально создаваться супероксид анион. Однако такие данные в литературе не обнаружены. Используя определенный подход, мы впервые идентифицировали $O_2^{\bullet -}$ и в этой реакции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Полярография. Эксперименты проводили на полярографической установке с закрытым платиновым электродом Кларка в термостатированной кювете объемом 1 мл с фиксированной скоростью перемешивания. Система автоматической регистрации потребления кислорода (АЦП и программное обеспечение) была разработана В.А. Шлектаревым (ИТЭБ РАН) и В.С. Семеновым (ИБК РАН) [21]. Условия каждой модельной реакции, описанные в литературе для спектрофотометрических методов, были воспроизведены в полярографической кювете с некоторой коррекцией (например, температура, концентрации веществ и др.), что указано в подписях к рисункам.

Автоокисление адреналина. Реакцию автоокисления адреналина в щелочном карбонатном буфере осуществляли по протоколу, разработанному нами ранее [22]. Использовали 0.2 М карбонатный буфер, pH 10.55; температура 37°С. Реакцию начинали внесением в кювету 0.23 мМ адреналина гидрохлорида.

ФМС/НАДН реакция. Условия проведения реакции, описанные в спектрофотометрическом исследовании [13], были соблюдены и в полярографических экспериментах, исключая из среды НСТ. Использовали калий-фосфатный буфер (PBS) (150 мМ KCl, 20 мМ KH_2PO_4, pH 7.4), содержащий 60 мкМ ФМС, реакцию начинали внесением 150 мкМ НАДН. Температура 24°С.

Ферментативная супероксидгенерирующая реакция «ксантин–ксантиноксидаза». При полярографии были воспроизведены условия реакции, описанные в работе [14]: 50 мМ Na-карбонатный буфер с 0.4 мМ ЭДТА, pH 10.2. Содержание ксантиноксидазы – 11.0 мкг белка /мл, НСТ отсутствовал. Реакцию начинали внесением 100 мкМ ксантина. Температура 26°С.

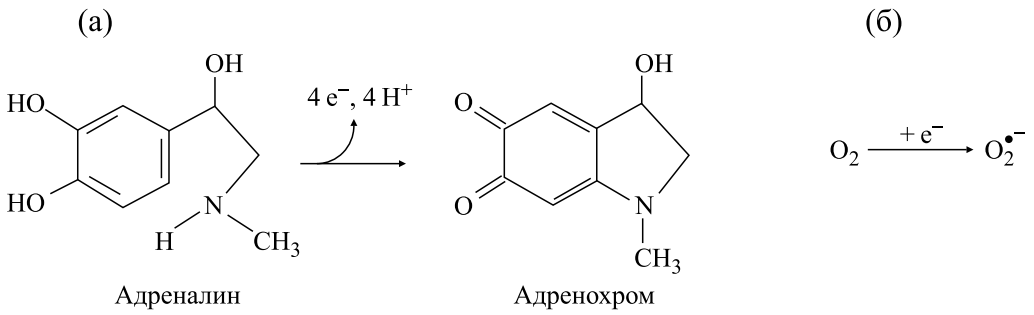

Рис. 1. Краткая схема хиноидного окисления адреналина до адренохрома (а), сопряженная с образованием супероксидных анион-радикалов (б). Подробности см. в работах [17, 19].

Ферментативная система глюкоза-глюкозооксидаза. Условия проведения реакции: PBS-буфер, pH 7.3, содержащий 5 мМ глюкозы [20, 23]. Реакцию начинали добавлением фермента. Количество глюкозооксидазы в кювете 7.5 мкг белка/мл, температура реакции 21°C.

Спектральные измерения осуществляли в термостатированной кювете на спектрофотометре UV/VIS Uvikon-923 (Италия) в режиме «time Driver» при длине волны 560 нм (регистрация диформазана) или 347 нм (регистрация адренохрома).

Реактивы. В работе использовали следующие реактивы: Na_2CO_3, нитросиний тетразолий, ксантин, ксантиноксидазу (КФ 1.1.3.22), каталазу (КФ 1.11.1.6), супероксиддисмутазу (КФ 1.15.1.1), глюкозооксидазу (КФ 1.1.3.4) – все от компании Sigma (США); $NaHCO_3$ (J.T. Baker, Нидерланды); ФМС и НАДН (Sigma-Aldrich, Fluka, Германия); фармакопейную форму 0.1% адреналина гидрохлорида (Московский эндокринный завод).

Статистика. Статистическую обработку результатов проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента в программе MS Excel: определяли среднее значение (*M*) и стандартное отклонение (*s.d.*). Представленные графики являются конкретными экспериментальными кривыми, выбранными из независимых многократно проведенных при четырех-шести параллельных измерениях в каждом опыте.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Активация кислорода в реакции автоокисления адреналина. Эта система известна как процесс многостадийного химического превращения катехоламина адреналина до конечного продукта адренохрома и сопряжена с образованием супероксида [24–26]. Упрощенная схема окисления адреналина представлена на рис. 1, детально эта химическая реакция описана в литературе [24, 25] и наших работах [11, 12, 16, 17, 19].

Эта реакция впервые была использована как модельная система генерации супероксида для определения активности СОД [26]. Ранее с использованием полярографического метода нами было показано, что происходит в кювете при автоокислении адреналина в щелочном карбонатном буфере [22]. Позднее мы исследовали эту реакцию с применением НСТ [12].

На рис. 2 представлена запись полярографической регистрации процесса автоокисления адреналина в щелочном буфере: наблюдается снижение концентрации кислорода в среде, связанное с его использованием в этой химической реакции (кривая *1*). Очевидно, что происходит переход молекулярного кислорода в форму радикала согласно уравнению (1), и эту форму кислорода платиновый электрод не регистрирует. Образовавшийся в среде супероксид анион выявляется внесенным в полярографическую кювету НСТ: обнаруживается диформазан – цветной продукт реакции восстановления НСТ супероксидом (качественная оценка). Добавленная по ходу реакции СОД тормозит потребление кислорода (рис. 2, кривая *2*), что также указывает на появление в кювете супероксида. Если СОД находится в буфере, то после внесения адреналина наблюдается увеличенный лаг-период и значительно сниженная скорость потребления кислорода (рис. 2, кривая *3*). Наличие индукционного периода определяется временем инициации цепной реакции, что характерно для подобных сопряженных процессов. В присутствии СОД, вероятно, замедляется инициирование цепи и потому снижается потребление кислорода. Возможно и такое объяснение: СОД катализирует реакцию дисмутации, продуктом которой кроме пероксида водорода является и молекулярный кислород; платиновый электрод, регистрирующий именно молекулярный кислород, отображает как появление кислорода в кювете, так и одновременно убыль его в процессе автоокисления адреналина.

Наличие лаг-периода и снижение скорости потребление кислорода регистрируются и в при-

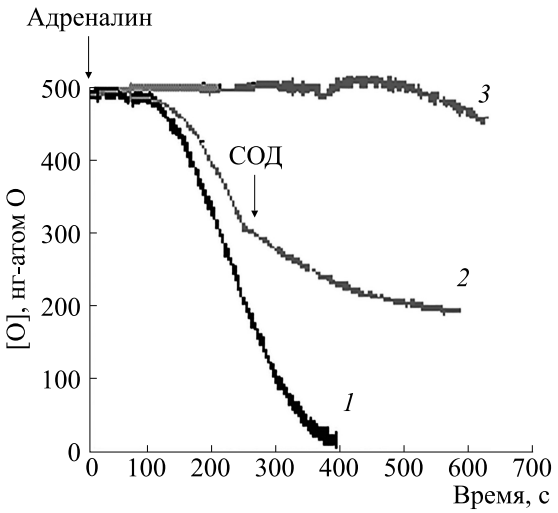

Рис. 2. Полярографическая регистрация потребления кислорода в процессе автоокисления 0.23 мМ адреналина в 0.2 М карбонатном буфере, pH 10.55: *1* – адреналин внесен в буфер; *2* – то же, но по ходу реакции добавлена СОД (5.5 мкг/мл); *3* – СОД добавлена в буфер до внесения адреналина. Температура 37°С.

сутствии различных материалов, обладающих антиоксидантными свойствами, что позволяет количественно оценивать их антиоксидантную активность [22].

В предыдущих наших работах методического характера вопрос об активации кислорода в этой реакции не обсуждался [14, 18–22].

Активация кислорода в химической реакции ФМС/НАДН. Реакция известна как супероксидгенерирующая система; она проводится в присутствии НСТ и лежит в основе разработанного спектрофотометрического метода определения активности СОД [13]: измеряют при 560 нм образование диформазана, продукта восстановления НСТ супероксидом, образующимся в этой системе. Полярографические исследования этой реакции в литературе не обнаружены.

На рис. 3 представлена полярографическая регистрация процесса, происходящего в этой реакции: ФМС находится в буфере, добавка НАДН вызывает интенсивное потребление кислорода и убыль его из среды. На каждую последующую добавку НАДН при достаточной концентрации ФМС в буфере происходит очередное исчерпание молекулярного кислорода. Такая картина имеет место и при добавлении ФМС, если НАДН нахо-

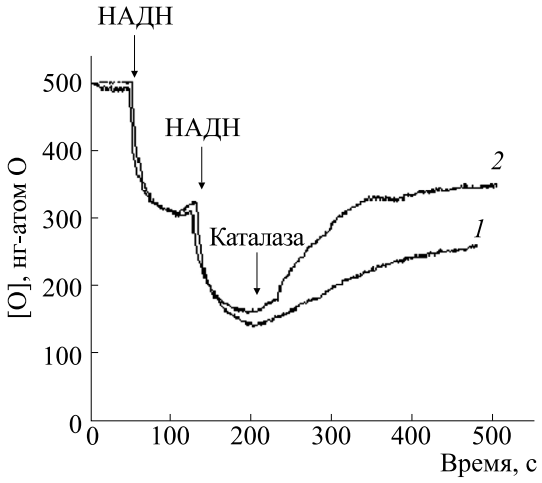

Рис. 3. Регистрация потребления кислорода в химической супероксидгенерирующей системе ФМС/НАДН. Условия реакции: PBS-буфер, pH 7.4; 60 мкМ ФМС в буфере. Стрелкой указано внесение НАДН (дважды по 150 мкМ): *1* – самопроизвольный выход кислорода; *2* – эффект от добавки каталазы (50 мкг/мл). Температура 24°С.

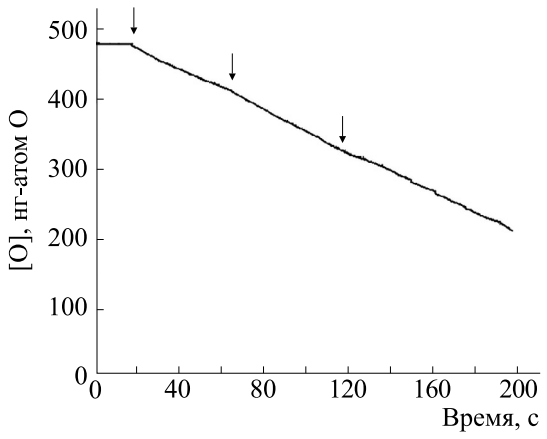

Рис. 4. Регистрация потребления кислорода в ферментативной супероксидгенерирующей реакции ксантин–ксантиноксидаза. Условия реакции: 50 мМ карбонатный буфер, pH 10.2, 0.4 мМ ЭДТА. Реакцию начинали внесением 100 мкМ ксантина, стрелками указаны повторные добавки субстрата. Концентрация фермента в среде инкубации 11.0 мкг/мл. Температура 26°С.

дится в буфере (данные не приводятся). В процессе потребления кислорода в этой реакции происходит образование $O_2^{\bullet-}$. В оригинальном спектрофотометрическом методе супероксид идентифицируется присутствующим в среде НСТ [15]. В нашем эксперименте при внесении в полярографическую кювету НСТ в процессе реакции наблюдается интенсивное образование фиолетово-синего диформазана. На рис. 3 (кривая *2*) показано, что добавленная каталаза выявляет пероксид водорода, который образуется в кювете в результате реакции диспропорционирования согласно уравнению (2): в буфере появляется кислород в количестве 177 н-г атом О/мл. Также наблюдается и спонтанное появление кислорода в среде – 115 н-г атом О/мл (рис. 3, кривая *1*).

Таким образом, в модельной системе ФМС/НАДН происходит активация кислорода, возникает $O_2^{\bullet-}$ с последующим образованием пероксида водорода.

Активация кислорода в ферментативной реакции ксантин–ксантиноксидаза. Как супероксидгенерирующая модель эта реакция часто применяется для определения активности СОД известным спектрофотометрическим методом: в присутствии НСТ идентифицируется образующийся супероксид [14]. Фермент ксантиноксидаза – хорошо изученный флавопротеид, катализирующий реакцию, которая представлена следующим уравнением [27]:

$$\text{ксантин} + O_2 + 2H_2O \rightarrow$$
$$\rightarrow \text{мочевая кислота} + 2H_2O_2. \qquad (3)$$

В действительности же эта реакция проходит в два этапа, именно на первом этапе НСТ и выявляет $O_2^{\bullet-}$:

$$\text{ксантин} + O_2 + 2H_2O \rightarrow$$
$$\rightarrow \text{мочевая кислота} + 2O_2^{\bullet-} + 4H^+. \qquad (4)$$

На рис. 4 представлена полярографическая кривая, иллюстрирующая процесс использования кислорода при функционировании фермента. Ксантиноксидаза присутствует в буфере, добавление субстрата в кювету «запускает» ферментативную реакцию и сопряженный с нею процесс образования супероксида, который происходит согласно уравнению (1). Платиновый электрод регистрирует убыль молекулярного кислорода из среды. Повторные добавки ксантина в представленном эксперименте не стимулируют скорость реакции, что указывает на достаточность субстрата для данного количества фермента. При других соотношениях количества фермента и субстрата отмечалась активация потребления кислорода и на повторные внесения субстрата (данные не приводятся). Образование супероксида в этом процессе также выявляется с помощью НСТ, который используется в оригинальном методе [14]. Именно спектрофотометрическим методом мы первоначально определяли активность фермента, подбирая необходимые соотношения фермента и субстрата, и затем проводили полярографические эксперименты.

Таким образом, показано, что в данной супероксидгенерирующей системе наблюдается убыль кислорода из среды и образование супероксида.

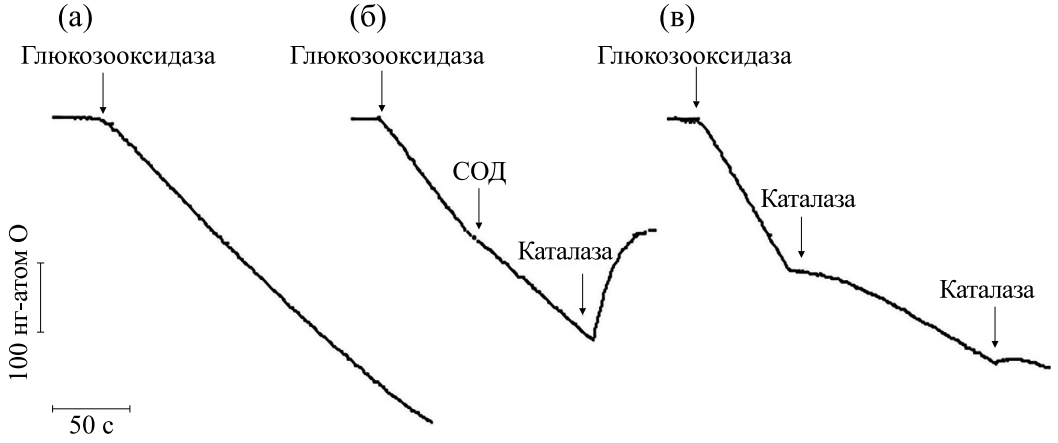

Рис. 5. (а) – Регистрация потребления кислорода при функционировании глюкозооксидазы, время внесения фермента в кювету здесь и далее указано стрелкой; (б) – в тех же условиях по ходу реакции добавлены СОД и затем каталаза; (в) – по ходу реакции дважды добавлена каталаза. Условия реакции: PBS-буфер, pH 7.3; 5 мМ глюкозы, концентрация глюкозоокси-дазы – 7.5 мкг/мл. Добавки СОД – 5.5 мкг/мл, каталазы – 50 мкг/мл. Температура 21°С.

Следует отметить, что в организме в нормальных условиях ксантиноксидаза существует как ксантиндегидрогеназа, однако при избытке гипоксантина и ксантина, образующихся при окислительном метаболизме пуринов [27], фермент приобретает функцию оксидазы и использует оба эти соединения как субстрат, катализируя образование мочевой кислоты и являясь таким образом мощным продуцентом супероксид анионов [28].

Активация кислорода в реакции глюкоза–глюкозооксидаза. Фермент глюкозооксидаза, как и ксантиноксидаза, относится к классу оксидоредуктаз и содержит кофактор флавинадениндинуклеотид, однако, катализируемая с участием глюкозооксидазы реакция в литературе не обсуждается как супероксидгенерирующая: т.е. речь не идет об образовании $O_2^{\bullet -}$. Уравнение этой реакции представлено ниже:

$$\beta\text{-D-глюкоза} + O_2 + 2H_2O \xrightarrow{\text{Глюкозооксидаза}} \beta\text{-D-глюконо-1,5-лактон} + 2H_2O_2 \quad (5)$$

$$\beta\text{-D-глюконо-1,5-лактон} + H_2O \downarrow \text{Глюконовая кислота}$$

Химическими формулами детально представлены этапы восстановления кислорода флавинами и делается предположение: «не исключено образование супероксидного анион-радикала *вместо* H_2O_2» [27]. Эту ферментативную систему используют в качестве модели «H_2O_2-повреждения» [20], т.е. как повреждающий агент рассматривается именно H_2O_2, а не $O_2^{\bullet -}$, хотя первоначально, очевидно, возникает супероксид анион и затем пероксид водорода как продукт реакции диспропорционирования. В литературе это не обсуждается.

Реакция была нами воспроизведена в полярографической кювете. Данные, представленные на рис. 5, демонстрируют убыль кислорода из среды, что указывает на использование молекулярного кислорода в ходе химического превращения глюкозы (уравнение (5)). В кювете одновременно с окислением глюкозы до глюконовой кислоты происходит и сопряженный процесс активации молекулярного кислорода. Рис. 5б показывает: СОД замедляет процесс потребления кислорода, что связано с превращением $O_2^{\bullet -}$ в пероксид водорода согласно уравнению (2) и каталаза обнаруживает в кювете H_2O_2. Чувствительность данной реакции к СОД, а также появление H_2O_2 указывают на существование в этой системе $O_2^{\bullet -}$. Наблюдаемое торможение реакции при внесении СОД связано, вероятно, с появлением в кювете молекулярного кислорода в результате реакции дисмутации, которое визуально воспринимается как замедление процесса потребления кислорода, что и регистрирует платиновый электрод. Однако НСТ, добавленный в кювету, где происходит

окисление глюкозы, не выявляет $O_2^{\bullet-}$, как это наблюдалось в исследованных выше реакциях. Возможно, что условия, в которых происходит данная реакция, не оптимальны для существования супероксида. Мы изменили состав буфера и сделали щелочным его pH, поскольку известно, что супероксид анионам необходимы карбонат/бикарбонатные ионы [11, 29] и время жизни $O_2^{\bullet-}$ увеличивается в щелочной среде [30, 31]. В таблице представлены результаты спектрофотометрического измерения образования диформазана в разных условиях проведения реакции. Не появляется диформазан в среде после внесения фермента, если реакция проводится в PBS-буфере с pH 7.3 в присутствии субстрата и НСТ, т.е. $O_2^{\bullet-}$ не обнаруживается. В щелочных условиях: (0.2 М карбонатный буфер, pH 10.55) при наличии субстрата и НСТ внесение глюкозооксидазы сразу же выявляет цветной диформазан и интенсивность окраски в кювете увеличивается во времени (см. таблицу). Очевидно, потому и используют в супероксидгенерирующих системах щелочные карбонатные буферы [14, 16, 26]. Подтверждение этому находим в работе [30], где показано, что образование супероксида и выход адренохрома при автоокислении адреналина возрастает при более высоком pH, а для реакции диспропорционирования нужен H^+ и этот процесс происходит при низком значении pH. В щелочных условиях и в присутствии карбонатных ионов, вероятно, увеличивается время существования супероксид анион-радикалов, что и позволило нам выявить $O_2^{\bullet-}$ в реакции глюкоза–глюкозооксидаза.

Следует отметить, что глюкозооксидаза широко используется в промышленных технологиях (в пищевой промышленности, химической, фармацевтической, клинической химии, биотехнологии и других отраслях) для обеззараживания и сохранности продуктов, поскольку «удаляет» кислород из среды, используя эндогенную глюкозу как субстрат и молекулярный кислород в качестве акцептора электронов, с одновременным выделением H_2O_2, как известно из литературы [32]. Однако, согласно нашим данным, первоначально образуется именно супероксид, и затем уже пероксид водорода. Оба эти продукта обладают бактерицидным действием и в практике, вероятно, не так важно, чем «убивать» бактерии: супероксид-радикалом $O_2^{\bullet-}$, который первоначально образуется в этой реакции, или H_2O_2, который создается далее из $O_2^{\bullet-}$. В научных экспериментах необходимо учитывать, что первичным продуктом реакции при функционировании глюкозооксидазы являются именно супероксид анионы. Иммобилизованные препараты этого фермента используются как биосенсор в работе глюкометра.

Образование диформазана при функционировании глюкозооксидазы

Время, мин	Оптическая плотность, $E_{560\ нм}$	
	pH 7.3*	pH 10.55**
1	0.022 ± 0.003	0.0433 ± 0.003
5	0.022 ± 0.003	0.0838 ± 0.003

Примечание. Условия проведения реакции: * – PBS-буфер, pH 7.3, 7.5 мМ глюкозы, 125 мкМ НСТ, 6.0 мкг/мл глюкозооксидазы; ** – 0.2 М карбонатный буфер, pH 10.55, 7.5 мМ глюкозы, 125 мкМ НСТ, 6.0 мкг/мл глюкозооксидазы.

Таким образом, в настоящем исследовании экспериментально показано, что в химических и ферментативных системах образуется сначала $O_2^{\bullet-}$ – это и есть активированный кислород, который далее превращается в пероксид водорода спонтанно или при участии СОД и, что особенно важно, в среду вновь поступает молекулярный кислород. Появление молекулярного кислорода в среде, в клетках организма, обеспечивают ферменты каталаза и пероксидаза, таким образом в организме сохраняется и поддерживается кислородный гомеостаз. Оксидазный процесс превращения молекулярного кислорода в супероксид сопровождается убылью кислорода из среды, т.е. возникают гипоксические условия. Появление кислорода при участии каталазы и/или СОД может восстанавливать его баланс в клетке. Такие превращения кислорода и показаны в настоящем исследовании: $O_2 \rightarrow O_2^{\bullet-} \rightarrow H_2O_2 \rightarrow O_2$.

Следует отметить работы Тимочко и соавт. [33], которые сформулировали гипотезу о наличии в организме запасного депо кислорода в виде пероксида водорода и гидропероксидов липидов, функционально связанного с системой пероксидаза–каталаза и СОД. Эта система может высвобождать молекулярный кислород и таким образом поддерживать градиент кислорода в органах и тканях [33]. Авторами введено понятие «эндогенный кислород». Первоначально происходит его исчерпание из среды, переход в активированное состояние, затем создание «запасного депо» и последующее высвобождение кислорода из пероксида водорода и гидропероксидов липидов под действием соответствующих ферментов [33].

Также важно отметить, что намного раньше термин «активированный кислород» или «метаболически активный кислород» впервые был введен

А.Н. Бахом [34, 35]. Однако в его работах речь велась исключительно о пероксиде водорода, из которого под действием каталазы или пероксидазы и образуется «активированный кислород». В современном понимании расстановка акцентов несколько иная: первоначально в химических и ферментативных (оксидазных) реакциях в клетке и организме образуется супероксид и затем пероксид водорода, уровень которого контролируется пероксидазой и каталазой. Также А.Н. Бахом впервые был сделан вывод о важной положительной роли пероксида водорода в жизни живых организмов [35].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В исследованных модельных системах экспериментально показано, что в химических реакциях и в процессе функционирования ферментов класса оксидоредуктаз (оксидаз), изначально образуются супероксид анионы, которые и являются метаболическим активированным кислородом. Происходящие превращения кислорода ($O_2 \rightarrow O_2^{\bullet -} \rightarrow H_2O_2 \rightarrow O_2$) могут иметь место во внутриклеточных системах при участии соответствующих оксидоредуктаз и антиоксидантных ферментов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа проведена в рамках бюджетного финансирования ИТЭБ РАН по теме 04, направление 63.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. R. Gerschman, D. L. Gilbert, S. W. Nye, et al., Science **119** (3097), 623 (1954).
2. В. Г. Колпаков, Журн. невропатологии и психиатрии им. С. С. Корсакова **74** (8), 1254 (1974).
3. A. Bindoli, M. P. Rigobello, D. J. Deeble, Free Radic. Biol. Med., **13**, 391 (1992).
4. M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, et al., Int. J. Biochem. Cell Biol. **39** (1), 44 (2007). DOI: 10.1016/j.biocel.2006.07.001
5. Е. Е. Дубинина, *Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток* («Мед. пресса», Санкт-Петербург, 2006), сс. 111–135.
6. Е. Б. Меньщикова, В. З. Ланкин, Н. К. Зенков и др., *Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты* («Слово», М., 2006), сс. 35–40.
7. B. Halliwell, Trends Biochem Sci, **31** (9), 509 (2006). DOI: 10.1016/j.tibs.2006.07.005
8. P. D. Ray, B.W. Huang, and Y. Tsuji, Cell. Signal. **24**, 981 (2012). DOI: 10.1016/j.cellsig.2012.01.008
9. Н. К. Зенков, А. Р. Колпаков и Е. Б. Менщикова, Сибирский науч. мед. журн. **35** (5), 5 (2015).
10. https://www.isanh.net.
11. Т. В. Сирота, Биомед. химия **61** (1), 115 (2015).
12. Т. В. Сирота, Биомед. химия **59** (4), 399 (2013).
13. M. Nishikimi, N. A. Rao, and K. Yagi, Biochem. Biophys. Res. Commun. **46** (2), 849 (1972). DOI: 10.1016/s0006-291x(72)80218-3
14. C. Beauchamp and I. Fridovich, Anal. Biochem. **44**, 276 (1971).
15. F. P. Altman, Progr. Histochem. Cytochem. **9**, 1 (1976).
16. Т. В. Сирота, Вопр. мед. химии **45**, 263 (1999).
17. Т. В. Сирота, Патент РФ на изобретение № 2144674, Б.И. № 2 (2000).
18. Т. В. Сирота, Биомед. химия **62,** 650 (2016). DOI: 10.18097/PBMC20166206650
19. Т. В. Сирота, Биофизика **65** (4), 648 (2020). DOI: 10.31857/S0006302920040031
20. M. Tenopoulou, P. T. Doulias, A. Barbouti, et al., Biochem. J., **387,** 703 (2005). DOI: 10.1042/BJ20041650
21. Т. В. Сирота, О. П. Елисеева, Н. В. Хундерякова и др., Укр. биохим. журн. **79** (5), 196 (2007).
22. Т. В. Сирота, Биомед. химия, **58** (1), 77 (2012).
23. Л. И. Казакова, Н. П. Сирота, Т. В. Сирота и Л. И. Шабарчина, Журн. физ. химии **91** (9), 1613 (2017). DOI: 10.7868/S0044453717090187
24. A. Bindoli, M. P. Rigobello, and L. Galzigna, Toxicol. Lett. **48**, 3 (1989). DOI: 10.1016/0378-4274(89)90180-X
25. F. Marques, R. O. Duarte, J. J. Moura, and M. P. Bicho, Biol. Signals **5**, 275 (1996). DOI: 10.1159/000109200
26. H. P. Misra and I. Fridovich, J. Biol. Chem. **247**, 3170 (1972).
27. Д. Мецлер. *Биохимия: химические реакции в живой клетке* (Мир, М., 1980), т. 2, сс. 256–257, 265–268, 274.
28. R. Fried, L. W. Fried, and D. R. Babin, Eur. J. Biochem. **33**, 439 (1973). DOI: 10.1111/j.1432-1033.1973.tb02701.x
29. В. Л. Воейков, Н. Д. Виленская, До Минь Ха и др., Журн. физ. химии **86** (9), 1518 (2012).
30. R. Alhasan and D. Njus, Anal. Biochem. **381** (1), 142 (2008). DOI: 10.1016/j.ab.2008.06.030

31. Н. К. Зенков и Е. Б. Меньщикова, Успехи соврем. биологии **113** (3), 286 (1993).
32. S. B. Bankar, M. V. Bule, R. S. Singhal, and L. Ananthanarayan, Biotechnol. Adv. **27** (4), 489 (2009). DOI: 10.1016/j.biotechadv.2009.04.003
33. М. Т. Тимочко, Л. И. Кобылинская и Я. И. Алексеевич, Hypoxia Med. J. **6** (4), 154 (1998).
34. А. Н. Бах, Журн. физ.-хим. общества **29** (6), 373 (1897).
35. А. Н. Бах, *Сборник избранных трудов* (ОНТИ Хим-Теорет, Л., 1937), сс. 181–196.

On the Mechanism of Oxygen Activation in Chemical and Biological Systems

T.V. Sirota and N.P. Sirota

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

It has been shown that activation of oxygen in model chemical and biological systems associated with the formation of superoxide anion radicals ($O_2^{\bullet-}$) leads to a decrease in the content of molecular oxygen in the buffer. The following chemical and enzymatic reactions have been considered: autooxidation of adrenaline in an alkaline medium, phenazine methosulfate/NADH, as well as xanthine–xanthine oxidase reaction. It has been found that when the chemical transformation of the substrate occurs in each of these reactions, O_2 is consumed from the buffer, leading to temporary hypoxic conditions. Nitroblue tetrazolium and superoxide dismutase were used to determine the production of anion radicals $O_2^{\bullet-}$. It has been discovered for the first time, that $O_2^{\bullet-}$ is produced in the reaction of glucose-glucose oxidase, known as the reaction that does not generate superoxide. Catalase in reactions under study reacted with the hydrogen peroxide – the product of $O_2^{\bullet-}$ disproportionation, and molecular oxygen was detected in the buffer. Thus, the following oxygen transformations are shown: $O_2 \rightarrow O_2^{\bullet-} \rightarrow H_2O_2 \rightarrow O_2$, which can also occur in intracellular systems with the involvement of appropriate oxidoreductases and antioxidant enzymes.

Keywords: superoxide, hydrogen peroxide, polarography, adrenaline, phenazine methosulfate/NADH, xanthine–xanthine oxidase, glucose–glucose oxidase, superoxide dismutase, catalase