
ТИМИН ОЛЕГ АЛЕКСЕЕВИЧ

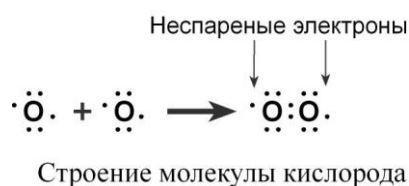
**СВОБОДНО-РАДИКАЛЬНОЕ
ОКИСЛЕНИЕ**

2018

Эволюционный переход клеток от анаэробного метаболизма к аэробному позволил клетке перейти на более эффективный метаболизм, получать гораздо больше энергии и повысить ее возможности. Однако такая выгода оказалась "тройным конем", так как кислород окисляет не только источники энергии, но и многие другие молекулы и жизненно важные клеточные структуры. Эти проблемы связаны с особенностями строения молекулы кислорода.

КИСЛОРОД И ЕГО АКТИВНЫЕ ФОРМЫ

Порядковый номер кислорода в таблице Менделеева – 8, заряд ядра – +8, общее число электронов – 8, электронная формула кислорода – $1s^2 2s^2 2p^4$. На 2p-подуровне атома имеются два неспаренных электрона, обычное для кислорода окислительное число равно -2.

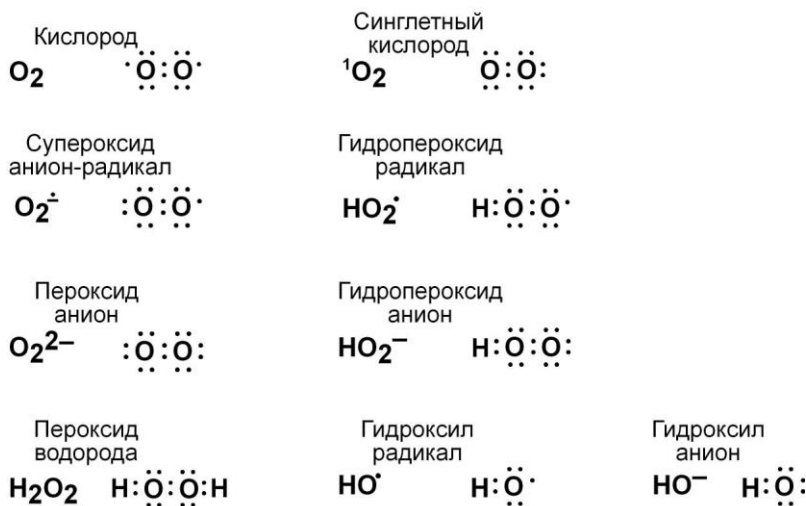


Кислород в своем обычном состоянии отличается от других газообразных элементов тем, что имеет два неспаренных электрона, т.е. является **бирадикалом**. В целом, общие механизмы восстановления кислорода в биохимических реакциях происходят с участием только одного электрона, а кислород является довольно стабильной молекулой, обладающей свойством сильного окислителя.

Упомянутые неспаренные электроны обладают параллельными спинами. Это, в соответствии с принципом Паули, выдвигает условие, что с кислородом могут взаимодействовать только такие двухвалентные восстановители, которые имеют два неспаренных электрона с параллельными спинами, но спины приносимых электронов должны быть противоположны имеющимся в кислороде.

ВИДЫ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА

В процессе реакций восстановления кислорода возникает ряд промежуточных метаболитов, которые называются **активными формами кислорода (АФК)**. Они являются нестабильными молекулами и весьма реакционноспособными соединениями.



Строение и обозначения активных форм кислорода



Производные органических молекул

Кроме активных форм кислорода в клетках могут образовываться активные формы азота и хлора – **оксид азота** и пероксинитрит, **гипохлорная кислота** и гипохлорит.



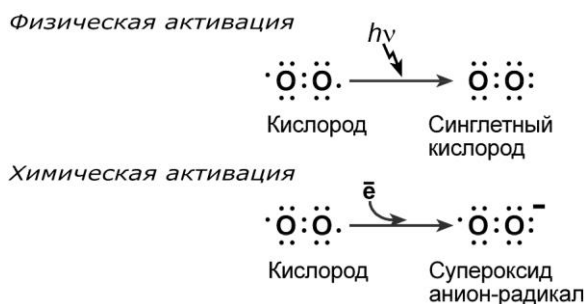
АКТИВАЦИЯ КИСЛОРОДА

Активация кислорода происходит по двум различным механизмам:

1. **Поглощение** молекулой O_2 достаточного количества **энергии**, чтобы изменить спин одного из неспаренных электронов.

Когда кислород находится в основном, **триплетном** состоянии, его электроны имеют параллельные спины. Если триплет кислорода поглощает энергию, достаточную для изменения спина одного из своих неспаренных электронов, он превращается в **синглетную** форму, в которой оба электрона имеют противоположные спины.

Синглетный кислород может уже участвовать в реакциях с одновременной передачей двух электронов. Поскольку спаренные электроны распространены в органических молекулах, синглетный кислород гораздо более реакционноспособен, чем его триплетный аналог.



Способы активации кислорода

2. Одноэлектронное восстановление кислорода

В реакциях восстановления молекулы кислорода промежуточными метаболитами являются **свободные кислородные радикалы**. В конце восстановительного пути кислород превращается в воду.

Свободные радикалы – это молекулы с неспаренными электронами, находящимися на внешней оболочке атома или молекулы, обладающие очень высокой реакционной способностью и, как следствие, выраженным повреждающим действием на клеточные структуры.

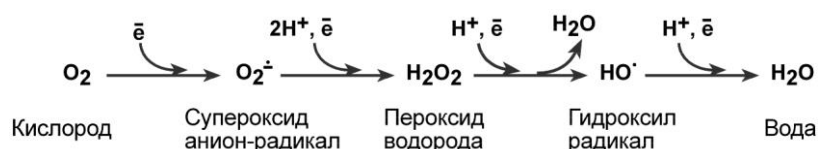


Схема реакций восстановления кислорода до воды

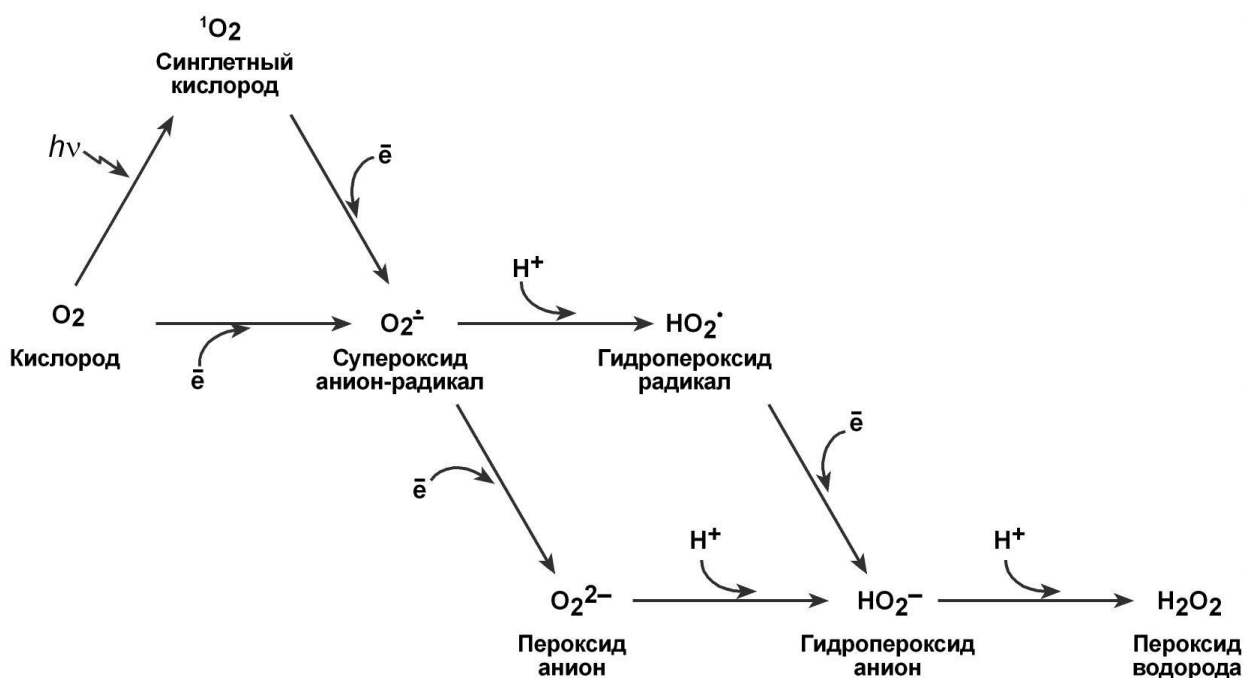
Реакции одноэлектронного восстановления кислорода

Процесс сводится к поочередному присоединению электронов и протонов к молекуле кислорода. Часть промежуточных метаболитов процесса имеют неспаренный электрон и являются свободными радикалами.

Добавление первого электрона к кислороду приводит к образованию **супероксид анион-радикала**. Его образование происходит с поглощением энергии (**эндотермически**), все остальные реакции являются **экзотермическими**. Супероксид анион-радикал в клетке может выступать в качестве **окислителя** (забирает электрон) или **восстановителя** (отдает электроны).

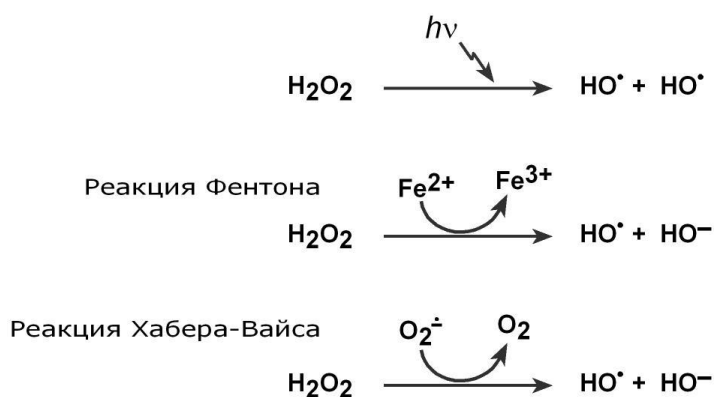
Во второй реакции восстановления происходит присоединение либо иона H^+ с появлением **гидропероксид радикала**, либо электрона с образованием **пероксид аниона**. Дальнейшее восстановление происходит путем присоединения либо электрона, либо иона H^+ и приводит к формированию **гидропероксид аниона**, который далее восстанавливается до **пероксида водорода** H_2O_2 .

Пероксид водорода – это не свободный радикал, все его электроны спарены, но в то же время он является **непрочным** соединением. Ковалентная связь между атомами кислорода может разрываться при воздействии ионизирующего или ультрафиолетового **излучения**, при спонтанном восстановлении **донорами** электронов (ионы Fe^{2+} , супероксид анион-радикал).



Образование активных форм кислорода

При восстановлении пероксида водорода образуется **гидроксил радикал**, обладающий высокой энергией и способный атаковать множество соединений, включая органические (белки, жирные кислоты, нуклеиновые кислоты). Однако из-за малой продолжительности жизни он оказывает свое воздействие только в месте возникновения.



Реакции образования гидроксил радикала

ОБРАЗОВАНИЕ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА

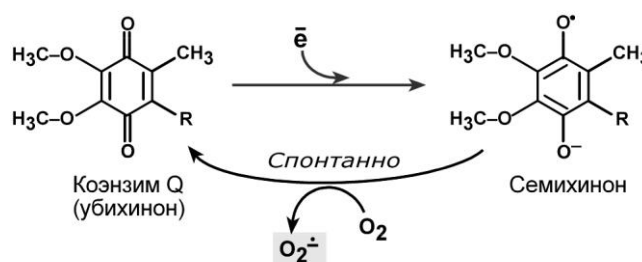
Строение молекулы кислорода позволяет поочередно присоединять ионы водорода или электроны от веществ, также несущих неспаренные электроны.

Присоединение электронов может происходить ферментативным способом или без участия ферментов, под воздействием химических или физических стимулов.

НЕФЕРМЕНТАТИВНОЕ ОБРАЗОВАНИЕ АФК

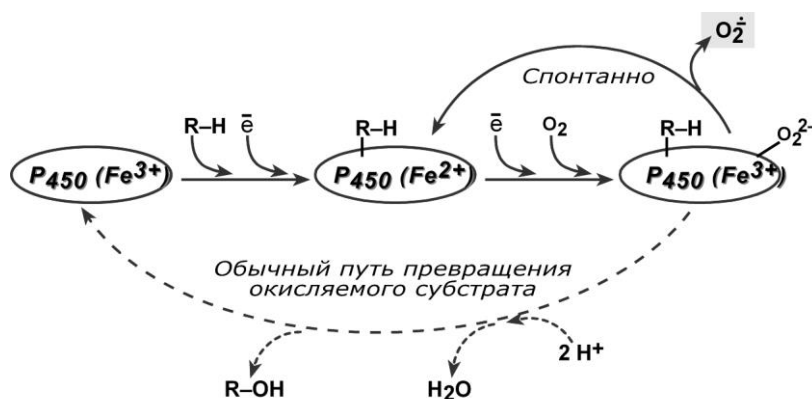
В организме основным источником АФК являются ферментативные реакции, но в ряде случаев свободные радикалы образуются случайно, как продукт "утечки" отдельных электронов.

1. **Основным** источником активных форм кислорода является **дыхательная цепь** митохондрий. Все ее комплексы (особенно коэнзим Q) способны "терять" электроны, которые используются для образования АФК. Дополнительными **индукторами** образования АФК являются **гипоксия**, различные **ингибиторы** дыхательных ферментов или АТФ-синтазы, то есть все, что **замедляет** скорость движения электронов и передачу их на кислород в конце дыхательной цепи. Это приводит к «сбрасыванию» электронов на кислород на более ранних этапах, т.к. у других дыхательных ферментов имеется **большее** сродство к кислороду по сравнению с 4-м комплексом.



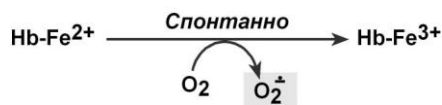
Образование супероксид анион-радикала при функционировании коэнзима Q

2. Некоторое количество АФК синтезируется с участием цитохромов P₄₅₀ и b₅ в **микросомальном окислении**. Это окисление происходит в мембранах эндоплазматического ретикула всех тканей, кроме мышечной, и используется при синтезе и метаболизме ряда веществ (желчных кислот, эйкозаноидов, холестерина и т.п.), или для окисления веществ при их обезвреживании. В одной из реакций происходит спонтанная передача электрона на присоединившийся кислород и образуется супероксид анион-радикал.



Образование супероксид анион-радикала в реакциях микросомального окисления

3. В эритроцитах основным неферментативным источником супероксид анион-радикала является **окисление гемоглобина** при участии включенной в гем молекулы железа. Сам гемоглобин при этом превращается в метгемоглобин.



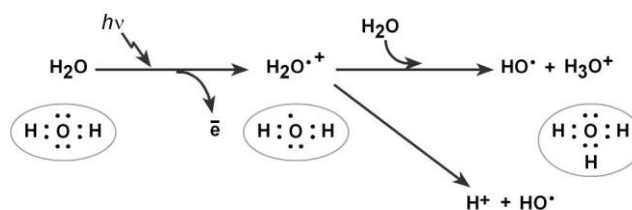
Образование супероксид анион-радикала в реакции автоокисления гемоглобина

4. При **спонтанной дисмутации** двух супероксид анион-радикалов возможно образование синглетного кислорода и пероксида водорода.



Образование синглетного кислорода при дисмутации супероксид анион-радикала

5. **Радиолиз воды.** При действии ионизирующего излучения, например, альфа-излучения, молекула воды ионизируется, теряя электрон. Высвобожденный электрон в состоянии присоединиться к соседней молекуле воды. Обе ионизированные молекулы воды могут разлагаться на ионы H^+ и HO^- и на свободные радикалы. Все образуемые частицы быстро рекомбинируют друг с другом, получая и отдавая электроны, образуя новые радикалы или ионы.



Процесс и продукты радиолиза воды

ФЕРМЕНТАТИВНОЕ ОБРАЗОВАНИЕ СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ

Некоторые ферменты при осуществлении своей реакции производят активные формы кислорода. При этом свободные радикалы могут быть как **целевыми** продуктами, например, для НАДФ-оксидазы, миелопероксидазы, NO-синтазы, так и появляться как обязательный, но все-таки **побочный** продукт реакции (моноаминоксидаза, оксидазы D- и L-аминокислот, ксантиноксидаза, лизилоксидаза, полиаминоксидазы, циклоксигеназы, липоксигеназы).

Образование свободных радикалов как главного продукта реакции

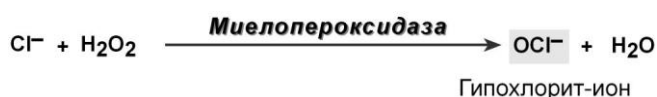
1. **НАДФН-оксидаза** в большом количестве локализуется на плазматической мембране моноцитов и гранулоцитов. Она представляет собой мультикомпонентную систему, состоящую из цитозольных и мембраносвязанных субъединиц. При стимуляции фагоцитов происходит быстрая самосборка цитозольных и мембранных компонентов в НАДФН-оксидазный комплекс.

Окисляя НАДФН внутри клетки, НАДФН-оксидаза одновременно связывает внеклеточный O_2 и восстанавливает его до супероксид анион-радикала, чем обеспечивает бактерицидный эффект при фагоцитозе.

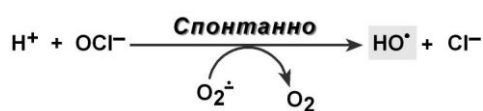


Реакция, катализируемая НАДФН-оксидазой

2. **Миелопероксидаза** – гемсодержащий фермент нейтрофилов, содержится в азурофильных гранулах и секретируется из них при фагоцитозе. Также фермент содержится в слюне, обеспечивая ее микробицидную активность. Образованный в реакции **гипохлорит-ион** является сильным окислителем, по агрессивности сопоставимым с ОН-радикалом. Он реагирует с аминок группами мембранных белков бактерий с образованием хлораминов. Кроме этого, гипохлорит-ионы способны генерировать **гидроксил-радикалы** в реакции с супероксид анионом.



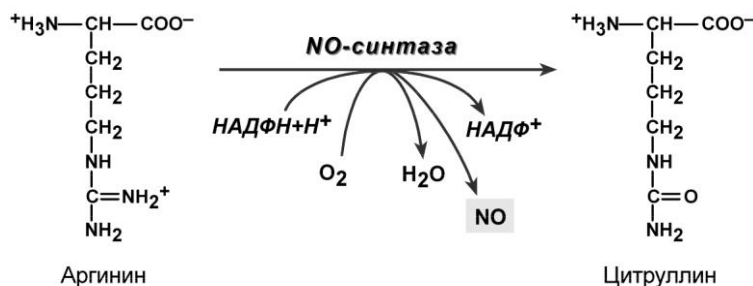
Реакция, катализируемая миелопероксидазой



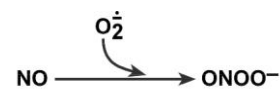
Реакция взаимодействия супероксида с гипохлорит-ионом

3. **NO-синтаза** – группа НАДФН-зависимых изоферментов, катализирующих сложную многоходовую реакцию окисления аргинина с образованием **оксида азота (NO)**. Выделяют нейрональную, эндотелиальную и индуцируемую (в сердечно-сосудистой и иммунной системах) формы фермента.

Оксид азота в организме выполняет множество функций, от регуляции тонуса сосудов до бактерицидного эффекта. После формирования молекула NO при взаимодействии с супероксиданион-радикалом может превращаться в сильный окислитель **пероксинитрит-анион**.



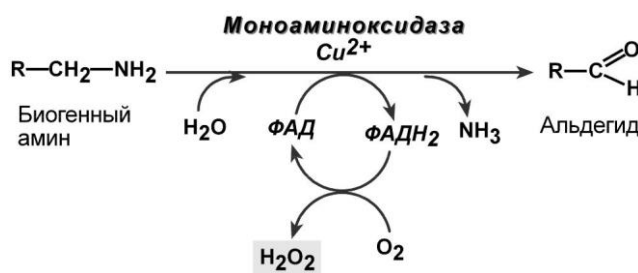
Реакция, катализируемая NO-синтазой



Образование пероксинитрит-аниона

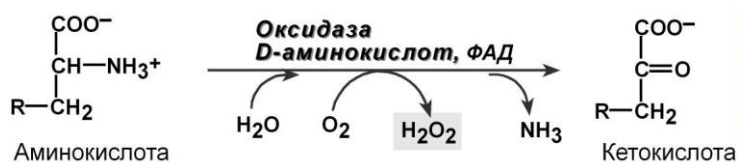
Образование АФК как побочного продукта реакции

1. **Моноаминоксидаза**, ФАД-содержащий фермент, расположенный на внешней мембране митохондрий, окисляет биогенные амины (гистамин, серотонин, дофамин) в альдегиды. На эту реакцию расходуется до 2% потребляемого кислорода, который превращается в H_2O_2 .



Реакция, катализируемая моноаминоксидазой

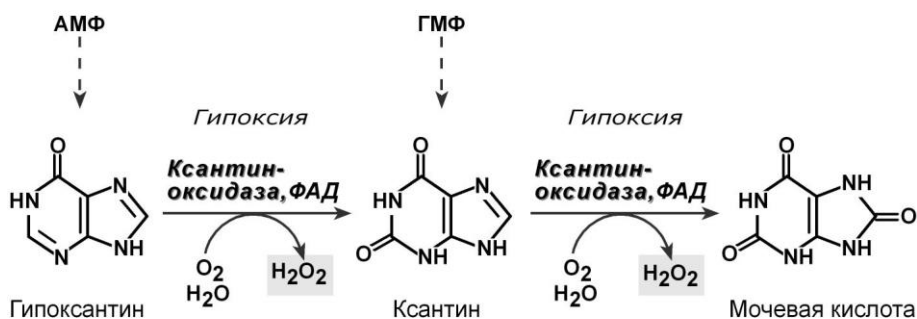
2. **Оксидазы D- и L-аминокислот** локализуются в пероксисомах печени и почек, содержат флавиновые коферменты – ФАД (оксидаза D-аминокислот) и ФМН (оксидаза L-аминокислот). Роль этих ферментов недостаточно изучена и не совсем ясна.



Реакция, катализируемая оксидазой D-аминокислот

3. **Ксантиндегидрогеназа** – фермент, содержащий в своем составе ФАД, молибден и железо. Она принимает участие в конечных реакциях катаболизма пуриновых нуклеотидов АМФ и ГМФ – превращает гипоксантин и ксантин в мочевую кислоту. В аэробных условиях фермент использует в качестве акцептора электронов НАД с образованием НАДН.

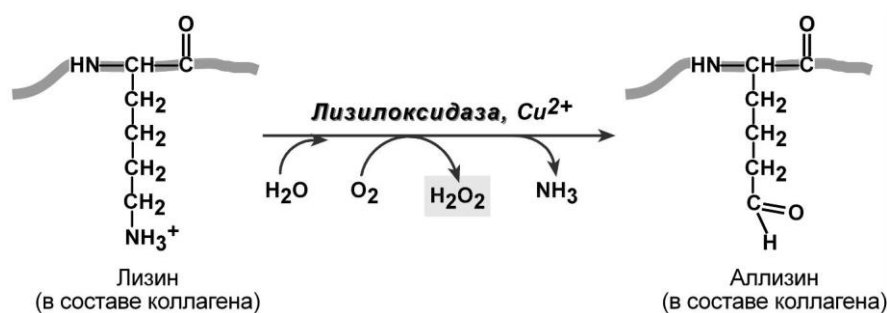
Однако в клетке может происходить превращение фермента в O_2 -зависимую **ксантин-оксидазу**. Превращение может запускаться разными механизмами, включая окисление HS-групп остатков цистеина в ферменте или ограниченный протеолиз. Образующий ксантиноксидазой H_2O_2 составляет существенную долю в общей массе активных форм кислорода клетки.



Реакция, катализируемая ксантиноксидазой

4. **Лизилоксидаза**, медь-содержащий белок, работает в межклеточной среде и необходим для синтеза фибрилл коллагена. Он окисляет остатки лизина в белковой цепи коллагена до альдегидных групп (аллизин), и далее самопроизвольная реакция (на схеме не показана) между аллизином и лизином обеспечивает ковалентное "сшивание" молекул коллагена меж-

ду собой и образование прочных нерастворимых фибрилл коллагена. Пероксид водорода является побочным продуктом процесса.

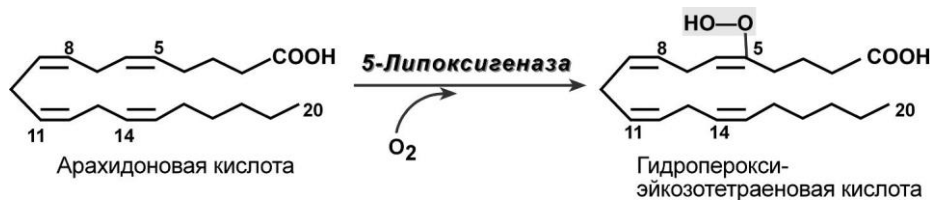


Реакция, катализируемая лизилоксидазой

Образование гидроперекисей жирных кислот

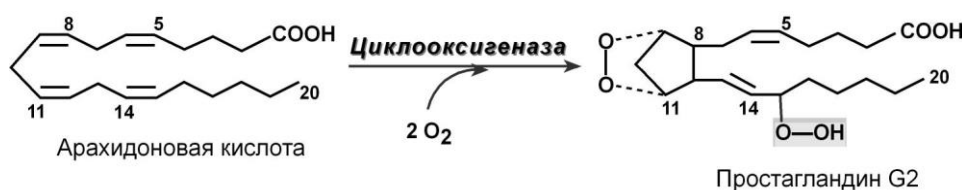
Кроме указанных выше "целевого" и "побочного" образования активных форм кислорода в клетках осуществляются реакции образования органических форм кислородных радикалов – **гидроперекисей** жирных кислот. И хотя образованная гидроперекись способна спонтанно вызывать образование новых свободных радикалов (см "Перекисное окисление липидов"), истинной целью процесса является биосинтез **эйкозаноидов** – простагландинов, тромбоксанов и лейкотриенов.

1. **Липоксигеназы** – железосодержащие ферменты, присоединяющие два атома кислорода к полиненасыщенным жирным кислотам. Продуктом реакции является гидропероксид жирной кислоты, который в дальнейшем используется для синтеза **лейкотриенов**, важнейших регуляторов активности лейкоцитов



Реакция, катализируемая липоксигеназой

2. **Циклооксигеназы** присоединяют к полиненасыщенным жирным кислотам четыре атома кислорода с образованием гидроперекиси – простагландина G (PgG), который далее идет на образование других **простагландинов, протациклинов и тромбоксанов**.



Реакция, катализируемая циклооксигеназой

АНТИОКСИДАНТНЫЕ СИСТЕМЫ

Для защиты от свободных радикалов клетками были выработаны эффективные механизмы молекулярных реакций ликвидации АФК, называемые системой **антиоксидантной защиты**.

I. По **локализации** антиоксиданты можно разделить

- плазмы крови – аскорбиновая кислота, билирубин, мочева кислота, трансферрин, церулоплазмин, β -каротин,
- мембранные – токоферол, убихинон, каротиноиды,
- внутриклеточные – супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, глутатион-S-трансфераза, глутатион, ферритин, металлотионеины, пероксиредоксины, тиоредоксины.

II. По **природе и действию****Ферментативные**

1. Супероксиддисмутаза.
2. Каталаза.
3. Глутатионпероксидаза.
4. Глутатион-S-трансфераза.
5. Лактопероксидаза.
6. Тиреопероксидаза.
7. Пероксиредоксины.
8. Церулоплазмин.

Неферментативные

1. Белки и пептиды
 - трансферрин, ферритин,
 - металлотионеины, тиоредоксины,
 - глутатион, карнозин, ансерин.
2. Нутриенты
 - витамины – аскорбиновая кислота, токоферол,
 - каротиноиды – β -каротин, ликопин,
 - биофлавоноиды – кверцетин, ресвератрол, проантоцианиды,
 - селен.
3. Метаболиты
 - билирубин, мочева кислота, убихинон.

АНТИОКСИДАНТНЫЕ ФЕРМЕНТЫ**Ферменты, ликвидирующие АФК**

1. **Супероксиддисмутаза** – фермент, представленный в цитозоле и митохондриях, выполняет функции антиоксидантного фермента, удаляя агрессивный супероксид анион-радикал и образуя при этом более устойчивый пероксид водорода.

У человека имеется три формы фермента:

- цитозольная и внеклеточная формы, содержат металлы **медь** и **цинк**,
- митохондриальный изофермент, включает **марганец**.



Реакция, катализируемая супероксиддисмутазой

2. **Каталаза**, гемсодержащий фермент, присутствует в пероксисомах всех клеток человека и обладает чрезвычайно высокой молекулярной активностью. В эритроцитах она находится в цитозоле и защищает гемоглобин от окисления.

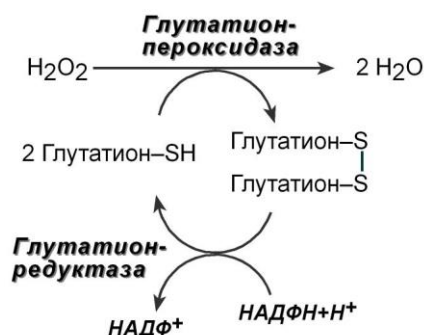


Реакция, катализируемая каталазой

3. **Глутатионпероксидаза**, как и каталаза, является гемсодержащим ферментом и обезвреживает H_2O_2 . Обладая в 1000 раз большим сродством к пероксиду водорода, чем каталаза, она эффективна даже при низких его концентрациях.

Особенностью глутатионпероксидазы является наличие в активном центре фермента **селеноцистеина**, т.е. такого цистеина, в котором сера заменена на **селен**.

В качестве восстановителя для H_2O_2 фермент использует трипептид **глутатион**, содержащий цистеин с его SH-группой. Окисленный в результате реакции глутатион восстанавливается глутатионредуктазой

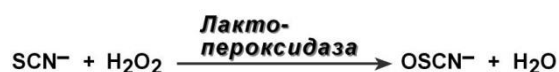


Система глутатионовых ферментов

Ферменты, использующие АФК

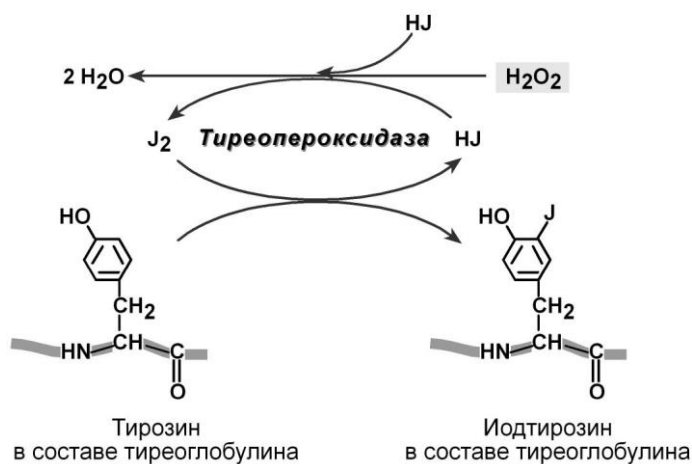
Вместе с вышеперечисленными ферментами, задачей которых является уборка агрессивных кислородных радикалов, в организме присутствуют ферменты, для которых наличие H_2O_2 необходимо для выполнения ими **своих метаболических функций**. К таким ферментам относятся лактопероксидаза и тиреопероксидаза.

1. **Лактопероксидаза** гемсодержащий гликопротеин, который обнаруживается в молоке, слюне, слезной жидкости, на слизистой оболочке дыхательных путей. Ее функцией является использование H_2O_2 для образования гипотиоцианата (OSCN^-), обладающего бактериостатическим действием.



Реакция, катализируемая лактопероксидазой

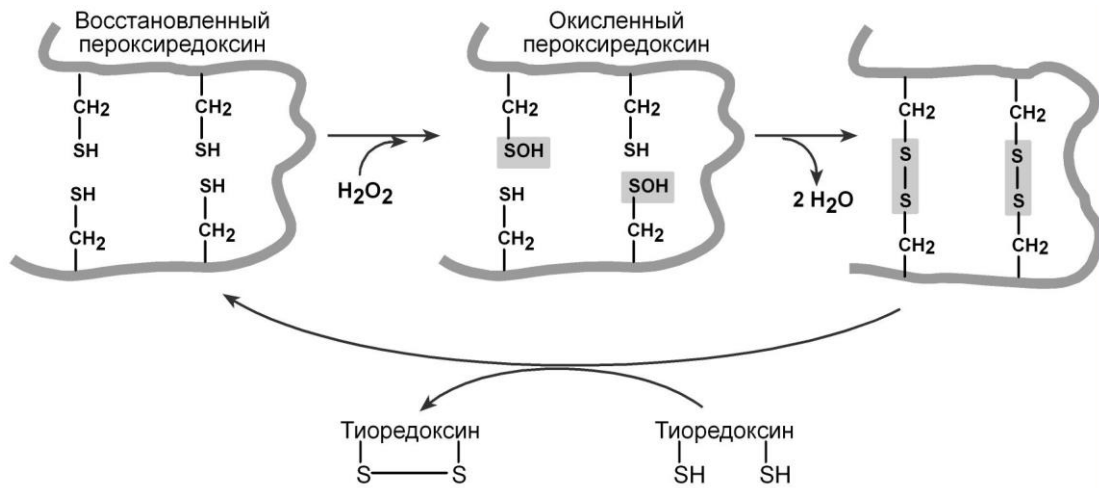
2. Еще одним ферментом, нуждающимся в перексиде водорода, является **тиреопероксидаза** (йодидпероксидаза). Этот фермент принимает участие в образовании тиреоидных гормонов в белке тиреоглобулине в щитовидной железе.



Реакция, катализируемая тиреопероксидазой

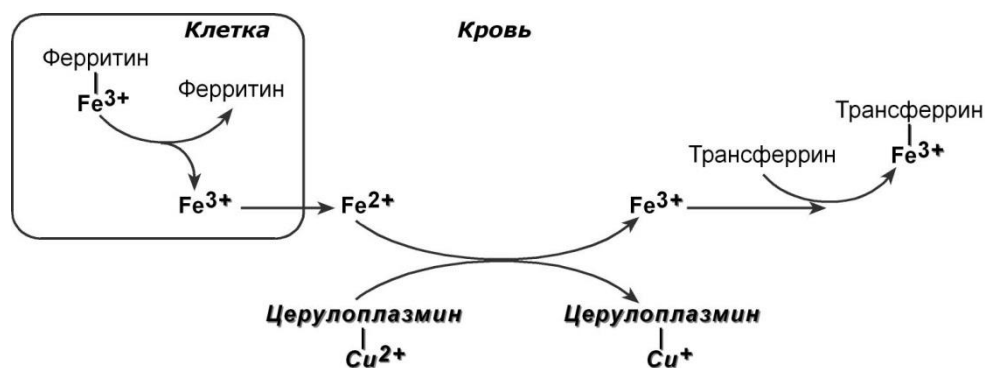
3. **Пероксиредоксины** – антиоксидантные ферменты, контролирующие уровень цитокин-индуцированных пероксидов, участвующих в передаче клеточных сигналов.

В активном центре фермента находятся SH-группы цистеина, которые окисляются до R-SOH состояния пероксидным субстратом (например, липидной гидроперекисью).



Участие пероксиредоксина в антиоксидантной защите и его восстановление тиоредоксином

4. **Церулоплазмин** – антиоксидантный фермент плазмы крови, содержит 6-8 ионов меди (II) и окисляет ионы Fe^{2+} до Fe^{3+} без образования гидроксил-радикала, что позволяет железу связываться с белком трансферрином. Таким образом, церулоплазмин обеспечивает равновесие между депонированием и использованием железа, а применительно к СРО **препятствует** инициации свободнорадикальных процессов (реакция Фентона).



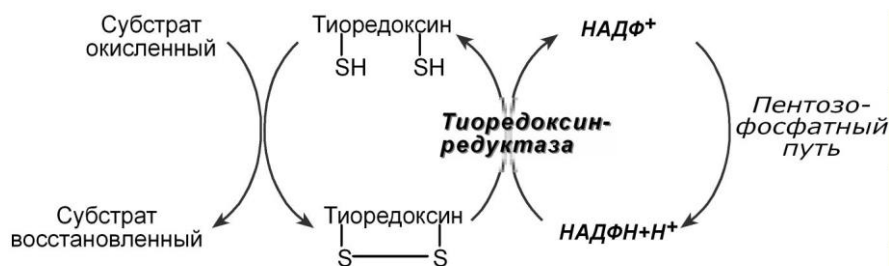
Участие церулоплазмينا в переносе железа от ферритина к трансферрину

НЕФЕРМЕНТАТИВНЫЕ АНТИОКСИДАНТЫ

Антиоксидантные белки

1. **Тиоредоксины** – семейство небольших белков, содержащих расположенные рядом остатки цистеина (-Цис-Гли-Про-Цис-). В отношении антиоксидантной защиты их функция сходна с таковой у глутатиона и частично с ней перекрывается. С помощью HS-групп тиоредоксины выполняют функции:

- восстановление активности некоторых ферментов (пероксиредоксины, метионин-сульфоксид-редуктаза),
- кофактор редуктаз, используемых при синтезе дезоксирибонуклеотидов и при активации витамина К,
- восстановление дисульфидных связей в белках.



Участие тиоредоксина в антиоксидантной защите и его восстановление

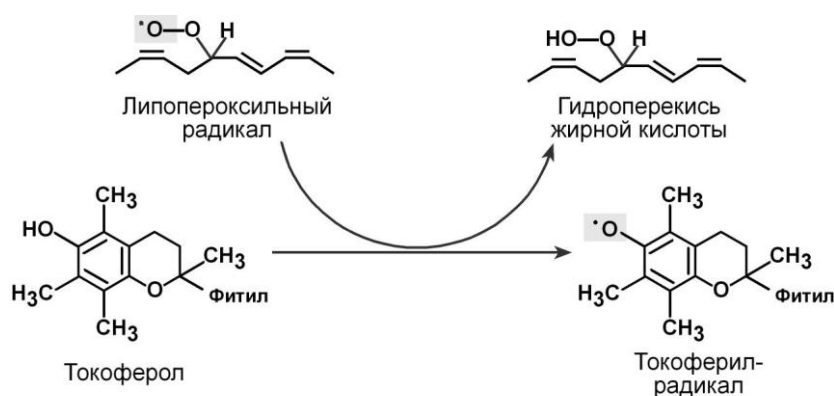
2. **Металлотионеины** – небольшие, богатые цистеином (до 30% от состава) белки, способные связывать ионы металлов переменной валентности, такие как железо, цинк и медь, тяжелые металлы (например, кадмий и ртуть). В результате действия этих белков металлы, способные отдавать электроны, "выходят из игры".

3. Другие белки проявляют антиоксидантную активность благодаря способности связывать ионы железа и предотвращать реакцию Фентона. Например, ионы Fe^{3+} в крови связываются с **трансферрином**, а внутри клетки – с **ферритином**.

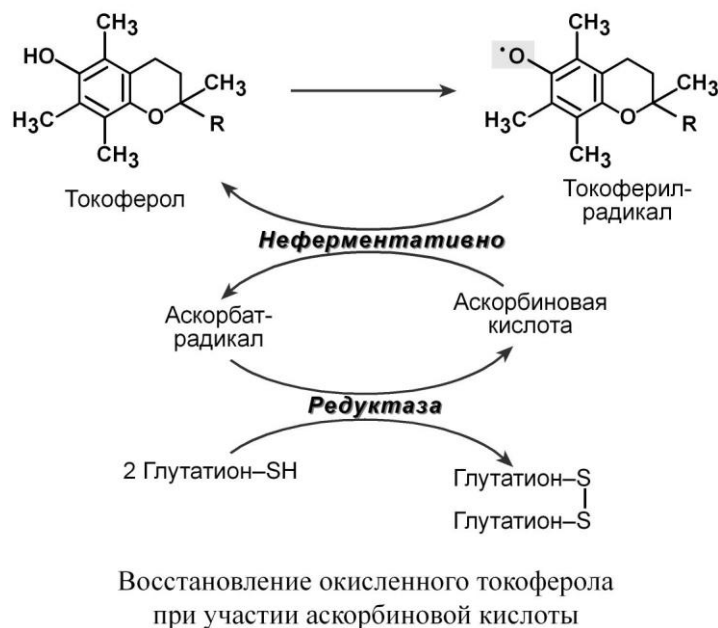
Небелковые антиоксиданты

Неферментативные антиоксиданты – это соединения, имеющие такой атом водорода, связь которого с атомом углерода гораздо слабее, чем связь С–Н в молекуле, например, полиненасыщенной жирной кислоты. Поскольку разрыв связи в молекуле антиоксиданта требует меньше энергии, то он легко отдает свой атом водорода, нейтрализуя свободный радикал. Но сам антиоксидант при этом переходит в радикальную форму, хотя и в слабо активную, **химически инертную**, поскольку взаимодействие с молекулой жирной кислоты для нее энергетически невыгодно. Более вероятно взаимодействие этого радикала с другими свободными радикалами.

Природными «целенаправленными» антиоксидантами являются **токоферол** (витамин Е) и **каротиноиды**, активно участвуют в этом также **витамин А**, **аскорбиновая кислота**, **липоевая кислота**.



Механизм действия токоферола



Целый ряд веществ с совершенно иной функцией могут выступать в роли ловушек свободных радикалов – это **бензойная** и **мочевая** кислоты, **билирубин**, **биофлавоноиды**, одно- и многоатомные **спирты**, **мелатонин**, **эстрогены**. Их химическая структура позволяет восстанавливать АФК. Возникающие при этом малоактивные радикальные формы либо взаимодействуют между собой, либо метаболизируют обычным образом, либо нейтрализуются природными антиоксидантами.

РОЛЬ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС

Термин «окислительный стресс» относится к состоянию клеток, которое характеризуется избыточной продукцией **эндогенных** активных форм кислорода или возникает в результате действия больших концентраций **экзогенных** АФК. Показана важная роль окислительного стресса в развитии таких заболеваний, как рассеянный склероз, миодистрофия, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, атеросклероз, ишемическая болезнь сердца и инфаркт миокарда, женское бесплодие, хроническая обструктивная болезнь легких, метаболический синдром.

Различные стимулы – ионизирующая радиация, воспаление, промышленные и бытовые токсины, повышенная или пониженная концентрация кислорода – активируют процессы образования свободных радикалов.

Главной особенностью радикальных форм кислорода является их способность практически мгновенно реагировать с молекулами, контактирующими с ними. В этом случае они инициируют процессы окисления непосредственно в местах своего образования – митохондриях, клеточной мембране, мембранах ЭПР. Под влиянием свободных радикалов происходит окисление молекул ядерной и митохондриальной ДНК, РНК, белков, фосфолипидов и гликозаминогликанов – это **первичные** механизмы окислительного стресса.



Свободнорадикальная теория гибели клетки

Агрессивность АФК лежит в основе деструкции мембран, внутриклеточных структур и органелл – **вторичных** механизмов окислительного стресса. Перекисное окисление жирнокислотных остатков фосфолипидов резко меняет свойства клеточных мембран. Окисленные фосфолипиды формируют группы, т.н. **кластеры**, образующие гидрофильные поры, что увеличивает проницаемость мембран и ведет к потоку ионов Na^+ и Ca^{2+} внутрь клетки. Повышается микровязкость мембран за счет снижения количества ненасыщенных фосфолипидов, в результате интегральные белки оказываются как бы «вмороженными» в более жесткую матрицу. Подвижность пептидной цепи, необходимая для нормального функционирования ферментов, рецепторов и каналаобразующих белков, снижается. В результате функция белков ингибируется, например, нарушается активность Ca^{2+} -АТФ-азы и Na^+, K^+ -АТФазы, ферментов дыхательной цепи.

ПЕРВИЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПОВРЕЖДАЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

Перекисное окисление липидов

Среди первичных механизмов повреждения клеток при окислительном стрессе лидирует окисление жирнокислотных остатков в фосфолипидах мембран. Это снижает их гидрофобность и нарушает устойчивость мембран, изменяет работу мембраносвязанных ферментов, повышает проницаемость мембран для ионов.

Реакции взаимодействия свободных радикалов с жирными кислотами получили широкую известность в связи с их актуальностью в пищевой промышленности. Появление неприятного запаха масла и прогоркание продуктов – это и есть проявление перекисного окисления липидов.

Основным субстратом для свободно-радикальных реакций являются **двойные связи** полиненасыщенных жирных кислот. В клеточных мембранах полиненасыщенные жирные

кислоты находятся в составе фосфолипидов и гликолипидов. Большое количество фосфолипидов с полиненасыщенными жирными кислотами также локализуется в оболочке липопротеинов высокой, низкой и очень низкой плотности.

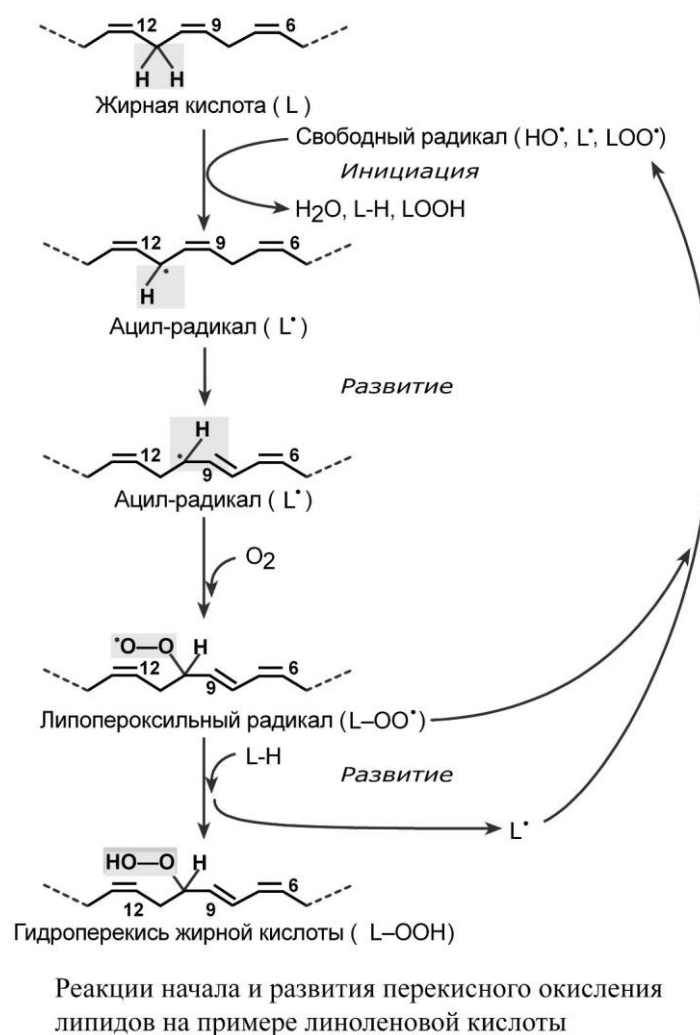
В результате свободнорадикального окисления жирных кислот образуются гидроперекиси и диеновые конъюгаты (**первичные** продукты), которые очень нестабильны. При участии металлов переменной валентности они быстро метаболизируются во **вторичные** (альдегиды и диальдегиды) и **третичные** (шиффовы основания) продукты перекисного окисления липидов.

Перекисное окисление липидов включает в себя несколько стадий:

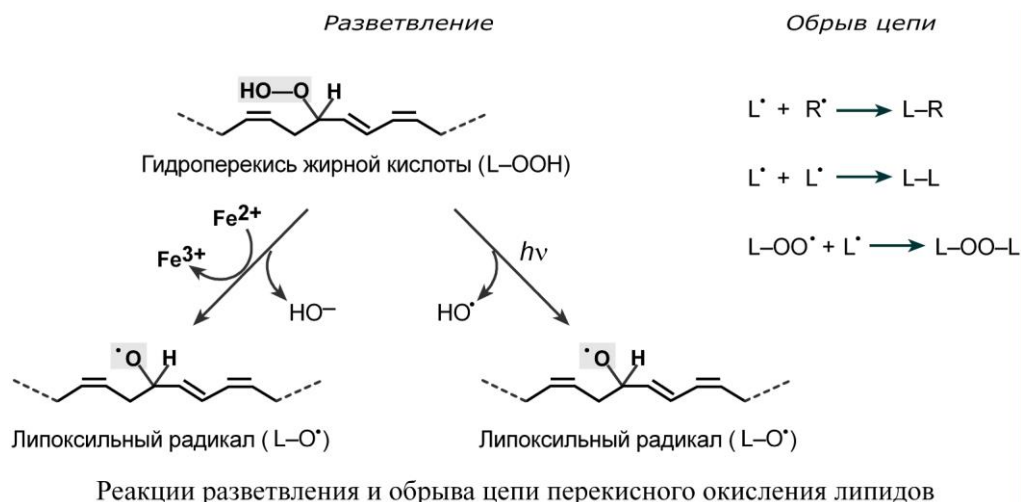
1. Инициация
2. Развитие.
3. Разветвление.
4. Обрыв цепи.

В момент **инициации** гидроксил радикалом атакуется метиленовая группа, расположенная между двойными связями, и выбивается электрон, восстанавливающий гидроксил радикал до воды. Далее следует перестановка двойной связи, смещение радикальной группы и взаимодействие ее с кислородом. В результате образуется **липопероксильный** радикал.

Дальнейшее взаимодействие полученного липоперекисного радикала со структурами соседних жирных кислот приводит к его нейтрализации и появлению новых липоперекисных радикалов, т.е. к **развитию** линейной цепной реакции с появлением новых окисленных жирных кислот.



Кроме линейного развития, может происходить **ветвление** реакции за счет получения гидроперекисью электронов от каких-либо металлов или при воздействии излучения. **Обрыв** цепной реакции происходит при взаимодействии радикалов друг с другом или в реакции с различными антиоксидантами, например, витамином Е, который отдает электроны, превращаясь при этом в стабильную окисленную форму.



Первичными продуктами ПОЛ являются гидроперекиси жирных кислот, они подвергаются дальнейшему распаду с образованием **вторичных** продуктов ПОЛ – различных спиртов, кетонов, альдегидов и диальдегидов, эпоксидов и других соединений.

Наиболее реакционноспособным из вторичных продуктов ПОЛ является **малоновый диальдегид** (МДА), который способен образовывать ковалентные связи с NH₂-группами белков и иных молекул с образованием шиффовых оснований.

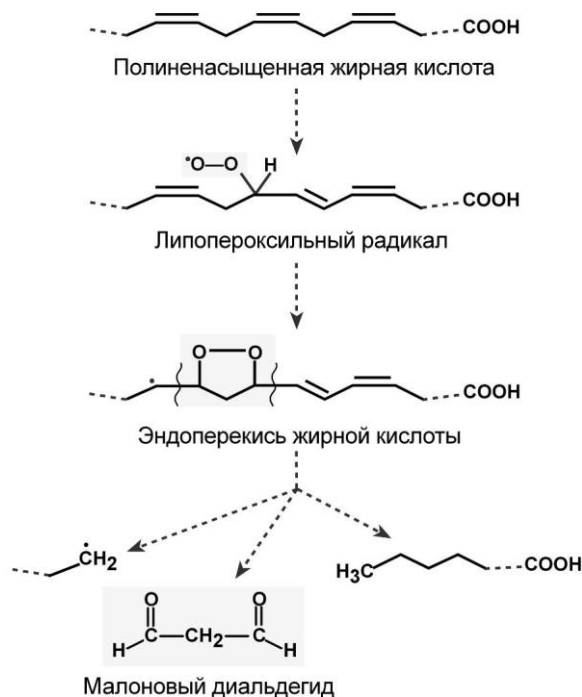
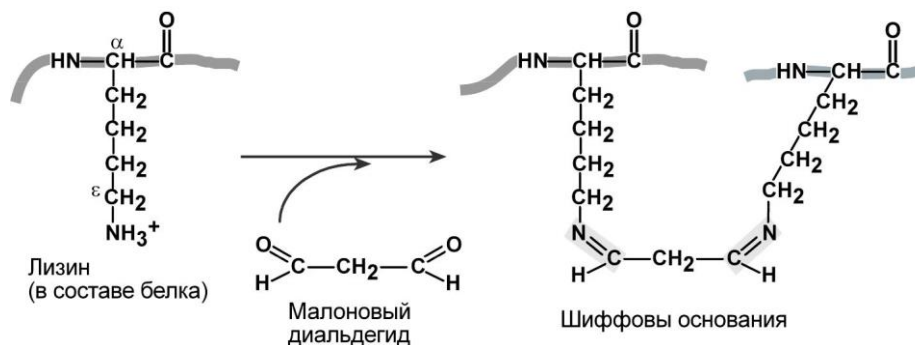


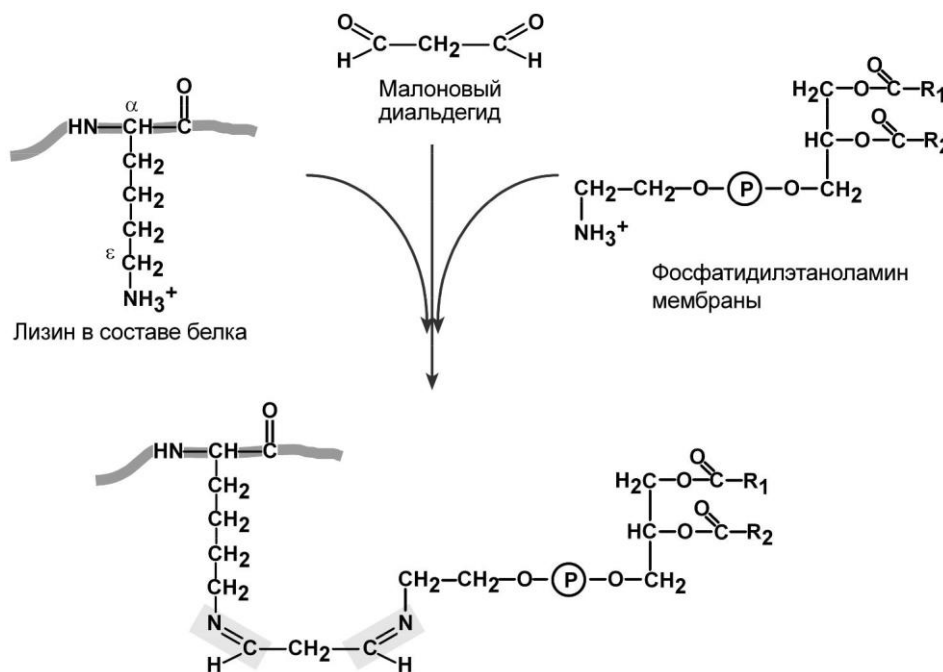
Схема образования малонового диальдегида на примере окисления линоленовой кислоты

Роль малонового диальдегида

Малоновый диальдегид (МДА), образующийся при перекисном окислении липидов, способен реагировать с ϵ -NH₂-группами лизина или N-концевыми аминокислотами белков, с NH₂-группами фосфолипидов и гликозаминогликанов. МДА формирует поперечные и внутримолекулярные мостики внутри молекулярных структур и между молекулами с образованием шиффовых оснований (основания Шиффа).



Образование сшивок при участии МДА между остатками лизина



Образование сшивок при участии МДА между остатками лизина и фосфатидилэтаноламина

В конечном результате после окислительной атаки в белках появляются поперечные сшивки внутри одной молекулы, между разными белками, между белками и фосфолипидами. Из-за этого активность ферментативных белков изменяется, возможности структурных и сократительных белков падают, каналобразующие белки мембраны деформируются и проницаемость мембран возрастает, жизнеспособность и функционирование клетки уменьшаются.

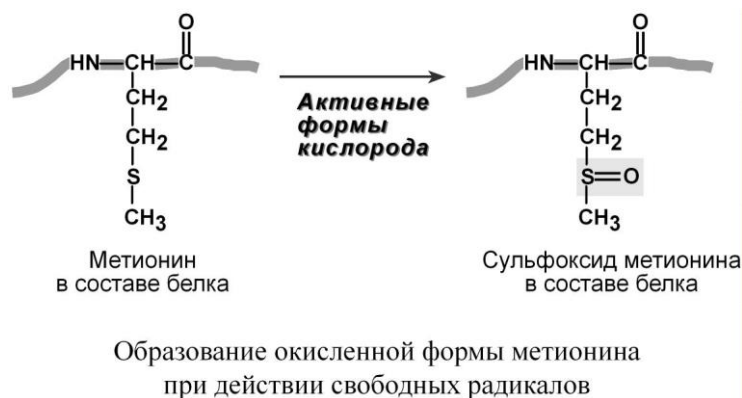
Повреждение белков

Окислительная атака на белки модифицирует остатки аминокислот, фрагментирует пептидные цепи, приводит к сшивке белков, изменяет заряд белка и его чувствительность к протеолизу.

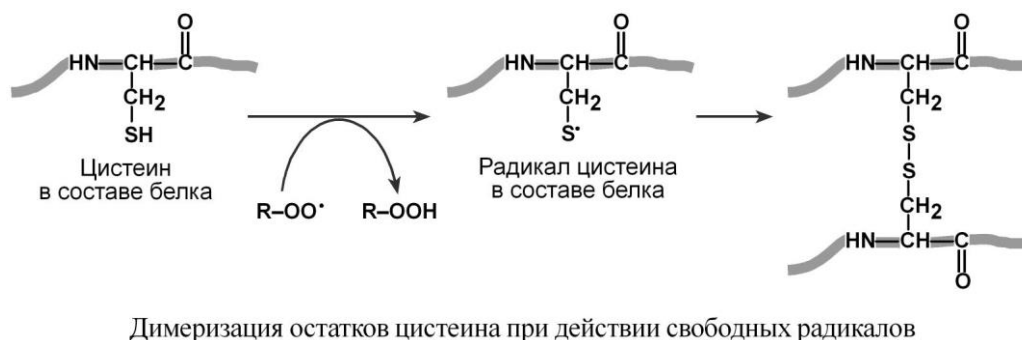
В белках наиболее уязвимыми к повреждающему действию свободных радикалов оказываются **серусодержащие** аминокислоты, остатки **лизина**, **триптофана** и **гистидина**. Окислительное разрушение белка усиливается в присутствии металлов, способных отдавать электроны, например, ионы Fe^{2+} . Наличие металла позволяет локально образовывать гидроксил-радикал в реакции Фентона и окислять аминокислотные остатки в непосредственной близости.

В качестве примеров повреждения белков свободными радикалами можно привести образование сульфоксида метионина и окисление SH-групп цистеина, появление хлораминов и аллизина.

1. Окисление серы в составе **метионина** приводит к образованию сульфоксида.

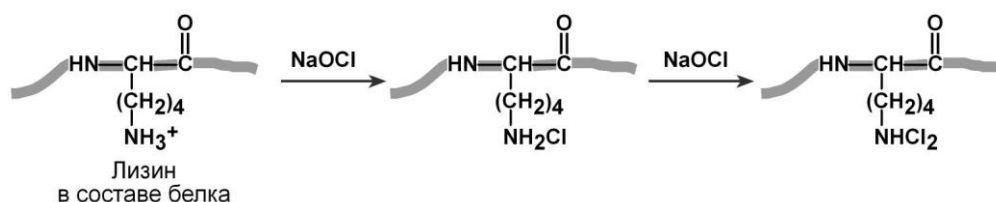


В **цистеине** активные радикалы (АФК, хлорамины) способны отрывать атом водорода от SH-группы, формируя тиольные радикалы и дисульфидные сшивки между белками.



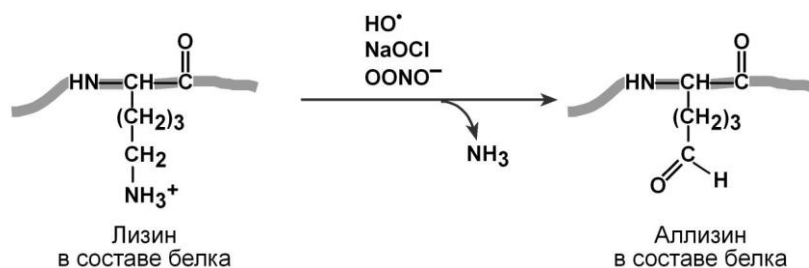
2. Окисление **лизина**.

Образуемый миелопероксидазой гипохлорит-ион (OCl^-) по силе воздействия сопоставим с гидроксил-радикалом, и он атакует аминогруппы остатков лизина в белках с образованием структур **хлораминов**.



Хотя хлорамины сами по себе нарушают функционирование микробных белков, главный бактерицидный эффект гипохлорит-иона обусловлен дальнейшим отщеплением хлораминовой группы, окислением δ -углеродного атома лизина до альдегидной группы и появле-

нием новой аминокислоты **аллизина**. Аналогичным эффектом на лизин в белках обладают гидроксил-радикалы и пероксинитрит-ион.



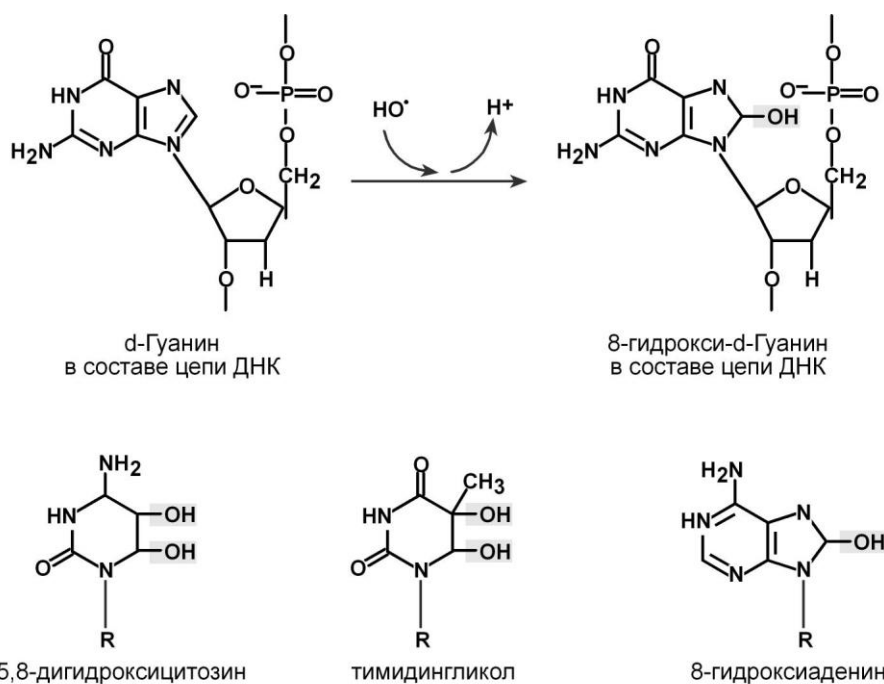
Образование аллизина под влиянием активных форм кислорода, азота и хлора

Повреждение нуклеиновых кислот

Наличие большого количества катионных групп в нуклеиновых кислотах позволяет ионам железа, имеющимся в клетке, связываться с ними и участвовать в реакции Фентона с образованием гидроксильных радикалов. Свободные радикалы индуцируют в живой клетке многочисленные повреждения РНК и ДНК:

- с появлением модифицированных и неспаренных оснований,
- вызывая одно- и двунитевые разрывы между нуклеотидами цепи,
- стимулируя разрывы гликозидных связей между азотистым основанием и пентозой,
- с образованием сшивок между цистеином и тиминном,
- с возникновением окисленных пентозных остатков.

Окисление оснований приводит к образованию 8-гидроксигуанина, 5,8-дигидрокси-цитозина и тимидингликоля, к раскрытию цикла пуриновых оснований.



Окисление азотистых оснований

СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ ПРИ ГИПОКСИИ

Гипоксия клеток является распространенным явлением в жизнедеятельности организма как в норме, так и в патологии. Ряд нарушений, таких как заболевания сердечно-сосудистой и бронхолегочной систем, тромбозы, разнообразные анемии имеют в своем патогенезе состояние клеточной гипоксии. И как ни парадоксально это выглядит, недостаточность кислорода приводит к **активации** образования АФК и свободнорадикального окисления.

Предложены несколько возможных механизмов этой активации:

1. Конверсия ксантиндегидрогеназы.

В обычных условиях последние реакции катаболизма пуриновых нуклеотидов до мочевой кислоты катализируются ксантиндегидрогеназой, которая использует в качестве акцепторов электронов НАДН. В ишемизированной ткани происходит частичный протеолиз ксантиндегидрогеназы в ксантиноксидазу. Последняя в качестве акцептора электронов использует молекулу кислорода и образует пероксид водорода. Учитывая факт, что при длительной гипоксии замедляются реакции окислительного фосфорилирования и часть адениловых нуклеотидов оказываются "лишними" и попадают в катаболизм, можно понять, что количество образуемого H_2O_2 будет велико.

2. Увеличение утечки с дыхательной цепи

При гипоксии утечка электронов с дыхательных комплексов усиливается. Это объясняется относительно **невысоким средством** цитохромоксидазы (комплекс IV) к кислороду. Поэтому при снижении концентрации кислорода цитохромоксидаза оказывается "слабым звеном" и не может передать получаемые электроны на молекулы кислорода. При этом на предыдущих дыхательных комплексах электроны замедляют свой бег, и их "утечка" на кислород усиливается.

3. Образование адренохрома.

Данный механизм рассматривается, как правило, в связи с развитием инфаркта миокарда. В этом случае болевой синдром сопровождается выбросом катехоламинов – адреналина и норадреналина. Окисление адреналина до адренохрома происходит в результате внутримолекулярных перестроек молекулы адреналина путём дегидрирования и циклизации с образованием промежуточных хинонов. Этот процесс сопровождается одноэлектронным восстановлением кислорода и связан с образованием **супероксид анион-радикала**. К тому же нейтрализация других продуктов окисления адреналина и накопление глутатионовых конъюгатов адреналина и адренохрома истощают антиоксидантные системы клеток и тканей.

4. Активация нейтрофилов.

На стадии необратимой ишемии и инфаркта, когда ишемизированная ткань инфильтруется нейтрофилами, в межклеточной среде появляются продукты клеточного распада. Развитие реакций протеолиза и фосфолиполиза погибающих клеток поддерживает активацию приходящих фагоцитов и способствует выделению ими супероксид анион-радикала.

5. Дегградация антиоксидантных систем.

При длительных патологических процессах в ткани истощаются резервы неферментативных антиоксидантов, активность антиоксидантных ферментов недостаточна для противодействия непрерывно поступающим АФК. Поэтому свободнорадикальные процессы начинают нарастать и происходит необратимое окисление HS-групп метаболических ферментов, глутатиона, металлотионеинов, тиоредоксинов и пероксиредоксинов.

ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ СТОРОНЫ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ

Процессы свободнорадикального окисления имеют важное значение для обновления состава и поддержания функциональных свойств биомембран, энергетических процессов,

клеточного деления, синтеза биологически активных веществ, внутриклеточной сигнализации.

1. Регуляция сосудистой системы.

Одна из активных молекул, **оксид азота NO**, участвует в физиологических реакциях организма. Являясь нейромедиатором, он регулирует сосудистый тонус, расслабляя гладкую мускулатуру сосудов, и также называется **эндотелиальный фактор релаксации** сосудов. Также NO снижает агрегацию тромбоцитов, адгезию нейтрофилов к эндотелию.

2. Участие в реакциях иммунитета.

Проявляя свойства радикала, синтезируемый фагоцитами оксид азота **NO** может оказывать цитотоксический и бактерицидный эффект, хотя большую роль в этом играет его производное – **пероксинитрит** (ONOO^-). Образование NO с участием индуцибельной NO-синтазы в иммунных клетках играет роль в образовании интерлейкинов и других индукторов воспаления.

Свободнорадикальное окисление участвует в реакциях специфического и неспецифического **иммунитета**. Ярким проявлением роли свободных радикалов в иммунитете является **фагоцитоз**, осуществляемый нейтрофилами, моноцитами, тканевыми макрофагами, купферовскими клетками, остеокластами, клетками микроглии. Ведущую роль играет генерация клетками кислородных радикалов (**супероксид анион-радикал**) и оказываемый ими бактерицидный эффект.

3. Участие в реакциях воспаления.

Кроме бактерицидного эффекта, **супероксид анион-радикал** принимает участие в выработке хемотаксинов и в цитокин-опосредованных реакциях. Вместе с указанным его взаимодействием с оксидом азота NO приводит к двум важным следствиям:

- снижение концентрации NO и, таким образом, повышение адгезии нейтрофилов к эндотелию в зоне поражения,
- образование пероксинитрита OONO^- , являющегося агрессивной молекулой и повреждающего клеточные белки.

4. Ускорение обновления белковых структур.

Также окисление макромолекул является естественным и необходимым элементом в самообновлении клеток. **Окислительная модификация** аминокислот является одним из механизмов маркировки белка для протеолиза. К тому же лизосомальные протеазы быстрее гидролизуют окисленный и денатурированный белок, что сокращает срок жизни и ускоряет самообновление клеточных структур.

5. Регуляция вязкости и обновление клеточных мембран.

Перекисное окисление липидов поддерживает жидкость мембран на определенном уровне, усиливаясь, например, при накоплении холестерина, уплотняющего фосфолипидный бислой. Перекиси липидов являются промежуточным продуктом при биосинтезе **эйкозаноидов**, участвуют в регуляции мембранных ферментов. Таким образом, реакции ПОЛ в организме играют роль не только повреждающего, но и регулирующего фактора.

6. Регуляция внутриклеточного метаболизма.

В **малых** количествах АФК усиливают регенерацию, дифференцировку, пролиферацию клеток. Существует механизм передачи сигнала, называемый **АФК-зависимый сигналинг**, этим образом АФК участвуют в клеточном росте, их делении и апоптозе. Механизмы рецепции и передачи АФК-сигналов описаны пока только схематически. Основными компонентами этих схем являются АФК-чувствительные протеинкиназы и протеинфосфатазы, АФК-чувствительные транскрипт-факторы, белки теплового шока, редокс-регулируемые ионные каналы. Антиоксидантные белки, изменяя степень окисления сигнальных белков и ферментов, также участвуют во всех этих процессах.

Фагоцитоз как пример использования СРО

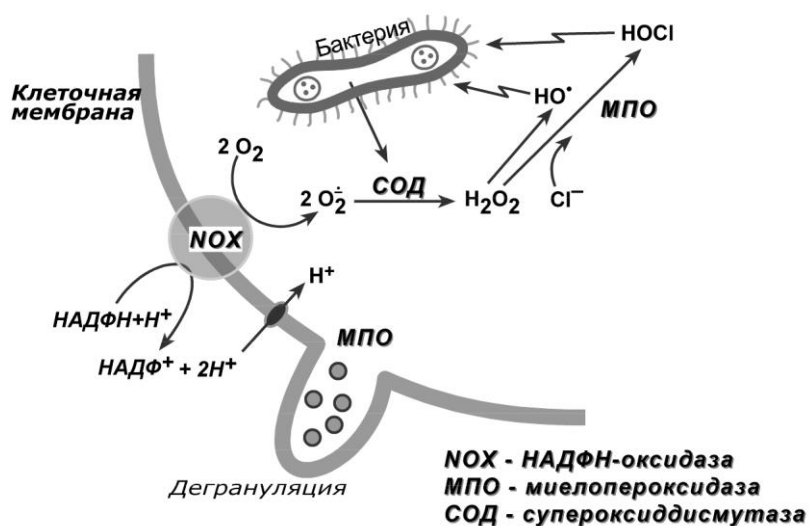
Ярким проявлением роли свободных радикалов в иммунитете является **фагоцитоз**, осуществляемый микрофагами и макрофагами: нейтрофилами, моноцитами, тканевыми мак-

рофагами, купферовскими клетками, остеокластами, клетками микроглии. После того как микроб свяжется с рецепторами фагоцитирующих клеток, начинается образование пищеварительной вакуоли, или фagosомы. Вскоре с фagosомой сливаются лизосомы, в нейтрофилах их роль выполняют азурофильные гранулы. Микроорганизм разрушается, непереваренные остатки выбрасываются наружу.

Узнавание микроба резко изменяет метаболизм фагоцита, происходит его активация, выражающаяся в усилении поглощения кислорода. Это явление получило название "дыхательного" или "**респираторного**" взрыва. Потребление кислорода клеткой возрастает в 20-40 раз. При этом 90% потребляемого клеткой кислорода быстро превращается в **супероксид анион-радикал** под действием мембранного фермента **НАДФН-оксидазы** и выделяется во внеклеточное пространство (цитотоксический эффект) или внутрь фаголизосомы (бактерицидный эффект).

Большая часть супероксид анион-радикала вне клетки **спонтанно** превращается в пероксид водорода. Другая часть супероксида превращается в H_2O_2 при участии **супероксид-дисмутазы**, постоянно присутствующей в межклеточном пространстве, или бактериальной супероксиддисмутазы.

Одновременно, дегрануляция нейтрофила сопровождается высвобождением еще одного фермента, **миелопероксидазы**, в фagosому, который используя перекись водорода H_2O_2 , образует **гипохлорную кислоту** ($HOCl$) и **гипохлорит-ион** (ClO^-).



Роль ферментов в антимикробной активности фагоцита

При наличии в среде H_2O_2 и ионов Fe^{2+} может происходить реакция Фентона, присутствие H_2O_2 и супероксида запускает реакцию Хабера-Вайса. Эти реакции сопровождаются образованием чрезвычайно активного **гидроксил-радикала**. Кроме названных АФК, фагоциты в состоянии атаковать бактерий и при помощи **оксида азота**.

Для постоянного образования непрерывно распадающихся АФК требуется непрерывный приток НАДФН, ресинтез которого связан с окислением глюкозы в пентозофосфатном пути. Таким образом, для полноценного фагоцитоза требуется, чтобы клетка активно дышала (приток кислорода) и получала достаточное количество глюкозы.

Естественно, что атакующие бактерий АФК способны повредить и собственные клетки. Для этого в лейкоцитах присутствует глутатионовая антиоксидантная система, включающая **глутатионпероксидазу** и **глутатионредуктазу**.

В результате описанных событий происходит окислительная деградация поглощенной частицы и облегчение фагоцитоза и переваривания.