НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ им. Г.Х.БУНЯТЯНА

ФЕСЧЯН СОНА МКРТИЧЕВНА

Механизмы адреналин-индуцированного оксидативного повреждения клеток тканей и защитные факторы в эксперименте

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.00.04 – Биохимия

Научный руководитель
доктор биологических наук, проф. Симонян М.А.

Ереван 2016

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ……..……..... 4

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ ……. 5

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ……..... 12

1.1. Состояние, локализация и механизмы действия изоформ NADPH оксидазы в норме и при патологии ……..……. 12

1.2. Механизмы оксидативного повреждения клеток катехоламинами ……... 18

1.3. Гемоглобин-индуцирующий рилизинг изоформ Nox…… 25

1.4. Механизмы действия селената натрия, α-токоферола, L-аргинина при оксидативном повреждении клеточных компонентов тканей крыс..... 26

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ……..... 32

2.1. Используемые материалы, приборы и иные приспособления ……..…..... 32

2.2. Используемые методы 33

2.2.1. Очищение мембран митохондрий, ядер и клеток сердечной ткани и селезенки крыс..... 33

2.2.2. Очищение эритроцитарных мембран..... 33

2.2.3. Выделение плазматических мембран цитазоля клеток.Выделение изоформ Nox из мембран, митохондрий и ядер клеток тканей крыс..... 34

2.2.4. Выделение и очистка Nox из мембран клеток, мембран внутриклеточных компонентов тканей крыс и эритроцитарных мембран..... 34

2.2.5. Выделение экстрацеллюлярной Nox из сыворотки крови крыс и жидкости асцитной карциномы яичника женщин..... 35

2.2.6. Определение NADPH зависимой O_2 -продуцирующей активности Nox..... 35

2.2.7. Определение ферригемоглобин-восстанавливающей активности Nox..... 35

2.2.8. Определение СОД-миметической активности селената натрия методом восстановления НТС суперокаидными радикалами 36

2.2.9. Определение СОД-миметической активности селената натрия методом обесцвечивания КБС суперокаидными радикалами 36

2.2.10. Определение молекулярной массы Nox 37
2.2.11. Процедура проведения экспериментов..... 37
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ..... 42
3.1. Окисление адреналина NADPH оксидазами и изменения их активностей и форм оптических спектров поглощения *in vitro* 42
3.2. Рилизинг NADPH оксидазы из клеточных компонентов крыс и стимулирование активности этого фермента аминохромами *ex vivo*. 47
3.3. Роль гемоглобина в процессе рилизинга экстрацеллюлярной NADPH оксидазы в сыворотке донорской крови и асцитной жидкости яичника женщин.. 60
3.4.Подавление селенатом натрия рилизинга изоформ NADPH оксидазы из мембран клеточных формирований кардиомиоцитов крыс *ex vivo*..... 66
3.5.Стимуляция ферригемоглобином рилизинга изоформ NADPH оксидазы из сыворотки крови и мембран субклеточных формирований кардиомиоцитов крыс и подавление этого процесса α-токоферолом и L-аргинином..... 69
3.6.Подавление L-аргинином гемоглобин-индуцирующего рилизинга NADPH оксидазы из мембран клеток аорты сердца крыс..... 76
3.7. α-Токоферол подавляет рилизинг изоформ NADPH оксидазы из мембран клеточных компонентов тканей крыс..... 79
3.8. Активность, степень рилизинга и комплексообразобание с ферригемоглобином изоформ NADPH оксидазы из клеточных образований тканей крыс под влиянием подкожно введенного адреналина различной концентрации..... 84
3.9. Регулирование уровня и активности изоформ NADPH оксидазы клеточных компонентов крыс при острой адреналиновой интоксикации под влиянием введенных L-аргинина, α-токоферола и селената натрия 92
ЗАКЛЮЧЕНИЕ..... 100
ВЫВОДЫ..... 104
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... 105

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

α-Тк	α-токоферол
АФК	активные формы кислорода
ИЛ	интерлейкин
Hb	гемоглобин
КФБ	калий фосфатный буфер
МИКС	митохондрия клеток селезенки
МДА	малоновый диальдегид
МККМ	мембран клеток костного мозга
МКС	мембран клеток селезенки
МПА	металлопротеины прооксидантной активности
НТС	нитротетразолиевый синий
Nox	NADPH оксидаза
eNox	экстрацеллюлярная NADPH оксидаза
L-Арг	L-аргинин
ПАГ	полиакриламидный гель
ПОЛ	перекисное окисление липидов
СОД	супероксиддисмутаза
СК	сыворотка крови
ФАД	флавинадениндинуклеотид
ферриHb	ферригемоглобин
ФерроHb	феррогемоглобин
-ФМС	феназинметасульфат
ФНО	Фактор некроза опухоли
Phox	фагоцитоксидаза
Цит	цитохром
ЭМ	эритроцитарные мембраны

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Для аэробных организмов, включая человека и млекопитающих, важность исследований, ассоцированных с определением характерных изменений свойств изоформ NADPH оксидазы на молекулярно-биохимическом уровне в норме и при различных патологических состояниях, включая сердечно-сосудистые заболевания, трудно переоценить. Изоформы Nox различной локализации являются ключевыми системами ферментативного продуцирования супероксидных радикалов ($\mathbf{O_2^{\cdot-}}$), соответственно их производных ($^1O_2$, $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2, NO•, HO•, -ONOO, HOO•)$^{\cdot}$, как активные промежуточные интермедиаты для аэробных метаболических процессов**. З**а счет этих активных интермедиатов изоформы Nox регулируют иммунную систему, экспрессию генов, митохондриальное дыхание, пролиферацию и апоптоз клеток, кислородный гомеостаз и другие жизненно важные процессы [Bedard K et al, 2007, Vignais P.V. 2002]. Регулирование активности этих ферментов является важным аспектом снижения фона оксидативного стресса при различных патологических состояниях в эксперименте и клинике. Активирование Nox1(22 phox) инициирует редокс-зависимый сигнал в патогенезе сосудистых заболеваний. Впервые показано, что Nox1 при этих заболеваниях фосфорилируется. Причем фосфорилирование треонина 429 у Nox1 ускоряет ассоциацию Nox1 с NoxA1 активированным доменом, который необходимо для сохранения целостности комплекса Nox, продуцирования АФК и миграции клеток гладких мышц. Этим путем фосфорилирование треонина 429 протеин киназой бета1 является новым механизмом активации Nox1 [Streeter J. et al, 2014]. Показано, что Nox или флавоцитохром b_{558} фагоцитов является гетеродимерным мембранным интегральным белком, состоящейся из двух субединиц, p22 (phox) и gp91 (phox-фагоцитоксидаза). Последняя единица известна как Nox2 и имеет цитозолевый С-терминальный «дегидрогеназный домен», который содержит ФАД/NADPH-связывающие участки. В настоящее время чаще всего используется термин Nox вместо цитохром b_{558} [Carrichon L. et al, 2001; Kikuchi H. et al., 2010; Simonyan G.M et al, 2011; Ostuni M.A., Campion Y. et al, 2009, Benna J. et al, 2008, Morel F, 2007; Paclet

M.H. et al, 2007]. Огромное внимание специалистов придается факторам оксидативного повреждения, вызванное под влиянием катехоламинов, в частности, адреналина. Введенные катехоламины (адреналин) могут индуцировать оксидативное повреждение клеток активными промежуточными соединениями, образованными при их аутоокислении. Эти соединения воздействуют с адренергическими рецепторами, вызывая катехоламин-индуцированную кардиотоксичность [Neri M. et al, 2007]. Соответственно, норадреналин стимулирует продуцирование супероксидов мононуклеарными клетками периферической крови Nox и этот процесс активируется алфа-адренергическими рецепторами [Deo S.H. et al, 2013]. При адреналин-зависимой аритмии антиоксиданты N-ацетилцистеин, витамин Е и валсартин , снижая степень оксидативного повреждения и уровень продукта окисления адреналина, под влиянием O_2^- регулируют ритмичность работы сердца крыс [FuY.C. et al, 2011; Sethi R. et al, 2009; Rozario R.J. et al, 2008]. Продукты такого окисления адреналина (адренохром, аминохромы) оказывают кардиотоксический эффект [Armarego W.L. et al, 1983].

В настоящее время наряду с ферментативними антиоксидантами широко исследуются механизмы действия неферментативных антиоксидантов (селенат натрия, L-Арг и α-Тк) как факторов стабилизации биомембран и других биосистем. Селен-содержащие белки оказывают антистрессорный эффект при сердечно-сосудистых и других хронических заболеваниях [Rees K. et al, 2013], повышают активность простагландина E_2, супероксиддисмутазы (СОД), каталазы и глутатионпероксидазы (ГПО) на фоне снижения перекисного окисления липидов (ПОЛ) мембран клеток [Abbas A.M. et al, 2013]. При цисплатин-индуцированном спермотоксичности повреждение РНК и хроматина подавляется наночастицами селена, с проявлением антиоксидантного эффекта [Rezvanfar M.A. et al, 2013].

Натуральный витамин Е состоит из 4 аналогов (альфа, бета, гамма и дельта) и все они обладают антиоксидантным эффектом, однако альфа- и бета- формы обладают и противовоспалительным действием [Singh U. et al, 2004; Reiter E. et al, 2007; Yoshida L.S. et al 2008; Declèves A. et al 2014; Jiang Q. 2014]. При их недостатке наблюдается снижение стабильности эритроцитарных мембран (ЭМ) и нервной

системы, а α-Тк совместно с витамином С проявляют противовоспалительный эффект и предотвращают ПОЛ мембран [Lei X et al, 2011]. α-Тк оказывает неврологическое действие, подавляет агрегацию тромбоцитов и окисление ненасыщенных жирных кислот [Muller D.P., 2010], играет важную физиологическую роль для регуляции сердечно-сосудистой системы и антиоксидантной защиты, для продуцирования $NO^{\cdot}$ и полиаминов в эндотелиальных клетках, в физиологических количествах (0,1 мМ) повышает экспрессию структурных белков клеток этих сосудов (виментин и тропомиозин), подавляя экспрессию стресс стимулирующих белков [Haklar G. et al, 1998; Dhawan V. et al 2005; Lei X. et al, 2011]. L-Арг играет регулирующую роль при регенерации клеток печени крыс путем снижения ПОЛ [Jablecka A et al, 2012]. При этом L-Арг играет важную физиологическую роль для регуляции функции сердечно-сосудистой системы, повышения антиоксидантной защиты и для продуцирования $NO^{\cdot}$ и полиаминов в эндотелиальных клетках [Jablecka A et al, 2004]. Актуальность работы заключается в том, что в нем впервые осуществлены комплексное определение свойств (оптические спектральные изменения, активности, степени Hb-индуцированного рилизинга) изоформ Nox из мембран клеток и клеточных компонентов тканей крыс под влиянием адреналина и продуктов его окисления в отсутствии и присутствии антиоксидантов неферментативного характера L-Арг, α-Тк и селената натрия *in vitro, ex vivo* и *in vivo.*

Цель и задачи исследования

Целью исследования являлось комплексное определение молекулярно-биохимических механизмов воздействия адреналина и продуктов его окисления на уровень, активность и степень гемоглобин-индуцированного рилизинга из клеточных и субклеточных мембран изоформ Nox под влиянием L-аргинина (L-Арг), α-токоферола (α-Тк)и селената натрия, *in vitro, ex vivo* и *in vivo*. Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Определение механизмов взаимодействия изоформ Nox с адреналином *in vitro.*
2. Определение степени рилизинга NADPH оксидазы из клеточных компонентов тканей крыс и изменение активностей этого фермента под влиянием продуктов окисления адреналина *ex vivo.*

3. Выявление роли гемоглобина на процесс отщепления изоформ NADPH оксидазы из мембранных компонентов и экзосом сыворотки донорской крови.

4. Определение эффекта α-токоферола,L-аргинина и селената натрия на процесс рилизинга изоформ NADPH оксидазы из мембран клеточных формирований кардиомиоцитов, мембран клеток и субклеточных компонентов,а также экзосом сыворотки крыс ex vivo.

5. Определение эффекта L-аргининана на гемоглобин-индуцирующый рилизинг NADPH оксидазы из мембран клеток аорты сердца крыс.

6. Определение активности, степени рилизинга и комплексообразования с ферригемоглобином изоформ NADPH оксидазы из клеточных образований тканей крыс под влиянием подкожно введенного адреналина различной концентрации *in vivo.*

7. Определение уровня и активности изоформ NADPH оксидазы клеточных компонентов крыс при острой адреналиновой интоксикации под влиянием L-аргинина, α-токоферола и селената натрия *in vivo.*

Научная новизна работы

Было показано, что:

- Nox из ЭМ, МКС, МКСТ, МККМ и eNox из сыворотки крови окисляют адреналин в адренохром ,далее в аминохром, который способен необратимо связываться с определенным участком (доменом) молекулы Nox, вызывая характерные изменения форм оптических спектров поглощения изоформ Nox, с подавлением (при избытке адренохрома) или стимулированием (при низких количествах адренохрома) NADPH зависимой O_2^--продуцирующей и ферриHb-восстанавливающей активностей изоформ этих Nox, которые могут считаться рецепторами адреналина.

- В зависимости от степени сродства продуктов окисления адреналина-аминохромов к приведенным Nox и eNox также наблюдается снижение или повышение уровня и активности этих Nox с необратимым изменением оптических спектральных характеристик этих ферментов. Скорее всего, увеличение аминохромами удельного содержания отщепленных из клеточных компонентов Nox

связано с индуцированием процесса ПОЛ мембран клеточных компонентов, стимулирующие рилизинг Nox из этих мембран.

• Продукты окисления адреналина–аминохромы, могут проникать через мембраны клеток и мембраны субклеточных компонентов тканей и связываться непосредственно с локализованными в них Nox, стимулируя процесс их отщепления в гомогенную фазу и изменяя NADPH-зависимую O_2^--продуцирующую и ферриHb-восстанавливающую активности этих ферментов в гомогенной и гетерогенной фазах. Отщепление Nox аминохромами из клеточных компонентов является новым механизмом дестабилизации мембран клеточных компонентов *ex vivo*.

• У млекопитающих Hb является фактором индукции отщепления eNox в сыворотке донорской крови и жидкости асцитной карциномы яичника женщин, путем образования нестабильного комплекса с eNox в составе локализованных в этих жидкостях экзосом с отщеплением eNox в растворимую фазу как *in vitro* так и *in vivo*.

• Путем нейтрализации O_2^- селенат натрия подавляет рилизинг изоформ Nox из мембранных формирований кардиомиоцитов. Этим механизмом селенат натрия проявляет мембраностабилизирующую роль, защищая кардиомиоциты от оксидативного повреждения, наблюдающегося, в частности, при сердечно-сосудистых заболеваниях. Полученные данные дают основание для использования селената натрия как антистрессорного агента неферментативного характера при инфаркте миокарда в эксперименте.

• L-Арг и α-Тк подавляют ферригемоглобин-индуцированный рилизинг Nox из мембранных образований кардиомиоцитов крыс. Механизм такого эффекта связывается скорее всего, с подавлением ПОЛ. Подавление рилизинга изоформ Nox из мембран и субклеточных формирований кардиомиоцитов крыс L-Арг и α-Тк является новым механизмом мембраностабилизирующего эффекта этих неферментативных антиоксидантов. При дестабилизации эритроцитов, проникающий в сыворотку гемоглобин может играть дестабилизирующую роль в отношении мембран кардиомиоцитов, проявляя кардиотоксический эффект, а α-Тк, совместно с L-Арг, могут проявить кардиопротекторный эффект.

• Предполагается, что повышая активность каталазы и соответственно снижая уровень перекиси водорода (она образуется в результате ферментативного дисмутирования супероксидных радикалов, продуцируемые NADPH оксидазой в данной системе), L-Арг подавляет ПОЛ мембран клеток аорты сердца, соответственно снижая рилизинг Nox из этих мембран, для которых этот фермент является важным структурно-функциональным компонентом [Batot G. et al, 1998]. Это является новым механизмом стабилизации L-Арг мембран клеток аорты сердца.

• Продукты окисления введенного адреналина в концентрационно зависимой манере необратимо изменяют формы оптических спектров поглощения отщепленных изоформ Nox, изменяют NADPH зависимую O_2^--продуцирующую и ферриHb-восстанавливающую активности этих ферментов, а также степень отщепления и интенсивность комплексообразования изоформ приведенных Nox из ЭМ и из клеточных формирований (мембраны, ядра, митохондрий и цитозоля клеток) сердечной ткани, легких, печени и почек, а также из экзосом сыворотки крови [Kesimer M. et al 2009, Lasser C. et al 2012, Rupp Q.A.K. et al, 2011,Simonyan R.M. et al, 2014].

• L-Арг, α-Тк и селенат натрия при острой адреналиновой интоксикации крыс проявляют различные степени положительного эффекта, предотвращая токсические эффекты продуктов окисления адреналина и снижая рилизинг изоформ Nox из клеточных мембран, мембран ядер, митохондрии и цитозоля клеток сердечной ткани, легких, печени , почек и из экзосом сыворотки. На этом фоне при острой адреналиновой интоксикации крыс эффективность регулирования приведенных показателей, а также снижение числа гибели животных выше под влиянием введенных L-Арг, затем α-Тк и далее селената натрия.

Научно-пракическое значение работы

- Предложенные методы получения Nox из мембран клеток и субклеточных компонентов, а также eNox из наночастиц – экзосом сыворотки крови могут быть использованы для определения количественных характеристик оксидативного повреждения этих тканей, ассоцированных с характерными изменениями уровня и активностей изоформ Nox и eNox, после воздействия адреналина in vitro, ex vivo и in

vivo. Диапазон этих изменений в крови и других тканях может быть использован в качестве новых и чувствительных маркеров определения допустимых границ воздействия адреналина в экспериментальной биохимии и клинике.

- Явление окисления адреналина изоформами Nox и eNox *in vitro*, с характерными необратимыми изменениями формы оптических спектров и активности этих ферментов может служить чувствительным маркером адреналиновой интоксикации.

- Проникновение продуктов окисления адреналина (аминохромы) через биомембраны и стимуляция процесса рилизинга изоформ Nox из мембран клеточных компонентов наряду с гемоглобином является новым механизмом дестабилизации мембран клеточных компонентов тканей крыс *ex vivo*.

- Выявленный новый механизм мембраностабилизирующего эффекта L-Арг, α-Тк и селената натрия *in vivo*, ассоцирован с подавлением рилизинга изоформ Nox из биомембран и может быть применен в хирургии при соединении поврежденных тканей для стабилизации мембран поверхностных клеток.

- Полученные результаты по новому оценивают обоснование для использования L-Арг, α-Тк и селената натрия как антиоксидантных агентов неферментативного характера при адреналин-индуцированной кардиотоксичности.

ГЛАВА 1

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Состояние, локализация и механизмы действия изоформ NADPH оксидазы в норме и при патологии.

В последние десятилетия колосальную важность приобретают исследования, связанные с определением характерных структурно-функциональных изменений ферментных систем – изоформ Nox, которые имеют огромное значение для регуляции метаболизма активных форм кислорода.

Приводится сравнительно новые литературные данные о физиологии и патофизиологии изоформ Nox. Изоформы Nox являются ключевыми компонентами фагоцитов (нейтрофилы, эозинофильные гранулоциты, моноциты и макрофаги). Nox катализирует процесс перехода электрона от NADPH к молекулярному кислороду, превращая его в супероксидный радикал по схеме: $NADPH + 2O_2$ --- $NADP^+ + 2O_2^- + H^+$. Продуцированные O_2^- являются важными бактериоцидными факторами. При этом после дисмутации O_2^- образуется перекись водорода, которая превращается в гидроксильные радикалы в присутствии следов ионов переходных металлов. С другой стороны в присутствии гидроксильных ионов перекись водорода превращается в O_2и $HO\cdot$ по схеме : $H_2O_2 + O_{2*}$ --- $O_2 + HO\bullet$ [L Van Heerebeek et al,2002, Simonyan M.A., 1982].

В фагоцитах локализованы пять изоформ Nox: Nox1, Nox2, Nox3, Nox4, Nox5 и их активаторы Rac 1 и Rac 2. Физиологическое функционирование Nox заключается в регуляции иммунной системы, экспрессии гена, митохондриального дыхания, клеточной дифференциации и кислородного гомеостаза (изоформы Nox обладают и ферригемоглобин-восстанавливающей активностью [Simonyan G.M.et al, 2006]). При дефиците Nox может возникнуть иммуннодефицит. С другой стороны повышение активности Nox вызывает многочисленные патологические состояния, в частности сердечно-сосудистые заболевания и нейродегенерацию. В этом обзоре приведены особенности изменения функционирования изоформ фермента Nox в

физиологическом и патофизиологическом состояниях [Bedard K et al, 2007]. Изоформы Nox являются ключевыми источниками O_2^- и важными факторами патогнеза различных заболеваний. Регулирование активности этих ферментов является важным аспектом снижения фона оксидативного стресса при различного характера патологических состояниях в клинике. Активирование Nox1 инициирует редокс зависимый сигнал в патогенезе сосудистых заболеваний. Впервые было показано, что Nox1 фосфорилируется при этих заболеваниях. Причем фосфорилирование треонин 429 у Nox1 ускоряет ассоциацию Nox1 с NoxA1 активированным доменом, который необходимо для сохранения целостности комплекса Nox, продуцирования АФК и миграции клеток гладких мышц. Nox2 катализирует процесс продуцирование O_2^- при обострении нейрологических заболеваний в частности при амиотрофического латерального склероза (АЛС) у мышей. В процессе активации Nox важную роль играют ионы кальция, свободные жирные кислоты, белок-белковая взаимодействие, внутриклеточний траффикинг, фосфорилирование и ацетилирование [Marrali G. et al, 2014; Brandes R.P.et al, 2014]. Nox4 является источником продуцирования O_2^- в различных тканях тела человека. Nox4 стимулирует процесс пролиферации различных типов клеток, включая опухолевые клетки. При этом Nox4 играет определенную роль в регуляции сердечно-сосудистой системы (при атеросклерозе, гипертрофии клеток сосудов, их апоптозе и развитии [Przybylska D. et al, 2014]. Путем продуцирования O_2^- Nox играют ключевую роль при грибковой инфекции, оказывая микробоцидный эффект с регуляцией иммунной системы. Нарушение баланса ненасыщенных жирных кислот вызывает изменение функционирования Nox тромбоцитов, на фоне обострения оксидативного повреждения клеток печени при циррозе. Nox5 является главным источниками продуцирования O_2^- в сердечно-сосудистых, нейрональных и почечных клетках. O_2^- вызывают гипертензию проксимальных трубочек почек, на фоне повышения экспрессии Nox и ослабления допаминергой системы клеток почек [Yu P. et al, 2014]. Оксидативный стресс играет патогенический роль при сердечной недостаточности в эксперименте и клинике. Кардиомиопатия в клинике и эксперименте (опыти на мышей) ассоцируется с повышением уровня Nox2, с соответственным усилением

оксидативного стресса и активацией митоген-активированной протеин киназы, при этом повышается гипертрофия кардиомиоцитов и их фиброз. Соответственно, снижение активности Nox2 уменьшает фон оксидативного повреждения клеток сердечной ткани. В результате внутрибрюшинного введения мышам ТНФ-α (10μг/кг) наблюдается острое воспаление кишок с существенной экспресией Nox1. При этом повышается ПОЛ и снижается активность каталазы, а апоцинин проявляет антистрессорный эффект [Mouzaoui S. et al, 2014]. Причем содержание АФК, стимулирующее ангиогенез после индукции ишемии в эксперименте составляет 9,82 x 10^{-12} М/мг ткани [Bir S.C., 2013]. Показано,что активность Nox4 модулируется 4 производными хинона (AA-861, tBuBHQ, tBuBQ и дюрохинона). Предполагается, что NADPH хинон оксидоредуктаза может участвовать в этом процессе [Nguyen M.V. et al, 2013]. Антимикробиальную активность фавоцитохрома b_{558} (Nox1+Nox2), обусловленно продуцированием супероксидов, повышением ИФ-γ, повышая этим NADPH оксидазную активность макрофагов. Таким образом цитокины модулируют антимикробиальную активность макрофагов [Casbon A.J.et al, 2012]. При инфекции вирусом иммунодефицита человека наблюдается дисфункционирование полиморфонуклеарных лейкоцитов со снижением продуцирования супероксидов локализованных в этих клетках Nox при прогрессировании заболевания. Считается, что нейтрофильная Nox является плазматическим мембраносвязанным цитохромом b_{558} (является гетеродимером с 22 и 91 phox) и цитозолиевым цит b_{558} (субединицы p47-, 67- и 40-phox). При иммунодефиците снижается O_2^--продуцирующая активность Nox, с активацией gp91-phox путем глюколизации. Эта субединица активируется и лектином [Gorudko I.V.et al, 2011]. Nox2 имеет цитозолевый С терминал - «дегидрогеназный домен», который содержит ФАД/NADPH-связываюшие участки. В настоящее время чаще всего используется термин Nox вместо цитохром b_{558} [Carrichon L. et.al, 2001; Kikuchi H. et al, 2010; Simonyan G.M et al, 2011; Ostuni M.A., Campion Y. et al, 2009; El-Benna J. et al, 2008; Morel F., 2007;Paclet M.H. et al, 2007]. Есть мнение, что при продуцировании O_2^- фагоцитами субединицы p47,67,40(phox) активируются, путем ассоциации с мембраносвязанным цит. b_{558}. Продуцирование супероксидов повышается при фосфорилировании изоформ Nox и стимуляции этого

фермента иономицином и fMLF [Carrichon L. et al,2011]. Нейтрофилы играют существенную роль в иммунной защиты организма против микробиального патогенеза и в стимуляции воспалительной реакции при повышенном продуцировании O_2^-. При активации нейтрофилы продуцируют O_2^- и его производные: перекиси водорода, гидроксильные радикалы, гипохлорную кислоту (HOCI), микробицидальный пептид и протеаз. Изоформы Nox иногда называют и ферментом дыхательного тракта. Этот мультикомпонентный энзим состоит из 2 трансмембранных протеинов (p22 phox и gp91phox) [Ei-Benna J. et al,2008]. Однако, результаты, полученные в последние 4-5 лет свидетельствуют о том, что приведенную концепцию о комбинированном действии изоформ Nox нельзя считать окончательным. Фактически изоформы Nox выделены не только из клеточных мембран, но и из мембран ядер, митохондрий и мембран цитоплазматических формирований [Симонян Р.М. и др., 2008]. Эти изоформы Nox продуцируют O_2^- автономно в отсутствии NADPH и имеют характерные для Nox или цитохрома b_{558} оптические спектральные показатели. При этом O_2^--продуцирующая и ферригемоглобин-восстанавливающая активности этих Nox не увеличиваются при их комбинированном действии [Мелконян Л.Г. и др., 2010., Тадевосян Л.Г. и др 2011].

Продуцированные NADPH оксидазами O_2^- и его производные играют важную роль в клеточной патофизиологии, в частности, трансдукции сигнала при развитии клеток и функционировании с инфламаторными цитокинами [Kleniewska P. et al, 2012].

В следующем обзоре приведены данные о активирующей роли Rac1 и Rac2, GTPаз для изоформ Nox [Peter L. Hordijk, 2006]. Нахождение фармакологических ингибиторов активности изоформ Nox является важной задачей фармакологии для лечения сердечно-сосудистых заболеваний [Rodiño-Janeiro B.K. et al, 2013].Особое внимание придается фармакологическим препаратам, которые снижают фон оксидативного повреждения миокарда и в целом оксидативного стресса. [Zamora P.L. et al, 2013]. Ангиотензин II является важным физиологически активным субстратом в ренин-ангиотензинной системе. За счет продуцируемых АФК ангиотензин II активирует некоторые сигнальные пути, путем модификации белков,

регулируя Nox, комплекса митохондриального дыхания, нитрит оксидазы и играет важную роль в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний. Нарушение функционирования этих биосистем вызывает обострение сердечно-сосудистых заболеваний, с нарушением гомеостаза активными формами кислорода (АФК) [Sunggip C. et al, 2013]. АФК убивают бактерий и нарушают функционирование клеток тканей, однако роль АФК при патологических состояниях оценивается по новому. АФК играют огромную роль в нормальных физиологических процессах, таких как редокс регуляция, фосфорилирование белков, ионных каналов и транскрипционных факторов. АФК регулируют также биосинтетические процессы, включая продуцирование тироидного гормона и экстрацеллюлярного матрикса. Заболевания происходяшие с нехваткой АФК (хроническое грануломатозное заболевание, некоторые аутоиммунные заболевания) или с накпоплением АФК (сердечно-сосудистые и нейродегенеративные заболевания) являются АФК–зависимыми патологиями. Nox4 локализована на плазматических мембранах, на интрацеллулярных мембранах, на митохондриях, эндоплазматических ретикулумах и ядрах. Хотя Nox2 играет важную роль при ангиотензин II индуцированной сердечной гипертрофии, Nox4 индуцирует сердечную гипертрофию и недостаточность, с повышением кровяного давления. Нарушение функционирования Nox4 индуцирует окисление митохондриальных белков, включая аконитазу, вызывая дисфункционирование митохондрий и гибель клеток миокарда [Maejima Y. et al,2011].Оксидативный стресс сердечной ткани индуцируется при гипертрофии, апоптоза, фиброза, митохондриального дисфункционировния на фоне сердечной аритмии. При этом, Nox4 экспрессируется в митохондриях кардиомиоцитов и за счет продуцируемых O_2^- инициирует апоптоз и нарушение функции митохондрий. Этим Nox4 является важной мишенью при лечении сердечной недостаточности [Kuroda J. et al, 2010]. При этом, АФК, в частности O_2^- и перекись водорода, являются важными сигнальными молекулами при сердечно-сосудистых заболеваниях. Перекись водорода генерируется в ряде биологических процессах и является важным трансмиттером редокс сигналов. Хотя перекись водорода является сильным оксидантом, однако имеет высокий энергетический барьер, что не позволяет

взаимодействовать с многими биосистемами, слабо воздействует с тиолами и цистеиновыми остатками белков, однако хорошо воздействует с переходными металлами, селенопротеинами и тиолсодержащимы белками [Winterbourn C.C., 2013]. АФК участвуют в развитии, апоптоза и миграции клеток гладких мышц, в процессе модуляции функции эндотелия, включая эндотель-зависимую релаксацию и экспрессию проинфламаторных фенотипов и в модуляции экстрацеллюлярного матрикса. В этих условиях патологическое состояние ассоцируется с неконтролируемым развитием и инфламацией, приводящие к болезни коронарной артерии [Arora S. et al, 2010]. В повышенных концентрациях АФК вызывают нарушение окислительно-восстановительного статуса клеток и их оксидативное повреждение .

При ишемическом шоке мозговой ткани наблюдается повышение уровня O_2^- и других форм активного кислорода, вызывая оксидативный стресс. В этом процессе ключевую роль играют изоформы Nox, как ключевые системы продуцирования O_2^-. Снижение активности этого фермента на фоне использования антиоксидантов является стратегией снижения оксидативного повреждения при ишемическом приступе мозговой ткани. Определяется и важную роль изоформ Nox при хронической почечной болезни, пересадки почек и при сопутствующей воспалении и легочной гипертензии, обусловленной с нарастающим легочным артериальным давлением, как результат изменения структуры и функции сосудов легких. Это обычно сопровождается сердечной недостаточностью. При этом терапевтический эффект оказывают сосудорасширяющие простаноиды, ингибиторы фосфодиестераз-5 и антагонисты эндотелин-1 рецептора [Decleves A.E. et al, 2014]. Однако, воздействие антиоксидантов практически неэффективны, в клинике более эффективны препараты подавляющие активности АФК продуцируюших ферментов - Nox [Brieger K. et al, 2012]. Существуют различные факторы, изменяющие степени экспрессии субъединиц NADPH оксидазы в различных клеточных формированиях. Одновременно, при экспрессии Nox5 продуцируемые O_2^- в избытке вызывают дальнейшее дисфункционирование клеток гладких мышц аорты, вызывая атеросклероз [Manea A. et al, 2012]. Аналогичный эффект наблюдается при сердечно-сосудистых

заболеваниях, когда повышенное продуцирование NADPH оксидазой активные формы кислорода вызывают нарушение функционирования эндотелиальных клеток у мышей [DouglasG. et al, 2012]. Кальциум-калмодулин зависимая киназа стимулирует активность Nox5 в эндотелиальных клетках аорты быка и на основании масс-спектральных анализов кальциум калмодулин регулирует активность Nox5 путем фосфорилирования сер475 [PandeyD. et al, 2011]. Факторы, вызывающие внеклеточный оксидативный стресс, индуциируют экспрессию Nox1, стимулируя сосудистый оксидативный стресс в культуре клеток аорты [Stanic B. et al, 2010]. Nox1 и Nox2, но не Nox4, повышают спонтанную гипертензию аорты крыс, а экспрессия Nox1 в эндотелиальных клетках вызывает изменение функционирование сосудов при подавлении или стимуляции активности Nox. Это считается новым фактором лечения системной гипертензии [Wind S. et al, 2010]. В свою очередь Nox (p67 phox) в клетках гладких мышц, регулирует редокс сигналы и фенотипы этих мышц. Эти данные подтверждают потенциальную возможность модуляции экспрессии Nox при лечении сосудистых заболеваний [Niu X.L. et al, 2010].

Однако, распространенную концепцию о комбинированном ферментативном действии изоформ Nox нуждается определенной коррекции на основании автономной действии изоформ Nox из мембран ядер, митохондрий, мембран клеток, цитоплазматических мембран, экзосом сыворотки, а также эритроцитарных мембран. При этом из эритроцитарных мембран после выделения Nox [Симонян М.А. и сотр., 1995], была обнаружена Nox активность ЭМ только через 19 лет [George A. et al. 2013].

1.2 Механизмы оксидативного повреждения клеток тканей млекопитающих катехоламинами.

Катехоламины, в частности, адреналин синтезируется в надпочечниках путем ферментативного превращения тирозина, который сперва окисляется до L-ДОФА, далее декарбоксилируется и превращается в дофамин [Baselt R., 2008]. Эндогенная концентрация адреналина в плазме крови составляет до 10 нг/л, однако при

физических нагрузках и при стрессовом состоянии организма это количество повышается в 10-50 раз (0,9 мг/л). При парентеральном введении адреналина у больных при обострении сердечно сосудистых заболеваний, содержание адреналина в плазме повышается от 10.000 до 100.000 раз [Raymondos K. et al, 2000]. Введенные катехоламины (адреналин) индуцирует оксидативное повреждение клеток активными промежуточными соединениями кислорода, образованными при автоокислении адреналина. Эти соединения воздействуют с адренергическими рецепторами, вызывая катехоламин-индуцированную кардиотоксичность [Neri M. et al, 2007]. Адреналин способен вызывать оксидативное повреждение в печени ксенобиотиками. При этом, адреналин повышает уровень гидроксильных радикалов α, β_1 адреноцептор-зависимым механизмом, тогда, как этанол это делает рецептор-независимым механизмом [Castojon-Sosa M. et al, 2002]. При аутоокислении катехоламинов образуются активные формы кислорода (АФК), которые участвуют в процессе снижения количества дофаминергических нейронов мозга при нормальном старении и болезни Паркинсона. Анализы показывают, что О-метилирование катехоламинов и мелатонин могут быть важными компонентами антиоксидантной защиты клеток мозга против продуктов окисления катехоламина и дофаминергической нейродегенерации [Miller J.W. et al, 1996]. Введенный симпатетический нейротрансмиттер норадреналин в эксперименте стимулирует продуцирование АФК циркулирующими лейкоцитами. Существует мнение, что норадреналин стимулирует продуцирование O_2^- изоформой Nox, локализованной в мононуклеарных клетках периферической крови и этот процесс активируется алфа-адренергическими рецепторами [Wang Q. et al, 2012; Deo S.H. et al, 2013]. Норадреналин из симпатической нервной системы может включаться в регулации функционирования яичника. При заболевании яичника в клетках фоликулярной жидкости уровень норадреналина существенно снижается. При этом норадреналин стимулирует продуцирование супероксидов этими клетками и этот процесс несколько подавляется моноамин оксидазой А [Saller S. et al, 2012]. Повышение уровня катехоламина вызывает повреждение сердечной ткани. Кардиотоксичность

катехоламинов связывается с их способностью конвертироваться в аминохромы, с продуцированием O_2^-, которые и повреждают кардиомиоциты, индуцируя железо-зависимую реакцию Фентона, с образованием высокоактивных гидроксильных радикалов. Это свидетельствует о том, что хелаторы железа (салицилалдегид, изоникотиноил гидразон) могут играть положительную роль [Haskova P. et al, 2011]. Катехоламины продуцируют O_2^- и индуцируют повреждение ДНК путем окислительно-восстановительных реакций, стимулированными ионами меди или железа. При этом дофамин индуцирует метал-зависимое повреждение ДНК, снижение экспрессии гена и повреждение последнего аминохромами [Nishino Y. et al, 2011]. Нейротрансмиттеры, такие как катехоламины (допамин, эпинефрин, норэпонефрин) имеют фенольную структуру и улавливают АФК, путем восстановления последних атомом водорода. Ингибирующий эффект допамина на расщепление ДНК повышается в присутствии ионов магнезия, которые повышают радикал-улавливающую активность допамина [Kawashima T. et al, 2010]. В результате предварительной инкубации культуры клеток кардиомиоцитов крыс с антиоксидантом кроцетином, предотвращается снижение активности СОД и содержание GSH, вызванного норадреналином. При этом снижается уровень апоптоза этих клеток. Таким образом кроцетин снижает повреждающий эффект норадреналина на кардиомиоцитов, путем повышения активности СОД, увеличения уровня GSH, снижения ПОЛ, количество ионов кальция в клетках с подавлением апоптоза. Стимуляция норадреналином кардиозащитного эффекта алфа(1)-адреноцептора подавляется L-NAME или темполом в анстезиованном сердце крыс [Imani A. et al, 2011]. Nox индуцирует активирование каплаина, вызывая норадреналин-индуцированный апоптоз кардиомиоцитов, а таурин путем ингибации Nox и активации каплаина, оказывает антиапоптический эффект [Friis M. et al, 2008; Li Y. et al, 2009; Han Z. et al, 2016].

При сердечно-сосудистых нарушениях уровень эндогенных катехоламинов существенно повышается. При ишемии/реперфузии и дисфункционирования коронарных сосудов сердца наблюдается рилизинг больших количеств

катехоламинов, в частности, адреналина, соответственно повышается количество генерированных O_2^-. Определяется токсическое воздействие адреналина отдельно или в присутствии супероксид-продуцирующих систем (ксантин с ксантин оксидазой) на свежеполученных, кальциум толерантных кардиомиоцитов из пожилых крыс. В этих условиях наблюдается время-зависимое увеличение скорости образования адренохрома. Повышение концентрации адренохрома наблюдается в присутствии O_2^--продуцируюшей системы. При этом продукты окисления адреналина являются важными факторами индуцирования кардиотоксичности [CostaV.M., et al, 2007].В патогенезе катехоламин-индуцированной кардиотоксичности основную роль играют O_2^-, образованные при аутоокислении адреналина. В результате введения животным адреналина кардиоингибирующие цитокины играют адаптивную роль при нарушении функционирования миокарда [Neri M.et al, 2007]. Было показано, что норепинефрин индуцирует апоптоз эндотелиальных клеток путем нарушении функционирования Bc1-2 белка и активации каспаз-2. Однако роль АФК и митоген активирующего протеин киназ (МАРК) в этом процессе остается еще нерешенной. Обработка культуры эндотелиальных клеток 100 мкМ норэпинефрином повышается уровень внутриклеточного АФК и c-Jun N-терминал киназы и p38 фосфорилации. Антиоксиданты витамин С и N-ацетил цистеин ингибируют норэпинефрин-индуцированное образование АФК, JNK фосфорилацию, активацию каспаз и апоптоз клеток. Экзогенно введенная СОД или каталаза существенно снижают процесс продуцирования АФК и гибель клеток при сердечной недостаточности. Норэпинефрин индуцирует апоптоз кардиомицитов беременных крыс АФК - TNF-каспаз сигнальным путем [FuY.C.et al, 2006].

Полученные данные показывают, что адреналин и 2,4-динитрофенол повышают окислительное фосфорилирование клеток изолированной печени и стимулируют продуцирование АФК. Аналог адреналина - норэпинефрин (5 мкМ) повышает O_2^--продуцирующую активность NADPH оксидазы, вызывая апоптоз вентрикулярных кардиомиоцитов в культуре этих клеток. Этот процесс подавляется скавенджером O_2^- – таурином (0,5 мг/кг). Подавлением активности Nox – gp91phox снижается апоптоз кардиомиоцитов. При этом норэпинефрин повышает активность каплаина-1 в

кардиомиоцитах. Таурин ингибирует Nox и снижает норэпинефрин- или H_2O_2-индуцирующую активацию калпаина-1 в кардиомиоцитах[Li Y et al, 2009]. Подавление активности Nox ингибиторами (апоцинин, дифениленйодониум) снижает индуцированную коллагеном и эпинефрином (10 мкМ) агрегацию тромбоцитов у аспирин-резистентных пациентов с повышением риска сердечно-сосудистых заболеваний [Stef G. et al, 2007]. Ингибиторы Nox и витамин С ослабляют, а NO из эндотелия сосудов и норэпинефрин, путем активирования Nox, модулируют процесс сокращения сосудов при гипертензии у крыс. С другой стороны, повышение O_2^--продуцирующей активности Nox происходит под влиянием холестерина в микросомах легких крыс в присутствии эпинефрина или цитохрома С. При этом окисление эпинефрина в адренахром микросомами блокируется супероксиддисмутазой, хотя активности NADPH, цитохром С редуктазы и арилгидроксилазы не изменяются [Miyagawa K. et al, 2007]. Однако, при инкубировании нейтрофилов с повышенными концентрациями адреналина (до 50 мкМ) наблюдается, наоборот, подавление O_2^--продуцирующей активности нейтрофилов или локализованных в них Nox.При этом фагоцитирующая активность нейтрофилов крыс не изменяется адреналином в присутствии глюкозы или глутамина [Garcia C.et al, 1999]. Скорее всего, в этом случае количество O_2^- (для фагоцитоза) увеличивается за счет стимулирования глюкозой процесса расщепления перекиси водорода в O_2^- [Simonyan M.A.,1982]. Фактически, в зависимости от действующей концентрации адреналина или его аналогов NADPH зависимая O_2^--продуцирующая активность Nox может стимулироваться или подавляться. Механизмы кардиотоксичности катехоламинов (адреналин, норадреналин) связаны, в первую очередь, с изменением уровня АФК в клеточных и внеклеточных формированиях млекопитающих. Экзогенно введенный норадреналин стимулирует продуцирование O_2^-NADPH оксидазой локализованной в циркулирующих лейкоцитах крови человека. При этом ингибитор этого фермента дифениленйодониум и ингибитор протеинкиназы С страуроспорин подавляет такой эффект адреналина [DeoS.H.et al, 2013]. В свою очередь катехоламины стимулируют развитие клеток сосудов гладких мышц, путем повышения активности Nox [FuY.C. et al, 2006]. При повышенных

концентрациях адреналин вызывает увеличение уровня гидроксильных радикалов (HO·) в гепатоцитах, как продукта неферментативного расщепления перекиси водорода (она является продуктом ферментативного дисмутирования O_2^-). Этим путем адреналин оказывает кардиотоксический эффект [Antonio A Díaz-Cruz et al,2007]. Эффективная доза подкожно введенного адреналина составляет 2 мг/кг массы животного, 2 раза в течение 24 ч. При том, антиоксидант валсарман (30 мг/кг), лисопен из томатного сока (1,2 мг/мл) и витамин Е (50 мг/мл) оказывают протективный эффект снижая уровень МДА и повышая количвство GSH. При адреналин-зависимой аритмии антиоксиданты N-ацетилцистеин, витамин Е и валсартин снижая степень оксидативного повреждения и уровень продукта окисления адреналина под влиянием O_2^- регулируют ритмичность работы сердца крыс [FuY.C. et al, 2011; Sethi R. et al, 2009; Rozario R.J. et al, 2008, Kirshenbaum et al, 1990]. Продукты такого окисления адреналина (адренохром, аминохромы) оказывают кардиотоксический эффект [Armarego W.L. et al, 1983]. Фактически кардиотоксичность адреналина проявляется не только при характерных изменений уровня и активности Nox кардиомиоцитов, но и других клеточных и внеклеточных формирований.

В зависимости от действующих концентраций адреналина и аналогов, они по-разному изменяют уровни регулирующие метаболизм АФК. Так, адреналин в физиологических количествах (5-100 нМ) ингибирует формил-метионил-лейцил-фенилаланин (ФМЛФ)-индуцированное продуцирование полиморфонуклеарными нейтрофилами O_2^-. В физиологических количествах адреналин не ингибирует ФМЛФ-индуцированную транслокацию компонентов NADPH оксидазы p47 и p67phox и фосфорилирование p47phox, но подавляет активность цитозолевой фосфолипазы A(2) [D'Down Y.M. et al, 2004]. Норадреналин вызывает апоптоз эндотелиальных клеток путем нарушения регуляции Bcl-2 белка и активации β-адрэнергических и каспаз-3 путей. Норадреналин повышает внутриклеточные уровни АФК, экстрацеллюлярной N-терминальной киназы и фосфорилирование протеина p38. Антиоксиданты (витамин С и N-ацетил цистеин) ингибируют такой эффект норадреналина. Адреналин способствует продуцированию высокоактивных

гидроксильных радикалов изолированными гепатоцитами крыс. При этом продуцированные Nox-ой O_2^- после ферментативной дисмутации превращаются в перекись водорода и этот процесс стимулируется адреналином [Fu Y.C. et al, 2006]. Адреналин оказывает и кардиотоксический эффект, а антиоксидант кроцетин оказывает положительный эффект, повышая уровень ГSH, СОД и снижая содержание Ca^{+2} и интенсивность протекания ПОЛ в клетках миокарда *in vitro* [ShenX.C et al, 2009]. Катехоламины вызывают определенное нарушение метаболизма АФК в клетках тканей млекопитающих. Путем активации Nox, локализованной в клетках сосудов, катехоламины оказывают трофический эффект [Bleeke T. et al,2004],а таурин, обладающий антиоксидантной активностью, подавляет активнисть Nox и активацию калпаина, оказывая антиапоптический эффект кардиомиоцитов крыс в культуре клеток [Li Y. et al, 2009]. С другой стороны, в ходе окисления адреналина продуцируются супероксиды, которые играют определенную роль в процессе активации глутатион пероксидазы микросом печени крыс [Lundqvist G. et al,1992; Díaz-Cruz A. et al, 2013]. В экстрацеллюлярных жидкостях при аутоокислении накапливающегося норадреналина также образуются гидроксильные радикалы , которые вызывают снижение тонуса аорты, ослабляя метаболизм нитрит оксида, арахидоновой кислоты и АТФ-зависимого K^+ канала [Obata T. et al, 2002;Yagi K. et al,1992]. В процессе окисления гидроперекисей липопротеина низкой плотности, стимулируемом адреналином, также продуцируются гидроксильные радикалы [Yagi K., 1993]. При повышенных концентрациях АФК, в том числе и гидроксильный радикал, оказывают деградирующее действие на окружающие биосистемы, вызывая оксидативное повреждение при заболеваниях различного характера [Simonyan G.M. et al, 2011]. Изоформы Nox клеточных компонентов стимулируют окисление адреналина, а соединения антиоксидантной активности α-токоферол, L-аргинин и селенат натрия оказывают положительный эффект [Wen X. et al, 2013, Rees K. et al,2013]. Однако, литературные данные о механизме воздействия адреналина на оптические спектральные характеристики изоформ Nox клеточных компонентов тканей и экзосом сыворотки крови в отсутствии и присутствии α–тк, L-Арг и селената натрия *in vitro, ex vivo, in vivo* еще отсутствуют. Исходя из того, что свободный

гемоглобин играет дестабилизирующую роль на биомембраны [Simonyan R.M. et al, 2014], вкратце приведем некоторые новые данные о механизмах воздействия Hb на клеточные компоненты.

1.3. Гемоглобин-индуцирующий рилизинг изоформ Nox.

В последние десятилетия опубликованы данные о существовании в жидкостях тела млекопитающих (сыворотка, плазма, слюна, моча, грудное молоко, а также асцитные жидкости различного характера) наночастиц-экзосом, которые секретируются из нормальных и опухолевых клеток [Gallo A. et al, 2012]. Эти экзосомы с диаметром 30-100 нм имеют мембраны и содержат многочисленные некодирующие микро-РНК, которые регулируют экспрессию гена. Они являются биомаркерами сердечно-сосудистых [Zhu.H.et al, 2011], почечных [Van Balkom B.W. et al, 2011] заболеваний и рака простаты [Bryant R.J., 2012]. Экзосомы, секретируемые из тучных клеток костного мозга, стимулируют митогенную активность В и Т лимфоцитов *in vitro* и *in vivo*, усиливают процесс продуцирования цитокинов (ИЛ-2, ФНО) и являются компонентами иммунной системы [Skokos D. et al, 2001]. Они присутствуют и в асцитной жидкости карциномы яичника женщин и играют важную роль в развитии опухолевых клеток [Gutwein P.et al,2005]. Интересен и тот факт, что экзосомы обладают NADPH оксидазной активностью и продуцируют супероксидные и иминопероксильные радикалы [Marcela Helena G. et al, 2007]. С другой стороны, сыворотка крови стимулирует активность NADPH оксидазы, локализованной в мембранах нейтрофилов *in vitro*. При этом в самой сыворотке крови носителя злокачественного новообразования активность NADPH-оксидазы существенно повышена по сравнению с интактной сывороткой крови [Berridge M.V. et al, 2000, Ligeti E. et al, 1999].

Фракция экстрацеллюлярной NADPH оксидазы (eNox) впервые была выделена из сыворотки крови млекопитающих с использованием ионообменной хроматографии на целлюлозах КМ-52, ДЕ-52 и сефадексе ДЕАЕ А-50 [Симонян М.А. и др., 1995]. Эндогенный уровень eNox в сыворотке крови человека резко повышается при

лимфобластическом и миелобластическом лейкозах [Симонян Г.М, 2002], после аэробного инкубирования крови крыс *in vitro* [Симонян Р.М. и др., 2005], в сыворотке крови крыс при саркоме-45, при хронической интоксикации крыс ионами кадмия [Сираканян М.С. и др., 2006]. В приведенных патологических состояниях стабильность эритроцитов снижается, в результате чего происходит некоторый гемолиз эритроцитов и выброс Hb в сыворотку крови. При этом Hb, проникая в поврежденные участки эритроцитарных мембран (при липидной пероксидации ненасыщенных жирных кислот этих мембран), образует нестабильный комплекс с NO в лигандном окружении гемовой группы локализованного в этих мембранах Nox. Наличие этого комплекса является чувствительным маркером дестабилизации эритроцитарных мембран при заболеваниях различного характера, включая злокачественные новообразования и сердечно-сосудистые заболевания [Симонян Г.М. и др., 2003].

1.4. Механизмы действия селената натрия, α-токоферола, L-аргинина при оксидативном повреждении клеточных компонентов тканей крыс.

Селен (Se) является компонентом селен-содержащих белков и проявляет антиоксидантную активность, играет протективную роль при различных проявлениях оксидативного повреждения. Se оказывает протекторный эффект при индометоцин-индуцированном повреждении слизистой оболочки желудка крыс со снижением числа образующихся язв желудка. При этом повышается активность простагландина E_2, СОД, каталазы и ГПО на фоне снижения ПОЛ мембран клеток. Селен-содержащие белки оказывают антистрессорный эффект при сердечно-сосудистых и других хронических заболеваниях [ReesK. et al,2013]. При этом накопление селена стимулирует инсулин-независимый диабет. При дефиците селена у куриц, как результат повреждающих эффектов NO•, существенно повышается активность iНОС (нитрикоксидсинтаза), с усилением апоптоза клеток органов иммунной системы и повышением экспрессии мРНК каспаз-3 [Zhang Z.W. et al, 2013]. Экспрессия селенопротеина антиоксидантной активностью повышается в мозговой ткани

человека, этим оказывая нейропротекторный эффект с регулированием уровня внутриклеточного кальция при болезни Альцгеймера и снижения агрегации β-амилоида в мозговых клетках [Chen P.et al, 2013]. Диетический селен органического и неорганического происхождения снижает Cd-индуцированный токсический эффект, регулируя антиоксидантный статус и иммунную активность животных [Al-WaeliA. et al, 2012]. При цисплатин-индуцированной спермотоксичности повреждение РНК и хроматина подавляется наночастицами селена, с проявлением антиоксидантного эффекта [Rezvanfar M.A. et al, 2013]. Органические селен-содержащие аминокислоты - селеноцистеин и селенометионин - оказывают непосредственный антиоксидантный эффект и являются источниками для синтеза селен-зависимых антиоксидантов(ГПО, тиоредоксин редуктаза, метионин сульфоксид редуктаза). При этом селен-содержащие аминокислоты являются хелаторами редокс-активных ионов металлов [RahmantoS. et al, 2012]. Натрий селенат (100 нМ) и селенометионин (500 нМ) защищают трофобластические клетки от оксидативного повреждения, индуцированного перекисью водорода (200-400 μM), которая нарушает функционирование этих клеток [WatsonM.et al, 2012]. Диетический селенат за счет антиоксидантного эффекта проявляет противоопухолевый эффект, предотвращая оксидативное повреждение активными формами кислорода, снижая этим гибель клеток [RamoutarR.R. et al, 2010]. Противоопухолевый эффект селена ассоцирован также с индукцией ГПО и подавлением ПОЛ мембран клеток при гепатокарциноме у крыс, с повышением активности СОД и каталазы [Bjorkem-BergmanL.etal, 2012,GhadiF.E.et al, 2012]. Однако механизмы воздействия селена на рилизинг Nox из клеточных мембран как ключевого компонента иммунной системы [Briggs R.T. et al, 1975, Brar S.S.et al, 2001; Brar S.S.et al, 2002, Vignais P.V.,2002] еще не определены. В настоящее время наряду с ферментными антиоксидантами широко исследуются механизмы действия неферментативных антиоксидантов (L-Арг и α-Тк) как факторов стабилизации биомембран и других биосистем. Это становится актуальным, так как механизмы стабилизации биомембран ассоциированы и с новым явлением-отщеплением (рилизинг) из них изоформ Nox, которые являются важными структурно-функциональными компонентами биомембран. L-Арг играет важную

физиологическую роль для регуляции функции сердечно-сосудистой системы, повышения антиоксидантной защиты и для продуцирования NO•· и полиаминов в эндотелиальных клетках [JableckaA et al, 2012]. L-Арг в физиологических количествах (0,1 мМ) повышает экспрессию структуральных белков (виментина и тропомиозина) эндотелиальных клеток сосудов, подавляя экспрессию стресс-индуцирующих белков. L-Арг проявляет неаддитивный эффект на функциональное состояние сердца или экспрессию антиоксидантных ферментов при физических упражнениях в эксперименте [Lei X. et al, 2011]. При комбинированном использовании L-Арг и витаминов, обладающих антиоксидантным действием, наблюдается улучшение кровообращения с повышением продуцирования NO•· в условиях ишемии- реперфузии у кроликов [Nanobashvili J. et al, 2004]. При пероральном приеме L-Арг у больных атеросклерозом наблюдается повышение суммарного антиоксидантного статуса, что подчеркивает антиоксидантный эффект этой аминокислоты [JableckaA. et al, 2004]. L-Арг повышает уровень NO• и оказывает кардиопротекторный эффект, снижая уровень АФК в изолированной сердечной ткани крыс [TuncyurekP. et al,2006]. При адреналин-индуцированном нарушении антиоксидантного статуса сердечной ткани крыс метилэстер N(омега)-нитро-L-аргинин (N-ОНЛА) играет положительную роль, снижая уровень продуктов ПОЛ [Perovic A. et al, 2008; JakovlevicV.L.et al, 2006]. L- Арг играет регулирующую роль при регенерации клеток. Периорально введенный L-арг у больных с атеросклерозом (3х2 г/день) вызывает повышение концентрации NO• и суммарного антиоксидантного статуса, оказывая антиоксидантный эффект [NiuX.L.et al, 2012]. При перорриальной подачи L-арг больным с атеросклерозом наблюдается повышение суммарного антиоксидантного статуса, подчеркивая антиоксидантное воздействие этой аминокислоты. В свою очередь L-арг повышает уровень NO• и оказывает кардиопротективный эффект, снижая уровень АФК в изолированной сердечной ткани крыс [Suessenbacher A. et al,2002]. При адреналин-индуциированном нарушении антиоксидантного статуса сердечной ткани крыс N(омега)-нитро-L-аргинин метилэстер (L-NAME) играет положительную роль снижая уровень ПОЛ[Sigola L et al, 2000]. Приведенные эффекты L-аргинина, возможно, связаны и с

эффектом повышения каталазной активности [Товмасян М.С., 2008], с соответственным подавлением липидной пероксидации мембран клеток печени крыс в первую очередь высокоактивными гидроксильными радикалами путем снижения ПОЛ [Jab A. et al, 2004]. При ингибировании синтазы оксида азота (НОС) и снижении уровня NO•· наблюдается изменение равновесия анти- и прооксидантных систем на фоне увеличения уровня ПОЛ, снижается гемоглобин - кислородное сродство при липополисахарид - индуцированном оксидативном повреждении. В этом случае L-Арг оказывает протективный эффект в эксперименте [GlebovA. et al, 2008]. L-Арг и спермидин подавляют гликолизацию гемоглобина и ПОЛ в плазме крови при диабете крыс *in vitro* [MendezD. et al, 2006]. При оксидативном повреждении слизистой оболочки желудка крыс после перорального введения ибупрофена (100 мг/кг), внутрибрюшинно введенный L-Арг оказывает протективный эффект, снижая ПОЛ [Jiménez M.D. et al, 2004]. В зависимости от концентрации, NO•· оказывает цитопротекторный и цитотоксичный эффекты в условиях ишемии - реперфузии тканей. Исследуются эффекты L-Арг (субстрат для продукции NO•) и N-ОНЛА (ингибитор НОС) на активность СОД, уровень МДА, нитратов и гистопатологических структур в седалищном нерве крыс после 2 часов ишемии и 3 часов реперфузии. При этом, реперфузия вызывает повышение уровня МДА и снижение активности СОД в этом нерве, а N – ОНЛА и L-Арг вызывают снижение ПОЛ [Jiménez M.D.et al,2004].

Другой антиоксидант неферментативного характера α-Тк совместно с селеном и коэнзимом Q10 проявляют протективный эффект у больных при псориазе [Kharaeva Z. et al,2009]. Под влиянием ежедневно потребляемого α-Тк (400 международных единиц) у пациентов наблюдаются явления интоксикации [Kharaeva Z. et al, 2008]. Натуральный витамин Е состоит из 4 аналогов (альфа, бета, гамма и дельта) и все они обладают антиоксидантным эффектом, однако альфа и бета формы обладают и противовоспалительным действием [Reiter E. et al, 2007, Jiang Q. 2014]. При недостатке α-Тк наблюдается снижение стабильности эритроцитарных мембран (ЭМ) и нервной системы, а α-Тк совместно с витамином С проявляют противовоспалительный эффект и предотвращают ПОЛ мембран [LeiX.et al, 2011]. α-Тк оказывает неврологическое действие, подавляет агрегацию тромбоцитов и

окисление ненасыщенных жирных кислот [Muller D.P., 2010]. Таким образом, ключевые механизмы антиоксидантного и мембраностабилизирующего действия α-Тк, в большинстве случаев, ассоциированы с подавлением ПОЛ. α-Тк имеет различные биологические функции: обладает антиоксидантной активностью [Bell E.F., 1987], регулирует ферментативную активность [Sethi R. et al,2004; Rosic et al, 2016], экспрессию гена [Azzi A. et al, 2000, Barzedar A. et al, 2011], функционирование сигнальных клеток нервной системы [Azzi A. et al, 2007; Zingg J. et al, 2004]. Как антиоксидант α-Тк растворяется в липиде и является скавенджером гидропероксильных радикалов ($HO_2^{\bullet}$), путем реагирования с ними, предотвращая цепным механизмом размножение свободных радикалов в тканях. Далее α-Тк превращается в токоферильный радикал, который в последствии окисляется донорами водорода (аскорбиновая кислота, убихинон, ретинол) и возвращается в интактное состояние [Traber M.G. et al, 2011; Traber M.G.et al,1999]. При этом α-Тк взаимодействует и с глутатион пероксидазой [Wefers H.S., 1988]. Как липидрастворимое соединение α-Тк защищает клеточные мембраны от оксидативного повреждения, вызванного АФК, в первую очередь гидроксильными радикалами. α-Тк обладает способностью подавления активности протеин киназы С, которая участвует в процессе регуляции и развития клеток гладких мышц. Он стимулирует активность дифосфорилирующих ферментов (протеин фосфатсза 2А) [Sethi R. et al, 2004]. α-Тк влияет на экспрессию гена, путем модуляции экспрессии фактора развития соединительных тканей [Villacorta L. et al, 2003]. Неврологическая функция α-Тк состоит в подавлении агрегации тромбоцитов. С другой стороны, α-Тк защищяет липиды, предотвращает окисление полиненасыщенных жирных кислот [Azzi A. 2007; Zingg J. et al, 2004]. Действуя приведенными механизмами, α-Тк оказывает протективный эффект при адреналин-индуцированной кардиотоксичности, снижая некроз клеток миокарда. Совместно с N-ацетилцистеином, α-Тк существенно снижает продолжительность эпинефрин-индуцированной аритмии у крыс [Sethi R.et al, 1988]. α-Тк не растворяется в воде, однако, имеются его водорастворимые аналоги, которые также проникают через биомембраны и оказывют антистрессорный эффект при различных патологических состояниях. α-Тк совместно с аскорбиновой кислотой

регулирует фактор индукции гипоксии при злокачественных новообразованиях, инфекциях и воспалениях [Traber M.G. et al, 2911]. Путем снижения уровня активного кислирода α-Тк стабилизирует ЭМ и другие клеточные мембраны. С другой стороны, антиоксиданты различного характера (СОД, каталаза, церулоплазмин), а также синтетический аналог нейропептида из нейросекреторных гранул гипоталамуса - галармин, снижают степень самоотщепления (рилизинг) Nox из ЭМ в экстримальных условиях (при pH10-10,5) *in vitro* [Симонян Р.М.,2003]. Однако, механизмы рилизинга Nox из биомембран в гомогенную фазу, в близких к физиологическим условиям остаются нерешенными.

Можно заключить, что литературные данные о молекулярно-биохимических механизмах на оптическом спектральном уровне, воздействия адреналина на новые свойства изоформ Nox клеточных и субклеточных компонентов *in vitro, ex vivo* и *in vivo* отсутствуют.

ГЛАВА 2

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Используемые материалы, приборы и иные приспособления

Для выделения и очистки изоформ Nox из крови и клеток тканей млекопитающих были использованы целлюлозы DE-52, KM-52 («Whatman», Англия), сефадексы DEAE A-50 и G-100 (“Pharmacia”, Швеция). Для определения супероксиддисмутазной активности антиоксидантов или O_2^--продуцирующей активности изоформ Nox были использованы нитротетразолиевый синий (НТС), феназин метасульфат (ФМС), пирофосфат натрия, динатриевая или тетранатриевая соль NADPH, краситель кумасибрилиантовый синий (КБС) и перекись водорода. Для приготовления буферных растворов использовали одно- и двухзамещенный фосфат калия (марки «чистый для анализа»). Для изменения pH растворов использовали соляную кислоту.

Электрофорез белков был осуществлен на приборе венгерского производства с соответствующими реактивами и приспособлениями. Остальные реактивы (натрий хлористый, NaOH, KOH и др.) также были маркой “чистый для анализа”. Для размельчения ткани был использован стеклянный гомогенизатор с тефлоновым пестиком. Для проведения ионообменной хроматографии были использованы стеклянные колонки со стеклянными фильтрами размерами: 4×30 см, 2×20 см, 1×15 см, а для гель-фильтрации: 3×90 см и 2×70 см. При очищении эритроцитарных мембран, ядер, митохондрий и мембран клеток тканей были использованы центрифуги К-24 и К-70 («Veb MLW Zentrifugenbaum Engelsdorf», Германия). Оптические спектральные измерения осуществляли на спектрофотометре «Specord UV/VIS» (Германия), с длиной оптического пути 1 см, при комнатной температуре.

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли общеизвестным методом вариационной статистики Стьюдента-Фишера, с определением критерия достоверности "p″.

2.2. Используемые методы

Для выделения и очистки Nox из эритроцитарных мембран, мембран клеток и субклеточных компонентов тканей (сердце, печень, почки, легкие), а также из экзосом сыворотки крови и асцитной жидкости были использованы лицензированные методы Симоняна М.А. и др., 1997; Симоняна Г.М. и др., 2001; Симоняна Р.М. и др., 2008; 2013; 2014.

2.2.1. Очищение мембран митохондрий, ядер и клеток сердечной ткани и селезенки крыс. После промывания ткани (по 0,5-30 г) физиологическим раствором и взвешивания проводили ее гомогенизацию в 0,25М растворе сахарозы (1г ткани в 10 мл сахарозы) в течение 3 мин при 4^{o}С. Ядра клеток осаждали при центрифугировании гомогената 5 мин при 1000 об/мин (для сердечнной ткани) и 3000 об/мин (для остальных тканей). Митохондрии осаждали после центрифугирования супернатанта при 10.000 об/мин, 10 мин. Из полученного супернатанта мембраны клеток осаждали после их центрифугировании при рН5,6 в течение 10 мин, при 6000 об/мин. Осадки мембран, ядер и митохондрий промывали водой (1:500 об/об) и после центрифугирования смесей в приведенных условиях осадки повторно гомогенизировали в воде (1:50 об/об).

2.2.2. Очищение эритроцитарных мембран. После гемолиза очищенных от следов элементов плазмы эритроцитов (1мл и больше) в воде (1:10 об/об) эритроцитарные мембраны (ЭМ) осаждаются центрифугированием смеси при рН 5,6, при 6000 об/мин, 10 мин. Осажденные ЭМ далее четырехкратно промываются 0,04 М калий фосфатным буфером, рН7,4 (КФБ) до получения бесцветного супернатанта (для полного удаления следов гемоглобина). Осадок ЭМ далее промывается водой (1:500 об/об) и после центрифугирования в приведенном режиме осадок очищенных ЭМ гомогенизируется в воде (1:30 об/об).

2.2.3. Выделение плазматических мембран цитозоля клеток.После выделения ядер, митохондрий дифференциальным центрифугированием мембраны клеток осаждаются центрифугированием при pH5,6. В этих условиях плазматические мембраны цитозоля не осаждаются и остаются в надосадочном растворе [Симонян Р.М. и др., 2014].

2.2.4. Выделение и очистка Nox из мембран клеток, мембран внутриклеточных компонентов тканей и эритроцитарных мембран крыс. Nox из водных смесей мембран клеток селезенки (МКС), сердечной ткани (МКСТ) и костного мозга (МККМ) и эритроцитарных мембран (ЭМ) 30 г, 25г, 1,5 г, 1 мл соответственно, а также из плазматических мембран цитозоля выделяли и очищали следующей последовтельностью. Очищенные МКС, МКСТ, МККМ и ЭМ смешивали с водой (1:5 об/об) и повторно гомогенизировали в аналогичном режиме. После солюбилизации фракций изоформ Nox из очищенных МКС, МКСТ, МККМ и ЭМ при pH 9,5, удаления нерастворимых осадков центрифугированием в аналогичных условиях и диализа надосадочных растворов против воды, для удаления следов гемоглобина или других сопутствующих белков основного характера, фракции Nox подвергали ионообменной хроматографии на отдельных колонках с целлюлозой КМ-52, уравновешенной 0,004 М калий фосфатным буфером (КФБ), pH 7,4. Не задержавшиеся на колонке с КМ-52 белковые фракции далее подвергали ионообменной хроматографии на колонке с целлюлозой ДЕ-52. После промывания колонки сначала водой, а затем - 0,01 М КФБ, изоформы Nox из колонки ДЕ-52 элюировали 0,2 М КФБ. После гель-фильтрации этих Nox на колонке с сефадексом G100, центральная фракция имела электрофоретически гомогенное состояние (об этом свидетельствует наличие единой окрашенной белковой полосы на 10% полиакриламидном геле). В дальнейшем процедура диализа белковых растворов не проводится, они разбавляются водой (до 30 раз), снимается и хроматографирование на целлюлозе КМ-52, при этом белковые растворы инкубируется с 15 μМ ферриHb при pH7,4-8 в течение 2 ч при 37^{o}C и после центрифугирования осуществляется ионообенная хроматография на колонке с ДЕ-52 [Симонян Р.М. и др., 2013, 2014]

2.2.5. Выделение экстрацеллюлярной Nox из сыворотки крови крыс и асцитной жидкости карциномы яичника женщин. После инкубации очищенную от следов эритроцитов и плазменных клеток сыворотки крови (СК) и асцитной жидкости яичника женщин в течение 4-х суток при 4^{o}C их подвергали диализу против воды. После центрифугирования диализата (13000 об/мин, 10мин) и удаления из надосадочного раствора липопротеина высокой плотности – супрола [Симонян М.А. и др., 1996], повторным центрифугированием супернатанта при pH 5,6 фракцию экстрацеллюлярной NADPH оксидазы (eNox) выделяли ионообменным хроматографированием надосадочного раствора на сефадексе ДЕАЕ А-50. Из этой колонки фракцию eNox элюировали 0,04 М КФБ. Далее, после разбавления элюата водой (в 30 раз) и ионообменного хроматографирования на колонке с целлюлозой ДЕ-52, фракцию eNox элюировали 0,04 М КФБ. Путем гель фильтрации фракции eNox на колонке с сефедексом G100, центральная фракция имела электрофоретически гомогенное состояние. Уровень Nox определяли путем измерения характерной для Nox (цитохрома b_{558})оптической плотности при 530 нм (β полоса поглощения). Удельное содержание Nox из МКС, МКСТ, МККМ, ЭМ и eNox определяли из расчета на 1 мл раствора Nox, полученного из 1 г тканей, 1 мл сыворотки и 1 мл эритроцитов.

2.2.6. Определение NADPH зависимой O_2^--продуцирующей активности изоформ Nox.NADPH зависимую O_2^--продуцирующую активность изоформ Nox определяли нитротетразолиевым синим (НТС) методом, путем вычисления процента образующегося формазана при 560 нм в результате восстановления НТС супероксидными радикалами. За единицу NADPH зависимой O_2^-- продуцирующей активности Nox принимали количество белка (плотность оптического поглощения β-полосы цит b_{558} при 530 нм), которое стимулирует образование формазана на 50%. Удельная NADPH зависимая O_2^--продуцирующая активность Nox была определена в расчете на 1 мл эритроцитов, 1 мл сыворотки или 1 г тканей.

2.2.7. Определение ферригемоглобин-восстанавливающей активности Nox. Ферригемоглобин(ферриHb)-восстанавливающую активность изоформ Nox

определяли используя свежеполученный ферриHb цитоплазмы эритроцитов крыс с величиной плотности максимального оптического поглощения (α-полоса поглощения) при A_{565}=0,8. Непосредственно в кварцевые кюветы спектрофотометра к 3 мл раствора ферриHb добавляли 0,2 мл Nox (цит b_{558})с A_{530}=0,3. После перемешивания реакционной смеси ее инкубировали в аэробных условиях в течение 15-16 ч при 30°. Далее, после повторного перемешивания реакционной смеси, определяли кинетику восстановления ферриHb до ферроHb, путем измерения снижения плотности α-полосы поглощения ферриHb при 565 нм (это прямо пропорционально количеству образующегося ферроHb при A_{555}). За единицу ферриHb-восстанавливающей активности NADPH оксидазы принимали количество белка, вызывающего снижение плотности максимального оптического поглощения α-полосы ферриHb величиной до 0,05 оптических единиц в течение часа при 20°. Удельная ферриHb-восстанавливающая активность Nox была определена в расчете на 1 мл эритроцотов, 1 мл сыворотки и 1 г тканей [Simonyan G.M.et al,2006; Алексанян и др., 2010].

2.2.8. Определение СОД-миметической активности селената натрия методом восстановления НТС супероксидными радикалами. СОД-миметическую активность Na_2SeO_3 определяли НТС методом, путем вычисления процента подавления образования формазана (при 560 нм) в результате восстановления НТС супероксидными радикалами. За единицу O_2^- дисмутирующей активности селената принимали количество этой соли, которое подавляет образование формазана на 50%.

2.2.9. Определение СОД-миметической активности селената натрия методом обесцвечивания КБС супероксидными радикалами. СОД-миметическая активность селената натрия была определена и КБС методом. Суть этого метода заключается в следующем. После добавления к раствору перекиси водорода (200 мкМ) КОН до pH8-8,2 и инкубирования раствора при комнатной температуре в течение 20-25 мин, образуются O_2^- с характерными ЭПР спектрами (с фактором

Ланде–2,2). Эти O_2^- ферментативно дисмутируются изоформами СОД. С другой стороны генерированные O_2^- обесцвечивают (восстанавливают) КБС, а СОД подавляет этот процесс. Путем вычисления степени подавления скорости обесчвечивания КБС супероксидами определяется антиоксидантная активность селената натрия.

2.2.10. Определение молекулярной массы eNox. Молекулярную массу e*Nox* из асцитных жидкостей и сыворотки крови определяли гель-фильтрационным методом на колонке с сефадексом G-100, используя в качестве маркеров цитохром С и Cu,Zn-COD из печени быка, трансферрин и церулоплазмин из сыворотки плацентарной крови женщин, каталазу из печени быка.

2.2.11. Процедура проведения экспериментов.

1. В экспериментах ***"Окисление адреналина NADPH оксидазами и изменения их активностей и форм оптических спектров поглощения in vitro"***полученные пробы водных гомогенатов компонентов клеток разделяли на две группы: контрольные (К) и опытные (ОП) и к последним добавляли 50 μM адреналина, что является эффективным количеством для получения достаточного уровня продуктов окисления адреналина (адренохром, аминохромы) и воздействия на клеточные компоненты. К и ОП пробы инкубировали при 4^o С и pH 7,4-8, в течение 6 ч. К пробам сыворотки добавляли 15 μM ферригемоглобина и инкубировали в приведенных условиях. Далее осуществляли выделение из К и ОП проб фракций Nox из сыворотки крови, ЭМ, мембран клеток селезенки (МКС), ядер клеток селезенки (ЯКС), митохондрий клеток селезенки (МИКС), из мембран клеток костного мозга (МККМ), ядер клеток сердечной ткани (ЯКСТ), мембран клеток сердечной ткани (МКСТ) и митохондрий клеток сердечной ткани (МИКСТ).

2. В экспериментах ***"Рилизинг NADPH оксидазы из клеточных компонентов крыс и стимулирование активности этого фермента аминохромами ex vivo"*** пробы водных гомогенатов мембран клеток и мембран субклеточных компонентов разделяли на две части: контрольные (К) и опытные (ОП) и к последним добавляли 50

μM адреналина, что является эффективным количеством для получения достаточного уровня продуктов окисления адреналина и воздействия на клеточные компоненты. К и ОП пробы инкубировали при 4^{o} при pH 7,4-8 в течение 4 дней. К пробам сыворотки добавляли 15μM ферригемоглобина. Далее осуществляли выделение из К и ОП проб фракций Nox из сыворотки крови, ЭМ, мембран клеток селезенки (МКС), ядер клеток селезенки (ЯКС), митохондрий клеток селезенки (МИКС), из клеток костного мозга (ККМ), ядер клеток сердечной ткани (ЯКСТ), мембран клеток сердечной ткани (МКСТ) и митохондрий клеток сердечной ткани (МИКСТ). Во второй серии экспериментов после диализа против воды растворов Nox и eNox приведенных групп осуществляли ионообменную хроматографию на целлюлозе ДЕ-52, гель-фильтрацию на сефадексе G100 и концентрирование на целлюлозе ДЕ-52 для удаления следов несвязанного с Nox адренохрома или аминохрома. Далее определяли NADPH зависимую O_2^--продуцирующую и ферриHb-восстанавливающую активности Nox приведенных проб.

3. В экспериментах «***Роль гемоглобина в процессе появления экстрацеллюлярной NADPH оксидазы в сыворотке донорской крови и асцитной жидкости яичника женщин"*** асцитную жидкость карциномы яичника женщин (по шесть больных, 46-55 лет), с давностью заболевания 1,2 и 3,5 года была доставлена из онкологического диспансера г. Гюмри.Следы эритроцитов и плазменных клеток из асцитной жидкости карциномы яичника и сыворотки донорской крови были удалены путем их центрифугирования при 14000 об/мин, 15 мин. Супернатанты, которые имели слабо-розовый цвет у пациентов с давностью заболевания 1,2 года (с содержанием Hb до 13μM) и темно красный цвет, с давностью заболевания 3,5 года, (с содержанием Hb до 40μM) центрифугировали в приведенных условиях и после разбавления водой (20-25 раз) фракции экстрацеллюлярной NADPH оксидазы из асцитной жидкости карциномы яичника выделяли и очищали аналогичным путем, без инкубирования асцитных жидкостей в приведенных условиях Симонян Р.М. и др., 2013].

4. В экспериментах ***«Подавление селенатом натрия рилизинг изоформ NADPH оксидазы из мембран клеточных формирований кардиомиоцитов крыс ex***

vivo» были определены изменение активности и интенсивности оптического спектра поглощения изоформ Nox (при 530 нм) полученной из мембран кардиомиоцитов, ядер и митохондрий под влиянием селената натрия, в концентрационно-зависимой манере (до 8 мг/мл), при этом биомембраны (по 3 мл) инкубировали с селенатом натрия ex vivo при 4^{o}, в течение 4 дней.

5. В экспериментах ***"Стимуляция ферригемоглобином рилизинга изоформ NADPH оксидазы из сыворотки крови и мембран субклеточных формирований кардиомиоцитов крыс и подавление этого процесса α-токоферолом и L-аргинином ex vivo».***РН сыворотки крови (по 5 мл) и проб водных смесей мембран ядер, митохондрий и кардиомиоцитов (с 10 мл водой) довели до 8 добавлением 0,1 М раствора КОН. В первой серии экспериментов к этим пробам мембран и сыворотки добавляли ферриHb 5 – 20 μM. Во второй серии экспериментов к пробам мембран и сыворотки добавляли ферриHb в приведенных количествах и 0,1 мг/мл α-Тк. В третьей серии экспериментов к пробам мембран и сыворотки крови добавляли ферриHb, α-Тк и L-арг (от 0,05 до 0,2 мг/мл). После интенсивного перемешивания инкубировали при 4 ^{o}C в аэробных условиях в течение четырех дней ex vivo. Затем осуществляли выделение фракций изоформ Nox из этих биообъектов. Были определены эффекты α-Тк и L-арг на рилизинг изоформ Nox из сыворотки крови и мембран клеточных компонентов кардиомиоцитов крыс при отсутствии и присутствии гемоглобина ex vivo.

6. В экспериментах "***Подавление L-аргинином гемоглобин-индуцирующего рилизинга NADPH оксидазы из мембран клеток аорты сердца крыс"*** с использованием открытого недавно явления комплексообразования ферригемоглобина с Nox и индукции рилизинга последней [Симонян Р.М., 2013]. Nox из клеток аорты сердечной ткани крыс были выделени и определены эффекты L-арг на этот рилизинг. В первой серии эксперимента водные гомогенаты очищенных клеточных мембран и мембран субклеточных формирований (по 10 мл) аорты сердца крыс инкубировали (при 4^{o} в течение 2-х дней при рН 7,4-8) в аэробных условиях в отсутствии (контрольные пробы – К) и присутствии (опытные пробы – ОП) 1 мг/мл L-арг. Во второй серии эксперимента после солюбилизации Nox (при рН 7,4-8) и

центрифугирования в аналогичных условиях, осадки мембран в отдельности повторно гомогенизировали с водой (по 10 мл) и инкубировали в аналогичных условиях, но при pH 10 в отсутствии (контрольные пробы –К) и присутствии (опытные пробы –ОП) 1 мг/мл L-арг. В третьей серии эксперимента очищенную сыворотку крови (по 10 мл) инкубировали с 15 μМферриHb также в отсутствии (К) и присутствии (ОП) 1 мг/мл L-арг (при 4^{o} в течение 4 дней при pH 7,4). Далее осуществляли выделение Nox и eNox вышеприведенными процедурами.

7. В экспериментах ***"α-Токоферол подавляет рилизинг изоформ NADPH оксидазы из мембран клеточных компонентов тканей крыс"*** **в** первой серии эксперимента водные гомогенаты очищенных клеточных мембран и мембран субклеточных формирований (по 10 мл) инкубировали (при 4^{o} в течение 2-х дней при pH 7,4-8) в аэробных условиях в отсутствии (контрольные пробы – К) и присутствии (опытные пробы – ОП) 1 мг/мл α-Тк. Во второй серии эксперимента после солюбилизации Nox (при pH 7,4-8) и центрифугирования в аналогичных условиях, осадки мембран в отдельности повторно гомогенизировали с водой (по 10 мл) и инкубировали в аналогичных условиях, но при pH 10 в отсутствии (контрольные пробы –К) и присутствии (опытные пробы –ОП) 1 мг/мл α-Тк. В третьей серии эксперимента очищенную сыворотку крови (по 10 мл) инкубировали (при 4^{o} в течение 4 дней при pH 7,4) с 15μМферриHb также в отсутствии (К) и присутствии (ОП) 1 мг/мл α-Тк.

8. В экспериментах ***«Активность, степень рилизинга и комплексообразование с ферригемоглобином изоформ NADPH оксидазы из клеточных образований тканей крыс под влиянием адреналина различной концентрации»*** животным (по 12 крыс в каждой группе, массой 220–240г) первой опытной группы – (ОГ-1) вводили по 1 мл физраствора один раз. Животным ОГ-2 вводили подкожно адреналин («Sigma», США) по 0,5 мг/кг массы животного растворенного в 1 мл физраствора, животным ОГ–3 и ОГ-4 вводили в аналогичном режиме по 1 мг/кг и 2 мг/кгадреналина. Через 4 часа животных декапитировали и забирали почки, легкие, печень, сердце и кровь, которую стабилизировали 0,2% оксалатом натрия, в условиях легкого перемешивания.

9. В экспериментах***«Регулирование уровня и активности изоформ NADPH оксидазы клеточных компонентов крыс при острой адреналиновой интоксикации под влиянием L-аргинина, α-токоферола и селената натрия»***в первой опытной группе (ОГ-1) крысам (по 12 животных) массой 220-240г подкожно вводили по 1 мл физиологического раствора. В ОГ-2 острую адреналиновую интоксикацию животных вызывали подкожным введением 2 мг/кг массы животного адреналина («Sigma», США), растворенного в 1 мл физраствора. Животным ОГ-3 через 20 мин после введения адреналина вводили по 50 мг/кг α-Тк (эффективная доза), растворенного в 1 мл растительного масла. Животным ОГ-4 после введения адреналина вводили по 4мг/кг L-Арг. Животным ОГ-5 после введения адреналина вводили по 5 мг/кг селената натрия (введенные L-Арг и селенат натрия были растворены в 1 мл физраствора). Через 4 часа после указанных процедур животных декапитировали и забирали почки, легкие, печень, сердце и кровь.

ГЛАВА 3

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Окисление адреналина NADPH оксидазами и изменения их активностей и форм оптических спектров поглощения *in vitro*.

К настоящему времени воздействие продуктов окисления адреналина (адренохром, аминохромы) на изменения оптических спектральных характеристик, уровня и активностей изоформ Nox в клеточных компонентах (мембран, митохондрий и ядер) селезенки, костного мозга, сердечной ткани, эритроцитарных мембран и сыворотки крови после аэробного инкубирования адреналина с этими компонентами *ex vivo* не определены. В результате инкубации адреналина (50 μM) с 50 μM электрофоретически гомогенными Noxиз сыворотки крови (eNox), МКСТ, МККМ, МКС и ЭМ в приведенных условиях наблюдается определенное изменение формы и интенсивности поглощения этих Nox (рис.1). Эти изменения обусловлены эффектом наложения плотности оптического поглощения Nox и адренохрома, как это показано на рис.2, на примере Nox из ЭМ (остальные Nox претерпевают аналогичные изменения). Однако, увеличение интенсивности поглощения Nox и, особенно, eNox при 530 нм (пунктирные линии на рис.1) не является эффектом аутоокисления адреналина, так как при инкубации 50 μM адреналина с 0,2 М КФБ в отсутствии Nox в аналогичных условиях образование адренохрома практически не наблюдается. Причем на начальных этапах (до 3 ч) инкубации Nox с адреналином происходит прямолинейное увеличение плотности поглощения Nox (при 530 нм). При дальнейшей инкубации увеличение плотности поглощения Nox уже ослабляется и происходит непрямолинейно. Эти результаты свидетельствуют о том, что Nox и eNox способны окислять адреналин до адренохрома. Более того, взятым от адреналина электроном (как дополнительный источник электрона, наряду с NADPH) приведенные NADPH оксидазы, видимо, восстанавливают O_2 превращая его в O_2^-, а последние уже способны окислять адреналин до адренохрома-аминохрома. Фактически это является механизмом активации Nox адреналином при

продуцировании O_2^-. Причем уровень адренохрома намного выше у eNox, по сравнению с другими Nox, как это показано на табл.1.

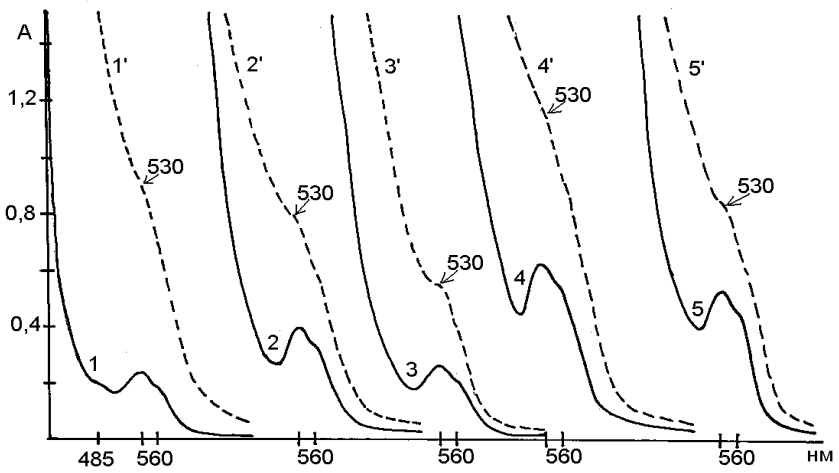

Рис. 1.*Оптические спектры поглощения Nox и eNox (50 μM) из: сыворотки крови (eNox,), до (1) и после 6 ч инкубации с 50 μM адреналином при 4° (1'), то же самое для Nox из МКСТ (2, 2'), из МККМ (3,3'), МКС (4,4') и ЭМ (5,5') до проведения ионообменной хроматографии и гель-фильтрации (А-адсорбция-плотность оптического поглощения).А – адсорбция (плотность оптического поглощения).*

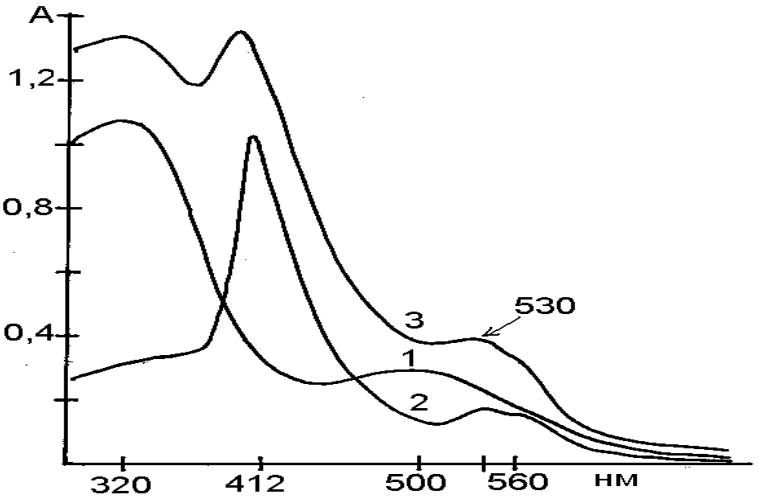

Рис. 2. *Оптические спектры поглощения адренохрома (1) и Nox, на примере Nox из ЭМ (2) до и после их смешивания и инкубации в течение 30 мин при 20° (3).*

Таблица 1.

Отношение плотности максимального оптического поглощения Nox и eNox (при 530 нм) до (A_o) и после инкубации 50 μM Nox с 50 мкМ адреналина (A_{on}) в течение 6 ч при 4^o.

Nox из:	**A_o**	**A_{on}**	**A_o/A_{on}**
СК eNox)	0,24	0,85	3,6
МКСТ	0,34	0,80	2,3
МККМ	0,27	0,53	1,96
МКС	0,62	1,13	1,82
ЭМ	0,52	0,83	1,59

После ионообменной хроматографии на целлюлозе ДЕ-52 и гель-фильтрации Nox и eNox на сефадексе G100 искаженность оптических спектров этих ферментов или на ложение спектров адренохрома и Nox несколько сохраняется (рис.3).

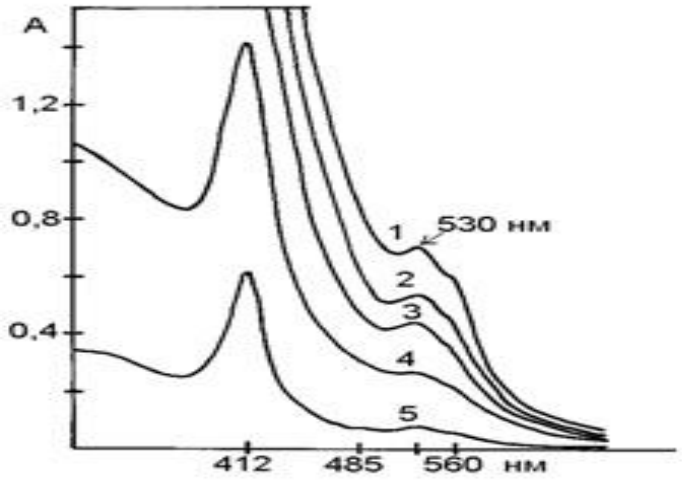

Рис.3.*Оптические спектры поглощения Nox и eNox (50 мкМ) после 6 ч инкубирования с 50 мкМ адреналином при 4^o, с последующим диализом против воды, ионообменным хроматографиро- ванием на целлюлозе ДЕ-52, гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-100 и концентрирования на ДЕ-52.*

Причем после ионообменной хроматографии на колонке с целлюлозой ДЕ-52 адренохром не задерживается на ней, в отличие от инкубационной смеси адренахрома с Nox, которая элюируется из этой колонки 0,4 М КФБ. Однако, даже после удаления избытка адренохрома NADPH зависимая O_2^--продуцирующая и ферриHb-восстанавливающая активности несколько подавляются у Nox из ЭМ, МКС и МККМ, МКСТ и eNox с искаженной формой оптического спектра (рис.3, табл.2).

Таблица 2.

Изменения NADPH зависимой O_2^--продуцирующей и ферриHb-восстанавливающей активностей изоформ Nox (50 μM) после их инкубации с 50 μM адреналина при 4^o в течение 6 ч, диализа против воды, ионообменного хроматографирования на целлюлозе ДЕ-52 и гель-фильтрации на сефадексе G100 (p <0,05, n=6).

Nox из:	NADPH зависимая O_2 - продуцирующая активность *		ферриHb-восстанавливающая активность*	
	К	+ адреналин	К	+ адреналин
ЭМ	14,6±2,3,p=0,03	6,6± 0,4, p=0,02	9,1± 0,6,p=0,04	4,1± 0,1,p=0,03
МКС	16,2±1,6,p=0,04	12,3±1,5,p=0,02	12,5±1,4,p=0,01	9,5±1,1, p=0,04
МККМ	18,5± 2,2,p=0,03	13,4±1,7,p=0,04	14,6±2,7,p=0,03	10,5±0,7,p=0,03
МКСТ	17,0±3,1,p=0,01	14,7±2,0,p=0,02	16,1±2,4,p=0,03	13,1±1,4,p=0,01
СК (eNox)	22,3±2,4,p=0,03	16,1±2,6,p=0,03	19,3,±2,2,p=0,3	13,1±2,1,p=0.01

***Примечание:**активность определена в расчете на 1г ткани (ед/г).

При этом после инкубирования изоформ Nox и eNox (до 50 мкМ) с 5 нМ адреналином в течение 30 мин при 20^0, с дальнейшим ионообменным хроматографированием на целлюлозе ДЕ-52 и гель-фильтрацией на сефедексе G-100, наблюдается стимулирование NADPH зависимой O_2^--продуцирующей и ферриHb-восстанавливающей активностей изоформ Nox (табл.3).

Таблица 3

Изменения NADPH зависимой O_2^--продуцирующей и ферриHb-восстанавливающей активностей изоформ Nox (10 μM) в присутствии 5 нМ адреналина (без инкубирования), (p <0,05, n=6).

Nox из:	NADPH зависимая O_2 - продуцирующая активность		ферриHb-восстанавливающая активность	
	К	+ адреналин	К	+ адреналин
ЭМ	14,6±2,3,p=0,03	17,8±3,3,p=0,01	9,1± 0,6, p=0,04	10,7±1,1,p=0,03
МКС	16,2±1,6,p=0,04	24,3±3,6,p=0,01	12,5±1,4,p=0,01	16,7±2,1,p=0,001
МККМ	18,5± ,2,p=0,03	22,2±3,0,p=0,04	14,6±2,7,p=0,03	16,8±2,6,p=0,01
МКСТ	17,0±3,1,p=0,01	25,3±4,4,p=0,03	16,1±2,4,p=0,03	21,2±2,4,p=0,01
СК (eNox)	22,3±2,4,p=0,03	27,1±4,2,p=0,01	19,3±2,2,p=0,03	23,6±3,2,p=0,04

Фактически, в повышенных концентрациях адренохром (аминохром) подавляет активности Nox, а в пониженных концентрациях – стимулирует их. Адренохром в определенных концентрациях необратимо связывается с молекулой Nox, которые, видимо, являются рецепторами адреналина. Этим путем адреналин в низких количествах активирует O_2^--продуцирующую и ферриHb-восстанавливающую активности Nox, а в избытке он подавляет их (возможно адренохром играет роль блокатора для Nox). Nox является и рецептором нейроактивного полипептида–

галармина, который в определенных количествах (до 10 мкг) стимулирует приведенные активности изоформ Nox [Simonyan M.A. et al, 2011].

Действуя подобным механизмом в соотвествующих количествах адреналин (адренохром) может стимулировать или подавлять активность иммунной системы (изоформы Nox являются ключевыми O_2^--продуцирующими ферментами, в частности, клеток органов иммунной системы – селезенки, костного мозга, а также кардиомиоцитов и эритроцитов), регулируя кислородный гомеостаз [Simonyan M.A. et al, 2011, Briggs R.T. et al, 1975, Vignais P.V., 2002]. Таким образом изоформы Nox из ЭМ, МКС, МКСТ, МККМ и eNox из сыворотки крови окисляют адреналин в адренохром, который способен необратимо связываться с определенным участком (доменом) молекулы Nox.

В следующей серии экспериментов была определена роль продуктов окисления адреналина в процессе отщепления изоформ Nox из биомембран.

3.2. Рилизинг NADPH оксидазы из клеточных компонентов крыс и стимулирование активности этого фермента аминохромами *ex vivo*.

В настоящее время механизмы воздействия окислительных продуктов катехоламинов, в частности адреналина, на метаболизм Nox мембран клеточных компонентах в гомогенной и гетерогенной фазах еще практически не определены. В зависимости от действующих концентраций адреналина и аналогов они по-разному изменяют уровни регулирующих метаболизм АФК систем. Так, адреналин в физиологических количествах (5-100 нМ) ингибирует формил-метионил-лейцил-фенилаланин (ФМЛФ)-индуцированное продуцирование полиморфонуклеарными нейтрофилами O_2^-. В физиологических количествах адреналин не ингибирует ФМЛФ-индуцированную транслокацию изоформNox p47phox (фагоцит оксидаза) и p67phox и фосфорилирование p47phox, но подавляет активность цитозольной фосфолипазы A(2) [D`Down Y.M. et al, 2004]. Адреналин способствует продуцированию высокоактивных гидроксильных радикалов изолированными гепатоцитами крыс. При этом продуцированные Nox-ой O_2^-, при их ферментативной

дисмутации, превращаются в перекись водорода и этот процесс стимулируется адреналином [Diar-Cruz A. et al, 2007]. Адреналин оказывает и кардиотоксический эффект, а антиоксидант кроцетин оказывает положительный эффект, повышая уровень GSH, СОД и снижая содержание Ca^{+2} и интенсивность протекания ПОЛ в клетках миокарда *in vitro* [Shen X.C. et al, 2009]. К настоящему времени воздействия продуктов окисления адреналина (аминохромы) на изменения оптических спектральных характеристик, уровня и активностей изоформ Nox в клеточных компонентах (мембран, митохондрий и ядер) селезенки, костного мозга, сердечной ткани, эритроцитарных мембран и сыворотки крови после аэробного инкубирования адреналина с этими компонентами *ex vivo* не определены. Увеличение рилизинга Nox наблюдался при повышенных pH среды, и этот процесс определенно подавлялся препаратами с антиоксидантной активностью [Симонян Г.М. 2009].

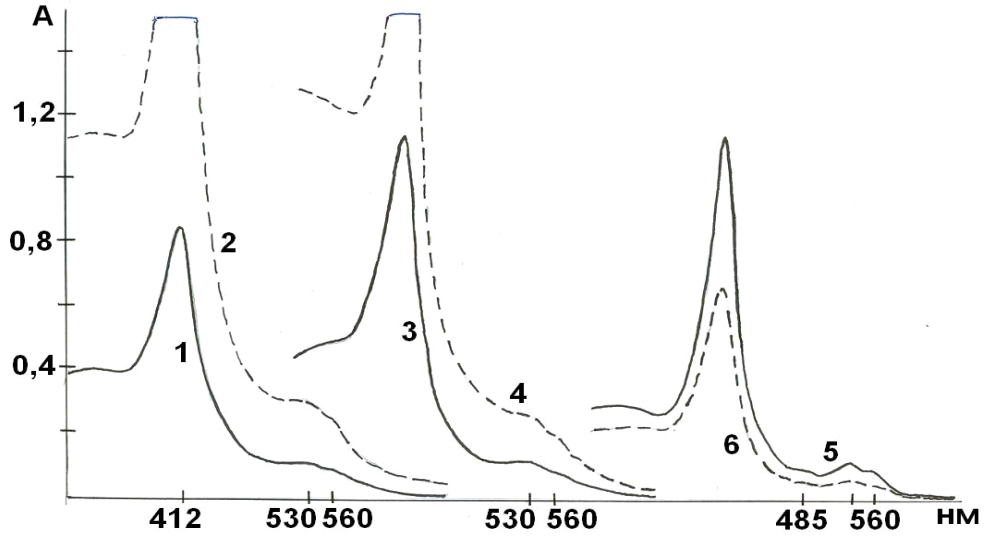

Рис.4. Оптические спектры поглощения фракции Nox из клеточных и внеклеточных компонентов К проб (сплошные линии), ОП проб Nox (пунктирные линии) до и после диализа против воды, до проведения ионообменной хроматографии растворов отщепленных Nox. Оптические спектры поглощения для Nox из эритроцитарных мембран (1,2); клеток костного мозга (3,4) и сыворотки крови – eNox (5,6).

Как показано на рис. 4 и 5, после удаления следов неприсоединившихся к отщепленной Nox продуктов окисления адренохрома (аминохромы) диализом против воды и центрифугирования, оптические спектры поглощения истинных растворов свежей фракций Nox у К проб (сплошные линии) и ОП проб (пунктирные линии) несколько отличаются у фракций Nox из: эритроцитарных мембран (1,2), костного мозга (3,4), а также eNox (5,6) из сыворотки крови. По сравнению с Nox из К проб интенсивность оптического поглощения Nox ОП проб повышена.

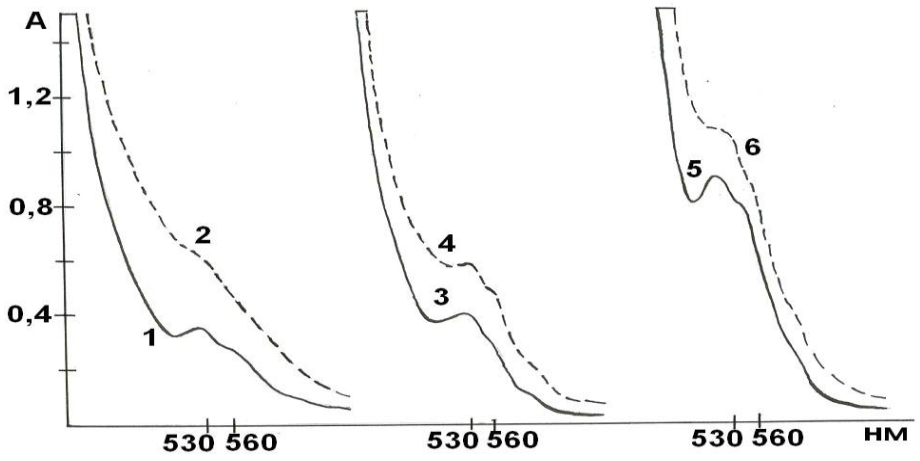

Рис.5.Оптические спектры поглощения фракции Nox из клеточных и внеклеточных компонентов К проб (сплошные линии), ОП проб (пунктирные)до и после их диализа против воды, до проведения ионообменной хроматографии растворов отщепленных Nox.

При этом наблюдается увеличение степени отщепления Nox из ЭМ и костного мозга, но снижение поглощения eNox сыворотки. Аналогичная закономерность наблюдается и у фракции Nox, отщепленной из митохондрий (1, 2), ядер (3, 4) и мембран клеток селезенки (5, 6), как это показано на рис.8.

По сравнению с К пробами, в ОП пробах интенсивность оптического поглощения и форма оптических спектров фракций Nox из ядер (1, 2) и митохондрий выше, но у мембран клеток сердечной ткани эти поглощения не отличаются (3, 4). Приведенные показатели несколько отличаются у фракции Nox из ядер клеток сердечной ткани (рис.6).

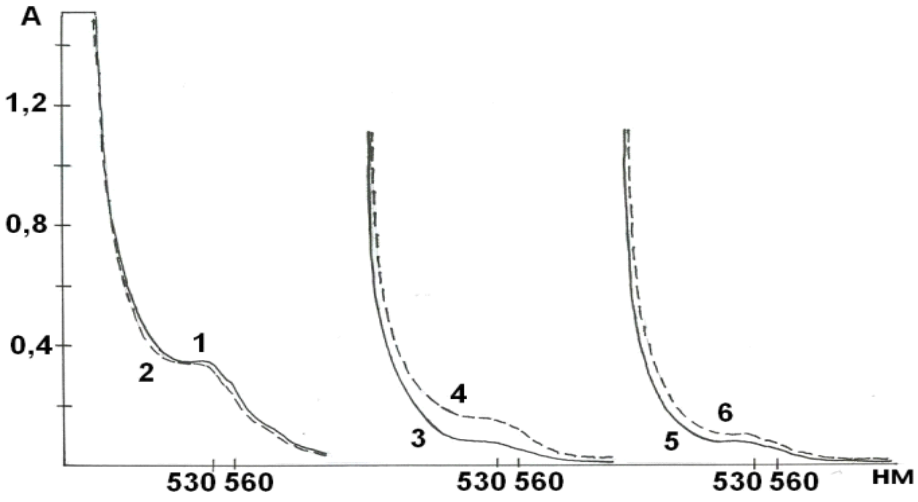

Рис.6. Оптические спектры поглощения фракции Nox из клеточных и внеклеточных компонентов К проб (сплошные линии), ОП проб (пунктирные линии)до и после их диализа против воды, до проведения ионообменной хроматографии растворов отщепленных Nox. Оптические спектры поглощения для Nox из ядер (1,2), мембран (3,4) и митохондрий клеток сердца (5,6).

Фактически, в результате диализа отщепленных от ЭМ, МКС, ЯКС, МИКС, МКСТ, МИКСТ и ККМ Nox против воды, определенное количество аминохромов в ОП пробах не отщепляется от фракций Nox и вызывает не только налаживание (увеличение) фона оптического поглощения (оптическое поглощения аминохрома наблюдается при 350 нм), но и стимулирование процесса самоотщепления Nox из клеточных компонентов. Однако эта закономерность не распространяется на eNox из сыворотки крови. Рилизинг eNox в сыворотке крови крыс в К и ОП пробах есть результат образования нестабильного комплекса между Nox в экзосомах и Hb в сыворотке крови и на этот процесс не влияют ферментные антиоксиданты (Cu,Zn-SOD, каталаза). Видимо, аминохромы путем повышения процесса ПОЛ клеточных остатков в гетерогенной фазе [Donaldson J. et al, 1983, Kresium V.I. et al, 1996, Sethi R. et al, 2009, Shen X.C. et al, 2009], стимулируют процесс отщепления Nox в гомогенную фазу. Этим аминохромы проявляют отрицательную,

дестабилизирующую роль на мембраны клеточных компонентов селезенки, костного мозга, сердечной ткани и эритроцитарных мембран. В следующей серии экспериментов регистрировали оптические спектры поглощения отщепленных Nox из ЭМ, МКС, ЯКС, МИКС, МКСТ, МИКСТ, ЯКСТ, МККМ и eNox из экзосом сыворотки крови после диализа против воды и ионообменной хроматографии на целлюлозе ДЕ-52.

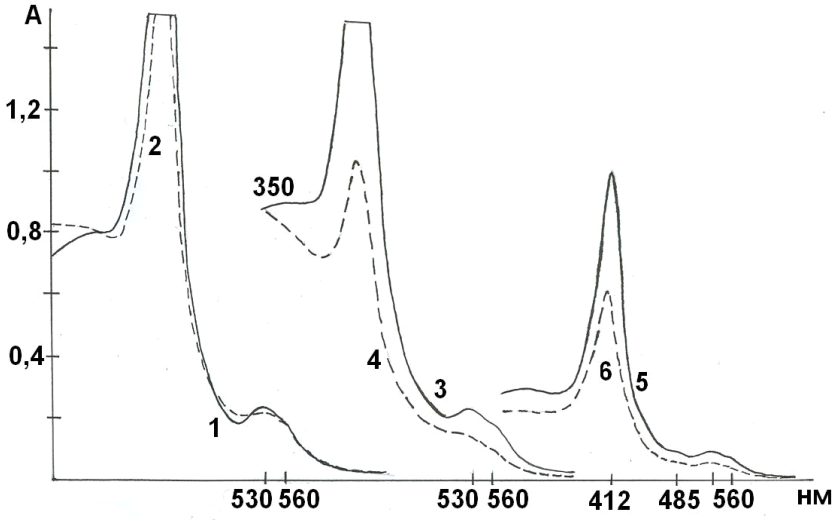

Рис.7. Оптические спектры поглощения фракции Nox из клеточных и внеклеточных компонентов К-проб (сплошные линии), ОП-проб (пунктирные линии), после их диализа против воды и проведения ионообменной хроматографии растворов отщепленных Nox на целлюлозе DE-52. Оптические спектры поглощения для Nox из эритроцитарных мембран (1,2), клеток костного мозга (3,4) и сыворотки крови - eNox (5,6).

Как показано на рис.7, в результате ионообменной хроматографии на целлюлозе ДЕ-52 интенсивность оптических спектров поглощения Nox из эритроцитарных мембран (1,2), костного мозга (3,4), а также eNox из сыворотки крови (5,6) в опытных пробах существенно снижается у Nox из ККМ и eNox из сыворотки крови, но практически не изменяется у Nox из ЭМ. При этом в данном случае остатки аминохрома в определенных количествах не отделяются от молекул Nox, в результате чего фон поглощения при 350 нм несколько увеличивается.

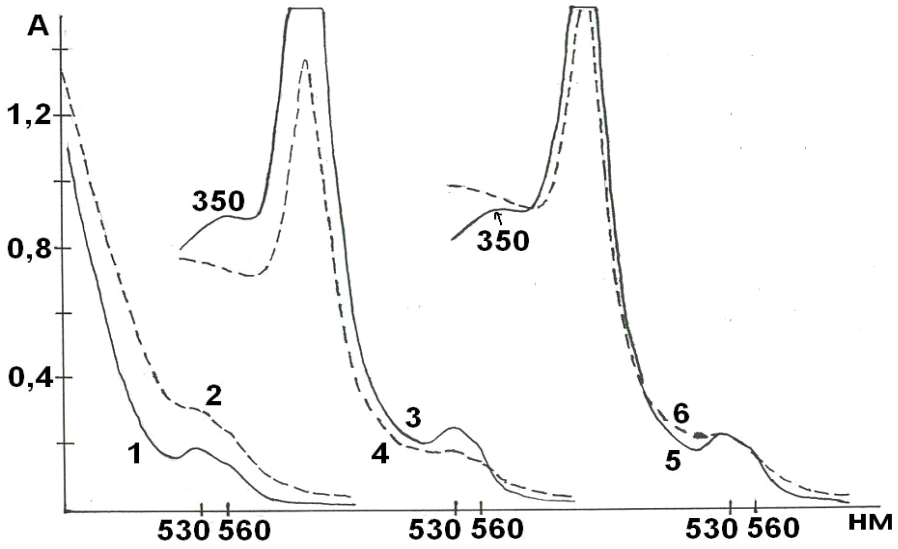

Рис.8. Оптические спектры поглощения фракции Nox из клеточных и внеклеточных компонентов К проб (сплошные линии) и ОП проб (пунктирные линии), после их диализа против воды и проведения ионообменной хроматографии растворов отщепленных Nox на целлюлозе DE-52. Оптические спектры поглощения для Nox из митохондрий (1,2), ядер (3,4) и мембран клеток селезенки (5,6).

Как показано на рис.8, интенсивность оптического поглощения спектров Nox из митохондрий (1,2), ядер (3,4) и мембран клеток селезенки (5,6) изменяется неодинаковым образом: она увеличивается у Nox из митохондрий клеток селезенки, снижается у Nox из ядер и практически не изменяется у Nox из мембран клеток селезенки. Однако фон поглощения при 350 нм также несколько сохраняется. Таким образом, сродство присоединения аминохрома к Nox из клеточных компонентов селезенки неодинаковое. При этом аминохром практически не связывается с eNox. После диализа и ионообменной хроматографии на целлюлозе DE-52 интенсивность оптического поглощения спектров растворов фракций Nox при 530 нм из компонентов клеток сердечной ткани в ОП пробах по сравнению с К пробами повышается (рис.9).

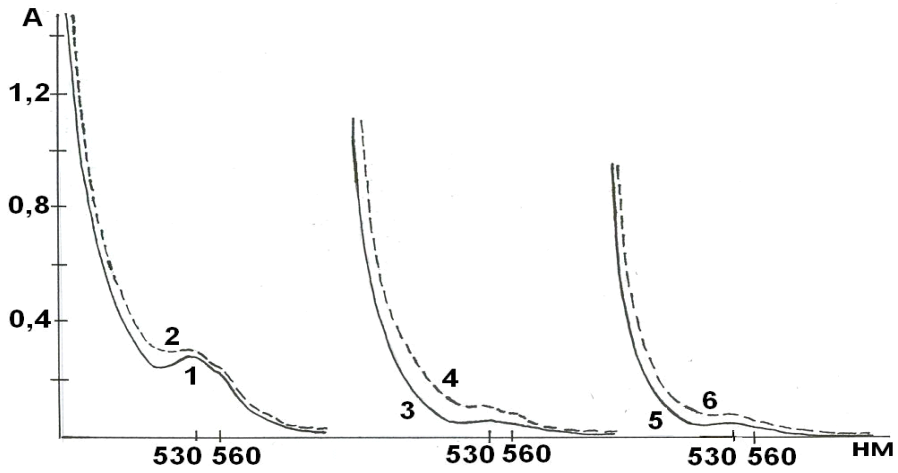

Рис.9. Оптические спектры поглощения фракции Nox из клеточных и внеклеточных компонентов К проб (сплошные линии) и ОП проб (пунктирные линии), после их диализа против воды и проведения ионообменной хроматографии растворов отщепленных Nox на целлюлозе DE-52. Оптические спектры поглощения для Nox: из ядер (1,2), мембран (3,4) и митохондрий клеток сердца (5,6).

В данном случае наблюдается фоновое поглощение аминохрома. По сравнению с К пробами, в ОП пробах до проведения ионообменной хроматографии удельное содержание фракции Nox в ЭМ, МКС, ЯКС, МИКС, МКСТ, МИКСТ и, особенно, ККМ существенно повышается: от 10,8±0,4% до 150,0±32,4%. При этом снижены только уровни Nox из сыворотки крови (55,4±4,9%) и из ЯКСТ (9,1±0,1%). В этих условиях наблюдается резкое увеличение удельного содержания у Nox из ККМ (A_{530} = 36,0 и A_{530} = 75,0 для К и ОП проб соответственно) (табл.4).

Такое повышение удельного содержания Nox из МККМ, отщепленных при pH 7,4, скорее всего, связано с тем, что оно является суммарным уровнем изоформ Nox клеточных компонентов костного мозга (в данном случае они еще не разделены). С другой стороны, деградирующие факторы при pH 7,4 намного ниже, чем при pH 10 и выше (раньше солюбилизацию Nox осуществляли при таких повышенных pH [Симонян Г.М. и др., 2008, Kresium V.I. et al, 1996]) и, наконец, уровень факторов, стимулирующих активность Nox (степень фосфорилирования определенных доменов молекулы Nox [Chessa T.A. et al, 2010, Tsai Y.R. et al, 2012], содержание кофакторов

ФАД, NADH) во фракции свежеполученной Nox, по-видимому, достаточен (их уровень снижается при процедуре очистки Nox).

Таблица 4

Удельное содержание (плотность максимального оптического поглощения β-полосы при 530 нм) фракции Nox в К и ОП пробах, после их диализа против воды до проведения ионообменной хроматографии отщепленных из них Nox (n =6, p<0,05).

Источники Nox	К	ОП	Разница, %
Сыворотка крови	0,09±0,01,p=0,001	0,04±0,006, p=0,01	↓55,4±4,9
ЭМ	0.4± 0,03,p=0,0001	1,0±0,07, p=0,03	↑150,0±32,8
МКС	3,7±0,2, p=0,02	0,4±0,01, p=0,001	↑10,8±0,4
ЯКС	4,8±0,5, p=0,002	6.0±0,5, p=0,01	↑25,0±3,6
МИКС	0,75±0,06,p=0,001	1,44±0,1, p=0,01	↑92,0±7,1
ККМ	36,0±7,1, p=0,004	75,0±3,7, p=0,002	↑108.3
ЯКСТ	2,2±0,1, p=0,002	2,0±0,4, p=0,006	↓9,1±0,1
МКСТ	0,13±0,02, p=0,001	0,23±0,01, p=0,002	↑76,9±6,9
МИКСТ	0,12±0,02, p=0,006	0,26±0,01, p=0,01	↑116,6±13,4

В результате диализа и ионообменной хроматографии фракций изоформ Nox из ЭМ, МКС, ЯКС, МИКС, МКСТ, МИКСТ, ЯКСТ, ККМ и eNox из сыворотки крови динамика изменения уровня этих ферментов практически сохраняется, хотя удельное содержание этих Nox значительно снижено в К и ОП пробах (табл.5). Это может быть связано с некоторым необратимым иммобилизирующим эффектом этих мембранных белков на целлюлозе ДЕ-52. Динамика изменения удельной NADPH-зависимой O_2^--продуцирующей активности отщепленных фракций Nox К и ОП проб (гомогенная фаза), а также клеточных компонентов после некоторого отщепления из них Nox (гетерогенная фаза) и диализа против воды существенно отличается (табл.4, 5).

Таблица 5

Удельное содержание (плотность максимального оптического поглощения β-полосы при 530 нм) фракции Nox в К и ОП пробах после их диализа против воды и проведения ионообменной хроматографии фракции отщепленных Nox на целлюлозе ДЕ-52 (n =6, p<0,05).

Источники Nox	К	ОП	Разница, %
Сыворотка крови	0,08±0,01, p=0,002	0,05±0,008,p=0,01	↓62,5±7,1
ЭМ	0,15±,02, p=0,002	0,38±0,03, p=0,04	↑153,3±20,0
МКС	0,28±,03, p=0,003	0,32±0,03,p=0,0001	↑14,2±1,6
ЯКС	0,48±0,03, p=0,001	0,35±0,01, p=0,001	↓27,1±4,7
МИКС	0,2±0,03, p=0,003	0,35±0,02, p=0,002	↑75,0±6,1
ККМ	17,6±2,5, p=0,001	20,4±2,2, p=0,01	↑15,9±2,7
ЯКСТ	1,12±0,08, p=0,002	1,10±0,08, p=0,002	↓1,8±0,2
МКСТ	0,07±,01,p= 0,001	0,12±,008,p=0,001	↑71,4±6,4
МИКСТ	0,09±0,01, p=0,004	0,19±0,02, p=0,001	↑111,1±9,3

Особое увеличение NADPH-зависимой O_2^--продуцирующей и ферриHb-восстанавливающей активности Nox из клеток костного мозга, по сравнению с активностью Nox из других клеточных компонентов (табл 6-9), имеет определенное физиологическое значение, так как стволовые клетки костного мозга для проведения аэробных метаболических процессов различного характера должны продуцировать повышенные количества O_2^- NADPH оксидазами, включая процессы стимуляции развитии и пролиферации клеток поврежденных тканей [Novo E. et al,2011, Piccoli C. et al, 2007, Urao N. et al, 2012].

Таблица 6

Удельная NADPH зависимая O_2^- -продуцирующая активность Nox К и ОП проб в гомогенной фазе после их диализа против воды (n =6, p<0,05).

Источники Nox	К	ОП	Разница, %
Сыворотка крови	16,0±1,7,p=0,002	13,7±1,2, p=0,002	↓14,4±1,4
ЭМ	11,1±1,6,p=0,001	44,2±5,2, p=0,005	↑ 298±37,5
МКС	28,3±3,2,p=0,001	16,2±2,5, p=0,0001	↓42,8±5,5
ЯКС	33,7± 4,0,p=0,001	18,6±2,7, p=0,0002	↓44,8±5,6
МИКС	21,9±3,0, p=0,007	14,7±2,8, p=0,004	↓32,9±4,9
ККМ	887,0±23,7p=0,02	1596,4±101,3,p=0,001	↑79,8±5,8
ЯКСТ	194,3±32,3,p=0,003	170,4±21,0, p=0,004	↓12,4±1,1
МКСТ	13,8±1,1, p=0,008	47,3±5,0, p=0,002	↑242,7±23,8
МИКСТ	24,5±3,7, p=0,001	38,3±5,1, p=0,004	↑56,3±6.8

Таблица 7

Удельная NADPH зависимая O_2^- -продуцирующая активность клеточных компонентов (гетерогенная фаза) К и ОП проб после рилизинга из них Nox и диализа против воды (n =6, p<0,05).

Источники Nox	К	ОП	Разница, %
Сыворотка крови	16,0±2,1, p=0,002	13,7±1,3, p=0,001	↓14,4±1,8
ЭМ	77,1±6,1, p=0,01	61,4±4,9, p=0,005	↓20,0±2,6
МКС	26,5±2,8, p=0,003	35,2±3,1, p=0,001	↑32,8±3,3
ЯКС	85,3±6,9, p=0,003	71,3±5,0, p=0,002	↓16,6±2,1
МИКС	43,9±4,7, p=0,0001	33,6±4,0, p=0,005	↓23,5±3,7
ККМ	2344,7±125,6,p=0,001	1968,3±97,0,p=0,001	↓16,2±2,0
ЯКСТ	364,7±22,9, p=0,005	333,4±22,7,p=0,005	↓8,6±0,4
МКСТ	25,3±3,5, p=0,003	27,8±4,0, p=0,002	↑10,0±0,7
МИКСТ	34,3±4,8, p=0,0001	29,1±4,2, p=0,002	↓15,4±2,1

Однако по сравнению с показателями К проб ферриHb-восстанавливающая активность Nox ОП-проб в гомогенной фазе снижена сравнительно больше, чем в гетерогенной фазе *(табл. 8,9).*

Таблица 8

Удельная ферриHb-восстанавливающая активность Nox К и ОП проб, после диализа этих ферментов против воды в гомогенной фазе (n =6, p<0,05).

Источники Nox	К	ОП	Разница, %
Сыворотка крови	31,5±4,0, p=0,001	31,8±3,8, p=0,002	0
ЭМ	42,4±5,5, p=0,004	26,2±3,2, p=0,002	↓38,3±4,7
МКС	38,7±4,4, p=0,0002	21,3±3,0, p=0,001	↓45,1±5,1
ЯКС	40,9±4,6, p=0,003	26,7±2,0, p=0,001	↓34,7±3,1
МИКС	22,3±3,0, p=0,01	6,3±0,2, p=0,002	↓71,7±6,4
ККМ	1488,3±101,6,p=0,001	640,4±38,9,p=0,005	↓57,0±5,9
ЯКСТ	89,2±8,1, p=0,002	19,0±2,1, p=0,004	↓78,7±6,8
МКСТ	41,4±6.3,p=0,002	23,8±2,9, p=0,0003	↓57,4±6,6
МИКСТ	85,7±7,7, p=0,002	31,1±2,9, p=0,001	↓62,6±7,2

Таблица 9

Удельная ферриHb-восстанавливающая активность клеточных компонентов (гетерогенная фаза) К и ОП проб после рилизинга из них Nox и диализа против воды (n =6, p<0,05).

Источники Nox	К	ОП	Разница, %
ЭМ	21,4±2,2, p=0,004	15,0±1,4, p=0,001	↓28,9±3,8
МКС	28,8±4,1, p=0,001	28,7±3,3, p=0,002	0
ЯКС	29,9±5,0, p=0,0005	25,6±3,7, p=0,001	↓14,4±2,0
МИКС	19,4±1,4, p=0,01	10,1±0,2, p=0,02	↓48,0±6.9
ККМ	1810,7±110,6,p=0,004	870,4±34,1,p=0,002	↓52,0±6,0
ЯКСТ	94,0±7,8, p=0,001	91,6±7,8, p=0,003	↓3,2±0,2
МКСТ	7,3±6,4, p=0,001	60,4±6,2, p=0,0005	↓15,3±2,1
МИКСТ	60,3±6,0, p=0,01	38,4±5,9, p=0,02	↓36,3±3,6

Недавно нами было показано, что в результате инкубации адреналина (50 μM) в вышеприведенном режиме непосредственно с электрофоретически гомогенными препаратами Nox и eNox наблюдалось определенное снижение NADPH-зависимой O_2^--продуцирующей и ферриHb-восстанавливающей активности изоформ Nox. Однако стимулирование этой активности наблюдалось под влиянием 5 μM адреналина в аналогичных условиях *in vitro*. Предполагалось, что за счет продуцируемых этими ферментами O_2^- может происходить окисление адреналина в адренохром. В частности, продукты дальнейшего окисления адренохрома, которые, по-видимому, связываясь с определенными доменами молекул Nox, изменяют оптико-спектральные характеристики и активность этих гемопротеинов. Фактически этот механизм изменения уровня и активности фракций Nox в гомогенной и гетерогенной фазах сохраняется в К и ОП пробах *ex vivo* (при инкубации адреналина с

компонентами клеток тканей – селезенка, сердце, костный мозг, кровь). Впервые осуществлен рилизинг (самоотщепление) фракций Nox из ЭМ, МКС, ЯКС, МИКС, МКСТ, МИКСТ, ЯКСТ и МККМ в условиях, близких к физиологическим (pH 7,4-8), а не при pH среды 10-10,5 [Симонян Г.М.и др., 2009, Симонян Г.М.и др, 2008, Kresium V.I. et al, 1996, после инкубации приведенных компонентов клеток тканей при 4^{o}, в течение 48 ч в отсутствие и присутствии 50 мкМ адреналина *ex vivo.* Удаление неприсоединившихся следов аминохромов (это водорастворимые соединения) диализом против воды приводит к существенному увеличению удельного содержания Nox клеточных компонентов. И, наоборот, продукты окисления адренохрома несколько снижают уровень eNox из сыворотки крови. Скорее всего, увеличение удельного содержания отщепленных из клеточных компонентов Nox связано с индуцированием процесса ПОЛ мембран клеточных компонентов аминохромами, стимулирующими рилизинг Nox из этих компонентов. Естественно, препараты с антиоксидантной активностью подавляют рилизинг Nox из клеточных компонентов [Симонян Г.М. и др. 2008, Kresium V.I. et al, 1996]. Этот механизм, разумеется, не распространяется на рилизинг eNox сыворотки. При этом снижение NADPH-зависимой O_2^--продуцирующей активности компонентов клеток тканей (гетерогенная фаза), включая сердечную ткань, связано с тем, что в этих клеточных компонентах количество остаточной Nox не высоко (большая часть Nox переходит в гомогенную фазу). Фактически сродство аминохромов к Nox из ЭМ, МКС, ЯКС, МИКС, МКСТ, МИКСТ, ЯКСТ и ККМ различное, из-за чего, видимо, оптико-спектральные свойства и активность Nox подвергаются различным изменениям. Следовательно в результате инкубации (при 4^0, в течение 24 ч, pH 7,4-8) относительно высоких доз адреналина (50 мкМ) с ЭМ, МКС, ЯКС, МИКС, ККМ, МКСТ, МИКСТ, ЯКСТ и сыворотки крови *ex vivo* наблюдаются неадекватные изменения уровня, NADPH-зависимой O_2^--продуцирующей и ферриHb-восстанавливающей активностей фракций Nox, впервые отщепленных в гомогенную фазу из этих клеточных компонентов.

Далее была определена роль гемоглобина в процессе рилизинга eNox, как нового компонента исследования.

3.3. Роль гемоглобина в процессе рилизинга экстрацеллюлярной NADPH оксидазы в сыворотке донорской крови и асцитной жидкости яичника женщин.

В последние десятилетия опубликованы данные о существовании в жидкостях тела млекопитающих (сыворотка, плазма, слюна, моча, грудное молоко, а также асцитные жидкости различного характера) экзосомов, которые секретируются из нормальных и опухолевых тканей [Gallo A. et al, 2012]. Экзосомы, секретируемые из тучных клеток костного мозга, стимулируют митогенную активность В и Т лимфоцитов *in vitro* и *in vivo*, усиливают процесс продуцирования цитокинов (ИЛ-2, ФНО) и являются компонентами иммунной системы [Skokos D. et al, 2001]. Они присутствуют и в асцитной жидкости карциномы яичника женщин и играют важную роль в развитии опухолевых клеток [Gutwein P. et al, 2005]. Интересен и тот факт, что экзосомы обладают NADPH оксидазной активностью и продуцируют супероксидные и иминопероксильные радикалы [Marcela H.G. et al, 2007]. Фракция экстрацеллюлярной NADPH оксидазы (eNox) впервые была выделена из сыворотки крови млекопитающих с использованием ионообменной хроматографии на целлюлозах КМ-52, ДЕ-52 и сефадексе ДЕАЕ А-50 [Симонян М.А. и др., 1995]. Эндогенный уровень eNox в сыворотке крови человека резко повышается при лимфобластическом и миелобластическом лейкозах [Симонян Г.М., 2002], после аэробного инкубирования крови крыс *in vitro* [Симонян Р.М. и др, 2005], в сыворотке крови крыс при саркоме-45 [Симонян Г.М. и др., 2005]. Наличие этого комплекса является чувствительным маркером дестабилизации эритроцитарных мембран при заболеваниях различного характера, включая злокачественные новообразования и сердечно-сосудистые заболевания [Симонян Г.М. и др., 2003, 1997, 2003]. Была определена роль ферригемоглобина на процесс рилизинга eNox из сыворотки крови и асцитной жидкости яичника женщин.

- Индукция рилизинга eNox в сыворотке донорской крови под влиянием Hb in vitro. В результате аэробного инкубирования сыворотки крови человека в отсутствии и присутствии гемоглобина *in vitro* в выше приведенных условиях, из этих проб сыворотки выделяются и очищаются eNox до электрофоретически гомогенного

состояния, с выходом белка на 72,4 ± 6,5 % (p=0,03). Эффективное количество Hb для рилизинга eNox *in vitro* состовляет до 85μM. При этом удельное содержание (плотность поглощения при 530 нм) eNox в остутствии Hb сыворотке составляло 0,02±0,003, в присутствии гемоглобина – 0,15±0,002. Уровень eNox асцитной жидкости карциномы яичника женщин с давностью заболевания 1,2 и 3,5 года составляла 0,12±0,01 и 0,3±0,01 соответственно($p<0,05$, n=6). По оптическим спектральным показателям, в окисленном и восстановленном дитионитом натрия состояниях, полученные изоформы eNox практически не отличаются от NADPH оксидаз (Nox), выделенных и очищенных из ЭМ, МКС, ЯКС, МККМ крыс, на примере Nox из МКС (оптические спектры Nox из приведенных клеток практически идентичны с Nox из МКС и отдельно не приводятся), как это показано на рис. 10 – а,б.

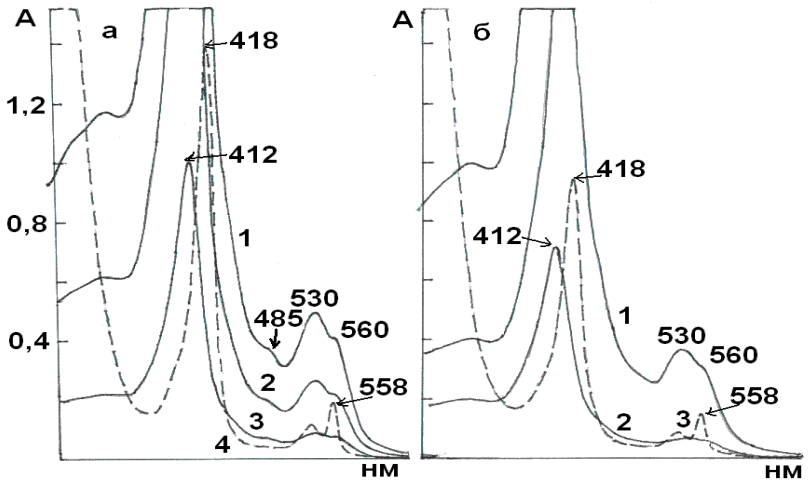

Рис. 10. Оптические спектры поглощения eNox: а – в окисленном состоянии, из асцитной жидкости карциномы яичника женщин с давностьюзаболевания 3,5 года (1) и 1,2 года (2); после разбавления последнего 0,04 М КФБ (3) и восстановления дитионитом натрия (4). б - спектры Nox из клеточных компонентов селезенки, костного мозга и эритроцитарных мембран крыс в окисленном состоянии (на примере Nox из мембран клеток селезенки); после разбавления последнего (2) и восстановления дитионита натрия (3).

Однако, в отличие от этих Nox на оптическом спектре eNox из сыворотки донорской крови имеется небольшое, но характерное для eNox поглощение при 485нм (рис.10-а). Эффективное количество Hb для формирования eNox in vitro составляет до $8{,}5\times10^{-6}$ М. В ходе формирования eNox расходование Hb не наблюдается (рис.11).

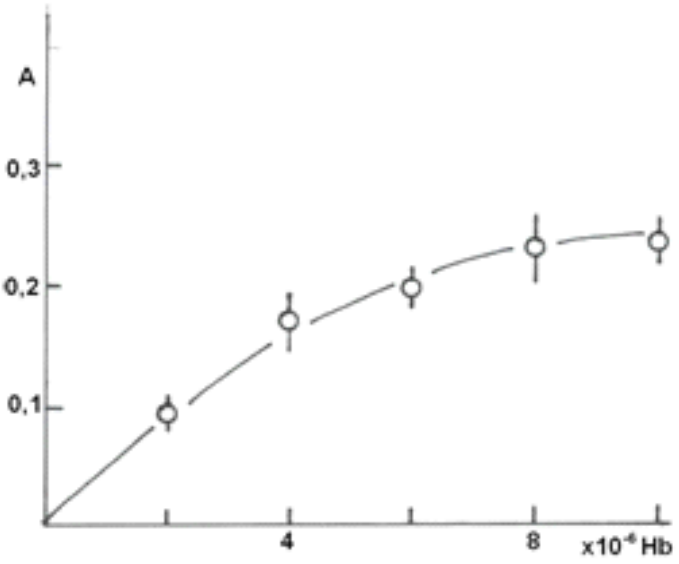

Рис. 11. Изменение плотности поглощения eNox из сыворотки донорской крови человека, после инкубирования сыворотки с различными количествами Hb при 4^o в течение 4-х дней. eNox растворены в 0.04 М КФБ.

После аэробного инкубирования Hb с белками сыворотки крови (альбумин, трансферрин, церулоплазмин, γ-глобулин, супероксид продуцирующий липопротеин сыворотки – супрол, а также с Nox из ЭМ, МКС, ЯКС и МККМ) в результате возможной «конверсии» этих белков eNox не формируется. Полученные eNox обладают как NADPH-зависимой O_2^--продуцирующей, так и ферриHb-восстанавливающей активностями [Симонян Г.М. и др., 2003, Simonyan G.M.et al, 2006]. При этом удельная NADPH-зависимая O_2^--продуцирующая и ферриHb-восстанавливающая активности этих eNox на 20.2 ± 2,1% (n=6, p=0,01) и 17,9 ± 2,5%

(n=6, p=0,03) соответственно, выше таковых у Nox из ЭМ, селезенки и костного мозга. Молекулярная масса этих eNox составляет 70-75 кДа.

- Рилизинг eNox из асцитной жидкости карциномы яичника женщин *in vivo.* Электрофоретически гомогенные eNox также получаются по приведенной методике, без аэробного инкубирования свеженабранной асцитной жидкости (по 30 мл)у женщин с карциномой яичника давностью заболевания 1,2 года (содержание Hb в жидкости уже состовляло до 13 μM) и 3,5 года (содержание Hb в жидкости еще выше и состовляло до 30μM). При этом содержание eNox в асцитной жидкости больных с давностью заболевания 3,5 года выше таковой у eNox в асцитной жидкости больных с давностью заболевания 1,2 года в 2-2,5 раз. Увелечение уровня eNox прямопропорционально повышению концентрации Hb в сыворотке крови, как результат снижения стабильности эритроцитов с соответственным увеличением степени гемолиза эритроцитов при обострении болезни. По сравнению с изоформами Nox из ЭМ, МКС, ЯКС и МККМ (на примере Nox из ЭМ крыс) толерантность eNox из сыворотки крови человека или из асцитной жидкости карциномы яичника женщин против перекиси водорода намного выше (рис.12 - 1,2).

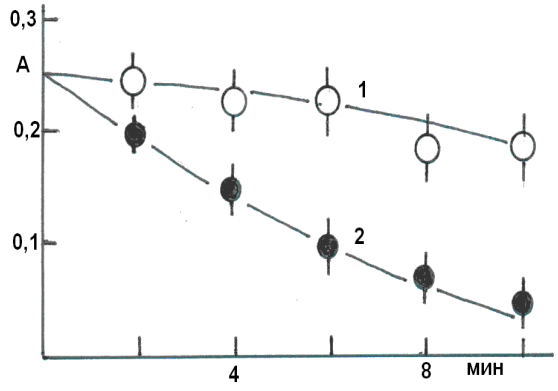

Рис. 12. Кинетические кривые снижения плотности оптического поглощения eNox из донорской крови или из асцитной жидкости карциномы яичника женщин под влиянием $2\times10^{-3}M$ H_2O_2 (1). Аналогичные показатели получаются для Nox из клеточных компонентов селезенки, костного мозга и эритроцитарных мембран (на примере Nox из мембран клеток селезенки крыс) (2). Белки растворены в 0.04 М КФБ.

С другой стороны, в отличие от изоформ Nox, eNox не деградируется при ионообменной хроматографии на сефадексе ДЕАЕ А-50. eNox является слабокислым гемопротеином, элюируется из колонки ДЕАЕ А-50 и ДЕ-520,04 М КФБ, а Nox элюируются из колонки ДЕ-52 0,2 М КФБ. Однако eNox в отличие от Nox необратимо деградируется (до 23%) при pH 5. Проникновение Hb в сыворотку крови человека наблюдается при лимфобластическом и миелобластическом лейкозах у человека [Симонян Г.М., 2002], при саркоме-45 у крыс [Симонян Г.М. и др., 2005], при хронической кадмиевой интоксикации крыс [Сираканян М.С. и др., 2006], при сердечно-сосудистых заболеваниях [Алексанян Серг.С. и др., 2004] и карциноме молочной железы, при инкубировании крови *in vitro* [Симонян Р.М. и др., 2005] за счет чего и формируется eNox в сыворотке крови *in vivo*. Каковы возможные механизмы формирования eNox?

Расходования Hb в ходе рилизинга (отщепления) eNox *in vitro* не наблюдается, что свидетельствует о том, eNox не является продуктом конверсии Hb или сывороточных белков и Nox клеток. Скорее всего Hb играет роль «скавенджера» eNox.

• Источниками eNox, видимо, являются экзосомы, локализованные в сыворотке крови или асцитной жидкости (экзосомы не осаждаются при центрифугировании этих жидкостей в приведенных нами условиях). Как экзосомы, так и изоформы Nox являются ключевыми компонентами иммунной системы. С другой стороны, известно, что Hb индуцирует рилизинг Nox из ЭМ в растворимую фазу, путем образования нестабильного комплекса с Nox, (с образованием нитрозоHb, за счет NO, локализованной, например, в гемовой группе Nox) [Симонян Г.М. и др.,2003, Алексанян Серг.С., 2004, Karapetyan A.V. et al, 2004]) при различных патологических состояниях, при которых происходит дестабилизация эритроцитов и их гемолиз [Симонян Г.М, 2002, Симонян Р.М. и др., 2005, Симонян Г.М. и др., 2005, Сираканян М.С. и др., 2006, Симонян Г.М. и др., 2005]. Оптический спектр комплекса Hb с Nox мало отличается от спектра Hb и это затрудняет процесс обнаружения Nox и только после ионообменной хроматографии на целлюлозе КМ-52 происходит расщепление этого комплекса и отделение Nox от Hb, с характерными оптическими спектральными

показателями. Остается предполагать, что на поверхности мембран экзосом локализована eNox, а Hb индуцирует отщепление этой eNox из экзосом и переводит ее в растворимую фазу аналогичным путем комплексообразовая с нею. Экзосомы (как экстрацеллюлярные формирования) проявляют иммунномодулирующую активность, видимо, и за счет eNox [Rupp Q.A.K. et al, 2011]. Причем уровень eNox намного выше при злокачественных новообразованиях, при которых и количество экзосом гороздо выше [Duijvest D. et al, 2011].

• Образование eNox, видимо, является ответом адаптационных систем организма при таких патологических состояниях, когда наблюдается снижение стабильности эритроцитов (выход Hb в сыворотку). Видимо, eNox играет определенную роль в процессе активации иммунной системы (eNox является более энергичным, чем другие Nox, NADPH зависимым генератором O_2^-) в экстрацеллюлярной среде и регуляции кислородного гомеостаза (eNox восстанавливает ферриHb до ферроHb или оксиHb *in vivo,* который уже способен перенести молекулярный кислород к клеткам [Della R.F. et al, 1995]). В этом аспекте eNox может играть определенную физиологическую роль, особенно, при развитии злокачественного новообразования, как это имеет место для Nox из опухолевых клеток (лимфосаркома человека), а изоформы этих Nox в свою очередь, являются рецепторами нейроактивных полипептидов (пролин богатый полипептид и его аналоги) [Simonyan G.M. et al, 2011]. Уровень продуцируемых экстрацеллюлярной NADPH оксидазой O_2^- регулируется экстрацеллюларной супероксиддисмутазой [Tsan M.F. et al, 2011, Bowler R.P. et al, 2004].

Таким образом, у млекопитающих Hb является фактором индукции отщепления eNox из экзосом сыворотки донорской крови и асцитной жидкости карциномы яичника женщин. Далее были определены эффекты антиоксидантов на процесс рилизинга изоформ Nox.

3.4. Подавление селенатом натрия рилизинга изоформ NADPH оксидазы из мембран клеточных формирований кардиомиоцитов крыс *ex vivo*.

Механизмы воздействия селена на рилизинг из клеточных мембран Nox как ключевого компонента иммунной системы [Briggs R.T. et al, 1975, Brar S.S. et al; 2002, Vignais P.V, 2002] еще не определены. Определяли концентрационно-зависимый эффект селената натрия на процесс рилизинга изоформ Nox из мембран клеток, ядер и митохондрий кардиомиоцитов крыс на оптическом спектральном уровне, с выявлением особенности антиоксидантного действия этой соли ex vivo. Селенат натрия в концентрационно-зависимой манере подавляет обесцвечивание КБС, снижается плотность максимального оптического поглощения этого красителя при 580 нм. В отдельности щелочь или перекись не обесцвечивают КБС. Такое обесцвечивание практически полностью подавляется Cu,Zn- СОД (рис.13).

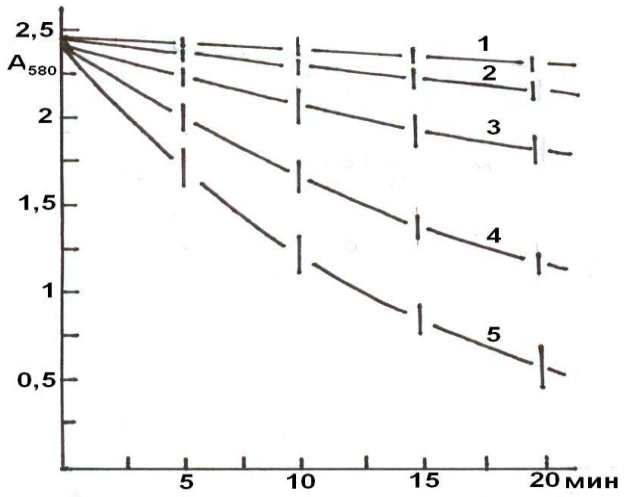

Рис.13. Кинетические кривые снижения плотности максимального оптического поглощения КБС при 580 нм при комнатной температуре под влиянием Cu,Zn-СОД, супероксидов и селената натрия. К 5 мл раствору КБС добавлена: 50 мкМ Cu,Zn-СОД и 0,1 мл раствора O_2, генерированные при ращеплении перекиси водорода (1).К раствору КБС одновременно добавляли: 0,1 мл раствора O_2и4 мг/мл селената натрия (2)., O_2 и 2 мг/мл селената натрия (3) и O_2 и 1 мг/мл селената натрия (4) и после добавления к раствору КБС только O_2 (5).

СОД активность этого фермента, определенная методом НТС на 20,1±2,2% ($p<0,05$) выше таковой, определенной КБС методом. Это связано с тем, что перекись водорода несколько ингибирует Cu,Zn-СОД [Simonyan M.A. et al, 1972]. И наоборот, СОД-миметическая активность селената натрия определенной методом НТС составляет 160,4 ±21,2 единиц ($p<0,001$), а методом КБС - 503±32,8 единиц ($p<0,05$). Фактически, толерантность селената натрия против перекиси водорода и гидроксильных радикалов (они также образуются при неферментативном расщеплении перекиси восорода [Simonyan M.A. et al, 1979]) выше чем таковой у Cu,Zn-СОД. Это дало основание для использования селената натрия в процессе экспрессии (рилизинга) Nox из клеточных формирований кардиомиоцитов крыс ex vivo. Известно, что антиоксиданты различного характера (СОД, каталаза, церулоплазмин, трансферрин, а также синтетический аналог нейропептида из нейросекреторных гранул гипоталамуса – галармин) играют мембрано-стабилизирующую роль, путем подавления транслокации Nox, который является структурно-функциональным компонентом биомембран [Симонян Р.М. и др., 2003]. Селенат натрия в приведенных условиях существенно подавляет экспрессию изоформ Nox из мембран ядер, митохондрий и кардиомицитов крыс, при этом не изменяя форму оптических спектров поглощения изоферм Nox, а также их NADPH-зависимую O_2^--продуцирующую и ферриHb-восстанавливающую активности. При этом наблюдается концентрационно-зависимое от селената натрия (до 4 мг/мл) подавление рилизинга изоформ Nox после аэробного инкубирования при 4^o в течение 4 дней селената натрия с мембранами кардиомиоцитов, ядер и митохондрий. Подавление рилизинга селенатом натрия выше у Nox из мембран кардиомиоцитов, затем у Nox из мембран ядер и, наконец, из мембран митохондрий (рис.14). При этом форма оптических спектров отщепленных Nox не изменяется.

Открытое недавно явление рилизинга изоформ Nox из мембран клеточных формирований в приведенных условиях ex vivo является новым механизмом оксидативного повреждения биомембран при липидной пероксидации ненасыщенных жирных кислот этих мембран, инициированной АФК, супероксидным радикалом и его производными ex vivo [Симонян Р.М. и др., 2003]. Соответственно, путем

нейтрализации супероксидов селенатом натрия подавляется рилизинг изоформ Nox из мембранных формирований кардиомиоцитов. Этим механизмом селенат натрия может играть мембраностабилизирующую роль, защищая кардиомиоциты от оксидативного повреждения, наблюдающегося, в частности, при сердечно-сосудистых заболеваниях [Rahmanto A.S. et al, 2012, Rees K. et al, 2013]. Полученные данные дают основание для использования селената натриа как антистрессорного агента неферментативного характера при инфаркте миокарда в эксперименте.

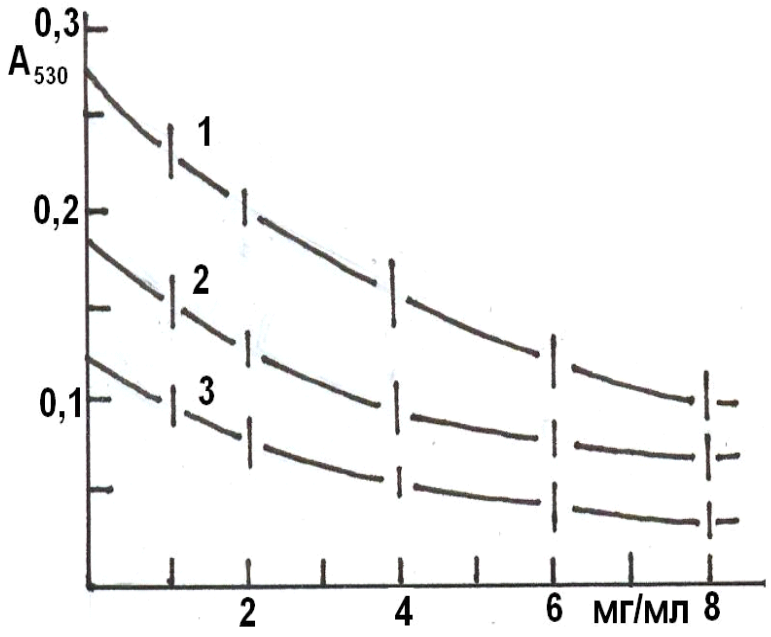

Рис. 14. Изменение интенсивности оптического спектра поглощения изоформ Nox (при 530 нм) полученной из мембран кардиомиоцитов (1), ядер (2) и митохондрий (3), после инкубации селената натрия с биомембранами в приведенных условиях.

3.5. Стимуляция ферригемоглобином рилизинга изоформ NADPH оксидазы из сыворотки крови и мембран субклеточных формирований кардиомиоцитов крыс и подавление этого процесса α-токоферолом и L-аргинином.

Механизмы антиоксидантного и мембраностабилизирующего действия α-токоферола (α-Тк), в большинстве случаев, ассоциированы с подавлением ПОЛ. С другой стороны, ферригемоглобин (ферриHb) индуцирует рилизинг Nox из экзосом сыворотки, оказывая дестабилизирующий эффект на мембраны этих наночастиц. Однако роль ферриHb в дестабилизации мембран клеточных компонентов кардиомиоцитов крыс как фактора кардиотоксичности еще не определена. В результате аэробной инкубации сыворотки крови и водных смесей мембран клеток, ядер и митохондрий кардиомиоцитов крыс при pH 8 в аэробных условиях при 4 ^{o}C в течение 4-х дней ex vivo наблюдается рилизинг (отщепление) изоформ eNox и Nox из сыворотки крови и из этих мембран в растворимую фазу. При этом характерные формы оптических спектров поглощения изоформ Nox и eNox, полученных из мембран клеточных формирований миокарда и сыворотки крови крыс в приведенных условиях в трех сериях экспериментов (в условиях присутствия ферриHb, α-Тк и L-арг) практически не изменяются по сравнению с показателями в отсутствии этих соединений (рис.15). При этом, NADPH-зависимая O_2^--продуцирующая и ферриHb-восстанавливающая активности отщепленных eNox и Nox из этих биомембран практически не отличаются от показателей для изоформ Nox в отсутствии ферриHb, α-Тк и L- арг. Это свидетельствует о том, что ферриHb, α-Тк и L-арг в приведенных количествах не вызывают необратимых деградирующих эффектов на хромофорную группу и активности изоформ Nox. Важным феноменом можно считать то, что ферриHb индуцирует рилизинг не только eNox из наночастиц (экзосом) сыворотки,еще и индуцирует рилизинг Nox из мембран клеточных формирований кардиомиоцитов.При этом, ферриHb вызывает неадекватное увеличение удельного содержания (плотность максимального поглощения при 530 нм в расчете на 1 мл отщепленного Nox из 1 г ткани или 1 мл сыворотки), как это показано на рис. 15-18.

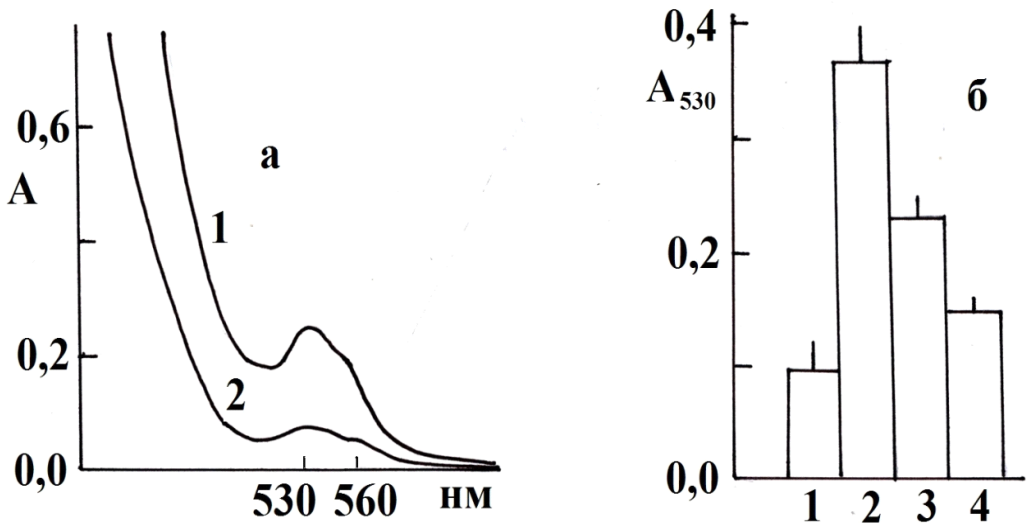

Рис. 15. Оптические спектры поглощения Nox из водных смесей мембранмитохондрий крыс после аэробной инкубации этих мембран в условиях отсутствии иприсутствии Hb, α- Тк и L- арг ***(а),*** *и изменение уровня Nox (расчетная удельная плотность β- поглощения при 530 нм) из водных смесей мембран митохондрий послеих аэробной инкубации в условиях отсутствия и присутствия Hb, α-Тк и L-арг ex vivo****(б):****а–1 Форма оптического спектра поглощения Nox, выделенной из водных смесеймембран митохондрий после их аэробной инкубации при pH 8 в течение четырех днейпри 4 oC в присутстви 15x10(-6) M ферриHb или ферриHb+ α-Тк (0,1 мг/мл) или ферриHb + 0,15 мг/мл L- арг ex vivo;а-2 Форма оптического спектра поглощения Nox,выделенной из водных смесей мембран митохондрий после их инкубации ваналогичных в отсутствии приведенных агентов . б. Изменение удельного содержания Nox, выделенной из водных смесей мембран митохондрий в приведенныхусловиях в отсутствии приведенных агентов (1) и в присутствии ферриHb (2), ферриHb + α-Тк (3) и ферриHb + L- арг (4) в указанных количествах.*

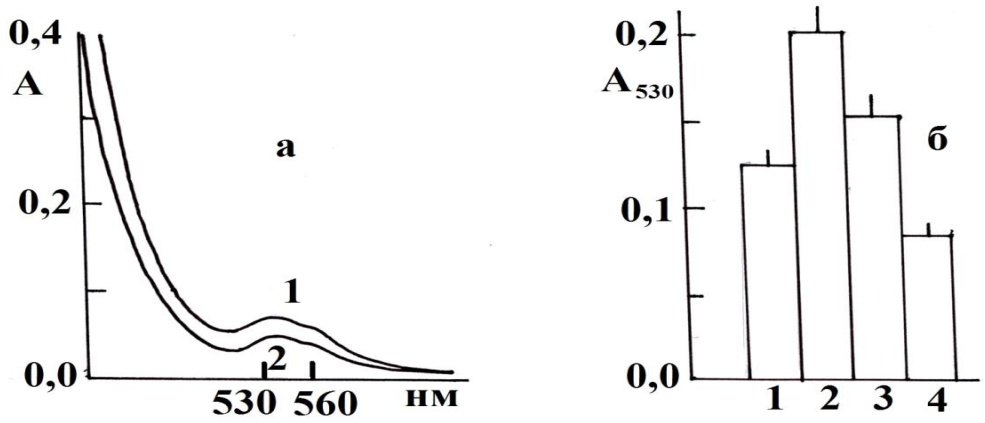

Рис.16.Оптические спектры поглощения Nox из водных смесей мембран кардиомиоцитов крыс после аэробной инкубации этих мембран в условиях отсутствии и присутствии Hb, α- Тк и L- арг ex vivo (а), и изменение уровня Nox (расчетная удельная плотность β- поглощения при 530 нм) из водных смесей мембран кардиомиоцитов после их аэробной инкубации в условиях отсутствия и присутствия Hb, α- Тк и L- арг (б); а–1 Форма оптического спектра поглощения Nox, выделенной из водных смесей мембран кардиомиоцитов после их инкубации при pH 8 в течение четырех дней при 4 oC в условиях присутствия 15μM ферриHb или ферриHb + α-Тк (0,1 мг/мл) или ферриHb+ α- Тк + 0,15 мг/мл L- арг ex vivo; а-2 Форма оптического спектра поглощения Nox, выделенной из водных смесей мембран кардиомиоцитов после их инкубации в аналогичных условиях в отсутствии приведенных агентов;б- Изменение удельного содержания Nox, выделенной из водных смесей мембран кардиомиоцитов в приведенных условиях при отсутствии приведенных агентов (1) и в присутствии ферриHb (2), ферриHb + α-Тк (3) и ферриHb + L- арг (4) в приведенных количествах.

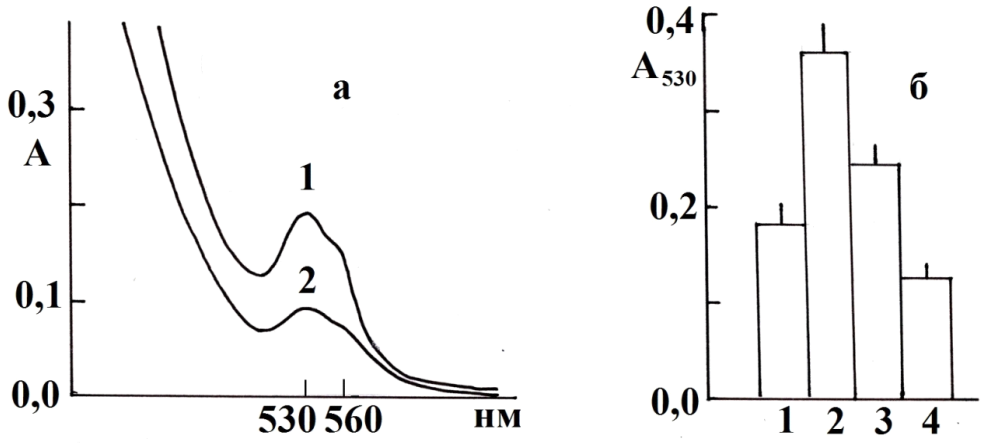

*Рис.**17.**Оптические спектры поглощения Nox из водных смесей мембран ядер кардиомиоцитов крыс после аэробной инкубации этих мембран в отсутствии и присутствии Hb, α- Тк и L- арг **(а),** и изменение уровня Nox водных смесей мембран ядер кардиомиоцитов после их аэробной инкубации в отсутствии и присутствия Hb, α- Тк и L- арг **(б)** ex vivo. **а– 1.** Форма оптического спектра поглощения Nox, выделенной из водных смесей мембран ядер кардиомиоцитов после их инкубации при pH 8 в течение четырех дней при 4 °C в присутствии 15 μM ферриHb или ферриHb + α-Тк (0,1 мг/мл) или ферриHb + 0,15 мг/мл L-арг; **а- 2.** Форма оптического спектра поглощения Nox, выделенной из водных смесей мембран ядер кардиомиоцитов после их инкубации в аналогичных условиях при отсутствии приведенных агентов;б. Изменение удельного содержания Nox, выделенной из водных смесей мембран ядер кардиомиоцитов в приведенных условиях при отсутствии приведенных агентов (1) и в присутствии ферриHb (2), ферриHb + α- Тк (3) и ферриHb + L- арг (4) в указанных количествах.*

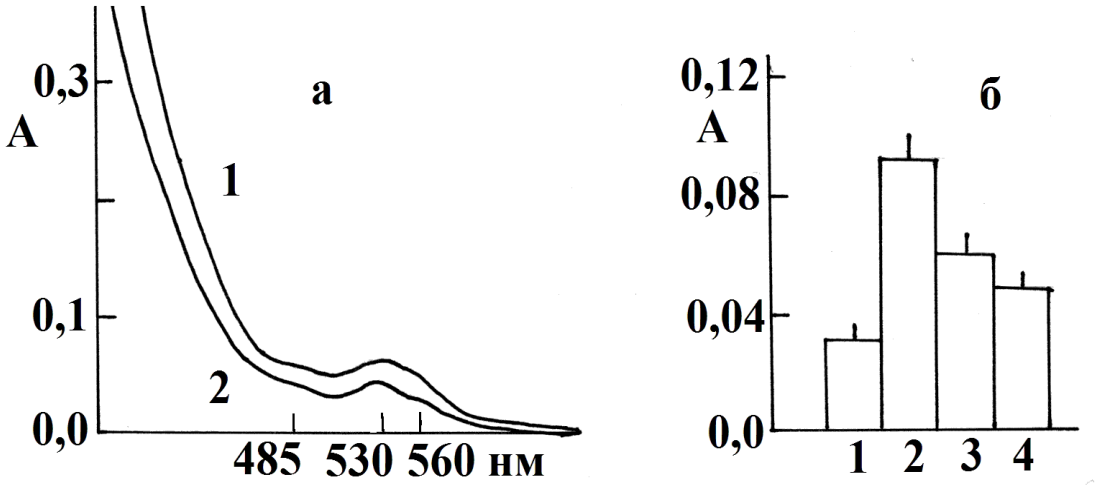

Рис.18. Оптические спектры поглощения Nox из сыворотки крови крыс после ее аэробной инкубации в отсутствии и присутствии Hb, α- Тк и L- арг ***(а),*** *и изменение уровня Nox (расчетная удельная плотность β- поглощения при 530 нм) из сыворотки крови после ее аэробной инкубации в отсутствии и присутствии Hb, α- Тк и L- арг ex vivo* ***(б). а– 1*** *Форма оптического спектра поглощения Nox, выделенной из сыворотки после ее инкубации при pH 8 в течение четырех дней при 4 ^{o}C в присутствия 15μM ферриHb или ферриHb + α-Тк (0,1 мг/мл) или ферриHb + 0,15 мг/мл L- арг;* ***а- 2*** *Форма оптического спектра поглощения Nox, выделенной из сыворотки крови после ее инкубации в аналогичных условиях при отсутствии приведенных агентов.* ***б-*** *Изменение удельного содержания Nox, выделенной из сыворотки крови в приведенных условиях при отсутствии приведенных агентов* ***(1)*** *и в присутствия ферриHb* ***(2),*** *ферриHb + α-Тк* ***(3)*** *и ферриHb + L- арг (4) в приведенных количествах.*

Причем, повышение степени рилизинга изоформ Nox происходит дозозависимо в отношении ферриHb (рис. 19) с эффективной концентрацией последнего до 15x10(-6) М. Рилизинг изоформ Nox ферригемоглобином происходит интенсивнее из мембран митохондрий, далее из мембран ядер и мембран кардиомиоцитов, а также из мембран экзосом сыворотки крови (рис. 19, 20).

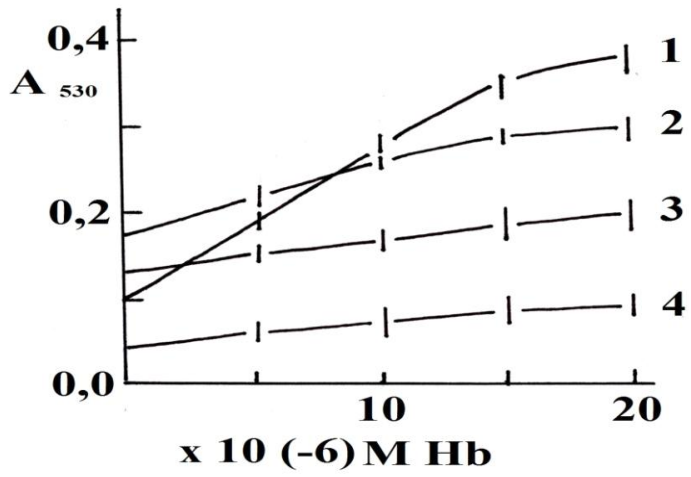

Рис. 19. Ферригемоглобин- дозозависимое изменение расчетного удельного содержания (плотность β- поглощения при 530 нм) изоформ Nox, выделенных из клеточных формирований кардиомиоцитов крыс и сыворотки крови после аэробной инкубации их водных смесей в течение четырех дней при 4 ^{o}C и pH 8 в присутствии ферриHb ex vivo. Показатели для Nox из водных смесей: мембран митохондрий ***(1),*** *ядер* ***(2),*** *мембран кардиомиоцитов* ***(3)*** *и из сыворотки крови* ***(4).***

Механизм отщепления изоформ Nox ферригемоглобином связан с образованием нестабильного комплексного соединения между ферриHb и локализованной на поверхности клеточных мембран Nox [Azzi A. et al, 2007, Cho M. et al; Симонян Г.М. и др., 2003]. Видимо, в зависимости от прочности связывания Nox с гидрофобной средой приведенных мембран (такой средой могут быть ненасыщенные жирные кислоты этих мембран) наблюдается различная степень рилизинга Nox. После ионообменной хроматографии этого комплексного соединения на целлюлозе DE-52, этот комплекс легко расщепляется, а ферриHb элюируется 0,02 М КФБ, как это представлено в методическом разделе. С другой стороны, такое комплексообразование между ферриHb и Nox наблюдается при различных патологических состояниях, при которых существенно стимулируется перекисное окисление ненасыщенных жирных кислот биомембран с ослаблением стабильности ЭМ (мембран других клеток), некоторого гемолиза и выхода в сыворотку крови

гемоглобина. Именно этот гемоглобин проникает на поврежденные участки мембран клеток, включая ЭМ, с образованием комплекса с локализованной на мембранах Nox.

Фактически, причиной рилизинга Nox является ПОЛ биомембран и имеется прямо-пропорциональная зависимость между степенью рилизинга Nox и ПОЛ. Действительно, процесс такого рилизинга Nox подавляется антиоксидантными агентами: α-токоферолом и дозозависимо L-аргинином (рис. 20).

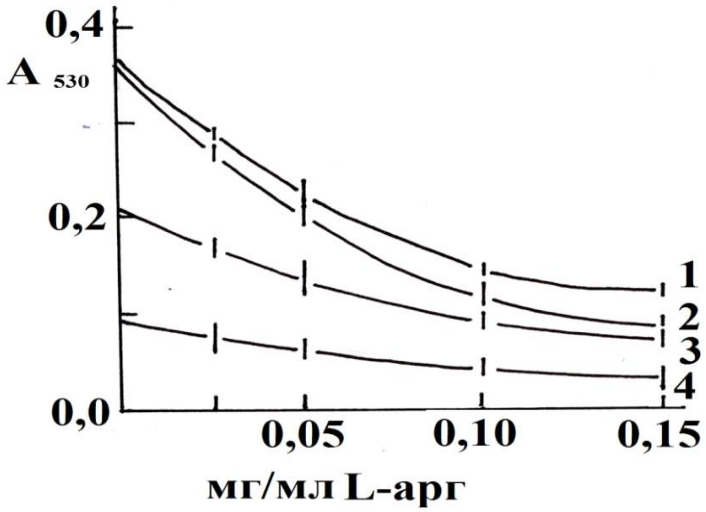

Рис. 20. Дозозависимое от концентрации L-аргинина изменение удельного содержания (расчетная удельная плотность β- поглощения при 530 нм) изоформ Nox, выделенных из клеточных формирований кардиомиоцитов крыс и сыворотки крови, после аэробной инкубации их водных смесей в течение четырех дней при 4 ^{o}C и pH 8 в присутствии L-арг ex vivo. Показатели для Nox из водных смесей: мембран митохондрий ***(1),*** *ядер* ***(2),*** *мембран кардиомиоцитов* ***(3)*** *и из сыворотки крови* ***(4).***

Эффективную дозу α-Тк трудно определить, так как α-Тк не расворяется в воде, однако определенная часть α-Тк присоединяется к мембранам и действует в гетерогенной (гидрофобной) фазе, улавливая гидроперекисные радикалы, подавляя ПОЛ [Azzi A. et al, 2007] и, соответственно, рилизинг Nox. Механизм подавления рилизинга Nox L-аргинином несколько отличается от действия α-Тк. Наряду с другими механизмами L-арг проявляет антиоксидантную активность путем

повышения или сохранения активности каталазы [Товмасян М.С. и др., 2008]. Этим путем L-арг снижает уровень перекиси водорода, которая является источником гидроксильных радикалов, которые являются энергичными инициаторами ПОЛ биомембран. Неадекватное снижение уровня отщепленной Nox L-аргинином и α-токоферолом из биомембран свидетельствует о неадекватности ПОЛ мембран клеток и субклеточных образований кардиомиоцитов.

Как показано на рис. 20, L-арг и α-Тк более эффективно подавляют рилизинг Nox из мембран ядер, митохондрий, мембран кардиомиоцитов крыс и, наконец, из экзосом сыворотки. При этом эффективная концентрация L-арг составляет до 0,15 мг/мл.

Можно заметить, что при дестабилизации эритроцитов, проникающий в сыворотку гемоглобин может играть дестабилизирующую роль в отношениимембран кардиомиоцитов, проявляя кардиотоксический эффект, а α-Тк совместно с L-арг могут проявить кардиопротекторный эффект**.**

3.6. Подавление L-аргинином гемоглобин-индуцирующего рилизинга NADPH оксидазы из мембран клеток аорты сердца крыс.

Перорально введенный L-арг(3х2 г/день) у больных атеросклерозом вызывает повышение концентрации NO и суммарного антиоксидантного статуса, оказывая антиоксидантный эффект [Jablecka A. et al, 2004]. Эта аминокислота играет важную физиологическую роль для регуляции сердечно-сосудистой системы и антиоксидантной защиты, для продуцирования NO• и полиаминов в эндотелиальных клетках, в физиологических количествах (0,1 мМ) повышает экспрессию структурных белков клеток этих сосудов (виментин и тропомиозин), подавляя экспрессию стресс стимулирующих белков [Lei X. et al, 2011]. L-Арг показывает неаддитивный эффект на функцию сердца или экспрессию антиоксидантных ферментов при физических упражнениях в эксперименте [Xu X. et al,2010]. Приведенные эффекты L-Арг, возможно, связаны с эффектом повышения каталазной активности [Товмасян М.С. и др., 2008], с соответственным подавлением липидной пероксидации мембран клеток в

первую очередь высокоактивными гидроксильными радикалами. Впервые представляется данные о роли L-арг на процесс гемоглобин-индуцирующего отщепления Nox из мембран клеток аорты сердца. В результате аэробной инкубации проб гомогенатов аорты сердца крыс в приведенных условиях наблюдается рилизинг (отщепление) из мембран клеток аорты фракции Nox. Этот Nox по оптическим-спектральным показателям практически не отличается от таковых у Nox, выделенных из других клеточных формирований тканей (селезенки, легких и эритроцитов) крыс: в окисленном состоянии наблюдается поглощение при 560 нм, 530 нм и 412 нм, а после восстановления дитионитом натрия: при 558 нм, 525 и 418 нм (рис.21).

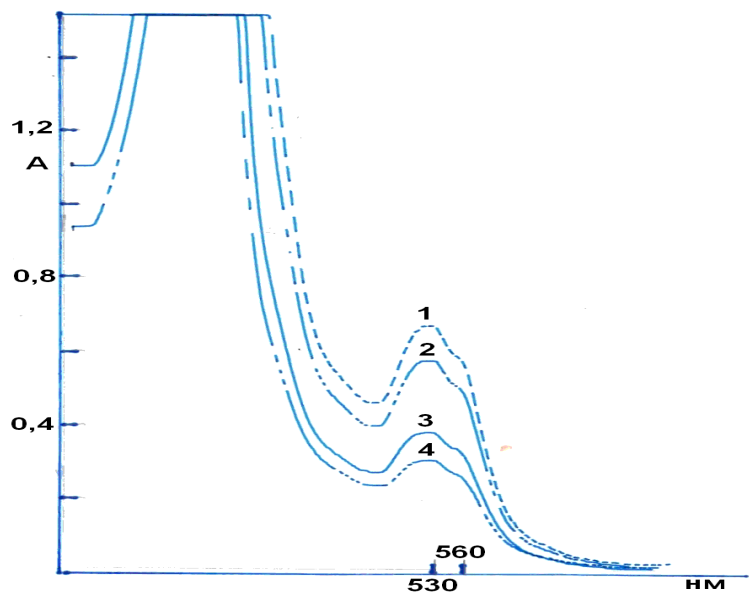

Рис. 21. Оптические спектры поглощения отщепленной Nox из менбран клеток аорты сердца (1) и Nox выделенных из мембран клеток легких (2), селезенки (3) и эритроцитарных мембран (4) белых крыс. Изоформы Nox растворены в 0,1 М КФБ, pH 7,4.

При этом форма оптического спектра поглощения у Nox из аорты сердца крыс в приведенных пробах сохраняется, несколько отличается величина оптического спектрального индекса (A_{412}/A_{530}). Изоформы Nox растворены в 0,1 М КФБ. С другой стороны, удельная плотность максимального оптического поглощения

(поглощение 1 мл Nox, полученной из 1 г аорты) отщепленной Nox из ОП-1 составляет 0,83 ± 0,1 ое (p=,001, n=6). Этот показатель для Nox из ОП-2 составляет 0,44 ± 0,05 ое, (p=,001, n=6), а для Nox контрольной пробы - 0,11± 0,03 ое (p=,01, n=6). При этом, кислотно-основные характеристики Nox из мембран клеток аорты сердца крыс не изменяются, по сравнению с другими типами Nox. Однако, NADPH зависимую O_2^--продуцирующая и ферриHb-восстанавливающая активности фракции Nox из клеток аорты несколько снижены (на 10,7±1,2% и 12,4 ± 1,1%, соответственно) по сравнению с клеточными Nox из вышеприведенных тканей.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что за счет формирования нестабильного комплекса (ассоциата) между ферриHb и Nox, локализованной на поверхности клеток аорты сердца крыс, происходит отщепление Nox из гетерогенной фазы в гомогенную (растворимую) фазу. Ассоцированный гемоглобин полностью отделяется от Nox в резвультате ионообменной хроматодрафии на целлюлозе DE-52. Комплексообразование ферриHb с изоформами внутриклеточной и внеклеточной Nox (eNox) наблюдается при различных патологических состояниях (сердечно-сосудистые заболевания, злокачественные новообразования, интоксикация тяжелыми металлами), когда имеет место ослабления стабильности эритроцитарных мембран (происходит гемолиз эритроцитов) [Симонян Г.М. и др., 2003, Алексанян Серг С. и др., 2004, Сираканян М.С. и др., 2006, Симонян Г.М. и др., 2014]. Возможно, за счет стимулирования перекисного окисления ненасыщенных жирных кислот мембран клеток аорты сердца (при их аэробной инкубации в приведенных условиях) продуцируемыми активными формами кислорода (АФК) увеличивается возможность проникновения гемоглобина в эти мембраны с образованием нестабильного комплекса с Nox, локализованной на этих мембранах. Фактически явление образования нестабильного комплекса между гемоглобином и Nox имеет универсальный характер и наблюдается практически для всех типов Nox, включая Nox из аорты сердца крыс. Время выделения фракции Nox из мембран клеток аорты сердца крыс резко сокращено (2-3 ч) по сравнению с временем получения Nox из других биоисточников (до 5-6 суток [Симонян Р.М. и др, 2013]). Подавление рилизинга Nox из мембран клеток аорты сердца L-Арг (возможно это связано с

стимуляцией активности каталазы L-аргинином *in vitro* [Товмасян М.С. и др., 2008]), свидетельствует о важной роли перекиси водорода, как возможного агента индукции перекисного окисления ненасыщенных жирных кислот (ПОЛ) мембран клеток аорты. Фактически L-арг является стабилизирующим фактором клеток аорты сердца крыс. Каковы возможные механизмы действия ферриHb и L-арг на рилизинг Nox из клеток аорты сердца?

Предполагается, что за счет NO•, локализованной в гемовой группе Nox [Симонян Г.М. и др., 2003] образуется нестабильное комплексное соединение между ферриHb и Nox (видимо образуется нитрозогемоглобин). Не исключается и образование связи между терминальной аминогруппой ферриHb с терминальной карбоксильной группой Nox. В результате наблюдается изменение кислотно-основных характеристик (изоэлектрическая точка) ферриHb. В пользу последнего предположения свидетельствует тот факт, что в состояние комплекса с Nox, ферриHb осаждается на целлюлозе DE-52 (в свободном состоянии ферриHb является белком основного характера и осаждается только на КМ-52). Путем повышения L-Арг активности каталазы и соответственного снижения уровня перекиси водорода (она образуется в результате ферментативного дисмутирования супероксидных радикалов, продуцируемые NADPH оксидазой в данной системе) подавляется ПОЛ мембран клеток аорты, соответственно снижая рилизинг Nox из мембран клеток аорты, для которых этот фермент является важным структурно-функциональным компонентом [Batot G. et al,1998]. Это является новым механизмом стабилизации мембран клеток аорты сердца L-аргинином.

3.7. α-Токоферол подавляет рилизинг изоформ NADPH оксидазы из мембран клеточных компонентов тканей крыс.

α-Тк имеет различные биологические функции: обладает антиоксидантной активностью [Bell E.F. et al, 1987], регулирует ферментативную активность [Sethi R. et al, 2004], функционирование сигнальных клеток нервной системы [Azzi A. et al, 2000, Zingg J. et al, 2004]. Как антиоксидант α-токоферол (α-Тк) является скавенджером

гидропероксильных радикалов ($HO_2^{\bullet}$), путем реагирования с ними предотвращая цепным механизмом размножение свободных радикалов в тканях. Действуя приведенными механизмами, α-Тк оказывает протективный эффект при адреналин-индуцированной кардиотоксичности, снижая некроз клеток миокарда [Schneider S., 2005, Szafarov A.J. et al, 1988].

Совместно с N-ацетилцистеином он существенно снижает продолжительность эпинефрин-индуцированной аритмии у крыс [Sethi R. et al, 2004]. Путем снижения уровня активного кислорода α-Тк стабилизирует эритроцитарные (ЭМ) и другие клеточные мембраны. С другой стороны, антиокситанты различного характера (СОД, каталаза, церулоплазмин) а также синтетический аналог нейропептида из нейросекреторных гранул гипоталамуса - галармин, снижают степень самоотщепления (рилизинг) NADPH оксидазы (Nox) из ЭМ в экстримальных условиях (при pH10-10,5) *in vitro* [Симонян Р.М. и др., 2003].

Однако, механизмы рилизинга Nox из биомембран в гомогенную фазу, в близких к физиологическим условиям остаются нерешенными. Определяется степень рилизинга изоформ Nox из клеточных мембран в отсутствии и присутствии α-Тк. Впервые показано, что в результате аэробного инкубирования в вышеприведенном режиме водных гомогенатов очищенных мембран клеток, мембран ядер и митохондрий селезенки, миокарда, костного мозга, а также сыворотки крови крыс наблюдается явление самоотщепления (рилизинг) Nox и eNox в растворимую (гомогенную) фазу в близких к физиологическим значениям pH (7,4-8) и при pH10.

По оптическим спектральным характеристикам, NADPH зависимые O_2^--продуцирующие и ферриHb-восстанавливающие активности отщепленных Nox в отсутствии и присутствии α-Тк практически не отличаются (наблюдаются характерные для Nox максимальные оптические поглощения при 560, 530 и 412 нм в окисленном и 558, 525 и 418 нм – в восстановленном состояниях) [Симонян Р.М. и др., 2003]. При этом процент отщепления Nox выше из мембран клеток костного мозга и клеток селезенки, далее из локализованных в сыворотке экзосом, из эритроцитарных мембран и, наконец из мембран миокарда. При интенсивном перемешивании α-Тк с водными гомогенатами мембран клеточных и субклеточных

формирований наблюдается образование очень мелких капель α-Тк в виде мутности. С другой стороны, α-Тк является липидрастворимым метаболитом [Klepler K. et all., 2005]. Даже в этих условиях он подавляет процесс рилизинга Nox и eNox не только при pH 7,4-8, но и pH10. (табл. 10, 11).

Таблица 10

Плотность максимального оптического поглощения (при 530 нм) отщепленных изоформ Nox из мембран клеток и субклеточных формирований крыс после их инкубации при 4^o в течение 2 дней с перемешиванием в отсутствии (К) и присутствии (ОП) 1 мг/мл α-ТФ при pH 7,4-8 ($p<0.05$, $n=6$).

Изоформы Nox из:	К	ОП
МК мионкарда*	0,16 ± 0,02	0,11 ± 0,004
МЯК миокарда	0,25 ± 0,01	0,14 ± 0,007
МТК миокарда	0,08 ± 0,005	0,06 ± 0,008
ЭМ	0,13 ± 0,01	0,09 ± 0,003
Клеток костного мозга	4,20 ± 0,7	2,6 ± 0,8
МК селезенки	0,90 ± 0,07	0,63 ± 0,04
МЯК селезенки	0,60 ± 0,03	0,45 ± 0,02
МТК селезенки	0,42 ± 0,3	0,28 ± 0,06
Сыворотки крови (eNox)	0,32 ± 0,04	0,19 ± 0,02

***Примечание:** МК - мембраны клеток, МЯК - мембраны ядер клеток, МТК - митохондрии клеток, ЭМ – эритроцитарные мембраны.

Таблица 11

Плотность максимального оптического поглощения (при 530 нм) отщепленных изоформ Nox из мембран клеток и субклеточных формирований крыс после их инкубации при 4^{o} в течение 2 дней с перемешиванием в отсутствии (К) и присутствии (ОП) 1 мг/мл α-ТФ при pH 10,5 ($p<0.05$, $n=6$).

Изоформы Nox из:	К	ОП
МК миокарда*	0,15 ± 0,02	0,11 ± 0,008
МЯК миокарда	0,21 ± 0,01	0,12 ± 0,009
МТК миокарда	0,12 ± 0,006	0,08 ± 0,01
ЭМ	0,21 ± 0,02	0,12 ± 0,01
Клеток костного мозга	2,6 ± 0,4	1,8 ± 0,07
МК селезенки	0,83 ± 0,05	0,60 ± 0,05
МЯК селезенки	0,72 ± 0,03	0,52 ± 0,04
МТК селезенки	0,80 ± 0,05	0,64 ± 0,02*

***Примечание:** МК - мембраны клеток, МЯК - мембраны ядер клеток, МТК - митохондрии клеток, ЭМ – эритроцитарные мембраны.

При этом проценты подавления α-токоферолом рилизинга изоформ внутриклеточной и внеклеточной Nox несколько отличаются (в среднем от 25% до 44%).В водной среде α-Тк не растворяется, однако, за счет некоторого прилипания α-Тк к мембранам, наблюдается фоновая мутность раствора смесей мембран с водой, после их центрифугирования (такое явление не наблюдается в отсутствии α-Тк).

Пока трудно определить эффективную концентрацию α-Тк, однако по-видимому, она небольшая, так как некоторая часть капель α-Тк собирается на поверхности гомогенатов мембран.

Таким образом, даже в этих условиях α-Тк существенно подавляет рилизинг Nox из приведенных биомембран. Как было показано недавно, проникновение экзосом (они являются мембранными наночастицами, содержащими многочисленные РНК) в сыворотку крови наблюдается при различных заболеваниях как ответ адаптационных механизмов организма, для стимуляции иммунной системы [Фесчян С.М. и др., 2012]. При этом, ферриHb, за счет формирования нестабильного комплекса с Nox на мембранах экзосом, вызывает отщепление этой Nox (или eNox) в растворимую фазу. Фактически, в приведенных условиях α-Тк подавляет и рилизинг eNox из экзосом. Каков возможный механизм подавления рилизинга Nox и eNox? Общеизвестно, что в биомембранах присутствует определенное количество аналогов токоферола, которые, наряду с другими активностями, ответственны за подавление, в первую очередь, липидной пероксидации ненасыщенных жирных кислот биомембран. Эти липидные компоненты играют структурно-функциональную роль биомембран. Путем подавления перекисного окисления липидов биомембран α-Тк (в основном улавливает высокоактивные гидропероксильные радикалы) играет мембраностабилизирующий эффект [Bell E.F. et al, 1987, Azzi A., 2007, Zingg J. et al, 2004, Traber M.G. et al, 2011].

Аналогичным образом возможным механизмом рилизинга Nox или eNox является стимулирование ПОЛ ЭМ и мембран клеток и субклеточных формирований, среди которых селезенка и костный мозг являются органами иммунной системы. Таким образом мембраностабизирующий эффект α-Тк связан не только с подавлением ПОЛ мембран, но и с соответственным подавлением рилизинга Nox и eNox, которые являются ключевыми структурно-функциональными компонентами (как ферментные системы продуцирования супероксидов) приведенных мембран клеток и субклеточных образований.

Переходя от опытов определения изменения характерных свойств изоформ Nox под влиянием адреналина *in vitro* и *ex vivo*, в следующей серии экспериментов было

определено воздействие экзогенно введенного адреналина на процесс гемоглобин-индуцированного отщепления изоформ Nox из биомембран *in vivo.*

3.8. Активность, степень рилизинга и комплексообразования с ферригемоглобином изоформ NADPH оксидазы из клеточных образований тканей крыс под влиянием адреналина различной концентрации.

Механизмы кардиотоксичности катехоламинов (адреналин, норадреналин) связаны, в первую очередь, с изменением уровня АФК в клеточных и внеклеточных формированиях млекопитающих. Экзогенно введенный симпатический нейротрансмитер норадреналин стимулирует продуцирование O_2^- NADPH оксидазой локализованной в циркулирующих лейкоцитах крови человека. При этом ингибитор этого фермента дифениленйодониум и ингибитор протеинкиназы С страуроспорин подавляет такой эффект адреналина [Deo S. et al,2013]. Норадреналин индуцирует апоптоз эндотелиальных клеток путем изменения активности каспаз-2, с повышением уровня внутриклеточных O_2^-, а антиоксиданты (витамин С, N-ацетилцистеин, СОД и каталаза) подавляют апоптоз эндотелиальных клеток при сердечной недостаточности [Fu Y.C. et al, 2006]. При адреналин-зависимой аритмии антиоксиданты N-ацетилцистеин, витамин Е и валсартин, снижая степень оксидативного повреждения и уровень продукта окисления адреналина под влиянием O_2^-, регулируют ритмичность работы сердца крыс [Fu Y.C. et al, 2011, Rozario R.J. et al, 2008]. При этом при повышенных и пониженных концентрациях адреналин подавляет или стимулирует NADPH зависимую O_2^--продуцирующую и ферриHb-восстанавливающую активности изоформ Nox *in vitro* и *ex vivo*, соответственно [Фесчян С.М. и др., 2012, Фесчян С.М. и др., 2013]. Фактически кардиотоксичность адреналина проявляется не только при характерных изменений уровня и активности Nox кардиомиоцитов, но и других клеточных и внеклеточных формирований. С открытием недавно явления комплексообразования ферригемоглобином (ферриHb) с изоформами Nox клеточных формирований, ЭМ и мембран наночастиц – экзосом

сыворотки крови, был разработан комплексный, кратковременный способ получения Nox, с определением степени отщепления (рилизинг) из этих биосистем изоформ Nox [Симонян Р.М. и др., 2014]. Это дало возможность для комплексного определения уровня (степень отщепления изоформ Nox), активности и степени формирования комплексного соединения с изоформами Nox у крыс под влиянием адреналина. Однако, особенности изменения содержания и активности изоформ Nox на оптическом спектральном уровне под влиянием экзогенно введенного адреналина in vivo еще не определены.

Через 4 ч после введения адреналина гибель животных в ОГ-2 составляла до 8%, в ОГ-3 – 18%, а в ОГ-4 на 25%. В таком критическом состоянии организма у изоформ Nox, выделенных из мембран, ядер, митохондрий и цитозоля клеток органов животных (сердце, печень, почки лекгие), в ОГ-2, ОГ-3 и особенно ОГ-4 с увеличением дозы вводимого адреналина наблюдается некоторое необратимое изменение формы оптических спектров поглощения этих Nox. После гель-фильтрации на сефадексе G-100 и концентрирования изоформ Nox из приведенных биосистем, искаженность формы оптических спектров сохраняется. При этом происходит некоторое фоновое увеличение плотности α и β-полосы поглошения (при 560 и 530 нм), а также поглощение Core при 412 нм, за счет оптического поглощения необратимо ассоциированной с молекулой Nox продукта окисления адреналина. Соответственно, величины оптического спектрального индекса (A_{412}/A_{530}) этих гемопротеинов повышены (до 12-16%), по сравнению с показателями Nox ОГ-1, в отсутствии адреналина. Однако, с увеличением доз вводимого адреналина наблюдается соответственное снижение удельного содержания отщепленных изоформ Nox из клеточных формирований тканей (рис.22-26).

В приведенных условиях уровень отщепленной экстрацеллюлярной Nox (eNox) из экзосом сыворотки увеличивается (рис.26).

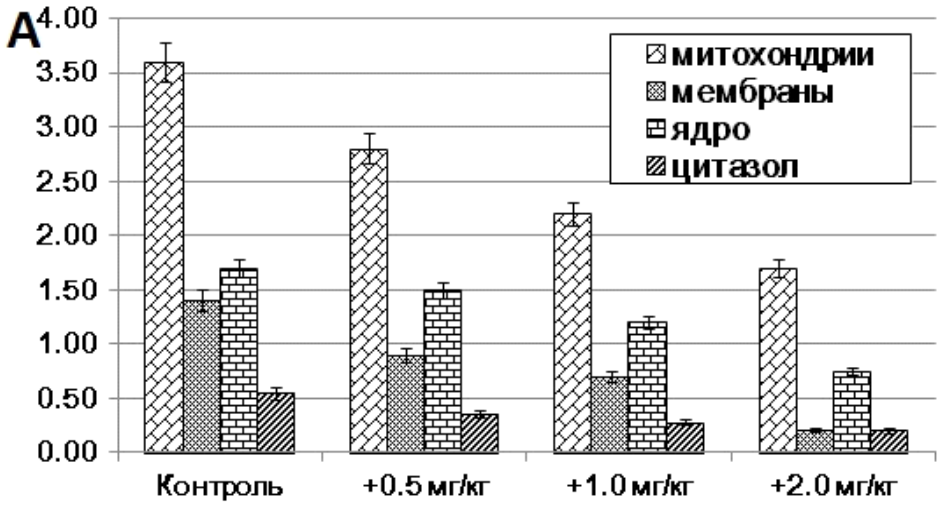

Рис. 22. Удельное содержание изоформ Nox (расчетная удельная плотность оптического поглощения при 530 нм) из клеточных формирований сердца, через 4 ч после введения крысам адреналина ($p<0,05$, $n=8$).

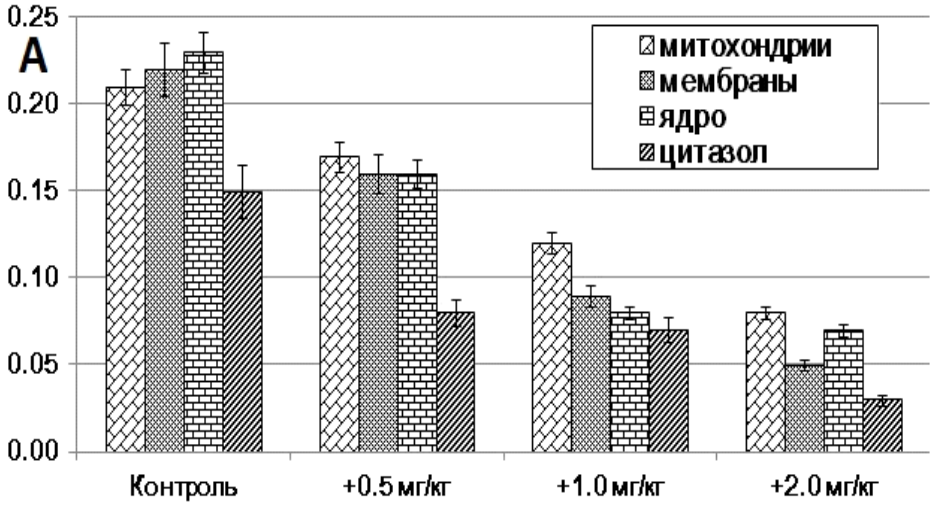

Рис 23. Удельное содержание изоформ Nox (расчетная удельная плотность оптического поглощения при 530 нм) из клеточных формирований печени через 4 ч после введения крысам адреналина ($p<0,05$, $n=8$).

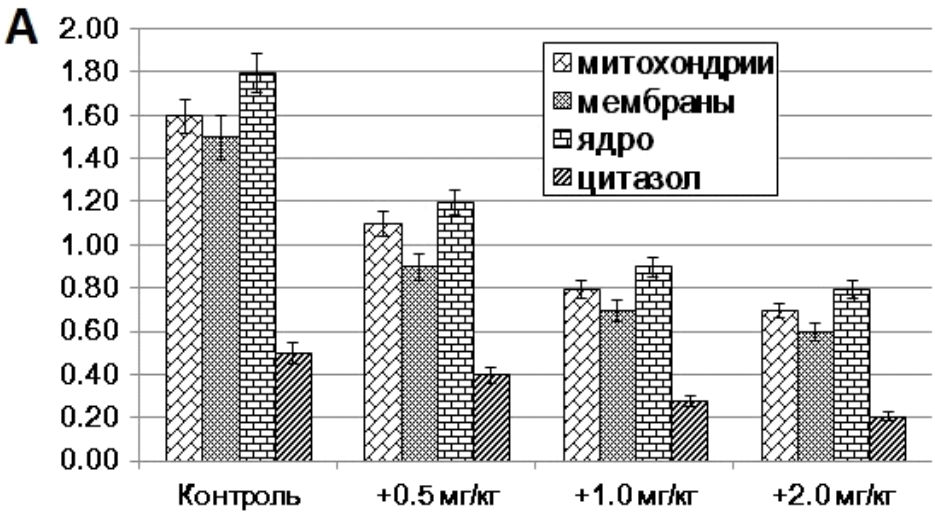

Рис.24. Удельное содержание изоформ Nox (расчетная удельная плотность оптического поглощения при 530 нм) из клеточных формирований почек, через 4 ч после введения крысам адреналина ($p<0,05$, $n=8$).

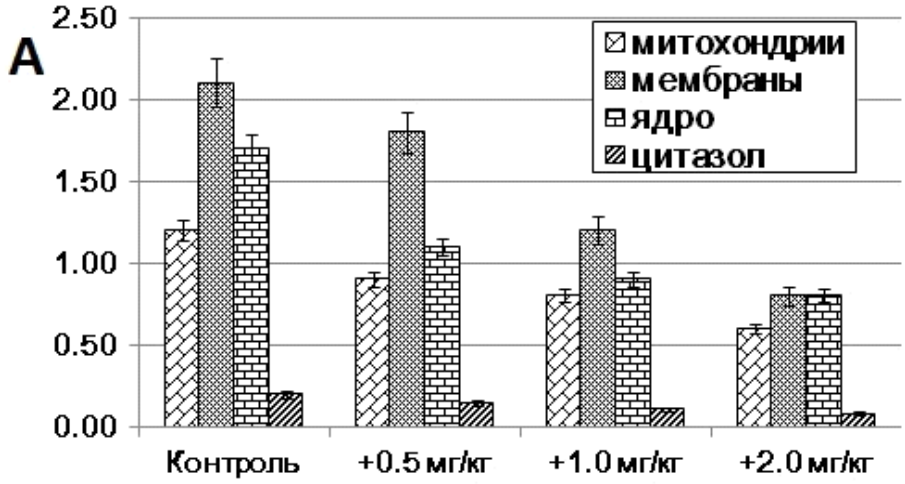

Рис.25. Удельное содержание изоформ Nox (расчетная удельная плотность оптического поглощения при 530 нм) из клеточных формирований легких, через 4 ч после введения крысам адреналина ($p<0,05$, $n=8$).

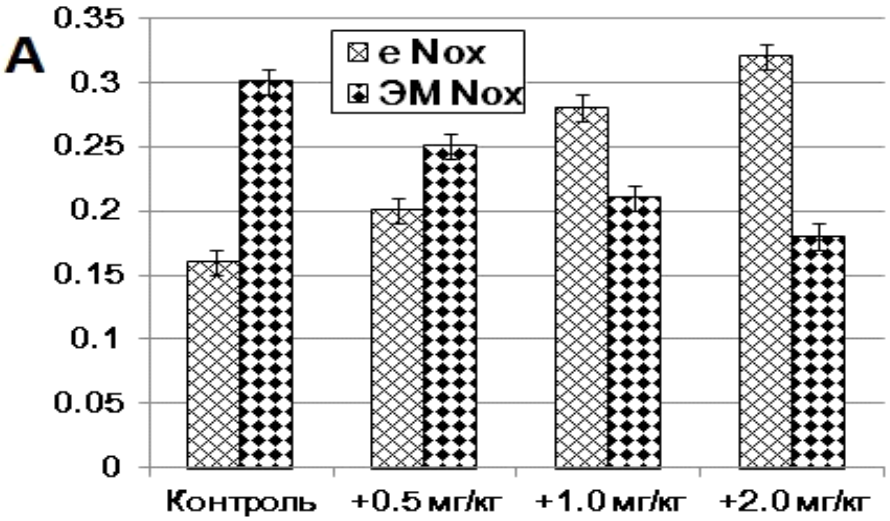

Рис.26 Удельное содержание изоформ Nox (расчетная удельная плотность оптического поглощения при 530 нм) из клеточных формирований экзосом сыворотки и из эритроцитарных мембран через 4 ч после введения крысам адреналина $p<0,05$, $n=8$).

В этих условиях происходит некоторое снижение уровня ферриHb, который вначале (до ионообменной хроматографии на целлюлозе DE-52) был ассоцирован в виде нестабильного комплексного соединения с изоформами Nox. Направленность снижения уровня ассоцированного ферриHb с изоформами Nox из приведенных клеточных формирований сохраняется (рис. 27-30).

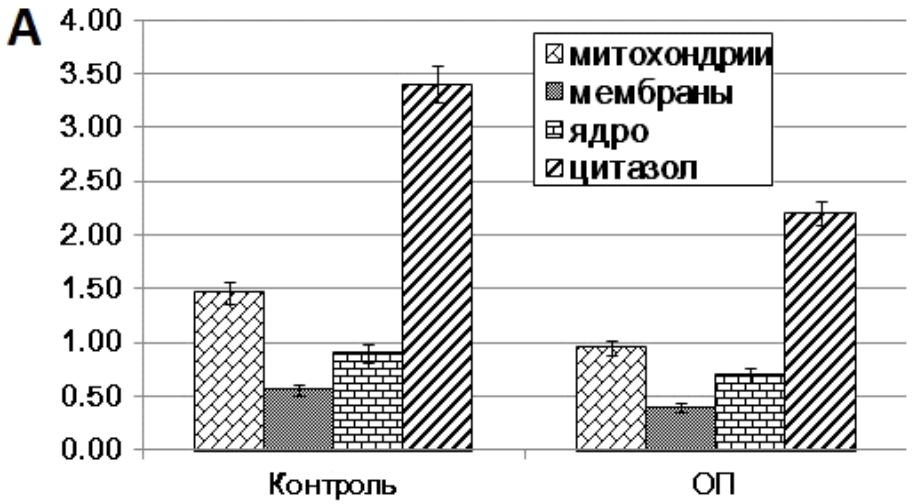

Рис.27. Удельное содержание ферриHb (расчетная удельная плотность оптического поглощения при 565 нм) из клеточных формирований легких через 4 ч после введения крысам 2 мг/мл адреналина ($p<0,05$, $n=8$).

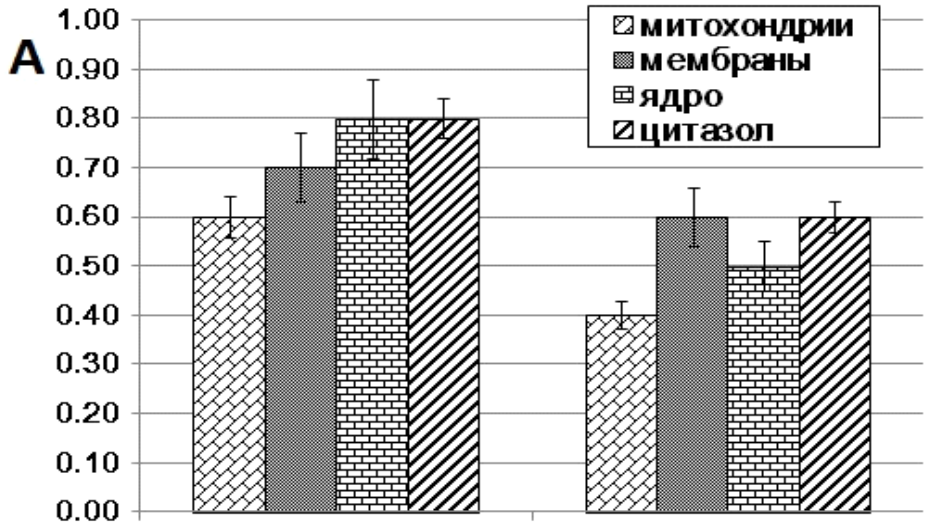

Рис.28.Удельное содержание ферриHb (расчетная удельная плотность оптического поглощения при 565 нм) из клеточных формирований печени через 4 ч после введения крысам адреналина $p<0,05$, $n=8$).

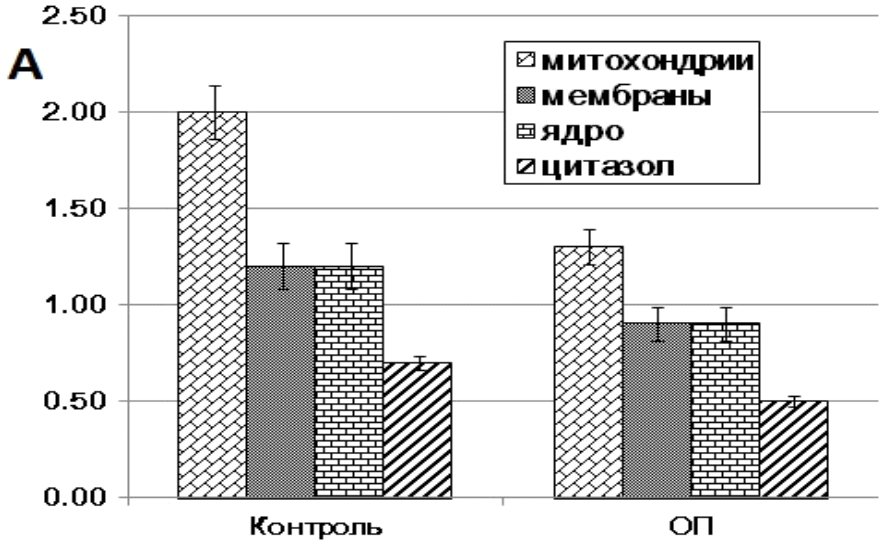

Рис.29. Удельное содержание ферриHb (расчетная удельная плотность оптического поглощения при 565 нм) из клеточных формирований сердца, через 4 ч после введения крысам адреналина p<0,05, n=8).

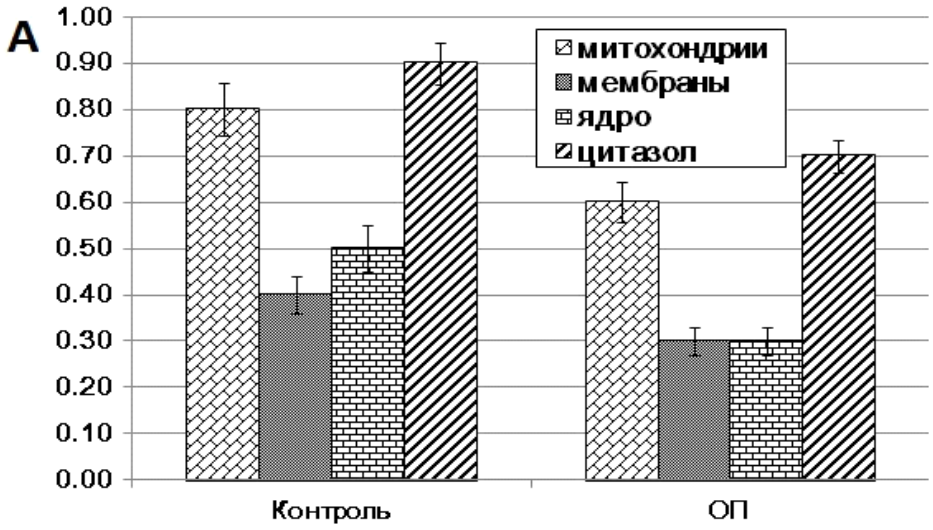

Рис.30. Удельное содержание ферриHb (расчетная удельная плотность оптического поглощения при 565 нм) из клеточных формирований почек, через 4 ч после введения крысам адреналина (p<0,05, n=8).

По сравнению с контрольными показателями (показатели ОГ-1) NADPH зависимая O_2^--продуцирующая, ферриHb-восстанавливающая активности изоформ Nox из приведенных клеточных формирований в ОГ-2 несколько увеличены (14-17%), в ОГ-3 и ОГ-4, наоборот снижены (16-22%).

Каковы возможные механизмы приведенных изменений? Изоформы Nox из мембран, ядер, митохондрий и цитозоля клеток тканей выделяли с помощью метода, основанного на открытом недавно явления образования нестабильного комплекса между ферриHb и изоформами Nox, локализованного в клеточных формированиях и экзосом сыворотки крови [Симонян Р.М. и др., 2014, Simonyan G.M. et al, 2011, Simonyan R.M. et al, 2014]. В результате такого комплексообразования изоформы Nox отщепляются из гетерогенной фазы (из биомембран) в гомогенную (растворимую) фазу. ФерриHb является белком основного характера (осаждается на целлюлозе КМ-52), однако в результате ассоциации (нестабильного комплексообразования) с изоформами Nox (последние являются белками кислого характера и осаждается на колонке с DE-52) ферриHb осаждается совместно с Nox на целлюлозе DE-52. Этот комплекс легко расщепляется при ионообменной хроматографии на колонке с целлюлозой DE-52, из которой ферриHb элюируется 0,02 М КФБ, а Nox 0,1 М КФБ.С увеличением содержания изоформ Nox наблюдается прямопропорциональное увеличение содержания входящее в комплексное соединение ферриHb. Используемые дозы внутрикожно вводенного адреналина оказывают токсический эффект и с увелечением этой дозы наблюдается повышение число гибели животных. Недавно было показано, что при аэробной инкубации элекрофоретически гомогенных препаратов изоформ Nox (они выделены из мембран клеток органов иммунной системы – селезенки, костного мозга, а также из ЭМ и сыворотки крови белых крыс) *in vitro*, а также после инкубации водных гомогенатов мембран клеточных формирований с адреналином *ex vivo*, эти Nox окисляют адреналин до адренохрома (аминохрома) в гомогенной и гетерогенной фазах. Продукты окисления адреналина в определенных количествах необратимо связывается, возможно, с соответственным доменом молекулы изоформ Nox. При этом, в сравнительно повышенных концентрациях (50 μM) адреналин подавляет NADPH зависимую O_2^--

продуцирующую и ферриHb-восстанавливающую активности изоформ приведенных Nox с некоторым изменением формы оптических спектров этих Nox, кроме eNox, которая проявляет высокую толерантность против продуктов окисления адреналина. Однако, как соединение гормонального характера при пониженных концентрациях (5нМ) адреналин, наоборот, вызывает повышение этих активностей изоформ Nox, практически не изменяя формы оптических спектров поглощения. Делается предположение, что изоформы Nox могут быть рецепторами и для адренохрома (аминохрома). Аналогичным путем изоформы Nox играют роль рецептора для нейроактивного богатого пролином полипептида – галармина, который является нейрогормоном и также в низких концентрациях увеличивает, а в повышенных концентрациях подавляет активности этих Nox [Симонян Г.М и др., 2006; Симонян Г.М и др. 2007]. Изменение формы оптических спектров поглощения изоформ приведенных Nox является эффектом налаживания плотности поглощения адренохрома (аминохрома) при 350 нм и 400 нм. С повышением доз вводимого адреналина, на фоне стимуляции приведенных изменений наблюдается повышение смертности животных.Далее были определены влияние экзогенно введенных антиоксидантов неферментативного характера на уровень и активность изоформ Nox клеточных компонентов крыс при острой адреналиновой интоксикации.

3.9. Регулирование уровня и активности изоформ NADPH оксидазы клеточных компонентов крыс при острой адреналиновой интоксикации под влиянием введенных L-аргинина, α-токоферола и селената натрия.

Определены механизмы воздействия адреналина на оптико-спектральные характеристики изоформ Nox *in vitro* и *ex vivo*. Они связываются с необратимым воздействием продуктов окисления адреналина. При этом изоформы Nox клеточных компонентов стимулируют окисление адреналина, а соединения антиоксидантной активности α-Тк, L-Арг и селенат натрия оказывают положительный эффект [Wen X. et al, 2013, Jablecka A. et al, 2004, Kalaiselvi P. et al, 2005, Demiralay R. et al, 2008, Ress K. et al, 2013]. Однако механизмы воздействия введенного адреналина на оптические

спектральные характеристики изоформ Nox клеточных компонентов тканей крыс под влиянием экзогенно введенного адреналина в отсутствии и присутствии также экзогенно введенных антиоксидантов (α–Тк, L-Арг и селенат натрия) еще не определены. Были определены механизмы воздействия и эффективности подкожно введенных антиоксидантов на уровень и активность изоформы Nox клеточных компонентов тканей крыс при острой адреналиновой интоксикации.

Используемая доза подкожно вводенного адреналина (2мг/кг) оказывает острый токсический эффект. Через 4 ч после введения адреналина гибель животных в ОГ-2 составляла 47±5.1% (p=,01, n=8). Через 20 мин после введения адреналина было введено: 50 мг/кг α-токоферола (ОГ-3), 4 мг/кг L-аргинина, (ОГ-4) и 5 мг/кг селената натрия (ОГ-5). α-Токоферол смешивали с 1 мл растительным маслом, остальные соединения были растворены в 1 мл физраствора и введены животным подкожно, ($p<0,05$, n=8).

Под влиянием введенных α-Тк, L-Арг и селената натрия, гибель животных составляла 25,5±3,2%, 11,4±2,1% и 28,2±4,4%, p=,001; ,01 и ,005 соответственно. В таком критическом состоянии организма у изоформ Nox, выделенных из мембран, ядер, митохондрий и цитозоля клеток органов животных (сердце, печень, почки и лекгие), а также ЭМ в ОГ-2, введенный адреналин вызывает некоторые необратимые изменения формы оптических спектров поглощения приведенных изоформ Nox. После гель-фильтрации на сефадексе G-100 и концентрирования на целлюлозе DE-52 изоформ Noxиз приведенных биосистем, искаженность формы оптических спектров сохраняется. При этом также происходит некоторое фоновое увеличение плотности α- и β-полосы поглошения (560 и 530 нм), а также поглощение Core при 412 нм на оптическом спектре поглощения Nox.С другой стороны, под влиянием введенного адреналина наблюдается соответственное снижение удельного содержания отщепленных изоформ Nox и уровня ферриHb, входящего в комплекс с изоформами Nox из клеточных формирований тканей и ЭМ животных (рис. 31-34).

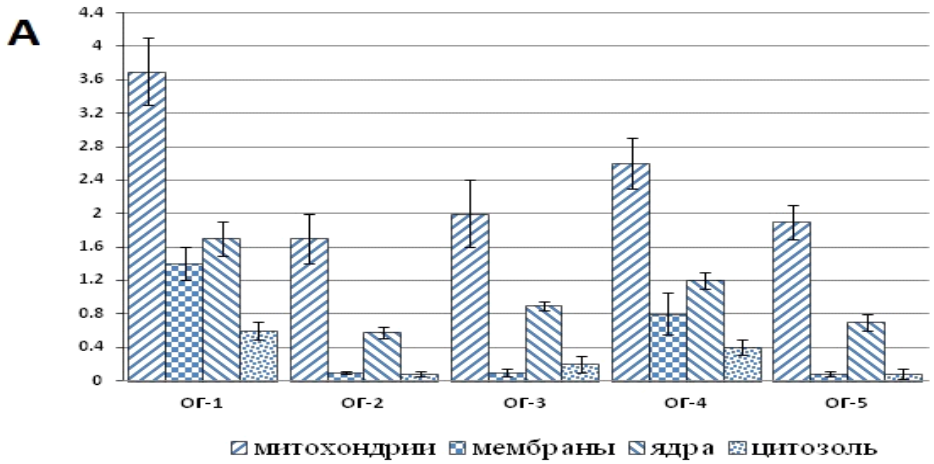

Рис.31. Расчетная удельная плотность изоформ Nox из митохондрий и мембран при 530 нм, ядер и цитозоля клеток сердечной ткани крыс, после введения 1 мл физраствора (ОГ-1); после подкожного введения 2мг/кг массы животного адреналина (ОГ-2). Через 20 мин после введения адреналина было введено: 50 мг/кг α-токоферола (ОГ-3), 4 мг/кг L-аргинина, (ОГ-4), 5 мг/кг селената натрия (ОГ-5). α-Токоферол смешивали с 1 мл растительного масла. Остальные соединения были растворены в 1 мл физраствора и введены животным подкожно, (p<0,05, n=8).

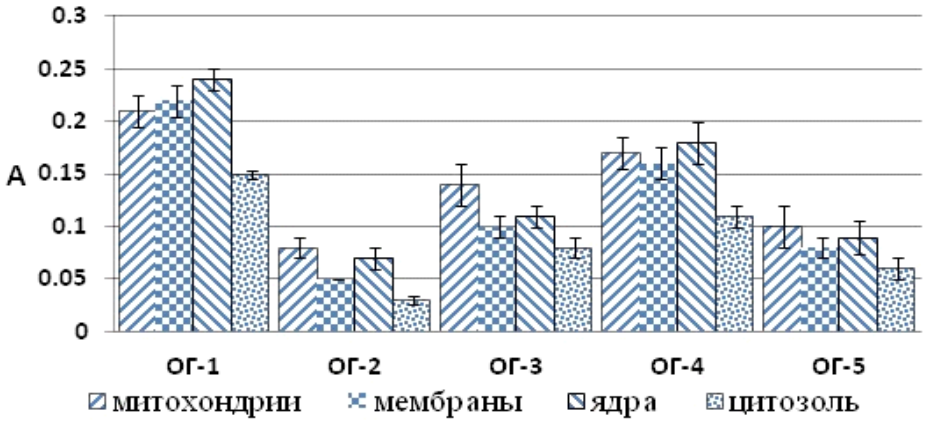

Рис.32. Расчетная удельная плотность при 530 нм изоформ Nox из митохондрий, мембран, ядер и цитозоля клеток печеночной ткани крыс, после введения 1 мл физиологического раствора (ОГ-1), после подкожного введения 2мг/кг массы животного адреналина (ОГ-2). Через 20 мин после введения адреналина было введено: 50 мг/кг α-токоферола (ОГ-3), 4 мг/кг L-аргинина, (ОГ-4), 5 мг/кг селената натрия (ОГ-5). α-Токоферол смешивали с 1 мл растительного масла. Остальные соединения были растворены в 1 мл физраствора и введены животным подкожно, (p<0,05, n=8).

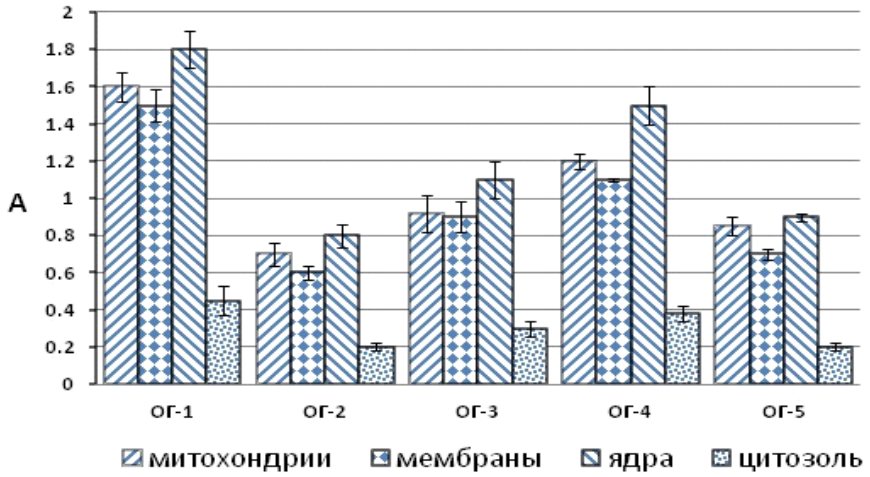

Рис.33. Расчетная удельная плотность при 530нм изоформ Nox из митохондрий, мембран, ядер и цитозоля клеток почечной ткани крыс, после введения 1 мл физиологического раствора (ОГ-1), после подкожного введения 2мг/кг массы животного адреналина (ОГ-2). Через 20 мин после введения адреналина было введено: 50 мг/кг α-токоферола (ОГ-3), 4 мг/кг L-аргинина, (ОГ-4), 5 мг/кг селената натрия (ОГ-5). α-Токоферол смешивали с 1 мл растительного масла. Остальные соединения были растворены в 1 мл физраствора и введены животным подкожно, (p<0,05, n=8).

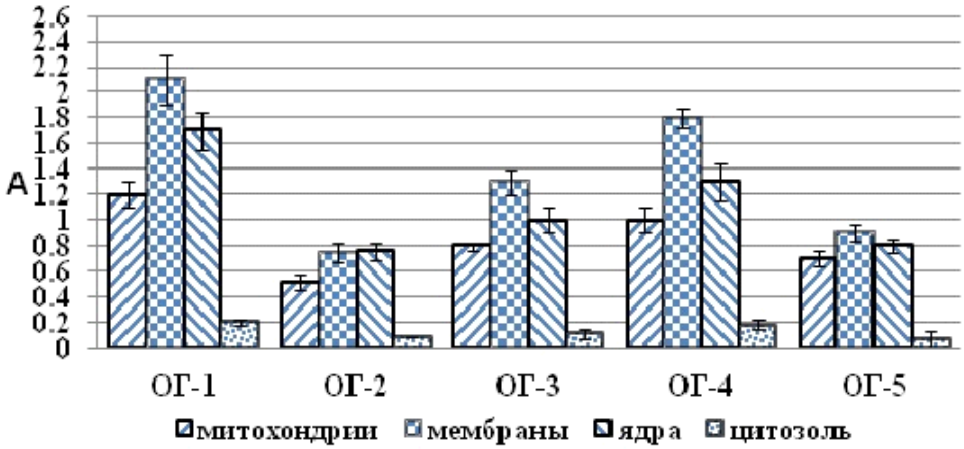

Рис.34. Расчетная удельная плотность изоформ Nox при 530 нм из митохондрий, мембран, ядер и цитозоля клеток легких крыс, после введения 1 мл физиологического раствора (ОГ-1), после подкожного введения 2мг/кг массы животного адреналина (ОГ-2). Через 20 мин после введения адреналина было введено: 50 мг/кг α-токоферола (ОГ-3), 4 мг/кг L-аргинина, (ОГ-4), 5 мг/кг селената натрия (ОГ-5). α-Токоферол смешивали с 1 мл растительного масла. Остальные соединения были растворены в 1 мл физраствора и введены животным подкожно, (p<0,05, n=8).

При этом уровень отщепленной экстрацеллюлярной Nox (eNox) из наноформирований (экзосом) сыворотки крови [Skokos D. et al, 2001, Simonyan R.M. et al, 2014] увеличивается (рис. 35). По сравнению с контрольными показателями (показатели ОГ-1) NADPH зависимая O_2^--продуцирующая и ферриHb-восстанавливающая активности изоформ Nox из приведенных клеточных формирований в ОГ-2, наоборот, снижены (до 16-22%).

В ОГ–3-5 под влиянием вводимого α-Тк, селената натрия и особенно L-Арг наблюдается определенное приближение уровня (расчетная плотность характерного максимального оптического β-поглощения при 530 нм), а также NADPH зависимой O_2^--продуцирующей и ферриHb-восстанавливающей активностей изоформ Nox к контрольным показателям (показатели ОГ-1). При этом искаженность оптических спектров поглощения изоформ Nox в ОГ-3 и ОГ-4 и, особено, в ОГ-5 практически отсутствует.

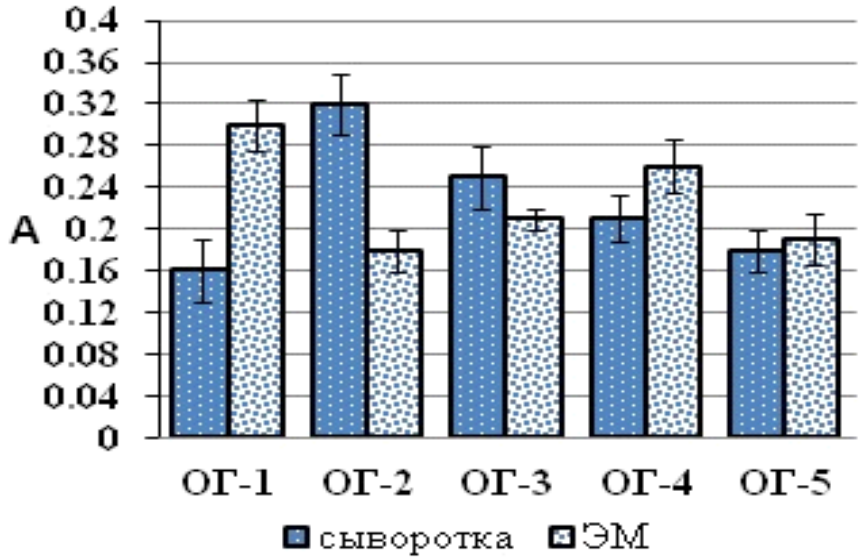

Рис.35. Расчетная удельная плотность при 530 нм изоформ Nox из сыворотки крови и ЭМ крыс, после подкожного введения 1 мл физиологического раствора (ОГ-1), после введения 2мг/кг массы животного адреналина (ОГ-2).

Каковы возможные механизмы приведенных изменений? Изоформы Nox из мембран, ядер, митохондрий и цитозоля клеток приведенных тканей выделяли с использованием метода, основанного на открытом недавно явлении образования нестабильного комплекса между ферриHb и изоформами Nox, локализованными в клеточных формированиях и экзосомах сыворотки крови [Skokos D. et al, 2001, Simonyan R.M. et al, 2014].

В результате такого комплексообразования изоформы Nox отщепляются из гетерогенной фазы (из биомембран) в гомогенную (растворимую) фазу. ФерриHb является белком основного характера (осаждается на целлюлозе КМ-52), однако в результате ассоциации (комплексообразования) с изоформами Nox (последние являются белками кислого характера и осаждаются на колонке с DE-52) ферриHb осаждается совместно с Nox на целлюлозе DE-52 [Симонян Р.М. и др., 2014].

Этот комплекс легко расщепляется при ионообменной хроматографии на колонке с целлюлозой DE-52, из которой ферриHb элюируется 0,02 М КФБ, а изоформы Nox 0,1М КФБ. Естественно, снижение содержания отщепленных изоформ Nox приводит к соответственному стехиометрическому снижению уровня ферриHb, входящего в комплексное состояние с ферриHb. Недавно было показано, что при аэробной инкубации элекрофоретически гомогенных препаратов изоформ Nox (они выделены из мембран клеток органов иммунной системы – селезенки, костного мозга, а также из ЭМ и сыворотки крови белых крыс) *in vitro*, а также после инкубации водных смесей клеточных мембран с адреналином *ex vivo,* эти Nox окисляют адреналин в адренохром (аминохром). Продукты окисления адреналина в определенных количествах необратимо связывается, возможно, с соответствующим доменом молекулы изоформ Nox. При этом, при сравнительно повышенных концентрациях (50 μM) адреналин подавляет NADPH зависимую $O_2^{\cdot-}$-продуцирующую и ферриHb-восстанавливающую активности изоформ приведенных Nox с некоторым необратимым изменением формы оптических спектров этих Nox, кроме eNox, которая проявляет высокую толерантность против адреналина. Однако, как соединение гормонального характера, при пониженных концентрациях (5нМ) адреналин, наоборот, вызывает повышение этих активностей изоформ Nox,

практически не изменяя формы оптических спектров поглощения. Предполагалось, что изоформы Nox могут быть рецепторами и для адренохрома (аминохрома). Аналогичным путем изоформы Nox играют роль рецептора для нейроактивного, богатого пролином полипептида – галармина, который является нейрогормоном и при низких концентрациях увеличивает, а при повышенных концентрациях подавляет активности этих Nox [Simonyan G.M. et al, 2011].

Изменение формы оптических спектров поглощения изоформ Nox является эффектом налаживания плотности поглощения адренохрома (аминохрома). При острой адреналиновой интоксикации крыс в приведенных условиях снижение уровня отщепленных изоформ Nox из клеточных компонентов тканей крыс в ОГ-2 скорее всего связано с воздействием продуцируемых гидроксильных радикалов (HO·) при неферментативном расщеплении перекиси водорода, которая является продуктом ферментативной дисмутации O_2^-(последние образуются при ферментативном окислении NADPH изоформами Nox, а также при окислении адреналина). Образующиеся HO· деградируют не только металлопротеины антиоксидантной, но и прооксидантной активностью (изоформы Nox) и являются высокоактивными окислителями для различных биосистем [Hou C.C. et al, 2011]. При этом, по сравнению с клеточными Nox, внеклеточная Nox (eNox) из экзосом сыворотки проявляет высокую толерантность к действию перекиси водорода и HO·[Симонян Р.М. и др., 1999].

В приведенных группах это является причиной повышения уровня eNox адаптационными системами организма, как фактора стимуляции внеклеточной иммунной системы [Skokos D. et al, 2001]. Путем нейтрализации гидроперекисных радикалов (HO_2^-) липидорастворимым α-токоферолом [Reiter E. et al,2007] и супероксидных радикалов селенатом натрия, в ОГ-3 и ОГ-5 снижается фон HO· радикалов, соответственно подавляется процесс деградации Nox, с увеличением уровня последних. В ОГ-4 эффективность защиты изоформ Nox L-аргинином выше. Это связано с тем, что L-Арг повышает активность каталазы [Товмасян М.С. и др., 2008] с соответственным снижением уровня перекиси водорода для ее неферментативного расщепления следами ионов переходных металлов с

образованием HO·. Эти изменения вызывают соответственное улучшение физиологического статуса и снижения числа гибели животных. Приближение уровня изоформ Nox и eNox в ОГ-3-5 является новым механизмом положительного эффекта L-аргинина, α-токоферола и селената натрия в эксперименте. Соответственно, использование L-аргинина при адреналиновой интоксикации более целесообразно по сравнению с α-токоферолом и селенатом натрия. Это, в свою очередь, дает предпосылки для использования L-аргинина при адреналиновом некрозе миокарда. На этом фоне,при острой адреналиновой интиксикации крыс, эффективность регулирования приведенных показателей, а также снижение числа гибели животных выше под влиянием введенных L-аргинина, затем α-токоферола и далее селената натрия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изоформы NADPH оксидазы (Nox) являются NADPH зависимыми O_2^--продуцирующими ферментами, действующими комбинированным механизмом [Vignais P., 2002]. Однако эта концепция нуждается пересмотру, так как Nox выделенные из мембран клеток, мембран внутриклеточных формирований продуцируют O_2^-автономно [Simonyan G.M. et al, 2011]. Впервые изоформы Nox были выделены и из эритроцитарных мембран (ЭМ) [Симонян М.А. и др., 1995], а спустя 19 лет была только определена Nox-активность ЭМ [George A. et al, 2013]. Наряду с внутриклеточной Nox, выделена и экстрацеллюлярная Nox (eNox) из наночастиц - экзосом сыворотки крови и асцитной жидкости различного характера в клинике и эксперименте. Причем экзосомы отщепляются из тканей млекопитающих в сыворотку крови и асцитных жидкостях при различного характера патологиеских состояниях, для стимуляции иммунной системы [Duijvest D.etal, 2011]. При этом изоформы Nox являются мембранными, а не цитозолевыми белками и они локализованы не в цитозоле, а цитоплазматических мембранах и при различных ситуациях отщепляются из цитоплазматических мембран и мембран клеточных и субклеточных компонентов (митохондрия, ядро) в цитозоль [Berridge M.V. et al, 2000, Симонян Р.М. и др., 2013; 2014]. При этом, наряду с активностью продуцирования O_2^-, изоформы Nox обладают и ферригемоглобин-восстанавливающей активностью [Simonyan G.M. et al, 2006]. За счет продуцируемых O_2^-,Nox регулируют окислительно-восстановительные процессы, происходящие при активации иммунной системы, экспрессию гена, митохондриальное дыхание, клеточную дифференциацию, их рост и апоптози, как это показано нами, кислородный гомеостаз. Этим обусловлена важность исследований с Nox. В последние годы нами было открыто явление самоотщепления (рилизинг) изоформ Nox из различных биомембран и стимуляции этого процесса ферри- или феррогемоглобином, за счет образования нестабильного комплекса между гемоглобином и локализованной на поверхности биомембран изоформ Nox [Симонян Р.М. и др., 2013]. Обнаружены различного

характера биоактивных соединений, стимулирующих или подавляющих рилизинг изоформ Nox.

Исходя из того, что катехоламины, в частности адреналин, проявляет кардиотоксический эффект за счет стимуляции продуцирование $O_2^{\cdot-}$, перекиси водорода и, соответственно гидроксильных радикалов, было актуально изучение эффекта адреналина на изменений характерных вышеприведенных свойств изоформ Nox *in vitro, ex vivo* и *in vivo*. В первой серии экспериментов было показано, что Nox из ЭМ, МКС, МКСТ, МККМ и eNox из сыворотки крови окисляют адреналин в адренохром, который способен необратимо связываться с определенным участком (доменом) молекулы Nox, вызывая характерные изменения форм оптических спектров поглощения этих ферментов, с подавлением (при избытке адренохрома-аминохрома) или стимулированием (при низких количествах адренохрома-аминохрома) NADPH зависимой $O_2^{\cdot-}$-продуцирующей и ферриHb-восстанавливающей активностей изоформ этих Nox, которые могут считаться рецепторами адреналина. Далее было показано, что в зависимости от степени сродства продуктов окисления адреналина - аминохромов к приведенным Nox и eNox также наблюдается снижение или повышение уровня и активности этих Nox с необратимым изменением оптических спектральных показателей изоформ Nox. Скорее всего, увеличение аминохромами удельного содержания отщепленных из клеточных компонентов Nox связано с индуцированием процесса ПОЛ мембран клеточных компонентов, стимулирующих рилизинг Nox из этих мембран.

В следующей серии экспериментов было показано, что, продукты окисления адреналина – аминохромы, могут проникать через мембраны клеток, мембраны субклеточных компонентов тканей и связываться непосредственно с локализованными в них Nox, стимулируя процесс их отщепления в гомогенную фазу и изменяя NADPH-зависимую $O_2^{\cdot-}$-продуцирующую и ферриHb-восстанавливающую активности этих ферментов в гомогенной и гетерогенной фазах. Отщепление Nox аминохромами из клеточных компонентов является новым механизмом дестабилизации клеточных компонентов *ex vivo*.

В исследованиях с гемоглобином было показано, что Hb является фактором индукции отщепления eNox из экзосом сыворотки донорской крови и асцитной жидкости карциномы яичника женщин, скорее всего, путем образования нестабильного комплекса с eNox, локализованных в этих жидкостях экзосом, с переходом eNox в растворимую фазу как *in vitro,* так и *in vivo.*

Далее было показано, что путем нейтрализации O_2^-, селенат натрия подавляет рилизинг изоформ Nox из мембранных формирований кардиомиоцитов. Этим механизмом селенат натрия проявляет мембраностабилизирующую роль, защищая кардиомиоциты от оксидативного повреждения, наблюдающегося, в частности, при сердечно-сосудистых заболеваниях [Rahmanto A.S. et al, 2012, Rees K. et al, 2013]. Полученные данные дают основание для использования селената натрия как антистрессорного агента неферментативного характера при инфаркте миокарда в эксперименте.

Было показано, что L-арг и α-Тк подавляют ферригемоглобин-индуцирующий рилизинг Nox из мембранных образований кардиомиоцитов крыс. Механизм такого эффекта связывается скорее всего, с подавлением ПОЛ. Подавление рилизинга изоформ Nox из мембран и субклеточных формирований кардиомиоцитов крыс L-Арг и α-Тк является новым механизмом мембраностабилизирующего эффекта этих неферментативных антиоксидантов. При дестабилизации эритроцитов, проникающий в сыворотку гемоглобин может играть дестабилизирующую роль в отношении мембран кардиомиоцитов, проявляя кардиотоксический эффект, а α-Тк совместно с L-Арг могут проявить кардиопротекторный эффект. С другой стороны, путем повышения L-аргинином активности каталазы и соответственного снижения уровня перекиси водорода, подавляется ПОЛ мембран клеток аорты сердца, соответственно снижая рилизинг Nox из этих мембран, для которых этот фермент является важным структурно-функциональным компонентом [Batot G. et al.1998]. Это является новым механизмом стабилизации L-аргинином мембран клеток аорты сердца.

Далее было констатировано, что продукты окисления подкожно введенного адреналина в концентрационно зависимой манере необратимо изменяют формы оптических спектров поглощения отщепленных изоформ Nox, изменяя NADPH

зависимой O_2^--продуцирующей и ферриHb-восстанавливающей активностей этих ферментов, а также степени отщепления и интенсивность комплексообразования изоформ приведенных Nox из ЭМ и из клеточных формирований (мембраны, ядра, митохондрий и цитозоля клеток) сердечной ткани, легких, печени и почек, а также из экзосом сыворотки крови крыс [Kesimer M. et al, 2009, Lasser C. et al, 2012, Rupp Q.A.K. et al, 2011, Simonyan R.M. et al, 2014; Ahmed G-E. 2014]. Эти показатели практически имеют аналогичную динамику изменений как *in vitro,* так и *ex vivo* и *in vivo.* Это свидетельствует о том, что мембраны клеточных формирований проницаемы для продуктов окисления адреналина *in vivo*, и, в зависимости от концентрации этих продуктов они могут стимулировать или подавлять активности изоформ Nox, путем необратимой ассоциации с молекулой этого фермента. Соответственно, в зависимости от количеств вводимого адреналина, на фоне стимуляции приведенных изменений наблюдается повышение смертности животных.

В опытах определения эффектов подкожно введенных L-арг, α-Тк и селената натрия при адреналиновой острой интоксикации крыс, было показано, что эти антиоксиданты проявляют различные степени положительного эффекта, предотвращая токсические эффекты продуктов окисления адреналина и снижая уровень изоформ Nox из клеточных мембран, мембран ядер, митохондрии и цитозоли клеток сердечной ткани, легких, печени и почек, из экзосом сыворотки [Li Y. et al, 2009, Lundquist G. et al, 1992, Obata T. et al, 2002, Obata T. et al, 1997]. На этом фоне, при острой адреналиновой интоксикации крыс, эффективность регулирования приведенных показателей и снижение числа гибели животных выше под влиянием введенных L-аргинина, затем α-токоферола и далее селената натрия.

ВЫВОДЫ

1. Продуцируемые O_2^- изоформами NADPH оксидазы (Nox) клеточных компонентов тканей крыс окисляют адреналин в адренохром, далее в аминохромы, которые вызывают необратимые изменения формы оптических спектров поглощения этих ферментов и в концентрационно зависимой манере повышают или подавляют NADPH зависимую O_2^--продуцирующую и ферриHb-восстанавливающую активности Nox *in vitro.*

2. Дестабилизирующий эффект аминохромов на мембраны клеточных компонентов тканей крыс обусловлен повышением перекисного окисления липидов (ПОЛ) мембран и увеличением степени рилизинга изоформ Nox *ex vivo.*

3. Индуцирование гемоглобином (Hb) рилизинга изоформ Nox из экзосом сыворотки и асцитной жидкости карциномы яичника женщин обусловлено образованием нестабильного комплекса между гемоглобином и Nox *in vitro* и *in vivo.*

4. Мембраностабилизирующие эффекты L-аргинина, α-токоферола и селената натрия обусловлены подавлением ПОЛ и рилизинга изоформ Nox из мембран клеток и мембран субклеточных формирований тканей крыс *ex vivo*.

5. При острой адреналиновой интоксикации крыс оксидативное повреждение мембран клеток и мембран субклеточных компонентов клеток тканей ассоцированы с инициированием ПОЛ этих мембран супероксидными и гидроксильными радикалами, изменением уровня и активностей отщепленных изоформ Nox и степени комплексообразования между Nox и Hb. Введенные крысам L-аргинин, α-токоферол и селенат натрия оказывают мембраностабилизирующий эффект, регулированием приведенных показателей различной степени.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексанян М.К., Галоян К.А. Симонян Г.М. Повышение NADPH-зависимой супероксид-продуцирующей и ферригемоглобин восстанавливающей активностей изоформами цит b558 кислого характера из клеток опухолевой ткани саркомы -37 мышей под влиянием богатого пролнном полипептида in vitro. // Вопр.теорет.клин.мед., 2010, 13(2), 54-57.

2. Алексанян С.С., Симонян Г.М., Алексанян А.С., Степанян А.А., Бабаян М.А., Симонян М.А. Различная степень рилизинга изоформ цитохрома b_{558} из эритроцитарных мембран и комплексообразование гемоглобина с цирохромом b_{558} при сердечно-сосудистых заболеваниях. // Мед.наука Армении, 2004, XLIV (3):47-50.

3. Мелконян Л.Г., Симонян Р.М., Симонян Г.М., БабаянМ.А., Аракелян Л.Н., Айрапетян Р.Л., Симонян М.А., Галоян А.А. Повышение уровня, NADPH зависимой O_2^--продуцирующей и ферригемоглобин-восстанавливающей активностей изоформ цитохрома b_{558} из мембран митохондрий и ядер клеток органов крыс после электрической стимуляции супраоптических и паравентрикулярных ядер (PVN) гипоталамуса повышает иммунореактивность гипоталамуса. // Нейрохимия, 2010, 27(2): 155-158.

4. Симонян Г.М. Цитохром b_{558} из сыворотки венозной крови человека при лимфобластическом и миелобластическом лейкозах и дисбаланс между эндогенными уровнями металлопротеинов. // Мед. Наука Армении, 2002, XLII(2): 101-103.

5. Симонян Г.М., Агамян Г.Р. Воздействие ПБП на активность цит.b558 и супрола in vitro. //Вестник МАНЭБ Санкт –Петербурга. 2006, Т.11(8), С. 171-175.

6. Симонян Г.М., Алексанян М.К., Симонян Р.М., Хачатрян А.Р., Бабаян Н.А., Алексанян С.С., Симонян М.А.Новые подходы аутотерапии рака в постоперационном периоде. // Вопр.Теорет.Клин.Мед., 2011, 14(4): 3-7.

7. Симонян Г.М., Григорян Г.Г., Симонян Р.М., Симонян М.А. Высокая резистентность сывороточных цитохромов b_{558} против перекиси водорода по сравнению с другими гемопротеинами. // В кн. Актуальные вопросы военной медицины. Сборник статей ЕрГМУ им М.Гераци, Ереван, 1999: 48-51.

8. Симонян Г.М., Нерсесян А.К., Симонян Р.М., Бабаян М.А., Симонян М.А., Галоян А.А. Противоопухолевый, антистрессорный эффекты RRP-1 при саркомы-45. Возможные биохимические механизмы. // Нейрохимия, 2005, 22(2): 125-130.

9. Симонян Г.М., Симонян Р.М., Агамян Г.Р. Влияние богатого пролином полипептида на восстановление метгемоглобина и продуцирование супероксидов металлопротеинами цитохромом b558 и супролом in vitro. // Нейрохимия, 2007, Т.24(10), С.37-40.

10. Симонян Г.М., Симонян Р.М., Бабаян М.А., Нерсесян А.К., Симонян М.А. Повышение кислотности эритроцитарного мембранного цитохрома b_{558} с образованием комплексного соединения с гемоглобином и изменение баланса между эндогенными уровнями антиоксидантных и прооксидантных металлопротеинов в крови женщин при раке грудной железы. // Мед.наука Армении, 2003, XLIII(2): 31-36.

11. Симонян Г.М., Симонян Р.М., Бабаян М.А., Секоян Э.С., Симонян М. А. Самоотщепление (рилизинг) фракции изоформ цитохрома b_{558} из гомогенатов тканей крыс *ex vivo* .// IV международная конференция «Современные реабилитации в медицине", Армения, Ереван, 2009.

12. Симонян Г.М., Симонян Р.М., Бабаян М.А., Симонян М.А., Галоян А.А.ФАД и углеводные остатки в составе ЭМ цитохромаb$_{558}$III, его NADPH-зависимая O_2^--продуцирующая активность и ЭПР спектральные характеристики. // Мед. наука. Армении, 2003, XLIII(1): 30-34.

13. Симонян Г.М., Симонян Р.М., Бабаян М.А., Степанян И.Е., Карапетян А.В., Симонян М.А.ФАД и углеводные остатки в составе эритроцитарного мембранного цитохрома b$_{558}$, его NADPH зависимая супероксид-продуцирующая активность и ЭПР спектральные характеристики. // Мед.наука Армении, 2003, XLIII(1): 30-34.

14. Симонян Г.М., Симонян Р.М., Симонян М.А. Образование сывороточного цитохрома b$_{558}$ после аэробного инкубирования крови *in vitro*. // Мед. наука Армении, 2005, XLV(2):26-29.

15. Симонян Г.М., Симонян Р.М., Симонян М.А. Способ получения цитохрома b$_{558}$ из клеточных компонентов. // Лицензия изобрет. Армпатента, N 2233 A. Ереван, 2008.

16. Симонян Г.М., Симонян Р.М., Симонян М.А. Способ получения цитохрома b$_{558}$ из эритроцитарных мембран. // Лицензия изобрет. Армпатента, N 908. Ереван, 2001.

17. Симонян М.А., Бабаян М.А., Симонян Г.М. Цитохромы b$_{558}$ из сыворотки крови и эритроцитарных мембран. Выделение, очистка и краткие характеристики. // Биохимия, 1995, 60(12): 1977-1987.

18. Симонян М.А., Карапетян А.В., Бабаян Н.А., Симонян Р.М. NADPH-содержащая, супероксид-продуцирующая липопротеиновая фракция из сыворотки крови. Выделение, очистка, краткая характеристика и механизм действия. // Биохимия, 1996, 61(6): 932-938.

19. Симонян М.А., Симонян Г.М., Симонян Р.М., Карапетян А.В. NADPH содержащая супероксид-продуцирующая липопротеиновая фракция из

сыворотки крови. Выделение, очистка краткие характеристики и механизм действия. // Биохимия, 1996, 61(5): 932-935.

20. Симонян Р.М., Галоян К.А., Симонян Г.М., Хачатрян А.Р., Бабаян М.А., Оксузян Г.Р., Симонян М.А. Ферригемоглобин индуцирует рилизинг NADPH оксидазы из клеток мозговой ткани ex vivo: подавления этого процесса галармином. // Нейрохимия, 2013, т.30, №3, с.1-5.

21. Симонян Р.М., Симонян Г.М., Бабаян М.А., Симонян М.А., Галоян А.А. Транслокация цитохрома b_{558} из мембран эритроцитов интактной и облученной Х-лучами крови при их инкубировании *in vitro*. Подавление этого процесса препаратами антиоксидантного действия. // Мед наука Армении, 2003, XLIII,26-31.

22. Симонян Р.М., Симонян Г.М., Симонян М.А. Получение цитохрома b_{558} из сыворотки крови в результате инкубирования крови в аэробных условиях *in vitro*. // Мед.наука Армении, 2005, XLV(2): 26-29.

23. Сираканян М.С., Оксузян Г.Р., Симонян Р.М., Симонян Г.М., Симонян М. А. Влияние ионов молибдена и кадмия на супероксид-продуцирующую и метHb-восстанавливающую активность новой изоформы цитохрома b_{558} из мембран клеток селезенки *in vitro*. // Биол.ж.Армении, 2006, 3-4: 185-189.

24. Сираканян М.С., Симонян Г.М., Арутюнян А.А., Бабаян М.А., Симонян М.А.Характеристические изменения уровня и активности антиоксидантных и прооксидантных металлопротеинов крови крыс при острой интоксикации ионами. // Вестник МАНЭБ Санкт-петербурга, 2006, 11(8): 192-197.

25. Тадевосян Л.Г., Симонян Р.М., Бабаян М.А., Симонян Г.М., Симонян М.А., Галоян А.А., Геворкян Г.А.Регулирующий эффект галармина на уровень и активность металлопротеинов при интоксикации крыс циклофосфамидом. // Вопр.Теорет.Клин.Мед., 2011, 14(5): 57-61.

26. Товмасян М.С., Хачатрян Г.С., Симонян Р.М., Бороян Р.Г., Симонян М.А.Изменение уровня и активности антиоксидантных и прооксидантных металлопротеинов тканей крыс под влиянием L-аргинина. // Мед. наука Армении, 2008, XLVIII (1): 35-46.

27. Фесчян С.М., Симонян Р., ВарданянА.Г., Бабаян М.А., Симонян Г.М., Енгибарян А.А., Симонян М.А. Рлиизинг NADPH оксидазы из клеточных компонентов крыс и стимулирование активности этого фермента аминохромами *ex vivo* . // Мед наука Армении**,** 2013, 1, т.LIII (1), 3-19.

28. Фесчян С.М., Симонян М.А., Енгибарян А.А., Симонян М.А.Роль гемоглобина в процессе появления экстрацеллюлярной NADPH оксидазы в сыворотке донорской крови и асцитной жидкости яичника женщин. // Вопр.Теорет.Клин.Мед., 2012, 4(71): 12-16.

29. Фесчян С.М., Симонян Р.М., Варданян А.Г., Бабаян М.А., Симонян Г.М., Енгибарян А.А., Симонян М.А. Рилизинг NADPH оксидазы из клеточных компонентов крыс и стимулирование активности этого фермента аминохромами *ex viv*о. // Мед Наука Армении, 2013, lII, No1, 3-19.

30. Фесчян С.М., Симонян Р.М., Симонян Г.М., Бабаян М.А., Енгибарян А.А., Симонян М.А. Окисление адреналина NADPH оксидазами и изменение их активностей и форм оптических спектров поглощения *in vitro*. // Вопр.Теор.Клин.Мед., 2012, 15(4): 32-35.

31. Al-Waeli A., Pappas A.C., Zoidis E., Georgiou C.A., Fegeros K., Zervas G..The role of selenium in cadmium toxicity: interactions with essential and toxic elements. // Br Poult Sci. 2012, 53(6):817-827.

32. Ahmed G-E. I., Ke Cheng.Exosomes as critical agents of cardial regeneration triggered by cell therapy.//Stem cell reports, 2014; .2(5):606-619.

33. Antonio A. Díaz-Cruz, Raquel R. Guinzberg, Ruy R. Guerra, Magdalena M . Vilchis, Daniel D. Carrasco, Francisco J. FJ García-Vázquez, Enrique E.

Piñat..Adrenaline stimulates H2O2 generation in liver via NADPH oxidase. // Free Radical Research 2007, 41(6): 663-672.

34. Armarego W.L., Waring P.Inhibition of human brain dihydropteridine reductase [E.C.1-6.99.10] by the oxidation products of catecholamines, the aminochromes. // Biochem.Biophys.Res.Commun. 1983, 113(3): 895-899.

35. Arora S, Vaishya R, Dabla PK, Singh B. NAD(P)H oxidases in coronary artery disease. // Adv Clin Chem. 2010, 50:65-86.

36. Azzi A. Molecular mechanism of alpha-tocopherol action. Free Radic. Biol. med. 2007, 43(1): 16-21.Azzi A., Stocker R. Vitamin E: non antioxidant roles. // Prog, Lipid Res., 2000, 39(3): 231-255.

37. Barzedar A., Pedersen J.Z., Incerpi S., Moosavi-Movahedi A.A., Saso L. The mechanism of antioxidant activity of IRFI005 as a synthetic hydrophilic analogue of vitamin E. // Biochimie, 2011, 93(10): 1880-1883.

38. Baselt R. Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man (8th ed.). // Foster City, CA: Biomedical Publications. 2008, p. 545–547.

39. Batot G., Paclet M-H., Doussie`re J., Vergnaud S.,Ce´cile Martel C., Pierre V. Vignais P.V., Morel F. Biochemical and immunochemical properties of B lymphocytecytochrome *b*558 . // Biochimica et Biophysica Acta. 1998; 1406: 188–202.

40. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. // Physiol Rev. 2007, 87(1):245-313.

41. Bell E.F. History of vitamin E in infant nutrition. // American J.Clin.Nutrition, 1987, 46(1):183-186.

42. Berridge M.V., Tan A.S. High-capacity radox control at the plasma membranes of mammalian cells: trans-membrane, cell surface, and serum NADH-oxidases. Antioxid.Redox.Signal. 2000, 2(2):231-242.

43. Bir SC, Shen X, Kavanagh TJ, Kevil CG, Pattillo CB.Control of angiogenesis dictated by picomolar superoxide levels. // Free Radic Biol Med. 2013, 63:135-142.

44. Bjorkhem-Bergman L., Ekstrom L., Eriksson L.C..Review: Exploring anticarcinogenic agents in a rat hepatocarcinogenesis model - focus on selenium and statins. // In Vivo. 2012, 26(4):527-535.

45. Bleeke T, Zhang H, Madamanchi N, Patterson C, Faber JE.Catecholamine-induced vascular wall growth is dependent on generation of reactive oxygen species. // Circ Res. 2004, 94(1): 37

46. Bowler R.P., Nicke M., Tran K., Tanner G., Chang L.G., Young S.K., Worthen G.S. // Extracellular superoxide dismutase attenuates lipopolysaccharide-induced neutrophilic inflammation. Am.J. Respir. Cell Mol.Biol., 2004, 31(4): 432-439.

47. Brar SS, Kennedy TP, Sturrock AB, Huecksteadt TP, Quinn MT, Whorton AR, Hoidal JR. An NAD(P)H oxidase regulates growth and transcription in melanoma cells. //Ам. J. Physiol. Cell Physiol., 2002, C.1212-C.1224.

48. Brar SS, Kennedy TP, Whorton AR, Sturrock AB, Huecksteadt TP, Ghio AJ, Hoidal JR. Reactive oxygen species from NAD(P)H:quinone oxidoreductase constitutively activate NF-kappaB in malignant melanoma cells. // Am J Physiol Cell Physiol. 2001; 280(3):C659-76.

49. Brieger K, Schiavone S, Miller F.J. Jr, Krause K.H. Reactive oxygen species: from health to disease. // Swiss Med Wkly. 2012, 142:w13659.

50. Briggs R.T., Drath D.B., Karnovski M.L., Karnovski M.J. Localization of NADH oxidase on the surface of human polymorphonuclear leukocytes by a new cytochemical method. // J. Cell Biol., 1975, 67(3):566-586.

51. Briggs R.T., Drath D.B., Karnovski M.L., Karnovski M.J. Localization of NADH oxidase on the surface of human polymorphonuclear leukocytes by a new cytochemical method. // J. Cell Biol., 1975, 67(3):566-586.

52. Bryant R.J., Pawlowski T., Catto J.W., Marsden G. Vessella RL, Rhees B, Kuslich C, Visakorpi T, Hamdy FC. Changes in circulating microRNA levels associated with prostate cancer. // Br. J. Cancer., 2012, 106(4): 768-774.

53. Carrichon L., Picciocchi A., Debeurme F., Defendi F., Beaumel S., Jesaitis A.J., DagherM.C., Stasia M.J. Characterization of superoxide overproduction by the D-Loop(Nox4)-Nox2 cytochrome b(558) in phagocytes-Differential sensitivity to calcium andphosphorylation events. // Biochim Biophys Acta. 2011. 1808(1): 78-90.

54. Casbon A.J., Long M.E., Dunn K.W., Allen L.A., Dinauer M.C. Effects of IFNγ on intracellular trafficking and activity of macrophage NADPH oxidase flavocytochrome b558. // J Leukoc Biol. 2012, 92(4):869-882.

55. Castrejón-Sosa M, Villalobos-Molina R, Guinzberg R, Piña E.Adrenaline (via alpha(1B)-adrenoceptors) and ethanol stimulate OH* radical production in isolated rat hepatocytes. // Life Sci. 2002, 71(21):2469-2474.

56. Chen P, Wang R.R., Ma X.J., Liu Q., Ni J.Z.. Different Forms of Selenoprotein M Differentially affect Aβaggregation and ROS generation.// Int J Mol Sci. 2013, 14(3):4385-4399.

57. Chessa T.A., Anderson K.E., Hu Y., Xu G., Rausch O., Stephens L.R., Hawkins P.T. Phosphorilation of threonine 154 in p40 phox is an important physiological signal for activation of the neutrophil NADPH oxidase. // Blood, 2010, 116(26), c. 6027-6036.

58. Cho N., Morré D.J. Early developmental expression of a normally tumor-associated and drug-inhibited cell surface-located NADH-oxidase (ENOX2) in non-cancer cells. // Cancer Immunol Immunother., 2009, Apr., 58(4):547-552.

59. Costa V.M., Silva R, Ferreira L.M., Branco P.S., Carvalho F, Bastos M.L., Carvalho R.A., Carvalho M, Remião F.Oxidation process of adrenaline in freshly isolated rat cardiomyocytes: formation of adrenochrome, quinoproteins, and GSH adduct. // Chem Res Toxicol. 2007, 20(8):1183-1191.

60. D'Down Y.M., El-Benna J., Periania A., Newsholme P. Inhibition of formyl-methionil-leucyl-phenylalanine-stimulated respiratory burst in human neutrophils by adrenaline: inhibition of phospholipase A2 activity but not p47 phox phosphorylation and translocation. // Biochem. Pharmacol. 2004, 67(1), c.183-190.

61. Declèves A.E., Sharma K. Novel targets of antifibrotic and anti-inflammatory treatment in CKD. // Nat Rev Nephrol. 2014,10(5):257-267

62. Della Rovere F, Granata A, Broccio M, Zirilli A, Broccio G. Hemoglobin, oxidative stress in cancer. // Anticancer Res., 1995, 15: 2089-2095.

63. Deo S.H., Jenkins N.T., Padilla J., Parrish A.R., Fadel P.J.Norepinephrine increases NADPH oxidase-derived superoxide in human peripheral blood mononuclear cells via α-adrenergic receptors. // Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2013, 305(10): R1124-R1132.

64. Diaz-Cruz A., Guinzberg R., Guerra R. Vilchis M, Carrasco D, García-Vázquez FJ, Piña E. .Adrenaline stimulates hydrogen peroxide generation in liver via NADPH oxidase.// Free Radic.Res., 2007, 41(6): 663-672.

65. Dhawan V., Handu SS, Nain CK, Ganguly NK. Chronic L-arginine supplementation improves endothelial cell vasoactive functions in hepercholesterolemic and atherosclerotic monkeys. // Mol. Cell Biochem. 2005; 269(1-2):1-11.

66. Donaldson J., La Bella F. Prooxidant properties of vanadate in vitro on catecholamines and on lipid peroxidation by mouse and rat tissues. // J.Toxicol. Environ.Health. 1983, 12(1), c. 119-126.

67. Douglas G, Bendall J.K., Crabtree M.J., Tatham A.L., Carter E.E., Hale A.B., Channon K.M. Endothelial-specific Nox2 overexpression increases vascular superoxide and macrophage recruitment in ApoE$^{-/-}$ mice. // Cardiovasc Res. 2012, 94(1):20-29.

68. Duijvest D., Luider T., Bangma S.H., Jenster G. Exosomes as biomarker treasure chests for prostate cancer. // Eur. Urol., 2011, 59(5): 823-831.

69. Dzafarov A.I., Mogamedov N.A., Azimova A.M. Role of monoaminoxidase in the intensification of peroxidation of lipids in mitochondria during experimental myocardial necrosis. // Biull.Exp.Biol.Med., 1988, 106(7): 45-47.

70. El-Benna J, Dang P.M., Gougerot-Pocidalo M.A. Priming of the neutrophil NADPHoxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to theplasma membrane. // Semin Immunopathol. – 2008. – 30(3): 279-289.

71. Friis MB, Vorum KG., Lambert IH. Voliume-sensitive NADPH oxidase activity and taurine effluxe in NIH3T3 mouse fibroblasts. // Am J. Physiol cell Physiol. 2008, 294(6):1552-1565.

72. Fu Y.C., Yin S.C., Chi C.S., Hwang B., Hsu S.L. Norepinephrine induces apoptosis in neonatal rat endothelial cells via a ROS-dependent JNK activation pathway. // Apoptosis. 2006, 11(11):2053-2063.

73. Fu Y.C., Yin S.C., Chi C.S., Hwang B, Hsu S.L. Antioxidant effect of valsartan in experimental model of myocardial infarction. // Mymensingh Med J. 2011, 20(3):472-477.

74. Gallo A., Tandon M., Alevizos I., Illei G.G. The majority of micro RNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. // PLoS One, 2012, 7(3): e 30679.

75. Garcia C., Pithon-Curi T.C., de Lourdes Firmano M., Pires de Melo M., Newsholme P., Curi R. Effects of adrenaline on glucose and glutamine metabolism and superoxide production by rat neutrophils. // Clin.Sci. (Lond), 1999, 96(6): 549-555.

76. George A., Pushkaran S, Konstantinidis D.G., Koochaki S, Malik P, Mohandas N, Zheng Y, Joiner C.H., Kalfa T.A..Erythrocyte NADPH oxidase activity modulated by Rac GTPases, PKC, and plasma cytokines contributes to oxidative stress in sickle cell disease. // Blood. 2013, 121(11): 2099-2107.

77. Ghadi F.E., Malhotra A, Ghara A.R., Dhawan D.K..Selenium as a modulator of membrane stability parameters and surface changes during the initiation phase of 1,2-dimethylhydrazine induced colorectal carcinogenesis. // Mol Cell Biochem. 2012, 369(1-2): 119-26.

78. Glebov A., Zinchuk V.Blood oxygen-carrying function during the oxidative stress induced by lipopolysaccharide with a modification of the L-arginine-NO pathway.//Rocz Akad Med Bialymst. 2005, 50:247-251.

79. Gorudko I.V., Mukhortava A.V., Caraher B, Ren M, Cherenkevich S.N., Kelly G.M., Timoshenko A.V.Lectin-induced activation of plasma membrane NADPH oxidase in cholesterol-depleted human neutrophils. // Arch Biochem Biophys. 2011, 516(2):173-181.

80. Gutwein P., Stoeck A., Riedle S., Gast D. Runz S, Condon TP, Marmé A, Phong MC, Linderkamp O, Skorokhod A, Altevogt P. Cleavage of L1 in exosomes and apoptix membrane vesicles released from ovarian carcinoma cells. // Clin. Cancer. Res., 2005, 11(7): 2492-2501.

81. Haklar G., Ulukaya D.C. Oxygen radicals and nitric oxide in rat mesenteric ischemia-reperfusion: modulation by L-arginine and NG-nitro-L-arginine methyl ester. // Clin. Exp. Pharmacol. 1998; 25(11):908-912.

82. Han Z., Gao LY. Lin YH, Chang L, Wu HY, Luo CX, Zhu DY. Neuroprotection of taurine against reactive oxygen species is associated with inhibiting NADPH oxidases. // Eur. J. Pharmacol. 2016, 777:129-135.

83. Hašková P, Kovaříková P, Koubková L, Vávrová A, Macková E, Simůnek T. Iron chelation with salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone protects against catecholamine autoxidation and cardiotoxicity. // Free Radic Biol Med. 2011, 50(4):537-549

84. Hou C.C., Lin H, Chang C.P., Huang W.T., Lin M.T. Oxidative stress and pyrogenic fever pathogenesis. // Eur J Pharmacol. 2011, 667(1-3): 6-12.

85. Imani A, Faghihi M, Sadr S.S., Niaraki S.S., Alizadeh A.M. Noradrenaline protects in vivo rat heart against infarction and ventricular arrhythmias via nitric oxide and reactive oxygen species. // Author informationJ Surg Res. 2011, 169(1):9-15.

86. Jabłecka A., Checiński P., Krauss H., Micker M., Ast J.The influence of two different doses of L-arginine oral supplementation on nitric oxide (NO) concentration and total antioxidant status (TAS) in atherosclerotic patients. // Med Sci Monit. 2004, 10(1):CR29-CR32.

87. Jakovljevic V.L., Canovic P.S., Andjelkovic N.V., Djuric D.M. The effects of nimodipine and L-NAME on coronary flow and oxidative stress parameters in isolated rat heart. // Acta Physiol. Hung. 2006, 93(4):251-61.

88. Jiang Q. Natural forms of vitamin E: metabolism, antioxidant, and anti-inflammatory activities and their role in disease prevention and therapy. // Free Radic Biol Med. 2014; 72:76-90.

89. Jiménez M.D., Martín M.J., Alarcón de la Lastra C., Bruseghini L., Esteras A., Herrerías J.M., Motilva V. Role of L-arginine in ibuprofen-induced oxidative stress and neutrophil infiltration in gastric mucosa. // Free Radic. Res., 2004, 38(9):903-911.

90. Karapetyan A.V., Simonyan G.M., Anne-Frances Miller, Bert Lynn Jr., Babayan M.A., Simonyan R.M., Simonyan M.A. Cytochromes b_{558} from erythrocyte membranes: some physico-chemical properties. // 227th ACS National Meeting, Anaheim, CA, 2004.

91. Kawashima T, Ohkubo K, Fukuzumi S.Radical scavenging reactivity of catecholamine neurotransmitters and the inhibition effect for DNA cleavage. // J Phys Chem B. 2010, 114(1): 675-680.

92. Kesimer M., Scull M., Brighton B., DeMaria G. Burns K, O'Neal W, Pickles RJ, Sheehan JK.Characterization of exosome-like vesicles released from human tracheobronchial siliated epithelium: s possible role in innate defence. // FASEB J. 2009, 23(6): 1858-1868.

93. Kharaeva Z., Gostova E., De Luca C., Raskovic D., Korkina L. Blé-Castillo J.L., Díaz-Zagoya J.C., Méndez J.D. Is vitamin-E supplementation beneficial or harmful? // Gac. Med. Mex., 2008, Mar-Apr,144(2): 147-154.

94. Kharaeva Z., Gostova E., De Luca C., Raskovic D., Korkina L. Clinical and biochemical effects of coenzyme Q (10), vitamin E, and selenium supplementation to psoriasis patients. // Nutrition, 2009, 25(3): 295-302

95. Khurana S., Piche M., Hollingsworth A., Venkataraman K., Tai T.C.. Oxidative stress and cardiovascular health: therapeutic potential of polyphenols. // Can J Physiol Pharmacol. 2013, 91(3):198-212.

96. Kikuchi H, Kuribayashi F, Kiwaki N, Nakayama T. Curcumin dramatically enhancesretinoic acid-induced superoxide generating activity via accumulation of p47-phox and98 p67-phox proteins in U937 cells. // Biochem Biophys Res Commun. 2010, 95(1): 61-65.

97. Kleniewska P., Piechota A., Skibska B., Gorąca A. The NADPH oxidase family and its inhibitors.//Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2012, 60(4):277-294.

98. Klepler K., Schmid R. Alpha tocopherol in plasma, red blood cells and lenses with and without cataract. // Am.J. Ophthelmol. 2005, 139(2): 266-270.

99. Kresium V.I., Minakov O.L., Tyshchenko O.V., Kravchenko L.S., Dzenkevych J.O. The membrane-protective action of a new preparation of n-3 polyenic acids in the adrenaline-damaged myocardium. // Lik. Sprava, 1996, 3-4: 49-52.

100. Kirshenbaum LA, Gupta M. Antioxidant protection against adrenaline-induced arrhythmias in rats with chronic heart hypertrophy. // Can.J. Cardiol. 1990; 6(2):71-74.

101. Kuroda J., Sadoshima J. NADPH oxidase and cardiac failure. // J Cardiovasc Transl Res. 2010, 3(4):314-320.

102. Heerebeek L Van, Meischl C, Stooker W, Meijer C. J. L. M, Niessen H. W. M, RoosD. NADPH oxidase(s): new source(s) of reactive oxygen species in the vascular system. // J Clin Pathol 2002; 55:561–568.

103. Lässer C., Eldh M., Lötvall J. Exosomes detection. // J. Vis. Exp. 2012, 59: 3037-3055.

104. Lei X., Feng C., Liu C., Wu G., Meininger C.J., Wang F., Li D., Wang J.Regulation of protein expression by L- arginine in endothelial cells. // Front Biosci (Schol Ed). 2011, 3:655-661.

105. Li Y, Arnold J.M., Pampillo M, Babwah A.V., Peng T.Taurine prevents cardiomyocyte death by inhibiting NADPH oxidase-mediated calpain activation. // Free Radic Biol Med. 2009, 46(1):51-61.

106. Ligeti E., Tardif M., Vignais P.V. Activation of superoxide-generation oxidase of bovine neutrophils in a cell-free system. Interaction of a cytosolic factor with the plasma membrane and control by G nucleotides. // Biochemistry, 1999, 22(17): 7116-7123.

107. Liu J., Lloyd S.G. High-fat, low-carbohydrate diet alters myocardial oxidative stress and impairs recovery of cardiac function after ischemia and reperfusion in obese rats. // Nutr Res. 2013, 33(4): 311-321.

108. Lundqvist G, Morgenstern R. Mechanism of activation of rat liver microsomal glutathione transferase by noradrenaline and xanthine oxidase. // Biochem. Pharmacol. 1992, 43(8): 1725-1728.

109. Maejima Y, Kuroda J, Matsushima S, Ago T, Sadoshima J.Regulation of myocardial growth and death by NADPH oxidase. // Author information. J Mol Cell Cardiol. 2011,50(3):408-416.

110. Manea A, Manea SA, Florea I.C., Luca C.M., Raicu M. Positive regulation of NADPH oxidase 5 by proinflammatory-related mechanisms in human aortic smooth muscle cells. // Free Radic Biol Med. 2012, 52(9):1497-1507.

111. Marcela Helena Gambim, Alipio de Oliveira do Carmo, Luciana Marti, Sidney Veríssimo-Filho, Lucia Rossetti Lopes and Mariano Janiszewski. Platelet-derived exosomes induce endothelial cell apoptosis through peroxynitrite generation: experimental evidence for a novel mechanism of septic vascular function. // Critical Care 2007, 11:R107 (doi: 10.1186/cc6133).

112. Marrali G., Casale F., Salamone P., Fuda G., Caorsi C., Amoroso A. Brunetti M., Restagno G., Barberis M., Bertuzzo D., Canosa A., Moglia C., Calco A., Chio A. NADPH oxidase (NOX2) activity is a modifier of survival in ALS. // J Neurol. 2014, 261(11):2178-2183.

113. Méndez J.D., Balderas F.L. Inhibition by L-arginine and spermidine of hemoglobin glycation and lipid peroxidation in rats with induced diabetes. // Biomed. Pharmacother. 2006, 60(1):26-31.

114. Miller J.W., Selhub J, Joseph J.A..Oxidative damage caused by free radicals produced during catecholamine autoxidation: protective effects of O-methylation and melatonin. // Free Radic Biol Med. 1996, 21(2):241-249.

115. Miyagawa K., Ohashi M., Yamashita S., Kojima M., Sato K., Ueda R., Dohi Y. Increased oxidative stress impairs endothelial modulation of contractions in arteries from spontaneously hypertensive rats. // J. Hypertens., 2007, 25(2): 415-421.

116. Morel F.Molecular aspects of chronic granulomatous disease. "The NADPHoxidase complex". // Bull Acad Natl Med. 2007, 191(2): 377-390.

117. Mouzaoui S, Djerdjouri B, Makhezer N, Kroviarski Y, El-Benna J, Dang PM.Tumor necrosis factor-α-induced colitis increases NADPH oxidase 1 expression, oxidative stress, and neutrophil recruitment in the colon: preventive effect of apocynin. // Mediators Inflamm. 2014, 2014:312484. doi: 10.1155/2014/312484.

118. Muller D.P.Vitamin E and neurological function. // Review, Mol. Nutr. Food Res., 2010, 54(5):710–718.

119. Nanobashvili J., Neumayer C., Fuegl A., Punz A., Blumer R., Mittlböck M., Prager M., Polterauer P., Dobrucki L.W., Huk I., MalinskiT. Combined L-arginine and antioxidative vitamin treatment mollifies ischemia- reperfusion injury of skeletal muscle. // J. Vasc. Surg., 2004, 39(4):868-877.

120. Neri M, Cerretani D, Fiaschi A.I., Laghi P.F., Lazzerini P.E., Maffione A.B., Micheli L, Bruni G, Nencini C, Giorgi G, D'Errico S, Fiore C, Pomara C, Riezzo I, Turillazzi E, Fineschi V.Correlation between cardiac oxidative stress and myocardial pathology due to acute and chronic norepinephrine administration in rats. // J Cell Mol Med. 2007, 11(1):156-170.

121. Nguyen MV, Lardy B, Rousset F, Hazane-Puch F, Zhang L, Trocmé C, Serrander L, Krause K.H., Morel F.Quinone compounds regulate the level of

ROS production by the NADPH oxidase Nox4. // Biochem Pharmacol. 2013, 85(11):1644-1654.

122. Nishino Y, Ando M, Makino R, Ueda K, Okamoto Y, Kojima N.Different mechanisms between copper and iron in catecholamines-mediated oxidative DNA damage and disruption of gene expression in vitro. // Neurotox Res.2011,120(1):84-92.

123. Niu X.L., Madamanchi N.R., Vendrov A.E., Tchivilev I, Rojas M, Madamanchi C, Brandes R.P., Krause K.H., Humphries J., Smith A, Burnand K.G., Runge M.S. Nox activator 1: a potential target for modulation of vascular reactive oxygen species in atherosclerotic arteries. // Circulation. 2010, 121(4): 549-559.

124. Novo E., Busletta C., Bonzo L.V., Povero D., Paternostro C., Mareschi K., Ferrero I., David E., Bertolani C., Caligiuri A., Cannito S., Tamagno E., Compagnone A., Colombatto S., Marra F., Fagioli F., Pinzani M., Parola M. Intracellular reactive oxygen species are required for directional migration of resident and bone marrow-derived hepatic pro-fibrogenic cells. // J Hepatol. 2011, 54(5): 964-974.

125. Obata T., Yamanaka Y. Iron (III) attenuates hydroxyl radical generation accompanying non-enzymatic oxidation of noradrenaline in the rat heart. // Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2002, 365(2): 158-163.

126. Ostuni M.A., Lamanuzzi LB., Bizouarn T, Dagher M.C., Baciou L. Expression offunctional mammal flavocytochrome b(558) in yeast: comparison with improved insectcell system. // Biochim Biophys Acta, 2010, 1798(6): 1179-1188.

127. Paclet M.H., Berthier S, Kuhn L, Garin J, Morel F.Regulation of phagocyte NADPHoxidase activity: identification of two cytochrome b558 activation states. //FASEB J. 2007, 21(4):1244-1255.

128. Page P.Pharm Pat Anal.. Advances and strategies in NADPH oxidase inhibitors and activators patents. // Pharm .2014;3(4):387-409.

129. Pandey D, Gratton J.P., Rafikov R, Black S.M., Fulton D.J. Calciumcalmodulin-dependent kinase II mediates the phosphorylation and activation of NADPH oxidase 5.// Mol Pharmacol. 2011,80(3):407-415.

130. Parvin R., Akhter N. Protective effect of tomato against adrenaline-induced myocardial infarction in rats. // Bangladesh Med. Res. Counc.Bull., 2008, 34(3): 104-108.

131. Perovic A., Vuckovic T., Cvijic G., Djordjevic J., Davidovic V. Involvement of nitric oxide in noradrenalin-induced changes in the activity of antioxidant enzymes and lipid peroxidation in rat brown adipose tissue and heart. // Physiol Res. 2008, 57(1):95-100.

132. Peter L. Hordijk. Regulation of NADPH Oxidases. The Role of Rac Proteins. // Circulation Research. 2006, 98: 453-462.

133. Piccoli C., D'Aprile A., Ripoli M., Scrima R., Lecce L., Boffoli D., Tabilio A., Capitanio N.Bone-marrow derived hematopoietic stem/progenitor cells express multiple isoforms of NADPH oxidase and produce constitutively reactive oxygen species. // Biochem Biophys Res Commun. 2007, 353(4): 965-972.

134. Popolo A., Autore G., Pinto A., Marzocco S. Oxidative stress in patients with cardiovascular disease and chronic renal failure. // Free Radic Res. 2013, 47(5):346-356.

135. Przybylska D, Mosieniak G.The role of NADPH oxidase NOX4 in regulation of proliferation, senescence and differentiation of the cells. // Postepy Biochem., 2014, 60(1):69-76.

136. Rahmanto A.S., Davies M.J..Selenium-containing amino acids as direct and indirect antioxidants. // IUBMB Life. 2012, 64(11):863-871.

137. Ramoutar R.R., Brumaghim J.L. Antioxidant and anticancer properties and mechanisms of inorganic selenium, oxo-sulfur, and oxo-selenium compounds. // Cell Biochem Biophys. 2010, 58(1):1-23.

138. Raymondos K., Panning B., Leuwer M., Brechelt G., Korte T., Niehaus M., Tebbenjohanns J., Pieenbrock S. Absorption and hemodynamic effects of airway administration of adrenaline in patients with severe cardiac disease. // Ann. Intern. Med. 2000. 132 (10): 800–803.

139. Rees K., Hartley L., Day C., Flowers N., Clarke A., Stranges S.Selenium supplementation for the primary prevention of cardiovascular disease.//Cochrane Database Syst Rev. 2013, 31, 1:CD009671.

140. Reiter E., Jiang Q., Christen S.Anti-inflammatory properties of alpha- and gamma- tocopherol. //Mol. Aspects Med., 2007, 28(5-6):668-691.

141. Rezvanfar M.A., Rezvanfar M.A., Shahverdi A.R., Ahmadi A, Baeeri M, Mohammadirad A, Abdollahi M. Protection of cisplatin-induced spermatotoxicity, DNA damage and chromatin abnormality by selenium nano-particles.//Toxicol Appl Pharmacol. 2013, 266(3):356-65

142. Rodiño-Janeiro B.K., Paradela-Dobarro B, Castiñeiras-Landeira M.I., Raposeiras-Roubín S, González-Juanatey J.R., Alvarez E. Current status of NADPH oxidase research in cardiovascular pharmacology.//Vasc Health Risk Manag. 2013, 9:401-28.

143. Rozario R.J., Akhter N, Bhuiyan N.I., Alom M.M.. Protective effect of tomato against adrenaline-induced myocardial infarction in rats.//Bangladesh Med Res Counc Bull., 2008, 34(3):104-108.

144. Rosic G, Selakovic D, Joksimovic J, Srejovic I, Zivkovic V, Tatalović N, Orescanin-Dusic Z, Mitrovic S, Ilic M, Jakovljevic V. The effects of N-acetylcysteine on cisplatin-induced changes of cardiodynamic parameters within coronary autoregulation range in isolated rat hearts. // Toxicol Lett. 2016; 242:34-46.

145. Rupp Q.A.K., Rupp S., Keller S., Brase J.S., Ehehalt R., Fogel M., Moldenhauer G., Marme F., Sultmann H., Altevogt P. Loss of EpCAM expression in breast cancer derived serum exosomes: role of proteolytic cleavage. // Gynecol.Oncol. 2011, 122(2): 437-446.

146. Saller S, Merz-Lange J, Raffael S, Hecht S, Pavlik R, Thaler C, Berg D, Berg U, Kunz L, Mayerhofer A.Norepinephrine, active norepinephrine transporter, and norepinephrine-metabolismare involved in the generation of reactive oxygen species in human ovarian granulosa cells. // Endocrinology. 2012, 153(3):1472-1483.

147. Sarah K. McCann and Carli L. Roulston NADPH Oxidase as a Therapeutic Target for Neuroprotection against Ischaemic Stroke: Future Perspectives.// Brain Sci. 2013, 3, 561-598

148. Sayan H., Ugurlu B., Babül A., Take G., Erdogan D. Effects of L-arginine and NG-nitro L-arginine methyl ester on lipid peroxide, superoxide dismutase and nitrate levels after experimental sciatic nerve ischemia-reperfusion in rats.//Int. J. Neurosci., 2004, 114(3):349-364.

149. Schneider C. Chemistry and biologi of vitamin E.// Mol.Nutr.Food Res., 2005, 49(1):7-30.

150. Sethi R., Adameova A., Ghalla K.S., Khan M., Elimban V., Dhalla N.S. Modification of epinephrine-induced arritmias by N-acetil-L-cysteine and vitamin E. // J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther., 2009, 14(2): 134-142.

151. Sigola L B, Zinyama R B. Adrenaline inhibits macrophage nitric oxide production through beta1 and beta2 adrenergic receptors. // Immunology. 2000, 100(3):359-363.

152. Simonyan G.M., Galoian K.A., Simonyan R.M., Simonyan M.A., Galoyan A.A. Proline rich polypeptide (PRP-1) increases the superoxise-producing and ferrihemoglobin reducing activities of cytochrome b_{558} izofroms from human lymphosarcoma tissue cells.// Neurochem.Res., 2011, 36: 739-745.

153. Simonyan G.M., Simonyan R.M., Simonyan M.A. The reduction of hemoglobin by erythrocyte membrane cytochrome b_{558} at various pathologocal states in vitro.// Electronic J. Of National Sci. NAS RA, 2006, 2(7): 3-6.

154. Simonyan G.M., Simonyan R.M., Simonyan M.A., Galoyan A.A. Stimulation of the NADPH depending superoxide-producing and methemoglobin-reducing activities of new isoforms of cytochromes b_{558} by PRP-1 and $GxNH_2$. //Neurochem.Res. 2008, 33: 1155-1156.

155. Simonyan M., Simonyan R., Shirinyan S., Chailyan G., Simonyan G., Alexanyan S.Inadequate changes of the level and activity of extracellular NADPH oxidase, isolated from fluid's nanoparticles of ascetic human lung carcinoma depending on the dduration of the disease.//«NANO 2014», Moscow, July 13-18, 2014, p.794.

156. Simonyan M.A. Reduction of some organic and inorganic oxidants in alkaline media by superoxide dismutase and scavengers of hydroxyl radicals.// Biochem.Biophys.Res.Commun., 1982, 108(4): 1751-1756.

157. Simonyan M.A., Nalbandyan R.M. Interaction of hydrogen peroxide with superoxide dismutase from erythrocytes. FEBS Lett., 1972, 28(1):22.

158. Simonyan M.A., Nalbandyan R.M. Generation of superoxide radicals in alkaline solution of hydrogen peroxide and the effect os superoxide dismutase on this system.//Biochim.Biophys. Acta, 1979, 583(3): 279-286.

159. Simonyan R.M. Different counteraction of the blood at cardiovascular diseases against UVA-irradiation // Electronic J. of Natural Sciences of NAS RA, 2008, 1(10): 6-9.

160. Simonyan R.M., Simonyan G.M., Oxuzyan G.R., Alexanyan S.S., Simonyan M.A. The hemoglobin induces releasing ot the extracellular NADPH oxidase in mammalian blood serum and fluids of ascitic carcinomas *in vitro* and *in vivo* . // Issues in theoretical and clinical medicine, 2014, 17 (2): 16-21.

161. Singh U, Jialal I. Anti-inflammatory effects of alpha-tocopherol. // Ann. NY Acad Sci. 2004; 1031:195-203.

162. Skokos D., Le panse S., Villa I., Rousselle J.C. Peronet R, David B, Namane A, Mécheri S. Mast cell-dependent B and T lymphocyte activation is mediated by the secretion of immunologically active exosomes. // J. Immunol. 2001, 166(2): 868-876.

163. Souabni H., Thoma V., Bizouarn T., Chatgilialoglu C., A. Siafaka-Kapadai A., Baciou L., C. Ferreri C., C. Houée-Levin C., M.A. Ostuni M. A.trans Arachidonic acid isomers inhibit NADPH-oxidase activity by direct interaction with enzyme components. // Biochimica et Biophysica Acta. 2012; 1818(9): 2314–2324.

164. Stanic B, Katsuyama M, Miller FJ Jr.An oxidized extracellular oxidation-reduction state increases Nox1 expression and proliferation in vascular smooth muscle cells via epidermal growth factor receptor activation.//Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2010, 30(11):2234-2241.

165. Stef G., Csiszar A., Ziangmin Z., Ferdinandy P., Ungvari Z., Veress G. Inhibition of NADPH oxidase attenuates aggregation of platelet from high-risk cardiac patients with aspirin resistance. // Pharmacol. Rep. 2007; 59(4): 428-436.

166. Streeter J, Schickling B.M., Jiang S,, Stanic B., Thiel W.H., Gakhar L, Houtman J.C.,Miller F.J.Phosphorylation of Nox1 Regulates Association With NoxA1 Activation Domain. // Circ Res. 2014, 115(11):911-918.

167. Suessenbacher A., Lass A., Mayer B., Brunner F. Antioxidative and myocardial protective effects of L-arginine in oxygen radical-induced injury of isolated perfused rat hearts. // Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2002, 365(4):269-276.

168. Sunggip C., Kitajima N., Nishida M., Redox control of cardiovascular homeostasis by angiotensin II. // Curr Pharm Des. 201319(17):3022-3032.

169. Traber M.G., Stevens J.F. Vitamins C and E: beneficial effects from a mechanistic perspective. // Free Radic.Biol.Med. 2011, 51(5): 1000-1013.

170. Tsai Y.R., Huang L.J., Lee M.R., Chen Y-L. Kuo SC, Tzeng CC, Hsu MF, Wang JP. The signaling mechanisms mediating the inhibitory effect ot TCH-1116 on formil peptide-stimulated superoxide generation in neutrophils. // Eur.J.Pharmacol. 2012; 682(1-3):171-180.

171. Tsan M.F. Superoxide dismutase and pulmonary oxygen toxicity: lessons from transgenic and knockout mice (Review). // Int. J. Mol. Med. 2001; 7(1): 13-19.

172. Tuncyurek P., Yenisey C., Doger F.K., Soyder A., Bicakci T., Cevikel M.H.Nitric oxide as an independent regulatory factor in regenerating rat liver. // Acta Chir Belg. 2006; 106(5):581-587.

173. Urao N., McKinney R.D., Fukai T., Ushio-Fukai M. NADPH oxidase 2 regulates bone marrow microenvironment following hindlimb ischemia, role in reparative mobilization of progenitor cells. // Stem Cells, 2012, 30(5): 923-934.

174. Van Balkom B.W., Pisitkum T., Verhaar M.C., Knepper M.A. Exosomes and the kidney: prospects for diagnosis and therapy of renal diseases. //Kidney Int., 2011, 80(11): 138-145.

175. Vignais P.V. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. // Cell Mol. Life Sci., 2002, 59(9): 1428-1459.

176. Villacorta L., Graca-Souza A.V., Ricciarelly R., Zingg J.M., Azzi A. α-Tocopherol induces expression of connective tissue growth factor and antagonizes tumor necrosis factor- α-mediated down regulation in human smooth muscle cells. // Circ. Res., 2003, 92(1): 104-110.

177. Von Löhneysen K., Noack D., Wood M.R., Friedman J.S., Knaus U.G. Structural insights into Nox4 and Nox2: motifs involved in function and cellular localization. // Mol. Cell. Biol. 2010, 30(4):961-975.

178. Wang Q.Vitamin E and its function in membranes.//Progress in Lipid Research, 1999, 38(4): 309-336.

179. Wang Q., Zhou H. Naloxone inhibits immune cell function by suppressing superoxide production through a direct interaction with gp91 phox subunit of NADPH oxidase. // J. Neuroinflammation. 2012; 9:32.

180. Watson M., van Leer L., Vanderlelie J.J., Perkins A.V. Selenium supplementation protects trophoblast cells from oxidative stress. // Placenta. 2012, 33(12):1012-1019**.**

181. Wefers H.S. The protection of ascorbate and glutathione against misrosomal lipid peroxidation is dependent on vitamin E. // European J. of Biochemistry, 1988, 174(2): 353-357.

182. Wen X, Wu J, Wang F, Liu B, Huang C, Wei Y. Deconvoluting the role of reactive oxygen species and autophagy in human diseases. // Free Radic Biol Med. 2013, 65: 402-410.

183. Whitney E., Sharon R.R.Peggy Williams, ed.Understandding Nutrition // (Twelft ed.). California: Wadsworth, Cengage Learning ISBN 0-538-73465-5.

184. Wind S, Beuerlein K, Armitage ME, Taye A, Kumar AH, Janowitz D, Neff C, Shah AM, Wingler K, Schmidt HH. Oxidative stress and endothelial dysfunction in aortas of aged spontaneously hypertensive rats by NOX1/2 is reversed by NADPH oxidase inhibition. // Hypertension. 2010, 56(3):490-497.

185. Winterbourn CC. The biological chemistry of hydrogen peroxide. // Methods Enzymol. 2013,528:3-25.

186. Xu X, Zhao W, Lao S, Wilson B.S., Erikson J.M., Zhang J.Q., Effects of exercise and L-arginine on ventricular remodeling and oxidative stress.//Med Sci Sports Exerc. 2010, 42(2):346-354.

187. Yagi K., Ishida N., Komura S., Ohishi N., Kusai M., Kohno M.Generation of hydroxyl radical from linoleic acid hydroperoxide in the presence of epinephrine and iron. // Biochem. Biophys. Res. Commun., 1992, 183(3): 945-951.

188. Yagi K., Komura S., Ishida N., Nagata N., Kohno M., Ohishi N. Generation of hydroxyl radical from lipid hydroperoxides contained in oxidatively modified low-density lipoprotein. // Biochem. Biophys. Res. Commun., 1993, 190(2): 386-390.

189. Yoshida L.S., Tsunawaki S. Expression OD NADPH oxidases and enhanced hydrogen peroxide generating activity in human coronary artery endothelial cells upon induction with tumor necrosis factor –alfa. // Int.Immunopharmacol. 2008; 10:1377-1385.

190. Yu P., Han W., Villar V.A., Yang Y., Lu Q., Lee H., Li F., Quinn M.T., Gildea J.J., Felder R.A., Jose P.A.Unique role of NADPH oxidase 5 in oxidative stress in human renal proximal tubule cells. // Redox Biol. 2014, 2:570-579.

191. Zamora P.L., Villamena F.A. Pharmacological approaches to the treatment of oxidative stress-induced cardiovascular dysfunctions.//Future Med Chem. 2013, 5(4):465-478.

192. Zhang Z.W., Zhang J.L., Zhang Y.H., Wang Q.H., Li S, Wang X.L., Xu S.W.. Effect of oxygen free radicals and nitric oxide on apoptosis of immune organ induced by selenium deficiency in chickens. // Biometals. 2013, 26(2):355-365.

193. Zhu H., Fan G.C. Extracellular Circulating microRNAs and their potential role in cardiovascular disease. // Am.J. Cardiovasc. Dis., 2011, 1(2): 138-149.

194. Zingg J., Azzi A. Non-antioxidant activities of vitamin E. // Current medicinal chemistry, 2004, 11(9): 1113-1133.