

УДК 577.115:612.015.14:546.21:543.544

А.О. Сыровая, Ф.С. Леонтьева, И.В. Новикова,
С.В. Иванникова**, Е.Р. Грабовецкая*

Харьковский национальный медицинский университет

**НИИ патологии позвоночника и суставов им. Ситенко, г. Харьков*

*** Клинико-диагностическая лаборатория «Алвис-класс», г. Харьков*

АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА В ПРОЦЕССЕ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ

В статье представлены группы атомов, которые относятся к свободным радикалам. Отображены этапы изучения кислорода и его влияние на процесс перекисного окисления липидов в историческом аспекте. Представлены также наиболее изученные активные формы кислорода.

Ключевые слова: активные формы кислорода, свободные радикалы, аутоокисление, токсический эффект.

Понимание процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) основано на изучении метаболизма жирных кислот. ПОЛ определяет функционирование всех мембраносвязанных структур, активность липидзависимых ферментативных реакций [1]. При различных патологических процессах (стрессовых, воспалительных, иммунных, физической нагрузке, гипоксии) инициируются процессы ПОЛ. Известно, что липиды могут неферментативно окисляться в перекисные соединения в результате аутоокисления, а также принимать участие в реакциях ферментативного окисления [2, 3].

В ходе реакций последовательного присоединения четырёх электронов к молекуле кислорода образуются химически «активные формы кислорода» (АФК). Свободнорадикальные реакции окисления с участием АФК являются полезными, так как разрушают фагоцитированные клетки бактерий. «Вредное» воздействие свободнорадикального окисления связано с разрушением органических молекул, в первую очередь липидов. Для предотвращения токсического эффекта и повреждения мембранных структур клетки в организме работает система ингибирования ПОЛ [3, 4]. Разрушительному действию перекисей липидов препятствуют ферменты (супероксиддисмутаза – СОД,

каталаза, глутатионпероксидаза), а также неферментативные компоненты (α -токоферол, глутатион, аскорбиновая кислота), обеспечивая антиоксидантную защиту клеточных мембран [1, 5].

Основным путём образования АФК является «утечка» электронов в дыхательной цепи и непосредственное их взаимодействие с кислородом. В эукариотических организмах АФК в основном образуются в процессе нормального дыхания с участием кислорода, оксидаз, а также транспорта электронов в митохондриях и эндоплазматической сети [6]. К АФК относят окисленные формы липидов или перекисные радикалы, синглетный кислород, пероксинитриты, которые образуются из оксидов азота (NO). Указанные группы атомов ведут себя, как единое целое, и в настоящее время известны под названием «свободные радикалы». Эти химические формы содержат один или несколько неспаренных электронов и способны к самостоятельному существованию. Они формируются в результате либо потери, либо присоединения одного электрона к радикалу и легко могут формироваться при разрыве ковалентной связи в результате гомолитического разрыва.

Под воздействием чистого кислорода замедлялся рост бактерий (кишечной па-

© А.О. Сыровая, Ф.С. Леонтьева, И.В. Новикова и др., 2013

лочки). При воздействии ионизирующей радиации токсическое влияние кислорода усиливалось. Токсическое влияние кислорода на организм человека изучали у ныряльщиков, а также у лиц, которые длительно находились в условиях повышенного давления [2]; при лечении некоторых патологических состояний (онкологических, сердечно-сосудистых и др.) [3, 4, 7]. Избыток кислорода при давлении 101 кПа вызывал у человека болезненность в груди, кашель, ангины, повреждение альвеол и острое токсическое нарушение со стороны центральной нервной системы [2]. Центральным звеном развития многих патологических процессов, в том числе и акушерских, являлось расстройство окислительно-восстановительных систем, вследствие чего нарушалось снабжение тканей кислородом [8].

В 1954 г. ряд учёных изучали развитие слепоты у недоношенных детей, которые находились в инкубаторах с высоким содержанием кислорода. Учёные предположили, что большая часть вредного воздействия кислорода связана с образованием свободных радикалов [2]. При изучении системных нарушений антиоксидантной защиты у пациентов с макулярной дегенерацией были обнаружены изменения, проявляющиеся снижением интегрального показателя общего антиоксидантного статуса; повышение уровня общих перекисей и малонового диальдегида; дисбаланс системы ферментов антиоксидантной защиты (изменение активности СОД на фоне сниженной активности глутатионпероксидазы) [9]. Указанные изменения свидетельствовали об активации процессов свободнорадикального окисления.

Из истории изучения влияния кислорода на нарушение свойств липидов известно, что кислородзависимая «порча» липидов (прогоркание) была замечена с древнейших времен. О трансформации физических свойств растительного масла под влиянием воздуха впервые сообщил известный швейцарский учёный Jean Senebier в 1791 г. Он отметил, что оливковое масло на воздухе теряло свою текучесть и становилось прогорклым [2]. Первое скрупулёзное изучение преобразования липидов провёл швейцарский химик Никола Соссюр (Saussure) в 1800 г. Используя ртутный манометр, он

отметил, что слой масла грецкого ореха на воздухе мог поглотить в течение года кислород, превышающий его собственный объём в 150 раз. Механизм аутоокисления липидов был исследован H.N. Stephens в 1928 г., однако структура перекиси, образовавшейся в процессе аутоокисления, была установлена E.H. Farmer в 1942 г. [2].

Проблема «порчи» липидов остаётся актуальной при изучении процессов окисления при хранении натуральных продуктов, используемых человеком в пищу (жиры, масла, приправы или маргарины). При комнатной температуре жирные кислоты распадаются с образованием ряда вторичных продуктов – гидроксикислот, эпоксидов, кетонов и альдегидов, что приводит к изменению вкуса и запаха жира. Процесс аутоокисления ускоряется в присутствии тяжёлых металлов, которые содержатся в небольших количествах в жирах и маслах. Для жиров с преобладанием насыщенных жирных кислот характерно образование кетонов (кетонное прогоркание), для жиров с высоким содержанием ненасыщенных кислот – альдегидное прогоркание. Для предотвращения «порчи» жиры и масла часто обрабатывают хелатирующими агентами, такими как лимонная кислота [5].

Систематические исследования процессов аутоокисления липидов, начатые ещё в 40-х годах XX столетия, позволили установить, что гидроперекиси являются первичными продуктами окисления углеводов. Первичными продуктами аутоокисления линолевой кислоты являются гидроперекиси, содержащие сопряжённые диены у 9-го или 13-го атома углерода [2]. Важная роль в понимании процессов окисления ненасыщенных липидов принадлежит методам с высокой разделяющей способностью (например, высокоэффективной жидкостной хроматографии). С помощью данного метода разделяли продукты взаимодействия гидроперекисей после окисления арахидоновой кислоты. Также были изучены продукты ферментативного окисления при участии липоксигеназы. Первые результаты изучения процессов свободнорадикального окисления мембранных фосфолипидов были представлены в 1980 г., что открыло новую эпоху в проведении исследований, посвящённых

проблемам химии, биохимии и медицины [2]. В настоящее время широко используются методы, основанные на применении нормально- и обращённо-фазной двумерной высокоэффективной жидкостной хроматографии, масс-спектрометрии, которые позволяют разделять и детектировать окисленные фосфолипиды в общем липидном экстракте [10].

Среди наиболее изученных радикалов известны АФК: супероксид-радикалы (O_2^-), перекись водорода (H_2O_2), гидроксильные радикалы ($\bullet OH$), оксид азота ($\bullet NO$), синглетный кислород (1O_2), озон (O_3), а также тиоловые радикалы (RS) [2–4].

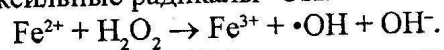
Супероксид-радикалы (O_2^-). Супероксид-радикалы образуются при получении одного электронного кислородом в процессе митохондриального транспорта электронов. Под влиянием экзогенных факторов образование супероксид-радикалов (в присутствии окислителей и восстановителей) может усиливаться. Первым сайтом образования супероксид-радикалов является внутренняя мембрана митохондрий. Ферментами, катализирующими этот процесс, являются НАДН убихинон-редуктаза и убихинол-цитохром-С-редуктаза. Свободный супероксид-радикал характеризуется наличием неспаренного электрона на внешней орбите, что обуславливает его агрессивность (превращает молекулы клеточной мембраны в свободные радикалы), и обеспечивает самоподдерживающуюся цепную реакцию [2, 4]. В результате реакции образуется перекись водорода (H_2O_2). Образование супероксид-радикалов на мембранном уровне (при участии НАДФН-оксидазы – клеточного мембраносвязанного мультимолекулярного ферментного комплекса) начинается в специализированных клетках с фагоцитарной функцией (макрофагах) и обеспечивает бактерицидный эффект. Происходит так называемый окислительный взрыв, при котором образуются АФК, радикалы и окись азота, обладающие бактерицидной активностью. Фермент ксантинооксидаза, который является типичным представителем флавопротеинов, локализуется в различных тканях и генерирует образование супероксид-радикалов из гипоксантина и кислорода. Существует гипотеза, что данный процесс является пусковым механизмом в развитии сосудистой патологии [7, 11].

При изучении вопроса истинной токсичности супероксид-радикала было отмечено, что он непосредственно может обладать токсическим эффектом, а также ограниченной реакционной способностью при взаимодействии с липидами. Предполагают, что его токсический эффект является следствием вторичного образования ещё более реактивного гидроксил-радикала ($\bullet OH$), который образуется в результате реакции Хабера–Вейса, катализируемой железом. В результате этой реакции при взаимодействии супероксида (O_2^-) и H_2O_2 образуется $\bullet OH$, что может приводить к окислительному стрессу. На первой стадии каталитической реакции восстанавливаются ионы трёхвалентного железа: $Fe^{3+} + O_2^- \rightarrow Fe^{2+} + O_2^-$. На второй стадии образуются гидроксил-радикалы: $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + \bullet OH$, и образуется цепь $O_2^- + H_2O_2 \rightarrow \bullet OH + HO^- + O_2$. Отмечена низкая скорость реакции Хабера–Вейса *in vivo*. Сделано предположение, что оксид азота вступает в реакцию с супероксидом [2]. В результате реакции образуется вторичный метаболит – пероксинитрил-анион, обладающий цитотоксическим эффектом.

Перекись водорода (H_2O_2). Образуется в основном в результате ферментативных реакций. Ферменты, катализирующие реакции образования пероксида, локализованы в микросомах, пероксисомах и митохондриях. Концентрация H_2O_2 , образующейся в условиях нормоксии, является постоянной (10^{-9} – 10^{-7} моль).

При участии фермента СОД в растительных и животных клетках в результате дисмутации O_2^- образуется H_2O_2 , приводя к снижению скорости окислительных реакций. Дисмутаза и каталаза обладают антиоксидантной клеточной активностью и способствуют удалению H_2O_2 . Кроме того, H_2O_2 может легко диффундировать через клеточные мембраны [2, 6].

Гидроксильные радикалы ($\bullet OH$). В присутствии двухвалентного железа (Fe^{2+}) и H_2O_2 в результате реакции Фентона (описана в 1894 г.) образуются высокоактивные гидроксильные радикалы $\bullet OH$:



Разложение H_2O_2 , катализируемое железом, является наиболее распространён-

ной реакцией в биологических системах и источником образования вредных продуктов ПОЛ.

Гидроксильные радикалы могут образовываться в результате следующих реакций: при разложении пероксинитритов или пероксиазотистой кислоты, с участием миелопероксидазы и хлорид-ионов (Cl^-). Гидроксильные радикалы образуются в процессе фагоцитоза в нейтрофилах [2, 4].

Оксид азота ($\bullet\text{NO}$). Образуется в различных клетках, однако его роль хорошо изучена в эндотелии сосудов. Не обладает высокой реакционной способностью (обладает слабыми окислительными свойствами). В физиологических концентрациях (до 100 нмоль) обладает антиоксидантными свойствами, быстро вступает в реакцию с кислородом, образуя диоксид азота ($\bullet\text{NO}_2$), который, в свою очередь, может вступать в реакцию с оксидом азота, образуя трёхоксид азота (N_2O_3). В результате быстрой реакции O^{2-} с $\bullet\text{NO}$ при различных патологических состояниях образуется чрезвычайно реактивный продукт реакции пероксинитрил (ONOO^-), который является промежуточным продуктом реакций окисления, нитрозирования и нитрирования. В щелочных растворах ONOO^- устойчив, но быстро расщепляется при протонировании до пероксиазотистой кислоты. $\bullet\text{OH}$ и $\bullet\text{NO}_2$ являются радикалами, играющими важную роль в образовании кислотных дождей [4, 7].

Описаны различные механизмы нитрования липидов, в результате которых образуется $\bullet\text{NO}$. Присоединение протона в реакции образования азотистой кислоты (HNO_2) из оксида азота (IV) в кислой среде может являться промежуточным этапом нитрования полиненасыщенных жирных кислот и гидроперекисей липидов, в результате чего образуются продукты нитрования липидов, структура и функция которых недостаточно изучена [2].

Оксид азота образуется в активированных макрофагах и эндотелиальных клетках. Полагают, что он принимает участие в развитии патологических состояний, связанных с воспалительными процессами, реперфузией органов, а также атеросклероза [3, 5].

Синглетный кислород ($^1\text{O}_2$). Эта форма кислорода не является истинным радикалом,

но принимает участие в реакциях образования АФК, связанных с ультрафиолетовым облучением (320–400 нм). Токсичность синглетного кислорода усиливается в присутствии фотосенсибилизаторов, взаимодействующих с молекулярным кислородом. К природным сенсибилизаторам, катализирующим окислительные реакции, относятся тетрапирролы (билирубин), флавины, гемопротеиды и восстановленный никотинамидадениндинуклеотид (NADH). Некоторые из них могут использоваться как лекарственные препараты. Образование синглетного кислорода усиливается в присутствии металлов, приводя к ускорению процесса окисления ненасыщенных липидов с образованием гидроперекисей [2, 4, 5]. Образование синглетного кислорода описано при хемилюминесцентном исследовании ПОЛ [2].

Озон (O_3). Это природное соединение присутствует в высших слоях атмосферы, а также в нижних слоях атмосферы загрязнённых городов. Озон является одним из основных загрязняющих веществ, образующихся в результате фотохимических реакций между углеводородами и оксидом азота. Не относится к свободным радикалам, но, как и синглетный кислород, может принимать участие в их образовании, стимулирует процессы ПОЛ и, таким образом, индуцирует повреждения липидов и белков *in vivo*, в основном вызывая нарушения со стороны дыхательных путей. Химические процессы перекисного окисления, индуцированные озоном, недостаточно изучены [2].

Тиоловые радикалы (Thiyl RS). Алифатические тиолы (R-SH) содержатся в живых организмах в высоких концентрациях. Нормальный уровень внутриклеточного глутатиона составляет 5–10 ммоль. Уровень серосодержащих белков может превышать концентрацию глутатиона. Серосодержащие производные являются одними из самых активных функциональных групп, присутствующих в белках. Тиоловые радикалы (RS), найденные в белках, являются одними из активных функциональных групп. Они могут вступать в реакции как нуклеофилы и атаковать дисульфидные связи. В отсутствие кислорода индуцируют цис/трансизомеризацию линолевой кислоты, что приводит к образованию нескольких изомеров [2].

Тиоловые соединения (R-SH) часто окисляются в присутствии ионов железа и меди: $R-SH + Cu^{2+} \rightarrow RS\cdot + Cu^+ + H^+$. Тиоловые радикалы обладают высокой реакционной способностью в присутствии кислорода O_2 : $RS\cdot + O_2 \rightarrow RSO_2\cdot$. Кроме того, они способны окислять НАДН в $НАД^+$, аскорбиновую кислоту и генерировать образование различных свободных радикалов ($\bullet OH$ и $O_2^{\cdot-}$). Тиоловые радикалы также могут формироваться в результате гомолитического разрыва дисульфидных связей в белках.

Углерод в центре радикалов. Образование свободных радикалов, содержащих углерод, наблюдали в клетках, обработанных CCl_4 . При воздействии системы цитохрома P-450 образуется трихлорметил радикал ($\bullet CCl_3$), который может вступать в реакцию с кислородом, образуя различные перекисные радикалы (например, $\bullet O_2 CCl_3$).

Первичными продуктами перекисного окисления являются гидроперекиси, в которых двойная связь может перемещаться и/или менять конфигурацию. Эти продукты могут структурно изменяться, превращаясь во вторичные продукты перекисного окисления. В результате аутоокисления жирных кислот образуются различные промежуточные продукты метаболизма, оказывающие токсическое влияние на организм человека.

Изучение процессов образования свободных радикалов и ПОЛ является важным в понимании механизмов развития патологических состояний человека. Окисление липидов является предметом изучения медико-биологических наук; и фундаментальные принципы неферментативных свободнорадикальных атак на фосфолипиды хорошо известны, хотя детали механизма всё ещё достаточно не изучены. Число известных конечных продуктов, которые образуются после инициации перекисного окисления фосфолипидов, велико и постоянно растёт, поскольку выявляются новые структуры окисленных фосфолипидов. Фосфолипиды с этерифицированными изопростанподобными структурами и продукты с укороченной

цепью; содержащие гидроксильные, карбонильные или карбоксильные группы, являются общими продуктами; карбонилсодержащие соединения являются реактивными и легко образуют аддукты с белками и другими биомолекулами. Фосфолипиды также могут быть атакованы химически активным азотом и хлором, что увеличивает спектр продуктов нитрования и хлорирования фосфолипидов [11].

Антиоксидантные процессы находятся в динамическом равновесии с процессами ПОЛ, обеспечивая в физиологических условиях антиокислительный гомеостаз. Характер изменения ПОЛ-антиоксидантной защиты отображает интенсивность и течение патологического процесса. Торможение уровня ПОЛ антиоксидантами с прямым механизмом действия реализуется благодаря их мембранопротекторным и антирадикальным свойствам [1]. Сдерживающая способность антиоксидантных систем ограничена. При многих патологических процессах возникает перенапряжение и происходит срыв антиоксидантных систем, что приводит к их дефициту, свободнорадикальной патологии, синдрому пероксидации, которая, безусловно, относится к универсальным и неспецифическим реакциям на патогенные факторы. Антиоксидантная недостаточность сама является повреждающим фактором, поскольку вызванные нарушения метаболизма лавинообразно нарастают [8].

Изучены индивидуальные продукты окисления фосфолипидов, образующиеся в естественных условиях. Использование масс-спектрометрии позволяет выявлять различные продукты окисления в биологических образцах. Материалом исследования может являться плазма крови, атеросклеротические бляшки, кишечная ткань и др. [8, 9, 11]. Уровень окисленных фосфолипидов *in vivo* является важным вопросом, так как в настоящее время получены неоспоримые доказательства того, что многие из этих соединений являются биоактивными и играют ключевую роль в развитии патологических состояний.

Список литературы

1. Сирова Г. О. Експериментальне та квантово-хімічне обґрунтування створення комбінованого протизапального препарату: автореф. дис. ... докт. фарм. наук / Г.О. Сирова. – Харків, 2011. – 36 с.

2. *Hammond E. G.* Brief history of lipid oxidation / E. G. Hammond, P. J. White // *J. Am. Oil Chemists' Society.* – 2011. – Vol. 88, № 7. – P. 891–897.
3. Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная терапия / В. К. Казимирко, В. И. Мальцев, В.Ю. Бутылин, Н.И. Горобец. – К. : Морион, 2004. – 160 с.
4. *Mitiu J.* Free radicals in cardiovascular disease / J. Mitiu, V. Sitiu, T. P. Simiu // *Series Med. and Biol.* – 1999. – Vol. 6, № 1. – P. 11–22.
5. *Yun-Zhong Fang.* Free radicals, antioxidants, and nutrition / Yun-Zhong Fang, Sheng Yang, Guoyao Wu // *J. Nutrition.* – 2002. – Vol. 18. – P. 872–879.
6. *Gutierrez J.* Free radicals, mitochondria, and oxidized lipids. The emerging role in signal transduction in vascular cells / J. Gutierrez // *Circ. Res.* – 2006. – Vol. 99. – P. 924–932.
7. Reactive oxygen species in vascular wall / L. M. Yung, F. P. Leung, X. Yao [et al.] // *Cardio-vasc. Hematol. Disord. Drug Targets.* – 2006. – Vol. 6. – P. 1–19.
8. *Бакуева Н. М.* Мембранные и функциональные нарушения клеток крови при гестозе в сочетании с железодефицитной анемией : автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.01 / Н.М. Бакуева. – М., 2003. – 21 с.
9. *Балацкая Н. В.* Значение динамического наблюдения показателей состояния системы про- и антиоксидантных реакций в диагностике, прогнозе и мониторинге фотодинамической терапии у пациентов с возрастной макулярной дегенерацией / Н.В. Балацкая, Н.А. Гольдина, М.В. Будзинская // Тез. докл. VIII Междунар. конф. – М.: РУДН, 2010. – С. 36–38.
10. Oxidized phospholipids as biomarkers of tissue and cell damage with a focus on cardiolipin / A. K. Samhan-Arias, J. Ji, O. M. Demidova [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta J.* – 2012. – Vol. 1818. – P. 2413–2423.
11. *Reis A.* Chemistry of phospholipid oxidation / A. Reis, C. M. Spickett // *Biochim. Biophys. Acta J.* – 2012. – Vol. 1818. – P. 2374–2387.

Г.О. Сирова, Ф.С. Леонтьева, І.В. Новікова, С.В. Іваннікова, Є.Р. Грабовецька
АКТИВНІ ФОРМИ КИСНЮ В ПРОЦЕСІ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ

В статті представлені групи атомів, що належать до вільних радикалів. Відображені етапи вивчення кисню та його вплив на процес перекисного окиснення ліпідів в історичному аспекті. Наведені деякі активні форми кисню, що є найбільш вивченими.

Ключові слова: активні форми кисню, вільні радикали, аутоокиснення, токсичний ефект.

A.O. Syrovaya, F.S. Leontyeva, I.V. Novikova, S.V. Ivannikova, E.R. Grabovetskaya
REACTIVE OXYGEN SPECIES IN PROCESS OF LIPID PEROXIDATION

Groups of atoms belonging to free radicals are described in a review article. The stages of studying of the oxygen and its role in lipid peroxidation are given in historical aspect. The most studied reactive oxygen species are presented in the article.

Key words: reactive oxygen species, free radicals, autooxidation, toxic effect.

Поступила 24.10.12