

УДК 612.176.54.024:678.048:57.083.1:591.046

І.О. Скороход, І.К. Курдиш

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, МСП, Д 03680, Україна*

НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНІ АНТИОКСИДАНТИ МІКРООРГАНІЗМІВ

Підтримка оптимального редокс-гомеостазу в клітинах мікроорганізмів відіграє суттєву роль у процесах синтезу ДНК, дихання, забезпеченні імунних і захисних реакцій, ензимній активності та інших. Зміни редокс-стану можуть супроводжуватись підвищенням рівня активних форм кисню (АФК), що зумовлюють пошкодження різних біологічно активних молекул. Регуляція концентрацій АФК є важливим процесом у функціонуванні мікроорганізмів. Ефективними інгібіторами вільнорадикальних процесів є низькомолекулярні антиоксиданти. В представленому огляді наведена характеристика оксидантів, розглянуті шляхи їх генерації та наслідки впливу на живі клітини. Зроблено акцент на феноменологічний опис низькомолекулярних антиоксидантів мікроорганізмів. Розглянуто основні механізми їх дії, особливості синергізму між цими протекторами. Детальне вивчення механізмів функціонування низькомолекулярних антиоксидантів у клітинах мікроорганізмів дозволить використовувати одержані результати в різних сферах людської діяльності.

Ключові слова: оксидативний стрес, активні форми кисню, низькомолекулярні антиоксиданти, мікроорганізми, синергізм.

Мікроорганізми в процесі свого функціонування зазнають впливу різних факторів навколишнього середовища. Окремі з них – іонізуюче і УФ-випромінювання, зміна температури, осмотичного тиску, дія токсичних речовин, механічні пошкодження тощо – сприяють утворенню в клітинах активних форм кисню (АФК), які є реакційноздатними продуктами його неповного відновлення [4, 27]. Перевищення генерації оксидантів над здатністю клітини до їх елімінації призводить до гіперокиснення – оксидативного стресу [2]. В сучасному розумінні стрес – це сукупність неспецифічних реакцій, що протікають на клітинному, тканинному та організменному рівнях у відповідь на вплив екстремальних чинників середовища [33].

Висока пошкоджувальна здатність АФК створює загрозу для організму в цілому. Щоб урівноважувати процес окиснення до оптимального рівня, в клітинах мікроорганізмів функціонує складний, потужний комплекс ензимних та низькомолекулярних антиоксидантів [2]. Ензими (каталаза, пероксидаза, супероксиддисмутаза (СОД)) забезпечують внутрішньоклітинний захист від оксидантів, перетворюючи їх в нетоксичні форми [12, 41]. Однак перебіг вільнорадикальних процесів також відбувається у водній та ліпідній фазах, де основну протекторну дію виконують низькомолекулярні антиоксиданти. Вони мають ряд переваг перед ферментами, нейтралізуючи широкий спектр АФК [5].

1. Оксиданти

1.1. Представники та джерела їх виникнення

Гіпотеза про присутність у живих клітинах АФК виникла завдовго до виявлення, однак питання щодо їх ролі в організмі залишалося відкритим. В середині XIX ст. вченими висунуто припущення, що активація молекули кисню (O_2) є необхідною умовою здійснення процесів біологічного окиснення [2], яке надалі було підтверджене експериментальними даними.

Згодом встановлено той факт, що АФК за дуже низьких концентрацій виконують ряд важливих функцій у живих системах [2, 3]. Слід виділити наступні: окиснення органічних субстратів у процесі дихання, забезпечення імунних відповідей і захисних реакцій [2], регуляція транспорту йонів, передача зовнішніх сигналів [27], активація каротиногенезу в різних мікроорганізмів [39] тощо.

При перевищенні допустимої концентрації у клітинах мікроорганізмів АФК, які є або радикалами, або нейтральними молекулами (табл. 1) [36, 37], перетворюються на агресивні стрес-агенти. Вони здатні окиснювати ліпіди біологічних мембран [22], пошкоджувати протеїни, ферменти, ДНК і РНК [36].

© І.О. Скороход, І.К. Курдиш, 2014

Стрес-агенти – радикали та нейтральні сполуки [18, 22, 37]

Назва	Формула	Час життя
Радикали		
Оксиген (бі-радикал)	$O_2^{\cdot\cdot}$	Стабільний
Супероксидний аніон-радикал	$O_2^{\cdot-}$	10^{-6} с
Гідроксильний	$\cdot OH$	10^{-9} с
Пероксильний	$ROO\cdot$	10 с
Алкоксильний	$RO\cdot$	10^{-6} с
Пергідроксильний	$HO_2^{\cdot-}$	10^{-3} с
Нейтральні сполуки		
Гідроген пероксид	H_2O_2	Стабільний
Органічний гідрпероксид	$ROOH$	Стабільний
Синглетний кисень	1O_2	10^{-6} с

У природі існує велика кількість АФК, які утворюються за участі різних факторів та джерел. Зокрема, ендогенними джерелами виникнення похідних O_2 є біохімічні процеси, що протікають у клітинах мікроорганізмів. Значний вплив на внутрішньоклітинне утворення АФК спричиняють і екзогенні фактори. Вони сприяють підвищенню концентрації оксидантів, які, в результаті, стають агресивними стрес-агентами (рис. 1) [36].



Рис. 1. Екзогенні фактори та ендогенні джерела виникнення активних форм кисню [36]

1.2. Утворення оксидантів у клітині

Активна кисню тісно пов'язана із залученням його в метаболічні процеси, в результаті чого утворюється ряд більш реакційноздатних молекул. Шляхи виникнення АФК тісно переплітаються між собою [2, 4, 8, 36, 37].

Супероксидний аніон-радикал ($\cdot O-O^{\cdot}$) – одноелектронний стан кисню. В клітинах мікроорганізмів виникає при неповному відновленні O_2 в процесі дихання, в результаті самоокиснення тіолів, флавінів, хінонів, а також як проміжний продукт у реакціях за участю різних оксидаз та оксигеназ [3, 37, 45]. $O_2^{\cdot-}$ зазнає як спонтанної трансформації, так і за участі СОД, що призводить до виникнення пероксиду водню [37, 44]. З H_2O_2 цей радикал може вступати в реакцію Хабер-Вайс, продуктом якої є активний гідроксильний радикал (константа швидкості $10^9 - 10^{10}$ моль $^{-1}$ с $^{-1}$) [24, 45]. Супероксидний аніон-радикал вивільняє Fe^{3+} із залізо- та сірковмісних протеїнів, феритину. В такому випадку, йони заліза виступають у ролі зворотних донорів електронів, утворюючи токсичну для біоструктур форму ($Fe^{3+}-O^{\cdot}$), що може стимулювати пероксидне окиснення біомолекул. $O_2^{\cdot-}$ бере участь у формуванні пероксинітриду [36, 37].

Гідроген пероксид (HO-OH) є відносно стабільним. Завдяки ліпофільним властивостям він легко проникає через біологічні мембрани. У водних розчинах може окиснювати різні неорганічні йони [37]. H_2O_2 сприяє утворенню гіпохлоритної кислоти (HOCl) в присутності мієлопероксидази – ензиматичне окиснення хлоридних йонів. HOCl, в свою чергу, може вступати в реакції з пероксидом водню чи супероксидним аніон-радикалом, продуктами яких є синглетний кисень (1O_2) та гідроксильний радикал [35].

Гідроксильний радикал ($\cdot OH$) – оксидант, який окрім вищезазначених шляхів утворення, є продуктом реакції Фентона. Це реакція розкладу пероксиду водню йонами металів змінної валентності (Fe^{2+} і Cu^{2+}) [24].

Синглетний кисень (1O_2) – АФК, яка бере участь у формуванні пероксидів та в реакціях за подвійним зв'язком. Виникає в клітинах за дії світла видимої області спектру [22] та має тривалий час життя [37]. Взаємодіє з більшістю біомолекул (жирні кислоти, амінокислоти, азотисті основи ДНК), утворюючи H_2O_2 та гідрпероксида [45].

Органічний гідрпероксид (ROOH) – оксидант, що формується в радикальних реакціях із клітинними компонентами (ліпіди та нуклеїнові кислоти). Молекула містить єдиний оксиген-оксигеновий зв'язок [36, 37].

Алкоксильні та пероксильні радикали ($RO\cdot$, $ROO\cdot$) – оксигенцентралізовані органічні радикали, що утворилися в результаті пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ). Формуються у присутності гідроксильного радикалу [22, 37].

1.3. Наслідки дії оксидантів

При дисбалансі між процесами генерації вільних радикалів і механізмами їх інактивації відбувається накопичення АФК, що є основною причиною розвитку оксидативного стресу [2, 3, 8]. Його наслідком є пошкодження біологічно важливих молекул (протеїнів, ліпідів, нуклеїнових кислот) (рис. 2) [36], що в результаті призводить до загибелі клітин.

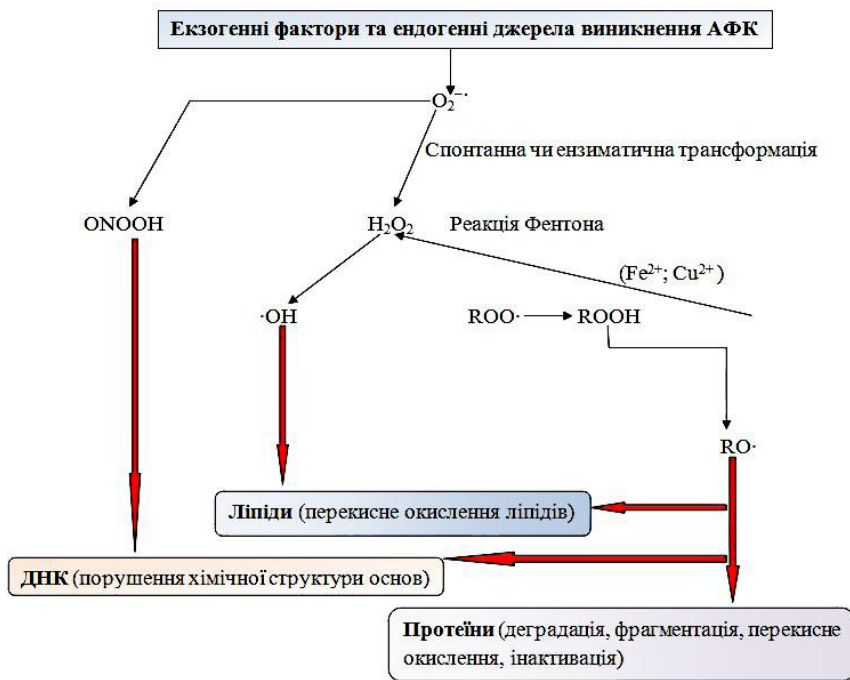


Рис. 2. Індукція пошкоджень біомолекул активними формами кисню [36]

Ефективним механізмом захисту клітин від агресивних стрес-агентів є функціонування складного протекторного комплексу, який включає як ферменти, так і низькомолекулярні антиоксиданти. Передовою лінією комплексного антиоксидантного захисту біополімерів є каталаза, пероксидаза, СОД [3, 7, 18, 27, 33, 45]. Однак при наростанні оксидативного стресу, ефективність таких ензимів зменшується, порівняно з дією низькомолекулярних антиоксидантів. Це може бути пов'язано з:

1) швидкою інактивацією вільними радикалами конститутивного пулу ензимів та необхідністю тривалого часу для відновлення їх синтезу;

2) слабкою проникністю ензимів крізь клітинні мембрани.

У зв'язку з такими причинами зростає роль низькомолекулярних антиоксидантів у захисті клітин мікроорганізмів від оксидативного стресу [5]. За рахунок нелінійної залежності між концентрацією цих речовин та ступенем інактивації вільнорадикальних процесів, відсутності субстратної специфічності та спорідненості до АФК, а також вільної міграції крізь клітинні мембрани, низькомолекулярні антиоксиданти забезпечують складні механізми захисту біомолекул від токсичного впливу оксидантів [18].

2. Низькомолекулярні антиоксидантні системи мікроорганізмів

Низькомолекулярні антиоксиданти – друга лінія захисту клітин мікроорганізмів від АФК, яка включає різні за хімічною структурою сполуки. До них відносяться – тіолова редокс-система (глутатіон) [30], фенольні антиоксиданти [5, 8], вітаміни (аскорбат, убіхінони, токоферолі) [9, 23, 25], пігменти (каротиноїди) [10, 39], деякі амінокислоти [17, 19], поліаміни [15], хелатори йонів металів змінної валентності [38, 47] та інші біологічно активні речовини. Ці протектори попереджують та до мінімуму зменшують пошкодження, спричинені продуктами часткового відновлення кисню [5].

Глутатіон (GSH) – трипептид (L-γ-глутаміл-L-цистеїнілгліцин) є широко поширеним в клітинах грамнегативних бактерій та інших мікроорганізмів. У грампозитивних бактерій він не виявлений, за виключенням окремих видів *Streptococcus* і *Enterococcus* [13, 30]. Антиоксидантні властивості цієї сполуки визначаються наявністю γ-глутамільного зв'язку та вільної сульфгідрильної (SH-) групи цистеїну, що є донором електронів і обумовлює здатність глутатіону бути відновником і елімінувати вільні радикали.

Завдяки високому рівню (до 10 мМ), GSH є головним редокс-буфером у клітинах мікроорганізмів [30]. В результаті одноелектронної реакції глутатіону з вільними радикалами виникає тільний радикал GS[•]. Під час його димеризації з аналогічним радикалом утворюється окиснена форма глутатіону – дисульфід глутатіон (GSSG). Редокс-пара глутатіон (GSH)_{вільн.} / дисульфід глутатіон (GSSG)_{окисн.} бере участь у формуванні інтраклітинного окисно-відновного потенціалу (E_{hc}) [4]. Підтримка E_{hc} при оксидативному стресі відбувається за декількома механізмами. Вони полягають в:

- активації глутатіонредуктази, яка каталізує відновлення глутатіону шляхом транспортування протонів від NADPH до дисульфід глутатіону;
- екскреції GSSG, що сформувався в результаті стресу;
- інтенсифікації синтезу GSH через активацію γ-глутамілцистеїнсинтетази [43].

Глутатіон, окрім підтримки внутрішньоклітинного гомеостазу, бере участь у роботі протекторних ензимів – глутатіонпероксидаз, як субстрат. GSH виступає донором протонів для відновлення H₂O₂ та ліпідних пероксидів [7]. Антиоксидантною функцією GSH також є детоксикація і транспорт йонів міді. Глутатіон постачає йони Cu²⁺ мідьвмісним ензимам – апопротейнам, а також Cu/Zn-супероксиддисмутазам. Це блокує перебіг потенційних токсичних реакцій між металами змінної валентності та АФК [30].

Багато видів бактерій виділяють у середовище мікромолярні кількості GSH. У *E. coli* рівень і редокс-статус екстраклітинного глутатіону варіює при зміні умов культивування та при стресах. За дії екзогенних оксидантів, рівень відновленої форми цього низькомолекулярного антиоксиданту перевищує рівень окисненої [13, 46]. Однією із функцій екстраклітинного GSH є захист від токсинів «на дальніх межах» [37], тобто елімінація шкідливих сполук довкола клітин.

Фенольні антиоксиданти. Значна роль в антиоксидантному захисті мікроорганізмів належить речовинам фенольної природи. Це сполуки, в структурі яких є ароматичне кільце (Ar), що має одну чи кілька гідроксильних груп – Ar(OH)_n. В основу класифікації фенолів покладено:

- 1) природа Ar – прості феноли, нафтоли та оксипохідні інших ароматичних сполук;
- 2) число OH-груп, що зв'язані з ароматичним ядром – моно- та поліфеноли;
- 3) кількість фрагментів Ar(OH)_n – моно- та поліядерні феноли.

Окремо виділяють просторово-затруднені чи екрановані феноли, в яких найближчі до гідроксильної групи замісники – трет-алкільні [11].

Здатність фенольних антиоксидантів до перехоплення вільних радикалів забезпечується присутністю в їх будові ОН-груп. Завдяки наявності системи π -електронів в ароматичному кільці, відбувається зміщення негативного заряду на оксиген, що призводить до легкого відриву H^+ гідроксильної групи та утворення ізоформ фенокси-радикалу [1].

Фенольні антиоксиданти ефективно інгібують пероксидний, алкоксильний, гідроксильний радикали, супероксидний аніон-радикал, синглетний кисень [1]. Така протекторна дія обумовлена кількістю та положенням ОН-груп, а також ступенем їх екранування, тобто числом найближчих до гідроксильної групи замісників [1].

Тільки вищі рослини та мікроорганізми можуть синтезувати ароматичне ядро. До фенольних антиоксидантів, що властиві мікроорганізмам, належать речовини, які відносяться до різних класів природних органічних сполук, це: вітаміни (Е, убіхінони), амінокислоти (фенілаланін, триптофан), пігменти (каротиноїди), фенолкарбонові кислоти [4, 5, 8].

Вітаміни – біоорганічні сполуки, які у невеликих кількостях необхідні для нормального функціонування живого організму [8]. Окремі вітаміни характеризуються антиоксидантними властивостями, зокрема аскорбінова кислота, убіхінони та токофероли.

L-аскорбінова кислота (аскорбат, вітамін С) – водорозчинний низькомолекулярний антиоксидант, який впливає на підтримку редокс-статусу в клітинах мікроорганізмів. Відновлена форма вітаміну елімінує широкий спектр АФК ($\cdot OH$, 1O_2 , $ROO\cdot$), однак найкраще знешкоджує в різних радикалгенеруючих системах супероксидний аніон-радикал ($O_2^{\cdot -}$). Антиоксидантний ефект аскорбата при перекисному окисненні ліпідів (ПОЛ) – вищий, ніж у інших протекторів [31].

Крім антиоксидантних властивостей, вітаміну С притаманні і прооксидантні. Так, при його окисненні утворюються АФК, які ініціюють виникнення радикальних ланцюгів у клітинах мікроорганізмів [24].

Функціонування L-аскорбінової кислоти як анти- чи прооксиданта залежить від концентрації субстрату та умов перебігу окисних реакцій [1]. Така її варіабельність важлива для підтримки мікроорганізмами редокс-гомеостазу в клітинах.

Убіхінони (вітаміни Q, CoQ) – вітаміноподібні жиророзчинні речовини, які виявлені в клітинах багатьох живих об'єктів. Бактеріальні убіхінони синтезуються із шикімової кислоти та містять 6 – 10 ізопренових ланок [4]. Основне місце локалізації – цитоплазматична мембрана, де вони транспортують електрони та протони від флавінових ензимів на цитохромну систему. Така участь вітамінів Q в редокс-реакціях характеризує їх як антиоксиданти. Вони ефективно інгібують $O_2^{\cdot -}$, $\cdot OH$ та $ROO\cdot$ [23].

Високий вміст CoQ спостерігається в окремих представників бактерій родів *Rhodospirillum*, *Pseudomonas*, *Gluconobacter*, *Agrobacterium*, *Rhizobium* та дріжджів *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Sporobolomyces* [23]. В клітинах деяких пурпурних бактерій зустрічається родохінон (амінохінон) [4].

Токофероли (вітаміни групи Е) – низькомолекулярні антиоксиданти, які побудовані на основі гетероциклічного ядра хроману, до якого приєднані:

- ОН-група – донор протонів у вільнорадикальних реакціях і відповідно відновник їх ініціаторів. За рахунок такого механізму захищає біомолекули від окиснення;
- гідрофобний вуглецевий ланцюг, що полегшує транспорт токоферолів крізь мембрани;
- CH_3 -замісники, число (1, 2 чи 3) та положення яких у молекулі визначає її біологічну активність: α -, β -, γ -, δ -токофероли (рис. 3) [4, 21].

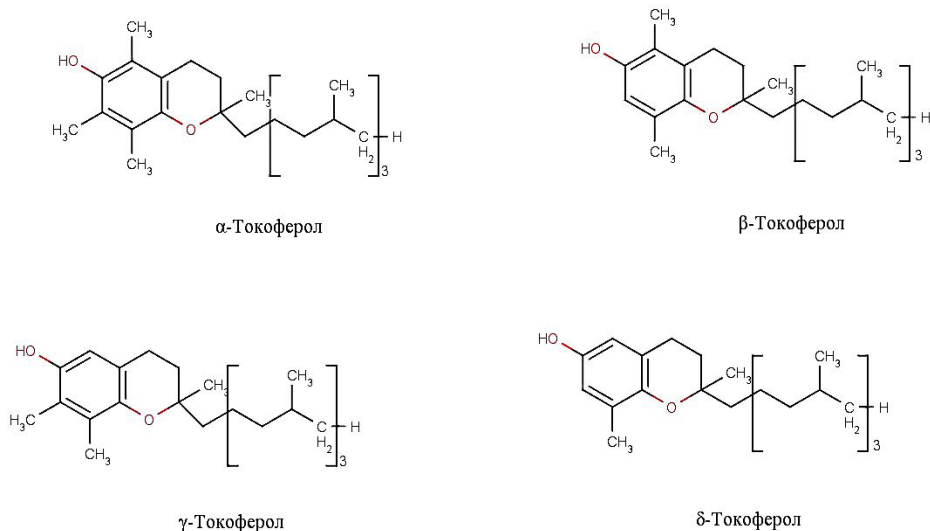


Рис. 3. Хімічні структури токоферолів [21]

Важлива біологічна роль вітамінів Е полягає в їх антиоксидантній дії. Вони ефективно інактивують: супероксидний аніон-радикал (швидкість взаємодії $O_2^{\cdot -}$ з α -токоферолом – $4,9 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ при 25°C і рН 7,8), гідроксильний радикал [21]; синглетний кисень; пероксильні радикали [25].

Однак в основному протекторний ефект токоферолів полягає у блокуванні ланцюгових реакцій окиснення мембранних ліпідів пероксильними радикалами. Ці низькомолекулярні антиоксиданти характеризуються високою константою взаємодії з $ROO\cdot$ [21].

При перенесенні H^+ від ОН-групи гетероциклічного ядра хроману токоферолів до $ROO\cdot$, реагуючі частини антиоксиданта та радикала повинні знаходитись на близькій відстані. Виділяють 2 варіанти положення окисленого жирнокислотного залишку та вітаміну Е в мембрані:

- 1) $ROO\cdot$ знаходиться біля поверхні мембрани;
- 2) токоферолі заглиблені в мембрану.

Наслідком такого розташування є мінімізація відстані між пероксильним радикалом та ОН-групою вітамінів Е, що дозволяє легко переносити протон на $ROO\cdot$ та відновлювати його [9].

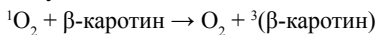
Біологічна активність токоферолів залежить від ступеня екранування гідроксильної групи. α -Токоферол активніший за β - та γ -форми, так як в його структурі сусідні з ОН-групою положення містять два метильних замісники. δ -Форма вітаміну Е в 100 разів менш активна, порівняно з α -токоферолом [4].

Вітаміни Е виявлені у бактерій роду *Bacillus*. Зокрема, у *Bacillus brevis subsp. G. B.* та його дисоціантів [20].

Пігменти – біологічно активні речовини, що широко розповсюджені серед мікроорганізмів та здатні відігравати важливу роль як вітаміни, антибіотики, а також як і антиоксиданти [13].

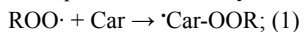
Каротиноїди – попередники ретинолу та ретиноєвої кислоти, які характеризуються високою антиоксидантною активністю. Антиокисні властивості цих пігментів обумовлені наявністю спряженої системи π -електронів, яка забезпечує низьке значення електронно-збуджених станів молекул при їх окисненні та відновленні [10, 25, 39].

Одна молекула β -каротину конвертує 200-1000 молекул синглетного кисню. Фізична суть механізму цієї реакції полягає в тому, що енергія переходить на рівень триплетного стану пігменту, який знаходиться на 22 ккал/моль нижче рівня 1O_2 [4]:

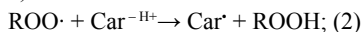


Механізм інактивації пероксильного радикалу каротиноїдами реалізується трьома шляхами [48]:

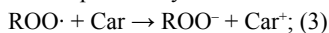
1) $\text{ROO}\cdot$ приєднується до пігменту в місцях локалізації подвійних зв'язків. Продуктом реакції є радикальний аддукт



2) H^+ відщеплюється від алільного фрагмента каротиноїду



3) пігмент віддає електрон пероксильному радикалу. В результаті утворюється катіон-радикал каротиноїду



Протекторний ефект каротиноїдів обумовлений наявністю в їх структурі хромофорної групи з 9 чи 11 спряженими подвійними зв'язками. Якщо ж їх кількість менше 7, то вони не виконують роль захисної системи [48].

Каротиноїди проявляють антиоксидантні властивості не лише у фототрофних, але і в багатьох нефотосинтезуючих мікроорганізмів. До складу їх клітин входять порфірини, флавіни та інші пігменти – ендogenous сенсibilізатори при дії світла. Каротиноїди здатні знижувати фотоокисні пошкодження цих компонентів [10, 25].

В окремих випадках такі пігменти виступають як замісники антиоксидантних ензимів. Наприклад, за відсутності Cu, Zn-супероксиддисмутаза в *Blakeslea trispora*, *Phaffia rodofzyma* і *Neurospora crassa* відбувалося збільшення кількості каротиноїдів, що підтверджує їх значення як антиоксидантів [50]. Дріжджі *Rhodotorula mucilaginosa*, які багаті на каротиноїд торулорадин, стійкіші до високих концентрацій кисню і дурухінону (генерує $\text{O}_2^{\cdot-}$), ніж не пігментований вид *Saccharomyces cerevisiae* [39].

Каротиноїди – найбагаточисленніша група мікробних пігментів, що характерна для всіх фототрофних бактерій, представників деяких родин нефотосинтезуючих бактерій (*Micrococcaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Achromobacteriaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Bacillaceae*), нижчих грибів (*Mucoraceae*, *Choanephoraceae*, *Mortierellaceae*, *Monoblepharidaceae*, *Sordariaceae*), дріжджів (*Sporobolomycetaceae*, *Cryptococcaceae*) і актиноміцетів (*Actinomycetaceae*, *Actinoplanaceae*) [6].

Амінокислоти – клас низькомолекулярних сполук, які мають одночасно аміно- (NH_2) та карбоксильні групи (COOH) і виконують низку важливих функцій у всіх біологічних системах. Зокрема, окремим представникам L-амінокислот відводиться роль антиоксидантів, яка пов'язана з їх структурою та фізико-хімічними властивостями [19], відомості про амінокислоти-протектори узагальнені в таблиці (табл. 2).

Таблиця 2

Амінокислоти – інгібітори активних форм кисню в клітинах мікроорганізмів

Історична назва	Назва згідно з номенклатурою IUPAC	Направленість антиоксидантної дії
Неполярні (гідрофобні)		
Met	2-аміно-4-(метилсульфаніл)-бутанова кислота	$^1\text{O}_2$ [36]
Phe	2-аміно-3-фенілпропанова кислота	$\cdot\text{OH}$ [37]
Pro	1H-пірол-3-карбоксикислота	$^1\text{O}_2$ [16]
Trp	2-аміно-4-(1H-індол-3-іл)-бутанова кислота	$^1\text{O}_2$ [8]
Полярні (гідрофільні), незаряджені		
Cys	2-аміно-3-сульфанілпропанова кислота	$\cdot\text{OH}$ [19]
Tyr	2-аміно-3-(4-гідроксифеніл)-пропанова кислота	$\cdot\text{OH}$ [8]
Полярні (основні), позитивно заряджені		
Lys	2,6-діаміногексанова кислота	$\text{O}_2^{\cdot-}$ [17]
Arg	2-аміно-5-карбамідамідопентанова кислота	$\text{O}_2^{\cdot-}$ [16]
His	2-аміно-3-(1H-імідазол-4-іл)-пропанова кислота	$^1\text{O}_2$, $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$ [19]

Ці амінокислоти здатні нейтралізувати високореакційні стрес-агенти, які зумовлюють окиснювальні пошкодження важливих біомакромолекул, зокрема ДНК. Завдяки такій активності, амінокислоти беруть участь у збалансуванні редокс-гомеостазу в клітинах мікроорганізмів [19].

Поліаміни (путресцин, спермідин, спермін, кадаверин) – катіонні сполуки, які містять в своїй структурі дві або більше аміногруп. Вони функціонують в організмі як еукаріот, так

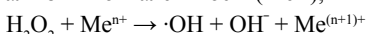
і прокариот. Зростання концентрацій поліамінів в клітинах мікроорганізмів є ранньою реакцією на оксидативний стрес [14]. Високий вміст цих речовин, зокрема путресцину в *E. coli*, спостерігається і в звичайних умовах. Це вказує про можливість поліамінів виступати регуляторами внутрішньоклітинного рівня вільних радикалів [34].

Протекторна дія поліамінів включає 2 стратегії:

- 1) транскрипційна модуляція генів, які є складовими регулонів антиоксидантного захисту (oxyR і soxRS);
- 2) елімінація вільних радикалів [14, 34].

Домінування однієї стратегії над іншою залежить від сили стресу. Так, нейтралізація вільних радикалів переважає на початкових етапах стресу, а при його наростанні, поліаміни виконують роль модуляторів транскрипції. Такий двоякий антиоксидантний механізм функціонування цих протекторів сприяє підвищенню життєздатності різних мікроорганізмів за впливу агресивних стрес-агентів [15].

Хелатори йонів металів змінної валентності є важливими низькомолекулярними сполуками, які входять до антиоксидантного комплексу клітин мікроорганізмів. Вони зв'язують метали змінної валентності (Me^{n+}), які часто є ініціаторами вільнорадикальних реакцій [22]:



Наслідком впливу продуктів таких реакцій на мікроорганізми є окиснення клітинних рецепторів. Хелатори (дифероксамін, металотіонеїни, лактат) на початкових етапах блокують зародження цих процесів [22]. Більшість хелатних сполук характеризуються залізов'язувальними властивостями, за якими їх поділяють на 2 групи [32]:

- 1) „професійні хелатори” – речовини, що мають високу спорідненість до йонів Fe^{3+} ;
- 2) хелатори, що активуються оксидативним стресом. Тобто, вони зв'язують залізо тільки в умовах стресу.

Така локальна активація знижує токсичність сполук першої групи, які можуть впливати на метаболізм заліза [4, 32].

Залізов'язувальні хелатні сполуки – пептиди, які об'єднані в загальну групу сидерофіліни (сидерофори). Виділяють три класи сидерофорів, які характерні для мікроорганізмів [26]:

- гідроксаматні – модифіковані пептиди, в складі яких є залишки орнітину та лізину, що з'єднані кінцевими аміногрупами з різними замісниками;
- катехольні – сполуки, які мають N-ацильовані 2,3-дигідроксibenзойною кислотою короткі пептиди;
- карбоксилатні – низькомолекулярні антиоксиданти, що мають в своїй структурі амінокислоти та залишки гідроксикарбонових кислот.

Сидерофіліни I та II класів найбільш вивчені у грамнегативних бактерій, зокрема ентробактерій, агробактерій, вібріонів [49] тощо. Більшість грампозитивних бактерій є продуцентами гідроксаматних хелаторів заліза, лише окремі представники синтезують катехольні сидерофори [29].

Дифероксамін (дисферіоксамін В) – хелатуюча сполука, виділена із *Streptomyces pilosus*. Три гідроксамові групи в його структурі визначають високу спорідненість до йонів заліза (константа зв'язування $K_d = 10^{34}$) [47]. В присутності дифероксаміну знижується токсичність йонів заліза, концентрація яких в клітинах мікроорганізмів зростає при деструкції металопротеїнів. Цей хелатор може легко мігрувати через біологічні мембрани [47].

Металотіонеїни – низькомолекулярні протеїни (500 Да – 14 кДа) з високим вмістом цистеїну, одна молекула яких може зв'язувати до 6 йонів цинку (Zn^{2+}), міді (Cu^{2+}), кадмію (Cd^{2+}), ртуті (Hg^{2+}) [28]. До складу цих антиоксидантів входить 62 амінокислотні залишки (30 % припадає на цистеїн) та 7 г-атомів Zn^{2+} та / або Cd^{2+} [4]. За хімічною структурою металотіонеїни поділяються на 3 класи сполук: металотіонеїни ссавців, одноклітинних еукаріот та рослин. Ці протеїни виконують ряд протекторних функцій [38]:

- неспецифічно хелатують йони важких металів, які є ініціаторами вільнорадикальних реакцій;
- блокують вільні радикали;
- впливають на активність антиоксидантних ензимів;

НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ АНТИОКСИДАНТЫ МИКРООРГАНИЗМОВ

Резюме

Поддержка оптимального редокс-гомеостаза в клетках микроорганизмов играет существенную роль в процессах синтеза ДНК, дыхания, обеспечивает иммунные и защитные реакции, активность энзимов и др. Изменения редокс-состояния могут сопровождаться повышением уровня активных форм кислорода (АФК), которые обуславливают повреждения важных биологически активных молекул. Регуляция концентраций АФК очень важный процесс в развитии микроорганизмов. Эффективными ингибиторами свободнорадикальных процессов являются низкомолекулярные антиоксиданты. В представленном обзоре приводится характеристика оксидантов, рассматриваются пути формирования и последствия их влияния на живые клетки. Сделан акцент на феноменологическое описание низкомолекулярных антиоксидантов микроорганизмов. Рассматриваются основные механизмы их действия. Особое внимание уделяется вопросу синергизма между этими протекторами. Детальное изучение механизмов функционирования низкомолекулярных антиоксидантов в клетках микроорганизмов позволит использовать эти живые объекты в разных сферах человеческой деятельности.

К л ю ч е в ы е с л о в а: оксидативный стресс, активные формы кислорода, низкомолекулярные антиоксиданты, микроорганизмы, синергизм.

I.O. Skorokhod, I.K. Kurdish

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

THE LOW-MOLECULAR ANTIOXIDANTS OF MICROORGANISMS

S u m m a r y

Support of optimum redox-homeostasis in the cells of microorganisms plays a substantial role in the processes of DNA synthesis, respiration, providing of immune and protective reactions, activity of enzymes, etc. The changes of the redox-status can be accompanied by the increase of the level of reactive oxygen species (ROS) which predetermine the damage of biologically active molecules. Adjusting of ROS concentrations is a very important process in development of microorganisms. Low-molecular antioxidants are effective inhibitors of free-radical processes. The authors of the review present the description of oxidants and consider the ways of origin and consequences of their influence on the living cells. An accent is done on phenomenological description of low-molecular antioxidants. The basic mechanisms of their action are considered. Special attention is given to the question of synergism between these protectors. The detailed study of mechanisms of functioning of low-molecular antioxidants in the cells of microorganisms will allow using these living objects in different spheres of human activity.

The paper is presented in Ukrainian.

К е у в о р д: oxidative stress, reactive oxygen species, low-molecular antioxidants, microorganisms, synergism.

The a u t h o r's a d d r e s s: *Skorokhod I.A.*, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Akad. Zabolotny St. Kyiv MSP, D 03680, Ukraine.

1. *Бурлакова Е.Б., Губарева А.Е., Архипова Г.В., Рогинский В.А.* Модуляция перекисного окисления липидов биогенными аминами в модельных системах // *Вопр. мед. химии.* – 1992. – № 2. – С. 17–20.
2. *Белозерская Т.А., Гесслер Н.Н.* Активные формы кислорода и стратегия антиоксидантной защиты у грибов (обзор) // *Прикладная биохимия и микробиология.* – 2007. – **43**, № 5. – С. 565–575.
3. *Гесслер Н.Н., Аверьянов А.А., Белозерская Т.А.* Активные формы кислорода в регуляции развития грибов // *Биохимия.* – 2007. – **72**, вып. 10. – С. 1342–1364.
4. *Зенков Н.К., Ланкин В.В., Меньщикова Е.Б.* Окислительный стресс: биохимические и патофизиологические аспекты. – М.: МАИК «Наука / Интерпериодика», 2001. – 343 с.
5. *Кения М.В., Лукаш А.И., Гуськов Е.П.* Роль низкомолекулярных антиоксидантов при окислительном стрессе // *Успехи современной биологии.* – 1993. – **113**. – С. 456–470.
6. *Кондратьева Е.Н.* Фотосинтезирующие бактерии и бактериальный фотосинтез. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1972. – 530 с.

7. Ляхович В.В., Вавилин В.А., Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б. Активная защита при окислительном стрессе. Антиоксидант-респонсивный элемент // Биохимия. – 2006. – **71**, Вып. 9 – С. 1183–1197.
8. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Круговых Н.Ф., Труфакин В.А. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. – М.: Слово, 2006. – 600 с.
9. Новикова П.Ю., Красильников П.М. Молекулярное моделирование реакционноспособной конфигурации окисленного липида и альфа-токоферола в мембране// Биофизика. – 2009. – **54**, вып. 4. – С. 675–680.
10. Поляков Н.Э., Лёшина Т.В. Некоторые аспекты реакционной способности каротиноидов. Окислительно-восстановительные процессы и комплексообразование // Успехи химии. – 2006. – **75**, № 12. – С. 1175–1192.
11. Рогинский В.А. Фенольные антиоксиданты: реакционная способность и эффективность. – М.: Наука, 1988. – 246 с.
12. Семчишин Г.М., Луцка В.И., Стору К. Возможные причины различий в чувствительности к кислороду двух штаммов *Escherichia coli* // Биохимия. – 2005. – **70**, № 4. – С. 514–522.
13. Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н. Глутатион у бактерий (обзор) // Биохимия. – 2005. – **70**, № 11 – С. 1459–1473.
14. Ткаченко А.Г., Пишеничнов М.Р., Салахетдинова О.Я., Нестерова Л.Ю. Путресцин как фактор защиты *Escherichia coli* от окислительного стресса // Микробиология. – 2001. – **70**, № 4. – С. 487–494.
15. Ткаченко А.Г., Федотова М.В. Зависимость защитных функций полиаминов *Escherichia coli* от стрессорных воздействий супероксидных радикалов // Биохимия. – 2007. – **72**, вып. 1. – С. 128–136.
16. Черников А.В., Гудков С.В., Штаркман И.Н., Брусков В.И. Кислородный эффект при тепловых повреждениях ДНК // Биофизика. – 2007. – **52**, вып. 2. – С. 244–252.
17. Чистяков В.А., Корниенко И.В., Клецкий М.Е., Корниенко И.Е., Лисицын А.С. Новиков В.В. Супероксидустраняющая активность некоторых аминокислот в водных растворах // Биофизика. – 2005. – **50**, № 4 – С. 601–605.
18. Чистяков В.А. Неспецифические механизмы защиты от деструктивного действия активных форм кислорода // Успехи современной биологии. – 2008. – **128**, № 3. – С. 300–306.
19. Штаркман И.Н., Гудков С.В., Черников А.В., Брусков В.И. Образование перекиси водорода и гидроксильных радикалов в водных растворах L-аминокислот при воздействии рентгеновского излучения и тепла // Биофизика. – 2008. – **53**, вып. 1. – С. 5–13.
20. Юдина Т.П. Физиолого-биохимические особенности продуцентов грамицидина *S Bacillus brevis subsp. G.-B.* и их вариантов: Автореф. дис. канд. биол. наук. – М., 2002. – 20 с.
21. Azzi A. Molecular mechanism of alpha-tocopherol action // Free Radical Biol. and Med. – 2007. – **43** № 1. – P. 16–21.
22. Basaga H.S. Biochemical aspects of free radicals // Biochem. and Cell Biol. – 1990. – **68**. – P. 989–998.
23. Beyer R.E. The participation of coenzyme Q in free radical production and anioxidation // Free Radical Biol. and Med. – 1990. – **8**. – P. 545–565.
24. Buettner G.R., Jurkiewicz B.A. Catalytic metals ascorbate and free radicals: combinations to avoid // Radiat. Ros. – 1996. – **145**. – P. 532–541.
25. Dimascio P., Devasagayam T.P.A., Raiser S., Sies H. Carotenoids, tocopherols, and thiols as biological singlet molecular oxygen quenchers // Biochem. Soc. Trans. – 1990. – **18**. – P. 1054–1056.
26. Drechsel H., Jung G. Peptide siderophores // J. Pept. Sci. – 1998. – **4**. – P. 147–181.
27. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function // Physiol. Rev. – 2002. – **82**. – P. 47–95.
28. Dunn M.A., Blabock T.L., Cousins R.J. Metallothionein // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. – 1987. – **185**. – P. 107 - 119.
29. Fiedler H.P., Krastel P., Müller J. Enterobactin: the characteristic catecholate siderophore of *Enterobacteriaceae* is produced by *Streptomyces* species // FEMS Microbiol. Lett. – 2001. – **196**. – P. 147–151.
30. Filomeni G., Rotilio G., Ciriolo R. Cell signalling and the glutathione redox system // Biochem. Pharmacol. – 2002. – **64**, N 5-6. – P. 1057–1064.
31. Frei B. Ascorbic acid protects lipids in human plasma and low-density lipoprotein against oxidative damage // Amer. J. Clin. Nutr. – 1991. – **54**. – P. S1113–S1118.
32. Galey J.B., Dumats J., Genard S., Destree O., Pichaud P., Marrot P.C.L., Beck I., Fernandez B., Barre G., Seite M., Hussler G., Hocquaux M. N,N'-bis-(3,4,5-trimethoxybenzyl) ethylenediamine N,N'-diacetic acid as a new iron chelator with potential medicinal applications against oxidative stress // Biochem. Pharmacol. – 1996. – **51**. – P. 103–115.

33. Herouart D., Baudouin E., Frenedo P. Reactive oxygen species, nitric oxide and glutathione: a key role in the establishment of the legume – *Rhizobium* symbiosis? // *Plant Physiol. Biochem.* – 2002. – **40**, N 6-8. – P. 619–624.
34. Jung I.L., Oh T.J., Kim I.G. Abnormal growth of polyamine-deficient *Escherichia coli* mutant is partially caused by oxidative stress-induced damage // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2004. – **418**. – P. 125–132.
35. Khan U., Kasha M. Singlet molecular oxygen in the Haber-Weiss reaction // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1994. – **91**. – P. 12362–12367.
36. Kohen R., Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification // *Toxicol. Pathol.* – 2002. – **30**, N 6. – P. 620–650.
37. Marcelo Genestra. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants // *Cellular Signalling.* – 2007. – **19**. – P.1807–1819.
38. Maret W. Metallothionein/disulfide interactions, oxidative stress, and the mobilization of cellular zinc // *Neurochem. Int.* – 1995. – **27**. – P. 111–117.
39. Moore M.M., Breedveld M.V., Autor A.P. The role of carotenoids in preventing oxidative damage in the pigmented yeast, *Rhodotorula mucilaginosa* // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1989. – **270**. – P. 419–431.
40. Munday R., Winterboume C.C. Reduced glutathione in combination with superoxide dismutase as an important biological antioxidant defense mechanism // *Biochem. Pharmacol.* – 1989. – **38**. – P. 4349–4352.
41. Ng L.T., Wu S.J., Tsai J.Y., Lai M.N. Antioxidant activities of cultured *Almillariella melea* // *Прикладная биохимия и микробиология.* – 2007. – **43**, N 4. – С. 495–500.
42. Niki E. Action of ascorbic acid as a scavenger of active and stable oxygen radicals // *Amer. J. Clin. Nutr.* – 1991. – **54**. – P. S1119–S1124.
43. Paolicchi A., Dominici S., Pieri L., Maellaro E., Pompella A. Glutathione catabolism as a signaling mechanism // *Biochem. Pharmacol.* – 2002. – **64**. – P. 1027–1035.
44. Sidery M., Georgiou Ch.D. Differentiation and hydrogen peroxide production in *Sclerotium rolfsii* are induced by the oxidizing growth factors, light, and iron // *Mycologia.* – 2000. – **92**, N 6. – P. 1033–1042.
45. Sigler K., Chaloupka J., Brozmanova J., Stadler N., Höfer M. Oxidative stress in microorganisms – I. Microbial vs. higher cells – damage and defenses in relation to cell aging and death // *Folia microbial.* – 1999. – **44**, N 6. – P. 587–624.
46. Smirnova G.V., Muzyka N.G., Glukhovchenko M.N., Oktyabrsky U.N. Effects of menadione and hydrogen peroxide on glutathione status in growing *Escherichia coli* // *Free Radic. Biol. Med.* – 2000. – **28**. – P. 1009–1016.
47. Williams R.E., Zweier J.L., Flaherty J.T. Treatment with deferoxamine during ischemia improves functional and metabolic recovery and reduces reperfusion-induced oxygen radical generation in rabbit hearts // *Circulation.* – 1991. – **83**. – P. 1006–1014.
48. Woodall A.A., Britton G., Jackson M.I. Carotenoids and protection of phospholipids in solution or in liposomes against oxidation by peroxy radicals: Relationship between carotenoid structure and protective ability // *Biochim. biophys. acta.* – 1997. – **1336**, N 3. – P. 575–586.
49. Yamamoto S., Okujo N., Fujita Y., Saito M., Yoshida T., Shinoda S. Structures of two polyamine-containing catecholate siderophores from *Vibrio fluvialis*. // *J. Biochem.* – 1993. – **113**. – P. 538–544.
50. Yoshida Y., Hasunuma K.J. Reactive oxygen species affect photomorphogenesis in *Neurospora crassa* // *J. Biol. Chem.* – 2004. – **279**. – P. 6986–6993.

Отримано 12.01.2013.