

### **АКТИВОВАНІ ФОРМИ КИСНЮ В БІОЛОГІЧНИХ СИСТЕМАХ**

#### **Вступ**

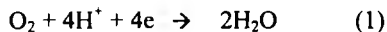
З моменту перших досліджень вільнорадикальних процесів учені приділяли велику увагу виявленню їх ролі у біологічних системах. Кисень та його метаболіти тут посідають особливе місце. З одного боку, кисень абсолютно необхідний для життєдіяльності аеробних організмів, і основна його роль полягає в енергозабезпеченні клітин, а з іншого, – при неповному відновленні його молекулярної форми утворюються так звані активовані форми кисню (АФК), які можуть спричинити пошкодження клітинних структур [3; 8; 11; 14; 15]. Зокрема, досить багато відомо про вільнорадикальне пошкодження ліпідів, білків та нуклеїнових кислот. Історично так склалося, що тривалий час увага була зосереджена тільки на негативних аспектах дії АФК. Із 60-х років минулого століття почали появлятися дані, які свідчили про можливе їх використання клітинами у ряді процесів [8]. Так, виявилось, що організми мають спеціальні системи для генерації АФК. Як приклад, можна привести їх утворення фагоцитами для знешкодження інфекційних чинників. Трохи згодом поруч із названими вище двома аспектами дії АФК було встановлено, що певні їх форми можуть виконувати й сигнальну функцію.

У живих організмах АФК утворюються спонтанно, як побічні продукти метаболізму, а також спеціалізованими системами, функціонування яких чітко контролюється. В даній роботі будуть проаналізовані загальні шляхи генерації та детоксикації АФК у живих організмах і порушення, які виникають при зсуві рівноваги між цими процесами у бік збільшення чи зменшення їх вмісту.

#### **Генерація активованих форм кисню**

Кисень є невід'ємною частиною життєдіяльності більшості живих організмів і, за винятком незначної кількості анаеробних бактерій, вони цілком залежать від його наявності в середовищі. Він, у першу чергу, необхідний для утворення АТФ у процесі окисного фосфорилування, що пов'язано з відновленням молекули кисню до води і є основним енергоутворюючим механізмом у аеробних організмів. Якщо в еукаріотів окисне фосфорилування відбувається в спеціалізованих органелах – мітохондріях, то у бактерій, які не мають внутрішньоклітинних мембранних структур, воно здійснюється на плазматичній мембрані. Згідно з експериментальними даними, більше 90% поглинутого тілом людини кисню використовується мітохондріальною цитохромоксидазою [3; 8; 10; 11]. Даний фермент

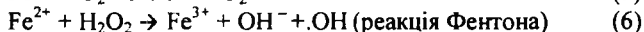
каталізує чотирьохелектронне відновлення молекули кисню до води за схемою:



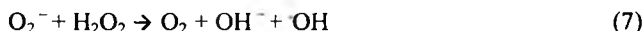
Кисень також використовується як субстрат багатьма ферментами. Наприклад, у нирках нараховується близько 30 ферментів, які використовують кисень при метаболізмі вуглеводів, амінів, простагландинів, пуринів, стероїдів, амінокислот, карнітину та ін. [3; 8]. Багато з цих реакцій супроводжуються утворенням АФК, таких, як супероксид-аніон  $\text{O}_2^-$ , пероксид водню  $\text{H}_2\text{O}_2$  і гідроксильний радикал  $\text{OH}^\cdot$ . Послідовне перетворення кисню у названі форми подано на схемах 2-4:



У біологічних системах АФК можуть утворюватися також з участю іонів металів зі змінною валентністю. Головним чином тут задіяні іони заліза та міді. Приведені нижче реакції (5-6) отримали назву модифікованої реакції Гарбера–Вейса:



Якщо скласти рівняння 5 і 6, то отримаємо сумарну реакцію Гарбера–Вейса:



Видно, що іони заліза використовуються лише як каталізатори, а в сумарному рівнянні вони відсутні. Саме в цьому і полягає небезпека вільних іонів заліза (і міді), що вони виступають каталізаторами утворення високо-реакційноздатних гідроксильних радикалів. Тому пошкодження активованими формами кисню локалізуються переважно в місцях знаходження іонів заліза та міді.

Активовані форми кисню утворюються й при окисленні невеликих молекул (таких, як флавіни, катехоламіни, гідрохінони) цитохромами  $\text{P}_{450}$  і  $\text{b}_5$ , флавопротеїдредуктазами, ксантиндегідрогеназами, моноаміноксидазами, а також при витіканні з електронно-транспортного ланцюга [2; 3]. У хребтних тварин швидкість утворення АФК тісно пов'язана зі швидкістю споживання кисню і пропорційна кількості мітохондрій у тканинах [4]. В органах теплокровних тварин, таких, як печінка щура чи серце голуба, при фізіологічних концентраціях кисню 1-4% від його спожитої кількості перетворюється в АФК у результаті витоку електронів із мітохондрій [5-8].

Пошкодження, ініційовані АФК, переважно локалізуються в місцях знаходження іонів металів зі змінною валентністю, у першу чергу іонів заліза і міді [8]. Практично всі клітинні компоненти атакуються АФК. Їхня взаємодія з білками може призвести до модифікації амінокислот – окислення сульфгідрильних груп цистеїну, імідазольних груп гістидину,

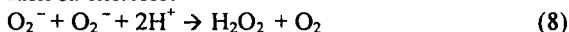
циклічних кілець тирозину, фенілаланіну та триптофану і т.д. [8; 14]. Активовані форми кисню атакують також і ДНК, викликаючи розриви ланцюга і модифікацію вуглеводної частини та азотистих основ, що може призвести до появи мутацій [8]. Поліненасичені жирні кислоти особливо чутливі до атаки АФК, і це нерідко ініціює ланцюгову реакцію в мембранах з утворенням пероксидів ліпідів (ліпід-ООН) і так званих лізоліпідів. Оскільки АФК небезпечні для функціонування клітини, то існує досить складна багаторівнева система захисту від них.

### Деградація активованих форм кисню

Нині прийнято умовно розділяти всі системи захисту від дії АФК на три групи [3]: 1) попередження утворення АФК; 2) обрив вільнорадикального ланцюга і знешкодження радикалів антиоксидантними ферментами і гасителями і 3) виправлення пошкоджених компонентів (репарація).

Важливим компонентом захисту від дії АФК, що попереджує вільнорадикальні процеси, виступає хелатування іонів металів зі змінною валентністю спеціалізованими і неспеціалізованими білками, наприклад, феритином, трансферином, альбуміном та ін. [1; 6]. До групи низькомолекулярних антиоксидантів належать глутатіон,  $\alpha$ -токоферол (вітамін Е), аскорбінова (вітамін С) і сечова кислоти, білірубін тощо. Вони діють, в основному, на стадії розриву ланцюга вільнорадикальної реакції, зупиняючи його поширення [3; 8]. Глутатіон гасить гідроксили-радикали і синглетний кисень, є субстратом для деяких ферментів, елементом для регенерації вітамінів Е і С [8].

Тепер проаналізуємо ферментативні антиоксидантні системи, які беруть участь у захисті від АФК (так звані антиоксидантні ферменти). Їх прийнято поділяти на первинні та вторинні [3; 11]. Первинними антиоксидантними ферментами є такі, які безпосередньо діють на АФК, а вторинними антиоксидантними ферментами вважаються ті, які, не діючи безпосередньо на АФК, важливі для функціонування першої групи ферментів. Звернемось до аналізу наявної інформації щодо первинних антиоксидантних ферментів. Логічно ці системи згрупувати згідно з їх місцем у стадіях метаболізму кисню, як подано в схемах 2-4. Першим у цьому ряду виступає супероксидиз-аніон. Він перетворюється в пероксид водню під дією супероксиддисмутази за схемою:



Родина супероксиддисмутаз нараховує досить багато ферментів, які каталізують приведену щойно реакцію [8]. Їх об'єднують у групи в залежності від того, іон якого з металів використовується при утворенні активної форми ферменту, апоформи. Слід зазначити, що в більшості випадків холоферменти також різні. Розрізняють такі форми супероксиддисмутази: марганцевмісні (Mn-SOD), мідь-, цинковмісні (Cu, Zn-SOD) та залізівмісні (Fe-SOD). Оскільки ці ферменти здатні утворювати гетероолігомери, то в ряді випадків у експериментальних умовах виявлені їх гібридні форми, але

наскільки можливе їх існування в живих клітинах поки що незрозуміло. Слід також зазначити, що реакцію (8) також можуть каталізувати певні низькомолекулярні сполуки, наприклад, комплекси іонів перехідних металів з органічними хелаторами. До речі, комплекси такої природи, здатні дисмутувати супероксид-іон (так звані імітатори СОД), вважаються перспективними для використання в якості медичних чинників для зниження шкідливої дії АФК.

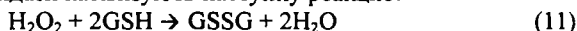
Після перетворення супероксид-іону у пероксид водню з'являється потреба в нейтралізації останнього. Дану функцію виконують ферменти, які отримали назву пероксидази. Одним із найпростіших представників цієї родини ферментів виступають каталази. Вони можуть містити в активному центрі гем і зв'язане з ним залізо, але існують і безгемові форми. Каталази здійснюють дисмутацію пероксиду водню згідно зі схемою:



Деградацію пероксиду водню здійснюють також і пероксидази. Вони діють за загальною схемою:



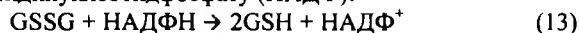
Дуже важливими представниками пероксидаз виступають глутатіонпероксидази (ГП). Як кофермент для нейтралізації пероксиду вони використовують цистеїнвмісний трипептид глутатіон (глу-цис-глі). В клітині більшість глутатіону знаходиться у вільній формі, але інколи аж до третини може бути у формі змішаних дисульфідів із речовинами, які містять тіолові групи. Це можуть бути білки, цистеїн, кофермент А тощо. Глутатіонпероксидази каталізують наступну реакцію:



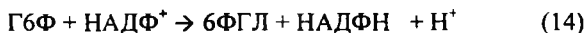
Видно, що в результаті реакції одночасно з деградацією пероксиду водню утворюється окислена форма глутатіону. Оскільки вміст відновленого глутатіону повинен підтримуватися досить високим, то необхідне функціонування відповідних механізмів. Цю функцію виконують певні представники групи вторинних антиоксидантних ферментів, про які мова йтиме трохи згодом. Тут же слід згадати ще про одну групу пероксидаз, відповідальних за метаболізм продуктів вільнорадикального окислення ліпідів. Йдеться про ліпідпероксидази. Вони каталізують реакції, які протікають за рівнянням:



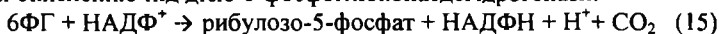
Окрім пероксидаз, відновлення пероксидів ліпідів із використанням глутатіону здійснюють також глутатіонтрансферази. Оскільки в результаті функціонування глутатіонпероксидаз і глутатіонтрансфераз глутатіон окислюється, то його висока концентрація підтримується цілою низкою ферментів, ключове місце серед яких посідає глутатіонредуктаза. Цей фермент каталізує відновлення глутатіону за рахунок окислення коферменту нікотинамідаденідинуклеотидфосфату (НАДФ):



Щоб завершити аналіз пов'язаних з глутатіоном шляхів детоксикації, доцільно ще вказати, яким чином забезпечується відновлений кофермент, необхідний для перетворення глутатіону у відновлену форму. Прийнято вважати, що більша частина НАДФН утворюється в реакції, яку каталізує ключовий фермент пентозофосфатного шунта глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа. Він перетворює глюкозо-6-фосфат (Г6Ф) у 6-фосфоглюконолактон (6ФГЛ):



Після перетворення 6ФГЛ у 6-фосфоглюконат (6ФГ) останній піддається окисленню під дією 6-фосфоглюконатдегідрогенази:



Поза сумнівом, існує ще багато реакцій, в ході яких утворюється НАДФН, але вважається, що їх внесок у процес підтримання його високого вмісту незначний у порівнянні з реакціями, каталізованими глюкозо-6-фосфатдегідрогеназою та 6-фосфоглюконатдегідрогеназою.

Окремо слід додати, що антиоксидантні властивості притаманні також білкам, яким приділяється інша основна функція, як, наприклад, моголобінові і гемоглобінові [1].

Ми проаналізували системи, відповідальні за генерацію та деградацію АФК. У нормі в клітині існує певна рівновага між ними. Але в ряді випадків така рівновага може порушуватись у той чи інший бік. Про такі порушення і йтиме мова.

### Оксидативний і редуктивний стреси

Рівновага між процесами утворення та деградації зберігається не завжди. Стан, коли з якихось причин потужність систем, які продукують АФК, перевищує таку систему деградації, прийнято називати "оксидативним стресом" [3; 5; 11; 12; 14; 15]. Можлива також протилежна ситуація, коли потужність антиоксидантних систем перевищує потужність систем генерації АФК. Такий стан отримав назву "редуктивного стресу".

Оксидативний стрес викликається дуже багатьма чинниками. Він може утворюватися при надходженні в організм певних сполук, здатних зворотно окислюватися чи відновлюватися. Прикладом таких речовин можуть виступати хінони, гербіциди чи пестициди [8]. Вільнорадикальні реакції можуть активуватися також при попаданні в організм іонів важких металів. Механізми, які призводять до оксидативного стресу, можна згрупувати у такі, які безпосередньо впливають на протікання вільнорадикальних процесів, і ті, що опосередковано їх активують.

Певні патології супроводжуються також розвитком оксидативного стресу. Серед них можна назвати злоякісні новоутворення, ішемію, цукровий діабет, нейродегенеративні захворювання тощо [2; 4; 13]. Вважається, що вільнорадикальне пошкодження клітинних компонентів причетне і до процесу старіння [14]. Чи є можливість якимось чином контролювати негативну дію цього виду стресу? Так, така можливість існує. Можна вводити

екзогенні антиоксиданти, що широко використовується в традиційній та комплементарній медицині. Прекрасним доповненням до названих підходів контролю вільнорадикальних процесів є підвищення ендогенного антиоксидантного потенціалу. В першу чергу мова йде про збільшення активності антиоксидантних ферментів, а також вмісту ключового низькомолекулярного антиоксиданту глутатіону. Проте антиоксидантна терапія не стала черговою панацеєю, хоча багато хто й тепер вважає її такою. Суть проблеми в тому, що регуляція активності антиоксидантних ферментів досить складна і на даний час ми ще дуже далекі до її розуміння [3; 9; 11; 15].

Щодо теорії редуکتивного стресу, то вона знаходиться тільки на початковому етапі розвитку. Як не парадоксально, але своєрідним поштовхом для її створення стало накопичення фактів, згідно з якими істотно підвищення антиоксидантного потенціалу організму також виявилось несприятливим. Такий стан може, наприклад, призводити до зниження захисного потенціалу імунної системи, порушення шляхів передачі сигналів тощо. Тому в черговий раз розуміємо, що дуже непросто вмішуватися в тонкі регуляторні механізми функціонування живих організмів. Процеси в них дуже добре збалансовані, і втручання може призвести до неочікуваних наслідків.

#### **Деякі особливості протікання оксидативного стресу у про- та еукаріотів**

Структурна організація клітин відіграє істотну роль у розвитку оксидативного стресу. Так, у клітинах еукаріотів як джерела АФК, так і системи їх детоксикації чітко компартменталізовані, тобто роз'єднані у просторі. Природно, що пошкодженню, в першу чергу, піддаються клітинні компоненти, які знаходяться поруч із джерелами утворення АФК і особливо в місцях локалізації незв'язаних форм іонів металів зі змінною валентністю [8]. Цю ситуацію можна продемонструвати на прикладі пошкодження ДНК. Даний процес особливо важливий тому, що саме пошкодження ДНК може призводити до появи точкових мутацій і викликати злоякісне переродження клітин [8]. На культурі клітин фібробластів людини було показано, що при їхній обробці пероксидом водню, який викликає в них оксидативний стрес, у першу чергу пошкоджується мітохондріальна, а не ядерна ДНК [8]. Більше того, якщо пошкодження ядерної ДНК були цілком виправлені через півтори години після обробки, то в мітохондріальній ДНК вони все ще виявлялися. Підрахунок частоти пошкоджень показав, що мітохондріальна ДНК пошкоджується в  $10^4$  разів частіше, ніж ядерна [8]. Варто підкреслити, що мітохондріальні компоненти значно більше піддані природному оксидативному стресу, ніж ядерні внаслідок того, що більша частина АФК генерується саме в цих органелах [7; 10]. Проте наслідки таких пошкоджень явно нерівноцінні – якщо пошкоджується ядерна ДНК генеративних клітин, то такі зміни пере-

даються потомству. Мітохондріальна передача спадкової інформації має набагато менше значення і здійснюється лише по материнській лінії.

У прокариотів такої компартменталізації оксидативних процесів не спостерігається внаслідок відсутності чіткої структурної організації клітини. Пошкодження ДНК у них здійснюється за тими ж механізмами, що і в еукариотів. Так, супероксид-аніон може чи сам викликати модифікацію, чи виконувати роль фактора, що звільняє іони заліза зі зв'язаного з білками стану й у такий спосіб підвищує інтенсивність оксидативного стресу.

### Висновки

Поява на Землі молекулярного кисню дала початок інтенсивному його використанню живими організмами. В першу чергу він використовується для високоефективної генерації енергії. Проте АФК, які утворюються переважно як побічні продукти метаболізму кисню, можуть створити несприятливі умови для життєдіяльності. Організми поруч із системами захисту від АФК виробили також способи їх використання з користю для себе, задіявши їх у специфічні окисні та захисні процеси і навіть у внутрішньоклітинну передачу інформації та міжклітинну комунікацію. Тонка рівновага між процесами утворення та деградації АФК може порушуватися, результатом чого є розвиток оксидативного та редуктивного стресів. Принципово існує можливість змінювати антиоксидантний/прооксидантний статус, але оскільки ми ще дуже далекі до повного розуміння тонких механізмів усієї різноманітності проаналізованих тут процесів, необхідно дуже делікатно втручатися у функціонування живих організмів. Головним напрямком досліджень на перспективу повинно стати розшифрування тонких механізмів регуляції антиоксидантно/прооксидантного статусу клітини і перенесення інформації, отриманої в експериментальних умовах, на живу клітину.

1. Васильєва В.О., Коробов В.М., Великий М.М. Роль міоглобіну в забезпеченні тканин киснем // Укр. біохім. журн. – 1996. – Т.68. – №4. – С.45-55.
2. Великий М.М., Бурда В.А., Біронг Н.В., Оліярник О.Д., Великий А.М. Вплив нікотинаміду на активність ферментів антиоксидантного захисту при експериментальному діабеті // Укр. біохім. журн. – 1996. – Т.68 – №2. – С.109-114.
3. Лушак В.И. Окислительный стресс и механизмы защиты от него у бактерий // Биохимия. – 2001. – Т.66. – №5. – С.592-609.
4. Abdalla D.S.P., Monteiro H.P., Oliveira J.A.C., Bechara E.I.J. Activities of superoxide dismutase and glutathione peroxidase in schizophrenic and manic-depressive patients // Clin. Chem. – 1986. – V.32. – №5. – P.805-807.
5. Bagnyukova T.V., Storey K.B., Lushchak V.I. Induction of oxidative stress in *Rana ridibunda* during recovery from winter hibernation. // J. Therm. Biol. – 2003. – V.28. – P.21-28.
6. Balla G., Jacob H.S., Balla J., Rosenberg M., Nath K., Apple F., Eaton J.W., Vercelotti G.M. Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategy of endothelium // J. Biol. Chem. – 1992. – V.267. – №25. – P.18148-18153.

7. Dawson T.L., Gores G.J., Nicminene A.-L., Herman B., Lemasters J.J. Mitochondria as a source of reactive oxygen species during reductive stress in rat hepatocytes // *Am. J. Physiol.* – 1993. – V.264. – №4 Pt1. – P.C961-C967.
8. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford: Clarendon Press. – 1989. – 543 p.
9. Harris E.D. Regulation of antioxidant enzymes // *FASEB J.* – 1992. – V.6. – №9. – P.2675-2683.
10. Konstantinov A.A., Reskin A.V., Popova E.Y., Khomutov G.B., Ruuge E.K. Superoxide generation by the respiratory chain of tumor mitochondria // *Biochim. Biophys. Acta* – 1987. – V.894. – №1. – P.1-10.
11. Lushchak V.I. Oxidative stress in bacteria, in: *Oxidative Stress at Molecular, Cellular and Organ Levels*, eds P. Johnston, A.A. Boldyrev, Research Singpost, Trivandrum, India, 2002. – P.45-65.
12. Lushchak V.I., Lushchak L. P., Mota A. A., Hermes-Lima M. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation // *American J. Physiol.* – 2001. – V.280. – №1. – P.R100-R107.
13. McCord J.M. Oxygen-derived free radicals in post-ischemic injury // *New Engl. J. Med.* – 1985. – V.312. – №3. – P.159-163.
14. Stadtman E.R. Protein oxidation and aging // *Science.* – 1992. – V.257. – №5074. – P.1220-1224.
15. Storey K.B. Oxidative stress: animal adaptations in nature // *Braz. J. Med. Biol. Res.* – 1996. – V.29. – P.1715-1733.

Volodymyr Lushchak

#### ACTIVATED OXYGEN SPECIES IN BIOLOGICAL SYSTEMS

The main roots of generation and degradation of reactive oxygen species in biological systems are characterized. The imbalance between two sets of processes is called oxidative or reductive stress. Specificity of mentioned stresses in pro- and eukariotic organisms as well as some perspectives of research in this field have been discussed.

*Галина Ткаченко, Наталія Кургалюк,  
Олександр Іккерт, Сергій Гордій*

### **ВПЛИВ МОДУЛЯТОРІВ АТФ-ЧУТЛИВИХ КАЛІЄВИХ КАНАЛІВ НА ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН МІТОХОНДРІЙ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ: РОЛЬ ТРАНСАМІНАЗНИХ РЕАКЦІЙ**

АТФ-чутливі калієві канали були відкриті А.Номою у 1983 році на ізольованих мембранах кардіоміоцитів мурчаків [9]. З тих пір увага дослідників та фармакологів зосереджена на встановленні їх структури, механізмів функціонування і регуляції активності. Виявлено, що цей тип каналів має виняткове значення у забезпеченні взаємозв'язку між матаболічним статусом і збудливістю мембрани клітини, а у деяких типах клітин (попе-