Тема: Утворення та дія активних форм кисню

План

1. Фізіологічна роль активних форм кисню (АФК) в організмі
2. Механізми утворення АФК
3. Вільні радикали: пероксид водню, супероксид, оксид азоту, семіхінон і Ко
4. Основні джерела АФК у клітині
5. Антиоксидантний захист клітин: ферментативні та неферментативні механізми
6. Вільнорадикальна теорія старіння

Кисень бере участь у трьох основних клітинних процесах

1. **Клітинне (мітохондріальне) дихання**: шляхом ферментативної взаємодії водню з киснем з утворенням води. Так до клітини надходить 90-95% кисню. При цьому утворюється енергія у вигляді АТФ. Зустрічається в мітохондріях і каталізується носіями дихального ланцюга.
2. **Мікросомальне окислення** (шлях оксигенації): приєднання кисню до субстратів для їх детоксикації та синтезу стероїдних гормонів із холестерину.
3. **Неферментативне окислення** (автооксадація). Дія вільних радикалів з високою реакційною здатністю.

Чи є вільні радикали кисню шкідливими?

- В процесі проміжних реакцій утворюються різні форми оксигену високої метаболічної активності.
- Неспарений електрон у складі таких сполук (вільні радикали) дозволяє їм окислювати різні субклітинні структури.
- Неспарений електрон як частина вільних радикалів дозволяє їм проникати у різні субклітинні структури. Раніше вважалося, що вільні радикали зумовлюють тільки пошкоджуючу дію.
- Сьогодні вважають, що вільні радикали є важливими елементами біологічних систем.

Фізіологічна роль активних форм кисню (АФК) в організмі

Активні форми кисню (АФК) or Reactive Oxygen Species (ROS)

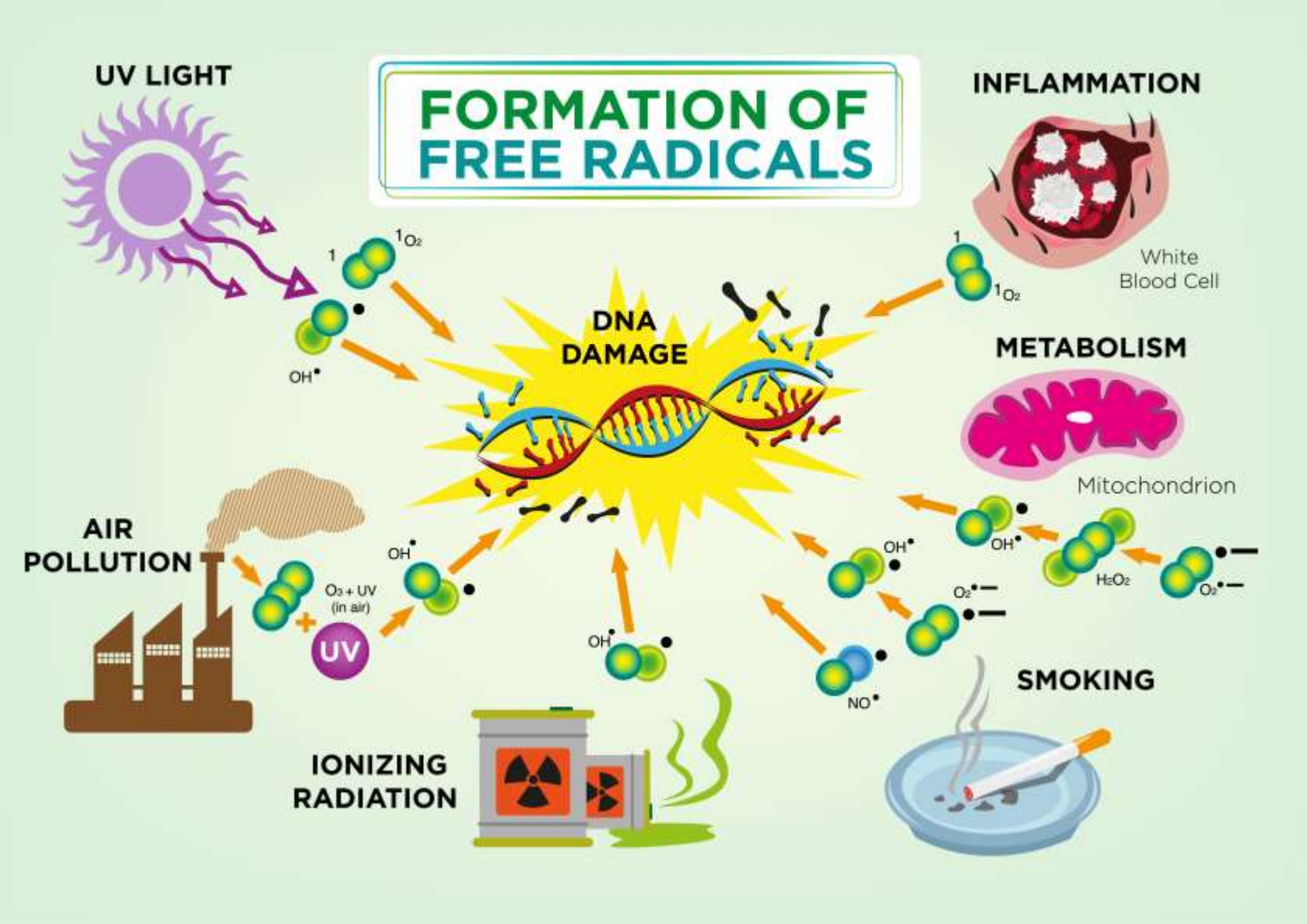
- Озон

Первинні радикали, що утворюються безпосередньо в тканинах:

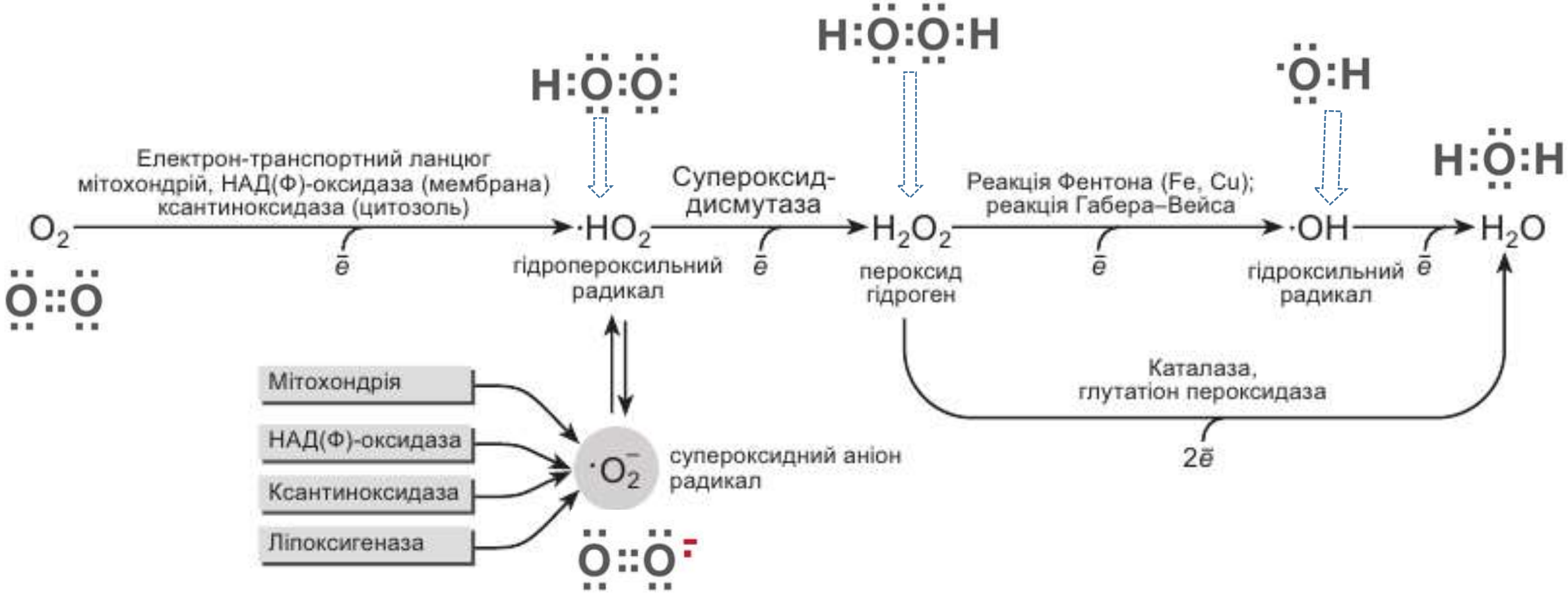
- *супероксид*
- *оксид азоту*
- *семіхінон*

Вторинні радикали, що є продуктами послідовного супероксидного перетворення:

- *пероксид*
- *гідроксил*
- *гіпохлорит*
- *синглетний кисень*
- *продукти окислення ліпідів*


FORMATION OF FREE RADICALS
UV LIGHT
INFLAMMATION
White Blood Cell
DNA DAMAGE
METABOLISM
Mitochondrion
AIR POLLUTION
O3 + UV (in air)
UV
IONIZING RADIATION
SMOKING
OH•
NO•
H2O2

Фізичні механізми утворення АФК під час відновлення кисню до води



Пероксид водню (H_2O_2)

- Пероксид водню - це АФК, що має одинарний зв'язок кисень-кисень.
- H_2O_2 є джерелом гідроксильних радикалів (•OH), які мають високу реакційну здатність.
- Пероксид водню є токсичним для клітин короткоживучим продуктом. Токсичність зумовлена окисленням білків, мембранних ліпідів і ДНК пероксид-іонами.
- Пероксид водню є сигнальною молекулою в регуляції широкого спектру біологічних процесів.
- H_2O_2 є основним фактором, залученим до вільнорадикальної теорії старіння, заснованої на тому, наскільки легко пероксид водню може розкладатися на гідроксильний радикал і як побічні продукти супероксидного радикалу клітинного метаболізму можуть реагувати з навколишньою водою з утворенням пероксиду водню.
- Ці гідроксильні радикали, у свою чергу, легко реагують і пошкоджують життєво важливі компоненти клітини, особливо мітохондрії.

Супероксид

- Супероксид має найбільшу пошкоджуючу дію і легко проникає в клітину.
- Окисно-відновний потенціал гідроксилу вищий, ніж в інших АФК, тому він здатний окислювати будь-яку речовину в клітині:
  - амінокислотні залишки білків, що порушує їх ферментні та транспортні функції
  - нуклеотиди та ДНК, що викликають генотоксичний ефект
  - поліненасичені жирні кислоти і фосфоліпіди в структурі мембран і ліпопротеїдів крові
- **Молекулярний окисний стрес**: токсична дія кисню та його метаболітів, що спричиняє прямі канцерогенні ефекти та інші патології або старіння.
- Супероксидисмутаза (СОД) перетворює супероксид-аніон-радикали в менш агресивний пероксид водню.
- Супероксид можна видалити або інактивувати в клітині:
  - **Каталаза**, яка розщеплює пероксид на воду і молекулярний кисень
  - **Пероксидаза**, яка відновлює пероксид водню до води, одночасно окисляючи, наприклад, глутатіон
- Супероксид служить субстратом для утворення гіпохлориту в фагоцитах, що сприяє пошкодженню бактеріальної клітини.
- Супероксид може бути джерелом утворення гідроксильного радикала в присутності іонів Fe^{2+} (реакція Фентона)

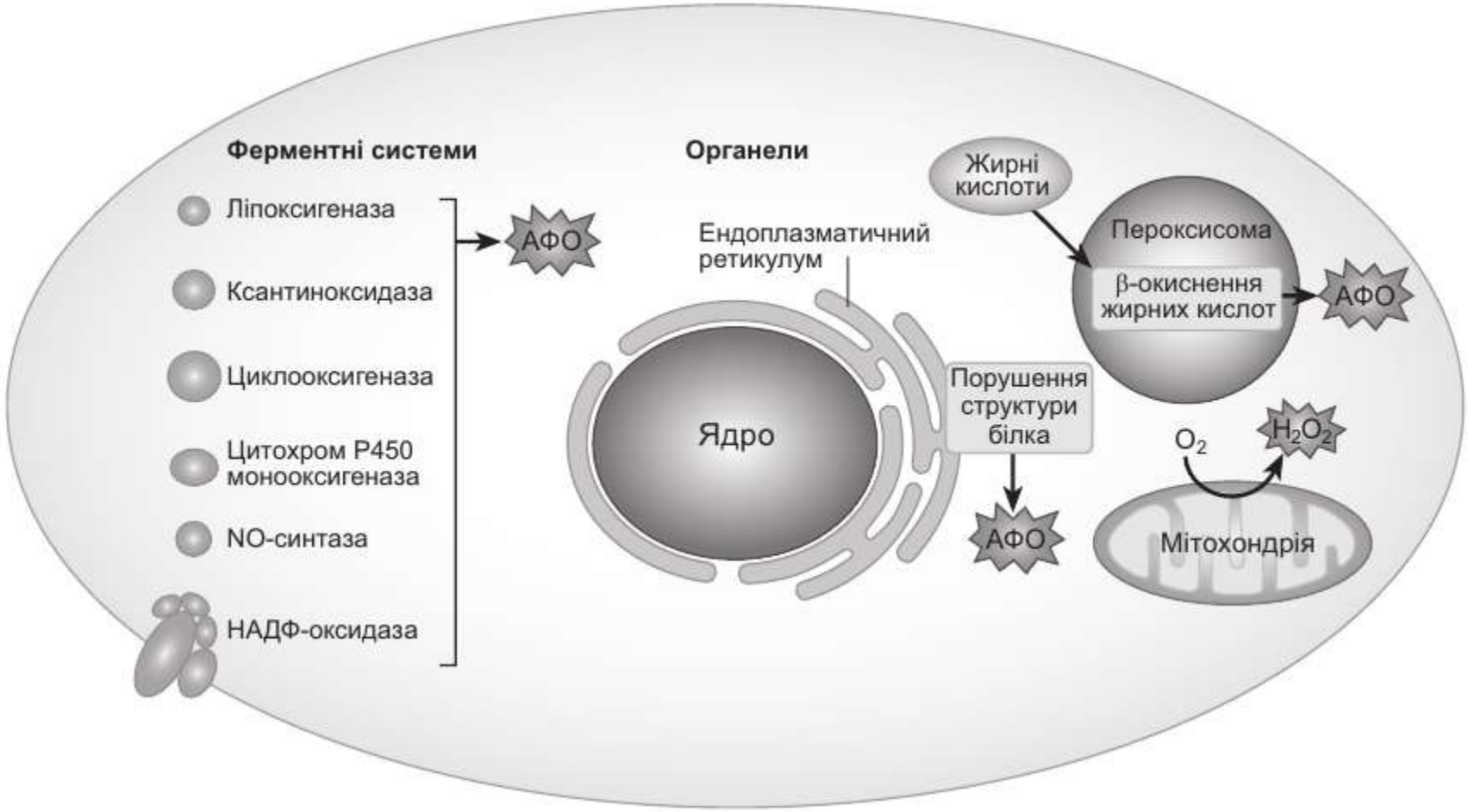
Озон (O_3)

- Спроби використання АФК в онкології за озонотерапії пухлин.
- Нікола Тесла наприкінці XIX ст. винайшов генератор озону. Озонування води, повітря, лікарські препарати оброблені озоном широко використовували до ери антибіотиків.
- Результати для онкохворих неоднозначні. В США офіційно не дозволено, в Німеччині толерують, в Росії і на Кубі озонотерапія дозволена.
- Доведена бактерицидна, ранозагоююча і загально стимулююча дія озонотерапії.
- Оксигенно-озонова суміш може дифундувати крізь кишечну стінку, підвищувати напруження окисгену в крові і збагачувати ним тканини.
- Препарати збагачені озоном вводять внутрівенно. Вони мають противірусну активність. Використовують за лікування СНІДУ, загоюванні ран шкіри, слизових оболонках та ін.

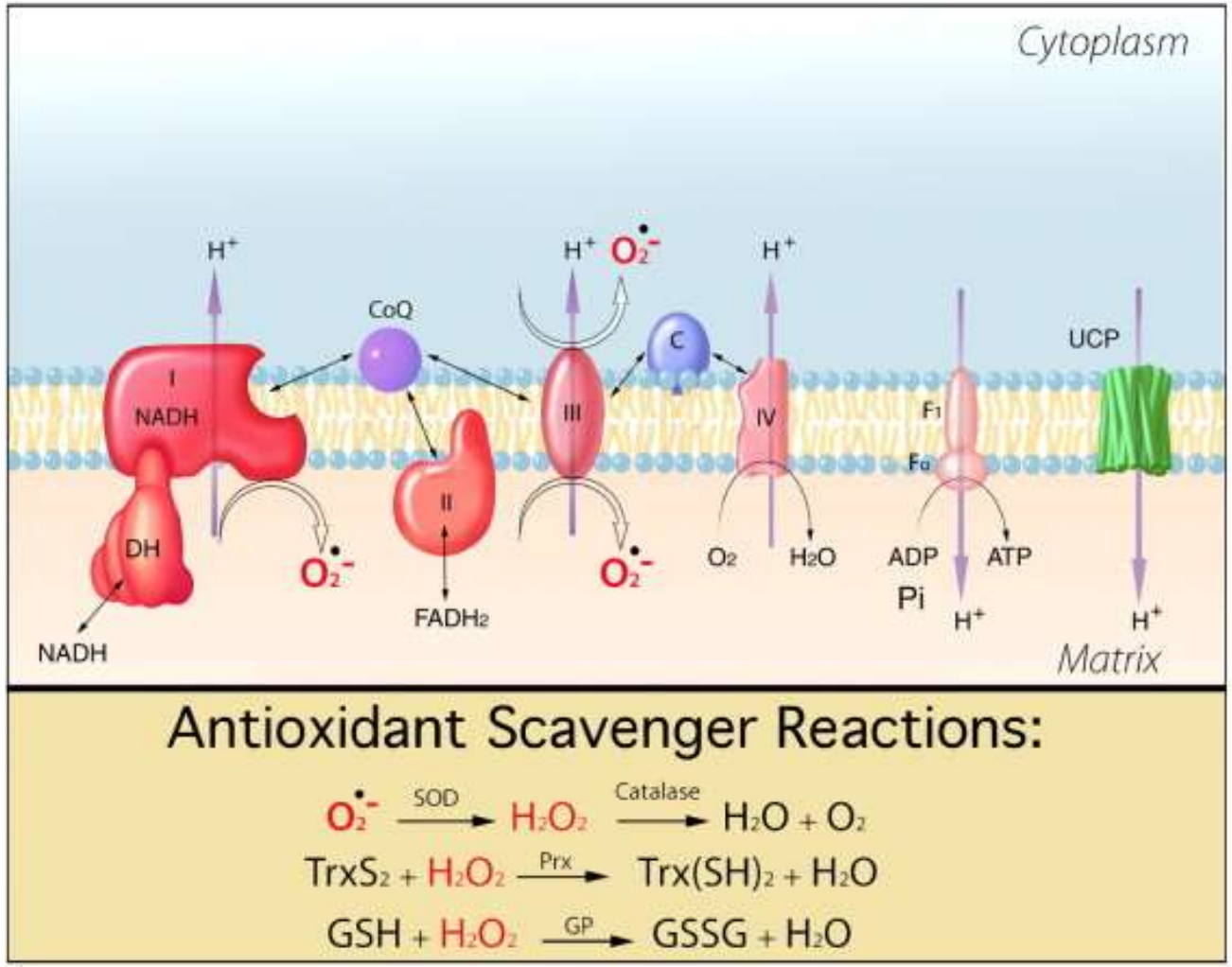
Оксид азоту (NO)

- Короткоживучий радикал, що утворюється:
  - із речовин зовнішнього середовища (вихлопні гази, тютюновий дим, промислові відходи…)
  - в організмі – в результаті реакції ферментного окислення L-аргініну NO-синтазою.
- Дві форми NO-синтаз: **нормальна** та **індуцибельна** (стимулюється клітинними медіаторами).
- NO має виражену **генотоксичну дію** і пригнічує активність ферментів репарації ДНК.
- NO (нітрогліцерин) є важливим фактором вазодилятації, який визначає рівень діастолічного тиску і має свої рецептори в судинному епітелії. У ссавців NO бере участь у регуляції артеріального тиску, передачі нервових імпульсів, згортанні крові та імунній відповіді.
- NO активує фактор росту судинного епітелію, а отже, раковий ангіогенез.
- Інгібітори нітрогенного стресу (компоненти зеленого чаю, червоного винограду, часнику, капусти) знижують рівень NO в організмі.
- NO швидко дифундує крізь клітинні мембрани, але час напіввиведення молекул NO становить лише 5-10 с.
- NO виконує сигнальну функцію як у тварин, так і у рослин.
- Однією з мішеней NO є фермент **гуанілатциклаза**. Циклічний GMP, який є продуктом гуанілатциклази, є вторинним посередником і запускає каскад реакцій у клітині.
- NO відіграє роль у функціонуванні імунної системи тварин, активуючи макрофаги та нейтрофіли.
- **Силденафіл (Віагра)** діє через NO-залежний механізм і використовується для лікування еректильної дисфункції.

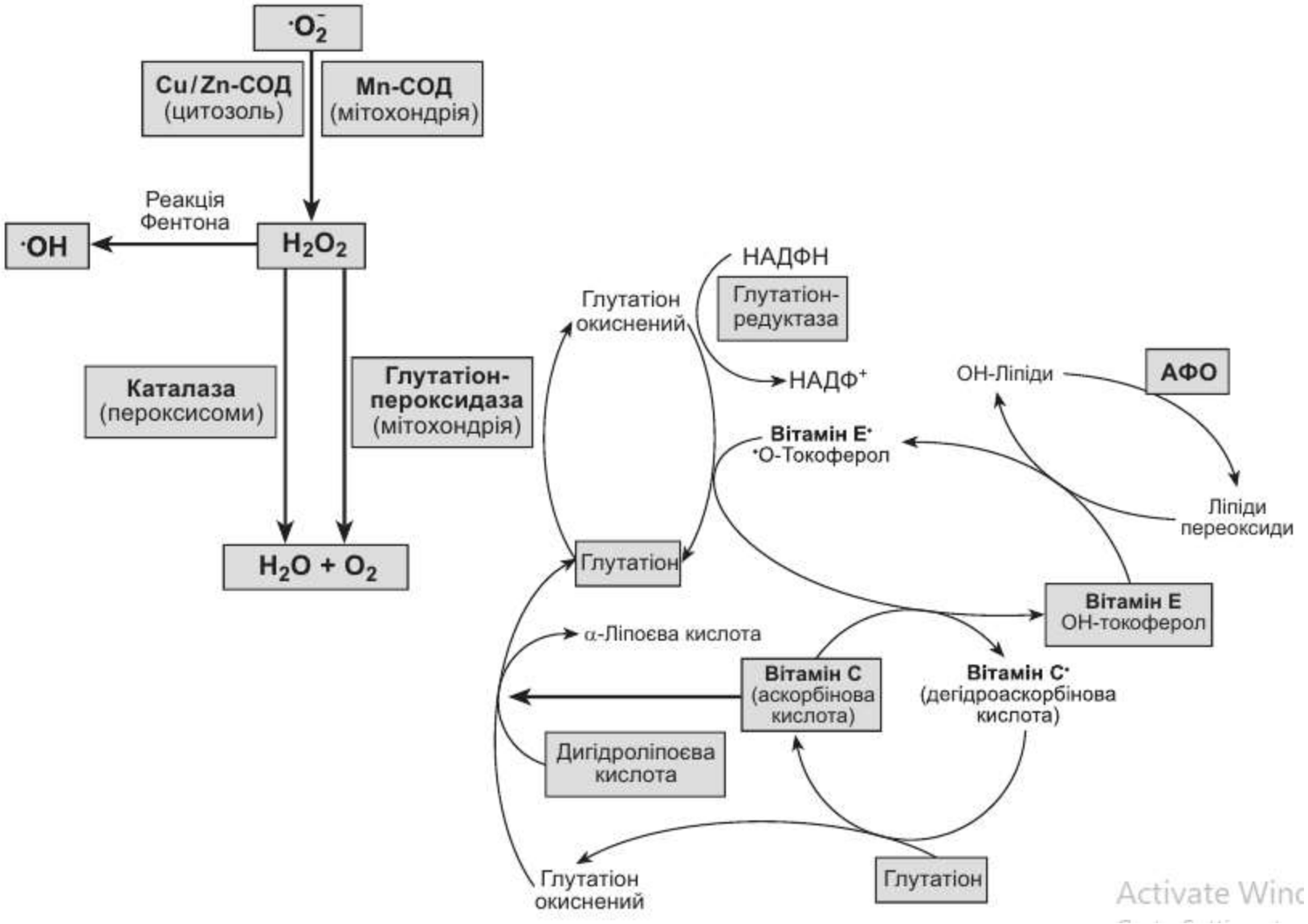
Основні джерела АФК у клітині



Генерування АФК у мітохондріях



Антиоксидантний захист клітин



Антиоксидантні механізми клітин

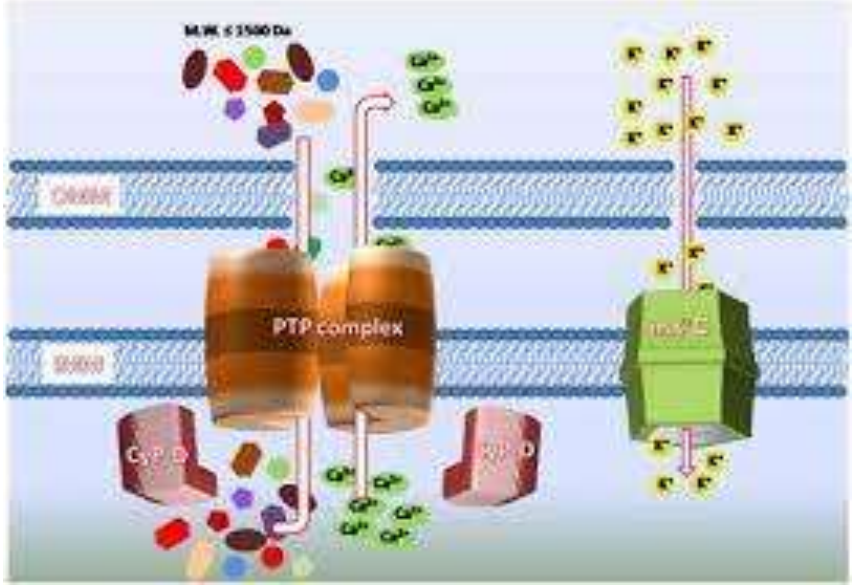
- Система антиоксидантного захисту нейтралізує потенційно небезпечну дію АФК і підтримує їх кількість на фізіологічному рівні.
- Дія може бути реалізована такими способами:

➢ за рахунок зниження рівня генерації АФК внаслідок інгібування вільнорадикальних реакцій специфічними ферментативними і неферментативними системами антиоксидантного захисту;

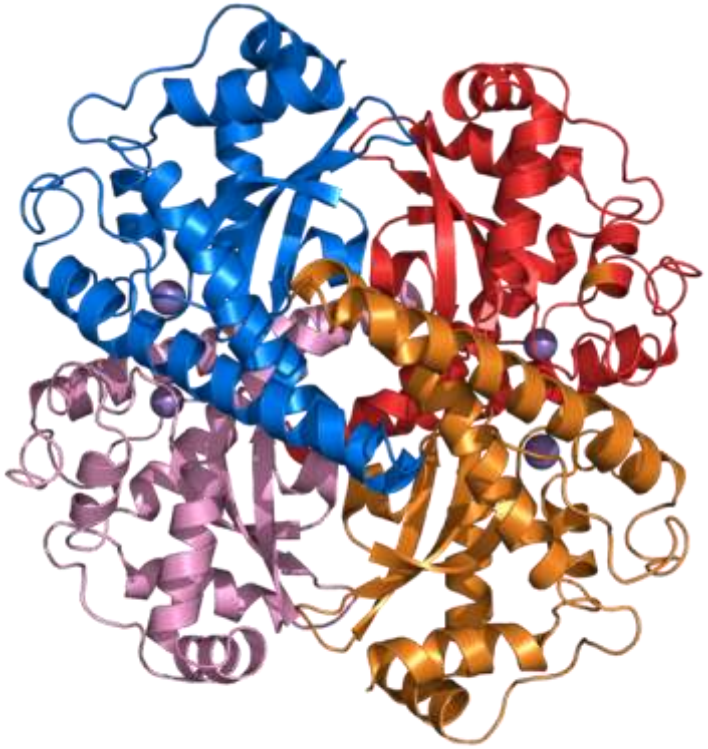
➢ за рахунок зв’язування катіонів металів (заліза і міді) з білками (трансферин, лактоферин, церулоплазмін), що унеможливлює участь цих катіонів у вільнорадикальних реакціях.

➢ низька напруга кисню в тканинах створює передумови для зниження утворення АФК.

- **Мітохондрії** можуть безпосередньо регулювати утворення АФК через зміни електрохімічного потенціалу іонів водню.
- Відкриття **пори транзієнтної проникності** (ПТП) у внутрішній мембрані мітохондрій. ПТП відкривається у відповідь на підвищення концентрації H_2O_2 або HO•, що призводить до посилення транспорту протонів у мітохондріальний матрикс, стимуляції дихання, швидкого зниження напруги кисню, а відтак до зменшення [АФК].



Супероксиддисмутаза (SOD)

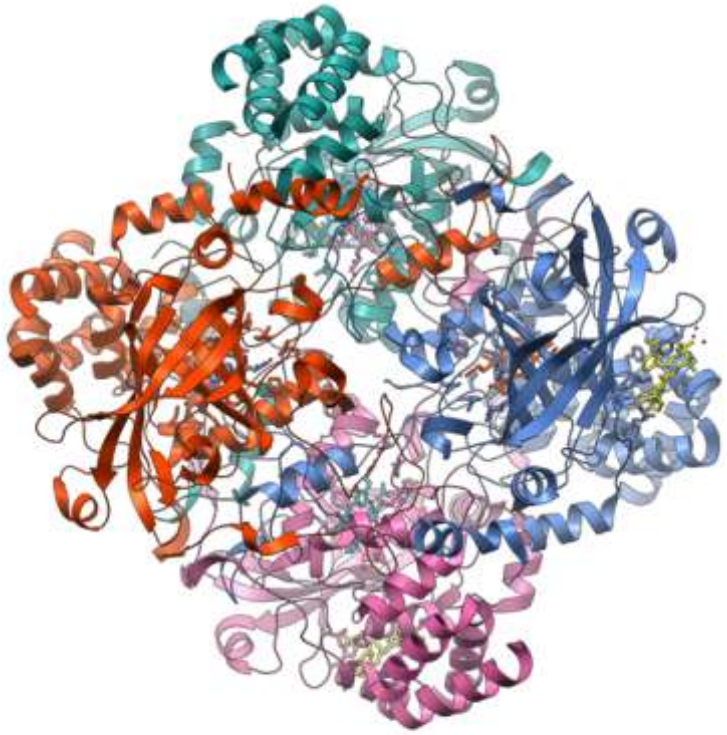


- Цей фермент нейтралізує супероксидні аніони шляхом дисмутації та перетворює їх у менш реакційноздатні молекули пероксиду водню.
- Завдяки дії СОД вміст супероксид-аніона в клітині знижується до 10^{-12}-10^{-13} М.
- Активний центр СОД містить катіони металів зі змінною валентністю (Zn^{2+}, Mn^{3+}, Cu^{2+}, Fe^{3+}, Ni^{3+}), які беруть безпосередню участь у дисмутації.
- Найпоширенішим видом СОД є мідь/цинковмісна форма. Вона розташована у міжклітинному просторі (SOD3) або в цитозолі клітин і міжмембранному просторі мітохондрій (SOD1).

$$O_2^{\bullet-} + O^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2.$$

Каталаза

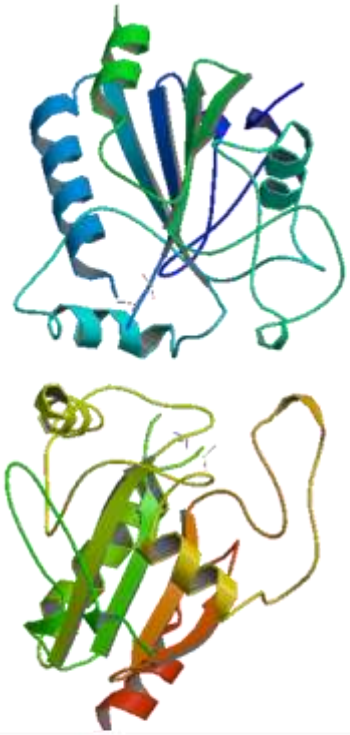
- Фермент-гемопротеїн, що каталізує перетворення пероксиду водню
- У більшості випадків каталаза локалізується в пероксисомах, але також присутня в мітохондріях.
- Молекулярна маса 220–250 кДа, складається з чотирьох однакових субодиниць, кожна з яких містить один гем із Fe^{3+}.
- Крім H_2O_2, каталаза взаємодіє з органічними гідропероксидами, утворюючи каталітично неактивні комплекси.



$$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$$

Глутатіонпероксидаза (GSH)

- Бере участь у відновленні пероксиду водню (до води) і пероксидів ліпідів (до відповідних спиртів) за участю глутатіону відновленої (GSH) і окисленої форми (GSSG).
- У ссавців приблизно 70% глутатіонпероксидази локалізовано в цитозолі і 30% в мітохондріях.
- Тетрамерний глікопротеїн з молекулярною масою 76–99 кДа.
- GSH відіграє провідну роль в інактивації гідропероксидів ліпідів.
- **GSH і каталаза** беруть участь в інактивації пероксиду водню. За низького вмісту пероксиду водню він розкладається переважно GSH, а при збільшенні H_2O_2 - каталазою Т.ч., каталаза і GSH є кооперативною внутрішньоклітинною системою.

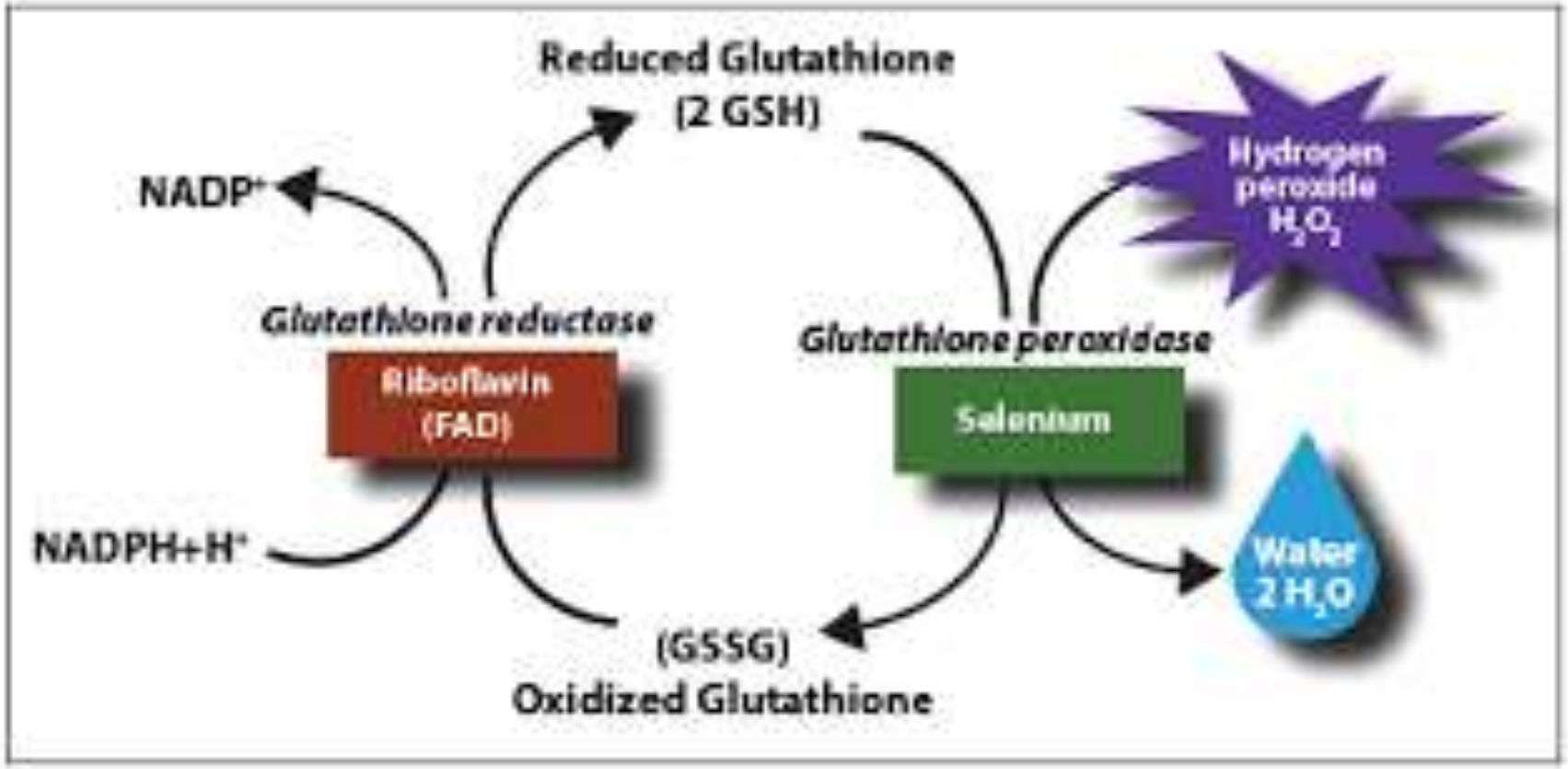


$$2GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + 2H_2O,$$

$$2GSH + ROOH \rightarrow GSSG + H_2O + ROH$$

Glutathione peroxidase

Роль глутатіону в клітинній антиоксидантній системі



- Глутатіон є трипептидом і утворений цистеїном, глутаміновою кислотою і гліцином.
- Він може бути в окисленому (**GS-SG**) і відновленому (**GSH**) станах.
- Антиоксидантну дію глутатіону пов’язують з ферментами **глутатіонпероксидазою, глутатіонредуктазою та глутатіонтрансферазою**.
- Як ефективний відновник, глутатіон відіграє важливу роль у процесах детоксикації. Його відновлена форма легко реагує з гідроксильними та карбонільними вільними радикалами.

Селен (Se)

- В організмі людини міститься 10-14 мг селену, переважно в печінці, нирках, селезінці, серці, яєчках.
- Добова потреба людини в селені - 70-100 мкг. Більш ніж у 80% населення України страждає на дефіцит селену.
- Селен входить в активний центр ферментів системи **антиоксидантного-антирадикального** захисту організму, метаболізму нуклеїнових кислот, ліпідів, гормонів. Селен є синергістом вітаміну Е і йоду. Селенгідрогенні групи (SeH-) мають більш високу електрон-донорну активність, ніж сульфгідрильні (SH-), тому селенвмісні сполуки більш ефективні у ролі метаболітних полапок вільних радикалів.
- Селен застосовується як потужний **протираковий засіб**. Прийом 200 мкг селену на добу знижує ризик захворюваності на рак прямої і товстої кишки — на 58%, пухлини простати на 63%, рак легенів — на 46%, знижує загальну смертність від онкологічних захворювань на 39%.

Убіхінон (кофермент Q)

- Вільний радикал убіхінону (семіхінон) утворюється через вилучення одного атома водню з його електроном під час дегідрування гідрохінону до хінону або шляхом зв’язування окремого атома водню з хіноном.
- CoQ_{10} розчиняється в жирах і проникає крізь мембрану. CoQ_{10} транспортує електрони у дихальному ланцюгу від ферментів комплексів I і II до комплексу III.
- Кофактором дії CoQ_{10} є вітамін К2.
- Антиоксидантна функція CoQ_{10} пов’язана з окисно-відновлювним циклом молекули CoQ_{10}, яка легко зв’язує та віддає електрони.
- CoQ_{10} інгібує перекисне окиснення ліпідів, запобігаючи утворенню радикалів перекису ліпідів. CoQ також зменшує утворення периферильного радикала та синглетного кисню з утворенням убісеміхінону та H_2O_2.
- Відновлена форма CoQ ефективно регенерує вітамін Е з радикала α-токоферолу.
- В умовах окисного стресу взаємодія H_2O_2 з іонами металу, приєднаними до ДНК, генерує гідроксильні радикали, а CoQ ефективно запобігає окисленню основ, особливо в мтДНК.
- Циркулюючий CoQ_{10} запобігає окисленню ліпідів низької щільності, що може принести користь при серцево-судинних захворюваннях.

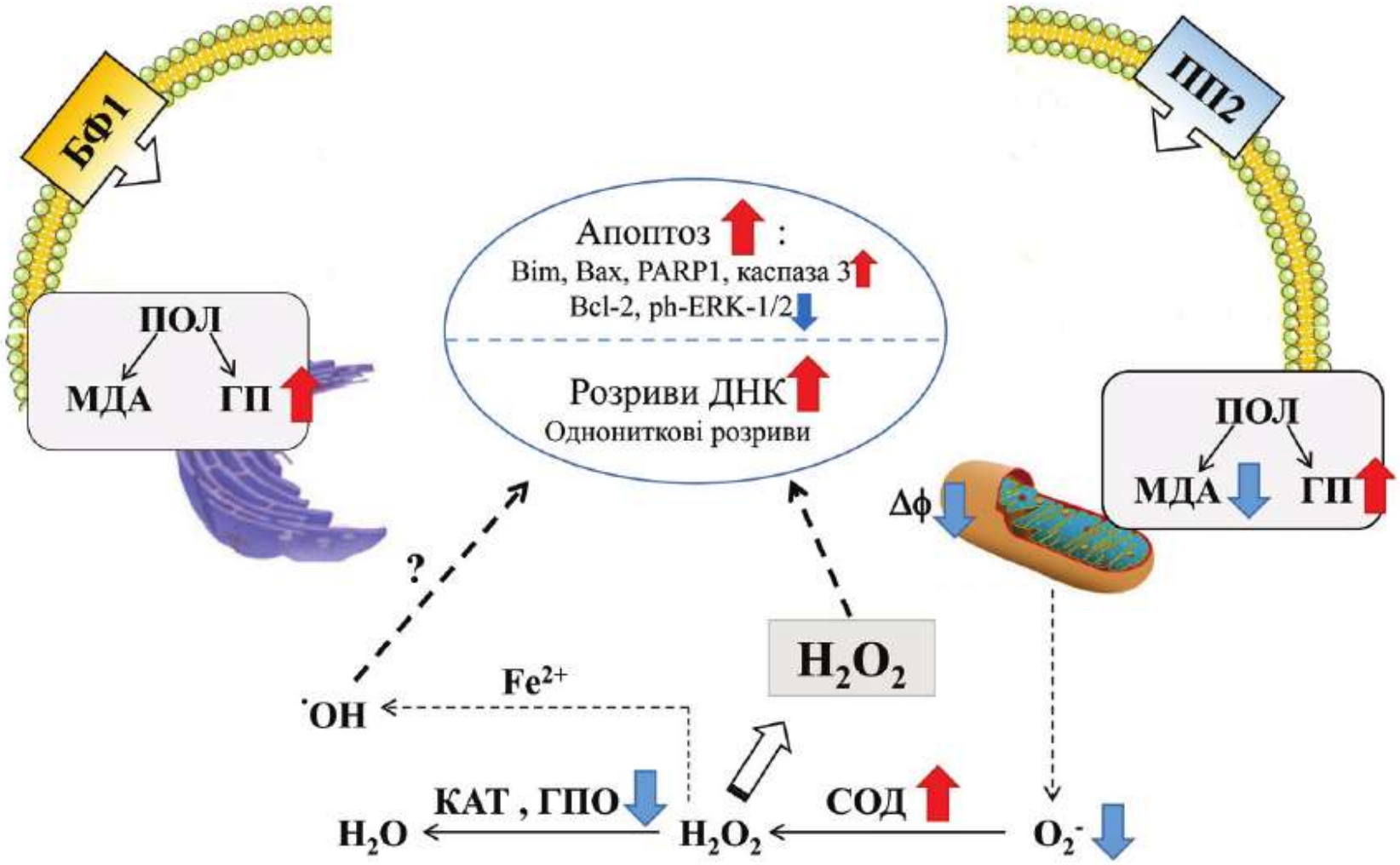
Антиоксиданти неферментативного походження

- **Токофероли** є основними природними антиоксидантами у тварин. α-токоферол (вітамін Е) локалізований в мембранах ядра (50%), мітохондрій (30%) і мікросом (20%). Після взаємодії з пероксидними сполуками утворюється стабільний токофероксильний радикал, який не реагує з ненасиченими жирними кислотами. Гіповітаміноз Е активізує процеси перекисного окислення ліпідів, порушує функціонування систем іонного транспорту, біосинтез білка та функціонування ядерного хроматину.
- **Естрогени** (жіночі статеві гормони) є потужними антиоксидантами завдяки своїй ліпофільності та мембранотропним властивостям.
- **Каротиноїди —** жиророзчинні сполуки з антиоксидантними властивостями. Вони знаходяться переважно в печінці, жировій тканині та надниркових залозах. β-каротини мають довгий ланцюг сполучених подвійних зв'язків, які дозволяють їм ефективно перехоплювати вільні радикали. β-каротин може реагувати з пероксильним радикалом, утворюючи низькоактивний радикал. β-каротин проявляє свої антиоксидантні властивості в умовах низького напруження кисню, а гіпероксіяспричиняє автокаталітичний прооксидантний ефект.
- **Цитохром с** є транспортером електронів у дихальному ланцюгу мітохондрій, який також здатний ефективно інактивувати супероксид-аніон. Окислений цитохром с може бути відновлений в дихальному ланцюзі, одержуючи електрон і супероксид-аніон.

Аскорбінова кислота (вітамін С)

- Важливий водорозчинний антиоксидант, який надходить з їжею (в основному овочами та фруктами).
- Вітамін С здатний до окисно-відновних перетворень. Аскорбінова кислота може окислюватися до дигідроаскорбінової кислоти і утворювати окисно-відновну пару, яка здатна приймати і віддавати електрони і протони.
- Вітамін С може взаємодіяти з радикалами токоферолу, глутатіону та сечової кислоти, зменшуючи їх кількість, а також інактивувати водорозчинні пероксильні радикали.
- У високих концентраціях аскорбінова кислота може бути прооксидантом.

Роль АФК і антиоксидантної системи в реалізації цитотоксичності похідних тіазолу в пухлинних клітинах



Вільнорадикальна теорія старіння

- **Теорія вільних радикалів** Д. Хармана запропонована в 1950 р.: старіння і хвороби, які його супроводжують, є результатом накопичення вільних радикалів та ушкоджень клітинних структур з віком.
- У 1970 р. Д. Харман припустив, що «біологічним годинником» живих організмів є мітохондрії, оскільки основна маса АФК та його метаболітів утворюється в мітохондріальному ланцюзі перенесення електронів. Накопичення цих ушкоджень, перш за все, в ДНК, спричиняє розвиток хворіб, старіння і смерть.

- **Протилежна точка зору**: помірні рівні АФК виконують захисну функцію, оскільки вмикають антиоксидантний захист. Наприклад, транскрипційний фактор PGC1α та/або АМФ-залежна кіназа посилюють біогенез мітохондрій.
- **Мітогормез** може лежати в основі парадоксального висновку, що метформін, слабкий інгібітор комплексу дихального ланцюга I, є ефективним засобом у боротьбі з цукровим діабетом 2 типу, який підвищує біоенергетичний потенціал мітохондрій печінки та пригнічує глюконеогенез.
- **2,4-динітрофенол**, класичний протонофор, який був запропонований як засіб для схуднення в 1930-х роках, може обмежити окислювальне пошкодження і продовжити життя мишей в ретельно контрольованих умовах.

Denham Harman

(1916 – 2014)

Додаткова література

- Дробот Л.Б., Самойленко А.А., Воротніков А.В. та ін. Reactive oxygen species in signal
- transduction // Укр. біохім. журн. – 2013. – Т. 85, № 6. – С. 209–217.
- Becker L.B. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physio-
- logy // Cardiovascular Research. – 2004. – Vol. 61– P. 461– 470.
- Brookes P.S., Yoon Y., Robotham J.L. et al. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate
- triangle // Am. J.Physiol. – 2004. – Vol. 287, N 4. – P. 817–833.
- Grivennikova V.G., Vinogradov A.D. Partitioning of superoxide and hydrogen peroxide pro-
- duction by mitochondrial respiratory complex I // Biochim. Biophys. Acta. – 2013. –
- Vol. 1827(3). – P. 446-54.
- Harman D. A biological clock: the mitochondria? // J. Am. Geriatric. Soc. – 1972. – Vol. 20, N4. – P. 145-147.
- Salgado P., Melin M., Contreras D. et al. Fenton reaction driven by iron ligands // Chil. Chem. Soc. – 2013. – Vol. 58, N 4. – P. 1842–1847.