

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«РОССИЙСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н. И. ПИРОГОВА»
(ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России)

**КАФЕДРА БИОХИМИИ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ
ЛЕЧЕБНЫЙ ФАКУЛЬТЕТ**

М.С. КАРБЫШЕВ, Ш.П. АБДУЛЛАЕВ

под общей редакцией проф. Шестопалова А.В.

БИОХИМИЯ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА

Учебно-методическое пособие

«Рекомендовано Центральным координационным методическим советом
ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России
для использования в образовательном процессе»

Москва - 2018

ISBN

УДК 577.334, 544.431.15, 577.1, 577.152, 678.048

ББК 28.707.2

Б XX

БИОХИМИЯ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА: учебно-методическое пособие // ФГБОУ ВО РНИМУ имени Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Издательство **XX**, 2018 г, 60 с.

Учебно-методическое пособие «Биохимия оксидативного стресса» включает материалы соответствующие содержанию учебных занятий по означенной теме, а также тестовые задания для самопроверки студентов по изученному материалу.

Пособие составлено в соответствии с действующими ФГОС ВО по специальностям 31.05.01 «Лечебное дело» и 31.05.02 «Педиатрия» в соответствии с рабочими программами по курсу биохимии.

Представленное пособие предназначено для студентов 2-го курса лечебных и педиатрических факультетов медицинских ВУЗов по специальностям «Лечебное дело» и «Педиатрия».

Составители: М.С. Карбышев, Ш.П. Абдуллаев

Общая редакция: А.В. Шестопапов, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой биохимии и молекулярной биологии лечебного факультета ФГБОУ ВО РНИМУ имени Н.И. Пирогова Минздрава России

Рецензенты:

1. О.С. Медведев - д.м.н., профессор, заведующий кафедрой фармакологии, ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова
2. А.М. Власов – к.фарм.н., исполнительный директор, АО «Государственный научно-исследовательский институт синтеза белка», доцент кафедры фармацевтической и токсикологической химии им А.П. Арзамасцева, ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)

ББК 28.707.2

УДК 577.334, 544.431.15, 577.1, 577.152, 678.048

© Коллектив авторов, 2018

© Российский национальный исследовательский
Медицинский университет им. Н.И. Пирогова, 2018

Оглавление	
I. Оксидативный стресс.....	4
II. Активные формы кислорода.	5
III. Неферментативные пути образования АФК. Химизм процессов СРО.....	7
IV. Ферментативные пути образования активных форм кислорода.....	9
Микросомальные монооксигеназы.....	10
Ксантиноксидоредуктаза.....	11
NADPH-оксидаза.	12
NO-синтаза.	13
Миелопероксидаза.	14
V. Механизмы повреждающего действия окислительного стресса	16
Повреждение ДНК	16
Повреждение белков.....	17
Перекисное окисление липидов	18
Образование комплексов.	22
VI. Антиоксидантная система организма, роль, компоненты	23
VII. Антиоксиданты неферментативной природы	27
Аскорбиновая кислота.....	28
Токоферол	28
Каротиноиды	30
Коэнзим Q10.....	31
Тиоредоксин.....	32
Металлотioneины	34
XI. Ферментные системы антиоксидантной защиты	34
Супероксиддисмутаза	34
Каталаза.....	36
Глутатионпероксидаза.....	37
Глутатион-S-трансферазы.	40
Церулоплазмин.....	42
Трансферрин.....	42
VIII. Свободнорадикальное окисление, фагоцитоз и воспаление	43
IX. Дополнительный материал.....	49
Окислительный стресс и апоптоз.....	49
Окислительный стресс и канцерогенез.....	51
Свободные радикалы при ишемии-реперфузии повреждения миокарда.	53
Вопросы для самоконтроля	55
Литература.....	59

I. Оксидативный стресс.

Кислород — один из самых распространенных химических элементов в природе. Реакция восстановления кислорода является основой биоэнергетики всех аэробных форм жизни.

Молекулярный кислород (O_2) обладает уникальной электронной конфигурацией. Кислород имеет два неспаренных электрона и представляет собой бирадикал. Согласно теории валентных связей, молекула кислорода представляет собой два атома, объединенные двойной связью ($O=O$). Однако высокую реакционную способность молекулы кислорода объясняет теория молекулярных орбиталей, согласно которой кислород имеет тройную связь ($\bullet O \equiv O \bullet$).

Окислительный стресс – это резкое усиление окислительных процессов в организме при недостаточном функционировании антиоксидантной системы. Сигналом для запуска данного типа реакции может служить некоторое изменение внутриклеточной среды, приводящее к смещению равновесия концентраций прооксидантных и антиоксидантных компонентов (определяемых также как перекисный гомеостаз) с последующей активацией процессов окисления. Соблюдение равновесного баланса между составляющими данной системы служит необходимым условием для поддержания нормального функционирования клетки.

Нарушение баланса, обусловленное стимуляцией свободнорадикального окисления (СО) и снижением активности антиоксидантов (АО), зачастую приводит к аккумуляции продуктов СО, обладающих чрезвычайно высокой реакционной способностью, обуславливающей модификацию структуры липидов, белков и нуклеопротеидов, а также иных важных групп биологических молекул, что приводит впоследствии к индукции и прогрессии различных патологических процессов в организме человека.

II. Активные формы кислорода.

Молекула кислорода, в основном состоянии, обладает двумя неспаренными электронами, таким образом, представляя собой бирадикал и исходя из термодинамических свойств, является заметно менее активным окислителем.

Существенное количество употребляемого человеком молекулярного кислорода принимает участие именно в реакциях митохондриального окисления, в ходе которого к молекуле O_2 происходит синхронная транспозиция четырех свободных электронов с последующим образованием двух молекул воды или подобных соединений. Во всех типах живых организмов непрерывно протекают реакции одноэлектронного восстановления, приводящего к формированию промежуточных продуктов восстановления молекулы кислорода. Образуемые таким образом химические соединения относятся к различным группам веществ как нерадикальной, так и радикальной природы, общим характерным свойством которых является высокая реакционная способность, вследствие чего они получили обобщенное название - активные формы кислорода (АФК). В частности, к данным соединениям относят: супероксидный анион – радикал (O_2^-), перекись водорода (H_2O_2), гидроксильный радикал ($HO\cdot$), синглетный кислород (1O_2), гипогалоиды ($HOCl$, $HOCl$, $HOBr$, HOI , $HOscn$), оксид азота ($NO\cdot$) и другие (Рис. 1).

Все виды АФК могут быть объединены и охарактеризованы, как реакционноспособные, короткоживущие, взаимопревращающиеся формы молекул кислорода, возникающие в результате электронного возбуждения или окислительно-восстановительных преобразований последнего.

Свободный радикал (СР) - это молекула или её часть, имеющая неспаренный электрон на внешней атомной или молекулярной орбите. Свободные радикалы могут быть нейтральными или заряженными – так называемые ион-радикалы (Рис. 2).

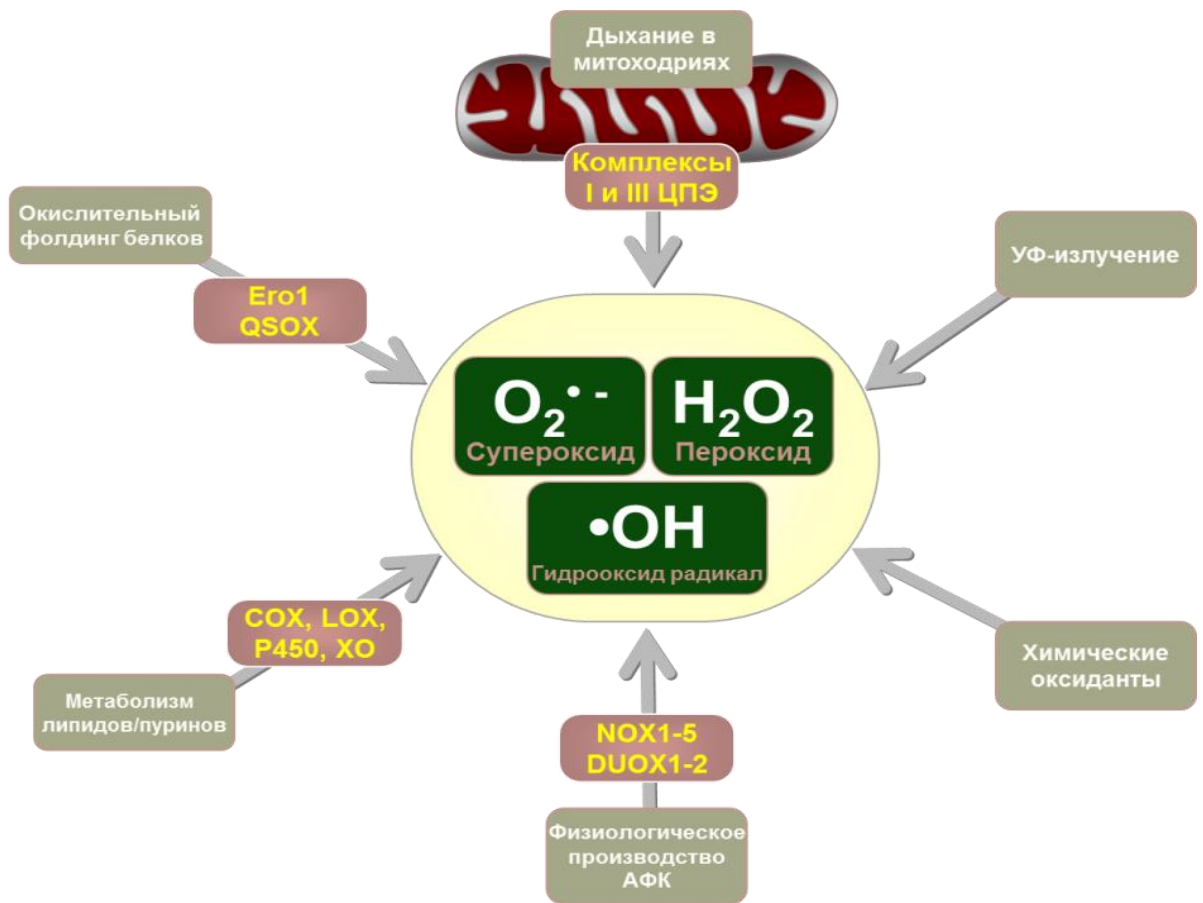


Рис. 1. Основные источники АФК в организме.

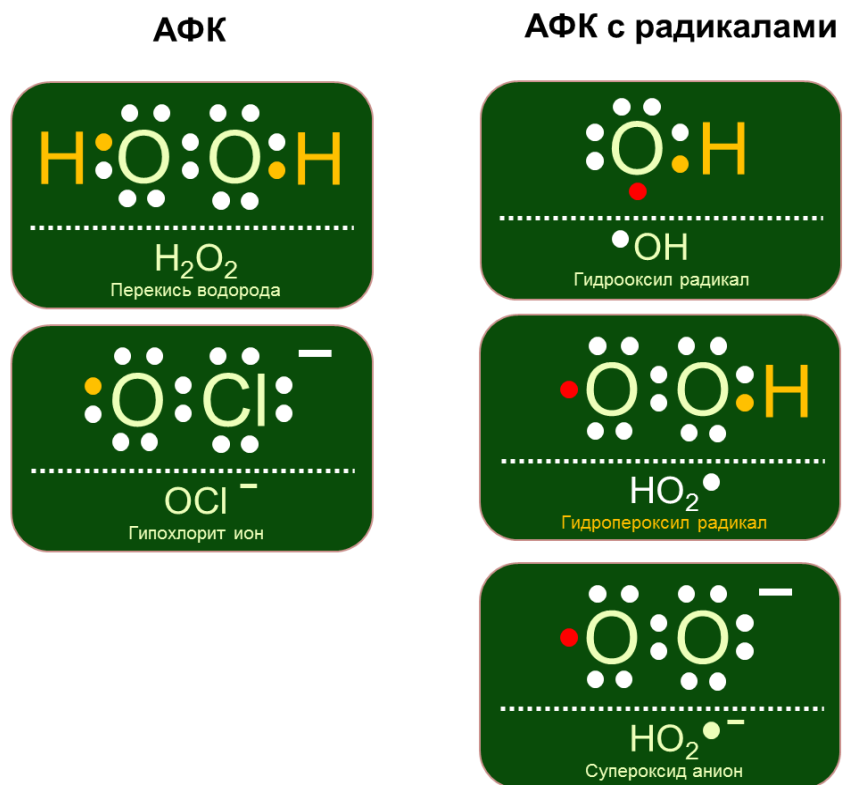


Рис. 2. Различные виды АФК.

Процессы свободнорадикального окисления (СРО) осуществляются при участии АФК, образующихся в ходе процессов одноэлектронного восстановления молекулярного кислорода. Обычно данные реакции СРО происходят в активном центре соответствующих ферментов без высвобождения промежуточных продуктов реакции во внешнюю среду.

III. Неферментативные пути образования АФК. Химизм процессов СРО.

Механизмы образования АФК подразделяют на ферментативные и неферментативные. В частности, в ходе процессов одноэлектронного окисления или восстановления образуются заряженные СР, подразделяемые на катион- или анион-радикалы (Рис. 3).

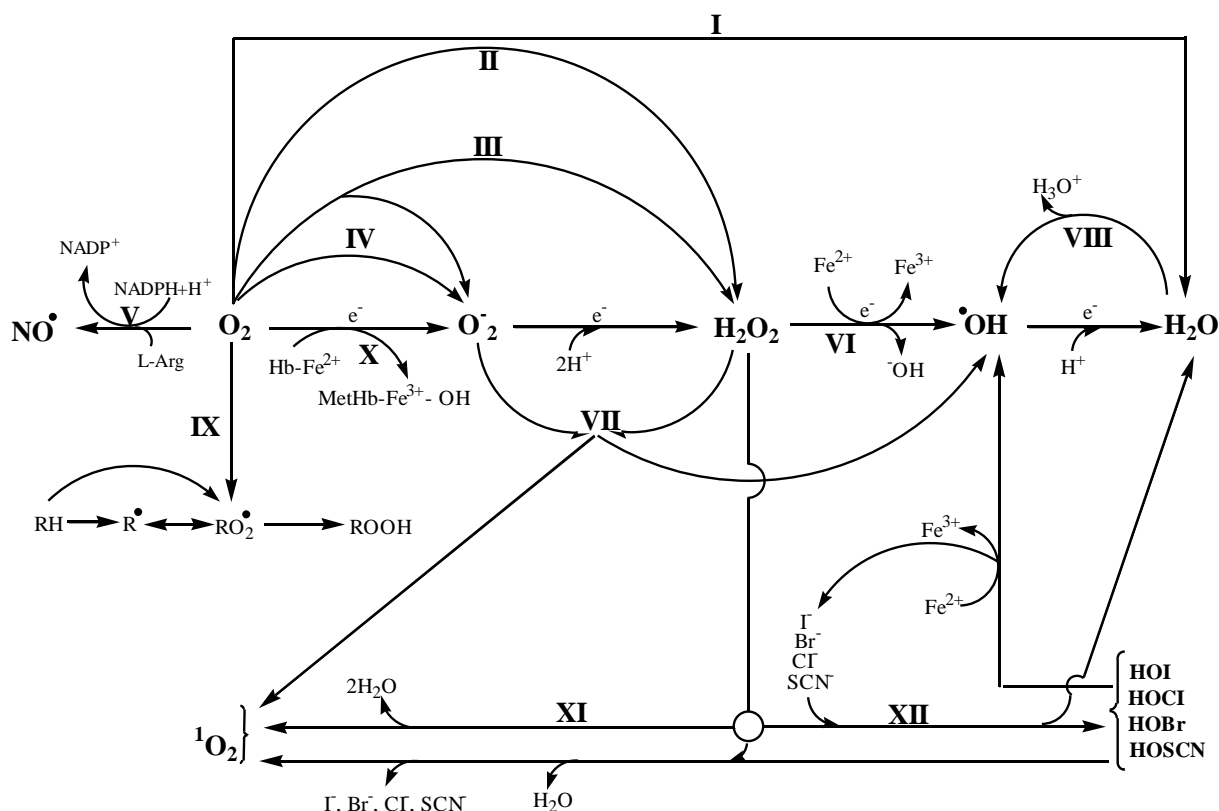


Рис 3. Основные биохимические пути и ферменты образования АФК.

I – цитохром-с-оксидаза; II – флавиновые оксидазы; III – ксантинооксидаза; IV – NADPH – оксидаза; V – NO-синтаза; VI – реакция Фентона; VII – реакция Хабера-Вайса; VIII – воздействие радиации; IX – перекисное окисление липидов; X – неферментативное окисление гемоглобина; XI – каталаза; XII – миелопероксидаза.

В основе механизма неферментативного образования АФК находятся нижеследующие реакции:

1. $O_2 + 1e^- \rightarrow O_2^{\cdot-}$
2. $O_2^{\cdot-} + 1e^- \rightarrow O^{2-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$
3. $HO^{\cdot} + 1e^- + 2H^+ \rightarrow 2H_2O$
4. $HO_2^{\cdot} + H^+ \rightarrow H_2O_2$

В свою очередь, одна из наиболее активных форм кислорода - гидроксильный радикал (HO^{\cdot}), достаточно быстро образуется из пероксида водорода, в присутствии атомов Fe^{2+} и/или $O_2^{\cdot-}$, как показано ниже:



Митохондриальная цепь переноса электронов (ЦПЭ) является одним из наиболее значимых источников генерации АФК ввиду того, что потеря (или «утечка») электронов из ЦПЭ митохондрий (а также микросом) обуславливает дальнейшее взаимодействие с кислородом (Рис. 4).

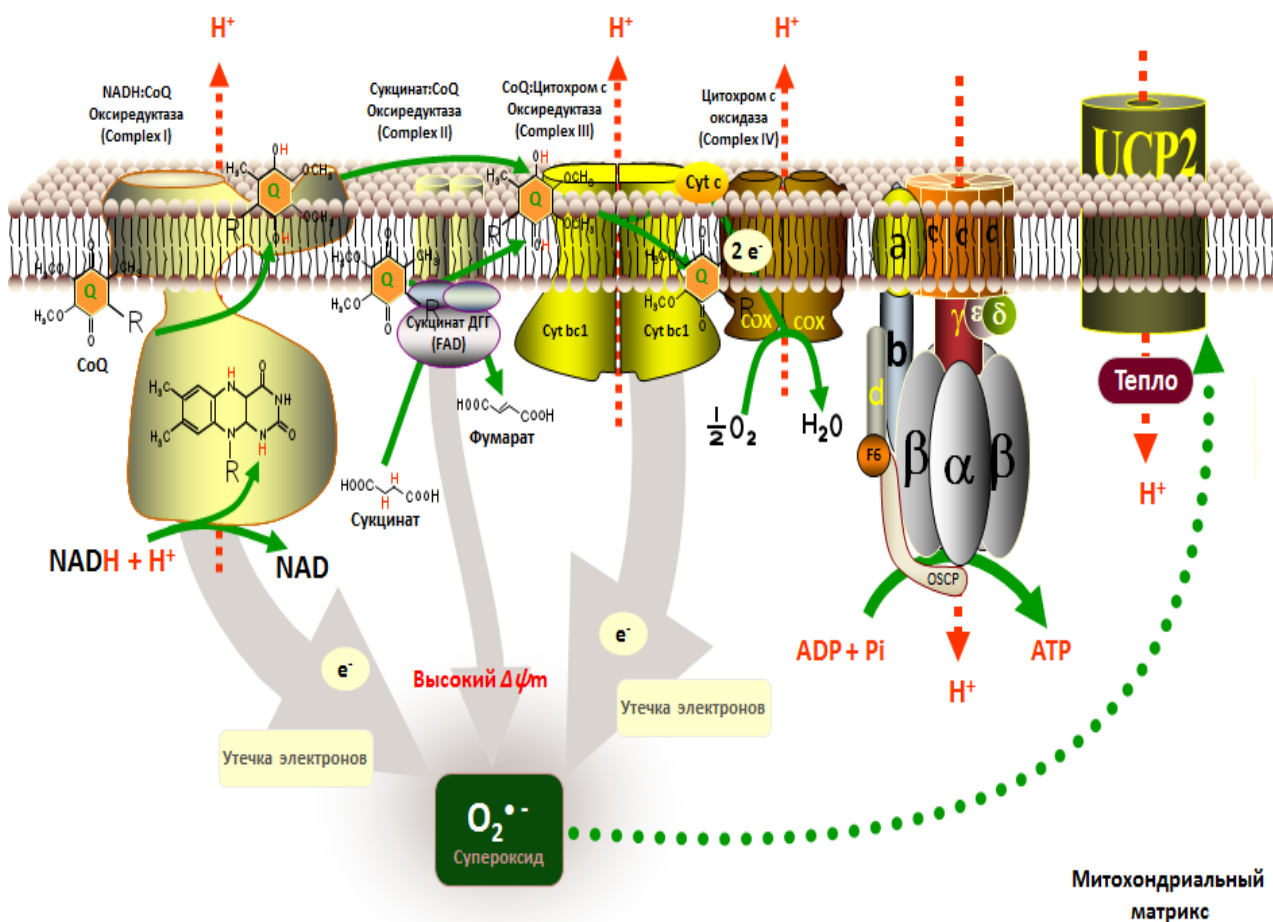


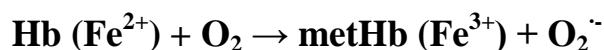
Рис. 4. Генерация АФК в дыхательной цепи.

Также примечательно, что генерация супероксидного анион-радикала кислорода в дыхательной цепи митохондрий может быть индуцирована путем направленного блокирования (например, посредством гипоксии) вследствие ограничения количества электронов, поступающих из «основного» потока. Образующийся при этом супероксид-анион радикал является высокореакционным соединением, которое накапливается в цитоплазме и не способно покинуть клетку ввиду гидрофильности и наличия отрицательного заряда, однако приводят к последующему образованию ряда активных молекул-окислителей. Генерация данного радикала может быть вызвана и влиянием ультрафиолетовых лучей или посредством взаимодействия кислорода с ионами различных металлов переменной валентности (чаще всего с железом). Показано, что супероксидный анион-радикал может образовываться и в процессе самопроизвольного окисления дофамина. Наконец, он может продуцироваться в клетках и такими ферментами, как NADPH-оксидаза или ксантинооксидаза.

Химически пероксид водорода не очень активен, однако он способствует появлению наиболее токсичной формы кислорода - гидроксильного радикала (OH^\bullet), например, в ходе следующей реакции:



Присутствие в клетках ионов переходных металлов (в частности, Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) ускоряет процесс формирования OH^\bullet -радикалов и иных АФК. В частности, в эритроцитах, окисление ионов Fe^{2+} локализованных в простетических группах молекул гемоглобина (порфириновых циклах гема), индуцирует генерацию супероксидного аниона:



IV. Ферментативные пути образования активных форм кислорода

Помимо неферментативных путей генерации АФК в организме человека возможно образование супероксидных анион-радикалов, а также перекиси

водорода посредством окисления органических молекул различными ферментами, в частности, оксидазами. Так, например, в ходе окисления ксантина до мочевой кислоты при участии ксантиноксидазы (КО) может образовываться супероксидный анион-радикал, а процесс дальнейшей трансформации данных радикалов в перекись водорода осуществляется при участии супероксиддисмутазы (СОД).

Внутри клеток, образующие перекись водорода ферменты, преимущественно локализируются в пероксисомах. В данных органеллах, кроме ксантиноксидазы, также представлены: гликолатоксидаза, уратоксидаза, оксидаза α -гидрооксикислот, оксидазы аминокислот и другие ферменты. Как правило, пероксисомальные ферменты относятся к индуцибельным, то есть специфическая активность последних существенно возрастает с увеличением концентрации соответствующих субстратов.

Микросомальные монооксигеназы.

Система микросомального окисления ксенобиотиков и эндогенных органических молекул представлена в клетке NADPH- и NADH-зависимым полиферментным комплексом цепи переноса электронов, интегрируемом цитохром Р-450-зависимой монооксигеназой (альтернативное наименование - цитохром Р-450, СYP). В составе упомянутого комплекса выделяют следующие макромолекулы: цитохром b5, NADPH-цитохром Р-450-редуктаза и NADH -цитохром b5-редуктаза.

Ферментативное гидроксирование субстрата является наиболее значимой реакцией в цепи микросомального окисления. Механизм данного превращения заключается в присоединении одного атома активированного кислорода к акцептору (окисляемому веществу) при этом другой атом направляется на образование молекулы воды. Именно участие молекул цитохрома Р-450 обуславливает переход атомов кислорода в гидроксильную группу и образование молекул воды.

Также помимо монооксигеназной активности, цитохром P-450 обладает и оксидазной активностью, выполняя заметную роль в генерации перекиси водорода и супероксидного анион-радикала.

Ксантиноксидоредуктаза.

Ксантиноксидаза (КО) - Mo-, Fe- и Cu-содержащий димерный флавопротеин, ускоряющий заключительную стадию окисления пуриновых соединений в клетках человека, также катализирующий окислительное преобразование ряда ароматических и алифатических альдегидов и гетероциклических соединений - птеридинов.

В нормальном состоянии КО представлена в клетке в форме дегидрогеназы и ускоряет NAD^+ -зависимое окисление молекул ксантина с образованием мочевой кислоты (Рис. 5). В структуре каждой субъединицы молекулы КО локализованы несколько кофакторных кластеров: 1 молибденовый центр, 2 железо-серных и 2 флавиновых центра. В Mo-центре осуществляется восстановительная полуреакция каталитического цикла, в ходе которой ксантин трансформируется в мочевую кислоту, в флавиновом центре молекулярный кислород превращается в пероксид водорода или супероксид-ион в зависимости от уровня восстановленности фермента.

Однако, при различных патологических состояниях, например при ишемии внутренних органов, приводящих к значительной активации внутриклеточных Ca^{2+} -зависимых протеаз, происходит ограниченный протеолиз молекул ксантиндегидрогеназы (с отщеплением короткого пептидного фрагмента), обуславливающий переход фермента в форму оксидазы. Ввиду индуцированного таким образом изменения субстратной специфичности фермента акцептором электронов в последующих реакциях выступает кислород, а не NAD^+ .

Значительная функциональная активность КО обнаружена в следующих тканях человека: головной мозг, скелетные мышцы и сердце, поджелудочная железа, печень и слизистые оболочки толстого и тонкого кишечника.

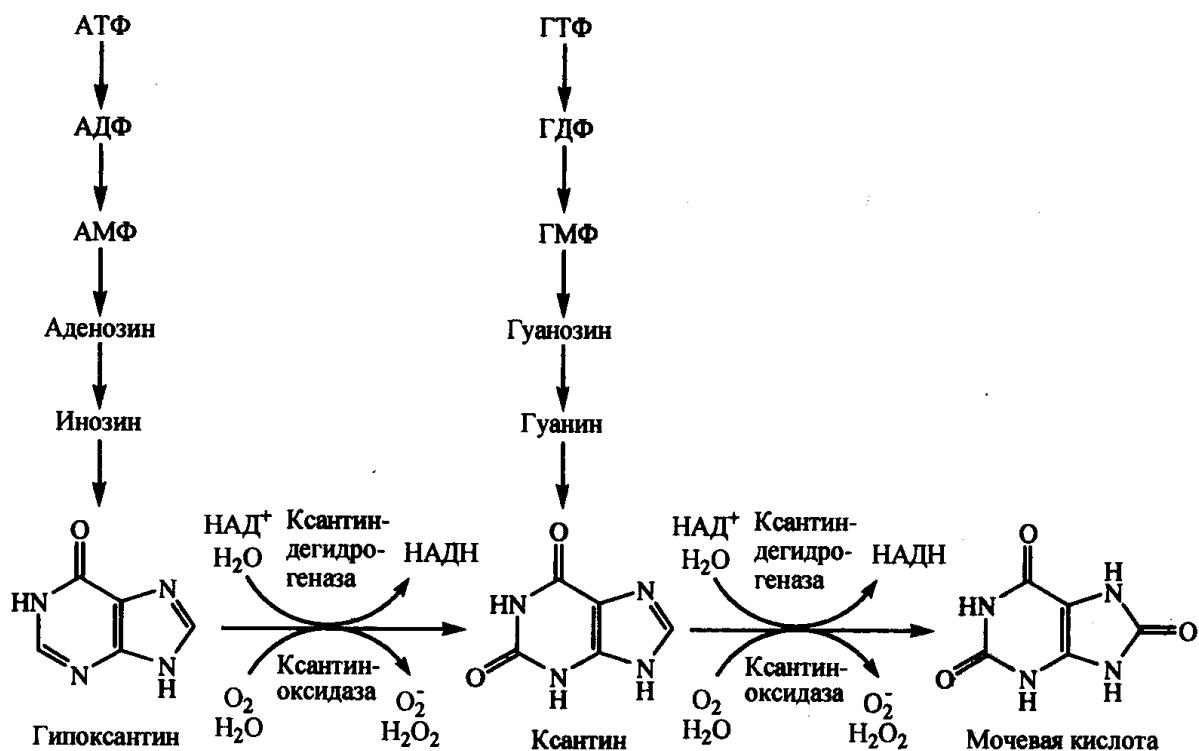


Рис.5. Синтез мочевой кислоты и образование супероксидного анион-радикала в ходе окисления пуриновых соединений в ксантиноксидоредуктазной реакции.

NADPH-оксидаза.

Помимо КО к значимым продуцентам супероксидного анион-радикала относится и NADPH-оксидаза (NOX), особенно широко представленная в фагоцитирующих клетках (макрофагах).

NADPH-оксидаза представляет собой мембрано-ассоциированный мультимолекулярный комплекс, обладающий ферментативной активностью и являющийся структурным элементом дыхательной цепи митохондрий. В неактивном состоянии данный комплекс состоит из флавопротеина и цитохрома. Структурными компонентами NADPH-оксидазы являются 4 белковые субъединицы, формирующие функционально-активный фермент в клеточной мембране. Две субъединицы - относятся к трансмембранным белкам и образуют гетеродимерный комплекс - цитохром b558, а две другие субъединицы – цитоплазматические и соединяются с цитохромом после

активации фагоцита. Таким образом, формируется активная молекула NADPH-оксидазы, необходимая для генерации супероксидного анион-радикала.

Функция NADPH-оксидазы заключается в катализе восстановления молекулярного кислорода до супероксид-радикала, трансформируемого затем в перекись водорода и иные токсичные формы кислорода (гидроксидный и гидропероксидный радикалы). Так, в нейтрофилах, перекись водорода, хлор и миелопероксидаза формируют сопряженную систему, обуславливающую синтез крайне токсичных химических веществ: молекулярного хлора и гипохлоритов.

В ходе активации фагоцитов именно генерация супероксидного анион-радикала играет значимую роль в осуществлении микробицидного, цитотоксического и иммунорегуляторного действия. В результате диспропорционирования супероксидный анион-радикал образует перекись водорода, которая используется миелопероксидазой фагоцитов для синтеза высоко-реакционных гипохлорит-ионов. В свою очередь перекись водорода при взаимодействии с ионами Fe^{2+} способствует образованию гидроксильных радикалов, при этом в случае взаимодействия с оксидом азота образуется мощный радикал-окислитель – пероксинитрит ($ONOO^-$). Таким образом, супероксидный анион-радикал, продуцируемый активированными фагоцитами, является основным компонентом для последующего образования иных активных свободных радикалов, обуславливающих протвомикробное действие.

5. Активные формы хлора и азота. Ферментативные реакции их образования

NO-синтаза.

Основной азотсодержащий радикал кислорода - оксид азота ($NO\cdot$) в организме человека и животных также образуется ферментативным путем посредством окисления L-аргинина. Данный процесс является достаточно

сложным и осуществляется группой ферментов, называемых NO-синтазами (NOS), при этом кофакторами являются молекулы NADPH, ФАД и ФМН. Образующийся в ходе данных процессов оксид азота обладает широким спектром биологического действия:

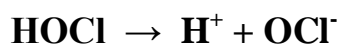
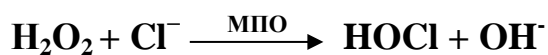
- Выполняет значимую роль в регуляции тонуса сосудов.
- Обуславливает релаксацию гладких мышц.
- Обладает антиагрегантными и антиадгезионными свойствами.
- Является важным нейромедиатором.
- Обладает противомикробной и цитотоксической активностью.

В клинической практике широкое распространение получили различные нитратосодержащие антиангинальные препараты (глицерина тринитрат, изосорбида динитрат, изоамилнитрит), терапевтический эффект которых основан на способности высвобождать оксид азота в организме пациента.

Миелопероксидаза.

В результате взаимодействия перекиси водорода с ионами хлора образуются высокоактивные гипохлорит-ионы, что обусловлено работой фермента - миелопероксидазы (МПО), локализованной в азурофильных гранулах нейтрофилов, а также в моноцитах и тканевых макрофагах. МПО (или H_2O_2 -оксидоредуктаза) относится к гемопротеинам и состоит из двух идентичных димеров, в составе которых выделяют гликозилированные тяжелые (α) и негликозилированные легкие (β) субъединицы. В состав α -субъединиц входят ковалентно-связанные Fe^{2+} -содержащие простетические группы (порфириновые циклы). Данные димеры дополнительно стабилизированы одной дисульфидной связью между собой.

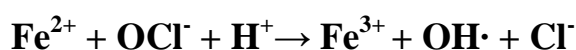
Первичным продуктом, образующимся в ходе реакции окисления хлоридов с участием МПО, является хлорноватистая кислота ($HOCl$), которая находится в равновесии с гипохлорит-ионом (OCl^-), являющимся сильным окислителем.



В результате активации фагоцитов, сопровождающейся дегрануляцией, осуществляется секреция МПО в фагосомы или внеклеточный матрикс, сопровождающаяся генерацией ОСl-иона, являющегося важным антимикробным фактором лейкоцитов. Гипохлорит-ион является сильным окислителем и накапливается в гранулах нейтрофилов, мембрана которых предохраняет клеточные структуры от повреждающего воздействия данных ионов.

В присутствии МПО также происходит образование гипогалоидных кислот (НОСl, НОВr, НОJ), являющихся мощными токсинами, обладающими чрезвычайно высокой химической реакционной способностью по отношению к органическим молекулами. При взаимодействии с гипогалоидами в первую очередь окисляются сульфгидрильные и тиоэфирные группы белков, поэтому именно наличие в клетках белковых молекул, заметно снижает общее цитотоксическое действие данных кислот. Основным ингибитором гипогалоидов в плазме крови человека является альбумин.

Гипогалоидные кислоты способны окислять железо-серные и гемовые простетические группы ферментов, снижая их функциональную активность. Также данные вещества могут как индуцировать, так и ингибировать процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ). Индукция ПОЛ может быть вызвана освобождением железа в каталитически активной форме (Fe^{2+}), одновременно гипохлорит может взаимодействовать с Fe^{2+} с образованием гидроксильного радикала:



Установлено, что гипохлорит-ион способен легко проникать в поверхностный фосфолипидный слой липопротеидов низкой плотности

(ЛПНП), циркулирующих в крови, вызывая окисление последних, тем самым индуцируя эффективный захват окисленных липопротеинов макрофагами через скавенджер рецепторы SCARB1.

V. Механизмы повреждающего действия окислительного стресса: повреждение белков, нуклеиновых кислот, деградация мембранных фосфолипидов, образование межмолекулярных комплексов.

Повреждение ДНК

Молекулы ДНК, могут быть подвержены прямому повреждению, в основном под действием гидроксид-радикалов, а также в меньшей степени при участии кислородных супероксид-анионов. Именно гидроксид-радикал способен к прямому взаимодействию с пуриновыми и пиримидиновыми основаниями, а также с остатками сахаров (дезоксирибозы и рибозы).

Супероксид-анион обладает селективным действием и взаимодействует преимущественно с гуаниновыми основаниями, в результате чего образуются различные оксо-производные, конечным продуктом процесса окисления данных оснований является 7,8-дигидро-8-гидроксигуанозин.

Радикалы, генерируемые при перекисном окислении липидов, также оказывают повреждающее действие на молекулы ДНК. Экспериментально установлено, что именно митохондриальная ДНК (мтДНК) подвергается окислительному действию АФК в большей степени, чем ядерная, ввиду топологической близости к источникам генерации АФК и не обладает защитой, которую обеспечивают белки гистоны. В ходе взаимодействия H_2O_2 , продуцируемой в дыхательной цепи с ионами Fe^{2+} и Cu^{2+} (локализованными в митохондриальных мембранах) образуется гидроксид-радикал, ответственный за повреждения мтДНК. Также внеядерные нуклеиновые кислоты могут повреждаться под действием H_2O_2 , образующейся в ходе моноаминоксидазной реакции. Повреждение мтДНК

приводит к ошибкам в синтезе компонентов дыхательной цепи, вследствие чего нарушается нормальное функционирование дыхательной цепи митохондрий и усиливается «утечка» супероксид-анионов. Повреждение ДНК происходит также в результате активации эндонуклеаз, вследствие роста концентрации внутриклеточных ионов Ca^{2+} , индуцируемом окислительным стрессом.

В результате воздействия АФК на молекулу ДНК индуцируются процессы хромосомных aberrаций, приводящих к нарушениям корректной структуры хромосом.

Повреждение белков

В условиях окислительного стресса происходят процессы окислительной модификации белковых молекул. Свободные радикалы способны атаковать белки в различных участках, приводя к нарушениям не только первичной, но и вторичной и третичной структур белков, что приводит к агрегации или фрагментации, обуславливающей дальнейшую потерю функциональной активности биомолекулы. Так многие ферменты, содержащие свободные SH-группы, в частности АТФазы или дегидрогеназы, легко окисляются вследствие свободнорадикальной атаки.

В процессе окислительной модификации белка образуются различные стабильные метаболиты аминокислот.

Обсуждение возможной окислительной деструкции белков в организме до последнего времени носило, в основном, теоретический характер. В ряде исследований этот процесс рассматривается как одна из возможных причин инактивации ферментов, изменения структурной организации белков при состоянии окислительного стресса. Значимым примером окислительной модификации белков и изменения функциональных свойств является фермент - ксантиндегидрогеназа. Под действием АФК происходит интенсивное окисление SH-радикалов данного белка и модификация ксантиндегидрогеназы в ксантиноксидазу.

Если белок в своем составе содержит металл с переменной валентностью, то в присутствии перекиси водорода образовывается гидроксид-радикал, окисляющий аминокислоты в активном центре, что приводит к инактивации. Так, в организме мышей, несущих мутантную форму гена *Mn-SOD*, супероксид-анион не может утилизироваться с достаточной степенью эффективности, это приводит к повреждению комплекса I дыхательной цепи митохондрий, а также сукцинатдегидрогеназы и ферментов, содержащих железосерные кластеры. В целом, данное изменение индуцирует дальнейшее нарушение функционирования цикла трикарбоновых кислот сопряженное с работой дыхательной цепи.

Свободные карбоксильные группы белков под влиянием АФК трансформируются в карбонильные группы, способные взаимодействовать с аминокислотными группами, формируя Шиффовы основания, что приводит к образованию нежелательных поперечных сшивок между белковыми молекулами. Индукция процессов образования химических сшивок наблюдается также и при неферментативном гликозилировании белков (гликировании), существенно активируемом при окислительном стрессе и приводящем к повреждению тканей (например, при сахарном диабете).

Перекисное окисление липидов

Кислород, будучи бирадикалом, энергично взаимодействует с органическими радикалами, имеющими неспаренный электрон. Эта реакция играет важную роль в живых организмах для продолжения и развития цепных радикальных процессов перекисного окисления липидов. Реакции ПОЛ протекают, главным образом, в билипидном слое клеточных мембран.

Процесс ПОЛ условно подразделяют на четыре стадии: инициирования цепей окисления, развитие цепных реакций, обрыв цепей, разрушение структуры окисленных липидов. Стадия инициирования свободнорадикального окисления липидов биомембран в качестве основных событий представлена разрушением связи углерод-водород, отрывом атома

водорода от жирнокислотной цепи и его присоединением к свободному радикалу-прооксиданту, появлением углерод-центрированного липидного радикала.

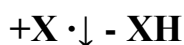
Ключевой характеристикой радикалов, необходимой для начала цепной реакции, является окислительно-восстановительный потенциал ($E_{ox/red}$). Так, в качестве прооксидантов для инициации ПОЛ могут выступать любые радикалы, значения $E_{ox/red}$ у которых выше, чем у липидов.

1. Стадия иницирования.

Именно жирные кислоты являются наиболее подверженными действию АФК, они содержат изолированные двойные связи, локализованные через CH_2 -группы, у которых свободный радикал ($X\cdot$) (инициатор окисления) легко отнимает электрон, трансформируя липид, содержащий данный фрагмент, в свободный радикал:



фрагмент остатка ненасыщенной жирной кислоты

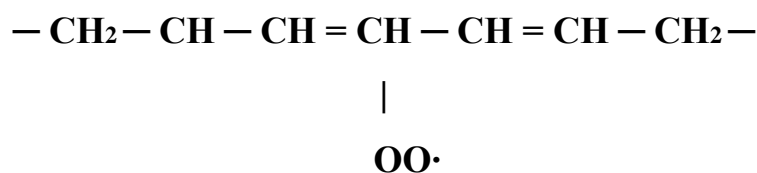


радикальный центр

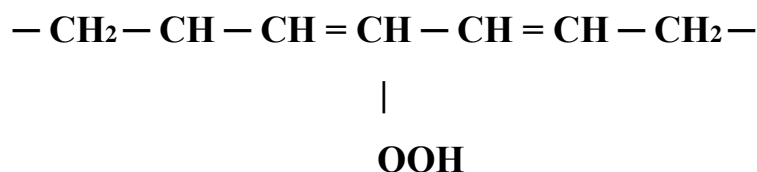
Единственный иницирующий свободный радикал способен образовать в липидной мембране множество молекул липидных пероксидов посредством цепной реакции.

2. Стадия развития цепных реакций.

Молекулы с двумя конъюгированными двойными связями называются **диеновые конъюгаты**. После взаимодействия с молекулярным кислородом образуется липопероксирадикал $LOO\cdot$, а затем диеновые конъюгаты, после чего - пероксид липида $LOOH$:



свободнорадикальный промежуточный продукт

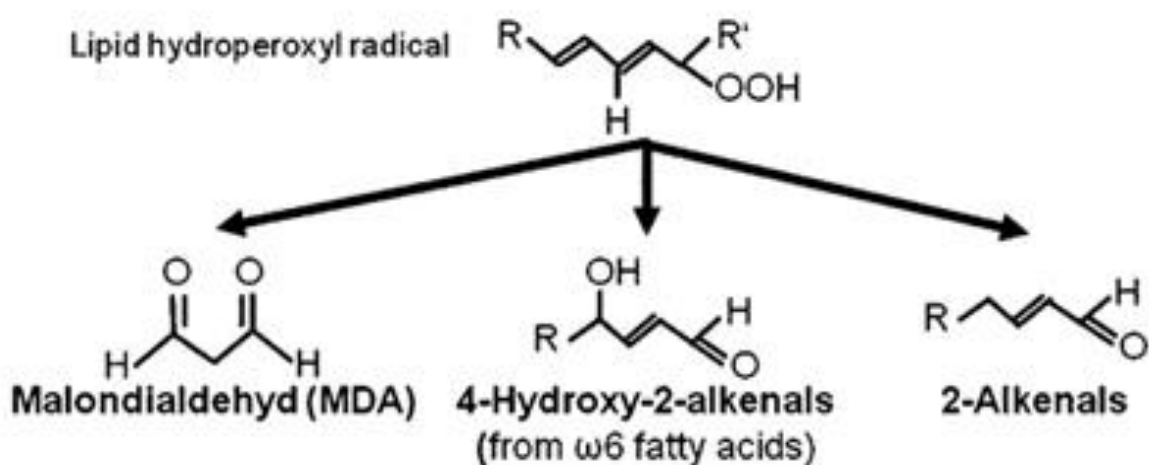


диеновый конъюгат

Образующиеся молекулы диеновых конъюгатов и гидроперекисей являются первичными продуктами ПОЛ.

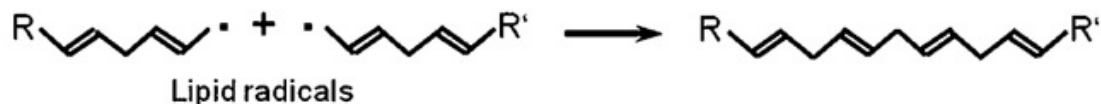
3. Разрушение структуры липидов.

Дальнейшее окисление липидов приводит к образованию широкого спектра конечных продуктов ПОЛ: альдегидных и спиртовых производных с укороченной цепью, низкомолекулярных продуктов, эпоксидов, гидропероксида кислоты и малонового диальдегида (МДА).

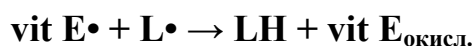
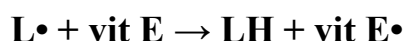
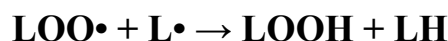


4. Стадия обрыва цепи.

Развитие цепи может быть остановлено посредством взаимодействия свободных радикалов между собой:



или в ходе взаимодействия с различными молекулами-антиоксидантами, например, витамином E, являющимся донором электронов, переходящим при этом в стабильную окисленную форму:



Результатом процесса ПОЛ является снижение текучести мембран, облегчение перехода молекул фосфолипидов из одного монослоя мембран в другой, увеличение проницаемости мембран для различных субстанций (K^+ , Ca^{2+} и т. д.), ковалентная модификация и изменение функциональной активности мембранных протеинов, рецепторов, ферментов и ионных каналов. Некоторые из продуктов перекисного окисления полиеновых жирных кислот оказывают выраженное цитотоксическое действие. Так 4-гидрокси-2-транс-ноненаль, обладая способностью ковалентно взаимодействовать с белками и ДНК, ингибирует специфическую активность различных ферментов, ионных каналов, рецепторов и индуцирует мутагенные эффекты. Возрастание уровня внутриклеточного Ca^{2+} в условиях оксидативного стресса сопровождается увеличением активности фосфолипазы A2 и, как следствие, высвобождением арахидоновой кислоты из мембранных фосфолипидов. Арахидоновая кислота может, как подвергаться свободнорадикальному окислению, так и использоваться в качестве субстрата в процессе синтеза эйкозаноидов. Синтез простагландинов тесно связан с перекисным окислением липидов не

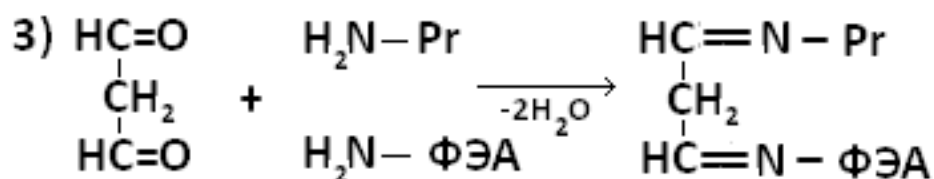
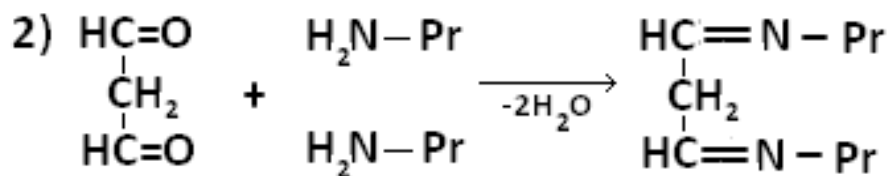
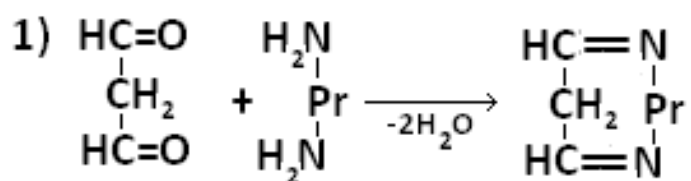
только из-за возрастания доступности арахидоновой кислоты, но и по причине стимуляции активности циклооксигеназ (ЦОГ) под влиянием липидных пероксидов.

Образование комплексов.

ПОЛ оказывает прямое влияние и на молекулы белков, среди прочих к наиболее важным изменениям, в ходе рассматриваемого процесса, относят образование комплексов состоящих из белковых молекул и окисленных липидов, а также полимеризацию фосфолипидов и полипептидов.

Формирование белок-липидных комплексов зачастую обусловлено образованием прочной химической связи между свободными аминогруппами радикалов аминокислот и альдегидными (или карбоксильными) группами окисленных липидов, а также ввиду существующих гидрофобных взаимодействий. Наиболее значимую роль в образовании вышеупомянутых комплексов играет МДА – один из конечных продуктов процесса ПОЛ.

Именно МДА образует Шиффовы основания, реагируя с лизиновыми ε-аминогруппами или остатками N-концевых аминокислот в молекулах полипептидов. Последовательность реакций образования как внутримолекулярных, так и поперечных межмолекулярных сшивок может быть представлена следующим образом:



Примечательно, что МДА способен к образованию различных типов комплексов: белок-липидных, межбелковых и межлипидных. В случаях, когда данные комплексы сформированы функционально-активными белковыми молекулами (ферментами, рецепторами), активность последних значительно изменяется. Помимо всего, формирование комплексов приводит к ригидности клеточных мембран, что заметно затрудняет нормальное функционирование ферментов, вследствие недоступности активных центров, обусловленных сложностями в осуществлении конформационных переходов.

VI. Антиоксидантная система организма, роль, компоненты

Поддержание концентрации АФК в клетках на относительно стабильном низком уровне осуществляется многокомпонентной системой регуляции процессов активации кислорода, без которой нормальное функционирование организма в аэробных условиях было бы невозможным. Антиоксидантами (в биологических системах) называют вещества, способные эффективно ингибировать процессы свободнорадикального окисления в клетках.

В антиоксидантной системе (АОС) выделяют следующие звенья:

1. Ферменты-перехватчики, в частности, супероксиддисмутаза (дисмутирующая $O_2^{\cdot -}$ до H_2O_2) каталаза и глутатионпероксидаза (конвертирующие H_2O_2 в H_2O). Глутатионпероксидаза вместе с глутатион-S-трансферазой участвует в детоксификации гидропероксидов жирных кислот;

2. Гидрофильные скавенджеры радикалов - восстановленный глутатион (GSH), аскорбат, урат, тиолы (цистеин, эрготионеин);

3. Липофильные перехватчики радикалов - токоферолы, флавоноиды, каротиноиды, убихиноны, билирубин;

4. Ферменты, осуществляющие восстановление окисленных низкомолекулярных биоантиоксидантов (глутатионредуктаза) или участвующие в поддержании в функционально активном состоянии белковых тиолов (тиоредоксинредуктаза);

5. Ферменты, участвующие в поддержании внутриклеточного стационарного уровня восстановительных эквивалентов (глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, катализирующая образование NADPH в пентозофосфатном пути окисления глюкозы);

6. Антиоксидантные белки (церулоплазмин, альбумин, ферритин, трансферрин, лактоферрин и др.), участвующие в хранении, транспорте или обезвреживании ионов металлов переменной валентности.

В зависимости от характера действия выделяют ферментативные и неферментативные компоненты специфической АОС. Исходя от растворимости, низкомолекулярные компоненты подразделяются на гидрофобные и гидрофильные, в зависимости от локализации в тканях – на внутриклеточные и внеклеточные.

Ферментативные компоненты:

- супероксиддисмутаза;
- каталаза;
- глутатион-пероксидаза;
- глутатионтрансфераза;

Эти ферменты катализируют металлы переменной валентности и участвуют в разложении гидроперекисей нерадикальным путем.

Неферментативные компоненты:

-высокомолекулярные (белковые) соединения: трансферрин, церулоплазмин и др.

-низкомолекулярные соединения – ловушки радикалов: витамины А, С, Д, Е, К; селен; мочева кислота и др.

Таблица 1. *Различные типы антиоксидантов*

Вид антиоксидантов	Локализация в организме	Механизм действия
1	2	3
Ферменты, белки		
Супероксиддисмутаза	Митохондрии и цитоплазма клеткок	Дисмутация анионов супероксида
Каталаза	Клетки, пероксисомы	
Глутатионпероксидаза	Клетки	Разрушение H_2O_2 , гидроперекисей, пероксинитритов.
Глутатион-S-трансфераза		
Другие пероксидазы	Клеточные мембраны, митохондрии, цитозоль	Разрушение H_2O_2
Церулоплазмин	Плазма крови	Связывание Cu и Fe, инактивация супероксида
Трансферрин	Плазма крови	Связывание и транспорт железа
Ферритин	Цитоплазма	Связывание железа
Низкомолекулярные антиоксиданты		
Витамин E	Клетки (цитоплазматические мембраны, мембраны митохондрий и лизосом), кровь	Нейтрализация супероксида, радикалов оксида азота и перекисных радикалов
Витамин C	Цитозоль, внеклеточная жидкость	Нейтрализация супероксида,

		гидроксильного радикала, восстановление окисленного витамина Е
Прочие витамины, напр, витамины В6, Р, РР, К (кроме витамина D)	Цитозоль, внеклеточная жидкость	Нейтрализация кислородных радикалов
Каротиноиды	Мембраны клеток	Защита клеток от синглетного кислорода
Восстановленный глутатион и другие SH-содержащие соединения	Клетки	Защита клеток от радикалов кислорода, предупреждение ПОЛ
Убихинон	Митохондрии	Ингибирование ПОЛ
Мочевина, мочева кислота	Внеклеточная жидкость	Связывание H_2O_2 , ингибирование ПОЛ
Билирубин	Кровь	Нейтрализация кислородных радикалов
Карнозин	Клетки мозга, сердца и скелетных мышц	Нейтрализация АФК, ингибирование ПОЛ
Селен	Гормоны, белки и ферменты, в частности глутатионпероксидаза	Разрушение H_2O_2 и гидроперекисей
Углекислый газ (CO_2)	Клетки, плазма крови	Ингибирование образования супероксида

У аэробных организмов в процессе эволюции сформировались первичная и вторичная системы защиты от оксидантов. Входящие в состав первичной системы элементы взаимодействуют напрямую с АФК на

клеточном и тканевом уровне. К данным компонентам можно отнести как ферментативные, так и неферментативные звенья АОС. Элементы, относящиеся к вторичной системе защиты (протеазы, липолитические ферменты, пептидазы.) образуют комплекс, функционирующий при случившихся окислительных повреждениях клеточных структур, когда возникает необходимость быстрого их удаления и восстановления.

VII. Антиоксиданты неферментативной природы

К основным компонентам неферментативной АОС относятся низкомолекулярные вещества, обладающие высокими значениями констант скорости взаимодействия с АФК.

Неферментативная антиоксидантная система объединяет достаточно различные по химическому строению и физическим свойствам соединения: водорастворимые (глутатион, аскорбат, цистеин, эрготионеин) и гидрофобные (α -токоферол, витамин А, каротиноиды, убихиноны, витамины группы К). Все перечисленные химические соединения обладают способностью к снижению скорости генерации свободных радикалов, равно как и к уменьшению концентрации продуктов реакций, протекающих с участием радикалов.

Основное направление действия низкомолекулярных АО связано с защитой белков, нуклеиновых кислот, полисахаридов и биомембран от окисления и разрушения в ходе свободнорадикальных процессов. Ключевая роль низкомолекулярных АО особенно заметна в случаях окислительного стресса, при котором компоненты ферментативной системы оказываются слабо эффективными, вследствие быстрой инактивации последних под действием свободных радикалов. Также необходимо довольно значительное время для индукции внутриклеточного синтеза макромолекул с целью дальнейшего формирования функционального пула ферментативной АОС.

Аскорбиновая кислота

Основа антиоксидантных свойств аскорбата базируется на одноэлектронных циклических переходах между дигидро-, монодегидро- и дегидроаскорбатными формами. Именно данное свойство создает предпосылки для повышения сопротивляемости организма различным заболеваниям, и обосновывает врачебные рекомендации – прием ударной дозы аскорбиновой кислоты в начале развития болезни. Тем не менее, аскорбат также обладает прооксидантным эффектом в присутствии ионов металлов с переменной валентностью.

Выполняя антиоксидантные функции аскорбат способен реагировать с $\text{HO}\cdot$, $\text{O}_2\cdot^-$, H_2O_2 и радикалом токоферола, окисляясь при этом до монодегидроаскорбиновой кислоты (МДГА) или дегидроаскорбиновой кислоты (ДГА). Окисленные формы трансформируются в аскорбат под действием соответственно МДГА- или ДГА-редуктаз, в первом случае используется восстановленный эквивалент NADPH^+H^+ , а во втором – глутатион.

Токоферол

Жирорастворимый витамин Е представлен в нескольких гомологичных формах (α , β , γ - токоферол) среди которых наибольшей антиоксидантной активностью обладает α -токоферол. Значительная эффективность действия α -токоферола (Рис.6), как природного антиоксиданта, обусловлена чрезвычайно высокой антирадикальной активностью (константа скорости взаимодействия данной молекулы с перекисными радикалами составляет $2,0 \times 10^5$ л/моль с, что на два порядка выше аналогичных констант скоростей для многих известных синтетических и природных антиоксидантов). Также для α -токоферола характерна функциональная стабилизация билипидного слоя мембран посредством формирования стабильных комплексов с полиненасыщенными ацилами липидов. Также α -токоферол может вступать

во взаимодействие с перекисными радикалами в качестве донора водорода, согласно схеме реакции:

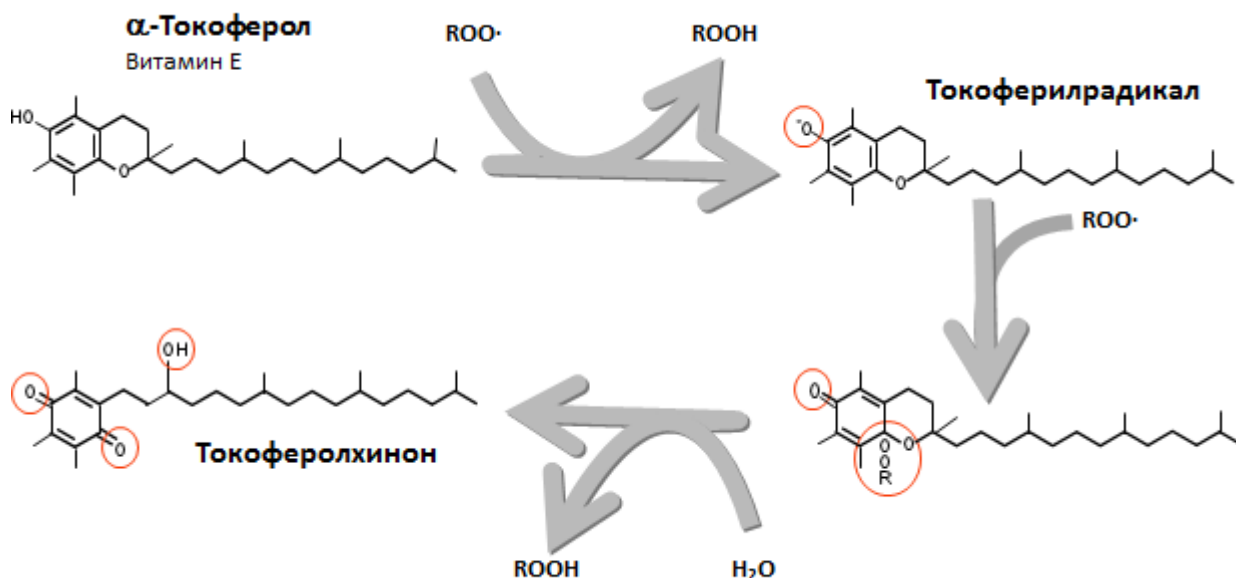
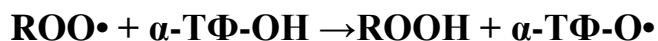
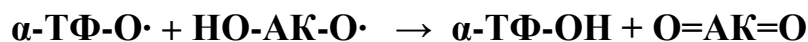
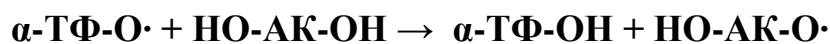


Рис 6. Механизм антиоксидантного действия витамина E.

Токофеноксильный радикал ($\alpha\text{-ТФ-О}\cdot$) способен взаимодействовать с аскорбиновой кислотой (НО-АК-ОН), в результате чего радикал α -токоферола восстанавливается, при этом появляется свободный радикал частично восстановленной формы аскорбиновой кислоты – семидегидроаскорбат ($\text{НО-АК-О}\cdot$), при последующем взаимодействии которого с новой молекулой токофеноксильного радикала образуется дегидроаскорбиновая кислота (О=АК=О):



Восстановление аскорбиновой кислоты и семидегидроаскорбиновой кислоты осуществляется в различных клеточных компартментах

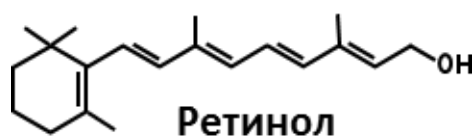
(микросомы, митохондрии, цитозоль) при участии NADPH^+ - и GSH -зависимых редуктаз. Образующиеся молекулы окисленного глутатиона (GSSG) быстро восстанавливаются под действием глутатионредуктазы, источником которой является пентозофосфатный путь.

Система регенерирующих циклов α -токоферола фактически исключает любые побочные реакции токоферилрадикала, предопределяя не только высокую антирадикальную, но и антиоксидантную активность в целом, блокируя развитие цепей ПОЛ.

Период полураспада молекул α -токоферола, определенный с помощью изотопной метки, варьирует от 5 дней (в печени и эритроцитах) до 30 дней (в клетках головного мозга).

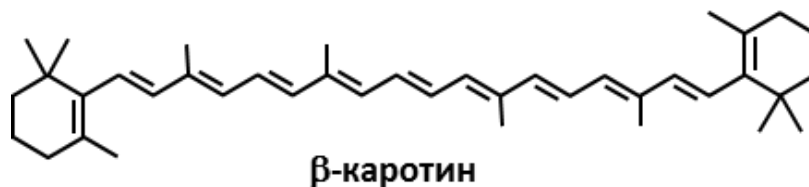
Каротиноиды

К гидрофобным антиоксидантам также относятся витамины группы А: А1 (ретинол), А2 и цис-форма витамина А1, отличающиеся дополнительными двойными связями в кольце ионона. Все соединения данной группы представляют собой циклические непредельные одноатомные спирты, состоящие из 6-членного кольца (ионон), двух остатков изопрена и первичной спиртовой группы:



Всасывание каротиноидов происходит в кишечнике в присутствии липидов. В организме данные соединения легко окисляются с образованием цис- (сетчатка глаза) и транс-альдегидов (прочие ткани); откладываются про запас в печени в форме более устойчивых сложных эфиров: ретинилпальмитат, ретинилацетат и ретинилфосфат. Известны также предшественники (провитамины) витамина А – каротины, подразделяемые на α и β -типы. Наибольшей биологической активностью обладает β -каротин,

поскольку он содержит два иононовых кольца, при расщеплении которых в кишечнике (возможно и в печени) при участии каротин-диоксигеназы, в присутствии молекулярного O_2 , из него образуются 2 молекулы витамина А:



Повышенное содержание β-каротина в пищевом рационе и, следовательно, в плазме крови оказывает профилактическое действие в отношении целого ряда заболеваний, оказывая иммуностимулирующее действие. Существует предположение, что благодаря наличию двойных связей в молекуле, витамин А может участвовать в окислительно-восстановительных реакциях, поскольку он способен образовывать перекиси, которые в свою очередь увеличивают активность антиоксидантных ферментов в клетке. Также предполагается участие витамина А в делении и дифференцировке клеток, обусловленное его действием на инициацию репликации; на рост костной ткани - участие в синтезе хондроитинсульфата. Неотъемлемым является участие витамина А в фотохимическом акте зрения.

Коэнзим Q10

Коэнзим Q10 (Q10) – жирорастворимое витаминоподобное вещество, крайне широко представленное в организме человека, с чем связано его второе официальное название – «убихинон» (от лат. *ubique* - везде, повсюду). Внутри клеток Q10 преимущественно локализуется в митохондриях. В сердечной мышце данного вещества вдвое больше, чем в любом другом органе или ткани. На данном этапе установлены две основные функции Q10 в живых организмах. Так, Q10 участвует в процессе выработки энергии в любой клетке. Именно коэнзим Q10 в митохондриях выступает в качестве переносчика электронов в ходе синтеза АТФ и сопрягает процессы

электронного транспорта и окислительного фосфорилирования. Молекулы данного кофермента являются необходимым звеном для передачи электронов с комплексов I и II на комплекс III дыхательной цепи. При недостатке Q10 (затруднении в передаче электронов по дыхательной цепи) комплексы I и III становятся основными генераторами супероксид-радикалов в клетках.

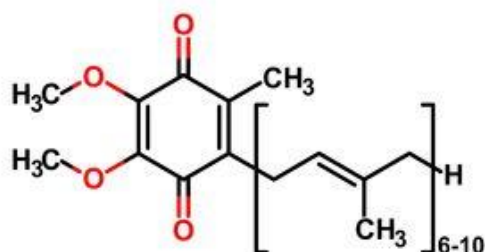


Рис.8. Структурная формула коэнзима Q10.

Коэнзим Q10 это единственный жирорастворимый антиоксидант, синтезируемый в организме человека и животных, а также постоянно регенерируемый из окисленной формы с помощью ферментных систем и антиоксидантов неферментной природы (аскорбата, альфа-токоферола).

Непосредственное антиоксидантное действие Q10 заключается в улавливании свободных радикалов. Q10 способен предупреждать развитие цепных реакций свободнорадикального окисления, в том числе перекисного окисления фосфолипидов клеточных мембран и липопротеинов плазмы. Опосредованное антиоксидантное действие Q10 состоит в предупреждении генерации феноксил-радикалов альфа-токоферола, то есть в недопущении возможного прооксидантного действия молекул витамина E.</

типа СХХС, где С - цистеин, а Х - любая, как правило гидрофобная, аминокислота. Ещё одна отличительной черта всех тиоредоксинов - специфическая третичная структура, также называемая тиоредоксиновой укладкой.

Функционально-важной частью данных белков являются дисульфидные связи, при помощи которых молекулы тиоредоксина способны восстанавливать дисульфидные связи других белков, разрушая в них существующие дисульфидные мостики. Таким образом, тиоредоксины выполняют функцию дисульфидоксидоредуктаз, восстанавливая NADPH-зависимым путем SH-группы различных белков и тем самым поддерживая их специфическую активность. Окисленные формы тиоредоксинов ретроредуцируются в активное состояние тиоредоксинредуктазой (Рис.9).

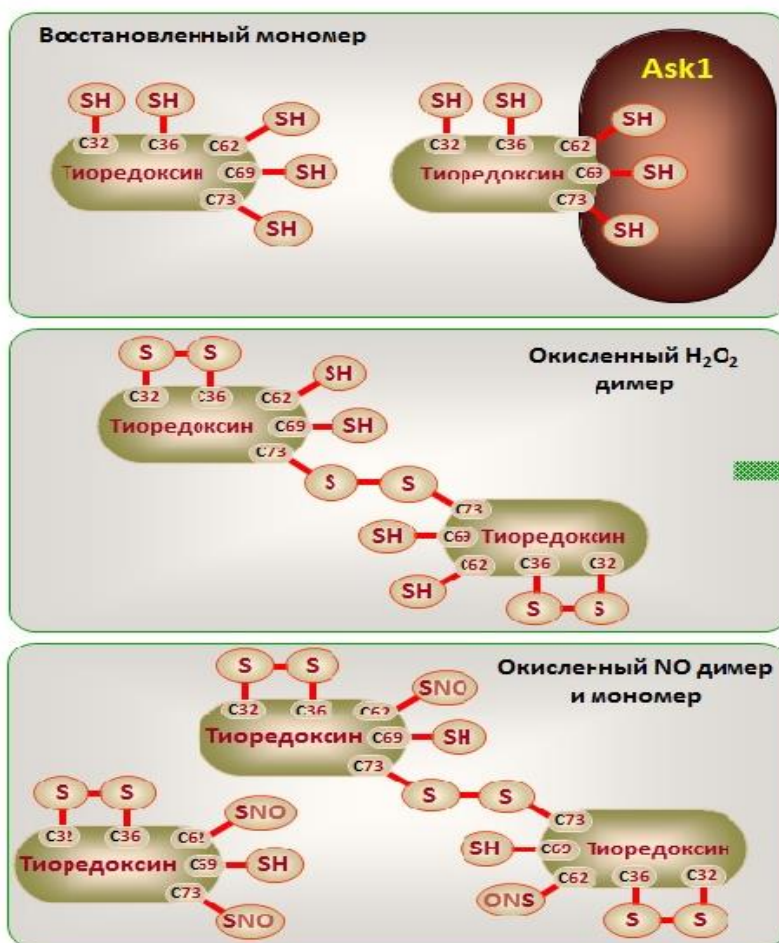


Рис. 9. Структурные переходы окисленных форм тиоредоксина-1.

Металлотионеины

Металлотионеины – еще один класс соединений, обеспечивающих эффективное ингибирование свободнорадикальных процессов. Они представляют собой семейство низкомолекулярных белков, характеризующихся необычно высоким содержанием остатков аминокислоты цистеин (до 30% от общего количества аминокислотных остатков) и способностью связывать ионы двухвалентных металлов. Например, связывая и выделяя ионы Zn^{2+} металлотионеины регулируют уровень данного катиона в биологических системах.

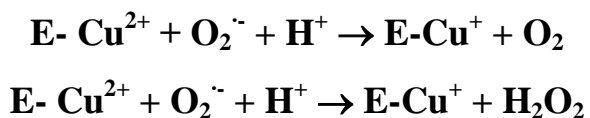
Сульфгидрильные группы металлотионеинов могут восстанавливать супероксидный, гидроксильный радикалы и другие прооксиданты. При этом антиоксидантная активность металлотионеинов оказалась существенно выше, чем у цистеина, N-ацетилцистеина и глутатиона. Окисление SH-групп остатков аминокислоты цистеин металлотионеинов в процессе восстановления прооксидантов сопровождается выделением связанных ранее данным полипептидом ионов цинка, обладающих способностью стимулировать экспрессию металлотионеинов. Этот самооптимизирующийся процесс - важный элемент антиоксидантной защиты организма.

XI. Ферментные системы антиоксидантной защиты

Супероксиддисмутаза

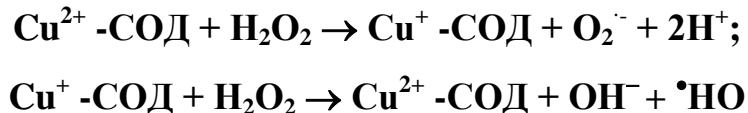
Супероксиддисмутаза (СОД) — важнейший элемент антирадикальной защиты, данный фермент обнаружен во всех аэробных организмах. В организме млекопитающих идентифицировано две изоформы СОД: Mn^{2+} -СОД (СОД2), локализованная в митохондриальном матриксе, и Cu^{2+}/Zn^{+} -СОД двух типов, находящейся либо внутри клеток (в цитозоле и межмембранном пространстве митохондрий) в виде димера (СОД1), либо во внеклеточной жидкости (СОД3) в виде тетрамера. СОД на три-четыре порядка ускоряет реакцию диспропорционирования $O_2^{\cdot -}$ (супероксидных анионов).

Реакция дисмутации с участием $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ -СОД осуществляется в две стадии, в ходе которых осуществляется перенос электронов с одного супероксидного анион-радикала на другой. В качестве промежуточного акцептора данного электрона служит атом меди.



Для представителей данного семейства ферментов характерна узкая субстратная специфичность, их действие направлено исключительно на полувосстановленную молекулу кислорода.

СОД может взаимодействовать также с пероксидом водорода и выступать в качестве прооксиданта, инициируя генерацию радикалов супероксида и гидроксила:



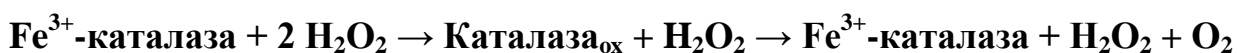
Неорганические перекиси ингибируют СОД путем необратимого восстановления ионов Cu^{2+} , представленных в составе активного центра. В свою очередь липидные перекиси способны обратимо ингибировать СОД. Эффективным ингибитором фермента является гидроперекись линоленовой кислоты, снижающая её активность в 3,5 раза.

Супероксиддисмутаза играет важную роль в защите клеток от повреждающего действия супероксидного анион-радикала и по праву считается главным ферментом внутриклеточной АОС. СОД не только стабилизирует клеточные мембраны, предотвращая процессы перекисного окисления липидов. Снижая уровень $\text{O}_2^{\cdot-}$, она защищает от его дезактивирующего действия каталазу и глутатионпероксидазу.

Регулирующее влияние на активность СОД оказывают SH-содержащие соединения: глутатион, цистеин и другие, а также опосредованно ферменты глутатионового обмена. Последние, наряду с каталазой и пероксидазами различной субстратной специфичности, обеспечивают детоксификацию пероксида водорода. Тем не менее, заметным недостатком данного ферментативного процесса является образование перекиси водорода, склонной к генерации высокореакционно гидроксильных радикалов, но восстанавливаемой до воды в основном каталазой и глутатионпероксидазой.

Каталаза

Каталаза – хромопротеин с молекулярной массой около 240 кДа, состоит из 4 субъединиц, имеющих по одной группе гема, локализуется в основном в пероксисомах, частично – в микросомах и в меньшей мере – в цитозоле. В пероксисомах, где концентрация перекиси водорода высока, каталаза активно разрушает ее. Разложение перекиси водорода каталазой осуществляется в два этапа:



В окисленном состоянии каталаза функционирует как пероксидаза, используя в качестве субстратов быть этанол, метанол, формиат, формальдегид и другие молекулы-доноры водорода. Примечательно, что около 0,5% кислорода (образующегося в результате разложения перекиси водорода) возникает в возбужденном (синглетном) состоянии. Именно так в процессе разложения перекиси водорода вновь генерируются АФК.

Каталаза в клетках, например в эритроцитах, представлена в функциональном комплексе с СОД, поэтому кооперативное действие данных антиоксидантных ферментов может быть предствлено в следующей реакции:



Представленный формат совместного действия СОД и каталазы формирует надежную защиту организма от токсического действия высоких концентраций супероксидного анион-радикала и перекиси водорода. В то же время осуществляется поддержание минимального (<50 μM) контролируемого уровня данных биомолекул, необходимых в физиологических условиях для осуществления многих клеточных процессов. В случае необходимости изменение активности одного из ферментов может резко изменить и уровень перекиси водорода. Так, например, при стимуляции фагоцитоза резко возрастает активность СОД, что приводит к образованию повышенных количеств перекиси водорода, используемой для создания самых мощных деструктивных факторов фагоцитоза – гидроксильного радикала и гипохлорит-иона.

Глутатионпероксидаза

Глутатионпероксидазы (ГПО) - важнейшие ферменты, обеспечивающие инактивацию активных форм кислорода путем разрушения как молекул H_2O_2 , так и гидропероксидов липидов. Данные ферменты катализируют восстановление пероксидов при участии трипептида – глутатиона (γ -глутамилцистеинилглицин) (Рис.10). Структурно ГПО является гомотетрамерным селенопротеином с молекулярной массой ~84 кДа, состоящим из 4 идентичных субъединиц, в составе активного центра представлен ион селена (в составе остатков селеноцистеина).

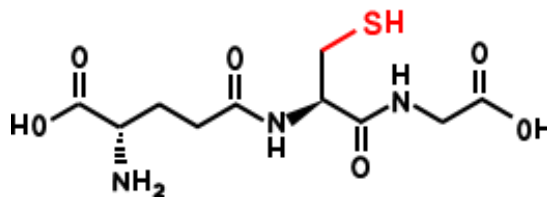
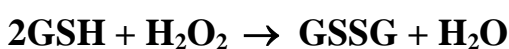


Рис.10. Структурная формула восстановленного глутатиона (GSH).

Сульфгидрильная группа восстановленного глутатиона (GSH) является донором электронов и, окисляясь, формирует дисульфидную связь, объединяющую 2 молекулы глутатиона, преобразующихся в окисленную форму (GSSG). Ген глутатионпероксидазы локализован в 3-й хромосоме. Глутатионпероксидаза катализирует реакции, в которых фермент восстанавливает пероксид водорода до воды, а также восстановление органических гидропероксидов (ROOH) до гидроксипроизводных, и в результате переходит в GSSG:



Молекулы GSSG восстанавливаются в ходе глутатионредуктазной реакции с участием NADPH (Рис.11).

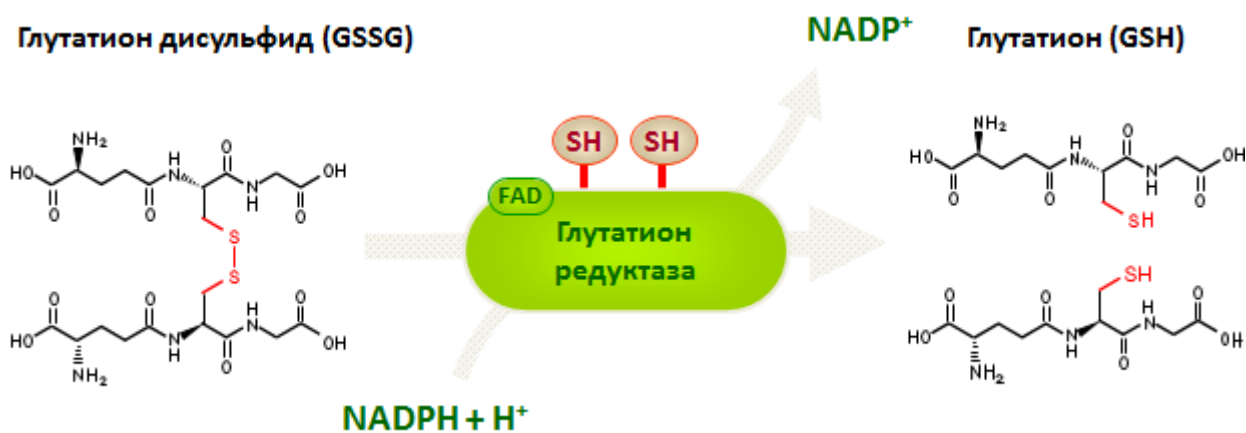


Рис. 11. Схема восстановления окисленной формы глутатиона.

ГПО способна обезвреживать не только H_2O_2 , но и различные липидные пероксиды, синтезирующиеся в организме при активации процессов ПОЛ. Например, гидропероксиды линолевой и линоленовой кислот, холестерин-7 β -гидропероксид и некоторые синтетические вещества (кумен-, трет-бутил-гидропероксиды). Глутатионпероксидаза защищает от окислительной атаки

белки, липиды, никотинамидные коферменты, восстанавливает липидные перекиси.

Помимо способности восстанавливать пероксид водорода и гидропероксиды жирных кислот, ГОП обеспечивает защиту аэробных организмов и от чрезвычайно токсичного пероксинитрита путем восстановления его до нитрит-аниона.

Фермент глутатионпероксидаза локализован в цитозоле в небольших количествах, а также в митохондриях. В тканях млекопитающих максимальная активность глутатионпероксидазы в печени, эритроцитах, надпочечниках. Активность фермента зависит от количества образованных пероксидов. Функционирует сопряженно с глутатионредуктазой (Рис.12).

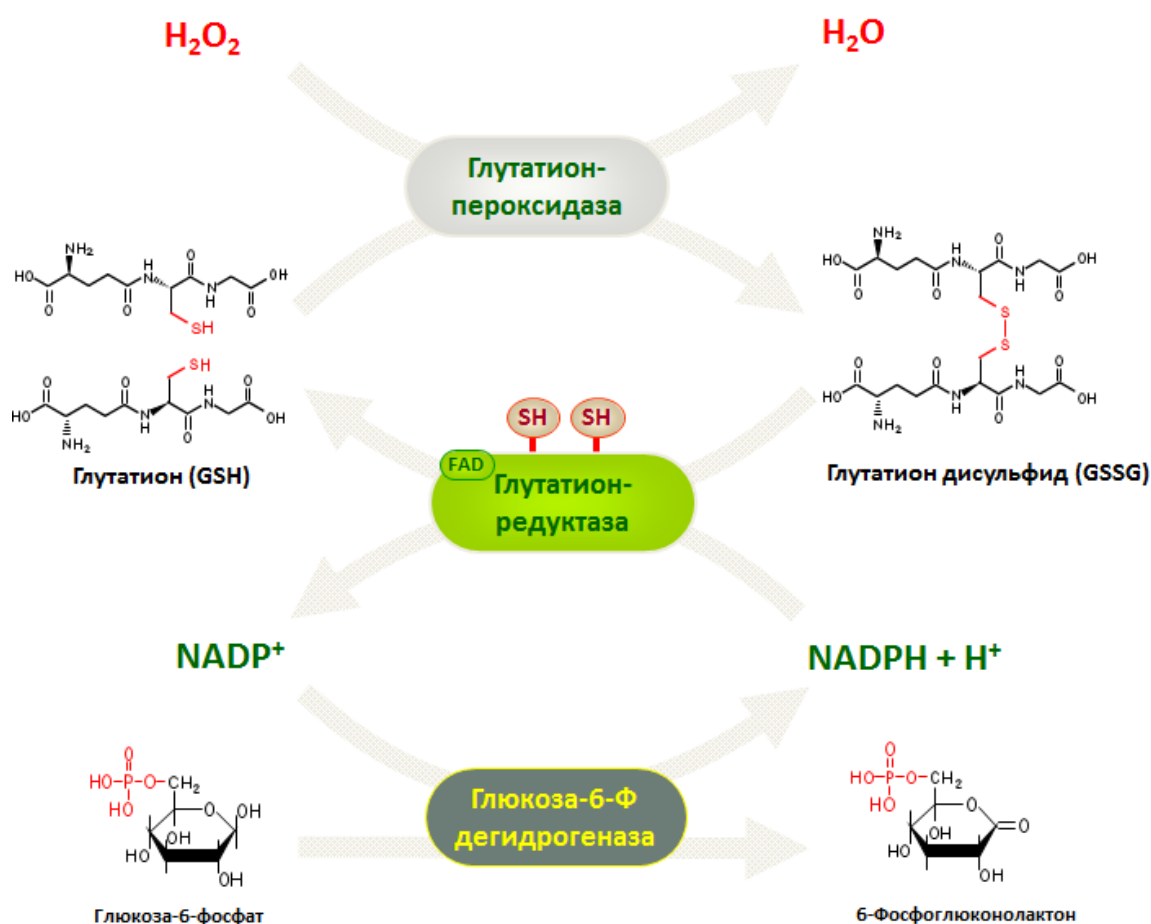


Рис.12. Схема механизма работы глутатион-редокс системы.

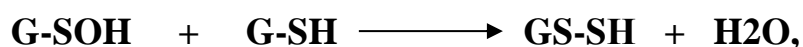
Глутатион-S-трансферазы.

Глутатион-S-трансферазы (GST) представляют собой целое суперсемейство мультифункциональных изоферментов, способствующих процессам детоксификации, базирующихся на различных механизмах, включающих: 1) каталитическую инактивацию различных типов ксенобиотиков путем конъюгации с GSH; 2) некаталитическое связывание определенных ксенобиотиков; 3) восстановление липид- и ДНК-гидропероксидов посредством увеличения активности GSH-пероксидазы. Кроме того, глутатион-S-трансферазы участвуют в изомеризации стероидов и простагландинов, участвуют в метаболизме других эндогенных веществ. В частности, GST могут вовлекаться в синтез лейкотриенов, поддерживая процесс воспаления.

В отличие от ГПО GST не способны к восстановлению молекул H_2O_2 , но подобно мономерной форме ГПО весьма эффективно восстанавливают гидропероксиацилы мембранных фосфолипидов. Также подобно тетрамерной форме ГПО восстанавливает свободные гидроперекиси полиненасыщенных жирных кислот, образовавшиеся в результате гидролиза окисленных фосфолипидов фосфолипазой A2. Восстановление гидроперекисей полиненасыщенных жирных кислот как свободных, так и находящихся в структуре мембранных фосфолипидов происходит по схеме:



Нестойкое сульфеновое производное глутатиона (G-SOH) способно взаимодействовать еще с одной молекулой глутатитона с образованием дисульфида окисленного глутатиона:



далее действуют молекулы ГПО.

Специфическая активность GST не оказывает конкурентного действия по отношению к ГПО. Предполагается, что в физиологических условиях, при низкой активности фосфолипазы A2, контроль уровня липопероксидов в клетке осуществляется посредством GST, что связано прежде всего со способностью восстанавливать мембранные фосфолипиды напрямую. При патологии, когда вследствие ацидоза и повышения уровня внутриклеточного Ca^{2+} активируется фосфолипаза A2, а также отщепляются свободные гидроперекиси полиненасыщенных жирных кислот, действует тетрамерная форма ГПО. Таким образом, глутатионзависимые антиоксидантные ферменты – ГПО и GST играют важную роль в репарации мембранных структур после их свободнорадикального повреждения. Кроме этого, установлено, что GST также способствует конъюгированию с G-SH токсичных конечных продуктов ПОЛ, что способствует их выведению из организма.

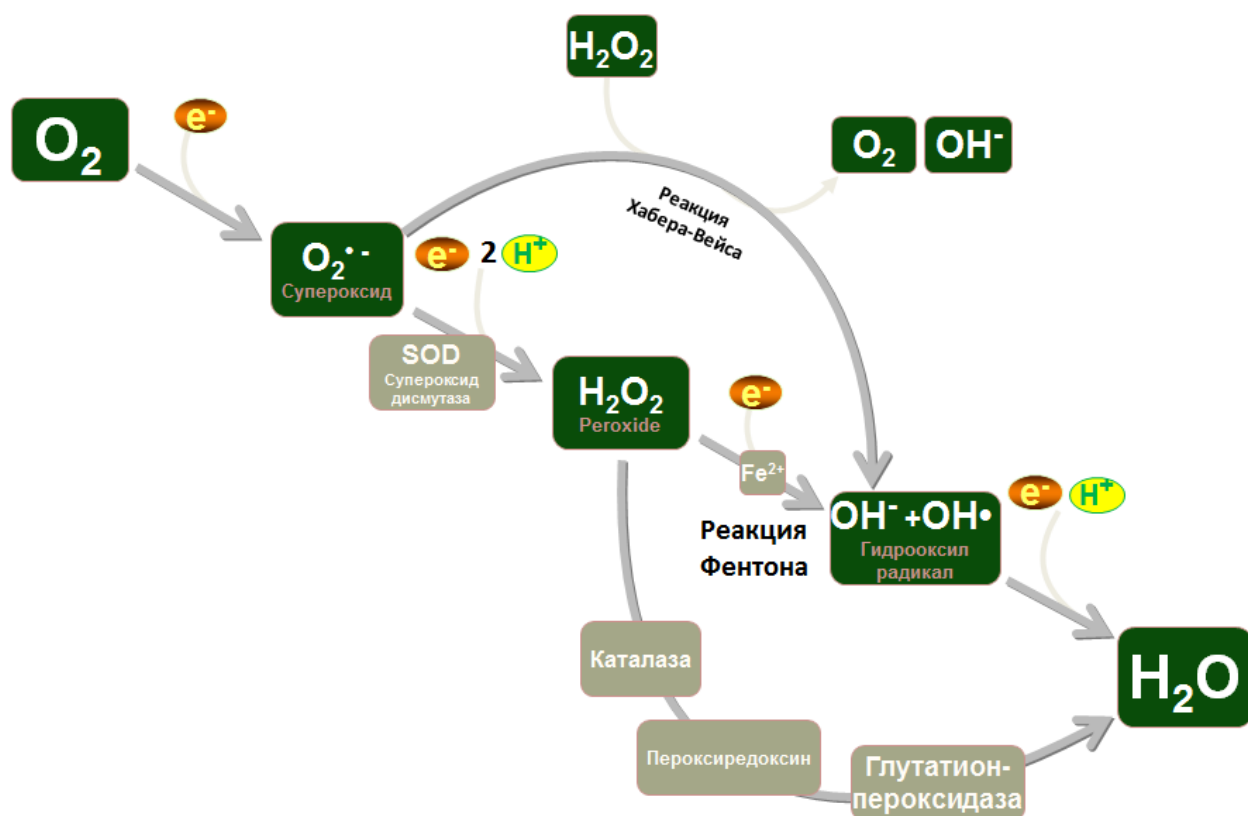
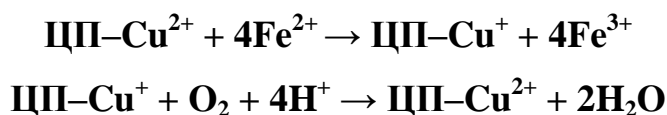


Рис.13. Схема работы ферментативной антиоксидантной системы при восстановлении кислорода до воды.

Церулоплазмин

Церулоплазмин — энзим плазмы крови гликопротеидной природы, прочно связывающий до шести атомов меди (Cu^{2+}), что обеспечивает секвестрирование до 95% ионов данного металла из их общего количества в крови. Церулоплазмин (часто обозначается как феррооксидаза) с высокой скоростью катализирует окисление ионов двухвалентного железа:



Ионы металлов переменной валентности способны эффективно катализировать продукцию прооксидантов, в частности гидроксильного радикала ($\cdot\text{OH}$). Для обеспечения адекватной антиоксидантной защиты организма чрезвычайно значимо удержание их уровня в биосредах в пределах безопасных концентраций и в окисленном состоянии.

Способствуя встраиванию в ферритин окисленного Fe^{3+} , ЦП ингибирует супероксидное и ферритин-зависимое перекисное окисление липидов. Описанные выше свойства ЦП послужили основой для объяснения его противовоспалительной активности, что вместе с быстрым возрастанием концентрации ЦП (в 2-3 раза) в русле крови уже в начале воспалительной реакции позволяет причислить его к белкам “острой фазы”.

Трансферрин

Трансферрин — гликопротеин плазмы крови, прочно, но обратимо связывающий катионы железа, обеспечивает транспорт данных ионов в организме млекопитающих. Полипептидная цепь молекулы трансферрина состоит обладает двумя сайтами связывания Fe^{3+} .

Синтезируется трансферрин, главным образом, в печени. Уровень экспрессии данного Fe^{3+} -связывающего белка определяется содержанием железа в биосредах организма — увеличивается при железодефицитных

состояниях и снижается при избытке данного металла переменной валентности. Насыщенный Fe^{3+} трансферрин может проникать путем эндоцитоза только в те клетки, на цитоплазматической мембране которых экспрессируется специфический трансферриновый рецептор (TFR-1).

Совместно с ЦП усиливает связывание ионов железа с трансферрином, а в случае их высокой концентрации в плазме крови - и с ферритином. Считается, что белки плазмы крови церулоплазмин и трансферрин совместно с тканевым ферритином формируют феррокинетическую систему, главную антиоксидантную систему, контролирующую процессы ПОЛ, индуцированные ионами двухвалентного железа. Действуя как ферроксидаза, церулоплазмин выполняет важнейшую роль в регуляции ионного состояния железа - окислении Fe^{2+} в Fe^{3+} . Это делает возможным включение железа в трансферрин без образования токсических продуктов железа.

Хелатные соединения, обладающие способностью связывать ионы металлов переменной валентности (ферритин, гемосидерин, трансферрины, церулоплазмин, молочная и мочевая кислота), являются важнейшей составной антиоксидантной системы организма, так как нейтрализуют основные катализаторы свободнорадикального окисления в организме.

Железо, высвободившееся из трансферрина, связывается специфическим белком ферритином, который доставляет железо в митохондрии, где оно включается в состав гема с участием феррохелатазы. Запасание железа в окисленной форме препятствует его вовлечению в окислительные процессы.

VIII. Свободнорадикальное окисление, фагоцитоз и воспаление

Под фагоцитозом понимают активное поглощение и разрушение клетками твердых частиц, чуждых для организма. Эти частицы могут быть любой природы: микроорганизмы и вирусы, иммунные комплексы антиген-антитело, простейшие или гельминты, твердые неорганические частицы, попадающие в наш организм в виде пыли и др. Фагоцитозу подвергаются и

отмершие клетки и части погибших клеток собственного организма. В любом случае киллерный механизм и последующий механизм деструкции неживых частиц универсален. Фагоциты способны проявлять как цитотоксическое, так и бактерицидное действие. Цитотоксическое действие реализуется экстрацеллюлярными факторами, в то время как бактерицидность обеспечивается, главным образом, внутриклеточными механизмами.

Фагоциты представляют собой клетки с выраженной способностью к фагоцитозу. Особо важное значение имеют полиморфноядерные нейтрофилы, что определяется их количеством и особенностями функции. Полиморфноядерные нейтрофилы представляют собой основной компонент лейкоцитов крови человека.

Моноциты периферической крови и, формирующиеся на их основе, тканевые макрофаги образуют, так называемую, «моноклеарно-фагоцитирующую систему – МНС». Основной структурной единицей МНС являются макрофаги – активно фагоцитирующие клетки, содержащие внутриклеточные ферменты для деструкции поглощенного материала и имеющие необходимый аппарат для выработки этих ферментов.

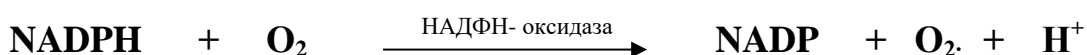
Взаимодействие твердых частиц с поверхностными рецепторами вызывает активацию фагоцитов, заключающуюся в повышении проницаемости цитоплазматической мембраны и перестройке клеточного метаболизма, *опосредованной повышением внутриклеточной концентрации ионов кальция, активированием аденилатциклазы и протеинкиназы С*. В активированных фагоцитах значительно усиливается окисление глюкозы по гексозо-монофосфатному пути (пентозный цикл) и резко (в десятки раз) усиливается потребление кислорода. Последнее обстоятельство, а также внезапность и скорость, с которой возникают и развиваются эти реакции, послужили основанием для того, чтобы назвать это явление «*респираторным*» или «*дыхательным*» взрывом. Это действительно напоминает взрыв, ибо потребление кислорода возрастает уже в первые секунды после стимуляции фагоцита. Следует отметить, что утилизация

кислорода не связана с процессами митохондриального окисления, так как не ингибируется цианидами, и направлена, главным образом, на образование активных форм кислорода.

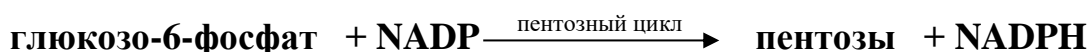
Респираторный взрыв – одно из универсальных проявлений реактивности фагоцитирующих клеток. Основным механизмом сводится к активации фагоцитов в результате контакта плазматической мембраны с фагоцитируемым объектом, что стимулирует активность цитоплазматического ферментного комплекса NADPH-оксидазы, который катализирует перенос электронов с NADPH на молекулярный кислород с образованием супероксидного анионрадикала. NADPH-оксидаза представляет собой мультикомпонентную систему, состоящую из мембраносвязанных и цитозольных компонентов (FAD, цитохром b_{558} , убихинон). Фермент локализован на мембране таким образом, что NADPH-связывающий центр направлен внутрь клетки, а супероксиданион-связывающий центр расположен на внешней стороне мембраны. В результате молекулярный кислород восстанавливается на внутренней поверхности мембраны, а супероксидный анионрадикал продуцируется либо в среду окружающую фагоцит, либо, если плазматическая мембрана образует фагосому, внутрь фагосомы, содержащей фагоцитированный материал (микроорганизмы). Убыль NADPH по механизму обратной связи стимулирует пентозный цикл (гексозо-монофосфатный путь) окисления глюкозы, восполняющий фонд НАДФН.

Таким образом, биохимическую основу «респираторного» взрыва составляют два сопряженных механизма:

1) окисление НАДФН с образованием супероксидного анионрадикала:



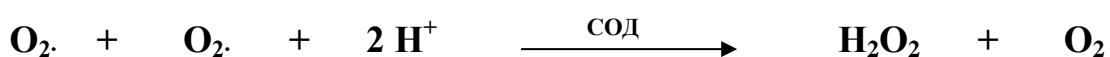
2) восстановление НАДФ в реакциях пентофосфатного цикла:



В настоящее время доказано, что стимуляция рецепторов фагоцитов приводит к мобилизации связанного с мембранами Ca^{2+} и увеличением его концентрации в цитоплазме. Мобилизация внутриклеточного кальция является ведущим механизмом в активации NADPH-оксидазы. Одновременно с мобилизацией внутриклеточного кальция при стимуляции рецепторов происходит включение системы транспорта ионов кальция, расположенной в плазматической мембране.

Важнейшую роль в развитии дыхательного взрыва играет активация *протеинкиназы С*. Протеинкиназа С может активироваться высокими концентрациями ионов кальция (в отсутствие диацилглицерина), либо - диацилглицерином в присутствии небольших количеств ионов кальция. Протеинкиназа С осуществляет фосфорилирование мембранных белков, что приводит к их активированию, в частности, это относится к NADPH-оксидазе.

Как в среде, окружающей фагоцит, так и внутри фагосомы дальнейшее превращение супероксида, примерно, одинаковое. Супероксиданионы дисмутируют с образованием перекиси водорода, дисмутации способствует снижение pH (закисление среды) в очаге воспаления:

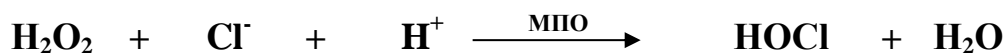


Перекись водорода под влиянием ионов двухвалентного железа (донор электронов) распадается с образованием гидроксильного радикала ($\text{HO}\cdot$) – самой агрессивной из всех активных форм кислорода. Гидроксильный радикал инициирует перекисное окисление липидов бактериальной стенки, обеспечивая тем самым, один из механизмов бактерицидности, в деструктивный процесс вовлекаются не только липиды, но и белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды.

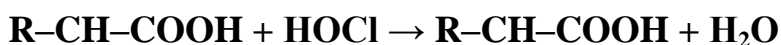
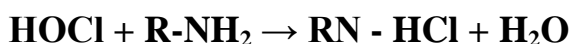
Перекись водорода используется также для образования высокотоксичных гипогалоидов. Эта реакция катализируется,

содержащимися в фагоцитирующих клетках, миелопероксидазой (МПО) и пероксидазой эозинофилов (ЭПО), которые различаются по структуре и субстратной специфичности. Так, основным продуктом МПО является HOCl , в то время как ЭПО катализирует преимущественно образование HOBr , HOI , HOSCN .

МПО представляет собой сложный гемопротейн, содержащий две ковалентно связанные железосодержащие простетические группы. Очищенная МПО имеет интенсивный зеленый цвет. Характерный для гнойных выделений зеленоватый оттенок обусловлен, содержащейся в них, МПО. Первичным продуктом окисления миелопероксидазной системой хлоридов является HOCl - гипохлорная (хлорноватистая) кислота:



Гипогалоиды представляют собой мощные токсины, обладающие чрезвычайной реакционной способностью в химическом отношении, галогенируя объект либо окисляя его. При взаимодействии с гипогалоидами, в первую очередь, окисляются сульфгидрильные и тиоэфирные группы белков. Гипохлорит может взаимодействовать с биологическими аминами, аминокислотами и белками, продуцируя хлорамины:



Хлорированию подвергаются как свободные аминокислоты, так и аминокислоты, входящие в структуру белковых молекул, с последующим расщеплением, декарбоксилированием и дезаминированием.

Система МПО, H_2O_2 , Cl^- хлорирует и пептидные связи в белковых молекулах. Этим объясняются детоксицирующий и бактерицидный эффекты.

Известно, что хлорная известь и хлорамины издавна используются в качестве дезинфицирующих средств.

Активированные макрофаги и другие фагоцитирующие клетки продуцируют также и оксид азота – NO·. Оксид азота обладает антимикробной, противовирусной, противопаразитарной и противоопухолевой активностью. При взаимодействии с супероксидным антионрадикалом образуется пероксинитрит, также обладающий высокой токсичностью:



Бактерицидному действию способствует лизоцим, который разрушает полисахариды бактериальной стенки, обеспечивая АФК (гидроксильный радикал, гипохлорит-ион) более свободный доступ к белковым структурам.

В результате деструкции белков и липидов как самих бактерий, так и тканей окружающих очаг воспаления, образуются продукты, обладающие антигенной и хемоатрактантной способностью. Эти вещества, в свою очередь, активируют фагоциты и усиливают их миграцию в очаг воспаления.

Установлено, что НАДФН-оксидазная активность усиливается лишь в результате контакта с плазматической мембраной, после поглощения и разрушения фагоцитированного объекта, стимулирующий эффект исчезает.

Следует отметить, что в случае незавершенного фагоцитоза, который характеризуется сохранением жизнеспособности объекта внутри фагосомы, повышенная продукция активных форм кислорода продолжается, что представляет реальную опасность как для самого фагоцита, так и для окружающих его клеток и тканей, так как АФК диффундируют в окружающую среду, следствием этого может быть некроз тканей в очаге воспаления с образованием полостей.

Таким образом, пока существует и действует чужеродный фактор, миграция и активация фагоцитов будет постоянно возрастать. Исходом может быть либо уничтожение этого чужеродного фактора, либо гибель организма вследствие подавления или истощения защитных сил. Сложность тактики врача заключается в том, чтобы коррегировать воспалительный

процесс таким образом, чтобы ограничить некроз окружающих тканей и в то же время сохранить свободнорадикальную активность на уровне, достаточном для быстрого и полного уничтожения бактерий или других факторов, вызывающих воспалительный процесс.

IX. Дополнительный материал

Окислительный стресс и апоптоз

Несомненно, что активные формы кислорода и окислительные реакции с их участием в той или иной степени участвуют в процессе апоптоза. Предполагается, что в результате апоптоза выбраковываются клетки с аномально высоким уровнем продукции АФК. Вместе с тем вопрос участия АФК в процессе апоптоза нельзя считать решенным, так как показано, что в некоторых случаях процесс протекает даже в анаэробных условиях, для которых характерно существенное снижение продукции АФК. Казалось бы, этот факт может служить прямым доказательством дополняющей (вторичной) роли окислительного стресса в индукции апоптоза. Однако нефизиологичность условий культивирования аэробных клеток в бескислородных условиях не позволяет принять данный факт за безусловный. Окислительный стресс возникает тогда, когда увеличивается продукция АФК - как вследствие активации АФК- продуцирующих систем, так и в результате снижения способности клетки к их нейтрализации в условиях действия неблагоприятных факторов и при патологиях, то есть когда нарушается работа антиоксидантной системы.

Апоптоз играет существенную роль во многих патологиях человека. У людей с генетическими дефектами NADPH-оксидазы наблюдается пониженная способность нейтрофилов к запрограммированной гибели, что служит причиной незавершенности воспалительного процесса и формирования хронических гранулем.

Особое внимание в последние годы уделяется изучению роли АФК в развитии апоптоза. Это связано с тем, что высокорекреационные АФК

образуются во всех аэробных клетках. Индуцированный глюкокортикоидами апоптоз тимоцитов значительно снижается в условиях гипоксии (при содержании кислорода в атмосфере менее 5%). Прямое действие H_2O_2 , NO, пероксинитрита (ONOO⁻), а также радиации, ультрафиолетового излучения, токсичных лекарственных препаратов, индуцирующих образование АФК, вызывает апоптоз. При разных формах индуцированного апоптоза наблюдается снижение активности элементов антиоксидантной защиты клеток. Клетки, имеющие дефекты антиоксидантной защиты, наиболее чувствительны к воздействиям, вызывающим их запрограммированную гибель. Кроме того, в многочисленных исследованиях показан защитный эффект антиоксидантов в этом процессе. Несмотря на очевидную взаимосвязь окислительного стресса с апоптозом, роль конкретных форм АФК в саморазрушении клеток и механизмы реализации цитотоксичности неясны. Более того, нет однозначного ответа на вопрос, чем является окислительный стресс, - следствием или индуктором функциональных изменений, сопровождающих развитие запрограммированной гибели клеток.

Гибель инсулинпродуцирующих β -клеток поджелудочной железы при сахарном диабете, уменьшение популяции Т-хелперных лимфоцитов при СПИДе, гибель макрофагов, фибробластов и гладкомышечных клеток в области атеросклеротической бляшки, клеток синовиальной полости при ревматоидном артрите, нейронов при некоторых нейродегенеративных патологиях происходят посредством апоптоза. Множественность физиологических и патологических проявлений апоптоза и универсальность его развития в разных клетках и тканях послужила причиной разворачивания широкого фронта исследований, направленных на изучение молекулярных механизмов развития запрограммированной гибели клеток.

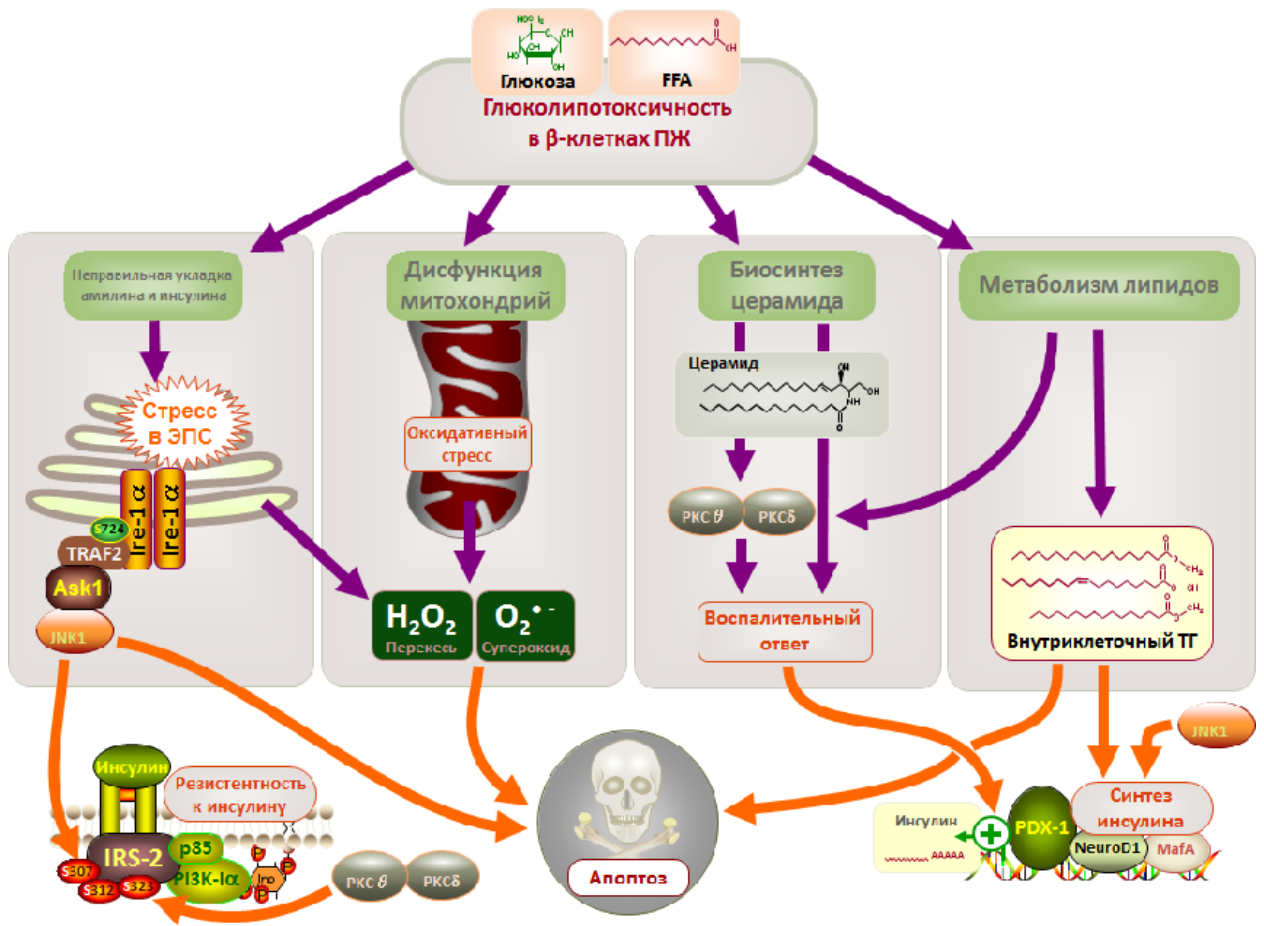


Рис 14. Процесс развития апоптоза в β -клетках поджелудочной железы.

Окислительный стресс и канцерогенез

Организм человека подвергается воздействию множества повреждающих внутренних и внешних агентов, что приводит к повреждениям ДНК клетки (10,000-100,000 в течение одного дня). Эти повреждения блокируют процессы репликации и транскрипции ДНК, что ведёт к появлению мутаций и возможному развитию карциогенеза. Система репарации детектирует повреждения в ДНК и способствует её восстановлению. Дефекты в репарационных системах ДНК чаще всего наблюдаются при развитии рака.

Канцерогенез – это возникновение и развитие злокачественной опухоли из нормальной клетки. Одним из механизмов его развития может являться окисление молекул ДНК.

Окислительный стресс играет ключевую роль в формировании большого количества близкорасположенных повреждённых участков ДНК, что является критическим фактором развития канцерогенеза.

Как было сказано выше, окисление является неотъемлемой частью процесса генерации энергии в митохондриях, компонентом воспалительного процесса и системы клеточной защиты в целом. В процессе острого воспаления активное участие принимают лейкоциты, которые способны вызывать серьёзные повреждения ДНК путём секреции многочисленных медиаторов воспаления и продукции некоторых АФК (включая гидроксил радикал, супероксид-ион). Гидроксильный радикал, реагируя с молекулами ДНК, приводит к повреждению гетероциклических оснований, сахарных остатков и модификации молекулы ДНК.

Воспаление является одним из ключевых аспектов развития процесса канцерогенеза. Хроническое воспаление способствует росту кровеносных сосудов и ремоделированию внеклеточного матрикса, тем самым создавая идеальную среду, где нормальная клетка с возникшей мутацией может переродиться в злокачественную. Кроме этого, нейтрофилы и макрофаги благодаря своей мембранной плазматической NADP-оксидазе продуцируют большое количество АФК в процессе развития воспаления. Интенсификация окислительного стресса приводит к всплеску продукции АФК. Радикалы могут легко связываться с белками, липидами и молекулами ДНК. АФК высвобожденные повреждёнными клетками могут сами индуцировать воспаление и запустить производство провоспалительных цитокинов. Также АФК играют важную роль в активации онкогенов.

Хроническое воспаление вызываемые бактериальной и вирусной инфекцией и связанный с ними окислительный стресс являются причиной развития рака желудка и гепатоцеллюлярной карциномы соответственно. Также оксидативное повреждение ДНК и воспаление участвуют в развитии рака лёгких, печени и молочной железы.

Свободные радикалы при ишемии-реперфузии повреждения миокарда.

Ишемия миокарда возникает, если потребность миокарда в кислороде превышает его поступление. Повреждение клеток миокарда, индуцированное циклами ишемии и реперфузии может быть связано, в частности, с образованием токсичных АФК, таких как супероксид-радикал, перекись водорода и гидроксильные радикалы.

Центральным местом в патофизиологии ишемических поражений является вопрос истощения энергии. Недостаток энергии сам по себе не может объяснить функциональные нарушения, происходящие во время фазы реперфузии. В настоящее время обращают внимание на следующие особенности ишемического и постишемического сердца: развитие ацидоза, образование отека, нарушение обмена кальция, образование свободных радикалов и окиси азота. Быстрое уменьшение содержания кислорода в ишемических тканях вызывает переход от окислительного к анаэробному метаболизму. Истощение энергии играет принципиальное значение в генезисе последующих событий. В результате накопления лактата и ионов водорода нарушаются кислотно-щелочное состояние и энергетически зависимые процессы: мембранные ионные градиенты, селективные и неселективные ионные каналы и ионное равновесие. В результате «анаэробной деполяризации» K^+ выходят из клетки, $NaCl$ и Ca^{2+} входят в клетку. Клеточное накопление ионов приводит к формированию цитотоксического отека. Внутриклеточный избыток ионов Ca^{2+} может запускать каскад событий, которые приводят к образованию АФК. Повышенная концентрация кальция активирует протеазы, которые могут трансформировать ксантин дегидрогеназу. В процессе реоксигенации ксантиноксидаза может использовать O_2 в качестве акцептора электронов, что приводит к образованию супероксид-аниона ($O_2^{\cdot-}$) и перекиси водорода (H_2O_2), которые могут вступать в реакцию с образованием гидроксильных радикалов (OH^{\cdot}), что приводит к повреждению тканей. Свободные радикалы кислорода, образованные ксантиноксидазой, играют важную роль в повреж-

дении тканей при ишемии/реперфузии. Тем не менее, ксантинооксидаза не может быть единственным источником свободных радикалов кислорода во время реперфузии. Активация комплемента протеазами наряду с другими механизмами приводит к активации нейтрофилов с их последующим восполнением в тканях после реперфузии. Истощение нейтрофилов или предотвращение их адгезии на эндотелии является первым этапом их восстановления, а также защитным механизмом при ишемии/реперфузии. Предполагают, что они способны являться важными источниками АФК. При повреждении ткани миокарда могут освобождаться ионы железа, которые могут стимулировать свободнорадикальные реакции.

Еще одним источником свободных радикалов кислорода является митохондриальная цепь переноса электронов. Свободные радикалы, образованные в митохондриях, могут также вызывать точечные мутации, нарушение структуры ДНК митохондриальных генов. Повреждение митохондриального генома в результате нарушения дыхания может приводить к увеличенному образованию радикалов кислорода. Нарушение функции митохондрий и увеличение образования супероксида часто сопровождают процессы, связанные с реперфузией.

Увеличение образования АФК после гипоксии/реоксигенации, к сожалению, связано с низкой антиоксидантной активностью ткани миокарда. То есть в миоцитах, так же как и в эндотелиальных клетках, очень низкая концентрация каталазы, которая локализуется в пероксисомах.

Каскад событий, связанных с ишемией/реперфузией, кроме образования свободных радикалов, включает в себя освобождение цитокинов и факторов роста, адгезию лейкоцитов, агрегацию тромбоцитов, пролиферацию гладкой мускулатуры и механические повреждения.

Вопросы для самоконтроля

1. Свободный радикал это -

- А. аминокислотный остаток в составе молекулы белка, не участвующий в образовании дисульфидных связей
- В. молекула или её часть, имеющая неспаренный электрон на внешней атомной или молекулярной орбите
- С. остаток ненасыщенной жирной кислоты в составе фосфолипида мембраны

2. Реакцией образования активных форм кислорода в реакции Фентона является:

- А. $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{HO}^\bullet + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+}$
- В. $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2^{\cdot -} \xrightarrow{\text{Fe}^{2+}} \text{HO}^\bullet + \text{OH}^- + \text{O}_2$
- С. $\text{HO}_2^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$

3. В реакциях перекисного окисления липидов участвуют:

- А. ненасыщенные высшие жирные кислоты в составе фосфолипидов мембран
- В. гидроксильный радикал
- С. NADPH-оксидаза
- Д. Супероксиддисмутаза
- Е. Аскорбиновая кислота

4. К активным формам кислорода относятся все, кроме:

- А. оксигенированный гемоглобин
- В. супероксиданионрадикал
- С. пероксид водорода
- Д. гипохлорит-ион
- Е. гидроксильный радикал

5. Какова роль коэнзима Q10, компонента цепи митохондриального окисления, в процессе развития оксидативного стресса:

А. является необходимым звеном для передачи электронов с комплексов I и II на комплекс III дыхательной цепи

В. катализирует реакцию нейтрализации свободных радикалов восстановленной формой QH₂

С. при затруднении передачи электронов по дыхательной цепи становятся основными генераторами супероксид-радикалов

6. К антиоксидантным ферментам относятся:

А. ксантинооксидаза

В. каталаза

С. супероксиддисмутаза

Д. NADPH-оксидаза

Е. глутатионпероксидаза

7. Какое соединение разлагается под действием СОД:

А. гидропероксид жирной кислоты

В. пероксид водорода

С. перекисный радикал

Д. супероксид-ион

8. К ферментативной антиоксидантной системе относятся:

А. супероксиддисмутаза

В. каталаза

С. глутатионпероксидаза

Д. глутатионредуктаза,

Е. глутатион-S-трансфераза

Ф. NADPH-оксидаза

9. Оксид азота:

- A. синтезируется в организме человека при участии ферментов
- B. участвует в регуляции сосудистого тонуса
- C. обладает цитотоксической и микробицидной активностью
- D. образуется в цепи переноса электронов

10. Перечислите этапы перекисного окисления липидов.

- A. инициация цепи
- B. разрушение структуры липидов
- C. обратное развитие процесса перекисного окисления
- D. развитие цепных реакций
- E. обрыв цепи

11. Перечислите механизмы повреждающего действия перекисного окисления липидов.

- A. образование межмолекулярных сшивок
- B. образование внутримолекулярных сшивок
- C. образование оксикислот
- D. повышение проницаемости мембраны

12. Назовите основные продукты перекисного окисления липидов:

- A. токоферол
- B. малоновый диальдегид
- C. пероксиды жирных кислот
- D. пероксид водорода
- E. супероксид-анион

13. Основными ферментами при фагоцитозе являются:

- A. NADPH-оксидазы

В. глутатион-S-трансферазы

С. каталазы

Д. ксантинооксидазы

14. Субстратом глутатионпероксидазы является:

А. гидропероксиды жирных кислот

В. гидроксильный радикал

С. глутаминовая кислота

Д. пероксид водорода

15. После гипоксии свободно-радикальное повреждение может усиливаться вследствие:

А. одноэлектронного восстановления кислорода избытком восстановленных эквивалентов

В. повышения активности антиоксидантных ферментов

С. понижения активности миелопероксидазы

Д. респираторного «взрыва» при нейтрофильной инфильтрации некротизированных участков

16. Виды повреждения ДНК при воздействии свободных радикалов:

А. образование окисленных производных пуриновых и пиримидиновых оснований

В. возникновение хромосомных aberrаций

С. активация эндонуклеаз

Д. увеличение скорости репарации молекул ДНК

Литература

1. Биохимия: Учебник для вузов под редакцией Е.С. Северина., 2003. 779 с.
2. Болдырев А.А., Кяйвярайнен Е.И., Илюха В.А. Биомембранология – Петрозаводск: Издательство Кар НЦ РАН, 2006.– 226 с.
3. Большой практикум: Учебно-методическое пособие по самостоятельной работе. Раздел «Свободнорадикальные процессы в биологических системах» /сост. Н. М. Титова, Т. Н. Субботина. Красноярск: Сиб. федер. ун-т, 2012.–20 с.
4. Владимиров Ю.А. Активные формы кислорода и азота: значение для диагностики, профилактики и терапии //Биохимия. 2004. Т. 69. Вып. 1. С. 5-7.
5. Владимиров, Ю. А. Свободные радикалы в биологических системах.// Соросовский образовательный журнал. – 2000. – Том 6, № 12. С. 13-19.
6. Горячковский А.И. Справочное пособие по клинической биохимии. - Одесса: ОКФА, 1994.- 415 с.
7. Зентов Н.К. Окислительный стресс. Биохимические и патофизиологические аспекты /Н.К. Зентов, В.З. Ланкин, Е.Б. Меньщикова. М: Наука. – 2001. – 340 с.
8. Костюк В.А., Потапович А.И. Биорадикалы и биоантиоксиданты. – Мн.: БГУ, 2004. – 179 с.
9. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К. и др. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. - М.: Фирма «Слово», 2006. – 556
10. Оценка структурно-функционального состояния клетки: метод. указания к практическим занятиям /сост.: Н.М. Титова, Т.Н. Замай, Т.Н. Субботина, А.А. Савченко. – Красноярск: ИПК СФУ, 2009. – 60 с.
11. Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э., Хилл Р., Леман И. Основы биохимии: в 3 томах. Т.2. — М., Мир - 1981. — 617 с.

Учебно-методическое пособие

Карбышев Михаил Сергеевич
Абдуллаев Шерзод Пардабоевич

под общей редакцией
д.м.н., проф. Шестопалова Александра Вячеславовича

Учебно-методическое пособие

Сведения об издательстве
Сведения о типографии, формате и дате издания,
тираже и количестве печатных листов