

**АКТИВНЫЕ ФОРМЫ**

**КИСЛОРОДА**

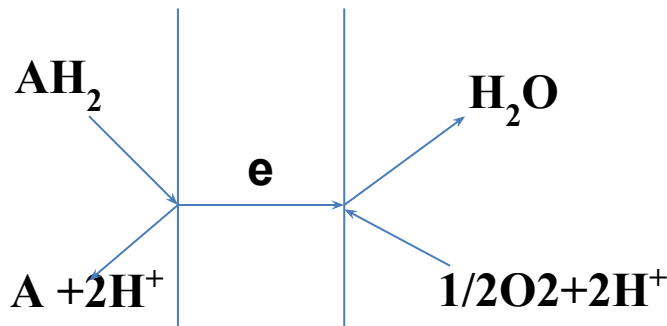
**АНТИОКСИДАНТЫ**

**Их физиологическая роль**

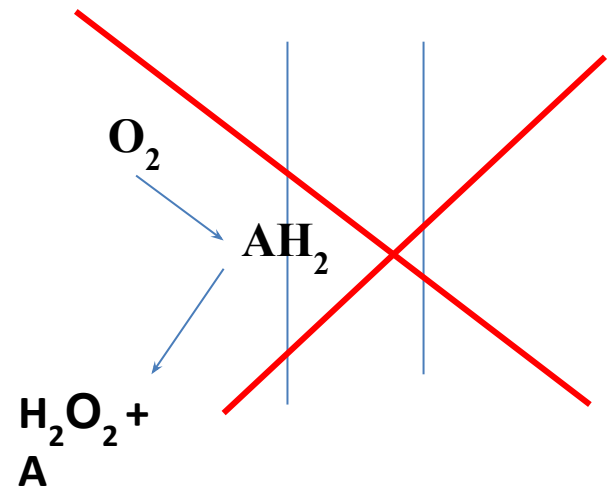
# АЭРОБНЫЕ ОРГАНИЗМЫ

При гликолитическом расщеплении одной молекулы глюкозы образуется 2 молекулы АТФ. При клеточном дыхании – 36 молекул АТФ. Следовательно, клеточное дыхание *эффективнее* гликолиза в 18 раз.

Но кислород — высокоэффективный окислитель — способен окислять *клеточные структуры*. Поэтому аэробные организмы должны иметь эффективные защитные системы против непосредственного окисления кислородом.



Да



# Активные формы кислорода (АФК)

Встречающиеся соединения кислорода в живых тканях (АФК) имеют большую химическую активность, чем молекулярный кислород.

К ним относятся:

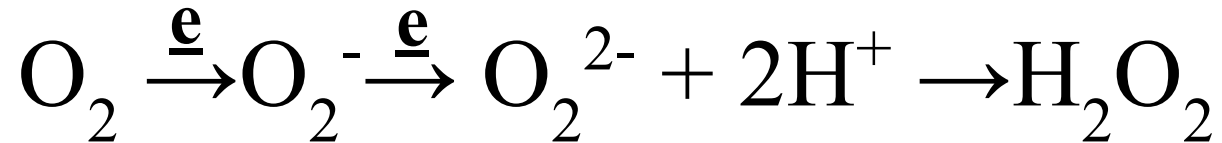
$O_2^-$  - супероксидный анион радикал;

$OH\bullet$  - гидроксильный радикал;

$H_2O_2$  - перекись водорода.

Эти соединения продуцируются в тканях аэробных организмов или образуются в

# Супероксидный анион-радикал



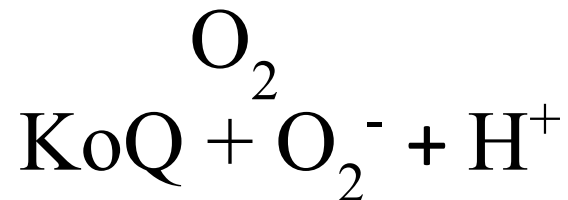
Относится к свободным радикалам, короткоживущий (от миллисекунд до секунд), способен спонтанно дисмутировать в кислород и пероксид водорода. Обладает парамагнитными свойствами.

Супероксид образуется, когда молекула кислорода захватывает один дополнительный электрон и при этом частично восстанавливается (полностью восстановленный кислород находится в молекуле воды)

# Образование супероксидного анион-радикала

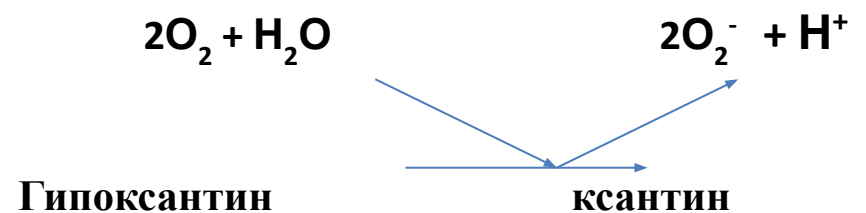
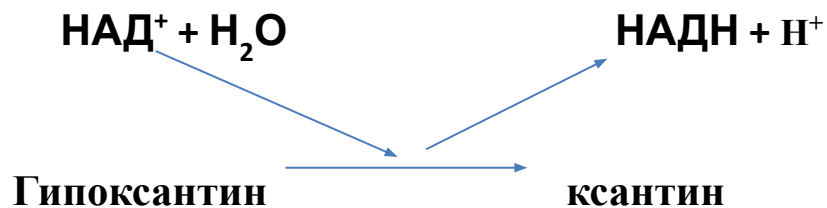
Одним из основных путей образования  $O_2^-$  является непосредственное взаимодействие с кислородом звеньев цепи переноса электронов. Коэнзим Q принимает от доноров последовательно по одному электрону, превращаясь в форму семихинона –  $CoQH\bullet$ .

Этот радикал может непосредственно взаимодействовать с кислородом, образуя  $O_2^-$ .



# Образование супероксид-анион-радикала

**Ксантиноксидоредуктаза** содержится в молоке (как антибактериальный фермент), в клетках печени и тонкого кишечника. В организме ксантиноксидоредуктаза находится в дегидрогеназной форме и катализирует окисление ксантина с участием НАД в качестве акцептора электронов с образованием мочевой кислоты. Однако при некоторых патологических состояниях (ишемия органов) активируются внутриклеточные кальций-зависимые протеазы, и ксантиндегидрогеназа подвергается протеолизу с отщеплением короткого пептида и необратимо превращается в оксидазную форму. Акцептором электронов в реакции выступает кислород



# Образование супероксид-анион-радикала

**НАДФ-оксидаза** Наряду с ксантинооксидазой мощным продуцентом супероксидного анион-радикала является НАДФН-оксидаза фагоцитирующих клеток. НАДФН-оксидаза — мультикомпонентная система. Состоит из цитозольных и мембраносвязанных ферментов. При стимуляции фагоцитов происходит быстрая самосборка цитозольных и мембранных компонентов в НАДФН-оксидазный комплекс, осуществляющий перенос электронов с цитозольного НАДФ на молекулярный кислород с образованием супероксидного анион-радикала.

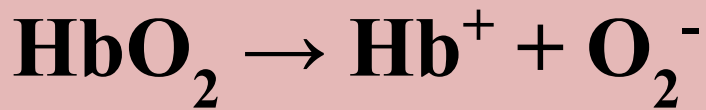
$$\text{НАДФ}\cdot\text{Н} \text{ (внутриклеточный)} + 2 \text{ O}_2 \text{ (внеклеточный)} \rightarrow \text{НАДФ}^+ \text{ (внутриклеточный)} + \text{H}^+ \text{ (внутриклеточный)} + 2 \text{ O}_2^{\cdot-} \text{ (внеклеточный)}$$

# Образование супероксид-анион-радикала

В норме эритроцитарный гемоглобин обратимо связывает кислород:



В каком-то проценте случаев происходит сбой, и один электрон Fe (II)-гема гемоглобина переходит на кислород:



В результате образуется метгемоглобин ( $\text{Hb}^+$ ) и супероксидный анион – радикал ( $\text{O}_2^-$ ).

В норме до 2% гемоглобина в эритроците может быть в состоянии метгемоглобина



# Супероксидный анион-радикал

Стандартный восстановительный потенциал пары  $O_2/O_2^-$  равен – 137 мВ.

Супероксид, как на  $1/4$  восстановленный кислород, обладает большим восстановительным потенциалом и меньшим окислительным, чем  $O_2$ .

Время жизни  $O_2^-$  в живых тканях -  $10^{-6}$  с.

Супероксид быстро дисмутирует с образованием перекиси водорода:

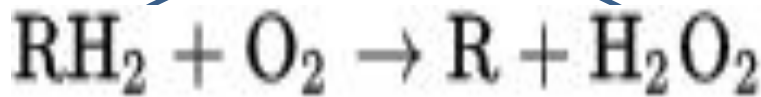


# Пероксид водорода

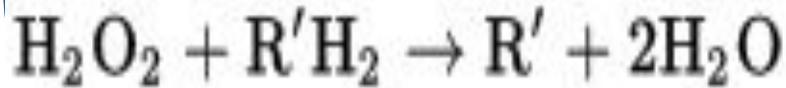
Перекись водорода образуется при дисмутации супероксидов, а также при окислении молекулярным кислородом различных органических субстратов, катализируемых оксидазами.

Наибольшее её количество содержится в т.н. пероксисомах: органеллах эукариотической клетки, ограниченных мембраной, и содержащих большое количество оксидаз, продуцирующих супероксид и перекись. Имеет размер от 0,2 до 1,5 мкм

$O_2$



оксидаза

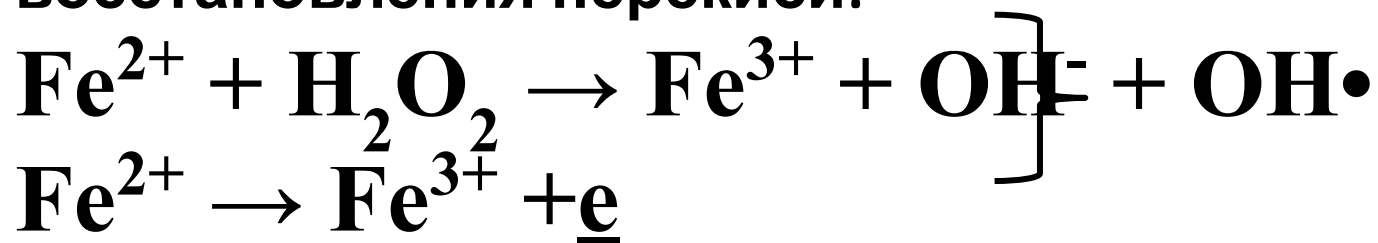


пероксидаза

Функции пероксисом в клетках разных типов различны: окисление жирных кислот, разрушение токсичных соединений. Наряду с митохондриями пероксисомы являются главными потребителями  $O_2$  в клетке. Ферменты пероксисом используют молекулярный кислород для отщепления атомов водорода от органических субстратов с образованием перекиси водорода

$$E_0([\text{H}_2\text{O}_2] [\text{H}^+] / [\text{H}_2\text{O}] [\text{OH}\cdot]) = +320 \text{ мВ}$$

В перекиси водорода кислород восстановлен наполовину. Поэтому у неё преобладают окислительные свойства. Ферменты, катализирующие окисление пероксидом различных веществ, называются *пероксидазами*. Так, до молекулярного йода, окисляются фенолы, формальдегид, иодид-ион. Токсичность  $\text{H}_2\text{O}_2$  заключается в способности окислять физиологически значимые соединения (гормоны, отдельные аминокислоты). Но главным образом, токсичность вызвана возможностью её распада с образованием гидроксильного радикала  $\text{OH}\cdot$ , что происходит в процессах одноэлектронного восстановления перекиси:



# Гидроксильный радикал $\text{OH}\bullet$

$$E_0([\text{HO}\bullet] [\text{H}^+]/[\text{H}_2\text{O}]) = +2180$$

МВ

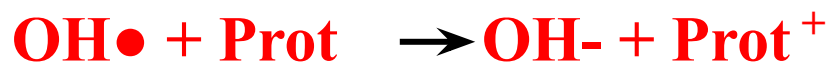
$$E_0([\text{HO}\bullet]/[\text{OH}^-]) = +1900 \text{ МВ}$$

*Самый реакционноспособный* радикал среди АФК.

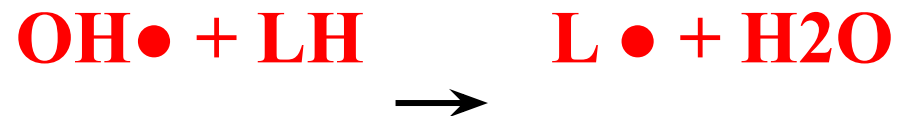
Время жизни в биологической среде от  $10^{-9}$  с.

Гидроксильный радикал способен окислять углеводы, нуклеиновые кислоты (что может привести к мутации или повреждению генов), липиды (вызывая перекисное окисление липидов) и аминокислоты

$\text{OH}\bullet$  окисляет аминокислоты белков:



$\text{OH}\bullet$  окисляет липиды:



# В присутствии кислорода в биомембранах развивается перекисное окисление липидов



- 



- 

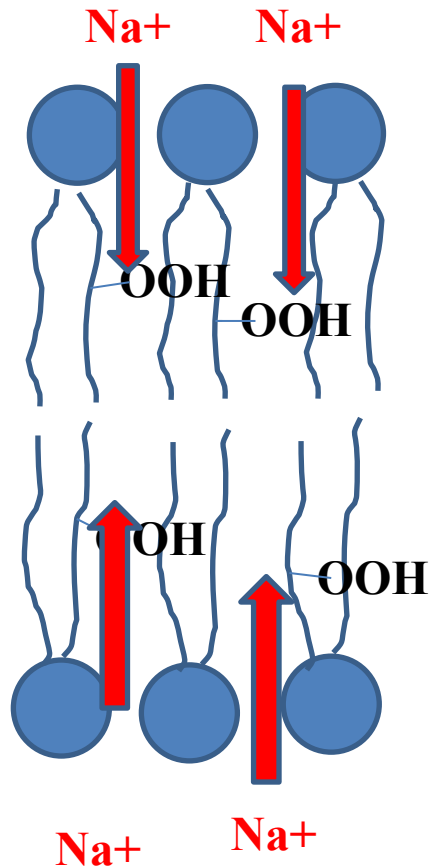


инициация

разветвление цепи

обрыв цепи

# Повреждение клеток в результате развития перекисного окисления липидов (ПОЛ)



В результате появления в гидрофобном слое мембран гидрофильных зон за счёт образования гидропероксидов жирных кислот в клетки могут проникать ионы натрия, кальция, что приводит к набуханию клеток, органелл и их разрушению

Активация перекисного окисления характерна для многих заболеваний: дистрофии мышц (болезнь Дюшенна), болезни Паркинсона. ПОЛ разрушает нервные клетки в стволовой части мозга при атеросклерозе, развитии опухолей. Перекисное окисление активируется в тканях, подвергшихся сначала ишемии, а затем реоксигенации, что происходит, например, при спазме коронарных артерий и последующем их расширении

Та же ситуация — при образовании тромба в сосуде, питающем миокард. Формирование тромба приводит к окклюзии просвета сосуда и развитию ишемии в соответствующем участке миокарда (гипоксия ткани). Если принять быстрые лечебные меры по разрушению тромба, то в ткани восстанавливается снабжение кислородом (реоксигенация). Показано, что в момент *реоксигенации* резко возрастает образование АФК, повреждающих клетку. Таким образом, несмотря на быстрое восстановление кровообращения, в соответствующем участке миокарда происходит повреждение клеток за счёт активации перекисного окисления.

Изменение структуры тканей в результате ПОЛ можно наблюдать на коже: с возрастом увеличивается количество пигментных пятен на коже, особенно на дорсальной поверхности ладоней. Этот пигмент называют *липофусцин* (смесь липидов и белков, связанных между собой поперечными ковалентными связями и денатурированными в результате взаимодействия с химически активными группами продуктов ПОЛ). Пигмент фагоцитируется, но не гидролизуется ферментами лизосом, и поэтому накапливается в клетках, нарушая их функции

# Защита клеток и тканей организма от АФК

Прежде всего, необходимо минимизировать возможность образования гидроксил-радикала  $\text{OH}\cdot$ . Для этого нужно эффективно удалить вещества, способствующие его образованию, т.н. «антиокислительные ферменты»:

*Супероксид-дисмутаза;*

*Каталаза;*

*Глутатион-пероксидаза;*

*Гемовые пероксидазы*



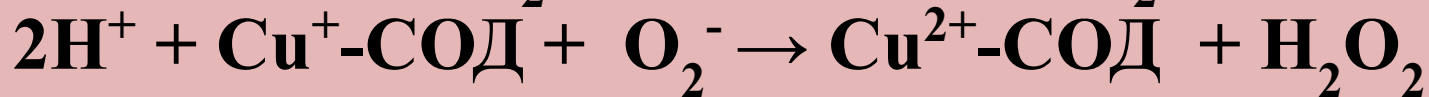
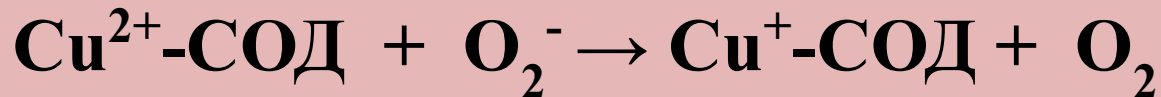
# Супероксид-дисмутаза (СОД)

Катализирует дисмутацию супероксидов до перекиси водорода.



Есть несколько изоферментов. Наиболее известный – Cu-Zn содержащий фермент.

Катализ осуществляется следующим образом:



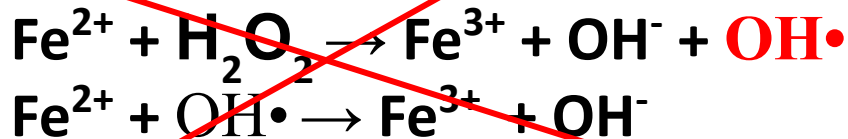
СОД на 3 порядка увеличивает скорость дисмутации супероксидов до перекиси водорода.

СОД – внутриклеточный цитозольный фермент.

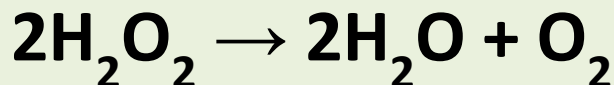
# Разложение пероксида водорода

Перекись водорода – продукт полувосстановления кислорода (степень окисления: -1). В связи у  $\text{H}_2\text{O}_2$  – сильно выраженная окислительная активность. Наибольшая её концентрация в живых клетках – в пероксисомах и в водянистой влаге глаза (десятки микромоляр, при катаракте – до миллимоля). Но в целом, концентрация в живых тканях не достаточна для эффективного окисления веществ без участия катализатора. Основная опасность перекиси водорода – возможность распада с образованием высокореакционноспособного гидроксил-радикала  $\text{OH}\cdot$ .

*Задача организма – ликвидировать перекись без образования свободнорадикальных продуктов*

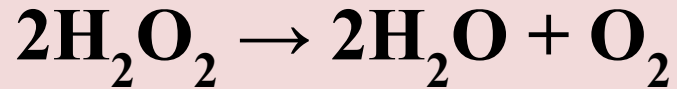


не  
т



да

# Разложение перекиси водорода. Каталаза

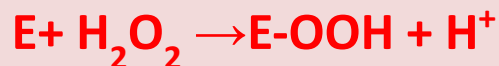


Четырехсубъединичный гем-содержащий фермент каталаза обеспечивает разложение перекиси водорода на кислород и воду по указанной схеме без образования свободнорадикальных форм кислорода. По сути, это окисление одной молекулой  $\text{H}_2\text{O}_2$  другой такой же молекулы. Для этого необходимо, чтобы одна молекула  $\text{H}_2\text{O}_2$  на какой-то момент приобрела более высокий окислительный потенциал, чем другая. Разность потенциалов должна быть такой, чтобы выполнялось равенство:

$$2F\Delta\phi = 2G^0\text{H}_2\text{O} - 2G^0\text{H}_2\text{O}_2$$

То есть:  $\Delta\phi = 2(G^0\text{H}_2\text{O} - G^0\text{H}_2\text{O}_2)/2F$

Это достигается образованием т.н. соединения I (E-OOH, где E-субъединица фермента):

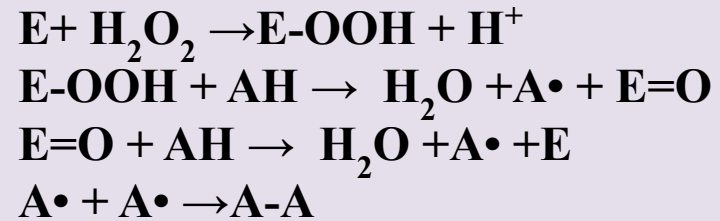
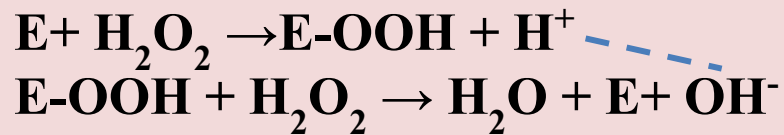
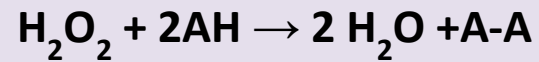
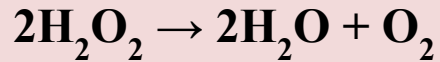


Соединение I имеет окислительный потенциал выше, чем перекись, который выступает по отношению к ней как двухэквивалентный окислитель



# Разложение перекиси водорода

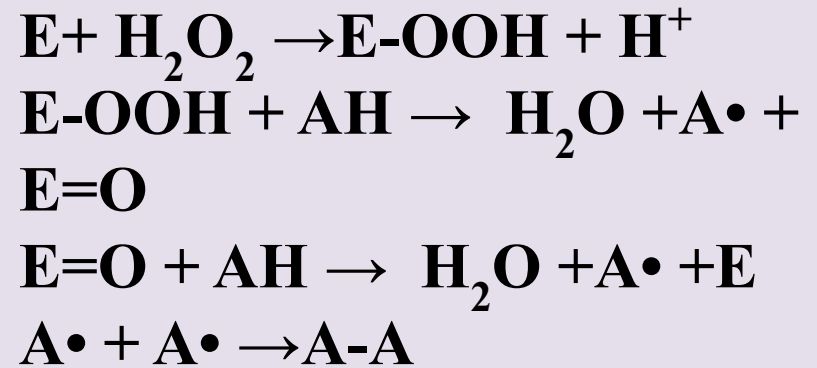
## Гем-содержащие пероксидазы



Каталаза эффективна при сравнительно большой концентрации перекиси, поскольку соединению I также необходима молекула перекиси. Каталаза очень специфичный к субстрату фермент. Гем-содержащие пероксидазы катализируют окисление перекисью водорода веществ, концентрация которых в живых тканях многократно больше перекиси.

Вначале образуется такое же соединение I, как и у каталазы. Оно имеет больший окислительный потенциал, чем свободная перекись. Так как большинство окисляемых субстратов – одноэквивалентные доноры, то соединение I пероксидазы сначала присоединяет один электрон, превращаясь в соединение II (E=O), которое, являясь уже одноэквивалентным окислителем, окисляет вторую молекулу субстрата.

**Каталаза – исключительно внутриклеточный фермент. Защиту от**



*Гем-содержащие пероксидазы* специфичны к окислителю, но не специфичны к субстрату. Многие физиологически значимые вещества синтезируются в реакциях, катализируемых гем-содержащими пероксидазами.

*Меланин* – продукт окисления и последующей полимеризации тирозина.

*Тиреоидные гормоны* – продукты взаимодействия тирозина и атомарного йода, являющегося, в свою очередь, продуктом окисления йодида ( $\text{I}^- \rightarrow \text{I}\cdot$ )

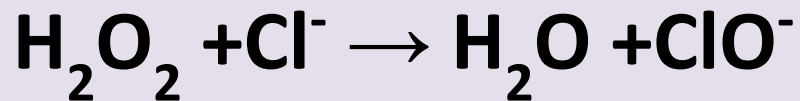
Защитный секрет насекомых – продукт пероксидазного окисления ряда соединений

# Разложение пероксида водорода. Гем-содержащие пероксидазы

В молоке **лактопероксидаза** окисляет тиоцианат до высокореакционноспособных свободнорадикальных продуктов. Эта реакция играет большую роль в **антибактериальной защите молока.**

**Миелопероксидаза лейкоцитов**

катализирует окисление галоид – ионов:

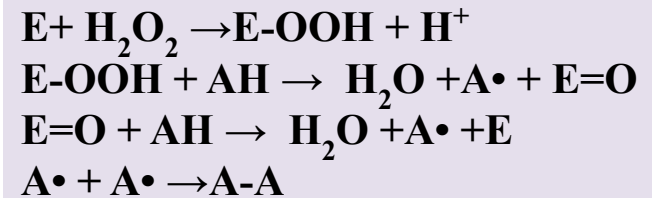


Образующийся гипохлорит – мощный окислитель и эффективный антибактериальный

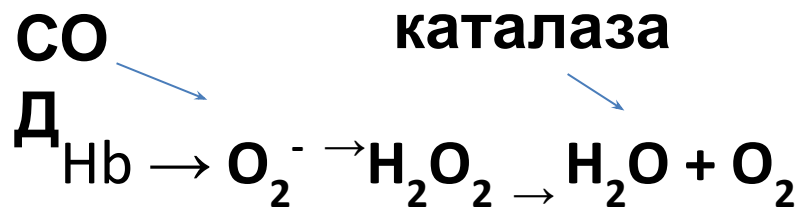
**Метгемоглобин** — эффективная гем-содержащая пероксидаза — не специфичен к окисляемому субстрату. Его субстратом становятся аминокислоты и полипептиды — части структурных и ферментативных белков, аскорбат, стероидные гормоны. Поэтому содержание метгемоглобина более 2% от общего числа гемоглобина, считается неприемлемым, ведущем к нарушению структуры эритроцита и к гемолизу.

Не так опасна свободная перекись, как перекись, связанная с метгемоглобином, т.к. она приобретает больший окислительный потенциал. Очень опасен метгемоглобин, вышедший из эритроцита в кровяное русло. Для его связывания есть фермент **гаптоглобин**.

# Функции эритроцита



## 1. Предотвращение окисления гемоглобина

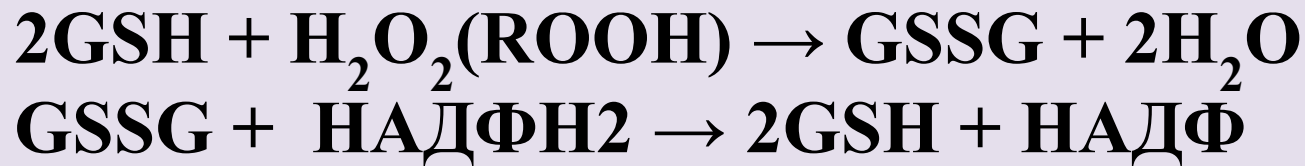


СОД и каталаза, присутствующие в эритроците, эффективно разрушают постоянно возникающие АФК, защищают гемоглобин от окисления. Восстановление метгемоглобина осуществляет эритроцитарная метгемоглобинредуктаза.

## 2. Предотвращение попадания метгемоглобина в кровяное русло



# Глутатион-пероксидаза



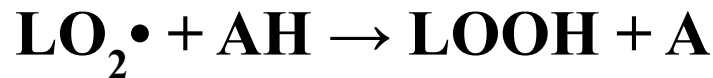
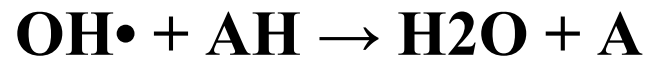
**Глутатион** — пероксидаза, специфичная к окисляемому субстрату и не специфичная к окислителю, которым могут быть и перекись водорода и липидные гидроперекиси.

Известны **мембранная** и **цитозольная** формы. Окисленный глутатион восстанавливается глутатион-редуктазой, использующей в качестве донора НАДФН<sub>2</sub>.

Таким образом, глутатион-пероксидазный путь разложения перекиси, в отличие от каталазного, энергозатратен

# Мембранные антиоксиданты

Аскорбат, токоферол, дибунол, нафтолы, танины



Последний рубеж защиты клеточных структур от АФК. Взаимодействуют непосредственно с уже образовавшимися свободными радикалами. В результате чего образуются соединения с низкой

# В присутствии кислорода в биомембранах развивается перекисное окисление липидов



•

**цепи**



**разветвление**

**обрыв цепи**

**Окисление мембранных липидов — цепной самоускоряющийся процесс:**  
распад гидроперекисей порождает ещё большее количество гидроперекисей, которые, распадаясь, порождают новые гидроперекиси. Следовательно, относительно малые концентрации соединений, эффективно нейтрализующих гидроксил-радикалы, алкильные, алкоксильные и алкил-пероксидные радикалы, могут предотвратить развитие цепи