

АГЛЯДЫ

УДК 615:577.152.11

Н. А. БИЗУНОК

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ NOX2-НАД(Ф)Н-ОКСИДАЗЫ

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь, e-mail: bizunokna@bsmu.by

В контексте развития направлений разработки способов и средств управления редокс-зависимыми процессами в организме человека в настоящей работе отражены как история развития научных представлений об одном из важнейших биологических генераторов активных форм кислорода – Nox2-НАДФН-оксидазе (К.Ф.1.6.3.1, Nox2), так и современный взгляд на особенности локализации и молекулярного строения этого ферментного комплекса, а также на спектр и биологическое значение активных форм кислорода, генерируемых при его участии.

Ключевые слова: активные формы кислорода, Nox2-НАДФН-оксидаза, редокс-регуляция, К.Ф.1.6.3.1, Nox2, gp91^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}.

N. A. BIZUNOK

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL FEATURES OF NOX2-NAD(P)H-OXIDASE

Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus, e-mail: bizunokna@bsmu.by

In the context of the development of ways and means to control the redox-dependent processes in the human body, the present article deals with the history of the scientific ideas of Nox2-NADPH oxidase (E.C.1.6.3.1, Nox2) – one of the most important biological generator of reactive oxygen species (ROS), the current understanding of the peculiarities of localization and molecular structure of the enzyme complex, the spectrum, and the biological significance of reactive oxygen species generated by its participation.

Keywords: reactive oxygen species, Nox2-NADPH oxidase, redox regulation E.C.1.6.3.1, Nox2, gp91^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}.

Введение. Одно из суперсемейств ферментов, обеспечивающих целевую генерацию активных форм кислорода (АФК) в клетках животных и растительных организмов, получило название НАД(Ф)Н-оксидазы по наименованию основного донора электронов (кофактора этих ферментов) – НАД(Ф)Н·Н⁺ и главной каталитической субъединицы – Nox. (Сегодня изоформы семейства НАД(Ф)Н-оксидаз принято называть по наименованию главной каталитической субъединицы, входящей в их состав. Так, если главной каталитической субъединицей фагоцитарной НАДФН-оксидазы (К.Ф.1.6.3.1) является Nox2, то весь ферментный комплекс называется Nox2 или Nox2-НАДФН-оксидаза, однако в настоящей работе сокращенное название не используется во избежание терминологической путаницы и Nox2 называется только каталитическая субъединица). Открытию НАД(Ф)Н-оксидаз, изучению их строения и выяснению биологической роли этих ферментов предшествовал долгий путь – от накопления разрозненных фактов до их объединения в концепцию редокс-регуляции. Первое сообщение о способности лейкоцитов экспоненциально увеличивать потребление кислорода при уничтожении фагоцитированных объектов появилось в начале 1933 г. [1]. Вскоре этот феномен получил название «респираторный взрыв» (respiratory burst), что, согласно представлениям того времени, объяснялось активацией тканевого дыхания, необходимой для обеспечения фагоцитоза дополнительной энергией. Только в 1959 г. Sbarra и Karnovsky [2] показали, что в основе респираторного взрыва лежит усиление метаболизма глюкозы в пентозофосфатном пути, а не активация окислительного фосфорилирования.

Вслед за этим в 1961 г. группа исследователей под руководством Iyer [3] обнаружила, что результатом респираторного взрыва является генерация пероксида водорода (H_2O_2), а затем Rossi и Zatti (1964 г.) [4] высказали предположение (оказавшееся впоследствии верным), что в его реализации участвует особый ферментный комплекс, названный позднее оксидазой респираторного взрыва. В начале 1970-х годов всеобщее внимание уделялось продуктам этого фермента, тогда же впервые был показан вклад миелопероксидазы (МПО) в антимикробную активность фагоцитов, ассоциированную с респираторным взрывом. В 1973 г. Babior и соавт. [5] опровергли исследование Iyer, доказав, что первичным продуктом оксидазы респираторного взрыва является не пероксид водорода, а супероксидный анион ($O_2^{\bullet-}$).

Требовали объяснения и результаты клинических наблюдений. В 1957 г. Berendes и соавт. [6] описали новый (и, как впоследствии оказалось, редкий) патологический синдром. Он был обнаружен у детей и проявлялся рекуррентно текущими пиогенными инфекциями в сочетании с гранулематозной реакцией, лимфоаденопатией и гипергаммаглобулинемией. В дальнейшем было установлено, что причиной синдрома является генетический дефект, при котором фагоциты не способны убивать поглощенные микроорганизмы. Несмотря на компенсаторное напряжение других звеньев иммунной системы, пациенты умирали в молодом возрасте (преимущественно до 40 лет), имея признаки генерализации грибковых и гнойных процессов. Это нарушение иммунитета впоследствии получило название «хроническая гранулематозная болезнь» (ХГБ). Вскоре было показано, что при ХГБ подавлена или вообще отсутствует бактерицидная активность фагоцитов, тогда как другие сопряженные с фагоцитозом процессы – хемотаксис, захват объектов фагоцитоза и дегрануляция – полностью интактны. В 1967 г. было установлено, что причиной ХГБ является неспособность фагоцитов генерировать АФК [7].

Следующим шагом стало обнаружение в фагоцитах протеинов, обеспечивающих продукцию АФК. В 1978 г. Segal и соавт. [8, 9] описали цитохром b_{558} в лейкоцитах здоровых людей и указали на его отсутствие при ХГБ. Около десятилетия понадобилось для того, чтобы изучить состав и свойства этого цитохрома. В конце 1980-х годов две исследовательские группы (Royer-Pokora и соавт. [10] и Teahan и соавт. [11]) независимо друг от друга клонировали ген, кодирующий каталитическую субъединицу цитохрома, называемую обычно $gp91^{phox}$ ($Nox2$ по нынешней номенклатуре), тогда же была открыта его вторая (мембранная) субъединица – $p22^{phox}$ [12].

С тех пор интерес к НАД(Ф)Н-оксидазам в научном мире непрерывно нарастал. К этому времени биологи получили в свое распоряжение новую технологию – cell-free, которая давала возможность оценивать активность ферментов и других компонентов клетки вне действия «помеховых» факторов. Широкое применение этой технологии в научных исследованиях позволило открыть цитозольные субъединицы фагоцитарной $Nox2$ -НАД(Ф)Н-оксидазы – $p47^{phox}$ и $p67^{phox}$ [13], а также выдвинуть предположение о роли ГТФ-связывающих протеинов $Rac1$ и $Rac2$ в работе фермента [14]. В 1993 г. Wientjes и соавт. [15] описали третью (последнюю) цитозольную субъединицу $Nox2$ -НАД(Ф)Н-оксидазы фагоцитов – $p40^{phox}$.

Параллельно с накоплением знаний о фагоцитарной $Nox2$ -НАД(Ф)Н-оксидазе в начале 1980-х годов было показано, что сходные ферментные системы существуют и в других клетках, включая фибробласты [16], различные опухолевые клетки [17] и гладкомышечные клетки сосудов (ГМКС) [18]. Поскольку фибробласты $Nox2$ -дефицитных пациентов обладали обычной способностью к генерации АФК, стало ясно, что их источником является не фагоцитарная НАД(Ф)Н-оксидаза, а другой фермент, однако молекулярная основа $Nox2$ -НАД(Ф)Н-оксидазной активности в клетках, отличных от фагоцитов, оставалась неопределенной. Ситуация коренным образом изменилась с развитием генно-инженерных технологий и появлением реальной возможности изучать геном.

В конце 1990-х две группы исследователей независимо друг от друга обнаружили первый гомолог субъединицы $Nox2$. Первоначально он именовался митогенной оксидазой-1 ($Mox-1$) [19] или НАД(Ф)Н-оксидазным гомологом-1 ($Noh-1$) [20], а в соответствии с современной номенклатурой называется $Nox1$. Вслед за $Nox1$ были клонированы $Nox3$ [21], $Nox4$ [22] и $Nox5$ [23]. Параллельно были открыты две изоформы семейства НАД(Ф)Н-оксидаз большей молекулярной массы, строение которых отличалось от уже известных. Они получили название двойных окси-

даз (Duox1 и Duox2) и первоначально были описаны как «тиреоидные оксидазы» [24, 25]. Вместе с тем поиск цитозольных субъединиц – гомологов $p47^{phox}$ и $p67^{phox}$ – привел к обнаружению и клонированию Nox1 и Noxa1 [26], а затем Duoxa1 и Duoxa2 [27].

Насколько полной является информация о суперсемействе НАД(Ф)Н-оксидаз, которой владеет современная наука, оценить сложно. На основе анализа геномов нескольких видов млекопитающих можно с высокой долей вероятности утверждать, что большинство специфических элементов Nox-системы в настоящее время уже обнаружено: семь изоформ каталитической субъединицы (Nox1-5 и Duox1-2), две организующие субъединицы ($p47^{phox}$, Nox1), две активаторные субъединицы ($p67^{phox}$, Noxa1) и два Duox-специфичных фактора созревания (Duoxa1 и Duoxa2).

В настоящей работе отражены современные представления об особенностях локализации и молекулярном строении Nox2-НАД(Ф)Н-оксидаз, спектре и биологических функциях АФК, генерируемых при их участии.

Локализация Nox2-НАД(Ф)Н-оксидаз. До сих пор широко распространено мнение о том, что Nox2-НАД(Ф)Н-оксидаза, являясь прототипом семейства, имеет чрезвычайно ограниченную, исключительно фагоцит-специфическую тканевую экспрессию, хотя к настоящему времени накоплено достаточно доказательств экспрессии Nox2-НАД(Ф)Н-оксидазы в клетках, не относящихся к фагоцитам, включая нейроны, кардиомиоциты, миоциты скелетных мышц, гепатоциты, эндотелиальные клетки и гемопоэтические стволовые клетки [28, 29].

Что касается внутриклеточного распределения, то в покоящихся лейкоцитах большая часть Nox2-НАД(Ф)Н-оксидазы находится во внутриклеточных компартментах, а именно во вторичных (специфических) и третичных (желатиназо-содержащих) гранулах. При стимуляции фагоцитов происходит перемещение этих гранул к плазматической мембране клетки, их слияние с фагосомальной мембраной и сборка на ней Nox2-НАД(Ф)Н-оксидазы, вслед за этим – активация фермента. Однако Nox2-НАД(Ф)Н-оксидаза может быть активирована внутри гранул и без предварительного слияния с мембраной. Биологическим смыслом такой внутриклеточной генерации АФК может быть реализация сигнальных функций этих молекул. В клетках, отличных от фагоцитов, внутриклеточное распределение Nox2-НАД(Ф)Н-оксидаз варьируется в зависимости от их типа. Например, в гладкомышечных клетках она обнаруживается в непосредственной близости от перинуклеарного скелета, в нейронах гиппокампа – на мембранах синаптических зон и участвует, как предполагается, в супероксид-зависимом долговременном потенцировании и формировании памяти [28, 29].

Субъединицы Nox2-НАД(Ф)Н-оксидаз. Главная каталитическая субъединица (Nox2, $gp91^{phox}$), называемая также β -субъединицей цитохрома b_{558} , состоит из 570 аминокислот. Nox2 человека – гликозилированный протеин [29]. Молекулярная масса гликозилированной формы колеблется в пределах от 70 до 90 кДа, удаление углеводных остатков снижает молекулярную массу до 55 кДа. Углеводные цепочки состоят в основном из N-ацетилглюкозамина, в их состав входят также фруктоза, манноза и глюкоза. Углеводы связаны и аспарагиновыми остатками (^{132}Asn , ^{149}Asn и ^{240}Asn) во второй и третьей экстраклеточных петлях [30]. Триста N-концевых аминокислот образуют 6 трансмембранных α -спиралей, а С-концевой цитоплазматический домен содержит сайты для связывания ФАД и НАДФ. $gp91^{phox}$ связывает две группы гема через две пары гистидина. Следовательно, $gp91^{phox}$ содержит все кофакторы, необходимые для переноса электронов, который происходит в два этапа: от НАД(Ф)Н- H^+ на ФАД и от ФАДН на гем с превращением O_2 в $\text{O}_2^{\bullet-}$ [31–33]. Одна из моделей трехмерной структуры $gp91^{phox}$ представлена на рис. 1.

Субъединица $p22^{phox}$, или α -субъединица цитохрома b_{558} , содержит 195 аминокислот и имеет молекулярную массу 21,0 кДа. Она связывает $gp91^{phox}$ в соотношении 1:1, обеспечивая его стабилизацию и функциональную готовность [35–37]. N-концевой фрагмент $p22^{phox}$ состоит предположительно из трех трансмембранных α -спиралей; С-концевая цитоплазматическая часть лишена вторичной структуры, имеет участок, насыщенный пролином (PRR), который содержит RxxP-последовательность (Pro-Хаа-Хаа-Pro) вокруг ^{156}Pro (рис. 1). Эта последовательность является мишенью для SH3 (Src homology 3) доменов цитозольной субъединицы $p47^{phox}$, мутация ^{156}Pro проявляется в виде одной из форм ХГБ [38–40]. Активация Nox2-НАД(Ф)Н-оксидазы со-

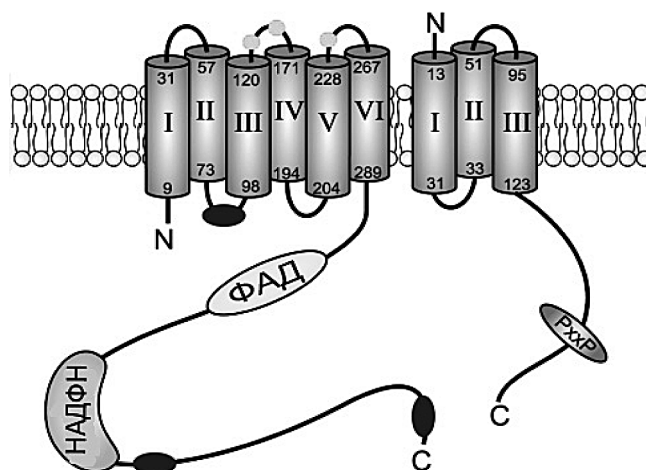


Рис. 1. Модель цитохрома b_{558} – главной каталитической субъединицы Nox2-НАД(Ф)Н-оксидазы (цит. по Y. Groemping, K. Rittinger [34]) с предполагаемыми трансмембранными спиралями $gp91^{phox}$ и $p22^{phox}$, сайтами гликозилирования (обозначены светлыми точками), участками, которые взаимодействуют с $p47^{phox}$ (обозначены темными овалами), ФАД- и НАДФ-связывающими сайтами в $gp91^{phox}$, а также положением RxxP последовательности в цитоплазматическом участке $p22^{phox}$, взаимодействующей с $p47^{phox}$

проводится фосфорилированием $p22^{phox}$ по остаткам треонина (^{132}Thr и ^{147}Thr) [41]. Физиологическое значение фосфорилирования в настоящее время не известно, но следует отметить, что ^{147}Thr находится в участке, взаимодействующем с $p47^{phox}$.

Рас-ГТФазы. Впервые предположение о том, что ГТФазы важны для активации НАД(Ф)Н-оксидазы, было выдвинуто в конце 1980-х годов, когда было показано, что гуаниновые нуклеотиды способны стимулировать ее активность [42]. Позже были идентифицированы Rac1 и Rac2 – ГТФазы, абсолютно необходимые для работы фермента [43]. Рас принадлежит к Rho-семейству малых ГТФаз, которые действуют как своеобразные «молекулярные рубильники», контролируя множество путей передачи сигнала, различные клеточные ответы и функции (например, такие, как ремоделирование цитоскелета и хемотаксис) [44]. Активность ГТФаз определяется состоянием гуанинового нуклеотида в тот или иной период времени. ГДФ поддерживает протеин в неактивном состоянии, ГТФ, напротив, способствует активации, обеспечивая взаимодействие с нижележащими эффекторами передачи сигналов. Переходы между активным и неактивным состояниями регулируются белками GEFs (guanine-nucleotide-exchange factors), которые инициируют отщепление ГДФ и облегчают связывание ГТФ, а также белками GAP (GTPase-activating proteins), которые существенно ускоряют гидролиз ГТФ, подавляя ГТФазную сигнализацию [45, 46].

Все ГТФазы состоят из шести стабильных β -слоев, называемых также полосами, и пяти α -лент [47–49]. Конформационные изменения, происходящие во время переходов из активного в неактивное состояние, ограничены двумя участками протеина, получившими название пусковых зон I и II (Switch I и II), которым соответствуют аминокислотный участок (АК) 30–40, известный как «эффекторная петля», и АК 60–67. Эти участки распознаются регуляторными протеинами GDIs, GEFs, GAPs и нижележащими эффекторами и могут играть роль «парковок» для протеинов, взаимодействующих с ГТФазами. Остаток ГТФазы, включающий вставочную спираль (АК 123–135), обнаруженный только у Rho-семейства ГТФаз, во время перехода ГДФ в ГТФ остается неизменным. Особенность Рас заключается в сохранении конформации пусковой зоны II при связывании с ГТФ [50, 51]. Rac1 и Rac2 геранил-геранилированы по С-концу, что способствует их соединению с мембранами. В покое обе изоформы находятся в цитозоле. Это обеспечивается их взаимодействием с ингибиторным GDI протеином через пусковую зону II и гидрофобный карман GDI, который вмещает геранил-гераниловую часть ГТФазы [52]. Подходящие стимулы индуцируют диссоциацию Rho-GDI, обеспечивая возможность дальнейшей транслокации ГТФазы к мембране [53] и замену ГДФ на ГТФ, которая катализируется GEFs – фосфоинозитид-активируемым фактором обмена P-Rex1 и гемопоэтическим клеточным фактором GEF – Vav1 [54, 55].

С позиций управления оксидазной активностью особенно интересны два участка Rac: вставочная спираль и гибкий С-конец, в которых отмечаются наибольшие структурные различия между Rac1 и Rac2. Rac1 экспрессируется повсеместно, тогда как экспрессия Rac2 ограничена гемопоэтическими клетками [56]. Оба протеина состоят из 192 аминокислот и имеют 92 %-ную гомологию последовательностей, при этом аминокислотные составы пусковых участков и вставочных спиралей абсолютно идентичны. Оба фермента поддерживают продукцию супероксида Nox2-НАД(Ф)Н-оксидазой в cell-free модельных системах, включающих чистые протеины. Однако существующие функциональные отличия между Rac1 и Rac2 обуславливают и разный характер их взаимодействия с изоформами Nox-НАД(Ф)Н-оксидаз. Интересно, что в активированных нейтрофилах изоформы Rac расположены в разных субклеточных структурах. Это распределение, регулируемое С-концевым участком и аспарагином 150 (¹⁵⁰Asn) в молекуле Rac2, может проявляться вариабельностью Nox-НАД(Ф)Н-оксидазных ответов [57].

Cdc42 – это малый G-протеин, на 70 % гомологичный Rac1/2 [58]. Cdc42 может активироваться при взаимодействии с интегрином β_2 и, как правило, является ингибитором Nox-НАД(Ф)Н-оксидаз. Таким образом, Rac и Cdc42 работают как антагонисты, конкурирующие за связывание с цитохромом b_{558} через вставочный домен или за счет управления транслокацией цитозольной субъединицы p67^{phox} [59]. Основное отличие протеинов заключается в аминокислотном составе эффекторного домена (Switch I) и состоит в замене четырех аминокислот. Наиболее важными из них являются аминокислоты в положениях 27 и 30, мутация которых в Cdc42 приводит к появлению способности активировать оксидазу подобно Rac2 [58, 60, 61].

P29 пероксиредоксин – последний из открытых протеинов, ассоциированных с оксидазой [62]. Имеет собственную фосфолипазную и пероксидазную активность, повышает активность оксидазы в условиях преинкубации с рекомбинантными Rac1, p47^{phox} и p67^{phox}. Дефицит этого протеина до сих пор не описан.

Активность фагоцитарной Nox2-НАД(Ф)Н-оксидазы зависит от кооперации цитохрома b_{558} с цитозольными протеинами – p67^{phox}, p47^{phox} и p40^{phox}. Они обеспечивают совокупность протеин-протеиновых и протеин-липидных взаимодействий, иногда многократно повторяющихся, как бы копируемых, и тем самым контролируют активность фермента.

Субъединица p47^{phox} – это 390-аминокислотный протеин с молекулярной массой 44,7 кДа, который состоит из N-концевого PX (Phox homology) домена, двух смежных SH3 доменов, полиосновного участка (polybasic region, PBR) – зоны, богатой аргининовыми и лизиновыми остатками, и участка, насыщенного пролином (proline reach region (PRR)) в области С-концевого фрагмента молекулы (рис. 2) [63].

PX домен впервые был идентифицирован в 1996 г. как фрагмент, присущий субъединицам p47^{phox} и p40^{phox} и необходимый для специфического распознавания фосфоинозитидов [63]. В случае p47^{phox} он распознает предпочтительно PtdIns(3,4)P₂ и осуществляет мембранное «закоревание» p47^{phox} после транслокации [64]. Два SH3 домена p47^{phox} обеспечивают множество протеин-протеиновых взаимодействий и в состоянии покоя, и при активации, отдельные из них запускаются фосфорилированием [65]. Среди всех субъединиц Nox2-НАД(Ф)Н-оксидазы в наибольшей степени подвержен фосфорилированию P47^{phox}. В настоящее время идентифицировано 11 сайтов фосфорилирования этого протеина в области С-концевого SH3В домена [66, 67].

Многочисленные исследования показали, что актин цитоскелета играет немаловажную роль в регуляции Nox2-НАД(Ф)Н-оксидазной активности. Например, показано, что PX домены p47^{phox} и p40^{phox} связывают моэзин, который относится к семейству актин-связанных протеинов ЭРМ (эзрин/радиксин/моэзин) [68]. Взаимодействие моэзина с PX доменом p47^{phox} может обеспечивать мембранную транслокацию этой субъединицы [69], однако его трудно согласовать с фосфоинозитид-связывающей функцией PX домена, поэтому роль актинового цитоскелета в сборке оксидазы остается предметом интенсивных исследований.

Субъединица p67^{phox} – 526-аминокислотный протеин с молекулярной массой 59,8 кДа, который состоит из N-концевого домена TPR, содержащего четыре тетратрикопептидных последовательности, PRR и двух SH3 доменов, разделенных доменом PB1 (Phox and Bem1) (рис. 2). Известно, что TPR домены обеспечивают в мультипротеиновых комплексах протеин-протеиновые

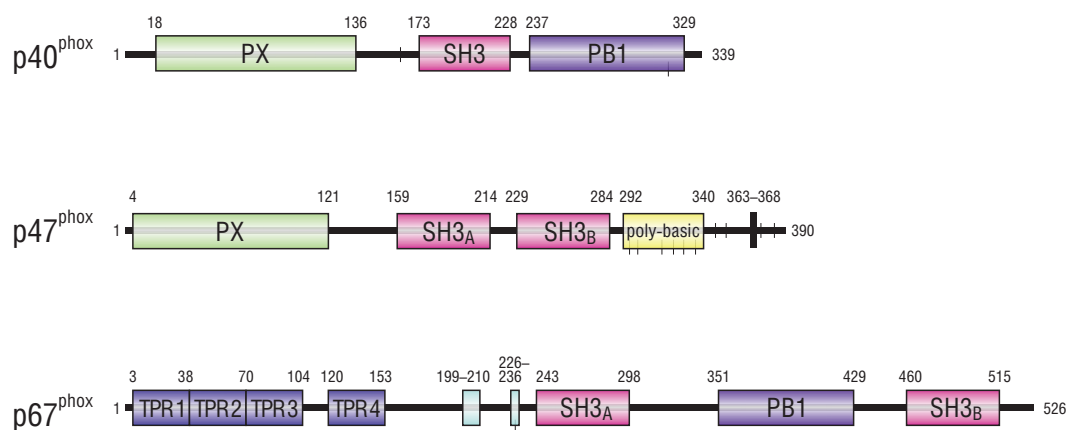


Рис. 2. Структура цитозольных субъединиц (**p40^{phox}**, **p47^{phox}** и **p67^{phox}**) Nox2-НАД(Ф)Н-оксидазы (цит. по Y. Groemping, K. Rittinger [34]). Структура доменов цитоплазматических компонентов установлена с использованием технологии SMART (simple modular architecture research tool). Положения консенсусной RxxP цепочки в p47^{phox} (АК 363–368) и p67^{phox} (АК 226–236) обозначены жирными штрихами, положения сериновых и треониновых остатков, которые фосфорилируются в процессе активации, – светлыми штрихами

взаимодействия [70]. В случае p67^{phox} он обеспечивает взаимодействие с Рас-ГТФ [71]. Кроме того, несмотря на отсутствие какой-либо гомологии с НАД(Ф)Н-связывающими сайтами других протеинов, TPR может связывать НАД(Ф)Н⁺ и проявлять слабую дегидрогеназную активность [72]. Биологическое значение этой активности непонятно, поскольку цитохром *b*₅₅₈ содержит связывающие сайты всех кофакторов, необходимых для восстановления кислорода. Пока не обнаружено партнеров для взаимодействия с PRR p67^{phox}, как не известно и то, участвует ли SH3A домен в регуляции Nox2-НАД(Ф)Н-оксидазной активности. PB1 домен p67^{phox} образует гетеродимер с аналогичным доменом p40^{phox} [73]. В дополнение к этим модулям p67^{phox} содержит активаторный домен, который включает аминокислоты 199–210 и абсолютно необходим для генерации супероксида, поскольку напрямую взаимодействует с флавоцитохромом и регулирует перенос электронов [74].

Изучение процессов фосфорилирования p67^{phox} с использованием различных киназ, включая p38 MAPK и Erk1/2, показало, что он способен к аутоингибированию. После удаления N-концевого участка молекулы p67^{phox}, в ее С-концевой области появляется новый сайт фосфорилирования (АК 244–526). Тем самым подтверждается, что p67^{phox} находится в конформации, при которой С-концевой сайт фосфорилирования маскируется N-концевым фрагментом, содержащим TPR-домен. Перемещение друг относительно друга N- и С-концевых фрагментов с образованием транс-конформации приводило к ингибированию фосфорилирования, что подтверждает необходимость тесного взаимодействия между этими областями [75].

Субъединица p40^{phox} представляет собой 339-аминокислотный протеин с молекулярной массой 39,0 кДа, который состоит из PX, SH3 и PB1 доменов (рис. 2). P40^{phox} – последняя из идентифицированных цитозольных субъединиц Nox2-НАД(Ф)Н-оксидазы [76, 77]. Она взаимодействует с p67^{phox} через PB1 домен, а через SH3 домен – с PRR субъединицы p47^{phox} [78]. Эти взаимодействия очень слабы в сравнении с теми, которые происходят между p47^{phox} и p67^{phox}, и их значение в регуляции активности оксидазы пока не известно. PX домен p40^{phox} специфически связывается с PtdIns(3)P, который накапливается в мембранах фагосом и может, таким образом, облегчать сборку оксидазы этой локализации [64]. Функциональное значение p40^{phox} в настоящее время не ясно. Предполагается, что при одних условиях он может выступать в роли активатора, в других – являться ингибитором оксидазной активности [79, 80].

Сборка Nox2-НАД(Ф)Н-оксидазы. Активация Nox2/p22^{phox} (цитохрома *b*₅₅₈) происходит через комплекс протеин-протеиновых взаимодействий и требует транслокации цитозольных факторов к Nox2/p22^{phox}. Действующая в настоящее время модель предполагает следующую цепочку событий [29, 34]:

Фосфорилирование субъединицы $p47^{\text{phox}}$ ведет к конформационным изменениям молекулы, позволяющим ей взаимодействовать с $p22^{\text{phox}}$.

Предварительно сформированный комплекс $p47^{\text{phox}}-p67^{\text{phox}}-p40^{\text{phox}}$ перемещается к мембране с образованием связи $p47^{\text{phox}}-p22^{\text{phox}}$.

Рас ГТФаза взаимодействует с $p67^{\text{phox}}$, обеспечивая его правильную ориентацию и контакт с цитохромом, что в конце концов замыкает цепь транспорта электронов.

Взаимодействие $p47^{\text{phox}}$ и $p40^{\text{phox}}$ с фосфоинозотидами мембраны способствует дополнительному закреплению комплекса.

Сборка активирует продукцию супероксида путем переноса электрона от $\text{НАД(Ф)Н}\cdot\text{Н}^+$, образуемого в цитозоле, на кислород люминальной поверхности клетки.

Что касается переноса электронов, то он происходит в два этапа. На первом этапе электрон переносится от $\text{НАД(Ф)Н}\cdot\text{Н}^+$ на ФАД (процесс регулируется активационным доменом $p67^{\text{phox}}$). При этом $\text{Nox2-НАД(Ф)Н-оксидаза}$ более селективна в отношении $\text{НАДФН}\cdot\text{Н}^+$, чем $\text{НАДН}\cdot\text{Н}^+$ как субстрата, с K_m порядка 40–45 мкМ против 2,5 мМ соответственно [34]. На втором этапе один электрон переносится от восстановленного флавина ФАДН_2 на железо внутреннего гема. Поскольку железо гема может принять только один электрон, внутренний гем должен отдать этот электрон внешнему гему, перед тем как принять второй электрон от теперь уже частично восстановленного флавина – ФАДН [34]. Электродвижущая сила для переноса второго электрона меньше (31 против 79 мВ), но все еще энергетически приемлема. Поскольку перенос электрона от внутреннего гема к внешнему происходит против электродвижущей силы, чтобы создать энергетически приемлемое состояние для захвата электрона, кислород должен быть связан с внешним гемом [34].

Биологическое значение АФК, генерируемых при участии $\text{Nox2-НАД(Ф)Н-оксидазы}$. Образующийся при активации $\text{Nox2-НАД(Ф)Н-оксидазы}$ супероксид является родоначальником других АФК (понятия «активные формы кислорода» и «свободные радикалы кислорода» не равнозначны, поскольку к первым относятся как радикальные, так и нерадикальные формы). Последние представляют собой небольшие молекулы, содержащие кислород в качестве основного компонента, и включают кислородные радикалы: гидроксил- ($\cdot\text{ОН}$), пероксил- ($\text{RO}_2\cdot$) и алкоксил- ($\text{RO}\cdot$), а также некоторые нерадикальные формы, которые либо являются окислителями, либо легко превращаются в радикалы (например, хлорноватистую кислоту (HOCl), озон (O_3), синглетный кислород ($^1\text{O}_2$) и пероксид водорода (H_2O_2)). Оксиданты, содержащие азот, такие как оксид азота ($\text{NO}\cdot$), называются активными формами азота (АФА), их часто относят к группе АФК. В физиологических условиях АФК постоянно появляются как побочные продукты различных биохимических процессов в митохондриях, пероксисомах, системе цитохрома P-450 и других ферментных комплексах клетки. В отличие от этого $\text{Nox2-НАД(Ф)Н-оксидазы}$ генерируют АФК не в качестве побочного, а в качестве главного продукта.

Генерация АФК в системе $\text{Nox2-НАД(Ф)Н-оксидазы}$ обычно происходит в виде каскадной реакции, которая начинается с образования супероксида. Последний быстро дисмутирует в пероксид водорода или спонтанно, особенно при низких значениях pH, или при участии супероксид-дисмутаза (СОД) в качестве катализатора. Другие элементы каскадной генерации АФК включают реакцию $\text{O}_2\cdot^-$ и $\text{NO}\cdot$ с образованием пероксинитрита, пероксидазное образование хлорноватистой кислоты из пероксида водорода и катализируемую железом реакцию Фентона, ведущую к образованию гидроксильного радикала.

На протяжении десятков лет в биологических и медицинских исследованиях основное внимание уделяли повреждающему действию АФК [81, 82]. Оно действительно имеет большое значение для развития ряда патологических процессов, но нет сомнений и в том, что индуцированная АФК окислительная модификация молекул – важный механизм физиологической регуляции множества биологических процессов [29, 83, 84].

Так, например, АФК индуцируют образование в клетках вторичных посредников – цАМФ и цГМФ. АФК стимулируют накопление ионов Ca^{2+} в цитозоле и фосфорилирование белков в результате активации протеинкиназ (в основном протеинкиназы C (РКС)), протеинтирозинкиназ и ингибирования протеинфосфатаз. АФК могут сами по себе играть роль посредников внутриклеточной сигнализации, индуцируют экспрессию генов (в том числе протоонкогенов)

и деление клеток, чему находится все больше экспериментальных подтверждений. Среди всех АФК наибольшее внимание как вторичный посредник привлекает H_2O_2 , для которой доказана способность активировать фактор транскрипции NF- κ B, что приводит к индукции синтеза ряда цитокинов и иммунных рецепторов, а также белков «острой фазы» и адгезии [83, 84].

Патологические последствия возникают при чрезмерном накоплении АФК, пероксидов и их вторичных продуктов – состоянии, называемом обычно оксидантным (оксидативным, окислительным) стрессом, а факторы и вещества, способствующие этому, называют прооксидантами. Каковы бы ни были пусковые механизмы оксидантного стресса, в конечном счете все сводится к окислительной модификации макромолекул (нуклеиновых кислот, белков и липидов) с изменением их структуры и функций.

В настоящее время известно более 60 заболеваний, в патогенезе которых ведущее значение имеет оксидантный стресс. Такие болезни часто называют «свободнорадикальной патологией». К ним, в частности, относят тяжелые, инвалидизирующие процессы – неопластическое перерождение, хронические воспалительные заболевания опорно-двигательного аппарата и желудочно-кишечного тракта; метаболические процессы – сахарный диабет, атеросклероз и его осложнения – инфаркты и инсульты, катаракту, нейродегенеративные заболевания (болезни Альцгеймера и Паркинсона, боковой амиотрофический склероз и др.) [29, 85–87]. Этиологическая роль оксидантного стресса во многих случаях не доказана, однако его патогенетическое значение бесспорно.

Первоочередное внимание АФК как главным «разрушителям» биосистем начали уделять после того, как в 1956 г. Harman [88] сообщил о потрясающем в то время наблюдении – АФК принимают участие в процессах старения. С тех пор деструктивный потенциал АФК широко эксплуатировался в различных теориях старения, а тотальная борьба с образованием в организме АФК рассматривалась как наиболее эффективный подход к замедлению процессов старения и профилактике ассоциированных с ним заболеваний. Однако за АФК признавали по крайней мере одну положительную функцию – защитную. Этот факт был подтвержден после установления взаимосвязи между параличом киллерного потенциала лейкоцитов и нарушением в них генерации АФК.

Стремительное развитие биологических наук в последние десятилетия позволило выдвинуть новую концепцию, в соответствии с которой АФК осуществляют регуляцию множества тонких биохимических процессов фактически в каждом органе и ткани. Концепция эта получила название «редокс-регуляции биологических функций» и ныне активно развивается, получая все более весомые экспериментальные подтверждения [29, 89–94].

Что касается биологических функций НАД(Ф)Н-оксидаз в контексте редокс-регуляции, то современные представления можно изложить в виде нескольких ключевых положений [28]. Во-первых, все НАД(Ф)Н-оксидазы, независимо от их локализации и строения, генерируют АФК в ответ на определенные стимулы. В зависимости от изоформы Nox генерация может происходить как во внешнюю по отношению к клетке среду, так и вовнутрь клетки (в отдельных ее компартментах). Во-вторых, АФК, генерируемые НАД(Ф)Н-оксидазами, являются прежде всего сигнальными молекулами, обеспечивающими быструю локальную внутри- и межклеточную регуляцию и коммуникацию. И, наконец, используемые организмом для сохранения его целостности и жизнеспособности АФК вместе с тем являются источником множества молекулярно-клеточных проблем и органических катастроф, поскольку при определенных условиях могут становиться индукторами патологических процессов, инициируя распад систем регуляции и гибель организма.

Закключение. Результатом пяти десятилетий интенсивных исследований стало не только описание строения и принципов работы НАД(Ф)Н-оксидаз, но и научное обоснование новой концепции о биологической роли АФК, генерируемых ферментами этого суперсемейства. В соответствии с этой концепцией АФК являются незаменимыми регуляторами жизнедеятельности биосистем. Сочетание же агрессивности и высочайшей биологической значимости АФК делает необходимым их качественный и количественный контроль. Однако, несмотря на эволюционно сформированную многоуровневую антиоксидантную защиту в растительных и животных организмах, этот контроль не устойчив к повреждению и искажению при действии множества факторов, и прежде всего тех, что не подлежат эволюционному контролю. Дисрегуляция актив-

ности НАДФН-оксидаз является важнейшим доказанным звеном патогенеза таких тяжелых заболеваний, как хронические артриты, ишемическо-реперфузионные повреждения миокарда, мозга и печени, сахарный диабет II типа, тяжелые нейродегенеративные и демиелинизирующие процессы, цирроз печени, злокачественные новообразования печени и толстой кишки, хроническая почечная недостаточность, бронхиальная астма и хронические обструктивные заболевания легких, хориоретинит и диабетическая ретинопатия [29]. По этой причине поиск способов надежного управления активностью НАДФН-оксидаз, а также средств коррекции эффектов самих АФК представляется перспективным научным направлением.

Список использованной литературы

1. *Baldrige, C. W.* The extra respiration of phagocytosis / C. W. Baldrige, R. W. Gerard // *Am. J. Physiol.* – 1933. – Vol. 103. – P. 235–236.
2. *Sbarra, A. J.* The biochemical basis of phagocytosis. I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes / A. J. Sbarra, M. L. Karnovsky // *J. Biol. Chem.* – 1959. – Vol. 234. – P. 1355–1362.
3. Biochemical aspects of phagocytosis / G. Y. N. Iyer [et al.] // *Nature.* – 1961. – Vol. 192. – P. 535–542.
4. *Rossi, F.* Biochemical aspects of phagocytosis in polymorphonuclear leucocytes. NADH and NADPH oxidation by the granules of resting and phagocytizing cells / F. Rossi, M. Zatti // *Experientia.* – 1964. – Vol. 20. – P. 21–23.
5. Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent / B. M. Babior [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 1973. – Vol. 52. – P. 741–744.
6. A fatal granulomatosis of childhood: the clinical study of a new syndrome / H. Berendes [et al.] // *Minn. Med.* – 1957. – Vol. 40. – P. 309–312.
7. *In vitro* bactericidal capacity of human polymorphonuclear leukocytes: diminished activity in chronic granulomatous disease of childhood / P. G. Quie [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 1967. – Vol. 46. – P. 668–679.
8. *Segal, A. W.* Novel cytochrome b system in phagocytic vacuoles of human granulocytes / A. W. Segal, O. T. Jones // *Nature.* – 1978. – Vol. 276. – P. 515–517.
9. Absence of a newly described cytochrome b from neutrophils of patients with chronic granulomatous disease / A. W. Segal [et al.] // *Lancet.* – 1978. – Vol. 2. – P. 446–449.
10. Cloning the gene for an inherited human disorder-chronic granulomatous disease-on the basis of its chromosomal location / B. Royer-Pokora [et al.] // *Nature.* – 1986. – Vol. 322. – P. 32–38.
11. The X-linked chronic granulomatous disease gene codes for the beta-chain of cytochrome b-245 / C. Teahan [et al.] // *Nature.* – 1987. – Vol. 327. – P. 720–721.
12. The glycoprotein encoded by the X-linked chronic granulomatous disease locus is a component of the neutrophil cytochrome *b* complex / M. C. Dinauer [et al.] // *Nature.* – 1987. – Vol. 327. – P. 717–720.
13. Two cytosolic neutrophil oxidase components absent in autosomal chronic granulomatous disease / B. D. Volpp [et al.] // *Science.* – 1988. – Vol. 242. – P. 1295–1297.
14. Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1 / A. Abo [et al.] // *Nature.* – 1991. – Vol. 353. – P. 668–670.
15. P40^{phox}, a third cytosolic component of the activation complex of the NADPH oxidase to contain SRC homology 3 domains / F. B. Wientjes [et al.] // *Biochem. J.* – 1993. – Vol. 296. – P. 557–561.
16. Identification of a superoxide-generating NADPH oxidase system in human fibroblasts / B. Meier [et al.] // *Biochemistry.* – 1991. – Vol. 30. – P. 241–245.
17. *Szatrowski, T. P.* Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells / T. P. Szatrowski, C. F. Nathan // *Cancer Res.* – 1991. – Vol. 51. – P. 794–798.
18. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells / K. K. Griendling [et al.] // *Circ. Res.* – 1994. – Vol. 74. – P. 1141–1148.
19. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1 / Y. A. Suh [et al.] // *Nature.* – 1999. – Vol. 401. – P. 79–82.
20. A mammalian H⁺ channel generated through alternative splicing of the NADPH oxidase homolog NOX-1 / B. Banfi [et al.] // *Science.* – 2000. – Vol. 287. – P. 138–142.
21. Homologs of gp91^{phox}: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, Nox5 / G. Cheng [et al.] // *Gene.* – 2001. – Vol. 269. – P. 131–140.
22. Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney / M. Geiszt [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2000. – Vol. 97. – P. 8010–8014.
23. A Ca⁽²⁺⁾-activated NADPH oxidase in testis, spleen, lymph nodes / B. Banfi [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276. – P. 37594–37601.
24. Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family / X. De Deken [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 275. – P. 23227–23233.
25. Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase. Cloning of the porcine and human cDNAs / C. Dupuy [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1999. – Vol. 274. – P. 37265–37269.
26. Two novel proteins activate superoxide generation by the NADPH oxidase NOX1 / B. Banfi [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278. – P. 3510–3513.

27. *Grasberger, H.* Identification of the maturation factor for dual oxidase: evolution of an eukaryotic operon equivalent / H. Grasberger, S. Refetoff // *J. Biol. Chem.* – 2006. – Vol. 281. – P. 18269–18272.
28. Molecular composition and regulation of the Nox family NAD(P)H oxidases / H. Sumimoto [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2005. – Vol. 338. – P. 677–686.
29. *Bedard, K.* The Nox Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology / K. Bedard, K.-H. Krause // *Physiol. Rev.* – 2007. – Vol. 87. – P. 245–313.
30. Asparagine-linked glycosylation of cytochrome b_{558} large subunit varies in different human phagocytic cells / M. E. Kleinberg [et al.] // *J. Immunol.* – 1989. – Vol. 143. – P. 4152–4157.
31. *Babior, B. M.* Superoxide-forming enzyme from human neutrophils: evidence for a flavin requirement / B. M. Babior, R. S. Kipnes // *Blood.* – 1977. – Vol. 50. – P. 517–524.
32. Cytochrome b_{558} : the flavin-binding component of the phagocyte NADPH oxidase / D. Rotrosen [et al.] // *Science.* – 1992. – Vol. 256. – P. 1459–1462.
33. Superoxide production by cytochrome b_{559} : mechanism of cytosol-independent activation / V. Koshkin [et al.] // *FEBS Lett.* – 1994. – Vol. 338. – P. 285–289.
34. *Groemping, Y.* Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective / Y. Groemping, K. Rittinger // *Biochem. J.* – 2005. – Vol. 386 (Pt 3). – P. 401–416.
35. Stoichiometry of $p22^{phox}$ and $gp91^{phox}$ in phagocyte cytochrome b_{558} / J. Huang [et al.] // *Biochemistry.* – 1995. – Vol. 34. – P. 16753–16757.
36. Biosynthesis of flavocytochrome b_{558} : $gp91^{phox}$ is synthesized as a 65-kDa precursor (p65) in the endoplasmic reticulum / L. Yu [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1999. – Vol. 274. – P. 4364–4369.
37. Biosynthesis of the phagocyte NADPH oxidase cytochrome b_{558} : role of heme incorporation and heterodimer formation in maturation and stability of $gp91^{phox}$ and $p22^{phox}$ subunits / L. Yu [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1997. – Vol. 272. – P. 27288–27294.
38. Point mutation in the cytoplasmic domain of the neutrophil $p22^{phox}$ cytochrome b subunit is associated with a nonfunctional NADPH oxidase and chronic granulomatous disease / M. C. Dinanuer [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1991. – Vol. 88. – P. 11231–11235.
39. $^{156}\text{Pro} \rightarrow \text{Gln}$ substitution in the light chain of cytochrome b_{558} of the human NADPH oxidase ($p22^{phox}$) leads to defective translocation of the cytosolic proteins $p47^{phox}$ and $p67^{phox}$ / J. H. Leusen [et al.] // *J. Exp. Med.* – 1994. – Vol. 180. – P. 2329–2334.
40. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: binding of Src homology 3 domains to proline-rich targets / T. L. Leto [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1994. – Vol. 91. – P. 10650–10654.
41. Phosphorylation of $p22^{phox}$ is mediated by phospholipase D-dependent and independent mechanisms: correlation of NADPH oxidase activity and $p22^{phox}$ phosphorylation / D. S. Regier [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 275. – P. 28406–28412.
42. Activation of bovine neutrophil oxidase in a cell free system: GTP-dependent formation of a complex between a cytosolic factor and a membrane protein / J. Doussiere [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1988. – Vol. 152. – P. 993–1001.
43. *Dinanuer, M. C.* Regulation of neutrophil function by Rac GTPases / M. C. Dinanuer // *Curr. Opin. Hematol.* – 2003. – Vol. 10. – P. 8–15.
44. *Etienne-Manneville, S.* Rho GTPases in cell biology / S. Etienne-Manneville, A. Hall // *Nature (London).* – 2002. – Vol. 420. – P. 629–635.
45. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism / H. R. Bourne [et al.] // *Nature (London).* – 1991. – Vol. 349. – P. 117–127.
46. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions / H. R. Bourne [et al.] // *Nature (London).* – 1990. – Vol. 348. – P. 125–132.
47. *Vetter, I. R.* The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions / I. R. Vetter, A. Wittinghofer // *Science.* – 2001. – Vol. 294. – P. 1299–1304.
48. The GTP binding motif: variations on a theme / M. Kjeldgaard [et al.] // *FASEB J.* – 1996. – Vol. 10. – P. 1347–1368.
49. *Sprang, S. R.* G protein mechanisms: insights from structural analysis / S. R. Sprang // *Annu. Rev. Biochem.* – 1997. – Vol. 66. – P. 639–678.
50. The Rac-RhoGDI complex and the structural basis for the regulation of Rho proteins by RhoGDI / K. Scheffzek [et al.] // *Nat. Struct. Biol.* – 2000. – Vol. 7. – P. 122–126.
51. The structural basis of Arfaptin-mediated cross-talk between Rac and Arf signalling pathways / C. Tarricone [et al.] // *Nature (London).* – 2001. – Vol. 411. – P. 215–219.
52. Structure of the Rho family GTP-binding protein Cdc42 in complex with the multifunctional regulator RhoGDI / G. R. Hoffman [et al.] // *Cell.* – 2000. – Vol. 100. – P. 345–356.
53. Targeting of Rac1 to the phagocyte membrane is sufficient for the induction of NADPH oxidase assembly / Y. Gorzalczany [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 275. – P. 40073–40081.
54. P-Rex1, a $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ - and $\text{G}_{\beta\gamma}$ -regulated guanine-nucleotide exchange factor for Rac / H. C. Welch [et al.] // *Cell.* – 2002. – Vol. 108. – P. 809–821.
55. The hemopoietic Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor Vav1 regulates N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-activated neutrophil functions / C. Kim [et al.] // *J. Immunol.* – 2003. – Vol. 171. – P. 4425–4430.
56. Deficiency of the hematopoietic cell-specific Rho family GTPase Rac2 is characterized by abnormalities in neutrophil function and host defense / A. W. Roberts [et al.] // *Immunity.* – 1999. – Vol. 10. – P. 183–196.

57. Localization of Rac2 via the C terminus and aspartic acid 150 specifies superoxide generation, actin polarity and chemotaxis in neutrophils / M. D. Filippi [et al.] // *Nat. Immunol.* – 2004. – Vol. 5. – P. 744–751.
58. Regulation of the human neutrophil NADPH oxidase by rho-related G-proteins / C. H. Kwong [et al.] // *Biochemistry.* – 1993. – Vol. 32. – P. 5711–5717.
59. Antagonistic cross-talk between Rac and Cdc42 GTPases regulates generation of reactive oxygen species / B. A. Diebold [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279. – P. 28136–28142.
60. Characterization of the effector-specifying domain of Rac involved in NADPH oxidase activation / C. H. Kwong [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1995. – Vol. 270. – P. 19868–19872.
61. *Shalom-Barak, T.* A p21-activated kinase-controlled metabolic switch up-regulates phagocyte NADPH oxidase / T. Shalom-Barak, U. G. Knaus // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277. – P. 40659–40665.
62. NADPH oxidase activity of neutrophil-specific granules: requirements for cytosolic components and evidence of assembly during cell activation / D. R. Ambruso [et al.] // *Mol. Genet. Metab.* – 2004. – Vol. 81. – P. 313–321.
63. *Ponting, C. P.* Novel domains in NADPH oxidase subunits, sorting nexins, and PtdIns 3-kinases: binding partners of SH3 domains? / C. P. Ponting // *Protein Sci.* – 1996. – Vol. 5. – P. 2353–2357.
64. The PX domains of p47^{phox} and p40^{phox} bind to lipid products of PI(3)K / F. Kanai [et al.] // *Nat. Cell. Biol.* – 2001. – Vol. 3. – P. 675–678.
65. *Quinn, M. T.* Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases / M. T. Quinn, K. A. Gauss // *J. Leukocyte Biol.* – 2004. – Vol. 76. – P. 760–781.
66. Phosphorylation of p47^{phox} sites by PKC α , β_{II} , δ , and ζ : effect on binding to p22^{phox} and on NADPH oxidase activation / A. Fontayne [et al.] // *Biochemistry.* – 2002. – Vol. 41. – P. 7743–7750.
67. Activation of the leukocyte NADPH oxidase by phorbol ester requires the phosphorylation of p47^{PHOX} on serine 303 or 304 / O. Inanami [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 273. – P. 9539–9543.
68. The NADPH oxidase components p47^{phox} and p40^{phox} bind to moesin through their PX domain / F. B. Wientjes [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2001. – Vol. 289. – P. 382–388.
69. P47^{phox} PX domain of NADPH oxidase targets cell membrane via moesin-mediated association with the actin cytoskeleton / Y. Zhan [et al.] // *J. Cell. Biochem.* – 2004. – Vol. 92. – P. 795–809.
70. *Blatch, G. L.* The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein–protein interactions / G. L. Blatch, M. Lasse // *BioEssays.* – 1999. – Vol. 21. – P. 932–939.
71. Tetratricopeptide repeat (TPR) motifs of p67^{phox} participate in interaction with the small GTPase Rac and activation of the phagocyte NADPH oxidase / H. Koga [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1999. – Vol. 274. – P. 25051–25060.
72. NADPH dehydrogenase activity of p67^{phox}, a cytosolic subunit of the leukocyte NADPH oxidase / P. M. Dang [et al.] // *Biochemistry.* – 1999. – Vol. 38. – P. 5746–5753.
73. The adaptor protein p40^{phox} as a positive regulator of the superoxide-producing phagocyte oxidase / F. Kuribayashi [et al.] // *EMBO J.* – 2002. – Vol. 21. – P. 6312–6320.
74. *Han, C. H.* Activation domain in p67^{phox} regulates the steady state reduction of FAD in gp91^{phox} / C. H. Han, M. H. Lee // *J. Vet. Sci.* – 2000. – Vol. 1. – P. 27–31.
75. Phosphorylation of the NADPH oxidase component p67^{phox} by ERK2 and P38MAPK: selectivity of phosphorylated sites and existence of an intramolecular regulatory domain in the tetratricopeptide-rich region / P. M. Dang [et al.] // *Biochemistry.* – 2003. – Vol. 42. – P. 4520–4526.
76. A novel cytosolic component, p40^{phox}, of respiratory burst oxidase associates with p67^{phox} and is absent in patients with chronic granulomatous disease who lack p67^{phox} / S. Tsunawaki [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1994. – Vol. 199. – P. 1378–1387.
77. P40^{phox}, a third cytosolic component of the activation complex of the NADPH oxidase to contain src homology 3 domains / F. B. Wientjes [et al.] // *Biochem. J.* – 1993. – Vol. 296. – P. 557–561.
78. Mapping the domains of interaction of p40^{phox} with both p47^{phox} and p67^{phox} of the neutrophil oxidase complex using the two-hybrid system / A. Fuchs [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1995. – Vol. 270. – P. 5695–5697.
79. P40^{phox} down-regulates NADPH oxidase activity through interactions with its SH3 domain / M. Sathyamoorthy [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1997. – Vol. 272. – P. 9141–9146.
80. *Cross, A. R.* P40^{phox} participates in the activation of NADPH oxidase by increasing the affinity of p47^{phox} for flavocytochrome b₅₅₈ / A. R. Cross // *Biochem. J.* – 2000. – Vol. 349. – P. 113–117.
81. *Inflammation: basic principles and clinical correlates* / eds. John I. Gallin, Ira M. Goldstein, Ralph Snyderman. – 2nd ed. – New York: Raven Press, 1992. – 1186 p.
82. Reactive oxygen species: Oxidative damage and pathogenesis / U. Bandyopadhyay [et al.] // *Curr. Sci.* – 1999. – Vol. 77. – N. 5. – P. 658–666.
83. *Forman, H. J.* Reactive oxygen species and cell signaling. respiratory burst in macrophage signaling / H. J. Forman, M. Torres // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2002. – Vol. 166. – P. S4–S8.
84. *Hoidal, J. R.* Reactive oxygen species and cell signaling / J. R. Hoidal // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* – 2001. – Vol. 25. – P. 661–663.
85. *Cave, A. C.* NADPH Oxidases in Cardiovascular Health and Disease / A. C. Cave // *Antioxidants and redox signaling.* – 2006. – Vol. 8, N 5/6. – P. 691–728.
86. *Li, C. H.* Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury / C. H. Li, R. M. Jackson // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2002. – Vol. 282. – P. C227–C241.

87. *Acker, T.* Cellular oxygen sensing need in CNS function: physiological and pathological implications / T. Acker, H. Acker // *The J. of Exp. Biol.* – 2004. – Vol. 207. – P. 3171–3188.
88. *Harman, D.* Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry / D. Harman // *J. Gerontol.* – 1956. – Vol. 11. – P. 298–300.
89. *Jones, D. P.* Radical-free biology of oxidative stress / D. P. Jones // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2008. – Vol. 295. – P. C849–C868.
90. *Октябрьский, О. Н.* Редокс-регуляция клеточных функций / О. Н. Октябрьский, Г. В. Смирнова // *Биохимия.* – 2007. – Т. 72. – Вып. 2. – С. 158–174.
91. *Капелько, В. И.* Редокс-регуляция ритма сердца / В. И. Капелько // *Биохимия.* – 2012. – № 11. – С. 1491–1503.
92. Редокс-регуляция клеточной активности: концепции и механизмы / С. Н. Черенкевич [и др.] // *Вест. НАН Беларуси. Сер. біял. навук.* – 2013. – № 1. – С. 92–108.
93. *Калинина, Е. В.* Роль глутатиона, глутатионтрансферазы и глутаредоксина в регуляции редокс-зависимых процессов / Е. В. Калинина, Н. Н. Чернов, М. Д. Новичкова // *Успехи биол. химии.* – 2014. – Т. 54. – С. 299–348.
94. *Парфенов, Э. П.* Редокс-регуляция как надежная платформа поиска и разработки лекарственных средств нового типа. Поиск гастропротекторов среди замещенных кумаринов / Э. П. Парфенов, В. А. Трапков, П. Д. Шабанов // *Обзоры по клин. фармакологии и лекарств. терапии.* – 2014. – № 12. – С. 22–42.

Поступила в редакцию 14.10.2015