

УДК 577.12

## ГИДРОПЕРОКСИД-ВОССТАНАВЛИВАЮЩИЕ ФЕРМЕНТНЫЕ СИСТЕМЫ В РЕГУЛЯЦИИ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ

### Обзор

© 2021 М.Г. Шарипов<sup>1\*</sup>, С.В. Гудков<sup>2,3,4</sup>, В.З. Ланкин<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Институт биофизики клетки ФИЦ ПНЦБИ РАН, 142290 Пущино, Московская обл., Россия; электронная почта: sharapov.mars@gmail.com

<sup>2</sup> Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, 119991 Москва, Россия

<sup>3</sup> Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, 603022 Нижний Новгород, Россия

<sup>4</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии, 143050 Большие Вяземы, Россия

<sup>5</sup> ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России, 121552 Москва, Россия

Поступила в редакцию 18.05.2021

После доработки 06.07.2021

Принята к публикации 06.07.2021

В обзоре представлены современные данные о молекулярных механизмах развития окислительного стресса. Рассмотрены основные этапы свободнорадикальных реакций в процессе окислительного стресса. Обсуждаются эндогенные и экзогенные причины развития окислительного стресса, включая дисфункцию системы оксидоредуктаз клетки, а также воздействие различных внешних физико-химических факторов. Описаны основные участники антиоксидантной системы защиты, а также этапы её эволюции, при этом основной акцент сделан на нескольких семействах пероксидаз: пероксиредоксинах, глутатионпероксидазах и глутатион-S-трансферазах, которые достаточно близки по своим филогенетическим, структурным и каталитическим свойствам. Подробно рассмотрены субстратная специфичность, сходства и различия механизмов катализа этих ферментов. Обсуждается роль пероксиредоксинов, глутатионпероксидаз и глутатион-S-трансфераз в регуляции внутриклеточных и межклеточных сигналов, опосредованных гидропероксидами и взаимодействием с другими рецепторными/нерецепторными белками. Показана важная роль этих ферментов не только в антиоксидантной защите, но также в регуляции таких процессов клетки как рост, дифференцировка и апоптоз.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** окислительный стресс, активные формы кислорода, свободные радикалы, пероксиредоксины, глутатионпероксидазы, глутатион-S-трансферазы.

DOI: 10.31857/S0320972521100067

### АФК, СВОБОДНЫЕ РАДИКАЛЫ И ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС

Потребление кислорода является неотъемлемым проявлением жизни аэробных организмов. Переход на кислородное окисление органических субстратов способствовал увеличению эффективности получения энергии, а также обеспечил бурный эволюционный прогресс живых организмов [1]. Тем не менее у такой формы

метаболического прогресса существует обратная сторона — возможность образования побочных продуктов кислородного дыхания, таких как активные формы кислорода (АФК).

**Источники АФК.** Известно, что примерно 90% АФК в клетке образуется в митохондриях из-за утечки электронов на молекулярный кислород в дыхательной цепи [2, 3]. По расчётам, утечка электронов в электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) митохондрий составляет 1–2% от об-

Принятые сокращения: АФГ — активные формы галогенов; АФК — активные формы кислорода; РФА — реактивные формы азота; СР — свободный радикал; ПОЛ — перекисное окисление липидов;  $O_2^-$  — супероксидный анион-радикал; GPx — глутатионпероксидаза; GR — глутатионредуктаза; Gtx — глутаредоксин; GSH — глутатион; GST — глутатион-S-трансфераза; C<sub>p</sub> — пероксидазный остаток цистеина (peroxidatic Cys); C<sub>R</sub> — восстанавливающий остаток цистеина (resolving Cys); In<sup>•</sup> — свободные радикалы антиоксидантов; HO<sup>•</sup> — гидроксильный радикал; L<sup>•</sup> — алкильный липидный радикал; LH — полиненасыщенные жирные кислоты; LO<sup>•</sup> — липоксильный радикал; LOO<sup>•</sup> — липопероксильный радикал; LOOH — липогидропероксид; PDI — протеиндисульфидизомераза; Prx (Prdx) — пероксиредоксин; RO<sup>•</sup> — алкоксильный радикал; SOD — супероксиддисмутаза; Ttx — тиоредоксин; TtxR — тиоредоксинредуктаза.

\* Адресат для корреспонденции.

шего потока [4]. Примерно 0,2% потребляемого кислорода переходит в супероксидный анион-радикал  $O_2^{\cdot-}$ , а 0,4% превращается в  $H_2O_2$ . Примечательно, что в нормальных условиях такая пропорция (1 : 2) между  $O_2^{\cdot-}$  и  $H_2O_2$  постоянна и не зависит от концентрации кислорода в воздушной среде и частоты дыхания. При этом чем выше метаболическая активность тканей/клеток, тем больше образуется АФК [5]. Например, миокард, в котором митохондрии составляют до 25–30% от массы, потребляет около 8 мМ кислорода в минуту, при этом образуя ~ 0,1 мМ супероксидных анион-радикалов. Превышение нормального потребления кислорода клетками чрезвычайно опасно, т.к. во время гипероксии скорость утечки электронов в митохондриях и образования АФК прямо пропорционально увеличению парциального давления кислорода. Например, здоровые взрослые крысы умирают в течение 72 часов, если их поместить в атмосферу 100% кислорода, что в 5 раз превышает его нормальную концентрацию в воздухе [6].

Оставшиеся 10% образующихся АФК в клетке в нормальных условиях приходится на работу индуцируемых ферментов-оксидаз: NADPH-оксидазы (NOX), ксантиноксидазы (XO), циклооксигеназы (COX), NO-синтазы (NOS) и т.д. [7]. Следует отметить, что вклад индуцируемых ферментов-оксидаз в образование эндогенных АФК может значительно возрастать. Например, было показано, что NADPH-оксидазы в нейтрофилах, макрофагах и клетках микроглии до 90% потребляемого кислорода могут конвертировать в  $O_2^{\cdot-}$  и  $H_2O_2$  [7].

**Классификация АФК.** По физико-химическим свойствам АФК можно разделить на две больших группы: радикальные и нерадикальные. Радикальные формы АФК содержат один или несколько неспаренных электронов, в результате чего они являются чрезвычайно нестабильными и высокореакционноспособными. Такие радикальные АФК за короткий период времени рекомбинируют друг с другом или реагируют с субстратом. Радикал может отдать свой неспаренный электрон или, напротив, забрать электрон у другой молекулы, чтобы стабилизировать электронную оболочку. Атакованная радикалом молекула, в свою очередь, сама становится свободным радикалом (СР), что запускает цепную реакцию и приводит к повреждению находящихся в непосредственной близости биомолекул [8].

К радикальным АФК обычно относят: супероксидный анион-радикал ( $O_2^{\cdot-}$ ), гидроксильный радикал ( $HO^{\cdot}$ ), гидропероксильный радикал ( $HO_2^{\cdot}$ ), алкоксильный радикал ( $RO^{\cdot}$ ), пероксильный радикал ( $RO_2^{\cdot}$ ) и др. К нерадикальным

АФК относятся пероксид водорода ( $H_2O_2$ ), органические гидропероксиды ( $ROOH$ ), а также синглетный кислород ( $^1O_2$ ) и озон ( $O_3$ ) [1].

Термин АФК вобрал в себя очень широкий спектр соединений как неорганической, так и органической природы, обладающих различными свойствами. Это связано с тем, что АФК (особенно свободнорадикальные) способны вступать в реакции практически с любыми молекулами. Например, АФК могут взаимодействовать с соединениями азота, тем самым способствуя образованию реактивных форм азота (РФА), таких как: монооксид азота ( $NO^{\cdot}$ ), диоксид азота ( $NO_2^{\cdot}$ ), пероксинитрит ( $ONOO^{\cdot-}$ ), пероксиазотистая кислота ( $ONOOH$ ) и др. Взаимодействие АФК с галогенами приводит к образованию гипогалогенитов ( $HOCl$ ,  $HOBr$ ,  $HOI$ ), относящихся к активным формам галогенов (АФГ). Для продуктов цепного окисления липидов: липидных радикалов (алкильный  $L^{\cdot}$ , алкоксильный  $LO^{\cdot}$ , липопероксильный  $LOO^{\cdot}$ ) и гидропероксидов ( $LOOH$ ), иногда применяется термин «активные формы липидов» [9]. Для СР белковой природы ( $P^{\cdot}$ ,  $RS^{\cdot}$ ) чаще всего используют термины «долгоживущие радикалы белков» и «долгоживущие активные формы белков» [10]. Следует отметить, что АФК, РФА и АФГ в ходе биохимических и СР-процессов реагируют друг с другом, переходя из одной формы в другую, тем самым оказывая комплексное влияние на биологические системы [11]. В табл. 1 приведены характеристики основных видов АФК, РФА, АФГ и СР, встречающихся в живых организмах.

Как видно из табл. 1 (см. стандартный электродный потенциал  $E^{\circ}$ ) наиболее реакционноспособными являются свободнорадикальные формы АФК, такие как гидроксильный ( $HO^{\cdot}$ ) или алкоксильный ( $RO^{\cdot}$ ) радикалы, которые способны модифицировать любые молекулы. В то же время менее реакционноспособные АФК являются более долгоживущими и имеют возможность диффундировать на большее расстояние от источника возникновения, что потенциально может нести большую угрозу для клетки.

Из представленных материалов следует, что восстановление пероксида водорода и органических (прежде всего, липидных) гидропероксидов с участием ферментов-пероксидаз (пероксиредоксинов, глутатионпероксидаз и глутатион-S-трансфераз) должно играть ключевую роль в предотвращении окислительного стресса (см. ниже), поскольку  $H_2O_2$  и природные органические гидропероксиды ( $ROOH$ ,  $LOOH$ ) при их разложении (гомолизе) служат основным источником активных СР ( $HO^{\cdot}$ ,  $RO^{\cdot}$  и  $LO^{\cdot}$  соот-

**Таблица 1.** Основные виды активных форм кислорода (АФК), реактивных форм азота (РФА), активных форм галогенов (АФГ) и свободных радикалов (СР) в биологических системах

Свободный радикал/ оксид/пероксид	Формула	$t_{1/2}$ , с	$R_d$ , мкм	$E^\circ$ , В (рН 7,0)*	Реакции образования АФК	Катализ**	
АФК	Синглетный кислород	$^1O_2$	$10^{-6}$	0,3	—	$2H_2O_2 \rightarrow H_2O + ^1O_2$ , $H_2O_2 + Cl^- \rightarrow H_2O + OCl^-$ , $OCl^- + H_2O_2 \rightarrow Cl^- + H_2O + ^1O_2$ , $O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \rightarrow OH^\cdot + HO^- + ^1O_2$ , $O_2^{\cdot-} + OH^\cdot + H^+ \rightarrow H_2O + ^1O_2$ .	Cat — MPO MPO —
	Супероксидный анион-радикал	$O_2^{\cdot-}$	$10^{-6}$	0,3	$O_2/O_2^{\cdot-} = -0,33$ $O_2^{\cdot-}/H_2O_2 = 0,93$	$O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot-}$	NOX, XO, CytC
	Озон	$O_3$	секунды	—	$O_3/O_3^- = 1,03$ $O_3/O_2 = 1,66$	$3O_2 + h\nu \rightarrow 2O_3$ 285 кДж/моль	УФ
	Гидроксильный радикал	$HO^\cdot$	$10^{-9}$	<0,01	$HO^\cdot/H_2O = 2,34$	$O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \rightarrow HO^\cdot + HO^- + ^1O_2$ , $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow HO^\cdot + Fe^{3+} + HO^-$ , $ClO^- + Fe^{2+} + H^+ \rightarrow HO^\cdot + Fe^{3+} + Cl^-$ .	— — —
	Пергидроксильный радикал	$HO_2^\cdot$	$10^{-6}-10^{-3}$	10	$HO_2^\cdot/H_2O_2 = 1,48$	$O_2^{\cdot-} + H_2O \rightarrow HO_2^\cdot + HO^-$	—
	Пероксид водорода	$HOOH$	стабилен	1–10	$H_2O_2/H_2O = 1,35$	$O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ , $2HO_2^\cdot \rightarrow H_2O_2 + ^1O_2$ .	SOD —
	Алкоксильный радикал	$RO^\cdot$	$10^{-6}$	#	$RO^\cdot/ROH = 1,60$	$Fe^{2+} + ROOH \rightarrow Fe^{3+} + HO^- + RO^\cdot$	—
	Пероксильный радикал	$ROO^\cdot$	$10^{-5}$	#	$RO_2^\cdot/RO_2H = 1,00$	$R^\cdot + O \rightarrow ROO^\cdot$	—
	Алкилгидропероксид	$ROOH$	стабилен	#	—	$ROO^\cdot + RH \rightarrow ROOH + R^\cdot$ , $ROO^\cdot + Fe^{2+} + H^+ \rightarrow ROOH$ .	—
	Липоксильный радикал	$LO^\cdot$	$10^{-6}$	#	—	$Fe^{2+} + LOOH \rightarrow Fe^{3+} + HO^- + LO^\cdot$	—
Липопероксильный радикал	$LOO^\cdot$	$10^{-3}$	#	—	$L^\cdot + O_2 \rightarrow LOO^\cdot$	—	
Липогидропероксид	$LOOH$	стабилен	#	—	$LOO^\cdot + LH \rightarrow LOOH + L^\cdot$ , $LOO^\cdot + Fe^{2+} + H^+ \rightarrow LOOH$ .	—	
АФГ	Хлорноватистая кислота	$HOCl$	стабилен	—	$ClO^-/Cl^- = 1,28$	$H_2O_2 + Cl^- + H^+ \rightarrow HOCl + H_2O$	MPO, EPX
	Бромноватистая кислота	$HOBr$	стабилен	—	$BrO^-/Br^- = 1,59$	$H_2O_2 + Br^- + H^+ \rightarrow HOBr + H_2O$	—
	Йодноватистая кислота	$HOI$	стабилен	—	$HO_3/I_2 = 1,19$	$H_2O_2 + I^- + H^+ \rightarrow HOI + H_2O$	—
РФА	Монооксид азота (оксид азота (II), нитрозил радикал)	$NO^\cdot$	1–10	50–1000	$NO/N_2O = 1,59$	$L-Arg + NADPH_2 + O_2 \rightarrow NO^\cdot + L-цитруллин$	NOS
	Диоксид азота (оксид азота (IV), двуокись азота)	$NO_2^\cdot$	$10^{-1}-1$	100	$NO_2^\cdot/NO_2 = 1,04$	$ONOOCO_2 \rightarrow CO_3^{\cdot-} + NO_2^\cdot$	—
	Пероксинитрит	$ONOO^\cdot$	0,5–1	1–4	$ONOO^\cdot/NO_2 = 1,20$ $ONOO^\cdot/NO_2 = 1,40$	$O_2 + NO^\cdot \rightarrow ONOO^\cdot$ $ONOO^\cdot + H^+ \rightarrow OH^\cdot + NO_2^\cdot$	—

Окончание таблицы

Свободный радикал/ оксид/пероксид		Формула	$t_{1/2}$ , с	$R_d$ , мкм	$E^\circ$ , В (рН 7,0)*	Реакции образования АФК	Катализ**
РФА	Пероксиазотистая кислота	ONOOH	1,3	—	$\text{NO}_3^-/\text{NO} = 0,95$ $\text{NO}_3^-/\text{HNO}_2 = 0,93$	$\text{ONOO}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{ONOOH}$	—
	Нитрозильный катион	$\text{NO}^+$	стабилен	—	—	$\text{NO}^\cdot - \bar{e} \rightarrow \text{NO}^+$	—
	Нитроксильный анион	$\text{NO}^-$	стабилен	—	—	$\text{NO}^\cdot + \bar{e} \rightarrow \text{NO}^-$	—
	Триоксид диазота (оксид азота (III), азотистый ангидрид)	$\text{N}_2\text{O}_3$	секунды	—	$\text{N}_2\text{O}_3/\text{N}_2\text{O}_5 = 0,9$	$\text{NO} + \text{NO}_2 \rightarrow \text{N}_2\text{O}_3$	—
	Тетраоксид диазота	$\text{N}_2\text{O}_4$	секунды	—	$\text{N}_2\text{O}_4/\text{HNO}_2 = 1,06$	$2\text{NO}_2 + 2\text{H}_2\text{O} + 2\bar{e} \rightarrow \text{N}_2\text{O}_4 + 4\text{HO}^\cdot$	—
	Азотистая кислота	$\text{HNO}_2$	секунды	—	$\text{HNO}_2/\text{N}_2\text{O} = 1,29$ $\text{HNO}_2/\text{NO} = 0,98$ $\text{HNO}_2/\text{H}_2\text{N}_2\text{O} = 0,86$	$\text{N}_2\text{O}_4 + 2\text{H}_3\text{O}^+ + 2\bar{e} \rightarrow$ $\rightarrow 2\text{HNO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$	—
Нитрил хлорид	$\text{ClNO}_2$	секунды	—	—	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Cl}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{HOCl} + \text{H}_2\text{O}$ , $\text{NO}_2^- + \text{HOCl} + \text{H}^+ \rightarrow$ $\rightarrow \text{ClNO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ .	МРО	
Прочие СР	Алкильный радикал	$\text{R}^\cdot$	$>10^{-6}$	#	—	$\text{HO}^\cdot + \text{RH} \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{R}^\cdot$ , $\text{RO}^\cdot + \text{LH} \rightarrow \text{ROH} + \text{L}^\cdot$ .	—
	Липоалкильный радикал	$\text{L}^\cdot$	$10^{-8}$	#	—	$\text{HO}^\cdot + \text{LH} \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{L}^\cdot$ , $\text{LO}^\cdot + \text{LH} \rightarrow \text{LOH} + \text{L}^\cdot$ .	—
	Тиильный радикал	$\text{RS}^\cdot$	$>10^{-6}$	#	—	$\text{R}^\cdot + \text{R}'\text{-SH} \rightarrow \text{R}'\text{-S}^\cdot + \text{RH}$	—
	Радикалы белков	$\text{P}^\cdot$	$1-10^5$	#	—	$\text{P} + \gamma \rightarrow \text{P}^\cdot + \text{hv}$	—
	Радикалы антиоксидантов	$\text{In}^\cdot$	$10^{-3}$	#	—	$\text{LOO}^\cdot + \text{InH} \rightarrow \text{In}^\cdot$	—

Примечание. Таблица составлена на основании материалов опубликованных ранее работ [10, 12–19].

\* Значения стандартного электродного потенциала ( $E^\circ$ ) взяты из ранее опубликованных работ [15, 16]. # Радиус диффузии ( $R_d$ ) зависит от размера молекулы. Средняя скорость диффузии липидов в мембране 2 мкм/с [17]. Исходя из времени существования радикалов и гидропероксидов, радиус диффузии таких молекул составляет  $10^{-6}-10^{-3}$  мкм.

\*\* Cat – каталаза, МРО – миелопероксидаза, ЕРХ – пероксидаза эозинофилов, NOX – NADPH-оксидаза, XO – ксантин-оксидаза, CytC – цитохром с-оксидаза, SOD – супероксиддисмутаза, NOS – NO-синтазы, hv – фотоны,  $\gamma$  – фотоны большой энергии (гамма-квант, рентгеновское излучение).

ответственно), способных инициировать или продолжить цепное СР-окисление биомолекул.

## ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС

Окислительный стресс – состояние в биологических системах, при котором уровень генерируемых АФК превосходит возможности их утилизации антиоксидантными системами, что приводит к нарушению редокс-регуляции и накоплению окислительно поврежденных биомо-

лекул. Следует отметить, что в настоящее время окислительный стресс подразделяют на эустресс и дистресс [20].

Окислительный эустресс происходит при кратковременном превышении уровня АФК в физиологическом диапазоне (для  $\text{H}_2\text{O}_2$  – это концентрация ниже 100 нМ), что обеспечивает передачу клеточных сигналов, защиту от патогенов и т.д., при этом окислительные изменения макромолекул обратимы. АФК при окислительном эустрессе зачастую эндогенного происхождения и связаны с активацией клеточных окси-

даз (см. выше) [20]. Эндогенные АФК регулируют активность многих белков через взаимодействие с редокс-чувствительными элементами (Redox-Sensitive Elements – RSE), представленными в белках остатками метионина, цистеина, селеноцистеина и протетическими группами, содержащими ионы металлов переменной валентности. К таким важнейшим регуляторным белкам с RSE относятся протеинкиназы (ERK, JNK, STAT, p38 и др.), фосфатазы (PTEN, SHP-2 и др.), металлопротеиназы (MMP), ростовые факторы (TGF, TNF $\alpha$ , EGF и др.), транскрипционные факторы (Nrf2, NF- $\kappa$ B, HIF, AP-1 и др.) и прочие [21, 22].

Окислительный дистресс сопровождается кратковременным или длительным увеличением уровня АФК, значительно превышающего физиологическую норму (для H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – это концентрация свыше 100 нМ), что приводит к необратимым окислительным модификациям макромолекул, запуску патологических процессов, остановке деления и гибели клетки [20]. Рост уровня АФК при окислительном дистрессе зачастую вызван внешними неблагоприятными факторами (ионизирующее излучение, УФ излучение, ксенобиотики и т.д.).

Таким образом, АФК играют двойную роль в жизни аэробных организмов. С одной стороны (окислительный эустресс), АФК используются в защите организма от патогенов («кислородный взрыв», опосредованный NADPH-оксидазой клеток иммунной системы), участвуют в нейтрализации ксенобиотиков, передаче сигналов внутри клеток и между клетками. С другой стороны, когда продукция АФК превышает антиоксидантные способности клетки (окислительный дистресс), происходят необратимые повреждения на всех уровнях организации (молекулярном, клеточном, тканевом, органном), провоцирующие развитие многих патологических состояний [23].

### ПОВРЕЖДЕНИЯ, ВЫЗВАННЫЕ ДЕЙСТВИЕМ АФК

АФК являются химически высокоактивными агентами, которые легко вступают в реакцию с самыми разнообразными классами веществ, подвергая их окислительной модификации. АФК вызывают окислительные повреждения важнейших биологических макромолекул (нуклеиновых кислот, белков, липидов), что приводит к нарушению их структуры и функции и впоследствии к повреждению клеток и тканей. Избыточная продукция АФК, особенно в сочетании с недостаточностью компенсаторных воз-

можностей систем антиоксидантной защиты, приводит к окислительно-восстановительному дисбалансу и развитию/усугублению патологических изменений на всех уровнях организации организма [8]. Зачастую уровень АФК увеличивается прямо пропорционально тяжести патологического состояния. При старении в организме человека также наблюдается интенсификация образования АФК. Большинство из этих процессов протекает достаточно медленно, поэтому организм успевает адаптироваться, что приводит к нивелированию повреждающей роли АФК в долгосрочной перспективе. Из этого следует, что крайне важным в этиологии и развитии любой патологии является скорость изменения про- и антиоксидантного баланса (резкое увеличение уровня АФК или уменьшение активности антиоксидантных систем). Тем не менее на практике определение сбалансированности про- и антиоксидантных систем затруднительно, в связи с чем степень поврежденности клеток, тканей и организма при воздействии окислительного стресса определяют по проявлению его последствий, а именно: по наличию модифицированных биомолекул. За последние десятилетия разработан широкий спектр методов и тест-систем, которые позволяют на количественном уровне определять уровень модифицированных окислительным стрессом биологических макромолекул [11].

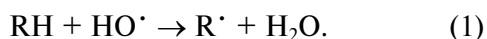
**Окислительные повреждения ДНК.** Окислительные повреждения ДНК являются одним из самых критических последствий окислительного стресса для клетки. Окислительные повреждения ДНК тесно связаны с процессами мутагенеза, канцерогенеза, старения и ряда сопряженных с ним возрастных патологий. В настоящее время идентифицировано более ста продуктов окислительного повреждения ДНК [24]. Основными из них являются: пиримидиновые димеры, ДНК-белковые сшивки, односторонние разрывы ДНК, двусторонние разрывы ДНК, окислительные повреждения дезоксирибозы, формидопиримидиновые производные пуринов, гидроксильированные производные и различные другие окисленные дериваты азотистых оснований. Одним из основных маркеров окислительных повреждений ДНК, безусловно, является 8-оксо-7,8-дигидрогуанин (8-оксогуанин) [25].

8-Оксогуанин образуется в ДНК под действием синглетного кислорода и гидроксильных радикалов. При окислительном стрессе любой этиологии данное повреждение составляет не менее 5% от общего количества окисленных оснований в ДНК. Исходя из этого, в настоящее время 8-оксогуанин рассматривается как один из ключевых биомаркеров окислительного стресса и

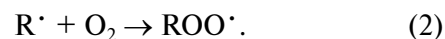
СР-повреждения ДНК [26]. Установлено, что 8-оксогуанин обладает неоднозначными кодирующими свойствами, следствием чего являются точечные мутации ДНК, нарушения репликации и транскрипции. В клетках человека 8-оксогуанин распознается и восстанавливается с помощью специфического фермента репарации hOGG1 (оксогуанингликозилаза 1 человека), причём потеря одного аллеля гена *hOGG1* увеличивает мутагенное действие 8-оксогуанина. Рост уровня 8-оксогуанина в ДНК увеличивает количество трансверсионных мутаций, чаще всего: G–C → T–A. Эта мутация является одной из самых распространенных соматических мутаций при онкологических заболеваниях [27].

**Окислительные повреждения белков.** Окислительные повреждения белков приводят к существенным нарушениям в нормальном функционировании клеточных систем. Эти повреждения проявляются в изменении функций рецепторов, ферментов, транспортных белков, ответственных за формирование антигенов, способных вызвать аутоиммунную реакцию и т.п. Окисление белков сопровождается рядом структурных изменений, к которым можно отнести окислительные повреждения аминокислот, включая образование дисульфидных связей, межбелковых сшивок, разрывов полипептидной цепи, денатурацию и агрегацию белковых молекул [28]. Кроме того, окислительные повреждения белков способны инициировать вторичное повреждение других биологических молекул. Классическим примером этого является повреждение репарационных ферментов, ведущее к их инактивации, что в конечном итоге вызывает изменение кодирующих свойств ДНК.

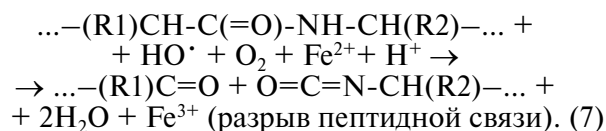
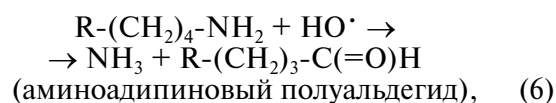
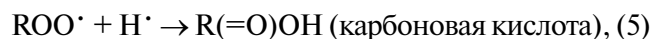
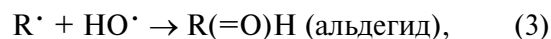
В настоящее время не вызывает сомнений, что СР-окисление белков в организме млекопитающих тесно связано с процессами старения и разнообразными физиологическими нарушениями. Считается, что СР-окисление белков играет важную роль в развитии атеросклероза, артрита, диабета, катаракты, мышечной дистрофии, сердечно-легочной недостаточности и нервно-дегенеративных болезней [29]. Анализ и систематика окислительных повреждений белков является достаточно сложной задачей. Окисление белков различными АФК может приводить к образованию аминокислотных радикалов, которые, реагируя с кислородом, образуют пероксильные органические радикалы, которые, в свою очередь, способны участвовать в образовании многочисленных продуктов окисления. Инициатором окисления белков чаще всего выступает гидроксильный радикал:



Образовавшийся алкильный радикал, взаимодействуя с кислородом, образует пероксильный радикал:



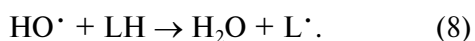
Кроме того, в ходе окисления белков образуются различные карбонильные (>C=O) соединения по следующим механизмам:



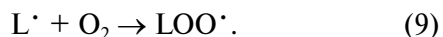
Карбонильные группы белков являются наиболее часто регистрируемыми маркерами их окислительных повреждений. Карбонильные группы возникают как при прямом окислении аминокислотных остатков АФК, так и при взаимодействии аминокислотных остатков с альдегидами (в том числе и со вторичными молекулярными продуктами перекисного окисления липидов) [30]. Основными продуктами окислительного повреждения аминокислот являются дитиозин, формилкинуренин, гидроксильрованные валин и лейцин, дигидроксифенилаланин, ортотиозин, 2-оксогистидин, глутаминовый и аминоадипиновый полуальдегид и т.п. Дитиозин в организме не катаболизирует и выводится с мочой, что делает его удобным биомаркером повреждения аминокислот при окислительном стрессе.

**Окислительные повреждения липидов.** Очевидно, что полиеновые липиды, вследствие наличия двойных связей, являются наиболее подверженными СР-окислению природными субстратами. Свободнорадикальное перекисное окисление липидов (ПОЛ) протекает по цепному механизму. В инициировании цепной реакции ПОЛ важную роль играет гидроксильный радикал. Будучи небольшой по размеру незаряженной частицей, он способен проникать в толщу гидрофобного липидного слоя и вступать в химическое взаимодействие с полиненасыщенными жирными кислотами (ЛН), входящими в

состав надмолекулярных липид-белковых природных комплексов – биологических мембран и липопротеинов плазмы крови. При этом образуются липидные радикалы:



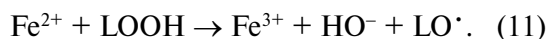
Образовавшийся липидный радикал ( $\text{L}^\cdot$ ) вступает в реакцию с растворённым в среде молекулярным кислородом, вследствие чего образуется липопероксильный радикал ( $\text{LOO}^\cdot$ ):



Липопероксильный радикал атакует одну из соседних молекул фосфолипида с образованием липопероксида ( $\text{LOOH}$ ) и нового радикала  $\text{L}^\cdot$ :



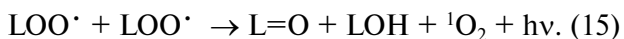
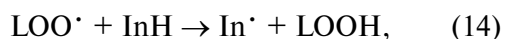
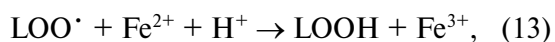
Чередование реакций 9 и 10 представляет собой цепную реакцию перекисного окисления липидов. Существенное ускорение перекисацции липидов наблюдается в присутствии ионов двухвалентного железа, в ходе которого происходит разветвление цепей окисления липидов:



Образующиеся радикалы  $\text{LO}^\cdot$  инициируют новые цепи окисления липидов:



При СР-окислении биомембран в экспериментальных условиях цепи окисления могут состоять из десятка и более звеньев, однако в организме обычно возможно не более 2–3 разветвлений цепей, вследствие наличия большого числа «тушителей», обрывающих цепную реакцию. Цепи СР-окисления липидов могут обрываться в результате взаимодействия СР с антиоксидантами ( $\text{InH}$ ), ионами металлов переменной валентности или друг с другом:



Реакция 13 сопровождается хемилюминесценцией, интенсивность которой отражает скорость перекисного окисления липидов в различных объектах [9].

Следовательно, свободнорадикальное ПОЛ приводит к образованию первичных молекуляр-

ных продуктов – гидропероксидов ненасыщенных жирных кислот, причём в качестве вторичных молекулярных продуктов окисления накапливаются ненасыщенные альдегиды, среди которых наиболее известны 4-гидроксиноненаль и малоновый диальдегид (МДА), являющиеся признанными биомаркёрами окислительного стресса. Кроме того, к биомаркёрам окислительного стресса можно отнести изопростаны – специфические продукты окисления ряда высоконенасыщенных жирных кислот, таких как арахидоновая, эйкозапентеновая и докозагексеновая кислоты. МДА и другие низкомолекулярные дикарбонилы способны к образованию межмолекулярных ковалентных связей с белками и нуклеиновыми кислотами [30]. В биологических системах нейтрализацию потенциально опасных гидропероксидов липидов (предшественников карбонильных соединений) преимущественно осуществляют три семейства гидропероксид-восстанавливающих ферментов: пероксиредоксины ( $\text{Prx}$ ), глутатионпероксидазы ( $\text{GPx}$ ) и глутатион-S-трансферазы ( $\text{GST}$ ), свойства которых далее будут подробно рассмотрены.

## АНТИОКСИДАНТЫ

Соединения, способные предотвращать образование АФК или нейтрализующие их, получили название антиоксидантов. В физиологических условиях низкомолекулярные природные антиоксиданты (преимущественно фенольной структуры) могут нейтрализовать АФК вследствие неферментных реакций за счёт своей способности отдавать или принимать электрон(ы), тем самым устраняя неспаренные/нестабильные состояния активных радикалов. В результате взаимодействия ингибиторов свободнорадикальных реакций ( $\text{InH}$ ) со свободными радикалами образуются СР-формы антиоксидантов ( $\text{In}^\cdot$ ), которые менее активны и менее опасны, чем исходные [1]. Таким образом, действие природных антиоксидантов состоит не в полном прекращении СР-окисления, а в его задержке в результате перехвата неспаренных электронов с активных радикалов молекулами ингибитора:



Исходя из этого, при интенсивном СР-окислении возможно уменьшение концентрации восстановленных форм фенольных ингибиторов с накоплением семихинонов, способных вновь инициировать окисление органических

субстратов. В организме существуют буферные восстановительные системы (аскорбат, глутатион), которые участвуют в неферментной биорегенерации антиоксидантов. При недостаточности этих систем антиоксидантное ингибирование СР-процессов (особенно при высоких уровнях антиоксидантов) может вызывать прооксидантный эффект (конверсия антиоксидантного действия в прооксидантное) за счёт инициации окисления биосубстратов накопившимися СР-формами антиоксидантов [31]. Это обстоятельство затрудняет использование низкомолекулярных антиоксидантов в медицинских целях.

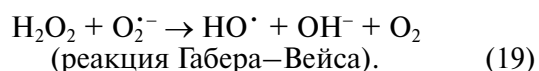
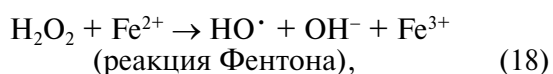
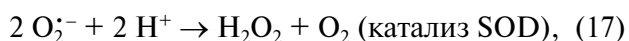
Токсическое действие АФК предотвращается в организме за счёт низкомолекулярных антиоксидантов, представленных широким спектром низкомолекулярных соединений (таких как токоферолы, флавоноиды, аскорбиновая кислота, восстановленный глутатион, мелатонин, эрготионеин и др.), и специализированными ферментами — высокомолекулярными антиоксидантами [1]. Несомненно, наиболее эффективным путём элиминации АФК является ферментативный катализ. Для этой цели в ходе эволюции возникли различные антиоксидантные ферменты, включая супероксиддисмутазы (SOD) для дисмутации супероксидного анионрадикала, а также широкий спектр пероксидаз: каталазы (CAT), глутатионпероксидазы (GPx), глутатион-S-трансферазы (GST), глутамил-цистеин синтазы (GCS), глутаредоксины (Grx), тиоредоксины (Trx), пероксиредоксины (Prx) и др. В связи с необходимостью систематизации накопленных данных в этой работе основное внимание уделено гидропероксид-восстанавливающим ферментам клетки: Prx, GPx и GST.

**Эволюция антиоксидантной системы.** В настоящее время у всех исследованных аэробных и анаэробных организмов обнаружены специализированные ферментные антиоксидантные системы защиты. Системы детоксикации АФК стали насущной необходимостью после «великого кислородного события» или «кислородной катастрофы», т.е. появления и накопления в атмосфере Земли свободного кислорода (~2,4–2,5 млрд лет назад), что привело к глобальной смене восстановительных условий на окислительные. Существует мнение, что при увеличении концентрации кислорода в атмосфере Земли дыхательная цепь бактерий и митохондрий эукариот вначале действовала как средство детоксикации  $O_2$ , т.е. исходно энергетическую и защитную функцию могли выполнять одни и те же биокатализаторы (ферменты или их аналоги). Такими системами «двойного назначения» могли быть компоненты электрон-транспортной цепи, наиболее важными из кото-

рых являются гемопротеиды и железосерные белки. В дальнейшем при специализации этих белков, по-видимому, произошло их разделение на, собственно, энергопреобразующие и защитные — антиоксидантные [32]. Нельзя исключить, что ещё на стадии предбиологической эволюции произошло разделение низкомолекулярных соединений на кофакторы и протекторы (антиоксиданты). Тем не менее некоторые хиноны (убихинон, пластохинон, менадион и др.) у современных организмов функционируют и как переносчики электронов, и в качестве антиоксидантов. Наличие кислорода в воде и атмосфере неизбежно должно было сопровождаться спонтанным образованием его полувосстановленной формы — супероксидного анионрадикала ( $O_2^{\cdot-}$ ). При спонтанной дисмутации радикалов  $O_2^{\cdot-}$  (скорость  $7 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ ) образуется пероксид водорода, причём более эффективно эту реакцию катализирует фермент супероксиддисмутазы — SOD (скорость  $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ ), представленная во всех царствах, а также железосерный белок — рубредоксин (супероксидредуктаза), обнаруженный у архей и бактерий [33]. Примечательно, что у многих прокариот железосерные белки являются регуляторами экспрессии генов антиоксидантных ферментов [34]. Можно полагать, что одними из первых ферментов-антиоксидантов, возникших ещё на заре «великого кислородного события», являются супероксиддисмутазы. Гены, кодирующие SOD, обнаружены во всех известных аэробных организмах (от бактерий до человека) и происходят от двух основных предков. Один ген дал начало Cu/Zn-содержащим SOD, второй ген дал начало ферментам, содержащим ионы Mn, Fe и Ni. Супероксиддисмутазы — высококонсервативные ферменты, участки вблизи активных центров обладают высокой гомологией между различными царствами. У млекопитающих обнаружено три изоформы SOD, которые локализуются в митохондриях (Mn-содержащая SOD2), цитоплазме (Cu/Zn-содержащая SOD1) и во внеклеточном пространстве (Cu/Zn-содержащая SOD3) [35]. При увеличении уровня  $O_2$  в атмосфере наблюдается адаптивный рост уровня экспрессии SOD как у про-, так и у эукариот, что вызывает увеличение SOD-активности в клетках и позволяет снизить токсическое действие  $O_2$  [36, 37]. Образующийся в процессе катализируемой SOD дисмутации радикалов  $O_2^{\cdot-}$  пероксид водорода ( $H_2O_2$ ) (реакция 17) представляет большую опасность вследствие возможности его разложения в присутствии ионов железа с образованием высокоактивного гидроксильного радикала ( $HO^{\cdot}$ ) (реакции 18 и 19), окислительные и повреждающие биологические



структуры свойства которого значительно выше, чем у  $O_2^{\cdot -}$  радикала (табл. 1):



Восстановление  $H_2O_2$ , образовавшейся в ходе дисмутации супероксидного анион-радикала, обеспечивают пероксидазы, которые представлены многочисленными семействами ферментов, в активных центрах которых может присутствовать гем, ионы Mn, SH- или SeH-группы. Прежде всего, следует отметить каталазу – гем-содержащий фермент, восстанавливающий  $H_2O_2$  до воды и молекулярного кислорода ( $2 H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$ ). При этом максимальную активность каталазы проявляет при очень высоких концентрациях  $H_2O_2$  (сотни мМ). Такие высокие концентрации  $H_2O_2$  в живой клетке практически не встречаются, вероятно, именно поэтому до 80% внутриклеточной каталазы содержится в специализированных органеллах клетки – пероксисомах, в которых может наблюдаться локальное повышение концентрации пероксида водорода до миллимолярных значений [38]. Более эффективными восстановителями  $H_2O_2$  являются пероксидазы, содержащие в активном центре цистеин или селеноцистеин, такие как: пероксиредоксины, Se-содержащие глутатионпероксидазы и неселеновые глутатион-S-трансферазы. Важно отметить, что некоторые из этих ферментов обладают способностью восстанавливать не только  $H_2O_2$ , но и различные органические гидропероксиды. Вероятно, опасность возможного окисления  $HO^{\cdot}$  радикалом органических субстратов (прежде всего полиеновых липидов) вызвало в процессе эволюции расширение субстратной специфичности ряда пероксидаз. У высших организмов наличие глутатионпероксидаз и пероксиредоксинов в значительной степени заместило потребность в каталазе [4]. Действительно, наследственное отсутствие в тканях каталазы (акаталаземия или болезнь Такахары) не является фатальной, в то время как нокаут генов некоторых глутатионпероксидаз приводит к летальным исходам ещё в эмбриогенезе, а нокауты генов пероксиредоксинов приводят к тяжёлым окислительным поражениям тканей (см. далее). Эти ферменты эффективно элиминируют избыточный уровень  $H_2O_2$ , а также снижают уровень ПОЛ, что очень важно для поддержания

нормальной структуры и функций биологических мембран.

**Эволюция тиол-содержащих оксидоредуктаз.** Некоторые аминокислоты оказались весьма чувствительными к действию молекулярного кислорода или его производных – АФК. Показано, что His, Met, Cys, Trp и Tyr наиболее чувствительны к окислительным модификациям. Окисление остатков Cys в белках представляется особенно важным, поскольку тиольная группа (SH-) может проходить через несколько стадий окислительных превращений, которые влияют на структуру и функцию белка. Следует отметить, что остатки Cys в белках проявляют различную восприимчивость к окислению из-за физико-химических свойств тиольной группы, а также микроокружения (соседние остатки аминокислот) в конкретной третичной структуре. Например, в активных центрах Prx остаток цистеина образует водородные связи с остатками Thr и Arg, которые способствуют депротонированию Cys-SH. Константа диссоциации (рKa) пероксидазного остатка цистеина значительно ниже (~7,3), чем у свободного цистеина (~8,5). Таким образом, при физиологическом значении pH сульфгидрильная группа активного Cys может подвергаться депротонированию и участвовать в обратимых или необратимых окислительных превращениях в ответ на изменения внутриклеточной окислительно-восстановительной среды [39].

Первичным продуктом окисления Cys-SH является сульфеновая кислота (Cys-SOH), которая нестабильна и может реагировать с тиольной группой других остатков Cys с образованием внутри- или межмолекулярных дисульфидов. Альтернативно, Cys-SOH реагирует с восстановленным глутатионом (GSH), образуя смешанные глутатион-белковые дисульфиды (так называемое глутатионилирование, Cys-SSG), или окисляется до сульфеновой кислоты (Cys-SO<sub>2</sub>H). Сульфеновая кислота может быть либо восстановлена до сульфгидрильной формы с помощью сульфиредоксинов и тиоредоксинов, либо подвергаться дальнейшему необратимому окислению до сульфоновой кислоты (Cys-SO<sub>3</sub>H), что зачастую приводит к инактивации белка или изменению его функции (см. ниже). Кроме того, Cys-SH и тиольный радикал (RS<sup>•</sup>) могут реагировать с активными формами азота (РФА) и ковалентно присоединять монооксид азота с образованием Cys-SNO в реакции S-нитрозилирования. Среди окисленных форм Cys особый интерес представляют стабильные и в значительной степени устойчивые к дальнейшему окислению внутримолекулярные дисульфиды, которые могут подвергаться обратимому

восстановлению. Образование и разрыв дисульфидных связей, вероятно, эволюционно использовались для изменения функции белка, позволяя адаптировать активность белка к изменяющейся окислительно-восстановительной среде. Эти реакции участвуют в регуляции важных метаболических процессов в соответствии с условиями окружающей среды и потребностями клетки [40].

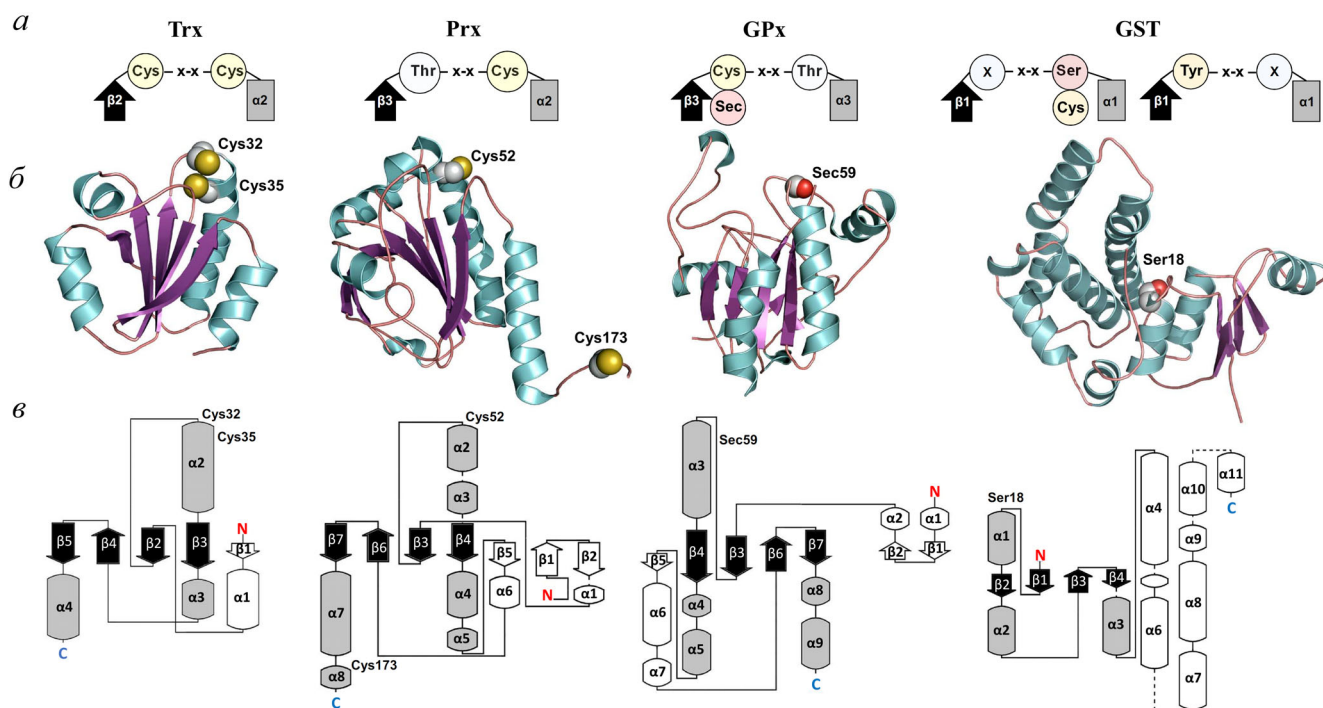
Восстановление дисульфидных связей белков до уровня сульфгидрильных групп (SH-) осуществляется главным образом за счёт тиоредоксиновой системы, которая состоит из субстрата – восстановленного глутатиона, FAD-зависимого фермента глутатионредуктазы (GR), глутаредоксина (Grx), тиоредоксинредуктазы (TrxR) и тиоредоксина (Trx). Следует отметить, что в живых организмах, помимо трипептида глутатиона, обнаружены другие тиольные восстановители: коэнзимы (A, B, M), глутатион-амид, глутатионспермидин, гамма-глутамилцистеин, миколтиол, бациллотриол, эрготионеин, овотиол, трипанотиол. Тем не менее наиболее распространённым восстановителем, встречающимся во всех царствах, является именно GSH. Глутатион – это универсальная молекула-адаптер, а система GSH/Trx в большинстве аэробных организмов служит центральной метаболической системой для удаления или модификации эндогенных электрофильных соединений (АФК, РФА, карбонилы), а также многочисленных ксенобиотиков. GSH представлен в высокой концентрации в цитозоле (1–11 мМ), ядре (3–15 мМ) и митохондриях клетки (5–11 мМ). Вероятно, система GSH/Trx возникла у аэробных организмов на самых ранних этапах эволюции, что отчасти объясняет её вовлечённость практически во все клеточные процессы [41].

Таким образом, вышеуказанные тиол-содержащие оксидоредуктазы посредством дитиол-дисульфидного обмена участвуют в структурной и функциональной модификации различных окисленных белков, в том числе регуляторных. Именно благодаря изменению степени окисления остатков Cys регуляторных белков клетки нашли способ модулировать различные сигнальные пути. При этом важнейшую роль в регуляции таких процессов играют Trx-подобные оксидоредуктазы. Система тиоредоксинов эволюционировала как ключевой окислительно-восстановительный компонент в живых организмах, участвуя в реакциях дитиол-дисульфидного обмена со множеством белков, контролируя основные сигнально-каталитические функции клетки при различных физиологических условиях. Филогенетические исследования Trx-по-

добных белков показали, что система этих белков имеет древнее происхождение и, начиная с появления жизни на земле, играет ключевую роль донора электронов, управляя антиоксидантными системами и регулируя функцию белков в ответ на изменения окислительно-восстановительной среды [42].

**Тиоредоксин-подобные оксидоредуктазы.** В связи с тем, что тиол-содержащие оксидоредуктазы представлены обширным классом ферментов, мы сконцентрировали основное внимание на нескольких семействах Trx-подобных оксидоредуктаз: тиоредоксинах, пероксиредоксинах, глутатионпероксидазах и глутатион-S-трансферазах. Тиоредоксин-подобные оксидоредуктазы – это глобулярные белки с характерной Trx-подобной укладкой (фолдом), который представляет собой последовательность четырёх β-стрендов и трёх α-спиралей (β1-α1-β2-α2-β3-β4-α3). На рис. 1 представлены структуры четырёх семейств ферментов: тиоредоксинов, пероксиредоксинов, глутатионпероксидаз и глутатион-S-трансфераз. Эти семейства достаточно сильно различаются по аминокислотным последовательностям (например, человеческий Trx1 гомологичен с Prx6 на ~12%, а с GPx1 – на ~8%), но при этом все они имеют общий тиоредоксиновый фолд – высококонсервативную эволюционно древнюю трёхмерную структуру [43]. Аналогичная укладка характерна и для других тиол-содержащих оксидоредуктаз: глутаредоксинов (Grx), протеиндисульфидизомераз (PDI) и т.д. По некоторым оценкам, впервые тиоредоксиновая укладка появилась уже около 4 млрд лет назад у общего предка архебактерий (last archaeal common ancestor – LACA), т.е. задолго до «кислородной катастрофы» на нашей планете [43]. Это указывает на то, что свободно-радикальные процессы происходили в «первичном» океане при отсутствии кислородной атмосферы, причём, наиболее вероятно, это были тиольные радикалы (табл. 1).

Для многих Trx-подобных оксидоредуктаз характерно наличие консервативного пероксидазного сайта (мотива), которым у тиоредоксинов является последовательность типа Cys-x-x-Cys, где два остатка цистеина разделены двумя любыми аминокислотами. В случае пероксиредоксинов один из цистеинов замещён на треонин – Thr-x-x-Cys. Для глутатионпероксидаз характерен мотив Cys/Sec-x-x-Thr, где вместо цистеина (на β3-стренде) может быть селеноцистеин – Sec (рис. 1). Наличие селеноцистеина почти на 3 порядка увеличивает эффективность пероксидазной реакции, что объясняется высокой реакционной способностью Sec [44]. Для некоторых глутатион-S-трансфераз также показано



**Рис. 1.** Структурная характеристика тиоредоксинов (Trx), пероксиредоксинов (Prx), глутатионпероксидаз (GPx) и глутатион-S-трансфераз (GST). *а* – Мотивы пероксидазного каталитического центра. *б* – Схема трёхмерной структуры Trx1, Prx1, GPx1 и GSTA1 человека (PyMOL v0.99). *в* – Укладка вторичных элементов указанных ферментов. Серым и черным выделены  $\alpha$ -спирали и  $\beta$ -стренды, относящиеся к общей тиоредоксиновой укладке

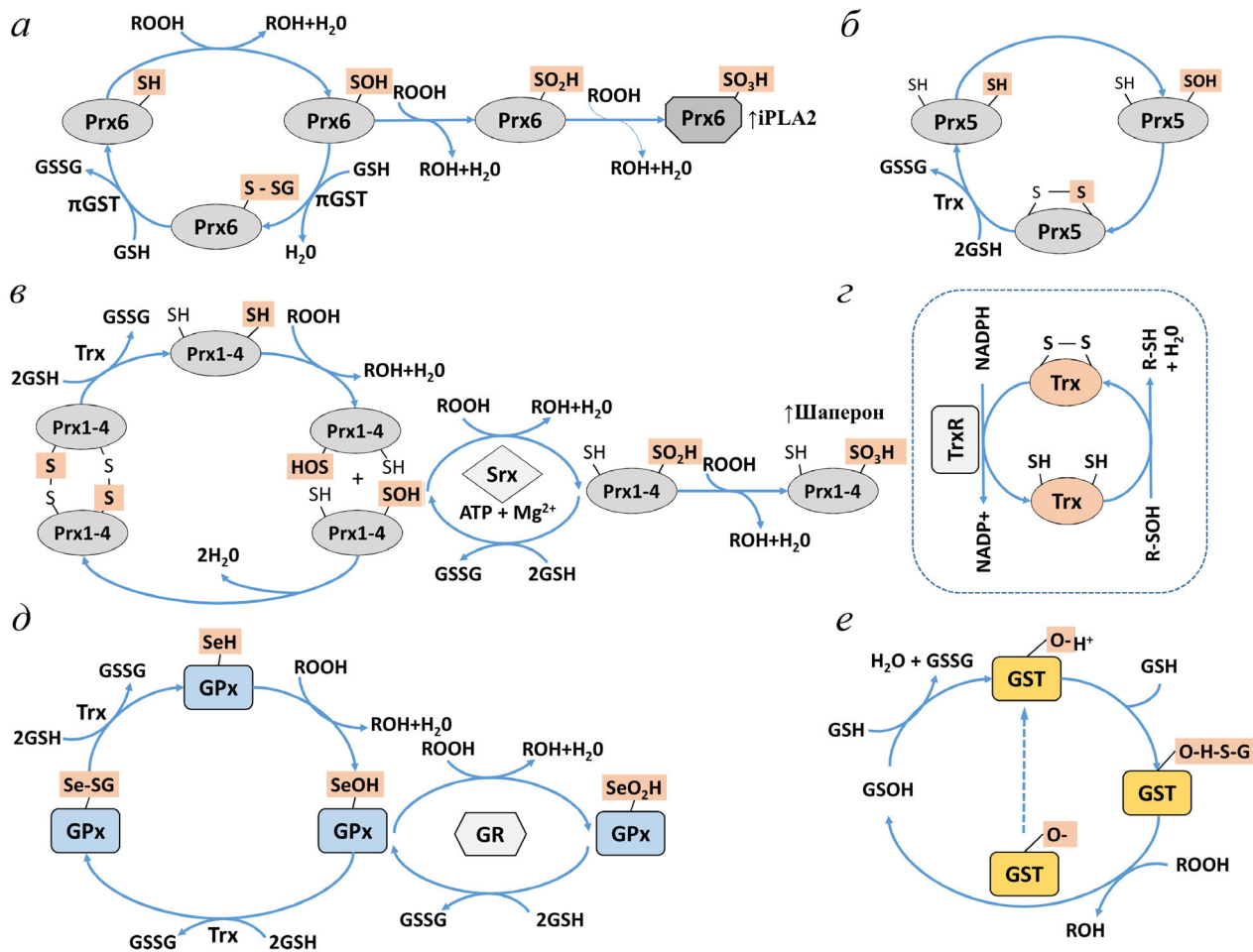
наличие одного из остатков Cys в каталитическом центре, однако чаще всего он замещён на остаток серина (Ser/Cys-GST) или тирозина (Tyr-GST) [45].

**Тиоредоксины.** Современные биоинформатические исследования указывают на то, что Trx являются наиболее древними ферментами среди оксидоредуктаз (возникли около 4 млрд лет назад). Этим может объясняться их вовлечённость во многие клеточные процессы, связанные с восстановлением окисленных остатков цистеина, причём тиоредоксины можно считать предками пероксиредоксинов, глутатионпероксидаз и глутатион-S-трансфераз.

Тиоредоксины – семейство небольших белков (~12 кДа), катализирующих окислительно-восстановительные реакции путём дитиол-дисульфидного обмена с участием двух редокс-активных остатков Cys, разделённых двумя аминокислотами (рис. 1). Trx осуществляют восстановление дисульфидных связей в белках, благодаря чему участвуют в самых различных процессах: 1) общий метаболизм клетки, например, в качестве субстрата для рибонуклеотидредуктазы в синтезе ДНК и 3'-фосфоаденилсульфатредуктазы – при ассимиляции серы; 2) антиоксидантная система – восстановление антиоксидантных ферментов, таких как 2-Cys-пероксиредоксины (см. ниже), и метионинсульфоксидредук-

тазы; 3) клеточные сигнальные пути, где Trx служит для регуляции ферментов в ответ на сигналы окружающей среды; 4) функции, не связанные напрямую с окислительно-восстановительной реакцией, такие как действие шаперонов, восстанавливающих нативную структуру денатурированных белков [42].

Тиоредоксины обнаружены у всех живых организмов: от архебактерий до человека. Геном *Escherichia coli* кодирует два тиоредоксина: *TXN1* и *TXN2* и одну тиоредоксинредуктазу (*TXNRD*). В геноме человека также обнаружено два гена тиоредоксина: цитозольного (*TXN1*) и митохондриального (*TXN2*) и два гена тиоредоксинредуктазы: цитозольной (*TXNRD1*) и митохондриальной (*TXNRD2*). У растений обнаружено 20 изоформ Trx, имеющих довольно схожую первичную структуру как с прокариотами, так и с эукариотами [46]. Вероятно, такое большое количество изоформ Trx у растений связано с появлением хлоропластов (фотосинтеза), функция которых сопряжена с высоким уровнем образования АФК. Примечательно, что несмотря на различия в первичной структуре (например, Trx1 архебактерий и человека гомологичны на ~27%), все Trx имеют очень консервативную трёхмерную структуру. Небольшие отличия касаются протяжённости  $\alpha 3$ -спирали, которая ответственна за стабильность структуры белка [47].



**Рис. 2.** Схемы каталитических циклов: *a* – 1-Cys-пероксиредоксинов (Prx6); *б* – атипичных 2-Cys пероксиредоксинов (Prx5); *в* – типичных 2-Cys-пероксиредоксинов (Prx1–4); *г* – тиоредоксинов (Trx); *д* – селен-содержащих глутатионпероксидаз (GPx) и *е* – глутатион-S-трансфераз (GSTA1). ROOH – гидропероксиды, GSH – глутатион восстановленный, GSSG – глутатион окисленный, Srx – сульфореоксины, GR – глутатионредуктаза, TrxR – тиоредоксинредуктаза, πGST – глутатион-S-трансфераза π, iPLA2 – Ca<sup>2+</sup>-независимая активность фосфолипазы A2 белка Prx6

Каталитический цикл Trx включает три этапа. 1) Тиольная группа *N*-концевого остатка Cys тиоредоксина атакует дисульфидную связь, формируя дисульфидную связь с остатком Cys белка-мишени. 2) Затем тиольная группа *C*-концевого остатка Cys тиоредоксина восстанавливает дисульфидную связь комплекса Trx–белок-мишень, при этом сам Trx окисляется. 3) Окисленный тиоредоксин восстанавливается тиоредоксинредуктазой в NADPH-зависимой реакции и вновь включается в каталитический цикл [46]. Схема каталитического цикла Trx представлена на рис. 2. Тиоредоксины играют исключительно важную роль в поддержании окислительно-восстановительного гомеостаза в клетках животных. Мыши, нокаутные по *TXN1* или *TXN2*, погибают ещё на ранних стадиях эмбрионального развития [48, 49]. Основные характеристики тиоредоксинов человека представлены в табл. 2.

**Пероксиредоксины.** Пероксиредоксины (Prx) – эволюционно древнее семейство пероксидаз, широко представленное в живом мире. Пероксиредоксины обнаружены во всех компартментах клетки, во всех тканях (но преимущественно эпителиального происхождения). Для катализа Prx используют консервативный остаток Cys в активном центре [69]. Современная классификация Prx основана на числе цистеинов (1 или 2 остатка) в активном центре и особенностях механизма катализа. Необходимым для катализа и характерным для всех пероксиредоксинов (как 1-Cys Prx, так и 2-Cys Prx) является «пероксидазный» остаток цистеина в *N*-концевой области – C<sub>p</sub> (peroxidatic cysteine). У 2-Cys Prx в *C*-концевой области белка располагается дополнительный «восстанавливающий» остаток цистеина – C<sub>r</sub> (resolving cysteine). Пероксидазный остаток цистеина C<sub>p</sub> окружён тремя консервативными

Таблица 2. Сравнение семейств антиоксидантных ферментов человека

Свойства	Trx	Prx	GST	GPx
Количество изоформ у человека	2 изоформы: Trx1, Trx2	6 изоформ: Prx1–Prx6	17 цитозольных изоформ: (α)/GSTA – 5 шт., (μ)/GSTM – 5 шт., (ω)/GSTO – 2 шт., (π)/GSTP – 1 шт., (σ)/GSTS – 1 шт., (θ)/GSTT – 2 шт., (ζ)/GSTZ – 1 шт. 1 митохондриальная: (κ)/GSTK – 1 шт. 6 мембраносвязанных: MGST1, MGST2, MGST3, LTC4, FLAP, PGES	8 изоформ: GPx1–GPx8
Локализация в клетке	цитоплазма (Trx1), ядро (Trx1), секреция (Trx1), митохондрии (Trx2)	цитоплазма (Prx1,2,5,6), ЭПР (Prx4), митохондрии (Prx3,5), лизосомы (Prx6), ядро (Prx1,2,6), секреция (Prx4,6)	цитоплазма/ядро, митохондрии, микросомы (мембраносвязанные); в соответствии с классификацией	цитоплазма (GPx1,4), ЭПР (GPx4,8), митохондрии (GPx4), мембраносвязанные (GPx8), ядро (GPx1,4), секреция (GPx3,5,6,7)
Локализация в тканях, органах	во всех органах и тканях	во всех органах и тканях; преимущественно в эпителиальных	во всех органах и тканях; в большем количестве представлены в желудочно-кишечном тракте, печени и лёгких	GPx1 – во всех тканях, преимущественно в эритроцитах, печени и почках; GPx2 – желудочно-кишечный тракт; GPx3,8 – почки; GPx4 – семенники, сетчатка глаз; GPx5 – придатки семенников; GPx6 – обонятельный эпителий; GPx7 – эпителий пищевода
Основные регуляторы экспрессии	ARE (Antioxidant-Responsive Element), Nrf2, NF-κB, Ref-1, AP-1	ARE, Nrf2, NF-κB, HIF, AP-1, c-Мyc, C/EBP, FOXO3	ARE, XRE (Xenobiotic-Responsive Element), GRE (Glucocorticoid-Responsive Element), BBE (Barbie Box Element), AHR (Aryl Hydrocarbon Receptor), MAF (Macrophage Activation Factor), NRL (Neural Retina Leucine Zipper), JNK, Fos, NF-κB	ARE, Nrf2, NF-κB, HIF, p63, AP-1, Sp1, NF-Y
Молекулярный вес (диапазон)	12–18 кДа	13–30 кДа	23–28 кДа	20–25 кДа
Трёхмерная структура	тиоредоксиновая укладка	тиоредоксиновая укладка	тиоредоксиновая укладка	тиоредоксиновая укладка
Четвертичная структура	гомодимеры (Trx1,2)	мономер (Prx5), гомодимеры (Prx1,2,3,4,6), олигомеры (Prx1,2,3,4,6)	гомодимеры/гетеродимеры для всех изоформ	гомотетрамеры (GPx1,2,3,5,6), димеры (GPx4,7,8)
Пероксидазный центр (мотив)	<u>Cys</u> -X-X- <u>Cys</u> (Trx1,2)	Thr-X-X- <u>Cys</u> (Prx1–6)	<b>Tyr</b> (α, μ, π, σ) <b>Cys</b> (ω) <b>Ser</b> (κ, θ, ζ) <b>Arg</b> (микросомальные GST)	<b>Sec</b> -X-X-Thr (GPx1,2,3,4,6) <b>Cys</b> -X-X-Thr (GPx5,7,8)

Окончание таблицы

Свойства	Trx	Prx	GST	GPx
Субстрат восстановитель	(Trx1,2) – GSH	(Prx1-6) – GSH	GSH	(GPx1,3,4,7,8) – GSH (GPx2,5,6) – ?
Фермент восстановитель	TrxR	Trx, πGST, ERp46, Grx, PDI	–	Trx, Grx, PDI
Субстрат окислитель	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ONOO <sup>-</sup>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Prx1–6) ONOO <sup>-</sup> (Prx2,5,6) ROOH (Prx1–6) LOOH (Prx6) PLOOH (Prx6)	RX – ксенобиотики ROOH (α, μ, κ, θ...) LOOH (α, μ, κ, θ...) RCH <sub>2</sub> ONO <sub>2</sub> (α...) RCH <sub>2</sub> SCN (α...)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (GPx1–8) ONOO <sup>-</sup> (GPx1,4) ROOH (GPx1,3,4) LOOH (GPx1,3,4) PLOOH (GPx3,4)
Скорость пероксидазной реакции (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	~ 10 <sup>3</sup> M <sup>-1</sup> ·c <sup>-1</sup> –10 <sup>5</sup> M <sup>-1</sup> ·c <sup>-1</sup>	~ 10 <sup>5</sup> –10 <sup>8</sup> M <sup>-1</sup> ·c <sup>-1</sup>	~ 10 <sup>5</sup> –10 <sup>6</sup> M <sup>-1</sup> ·c <sup>-1</sup>	~ 10 <sup>7</sup> –10 <sup>8</sup> M <sup>-1</sup> ·c <sup>-1</sup>
Константы Михаэлиса для H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10–100 мкМ	90–200 мкМ	>3 мМ	10 мкМ–500 мкМ
Константы Михаэлиса для ROOH	6–20 мкМ	80–120 мкМ	0,05–3 мМ	0,05–1 мМ
Количество белков партнеров (диапазон) ( <a href="https://thebiogrid.org/">https://thebiogrid.org/</a> )	130–233	130–240	3–148	3–51
Участие в сигнальных путях	ASK-1/AP-1, ERK, NF-κB, p53, ASK1/JNK/p38, KEAP1/Nrf2, MST1/FOXO3, PI3K, HIF1α, PI3K/PTEN/Akt/mTOR и др.	TLR4/NF-κB, ASK-1/AP-1, APE1/Ref-1, KEAP1/Nrf2, MST1/FOXO3, c-Jun/πGST, ERK/cyclin D1, JAK2/STAT3, JNK/p38, ERK1/2, HIF1α, C/EBPβ и др.	KEAP1/Nrf2, PI3K/AKT, HIF1α, ASK1/JNK/p38, MST1/FOXO3	ASK-1/AP-1, KEAP1/Nrf2, PI3K/AKT/mTOR, NF-κB и др.
Ссылки	[41, 50–54]	[55–59]	[60–63]	[64–68]

Принятые сокращения: Trx – тиоредоксинов, Prx – пероксиредоксинов, GST – глутатион-S-трансфераз, GPx – глутатион-пероксидаз.

для всех пероксиредоксинов аминокислотными остатками: Pro44, Thr48 и Arg127 (нумерация для Prx1). Также как и все Trx-подобные ферменты, Prx имеют консервативную пространственную структуру – тиоредоксиновую укладку (рис. 1).

По аналогии с тиоредоксинами, в ходе эволюции от бактерий и простейших одноклеточных до многоклеточных организмов происходило увеличение числа изоформ Prx. Так, у бактерий обнаружено 3 изоформы, у дрожжей – 5, у животных – 6, а у растений – 9 изоформ пероксиредоксинов. Вероятно, увеличение в клетке количества компартментов, различающихся по спектрам образующихся гидропероксидов, привело к специализации пероксиредоксинов (к определенным видам пероксидов) и, соответственно, к росту числа изоформ Prx.

Эффективность катализа Prx ниже, чем у каталазы или селен-содержащих глутатионпероксидаз, и находится в диапазоне ~ 10<sup>5</sup>–10<sup>8</sup> M<sup>-1</sup>·c<sup>-1</sup> [70].

Следует отметить, что в нормальных условиях концентрация H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> внутри клеток редко превышает 1–5 мкМ, при развитии патологических процессов она достигает 150 мкМ, а при концентрации свыше 200 мкМ вызывает апоптоз и некроз клеток [38]. Prx1–6 проявляют максимальную активность именно в вышеуказанных микромолярных концентрациях гидропероксидов, т.к. значения кажущихся констант Михаэлиса (app. K<sub>m</sub>) находятся в пределах 15–200 мкМ [71]. В то же время каталаза, миелопероксидаза и большинство глутатионпероксидаз максимальную активность проявляют в миллимолярных концентрациях (app. K<sub>m</sub> ~ 10–100 мМ) перекисных субстратов [72]. Пероксиредоксины обладают достаточно широкой субстратной специфичностью: Prx1–6 способны восстанавливать различные неорганические (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, пероксинитрит) и органические (алкилгидропероксиды, пероксиды фосфолипидов и т.д.) гидропероксиды,

благодаря чему они играют важную роль в регуляции окислительно-восстановительного гомеостаза клетки. Основные характеристики Prx представлены в табл. 2.

В каталитическом цикле пероксиредоксинов можно выделить три этапа: 1) окисление пероксидазного остатка цистеина, 2) образование внутримолекулярной или межмолекулярной дисульфидной связи, 3) восстановление каталитического цистеина. Схема каталитического цикла Prx представлена на рис. 2, *a–в*. В ходе восстановления перекисного субстрата тиольная группа (SH-) пероксидазного цистеина  $C_p$  обратимо окисляется до сульфеновой кислоты (SOH-). В зависимости от концентрации пероксида, окисление сульфеновой кислоты ( $C_p$ -SOH) может происходить ещё дальше – до сульфиновой ( $C_p$ -SO<sub>2</sub>H) и сульфоновой ( $C_p$ -SO<sub>3</sub>H) кислот [59]. Окисленный пероксидазный остаток цистеина ( $C_p$ -SOH) с участием глутатиона и тиоредоксина (см. выше) восстанавливается до реакционноспособной формы  $C_p$ -SH. При этом восстановление сульфиновой кислоты  $C_p$ -SO<sub>2</sub>H типичных 2-Cys-Prx до  $C_p$ -SOH осуществляется сульфоредами (Srx) или сестринами (SESN) с затратой энергии АТФ [73, 74]. Состояние  $C_p$ -SO<sub>3</sub>H является необратимо окисленным. Понимание механизма восстановления  $C_p$ -SOH позволило разделить 2-Cys-Prx на типичные и атипичные. Атипичные 2-Cys-Prx (Prx5) образуют внутримолекулярную связь в пределах одной полипептидной цепи, что по механизму катализа больше остальных сближает их с тиоредоксинами. С этой точки зрения, можно предположить, что Prx5 является наиболее древним представителем семейства пероксиредоксинов. Вероятно, из атипичных 2-Cys-возникли типичные 2-Cys-пероксиредоксины (Prx1–Prx4), которые в ходе восстановления  $C_p$ -SOH стали образовывать межмолекулярные дисульфидные связи между пероксидажным остатком цистеина ( $C_p$ ) одной молекулы и восстанавливающим цистеином ( $C_R$ ) другой. Образовавшиеся межмолекулярные или внутримолекулярные дисульфидные связи 2-Cys-Prx восстанавливаются с участием Trx и GSH. В случае 1-Cys-пероксиредоксинов (Prx6) образуется дисульфидная связь с GSH, опосредованная глутатион-S-трансферазой ( $\pi$ GST) [75]. Вероятно, утрата восстанавливающего остатка ( $C_R$ ) у Prx6 в ходе эволюции произошла вторично, а механизм катализа 1-Cys-пероксиредоксинов является наиболее поздним.

Особенности кинетики каталитического процесса Prx1–6 таковы, что из-за более медленного восстановления сульфеновой кислоты ( $C_p$ -SOH) по сравнению с кинетикой окисле-

ния  $C_p$ -SH, происходит накопление окисленных пероксиредоксинов  $C_p$ -SOH в клетке [59]. В ходе восстановления окисленного цистеина ( $C_p$ -SOH) Prx могут образовывать межмолекулярные дисульфидные связи не только с белками-восстановителями (Trx1, Trx2, PDI (ERp46),  $\pi$ GST), но и с другими тиол-содержащими белками (транскрипционными факторами, киназами, фосфатазами, рецепторами, ионными каналами и др.), тем самым модулируя их активность и оказывая влияния на многие клеточные процессы [39, 58].

Кроме пероксидазной функции, Prx проявляют шаперонную, фосфолипазную и сигнально-регуляторную активность. Изменение степени окисления пероксидазного цистеина в активном центре пероксиредоксинов влияет на их физико-химические свойства и функцию в клетке [76]. Окисление цистеина в молекуле типичных 2-Cys-Prx (Prx1–Prx4) приводит к изменению конформации белков и образованию кольцеобразных олигомерных структур (тороидов), обладающих шаперонной активностью. Благодаря шаперонной активности, типичные 2-Cys-Prx препятствуют агрегации белков и способствуют восстановлению их нативной структуры, обеспечивая выживание клетки в условиях окислительного стресса [55]. Окисление 1-Cys-Prx (Prx6) приводит к активации Ca<sup>2+</sup>-независимой фосфолипазы A<sub>2</sub> (iPLA2), которая в норме проявляется только в кислых условиях (в лизосомах и ламеллярных телах, при pH 4–5) и играет важную роль в метаболизме фосфолипидов и передаче внутриклеточных и межклеточных сигналов [77]. Кроме того, экстраклеточные формы Prx проявляют иммуномодулирующие и сигнально-регуляторные свойства, опосредованные Toll-подобными рецепторами [78, 79].

Физиологическое значение пероксиредоксинов было продемонстрировано на нокаутных по этим генам мышах. Нокаут по гену *PRDX1* приводит к гемолитической анемии, увеличению окислительных повреждений тканей, возрастанию числа злокачественных опухолей. Нокаут по гену *PRDX2* приводит к повреждению эритроцитов, патологии селезёнки и развитию анемии. Нокаут по гену *PRDX3* приводит к уменьшению массы тела. Нокаут по гену *PRDX4* приводит к атрофии тестикул, олигозооспермии и повышению чувствительности сперматогенных клеток к окислительным воздействиям. Нокаут по гену *PRDX6* приводит к повышенному уровню окислительных повреждений белков, тканей и органов, несмотря на нормальный уровень экспрессии генов других антиоксидантных ферментов [80]. Экспериментов по нокауту гена *PRDX5* на животных не проводилось, однако

эксперименты на беспозвоночных указывают на его важную роль в иммунном ответе [81]. Таким образом, пероксиредоксины являются важной составляющей антиоксидантной и сигнально-регуляторной системы организма.

**Глутатионпероксидазы.** В отличие от пероксиредоксинов (в активном центре которых содержится 1 или 2 остатка Cys) многие глутатионпероксидазы (GPx) являются селен-содержащими белками. Считается, что замена серы на селен в активном центре GPx связана с тем, что Sec имеет более низкую, чем у Cys, константу диссоциации ( $pK_a = 5,47$ ) и более высокий восстановительный потенциал. Из-за химических свойств селена при физиологическом значении pH в белках обычно присутствует Sec в виде селенолята ( $-Se^-$ ). Селенолят намного более реакционноспособен, чем тиолаты, что обеспечивает селен-содержащим ферментам высокую каталитическую эффективность. Необходимо отметить, что к селен-содержащим белкам также относятся некоторые тиоредоксинредуктазы (TrxR), входящие в состав антиоксидантной системы. В частности, Trx и TrxR участвуют в регенерации пероксиредоксинов [82].

Несомненно, что по сравнению с тиол-содержащими оксидоредуктазами, селен-содержащие GPx являются эволюционно более поздними ферментами, т.к. для их биосинтеза было необходимо создать специальные системы транскрипции и трансляции, включающие SECIS — элемент в мРНК (для кодирования Sec вместо стоп-кодона UGA), а также синтез специальной тРНК, несущей Sec [83]. Глутатионпероксидазы широко представлены в живом мире (от простейших до человека), причём обнаружены как селен-содержащие, так и цистеин-содержащие изоформы. Следует отметить, что в ходе эволюции живых организмов происходило увеличение числа селен-содержащих белков. Известно, что только ~20% прокариот используют Sec в своих белках, тогда как ~50% эукариот используют Sec в своих ферментах [84]. У человека обнаружено 8 глутатионпероксидаз (GPx1–8), из которых 5 изоформ (GPx1–4 и GPx6) содержат в активном центре селеноцистеин. Согласно филогенетическому анализу, семейство GPx состоит из трёх эволюционных групп, происходящих от общего Cys-содержащего предка: 1) GPx1/GPx2, 2) GPx3/GPx5/GPx6 и 3) GPx4/GPx7/GPx8. Cys-содержащие GPx7 и GPx8 произошли от GPx4-подобных предков. GPx5 и GPx6, по-видимому, являются результатом тандемной дупликации GPx3. GPx1 и GPx2 являются эволюционным ответвлением GPx3, GPx5 и GPx6 [85]. По структуре все GPx имеют тиоредоксиную укладку (рис. 1, в) и в основном представ-

ляют собой гомотетрамерные протеины, за исключением GPx4, которая является мономерным белком.

Глутатионпероксидазы имеют различную внутриклеточную и тканевую специфичность, что, вероятно, связано со «специализацией» каждой из изоформ для восстановления различных гидропероксидов. GPx1 локализована в цитоплазме и митохондриях почти во всех клетках. GPx2 обнаружена в эпителии кишечника и выполняет важную антиоксидантную функцию. GPx3 секретируется эпителием почечных канальцев в кровь, а снижение её уровня/активности приводит к росту тромбов. Изоформа GPx4 экспрессируется практически во всех тканях млекопитающих, связана с мембраной митохондрий и защищает их от окислительного повреждения. GPx5 является секреторным белком придатка яичек и участвует в защите созревающих сперматозоидов от АФК. GPx6 обнаружена в обонятельном эпителии и, предположительно, играет важную роль в метаболизме одорантов. Примечательно, что GPx6 человека и свиньи в активном центре содержит селеноцистеин, в то время как GPx6 мыши и крысы содержит цистеин. GPx7 и GPx8 — относительно недавно открытые изоформы цистеин-содержащих глутатионпероксидаз эндоплазматического ретикулума, где они в комплексе с дисульфидизомеразой (PDI) и Trx участвуют в дитиолдисульфидном обмене, препятствуя агрегации белков [86].

Для GPx характерна высокая пероксидазная активность и более эффективный механизм катализа по сравнению с тиоредоксинами и пероксиредоксинами. Глутатионпероксидазы восстанавливают пероксид водорода или органические гидропероксиды до воды или соответствующих спиртов, используя в качестве донора электронов восстановленный глутатион. Наличие селеноцистеина в активном центре глутатионпероксидаз обеспечивает им эффективную элиминацию гидропероксидов с константой скорости  $\sim 10^7\text{--}10^8 \text{ M}^{-1}\cdot\text{с}^{-1}$ , при этом максимальная активность этих ферментов проявляется в широком диапазоне концентраций пероксидов [87]. Рекомбинантные GPx с заменой Sec на Cys имеют пероксидазную активность на 2–3 порядка ниже. Основные характеристики глутатионпероксидаз представлены в табл. 2. В каталитическом цикле глутатионпероксидаз, как и в случае рассмотренных ранее семейств оксидоредуктаз, различают 3 этапа: 1) окисление пероксидазного остатка селеноцистеина ( $-SeOH$ ), 2) образование межмолекулярной дисульфидной связи с молекулой глутатиона ( $Se-SG$ ), 3) восстановление  $Se-SG$  второй молекулой GSH до активного



селеноцистеина (-SeH). Элиминация пероксидов глутатионпероксидазами происходит по механизму «пинг-понг» с участием двух субстратов: окислителя (пероксида/гидропероксида) и восстановителя (GSH) [68].

При исследовании GPx1 было показано наличие трёх аминокислот вблизи каталитического центра, которые обеспечивают связывание GSH. Взаимодействие GPx1 с пероксидом водорода приводит к окислению группы -Se-H в активном сайте фермента до -Se-OH, после чего фермент восстанавливается одной молекулой глутатиона GSH (находящейся рядом) с образованием промежуточного продукта -Se-SG. Вторая молекула глутатиона взаимодействует со связью -Se-SG, что приводит к восстановлению селеноцистеина глутатионпероксидазы (-Se-H) и окислению глутатиона (GSSG). Окисленный GSSG восстанавливается NADPH-зависимой глутатионредуктазой (GR) до двух молекул GSH и вновь включается в каталитический цикл. Схема каталитического цикла селен-содержащих GPx представлена на рис. 2. Каталитический цикл цистеин-содержащих глутатионпероксидаз (NS-GPx) напоминает каталитический цикл 2-Cys-пероксиредоксинов с участием Trx и GSH в качестве восстановителей, что ещё раз подтверждает генетическую связь этих семейств.

При недостатке селена в рационе питания уменьшается уровень GPx, что снижает устойчивость организмов к окислительному стрессу и может приводить к развитию свободнорадикальных патологий. У человека снижение активности GPx1 в результате дефицита селена выявлено при сердечно-сосудистых заболеваниях и при раке [88]. Снижение активности GPx7 способствует онкотрансформации клеток и развитию злокачественных опухолей молочной железы [89]. Физиологическая роль некоторых GPx была продемонстрирована в экспериментах по нокауту соответствующих генов мыши. Так, мыши, нокаутные по одной копии гена *GPX1*, имеют нормальный фенотип и нормальную продолжительность жизни, однако у мышей, нокаутных по обеим копиям этого гена, преждевременно развивается катаракта и наблюдаются дефекты в пролиферации вспомогательных мышечных клеток. Повышенная экспрессия гена *GPX1*, защищает мышей от развития окислительного стресса, однако у таких животных развивается гипергликемия, резистентность к инсулину и ожирение [68]. У мышей с нокаутом гена *GPX2* наблюдается воспаление слизистой оболочки кишечника, особенно при дефиците селена в рационе [65]. Мыши, нокаутные по гену митохондриальной и ядерной изоформы *GPX4*, погибают в раннем эмбриогенезе,

в то время как нокаут по гену цитоплазматической изоформы *GPX4* не приводит к таким фатальным последствиям [64, 67]. Нокаут *GPX5* приводит к появлению дефектов в общем развитии и отклонению развития зрительной системы у потомства, полученного от самцов с нокаутом по этому гену [66].

Таким образом, глутатионпероксидазы являются важными антиоксидантными ферментами, регулирующими окислительно-восстановительный гомеостаз, клеточную сигнализацию, апоптоз и дифференцировку клеток.

**Глутатион-S-трансферазы.** Еще одним важным представителем гидропероксид-восстанавливающей системы клетки являются глутатион-S-трансферазы (GST), которые также имеют тиоредоксиновую укладку и относятся к Trx-подобным белкам. GST участвуют в начальной стадии детоксикации гидрофобных ксенобиотиков (RX), связывая их с GSH, вследствие чего они делаются более водорастворимыми и после сложных ферментативных превращений в меркаптураты выводятся из организма:  $RX + GSH \rightarrow GSR + HX$  [90]. Благодаря функции GST клетки приобретают устойчивость к антибиотикам, гербицидам, инсектицидам и химиопрепаратам. В частности, повышенная экспрессия GST обнаружена в различных раковых клетках, имеющих лекарственную устойчивость [63]. Помимо функции детоксикации, GST играют важную роль в работе антиоксидантной системы благодаря способности восстанавливать органические гидропероксиды до спиртов, используя GSH в качестве субстрата – восстановителя (см. ниже). При этом GST не имеют характерного для других Trx-подобных белков дитиольного мотива (Cys-x-x-Cys) в каталитическом центре. Важные для S-глутатионилирования аминокислотные остатки располагаются в так называемой «каталитической петле», находящейся после первого  $\beta$ -стренда в тиоредоксин-подобном домене GST (рис. 1).

Глутатион-S-трансферазы широко представлены в живом мире: от бактерий до растений и животных. GST представляют из себя весьма гетерогенное семейство ферментов, с большим количеством изоформ (табл. 2), которые сильно различаются по субстратной специфичности и активности, что связано с процессами дупликации генов, генетической рекомбинацией и накоплением мутаций в ходе эволюции. Для некоторых членов GST функциональная неоднородность дополнительно увеличивается за счёт альтернативного сплайсинга и точечных мутаций (полиморфизм генов), что приводит к изменению субстратной специфичности новой изоформы GST. Присутствие большого количества

изоформ ферментов GST эволюционно связано с адаптацией к различным внешним условиям [62].

Все GST состоят из двух доменов: общего для всех изоформ консервативного N-концевого (GSH-связывающего) и варибельного C-концевого (для связывания субстратов). Классификация GST основана на различиях в аминокислотной последовательности C-концевого домена. По субклеточной локализации и последовательности C-концевого домена GST делят на несколько подсемейств. У человека цитозольные GST состоят из 7 подсемейств, митохондриальные GST включают одно подсемейство, а мембраносвязанные GST состоят из 6 подсемейств [62]. Основные характеристики глутатион-S-трансфераз представлены в табл. 2.

Как отмечалось ранее, GST являются важными ферментами антиоксидантной защиты. Показано, что отдельные изоформы GST способны в присутствии GSH восстанавливать некоторые классы органических соединений, таких как нитраты ( $\text{RCH}_2\text{ONO}_2$ ) и изотиоцианаты ( $\text{RCH}_2\text{SCN}$ ), а также гидропероксиды длинноцепочечных жирных кислот – LOOH [90]. Реакция в этом случае протекает в две стадии [91], поскольку фермент катализирует только восстановление молекулы липопероксида:



а дальнейшее окисление ещё одной молекулы GSH осуществляется спонтанно (неферментативно):



Как нетрудно убедиться, суммарная реакция полностью тождественна реакции, катализируемой глутатионпероксидазами:



Нами впервые было установлено [92, 93], а позднее подтверждено и другими авторами [94, 95], что GST, подобно мономерной GPx, способны восстанавливать LOOH-ацилы окисленных фосфолипидов непосредственно в мембранах без их предварительного фосфолипазного гидролиза. Более того, было показано, что сами GST ингибируются продуктами фосфолипазного гидролиза – длинноцепочечными свободными жирными кислотами, тогда как цитозольная Se-содержащая GPx, напротив, была абсолютно резистентна к действию свободных жирных кислот [96]. Исходя из полученных результатов можно предположить, что в нормальных физиологических условиях, когда фосфолипаза  $A_2$  ма-

лоактивна, контроль за уровнем LOOH в биомембранах осуществляется преимущественно глутатион-S-трансферазами, способными напрямую восстанавливать мембранные LOOH. При патологии же (например, при ишемии) создаются условия (ацидоз, выход ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и др.) для активации фосфолипазы  $A_2$ , что должно сопровождаться подавлением активности GST вследствие накопления свободных жирных кислот и включением в процесс детоксикации LOOH цитозольных GPx, нечувствительных к действию продуктов фосфолипазного гидролиза. В то же время фосфолипаза  $A_2$  гидролизует преимущественно окисленные жирнокислотные остатки фосфолипидов [97, 98], переводя их в гидропероксиды свободных жирных кислот, являющиеся субстратом Se-содержащих GPx, что подтверждает важную роль ферментативного гидролиза в репарации биомембран после CP-повреждения. Таким образом, фосфолипаза  $A_2$ , обеспечивая доступность окисленных жирнокислотных остатков мембранных фосфолипидов для восстановления цитозольными глутатионпероксидазами, принимает самое непосредственное участие в регуляции процессов CP-окисления липидов в клетке. Было установлено, что предпочтительными субстратами Se-содержащей GPx из бычьих эритроцитов являются гидрофильные и нуклеофильные органические гидропероксиды с низким молекулярным весом, а также  $\text{H}_2\text{O}_2$ , тогда как предпочтительными субстратами неселеновой GST из печени свиньи были липофильные и электрофильные гидропероксиды с большим углеводородным радикалом [99]. Оба фермента эффективно восстанавливают гидропероксиды полиеновых жирных кислот, но GST, неспособная восстанавливать  $\text{H}_2\text{O}_2$ , достаточно эффективно восстанавливает LOOH-ацилы ненасыщенных фосфолипидов в биомембранах без их предварительного гидролиза фосфолипазой  $A_2$  [98–100].

Кроме непосредственного участия в восстановлении гидропероксидов, для некоторых изоформ GST показано опосредованное участие в антиоксидантной защите. Например, GST $\pi$  восстанавливает окисленный пероксидазный остаток цистеина 1-Cys-пероксиредоксинов (рис. 2), тем самым являясь восстановителем в каталитическом цикле Ptxb человека. Окисленные формы катехоламинов, способствующие образованию супероксидного анион-радикала, являются субстратами GST. Конъюгация таких соединений с глутатионом препятствует избыточной продукции  $\text{O}_2^-$  и способствует нормализации редокс-статуса клеток [101].

Кроме детоксикации ксенобиотиков, антиоксидантной функции, GST являются регулято-

рами внутриклеточных сигналов за счёт белок-белковых взаимодействий с киназами и транскрипционными факторами (табл. 2). Например, *GSTA1-1* и *GSTP1-1* взаимодействуют с киназой *JNK1* (участвующей в запуске апоптоза), препятствуя её активации в нормальных условиях. С ростом уровня АФК в клетке комплексы *JNK1* и *GSTA1-1/GSTP1-1* распадаются, что приводит к запуску апоптоза. Аналогичная ситуация показана для *GSTM1-1* и проапоптогической киназы *ASK1*. Глутатион-S-трансферазы путём глутатионилирования (по остаткам Cys) принимают участие в регуляции работы серин/треониновых АМР-активируемых протеинкиназ (АМРК), которые играют ключевую роль в контроле энергетического баланса клетки. Кроме того, GST влияют на активность регуляторных белков опосредованно через регуляцию уровня продуктов перекисного окисления липидов (акролеин, 4-гидрокси-ноненаль), влияющих на активность циклин-зависимых киназ [60].

Физиологическая роль некоторых глутатион-S-трансфераз показана на животных моделях с нокаутом соответствующих генов: *GSTA3*, *GSTA4*, *GSTM1*, *GSTP1*, *GSTT1*, *GSTO1* и *GSTS1*. Нокаут указанных генов по отдельности не приводит к каким-либо серьезным изменениям фенотипа и фертильности у мышей, однако у таких животных существенно повышается чувствительность ко многим ксенобиотикам [61]. Например, мыши, нокаутные по гену *GSTP1-1*, оказались более чувствительными к нейротоксину 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридину (МРТР), что приводило к раннему появлению дегенерации дофаминергических нейронов и волокон полосатого тела головного мозга [102]. Нокаут *GSTT1* у мышей также приводил к повышенной чувствительности к 1,2-эпокси-3-п-нитрофенокси-пропану (EPNP), дихлорметану (DCM) и 1,3-бис (2-хлорэтил)-1-нитрозомочевине (BCNU) [61, 103]. Гомозиготные делеции генов *GSTM1* и *GSTT1* обнаружены у людей, что приводит к снижению общей GST-активности в их тканях. Для делеции *GSTT1* человека показана связь с лейко- и нейтропенией. Кроме того, предполагают, что гомозиготные по этим делециям люди подвержены повышенному риску злокачественных новообразований из-за снижения способности детоксицировать канцерогены [102, 104].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пероксиредоксины (Prx), глутатионпероксидазы (GPx) и глутатион-S-трансферазы (GST) – филогенетически близкие семейства ферментов, которые являются важнейшими ре-

гуляторами окислительно-восстановительного гомеостаза клетки. Указанные семейства ферментов способны нейтрализовать широкий спектр неорганических и органических пероксидов. По эффективности пероксидазной активности Prx и GST уступают GPx. Пероксиредоксины, будучи предшественниками GPx, эволюционно являются более древними белками. Однако в ходе своей эволюции Prx приобрели дополнительные функции в клетке. Например, 2-Cys-пероксиредоксины (Prx1–4) благодаря шаперонной активности предотвращают агрегацию белков в клетке в условиях окислительного и температурного стресса. Наличие фосфолипазной активности у Prx6 позволяет этому ферменту участвовать в метаболизме фосфолипидов мембран клеток, а также в регуляции дифференцировки, миграции и гибели клеток. Способность образовывать межмолекулярные дисульфидные связи с важнейшими регуляторными белками (транскрипционными факторами, рецепторами) позволяет Prx опосредованно влиять на все основные клеточные процессы. Глутатион-S-трансферазы – это наиболее многофункциональные тиоредоксин-подобные белки. Они являются важнейшими ферментами детоксикации ксенобиотиков, регуляторами внутриклеточной сигнализации, и, кроме того, они участвуют в элиминации многих гидропероксидов (в особенности, липидной природы). Глутатионпероксидазы, в отличие от Prx и GST, являются эволюционно более поздними и наиболее специализированными ферментами. Благодаря селеноцистеину в активном центре GPx относятся к наиболее эффективным пероксидазам, утилизирующим различные перекисные субстраты, что делает их незаменимыми элементами антиоксидантной защиты. Пероксиредоксины, глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы являются ярким примером молекулярной эволюции тиоредоксин-подобных белков, функции которых тесно взаимосвязаны, но до сих пор до конца не исследованы.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-14-50114).

**Благодарности.** Авторы благодарят проф. д.б.н. В.И. Новоселова за ценные замечания при подготовке рукописи.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследований.

1. Меньщикова Е. Б., Ланкин В. З., Зенков Н. К., Бондарь И. А., Круговых Н. Ф., Труфакин В. А. (2006) *Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты*, Слово, Москва, с. 556.
2. Hernansanz-Agustín, P., and Enríquez, J. A. (2021) Generation of reactive oxygen species by mitochondria, *Antioxidants (Basel)*, **10**, 415, doi: 10.3390/antiox10030415.
3. Chernyak, B. V., Izyumov, D. S., Lyamzaev, K. G., Pashkovskaya, A. A., Pletjushkina, O. Y., et al. (2006) Production of reactive oxygen species in mitochondria of HeLa cells under oxidative stress, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1757**, 525-534, doi: 10.1016/j.bbabi.2006.02.019.
4. McCord, J. M. (2000) The evolution of free radicals and oxidative stress, *Am. J. Med.*, **108**, 652-659.
5. Brand, M. D. (2016) Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling, *Free Radic. Biol. Med.*, **100**, 14-31, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.001.
6. Crapo, J. D., and Tierney, D. F. (1974) Superoxide dismutase and pulmonary oxygen toxicity, *Am. J. Physiol.*, **226**, 1401-1407.
7. Di Meo, S., Reed, T. T., Venditti, P., and Victor, V. M. (2016) Role of ROS and RNS sources in physiological and pathological conditions, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2016**, 1245049, doi: 10.1155/2016/1245049.
8. Halliwell, B. (2020) Reflections of an aging free radical, *Free Radic. Biol. Med.*, **161**, 234-245, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.10.010.
9. Vladimirov, Y. A., and Proskurnina, E. V. (2009) Free radicals and cell chemiluminescence, *Biochemistry (Moscow)*, **74**, 1545-1566, doi: 10.1134/S0006297909130082.
10. Bruskov, V. I., Karp, O. E., Garmash, S. A., Shtarkman, I. N., Chernikov, A. V., and Gudkov, S. V. (2012) Prolongation of oxidative stress by long-lived reactive protein species induced by X-ray radiation and their genotoxic action, *Free Radic. Res.*, **46**, 1280-1290, doi: 10.3109/10715762.2012.709316.
11. Soodaeva, S. K., Klimanov, I. A., and Nikitina, L. Y. (2017) Nitrosative and oxidative stresses in respiratory diseases, *Pulmonologiya*, **27**, 262-273, doi: 10.18093/0869-0189-2017-27-2-262-273.
12. Schöneich, C. (2019) Thiyl radical reactions in the chemical degradation of pharmaceutical proteins, *Molecules*, **24**, 4357, doi: 10.3390/molecules24234357.
13. Panov, A. (2018) Perhydroxyl radical (HO<sub>2</sub><sup>•</sup>) as inducer of the isoprostane lipid peroxidation in mitochondria, *Mol. Biol. (Mosk.)*, **52**, 347-359, doi: 10.7868/S0026898418030011.
14. Osipov, A. N., Borisenko, G. G., and Vladimirov, Y. A. (2007) Biological activity of hemoprotein nitrosyl complexes, *Biochemistry (Moscow)*, **72**, 1491-1504, doi: 10.1134/S0006297907130068.
15. Collin, F. (2019) Chemical basis of reactive oxygen species reactivity and involvement in neurodegenerative diseases, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 2407, doi: 10.3390/ijms20102407.
16. Dutton, A. S., Fukuto, J. M., and Houk, K. N. (2005) Theoretical reduction potentials for nitrogen oxides from CBS-QB3 energetics and (C)PCM solvation calculations, *Inorg. Chem.*, **44**, 4024-4028, doi: 10.1021/ic048734q.
17. Berg, J., Tymoczko, J., and Stryer, L. (2002) *Biochemistry*, 5th Edn., N. Y., WH Freeman.
18. Panasenko, O. M., Torkhovskaya, T. I., Gorudko, I. V., and Sokolov, A. V. (2020) The Role of halogenative stress in atherogenic modification of low-density lipoproteins, *Biochemistry (Moscow)*, **85** (Suppl 1), 34-55, doi: 10.1134/S0006297920140035.
19. Di Mascio, P., Martinez, G. R., Miyamoto, S., Ronsein, G. E., Medeiros, M. H. G., and Cadet, J. (2019) Singlet molecular oxygen reactions with nucleic acids, lipids, and proteins, *Chem. Rev.*, **119**, 2043-2086, doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00554.
20. Sies, H., and Jones, D. P. (2020) Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **21**, 363-383, doi: 10.1038/s41580-020-0230-3.
21. Kohlgrüber, S., Upadhye, A., Dyballa-Rukes, N., McNamara, C. A., and Altschmied, J. (2017) Regulation of transcription factors by reactive oxygen species and nitric oxide in vascular physiology and pathology, *Antioxid. Redox Signal.*, **26**, 679-699, doi: 10.1089/ars.2016.6946.
22. Forrester, S. J., Kikuchi, D. S., Hernandez, M. S., Xu, Q., and Griendling, K. K. (2018) Reactive oxygen species in metabolic and inflammatory signaling, *Circ. Res.*, **122**, 877-902, doi: 10.1161/circresaha.117.311401.
23. Hoffmann, M. H., and Griffiths, H. R. (2018) The dual role of reactive oxygen species in autoimmune and inflammatory diseases: evidence from preclinical models, *Free Radic. Biol. Med.*, **125**, 62-71, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.016.
24. Cadet, J., and Davies, K. J. A. (2017) Oxidative DNA damage & repair: an introduction, *Free Radic. Biol. Med.*, **107**, 2-12, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.03.030.
25. Chernikov, A. V., Gudkov, S. V., Usacheva, A. M., and Bruskov, V. I. (2017) Exogenous 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine: biomedical properties, mechanisms of action, and therapeutic potential, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 1686-1701, doi: 10.1134/S0006297917130089.
26. Chao, M. R., Evans, M. D., Hu, C. W., Ji, Y., Möller, P., et al. (2021) Biomarkers of nucleic acid oxidation – a summary state-of-the-art, *Redox Biol.*, **42**, 101872, doi: 10.1016/j.redox.2021.101872.
27. Poetsch, A. R. (2020) The genomics of oxidative DNA damage, repair, and resulting mutagenesis, *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, **18**, 207-219, doi: 10.1016/j.csbj.2019.12.013.
28. Davies, M. J. (2016) Protein oxidation and peroxidation. *Biochem. J.*, **473**, 805-825, doi: 10.1042/BJ20151227.
29. Kehm, R., Baldensperger, T., Raupbach, J., and Höhn, A. (2021) Protein oxidation – formation mechanisms, detection and relevance as biomarkers in human diseases, *Redox Biol.*, **42**, 101901, doi: 10.1016/j.redox.2021.101901.
30. Lankin, V. Z., Shumaev, K. B., Tikhaze, A. K., and Kurganov, B. I. (2017) Influence of dicarbonyls on kinetic characteristics of glutathione peroxidase, *Dokl. Biochem. Biophys.*, **475**, 287-290, doi: 10.1134/S1607672917040123.
31. Lankin, V. Z., Tikhaze, A. K., Konovalova, G. G., and Kozachenko, A. I. (1999) Concentration-dependent inversion of antioxidant and prooxidant effects of β-carotene in tissues *in vivo*, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **128**, 930-932, doi: 10.1007/bf02438088.
32. Braakman, R. (2019) Evolution of cellular metabolism and the rise of a globally productive biosphere, *Free Radic. Biol. Med.*, **140**, 172-187, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.004.
33. Ittarat, W., Sato, T., Kitashima, M., Sakurai, H., Inoue, K., and Seo, D. (2021). Rubredoxin from the green sulfur bacterium *Chlorobaculum tepidum* donates a redox equivalent to the flavodiiron protein in an NAD(P)H dependent manner via ferredoxin-NAD(P)<sup>+</sup> oxidoreductase, *Arch. Microbiol.*, **203**, 799-808, doi: 10.1007/s00203-020-02079-4.
34. Ding, H., and Demple, B. (2000) Direct nitric oxide signal transduction via nitrosylation of iron-sulfur centers in the

- SoxR transcription activator, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 5146-5150, doi: 10.1073/pnas.97.10.5146.
35. Case, A. J. (2017) On the origin of superoxide dismutase: an evolutionary perspective of superoxide-mediated redox signaling, *Antioxidants (Basel)*, **6**, 82, doi: 10.3390/antiox6040082.
  36. Zorov, D. B., Andrianova, N. V., Babenko, V. A., Bakeeva, L. E., Zorov, S. D., et al. (2020). Nonphosphorylating oxidation in mitochondria and related processes, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 1570-1577, doi: 10.1134/S0006297920120093.
  37. Lankin, V. Z., Vandyshev, D. B., Tikhaze, A. K., Kosykh, V. A., and Pomoinetskii, V. D. (1981) Effect of hyperoxia on superoxide dismutase and glutathione lipoperoxidase activity in mouse tissues, *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, **259**, 229-231.
  38. Schröder, E., and Eaton, P. (2008) Hydrogen peroxide as an endogenous mediator and exogenous tool in cardiovascular research: issues and considerations, *Curr. Opin. Pharmacol.*, **8**, 153-159, doi: 10.1016/j.coph.2007.12.012.
  39. Rhee, S. G., Woo, H. A., and Kang, D. (2018) The role of peroxiredoxins in the transduction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Signals, *Antioxidants Redox Signal.*, **28**, 537-557, doi: 10.1089/ars.2017.7167.
  40. Olson, K. R. (2020) Reactive oxygen species or reactive sulfur species: why we should consider the latter, *J. Exp. Biol.*, **223**, jeb196352, doi: 10.1242/jeb.196352.
  41. Lu, J., and Holmgren, A. (2014) The thioredoxin antioxidant system, *Free Radic. Biol. Med.*, **66**, 75-87, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.
  42. Balsera, M., and Buchanan, B. B. (2019) Evolution of the thioredoxin system as a step enabling adaptation to oxidative stress, *Free Radic. Biol. Med.*, **140**, 28-35, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.
  43. Ingles-Prieto, A., Ibarra-Molero, B., Delgado-Delgado, A., Perez-Jimenez, R., Fernandez, J. M., et al. (2013) Conservation of protein structure over four billion years, *Structure*, **21**, 1690-1697, doi: 10.1016/j.str.2013.06.020.
  44. Johansson, L., Gafvelin, G., and Arnér, E. S. J. (2005) Selenocysteine in proteins – properties and biotechnological use, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, **1726**, 1-13, doi: 10.1016/j.bbagen.2005.05.010.
  45. Atkinson, H. J., and Babbitt, P. C. (2009) Glutathione transferases are structural and functional outliers in the thioredoxin fold, *Biochemistry*, **48**, 11108-11116, doi: 10.1021/bi901180v.
  46. Pan, J. L., and Bardwell, J. C. A. (2006) The origami of thioredoxin-like folds, *Protein Sci.*, **15**, 2217-2227, doi: 10.1110/ps.062268106.
  47. Modi, T., Huihui, J., Ghosh, K., and Ozkan, S. B. (2018) Ancient thioredoxins evolved to modern day stability-function requirement by altering native state ensemble, *Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **373**, 20170184, doi: 10.1098/rstb.2017.0184.
  48. Nonn, L., Williams, R. R., Erickson, R. P., and Powis, G. (2003) The absence of mitochondrial thioredoxin 2 causes massive apoptosis, exencephaly, and early embryonic lethality in homozygous mice, *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 916-922, doi: 10.1128/MCB.23.3.916-922.2003.
  49. Matsui, M., Oshima, M., Oshima, H., Takaku, K., and Maruyama, T. (1996) Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse thioredoxin gene, *Dev. Biol.*, **178**, 179-185, doi: 10.1006/dbio.1996.0208.
  50. Mitchell, D. A., Morton, S. U., Fernhoff, N. B., and Marletta, M. A. (2007) Thioredoxin is required for S-nitrosation of procaspase-3 and the inhibition of apoptosis in Jurkat cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 11609-11614, doi: 10.1073/pnas.0704898104.
  51. Qayyum, N., Haseeb, M., Kim, M. S., Choi, S. (2021) Role of thioredoxin-interacting protein in diseases and its therapeutic outlook, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 2754, doi: 10.3390/ijms22052754.
  52. Benhar, M., Shytaj, I. L., Stamler, J. S., and Savarino, A. (2016) Dual targeting of the thioredoxin and glutathione systems in cancer and HIV, *J. Clin. Invest.*, **126**, 1630-1639, doi: 10.1172/JCI185339.
  53. Lee, S., Kim, S. M., and Lee, R. T. (2013) Thioredoxin and thioredoxin target proteins: from molecular mechanisms to functional significance, *Antioxid. Redox Signal.*, **18**, 1165-1207, doi: 10.1089/ars.2011.4322.
  54. Seco-Cervera, M., González-Cabo, P., Pallardó, F. V., Romá-Mateo, C., and García-Giménez, J. L. (2020) Thioredoxin and glutaredoxin systems as potential targets for the development of new treatments in Friedreich's ataxia, *Antioxidants (Basel)*, **9**, 1257, doi: 10.3390/antiox9121257.
  55. Rhee, S. G., and Kil, I. S. (2017) Multiple functions and regulation of mammalian peroxiredoxins, *Annu. Rev. Biochem.*, **86**, 1-27, doi: 10.1146/annurev-biochem-060815-014431.
  56. Luo, W., Chen, I., Chen, Y., Alkam, D., Wang, Y., and Semenza, G. L. (2016) PRDX2 and PRDX4 are negative regulators of hypoxia-inducible factors under conditions of prolonged hypoxia, *Oncotarget*, **7**, 6379-6397, doi: 10.18632/oncotarget.7142.
  57. Ma, S., Zhang, X., Zheng, L., Li, Z., Zhao, X., et al. (2016) Peroxiredoxin 6 is a crucial factor in the initial step of mitochondrial clearance and is upstream of the PINK1-Parkin pathway, *Antioxid. Redox Signal.*, **24**, 486-501, doi: 10.1089/ars.2015.6336.
  58. Sharapov, M. G., and Novoselov, V. I. (2019) Catalytic and signaling role of peroxiredoxins in carcinogenesis, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 79-100, doi: 10.1134/S0006297919020019.
  59. Portillo-Ledesma, S., Randall, L. M., Parsonage, D., Dalla Rizza, J., Karplus, P. A., et al. (2018) Differential kinetics of two-cysteine peroxiredoxin disulfide formation reveal a novel model for peroxide sensing, *Biochemistry*, **57**, 3416-3424, doi: 10.1021/acs.biochem.8b00188.
  60. Kalinina, E. V., Chernov, N. N., and Novichkova, M. D. (2014) Role of glutathione, glutathione transferase, and glutaredoxin in regulation of redox-dependent processes, *Biochemistry (Moscow)*, **79**, 1562-1583, doi: 10.1134/S0006297914130082.
  61. Arakawa, S. (2013) Utilization of glutathione S-transferase Mu 1- and Theta 1-null mice as animal models for absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity studies, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **9**, 725-736, doi: 10.1517/17425255.2013.780027.
  62. Mohana, K., and Achary, A. (2017) Human cytosolic glutathione-S-transferases: quantitative analysis of expression, comparative analysis of structures and inhibition strategies of isozymes involved in drug resistance, *Drug Metab. Rev.*, **49**, 318-337, doi: 10.1080/03602532.2017.1343343.
  63. Singh, R. R., and Reindl, K. M. (2021) Glutathione S-transferases in cancer, *Antioxidants (Basel)*, **10**, 701, doi: 10.3390/antiox10050701.
  64. Yang, W. S., Sriramaratnam, R., Welsch, M. E., Shimada, K., Skouta, R., et al. (2014) Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4, *Cell*, **156**, 317-331, doi: 10.1016/j.cell.2013.12.010.
  65. Esworthy, R. S., Yang, L., Frankel, P. H., and Chu, F. F. (2005) Epithelium-specific glutathione peroxidase, Gpx2, is involved in the prevention of intestinal inflammation in selenium-deficient mice, *J. Nutr.*, **135**, 740-745, doi: 10.1093/jn/135.4.740.

66. Chabory, E., Damon, C., Lenoir, A., Kauselmann, G., Kern, H., et al. (2009) Epididymis seleno-independent glutathione peroxidase 5 maintains sperm DNA integrity in mice, *J. Clin. Invest.*, **119**, 2074-2085, doi: 10.1172/JCI38940.
67. Lu, L., Oveson, B. C., Jo, Y. J., Lauer, T. W., Usui, S., et al. (2009) Increased expression of glutathione peroxidase 4 strongly protects retina from oxidative damage, *Antioxid. Redox Signal.*, **11**, 715-724, doi: 10.1089/ars.2008.2171.
68. Brigelius-Flohé, R., and Flohé, L. (2020) Regulatory phenomena in the glutathione peroxidase superfamily, *Antioxidants Redox Signal.*, **33**, 498-516, doi: 10.1089/ars.2019.7905.
69. Sharapov, M. G., Ravin, V. K., and Novoselov, V. I. (2014) Peroxiredoxins as multifunctional enzymes, *Mol. Biol. (Mosk.)*, **48**, 520-545, doi: 10.1134/S0026893314040128.
70. Peskin, A. V., and Winterbourn, C. C. (2021) The enigma of 2-Cys peroxiredoxins: what are their roles? *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 84-91, doi: 10.1134/S0006297921010089.
71. Winterbourn, C. C., and Peskin, A. V. (2016) Kinetic approaches to measuring peroxiredoxin reactivity, *Mol. Cells*, **39**, 26-30, doi: 10.14348/molcells.2016.2325.
72. Flohé, L., Toppo, S., Cozza, G., and Ursini, F. (2011) A comparison of thiol peroxidase mechanisms, *Antioxid. Redox Signal.*, **15**, 763-780, doi: 10.1089/ars.2010.3397.
73. Forshaw, T. E., Reisz, J. A., Nelson, K. J., Gumpena, R., Lawson, J. R., et al. (2021) Specificity of human sulfiredoxin for reductant and peroxiredoxin oligomeric state, *Antioxidants (Basel)*, **10**, 946, doi: 10.3390/antiox10060946.
74. Liu, Y., Li, M., Du, X., Huang, Z., and Quan, N. (2021) Sestrin 2, a potential star of antioxidant stress in cardiovascular diseases, *Free Radic. Biol. Med.*, **163**, 56-68, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.11.015.
75. Fisher, A. B., Vasquez-Medina, J. P., Dodia, C., Sorokina, E. M., Tao, J.-Q., and Feinstein, S. I. (2018) Peroxiredoxin 6 phospholipid hydroperoxidase activity in the repair of peroxidized cell membranes, *Redox Biol.*, **14**, 41-46, doi: 10.1016/j.redox.2017.08.008.
76. Perkins, A., Nelson, K. J., Parsonage, D., Poole, L. B., and Karplus, P. A. (2015) Peroxiredoxins: guardians against oxidative stress and modulators of peroxide signaling, *Trends Biochem. Sci.*, **40**, 435-445, doi: 10.1016/j.tibs.2015.05.001.
77. Fisher, A. B. (2017) Peroxiredoxin 6 in the repair of peroxidized cell membranes and cell signaling, *Arch. Biochem. Biophys.*, **617**, 68-83, doi: 10.1016/j.abb.2016.12.003.
78. Knoop, B., Becker, S., Poncin, M. A., Glibert, J., Derclaye, S., et al. (2018) Specific interactions measured by AFM on living cells between peroxiredoxin-5 and TLR4: relevance for mechanisms of innate immunity, *Cell Chem. Biol.*, **25**, 550-559.e3, doi: 10.1016/j.chembiol.2018.02.006.
79. Sharapov, M. G., Glushkova, O. V., Parfenyuk, S. B., Gudkov, S. V., Lunin, S. M., and Novoselova, E. G. (2021) The role of TLR4/NF- $\kappa$ B signaling in the radioprotective effects of exogenous Prdx6, *Arch. Biochem. Biophys.*, **702**, 108830, doi: 10.1016/j.abb.2021.108830.
80. Lee, Y. J. (2020) Knockout mouse models for peroxiredoxins, *Antioxidants (Basel)*, **9**, 182, doi: 10.3390/antiox9020182.
81. Radyuk, S. N., and Orr, W. C. (2018) The multifaceted impact of peroxiredoxins on aging and disease, *Antioxid. Redox Signal.*, **29**, 1293-1311, doi: 10.1089/ars.2017.7452.
82. Nelson, K. J., Perkins, A., Van Swearingen, A. E. D., Hartman, S., Brereton, A. E., et al. (2018) Experimentally dissecting the origins of peroxiredoxin catalysis, *Antioxid. Redox Signal.*, **28**, 521-536, doi: 10.1089/ars.2016.6922.
83. Labunskyy, V. M., Hatfield, D. L., and Gladyshev, V. N. (2014) Selenoproteins: molecular pathways and physiological roles, *Physiol. Rev.*, **94**, 739-777, doi: 10.1152/physrev.00039.2013.
84. Gladyshev, V. N., Kryukov, G. V., Fomenko, D. E., and Hatfield, D. L. (2004) Identification of trace element-containing proteins in genomic databases, *Annu. Rev. Nutr.*, **24**, 579-596, doi: 10.1146/annurev.nutr.24.012003.132241.
85. Mariotti, M., Ridge, P. G., Zhang, Y., Lobanov, A. V., Pringle, T. H., et al. (2012) Composition and evolution of the vertebrate and mammalian selenoproteomes, *PLoS One*, **7**, e33066, doi: 10.1371/journal.pone.0033066.
86. Brigelius-Flohé, R., and Maiorino, M. (2013) Glutathione peroxidases, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, **1830**, 3289-3303, doi: 10.1016/j.bbagen.2012.11.020.
87. Toppo, S., Flohé, L., Ursini, F., Vanin, S., and Maiorino, M. (2009) Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: variations of a basic scheme, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, **1790**, 1486-1500, doi: 10.1016/j.bbagen.2009.04.007.
88. Lubos, E., Loscalzo, J., and Handy, D. E. (2011) Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities, *Antioxidants Redox Signal.*, **15**, 1957-1997, doi: 10.1089/ars.2010.3586.
89. Jiao, Y., Wang, Y., Guo, S., and Wang, G. (2017) Glutathione peroxidases as oncotargets, *Oncotarget*, **8**, 80093-80102, doi: 10.18632/oncotarget.20278.
90. Mannervik, B., Board, P. G., Hayes, J. D., Listowsky, I., and Pearson, W. R. (2005) Nomenclature for mammalian soluble glutathione transferases, *Methods Enzymol.*, **401**, 1-8, doi: 10.1016/S0076-6879(05)01001-3.
91. Prohaska, J. R. (1980) The glutathione peroxidase activity of glutathione S-transferases, *Biochim. Biophys. Acta*, **611**, 87-98, doi: 10.1016/0005-2744(80)90045-5.
92. Lankin, V. Z., Tikhaze, A. K., Osis, Yu. G., Vikhert, A. M., Schewe, T., and Rapoport, S. (1985) Enzymatic regulation of lipid peroxidation in the membranes: the role of phospholipase A2 and glutathione transferase, *Doklady Biochemistry*, **281**, 204-207.
93. Bondar, T. N., Lankin, V. Z., and Antonovsky, V. L. (1989) The reduction of organic hydroperoxides by glutathione peroxidase and glutathione S-transferase: the influence of substrate structure, *Doklady Biochemistry*, **304**, 217-220.
94. Awasthi, Y. C., Zimniak, P., Singhal, S. S., and Awasthi, S. (1995) Physiological role of glutathione-S-transferases in protection mechanisms against lipid peroxidation: a commentary, *Biochem. Arch.*, **11**, 47-54.
95. Bao, Y., and Williamson, G. (1996) Metabolism of hydroperoxy-phospholipids in human hepatoma HepG2 cells, *J. Lipid Res.*, **37**, 2351-2360.
96. Lankin, V. Z., Bondar, T. N., and Tikhaze, A. K. (1997) The influence of free fatty acids on the lipoperoxidase activity of antioxidative enzymes-Se-containing glutathione peroxidase and nonselenic glutathione-S-transferase, *Dokl. Akad. Nauk*, **357**, 828-831.
97. Sevanian, A., Muakkassah-Kelly, S. E., and Montestrucque, S. (1983) The influence of phospholipase A2 and glutathione peroxidase on the elimination of membrane lipid peroxides, *Arch. Biochem. Biophys.*, **223**, 441-452, doi: 10.1016/0003-9861(83)90608-2.
98. Lankin, V. Z., Tikhaze, A. K., and Osis, Y. G. (2002) Modeling the cascade of enzymatic reactions in liposomes including successive free radical peroxidation, reduction, and hydrolysis of phospholipid polyenoic acyls for studying the effect of these processes on the structural-dynamic parameters of the membranes, *Biochemistry (Moscow)*, **67**, 566-574, doi: 10.1023/a:1015502429453.
99. Lankin, V. Z., Antonovsky, V. L., and Tikhaze, A. K. (2004) Regulation of free radical lipoperoxidation and organic peroxides metabolism during normal station and pathologic

- gies, in *Peroxides at the Beginning of the Third Millennium*, Nova Sci. Publ., pp. 85-111.
100. Lankin, V. Z., Tikhaze, A. K., Kapel'ko, V. I., Shepel'kova, G. S., Shumaev, K. B., et al. (2007) Mechanisms of oxidative modification of low density lipoproteins under conditions of oxidative and carbonyl stress, *Biochemistry (Moscow)*, **72**, 1081-1090, doi: 10.1134/S0006297907100069.
101. Hayes, J. D., Flanagan, J. U., and Jowsey, I. R. (2005) Glutathione transferases, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **45**, 51-88, doi: 10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857.
102. Allocati, N., Masulli, M., Di Ilio, C., and Federici, L. (2018) Glutathione transferases: Substrates, inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases, *Oncogenesis*, **7**, 8, doi: 10.1038/s41389-017-0025-3.
103. Goncalves, M., Moura Neto, J., Souza, C., Melo, P., and Reis, M. (2010) Evaluating glutathione S-Transferase (GST) null genotypes (GSTT1 and GSTM1) as a potential biomarker of predisposition for developing leukopenia, *Int. J. Lab. Hematol.*, **32**, e49-e56, doi: 10.1111/j.1751-553X.2009.01169.x.
104. Pljesa-Ercegovac, M., Savic-Radojevic, A., Matic, M., Coric, V., Djukic, T., et al. (2018) Glutathione transferases: potential targets to overcome chemoresistance in solid tumors, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 3785, doi: 10.3390/ijms19123785.

## HYDROPEROXIDE-REDUCING ENZYME SYSTEMS IN REGULATION OF FREE-RADICAL PROCESSES

### Review

M. G. Sharapov<sup>1\*</sup>, S. V. Gudkov<sup>2,3,4</sup>, and V. Z. Lankin<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cell Biophysics, Federal Research Center PSCBI RAS, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; E-mail: sharapov.mars@gmail.com

<sup>2</sup> Institute of General Physics named after A.M. Prokhorov, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia

<sup>3</sup> Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, 603022 Nizhny Novgorod, Russia

<sup>4</sup> All-Russian Research Institute of Phytopathology, 143050 Bolshiye Vyazemy, Russia

<sup>5</sup> FGBU "National Medical Research Center of Cardiology" of the Ministry of Health of Russia; 121552 Moscow, Russia

The review presents the current understanding of the molecular mechanisms of oxidative stress development. The main stages of free radical reactions in the process of oxidative stress are considered. Endogenous and exogenous causes of the development of oxidative stress, including dysfunction of the cell oxidoreductase system, as well as the effect of various external physicochemical factors are discussed. The main participants in the antioxidant defense system, as well as the stages of its evolution, are described, with the main emphasis on several families of peroxidases: peroxiredoxins, glutathione peroxidases, and glutathione-S-transferases, which are quite similar in their phylogenetic, structural, and catalytic properties. Substrate specificity, similarities and differences in the mechanisms of catalysis of these enzymes are considered in detail. The role of peroxiredoxins, glutathione peroxidases and glutathione-S-transferases in the regulation of intracellular and intercellular signals mediated by hydroperoxides and interactions with other receptor / non-receptor proteins is discussed. The important role of these enzymes was shown not only in antioxidant protection, but also in the regulation of such cell processes as growth, differentiation and apoptosis.

**Keywords:** oxidative stress, reactive oxygen species, free radicals, peroxiredoxins, glutathione peroxidases, glutathione S-transferases