

УДК 577.352.3

І.Ф.Мещишен, В.П.Польовий

МЕХАНІЗМ ОКИСНЮВАЛЬНОЇ МОДИФІКАЦІЇ БІЛКІВ

Кафедра медичної хімії (зав.– проф.І.Ф.Мещишен)
Буковинської державної медичної академії

Ключові слова: окиснювальна модифікація білків, активні форми кисню.

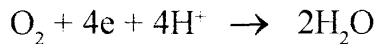
Резюме. В статті дається огляд літератури щодо можливого механізму окиснювальної модифікації білків і роль активних форм кисню.

Молекулярний кисень, який людина і тварини поглинають із повітря, у своєму стабільному триплетному стані є бірадикалом, з парамагнітними властивостями. Два неспарених електрони з паралельними спінами розміщуються на розрихлених р- і d-орбіталях. Таким незвичним основним станом молекул кисню пояснюється його висока стійкість і кінетична інертність у різних біохімічних реакціях. Причина кінетичної інертності кисню полягає в тому, що більшість органічних сполук – як субстрати, так і продукти окислення – є своєю електронною структурою діамагнітними синглетними сполуками, тобто містять на своїх орбіталях тільки спарені електрони (електрони з антипаралельно направленими спінами) [1].

Прямі реакції між триплетним киснем і синглетними сполуками в клітині не проходять. Для того, щоб кисень із хімічно інертного триплетного стану перейшов у реакційноздатний, необхідно його активувати. Основним шляхом активації молекулярного кисню в клітині є відновлення його в активних центрах ферментів – оксидаз і оксигеназ. Перенесення одного електрона на молекулу кисню супроводжується утворенням супероксидного аніон-радикала ($O_2^{\cdot -}$). Приєднання до молекули кисню двох електронів і протонування (приєднання H^+) призводить до утворення пероксиду водню (H_2O_2). І, нарешті, трьохелектронне відновлення O_2 із супутнім протонуванням викликає утворення одного із найсильніших окиснювачів – гідроксильного радикала (OH^{\cdot}) (другий атом кисню перетворюється у гідроксил води (OH^-)).

З метою об'єднання реакційноздатних форм кисню в один клас введено термін «активні форми кисню» (АФК), «активні метаболіти кисню» (АМК), «активний кисень» (АК) [2,7]. Утворення, властивості, утилізація АФК наведено в табл. 1. Висока реакційна здатність АФК робить їх високо-токсичними для біологічних систем на всіх рівнях – від молекулярного до організменного. Основними джерелами утворення $O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 є ферментні системи: НАДФН – оксидаза, ксантинооксидаза, мітохондріальна цитохромоксидаза і мікросомальні монооксигенази (система цитохрому Р-450) [2,37].

У організмі людини і тварин, як вже відмічалось вище, існує два основні шляхи активації (використання) O_2 : оксидазний і оксигеназний. Оксидазний шлях зв'язаний з окисненням енергетичних субстратів (ліпідів, вуглеводів, вуглецевих скелетів амінокислот) і реалізується кінцевою ланкою дихального ланцюга цитохромоксидазою. При цьому молекулярний кисень приєднує 4 електрони і 4 протони і утворює воду:



Оксидазний шлях окиснення спряжений з окиснювальним фосфорилуванням (утворення АТФ із АДФ і неорганічного фосфору за рахунок енергії протонів і електронів) і є головним джерелом енергії для всіх живих організмів. Дихальний ланцюг мітохондрій може бути джерелом пероксиду водню (не виключається можливість утворення і супероксидного аніон-радикалу за рахунок «втєчі» електронів на молекулярний кисень у ділянці коензим Q-цитохром b) [9,37].

Оксигеназний шлях допускає включення одного чи двох атомів кисню в молекулу субстрату за рахунок ферментів оксигеназ (моно- і діоксигеназ). При цьому можливе пряме відновлення O_2 одним чи двома електронами з утворенням супероксидного аніон-радикалу і пероксиду водню відповідно [1,31]. Оксигеназний шлях є одним з основних шляхів утворення АФК.

Нині виявлено такі фактори, які сприяють переключенню використання O_2 із оксидазного шляху на оксигеназний [1,5,26]:

- надлишок катехоламінів і продуктів їх неповного окислення під дією стресу;
- надлишок відновлених піридиннуклеотидів (НАДН, НАДФН) – донорів електронів;
- інактивація ферментних і неферментних антиоксидантних систем при авітамінозі Е і різноманітних захворюваннях;
- нагромадження ненасичених полієнових ліпідів, які піддаються дії АФК (при ожирінні);
- нагромадження металовмісних (Fe, Cu, Mn, Mo) комплексів із змінною валентністю (гемолітична жовтяниця).

Переключення використання O_2 із оксидазного шляху на оксигеназний сприяє посиленому утворенню АФК, а відповідно, їх негативного впливу на стан фосфоліпідів і біополімерів (білків і нуклеїнових кислот).

Нині нагромаджені численні дані щодо вивчення механізму пероксидного окиснення ліпідів клітинних мембран, його ролі в діяльності клітини за умов фізіологічної норми і в патогенезі різних захворювань. Що стосується окиснювальної модифікації білків (ОМБ), яка має місце в органах і тканинах людини і тварин за умов норми і різко зростає під дією окиснювального стресу, то за останні десять років він тільки починає вивчатися, а в Україні відсутні наукові роботи в цьому плані. Розробка нами методу кількісного визначення ступеня ОМБ [6] дала можливість виконати в Буковинській державній медичній академії ряд наукових досліджень з цієї тематики, які вимагають теоретичного обґрунтування. Представлена оглядова робота і ставить за мету проведення аналізу літератури, щодо механізму ОМБ.

Детальне вивчення окиснювальної модифікації глутамінсинтетази [КФ 6.3.1.2] із екстракту *E. coli* показало [22,33], що цей процес залежить від

УТВОРЕННЯ, ВЛАСТИВОСТІ ТА ЗНЕШКОДЖЕННЯ АКТИВНИХ ФОРМ КИСНЮ (АФК) [2,4,7,31,35]

АФК, час життя	Механізми утворення в живих системах	Біологічна дія	Інгібітори
Супероксидний аніон-радикал $O_2^{\cdot -}$, 10^{-6} с	Одноелектронне відновлення O_2 ксангін-оксидазою, НАДФН-оксидазою фагоцитів, оксидазами амінокислот; утворення в ланцюгу транспорту електронів мітохондрій і мікросом; при окисненні оксигемоглобіну.	Посилення проліферації лімфоцитів; інтенсифікація ПОЛ і біополімерів; вивільнення заліза із феритину; зруйнування мембран еритроцитів; утворення $HO\cdot$, H_2O_2 , $OH\cdot$ і 1O_2 ; відновлення цитохрому c; внутрішньоклітинна регуляція; вазомоторна дія.	Mn-SOD; Cu-Zn-SOD; убіхінон; аскорбінова кислота; церулоплазмін.
Пергідроксильний радикал $HO_2\cdot$, 10^{-3} с	Реакція H_2O_2 з органічними радикалами; проміжний продукт у реакціях відновлених флавінів з O_2 .	Індукція ПОЛ і біополімерів; утворення H_2O_2 при взаємодії з органічними молекулами; володіє цитотоксичною дією.	Аскорбінова кислота; відновлений глутатіон; убіхінон; селен; α -токоферол.
Пероксид водню H_2O_2 , стабільна сполука	Двоелектронне відновлення O_2 ксангін-оксидазою і флавіновими оксидазами; реакція дисмутації $O_2^{\cdot -}$ за участю SOD та без неї.	Цитотоксичність; локальне закислення серцевця; судиннозвужуюча дія; утворення $OH\cdot$ при одноелектронному відновленні; інгібування проліферації лейкоцитів.	Внутрішньоклітинні каталаза та пероксидази; церулоплазмін, відновлений глутатіон.
Синглетний кисень 1O_2 , 10^{-6} с	Супутній продукт в реакціях із пероксидами; при спонтанній дисмутації $O_2^{\cdot -}$.	Індукція ПОЛ і біополімерів; володіє цитотоксичною і мутагенною дією.	Аскорбінова кислота; α -токоферол; відновлений глутатіон; сечова кислота.
Гідроксильний радикал $OH\cdot$, 10^{-9} с	Розклад H_2O_2 іонами металів із змінною валентністю (реакція Фентона); дія іонізуючого випромінювання на H_2O_2 ; при мікросомальному окисненні.	Сильний окислювач; розриває будь-який СН-зв'язок; індукція ПОЛ і біополімерів; володіє сильними цитотоксичною, мутагенною та канцерогенною діями.	Аскорбінова кислота; відновлений глутатіон; урацил; одно- і багатомісні спирти.
Пероксидний радикал $ROO\cdot$, 10 с	Взаємодія O_2 з органічними радикалами; реакції $O_2^{\cdot -}$, 1O_2 , $OH\cdot$, $RO\cdot$ з ненасиченими ліпідами і жирними кислотами.	Взаємодія з ненасиченими ліпідами утворенням R_1 і $ROOH$.	Аскорбінова кислота; α -токоферол; убіхінон; селен.

НАДФН, молекулярного кисню і присутності іонів металів зі змінною валентністю (Fe^{3+} , Cu^{2+}). Необхідність O_2 і донора водню (НАДФН) вказує на те, що окиснювальна модифікація глутамінсинтетази проходить за механізмом дії оксигеназ із змішаними функціями (ОЗФ). Доведено [1,3,20,33], що багато ферментів інактивуються системами ОЗФ і це, в свою чергу, підвищує їх чутливість до розщеплення різними ендогенними та екзогенними протеазами. Нині очевидним є той факт, що ОМБ має місце за руйнування бактерій нейтрофілами і в утворенні модифікованих (неактивних або менш активних) форм ферментів, які нагромаджуються у людини і тварин з віком та при деяких патологічних станах [13,15,21,26,27,28,29,36,38].

На 17 білках (лактатдегідрогеназа, супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза, тирозиназа, трипсин, хімотрипсин, цитохром Р-450 та інші) вивчено вплив АФК [16-19]. Показано, що OH^\cdot – радикал утворює ковалентні зв'язки у білкових агрегатах, але не впливає на продукцію продуктів фрагментації. Залишок триптофану за цих умов швидко перетворювався у бітирозин-біфенол. При інкубації екстрактів еритроцитів людини і кролів, ретикулоцитів кролів, а також *E. coli* більшість OH^\cdot -модифікованих білків зазнавали протеолітичного розпаду в 50 разів швидше, ніж незмінені білки. Як свідчать результати одержаних даних, білки, які були денатуровані OH^\cdot -радикалами, легко розпізнаються і швидше розпадаються за допомогою внутрішньоклітинних протеолітичних систем.

На відміну від дії OH^\cdot -радикалу супероксидний аніон-радикал за дії на білки не викликав їх агрегації та фрагментації, втрату залишків триптофану. Спільна дія $\text{OH}^\cdot + \text{O}_2^\cdot$ призводила до значної фрагментації білків і не впливала на їх агрегацію. Понад 98% білкових фрагментів мали молекулярну масу більше 5000 в.о. і утворювали агрегати (скупчення) за рахунок іонних і гідروفобних зв'язків [16].

Результати проведених дослідів [17] вказують на загальну чутливість білків до дії АФК. ОМБ може включати пряму фрагментацію білків або викликати їх денатурацію. Фрагментовані і денатуровані білки є субстратами для внутрішньоклітинних протеаз.

Такі значні структурні зміни білків зумовлені пошкодженням їх первинної структури. Досліди із альбуміном плазми бика (АПБ) показали, що всі амінокислотні залишки чутливі до дії OH^\cdot і $\text{OH}^\cdot + \text{O}_2^\cdot$, хоча залишки триптофану, тирозину, гістидину і цистеїну були найбільш чутливими. Рівень руйнування амінокислотних залишків АПБ може досягати 45%. OH^\cdot - основний кисневий радикал, який викликає модифікацію амінокислотних залишків [17].

Модифікація первинної структури АПБ викликає глибокі зміни у вторинній і третинній структурі білка і підвищує їх чутливість до протеолізу – утворюються фрагменти. Це, в свою чергу, призводить до утворення нових карбонільних груп [18].

Фрагменти білків можуть викликати OH^\cdot - індуквані реакції α -вуглецевих радикалів амінокислот з O_2 з утворенням пероксидних радикалів, які розпадаються на фрагменти поліпептидних ланцюгів біля α -вуглецевого атома [37].

Вивчення протеолітичного розпаду АПБ за участю широкого спектра

очишених протеаз (карбоксіпептидаза А, хімотрипсин, еластаза, протеази (XIII, XIV і XVIII), термолізін, трипсин, субтилізін, колагеназа) виявило, що як OH^\cdot , так і $\text{OH}^\cdot + \text{O}_2^{\cdot-} + \text{O}_2$ викликали підвищену чутливість даного білка до ферментативного розщеплення. Протеолітична чутливість знаходилась у прямій залежності від ступеня денатурації та гідрофобності АПБ [19].

Наведені дані вказують на прямі і кількісні взаємовідношення між пошкодженням білків АФК і підвищенням їх протеолітичної чутливості.

За дії на альбумін бика металкаталізуєщої неферментативної (Cu^{2+} /аскорбат) окислювальної системи мала місце модифікація залишку гістидину з утворенням 2-оксогістидину [39]. Автори вважають, що кількісне визначення цього метаболіту може служити маркером для оцінки ОМБ за дії окиснювального стресу.

Використовуючи гомополімери із залишків аргініну, проліну, гістидину і лізину, а також шість білків різного ступеня очищення Ayala A. і Cutler R. [11] показали, що залишки аргініну і проліну в процесі окиснювального стресу перетворюються на γ -глутамілнапівальдегід, який після відновлення і гідролізу переходить у 2-аміно-5-гідроксивалеріанову кислоту. За кількістю останньої можна судити щодо ступеня ОМБ. Залишки в білках лізину в процесі окиснювальної чи хімічної модифікації перетворюються до N- ϵ -(карбоксител) лізину і N- ϵ -(карбоксител) лізину [10].

Із печінки щурів була виділена високоочищена карбоангідраза (ізофермент III) віком 2, 10 і 18 місяців [12]. Виявлено, що із віком наростає окиснювальна модифікація ферменту (оцінювали за збільшенням вмісту карбонільних сполук), яка призводить до втрати 30% каталітичної активності за 18 місяців [12].

За дії на супероксиддисмутазу H_2O_2 чи аскорбат/ Fe^{3+} має місце модифікація структури ферменту, що призводить до зміни його активності та імунологічних властивостей. Структурні зміни характеризуються втратою ферментом іонів міді, утворенням фрагментів пептидів і карбонільних груп в амінокислотних залишках, збільшенням вмісту аспарагінової і глутамінової кислот, гліцину та зменшенням вмісту гістидину, проліну, аргініну, лізину, серину і треоніну. Викликані структурні зміни призводять до втрати каталітичної активності супероксиддисмутази [24].

Сучасний погляд на те, як каталізоване іонами перехідних металів окиснення (МКО) впливає на модифікацію білків, показано на рис. 1.

Отже електронодонорна система (НАДФН) необхідна тільки для відновлення O_2 до пероксиду водню і Fe^{3+} до Fe^{2+} . Залежно від використаної системи - донора електронів, відновлення O_2 може проходити або за участю 2-х електронів з утворенням H_2O_2 , або приєднанням одного електрона і утворення супероксидного аніон-радикалу ($\text{O}_2^{\cdot-}$) з наступною дисмутацією супероксиддисмутазою до H_2O_2 і O_2 . Аналогічно може проходити відновлення Fe^{3+} : безпосередньо за рахунок електрона від НАДФН чи посередньо - через утворення $\text{O}_2^{\cdot-}$. Далі Fe^{2+} зв'язується зі специфічною (металозв'язуючою) ділянкою білка (P), після чого P- Fe^{2+} -комплекс реагує з H_2O_2 (реакція Фентона) з утворенням гідроксильного радикала (OH^\cdot). Останній взаємодіє із радикалами амінокислотних залишків (чи кінцевими амінокислотними

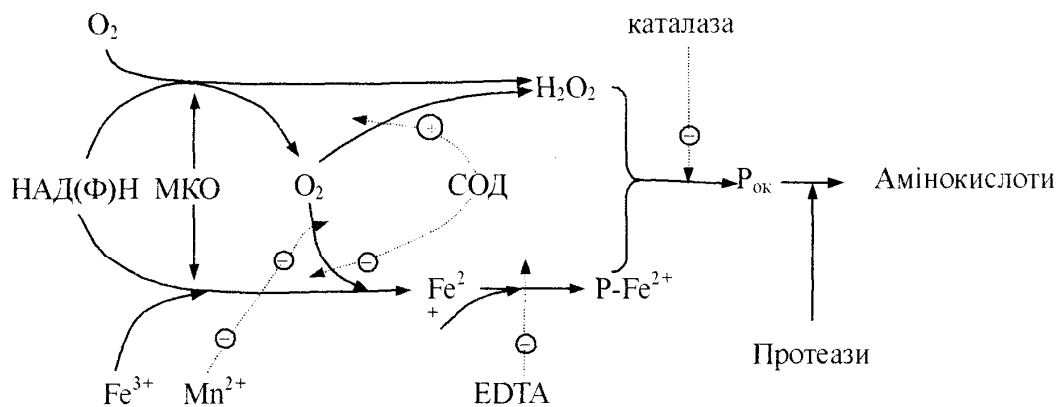


Рис. 1. Механізм окиснення і розщеплення білків (ферментів), де Р-білок, $P_{ок}$ – окислений білок; СОД – супероксиддисмутаза; \oplus і \ominus – активація і гальмування відповідно.

залишками) у металозв'язуючій ділянці білка. Серед інших модифікацій деякі амінокислотні залишки перетворюються у карбонільні похідні. Після окиснювальної модифікації білок стає високочутливим до протеолізу, а у випадку з ферментами — останні переходять у каталітично неактивні чи менш активні і більш термолабільні форми [16,26].

Металокаталізуюче окиснення (МКО) білків є вибірконим (місцевоспецифічним) процесом, який включає взаємодію H_2O_2 і Fe^{2+} із металозв'язуючою ділянкою білка [37]. Вибіркова природа реакцій підтверджується такими фактами:

а) інактивація ферментів МКО-системами не запобігається антиоксидантами (перехоплювачами вільних радикалів); б) тільки один чи декілька амінокислотних залишків можуть модифікуватися МКО-системами, тоді як за дії вільних радикалів, отриманих радіолізисом води, модифікації піддаються всі амінокислотні залишки білка; в) більшість ферментів високочутливі до окиснювальної модифікації МКО-системами і вимагають присутності іонів металів для каталітичної активності, а отже вони повинні мати місце для зв'язування іону металу. Щодо випадку з глутамінсинтетазою *E.coli*, втрата каталітичної активності корелює із модифікацією одного залишку гістидину і одного залишку аргініну на одну субодиницю ферменту. Обидва залишки знаходяться поблизу металозв'язуючої ділянки ферменту [22,23,33].

Для більшості мікроелементів періодичної системи встановлений їх взаємозв'язок з ферментами [8]. Так, цинк входить до складу більше 80 ферментів організму людини. Крім добре відомого металоензиму алкогольдегідрогенази, що містить міцно зв'язаний цинк, цинковмісними ферментами є також карбоксипептидази [КФ 3.4.17.1], амінопептидази [КФ 3.4.11.2], лужна фосфатаза [КФ 3.1.3.1], фруктозо-1,6-дифосфатаза [КФ 3.1.3.11], карбоангідраза [КФ 4.2.1.1], сорбітолдегідрогеназа [КФ 1.1.1.14] та інші.

Мідевімісні ферменти також дуже поширені в природі. До них належать: тирозинмонооксигеназа [КФ 1.14.17.1], уратоксидаза [КФ 1.7.3.3], амінооксидаза [КФ 1.4.3.6], церулоплазмін [КФ 1.16.3.1], супероксиддисмутаза [КФ 1.15.1.1], галактозооксидаза [КФ 1.1.3.9]. До молібденовімісних ферментів належать: нітратредуктаза [КФ 1.6.6.4], сульфїтоксидаза [КФ 1.8.3.1], ксантиндегідрогеназа [КФ 1.2.1.37], піридоксальдегідрогеназа

[КФ 1.1.1.107] та інші. Марганець-вмісними ферментами є: гуанідиноацетат-амідиногідролаза [КФ 3.5.3.2], фосфогліцератфосфомутаза [КФ 5.4.2.1], фосфопротейнфосфатаза [КФ 3.1.3.16], фосфоенолпіруват - карбоксикіназа [КФ 4.1.1.32], аденілатциклаза [КФ 4.6.1.1], гуанілатциклаза [КФ 4.6.1.2], глутамінсинтетаза [КФ 6.3.1.2], протеїнкінази [КФ 2.7.1.37] та інші. Велика кількість оксидоредуктаз є залізовмісними ферментами. Серед них: ксантинооксидаза [КФ 1.2.3.2], сукцинатдегідрогеназа [КФ 1.3.99.1], сульфїтредуктаза [КФ 1.8.99.1], ферредоксин [КФ 1.12.7.1], катехол-1,2-діоксигеназа [КФ 1.13.11.1] та інші. Карбоксипептидаза А [КФ 3.4.12.3] містить цинк, глутатіонпероксидаза [КФ 1.11.1.9] - селен.

Слід наголосити, що окремі ферменти у своєму складі містять два, а іноді і три елементи: лейцинамінопептидаза [КФ 3.4.11.1] (Mg, Mn), супероксиддисмутаза [КФ 1.15.1.1] (Cu,Zn), амінопептидаза [КФ 3.4.11.2] (Co, Zn), енолаза [КФ 4.2.1.11] (Mg, Zn,Fe), алкогольдегідрогеназа [КФ 1.1.1.1] (Zn,Fe,Co).

Можливий механізм вибіркової модифікації залишку лізину в металозв'язуючій ділянці білка подано на рис.2.

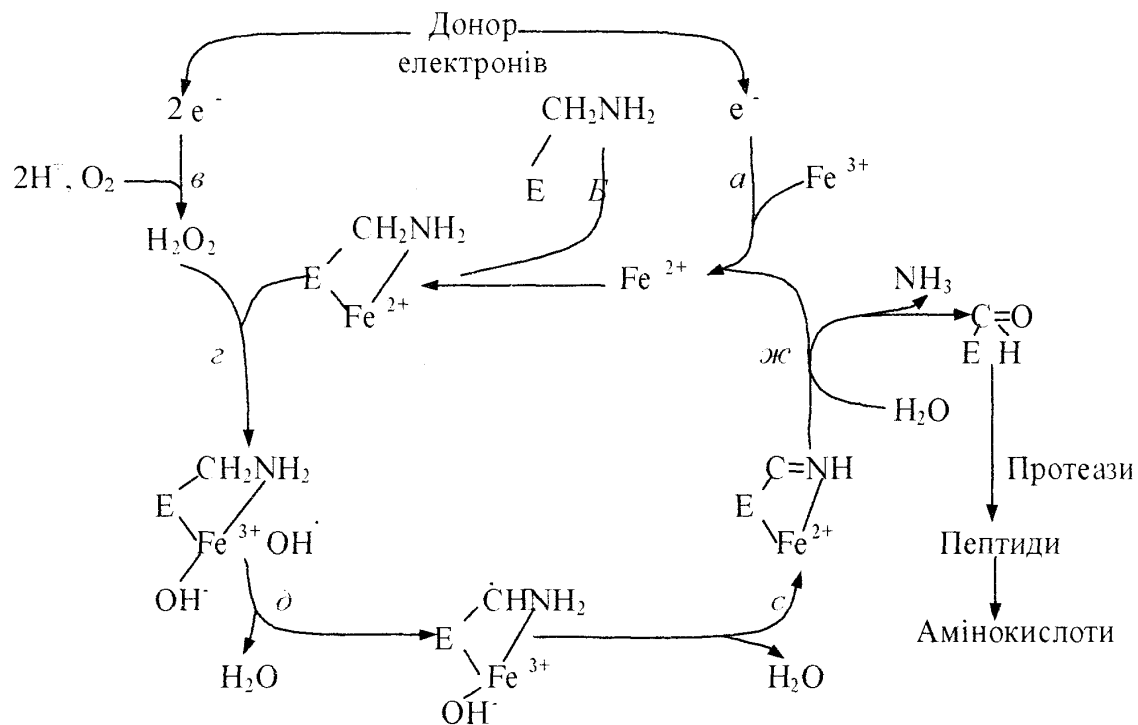


Рис. 2. Окиснювальна модифікація білка (фермента), який містить поряд із металозв'язуючою ділянкою залишок лізину (за Stadtman E., Oliver C.).

В цьому механізмі відновлення Fe^{3+} до Fe^{2+} (етап *a*) супроводжується зв'язуванням Fe^{2+} з ферментом (E) (етап *b*) з утворенням координаційного комплексу, в якому ϵ -аміногрупа лізину в металозв'язуючій ділянці є однією з декількох ліганд, до яких приєднується Fe^{2+} . Пероксид водню, який утворюється за 2-х електронного відновлення молекулярного кисню (етап *v*), може реагувати з іонами Fe^{2+} , що знаходяться в комплексі з ферментом, з утворенням OH^\cdot , OH^- і комплексу Fe^{3+} -фермент (етап *z*). Гідроксильний радикал відриває атом водню від вуглецевого атома, що знаходиться поряд із ϵ -аміногрупою лізину, з утворенням води і радикала E (етап *d*). Останній реагує своїм

неспареним електроном з Fe^{3+} і відновлює його до Fe^{2+} -комплексу і води, а аміногрупа перетворюється в імінопохідне (етап *c*). Зрештою, імінопохідне піддається спонтанному гідролізу, в результаті чого звільняється аміак, Fe^{2+} і альдегідне похідне ферменту (етап *ж*). Такий модифікований білок піддається протеолітичному розпаду. Якщо провести кислотний гідроліз такого білка, то 2-аміноадіпіновий напівальдегід є одним із його продуктів [37].

Будь-яка система, що утворює пероксид водню і відновлює Fe^{3+} до Fe^{2+} або Cu^{2+} до Cu^+ , може викликати вибірккову модифікацію білків, які мають металозв'язуючу ділянку (рис.1,2). У табл. 2 наведено деякі ферментні і неферментні системи, які каталізують ОМБ.

Таблиця 2

Металокаталізуючі системи, які викликають окиснювальну модифікацію білків

<p>а) ферментні:</p> <ul style="list-style-type: none"> • НАДФН - оксидаза (НАДФН/O_2/Fe^{3+}) • Ксантиноксидаза/ксантин/O_2/Fe^{3+} • Цитохром Р-450/цитохром Р-450-редуктаза/O_2/Fe^{3+}
<p>б) неферментні:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Аскорбат/O_2/Fe^{3+} • Fe^{2+}/O_2 • Fe^{2+}/H_2O_2 • Відновлений глутатіон/O_2/Fe^{3+}

Найбільш фізіологічними із МКО-систем є ті, для яких НАДН і НАДФН є додатковими донорами електронів, наприклад, НАДФН-оксидази і цитохром Р-450-системи. Із неферментних МКО-систем найважливішими є ті, в яких аскорбат і відновлений глутатіон є донором електронів. Система аскорбату розглядається як модель функціонування оксидаз із змішаними функціями, які каталізують O_2 -залежне гідроксилювання ароматичних сполук [1,35,37]. Ця система здатна окиснювати ліпіди, білки і нуклеїнові кислоти [14,21,32].

Вперше вказівка на те, що окиснювальна модифікація глутамінсинтетази викликає її швидке розщеплення екстрактами *E. coli*, була зроблена Levine R.L. [22,23]. Підтвердження цієї гіпотези були отримані в 1985 році (високоочищені препарати лужних протеаз із печінки щурів і *E. coli* каталізували швидкий розпад окиснених форм глутамінсинтетази: розпад ендогенних білків *E. coli*, еритроцитів, мітохондрій печінки і нирок значно підсилюється за результатом дії АФК) [33].

Доказ того, що карбонільні похідні деяких амінокислотних залишків знаходяться серед продуктів O_2 -радикального пошкодження білків, дав можливість кількісно оцінити ступінь такого пошкодження при різних патологічних станах [37]. Дослідження виявили [37], що каталітично неактивні чи менш активні, але більш термолабільні форми ферментів нагромаджуються в

клітинах з віком. Це чітко показано для гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази [КФ 1.2.1.12], аспартатамінотрансферази [КФ 2.6.1.1] і фосфогліцераткінази [КФ 2.7.2.3]. Активність глутамінсинтетази і глюкозо-6-фосфатдегідрогенази [КФ 1.1.1.49] в гепатоцитах щурів понижувалась з віком до 50% у порівнянні з молодими тваринами [15,29,34].

Нині стає очевидним той факт, що МКО-залежне окиснення білків є раннім індикатором пошкодження органів і тканин, а утворення білкових карбонільних похідних пов'язане з патологічними станами як у людини, так і у тварин. Це чітко показано при запальних процесах, атеросклерозі, серцевій ішемії, неврологічних захворюваннях, катарактогенезі [34].

Узагальнення. Проміжні продукти одноелектронного відновлення молекулярного кисню (супероксидний аніон-радикал, пероксид водню і гідроксильний радикал) викликають окиснювальну модифікацію білків (ОМБ) як *in vitro*, так і *in vivo*. ОМБ найбільш характерна для металоферментів - білків, які містять металозв'язуючу ділянку. Іони змінної валентності (заліза, міді), взаємодіючи з металозв'язуючим місцем ферменту, здатні утворювати гідроксильний радикал (використовуючи H_2O_2), який модифікує (найчастіше дезамінує) амінокислотні залишки, утворюючи карбонільні або інші похідні. Нагромадження окисненого білка може бути раннім критерієм пошкодження тканин активними формами кисню (АФК) і за деяких патологічних станів досягає 50-70% всього клітинного білка. Оскільки рівень внутрішньоклітинних модифікованих білків відображає стан рівноваги між рівнем окиснених білків і темпом їх розпаду, то нагромадження ОМБ є складовою багатьох факторів, які управляють синтезом і окисненням білків з одного боку, і активністю різних протеаз з другого. Крім певних умов (дія радіоактивного і ультрафіолетового випромінювання, гіпербарооксигенація тощо) реакції металокаталізуемого окиснення (МКО-реакції) є визначальними в механізмі вільнорадикального пошкодження. Процеси, які впливають на рівень в клітині H_2O_2 , Fe^{3+} і Cu^{2+} , можуть бути вирішальними чинниками різних метаболітичних розладів. Рівень H_2O_2 залежить від кількості O_2 і активності ферментних і неферментних систем, що генерують H_2O_2 з одного боку, і активністю ферментів, які каталізують розпад H_2O_2 (каталаза, пероксидази) з другого. Фактори, які регулюють рівень в клітині Fe^{2+} і Cu^{2+} , ще недостатньо вивчені, хоча вивільнення Fe із феритину (запасна форма іонів заліза) і вихід Fe^{2+} із Fe^{2+} -ферментних комплексів при розпаді гемпротеїнів, які відбуваються за певних фізіологічних і патологічних станів, є одним з найбільш ймовірних джерел.

Фактори, які регулюють активність внутрішньоклітинних протеаз гідролізуючих модифіковані білки, потребують ще більшого вивчення. Можна допустити, що саме втрата активності цих ферментів за дії на них АФК призводить до окиснювального стресу і нагромадження в клітині окиснених білків з віком.

Література. 1. Арчаков А.И., Мохосоев И.М. Модификация белков активным кислородом и их распад // Биохимия. -1989.-Т.54, вып. 2.- С. 179-186. 2. Владимирев Ю.А. Свободные радикалы и антиоксиданты // Вестн. РАМН.-1998.-N 7.- С.43-51. 3. Карузина И.И., Арчаков А.И. Инактивация цитохрома Р-450 в гидроксислазных реакциях // Биохимия.-1985.-Т.50, вып. 11.-С.1805-1810. 4. Меньшикова Е.Б., Зенков Н.К. Антиоксиданты и ингибиторы радикальных окислительных процессов // Успехи совр.биол.-1993.-Т.113, вып. 4.- С.442-455. 5. Метелица Д.И. Активация кислорода ферментными системами. М.:Наука, 1982.-255 с. 6. Мещишин І.Ф. Метод визначення окислювальної модифікації білків плазми (сироватки) крові // Буковинський медичний вісник.-1998.- Т.2, №1.-С.156-158. 7. Мещишин І.Ф., Пішак В.П. Обмін речовин у людини.-Чернівці:

C.156-158. 7. *Мецишен І.Ф., Пішак В.П.* Обмін речовин у людини.-Чернівці: Медінститут, 1995.-193 с. 8. *Мецишен І.Ф., Пішак В.П., Котильчук Г.П.* Ферменти.-Чернівці: Медінститут,1994.-117 с. 9. *Скулачев В.П.* О биохимических механизмах эволюции и роли кислорода // Биохимия.-1998.-Т.63,вып.11.-С.1570-1579. 10. *Ahmed M.U., Brinkmann E.E., Degenhardt T.P. et al.* N-epsilon-(carboxyethyl), a product of the chemical modification of proteins by methylglyoxal, increase with age in human lens proteins// Biochem.J.-1997.-Vol.324,Pt. 2.-P.565-570. 11. *Ayala A., Cutler R.G.* The utilization of 5-hydroxyl-2-aminovaleric acid as a specific marker of oxidized arginine and proline residues in proteins // Free Radic.Biol.Med.-1996.- Vol.21, № 1.- P.65-80. 12. *Cabiscol E., Levine R.L.* Carbonic anhydrase III. Oxidative modification in vivo and loss of phosphatase activity during aging // J.Biol.Chem.-1995.-Vol.270, №2.-P.14742-14747. 13. *Caraceni P., De Maria N., Ryu H.S. et al.* Protein but not nucleic acids are molecular targets for the free radical attack during reoxygenation of rat hepatocytes // Free Radic.Biol.and Med.-1997.-Vol.23,№2.-P.339-344. 14. *Cerda S., Weitzman S.A.* Influence of oxygen radical injury on DNA methylation // Mutat.Res.-1997.-Vol.386,N 2.-P.141-152. 15. *Ciolino H.P., Levine R.L.* Modification of proteins in endothelial cell death during oxidative stress // Free Radic. Biol. Med.-1997.-Vol.22, № 7.-P.1277-1282. 16. *Davies K.J.A.* Protein damage and degradation by oxygen radicals.I. General aspects // J.Biol.Chem.-1987.- Vol.262, № 20.- P.9895-9901. 17. *Davies K.J.A., Delsignore M.E., Lin S.W.* Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids // J.Biol.Chem.-1987.-Vol.262, №20.-P.9902-9907. 18. *Davies K.J.A., Delsignore M.E.* Protein damage and degradation by oxygen radicals.III. Modification of secondary and tertiary structure // J.Biol. Chem.-1987.-Vol.262,№ 20.-P.9908-9913. 19. *Davies K.J.A., Lin S.W., Pacifici R.E.* Protein damage and degradation by oxygen radicals. IV. Degradation of denatured protein//J.Biol. Chem.-1987.-Vol.262, № 20.-P.9914-9920. 20. *Flassetto S., Dias Renato D., Sarkis J.J.* Free radical-induced inhibition of ATP diphosphohydrolase activity [EC 3.6.1.5] from rat blood platelets // Biochem.and Mol.Biol. Int.-1997.- Vol.41, № 1.-P.161-168. 21. *Hatta A., Frei B.* Oxidative modification and antioxidant protection of human low density lipoprotein at high and low oxygen partial pressures // J.Lipid.Res.-1995.-Vol.36, № 11.- P.2383-2393. 22. *Levine R.L.* Oxidative modification of glutamine synthetase. I. Inactivation is due to loss of one histidine residue// J.Biol. Chem.-1983.-Vol.258, № 19.-P.11823-11827. 23. *Levine R.L.* Oxidative modification of glutamine synthetase.II. Characterization of the ascorbate model system // J.Biol.Chem.-1983.-Vol.258, N 19.-P.11828-11833. 24. *Li P.F., Fang Y.Z., Lu X.* Oxidative modification of bovine erythrocyte superoxide dismutase by hydrogen peroxide and ascorbate-Fe (III) // Biochem.Mol.Biol.Int.-1993.-Vol.29,№ 5.-P.929-937. 25. *Marcillat O., Zhang Y., Lin S.W., Davies K.J.A.* Mitochondria contain a proteolytic system which can recognize and degrade oxidatively-denatured proteins // Biochem.J.-1988.-Vol.254, № 3.-P.677-683. 26. *Maxwell S.R.J., Lih Q.Y.H.* Free radical and antioxidants in cardiovascular disease // J.Clin.Pharmacol.-1997.-Vol.44, № 4.-P.307-317. 27. *Murphy M.E., Kehrer J.P.* Oxidation state of tissue thiol groups and content of protein carbonyl groups in chickens with inherited muscular dystrophy // Biochem.J.-1989.-Vol.260, № 2.- P.359-364. 28. *Ocuda S., Saito H., Katsuki H.* Hydrogen peroxide-mediated neuronal cell death induced by an endogenous neurotoxin 3-hydroxykynurenine//Proc.Nat. Acad. Sci. USA.-1996.-Vol.93, № 22.-P.12553-12558. 29. *Oliver C.N., Bong-whan Ahn, Moerman E.J. et al.* Age-related in oxidized proteins // J.Biol. Chem.-1987.-Vol.262, № 12.- P.5488-5491. 30. *Palamanda J.R., Kehrer J.P.* Inhibition of protein carbonyl formation and lipid peroxidation by glutathione in rat liver microsomes // Arch. Biochem. Biophys.-1992.-Vol.293,№ 1.-P.103-109. 31. *Parke D.V., Sapota A.* Chemical toxicity and reactive oxygen species//Int.J.Occup.Med.and Environ.Healt.-1996.-Vol.9,№ 4.-P.331-340. 32. *Requena J.R., Fu M.X., Ahmed M.U. et al.* Lipoxidation products as biomarkers of oxidative damage to proteins during lipid peroxidation reactions // Nephrol. Dial. Transplant.- 1996.- Vol.11, Suppl.5.-P.48-53. 33. *Rivett A.J.* Purification of a liver alkaline protease which degrades oxidatively modified glutamine synthetase. Characterization as a high molecular weight cysteine proteinase // J. Biol. Chem.-1985.-Vol.260, № 23.-P.12600-12606. 34. *Rojas V.C., Grenfell G.A., Hicks J.J.* Participation of oxygen-free radicals in the oxido-reduction of proteins //Arch.Med.Res.-1996.-Vol.27, № 1.-P.1-6. 35. *Sies H.* Oxidative stress: oxidants and antioxidants // Exp. Physiol.-1997.-Vol.82, № 2.-P.291-295. 36. *Stadtman E.R.* Protein oxidation and aging // Science.-1992.-Vol.257, № 5074.-P.1220-1224. 37. *Stadtman E.R., Oliver C.N.* Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences // J. Biol. Chem.- 1991.- Vol. 266, № 4.- P.2005-2008. 38. *Sukalski K.A., La Berge T.P., Johnson W.T.* In vitro oxidative modification of erythrocyte membrane proteins in copper deficiency // Free Radic. Biol. and Med.-1997.-Vol. 22, № 5.-P.835-842. 39. *Uchida K., Kamakishi S.* 2-Oxo-histidine as a novel biological marker for oxidatively modified proteins // FEBS Lett.-1993.-Vol. 332, N 3.-P.208-210.

MECHANISM OF OXIDATIVE MODIFICATION OF PROTEINS

I.F.Meshchysheh, V.P.Poliiovi

Abstract. The article devoted to the modern ideas about the mechanism of oxidative modification of proteins and the role of active oxygen forms.

Key words : oxidative modification of proteins, mechanism, active oxygen forms.

Bukovinian State Medical Academy (Chernivtsi)