

Е.Б. Меньщикова, Н.К. Зенков

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ ПРИ АНАЛИЗЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА, ИЛИ КАК ИЗМЕРИТЬ НЕИЗМЕРИМОЕ

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины»,
Новосибирск, Россия

Рассмотрены основные понятия, имеющие отношение к концепции окислительного стресса. Проанализированы существующие подходы и методы, используемые при его анализе, и отмечено, что окислительный стресс как таковой «измерить» нельзя. Возможно оценить: 1) выраженность и/или стационарную концентрацию тех или иных видов активированных кислородных метаболитов; 2) окислительное повреждение биомолекул; 3) содержание/активность антиоксидантов, – и для характеристики интенсивности окислительного стресса применять ту или иную комбинацию параметров.

Ключевые слова: антиоксиданты, активированные кислородные метаболиты, окислительный стресс, методы анализа

MODERN APPROACHES TO OXIDATIVE STRESS ESTIMATION, OR HOW TO MEASURE THE IMMEASURABLE

E.B. Menshchikova, N.K. Zenkov

Research Institute of Experimental and Clinical Medicine, Novosibirsk, Russia

The concept of oxidative stress remains attractive to researchers combining the chemical nature of activated oxygen metabolites (AOM) and antioxidants, physical and biochemical mechanisms of action, including conditional simplicity of their versatility as redox regulators, with the original meaning of the word “stress” as Selye’s general adaptation syndrome. Attempts to classify the oxidative stress on the basis of its intensity and dynamics were made. The main components and driving forces of oxidative stress are pro-oxidants and antioxidants in determining that there is also a mass of inconsistencies. The main components and driving forces of oxidative stress are pro-oxidants and antioxidants in determining that there is also a mass of inconsistencies. The article discusses the basic concepts of direct relevance to the concept of oxidative stress. Existing approaches in its analysis are analyzed and it is noted that oxidative stress per se cannot be “measured”. Instead, using a variety of methods, one can assess: 1) the severity and/or the stationary concentration of various types of reactive oxygen species; 2) oxidative damage of biomolecules; 3) antioxidant content/activity, – and to apply a particular combination of parameters in order to characterize the oxidative stress intensity. The main methods, recently used for the registration of oxidative stress components, are outlined.

Key words: antioxidants, reactive oxygen species, oxidative stress, analysis

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС: ПОНЯТИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Для того чтобы анализировать существующие возможности регистрации окислительного стресса, прежде всего необходимо определиться, что же он собой представляет. Среди множества определений наиболее обстоятельным и имеющим свою историю нам представляется сформулированное Гельмутом Сисом (Helmut Sies), который в 1985 г. впервые обозначил окислительный стресс как концепцию редокс-биологии [36]. Во вступительном слове к книге (сборнику статей) «Oxidative stress», Сис дал следующее определение: «окислительный стресс есть нарушение баланса прооксидантов и антиоксидантов в сторону преобладания первых». В последующем автор пересматривал данную дефиницию в книге 1991 г. «Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants», обозначив окислительный стресс как «нарушение баланса между прооксидантами и антиоксидантами в сторону преобладания прооксидантов, которое может приводить к повреждению» [35], а в 2007 г., учитывая лавину новых сведений о редокс-регуляции, добавив в конец формулировки «... которое приводит к нарушению редокс-сигналинга и редокс-контроля и/или повреждению молекул» [37].

В настоящее время понятие «окислительный стресс» по-прежнему активно используется: так, в базе данных PubMed в 2015 г. зарегистрировано 14494 сообщений, в которых употребляется данный термин. В то же время существуют вполне резонные ограничения и критика его использования, в частности, в области медицины, и тем более – в медиасфере, за пределами научной деятельности. Это привело к размыванию смысла, чрезмерному и даже неправильному применению понятия «окислительный стресс». «Со временем механизмы, положенные в основу концепции, были в значительной степени забыты, и вместо того, чтобы становиться все более точной с точки зрения молекулярных мишеней и механизмов, гипотеза окислительного стресса приобрела диффузный и неспецифический характер» [24]. Парадоксально, но даже Гельмут Сис сегодня признает, что «гипотеза окислительного стресса не сформулирована до сих пор» [34].

Тем не менее, концепция окислительного стресса по-прежнему остается привлекательной для исследователей, поскольку в ней заложен определённый биологический смысл, позволяющий объединить химическую природу активированных кислородных метаболитов (АКМ) и антиоксидантов, физические и

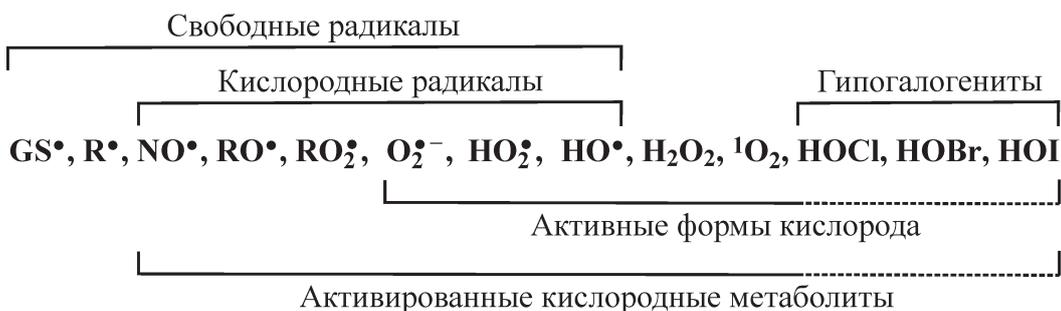


Рис. 1. Активированные кислородные метаболиты, активные формы кислорода и радикалы.

Динамика формирования микобактериальных *in vitro* гранулём

Таблица 1

Группа	Количество гранулём			Площадь гранулём, отн. ед. ¹			Занимаемая гранулёмами площадь, %		
	1-е сутки	4-е сутки	7-е сутки	1-е сутки	4-е сутки	7-е сутки	1-е сутки	4-е сутки	7-е сутки
БЦЖ	22,7 ± 2,8	35,6 ± 2,3	53,8 ± 4,6*	1,00 ± 0,04	1,21 ± 0,05*	1,12 ± 0,06	1,68 ± 0,24	3,22 ± 0,28	4,50 ± 0,52*
БЦЖ + ТС-13, 5 мкМ	36,5 ± 6#	62,2 ± 4,8*#	50,3 ± 4,9	1,04 ± 0,04	1,29 ± 0,05*	1,17 ± 0,07	2,83 ± 0,52#	5,94 ± 0,62*#	4,35 ± 0,51
БЦЖ + ТС-13, 20 мкМ	35,3 ± 5,2	43,7 ± 2,6#	47,5 ± 3,8*	0,92 ± 0,04#	1,38 ± 0,05*	1,17 ± 0,08*	2,40 ± 0,40	4,47 ± 0,42*#	4,13 ± 0,39*
БЦЖ + ТС-13, 100 мкМ	37 ± 3,5#	48,3 ± 3,3#	72,7 ± 5,4*#	0,97 ± 0,04	1,31 ± 0,06*	1,28 ± 0,08*	2,65 ± 0,32	4,70 ± 0,48#	6,90 ± 0,82*#

Примечание. ¹ – величины нормализованы на контроль; * – отличие от величины показателя на 1-е сутки статистически значимо при $p < 0,05$; # – отличие от величины показателя в группе БЦЖ статистически значимо при $p < 0,05$.

биохимические механизмы их действия, в том числе обуславливающие элегантно простоту их универсальности как редокс-регуляторов, с изначальным значением слова «стресс» как общего адаптационного синдрома по Селье. Предпринимаются попытки классифицировать окислительный стресс на основе его интенсивности и динамики [25].

Как явствует из определения окислительного стресса, основными его компонентами и движущими силами являются прооксиданты и антиоксиданты, в определении которых также существует масса разночтений. Мы предлагаем под прооксидантами понимать АКМ¹ – класс кислородных соединений радикальной и нерадикальной природы (рис. 1) [5]. Обширный класс соединений с антиоксидантными свойствами наиболее удачно, на наш взгляд, объединяет определение, данное Барри Холливеллом (Barry Halliwell) и Джоном М.С. Гаттериджем (John M.C. Gutteridge): «Антиоксидант – это любое вещество, которое, присутствуя в низких, по сравнению с окисляемым субстратом, концентрациях, существенно задерживает или препятствует его окислению» [18].

ВОЗМОЖНЫЕ ПОДХОДЫ К РЕГИСТРАЦИИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

Исходя из вышесказанного, очевидно, что окислительный стресс как таковой «измерить» нельзя. Можно с помощью различных методов оценить: 1) выраженность и/или стационарную концентрацию тех или иных видов АКМ; 2) окислительное повреждение биомолекул; 3) содержание/активность антиоксидантов [6]; – и, конкретно и детально обговорив, комбинация каких именно параметров использована

в исследовании, говорить о выраженности окислительного стресса. Таких комбинаций используется неисчислимо количество, и выделить некую оптимальную, наверное, невозможно.

Некоторые коммерческие лаборатории предлагают «тестировать окислительный стресс», однако при детальном рассмотрении оказывается, что имеется в виду достаточно произвольная комбинация параметров. В качестве примеров можно привести Oxidative Stress Analysis 2.0 (Genova Diagnostics, США), Oxidative Stress Analysis (Brunswick Laboratories, США), Generalized Oxidative Stress (Thermo Fisher Scientific Inc., США) или весьма сомнительные тест-полоски Oxidative Stress Analysis (Family Naturopathic Clinic, США). Компании по производству и продаже химических веществ и реагентов в каталогах указывают наборы «для анализа окислительного стресса» (oxidative stress kits), но это более или менее расширенные тест-системы, укомплектованные в произвольном порядке: Muse™ Oxidative Stress Kit (дигидроэтидин), Neogen's Oxidative Stress panel (измерение содержания изопропанов и «общей антиоксидантной мощности»). Такие известные компании, как Sigma-Aldrich, Promega, Qiagen, Cayman Chemical, Trevigen, подходят к вопросу более аккуратно, предлагая в качестве Oxidative Stress Assay Kits наборы для определения конкретных молекул и продуктов, участвующих в процессах свободнорадикального окисления. Еще один вид информации о способах «оценки окислительного стресса» – патенты, но при анализе патентов, в названии которых фигурирует «oxidative stress», перед нами вновь предстает необыкновенное разнообразие (табл. 1). Таким образом, в основной части статьи мы попытаемся рассмотреть основные методы, используемые на сегодняшний день для

¹ данный термин не охватывает дигидросульфид H₂S, играющий важную роль в редокс-регуляции

регистрации компонентов окислительного стресса. В связи с их колоссальным количеством данное рассмотрение во многом будет лишь перечислением без подробного анализа преимуществ и ограничений каждого метода.

МЕТОДЫ РЕГИСТРАЦИИ АКМ

Для регистрации синтеза супероксидного анион-радикала O_2^- широко применяется реакция восстановления цитохрома с, при которой феррицитохром с восстанавливается до ферроцитохрома с с изменением поглощения при 550 нм [20]. С целью повышения специфичности метода используют ацетилирование или сукцинирование. Наиболее простым методом регистрации O_2^- является НСТ-тест, в основе которого лежит реакция восстановления красителя нитросинего тетразолия до диформаза, образование которого легко регистрируется спектрофотометрически по поглощению при 550–560 нм [15]. Разработаны хемилюминесцентные методы, в основе которых лежит измерение свечения, возникающего в реакциях супероксидного анион-радикала с люминофорами, в качестве которых могут быть использованы люминол и его аналоги (изолюминол, 8-амино-5-хлоро-7-фенилпиридол [3,4-d]пиридазин-1,4-(2Н,3Н)дион), люцигенин, люциферины и их аналоги, фолазин (гликопротеин-связанный люциферин моллюска *Pholas dactylus*), CLA и MCLA (аналоги люциферина рачка *Cypridina*), целентеразин (люциферин кишечно-полостных) и его аналоги [1, 5, 33]. Чувствительность ЭПР при определении продукции супероксидного анион-радикала позволяет повысить использование различных спиновых ловушек, таких как гидроксилмин 1-гидрокси-2,2,6,6-тетраметил-4-оксопиперидин, тайрон (4,5-диоксибензол-1,3-дисульфат натрия), DEPMPO (5-диэтоксифосфорил-5-метил-1-пирролин-N-оксид). Помимо давно используемых флуоресцентных меток на супероксидный анион-радикал, таких как гидроэтидин (дигидроэтидин), в настоящее время разработаны более специфичные и чувствительные: бис(2,4-динитробензолсульфонил)флуоресцеины, 2-(2-пиридил)-бензотиазолин, флуорен [38, 40].

Регистрация перекиси водорода может осуществляться спектрофотометрически по поглощению при 240 нм, амперометрически с помощью специально разработанных биосенсоров для H_2O_2 , полярографически по образованию O_2 при разложении каталазой, спектрофото- и спектрофлуорометрически по образованию окрашенных продуктов в реакциях окисления доноров протонов в присутствии пероксидазы хрена. На способности перекиси водорода окислять ионы Fe^{2+} в реакции Фентона основан спектрофотометрический метод FOX: образующиеся ионы Fe^{3+} взаимодействуют с ксиленолом оранжевым, который превращается в пурпурно-голубой комплекс с максимумом поглощения при 560 нм [32]. Для измерения H_2O_2 в отдельных клетках с помощью проточной цитофотометрии чрезвычайно популярностью до сих пор пользуется метод, основанный на регистрации флуоресценции 2',7'-дихлорофлуоресцеина DCF, предшественником которого служит DCFH-DA. Чтобы улучшить внутриклеточное удержание продукта

окисления, применяют CM-DCFH DA, хлорметильная группировка которого образует ковалентную связь с внутриклеточными тиолами [32]. Японскими учёными синтезирован ряд пентафторбензолсульфонилфлуоресцеинов, селективно окисляющихся H_2O_2 (предел обнаружения 4,6 пмоль) [26]; создан пероксифлуор-1, арилборонатные группы которого при взаимодействии с перекисью водорода трансформируются в фенольные, при этом специфичность реакции для H_2O_2 более чем в 500 раз выше, чем для O_2^- , NO^* или $OSCl^-$ [12]; предложены моноборонаты модифицированного токийского зелёного и резозурина [32]; подробный список специфичных флуоресцентных меток на H_2O_2 приведен в работе [39]. С помощью спектрофлуориметрических методов перекись водорода измеряется также в тройной системе « H_2O_2 – пероксидаза (обычно пероксидаза хрена) – донор протонов (флуорогенный субстрат)», в которой в присутствии перекиси водорода происходит окисление ферментом молекулы-детектора (пара-гидроксифениллукусусной, пара-гидроксифенилпропионовой, гомованилиновой кислоты, тирамина, N-ацетил-3,7-дигидроксифеноксазина, амплекса красного, 3,5,3',5'-тетраметилбензидина, скополетина). На таком же принципе основаны спектрофотометрические методы, где в тройной системе окисляются феноловый красный или тетраметилбензидин. Для определения перекиси водорода разработаны высокочувствительные хемилюминесцентные методы, наиболее широко применяется хемилюминесцентная система «люминол – H_2O_2 – катализатор», где в качестве катализатора могут выступать пероксидаза, гемоглобин или соли металлов переменной валентности. Высокая чувствительность хемилюминесцентных методов позволяет регистрировать перекись водорода в выдыхаемом воздухе и в отдельных фагоцитирующих клетках [1, 5].

К прямым методам регистрации оксида азота NO^* относятся ЭПР и хемилюминесценция, однако для увеличения чувствительности методов применяются, соответственно, спиновые ловушки (2-метил-2-нитропропан, 3,5-дибром-4-нитрозобензол, гемоглобин, нитронильные нитроксиды (carboxy-PTIO), дериваты имидазолиноксил-N-оксида и дитиокарбаматов, насыщенных Fe^{2+} (DETC, MGD, DTCS) и люминофоры) [1, 19]. Чрезвычайно широк спектр флуоресцентных меток на NO^* и пероксинитрит $ONOO^-$ [28, 39]. Если вначале применялись неспецифичные метки, такие как DCFH-DA, то в настоящее время с помощью различных ухищрений и химических модификаций разработаны высокоэффективные и специфичные для оксида азота красители, которые мало зависят от pH, флуоресцируют преимущественно внутриклеточно и хорошо удерживаются клетками. Это в основном орто-фенилендиамины: 2,3-диаминонафталин, 1,2-диаминоантрахинон, DAMBOO и наиболее популярные для измерения внутриклеточной генерации NO^* в силу высокой чувствительности, фотостабильности и относительно небольшой зависимости от pH, DAF-FM DA (4-амино-5-метиламино-2',7'-дифторофлуоресцеина диацетат), DAR-4M AM (3',6'-бис(диметиламино)-9-[2-ацетометоксикарбонил-3-амино-4-(N-метиламино)

фенил]ксантилий йодистый)), дихлородиаминокальцеин DCI-DA Cal. Иногда используются «флуоресцентные хелетропные ловушки оксида азота» (FNOCTs) орто-хинонной природы, однако их применение ограничено низкой биологической селективностью и чувствительностью, а также высокой токсичностью [30]. Применяются комплексы на основе металлов (главным образом Cu(II), но разработаны и содержащие Co(II), Fe(II), Ru(II), Rh(II)). Так, показано, что CuFL селективно взаимодействует с NO[•] и не флуоресцирует в присутствии NO₂⁻, NO₃⁻, HNO, ONOO⁻, O₂⁻, H₂O₂ и OCl⁻ [28]. Разработан интересный зонд с двойной специфичностью, FP-H₂O₂-NO, с помощью которого можно регистрировать H₂O₂ и NO[•] как по отдельности, так и при их ко-локализации: при контактировании с каждой из этих форм АКМ метка испускает разные флуоресцентные сигналы, а в присутствии обоих происходит Фёрстеровский резонансный перенос энергии (FRET) [39].

В физиологических условиях NO[•] быстро окисляется молекулярным кислородом с образованием оксидов NO₂⁻ и NO₃⁻, поэтому ферментативная активность NO-синтазы может быть измерена спектрофотометрически в реакции Грисса, для оценки содержания нитритов применяют также жидкостную хроматографию с электрохимическим детектированием, разработан ферментативный метод определения нитрата в сыворотке крови и моче с использованием нитратредуктазы из *Aspergillus sp.* В биологических исследованиях используются также так называемые биологические методы определения NO[•], основанные на способности оксида азота вызывать дозозависимое расслабление гладкомышечных стенок сосудов. Субстратами NO-синтазы являются L-аргинин и NADPH, конечным продуктом – L-цитруллин, поэтому возможно определение её активности по образованию цитруллина, а также по увеличению флуоресценции NADP⁺ [5].

Для определения образования *гипогалогенитов* применяется простой хемилюминесцентный метод, основанный на регистрации хемилюминесценции в системе «H₂O₂ – миелопероксидаза – люминофор» [7, 16]. Предложено много способов определения продукции HOCl/OCl⁻, принцип которых заключается в регистрации продуктов специфического окисления гипогалогенитами целевых молекул: таурина, NAD(P)H, аскорбиновой кислоты, метионина [21]. В качестве флуоресцентных красителей для регистрации OCl⁻ предложены цианиновый сенсор на основе гибридной фенотиразиновой платформы, BODIPY и оксим на его основе, бензоилацетогидразиды, фенотиразины, кадмий-селенидные квантовые точки [21, 40]. Образование *пероксильных* и *алкоксильных радикалов жирных кислот* RO₂[•] и RO[•] в биологических реакциях перекисного окисления липидов (ПОЛ) можно оценивать посредством измерения ЭПР-сигналов, в том числе с применением спиновых ловушек (С-фенил-N-трет-бутилнитрон, 5,5-диметилпирролин-1-оксид, трет-нитрозобутан и их производные) или собственной биохемилюминесценции [1]. Взаимодействие перекисных радикалов с липидами (преимущественно ненасыщенными)

приводит к возникновению гидроперекисей ROOH, диалкилперекисей ROOR', пероксилинов RCOOH, пероксиэфиров RCOOR' и перекисей других классов, образование которых можно регистрировать посредством УФ- или ИК-спектрофотометрии, методами хемилюминесценции или ЯМР-спектроскопии, а также газовой и жидкостной хроматографии и их комбинации с масс-спектрометрией. Более устойчивыми, продуктами развития радикальных процессов ПОЛ являются так называемые вторичные (конечные) соединения: спирты, альдегиды, кетоны, лактоны, предельные углеводороды и др. В клинических и биологических исследованиях широкое применение получил предложенный в 1944 г. Коном и Ливерсиджем колориметрический метод определения малонового диальдегида (МДА) в реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК). Несмотря на во многом заслуженную критику, метод определения продуктов, реагирующих с ТБК (TBARS), и в настоящее время используется для оценки выраженности окислительного стресса, хотя количество статей начало снижаться (согласно базе данных PubMed, с 864 в 2012 г. до 704 в 2015 г.). Одним из конечных продуктов ПОЛ являются насыщенные низкомолекулярные углеводороды (этан, пентан, гексан), которые в нормальных условиях легко переходят в газообразное состояние. Оценка их содержания в выдыхаемом воздухе с помощью газовой хроматографии иногда используется в качестве интегрального показателя процессов ПОЛ в организме [8].

В экспериментальных исследованиях в настоящее время активно развиваются *генетические подходы к регистрации АКМ*: клетки модифицируются с помощью векторов (плазмид, космид, вирусов) генами, кодирующими редокс-чувствительные флуоресцентные белки. Введение двух остатков цистеина (гхYFP) в структуру жёлтого варианта (YFP), известного зелёного флуоресцентного белка (GFP) позволило визуализировать изменение редокс-статуса клетки [27], метка сrYFP специфична для супероксиданиона и не модифицируется пероксидом водорода [39], в то же время в результате её внедрения в H₂O₂-чувствительный регуляторный домен *E. coli* OxyR получили специфичные зонды HyPer (зелёный) и HyPerRed (красный) для регистрации внутриклеточной продукции H₂O₂ [14] (разработка российских учёных). По аналогии с HyPer создана флуоресцентная метка OHSer путём комбинации высококонсервативного у бактерий транскрипционного регулятора OhrR, отвечающего за защиту от органических гидропероксидов, и сrVenus, ещё одного жёлтого варианта GFP [42]. Созданы рекомбинатные варианты *E. coli* с встроенными после промоторов генов белков SoxS и каталазы-пероксидазы luxCDABE-генами люминесцентной бактерии *Photobacterium luminescens*, и показана более высокая чувствительность конструкции katG::lux к воздействию АКМ, чем варианта soxS::lux [2].

МЕТОДЫ РЕГИСТРАЦИИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ БИОМОЛЕКУЛ

Содержание в биологических тканях и жидкостях модифицированных АКМ биомолекул (белков, углеводов, липидов) может служить достаточно

информативным показателем выраженности окислительного стресса *in vivo*, хотя тоже неоднозначным – в частности, в силу наличия систем репарации.

Окислительные посттрансляционные модификации белков являются предметом изучения специальной отрасли науки, получившей название «редокс-протеомика» [23]. Окисление белков и аминокислот позволяют регистрировать высокочувствительные масс-спектрометрические методы с использованием матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (MALDI) или ионизацией распылением в электрическом поле (ESI) [9], а применение изотопных аффинных меток (ICAT) даёт возможность идентифицировать все виды обратимого окисления остатков цистеина [10], что позволяет анализировать регуляторные процессы с участием сигнальных белков (так, для ингибиторного белка Keap1 мастер-регуляторной системы антиоксидант-респонсивного элемента показано наличие «цистеинового кода» [41]). Интересным направлением регистрации радикалов белков является использование иммунных спиновых ловушек (immuno-spin trapping, IST) [17]: путем определённых ухищрений известной спиновой метке DMPO (5,5-диметил-1-пирролин-N-оксид) придается иммуногенность, к ней синтезируются антитела, и продукт взаимодействия комплекса DMPO-антитело и радикала белка можно регистрировать любым методом, например, иммунохимическим. Существуют различные подходы для определения продуктов модификации белков гипогалогенидами (3-хлоротирозина), активными формами азота (3-нитротирозин); глутатионилированных белков; карбонильных групп, образующихся при окислении лизина, аргинина и пролина; конечных продуктов неферментативного гликирования белков при их взаимодействии с карбонильными интермедиатами (глиоксаль, метилглиоксаль, 3-деоксиглюкозон – продукты взаимодействия углеводов с АКМ) [4, 11, 21, 23]. Удобным маркером окислительного стресса может служить дитирозин, так как он имеет интенсивную флуоресценцию в области 420 нм при действии возбуждающего излучения с длиной волны 284 нм (кислые растворы или 315 нм (щелочные растворы)) [5].

Окисление липидов, приводящее к повреждению мембранных структур, модификации липопротеинов, помимо упомянутых выше методов, можно регистрировать путем определения содержания изо- и нейтропростанов, пропеналей (акролеин), 2-гидрокси-4-ноненаля, лизофосфатидилхолина, оксистероинов (кето- и гидроксипроизводных холестерина), липофусцина [11]; чрезвычайно подробно и обстоятельно методы описаны в обзоре Етсуо Ники [29]. В результате взаимодействия гипохлорита с плазмалогенами (основными фосфолипидами цитоплазматической мембраны фосфолипидов эндотелиоцитов и гладкомышечных клеток сосудов) в конечном итоге образуется 2-хлорапидовая кислота, ее оценка с помощью масс-спектрометрии [21] может служить маркером одного из подвидов окислительного стресса – галогенирующего [7]. К числу интегральных показателей окислительного повреждения в организме можно отнести выявление

в тканях и плазме крови окисленных липопротеинов, эффективно определяемых иммуноферментным анализом или УФ-спектрофотометрией по накоплению липогидропероксидов при 233 нм [3, 22].

Идентифицировано около 100 типов окислительных повреждений молекул нуклеиновых кислот. Для регистрации образующихся 8,5'-циклопури-2'-деоксинуклеозидов (в том числе наиболее популярных в качестве маркеров окисления ДНК и РНК 8-оксогуанозина и 8-оксо-2'-деоксигуанозина), различных видов повреждения оснований и сахаров, одно- и двухцепочечных разрывов, сшивок и хромосомных aberrаций используют биологические (иммуноферментный анализ, метод ДНК-комет, щелочная элюция) и химические методы (газовая хроматография / масс-спектрометрия и жидкостная хроматография / масс-спектрометрия с одним или двумя масс-анализаторами и использованием ионизации распылением в электрическом поле; жидкостная хроматография с электрохимическим или амперометрическим детектированием) [13, 31].

МЕТОДЫ РЕГИСТРАЦИИ СОДЕРЖАНИЯ И АКТИВНОСТИ АНТИОКСИДАНТОВ

Общие принципы и достаточно подробное описание основных подходов, используемых при оценке содержания отдельных антиоксидантов, активности ферментативных антиоксидантов и методов определения так называемой «общей антиоксидантной активности» приведены в нашей книге [6], находящейся в открытом доступе на сайте группы фенольного метаболизма растений Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН (<http://biophenols.ru/library.htm>).

В рамках настоящего обзора хотим лишь отметить, что огромное количество химических соединений, супрамолекулярных комплексов и экстрактов растений могут проявить великолепную антиоксидантную активность при тестировании определённым способом в определённых условиях. Однако нельзя выбрать «наилучший метод», даже ориентируясь на его популярность в научной литературе, в которой нередко простота бывает заманчивее разумности.

ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция // Успехи биологической химии. – 2009. – Т. 49. – С. 341–388.
Vladimirov YA, Proskurnina EV (2009). Free radicals and cell chemiluminescence [Svobodnye radikaly i kletchnaya khemilyuminestsentsiya]. *Uspekhi biologicheskoy khimii*, (49), 341-388.
2. Каримов И.Ф., Дерябин Д.Г., Каримова Д.Н., Субботина Т.Ю., Манухов И.В. Использование *Escherichia coli*, несущих генетические конструкции *soxS::lux* или *katG::lux*, для оценки окислительного метаболизма лейкоцитов при фагоцитозе // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2016. – Т. 161, № 2. – С. 237–242.
Karimov IF, Deryabin DG, Karimova DN, Subbotina TY, Manukhov IV (2016). Using *Escherichia coli*, carrying ge-

netic constructs *soxS::lux* or *katG::lux*, to assess oxidative metabolism of phagocytosing leukocytes [Ispol'zovanie *Escherichia coli*, nesushchikh geneticheskie konstruktsii *soxS::lux* ili *katG::lux*, dlya otsenki okislitel'nogo metabolizma leykotsitov pri fagotsitoze]. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*, 161 (2), 237-242.

3. Ланкин В.З., Тихазе А.К., Капелько В.И., Шепелькова Г.С., Шумаев К.Б., Панасенко О.М., Коновалова Г.Г., Беленков Ю.Н. Механизмы окислительной модификации липопротеидов низкой плотности при окислительном и карбонильном стрессах // *Биохимия*. – 2007. – Т. 72, № 10. – С. 1330–1341.

Lankin VZ, Tikhaze AK, Kapelko VI, Shepelkova GS, Shumaev KB, Panasenko OM, Konovalova GG, Belenkov YN (2007). Mechanisms of oxidative modification of low density lipoproteins under conditions of oxidative and carbonyl stress [Mekhanizmy okislitel'noy modifikatsii lipoproteidov nizkoy plotnosti pri okislitel'nom i karbonil'nom stressakh]. *Biokhimiya*, 72 (10), 1330-1341.

4. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З., Бондарь И.А., Труфакин В.А. Окислительный стресс. Патологические состояния и заболевания. – Новосибирск: АРТА, 2008. – 284 с.

Menshchikova EB, Zenkov NK, Lankin VZ, Bondar IA, Trufakin VA (2008). Oxidative stress: Pathological states and diseases [Okislitel'nyy stress: Patologicheskie sostojaniya i zabolevaniya], 284.

5. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Круговых Н.Ф., Труфакин В.А. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. – М.: Слово, 2006. – 556 с.

Menshchikova EB, Lankin VZ, Zenkov NK, Bondar IA, Krugovykh NF, Trufakin VA (2008). Oxidative stress: Prooxidants and antioxidants [Okislitel'nyy stress. Prooksidanty i antioksidanty], 556.

6. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Кандалинцева Н.В. Фенольные антиоксиданты в биологии и медицине. – Saarbrücken: LAP LAMBERT Acad. Publishing, 2012. – 496 с.

Menshchikova EB, Lankin VZ, Kandalintseva NV (2012). Phenol antioxidants in biology and medicine [Fenol'nye antioksidanty v biologii i meditsine], 496.

7. Панасенко О.М., Сергиенко В.И. Галогенирующий стресс и его биомаркеры // *Вестник РАМН*. – 2010. – № 1. – С. 27–39.

Panasenko OM, Sergienko VI (2010). Halogenative stress and its biomarkers [Galogeniruyushchiy stress i ego biomarkery]. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*, (1), 27-39.

8. Antus B, Kardos Z (2015). Oxidative stress in COPD: molecular background and clinical monitoring. *Cur. Med. Chem.*, 22 (5), 627-650.

9. Artemenko K, Mi J, Bergquist J (2015). Mass-spectrometry-based characterization of oxidations in proteins. *Free Radic. Res.*, 49 (5), 477-493.

10. Boronat S, Garcia-Santamarina S, Hidalgo E (2015). Gel-free proteomic methodologies to study reversible cysteine oxidation and irreversible protein carbonyl formation. *Free Radic. Res.*, 49 (5), 494-510.

11. Calabrese V, Dattilo S, Petralia A, Parentia R, Pennisia M, Koverecha G, Calabrese V, Graziano A, Montea I, Maiolino L, Ferrer T, Calabrese EJ (2015). Analytical

approaches to the diagnosis and treatment of aging and aging-related disease: redox status and proteomics. *Free Radic. Res.*, 49 (5), 511-524.

12. Chang MC, Pralle A, Isacoff EY, Chang CJ (2004). A selective, cell-permeable optical probe for hydrogen peroxide in living cells. *J. Am. Chem. Soc.*, 126 (47), 15392-15393.

13. Dizdaroglu M, Coskun E, Jaruga P (2015). Measurement of oxidatively induced DNA damage and its repair, by mass spectrometric techniques. *Free Radic. Res.*, 49 (5), 525-548.

14. Ermakova YG, Bilan DS, Matlashov ME, Mishina NM, Markvicheva KN, Subach OM, Subach FV, Bogeski I, Hoth M, Enikolopov G, Belousov VV (2014). Red fluorescent genetically encoded indicator for intracellular hydrogen peroxide. *Nat. Commun.*, (5), 5222.

15. Ferraro SA, Astort F, Yakisich JS, Tasat DR (2016). Particulate matter cytotoxicity in cultured SH-SY5Y cells is modulated by simvastatin: Toxicological assessment for oxidative damage. *Neurotoxicology*, (53), 108-114.

16. Goiffon RJ, Martinez SC, Piwnica-Worms D (2015). A rapid bioluminescence assay for measuring myeloperoxidase activity in human plasma. *Nat. Commun.*, (6), 6271.

17. Gomez-Mejiba SE, Zhai Z, Della-Vedova MC, Muñoz MD, Chatterjee S, Townner RA, Hensley K, Floyd RA, Masong RP, Ramirez DC (2014). Immuno-spin trapping from biochemistry to medicine: advances, challenges, and pitfalls. Focus on protein-centered radicals. *Biochim. Biophys. Acta*, 1840 (2), 722-729.

18. Halliwell B, Gutteridge JMC (2007). Free radicals in biology and medicine, 704.

19. Hawkins CL, Davies MJ (2014). Detection and characterisation of radicals in biological materials using EPR methodology. *Biochim. Biophys. Acta*, 1840 (2), 708-721.

20. Jabri MA, Sani M, Rtibi K, Marzouki L, El-Benna J, Sakly M, Sebai H (2016). Chamomile decoction extract inhibits human neutrophils ROS production and attenuates alcohol-induced haematological parameters changes and erythrocytes oxidative stress in rat. *Lipids Health Dis.*, 15 (1), 65.

21. Kettle AJ, Albrett AM, Chapman AL, Dickerhof N, Forbes LV, Khalilova I, Turner R. (2014). Measuring chlorine bleach in biology and medicine. *Biochim. Biophys. Acta*, 1840 (2), 781-793.

22. Kumskova EM, Antonova OA, Balashov SA, Tikhaze AK, Melkumyants AM, Lankin VZ (2014). Malonyldialdehyde and glyoxal act differently on low-density lipoproteins and endotheliocytes. *Mol. Cell. Biochem.*, 396 (1-2), 79-85.

23. Lennicke C, Rahn J, Heimer N, Lichtenfels R, Wessjohann LA, Seliger B (2016). Redox proteomics: Methods for the identification and enrichment of redox-modified proteins and their applications. *Proteomics*, 16 (2), 197-213.

24. Levenon AL, Hill BG, Kansanen E, Zhange J, Darley-Usmare VM (2014). Redox regulation of antioxidants, autophagy, and the response to stress: implications for electrophile therapeutics. *Free Radic. Biol. Med.*, (71), 196-207.

25. Lushchak VI (2016). Time-course and intensity-based classifications of oxidative stresses and their

potential application in biomedical, comparative and environmental research. *Redox Rep.*, 1-9.

26. Maeda H, Fukuyasu Y, Yoshida S, Fukuda M, Saeki K, Matsuno H, Yamauchi Y, Yoshida K, Hirata K, Miyamoto K (2004). Fluorescent probes for hydrogen peroxide based on a non-oxidative mechanism. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 43 (18), 2389-2391.

27. Maulucci G, Labate V, Mele M, Panieri E, Arcovito G, Galeotti T, Østergaard H, Winther JR, De Spirito M, Pani G (2008). High-resolution imaging of redox signaling in live cells through an oxidation-sensitive yellow fluorescent protein. *Sci. Signal.*, 1 (43), pl3.

28. McQuade LE, Lippard SJ (2010). Fluorescent probes to investigate nitric oxide and other reactive nitrogen species in biology (truncated form: fluorescent probes of reactive nitrogen species). *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 14 (1), 43-49.

29. Niki E (2014). Biomarkers of lipid peroxidation in clinical material. *Biochim. Biophys. Acta*, 1840 (2), 809-817.

30. Pluth MD, Tomat E, Lippard SJ (2011). Biochemistry of mobile zinc and nitric oxide revealed by fluorescent sensors. *Ann. Rev. Biochem.*, (80), 333-355.

31. Poulsen HE, Nadal LL, Broedbaek K, Panieri E, Arcovito G, Galeotti T, Østergaard H, Winther JR, De Spirito M, Pani G (2014). Detection and interpretation of 8-oxodG and 8-oxoGua in urine, plasma and cerebrospinal fluid. *Biochim. Biophys. Acta*, 1840 (2), 801-808.

32. Rhee SG, Chang TS, Jeong W, Kang D (2010). Methods for detection and measurement of hydrogen peroxide inside and outside of cells. *Mol. Cells*, 29 (6), 539-549.

33. Roda A, Guardigli M (2012). Analytical chemiluminescence and bioluminescence: latest achievements and new horizons. *Anal. Bioanal. Chem.*, 402 (1), 69-76.

34. Sies H (2015). Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.*, (4), 180-183.

35. Sies H (1991). Oxidative stress: introduction. In: Sies H (ed.). *Oxidative stress: oxidants and antioxidants*, XV-XXII.

36. Sies H (1985). Oxidative stress: introductory remarks. In: Sies H (ed.). *Oxidative Stress*, 1-8.

37. Sies H, Jones D (2007). Oxidative stress. In: Fink G (ed.). *Encyclopedia of stress*, (3), 45-48.

38. Soh N (2006). Recent advances in fluorescent probes for the detection of reactive oxygen species. *Anal. Bioanal. Chem.*, 386 (3), 532-543.

39. Woolley JF, Stanicka J, Cotter TG (2013). Recent advances in reactive oxygen species measurement in biological systems. *Trends Biochem. Sci.*, 38 (11), 556-565.

40. Xu Z, Xu L (2016). Fluorescent probes for the selective detection of chemical species inside mitochondria. *Chem. Commun. (Camb.)*, 52 (6), 1094-1119.

41. Yamamoto T, Suzuki T, Kobayashi A, Wakabayashi J, Maher J, Motohashi H, Yamamoto M (2008). Physiological significance of reactive cysteine residues of Keap1 in determining Nrf2 activity. *Mol. Cell. Biol.*, 28 (8), 2758-2770.

42. Zhao BS, Liang Y, Song Y, Zheng C, Hao Z, Chen PR (2010). A highly selective fluorescent probe for visualization of organic hydroperoxides in living cells. *J. Am. Chem. Soc.*, 132 (48), 17065-17067.

Сведения об авторах Information about the authors

Меньщикова Елена Брониславовна – доктор медицинских наук, заведующая лабораторией молекулярных механизмов свободнорадикальных процессов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины» (630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2; тел.: 8 (383) 333-64-56; e-mail: lemen@centercem.ru)

Menshchikova Elena Bronislavovna – Doctor of Medical Sciences, Head of the Laboratory of Molecular Mechanisms of Free-Radical Processes of Research Institute of Experimental and Clinical Medicine (630117, Novosibirsk, Timakov str., 2; tel.: +7 (383) 333-64-56; e-mail: lemen@centercem.ru)

Зенков Николай Константинович – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник ФГБНУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины» (e-mail: zenkovnk@mail.ru)

Zenkov Nikolay Konstantinovich – Doctor of Biological Sciences, Leading Research Officer of Research Institute of Experimental and Clinical Medicine (e-mail: zenkovnk@mail.ru)