

УДК 57.053

ПЕРОКСИД ВОДОРОДА КАК НОВЫЙ ВТОРИЧНЫЙ ПОСРЕДНИК

© 2012 г. В. А. Ткачук¹, П. А. Тюрин-Кузьмин¹, В. В. Белоусов², А. В. Воротников^{1*}

¹Факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва 119192, Ломоносовский проспект, 31, корп. 5;

*электронная почта: vorotnikov@fbm.msu.ru

²Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва 117997, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 10.10.2011 г.

В обзоре приведены существующие доказательства того, что имеющая простую структуру молекула пероксида водорода удовлетворяет большинству сформулированных к настоящему времени критериев, предъявляемых к вторичным посредникам. Пероксид водорода накапливается и метаболизируется в клетках, его уровень изменяется в ответ на активацию поверхностных рецепторов. Он действует внутри клеток на сигнальные белки, используя особый механизм и вызывая такие реакции клеток, как миграция и пролиферация. Неясным остается, где и в какой момент образуется пероксид водорода, в какой области клетки он локализован, и какие сигнальные пути контролирует.

Ключевые слова: внутриклеточная сигнализация, вторичный посредник, NADPH-оксидаза, пероксид водорода, клеточная подвижность, пролиферация.

ВВЕДЕНИЕ

Значительная часть информации поступает в клетки из окружающей среды путем связывания различных лигандов (первичных посредников) со своими рецепторами на плазматической мембране. Активированные таким образом рецепторы запускают внутри клетки сигнальные каскады, вызывающие разнообразные клеточные ответы. Эти реакции могут быть быстрыми и кратковременными, такими как секреция и сокращение, или существенно более длительными, такими как движение, пролиферация или апоптоз. Характерной чертой многих рецепторов является использование для передачи сигнала вторичных посредников — специальных молекул, сопрягающих мембранные рецепторы с сигнальными каскадами, расположенными в цитозоле [1]. Другие ре-

цепторы используют для передачи сигнала физические белок-белковые взаимодействия и разнообразные адапторные белки [2]. Однако, как показывают результаты последних исследований, они также часто используют вторичных посредников на отдельных этапах передачи информации.

Согласно классическому определению, вторичные посредники — это низкомолекулярные вещества, которые не являются белками, образуются и действуют внутри клеток, и обеспечивают передачу сигнала от рецептора к мишеням в клетке. Вторичные посредники синтезируются *de novo* или хранятся во внутриклеточных депо, выходя в цитоплазму при активации рецепторов. Концепция вторичных посредников была заложена более 50 лет назад Тедом Роллом и Эрлом Сазерлендом, которые описали термостабильный фактор, опосредующий действие глюкагона и адреналина на метаболизм гликогена в клетках печени [3]. Это эпохальное открытие и сам фактор, позже определенный как циклический АМР (сАМР), принесли Эрлу Сазерленду Нобелевскую премию за 1971 г. [4]. С тех пор в клетках найдено несколько молекул, классифицированных как типичные вторичные посредники на основании ряда критериев, сформулированных Э. Сазерлендом 40 лет назад:

1) вторичный посредник действует внутри клетки;

2) в клетке должен существовать механизм синтеза и метаболизма вторичного посредника;

Сокращения: АФК, активные формы кислорода; СОД — супероксиддисмутаза; NADPH — восстановленный никотинамидадениндинуклеотидфосфат; FAD — флавинадениндинуклеотид; Akt/PKB — протеинкиназа В, известная также как Akt; DPI — дифенилениодоний; DUOX — оксидаза с двойной активностью (dual oxidase); EGF — эпидермальный фактор роста; GSH — глутатион; NAC — N-ацетилцистеин; NOX — NADPH-оксидазный комплекс; NoxA — активатор NADPH-оксидазного комплекса (NOX Activator); NoxO — организатор NADPH-оксидазного комплекса (NOX Organizer); PDGF — тромбоцитарный фактор роста; PI3-киназа — фосфатидилинозитол-3'-киназа; PIP₂ — фосфатидилинозитол-(4,5)-бисфосфат; PIP₃ — фосфатидилинозитол-(3,4,5)-трисфосфат; Prx — пероксиредоксин; PTEN — фосфатидилинозитол-3'-фосфатаза (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten); PTP-1B — фосфотирозинфосфатаза 1B; RTK — тирозинкиназный рецептор; Trx — тиоредоксин.

3) вторичный посредник должен имитировать физиологический эффект рецепторной стимуляции;

4) внутриклеточный уровень вторичного посредника должен изменяться при активации рецепторов;

5) в клетке должны существовать специфические мишени вторичного посредника;

6) антагонисты действия вторичного посредника должны блокировать эффект активации рецептора.

Эти критерии и по настоящее время остаются определяющими при рассмотрении новых кандидатов в число вторичных посредников [4, 5]. С тех пор критерии были уточнены и дополнены еще несколькими:

1) в неактивированной клетке концентрация вторичного посредника низкая;

2) вторичный посредник значительно усиливает первичный сигнал;

3) вторичный посредник компартиментализован в клетке, что направляет и ограничивает сигнал.

Всем перечисленным критериям на сегодняшний день удовлетворяет лишь небольшое число соединений. Выделяют четыре класса общепризнанных вторичных посредников:

– мембранные липиды и их производные (фосфоинозитиды, диацилглицерин);

– циклические нуклеотиды (сАМР, сGMP);

– ионы (Ca^{2+});

– газы (NO, CO).

В передаче внутриклеточных сигнальных каскадов принимает участие еще много других низкомолекулярных соединений, которые пока не удовлетворяют одному или нескольким критериям. В данном обзоре будет рассмотрен новый претендент на роль вторичного посредника – пероксид водорода (H_2O_2).

ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ H_2O_2

H_2O_2 – это одна из активных форм кислорода (АФК), к которым относятся химически активные молекулы, образующиеся при неполном восстановлении молекулярного кислорода, в том числе радикалы кислорода и пероксиды. АФК очень реакционноспособны из-за наличия свободных валентностей, образованных неспаренными электронами, либо слабой связи между атомами кислорода, которая может разрываться с образованием радикалов. АФК, а вместе с ними и H_2O_2 , традиционно рассматривались как нежелательные побочные продукты аэробного дыхания, вызывающие окислительный стресс (рис. 1). Окислительный стресс считается одной из главных причин старения [7], предполагается, что он может играть важную роль в патогенезе болезней

Альцгеймера и Паркинсона, а также шизофрении и атеросклероза. Однако в норме высокая реакционноспособность АФК используется клетками иммунной системы для нейтрализации патогенов в воспалительных процессах.

Лишь в конце 90-х годов начали появляться работы о сигнальной функции низких концентраций H_2O_2 внутри клетки. Пероксид водорода участвует в регуляции сигнальных ферментов и транскрипционных факторов. Эта молекула играет важную роль в клеточной пролиферации [8, 9], дифференцировке [10], миграции [11] и апоптозе [12] (см. ниже). Совокупность накопленных к настоящему времени данных свидетельствует о том, что H_2O_2 удовлетворяет большинству критериев вторичных посредников.

СИНТЕЗ И МЕТАБОЛИЗМ H_2O_2 В КЛЕТКЕ

Как и для всех вторичных посредников, в клетках существуют механизмы синтеза и распада H_2O_2 . Они опосредованы сложными белковыми системами и строго контролируются сигнальными системами клетки и других вторичных посредников.

Разновидности АФК

К группе АФК относятся молекулы и свободные радикалы, образующиеся при неполном восстановлении молекулярного кислорода до воды (рис. 2). Кислород, восстановленный одним электроном, образует супероксид-анион-радикал $\text{O}_2^{\cdot-}$. Из-за гидрофильности и заряда эта частица не проникает через клеточные мембраны. Молекула $\text{O}_2^{\cdot-}$ нестабильна, она может дисмутировать в кислород и H_2O_2 и кислород. Несмотря на высокий восстановительный потенциал (0.9 В), супероксид-анион-радикал из-за своей анионной природы и нестабильности взаимодействует лишь с небольшим числом соединений в клетках. Вследствие этого вреден не столько сам $\text{O}_2^{\cdot-}$, как продукты его дальнейшего восстановления.

При взаимодействии $\text{O}_2^{\cdot-}$ со свободными атомами меди, железа или других переходных металлов образуется высокореакционноспособный гидроксильный радикал OH^{\cdot} . Он также образуется при взаимодействии H_2O_2 с ионами Fe^{2+} . Гидроксил-радикал быстро вступает в реакции с близлежащими молекулами, поэтому имеет очень короткое время жизни внутри клетки и не распространяется далеко от места образования. Он может инициировать радикальные цепные реакции с образованием различных карбоновых пероксильных радикалов ROO^{\cdot} , вызывая повреждение липидов и, как следствие, клеточных мембран. В клетке не существует ферментатив-

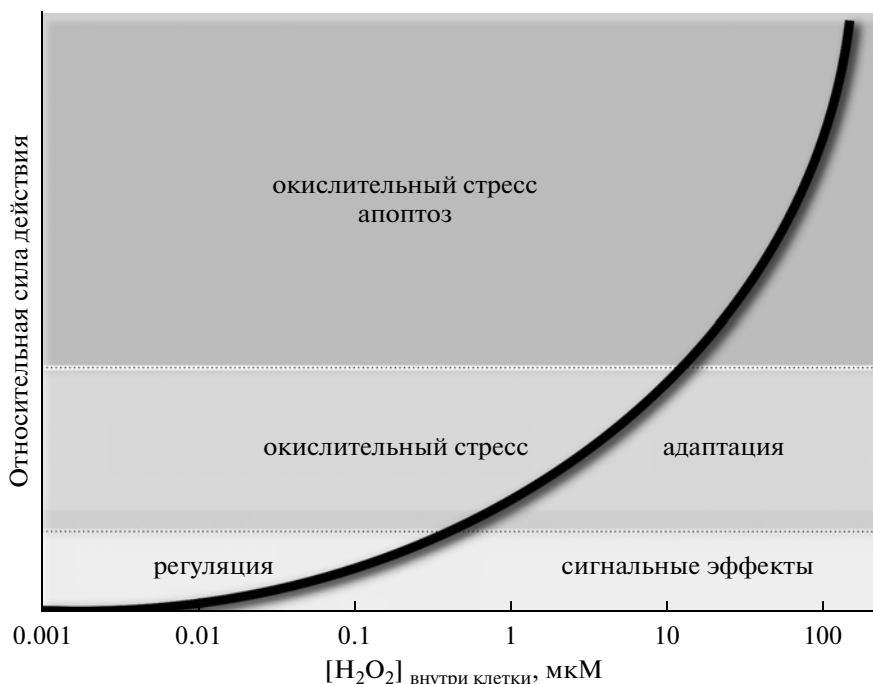


Рис. 1. Концентрационная шкала внутриклеточных эффектов H_2O_2 ([6], с изменениями). В физиологическом диапазоне концентраций (от 1 нМ до 0.1–0.5 мкМ) H_2O_2 действует как сигнальная молекула, стимулируя миграцию и пролиферацию клеток. При повышении концентрации до 1–10 мкМ H_2O_2 вызывает остановку деления, которое обычно восстанавливается и даже ускоряется в случае успешной адаптации к окислительному стрессу. При высоких концентрациях (≥ 10 мкМ H_2O_2) окислительный стресс преобладает, адаптация не срабатывает, клетка уходит в апоптоз. Границы этих реакций относительны и сильно зависят от типа клеток, условий культивирования и неоднородного распределения H_2O_2 в клетке, что в принципе делает понятие о средней внутриклеточной концентрации H_2O_2 малопримлемым.

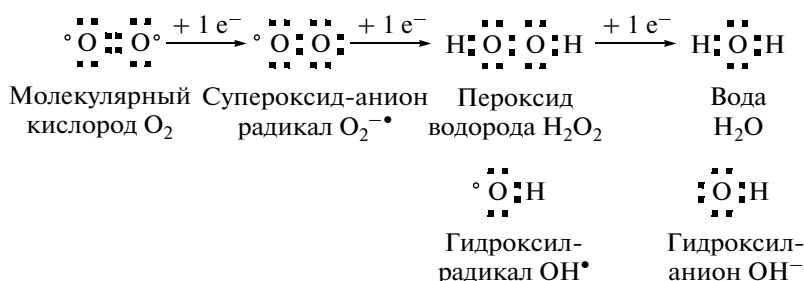


Рис. 2. Основные представители АФК, образующиеся при пошаговом восстановлении молекулярного кислорода (O_2) до воды и продукта ее диссоциации OH^- . Черными точками показаны электронные пары, белыми – неспаренные электроны радикалов. При восстановлении одним электроном O_2 превращается в супероксид-анион-радикал $O_2^{\cdot -}$, имеющий один неспаренный электрон. $O_2^{\cdot -}$ способен самопроизвольно дисмутировать в пероксид водорода H_2O_2 и синглетный кислород. Эту реакцию в клетке дополнительно катализирует супероксиддисмутаза. В присутствии Fe^{2+} H_2O_2 расщепляется на два крайне активных гидроксил-радикала OH^{\cdot} , которые могут образовываться и при восстановлении $O_2^{\cdot -}$ атомами переходных металлов. При дальнейшем восстановлении H_2O_2 превращается в воду.

ных реакций нейтрализации OH^{\cdot} и пероксильных радикалов ROO^{\cdot} . Их элиминация происходит только при взаимодействии с белками, липидами, нуклеиновыми кислотами или внутриклеточными антиоксидантами. В норме свободные атомы переходных металлов в клетке практически отсутству-

ют, они входят в состав белков в качестве кофакторов и тем самым экранированы от действия АФК. Таким образом, в физиологических условиях гидроксильный радикал появляется в клетке крайне редко и едва ли оказывает серьезное действие.

Супероксид-анион-радикал может спонтанно и быстро дисмутировать в H_2O_2 и синглетный кислород O_2 . Эта реакция еще более ускоряется супероксиддисмутазами (СОД) [13]. Различные изоформы СОД широко представлены в цитоплазме всех типов клеток, а также вне клеток. H_2O_2 — наиболее стабильная молекула из всех АФК; она обладает относительно большим временем жизни и способна распространяться на значительные расстояния в водных растворах. В первую очередь это связано со значительно более низкой реакционной способностью H_2O_2 по сравнению с другими представителями АФК. В этой связи некоторые исследователи даже не относят H_2O_2 к группе АФК. Например, среди тиоловых групп цистеинов H_2O_2 способен окислять лишь те, которые находятся в особом аминокислотном окружении в форме аниона [14]. Подробнее об этом будет написано при описании специфических мишеней H_2O_2 . H_2O_2 хорошо растворим в воде и благодаря отсутствию заряда хорошо проходит сквозь биологические мембраны. В клетках млекопитающих также возможна облегченная диффузия H_2O_2 через клеточные мембраны при помощи белков аквапоринов [15]. Присутствие аквапоринов позволяет контролировать проницаемость мембран для H_2O_2 , однако в клетках какого типа и как осуществляется этот контроль, до конца не понятно. Таким образом, $O_2^{\cdot -}$ в течение короткого времени после синтеза превращается в H_2O_2 , который более стабилен и способен диффундировать в цитоплазме и межклеточном пространстве на значительные расстояния. Другие АФК в нормальных условиях практически не накапливаются.

Источники АФК в клетке

Первичной АФК, образуемой клеткой, является супероксид-анион-радикал $O_2^{\cdot -}$, который быстро преобразуется в H_2O_2 под действием СОД. В свою очередь, H_2O_2 вступает в ряд реакций в качестве субстрата и разрушается антиоксидантными системами клетки. К системам, синтезирующим АФК, относится электрон-транспортная цепь митохондрий, семейство мембранных NADPH-оксидазных комплексов и ряд других оксидаз.

Электрон-транспортная цепь митохондрий служит важным источником АФК. Эта последовательность ферментов, объединенных в четыре крупных комплекса, осуществляет перенос электронов от NADPH к кислороду, восстанавливая его до воды. Белки цепи содержат кофакторы, способные окисляться и восстанавливаться. Они расположены по возрастанию своего окислительно-восстановительного потенциала [1]. В процессе прохождения электронов кофакторы поочередно восстанавливают каждый последующий

элемент цепи. АФК могут синтезироваться как при неполном восстановлении конечного акцептора электронов — кислорода, так и в случае прерывания цепи и перехода электрона на растворенный в матриксе митохондрий кислород [16]. В митохондриях содержатся и другие ферменты, побочным продуктом которых могут быть АФК [16].

NADPH-оксидазы. Практически все клетки млекопитающих содержат ферментативные комплексы NADPH-оксидаз (NOX), единственная функция которых — образование супероксид-аниона $O_2^{\cdot -}$. Гомологи NOX найдены в растениях, грибах и простейших [17]. Комплексы NOX производят $O_2^{\cdot -}$ путем переноса электрона с внутриклеточного NADPH на внеклеточный кислород. Электрон при этом пересекает мембрану, поэтому $O_2^{\cdot -}$ накапливается вне клетки [18].

Впервые ферменты NOX были открыты в нейтрофилах. При фагоцитозе макрофагами и нейтрофилами бактерий или чужеродных частиц [19] развивается так называемый окислительный взрыв, представляющий собой обильное выделение $O_2^{\cdot -}$ в просвет фагосомы. Там $O_2^{\cdot -}$ взаимодействует с хлорид-ионами с образованием токсичной для патогенов гипохлорной кислоты (HClO). Эту реакцию катализирует фермент миелопероксидаза [20]. В фагосомах HClO разрушает содержимое, действуя вместе с рядом пептидов и ферментов, разрушающих бактериальную клеточную стенку [21]. Образование $O_2^{\cdot -}$ в нейтрофилах и других фагоцитирующих клетках осуществляет изоформа NADPH-оксидазы, получившая название NOX2. Долгое время считалось, что синтез $O_2^{\cdot -}$ при окислительном взрыве в фагоцитах — это единственная функция NADPH-оксидаз. Однако позже NOX2 обнаружили не только в лейкоцитах, но и практически во всех клетках организма, а также открыли и другие изоформы NOX.

К настоящему времени в клетках млекопитающих обнаружены семь изоформ NADPH-оксидаз: NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 и DUOX2 [22, 23]. Все NADPH-оксидазы представляют собой трансмембранные белки, которые переносят электроны через клеточные мембраны, восстанавливая при этом молекулярный кислород до супероксид-анион-радикала или пероксида водорода (рис. 3). Каталитические субъединицы всех NADPH-оксидаз обладают шестью трансмембранными доменами и содержат два гема. NADPH-оксидазы найдены только в эукариотических клетках, хотя у прокариот известны схожие по строению и функции белки.

Наиболее хорошо изучена основная изоформа NADPH-оксидаз фагоцитов — NOX2. Она экс-

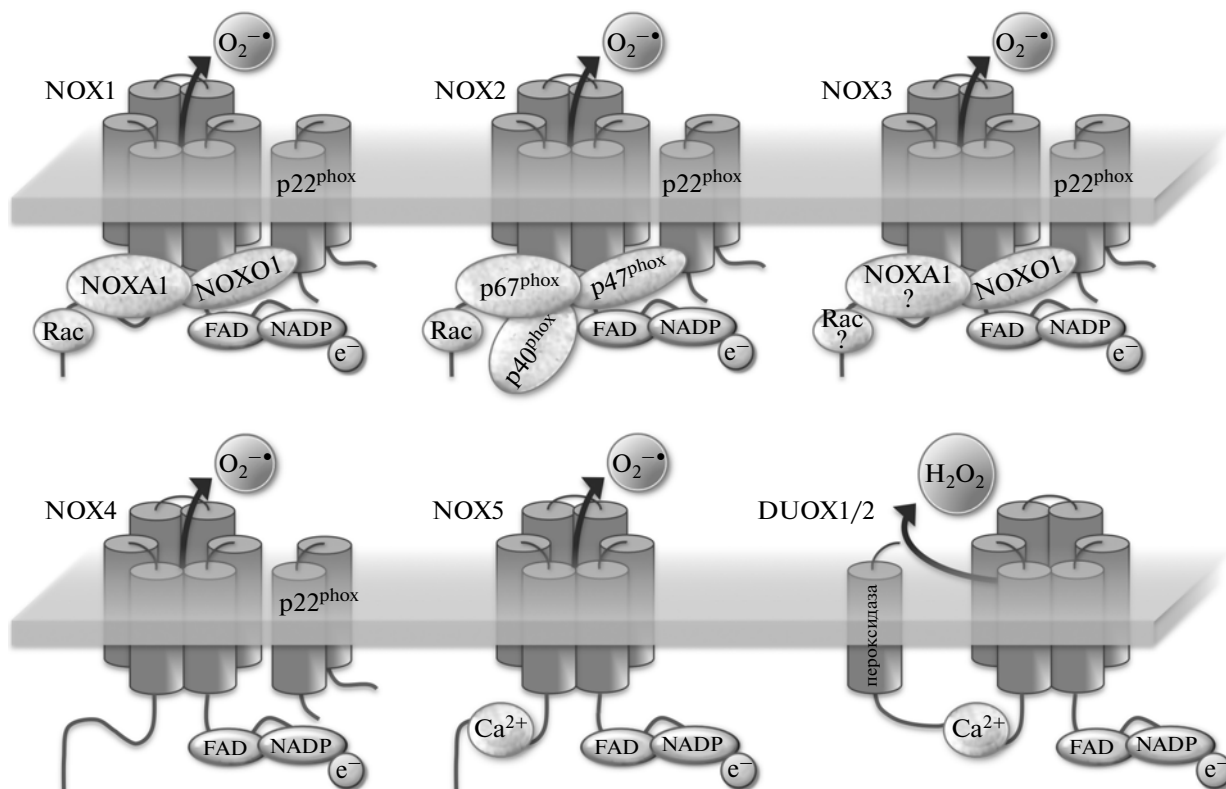


Рис. 3. Семейство NADPH-оксидаз [22, 23], с изменениями). Основной компонент, гомологичный gp91phox NOX2 и обладающий оксидазной активностью, имеет шесть трансмембранных доменов. Он принимает электрон от цитоплазматического NADPH и переносит его на FAD, а затем на гемовые центры (не показаны) и молекулярный кислород на наружной поверхности мембраны, образуя $O_2^{\cdot-}$. В комплексах NOX1-4 с ним связана субъединица p22phox, имеющая два трансмембранных домена. Остальные компоненты привлекаются в комплексы NOX1-3 из цитоплазмы при активации их сборки. Считается, что NOX4, связанный с p22phox, конститутивно активен и не требует дополнительных участников. В активации NOX5 и DUOX1/2 участвуют ионы Ca^{2+} , которые связываются с N-концевыми последовательностями “EF-руки” основной субъединицы. DUOX1/2 также содержит пероксидазный домен и образует непосредственно H_2O_2 . Взаимодействие с дополнительным компонентом, DuoxA1/2, фиксирует DUOX1/2 на плазматической мембране.

прессуруется в нейтрофилах и моноцитах, а также, в меньших количествах, практически во всех других типах клеток. Основу NOX2 составляют две мембранные субъединицы: p91phox и p22phox, где аббревиатура *phox* отражает фагоцитарную природу оксидазы (*phagocyte oxidase*). Три цитоплазматические субъединицы (p47phox, p67phox, p40phox) и малый G-белок Rac1 присоединяются к ним при формировании холоферментного комплекса [22]. Основная каталитическая субъединица комплекса, p91phox, состоит из шести трансмембранных доменов; она содержит участок связывания NADPH и протетической группы FAD в С-концевой, цитоплазматической части. Ее центральная часть содержит два гема между третьим и пятым трансмембранными доменами.

От цитоплазматического NADPH электрон переносится на FAD и далее через два гема на

кислород. Вторая мембранная субъединица, p22phox, содержит два трансмембранных домена, она постоянно ассоциирована с каталитической p91phox. Во время сборки NADPH-оксидазы она привлекает цитоплазматические субъединицы, специфически связывая p47phox [22, 23].

В неактивном состоянии цитоплазматические компоненты фагоцитарной NADPH-оксидазы (p47phox, p67phox и p40phox) образуют комплекс (рис. 4) [24]. Белок p47phox выступает в качестве организатора комплекса, а p67phox – в качестве активатора. Чтобы p47phox могла связаться с мембранными субъединицами, она должна быть фосфорилирована протеинкиназой С. Помимо этого для стабилизации холоферментного комплекса необходимо наличие в мембране вторичного посредника PIP_3 , который образуется из PIP_2 при действии P13-киназы, активируемой рецептором. Субъединицы p47phox и p40phox со-

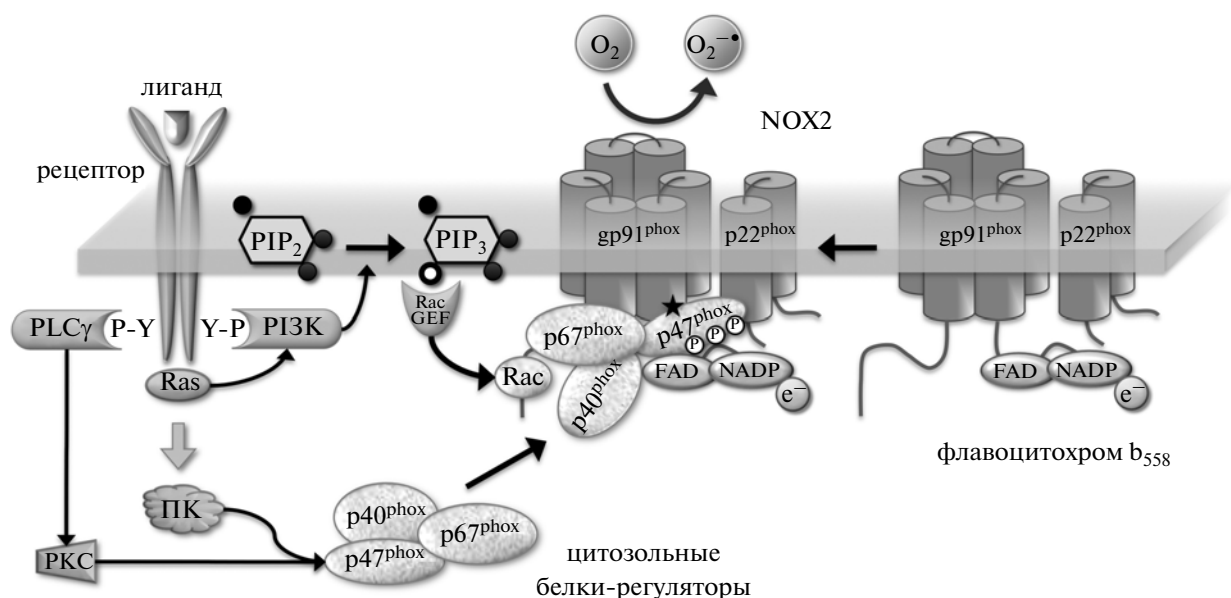


Рис. 4. Механизм активации NOX1-3 на плазматической мембране. Показана активация классической NOX2 путем сборки комплекса на плазматической мембране (из [24], с изменениями). Считается, что активация NOX1 и NOX3 происходит сходным образом. Сборка запускается как минимум тремя сигналами от активированных рецепторов, которые приводят к связыванию цитозольных компонентов p40phox, p47phox и p67phox с предсуществующим на мембране комплексом gp91phox и p22phox, образующим флавоцитохром b₅₅₈. Эти сигналы включают рецептор-зависимую активацию протеинкиназы, действие липидного вторичного посредника PIP₃ и факторы обмена гуаниловых нуклеотидов, активирующие малую GTP-азу Rac. Несколько остатков основной организующей комплекс субъединицы, p47phox, подвергаются фосфорилированию протеинкиназой C, которая активируется по классическому рецептор-зависимому механизму с участием фосфолипазы C_γ (PLC_γ) и образуемого ей диацилглицерина и инозитолтрисфосфата, вызывающего повышение Ca²⁺ в цитоплазме [1]. Возможно, другие рецептор-зависимые протеинкиназы (ПК) также фосфорилируют p47phox. В результате p47phox переходит из автоингибированного в активное (★) состояние и связывается с b₅₅₈, привлекая к нему остальные компоненты. Параллельная рецепторная активация Ras белка и PI3-киназы приводит к локальному образованию PIP₃, перемещению на мембрану и активации белков, несущих домены плекстриновой гомологии и специфично связывающих 3'-фосфорилированный PIP₃. Среди них факторы обмена гуаниловых нуклеотидов для белка Rac1 (Rac-GEF). Именно активация Rac критична для сборки и активации NOX, что делает этот процесс полностью рецептор-зависимым. Не исключено, что аналогичный механизм может обеспечивать активацию NOX 7-доменными рецепторами, связанными с тримерными G-белками. Они также активируют протеинкиназу C, Ras и PI3-киназу, однако их роль в активации NADPH-оксидаз пока не изучена.

держат PX-домены (домены, гомологичные Phox). Так же как и PH-домены (домены плекстриновой гомологии) других белков, PX-домены связывают преимущественно PIP₃, но могут взаимодействовать и с фосфатидилсерином, и с некоторыми другими липидами [25]. Субъединица p40phox дополнительно стабилизирует комплекс в собранном виде, закоривая его на мембране за счет связывания с PIP₃.

Независимо от цитоплазматических субъединиц на мембрану привлекается активированная (GTP-связанная) форма малого G-белка Rac1. Rac1 взаимодействует с N-концевым участком активаторной субъединицы p67phox, что является критическим событием в активации NOX2. Таким образом, активация мембранного ферментативного комплекса NOX2 представляет собой сложный многостадийный процесс, который

строго регулируется и практически не происходит спонтанно.

Другие изоформы NADPH-оксидаз изучены значительно слабее. NOX1 экспрессируется во многих типах клеток, в том числе в клетках гладкой мускулатуры кровеносных сосудов, эндотелии, в остеокластах, нейронах и глиальных клетках, в эпителии кишечника, а также в фибробластах [23]. В клетках NOX1 располагается на плазматической мембране, особенно в кавеолах [23]. Субъединичный состав и механизм активации NOX1 и NOX2 очень похожи. Аналогом каталитической субъединицы NOX2, p91phox, является белок Nox1 (строчными буквами принято называть белки-субъединицы, а заглавными – соответствующие комплексы NADPH-оксидаз). В качестве активаторной субъединицы, аналога p67phox, выступает белок NoxA1 (NOX activator); в качестве организатора сборки комплекса –

NoxO1 (NOX organizer – аналог p47phox). Для активации NOX1 также требуется включение в него GTP-связанного Rac1.

NOX1 регулирует рост и миграцию гладкомышечных клеток [26]. Вдобавок, NOX1 участвует в регуляции кровяного давления [27]. Мыши, нокаутированные по NOX1, выживают. У них снижена чувствительность к боли и наблюдается хроническое воспаление нервной системы, что указывает на функции NOX1 в нервной системе [28]. Как обсуждается ниже, АФК, образуемые NOX1, участвуют в инактивации внутриклеточных фосфатаз и регуляции активности киназных сигнальных каскадов, белков клеточного цикла и ряда факторов транскрипции [23].

NOX3 обнаружена только в эмбриональных тканях, причем почти исключительно в тканях внутреннего уха [29]. Про нее очень мало известно; по-видимому, она активируется по механизму, сходному с NOX1. В фибробластах эта изоформа не обнаружена.

NOX4 экспрессируется в клетках многих тканей, в том числе гладкомышечных, эндотелиальных клетках, остеокластах, нейронах и в фибробластах [23]. Особенно много NOX4 в клетках почечных канальцев [30]. Уровень экспрессии NOX4 значительно выше, чем всех других изоформ NADPH-оксидаз [31]. В клетке эта изоформа NADPH-оксидазы располагается главным образом на цитоплазматической стороне мембраны эндоплазматического ретикула [32], а также в ядре [33]. Активная NOX4 представляет собой димер Nox4 и p22phox. Никаких активаторных белков и белков-организаторов, нужных для ее функционирования, не выявлено [17]. При сверхэкспрессии Nox4 в модельных системах наблюдали высокий уровень образования АФК в отсутствие всякой стимуляции клеток. Известные коактиваторы и регуляторы других изоформ NADPH-оксидаз не влияют на активность NOX4 [34]. В связи с этим многие исследователи считают, что активность этой изоформы регулируется на уровне экспрессии.

Отсутствие регуляции NOX4 показано исключительно в модельных системах, когда Nox4 экспрессировали в клетках, не содержащих этой изоформы. В то же время существует ряд данных, свидетельствующих о возможности ее быстрой регуляции. Например, инсулин в течение 5 мин активирует NOX4-зависимое образование АФК в фибробластах линии 3T3-L1 [35]. Этого времени явно недостаточно для того, чтобы это происходило за счет повышения уровня экспрессии NOX4. Вероятно, в клетках, содержащих NOX4, его активность находится под контролем. Различные данные указывают на то, что NOX4 каким-то образом участвует в старении клеток, апоптозе и выживании клеток, их дифференцировке и ми-

грации [23]. Участие в таком разнообразии клеточных реакций и противоположных процессах клеточной жизни и смерти свидетельствует о роли NOX4 в регуляции фундаментальных физиологических механизмов.

NOX5 экспрессируется в эмбриональных тканях и матке. Во взрослом организме NOX5 обнаружен в Т- и В-лимфоцитах, кишечнике и селезенке [36]. В дополнение к доменам, гомологичным p91phox, в ее N-конце находятся Ca²⁺-связывающие последовательности “EF-руки”. Считается, что активация синтеза O₂^{-•} происходит при связывании ионов Ca²⁺ и не зависит от цитоплазматических белков-активаторов [37].

NADPH-оксидазы группы DUOX (DUOX1 и DUOX2) по структуре представляют собой дальнейшее “усовершенствование” NOX5. Они активируются ионами Ca²⁺, а образуемые ими внеклетки АФК сразу используются для модификаций соединительной ткани. Помимо участков, гомологичных p91phox, и “EF-руки”, эти изоформы содержат внеклеточный пероксидазный домен. Его аминокислотная последовательность очень близка к последовательности миелопероксидазы пероксисом – фермента, катализирующего взаимодействие Cl⁻ и H₂O₂ с образованием гипохлорной кислоты. Однако окисление ферментами DUOX1/2 хлорид-ионов не показано [38]. Поскольку именно пероксидазный домен DUOX1/2 вовлечен в АФК-зависимую модификацию внеклеточного матрикса [39], скорее всего эту функцию выполняет H₂O₂. В настоящее время не ясно как DUOX1/2 превращает O₂^{-•} в H₂O₂, но известно, что эта оксидаза образует только пероксид водорода [40]. Таким образом, можно предположить, что DUOX1/2 одновременно служит и источником АФК, и ферментом, генерирующим пероксид.

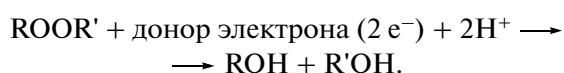
Системы, разрушающие АФК в клетке

АФК способны взаимодействовать с клеточными структурами и повреждать их, если накапливаются в клетках в больших количествах (рис. 1). При этом развивается окислительный стресс, который считается причиной старения, а также многих патологических состояний, таких как болезни Альцгеймера и Паркинсона, атеросклероз и другие. Вместе с тем в низких концентрациях и внутри клетки АФК выступают в качестве сигнальных молекул [23]. Для того чтобы синтезирующиеся в норме АФК не были токсичными и не повреждали белки, их образование должно находиться под жестким контролем многочисленных антиоксидантных систем. Уровень экспрессии, активность и внутриклеточная локализация фер-

ментов, входящих в эти системы и разрушающих АФК, также строго регулируется.

В эукариотических клетках существует несколько независимых антиоксидантных систем, которые отчасти дублируют друг друга, отчасти дополняют. Среди них выделяют четыре группы: пероксидазы, супероксиддисмутазы, тиоредоксиновая и глутатион-глутаредоксиновая системы.

Пероксидазы — обширная группа ферментов, восстанавливающих пероксиды до спиртов, в том числе до воды:

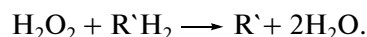


Обычный субстрат пероксидаз — H_2O_2 , но существуют и ферменты, восстанавливающие перекисные производные липидов и других органических веществ. Кофакторами эукариотических пероксидаз выступают либо геммы, либо остатки цистеина в активном центре.

К пероксидазам относятся ферменты основной антиоксидантной системы, разрушающей H_2O_2 в цитозоле — пероксиредоксины (Prx) 1 и 2. Другие изоформы пероксиредоксинов располагаются в митохондриях и эндоплазматическом ретикулуме. Prx1 и Prx2 находятся в цитоплазме в высокой концентрации, они составляют от 0.2 до 1% всех растворимых белков клетки млекопитающих [41]. В отличие от некоторых антиоксидантов, например аскорбиновой кислоты, пероксиредоксины способны многократно окисляться и восстанавливаться. После окисления при взаимодействии с H_2O_2 пероксиредоксины восстанавливаются при участии других тиолов (тиоредоксинов и глутатионов) или аскорбиновой кислоты. Прохождение сигнала от стимулированных рецепторов факторов роста внутрь клетки связано с накоплением H_2O_2 , которое обеспечивается за счет локальной инктивации Prx. При этом Prx1 инактивируется в районе плазматической мембраны в результате фосфорилирования, а Prx2 окисляется избытком локально образуемого H_2O_2 [42]. Таким образом, вблизи активного тирозинкиназного рецептора в цитоплазме появляется зона с пониженной антиоксидантной активностью. В этой области накапливается H_2O_2 [43], который локально осуществляет сигнальные функции.

Другой фермент, относящийся к пероксидазам, это каталаза. В клетках млекопитающих она находится в пероксисомах. Эти органеллы играют важную роль в осуществлении окислительно-восстановительных реакций при метаболизме таких соединений, как жирные и желчные кислоты, а также при инактивации токсических соединений. Используя образующуюся в пероксисомах H_2O_2 , каталаза окисляет множество таких субстратов,

как фенолы, муравьиная кислота, формальдегид и этанол, согласно реакции следующего типа:



Супероксиддисмутазы катализируют реакцию дисмутации $\text{O}_2^{\cdot -}$ с образованием молекулярного кислорода и H_2O_2 [13]. В активном центре этих ферментов содержатся переходные металлы. В клетках эукариот СОД локализуется в цитоплазме, ядре, митохондриях, пластидах, т.е. практически во всех компартментах клетки, а также на поверхности клеток и во внешней среде. Большинство NADPH-оксидаз и митохондрии синтезируют $\text{O}_2^{\cdot -}$, который при участии СОД конвертируется в H_2O_2 .

Тиоредоксины (Trx) — семейство белков, которые осуществляют восстановление дисульфидных связей в других окисленных белках, например пероксиредоксинах, путем так называемого дисульфидного обмена. При этом в белке-субстрате дисульфидная связь восстанавливается, а в Trx, наоборот, замыкается. Trx-редуктазы восстанавливают пул окисленного Trx при участии NADH [44].

Глутатион-глутаредоксиновая система (GSH-R) во многом дублирует функции тиоредоксиновой системы [45]. Глутатион (GSH) представляет собой трипептид γ -глутамилцистеинилглицин, содержащий остаток цистеина. Глутатион окисляется до дисульфида глутатиона (GSSG), восстанавливая при этом окисленный субстрат. GSH регенерируется конститутивно активными глутатионредуктазами, содержащими в активном центре FAD. Концентрация глутатиона в эукариотических клетках очень высока (например, в клетках печени она превышает 5 мМ), при этом практически весь глутатион находится в восстановленной форме.

Высокая концентрация и разнообразие антиоксидантных систем, находящихся во всех компартментах клеток, и их строгая регуляция обеспечивают жесткий контроль уровня H_2O_2 в цитоплазме, определяя локальное и кратковременное функционирование этой молекулы в качестве вторичного посредника.

ПЕРОКСИД ВОДОРОДА КАК СИГНАЛЬНАЯ МОЛЕКУЛА

Физиологические эффекты

Важный критерий вторичного посредника — имитация эффекта внешней стимуляции при экзогенном добавлении этого соединения или его мембранопроницаемого аналога к клеткам. Поскольку пероксид водорода свободно диффундирует через плазматическую мембрану, считается, что при добавлении экзогенного H_2O_2 быстро

устанавливается его равновесие между цитоплазмой и внеклеточной средой. Скорость диффузии H_2O_2 через плазматическую мембрану составляет от 0.01 до 0.7 см/мин [46]. Эти величины сравнимы со скоростью работы пероксидаз и каталаз, расщепляющих H_2O_2 в клетке. Таким образом, цитоплазматическая концентрация H_2O_2 в первые секунды после добавления примерно в 7–10 раз ниже внеклеточной [46, 47] (см. рис. 1). При добавлении высоких концентраций H_2O_2 (10–500 мкМ) в клетках активируются механизмы антиоксидантной защиты и репарации поврежденных белков и липидов. Если они не справляются, наступают необратимые повреждения (500 мкМ и более внеклеточного H_2O_2), и клетки входят в апоптоз.

Малые количества H_2O_2 (1–10 мкМ) не только не вызывают заметных повреждений клетки, но и оказывают митогенный эффект. Так, при добавлении к смешанной культуре лимфоцитов 10 мкМ H_2O_2 наблюдался значительный рост включения H^3 -тимидина, маркера пролиферативной активности клеток [48]. Повышение включения тимидина отмечали также при введении 1 мкМ H_2O_2 в среду культивирования первичных фибробластов [49]. Добавление 1 мкМ H_2O_2 к эпителиальным клеткам HeLa или фибробластам ВНК-21 ускорило деление клеток [50, 51]. Экзогенный H_2O_2 повышал митотический индекс и выживаемость культивируемых миобластов L6C5 [52], а добавление 1 мкМ H_2O_2 ускорило формирование трубок первичными эндотелиальными клетками в модели ангиогенеза *in vitro* [53]. При этом каталаза или другие антиоксиданты, наоборот, снижали пролиферацию и ангиогенез [50, 51, 53].

Существует достаточно много экспериментальных данных о том, что в малых количествах H_2O_2 стимулирует миграцию клеток, хотя молекулярный механизм его действия пока непонятен. Так, H_2O_2 участвует в трансэндотелиальной миграции лимфоцитов [54], вносящей критический вклад в развитие воспалительных реакций. Генерируемый в зоне острых тканевых повреждений H_2O_2 также вызывает быстрое перемещение в эту зону лейкоцитов [55]. Похоже, в обоих случаях H_2O_2 выступает в роли хемоаттрактанта, направляя движение клеток по градиенту своей концентрации. Однако пока прямых доказательств этому нет, и механизм остается неясным, поскольку маловероятно, что H_2O_2 действует как цитокин, связываясь с поверхностными рецепторами клеток. Скорее всего, H_2O_2 проходит сквозь мембрану и изменяет активность внутриклеточных сигнальных молекул на переднем крае мигрирующих клеток, повышая псевдоподиальную активность. Эта гипотеза сейчас активно разрабатывается и находит первые подтверждения. В таких клеточных моделях, как восстановление экспериментальной раны клеточного монослоя и хемотак-

сис через полупроницаемую мембрану, движение кератиноцитов ускорялось в присутствии H_2O_2 [56], а миграция гладкомышечных клеток подавлялась под действием ингибитора NADPH-оксидазы плазматической мембраны [57, 58].

Экзогенный H_2O_2 влияет на активацию внутриклеточных процессов, сопутствующих рецептор-зависимой стимуляции клеток. Так, в эндотелиальных клетках низкие дозы H_2O_2 активируют эндоцитоз, как показано на примере флуоресцентно меченного декстрана [59]. H_2O_2 также активирует сигнальные каскады тирозинкиназных рецепторов. Как и инсулин, внеклеточно добавленный H_2O_2 активировал PI3-киназу и ее мишень, киназу Akt/PKB, в инсулин-чувствительных преадипоцитах 3T3-L1 [60].

Сигнальная функция H_2O_2 косвенно подтверждается тем, что в больших концентрациях и экзогенный, и внутриклеточный H_2O_2 вызывают окислительный стресс, приводя к прямо противоположным клеточным эффектам — подавлению пролиферации и развитию апоптоза [6, 48]. По-видимому, H_2O_2 действует в строго контролируемом узком диапазоне физиологических концентраций, превышение которого приводит к гиперактивации и гибели клеток, так же как и при действии классических токсинов, например холерного и коклюшного, вызывающих неконтролируемое повышение внутриклеточного cAMP.

Рядом авторов было отмечено, что общий внутриклеточный уровень АФК не изменяется при добавлении к клеткам небольших, но физиологически значимых количеств H_2O_2 . Burdon и соавт. [50] показали, что при этом уменьшается пул GSH. Это свидетельствует о быстром восстановлении H_2O_2 внутриклеточными антиоксидантными системами. Прямые доказательства крайне высокой активности антиоксидантных систем клетки получены в нашей лаборатории при наблюдении за изменением цитоплазматического уровня H_2O_2 в режиме реального времени [9]. Добавление к клеткам эпителиальной карциномы линии А-431 экстремально высоких концентраций H_2O_2 (0.5 мМ) приводило к повышению внутриклеточного H_2O_2 в течение нескольких секунд. Однако весь экзогенный H_2O_2 разрушался в течение последующих 1.5 мин. Добавленный повторно H_2O_2 также быстро входил внутрь и инактивировался в клетке.

Таким образом, при экзогенном добавлении весь H_2O_2 разрушается в течение нескольких минут, а его митогенное действие длится несколько суток. Возникает кажущееся противоречие во временной динамике уровня H_2O_2 и его внутриклеточного эффекта. Такое несоответствие может объясняться, например тем, что за первые минуты H_2O_2 запускает внутриклеточный сигнальный каскад, отвечающий за пролиферативный ответ

клеток. Далее либо активность этого сигнального каскада продлевается за счет механизмов обратной связи в течение времени, необходимого для эффективного проведения этого сигнала в ядро клетки, либо экзогенный H_2O_2 приводит к активации его внутриклеточных источников. Другим возможным объяснением несовпадения временных характеристик накопления и действия H_2O_2 в клетке может быть отсутствие специфической связи между H_2O_2 и митогенным эффектом, который объясняется лишь стрессовым воздействием окислителя на клетки [61]. Однако результаты экспериментов, в которых антиоксиданты снижали пролиферацию клеток, свидетельствуют скорее в пользу специфической роли H_2O_2 в реализации длительных клеточных реакций.

Изменение внутриклеточного уровня H_2O_2 при стимуляции клеток

Пероксид водорода полностью удовлетворяет критерию вторичного посредника, требующему изменения его внутриклеточного уровня в ответ на внешнюю (рецепторную) стимуляцию клетки. Изменение внутриклеточной концентрации H_2O_2 в ответ на стимуляцию тирозинкиназных рецепторов показано как на линиях клеток, так и на первичных культурах [60, 62]. Однако существующие на тот момент методы детекции H_2O_2 не позволяли наблюдать динамические изменения его концентрации в цитоплазме отдельных клеток. Появление специфических чувствительных к H_2O_2 биосенсоров на основе флуоресцентных белков [63] дало возможность наблюдать динамику H_2O_2 в режиме реального времени в единичных клетках и даже в отдельных клеточных компартментах. Мы показали, что стимуляция клеток HeLa и эпителиальной карциномы A-431 EGF вызывает равномерное повышение уровня пероксида водорода в цитоплазме на протяжении 25–30 мин [9]. При этом в разных компартментах клеток динамика накопления H_2O_2 была различной. Так, вблизи эндоплазматического ретикула концентрация H_2O_2 изменялась двухфазно. Первая фаза достигала максимума обычно к пятой, а вторая – к 25–30 мин [43]. Нельзя исключать, что различная динамика H_2O_2 в разных отделах клетки может быть следствием активации различных изоформ NOX. В совокупности эти и многие другие результаты показывают, что H_2O_2 в полной мере удовлетворяет и третьему критерию вторичного посредника.

Специфические мишени и механизм действия H_2O_2 в клетке

Согласно четвертому классическому критерию, в клетке должны существовать специфические мишени вторичного посредника. К настоя-

щему времени идентифицированы несколько белков-мишеней, регулируемых H_2O_2 . H_2O_2 не только активирует некоторые ферменты и факторы транскрипции, но и ингибирует многие другие. Наиболее хорошо изученные мишени действия H_2O_2 – тирозиновые фосфатазы, гидролизующие фосфатные группы, связанные с остатками тирозина многих белков.

Механизм действия H_2O_2 заключается в том, что он окисляет остатки цистеина в активных центрах белков-мишеней (рис. 5). С H_2O_2 взаимодействуют только ионизированные сульфидные группы, окруженные положительными заряженными аминокислотами. Тирозиновые фосфатазы, а также некоторые другие белки, регулируемые H_2O_2 , имеют в активном центре консенсусную последовательность аминокислот Cys-X-X-X-X-Arg (где X – любая аминокислота). Вследствие особого микроокружения, сульфгидрильная группа каталитического цистеина имеет низкую константу диссоциации, и при физиологических значениях pH такой цистеин существует в виде тиолатного аниона, который может быть окислен H_2O_2 [14, 64]. Для взаимодействия с другими остатками цистеина внутриклеточных белков окислительной силы H_2O_2 оказывается недостаточно, поэтому подавляющее большинство белков клетки не является мишенью H_2O_2 .

Фосфорилирование по остаткам тирозина – ключевое событие в активации тирозинкиназных рецепторов (RTK). При стимуляции фактором роста эти рецепторы димеризуются и автофосфорилируются, в результате чего становятся активными. В отсутствие фактора роста рецептор не стимулирован, но сохраняет способность к спонтанному автофосфорилированию [65]. Инактивируется RTK путем дефосфорилирования, в основном, под действием фосфатазы PTP-1B. Этот фермент обладает высокой активностью, он предотвращает случайную активацию рецептора. При связывании фактора роста киназная активность рецептора усиливается, а PTP-1B ингибируется образующимся H_2O_2 (рис. 5). Уровень фосфорилирования рецептора резко возрастает, и запускается сигнальный каскад. Стимуляция RTK ведет к образованию на мембране PIP₃, активации Rac1 и выходу Ca²⁺ в цитозоль с последующей активацией протеинкиназы C. Как отмечено выше, эти сигнальные молекулы ведут к сборке и активации вблизи рецептора NADPH-оксидазы. Образующийся O₂^{-•} конвертируется в H_2O_2 , который попадает в цитоплазму и ингибирует фосфатазу. Таким образом, NADPH-оксидаза активируется теми же сигнальными молекулами, которые регулируют пролиферацию и миграцию клеток.

Пероксид водорода усиливает тирозиновое фосфорилирование не только путем ингибирования

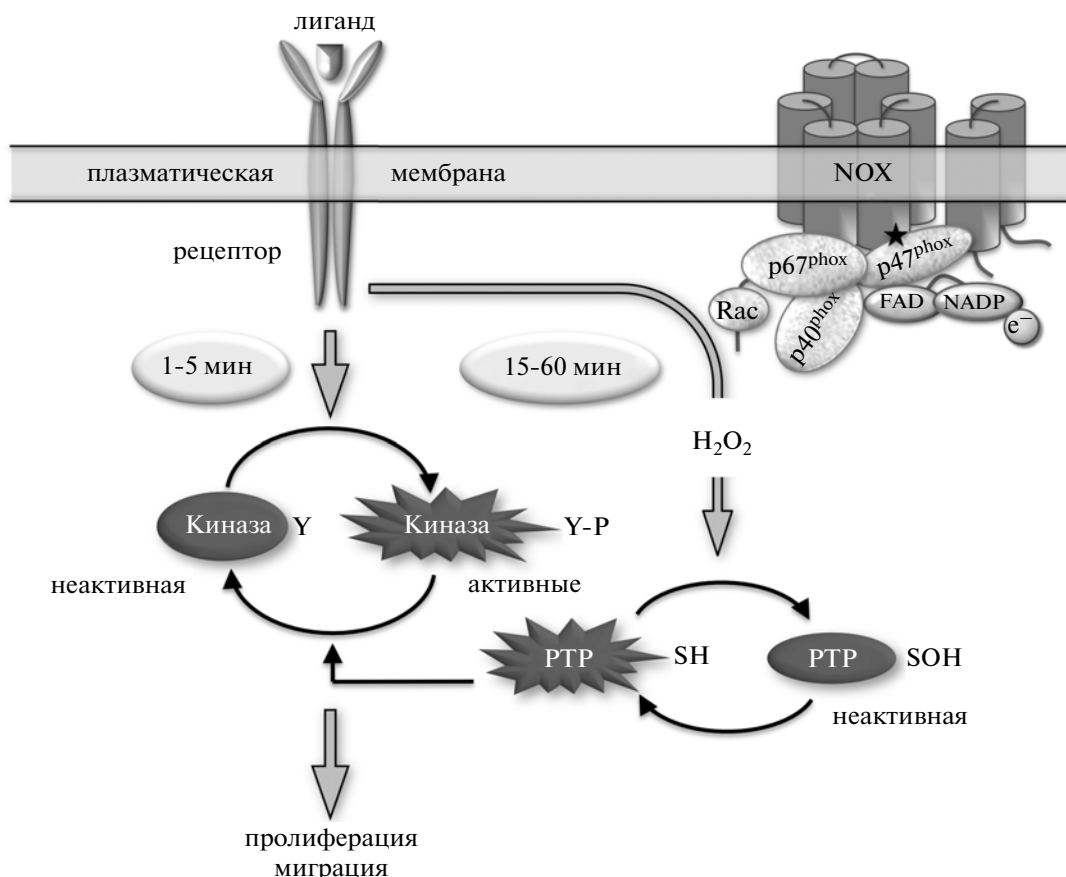


Рис. 5. Предполагаемый механизм действия H_2O_2 в клетке (по [14], с изменениями). Связывание лиганда с рецептором быстро, в течение первых минут, активирует рецепторную и другие (например, Src) тирозинкиназы, переводя их из неактивного в активное состояние. Конститутивно активные тирозинные фосфатазы (PTP) быстро дефосфорилируют и инактивируют рецептор и его мишени. Включение рецептором Rac-зависимой NADPH-оксидазы приводит к более медленному и локальному накоплению H_2O_2 , который окисляет и инактивирует PTP, тем самым поддерживая рецептор-зависимое тирозинное фосфорилирование и активность рецепторных мишеней.

ния фосфатаз, он также активирует некоторые тирозинные киназы. Прикрепление клеток к внеклеточному матриксу связано с образованием H_2O_2 , окислением и активацией растворимой тирозинной киназы Src. Более того, обработка клеток, содержащих онкогенную форму Src (*v*-Src), антиоксидантами, либо мутация по H_2O_2 -чувствительному цистеину приводит к снижению активности Src, инвазивности и способности к субстрат-независимому росту [66].

H_2O_2 регулирует не только активность рецепторов хемоаттрактантов, но и образование другого вторичного посредника, фосфатидилинозитолтрифосфата, PIP_3 . Этот фосфолипид образуется из PIP_2 под действием PI3-киназы, которая фосфорилирует гидроксильную группу по третьему положению инозитольного кольца. PI3-киназа активируется при связывании с активированными рецепторами и малой GTP-азой Ras. Обратную реакцию дефосфорилирования PIP_3 до $PI-4,5-P_2$ катализирует фосфатаза PTEN [67]. Показано, что

PTEN может обратимо инактивироваться под действием H_2O_2 путем окисления остатка Cys-124 [68]. PI3-киназный каскад активируется также при стимуляции преадипоцитов 3T3-L1 инсулином. Добавление дифенилениодонииума (DPI), ингибитора флавин-содержащих ферментов, к числу которых относится NOX, ведет к полной инактивации PI3-киназного каскада. При этом снижается уровень фосфорилирования сериновой киназы Akt/PKB – дальней мишени PI3-киназы и основного участника этого сигнального каскада. Внеклеточное добавление H_2O_2 на фоне DPI восстанавливает активность этих ферментов [60]. К существенному недостатку данной работы можно отнести то, что авторы добавляли H_2O_2 в концентрации 1 мМ и активация PI3-киназного сигнального каскада в присутствии DPI и H_2O_2 могла быть следствием окислительного стресса. Тем не менее, и в случае рецепторной фосфатазы, и в случае фосфатазы PTEN пероксид водорода выполняет роль основного компонента положи-

тельной обратной связи, когда один из продуктов каскада реакций повышает эффективность прохождения или продолжительность первичной реакции.

Действие антагонистов

Четвертый критерий вторичных посредников гласит, что антагонисты кандидата во вторичные посредники должны блокировать эффект внешнего стимула. Классических антагонистов H_2O_2 не существует из-за малого размера молекулы и принципа действия — не связывания с белком-мишенью, а его окисления. Функциональными антагонистами H_2O_2 могут быть восстановители окисленных тиоловых групп (сульфеновой кислоты и дисульфидных связей), а также каталаза, специфически нейтрализующая H_2O_2 . К первым относятся дитиотреитол, β -меркаптоэтанол, GSH и цистеин. Все эти вещества реактивируют тирозин-фосфатазы, окисленные H_2O_2 [69]. Однако помимо фосфатаз они восстанавливают дисульфидные связи в цитоплазматических и внеклеточных белках, что само по себе сильно влияет на клетки.

Значительно более распространенным подходом для обращения эффектов АФК, включая H_2O_2 , является использование антиоксидантов. Избыточная экспрессия антиоксидантных ферментов каталазы и пероксиредоксина, введение этих белков в клетки, а также добавление в культуральную среду таких антиоксидантов, как N-ацетилцистеин (NAC), широко используются для разрушения эндогенно образующегося H_2O_2 . Однако такие подходы имеют свои недостатки. В частности, NAC крайне неселективен и не позволяет специфично определить вклад H_2O_2 по отношению к другим АФК. Пероксиредоксин взаимодействует не только с H_2O_2 , но также с пероксинитритом и липидными пероксидами [70]. Каталаза наиболее избирательно и с высоким средотвом связывает и разрушает H_2O_2 . Однако и при ее использовании возникают проблемы. Каталазу можно либо ввести непосредственного в клетку, либо экспрессировать с использованием плазмидного вектора. Во втором случае внутриклеточный уровень белка, а значит, и антиоксидантные свойства, нарастают постепенно в течение суток. За это время клетка адаптируется к повышению антиоксидантного потенциала, и ее реакции становятся отличными от реакций контрольных клеток. Поскольку специфические быстродействующие ингибиторы отсутствуют, избирательно проследить за действием каталазы или H_2O_2 в одной клетке или клеточной культуре практически невозможно.

Эта проблема частично решается с помощью инъекции или электропорации белка в клетку, где он начинает действовать немедленно и изменяет

уровень пероксида в цитоплазме, что можно зарегистрировать с помощью специальных зондов. Однако при такой процедуре доставки клетка значительно повреждается и ее реакции, как правило, изменяются. Тем не менее, и антиоксиданты, и каталаза широко используются в экспериментах для снижения внутриклеточного уровня H_2O_2 и других АФК. При этом EGF-зависимая активация тирозинкиназных рецепторов и их сигнальных каскадов в значительной мере понижается [62].

В качестве традиционного и эффективного, но низкого инструмента широко используются кизомолекулярные ингибиторы ферментов, синтезирующих H_2O_2 . Надежных и специфичных ингибиторов NADPH-оксидаз на сегодняшний день не существует. Все используемые соединения имеют серьезные недостатки, основной из которых тот же — неспецифичность действия. Благодаря тому, что ингибиторы внутриклеточного образования H_2O_2 имеют различные мишени, общепринято использование нескольких ингибиторов, что позволяет делать достаточно приемлемые выводы. Наиболее активно в качестве ингибиторов NADPH-оксидаз применяют апоцинин и DPI.

Апоцинин (другое название ацетованилон) [71, 72] препятствует сборке изоформ NADPH-оксидаз Nox1 и Nox2. Апоцинин представляет собой *орто*-метокси-замещенный катехол (1-(4-гидрокси-3-метоксифенил)этанол) — вещество, близкое по структуре к ванилину, получаемое из лекарственного растения Коптиса японского (*Picrorhiza kurroa*). Сам по себе апоцинин не ингибирует сборку NADPH-оксидазного комплекса. Для превращения апоцинина в активную форму необходимо его окисление в присутствии пероксидаз. Это ведет к формированию симметричного димера — вещества, ингибирующего сборку NADPH-оксидаз. Восстановленный глутатион и L-цистеин ингибируют процесс димеризации апоцинина [71]. В бесклеточной модельной системе апоцинин практически полностью подавляет образование $O_2^{\cdot -}$ через 2 мин после добавления, что свидетельствует о достаточно короткой лаг-фазе его ингибиторного действия. Апоцинин — это низкоаффинный ингибитор [22]. Более того, недавно была показана возможная роль апоцинина в транзитном образовании АФК [73]. Тем не менее, апоцинин является наиболее активно используемым ингибитором NADPH-оксидаз. Это связано с тем, что другие существующие ингибиторы образования H_2O_2 либо еще менее специфичны, либо крайне неудобны в использовании. Апоцинин предотвращает EGF-индуцируемое образование H_2O_2 в эпителиальных клетках HeLa. При этом митогенный эффект EGF полностью исчезает. В то же время апоцинин не изменяет

уровень пролиферации клеток в отсутствие EGF [9]. Апоцинин ингибирует также пролиферацию нейтральных клеток-предшественников из гиппокампа [74].

DPI – это не специфический, но широко применяемый ингибитор всех NADPH-оксидаз. Помимо этих ферментов, DPI ингибирует многие другие флаavin-содержащие ферменты, в том числе и митохондриальный дыхательный комплекс I [75]. DPI забирает электрон из цепи переноса электронов и превращается в радикал, который ковалентно связывается с протетической группой, блокируя ее [22]. В связи с крайней неспецифичностью DPI, его эффекты необходимо проверять с использованием других ингибиторов NADPH-оксидаз. Более того, DPI невозможно применять в длительных экспериментах, так как клетки быстро гибнут из-за ингибирования дыхательной цепи митохондрий. Поэтому он используется, в основном, для наблюдения кратковременных эффектов H_2O_2 , например, для изучения регуляции сигнальных каскадов, а также для проверки работоспособности биосенсоров.

Образование и локализация H_2O_2 в клетке

Во внутриклеточной передаче сигнала от многих рецепторов участвует ограниченный набор вторичных посредников. При этом число рецептор-зависимых сигнальных каскадов значительно больше, и они ведут к специфичным клеточным ответам. Важным и интересным вопросом современной биологии является вопрос о том, каким образом несколько вторичных посредников передают специфические сигналы от огромного числа рецепторов. В последние годы стало ясно, что многие вторичные посредники действуют локально в различных компартментах [76, 77]. Направление прохождения сигнального каскада и конечный ответ клетки часто зависит от компартмента, в котором активировался данный вторичный посредник.

Как и многие другие вторичные посредники, H_2O_2 действует в клетке локально. Для взаимодействия с фосфатазами H_2O_2 должен достичь высокой концентрации, соответствующей уровню H_2O_2 при окислительном стрессе. Однако в норме на уровне целой клетки этого не происходит благодаря сильным антиоксидантным системам. Так, Prx2 взаимодействует с H_2O_2 с константой скорости $2 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, в то время как константа скорости реакции взаимодействия ключевой рецепторной тирозиновой фосфатазы РТР-1В с H_2O_2 составляет $20 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, а концентрация Prx2 в клетке превышает концентрацию РТР-1В на два порядка [78]. Таким образом, согласно кинетическим расчетам, H_2O_2 в клетке не должен взаимодействовать с РТР-1В. Кроме того, H_2O_2 синтезируется с наружной стороны плазматической мем-

браны, и значительная его часть должна рассеиваться и инактивироваться в межклеточном пространстве. Тем не менее, РТР-1В окисляется при физиологической стимуляции рецепторных тирозинкиназ [79].

Наиболее вероятным объяснением этого противоречия может быть локальное накопление H_2O_2 до необходимой концентрации вблизи субстрата (рис. 6). Хорошо известно, что для активации многих тирозинкиназных рецепторов необходима их интернализация после связывания с лигандом [80]. Также известно, что помимо рецепторов эндосомы содержат и NADPH-оксидазы [81, 82]. Исходя из этих данных, была высказана гипотеза о локализованном синтезе и накоплении H_2O_2 вблизи эндосом, содержащих и рецептор, и NOX [78]. Супероксид-анион-радикал, синтезирующийся в просвет эндосомы, конвертируется в H_2O_2 не рассеиваясь. Свободно диффундируя через мембрану, весь H_2O_2 выходит в цитоплазму и окисляет Prx2 в прилегающей области клетки. Восстановление Prx2 тиоредоксинном происходит сравнительно медленно, в то время как другая изоформа пероксиредоксина, Prx1, фосфорилируется тирозинкиназой Src и инактивируется [42]. Заметим, что Src активируется фосфорилированием рецепторной тирозиновой киназой и тем же самым образующимся H_2O_2 [66]. Избыток H_2O_2 , не разрушенный Prx1/2, взаимодействует с белками-мишенями, в том числе с РТР-1В (рис. 6). Местоположение эндосомы в цитоплазме определяет локализацию образуемого H_2O_2 . Мы проверили гипотезу о локальной продукции H_2O_2 и показали локализацию H_2O_2 и РТР-1В [43]. Оказалось, что при EGF-зависимой стимуляции эпителиальных клеток H_2O_2 синтезируется NADPH-оксидазой, которая расположена в эндосомах, содержащих интернализированный рецептор EGF. Около плазматической мембраны уровень H_2O_2 практически не изменяется, свидетельствуя о том, что H_2O_2 в клетке выделяется локально и не распространяется по всей цитоплазме. В то же время в фибробластах, стимулированных PDGF, H_2O_2 появлялся в основном вблизи плазматической мембраны. В обоих случаях концентрация H_2O_2 повышается также на мембране эндоплазматического ретикулума. В этом компартменте наблюдается двухфазная кинетика роста концентрации H_2O_2 , что может свидетельствовать о первоначальной активации Nox4, расположенного на эндоплазматическом ретикулуме, с последующим поступлением H_2O_2 , синтезированного на эндосомах.

Таким образом, H_2O_2 образуется и действует локально в определенных компартментах клетки при стимуляции рецепторных тирозиновых киназ факторами роста. Диффузия H_2O_2 между компартментами клетки ограничена, что соответ-

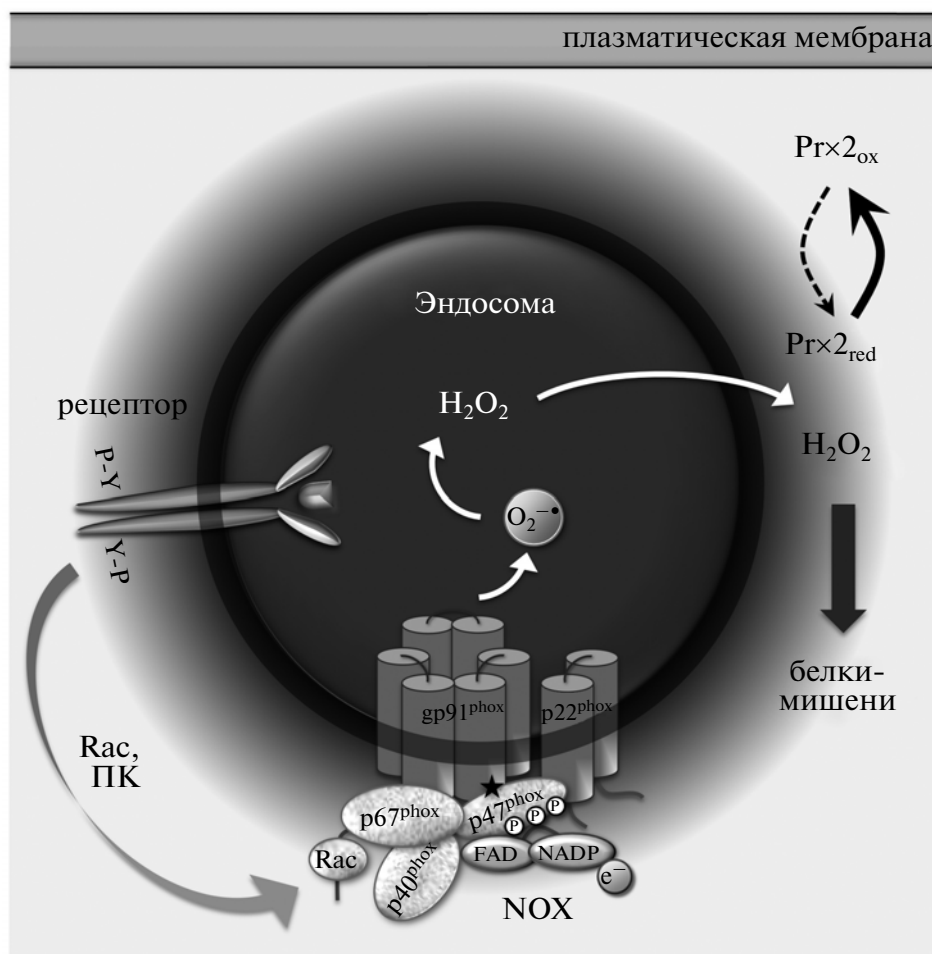


Рис. 6. Предполагаемый механизм локализации сигнала H₂O₂ внутри клеток ([11], с изменениями). Связывание лиганда с поверхностными рецепторами вызывает эндоцитоз и быструю интернализацию активных рецепторов. Благодаря преимущественно кавеолярной локализации, рецепторы и NADPH-оксидазы вместе поступают в эндосомальный компартмент, где рецепторы остаются активными продолжительное время [80]. Они рекрутируют Rac и p47^{phox} в этот компартмент, которые поддерживают активность NADPH-оксидазного комплекса, пока активны рецепторы. NADPH-оксидаза синтезирует супероксид-анион внутри эндосомы, где O₂^{•-} конвертируется в H₂O₂. В отличие от O₂^{•-}, H₂O₂ свободно проникает через мембрану в цитоплазму, где основными антиоксидантами, разлагающими H₂O₂, являются пероксиредоксины 1 и 2 (Prx1/2). В то время как Prx1 инактивируется за счет рецептор-зависимого фосфорилирования по тирозину [42], расположенный вблизи эндосомы Prx2 окисляется под действием поступающей H₂O₂. Поскольку его восстановление происходит достаточно медленно, время жизни H₂O₂ увеличивается и возникает “пристеночный эффект”, позволяющий H₂O₂ в высшей степени локально действовать на расположенные поблизости белки-мишени.

ствует механизму действия известных вторичных посредников.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Многочисленные данные, накопившиеся к настоящему времени, свидетельствуют о важной роли, которую H₂O₂ играет как вторичный посредник в метаболизме клеток. Однако остается еще много вопросов, на которые предстоит ответить. Например, нужно понять, почему и в какой

момент функционирования клетки происходит переход от нормального синтеза сигнального H₂O₂ к окислительному стрессу, какую роль играет H₂O₂ во внутриклеточной передаче сигнала, и какова сигнальная функция разных изоформ NOX в разных компартментах клетки. Интерес вызывают возможность перекрестной сигнализации H₂O₂ и других вторичных посредников, и участие H₂O₂ в регуляции их функций, а также механизмы активации изоформ NOX, отличных от NOX2. Эти новые механизмы регуляции синте-

за H₂O₂ могут быть мишенями для новых лекарственных средств против метастазирования раковых клеток, стеноза и рестеноза сосудов и многих других заболеваний, связанных с повышением уровня АФК.

Работа получила поддержку РФФИ (11-04-01519-а, 10-04-01561-а, 11-04-12187-офи-м-2011, а также Министерства образования и науки РФ (ГК № 16.512.12.2262).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Nelson D.L., Cox M.M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. W.H. Freeman, 2004.
- Scott J.D., Pawson T. 2009. Cell signaling in space and time: where proteins come together and when they're apart. *Science*. **326**, 1220–1224.
- Rall T.W., Sutherland E.W. 1958. Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles. *J. Biol. Chem.* **232**, 1065–1076.
- Sutherland E.W. 1972. Studies on the mechanism of hormone action. *Science*. **177**, 401–408.
- Carmi-Levy I., Yannay-Cohen N., Kay G., Razin E., Nechushtan H. 2008. Diadenosine tetraphosphate hydrolase is part of the transcriptional regulation network in immunologically activated mast cells. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 5777–5784.
- Stone J.R., Collins T. 2002. The role of hydrogen peroxide in endothelial proliferative responses. *Endothelium*. **9**, 231–238.
- Скулачев В.П. 2007. Попытка биохимиков атаковать проблему старения: “Мегапроект” по проникающему ионам. Первые итоги и перспективы. *Биохимия*. **72**, 1572–1586.
- Geiszt M., Leto T.L. 2004. The Nox family of NAD(P)H oxidases: host defense and beyond. *J. Biol. Chem.* **279**, 51715–51718.
- Тюрин-Кузьмин П.А., Агаронян К.М., Морозов Я.И., Мишина Н.М., Белоусов В.В., Воротников А.В. 2010. НАД(Ф)Н оксидаза регулирует EGF-зависимую пролиферацию клеток по механизму, отличному от активации ERK1/2 MAP-киназ. *Биофизика*. **55**, 1048–1056.
- Li J., Stouffs M., Serrander L., Banfi B., Bettiol E., Charnay Y., Steger K., Krause K.H., Jaconi M.E. 2006. The NADPH oxidase NOX4 drives cardiac differentiation: Role in regulating cardiac transcription factors and MAP kinase activation. *Mol. Biol. Cell.* **17**, 3978–3988.
- Ushio-Fukai M. 2006. Localizing NADPH oxidase-derived ROS. *Sci. STKE*. **2006**, re8.
- Cai H. 2005. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovasc. Res.* **68**, 26–36.
- Zelko I.N., Mariani T.J., Folz R.J. 2002. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic. Biol. Med.* **33**, 337–349.
- Rhee S.G., Bae Y.S., Lee S.R., Kwon J. 2000. Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. *Sci. STKE*. **2000**, pe1.
- Miller E.W., Dickinson B.C., Chang C.J. 2010. Aquaporin-3 mediates hydrogen peroxide uptake to regulate downstream intracellular signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **107**, 15681–15686.
- Starkov A.A. 2008. The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. *Ann. NY. Acad. Sci.* **1147**, 37–52.
- Sumimoto H. 2008. Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *FEBS J.* **275**, 3249–3277.
- Reth M. 2002. Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation. *Nat. Immunol.* **3**, 1129–1134.
- Sbarra A.J., Karnovsky M.L. 1959. The biochemical basis of phagocytosis. I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.* **234**, 1355–1362.
- Faurschou M., Borregaard N. 2003. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect.* **5**, 1317–1327.
- Aratani Y., Koyama H., Nyui S., Suzuki K., Kura F., Maeda N. 1999. Severe impairment in early host defense against *Candida albicans* in mice deficient in myeloperoxidase. *Infect. Immun.* **67**, 1828–1836.
- Bedard K., Krause K.H. 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* **87**, 245–313.
- Brown D.I., Griendling K.K. 2009. Nox proteins in signal transduction. *Free Radic. Biol. Med.* **47**, 1239–1253.
- Lambeth J.D. 2004. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 181–189.
- Ponting C.P. 1996. Novel domains in NADPH oxidase subunits, sorting nexins, and PtdIns 3-kinases: binding partners of SH3 domains? *Protein Sci.* **5**, 2353–2357.
- Garrido A.M., Griendling K.K. 2009. NADPH oxidases and angiotensin II receptor signaling. *Mol. Cell. Endocrinol.* **302**, 148–158.
- Gavazzi G., Banfi B., Deffert C., Fiette L., Schappi M., Herrmann F., Krause K.H. 2006. Decreased blood pressure in NOX1-deficient mice. *FEBS Lett.* **580**, 497–504.
- Ibi M., Matsuno K., Shiba D., Katsuyama M., Iwata K., Kakehi T., Nakagawa T., Sango K., Shirai Y., Yokoyama T., Kaneko S., Saito N., Yabe-Nishimura C. 2008. Reactive oxygen species derived from NOX1/NADPH oxidase enhance inflammatory pain. *J. Neurosci.* **28**, 9486–9494.
- Paffenholz R., Bergstrom R.A., Pasutto F., Wabnitz P., Munroe R.J., Jagla W., Heinzmann U., Marquardt A., Bareiss A., Laufs J., Russ A., Stumm G., Schimenti J.C., Bergstrom D.E. 2004. Vestibular defects in head-tilt mice result from mutations in Nox3, encoding an NADPH oxidase. *Genes Dev.* **18**, 486–491.
- Geiszt M., Kopp J.B., Varnai P., Leto T.L. 2000. Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **97**, 8010–8014.
- Krause K.H. 2004. Tissue distribution and putative physiological function of NOX family NADPH oxidases. *Jpn J. Infect. Dis.* **57**, S28–29.

32. Ambasta R.K., Kumar P., Griendling K.K., Schmidt H.H., Busse R., Brandes R. P. 2004. Direct interaction of the novel Nox proteins with p22phox is required for the formation of a functionally active NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.* **279**, 45935–45941.
33. Kuroda J., Nakagawa K., Yamasaki T., Nakamura K., Takeya R., Kuribayashi F., Imajoh-Ohmi S., Igarashi K., Shibata Y., Sueishi K., Sumimoto H. 2005. The superoxide-producing NAD(P)H oxidase Nox4 in the nucleus of human vascular endothelial cells. *Genes Cells.* **10**, 1139–1151.
34. Ellmark S.H., Dusting G.J., Fui M.N., Guzzo-Pernell N., Drummond G.R. 2005. The contribution of Nox4 to NADPH oxidase activity in mouse vascular smooth muscle. *Cardiovasc. Res.* **65**, 495–504.
35. Mahadev K., Motoshima H., Wu X., Ruddy J.M., Arnold R.S., Cheng G., Lambeth J.D., Goldstein B.J. 2004. The NAD(P)H oxidase homolog Nox4 modulates insulin-stimulated generation of H₂O₂ and plays an integral role in insulin signal transduction. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 1844–1854.
36. Pendyala S., Natarajan V. 2010. Redox regulation of Nox proteins. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **174**, 265–271.
37. Banfi B., Tirone F., Durussel I., Knisz J., Moskwa P., Molnar G.Z., Krause K.H., Cox J.A. 2004. Mechanism of Ca²⁺ activation of the NADPH oxidase 5 (NOX5). *J. Biol. Chem.* **279**, 18583–18591.
38. Hampton M.B., Kettle A.J., Winterbourn C.C. 1998. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood.* **92**, 3007–3017.
39. Edens W.A., Sharling L., Cheng G., Shapira R., Kinkade J.M., Lee T., Edens H.A., Tang X., Sullards C., Flaherty D.B., Benian G.M., Lambeth J.D. 2001. Tyrosine cross-linking of extracellular matrix is catalyzed by Duox, a multidomain oxidase/peroxidase with homology to the phagocyte oxidase subunit gp91phox. *J. Cell. Biol.* **154**, 879–891.
40. Geiszt M., Witta J., Baffi J., Lekstrom K., Leto T.L. 2003. Dual oxidases represent novel hydrogen peroxide sources supporting mucosal surface host defense. *FASEB J.* **17**, 1502–1504.
41. Chae H.Z., Kim H.J., Kang S.W., Rhee S.G. 1999. Characterization of three isoforms of mammalian peroxidoredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **45**, 101–112.
42. Woo H.A., Yim S.H., Shin D.H., Kang D., Yu D.Y., Rhee S.G. 2010. Inactivation of peroxidoredoxin I by phosphorylation allows localized H₂O₂ accumulation for cell signaling. *Cell.* **140**, 517–528.
43. Mishina N.M., Tyurin-Kuzmin P.A., Markvicheva K.N., Vorotnikov A.V., Tkachuk V.A., Laketa V., Schultz C., Lukyanov S., Belousov V. V. 2011. Does cellular hydrogen peroxide diffuse or act locally? *Antioxid. Redox Signal.* **14**, 1–7.
44. Arner E.S., Holmgren A. 2000. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur. J. Biochem.* **267**, 6102–6109.
45. Holmgren A., Johansson C., Berndt C., Lonn M.E., Hudemann C., Lillig C.H. 2005. Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 1375–1377.
46. Makino N., Sasaki K., Hashida K., Sakakura Y. 2004. A metabolic model describing the H₂O₂ elimination by mammalian cells including H₂O₂ permeation through cytoplasmic and peroxisomal membranes: comparison with experimental data. *Biochim. Biophys. Acta.* **1673**, 149–159.
47. Antunes F., Cadenas E. 2000. Estimation of H₂O₂ gradients across biomembranes. *FEBS Lett.* **475**, 121–126.
48. Roth S., Droge W. 1987. Regulation of T-cell activation and T-cell growth factor (TCGF) production by hydrogen peroxide. *Cell Immunol.* **108**, 417–424.
49. Murrell G.A., Francis M.J., Bromley L. 1990. Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals. *Biochem. J.* **265**, 659–665.
50. Burdon R.H., Alliangana D., Gill V. 1995. Hydrogen peroxide and the proliferation of BHK-21 cells. *Free Radic. Res.* **23**, 471–486.
51. Burdon R.H., Gill V. 1993. Cellularly generated active oxygen species and HeLa cell proliferation. *Free Radic. Res. Commun.* **19**, 203–213.
52. Caporossi D., Ciafre S.A., Pittaluga M., Savini I., Farace M.G. 2003. Cellular responses to H₂O₂ and bleomycin-induced oxidative stress in L6C5 rat myoblasts. *Free Radic. Biol. Med.* **35**, 1355–1364.
53. Yasuda M., Ohzeki Y., Shimizu S., Naito S., Ohtsuru A., Yamamoto T., Kuroiwa Y. 1999. Stimulation of in vitro angiogenesis by hydrogen peroxide and the relation with ETS-1 in endothelial cells. *Life Sci.* **64**, 249–258.
54. Cook-Mills J.M. 2006. Hydrogen peroxide activation of endothelial cell-associated MMPs during VCAM-1-dependent leukocyte migration. *Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand).* **52**, 8–16.
55. Niethammer P., Grabher C., Look A.T., Mitchison T.J. 2009. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature.* **459**, 996–999.
56. Loo A.E., Ho R., Halliwell B. 2011. Mechanism of hydrogen peroxide-induced keratinocyte migration in a scratch-wound model. *Free Radic. Biol. Med.* **51**, 884–892.
57. Schroder K., Helmcke I., Palfi K., Krause K.H., Busse R., Brandes R.P. 2007. Nox1 mediates basic fibroblast growth factor-induced migration of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 1736–1743.
58. ten Freyhaus H., Huntgeburth M., Winkler K., Schnitker J., Baumer A.T., Vantler M., Bekhite M.M., Wartenberg M., Sauer H., Rosenkranz S. 2006. Novel Nox inhibitor VAS2870 attenuates PDGF-dependent smooth muscle cell chemotaxis, but not proliferation. *Cardiovasc. Res.* **71**, 331–341.
59. Sundqvist T., Liu S.M. 1993. Hydrogen peroxide stimulates endocytosis in cultured bovine aortic endothelial cells. *Acta Physiol. Scand.* **149**, 127–131.
60. Mahadev K., Zilbering A., Zhu L., Goldstein B.J. 2001. Insulin-stimulated hydrogen peroxide reversibly inhibits protein-tyrosine phosphatase 1b in vivo and enhances the early insulin action cascade. *J. Biol. Chem.* **276**, 21938–21942.
61. Davies K.J. 1999. The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress. *IUBMB Life.* **48**, 41–47.

62. Bae Y.S., Kang S.W., Seo M.S., Baines I.C., Tekle E., Chock P.B., Rhee S.G. 1997. Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **272**, 217–221.
63. Belousov V.V., Fradkov A.F., Lukyanov K.A., Staroverov D.B., Shakhbazov K.S., Terskikh A.V., Lukyanov S. 2006. Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide. *Nat. Methods*. **3**, 281–286.
64. Rhee S.G. 2006. Cell signaling. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. *Science*. **312**, 1882–1883.
65. Keese M., Magdeburg R.J., Herzog T., Hasenberg T., Offterdinger M., Pepperkok R., Sturm J.W., Bastiaens P.I. 2005. Imaging epidermal growth factor receptor phosphorylation in human colorectal cancer cells and human tissues. *J. Biol. Chem.* **280**, 27826–27831.
66. Giannoni E., Buricchi F., Raugei G., Ramponi G., Chiarugi P. 2005. Intracellular reactive oxygen species activate Src tyrosine kinase during cell adhesion and anchorage-dependent cell growth. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 6391–6403.
67. Chalhoub N., Baker S.J. 2009. PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annu. Rev. Pathol.* **4**, 127–150.
68. Kwon J.L.S.-R., Yang K.-S., Ahn Y., Kim Y.J., Stadtman E.R., Rhee S.G. 2004. Reversible oxidation and inactivation of the tumor suppressor PTEN in cells stimulated with peptide growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **101**, 16419–16424.
69. Denu J.M., Tanner K.G. 1998. Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation. *Biochemistry*. **37**, 5633–5642.
70. Wood Z.A., Schroder E., Robin Harris J., Poole L.B. 2003. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 32–40.
71. Simons J.M., Hart B.A., Ip Vai Ching T.R., Van Dijk H., Labadie R.P. 1990. Metabolic activation of natural phenols into selective oxidative burst agonists by activated human neutrophils. *Free Radic. Biol. Med.* **8**, 251–258.
72. Johnson D.K., Schillinger K.J., Kwiat D.M., Hughes C.V., McNamara E.J., Ishmael F., O'Donnell R.W., Chang M.M., Hogg M.G., Dordick J.S., Santhanam L., Ziegler L.M., Holland J.A. 2002. Inhibition of NADPH oxidase activation in endothelial cells by ortho-methoxy-substituted catechols. *Endothelium*. **9**, 191–203.
73. Castor L.R., Locatelli K.A., Ximenes V.F. 2010. Prooxidant activity of apocynin radical. *Free Radic. Biol. Med.* **48**, 1636–1643.
74. Yoneyama M., Kawada K., Gotoh Y., Shiba T., Ogita K. 2010. Endogenous reactive oxygen species are essential for proliferation of neural stem/progenitor cells. *Neurochem. Int.* **56**, 740–746.
75. Li Y., Trush M.A. 1998. Diphenyleneiodonium, an NAD(P)H oxidase inhibitor, also potently inhibits mitochondrial reactive oxygen species production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **253**, 295–299.
76. Scott J.D. 2006. Compartmentalized cAMP signalling: a personal perspective. *Biochem. Soc. Trans.* **34**, 465–467.
77. Prior I.A. 2009. Compartmentalized signalling: cAMP, calcium and Ras. *FEBS J.* **276**, 1789.
78. Winterbourn C.C. 2008. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat. Chem. Biol.* **4**, 278–286.
79. Tonks N.K. 2005. Redox redux: revisiting PTPs and the control of cell signaling. *Cell*. **121**, 667–670.
80. Sigismund S., Argenzio E., Tosoni D., Cavallaro E., Polo S., Di Fiore P.P. 2008. Clathrin-mediated internalization is essential for sustained EGFR signaling but dispensable for degradation. *Dev. Cell*. **15**, 209–219.
81. Puri C., Tosoni D., Comai R., Rabellino A., Segat D., Caneva F., Luzzi P., Di Fiore P.P., Tacchetti C. 2005. Relationships between EGFR signaling-competent and endocytosis-competent membrane microdomains. *Mol. Biol. Cell*. **16**, 2704–2718.
82. Miller F.J., Jr., Filali M., Huss G.J., Stanic B., Chamseddine A., Barna T.J., Lamb F.S. 2007. Cytokine activation of nuclear factor kappa B in vascular smooth muscle cells requires signaling endosomes containing Nox1 and CIC-3. *Circ. Res.* **101**, 663–671.

Hydrogen Peroxide as a New Second Messenger

V. A. Tkachuk, P. A. Tyurin-Kuzmin, V. V. Belousov, A. V. Vorotnikov

¹Lomonosov Moscow State University, Faculty of Basic Medicine, Moscow, Russia

²Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Over the recent years hydrogen peroxide has emerged as a new candidate second messenger. Here we review current evidence for this simple chemical to meet classic criteria imposed for second messengers as well as additional ones that have been established since. Hydrogen peroxide accumulates and metabolizes inside cells changing the level upon activation of cell surface receptors; it targets signaling molecules inside cells via a relevant molecular mechanism and mediates the major responses such as cell migration and proliferation. As yet unresolved questions remain, such as to where hydrogen peroxide is produced and localizes in cells, and which signaling pathways it controls to exert physiological effects.