

# 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 -  $\text{HO}^\bullet$ , радикал пероксида водорода -  $\text{HO}_2^\bullet$ , 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



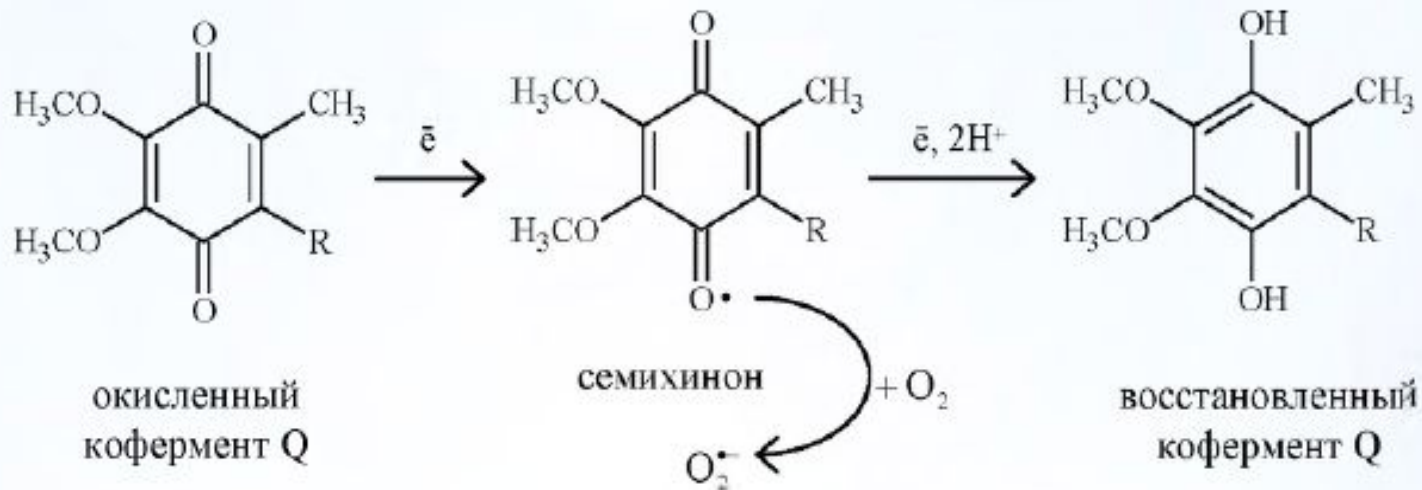
Для биологических систем наиболее важны кислородные свободные радикалы, и реактивные молекулы – пероксиды, пероксинитрит и гипохлорит.

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  $\text{CoQ}$ .





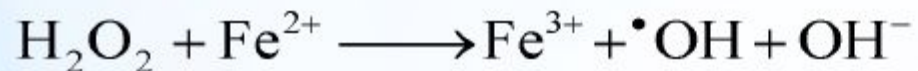
2) **в результате «утечки» электрона в электронтранспортной системе мембран эндоплазматического ретикулума и ядра,** включающие в себя цитохромы P-450 и b5, а также НАДФН- и НАДН-зависимые редуктазы (в том числе НАДФН-цитохром P-450-зависимую редуктазу в микросомах).

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  $\text{Fe}^{2+}$  (а также ионов других металлов переменной валентности  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ), 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 ().**

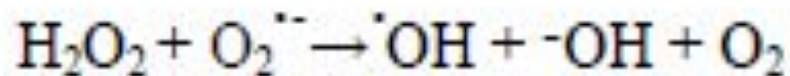
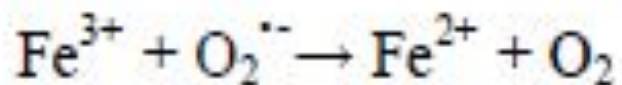
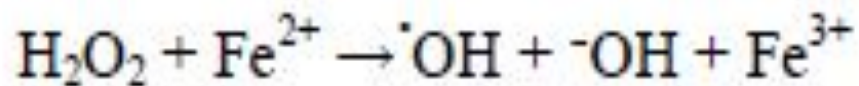
При внедрении в организм патогенов усиливается образование радикалов кислорода и пероксида водорода, происходит т.н. «дыхательный взрыв» (увеличение потребления кислорода нейтрофилами, макрофагами и др.).

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

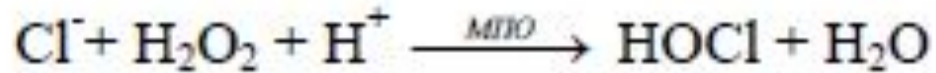
**Радикалы и активные формы кислорода (АФК) обладают бактерицидным действия.**

## 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  $\text{H}_2\text{O}_2$  участвует в сборке и разборке биологических мембран, запуске митогенеза, процессах клеточной пролиферации и дифференцировки, деградации белков.

$\text{H}_2\text{O}_2$  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.

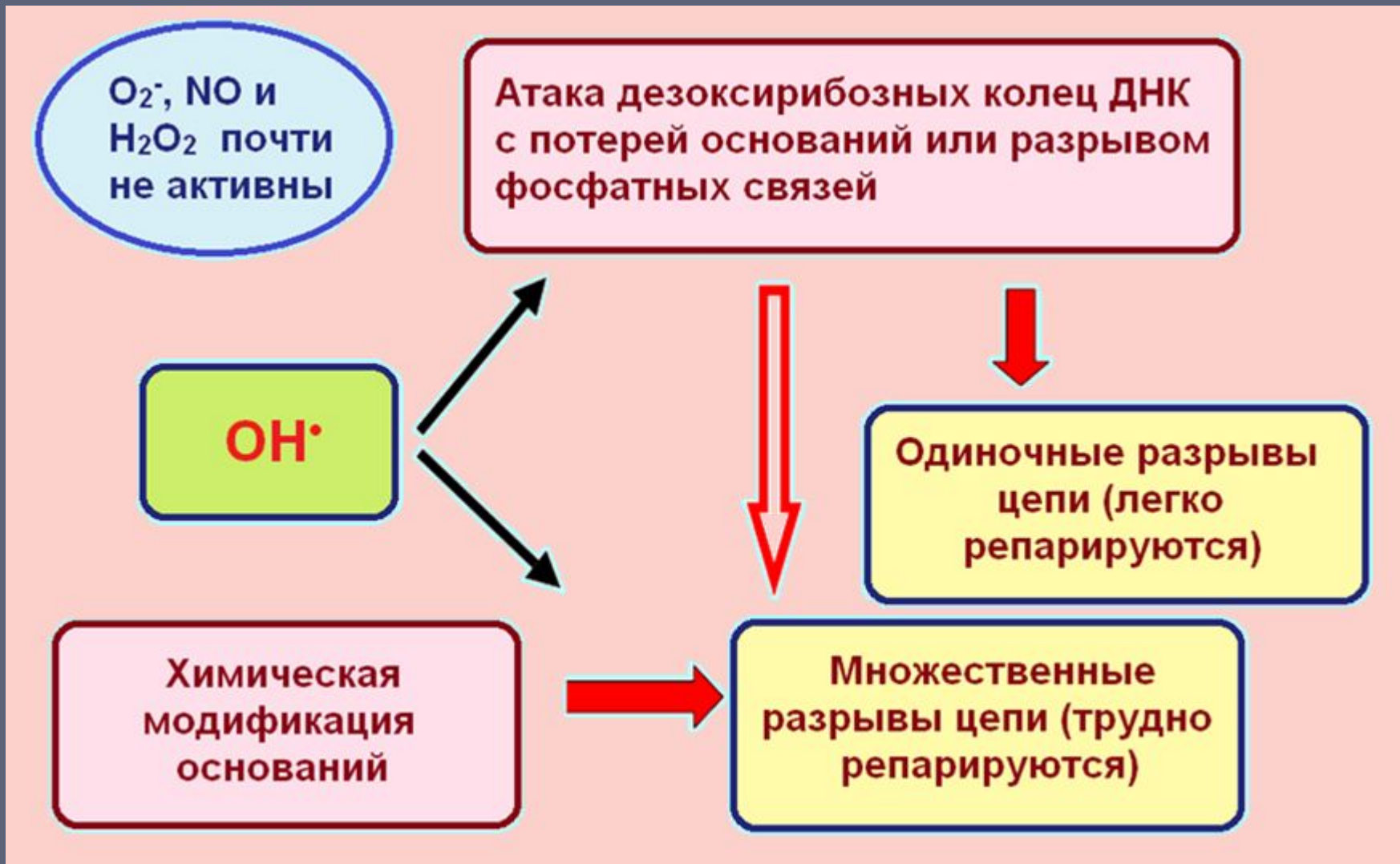
Окислительный стресс развивается, если равновесие между свободнорадикальными (окислительными) и антиоксидантными реакциями в организме смещается в сторону активации свободнорадикального окисления, а собственные антиоксиданты не могут его компенсировать.

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

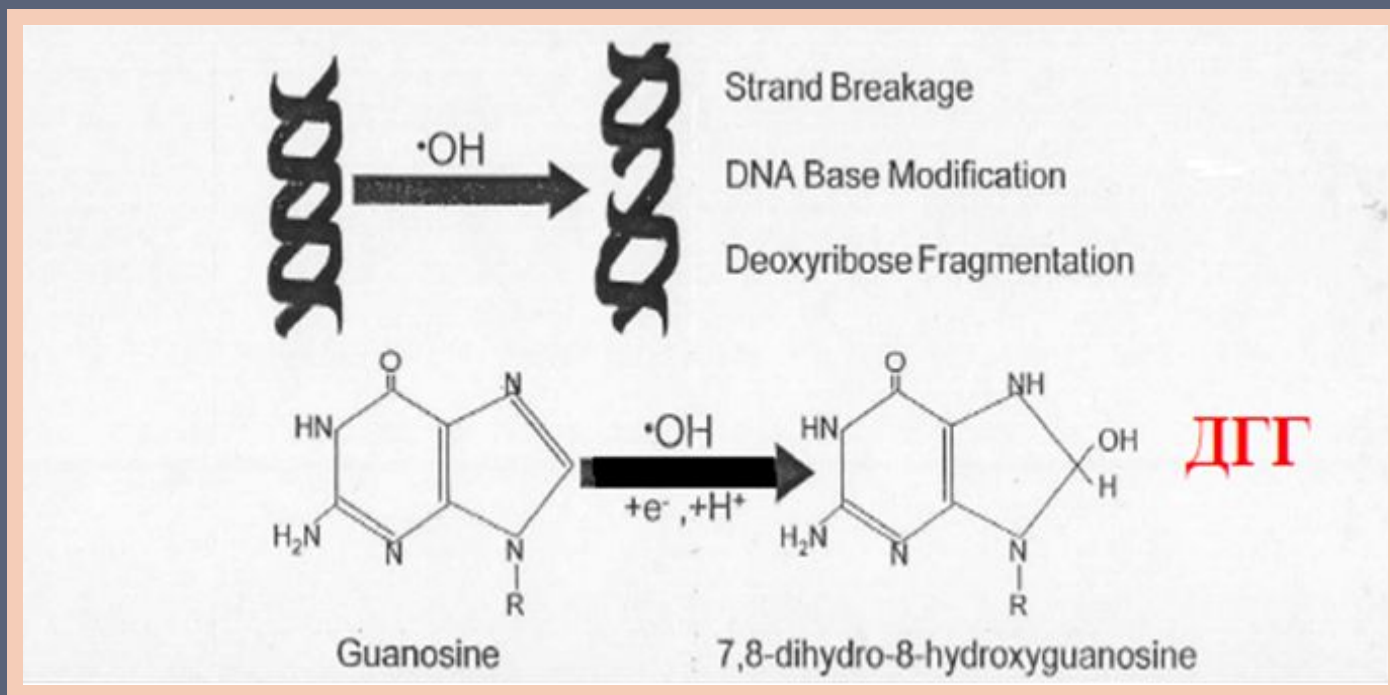
Переокисление липидов приводит к повреждению макромолекул и мембран. Это влечет за собой нарушение барьерной функции клеточных мембран, разбалансировку процессов окисления и фосфорилирования в митохондриях. Дефицит энергии отражается на всех процессах, включая пролиферацию, дифференцировку клеток, синтез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

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

# Модификация нуклеиновых кислот ДФК



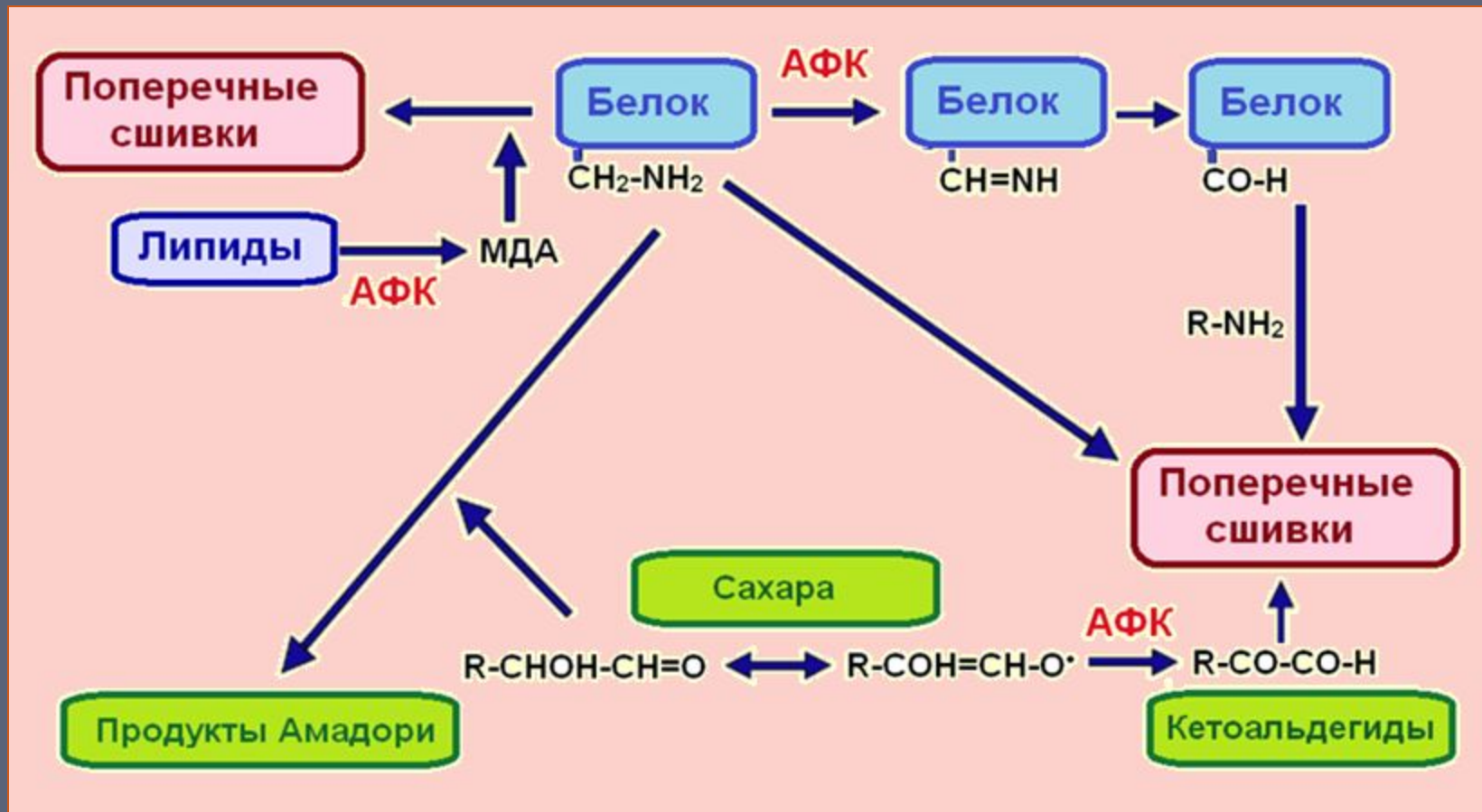
# Окислительная модификация ДНК



**•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**



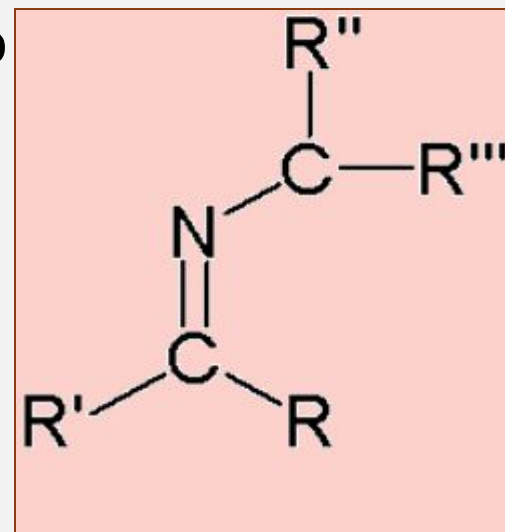
# Взаимодействие белков, липидов и углеводов при оксидативном стрессе



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. высокорекреакционных 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 – гидроксиналенали (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).

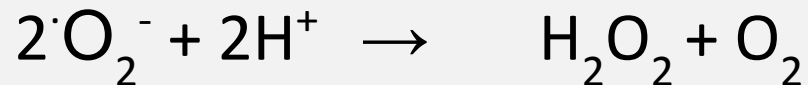
## **2. Низкомолекулярные антиоксиданты:**

некоторые аминокислоты, полиамины, мочевины, глутатион, аскорбиновая кислота, билирубин,  $\alpha$ -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).

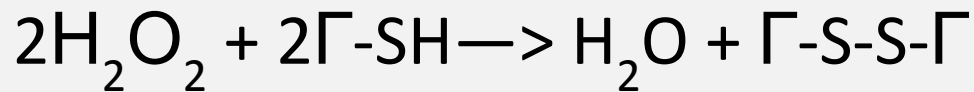


В первом случае (каталазный путь – реакции 1, 2), разложение 2-х молекул  $\text{H}_2\text{O}_2$  идет с образованием  $\text{H}_2\text{O}$  и триплетного кислорода.

Во втором (пероксидазный путь – реакции 1, 3), одна молекула  $\text{H}_2\text{O}_2$  образует фермент-субстратный комплекс (компл.1) и окисляет донор водорода ( $\text{AH}_2$ ). 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.

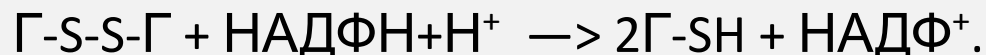
Наиболее активна глутатионпероксидаза (селен содержащий фермент). Донором водорода (вторым субстратом) является глутатион —  $\gamma$ -глутамил-цистеил-глицин.



$\Gamma-SH$  – 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  $\text{H}_2\text{O}_2$  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  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 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.

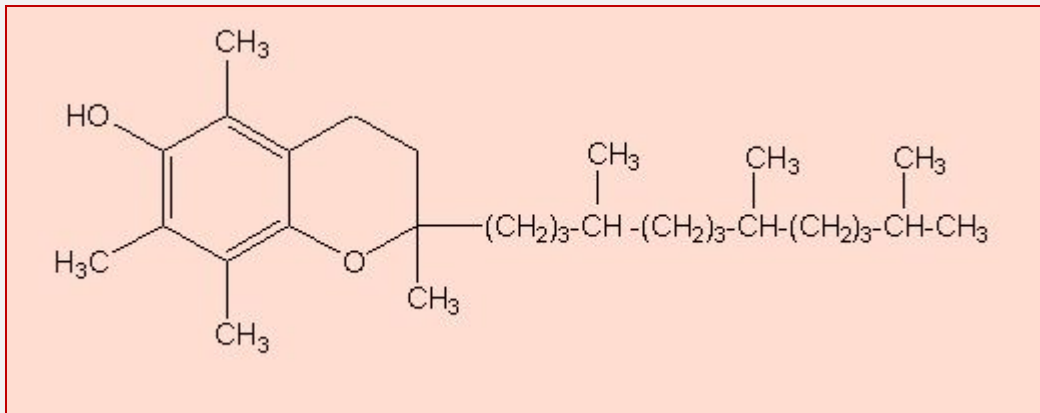
## **Неферментативные компоненты антиоксидантной системы**

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.

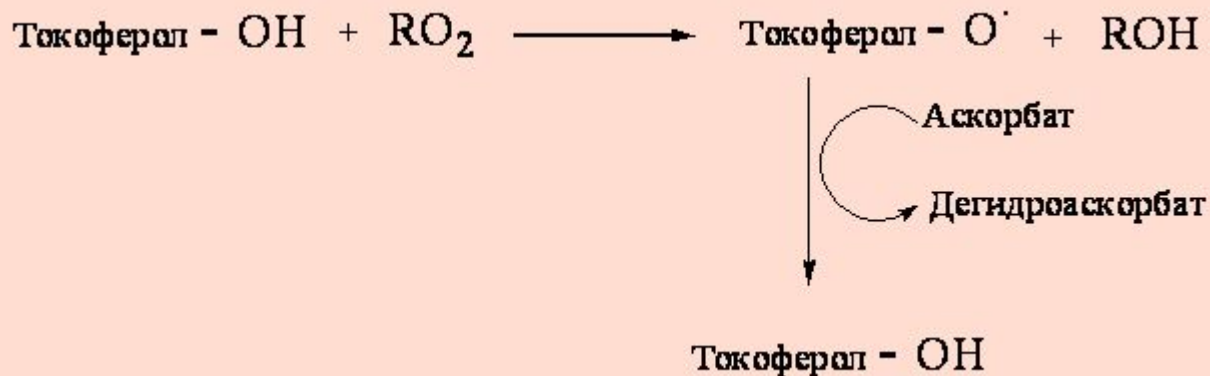
## Витамин Е (токоферол)

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

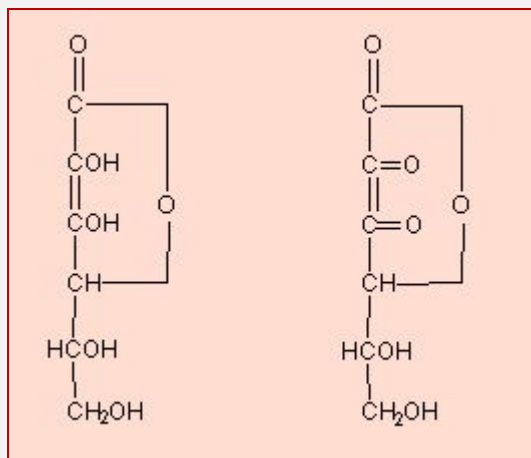
$\alpha$ -Токоферол способен реагировать с АФК и радикалами жирных кислот. В реакции принимает участие ОН-группа фенольного ядра, способная окисляться, отдавая электрон, с образованием малоактивного свободного радикала:



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



## Витамин С (аскорбиновая кислота)



L-аскорбиновая  
кислота

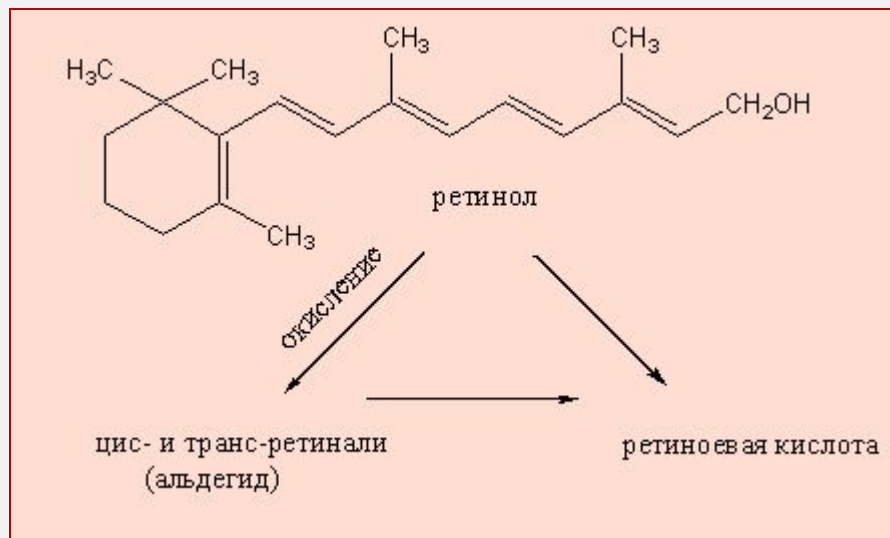
Дегидро-L-аскорбиновая  
кислота

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 жирорастворимые 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!

