

ОБЕЗВРЕЖИВАНИЕ СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ



Свободные радикалы – причина многочисленных нарушений, приводящих к возникновению целого ряда болезней.

Свободный радикал - это молекулярная частица (атом или молекула), имеющая на внешней электронной оболочке один или несколько неспаренных электронов.

Радикалы обладают высокой реакционной способностью:

- стремятся вернуть себе недостающий электрон, отняв его от окружающих молекул;
- или избавляются от «лишнего» электрона, отдавая его другим

Молекула кислорода (диоксиген)

содержит на внешней оболочке два неспаренных электрона.

Диоксиген – это бирадикал и, подобно другим радикалам, обладает высокой реакционной способностью.

Неспаренный электрон в радикалах принято обозначать точкой.

Радикал гидроксила - HO^\bullet , радикал пероксида водорода - HOO^\bullet , радикал супероксида- $\text{OO}^{\bullet-}$ или $\text{O}_2^{\bullet-}$.

Все радикалы, образующиеся в организме, можно разделить на:

- природные и чужеродные;
- первичные (могут быть полезными), вторичные (чаще повреждающие) и третичные (радикалы антиоксидантов).

Классификация биорадикалов



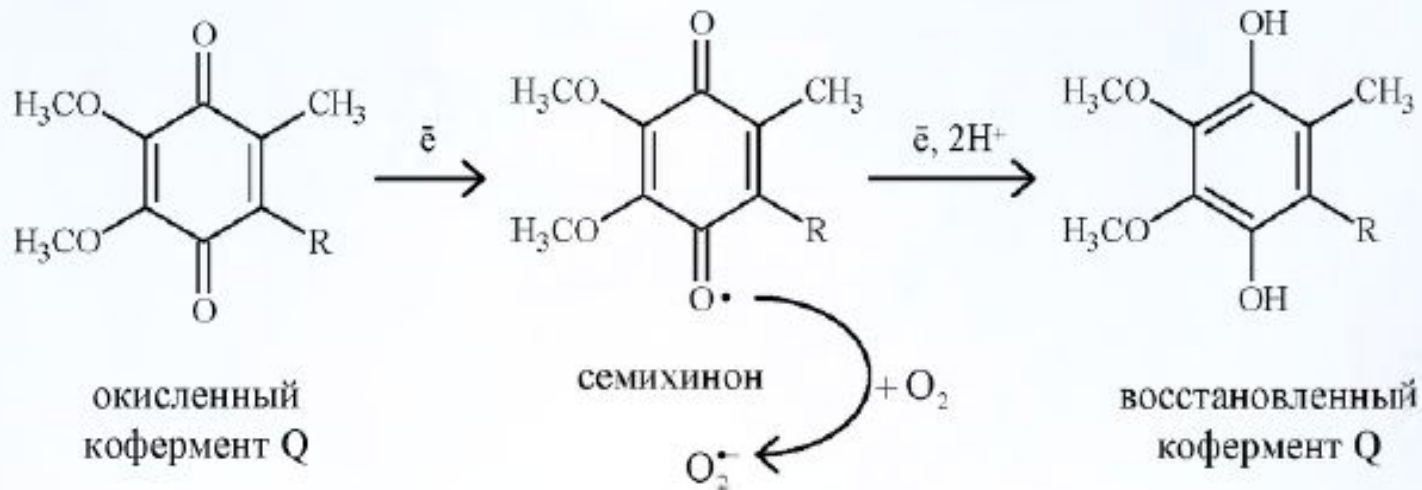
Для биологических систем наиболее важны кислородные свободные радикалы, и реактивные молекулы – пероксиды, пероксинитрит и гипохлорит.

Около 95% всего потребляемого кислорода в клетке восстанавливается в митохондриях до H_2O в процессе окислительного фосфорилирования.

Остальные 5% процентов в результате различных реакций превращаются в активные формы кислорода (АФК):

1) в результате «утечки» электрона в электронтранспортной цепи митохондрий

(I и III комплексы - НАДН:убихинол-
оксидоредуктаза и убихинол:цитохром c-
оксидоредуктаза соответственно) с
участием CoQ .



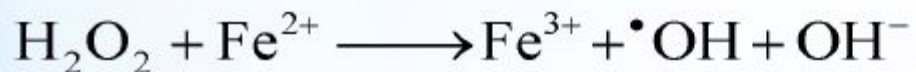
2) в результате «утечки» электрона в электронтранспортной системе мембран эндоплазматического ретикулума и ядра, включающие в себя цитохромы P-450 и b5, а также НАДФН- и НАДН-зависимые редуктазы (в том числе НАДФН-цитохром P-450-зависимую редуктазу в микросомах).

3) **при работе ферментов:** НАДФН-оксидазы, ксантинооксидазы, оксидазы аминокислот, циклооксигеназы, липоксигеназы, NO-синтазы, моноаминооксидазы и др.

4) в процессе функционирования **фагоцитов** (гранулоцитов, моноцитов крови) и тканевых макрофагов. Для борьбы с бактериями образуют O_2^- при активации НАДФН-оксидазного комплекса



5) в присутствии ионов Fe^{2+} (а также ионов других металлов переменной валентности Cu^{2+} , Co^{2+}), способствующих образованию гидроксильных радикалов посредством реакции Фентона:



6) при автоокислении гемоглобина $\text{Hb}(\text{Fe}^{2+})$:



7) при действии на организм УФ, радиации и др.

У всех аэробных организмов супероксидный анион-радикал кислорода, гидроксильный радикал, пероксид водорода, монооксид азота и другие являются обычными метаболитами, образующимися в нормально функционирующих клетках.

Образующиеся радикалы взаимодействуют между собой и с другими молекулами и ионами, это продуцирует новые токсические продукты.

Образование биорадикалов в организме можно разделить на две группы:

- 1. физиологически значимые (полезные) пути;**
- 2. нефизиологические пути.**

Деление очень относительное.

1. Физиологические пути ().

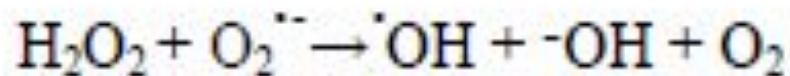
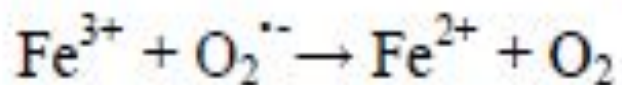
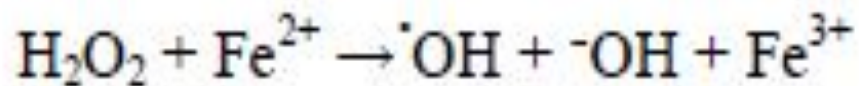
При внедрении в организм патогенов усиливается образование радикалов кислорода и пероксида водорода, происходит т.н. «дыхательный взрыв» (увеличение потребления кислорода нейтрофилами, макрофагами и др.).

В пероксисомах оксидазы воостанавливают кислород до пероксида водорода (уратоксидаза, гликолатоксидаза, оксидаза L-аминокислот).

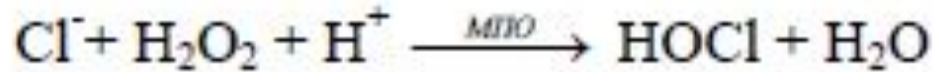
Радикалы и активные формы кислорода (АФК) обладают бактерицидным действия.

Физиологические механизмы реализации бактерицидного действия АФК:

- участие в образовании активных оксидантов в реакции Хабера- Вейса. Вносят небольшой вклад.



- **вовлечение пероксида водорода в реакции, катализируемые миелопероксидазой (МПО),** в результате образуются активные формы хлора, в первую очередь гипохлорит



Гипохлорит является чрезвычайно эффективным бактерицидным агентом, способным разрушить бактериальные стенки, основной бактерицидный агент нейтрофилов.

Т.о., образование гипохлорита под действием МПО играет важную роль в процессах неспецифического иммунитета и, в частности, фагоцитоза.

- **реакция анион-радикала кислорода с монооксидом азота и образование пероксинитрита.**

NO образуется из *L*- аргинина в результате ферментативной реакции, катализируемой NO-синтетазой.

Пероксинитрит является важным цитотоксическим агентом, продуцируемым макрофагами и действующим на патоген.

К физиологическим механизмам можно также отнести продукцию АФК при работе липоокси-геназ и циклооксигеназ.

Кроме бактерицидного действия H_2O_2 участвует в сборке и разборке биологических мембран, запуске митогенеза, процессах клеточной пролиферации и дифференцировки, деградации белков.

H_2O_2 принимает участие в действии инсулина и сам обладает инсулиноподобным действием.

АФК нужны для протекания ПОЛ в стационарном режиме, выполняют сигнальную и адаптационную функции - являются вторичными послединиками в передаче гормональных сигналов.

2. Механизмы нефизиологической продукции биорадикалов в организме:

- окисление органических соединений, в первую очередь фенолов и полифенолов;
- утечка электронов с компонентов электронтранспортных цепей (митохондриальной, ЭПР) при переносе на кислород;
- биотрансформация и токсификация некоторых ксенобиотиков монооксигеназами и другими оксидоредуктазами;
- спонтанное окисление нейромедиаторов;
- при переходе оксигемоглобина в гемоглобин.

Образование АФК в организме происходит под действием:

- ионизирующей радиации;
- ультрафиолетового излучения;
- магнитного и электрического полей;
- гипероксидации и др.

Количество АФК возрастает при переломах, ожогах, обморожениях, старении...

Окислительный стресс (оксидативный стресс, от англ. *oxidative stress*) — нарушение обмена веществ и энергии, накопление активных повреждающих агентов (свободных радикалов, прооксидантов, АФК), инициирующих повреждение клеток и ведущих к развитию различных патологических состояний.

Оксидативный стресс, как правило, вызывается и сопровождается массированным образованием свободных радикалов.

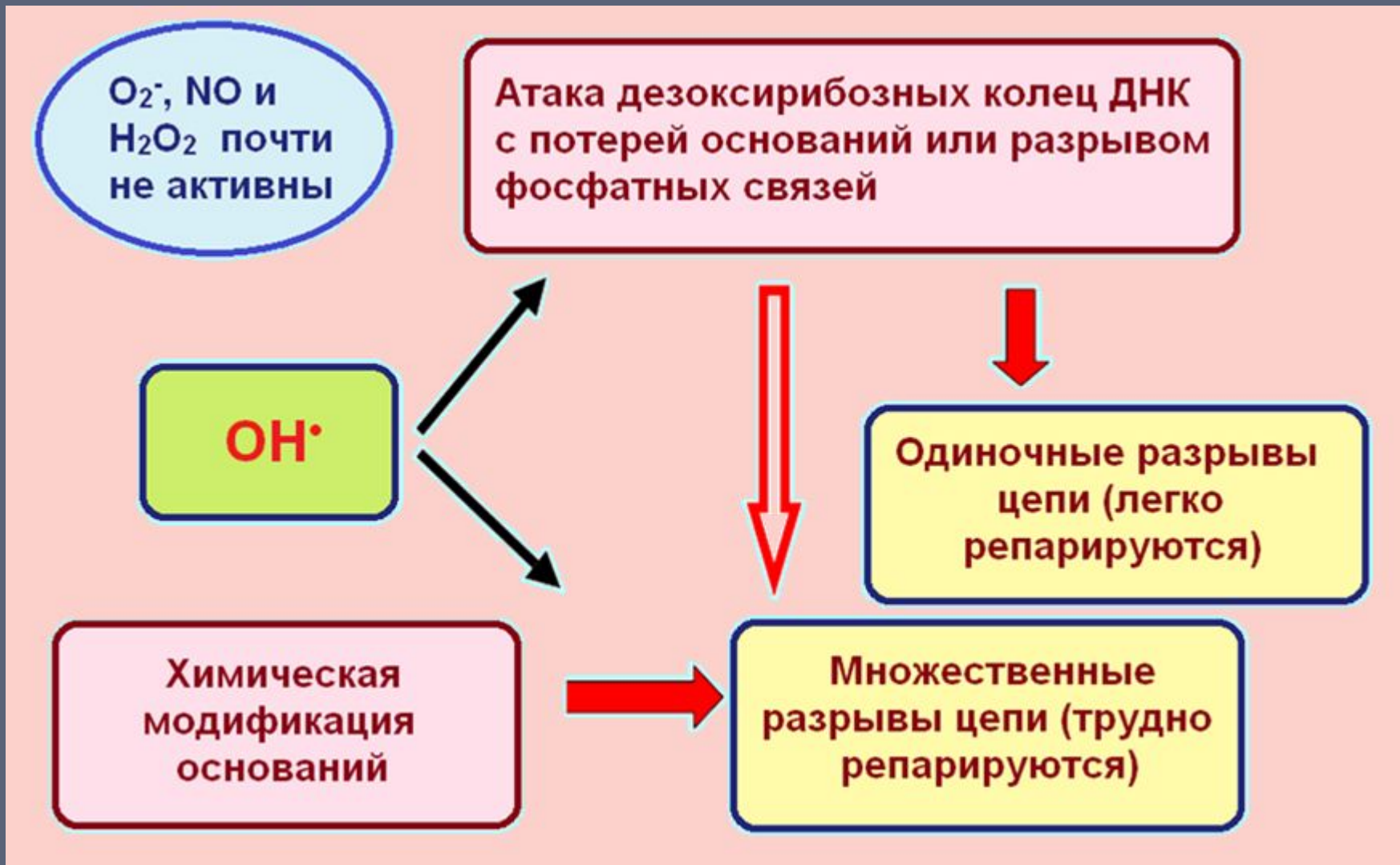
Окислительный стресс развивается, если равновесие между свободнорадикальными (окислительными) и антиоксидантными реакциями в организме смещается в сторону активации свободнорадикального окисления, а собственные антиоксиданты не могут его компенсировать.

В результате окислительного стресса происходит повреждение клеточных мембран, инактивация или трансформация ферментов, подавление деления клеток и накопление инертных полимеров типа липофусцина.

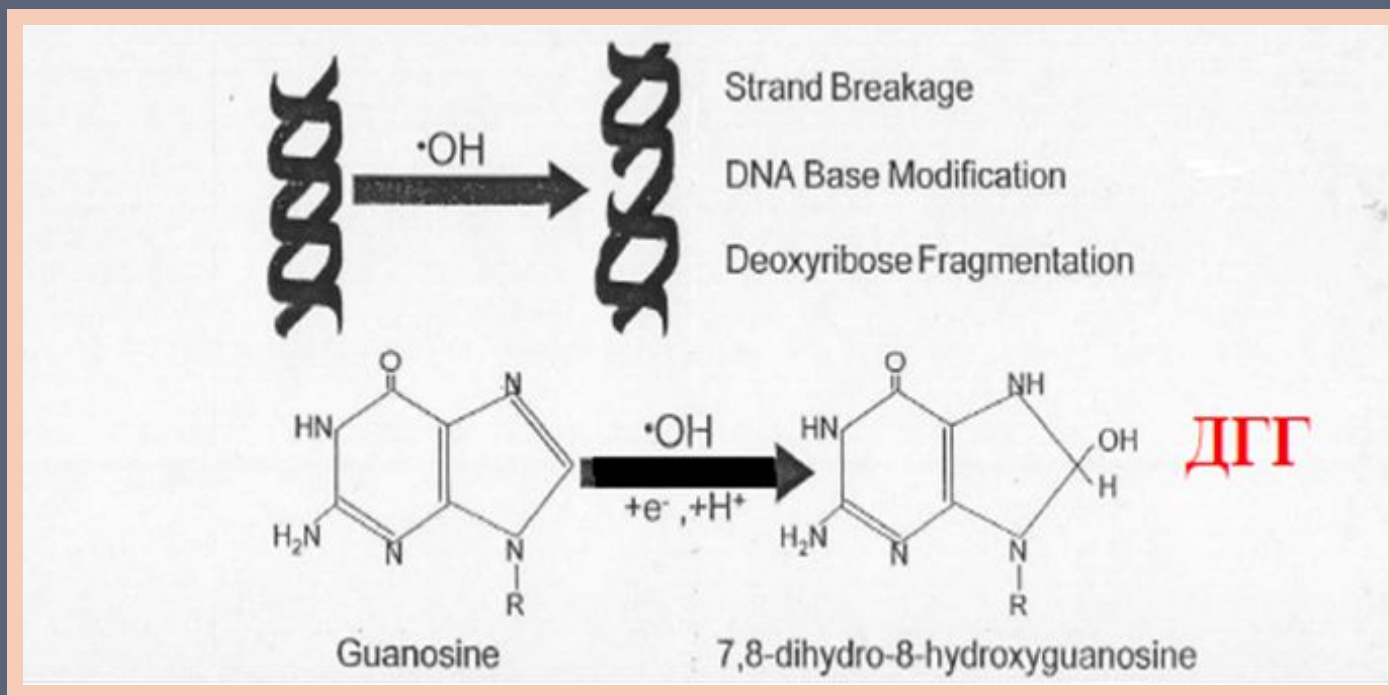
Переокисление липидов приводит к повреждению макромолекул и мембран. Это влечет за собой нарушение барьерной функции клеточных мембран, разбалансировку процессов окисления и фосфорилирования в митохондриях. Дефицит энергии отражается на всех процессах, включая пролиферацию, дифференцировку клеток, синтез различных веществ.

Экзогенные факторы прооксидантного действия	Эндогенные факторы прооксидантного действия
1. Табачный дым	1. “Утечка” свободных радикалов из митохондрий, ЭПР, пероксисом, фагоцитов,
2. Чрезмерная физическая нагрузка	2. Гипоксия, гипероксия
3. Загрязнение воздуха выбросами транспорта и промышленных предприятий	3. Воспаление
4. Радиационное излучение	4. Канцерогенез
5. Ультрафиолетовое излучение	5. Ишемическая болезнь
6. Ксенобиотики, в том числе лекарства, анестетики, пестициды, промышленные растворители	6. Гепатопатия и др. заболевания органов
7. Стресс, переутомление	7. Инфекционные заболевания
8. Озон	8. Старение
9. Компоненты пищи (некачественный, окисленный жир, избыток полиненасыщенных жирных кислот,	

Модификация нуклеиновых кислот ДФК

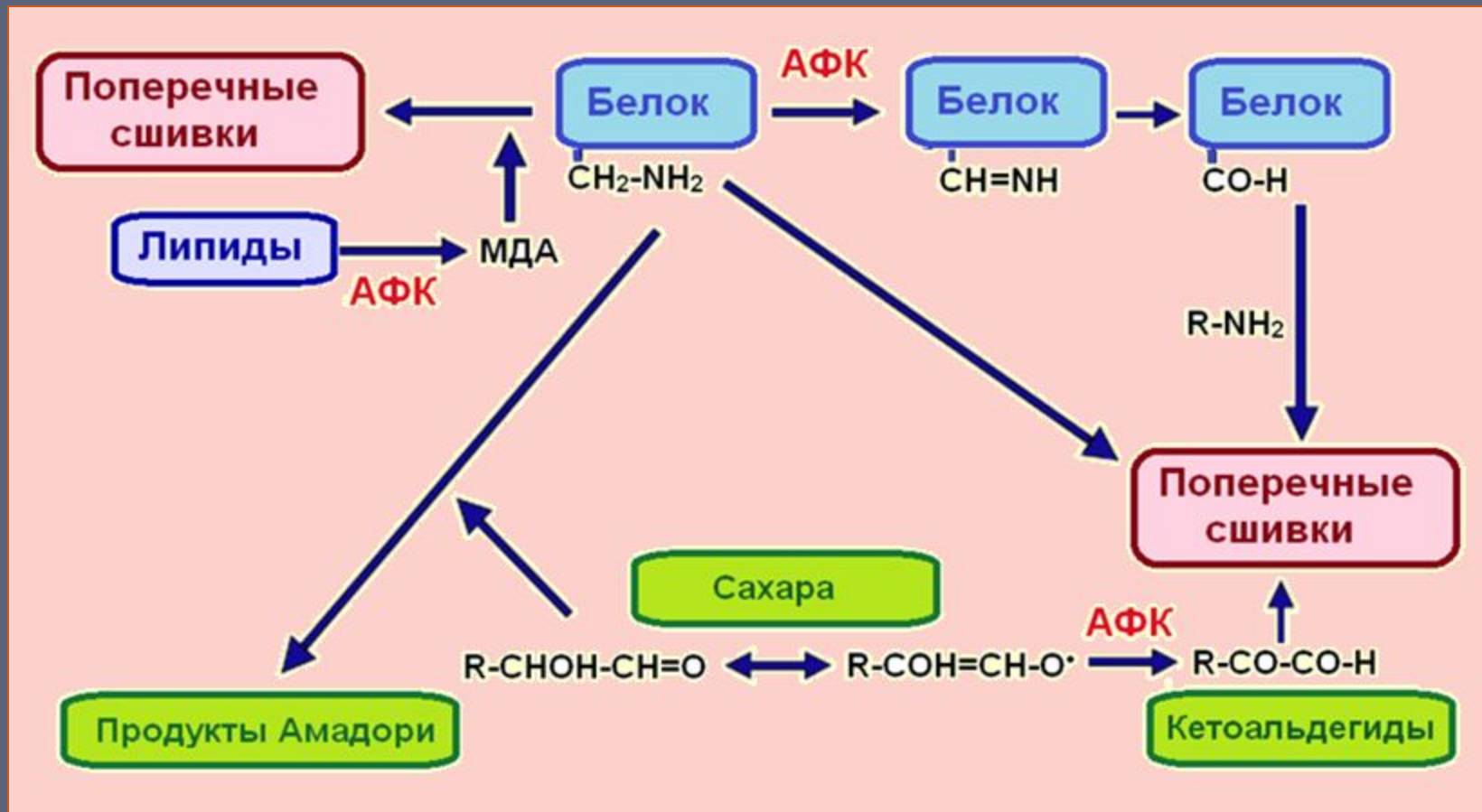


Окислительная модификация ДНК



•ОН-радикалы, образующиеся в непосредственной близости от молекулы ДНК из H_2O_2 и ионов Cu или Fe , осуществляют разрыв цепи, фрагментацию дезоксирибозы и модификацию оснований. Показан последний случай, приводящий к образованию окисленного гуанозина, наименее репарируемого основания. Служит маркером окислительного стресса

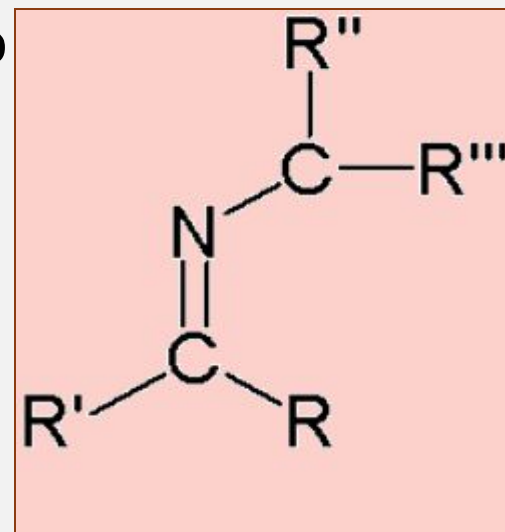
Взаимодействие белков, липидов и углеводов при оксидативном стрессе



Продукты Амадори – модифицированные белки (при образовании с углеводами оснований Шиффа формируют более стабильные гликозилированные продукты). Образуются также при **неферментативном гликозилировании белков.**

Шиффово основание (или азометин) — функциональная группа, названная в честь Гуго Шиффа. Содержит двойную связь углерод-азот, где азот соединен с арильной или алкильной группой, но не с водородом.

Шиффовы основания обладают общей формулой $R_1R_2C=N-R_3$, где R_3 — арильная или алкильная группа, которая делает Шиффово основание стабильной имино-группой.



Важное значение играет процесс, протекающий в организме под действием свободных радикалов – **процесс перекисного окисления липидов (ПОЛ)**

В результате ПОЛ образуются **гидропероксиды** липидов. Подвергаясь дальнейшим превращениям, особенно в присутствии железа (II), они приводят к образованию **альдегидов, диальдегидов, кетонов, кислот, эпоксидов** и др. высокорреакционных соединений.

При выходе процессов ПОЛ из под контроля продукты ПОЛ способны, реагируя с биомолекулами, привести к полному распаду клеточных мембран и клетки в целом.

Классификация ПОЛ:

- спонтанное, инициированное свободными радикалами и аскорбатзависимое;
- ферментативное – в результате работы липооксигеназ и циклооксигеназ

Повреждающие эффекты продуктов ПОЛ



HNE – гидроксиноненали (диальдегиды)

Потеря контроля над АФК в **способствует появлению более 100 различных заболеваний.**

Начинается разрушительная цепная реакция, которая губительно действует на живые клетки. В результате организм начинает преждевременно СТАРЕТЬ, развиваются патологические изменения, которые могут стать причиной:

- рака, возникшего из-за экзогенных факторов;
- гипертонической болезни;
- ишемической болезни сердца и мозга,
- атеросклероза (вызывая коронарные, церебральные, периферические нарушения кровообращения);
- легочных заболеваний (хронический, обструктивный бронхит, бронхиальная астма);
- диабета, ослабления зрения, памяти и др.

Ученые предполагают, что начальной стадией многих заболеваний – от простого кашля до онкозаболевания – является именно большое количество свободных радикалов в организме, снижение антиоксидантной защиты.

Баланс АФК в живых клетках



Антиоксидантная система

Природа создала сложную антиоксидантную систему, способную нейтрализовать свободные радикалы, возникающие в результате обмена веществ, и избежать оксидативного стресса.

Биооксиданты обладают способностью реагировать с активными формами кислорода, пероксидными радикалами липидов, инактивировать их и, таким образом, обрывать цепи свободнорадикального окисления.

Факторы антиоксидантной защиты клеток

Единой универсальной классификации антиоксидантов нет.

Высказывается точка зрения о нескольких уровнях защиты клеток макроорганизма от активных форм кислорода (Петрович Ю.А., Гуткин Д.В., 1986):

1-й уровень - системная защита клеток за счет значительного снижения напряжения O_2 в тканях по сравнению с атмосферным воздухом;

2-й уровень - обеспечивается в процессе четырехэлектронного восстановления основной массы внутриклеточного O_2 при участии цитохромоксидазы без освобождения свободных радикалов;

3-й уровень - ферментативное удаление образовавшихся супероксидного анион-радикала и H_2O_2 ;

4-й уровень - наличие ловушек свободных радикалов (антиоксидантов);

5-й уровень - ферментативное восстановление гидропероксидов полиненасыщенных жирных кислот.

Число эндогенных соединений, относимых к антиоксидантам, постоянно возрастает.

Некоторыми авторами предпринята следующая попытка классификации антиоксидантов (2 группы).

1. Высокмолекулярные соединения:

- ферменты антиоксидантной защиты – СОД, церулоплазмин, каталаза, глутатионзависимые ферменты, обеспечивают комплексную антирадикальную защиту биополимеров.

Для ферментативных антиоксидантов характерны высокая специфичность, строго определенная органная и клеточная локализация, а также использование в качестве катализаторов металлов Cu, Fe, Mn, Zn, Se (Меньшикова Б.Е., Зенков Н.К., 1993);

- белки, способные связывать ионы Fe и Cu, являющиеся катализаторами свободнорадикальных процессов. К их числу относят альбумины крови, трансферрин, ферритин, лактоферрин, церулоплазмин. Белки-восстановители - тиоредоксины и др.

Многие из них весьма эффективны, но слабо проникают через мембраны и тканевые барьеры (Белизи С. и соавт., 1997; Синичкин А.Н., 1997; Синичкин А.А., Медведева И.А., Маслова М.Н., 1997; Кошпаева Е.С., 1997).

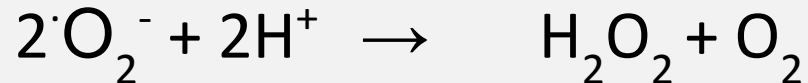
2. Низкомолекулярные антиоксиданты:

некоторые аминокислоты, полиамины, мочевины, глутатион, аскорбиновая кислота, билирубин, α -токоферол, витамины группы А, К, Р, убихинон, изофлавоны и др. (Соколовский В.В., 1988, Кения М. В., Лукиш А.И., Гуськов Е.П., 1993).

Ферментативная защита

Супероксиддисмутаза (СОД; КФ 1.15.1.1.)

катализирует реакцию восстановления анион радикала кислорода ($\cdot\text{O}_2^-$) до пероксида водорода, т.о. она является ключевым ферментом антиоксидантной системы аэробных организмов.



В клетках эукариот СОД имеет несколько форм:

а) медь и цинксодержащая СОД – локализована в цитозоле, межмембранном пространстве митохондрий, лизосомах и пероксисомах;

б) марганецсодержащая СОД – локализована в матриксе митохондрий и у прокариотов;

в) позднее был выявлен и железосодержащий фермент, встречающийся только у прокариотов;

г) экстрацеллюлярная форма СОД – функционирует в плазме крови, лимфе и синовиальной жидкости.

Каталаза (Кат.; КФ 1.11.1.6) обладает свойствами разлагать пероксид водорода по двум путям: каталазному или пероксидазному.

В обоих случаях процесс идёт через образование промежуточного фермент-субстратного комплекса (компл.1).

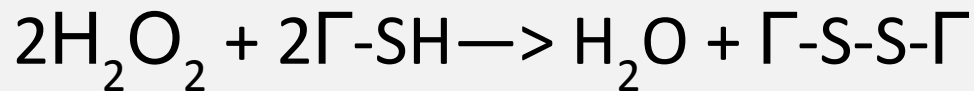


В первом случае (каталазный путь – реакции 1, 2), разложение 2-х молекул H_2O_2 идет с образованием H_2O и триплетного кислорода.

Во втором (пероксидазный путь – реакции 1, 3), одна молекула H_2O_2 образует фермент-субстратный комплекс (компл.1) и окисляет донор водорода (AH_2). В качестве доноров водорода могут выступать одноатомные спирты, органические доноры водорода, ксенобиотики, например, аминобифенилы и др.

Пероксидазы — подкласс геминовых ферментов. Восстанавливают пероксид водорода до H_2O , при этом обязательно идет окисление восстановителя.

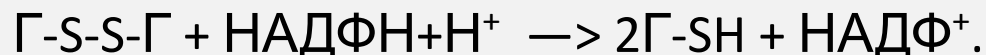
Наиболее активна глутатионпероксидаза (селен содержащий фермент). Донором водорода (вторым субстратом) является глутатион — γ -глутамил-цистеил-глицин.



$\Gamma-SH$ – восстановленный глутатион,

$\Gamma-S-S-\Gamma$ – окисленный глутатион.

Регенерация глутатиона идет с участием НАДФН+ H^+ и глутатион-редуктазы.



Наряду с «классической» селен-зависимой глутатионпероксидазой, в организме присутствует ряд других ферментов, выполняющих сходную функцию, это – **глутатионтрансферазы** (КФ 2.5.1.18). Они катализируют реакции конъюгации глутатиона с многочисленными электрофильными субстратами и реакции восстановления органических гидропероксидов, включая пероксиды фосфолипидов, эндопероксиды (эпоксиды). Неактивны в отношении гидропероксида водорода.

Важную роль в поддержании редокс-баланса в клетке играют - **тиоредоксины,**
глутаредоксины и пероксиредоксины.

Тиоредоксины (TRX) – полифункциональные низкомолекулярные белки, имеющие в своей структуре двухцистеиновый участок и образующие при окислении внутримолекулярную дисульфидную связь. (Таким образом способны окисляться и восстанавливаться).

Мощные антиоксиданты, регуляторы апоптоза, метатической активности клеток др.

Восстанавливают каталитическую активность пероксиредоксинов и глутатионпероксидаз. Способны восстанавливать H_2O_2 и окисленный глутатион, играют роль «ловушки» $\cdot\text{OH}$ радикалов

Пероксиредоксины (тиоредоксиновые пероксидазы)— широкораспространенное большое семейство неселеновых антиоксидантных ферментов. В отличие от тиоредоксинов, не имеют двухцистеиновых участков. Остатки цистеинов, присутствующие в структуре пероксиредоксинов, способны образовывать межмолекулярные дисульфидные связи.

Главная функция пероксиредоксинов – восстановление и детоксикация H_2O_2 , органических гидропероксидов и пероксинитрита.

У млекопитающих, например, контролируют уровень цитокин-индуцированных пероксидов, участвующих в передаче клеточных сигналов.

Глутаредоксины – Г-SH-зависимые полифункциональные оксидоредуктазы с низкой молекулярной массой (9-14 кДа). В отличие от тиоредоксинов имеют высокую степень гомологии аминокислотной последовательности, особенно в области активного центра. Функционально сопряжены с работой глутатионредуктазы и с соотношением Г-SH/ГS-SГ.

Также как тиоредоксины и пероксиредоксины, играют важную роль в поддержании клеточного редокс-гомеостаза. Обезвреживают АФК, участвуют в регуляции пролиферации, дифференцировки и апоптоза.

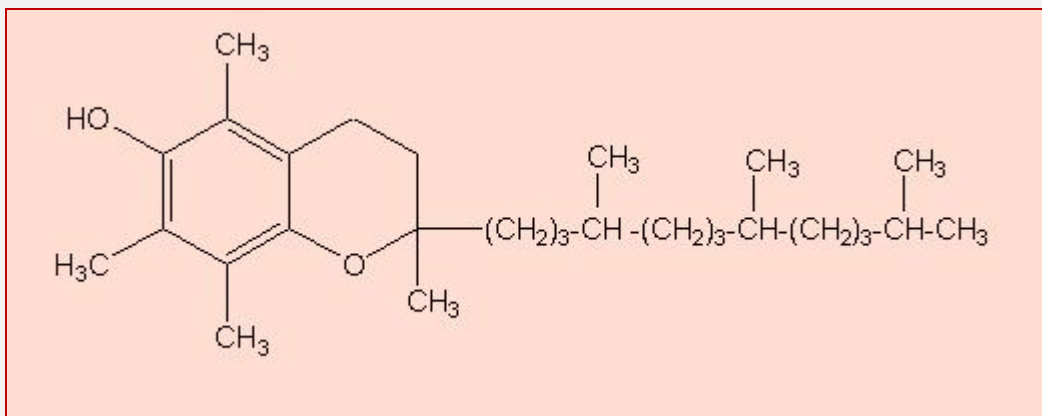
Неферментативные компоненты антиоксидантной системы

По механизму действия могут быть классифицированы на следующие группы:

- классические антиоксиданты (обрывающие цепь агенты);
- ловушки инициаторов свободнорадикальных реакций;
- хелаторы (железосвязывающие агенты);
- кофакторы и низкомолекулярные компоненты защитных антиокислительных ферментов и их предшественники.

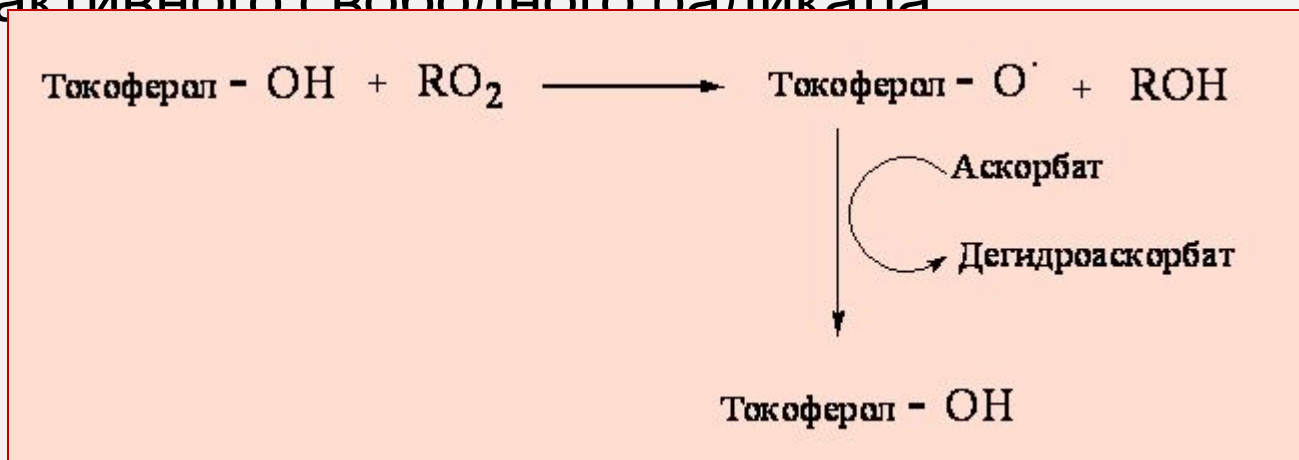
Витамин Е (токоферол)

Токоферолы участвуют в процессе разрушения свободных радикалов в клетках и регулируют интенсивность процессов перекисного окисления липидов на различных уровнях организации живых систем. Наиболее активные антиокислители.



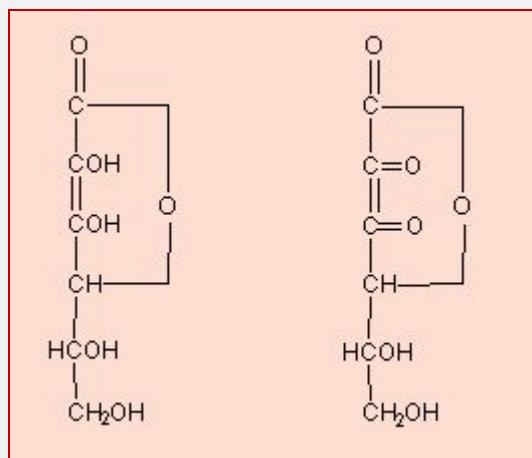
α-токоферол

α -Токоферол способен реагировать с АФК и радикалами жирных кислот. В реакции принимает участие ОН-группа фенольного ядра, способная окисляться, отдавая электрон, с образованием малоактивного свободного радикала:



Синергистом является витамин С. Аскорбат восстанавливает токоферол, превращаясь в дегидроаскорбат, последний восстанавливается аскорбатредуктазой.

Витамин С (аскорбиновая кислота)



L-аскорбиновая
кислота

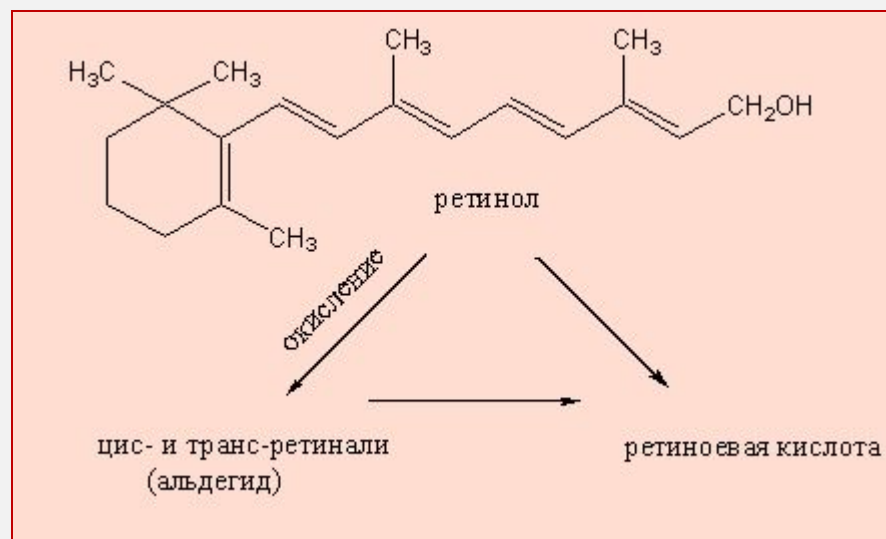
Дегидро-L-аскорбиновая
кислота

Вит.С – наиболее эффективный водорастворимый антиоксидант.

В желудке препятствует образованию в кислой среде из нитритов и аминов нитрозоаминов, являющихся канцерогенами. Предотвращает разрушение ферментов свободными радикалами, защищает клетки от окисления.

Вит. С участвует в окислительно-восстановительных реакциях, защищая гемоглобин от окисления, способствует синтезу коллагена (реакции гидроксирования), обеспечивает образование гормонов коры надпочечников, желчных кислот. Его добавляют во многие напитки и пищевые продукты в качестве антиоксиданта и вкусовой добавки.

Витамин А (ретинол)



Антиоксидантное действие вит.А и каротиноидов направлено на предотвращение кератинизации эпителия. Кератинизация обуславливается окислением SH-содержащих белков с образованием в них поперечных сшивок S-S связей между отдельными аминокислотами. Вит.А способствует поддержанию SH-групп в восстановленном состоянии.

Усиливает антиоксидантное действие токоферола.

Флавоноиды эффективно нейтрализуют радикалы, благодаря наличию гидроксильных и карбонильных групп.

Способны акцептировать свободные радикалы и хелатировать ионы металлов переменной валентности с образованием комплексов. Наиболее известны кверцетин, морин, таксифолин, силибины и др.

Стимулируют выработку антиоксидантов самим организмом.

Благодаря их присутствию, красное вино – хороший антиоксидант (можно регулярно принимать в небольших количествах), например помогает предотвращать сердечные приступы.

В поддержании физиологических значений АФК большой вклад вносят **тиолсодержащие молекулы: глутатион, серосодержащие аминокислоты.**

Убихинон (коэнзим Q) обладает антиоксидантной активностью, образуя окислительно-восстановительную систему убихинол-убихинон.

Его важнейшая биологическая роль определяется участием в митохондриальной электрон-транспортной цепи в качестве кофермента.

Антиоксидантные свойства:

- восстановленная форма (убихинол) может реагировать с пероксильным радикалом, препятствуя образованию алкильных радикалов, что ведет к обрыву цепи ПОЛ;

- обеспечивает эффективную защиту мембранных липидов, белков и ДНК от действия АФК;
- восстанавливает витамин Е, взаимодействуя с его токофероксильным радикалом;

Убихинон является единственным липидорастворимым антиоксидантом, который синтезируется в клетках и постоянно регенерируется из окисленной формы с помощью ферментных систем организма.

Высокая антиокислительная активность выявлена у некоторых гормонов, в частности, содержащих фенольную группу эстрогенов (женских половых гормонов) - **эстрадиола, эстриола и эстрона**.

Химическая модификация этих соединений и исследование антиокислительного и защитного действия полученных производных при развитии окислительного стресса – перспективное направление по созданию новых антиоксидантов, более эффективных, чем их эндогенные аналоги.

Мелатонин - связывает жиро- и водорастворимые радикалы.

Выраженной биологической активностью обладают синтетические хиноны, например производные **о-бензохинона**. Эти соединения оказывают хороший защитный эффект в условиях ишемии головного мозга, сердца, почек. Они легко восстанавливаются компонентами электрон-транспортной цепи митохондрий и микросом в диоксибензолы, способные легко отдавать атомы водорода гидроксильных групп на восстановление радикалов.

Эффективными антиоксидантами являются транспортеры металлов переменной валентности (цеоулоплазмин, трансферрины, в частности **лактоферрин** и др.).

На их основе разрабатываются новые лекарственные препараты, обладающие антиоксидантными свойствами в сочетании низким токсическим действием.

Церулоплазмин - медная оксидаза, медьсодержащий белок плазмы крови, играющий важную роль в метаболизме меди и железа. Полифункционален, обладает антиоксидантными свойствами, способен разрушать супероксидные радикалы кислорода, предотвращая активацию ПОЛ.

К внеклеточным антиоксидантам относятся транспортеры железа и железо-связывающие белки – **трансферрин, лактоферрин** и др. Находясь в составе указанных протеинов, железо не катализирует свободнорадикальные процессы.

БЛАГОДАРЮ ЗА ВНИМАНИЕ!

