Подписано электронной подписью:
Вержицкий Данил Григорьевич
Должность: Директор КГПИ КемГУ
Дата и время: 2025-04-23 00:00:00
471086fad29a3b30e244c728abc3661ab35c9d50210dcf0e75e03a5b6fdf6436

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Кемеровский государственный университет»
Новокузнецкий институт (филиал)
Кафедра естественнонаучных дисциплин

Жукова А.Г., Горохова Л.Г.

ПРИРОДНЫЕ И СИНТЕТИЧЕСКИЕ АНТИОКСИДАНТЫ

Методические указания по работе на лекциях
для обучающихся по направлению подготовки
44.03.05 Педагогическое образование (с двумя профилями подготовки)

Новокузнецк – 2020

Жукова А.Г., Горохова Л.Г.

Природные и синтетические антиоксиданты: методические указания по работе на лекциях для студентов обучающихся по направлению подготовки 44.03.05 Педагогическое образование (с двумя профилями подготовки) / А.Г. Жукова, Л.Г. Горохова; Новокузнецк; НФИ КемГУ, 2020. – 49 стр.

В работе для студентов изложены материалы к лекциям в рамках изучения дисциплины «Природные и синтетические антиоксиданты».

Рекомендовано
на заседании кафедры
естественнонаучных дисциплин
протокол №9 от 15 мая 2020 г.
И.о. заведующего кафедрой
А.Г. Жукова

Утверждено
методической комиссией факультета физической культуры, естествознания и природопользования
«05» октября 2020 г.
Председатель комиссии Н. Т. Егорова

© Жукова А.Г., Горохова Л.Г.
© Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кемеровский государственный университет» Новокузнецкий институт (филиал), 2020

Текст представлен в авторской редакции

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение 4
1. Методические указания обучающимся по подготовке к лекциям 5
2. Методические указания обучающимся по слушанию лекции 5
3. Методические указания обучающимся по конспектированию лекции 6
4. Методические указания по доработке конспекта лекции обучающимся 8
5. Краткое содержание лекций 9
Лекция №1. История учения о свободнорадикальных процессах 8
Лекция №2. Физиологическая роль свободнорадикальных процессов в организме 12
Лекция №3. Современные представления о стратегии защиты клеток от свободнорадикальных процессов 32
Лекция №4. Неферментные антиоксиданты и особенности их функционирования 38
Перечень основной и дополнительной учебной литературы, необходимой для освоения дисциплины 48

Введение

Цель дисциплины «Природные и синтетические антиоксиданты» сформировать понимание роли свободнорадикальных процессов и антиоксидантной системы в функционировании организма.

Задачи дисциплины «Природные и синтетические антиоксиданты»:

1) сформировать представление о роли свободнорадикальных процессов в организме;

2) сформировать представление о функционировании эндогенной системы антиоксидантной защиты и об использовании синтетических антиоксидантов;

3) сформировать навыки и умения использования в будущей профессиональной деятельности знаний о природных и синтетических антиоксидантах.

Лекция считается традиционно ведущей формой организации обучения в высшем учебном заведении. Она представляет собой систематическое, последовательное, монологическое изложение преподавателем-лектором учебного материала по какой-либо теме (проблеме), как правило, теоретического характера.

Цель лекции – способствовать организации целенаправленной познавательной деятельности студентов по овладению программным материалом учебной дисциплины.

Чтение курса лекций позволяет дать связанное, последовательное изложение материала в соответствии с новейшими данными науки, сообщить обучающимся основное содержание предмета в целостном, систематизированном виде. В ряде случаев лекция выполняет функцию основного источника информации: при отсутствии учебников и учебных пособий, чаще по новым курсам; в случае, когда новые научные данные по той или иной теме не нашли отражения в учебниках; отдельные разделы и темы очень сложны для самостоятельного изучения. В таких случаях только лектор может методически помочь студентам в освоении сложного материала.

Задачи лекции заключаются в обеспечении формирования системы знаний по учебной дисциплине, в умении аргументировано излагать научный материал, в формировании профессионального кругозора и общей культуры, в отражении еще не получивших освещения в учебной литературе новых достижений науки, в оптимизации других форм организации учебного процесса.

Функции лекции, информационная, мотивационная, ориентировочная, воспитательная, реализуются в изложении системы знаний, в формировании познавательного интереса к содержательной стороне учебного материала и профессиональной мотивации обучающегося, в обеспечении основ для дальнейшего усвоения учебного материала, в формировании сознательного отношения к процессу обучения, стремления к самостоятельной работе и всестороннему овладению специальностью, в развитии интереса к учебным дисциплинам.

1. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ОБУЧАЮЩИМСЯ ПО ПОДГОТОВКЕ К ЛЕКЦИЯМ

При подготовке к лекционным занятиям обучающимся важно соблюдать следующие правила:

- приобрести общую тетрадь, в которой будут вестись записи лекций по конкретной учебной дисциплине;

– перед каждой лекцией просматривать рабочую программу дисциплины, что позволит сэкономить время на записывание темы лекции, ее основных вопросов, рекомендуемой литературы;

– на отдельные лекции приносить соответствующий материал на бумажных носителях, представленный лектором на портале или присланный на «электронный почтовый ящик группы» (таблицы, графики, схемы); данный материал будет охарактеризован, прокомментирован, дополнен непосредственно на лекции;

– перед очередной лекцией необходимо просмотреть по конспекту материал предыдущей лекции; при затруднениях в его восприятии следует обратиться к основной учебной литературе; если разобраться в материале опять не удалось, то необходимо обратиться к преподавателю;

– студенты, присутствующие на лекционном занятии, обязаны не только внимательно слушать преподавателя кафедры, но и конспектировать излагаемый им материал;

– студенту, пропустившему лекционное занятие (независимо от причин), рекомендуется не позже чем в 10-дневный срок явиться на консультацию к преподавателю и отчитаться по теме, изучавшейся на лекции.

2. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ОБУЧАЮЩИМСЯ ПО СЛУШАНИЮ ЛЕКЦИИ

Внимательное слушание лекций предполагает интенсивную умственную деятельность обучающегося. В процессе слушания студент должен разобраться в том, что излагает преподаватель; обдумать сказанное им; связать новое с тем, что ему уже известно по данной теме из предыдущих лекций, прочитанной учебной и научной литературы.

Слушая лекции, надо стремиться понять цель и логическую последовательность изложения, уловить ход мыслей лектора. Таким образом, первая и важнейшая задача при слушании лекции - *осмысление излагаемого в ней материала*. Для этого нужно слушать лекцию с самого начала, не упуская общих, ориентирующих в материале рассуждений и установок лектора. То, что действительно внимательно прослушано, продумано и записано на лекциях, становится достоянием студента, входит в его образовательный фонд.

Осмысленно слушать лекцию помогают следующие рекомендации.

1. Необходимо психологически подготовиться к процессу восприятия новой информации. Если у вас будет положительный настрой на данное выступление, то вы сможете услышать много полезной информации, которая расши-

рит ваш кругозор. В любом сообщении всегда присутствует информация, которая сможет пригодиться. Важным аспектом умения эффективно слушать является анализ и сортировка услышанной информации, а также собственных представлений о ней. Как услышанное соотносится с тем, что мне уже известно? Что из сказанного я могу применить? Где это может быть использовано? В каких ситуациях данная информация может мне пригодиться?

2. Выделять на слух основные положения лекции. Для этого необходимо обращать внимание на стандартные приемы построения любого выступления, в том числе лекции: формулировка темы и плана лекции, вводные фразы, которые используются для перехода к новым положениям, «мостики» от одного предмета обсуждения к другому, примеры, словесные иллюстрации, выводы, заключения, рекомендации по применению материала.

3. Не отвлекаться на внешние обстоятельства. Сядьте там, где вам будет видно и слышно лектора, где вас не будут отвлекать. Нужно сконцентрировать свое внимание, и тогда все шумы и помехи не будут вам мешать. Восприятие содержания гораздо важнее, чем оценка внешности говорящего, поэтому не позволяйте себе реагировать на манеру речи, голос, внешний вид выступающего. Старайтесь не поддаваться унынию и внутренне не сопротивляйтесь самому трудному материалу.

*4. Использовать разнообразные способы конспектирования лекционного материала***.** Чтобы улучшить свои способности усваивать и запоминать материал, нужно владеть разными способами конспектирования и ведения кратких записей основных положений лекции.

5. Регулярно практиковаться в совершенствовании своего умения слушать. Приобретайте опыт в процессе слушания сложной информации, требующей максимального умственного напряжения. Убедите себя в том, что ваше умение слушать постоянно улучшается и становится вашей отличительной особенностью.

3. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ОБУЧАЮЩИМСЯ ПО КОНСПЕКТИРОВАНИЮ ЛЕКЦИИ

Конспектирование лекций – сложный вид вузовской аудиторной работы, предполагающий интенсивную умственную деятельность студента.

Конспект является полезным тогда, когда он оформляется самим обучающимся. Запись лекции должна вестись четко, разборчиво, аккуратно, чтобы в ходе последующей работы с конспектом можно было им воспользоваться.

Структура записи конспекта должна отражать структуру содержания излагаемого лектором материала.

Конспект лучше подразделять на параграфы, пункты, подпункты, соблюдая красную строку. Этому в большой степени будут способствовать вопросы плана лекции, предложенные преподавателем.

Важно правильно выбрать момент записи. Записывать основное содержание услышанного надо тогда, когда лектор, изложив очередной, сравнительно небольшой по объему и законченный по смыслу раздел лекции, переходит к

новому разделу. В процессе этого перехода, когда лектор произносит связующие фразы или дает дополнительные комментарии к прочитанному разделу, запись может быть осуществлена наиболее удачно, без ущерба для слушания и дальнейшего понимания лекции.

Следует обращать внимание на акценты, выводы, которые делает выступающий, отмечая наиболее важные моменты в лекционном материале замечаниями «важно», «хорошо запомнить» и т.п., выделяя их и с помощью разноцветных маркеров или ручек, подчеркивая термины и определения. Такие записи представляют своего рода модели осмысленно переработанной информации и оказывают существенную помощь в процессе слушания лекции, облегчают запоминание и особенно воспроизведение учебного материала.

В процессе конспектирования лекции на полях целесообразно записывать возникающие по ходу изложения материала свои мысли, вопросы, оценку тех или иных событий, научно-теоретических положений.

Не надо стремиться записать дословно всю лекцию. Целесообразно сначала понять основную мысль, излагаемую лектором, а затем записать ее. Желательно запись осуществлять на одной странице листа или оставляя поля, на которых позднее, при самостоятельной работе с конспектом, можно сделать дополнительные записи, отметить непонятные места.

Целесообразно разработать собственную систему сокращений, аббревиатур и символов, условных обозначений, подчеркивания, терминов, кроме общепринятых; разработать собственную «маркографию». Например: ! - важно; !!! - очень важно; ? - под вопросом; NB - обратить внимание; R - запомнить; С - скопировать и т. д.

В процессе дальнейшей работы по курсу конспект надо дополнять, дописывать, возвращаясь к нему по мере ознакомления с литературой, учебниками, материалами практических/семинарских занятий, производственной практики. Переписывать конспект с черновика набело нецелесообразно.

Работая над конспектом лекций, всегда необходимо использовать не только учебник, но и ту учебную литературу, которую дополнительно рекомендовал преподаватель. Именно такая серьезная, кропотливая работа с текстом лекции позволит глубоко овладеть теоретическим материалом.

Правила ведения конспекта лекции:

1. Запись лекций делается в тетради на одной стороне каждого листа или на двух сторонах листа, но с оставлением широких полей — для внесения дополнительных данных.

2. Необходимо четко выделять (фломастерами или цветными карандашами) главы и разделы, подчеркивать основные мысли, даты, имена, определения, части рисунка.

3. На последней странице тетради следует сделать оглавление с указанием названий тем лекций и страниц, для чего страницы конспекта пронумеровать.

4. В конце конспекта лекций полезно поместить терминологический словарь.

5. При записи цитат нет необходимости записывать их дословно, но на полях нужно сделать ссылку на источник.

4. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ДОРАБОТКЕ КОНСПЕКТА ЛЕКЦИИ ОБУЧАЮЩИМСЯ

После прослушивания лекций необходимо систематически работать над их конспектами, так как процесс забывания особенно интенсивно происходит в первый период после усвоения (заучивания); это одна из закономерностей человеческой памяти. Записи лекций следует периодически перечитывать, выправлять текст, делать дополнения, размечать цветом то, что должно быть глубоко и прочно закреплено в памяти.

Первый просмотр конспекта рекомендуется сделать вечером того дня, когда была прослушана лекция (предварительно вспомнить, о чем шла речь, и просмотреть записи). Доработать его, пока материал еще легко воспроизводим в памяти (через 10 часов после лекции в памяти остается не более 30-40 % материала). С целью доработки необходимо прочитать записи, восстановить текст в памяти, а также исправить описки, расшифровать не принятые ранее сокращения, заполнить пропущенные места, понять текст, вникнуть в его смысл. В ходе доработки конспекта углубляются, расширяются и закрепляются знания, а также дополняется, исправляется и совершенствуется сам конспект.

Затем вновь просмотреть конспект через 3-4 дня. Времени на такую работу уходит немного, но результаты обычно бывают эффективными: студент основательно и глубоко овладевает материалом и к сессии приходит хорошо подготовленным. Непременным условием глубокого усвоения учебного материала является знание основ, на которых строится изложение материала. Обычно преподаватель напоминает, какой ранее изученный материал и в какой степени требуется подготовить к очередному занятию. Обращение к ранее изученному материалу не только помогает восстановить в памяти известные положения, выводы, но и приводит разрозненные знания в систему, углубляет и расширяет их. Каждый возврат к старому материалу позволяет найти в нем что-то новое, переосмыслить его с иных позиций, определить для него наиболее подходящее место в уже имеющейся системе знаний.

Работая над конспектом лекций, всегда следует использовать не только учебную литературу, но и те источники, которые дополнительно рекомендовал лектор. Только такая серьезная, кропотливая работа с лекционным материалом позволит каждому студенту овладеть прочными знаниями и развить в себе научные и творческие задатки, способности.

5. КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ ЛЕКЦИЙ ПО УЧЕБНОЙ ДИСЦИПЛИНЕ

«Природные и синтетические антиоксиданты»

Лекция №1.
История возникновения и развития учения о свободнорадикальных процессах

Понятие «радикалы» зародилось в дискуссиях химиков более 200 лет назад (вторая половина XVIII века). Термин «радикал» (от латинского radix – корень) предложил Лавуазье, назвавший так химически активные вещества, в то время еще неясной природы. Лавуазье наблюдал образование радикалов из органических веществ, но выделить их в свободном виде не мог из-за высокой реакционной способности и неустойчивости, поэтому в их существование долгое время никто не верил. Многочисленные попытки выделения радикалов в течение всего XIX в. не дали результата. Только в 1900 г. учёный-химик из США Мозес Гомберг (1866-1947) в ходе опытов с органическими веществами случайно получил свободные радикалы, благодаря чему стал знаменитым основателем химии свободных радикалов. Однако только с развитием квантовой механики удалось объяснить химическую природу радикалов, а после появления метода электронного парамагнитного резонанса (Завойский, 1945) стало возможным прямо измерять их [Зенков Н.К. с соавт., 2001].

Другая линия зарождения свободнорадикальной биологии ведёт своё начало с работ великого французского химика Антуана Лавуазье (1743-1794), который впервые показал роль кислорода, открытого английским химиком Джозефом Пристли, в процессах горения, окисления и дыхания. В 1818 году другой французский исследователь, Луис-Жакоб Тенард, впервые описал перекись водорода и показал, что она может разлагаться живыми тканями с выделением молекулярного кислорода.

Впервые реакционная сущность кислородных радикалов была выявлена Фентоном в 1894 году. Изучая окисление различных соединений, он показал, что окислительная способность перекиси водорода значительно возрастает в присутствии сульфата железа. Смесь H_2O_2 с солями железа была названа реактивом Фентона. В дальнейшем Ф. Габер (1868-1934) и Й. Вайс (1905-1972) обнаружили, что высокая реакционность реактива Фентона обусловлена образованием ОН-радикалов, и показали, что для протекания реакции необходимо восстановление ионов железа. В 1930-х годах в работах Михаэлиса было показано, что абсолютное большинство химических реакций протекает через участие свободных радикалов.

Дальнейшее изучение химии радикалов связано с созданием ядерного оружия. Возникла острая необходимость изучения биологических эффектов ядерного оружия и разработки средств радиационной защиты. Проведённые в 50-60-х годах исследования влияния радиации на живые организмы показали, что действие ионизирующих излучений реализуется через образование радикалов, возникающих при расщеплении молекулы воды. В это же время группой химиков во главе с лауреатом Нобелевской премии Н.Н. Семеновым была разрабо-

тана теория цепного радикального окисления органических молекул, которая оказалась применимой для окисления липидов в составе клеточных мембран. Объединив данные положения, Б.Н. Тарусов выдвинул концепцию о свободнорадикальной патологии, которая вызывается усилением процессов свободнорадикального окисления [Зенков Н.К. с соавт., 2001].

Положительные свойства свободных радикалов в живых организмах были открыты в 1972-1973 годах. В это время была показана связь дыхательного «взрыва» в фагоцитирующих клетках с наработкой активных форм кислорода (АФК). Оказалось, что микробицидная функция фагоцитов, осуществляющих защиту организма от бактериальных инфекций, во многом зависит от способности клеток нарабатывать супероксидный радикал и перекись водорода. Показано, что кислородные радикалы широко вовлечены в процессы неспецифической резистентности организма и иммунорегуляции. Более того, снижение их продукции ослабляет неспецифический иммунитет и может являться причиной бактериального инфицирования.

Исследования, проведённые в последние десятилетия, показали, что свободные радикалы являются ключевыми элементами регуляции многих физиологических процессов на всех уровнях: от регуляции активности внутриклеточных ферментов до нервной регуляции сократительной функции желудка и внешнего дыхания.

Таким образом, свободнорадикальная биология впитала в себя большое количество противоречивых фактов и прошла длинный путь от теоретических догадок до осознания жизненно важной функции кислородных радикалов.

Таблица 1.

История развития свободнорадикальной биологии
(по Фархутдиновой Л.М., 2015).

1703 г. немецкий врач и химик Георг Эрнст Шталь (1659-1734)	Учение о флогистоне, объяснявшее горение наличием в телах живой и неживой природы горючего вещества – флогистона, который выделяется в воздух при сжигании веществ, а дыхание – удалением лишнего тепла из организма. Учение Шталя господствовало в течение почти 100 лет, до конца XVIII в.
1772 г. выдающийся английский химик Дж. Пристли (1733-1804)	Обнаружил, что мышь не может дышать кислородом так же долго, как воздухом, и пришёл к выводу о том, что в кислороде жизнь сгорает слишком быстро.
1775 г. великий французский химик Антуан Лоран Лавуазье (1743–1794)	Установил, что атмосферный воздух состоит из кислорода и азота, и горение обусловлено окислением горючих веществ в результате взаимодействия с кислородом воздуха. Дыхание, по кислородной теории Лавуазье, – это медленное горение, или окис-

	ление, в живом организме с образованием тепла и энергии
1900 г. учёный-химик из США Мозес Гомберг (1866-1947)	В ходе опытов с органическими веществами случайно получил свободные радикалы.
1914 г. учёный-химик Л.В. Писаржевский (1874–1938)	Предложил электронно-ионную теорию окислительно-восстановительных реакций, согласно которой химическое взаимодействие между веществами – это обмен электронами.
1930 г. советский биохимик В.А. Энгельгард (1894–1984)	Исследуя процессы окисления в клетке на примере эритроцитов птиц, сделал вывод, что поглощаемый клеткой кислород идет на образование аденозинтрифосфата (АТФ). Этот процесс получил название окислительного фосфорилирования
1939 г. советский биохимик В.А. Белицер (1906–1988)	Показал, что при окислительном фосфорилировании происходит перенос электронов с пищевых биомолекул на кислород, и этот процесс с двухэлектронным восстановлением кислорода представляет собой основной способ получения энергии для всего живого мира.
1939 г. немецкий биохимик и химик органик Леонор Михаэлис (1875–1949)	Изучая окислительные процессы в тканях животных, обнаружил, что они идут с образованием радикалов.
1950-е годы советский биофизик Б.Н. Тарусов (1900–1977)	Показал, что ионизирующее излучение вызывает в биологических объектах развитие свободнорадикальной реакции, являющейся важным фактором патогенеза лучевой болезни. Обладая мощным энергетическим влиянием, ионизирующая радиация активирует процессы окислительного фосфорилирования, что сопровождается усилением одноэлектронного восстановления кислорода. Сформулировал концепцию о «свободнорадикальной патологии», согласно которой свободнорадикальным реакциям принадлежит ведущая роль в развитии патологических процессов в клетке, органах и тканях. В настоящее время насчитывается более 200 болезней и патологических состояний, при которых установлено участие механизмов свободнорадикального окисления.

Советский физико-химик Н.Н. Семенов (1896–1986) и английский физико-химик С.Н. Хиншелвуд (1887–1967), удостоенные Нобелевской премии 1956 г.	Впервые объяснили взрывообразный характер свободнорадикального окисления механизмом разветвленной цепной реакции, получившей название «эффекта сплетен», в результате которого небольшое число первичных свободных радикалов вызывает взрывообразный рост их числа.
1954 г. американский исследователь Д. Харман	Выдвинул теорию, согласно которой снижение активности антиоксидантной системы с возрастом приводит к повышению интенсивности свободнорадикального окисления.
1961 г. биофизик А.И. Журавлев	Обнаружил антиоксилительную активность в животных организмах.
1969 г. американские биохимики Дж. Мак Корд и И. Фридович	Обнаружили антиоксидантную активность фермента супероксиддисмутазы. Это единственный известный фермент, субстратом которого являются радикалы. Супероксиддисмутаза превращает супероксидные анион-радикалы в молекулярный кислород и перекись водорода, которая разрушается ферментами – каталазой и пероксидазой, что обрывает цепь свободнорадикального окисления.

Лекция №2.
Физиологическая роль свободнорадикальных процессов в организме

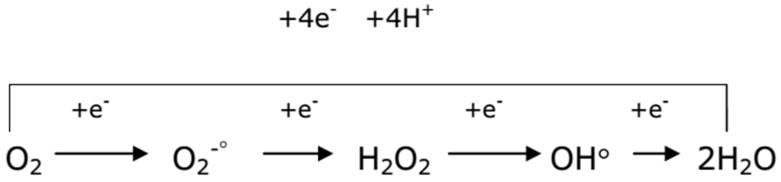
Одной из первых глобальных экологических катастроф, произошедших на планете Земля, было «загрязнение» биосферы молекулярным кислородом – продуктом жизнедеятельности сине-зелёных водорослей. Этим были обусловлены как вымирание большей части древних анаэробных прокариот, так и мощный эволюционный рывок в развитии живых организмов, который привёл к появлению аэробных эукариот, а в последующем – к огромному разнообразию животных и растительных организмов. Живые организмы успешно справились с возникшей проблемой: ***1)*** появился эффективный энергопродуцирующий механизм – окислительное фосфорилирование; ***2)*** многоклеточные организмы научились использовать реакционные продукты неполного восстановления O_2 (активные формы кислорода – АФК) для своей защиты от бактериальных агрессий, а также в качестве эффективного механизма внутри- и межклеточной сигнализации.

В настоящее время доказано, что АФК являются ключевыми элементами регуляции многих физиологических процессов на различных уровнях. Участие одних и тех же молекул в повреждении клеток и тканей, в их защите от внешней агрессии и в процессах внутри- и межклеточной регуляции позволяет счи-

тать, что образование АФК является характерным физиологическим процессом, результатом эволюционного отбора.

2.1. Характеристика активных форм кислорода. Источники образования активных форм кислорода в тканях

Основное количество молекулярного кислорода (95-98%), потребляемое организмом, расходуется на выработку энергии и окислительный катаболизм субстратов. Кроме четырёхэлектронного восстановления молекулы O_2 на компонентах дыхательной цепи митохондрий в аэробных клетках всегда происходит и неполное – одно-трёхэлектронное восстановление с образованием различных активных форм кислорода или прооксидантов [Владимиров Ю.А. и др., 1991]. Это – супероксидный анион-радикал – $O_2^{-\circ}$, перекись водорода – H_2O_2, гидроксильный радикал – OH° (реакции 1):



(1)

Основными свойствами АФК являются – высокая реакционная способность, короткое время жизни и относительно низкая концентрация в тканях. Всё это делает АФК эффективным инструментом локального действия. Особенное значение приобретают АФК в деятельности органов, отличающихся высоким уровнем аэробного метаболизма. К таким органам относятся сердце, мозг, лёгкие. Так, например, сердце при массе, составляющей всего 0,5% массы тела, поглощает около 10% всего кислорода, потребляемого организмом [Капелько В.И., 2012].

Согласно современным представлениям все АФК можно разделить на 3 группы в зависимости от их происхождения и биологического действия – первичные, вторичные и третичные [Владимиров Ю.А., 1998; Горожанская Э.Г., 2010].

Первичные радикалы образуются при одноэлектронном окислении молекул с участием металлов переменной валентности. Эти радикалы функционируют в нормальных физиологических условиях и участвуют в различных биохимических процессах, выполняя жизненно важные функции. К ним относятся супероксидный анион-радикал ($O_2^{-\circ}$) и перекись водорода (H_2O_2), участвующие в защите клетки от микроорганизмов, убихинон (коэнзим Q), участвующий в транспорте электронов в дыхательной цепи, оксид азота (NO) – многофункциональная молекула. Первичные радикалы в физиологических концентрациях не обладают мембранотоксичностью и не оказывают на организм патогенного действия. Более того, поскольку они участвуют в процессах жизнедеятельности здоровых клеток, их устранение может способствовать развитию негативных

явлений, приводящих к нарушению нормальных физиологических функций организма.

Супероксидный анион-радикал образуется в результате присоединения одного электрона к молекуле кислорода. Как анион $O_2^{-\circ}$ имеет заряд и плохо мигрирует через мембраны [Владимиров Ю.А., 1998]. Обладая способностью и отдавать, и принимать электроны, $O_2^{-\circ}$ может выступать и как восстановитель, и как окислитель. Среди его мишеней небольшие органические молекулы – катехоламины, низкомолекулярные тиолы, аскорбат, тетрагидроптерины. В кислой среде он способен образовывать гидропероксильный радикал – H_2O°, являющийся гораздо более активным окислителем, чем супероксидный анион-радикал.

Перекись водорода. В норме $O_2^{-\circ}$ под действием супероксиддисмутазы (СОД) превращается в H_2O_2, которая используется, в частности для синтеза гипохлорита (ClO^-) или разлагается нерадикальным путём под действием других защитных ферментов – пероксидаз, наибольшей активностью среди которых обладают каталаза и глутатионпероксидаза.

Оксид азота. Оксид азота (NO°) – высоколабильный, реактивный свободный радикал, который способен влиять на целый ряд физиологических и патологических процессов в организме животных и человека. Биологическая роль NO° в большей степени определяется малой величиной молекулы, её высокой реактивностью и способностью к диффузии в тканях. Образование NO° в организме человека и животных происходит при ферментативном окислении L-аргинина и обнаружено во многих клетках и тканях. Синтез NO° осуществляется семейством уникальных цитохром-Р-450-подобных гемопротеинов – NO-синтаз. Для работы NO-синтаз необходим кислород, поскольку он служит источником $O_2^{-\circ}$, включающегося в гуанидиновую группу L-аргинина. В результате этой реакции происходит 5-электронное окисление L-аргинина с образованием L-цитруллина и NO. Синтез NO° с участием различных NO-синтаз является доминирующим, но не единственным путём его генерации *in vivo*. Так, описаны катализируемое ксантиноксидазой восстановление нитрита в NO° в условиях тканевого ацидоза и при гипоксии, а также зарегистрирована реакция между аргинином и H_2O_2 с образованием NO°.

Диапазон проявлений биологический активности NO° огромен. Было показано, что этот радикал участвует в регуляции тонуса кровеносных сосудов как эндогенный вазодилататор и антагонист адренергической нервной системы, а также тормозит агрегацию тромбоцитов и их адгезию на стенках сосудов. NO° проявляет и цитотоксическую активность, выступая в качестве одного из основных эффекторов системы клеточного иммунитета.

Повреждающее действие NO° во многом опосредуется его способностью реагировать с $O_2^{-\circ}$ с образованием чрезвычайно реакционного пероксинитрита. Пероксинитрит в свою очередь повреждает любые белковые молекулы, в том числе и ферменты антиоксидантной защиты. Так, обнаружено, что пероксинитрит может повреждать митохондриальную Mn-СОД и глутатионпероксидазу, что ещё более увеличивает уровень $O_2^{-\circ}$ и в дальнейшем – пероксинитрита.

Вторичные свободные радикалы образуются из H_2O_2, липоперекисей и гипохлорита в присутствии ионов Fe (II). К ним относятся – гидроксильный радикал и липидные радикалы, участвующие в реакциях окисления ненасыщенных жирнокислотных цепей липидов биологических мембран и липопротеинов плазмы крови [Владимиров Ю.А., 1998].

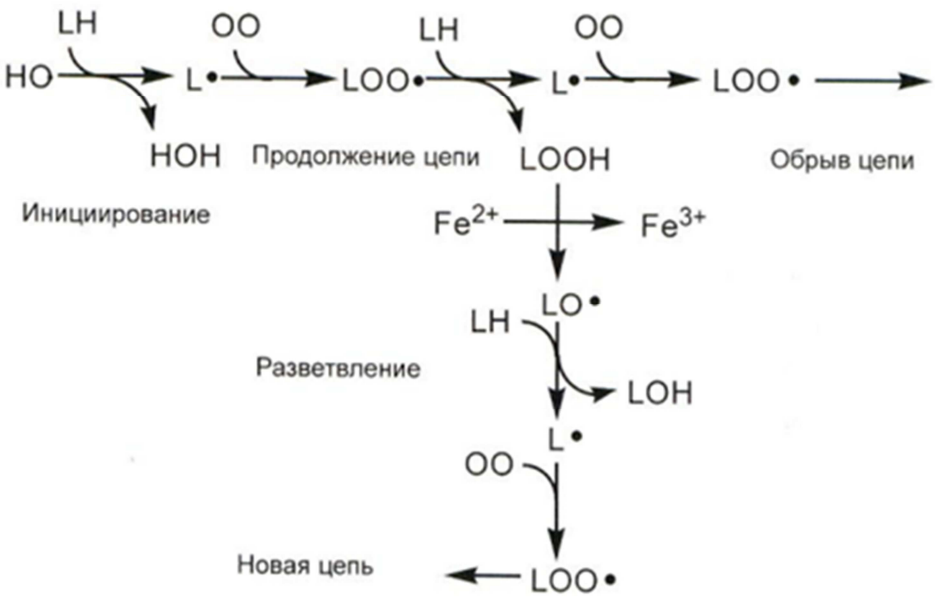
Гидроксильный радикал. Дальнейшее одноэлектронное восстановление перекиси водорода, происходящее в присутствии свободных ионов Fe^{2+} и Cu^{+} (реакция Фентона, **2**), приводит к образованию OH°, который является весьма сильным окислителем, способным атаковать нуклеиновые кислоты, белки и фосфолипиды.

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH^- + OH^\circ + Fe^{3+} \quad \textbf{(2)}$$

OH-радикал может разрывать любую C-H или C-C-связь, при этом скорость его взаимодействия с большинством органических соединений достигает величин, равных скорости его диффузии [Зенков Н.К., и др., 2001]. В обычных условиях образование OH° протекает достаточно слабо и усиливается в присутствии металлов переменной валентности.

Гидроксильный радикал атакует боковые цепи ненасыщенных жирных кислот с отщеплением водорода и образованием ***липидного радикала*** (L°) (реакции 3), который в присутствии кислорода переходит в органические радикалы кислорода (LOO°) – ***пероксильные*** радикалы. Они, в свою очередь, забирают водород от жирнокислотных цепей фосфолипидов с образованием ***гидроперекисей липидов*** (LOOH). Одновременно с этой реакцией появляются новые липидные радикалы, которые могут вновь вступить в реакционный цикл.

В результате свободнорадикального окисления жирнокислотных остатков фосфолипидов образуются продукты, которые являются источниками различных биологически активных соединений. Так, жирнокислотные ацилы до свободнорадикального окисления могут быть предварительно отщеплены от фосфолипидов с помощью фермента фосфолипаза типа A_2. Тогда в результате действия липоксигеназы, при окислении жирных кислот образуются лейкотриены, а с помощью циклооксигеназы – простагландины, тромбоксаны и простациклины. При окислении жирнокислотных ацилов без выщепления их из состава фосфолипидов образуются диеновые конъюгаты, гидроперекиси липидов, а затем – газообразные продукты и карбонильные соединения типа альдегидов и, наконец, шиффовы основания, то есть первичные, вторичные и конечные продукты перекисного окисления липидов.



(3) Реакции цепного окисления липидов [по Владимирову Ю.А., Проскуриной Е.В., 2007].

Третичные радикалы – образуются при взаимодействии вторичных радикалов с молекулами антиоксидантов и других легко окисляющихся соединений. При этом радикал антиоксиданта, вступая в реакцию с гидроперекисями липидов, образует стабильные радикалы с малой реакционной способностью.

Существует принципиальная разница в функционировании первичных и вторичных радикалов в организме. Первичные радикалы специально вырабатываются клетками и участвуют в переносе электронов в дыхательной цепи (убихинон), защите от микроорганизмов ($O_2^{-\circ}$) и регуляции кровяного давления (NO°). Вторичные радикалы в основном оказывают цитотоксическое действие, вызывая повреждение нуклеиновых кислот, инактивацию ферментов и активацию свободнорадикальных процессов в мембранах клеток [Владимиров Ю.А., 1998].

Источниками свободных радикалов в организме являются самые различные процессы, протекающие как вне-, так и внутри клеток. Обнаружен целый ряд специальных ферментов, основной функцией которых является генерация АФК:

- в дыхательной цепи митохондрий NADP-зависимая дегидрогеназа и NAD-зависимая убихинонредуктаза генерируют $O_2^{-\circ}$;
- в процессе активации NADPH-оксидазы фагоцитирующих клеток крови, эндотелиальных клеток, хондроцитов и астроцитов образуется $O_2^{-\circ}$;
- при синтезе простагландинов как по циклооксигеназному пути, так и липоксигеназному пути;
- в системе миелопероксидаза-H_2O_2-галогены, которая запускается вследствие активации фагоцитоза и приводит к образованию $O_2^{-\circ}$, OCl^- и OH°;
- при спонтанном ($O_2^{-\circ}$) или катализируемом (H_2O_2) моноаминооксидазами окислении дофамина и адреналина;

- в процессе синтеза NO° в реакции дезаминирования аминокислоты L-аргинина до цитруллина при участии гем содержащих ферментов – NO-синтаз;

- при окислении антиоксидантов, например, глутатиона, аскорбиновой кислоты.

Основным источником АФК – O_2^{-}°, H_2O_2 и OH° в клетке являются ***митохондрии***, что было впервые показано на клетках миокарда животных и человека. В нормальных условиях при окислительном фосфорилировании в митохондриях менее 5% молекулярного кислорода преобразуется в АФК. Основными участками дыхательной цепи митохондрий, где образуются АФК, являются ферменты NADH-зависимая дегидрогеназа и NADH-зависимая убихинонредуктаза. В физиологических условиях в митохондриях O_2^{-}° и H_2O_2 метаболизируются Mn-СОД и глутатионпероксидазой, в результате концентрация этих АФК поддерживается на низком уровне.

Образование АФК в митохондриях может возрастать при различных патологических состояниях, в частности при ишемии/реперфузии органов, как показано на сердце и почках, при гипоксии/реоксигенации кардиомиоцитов и при старении организма. Так, например, увеличение степени восстановленности переносчиков дыхательной цепи (NAD, NADP, FAD, коэнзим-Q), а также снижение активности СОД при ишемии создают благоприятные условия для образования O_2^{-}°. Кроме того, показано, что при ишемии восстановленные формы переносчиков дыхательной цепи – NAD, FAD и коэнзим-Q подвергаются автоокислению с образованием АФК, инициирующих свободнорадикальное окисление.

Немаловажную роль в образовании АФК играет изменение мембранного потенциала митохондрий. Так, показано, что ингибирование окислительного фосфорилирования в митохондриях приводит к повышению мембранного потенциала и усилению образования АФК.

Наиболее хорошо изученным ферментом, продуцирующим АФК, является ***фагоцитарная NADPH-оксидаза*** (молекулярная масса 240-250 kDa), которая опосредует феномен «респираторного взрыва» при активации нейтрофилов. Центральной каталитической субъединицей этого фермента является gp91phox (phox – phagocyte oxidase). Этот протеин вместе с белком p22phox составляет флавоцитохром b558, который осуществляет перенос электронов от NADPH к кислороду. Кроме того, в состав фагоцитарной NADPH-оксидазы входят три цитоплазматических белка p47phox, p67phox и Rac, выполняющие регуляторную функцию при активации этого мембранного комплекса. В функционировании и активации фагоцитарной NADPH-оксидазы также принимают участие мембранный GTP-связывающий белок Rap-1A и белки из семейства малых GTP-связывающих цитозольных белков p21rac1 и p21rac2. При стимуляции фагоцитов происходит быстрая самосборка из мембранных и цитозольных компонентов NADPH-оксидазного комплекса, осуществляющего перенос электрона с цитозольного NADPH на O_2 с образованием O_2^{-}°.

В настоящее время подобные NADPH-оксидазе ферменты, не связанные с фагоцитозом, выявлены и в других клетках. Так, например, образование АФК с участием NADPH-оксидазы обнаружено в нейроэпителиальных тельцах лёгко-

го и клетках каротидного синуса. Мембранно-связанная ферментная система, сходная по свойствам с NADPH-оксидазой была обнаружена и в гладкомышечных клетках сосудов. У человека в гладкомышечных клетках были обнаружены белки, последовательность которых на 25-55% идентична последовательности субъединицы gp91phox – это белки Nox1, Nox4 и Thox1. Анализ структуры gp91phox и его гомологов показал, что локализация этих белков внутри клетки различается, что может свидетельствовать о разной функции NADPH-оксидаз, состоящих из этих пептидов. Так, например, в нейтрофилах и макрофагах phox-пептиды находятся в цитоплазме, собираясь в активный ферментный комплекс после активации этих клеток, а гиперпродукция $O_2^{-\circ}$, осуществляемая посредством gp91phox-зависимой NADPH-оксидазы играет важную роль в реализации бактерицидного, цитотоксического и иммунорегуляторного действия нейтрофилов и макрофагов. В отличие от нейтрофилов эндотелиальные клетки содержат уже сформированную gp91phox-зависимую NADPH-оксидазу, обладающую низкой конститутивной активностью и локализованную в перинуклеарном компартменте цитоплазмы. Подобное расположение этого фермента позволяет предполагать, что продуцируемые им АФК принимают участие в регуляции апоптоза эндотелиальных клеток сосудов, ангиогенеза, выхода ионов Ca^{2+}, нитрирования внутриклеточных белков и экспрессии потенциалчувствительных генов. Структурный анализ белков Nox1 и Nox4 показал, что NADPH-оксидазы, содержащие эти пептиды, также находятся в цитозоле и, следовательно, тоже принимают участие в генерации АФК внутри клетки. Напротив, белок Thox1 локализован на плазматической мембране клеток и Thox1-зависимая NADPH-оксидаза продуцирует $O_2^{-\circ}$ во внеклеточное пространство.

Кроме NADPH-оксидазы, единственной функцией которой является образование АФК, в нейтрофилах крови, а также в нейронах головного мозга крыс и фибробластах человека, была обнаружена ***миелопероксидаза*** (МПО). МПО катализирует образование ионов гипохлорита (^{-}OCl) из хлорита (Cl^-) и H_2O_2 (реакция 5):

$$Cl^- + H_2O_2 \rightarrow {}^{-}OCl + H_2O \quad \textbf{(5)}$$

МПО относится к семейству гемовых пероксидаз/циклооксигеназ и является одним из основных компонентов бактерицидного действия нейтрофилов [Лабас Ю.А. с соавт., 2010]. МПО является тетрамерным ферментом с молекулярной массой 150 kDa и состоит из двух лёгких (15 kDa) и двух тяжёлых (60 kDa) цепей. Каждая тяжёлая цепь имеет одну Fe-Cl простетическую группу. В настоящее время показано, что МПО является маркером риска возникновения ишемической болезни сердца, участвует в окислении липопротеинов низкой плотности и потреблении эндотелиального NO°, снижая таким образом его биодоступность, сосудосуживающий и провоспалительные эффекты.

Другой специализированной на образовании АФК ферментативной системой является ***ксантиноксидаза***, которая состоит из двух близких по структуре молибден- и железосодержащих нестабильных цитозольных ферментов: собственно, ксантиноксидазы и ксантиндегидрогеназы. Оба фермента локализуют-

ся в большинстве органов, обладают широкой субстратной специфичностью и участвуют во многих окислительных реакциях, в том числе в метаболизме пуринов (гипоксантина и ксантина) с образованием мочевой кислоты, а также в окислении жирных кислот, глутатиона, адреналина.

Структурно ксантиноксидаза состоит из двух идентичных субъединиц с молекулярной массой по 145 kDa, каждая субъединица содержит 1 атом молибдена и 4 атома железа. Ограниченный протеолиз фермента трипсином приводит к образованию трёх фрагментов с молекулярной массой 20, 40 и 85 kDa. Fe_2S_2 центры располагаются в низкомолекулярном фрагменте 20 kDa, атом молибдена – в высокомолекулярном фрагменте 85 kDa, FAD – во фрагменте 40 kDa.

В физиологических условиях в мозге, почках, лёгких, селезёнке и печени крыс, а у человека – в клетках печени, тонкого кишечника и стенок артерий большая часть фермента (до 90%) находится в дегидрогеназной форме и лишь 10% в оксидазной, но в сердце содержание ксантиндегидрогеназы и ксантиноксидазы приблизительно равно. Окисление гипоксантина до мочевой кислоты с помощью ксантиндегидрогеназы происходит в присутствии NAD (реакция 6), с помощью ксантиноксидазы – без NAD, но это приводит к образованию $O_2^{-\circ}$, H_2O_2 и OH° (реакция 7). Роль ксантиноксидазы в образовании АФК может быть обусловлена, также способностью этого фермента повышать уровень свободного железа в плазме крови путём его мобилизации из ферритина печени.

$$\text{Ксантин} + H_2O + NAD^+ \xrightarrow[\text{дегидрогеназа}]{\text{Ксантин-}} \text{мочевая кислота} + NADH + H^+ \quad (6)$$

$$\text{Ксантин} + H_2O + 2O_2 \xrightarrow[\text{Ксантиноксидаза}]{} \text{мочевая кислота} + 2O_2^{-\circ} + 2H^+ \quad (7)$$

В условиях повышенного уровня свободнорадикального окисления, в частности при ишемии, ксантиндегидрогеназа может модифицироваться двумя различными способами, осуществляющимися с различной скоростью. В условиях низкой концентрации O_2 в тканях, в частности при ишемии, окисление SH-групп приводит к образованию дисульфидных связей в молекуле ксантиндегидрогеназы, что изменяет характер катализируемой ею реакции окисления гипоксантина и ксантина: она превращается в ксантиноксидазу и начинает продуцировать $O_2^{-\circ}$, то есть приводит к увеличению внутриклеточного уровня АФК. Иной путь модификации ксантиндегидрогеназы осуществляется при активации Ca^{2+}-кальмодулин-зависимых протеаз и ограниченного протеолиза фермента, что также приводит к переходу ксантиндегидрогеназы в ксантиноксидазу. Первый путь занимает десятки секунд и реализуется при даже незначительном избытке АФК. Второй путь занимает минуты и осуществляется в случае, когда нарушение мембранной структуры клеток под действием АФК приводит к повышению внутриклеточной концентрации кальция.

Превращение ксантиндегидрогеназы в ксантиноксидазу также может происходить при увеличении в клетке концентрации субстратов реакции – ксантина и гипоксантина, которое обусловлено, например при ишемии, усилением дегра-

дации адениловых нуклеотидов и накоплением в ткани продуктов их распада – пуриновых оснований.

К ферментам, обеспечивающим образование АФК, относятся также микросомальные системы транспорта электронов, а именно ***ферменты Р-450-зависимой монооксигеназной системы***, которые локализованы в мембранах эндоплазматического ретикулума печени и участвуют в детоксикации ксенобиотиков и эндогенных токсических продуктов. Основными белковыми компонентами данной системы являются цитохром Р-450 и NADPH-цитохром Р-450-редуктаза. Цитохром Р-450 играет важную роль в окислении неполярных, низкомолекулярных химических соединений, как попадающих в организм извне (лекарственные вещества, яды, пищевые добавки, атмосферные загрязнения), так и образующихся в клетке (холестерин, насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты, стероидные гормоны, простагландины и др.). Продукты окисления этих субстратов в дальнейшем или используются в качестве регуляторов в системах метаболизма клеток, или выводятся из организма.

Важную роль в образовании АФК при гидроксилировании ксенобиотиков системой микросомальных монооксигеназ играет цитохром Р-450, последовательно образующий с гидрофобным субстратом ряд фермент-субстратных комплексов. В настоящее время выделяют два пути образования АФК с участием цитохрома Р-450: при распаде окси- и пероксикомплексов цитохрома Р-450 и в результате автоокисления оксицитохрома Р-450.

В физиологических условиях образование АФК системой микросомальных монооксигеназ регулируется целым рядом факторов антиоксидантной защиты, таких как СОД, каталаза, глутатионпероксидаза, α-токоферол, глутатион и др.

Помимо рассмотренных выше ферментных механизмов образования АФК, в клетке одноэлектронное восстановление кислорода наблюдается в реакциях с ***легко окисляющимися соединениями*** (например, при окислении катехоламинов в присутствии ионов железа, при окислении полувосстановленных флавинов, семихинонов и гемового железа молекулярным кислородом). В качестве восстановителей O_2 могут выступать ионы металлов переменной валентности, NADPH и др. Например, образование $O_2^{-\circ}$ наблюдается при окислении арахидоновой кислоты по цикло- и липоксигеназному путям, где в качестве кофакторов используются NADH и NADPH. Образование АФК в клетке показано и при окислении собственно антиоксидантов. Так, особенностью действия природных низкомолекулярных антиоксидантов является то, что при определённых условиях они способны проявлять прооксидантную роль. Впервые это было отмечено для аскорбата в условиях, при которых этот типичный антиоксидант в присутствии ионов железа оказался способен инициировать перекисное окисление липидов благодаря своей способности восстанавливать трёхвалентное железо в двухвалентное. При этом молекула аскорбата переходит в окисленную форму. Реакция является обратимой, и её направление зависит от общего окислительно-восстановительного потенциала клетки. Аналогичная двойственная роль продемонстрирована для глутатиона и липоевой кислоты. Так, глутатион при автоокислении в физиологических концентрациях способен продуцировать АФК и вызывать повреждение ДНК.

Таким образом, образование АФК является ***естественным физиологическим процессом***, постоянно протекающим в организме. Именно поэтому источниками АФК, или прооксидантов являются самые различные процессы в клетке.

2.2. Физиологическая роль свободнорадикальных процессов в клетке

АФК в низких и средних концентрациях выполняют физиологические функции, играя важную роль в поддержании гомеостаза организма. Так, образующиеся в клетке ***АФК участвуют в катаболизме старых и синтезе новых молекул*** [Сазонтова Т.Г., Архипенко Ю.В., 2007; Горожанская Э.Г., 2010]. С помощью АФК в клетке происходит окисление белков и липидов, потерявших нативную конформацию в результате их повреждения или окончания биологического времени жизни. Окисление таких белков и липидов прооксидантами облегчает последующее действие ферментов деградации – фосфолипаз и протеаз, сродство которых намного выше к окисленному субстрату. С другой стороны, АФК, участвуют в постоянно протекающем синтезе новых молекул. Так, с помощью стационарного уровня свободнорадикального окисления регулируется синтез лейкотриенов, тромбоксанов, простагландинов и стероидных гормонов. Большое значение АФК для организма заключается в обновлении мембран клеток и поддержании посредством этого структурного гомеостаза.

Таким образом, участвуя в катаболизме и синтезе, АФК способствуют поддержанию функционирования клетки, а также принимают участие в её адаптации к новым условиям среды, изменяя состав мембранных фосфолипидов и обновляя эндогенный белковый спектр.

Основным источником первичных радикалов в нашем организме служат клетки-фагоциты – гранулоциты и моноциты крови, а также тканевые макрофаги. Для борьбы с бактериями эти клетки образуют $O_2^{-\circ}$ при помощи фагоцитарной изоформы NADPH-оксидазы. Резкое увеличение потребления кислорода фагоцитирующей клеткой с образованием АФК, обладающих противомикробным действием, называется ***«респираторным взрывом»***. При этом $O_2^{-\circ}$ участвует в наработке хемотаксических пептидов, индуцирует синтез интерлейкин-I-подобного фактора, усиливает митогенстимулированную пролиферацию лимфоцитов [Меньщикова Е.Б. с соавт., 2006].

АФК вносят свой вклад в ***поддержание парциального давления кислорода*** в кровотоке в целом и в отдельных областях организма. Хеморецепторные клетки каротидных тел высокочувствительны к изменению напряжения кислорода в артериальной крови. Они представлены нейроэктодермальными клубочковыми клетками I типа и высвобождают медиаторы в синапсы нейронов, ведущих к дыхательному центру. В ответ на гипоксию в хеморецепторах увеличивается активность изоформы NADPH-оксидазы, образующей АФК, которые, в свою очередь, изменяют проницаемость клеточной мембраны и работу K^+-каналов. Этот процесс ведёт к увеличению Ca^{2+} в клетке, деполяризации мембраны и

выходу нейромедиатора в синапс. Изменение уровня электрической активности в эфферентных волокнах языкоглоточного нерва ретранслируется в сенсорную информацию в стволовых нейронах мозга, которые регулируют дыхание.

АФК принимают участие в регуляции сосудистого тонуса, способствуя дифференциации кровоснабжения, а значит, и доступности кислорода в различных тканях. Практически во всех типах клеток сосудистой стенки и кардиомиоцитах обнаружено образование АФК, основными источниками которых являются изоформы NADPH-оксидазы. Активация этого ферментного комплекса происходит при действии различных факторов – гормонов, факторов роста, цитокинов, а также при гемодинамических и метаболических изменениях. Причём, если действие гормонов и факторов роста опосредовано соответствующими мембранными рецепторами, то гемодинамические и метаболические изменения непосредственно приводят к активации NADPH-оксидазы и образованию АФК. Такая особенность образования АФК в сосудистой системе позволяет рассматривать их как элемент единой реакции на воздействие и модулятор сигнальных путей. АФК, образованные комплексами NADPH-оксидазы гладкомышечных клеток сосудов, регулируют активность сигнальных белков p38 MAPK и необходимы для реализации эффекта ангиотензина II.

В процессе эволюции многоклеточные организмы научились использовать уникальные свойства АФК не только для защиты от бактериальных агрессий, но и в ***качестве эффективного механизма внутри- и межклеточной коммуникации***. Метаболизм любой клетки зависит от характера информации, поступающей из окружающей среды. Носителями этой информации являются различные гормоны, нейромедиаторы, лекарственные препараты, межклеточные контакты и др., со специфическими рецепторами на поверхности клетки, что в свою очередь вызывает активацию систем, реализующих передачу внешнего сигнала на уровень внутриклеточного метаболизма. Ключевыми факторами, контролирующими функционирование этих систем, являются вторичные мессенджеры: два циклических нуклеотида – циклический аденозинмонофосфат (cAMP) и циклический гуанозинмонофосфат (cGMP), продукты фосфоинозитидного обмена – 1,3-фосфоинозитолтрифосфат и диацилглицерол, различные протеинкиназы. Кроме того, показано, что действие ряда физиологически активных веществ (в частности, цитокинов, факторов роста) осуществляется либо через активацию процессов генерации АФК и повышение их уровня в тканях, либо через ингибирование компонентов антиоксидантной защиты. Всё это позволяет рассматривать АФК в качестве вторичных мессенджеров, участвующих в передаче сигналов в физиологических условиях от различных межклеточных сигнальных молекул и их мембранных рецепторов на контролирующие экспрессию генов внутриклеточные регуляторные системы.

Показано непосредственное участие физиологических концентраций АФК в передаче сигнала от клеточной мембраны на метаболические процессы. В их числе – влияние на состояние Ca-каналов, которое сопровождается освобождением кальция из эндотелиальных клеток сосудов, саркоплазматического ретикулума миоцитов; активация потенциал-зависимых калиевых каналов и изме-

нение мембранного потенциала; регуляция активности протеинфосфатаз и МАР-киназ (Mitogen-Activated Protein Kinase).

Другой мишенью действия АФК в качестве вторичных мессенджеров в клетке является фосфолипаза ***A_2***. Хорошо известно, что окисление мембранных фосфолипидов приводит к образованию гидроперекисей, которые могут изменять физические свойства мембраны и инактивировать белки. Изменение мембранных структур является важным фактором для активации фосфолипаз как Са-зависимых, так и Са-независимых, что приводит к освобождению таких сигнальных молекул как арахидоновая кислота, диацилглицерол и 1,3-фосфоинозитолтрифосфат, опосредованно влияющих на Са-гомеостаз клетки.

Сигнальная роль АФК осуществляется и за счёт активации факторов транскрипции, например NF-*k*B, AP-1, HIF, что приводит к последующему синтезу специфических и неспецифических белков, в том числе с защитной функцией.

Поскольку АФК образуются из различных внутриклеточных источников и при многих воздействиях на клетку, такая система приёма и передачи сигнала является неспецифической. Это приводит к тому, что практически любой ответ клетки помимо специфической компоненты, содержит и неспецифическую составляющую, опосредованную действием АФК**.**

Одним из механизмов действия АФК на регуляторные белки и факторы транскрипции является обратимое окисление SH-содержащих аминокислотных остатков цистеина или метионина в этих молекулах [Зенков Н.К. с соавт., 2009]. На сегодняшний день известно более 20 факторов транскрипции, активность которых модулируется редокс-балансом в клетках млекопитающих за счёт наличия цистеиновых остатков в их ДНК-связывающих доменах.

В дальнейшем передача сигнала от АФК может осуществляться по трём редокс-чувствительным механизмам [Сазонтова Т.Г., Архипенко Ю.В., 2007; Сазонтова Т.Г. с соавт., 2008] (рис. 1):

1) через индукцию киназных каскадов, например МАРК (Mitogen-Activated Protein Kinase) и фосфорилирование белков;

2) через изменение работы нейтральных протеаз, которые модифицируют многие белки, ингибируя или активируя их за счёт частичного протеолиза или через изменение уровня ионов медиаторов, например, Ca^{2+};

3) через активацию факторов транскрипции, отвечающих на изменение окислительно-восстановительного баланса.

Основная регуляторная система, контролирующая экспрессию генов в ответ на действие АФК, представлена в клетке ядерными факторами транскрипции NF-*k*B, AP-1, NRf2, HIF-1α, HIF-3α, Ref-1 и др. Роль факторов транскрипции заключается в том, что после активации они взаимодействуют с ДНК и инициируют синтез многочисленных защитных белков в клетке, среди которых антиоксидантные ферменты СОД, каталаза, гем-оксигеназа; белки семейства HSP, Fe^{2+}- связывающие белки. Повышение уровня этих белков способствует адаптации и выживаемости клеток в неблагоприятных условиях. Кроме того, АФК активируют экспрессию генов сигнальных молекул – тирозингидроксилазы, эритропоэтина, онкопротеинов *c-fos* и *c-jun* и белков с репаративными функциями, предупреждающими повреждения генома клетки.

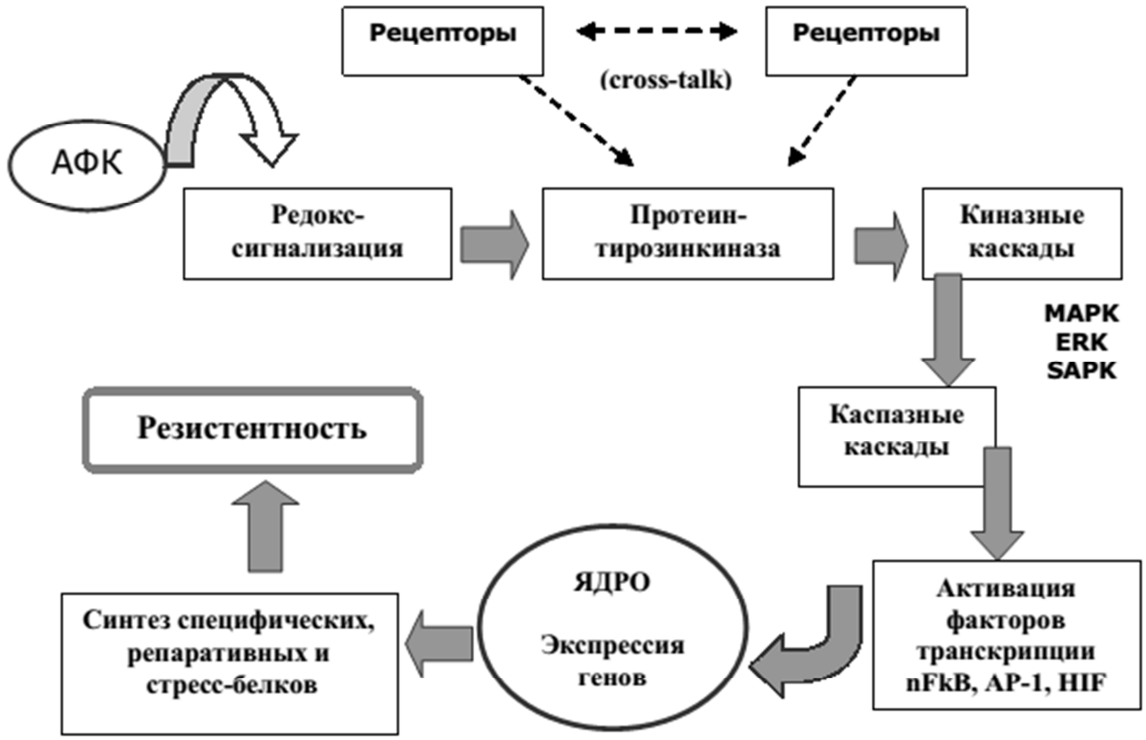


Рис. 1. Редокс-чувствительные механизмы передачи сигнала от АФК в клетке [по Т.Г. Сазонтовой с соавт., 2008].

Фактор транскрипции NF-*k*B контролирует экспрессию многих десятков генов, действие которых направлено на повышение устойчивости клеток к стрессорным воздействиям, на подавление апоптоза и регуляцию процессов клеточного иммунитета. Активация его происходит под действием воспалительных цитокинов и эндотоксинов различной природы. В неактивном состоянии фактор NF-*k*B предсуществует в клетке в форме тримера, включающего субъединицы Rel (p65), NF-*k*B1 (p50) и I*k*B. Последняя субъединица является ингибирующей и препятствует перемещению NF-*k*B из цитоплазмы в ядро. Фосфорилирование I*k*B по остаткам серина вызывает диссоциацию этой субъединицы из комплекса с NF-*k*B и её последующую протеолитическую деградацию. Удаление субъединицы I*k*B приводит к активации фактора NF-kB (p65/p50 димер) и его перемещению в ядро. Вместе с тем показано, что фактор NF-*k*B по принципу обратной связи участвует в регуляции транскрипции гена, кодирующего субъединицу I*k*B, и способствует восстановлению исходного уровня собственного ингибитора.

В активном состоянии фактор транскрипции NF-*k*B обладает повышенной чувствительностью к АФК, что обеспечивает его регуляцию различными антиоксидантами, например, тиоредоксином. Тиоредоксин – это низкомолекулярный (12 kDa) тиолсодержащий белок, который может находиться в клетке в восстановленном или окисленном состоянии в зависимости от присутствия в цитоплазме восстановителей (например, глутатиона) или АФК, являясь, таким образом, внутриклеточным сенсором свободных радикалов. Тиоредоксин способен поддерживать в активном состоянии многие клеточные белки, что было

показано, в частности, для NF-*k*B. В редокс-зависимой регуляции NF-*k*B участвует цитоплазматическая тиоредоксинпероксидаза, которая окисляет тиоредоксин в реакции с H_2O_2. При накоплении в клетках окисленного тиоредоксина происходит активация NF-*k*B, а увеличение внутриклеточного уровня восстановленного тиоредоксина приводит к его ингибированию.

Таким образом, активация NF-*k*B с помощью не только провоспалительных стимулов, но и в результате редокс-сигнализации, обеспечивает экспрессию различных белков, в числе которых могут быть факторы пролиферации, адгезии или воспаления, и тем самым играет важную роль в регуляции иммунных, воспалительных ответов клетки, а также в регуляции клеточной пролиферации (табл. 2).

Таблица 2.

Гены, регулируемые фактором транскрипции NF-*k*B

[по Зенкову Н.К. с соавт., 2009]

Гены	
Факторы транскрипции	c-myc c-rel junB HIF-1 Интерферонрегулирующий фактор 1, 2 Предшественники NF-*k*B (p100, p105) p53 Ингибитор Rel/NF-*k*B (I*k*B)
Белки острой фазы	Ангиотензиноген Фактор комплемента B, C4 С-реактивный белок Активатор плазминогена урокиназного типа
Молекулы адгезии	Молекула межклеточной адгезии Рецептор адгезии тромбоцитов Молекула адгезии клеток сосудов Эндотелиоцитарная молекула адгезии лейкоцитов
Цитокины	Интерлейкины: IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-15, IL-17, IL-23 Интерферон γ Лимфотоксин α, β Фактор некроза опухоли (TNF) α, β
Ферменты	Коллагеназа I Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа Лизоцим Трансглутаминаза Ксантиноксидоредуктаза
Факторы роста	Колониестимулирующие факторы Инсулиноподобный фактор роста-связывающий белок

	1, 2 Тромбоцитарный фактор роста Тромбоспондин Фактор роста эндотелия сосудов
Иммунный ответ	Цепи ε и к иммуноглобулинов Главный антиген гистосовместимости класса I, II Рецептор IL-2 β_2-Микроглобулин Рецептор Т-клеток
Гены стресс-ответа	Ангиотензин II Циклооксигеназа 2 Липоксигеназа Индуцибельная NO-синтеза Фосфолипаза A_2 Mn-супероксиддисмутаза (Mn-СОД)
Регуляторы апоптоза	Гомолог Bcl-2 cCD95 (Fas) Индукторы апоптоза
Разное	Аполипопротеин С III Циклин D Фактор VIII Виментин α_1-Антитрипсин

Фактор транскрипции АР-1 (Activating Protein-1) представляет собой специфичный к последовательности ДНК транскрипционный фактор, вовлечённый в регулирование экспрессии большого числа генов, контролирующих различные клеточные процессы, такие как регуляция клеточного цикла, контроль роста, пролиферация и дифференцировка тканей, репарация ДНК, апоптоз. АР-1 на уровне организма выполняет важную роль в функционировании иммунной системы, воспалительной реакции, клеточной адгезии.

Активация АР-1 происходит в ответ на самые разнообразные стимулы: цитокины, факторы роста, стрессовые агенты, влияющие на окислительно-восстановительный баланс в клетке. Одним из главных эффектов активации этого фактора транскрипции является усиление клеточной пролиферации.

Одним из важных следствий ограниченного повышения уровня АФК является активация **фактора транскрипции, индуцируемого гипоксией – HIF** (Hypoxia Inducible Factor), контролирующего экспрессию более 100 генов. HIF опосредовано, через специфические и неспецифические белки, оказывает влияние на важнейшие функции организма. К ним относятся: поддержание гомеостаза железа через повышение уровня железо-связывающего и железо-переносящего белков; регуляция энергетического обмена, в частности синтеза ферментов гликолиза, транспорта глюкозы; поддержание баланса антиоксидантной системы; активация или подавление апоптоза; индукция неоангиогенеза.

HIF представляет собой гетеродимерный редокс-чувствительный белок и состоит из двух субъединиц – HIF-α (120 kDa) и HIF-β (или ARNT – Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator, 91-94 kDa). Обе субъединицы имеют сайт ядерной локализации (NLS) и мотив «спираль-петля-спираль» (bHLH), характерный для многих факторов транскрипции и отвечающий за олигомеризацию. Ещё одним общим мотивом для α- и β-субъединиц является домен Per/ARNT/Sim (PAS-домен). Этот домен определяет принадлежность HIF к большому семейству димерных эукариотических факторов транскрипции и отвечает за димеризацию, связывание с ДНК и взаимодействие с РНК-полимеразой. Кроме этих доменов в α-субъединице выделяют также два трансактивационных домена: N-terminal transactivation domain (N-TAD) и C-terminal transactivation domains (C-TAD). NTAD необходим для генной специфичности, в то время как C-TAD способствует регуляции большинства HIF-зависимых генов. Кроме того, оба белка достаточно консервативны – сходство последовательности HIF человека, мыши и крысы составляет приблизительно 90%.

Субъединица HIF-β является конститутивным ядерным белком, уровень которого не зависит от концентрации кислорода в клетке. Субъединица HIF-β имеет различных партнёров димеризации и в других системах генной регуляции. Так, HIF-β образует гетеродимерный комплекс с AHR (Aryl Hydrocarbon Receptor). Этот комплекс способен связываться с ксенобиотик-чувствительным элементом в молекуле ДНК, контролирующим гены, продукты которых участвуют в метаболизме ксенобиотиков.

Субъединица HIF-α является индуцибельной, кислородчувствительной и выполняет важную роль в адаптации организма к недостатку кислорода. Выделяют 3 её изоформы, которые обладают различными биологическими свойствами – HIF-1α, HIF-2α и HIF-3α. Основные различия между этими молекулами заключены в NTAD участке, точнее в домене O_2-зависимой деградации (ODD). Кроме этого, субъединица HIF-3α не имеет C-TAD на С-конце, что делает её слабым транскрипционным фактором по сравнению с HIF-1α и HIF-2α. В настоящее время обнаружено по 6 изоформ HIF-1α и HIF-3α, образующихся в результате альтернативного сплайсинга. Показано, что изоформа HIF-3α4, у которой отсутствуют домены ODD, N-TAD и C-TAD является эндогенным ингибитором HIF-1α (рис. 2).

HIF-1α и HIF-2α имеют очень близкие биохимические свойства, но каждая субъединица контролирует свои определённые биологические функции. Например, в процессе эмбриогенеза HIF-1α контролирует процесс образования сосудов, а HIF-2α – продукцию катехоламинов. Изоформа HIF-1α отвечает за экспрессию генов, участвующих в регуляции углеводного обмена (в частности, в регуляции гликолиза), антиоксидантной системы, тогда как HIF-2α регулирует синтез эритропоэтина в печени и основного транспортёра железа (Divalent Metal Transporter 1 – DMT1) в тонком кишечнике.

В целом гены, регулируемые изоформами субъединицы HIF-α, можно разделить на 3 группы: ***1)*** специфически регулируемые HIF-1α (например, гены ферментов гликолиза и антиоксидантные ферменты); ***2)*** специфически регулируемые HIF-2α (например, гены фактора роста TGF-α и эритропоэтина); 3) регули-

руемые двумя изоформами HIF-1α и HIF-2α (например, гены фактора роста VEGF и транспортёра глюкозы – GLUT1).

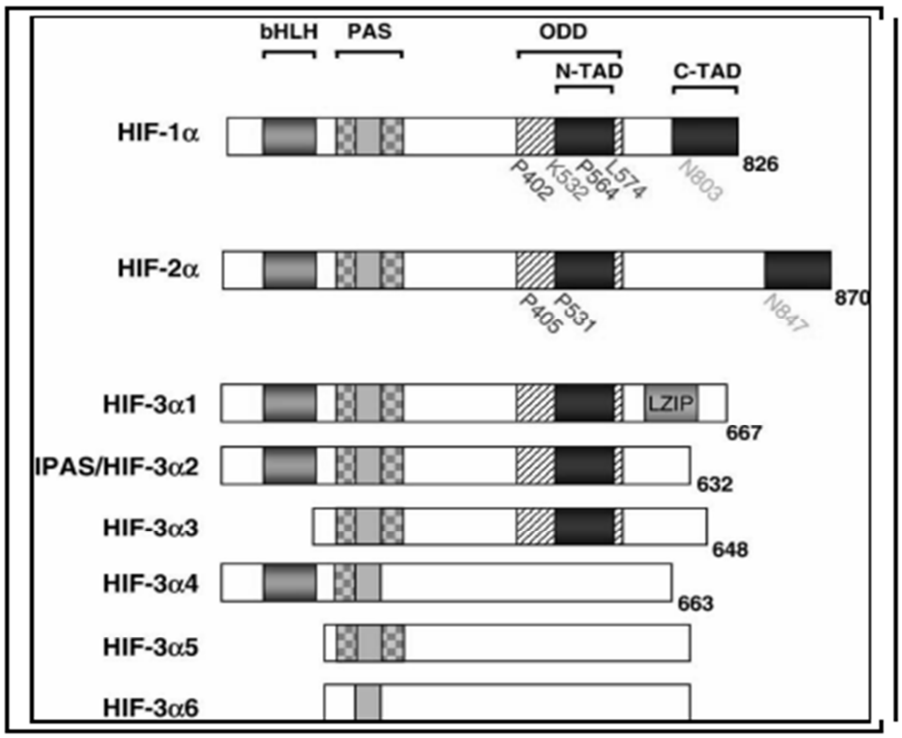


Рис. 2. Изоформы субъединицы HIF-α

Примечание: bHLH – мотив «спираль – петля – спираль»; PAS – Per/Arnt/Sim domain (PASдомен); ODD – домен O_2-зависимой деградации; N-TAD – N-terminal transactivation domain; C-TAD – C-terminal transactivation domain.

Выявлены тканеспецифические особенности экспрессии изоформ HIF. Так, например высокий уровень мРНК HIF при нормоксии обнаружен в мозге (кора, гиппокамп) и лёгких, причём в мозге высоко экспрессированы субъединицы HIF-1 и HIF-β, тогда как в лёгком только HIF-2α. Самый низкий уровень мРНК субъединиц HIF-1, HIF-2 и HIF-3 зарегистрирован в сердце и печени. Наибольший уровень мРНК для HIF-2α показан в тканях, участвующих в системной доставке кислорода – в лёгких, сердце и эндотелии сосудов. Кроме того, выявлен клеточно-специфический характер экспрессии изоформ HIF-α. Так, в тубулярных клетках почек был обнаружен только HIF-1α, в то время как HIF-2α экспрессировался в эндотелиальных клетках и фибробластах. Изоформа HIF-3 экспрессируется во всех тканях. Показано, что её сплайс-форма IPAS/HIF-3α2 высоко экспрессирована в клетках Пуркинье мозжечка и роговичном эпителии.

Наименее изученной является изоформа ***HIF-3α***. Подобно HIF-1α и HIF-2α, HIF-3α способен димеризоваться с субъединицей HIF-1β, в результате полученный гетеродимер распознаёт HRE на промоторе генов-мишеней. Структурная организация гена HIF-3α видоспецифична и включает различное количество экзонов. Так, ген HIF-3α в хромосоме 7 мыши состоит из 18 экзонов, при этом экзоны 1 и 1a содержат альтернативные сайты транскрипции. Ген HIF-3α человека в хромосоме 19 состоит из 19 экзонов, а три альтернативных сайта транскрипции расположены в экзонах 1a, 1b и 1c [Ravenna L. et al., 2016]. Наличие

разных сайтов транскрипции приводит к образованию длинных и коротких полипептидных цепей HIF-3α за счёт механизма альтернативного сплайсинга. Кроме того, у человека в образовании альтернативных полипептидов HIF-3α участвуют экзоны 13 и 14. В результате происходит образование 10 вариантов этого белка: HIF-3α1- HIF-3α10.

Субъединицы HIF 1α и 2α участвуют в регуляции транскрипции HIF-3α. Показано, что HIF-3α и HIF-1α могут регулировать экспрессию одних и тех же генов – усиливают активность генов, участвующих в метаболизме глюкозы и аминокислот, апоптозе, протеолизе белков, в передаче сигнала от фактора транскрипции p53. HIF-3α, но не HIF-1α, увеличивает экспрессию генов, участвующих в метаболизме азота и в сигнальных путях Jak-STAT. Экспрессия генов, связанных с глюконеогенезом, метаболизмом арахидоновой кислоты и инозитолтрифосфата, активацией фактора роста эндотелия сосудов и MAPK, регулируется только HIF-1α.

Транскрипция и трансляция ***HIF-1α*** в клетках идут постоянно с затратой большого количества энергии. Однако в условиях нормоксии время полужизни этого фактора транскрипции составляет не менее 5 мин. В настоящее время описано несколько механизмов регуляции уровня HIF-1 в клетках. Так, стабилизация и активация HIF-1α регулируется его посттрансляционной модификацией, включающей гидроксилирование, ацетилирование, убиквитинирование и фосфорилирование.

В физиологических условиях содержание HIF-1α в клетке минимально, за счёт его протеасомной деградации. Важными регуляторами этого процесса являются белок vonHippel-Lindau (pVHL) и ферменты пролил-гидроксилазы. Показано, что высокая активность пролилгидроксилаз зависит от уровня кислорода, Fe^{2+}, pH среды и косубстратов реакций пролил-гидроксилирования – α-кетоглутарата и аспартата. α-Кетоглутарат синтезируется в реакциях цикла Кребса, а окисляется в реакциях субстратного фосфорилирования и в $НАД^{+}$-зависимых реакциях, катализируемых митохондриальным дыхательным комплексом I. Вовлечение α-кетоглутарата в пролил-гидроксилазные реакции сопряжено с образованием в цитозоле сукцината – ингибитора этих реакций, что необходимо, по-видимому, для притормаживания активности пролил-гидроксилаз, и может быть причиной небольшого фонового содержания HIF в условиях нормоксии. Последнее необходимо для индукции базового содержания генов, ответственных за синтез энергии.

При снижении уровня кислорода происходит ингибирование пролил-гидроксилаз и подавление протеасомной деградации HIF-α, что приводит к его стабилизации и транслокации в ядро. После этого HIF-α в ядре связывается с субъединицей HIF-1β и с коактиватором транскрипции CBP/p300. CBP/p300 связывается с α- и β-субъединицами по C-TAD и рекрутирует дополнительные коактиваторы транскрипции – TIF2 (Transcription Intermediary Factor-2), SRC-1 (Steroid Receptor Coactivator-1) или Ref-1 (Redox Factor-1). Кроме того, при длительной гипоксии происходит фосфорилирование HIF-α с помощью MAPK или PI3K, что также приводит к повышению его транскрипционной активности. При этом в условиях гипоксии этот путь активации HIF-α усиливается АФК.

Недавними исследованиями показано участие белков семейства HSP в стабилизации HIF при нормоксии и гипоксических состояниях [Тихонова Н.С. с соавт., 2008]. Так, белок HSP90 связывается с доменом PAS в HIF-1β, тогда как HSP70 узнаёт в субъединице HIF-1α домен кислородзависимой деградации. В результате этих межбелковых взаимодействий происходит стабилизация фактора HIF-1 в физиологических условиях. В тоже время, белок HSP70 увеличивает время жизни HIF-1 в клетках, подвергнутых гипоксическому воздействию.

Важную роль в стабилизации HIF-1α играет уровень АФК в клетке. Субъединица HIF-1α содержит негемовое железо (два атома Fe (II) на одну молекулу белка) и активный остаток цистеина, которые образуют железосерный кластер, выполняющий функцию рецептора АФК. При гипоксии, в частности в митохондриях увеличивается уровень АФК, под действием которых происходит окисление и диссоциация связанных с HIF-1α ионов железа. Эта модификация подавляет протеасомную деградацию HIF-1α и делает возможным связывание её с субъединицей HIF-1β и транслокацию в ядро. Процессы окисления в митохондриях не только регулируют уровень HIF-1 в клетке, но и сами являются мишенью для воздействия этого фактора [Анохина Е.Б., Буравкова Л.Б., 2010]. Показано, что HIF-1 повышает экспрессию киназы, ингибирующей пируватдегидрогеназу, что препятствует включению пирувата в цикл Кребса. В результате снижается потребление кислорода митохондриями и образование АФК при гипоксии.

В стабилизации HIF-1α в условиях гипоксии участвуют также АФК, образованные NADPH-оксидазой эпителиальных клеток. Эти АФК стабилизируют HIF-1α через Ca^{2+}-зависимый сигнальный путь, активирующий фосфолипазу Cγ (PLC) и протеинкиназу C (PKC).

После активации и стабилизации транскрипционный фактор HIF-1 способен связываться с гипоксия-чувствительным элементом (HRE) в регуляторной области HIF-зависимых генов, экспрессия которых необходима для регуляции метаболизма, ангиогенеза, пролиферации и выживания клеток не только в физиологических условиях, но и при гипоксическом воздействии (табл. 3).

Таблица 3.

Роль HIF и HIF-зависимых генов в регуляции гомеостаза клетки при физиологических и гипоксических условиях.

Процессы	**HIF-зависимые гены**
Регуляция транспорта O_2:	
Эритропоэз	Эритропоэтин
Ангиогенез	VEGF, VEGFR-1 и 2
Сосудистый тонус	Эндотелин-1, iNOS, HOx-1
Энергетический обмен:	
Ферменты гликолиза:	Лактатдегидрогеназа
	Фосфоглицераткиназа-1
	Альдолаза A и C
	Фосфофруктокиназа L и C
	Пируваткиназа M

	Енолаза А
	Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа
Транспорт глюкозы	Транспортёры глюкозы – GLUT-1 и 3
Синтез катехоламинов	Тирозингидроксилаза
Эритропоэз и обмен железа	Эритропоэтин
	Трансферрин, рецептор трансферрина
	Церулоплазмин
Метаболизм гема	Heme oxygenase 1 (HOx-1) Гемоглобин
Факторы роста	Transforming growth factor (TGF-β), Placental growth factor (PGF), Platelet-derived growth factor (PDGF-β), Angiogenic factor angiopoietin (ANGPT-1 и 2), Hepatocyte growth factor (HGF)
Регуляция апоптоза	Ингибиторы: Bcl-2, McI1
	Стимуляторы: Bax
Антиоксидантная система	Каталаза Супероксиддисмутаза Глутатионредуктаза
Белки теплового шока	HSP70, HSC70 HSP90, HSC90
Ангиогенез и тонус сосудов	Vascular endothelial growth factor (VEGF) VEGF receptor-1 Endocrine-gland-derived VEGF (EG-VEGF) Leptin (LEP) Nitric oxide synthase (NOS2) HOx-1 Endotelin 1 (ET1) Adrenomedulin (ADM) α1B-Adrenergic receptor
Матриксный метаболизм	Матриксные металлопротеиназы (MMPs) Plasminogen activator receptors and inhibitors (PAIs) Collagen prolyl hydroxylase
Метаболизм ксенобиотиков	Цитохромы P450 – CYP1A1, CYP1A2
Регуляция активности HIF	p35srj HIF-1 prolyl hydroxylase PHD3 (EGLN3) HIF-1 prolyl hydroxylase PHD2 (EGLN1)

Таким образом, АФК образующиеся преимущественно в процессе метаболической активности клетки, являются вторичными мессенджерами во множественных внутриклеточных и тканевых реакциях, модулируют активность митогенных сигнальных путей. Изменение уровня АФК приводит к широкому спектру клеточных ответов, таких как пролиферация, дифференцировка, ми-

грация и гибель клеток. Образование АФК в ряде случаев имеет значение для регуляции функций организма в целом: уровня неспецифической и специфической иммунной защиты, сосудистого тонуса, ангиогенеза, поддержания парциального давления кислорода, синтеза гормонов щитовидной железы. АФК и антиоксидантная система образуют ***редокс-гомеостатическую систему***, обеспечивающую возможность функционального ответа на сигнал, а также сохранение баланса в изменяющихся условиях внешней и внутренней среды.

Лекция №3.
Современные представления о стратегии защиты клеток от свободнорадикальных процессов

АФК постоянно образуются и являются необходимым компонентом жизнедеятельности клеток и организма в целом. Они принимают участие во многих метаболических и регуляторных процессах. Условием осуществления всех этих процессов является поддержание физиологического уровня АФК за счёт функционирования ***антиоксидантной системы***. АФК и антиоксидантная система образуют ***редокс-гомеостатическую систему***. Для поддержания физиологического уровня АФК требуется постоянная регенерация различных компонентов антиоксидантной системы, а это активные энергоёмкие процессы, требующие согласованной работы на всех уровнях организма, клеток, клеточных структур и генов. Изменение любого из компонентов редокс-гомеостатической системы ведёт к дисбалансу, который, в свою очередь, приводит к компенсаторным реакциям на локальном уровне.

3.1. Внутриклеточные защитные системы – классификация и механизм действия

Система антиоксидантов – один из наиболее важных внутриклеточных способов поддержания физиологического уровня АФК и недопущения повреждений, обусловленных цитотоксическим действием свободных радикалов. Каждая клетка обладает целым комплексом белковых и небелковых соединений, обладающих антиоксидантной способностью, активация которых зависит от типа и степени повреждения. Увеличение активности системы антиоксидантной защиты всегда связано с ростом концентрации субстратов для антиоксидантов, а именно, повышением уровня АФК и продуктов свободнорадикального окисления. Именно они являются сигналом к увеличению синтеза новых молекул антиоксидантов и появляются при различных повреждающих воздействиях на организм – остром стрессе, ишемии, гипоксических воздействиях, температурном шоке и т.д.

Условно антиоксидантную систему можно разделить на ***специфическую*** и ***неспецифическую***. К специфической можно отнести ферментативные и неферментативные компоненты, которые направлены на снижение уровня прооксидантов, что приводит к обрыву цепей свободнорадикальных реакций. Действие

неспецифического компонента связано со снижением возможности дополнительной генерации свободных радикалов (рис. 3).

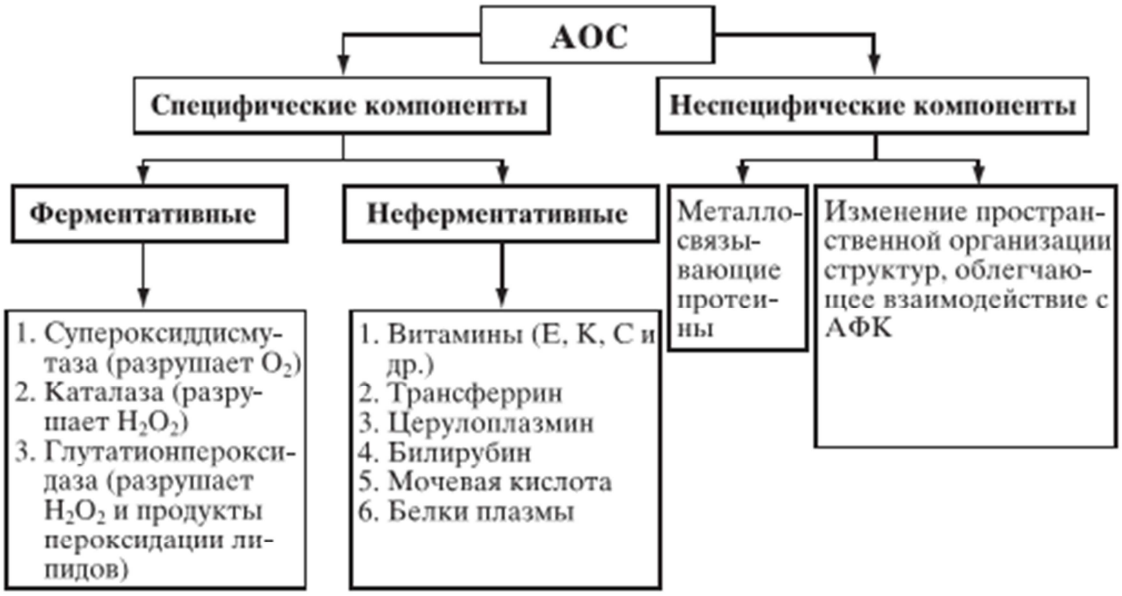


Рис. 3. Схема антиоксидантной системы [по Дубининой Е.Е., 2006].

Биохимические механизмы антиоксидантной защиты организма представляют собой сложную систему, в которой выделяют 4 главных звена:

– ферменты антиоксидантной защиты;

– низкомолекулярные антиоксиданты, синтезируемые в организме;

– естественные антиоксиданты, поступающие в организм с пищей (аскорбиновая кислота – витамин ***C***, α-токоферол – витамин ***E***, рутин – витамин ***P***, флаваноиды, β-каротин и другие каротиноиды, предшественники группы витаминов ***A***. Кроме витаминов и их предшественников, к этой же категории веществ могут быть отнесены химические элементы, входящие в состав активных центров антиоксидантных ферментов, например, селен);

– специфические белки и пептиды, которые связывают ионы переходных металлов, катализирующие реакции свободнорадикального окисления (ферритин – в клетках, трансферрин и церулоплазмин – в плазме, карнозин – в мышцах и др.).

Согласованная работа этих механизмов поддерживает на постоянном уровне, как образование, так и превращения свободных радикалов и других потенциально опасных соединений.

3.1.1. Ферментные антиоксидантные системы

В процессе эволюции в клетках для защиты от АФК выработались специализированные системы ***ферментов антиоксидантной защиты***, к которым относятся СОД, катализирующая реакцию дисмутации супероксидного анион-радикала в H_2O_2, каталаза, разлагающая перекись водорода, глутатион-зависимые пероксидазы и трансферазы, удаляющие органические перекиси.

СОД и каталаза не нуждаются в кофакторах, что делает их работу автономной, не зависящей от функционирования других клеточных структур. В то же время для работы глутатион-зависимых ферментов необходим восстановленный глутатион, который синтезируется (преимущественно в печени) глутатионсинтетазой или восстанавливается в реакции с глутатионредуктазой.

Ферменты антиоксидантной защиты характеризуются: ***1*** – высокой специфичностью действия, направленного против определенных форм АФК и ***2*** – специфичностью клеточной и органной локализации

Супероксиддисмутаза (КФ 1.15.1.1, супероксид: супероксид-оксидоредуктаза) – находится «у самых истоков» образования АФК и представляет наиболее важный уровень клеточный защиты [Fridovich I., 1995]. В организме человека и животных выделяют 3 изоформы фермента: цитозольная – Cu,Zn-СОД, митохондриальная – Mn-СОД и внеклеточная (экстрацеллюлярная) высокомолекулярная форма – Э-СОД (Cu,Zn-СОД). Каждый изозим кодируется определённым геном, расположенным у человека на хромосомах 21q21, 6q27 и 4p соответственно.

Cu,Zn-СОД содержится в ядре, цитоплазматическом матриксе, пероксисомах и межмембранном пространстве митохондрий. Молекулярная масса Cu,Zn-СОД 31 kDa, молекула состоит из двух идентичных субъединиц, связанных дисульфидным мостиком. Каждая субъединица содержит один атом Cu^{2+} и один атом Zn^{2+}. Считается, что атом цинка необходим для стабилизации молекулы фермента, в то время как медь принимает непосредственное участие в дисмутации супероксидного анион-радикала [Зенков Н.К. и др., 2001].

Mn-СОД локализована в митохондриях, имеет молекулярную массу около 40 kDa и состоит из 4 субъединиц, содержащих ион марганца в активном центре. Характерной особенностью Mn-СОД является её высокая резистентность к действию перекиси водорода, а также индуцибельность. Так, например, было показано, что в фибробластах человека под действием ионизирующей радиации в 2 раза повышается скорость транскрипции мРНК Mn-СОД и в 3 раза – её стабильность.

Э-СОД – является важным ферментом антиоксидантной защиты межклеточных жидкостей. Молекулярная масса Э-СОД составляет 135-147 kDa. Активный центр фермента содержит по 4 атома Cu^{2+} и Zn^{2+}. Характерной особенностью Э-СОД является наличие гепарин-связывающего участка в молекуле фермента, который содержит группы положительно заряженных аминокислот, а также наличие участка для гликозилирования. Несмотря на то, что максимальная активность Э-СОД регистрируется во внеклеточной жидкости, показана экспрессия этого фермента в фибробластах, эндотелиальных клетках сосудов. При усилении свободнорадикального окисления Э-СОД способна перемещаться в клеточное ядро, что может играть важную роль в защите генома от повреждений, вызванных повышенным уровнем АФК.

Особенностью функционирования СОД является то обстоятельство, что в присутствии избыточного количества H_2O_2 она может образовывать гидроксильный радикал, который атакует саму белковую молекулу СОД, приводя к её

фрагментации и потере активности. Таким образом, для эффективной работы этот фермент, вероятно, нуждается в присутствии низкомолекулярных антиоксидантов, либо согласованной работы с пероксидазами.

Одним из главных ферментов, связанных с метаболизмом H_2O_2, является каталаза. **Каталаза** (КФ 1.11.1.6, H_2O_2-оксидоредуктаза) – это железосодержащий протопорфирин с молекулярной массой около 250 kDa, обладающий двойной функцией – каталазной и пероксидазной. При высоких концентрациях H_2O_2 в клетке преобладает каталазная активность фермента, а при низких концентрациях – пероксидазный путь расщепления перекиси водорода. Имеются данные, что каталаза может также неспецифически стимулировать распад гидроперекисей липидов.

В организме человека и животных максимальное содержание каталазы обнаружено в эритроцитах, печени и почках, а низкий уровень фермента зарегистрирован в сердце и особенно в мозге. В клетках каталаза локализована преимущественно в пероксисомах, и низкий уровень её обнаруживают в цитозоле и в митохондриях. Каталаза относится к ферментам, которые наиболее длительно сохраняют свою высокую активность, и скорость её реакции зависит лишь от скорости диффузии субстрата к активному центру фермента. В то же время во внеклеточных жидкостях каталаза быстро теряет свою активность в результате действия протеолитических ферментов.

Каталаза и СОД «работают» сопряжённо – их активность в определённых условиях изменяется однонаправленно, чаще в сторону повышения, в результате эффективно снижается уровень свободных радикалов и продуктов свободнорадикального окисления.

Другим ферментом, контролирующим уровень H_2O_2 в клетке, является **глутатионпероксидаза** (КФ 1.11.1.9, глутатион: перекись водорода оксидоредуктаза, GPx), локализованная в цитозоле и матриксе митохондрий. Наиболее высокую активность GPx регистрируют в тканях печени, почки и эритроцитах. Глутатионпероксидаза катализирует реакции разложения перекисей более широкого спектра. Помимо H_2O_2 она способна восстанавливать гидроперекиси жирных кислот, а также перекиси белкового или нуклеинового происхождения. Глутатионпероксидаза способствует разложению H_2O_2 и других гидроперекисей в реакции окисления-восстановления глутатиона. В регуляции этой реакции могут участвовать также аскорбат, тиоредоксин, NADH и даже ионы йода или хлора. Восстановление окисленного глутатиона, образующегося в глутатионпероксидазной реакции, осуществляется в сопряжённой системе NADPH – глутатионредуктаза. Восстановленный NADPH, который необходим для работы глутатионредуктазы, происходит главным образом из пентозофосфатного шунта [Зенков Н.К. и др., 2001]. Сродство глутатионпероксидазы к H_2O_2 выше, чем у каталазы, поэтому она более эффективно работает при низких концентрациях перекиси водорода, в то же время в защите клеток от окислительного стресса, вызванного высокими концентрациями H_2O_2, ключевая роль принадлежит каталазе.

В тканях человека и животных глутатионпероксидазная активность представлена мере пятью изоформами, которые находятся под независимым генети-

ческим контролем, различаются по первичной структуре, тканевой локализации и специфичному распределению у разных видов [Ефимцева Э.А., Челпанова Т.И., 2009]. Глутатионпероксидаза-1 (***GPx-1***) – основная изоформа глутатионпероксидазы, содержит в активном центре селен (Se). От уровня Se зависит экспрессия гена GPx-1 и соответственно активность изоформы. В клетках GPx-1 присутствует в цитоплазме и митохондриях, причём на долю митохондриальной изоформы приходится приблизительно $^1/_3$ активности фермента. Ген GPx-1 экспрессируется не только в клетках различных тканей, но и в местах их контакта с жидкостями организма: почках, мерцательном теле, плоде и материнском организме.

Второй изофермент глутатионпероксидаза-2 (***GPx-2***, ген GPx-2 у человека на хромосоме 14q24.1) также является внутриклеточным изозимом, но при этом не зависит от уровня селена. Эта изоформа экспрессируется только в эпителии желудочно-кишечного тракта, а у человека – ещё и в печени; обнаруживается в основном в цитоплазме клеток.

Основным антиоксидантным ферментом плазмы из семейства глутатионпероксидаз является изоформа ***GPx-3*** (ген GPx-3 у человека на хромосоме 5). Ген GPx-3 экспрессируется во многих тканях и главным образом в почках, откуда эта изоформа освобождается в кровеносное русло. Эта единственная изоформа из пяти известных существует во внеклеточном пространстве (экстрацеллюлярных жидкостях), из которого устраняет H_2O_2 и гидропероксиды липидов, образующиеся в процессе нормального метаболизма или после «респираторного взрыва». Кроме того, её роль заключается в поддержании биодоступности NO° – основного вазорелаксанта и ингибитора активации тромбоцитов, поскольку этот радикал может быстро инактивироваться АФК. Изоформа GPx-3 защищает молекулы фибриногена от посттрансляционных модификаций под действием АФК и от пероксинитрита, способствующего тромбообразованию. Транскрипция гена GPx-3 регулируется парциальным давлением кислорода и состоянием редокс-системы клетки [Ефимцева Э.А., Челпанова Т.И., 2009].

Четвёртая изоформа ***GPx-4*** (ген GPx-4 у человека на хромосоме 19) проявляет свою активность во многих тканях организма: печени, почках, сердце, лёгких, мозге, плаценте и яичках. Эта мембраносвязанная изоформа может восстанавливать различные гидропероксиды фосфолипидов, включая гидропероксиды, интегрированные в мембраны, гидропероксиды липидов в липопротеинах низкой плотности.

В эпидидимисе крыс (придаток яичка) была выявлена пятая изоформа глутатионпероксидазы – ***GPx-5***. Эта изоформа не содержит в активном центре селенцистеин.

Кроме глутатионпероксидаз в клетках млекопитающих выявлено целое семейство многофункциональных белков – **глутатионтрансфераз**, основная функция которых защита клеток от ксенобиотиков и продуктов перекисного окисления липидов посредством их восстановления [Кулинский В.И., Колесниченко Л.С., 2009]. Глутатионтрансферазы локализованы преимущественно в цитозоле клеток.

Глутатионредуктаза (КФ 1.6.4.2, NAD(P) H: GSSG-оксидоредуктаза, глутатион оксидоредуктаза) – широко распространённый флавиновый фермент, катализирующий обратимое восстановление окисленного глутатиона (GSSG) с помощью NADPH (или NADH). Восстановленный глутатион (GSH) является антиоксидантом и необходим в качестве субстрата для реакции, катализируемой глутатионпероксидазой. Глутатионредуктаза у человека кодируется одним геном (хромосома 8p21.1) и, исходя из генетических данных, представляет собой димер, состоящий из идентичных субъединиц. Фермент, поддерживающий высокую внутриклеточную концентрацию GSH, обнаружен в эритроцитах, ооцитах, почках, тонкой кишке и печени. В лёгких и скелетных мышцах выявлена более низкая активность этого фермента.

Восстановленный глутатион, глутатионпероксидаза, глутатионтрансферазы, глутатионредуктаза и NADPH образуют глутатионовую антиоксидантную систему, в которой глутатионредуктаза и NADPH необходимы для восстановления окисленного глутатиона.

В последние годы интенсивно изучается новое семейство ферментов антиоксидантной защиты – **пероксиредоксины**, которые обнаружены в различных организмах от бактерий до человека. Пероксиредоксины характеризуются как пероксидазы, восстанавливающие H_2O_2 и органические гидроперекиси с помощью тиоредоксина, глутатиона или других молекулярных доноров электронов. Молекула ферментов пероксиредоксинов в своей структуре имеет цистеиновые остатки, благодаря которым фермент может быстро переходить из окисленного в восстановленное состояние. Показано, что пероксиредоксины могут играть важную роль в антиоксидантной защите клеток и редокс-сигнализации, в частности влияют на связывание различных гормонов со своим рецептором, фосфорилирование белков, экспрессию генов и на процессы апоптоза [Калинина Е.В. с соавт., 2008].

У млекопитающих различают 6 типов пероксиредоксинов (Prx1 – Prx6). В клетке пероксиредоксины находятся в основном в цитозоле, а также в митохондриях, пероксисомах, хлоропластах. Две изоформы пероксиредоксинов (Prx4 и Prx6) являются секреторными белками.

Характер экспрессии генов различных изоформ Prx (*PRDX*) имеет клеточную, тканевую и органную специфичность. Так, Prx1 наиболее широко представлен практически во всех органах и тканях мышей и человека как в нормальных тканях, так и в злокачественных опухолях [Калинина Е.В. с соавт., 2008]. Однако в центральной и периферической нервной системе выявлена максимальная экспрессия гена *PRDX1*. Для печени, семенников, яичников и мышц характерна высокая экспрессия гена *PRDX4*. Высокий уровень Prx1 и Prx2 выявлен в панкреатических β-клетках островков Лангерганса.

Различный характер экспрессии *PRDX* показан в дыхательной системе. В бронхиальных эпителиальных клетках установлен умеренный или высокий уровень Prx1, Prx3, Prx5 и Prx6; в альвеолярном эпителии присутствуют в основном Prx5 и Prx6, а в альвеолярных макрофагах – Prx1 и Prx6. В системе антиоксидантной защиты верхних дыхательных путей млекопитающих вклад Prx6 составляет практически 75%.

Prx присутствуют во всех субклеточных компартментах, где также выявлена определённая специфичность экспрессии генов разных изоформ фермента. Во внутриклеточных органеллах (цитоплазма, пероксисомы, митохондрии и ядро) наиболее широко представлены Prx1 и Prx5. В отличие от Prx1и Prx5 другие изоформы имеют более ограниченную субклеточную локализацию. Так, Prx2 присутствует в ядре и цитоплазме, секретируемый Prx4 – в цитоплазме и лизосомах, Prx3 – в митохондриях, Prx6 – в цитоплазме [Калинина Е.В. с соавт., 2008].

Лекция №4.
Неферментные антиоксиданты и особенности их функционирования

Антиоксидантная система клетки включает большое количество ***низкомолекулярных компонентов***, активных в водной и липидных фазах. В её состав входят фенольные антиоксиданты, серосодержащие соединения, каротиноиды и витамины ***A***, ***C***, и ***E***. Все эти соединения определённым образом взаимодействуют, что позволяет говорить о системной организации антиоксидантной системы.

Важную роль в защите клеток от окислительных повреждений играет **витамин *E* (α-токоферол)**, как эндогенного, так и экзогенного происхождения. Показано, что этот антиоксидант при его потреблении с пищей в больших количествах накапливается в мембранах клеток печени. Это позволило предположить, что печень являясь эндогенным депо витамина *E*, обладает наивысшей защитой от свободнорадикального окисления. Однако, многочисленными исследованиями показано, что липиды печени легко окисляются и, более того, имеют более высокую чувствительность к АФК-индуцированному окислению по сравнению с другими органами. Оказалось, что печень, в отличие от любого другого органа, хотя и запасает витамин ***E*** в микросомальных мембранах, но не использует его как антиоксидант.

При индукции свободнорадикального окисления в разных органах наблюдают различную по длительности, но обязательно присутствующую лаг-фазу, в течение которой не происходит накопления свободнорадикальных продуктов, но максимально используется весь запас витамина ***E*** в мембранах данной ткани. Аналогичная картина зарегистрирована в митохондриях печени, где витамин ***E*** используется как антиоксидант, ингибируя свободнорадикальное окисление. Однако в микросомах печени, содержащих основной запас витамина ***E***, активация окисления происходит мгновенно, без наличия лаг-фазы, то есть на начальном этапе окисления витамин ***E*** не используется, что подтверждается отсутствием уменьшения его концентрации при индукции свободнорадикального окисления. При дальнейшем развитии свободнорадикального окисления витамин ***E*** начинает перераспределяться из депо через кровяное русло в сердце и другие органы для предупреждения АФК-опосредованных повреждений. Даже в отсутствие получения экзогенного витамина ***E*** этот процесс может протекать интенсивно, но ещё более усиливается в присутствии пищевого источника этого антиоксиданта. Таким образом, печень регулирует пул витамина ***E*** в орга-

низме, являясь эндогенным источником этого антиоксиданта для других органов и тканей, где возникает риск развития свободнорадикальных повреждений. Благодаря начальной задержке использования витамина ***E*** в месте его депонирования, то есть в печени, и быстрой доставке антиоксиданта через кровь с помощью токоферолтранспортирующих белков в сердце и другие органы, витамин ***E*** проявляет свои антиоксидантные свойства во всем организме.

Витамин ***E***, обладающий липофильными свойствами, действует главным образом в составе мембран клеток и внутриклеточных органелл, а также липопротеинов плазмы крови, препятствуя дальнейшим свободнорадикальным реакциям, связанным с участием липидных радикалов. Например, витамин ***E*** восстанавливает пероксильные радикалы, превращаясь при этом в менее реакционноспособный феноксильный радикал. В таком состоянии он может находиться в мембране до тех пор, пока не будет восстановлен аскорбатом в исходное состояние.

Антиоксидантное действие витамина ***E*** может быть обусловлено не только его непосредственным взаимодействием со свободными радикалами, но и способностью связывать ионы железа, играющие важную роль в инициации процессов свободнорадикального окисления в качестве центров образования радикалов. Другой механизм действия витамина ***E*** на свободнорадикальные процессы связан с повышением в его присутствии уровня антиоксидантов. Так, показано, что витамин ***E*** увеличивает активность СОД, а также может стабилизировать активность глутатионпероксидазы и каталазы.

Помимо прямой и опосредованной антиоксидантной функции витамин ***E*** выступает как мембранный стабилизатор, что не менее важно для поддержания соотношения прооксидантных и антиоксидантных факторов в клетке. Молекула витамина ***E*** содержит длинную боковую изопреноидную цепь, которая позволяет ей встраиваться в липидный бислой мембран. Действие витамина ***E*** на структуру и функции липидного бислоя может быть опосредовано, по крайней мере, тремя различными механизмами [Капралов А.А. и др., 2003]:

1) непосредственным влиянием на структуру и физические свойства липидов мембраны;

2) регуляцией свободнорадикального окисления в мембранах;

3) взаимодействием со свободными жирными кислотами и лизофосфолипидами – продуктами гидролиза липидов фосфолипазами, которые способны модифицировать структуру мембран.

Витамин *C* (L-аскорбиновая кислота) – является одним из важных природных антиоксидантов, обеспечивающих окислительно-восстановительный метаболизм клетки. Витамин С обнаружен практически во всех тканях млекопитающих, однако больше всего его содержится в надпочечниках, гипофизе и вилочковой железе. Низкий уровень содержания аскорбиновой кислоты зарегистрирован в печени, селезёнке, поджелудочной железе и головном мозге.

Витамин ***C*** обладает способностью инактивировать различные свободные радикалы, например, восстанавливать $O_2^{-\cdot}$ до H_2O_2, которая далее может подвергаться разложению пероксидазами. Наиболее важным считают способность витамина ***C*** восстанавливать токоферильный радикал, и тем самым участвовать в

регенерации фонда важнейшего липидного антиоксиданта организма – витамина ***E***. Эта реакция является ключевой в антиоксидантной защите, поскольку она обеспечивает связь между водорастворимыми и липидными антиоксидантами.

Важную роль в антиоксидантной защите организма играют легкоокисляющиеся пептиды, в состав которых входит SH-содержащая аминокислота – цистеин. Особое место среди этих соединений занимает **глутатион** – трипептид, образованный аминокислотами – цистеином, глутаминовой кислотой и глицином. Благодаря наличию в своём составе цистеина, это вещество очень быстро переходит из окисленного в восстановленное состояние. Глутатион является одним из основных растворимых антиоксидантов клетки и его концентрация у большинства видов позвоночных превышает уровень других растворимых антиоксидантов, таких как витамин ***C***, мочевая кислота. Основной антиоксидантный эффект глутатиона реализуется посредством его участия в работе антиоксидантных ферментов – глутатионпероксидазы и глутатионтрансферазы. Являясь субстратом для этих ферментов, глутатион в восстановленной форме может выступать донором атомов водорода для H_2O_2 и липидных перекисей. Вместе с тем глутатион, как другие SH-содержащие белки, является акцептором АФК и тем самым ингибирует свободнорадикальное окисление в клетке.

В настоящее время к числу низкомолекулярных антиоксидантов относят и ряд других соединений, в числе которых различные каротиноиды, мелатонин, дипептид карнозин, N-ацетилцистеин, липоевая кислота. Так, например, показано, что мелатонин (гормон эпифиза, синтезируемый из серотонина в ночное время суток) помогает *in vivo* защищать клеточные компоненты, включая ДНК, белки и липиды. Этот защитный эффект проявляется не только в способности мелатонина нейтрализовать свободные радикалы, но и в стабилизации активности ферментов антиоксидантной защиты, в частности глутатионпероксидазы и СОД. Кроме того, до сих пор не выявлено условий, при которых мелатонин мог бы выступать как прооксидант, в связи с этим он практически нетоксичен для животных и человека.

4.1. Хелаторы ионов металлов переменной валентности

В присутствии металлов переменной валентности усиливается образование высокореактивных гидроксильных радикалов. Поэтому хелатные соединения, связывающие ионы металлов переменной валентности (ферритин, трансферрины, церулоплазмин и др.) и тем самым препятствующие их вовлечению в реакции разложения перекисей, представляют важный компонент антиоксидантной защиты организма [Зенков Н.К. с соавт., 2001]. Хелаторы являются главными в защите от окисления белков сыворотки и клеточных рецепторов, так как в межклеточных жидкостях отсутствует или значительно ослаблено ферментативное разложение перекисей, хорошо проникающих через клеточные мембраны.

4.2. Специфические защитные внутриклеточные белки

Помимо активации антиоксидантных ферментов АФК индуцируют синтез защитных белков семейства HSP. При этом увеличение уровня HSP имеет триггерное влияние на защитную систему клетки: активация синтеза этих белков необходима для подготовки клеток к длительным повреждающим воздействиям.

Существует несколько классов HSP, которые обозначают в соответствии с величиной молекулярной массы их представителей: HSP100, 90, 70, 60 и малые HSP.

Защитные свойства HSP определяются их шаперонной функцией – способностью связываться с денатурированными в той или иной мере белками и пептидами, а также с вновь синтезированными белками и придавать им правильную функциональную конформацию. Это свойство HSP является важнейшим для функционирования живых систем в нормальных условиях, а также при неблагоприятных воздействиях и адаптации к ним. Из шаперонных свойств HSP вытекает их третья важная функция – это способность связывать белки и регулировать их активность. Так, мишенями для HSP являются белки, имеющие отношение к клеточному сигналлингу и транскрипции генов – факторы транскрипции NF-kB, HIF1, белки, участвующие в инициации процесса апоптоза.

Наиболее исследованное семейство белков теплового шока – ***семейство HSP70*** – включает в себя индуцируемый стрессовыми воздействиями Hsp72 и конститутивно экспрессируемый клетками белок Hsp73 (или Hsc70 – heat shock cognate protein 70). Hsc70 представляет собой белок с выраженной структурной консервативностью. Этот белок постоянно экспрессируется в клетках в отсутствие стресса, выполняет функцию молекулярного шаперона для вновь синтезируемых белков, участвует в их транспорте в клеточные органеллы, а также переносит необратимо повреждённые полипептиды и белки к протеасомам для последующей их деградации. Показано, что белок Hsc70 необходим для адаптационных изменений в клетках и повышения устойчивости к действию повреждающего фактора [Андреева Л.И. с соавт., 2009]. Индуцибельный белок, Hsp72, отличает мощная экспрессия в ответ на стрессирующие воздействия самой разной природы. Поэтому основным предназначением Hsp72 является выполнение защитной функции по отношению к клеточным белкам при стрессе, а сам Hsp72 относят к одному из основных маркёров цитотоксических и патогенных воздействий на организм животных и человека. Так, синтез индуцибельного Hsp72 запускается гипертермией, окислительным стрессом, тяжёлыми металлами, органическими растворителями, радиацией и другими факторами. При этом накопление Hsp72 происходит тканеспецифично и зависит от продолжительности и силы воздействия повреждающего фактора. Например, его содержание очень высоко в сердце и печени, и крайне низко (и не запускается в ответ на стресс) в головном мозге и лёгких [Гужова И.В, 2004; Сазонтова Т.Г. с соавт., 2007]. Кроме того, данный белок характеризует лабильная динамика его экспрессии – срочное реагирование на повреждающее воздействие и такое же быстрое снижение экспрессии в случае возвращения клетки в нормальное состояние. Показана связь активации свободнорадикальных процессов и экспрессии Hsp72. При этом происходит улучшение окислительно-восстановительного

состояния клетки и увеличение активности антиоксидантных ферментов (каталазы, глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы). В настоящее время в литературе имеются данные о выходе белков HSP из клетки во внеклеточное пространство, а также в биологические жидкости – слюну или кровь человека и животных. Так, выход Hsp72 наблюдается при тепловом шоке, ионизирующем облучении, гипертонии и атеросклерозе, отёке лёгких, вирусных инфекциях, психическом и физическом стрессах. Кроме того, показано, что белки HSP способны выходить и из неповреждённых клеток. В качестве одного из транспортёров HSP из клетки рассматривают экзосомы – внутренние везикулы мультивезикулярных тел, которые выходят во внеклеточную среду путём слияния с клеточной поверхностью [Евдонин А.Л., Медведева, 2009].

Выход HSP70 из клеток в составе экзосом подтверждён следующими фактами: ***1)*** Hsp72 был обнаружен в составе экзосом, изолированных из клеток крови, миобластов и фибробластов и ***2)*** Hsp72 колокализовался с маркёром экзосом Rab4.

Выброс HSP70 из клеток осуществляют секреторные лизосомы, при этом выход белка сопровождается появлением на поверхности клеток маркёра лизосом Lamp1. Кроме того, выход HSP70 может происходить через плазматическую мембрану клетки и не в составе везикул. Так, HSP70 взаимодействует с фосфатидилсерином, в результате чего он транспортируется на наружный липидный слой плазматической мембраны. При этом HSP70 ассоциируется с кислыми липидами при помощи своего АТФазного и липидсвязывающего домена.

Внеклеточный HSP70 обладает множественными функциями, основными из которых являются иммуномодуляторная и сигнальная. Так, HSP70 распознаётся иммунной системой как сигнал опасности, участвует в активации и пролиферации естественных киллерных клеток, стимулирует синтез и секрецию провоспалительных цитокинов. Внеклеточный HSP70 специфически связывается с поверхностной мембраной различных клеток иммунной системы, эндотелиальных и эпителиальных клеток.

В настоящее время обнаружена группа клеточных рецепторов, с которыми связывается внеклеточный HSP70. Так показано, что он активирует toll-like рецепторы (TLR), узнающие структурные компоненты различных бактерий, вирусов и грибов. При этом происходит активация транскрипционного фактора NF-kB и MAP-киназ. Помимо TLR HSP70 способен связываться и со скэвенджеррецепторами, которые способны узнавать химически модифицированные формы липопротеинов, в частности, окисленные или ацетилированные липопротеины низкой плотности. Связывание этих рецепторов с лигандом ведёт к активации транскрипционного фактора NF-kB и повышению внутриклеточного уровня АФК.

Таким образом, белки семейства HSP являются регуляторами многих процессов, связанных с устойчивостью клеток и организма в целом к неблагоприятным воздействиям, в том числе к окислительному стрессу.

Активация свободнорадикального окисления может приводить также к индукции низкомолекулярных белков семейства HSP, в частности ***гем-оксигеназы*** (HOx). HOx обладает разными функциями, в том числе регуляторными, но пер-

востепенной является контроль уровня гема в клетке. Благодаря этому, в тканях всегда присутствует определённый уровень конститутивной формы – НОх-2, а при дополнительных нагрузках, связанных с повышенной продукцией АФК синтезируется индуцибельная форма этого белка – НОх-1.

Гем-оксигеназа (НОх) была впервые обнаружена в 1968 г. в печени и охарактеризована как фермент, участвующий в деградации гема с образованием биливердина, СО и свободного железа [Maines M.D., 2000]. Показано, что НОх обладает разными функциями, в том числе регуляторными, но первостепенной является поддержание нормального уровня гема в клетке. Благодаря этому в тканях всегда присутствует определённый уровень конститутивной формы – НОх-2, а при дополнительных нагрузках, связанных с повышенной продукцией АФК синтезируется индуцибельная форма этого белка – НОх-1.

Биологическая роль молекулы гема в клетке. Гем входит в состав различных белков, играющих важную роль в биологических процессах. В настоящее время к ним относят:

1. Гемоглобин, который обладает способностью обратимо связывать кислород и транспортировать его в системе кровообращения.

2. Миоглобин, находящийся в мышечных клетках и необходимый для обмена кислорода в них.

3. Цитохромы – соединения, функционирующие как переносчики электронов в окислительно-восстановительных реакциях.

4. Ферменты антиоксидантной защиты, такие как каталаза, пероксидазы, супероксиддисмутаза.

5. Белки, участвующие в образовании NO из L-аргинина – NO-синтазы эндотелиальная (eNO-синтаза), индуцибельная (iNO-синтаза) и нейрональная (nNO-синтаза).

6. Растворимая гуанилатциклаза, катализирующая биосинтез циклического 3′, 5′-гуанозинмонофосфата (cGMP) из гуанозинтрифосфата (GTP).

Таким образом, гем в составе различных белков участвует в биологических окислительных процессах и способствует поддержанию гомеостаза всего организма. Однако «свободный» гем является прооксидантом, и его накопление вызывает изменение соотношения между про- и антиоксидантами в клетках как за счёт непосредственного участия гема в окислительно-восстановительных реакциях, так и за счёт высвобождения Fe^{2+} из «свободного» гема и повышения его содержания. Поэтому для поддержания клеточного гомеостаза концентрация гема в клетке должна жёстко регулироваться.

Защитную роль от окислительного повреждения клеток «свободным» гемом играет активация НОх. Важно, что Нох-система индуцируется субстратом, то есть самим гемом, представленным в виде протопорфирина – PPIX-Fe(III), при расщеплении которого образуются биливердин IX , вода и монооксид углерода (CO).

Билирубин, образующийся из биливердина с помощью биливердинредуктазы, является довольно мощным антиоксидантом. В своей работе Stocker R. и др. [1987] показали, что in vitro билирубин в микромолярных концентрациях (0,5-1 мкМ) эффективно препятствует развитию свободнорадикальных реакций, свя-

занных главным образом с участием липидных радикалов. На модели ишемии изолированного сердца было показано, что перфузия сердца билирубином улучшает состояние постишемического миокарда. Кроме того, Dore S. и др. [1999] показали, что увеличение образования билирубина после активации НОх-2 защищает нервные клетки от повреждений, вызванных H_2O_2, то есть окислительным стрессом.

Другой продукт НОх-реакции – СО – оценивается в настоящее время, как важный клеточный мессенджер с различными физиологическими функциями. Сигнальная роль СО напоминает передачу сигналов оксидом азота, только в отличие от NO, который образует пероксинитриты при взаимодействии с $O_2^{-\circ}$, СО не образует радикалы. Показано, что СО участвует в регуляции сосудистого тонуса и водно-солевого гомеостаза.

Важнейшим следствием НОх-реакции является высвобождение железа из гема – кофактора многочисленных клеточных ферментов и редокс-зависимых белков, и прямого участника активации свободнорадикального окисления. Поэтому его избыточное количество в свободном состоянии является цитотоксичным, от чего клетка защищается индукцией синтеза железо-связывающих белков – трансферрина и ферритина. На культуре клеток фибробластов кожи было показано, что синтез железо-связывающего белка ферритина зависит от увеличения активности НОх-1 во время клеточного ответа на окислительный стресс, и таким образом предотвращает цитотоксичность, вызванную избыточным уровнем железа. Обратная ситуация сниженного уровня НОх, как было показано, например, на дефицитных по НОх-1 мышах, одновременно приводит к перегрузке печени железом и в то же время к железодефицитной анемии.

Таким образом, экспрессия гена НОх-1 играет важную регуляторную роль в физиологической регуляции гомеостаза железа, утилизации «свободного» гема и тем самым, снижении чрезмерной активации свободнорадикальных процессов. На примере НОх ярко проявляется дуализм регуляции гомеостаза. Так, активация НОх-системы приводит к высвобождению АФК-индуцирующих факторов, но одновременно запускает ряд механизмов, ограничивающих свободнорадикальное окисление. К наиболее важным из них относятся образование билирубина, обладающего антиоксидантными свойствами, и индукция синтеза железо-связывающих белков.

Обнаружено и описано три изозима НОх: индуцибельная форма – НОх-1 и две конститутивные формы – НОх-2 и НОх-3. НОх-1 и НОх-2 катализируют одинаковые биохимические реакции, но различаются по первичной структуре, молекулярному весу (НОх-1 – 30-33 kDa, НОх-2 – 36 kDa), термостабильности, а также по механизмам их регуляции. В то же время НОх-3 является гомологом НОх-2, однако обладает низкой активностью. Изозимы НОх кодируются разными генами. Так, у человека ген для НОх1 локализован в хромосоме 22q12, а для НОх-2 в хромосоме 16p13, что определяет различие в аминокислотном составе этих изозимов, а также в первичной структуре НОх-1 (289 аминокислотных остатков) и НОх-2 (315 аминокислотных остатков). В структуре всех изозимов НОх существует участок, имеющий сродство к гему – так называемый гидрофобный каталитический карман, который расположен в центральной ча-

сти оксигеназ и состоит из 24 аминокислот. Он ответственен только за деградацию гема. При этом в каталитическом центре НОх наиболее важную роль играет остаток гистидина (гистидин 132 в НОх-1, 151 в НОх-2 и 128 в НОх-3). Показано, что этот остаток гистидина необходим для ферментативной активности НОх.

НОх-1 и НОх-2 (НОх-3) используют одинаковый субстрат и катализируют одну и туже реакцию. В связи с этим возникает вопрос – почему в процессе эволюции появились разные изоформы этого фермента. На основе того, что известно о регуляции активности НОх-1 и НОх-2, их распределении в клетках и времени ответа на стимул, можно предположить, что конститутивная форма НОх-2 отвечает за клеточный гомеостаз при физиологических условиях (так как не обладает способностью к быстрой индукции в ответ на стимул), а НОх-1 (способная быстро индуцироваться) – при патологических изменениях уровня кислорода, АФК или при действии избыточного количества «свободного» гема.

Изучение первичной структуры НОх показало, что НОх-2 и НОх-3, в отличие от НОх-1, помимо каталитического кармана имеют дополнительный специфический участок, который является цистеин-пролиновым дипептидом, окружённым сверху заряженными аминокислотами, а снизу гидрофобными остатками. Этот участок обнаружен у небольшой группы белков и известен как «гем регуляторный участок» (HRM). НОх-2 и НОх-3 имеют по две копии HRM. Исследования с использованием метода направленного мутагенеза показали, что мутации в HRM не существенны для изменения активности НОх2 в отношении деградации гема в отличие от мутации гистидина 151, которая инактивирует фермент. Два HRM НОх-2 участвуют в связывании гема с высоким сродством, но не вовлечены в реакцию деградации гема. Исследования с использованием доноров NO показали, что HRM НОх-2 взаимодействует с оксидом азота. Это привело к предположению, что НОх-2 может функционировать помимо прочего и как внутриклеточная «ловушка» для NO. Эта функция выявлена и у НОх-3 и фактически она может быть основной функцией НОх-3 в клетке, так как этот белок, обладая более низкой каталитической активностью, только в крайних случаях участвует в деградации гема. Связывая и инактивируя NO, НОх-2 и НОх-3 могут служить буфером и принимать участие в регуляции биологических функций NO в клетке, а присутствие конститутивной НОх-2 во всех типах клеток подтверждает эту гипотезу.

Кроме HRM в структуре НОх-2 был обнаружен кислород-чувствительный элемент. Наличие кислород чувствительного элемента и HRM в НОх-2 дают возможность предположить, что конститутивная форма этого фермента может функционировать как гем/кислородный сенсор и участвовать в регуляции экспрессии генов, которые индуцируются АФК, гемом или Fe, например генов ферритина, iNO-синтазы и НОх-1. При окислительном стрессе происходит увеличение уровня «свободного» гема, который может связываться с HRM в НОх-2 с образованием АФК. Увеличение уровня АФК, в свою очередь, приводит к активации транскрипции генов для НОх-1 и iNO-синтазы, через факторы транскрипции NF-kB и AP-1. Гены и, НОх-1, и iNO-синтазы имеют участки для связывания с NF-kB и AP-1 в промоторной области. Гипотезу о том, что НОх-2

может функционировать, как сенсор кислорода подтверждают данные о высоком её уровне в норме в эндотелии кровеносных сосудов и каротидных тельцах.

Транскрипция гена НОх-1 регулируется интенсивностью свободнорадикального окисления и индуцируется прооксидантными факторами (например, ультрафиолетовым излучением, металлопорфиринами, гемином и воспалением). Это привело к появлению гипотезы о том, что НОх -1 обеспечивает защиту клеток во время окислительного стресса. Кроме того, АФК-опосредованная индукция гена НОх-1 может увеличиваться и при снижении уровня антиоксидантов в клетке, например восстановленного глутатиона. Было показано, что снижение уровня эндогенного восстановленного глутатиона при окислении сульфгидрильных групп в этом трипептиде коррелирует с индукцией НОх-1 и белков теплового шока.

Способность гена НОх-1 к индукции с помощью различных факторов объясняется его конфигурацией. В промоторной области гена НОх-1 обнаружена последовательность нескольких регуляторных элементов. Она включает АР-1, АР-2 и NF-kB связывающие участки, два металл-регулируемых элемента, участки, регулируемые тепловым шоком и гемом. Промоторная область гена НОх-1 также содержит антиоксидантный регуляторный элемент с последовательностью аминокислот, сходной с последовательностью антиоксидантных ферментов. А для ответа на гипоксию имеется фрагмент из 163 пар оснований, содержащий два HIF-1-связывающих участка, которые вызывают транскрипцию гена НОх-1 [Zhukova A.G., Sazontova T.G., 2004].

Все ткани млекопитающих содержат различные уровни активности НОх. Так, например, Scapagnini G. с соавт. [2002] показали, что в мозге присутствуют три изоформы НОх, которые распределены неравномерно: НОх-2 > НОх-1 > НОх-3. Высокий уровень НОх-1 и НОх-2 обнаружен в мозжечке и гиппокампе. НОх-3 была обнаружена в гиппокампе, мозжечке и коре мозга. В печени обнаружены две изоформы НОх – НОх-1 и НОх-2. НОх-2 в норме преобладает в эндотелиальных и гладкомышечных клетках сосудов, каротидных тельцах. Предполагается, что внутриклеточный «свободный» гем должен подвергаться разложению НОх непосредственно в той ткани, в которой и образовался. Это предпочтительней, чем экспортирование в сыворотку и последующее разложение в печени. Высокий уровень НОх активности обнаружен в печени, почках, селезёнке, семенниках, а также в мозге и лёгких.

Было показано, что в разных тканях активность НОх сопряжена с работой других ферментов. Например, в почках повышение активности НОх-1 индуцирует синтез эритропоэтина, а в гладкомышечных клетках NO-синтазы индуцируют НОх-1. Активность НОх-1 в головном мозге крыс сопряжена с работой важного антиоксидантного фермента – Mn-СОД. При этом гены для НОх-1 и Mn-СОД имеют разный уровень экспрессии в мозге крыс – Mn-СОД > НОх-1. Высокий уровень НОх-1 и Mn-СОД обнаружен в гиппокампе, мозжечке и коре головного мозга. Исследования с помощью конфокальной микроскопии показали, что в сердце НОх-1 помимо цитозоля локализована и в саркоплазматическом ретикулуме, что свидетельствует о важной роли НОх-1 в регуляции Ca^{2+}-гомеостаза в миокарде.

Таким образом, активация НОх является важным компонентом редокс-сигнальной системы. Хотя обе изоформы НОх катализируют одну реакцию, НОх1 и НОх-2 могут функционировать по-разному. НОх-1 – это стрессиндуцированная форма, которая быстро активируется АФК и гипоксическими состояниями. Высокая индукция НОх-1 защищает клетки при различных патологических состояниях от чрезмерной активации свободнорадикальных реакций. НОх-2 является конститутивной формой и помимо поддержания клеточного гомеостаза гема участвует в инактивации избыточных NO и АФК. Кроме того, необходимо отметить полифункциональность действия разных изоформ НОх и продуктов их реакции, которое нельзя сводить только к «положительным» или только «отрицательным» эффектам. Хотя продукты гемоксигеназной реакции могут оказывать протекторный эффект на клетки организма, в больших концентрациях они могут вызывать повреждающее действие в кислород чувствительных тканях.

Важное условие эффективного защитного действия антиоксидантной системы заключается в синхронном взаимодействии всех её компонентов. Увеличение активности антиоксидантной системы всегда связано с ростом концентрации субстратов для компонентов этой системы – АФК. Именно они являются сигналом к увеличению синтеза новых молекул антиоксидантов. Главным при этом является дозированность окислительного стресса, то есть необходимость, с одной стороны, активировать защитные системы, а с другой – не сорвать адаптационный процесс и не вызвать истощения клеточных ресурсов, и возможного повреждения [Сазонтова Т.Г., Архипенко Ю.В., 2007].

Заключение

АФК постоянно образуются и являются необходимым компонентом жизнедеятельности клеток и организма в целом. Они принимают участие во многих метаболических и регуляторных процессах. Условием осуществления всех этих процессов является поддержание физиологического уровня АФК за счёт функционирования антиоксидантной системы (АОС).

Наличие в организме многочисленных антиоксидантных соединений обеспечивают высокую базальную буферную емкость АОС, которая может быть существенно увеличена, например, за счёт протеолитической деградации.

АФК и АОС образуют ***редокс-гомеостатическую систему***, обеспечивающую возможность функционального ответа на сигнал. Для поддержания физиологического уровня АФК требуется постоянная регенерация различных компонентов АОС, а это активные энергоёмкие процессы, требующие согласованной работы на всех уровнях организма, клеток, клеточных структур и генов.

Эволюционно сформированный редокс-гомеостаз представляет собой саморегулирующуюся систему. Это означает, что изменение любого из её компонентов ведет к дисбалансу, который, в свою очередь, приводит к компенсаторным реакциям на локальном уровне.

На сегодняшний день нет сомнений, что непосредственное действие АФК может быть пагубным для клетки в связи с окислительным повреждением липидов, белков и ДНК.

Конечными продуктами этого окисления являются гидроперекиси липидов, карбонилированные белки и окисленные основания ДНК (например, 7,8-дигидро-8 -оксогуанин). Однако наводнение системы антиоксидантами или гипер-экспрессия антиоксидантных ферментов могут быть столь же пагубны, как и чрезмерное воздействие свободных радикалов.

Неспецифичность и распространённость окислительного стресса в клетках организма приводит к использованию энергетических субстратов и жизненно необходимых белковых молекул для сбалансирования редокс-системы, и, в зависимости от длительности окислительного стресса и функциональных резервов АОС, в итоге приводит к истощению репарационных и адаптационных возможностей организма.

В клинике это проявляется множественными осложнениями при лечении заболевания: когда за успешной коррекцией одного состояния неизбежно идёт череда других опасных осложнений, медикаментозная коррекция которых порой является взаимоисключающей. Интенсификация окисления с участием АФК, расцениваемая как окислительный стресс, может быть проявлением различных процессов, происходящих в клетках: интенсификация метаболизма, мобилизация защитных сил, разрушение и гибель клеток. Для адекватной оценки окислительного стресса необходимо динамическое наблюдение за происходящими процессами.

Перечень основной и дополнительной учебной литературы, необходимой для освоения дисциплины

Основная

1. Бухаров, С.В. Химия и технология антиоксидантов химических и биологических систем: учебное пособие / С.В. Бухаров, Г.Н. Нугуманова; Казанский национальный исследовательский технологический университет. – Казань: Казанский научно-исследовательский технологический университет (КНИТУ), 2018. – 152 с.: схем. – Режим доступа: по подписке. – URL: https://biblioclub.ru/index.php?page=book&id=500560. – Библиогр. В кн. – ISBN 978-5-7882-2338-4. – Текст: электронный.

2. Шарова, Е.И. Антиоксиданты растений: учебное пособие: [16+] / Е.И. Шарова; Санкт-Петербургский государственный университет. – Санкт-Петербург: Издательство Санкт-Петербургского Государственного Университета, 2016. – 140 с. : схем., табл., ил. – Режим доступа: по подписке. – URL: https://biblioclub.ru/index.php?page=book&id=458111. – Библиогр.: с. 127-132. – ISBN 978-5-288-05641-3. – Текст: электронный.

Дополнительная

1. Чиркин, А.А. Биологическая химия: учебник / А.А. Чиркин. – Минск: Вышэйшая школа, 2017. – 432 с. : схем.,ил. – Режим доступа: по подписке. –

URL: https://biblioclub.ru/index.php?page=book&id=477417 (. – Библиогр. в кн. – ISBN 978-985-06-2383-6. – Текст: электронный.

2. Биологическая химия: учебник / А.Д. Таганович, Э.И. Олецкий, Н.Ю. Коневалова, В.В. Лелевич ; ред. А.Д. Таганович. – 2-е изд., испр. – Минск: Вышэйшая школа, 2016. – 672 с.: ил. – Режим доступа: по подписке. – URL: https://biblioclub.ru/index.php?page=book&id=235731. – Библиогр.: с. 654. – ISBN 978-985-06-2703-2. – Текст: электронный.

3. Плакунов, В.К. Основы динамической биохимии: учебное пособие / В.К. Плакунов, Ю.А. Николаев. – Москва: Логос, 2010. – 216 с. – (Новая университетская библиотека). – Режим доступа: по подписке. – URL: https://biblioclub.ru/index.php?page=book&id=84985. – ISBN 978-5-98704-493-3. – Текст: электронный.

4. Узденский, А.Б. Биоэнергетические процессы: учебное пособие / А.Б. Узденский; Южный федеральный университет, Физический факультет ЮФУ. – Ростов-на-Дону: Южный федеральный университет, 2011. – 124 с. : ил., табл. – Режим доступа: по подписке. – URL:https://biblioclub.ru/index.php?page=book&id=241180. – ISBN 978-5-9275-0829-7. – Текст: электронный.