

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ДОНЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ВАСИЛЯ СТУСА
ФАКУЛЬТЕТ ХІМІЇ, БІОЛОГІЇ І БІОТЕХНОЛОГІЙ
НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ФІЗИКО-ОРГАНІЧНОЇ ХІМІЇ І ВУГЛЕХІМІЇ
ІМЕНІ Л. М. ЛИТВИНЕНКА

Кущ О. В.
Шендрик О. М.

АКТИВНІ ФОРМИ ОКСИГЕНУ

*Навчальний посібник
для здобувачів вищої освіти спеціальності 102 Хімія*

Київ, Вінниця 2023

УДК 54.024:[577.128:546.21]:661.56](075.8)
К 967

*Рекомендовано до друку Вченою радою
Донецького національного університету імені Василя Стуса
(протокол № 10 від 30 червня 2023 року)
і Вченою радою Інституту фізико-органічної хімії і вуглекімії
імені Л. М. Литвиненка Національної академії наук України
(протокол № 6 від 14.09.2023 р.)*

Автори: О. В. Куш, д-р хім. наук, старший науковий співробітник;
О. М. Шендрик, д-р хім. наук, професор.

Рецензенти: М. І. Короткіх, д-р хім. наук, професор;
О. С. Лявинець, д-р хім. наук, професор.

Куш О. В., Шендрик О. М.

К 967 Активні форми оксигену: навчальний посібник. Вінниця: ДонНУ імені Василя Стуса, 2023. 128 с.

У посібнику представлено матеріал до курсу лекцій «Радикальні реакції в клітині. Антиоксидантний захист» для здобувачів вищої освіти спеціальності 102 Хімія у Донецькому національному університеті імені Василя Стуса. Наведений матеріал має на меті ознайомити студентів з теоретичними основами вільно-радикальних реакцій окиснення, їх перебігом у метаболічних процесах у клітинах аеробів за участі молекулярного кисню і його активних форм. Посібник складається з десяти глав, у яких розглянуто основні механізми утворення реактивних видів оксигену, методи їх виявлення і дослідження, ферментативні і неферментативні компоненти антиоксидантного захисту клітин, біологічні ефекти і хімічні механізми дії активних форм оксигену на біомолекули. Після кожної глави наведено питання для самоконтролю і посилання на літературу, включно з науковими статтями останніх років.

Посібник рекомендований студентам бакалаврату, магістратури та аспірантури хімічних спеціальностей вищих навчальних закладів. Може бути корисним для фахівців медичного і біологічного профілів.

УДК 54.024:[577.128:546.21]:661.56](075.8)

© О. В. Куш, 2023

© О. М. Шендрик, 2023

© ДонНУ імені Василя Стуса, 2023

ЗМІСТ

ВСТУП	6
ГЛАВА 1. Відкриття, класифікація, структура вільних радикалів	8
1.1. Історія відкриття вільних радикалів	8
1.2. Властивості трифенілметильного радикала	10
1.3. Відкриття аліфатичних радикалів	13
1.4. Радикал Кельша	14
1.5. Класифікація радикалів	15
1.6. Генерування радикалів	20
1.7. Реакції за участі вільних радикалів	23
Контрольні питання	26
Література	26
ГЛАВА 2. Утворення активних форм кисню в клітинах і тканинах. Оксидативний стрес	28
2.1. Генерація активних форм кисню в клітині	28
2.2. Оксидативний стрес	35
Контрольні питання	36
Література	36
ГЛАВА 3. Основні види активних форм кисню. Джерела і роль у клітинах	38
3.1. Супероксид аніон-радикал	38
3.1.1. Джерела супероксид аніон-радикала в клітині	38
3.1.2. Властивості супероксид аніон-радикала	40
3.1.3. Дія супероксид аніон-радикала на біологічні структури	42
3.2. Пероксинітрид аніон	43
3.3. Гідроген пероксид	43
3.4. Гідроксильний радикал	45
3.5. Синглетний кисень	46
3.6. Гіпохлорит аніон	47
3.7. Радикал убіхінону – семіхінон	48
3.8. Нітроген оксид	49
3.8.1. Історія відкриття оксиду нітрогену	49
3.8.2. Утворення оксиду нітрогену	52
3.8.3. Механізми дії оксиду нітрогену	52
3.8.4. Цитотоксичність нітроген оксиду	54
Контрольні питання	55
Література	55

ГЛАВА 4. Ферментативна антиоксидантна система захисту клітини	59
4.1. Механізми антиоксидантного захисту	59
4.2. Ферменти антиоксидантної системи	61
4.2.1. Супероксиддисмутаза	61
4.2.2. Каталаза	63
4.2.3. Глутатіонзалежні ферменти антиоксидантного захисту...	63
Контрольні питання	66
Література	66
ГЛАВА 5. Неферментативна система антиоксидантного захисту.....	68
5.1. Вітаміни-антиоксиданти	68
5.2. Флавоноїди.....	71
5.3. Мелатонін – гормон-антиоксидант.....	72
5.4. Убіхінон, сечова кислота як ендогенні антиоксиданти.....	73
5.5. Хелатори іонів металів змінної валентності.....	74
Контрольні питання	76
Література	77
ГЛАВА 6. Пероксидне окиснення ліпідів	78
6.1. Механізм пероксидного окиснення ліпідів.....	78
6.2. Окиснення арахідонової кислоти	82
6.3. Біологічні наслідки ПОЛ	83
6.4. Аналіз продуктів ПОЛ	85
Контрольні питання	85
Література	86
ГЛАВА 7. Оксидативна трансформація білків і пептидів	
під дією активних форм кисню	87
7.1. Механізми оксидативної модифікації білків	
під впливом АФО	87
7.1.1. Фрагментація поліпептидних ланцюгів	88
7.1.2. Внутрішньо- і міжмолекулярні ковалентні «зшивки»	89
7.1.3. Окиснення простетичних груп білків	90
7.1.4. Оксидативна модифікація бічних груп	
амінокислотних залишків	90
7.2. Вплив оксидативної модифікації на функціональні	
властивості білків	92
7.3. Аналітичний контроль процесу окисної модифікації білків	93
Контрольні питання	94
Література	94

ГЛАВА 8. Оксидативна модифікація нуклеїнових кислот і вуглеводів	96
8.1. Окиснювальна модифікація азотистих основ у складі нуклеїнових кислот	97
8.2. Окиснення цукрових фрагментів у складі нуклеїнових кислот	99
8.3. Біологічні наслідки дії активних форм кисню на ДНК.....	100
8.4. Окиснення вуглеводів під дією активних форм кисню	101
Контрольні питання	104
Література	105
ГЛАВА 9. ЕПР-спектроскопія радикалів у хімічних та біологічних системах.....	106
9.1. Принципи методу електронного парамагнітного резонансу	107
9.2. Структура і параметри спектрів ЕПР	107
9.3. ЕПР-спектроскопія як метод дослідження радикалів у біологічних системах	109
9.3.1. Метод спінових пасток	110
9.3.2. Метод спінових міток	111
Контрольні питання	114
Література	114
ГЛАВА 10. Метод хемілюмінесценції	116
10.1. Принцип хемілюмінесценції	116
10.2. Біолюмінесценція	117
10.3. Неактивована ХЛ.....	119
10.4. Активована хемілюмінесценція.....	121
10.4.1. Хімічні активатори ХЛ	121
10.4.2. Фізичні активатори ХЛ.....	123
10.5. Застосування ХЛ в медицині.....	123
Контрольні питання	124
Література	124

ВСТУП

Кисень тісно пов'язаний з еволюцією життя на Землі і відіграє найважливішу роль в існуванні аеробних організмів протягом усього їхнього життєвого циклу. Насамперед він є активним учасником процесів клітинного дихання. Але з іншого боку, він може проявляти токсичну дію на клітини. Властивості кисню обумовлені самою його природою: він є бірадикалом і легко приймає електрони, перетворюючись на більш реактивні форми. Сьогодні накопичилось багато інформації, на основі якої можна стверджувати про незамінну роль кисню в життєво важливих процесах організмів, яку він здійснює саме через свої активні види.

Активні форми кисню (АФО) утворюються під час перебігу багатьох біохімічних процесів практично у кожному компартменті клітини як спонтанно, так і контролювано. АФО охоплюють широкий спектр хімічних сполук різної природи – це можуть бути як вільні радикали, так і молекули із закритою оболонкою. Вони різняться за своїми фізіологічними властивостями, локалізацією, механізмами утворення та дії на біомолекули. Реактивність АФО залежить від тривалості їх життя, здатності до дифузії і потенціалу генерувати нові реактивні види. На ранніх етапах дослідження АФО їм приписували суто негативну роль через здатність викликати окисні пошкодження біологічних макромолекул, як-от хімічна модифікація білків (агрегація, окиснення амінокислотних залишків), ліпідів (пероксидне окиснення), нуклеїнових кислот (фрагментація нуклеотидів, окиснення азотистих основ), вуглеводів (розриви ланцюгів полісахаридів, окиснення моносахаридів). Такі структурні трансформації призводять до порушення проникності біомембран, зміни функціональності білків, мутацій ДНК, ослаблення захисних механізмів організму, загибелі клітин. Наслідком окисативних пошкоджень біомолекул є старіння організму і розвиток багатьох захворювань, опосередкованих вільними радикалами. Але добре відомо, що АФО утворюються і за умови нормального фізіологічного стану клітин та залучаються у різноманітні метаболічні процеси. АФО є важливими сигнальними молекулами, вони індукують клітинну диференціацію та апоптоз, беруть участь у регуляції тону судин, оновленні біоструктур, інгібуванні агрегації тромбоцитів, захисті від патогенів, синтезі важливих біологічно активних речовин. Свого часу було введено термін «кисневий парадокс», який висвітлює феномен того, що з одного боку, кисень і його активні форми є важливими учасниками метаболічних механізмів, а з іншого, – вони проявляють токсичну дію на всі живі організми. Рівень вироблення АФО може різко підвищуватись через аномальний метаболізм за умови багатьох патологій, тривалого стресу, неправильного харчування, вживання стимуляторів, впливу радіаційного та ультрафіолетового опромінення.

Надмірна активність АФО порушує окисно-відновний гомеостаз клітин, призводить до окисного стресу та пошкодження важливих органел та біомолекул. Отже, клітина повинна зберігати баланс між продукцією та утилізацією АФО. Для підтримки клітинного гомеостазу у фізіологічних умовах живі організми виробили розгалужену антиоксидантну систему захисту, яка запобігає *in vivo* потенційним пошкодженням біоструктур під впливом АФО. Антиоксидантна система включає ферменти та невеликі молекули, які реагують з окремими видами АФО для зменшення окисного ушкодження біомолекул та/або модулювання редокс-передачі сигналів.

Сьогодні дисципліна «Активні форми кисню» – це сучасна область наукових знань, яка стрімко розвивається, маючи взаємозалежний зв'язок з хімією, біологією, медициною, фізикою. Вона вивчає природу, джерела і механізми утворення АФО, компоненти антиоксидантного захисту клітин, біологічні ефекти і хімічні механізми дії АФО на всі структурні і функціональні компоненти клітин. Накопичення нових доказів про дуалістичну роль АФО як мутагенів або посередників і регуляторів у багатьох фізіологічних і патологічних процесах, всебічне глибоке розуміння механізмів генерації, регуляції та усунення АФО сприяє пошуку профілактичних, захисних і терапевтичних підходів, пов'язаних з антиоксидантним потенціалом різноманітних сполук для зниження наслідків окисативного стресу.

ГЛАВА 1

ВІДКРИТТЯ, КЛАСИФІКАЦІЯ, СТРУКТУРА ВІЛЬНИХ РАДИКАЛІВ

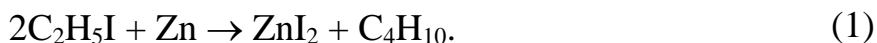
Хімічний ковалентний зв'язок між атомами формується через узагальнення електронів, які розташовуються парами на молекулярних орбіталях. Вільні радикали відрізняються тим, що у їх складі є орбіталі з неспареними електронами. Це робить радикали хімічно високоактивними, оскільки вони мають значний надлишок енергії і намагаються зменшити її завдяки утворенню хімічного зв'язку за участі неспареного електрона. Отже, вільний радикал – це атом або група атомів з одним або декількома неспареними електронами і відповідно з відмінним від нуля сумарним спіном. Найпростішим радикалом є атом елемента Гідрогену з одним протоном і одним електроном. Неспарений електрон у радикалах прийнято позначати точкою у верхньому індексі – **R•**.

1.1. Історія відкриття вільних радикалів

Термін «радикал» вперше ввів Л. Лавуазьє у 1790 р. [1]. Він назвав радикалом елемент або групу елементів, які під час взаємодії з киснем утворюють оксид або кислоту. Очевидно, що таке визначення не має відношення до сучасних уявлень про вільний радикал як частинку з неспареним електроном. Пізніше Г. Деві [2] продемонстрував, що Оксиген не є обов'язковим елементом у складі кислоти. Надалі уявлення про радикали декілька разів змінювались. У 1832 р. Ю. Лібіх і Ф. Велер [3] запропонували радикалом називати групу елементів, які залишаються без змін у хімічних реакціях і переходять із вихідних речовин у продукти. Наприклад, бензоїльна група $C_5H_4CH_2O$ переноситься незмінною під час взаємних перетворень бензойної кислоти, бензальдегіду, бензоїлхлориду, бензоїлсульфіду тощо. Таке визначення радикала підтримав Й. Я. Берцеліус, а Ю. Лібіх назвав органічну хімію «хімією складних радикалів». Учені-хіміки побудували теорію радикалів, яка розглядала органічні молекули подібно до неорганічних сполук, як-от оксиди, гідрати, солі. Ця теорія, однак, суперечила багатьом фактам, і тому з часом була спростована, але термін «радикал» в органічній хімії залишився і використовується сьогодні для позначення окремих замісників та функціональних груп в органічних молекулах.

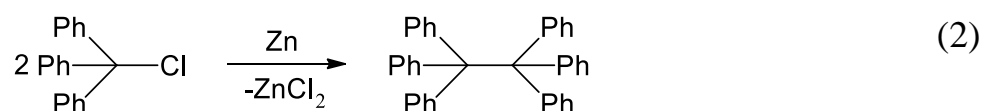
Протягом довгого часу у чистому вигляді вільний радикал отримати ніяк не вдалося, тому мало хто вірив, що радикали дійсно можуть бути «вільними», тобто ізольованими, та існувати самі по собі, а не у складі молекули. У 1849 р. молодий англійський хімік Е. Франкланд намагався отримати етильний радикал, для чого провів реакцію Вюрца: нагрів йодистий етил із цинком і отримав, як він вважав, вільний радикал – «етил» [4]. Але Франкланд, на жаль, помилився.

Виявилося, що отриманий газ має молекулярну вагу в два рази більшу, ніж етил. Це був бутан:



Так само А. В. Г. Кольбе у відомих дослідах з електролізу ацетату натрію прийняв етан за метильний радикал [5]. В обох випадках до помилок призвела недосконалість методів визначення молекулярних мас. Пізніше було з'ясовано, що вільний радикал, як і раніше, не отримано, а продуктами проведених реакцій є димери. Дискусія щодо існування вільних радикалів ще тривала майже п'ятдесят років аж до 1900 р.

Радикальна хімія як область наукових знань бере свій початок саме з 1900 р. і безпосередньо пов'язана з дослідженнями американського хіміка Мозеса Гомберга. М. Гомберг народився в Єлісаветграді Російської імперії (нині м. Кропивницький, Україна). У 1884 р. сім'я емігрувала до Чикаго, де у 1886 р. Гомберг вступив до Мічиганського університету, отримав хімічну освіту і пізніше – ступінь доктора [6]. М. Гомберг провів хімічний експеримент, намагаючись синтезувати гексафенілетан – симетричний вуглеводень, у якому до обох центральних атомів Карбону приєднані по три фенільні групи. Учений не без підстав вважав, що отримати цю речовину можна за допомогою добре відомої реакції Вюрца – взаємодії активного металу з трифенілметилхлоридом (2). Тобто М. Гомберг провів реакцію, подібну до тієї, яку досліджував Франкланд, але з іншими реагентами. У бензолі в атмосфері інертного газу він подіяв сріблом на хлористий трифенілметил, намагаючись отримати гексафенілетан за реакцією (2):



Але Гомберг виділив продукт, у складі якого, окрім Карбону і Гідрогену, було виявлено Оксиген. Вчений повторив дослід, ретельно оберігаючи реакційну суміш від повітря. Розчин виявився не безбарвним, як очікувалось, а жовтим; поява забарвлення свідчила про утворення іншої речовини. Виділений в інертній атмосфері продукт за складом був таким самим, як гексафенілетан, але за властивостями різко відрізнявся від нього: навіть за низької температури швидко реагував із молекулярним киснем, бромом і йодом. Гексафенілетан у такі реакції вступати ніяк не міг. Переконавшись у тому, що отримані результати не є наслідком експериментальних помилок, учений прийшов до парадоксального висновку: він отримав раніше невідому форму органічної речовини з незвичайним тривалентним станом Карбону, тобто не «цілу» молекулу, а

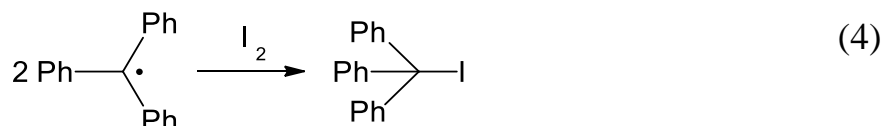
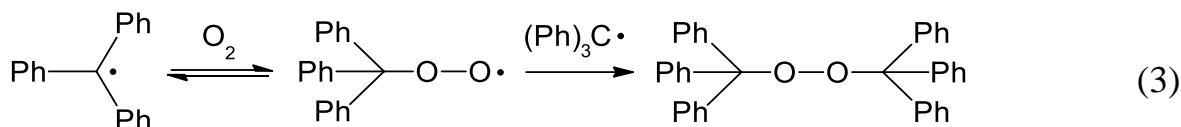
радикал – «обломок» молекули з розірваним хімічним зв'язком і відповідно з неспареним електроном. Це відкриття повністю суперечило традиційним поглядам про тетравалентність Карбону в органічних сполуках. Гомберг висунув сміливу гіпотезу: в реакції утворюється вільний трифенілметильний радикал – $(C_6H_5)_3C\cdot$. Неспарений електрон робить його дуже активним відносно галогенів та кисню, тому на повітрі до радикала приєднується кисень з утворенням пероксильного радикала. Дослідник припустив також, що в інертній атмосфері реакція проходить не до кінця й існує рівновага між радикалами і продуктом їх димеризації. На це вказувала і молекулярна маса продукту, яка виявилася більшою, ніж у трифенілметану, але меншою, ніж у його димеру – гексафенілетану. У 1900 р. М. Гомберг опублікував статтю з незвичною для того часу назвою «Triphenylmethyl, a case of trivalent carbon» («Трифенілметил, випадок тривалентного Карбону») [7]. Закінчення статті Гомберга було таким: «It is my intention to extend this study to other oxygen compounds, as well as to nitrogen derivatives, and I beg to reserve this field for further work» («Я маю намір поширити це дослідження на інші сполуки кисню, а також на похідні нітрогену, і я прошу залишити цю область для подальшої роботи»). У виданій у 1999 р. «Книзі рекордів в хімії» таку заяву було названо «найкращою кінцівкою статті з хімії».

Відкриття Гомберга зустріло скептичне ставлення хіміків-органіків. Однак у подальшому нові факти переконливо довели існування вільних радикалів не тільки як активних проміжних продуктів багатьох хімічних реакцій, але і як стабільних сполук. Гомберга перевіряли безліч разів, але на цей раз помилки не відбулося – це був дійсно вільний радикал. Докази вченого були визнані переконливими, і трифенілметильний радикал отримав назву радикала Гомберга. Так хіміки нарешті отримали радикал не у зв'язаному, а у вільному стані – перший хімічно стабільний вільний радикал [8, 9]. З імені Мозеса Гомберга починається справжня хімія вільних радикалів.

1.2. Властивості трифенілметильного радикала

Хоча відкриття трифенілметильного радикала відбулося не внаслідок цілеспрямованих досліджень, а як несподіваний експериментальний результат (це дуже часто буває у природничих науках), значення робіт Гомберга важко переоцінити в хімії вільних радикалів і взагалі в органічній хімії. Трифенілметильний радикал є типовим вільним радикалом і, як з'ясувалось пізніше, його хімічні властивості характерні для багатьох радикалів. Головне, Гомберг довів, що частинки, як-от вільні радикали, можуть взагалі існувати. Подальший перебіг подій показав, що вони є «хімічною нормою» і аж ніяк не рідкістю.

Сьогодні встановлено, що на повітрі трифенілметильний радикал швидко окиснюється до пероксильного з подальшим утворенням пероксиду (3), і колір розчину змінюється від жовтого до безбарвного. Аналогічно радикал реагує з йодом до трифенілметилйодиду (4):



Історія відкриття радикала Гомберга мала цікаве продовження. Отримані ним результати та їх трактування були досить переконливими, ніхто не сумнівався і в тому, що внаслідок димеризації трифенілметильних радикалів утворюється гексафенілетан. Однак багато років потому, у 1968 р. [10], було доведено, що два радикали Гомберга взаємодіють один з одним зовсім не так, як думали хіміки протягом більш як пів століття. Виявилось, що один із трифенілметильних радикалів приєднується до іншого в *n*-положенні фенільного кільця (структура «голова до хвоста»), далеко від «тривалентного» атома Карбону. Під час цього утворюється молекула димеру, в якій одне з шести бензольних кілець має хіноїдну структуру, що представлена на рис. 1:

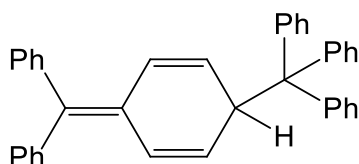


Рис. 1. Продукт димеризації трифенілметильного радикала

Саме таку хіноїдну структуру димеру ще у 1904 р. запропонував німецький хімік Пауль Якобсон. Він вважав (як виявилось, абсолютно справедливо), що два трифенілметильні радикали просто не можуть підійти один до одного так, як думав Гомберг, оскільки цьому заважають три фенільні групи, розташовані навколо центрального С-атома. Подальші дослідження показали, що бензольні кільця в трифенілметильних радикалах розташовані не в одній площині, а повернені під кутом у кілька десятків градусів, утворюючи своєрідний «пропелер» через взаємодію атомів Гідрогену в *o*-положеннях фенільних замісників (рис. 2). Зрозуміло, що шість «лопастей» двох таких «пропелерів» не дають підійти до радикального центра впритул, щоб утворити молекулу гексафенілетану. Тому

реакція відбувається іншим шляхом, як припустив Якобсон. Але тоді на запропоновану ним дивну формулу продукту реакції ніхто не звернув уваги. Згодом його гіпотезу було підтверджено у 1967 р., коли були опубліковані дані протонного ЯМР [1].

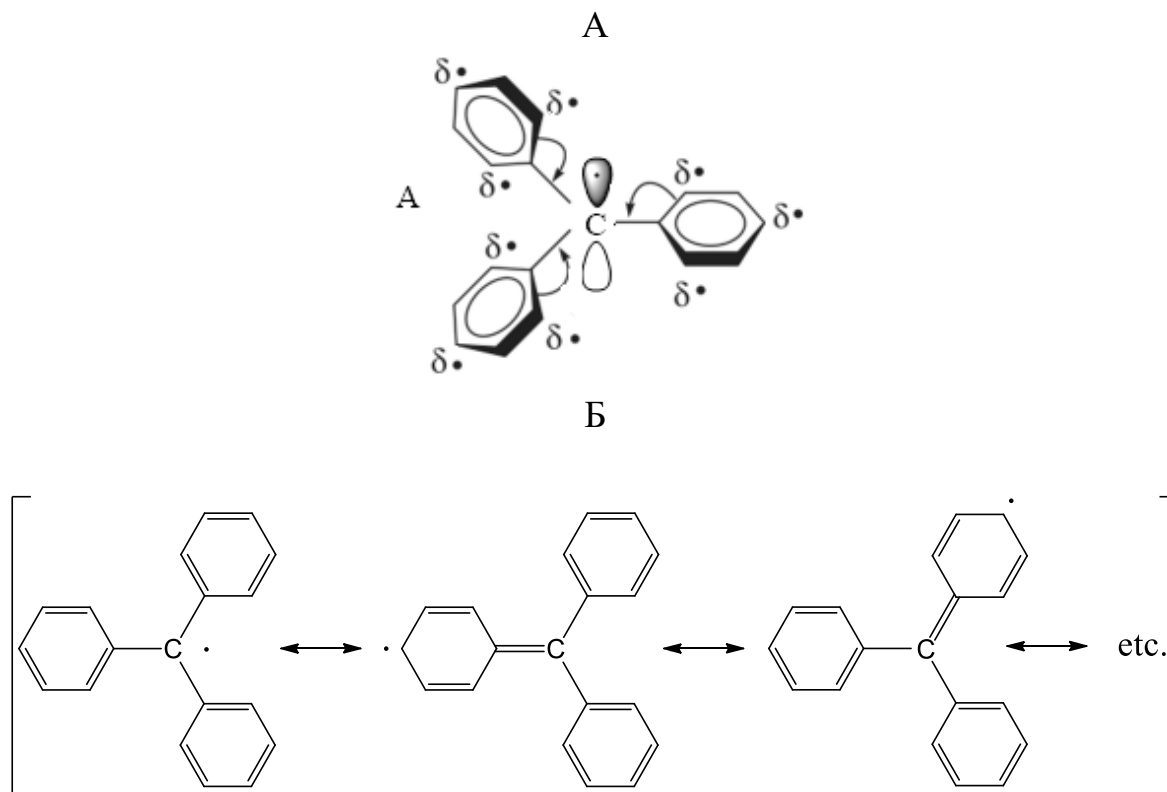


Рис. 2. Просторова структура (А) і резонансні структури (Б) трифенілметильного радикала

Отже, стабільність радикала Гомберга насамперед обумовлена стеричними перешкодами і екрануванням реакційного центра. Другою причиною, яка сприяє високій стабільності радикала, є делокалізація спінової густини. Пояснення механізму делокалізації є такими. У трифенілметані та трифенілхлорметані центральний С-атом знаходиться в sp^3 -гібридному стані і відповідно до цього має тетраедричну конфігурацію. З цієї причини фенільні кільця розташовані не в одній площині і не кон'юговані. Під час переходу до трифенілметилрадикала центральний С-атом перебудовується в sp^2 -гібридний стан, внаслідок чого структура стає більш плоскою (118°) [12]. Бензольні кільця нахилені один до одного під кутом $30\text{--}40^\circ$, довжина зв'язків між центральним С-атомом та бензольними кільцями становить $1,48\text{ \AA}$, що менше, ніж у трифенілметані ($1,53\text{ \AA}$). Це свідчить про те, що взаємодія між неспареним електроном та π -системами бензольних кілець посилюється. Неспарений електрон делокалізований по всій ароматичній системі, що підтверджується ЕПР-спектром радикала.

1.3. Відкриття аліфатичних радикалів

Відкриття Гомберга та його подальші роботи довели існування стабілізованих арилметилрадикалів, але серед хіміків все ще існував скептицизм щодо існування простих аліфатичних радикалів, як-от метил та етил. Більшість вільних радикалів, наприклад, атоми Гідрогену і галогенів, алкільні радикали, мають занадто високу реакційну здатність, тому за звичайних умов вони «живуть» лише частки секунди як активні проміжні частинки у деяких реакціях. Виникає питання, чи можна у такому випадку вивчити ці активні частинки, або хоча б довести їх наявність і виміряти час життя?

Переконливий доказ існування вільних алкільних (метильних) радикалів було отримано Ф. Панетом і його учнем В. Хофдіцем у дослідях із термолізу тетраметилсвинцю через 30 років після відкриття трифенілметильного радикала [13]. Учені пропускали через кварцову термостійку трубку газ азот, насичений парами тетраметилсвинцю. У тому місці, де трубка нагрівалася пальником, спостерігалося утворення металевого свинцевого дзеркала, а на виході в потоці азоту було виявлено етан. Коли пальник пересували назустріч потокові газу, то в місці нагрівання трубки з'являлося нове дзеркало, а старе поступово зникало (рис. 3).

Усі ці явища пояснюються термолізом $\text{Pb}(\text{CH}_3)_4$ і утворенням вільних метильних радикалів (5):



Реагуючи із свинцевим дзеркалом, метильні радикали «змивають» його з утворенням вихідного тетраметилсвинцю (6) або рекомбінують один з одним (7):

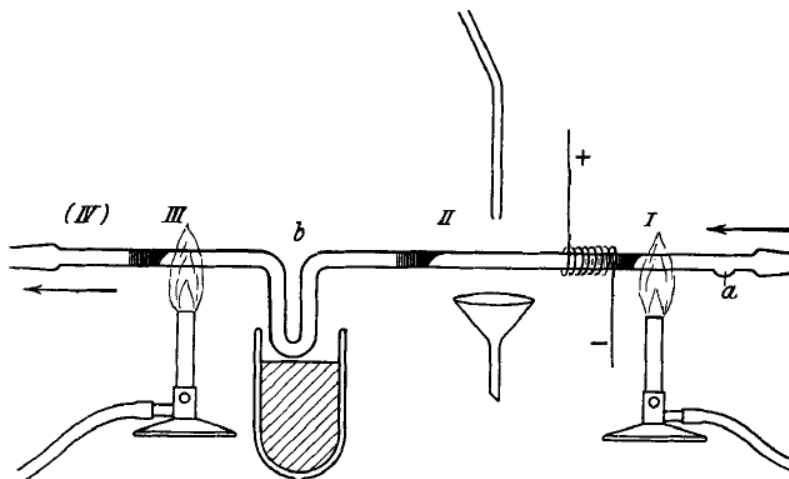


Рис. 3. Установка Панета для виявлення метильних радикалів [13]

Отже, Ф. Панету вдалося зафіксувати дуже високореактивний метильний радикал і, використовуючи швидкість потоку газу, розрахувати час життя радикала в умовах експерименту.

1.4. Радикал Кельша

У другій половині ХХ ст. було синтезовано велику кількість стабільних вільних радикалів, зокрема і з неспареним електроном на атомах Нітрогену (амінільні радикали) або Оксигену N-О фрагмента (аміноксильні радикали). Але ще у 1932 р. до редакції того самого журналу (The Journal of American Chemical Society), в якому була опублікована піонерська робота Гомберга, надійшла стаття німецького хіміка С. Кельша, в якій був описаний синтез ще одного стабільного радикала – похідного флуорену (рис. 4). Незвичайним було те, що цей радикал залишався стабільним навіть у присутності кисню. Усі відомі на той час вільні радикали практично миттєво реагували з молекулярним киснем. Внаслідок негативного відгуку рецензента статтю відхилили. У 1955 р. Кельш згадав про свою невдачу і вирішив перевірити ще раз, чи є речовина, синтезована багато років тому, дійсно стабільним вільним радикалом. Тепер для цього був прямий метод для виявлення неспарених електронів – електронний парамагнітний резонанс (ЕПР). Кельш переконався у тому, що речовина дійсно є вільним радикалом, причому дуже стабільним – адже він пролежав у незмінному стані 23 роки! У автора збереглася не тільки речовина, але і відхилена стаття. Недовго думаючи, він послав її в первісному варіанті до редакції того ж журналу, і на цей раз стаття була опублікована – вона побачила світ у 1957 р. [4]. У примітках до статті Кельш написав: «Зразок, що зберігається на повітрі 23 роки, не змінився за зовнішнім виглядом і показує високий вміст вільних радикалів. Оскільки спочатку запропонована структура підтверджується, бажано опублікувати роботу зараз».

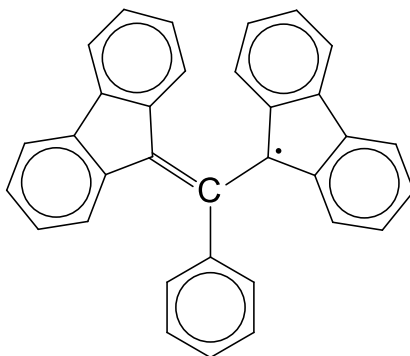


Рис. 4. Структура радикала Кельша

Висока стабільність радикала Кельша (α,γ -бідифенілен- β -фенілалілійний радикал), порівняно з трифенілметильним радикалом, пояснюється більш високим ступенем делокалізації неспареного електрона, а також більшими стеричними перешкодами внаслідок присутності об'ємних флуоренових груп, порівняно з бензолними кільцями. Радикал Кельша називають історично унікальним, оскільки це був перший С-центрований радикал, інертний до кисню. Сьогодні інтерес до цього радикала дуже високий через його специфічні фізико-хімічні властивості: він може розглядатися як графен з відкритою оболонкою. У 2018 р. Ікеда зі співавторами показали [15], що радикали Кельша можна використовувати як основні функціональні матеріали у високооборотних окисно-відновних системах, як-от вторинна батарея (рис. 5). Завдяки низькому окисно-відновному потенціалу такі радикали можуть виконувати роль органічних напівпровідників у майбутньому.

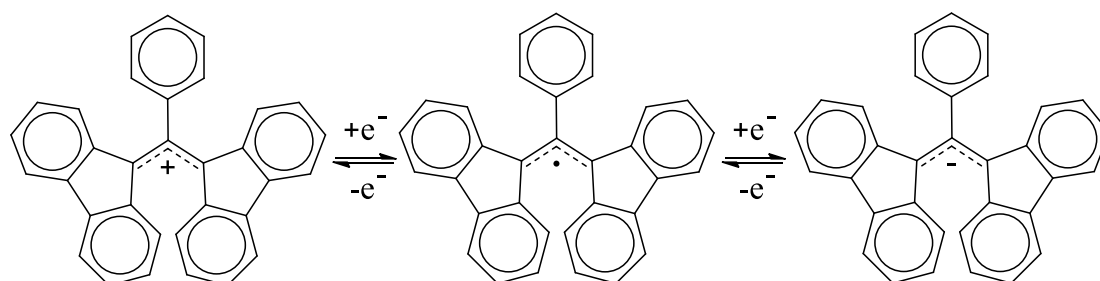


Рис. 5. Окисно-відновні перетворення радикала Кельша [15]

Із часу відкриття трифенілметильного «вільного» радикала минуло більше ніж 120 років. На жаль, автори перших робіт з радикальної хімії не удостоєні Нобелівських премій, хоча М. Гомберг неодноразово номінувався. Справжнє значення перших досліджень на той час не могло бути повністю оцінено, але пізніші численні досягнення з хімії вільних радикалів, побудовані на цих відкриттях, досягли вищої відзнаки серед науковців. Це означає, що історія хімії радикалів триває, і нові досягнення ще попереду.

1.5. Класифікація радикалів

Радикали можна класифікувати за хімічною структурою або за фізико-хімічними властивостями:

1. Залежно від атома, на якому розташований неспарений електрон, радикали поділяють на С-, О-, S-, N-центровані:

а) С-центровані: R• алкільні (CH_3^\bullet , $\text{C}_2\text{H}_5^\bullet$, $\text{C}_6\text{H}_5^\bullet$; радикал Гомберга, радикал Кельша), фенільний;

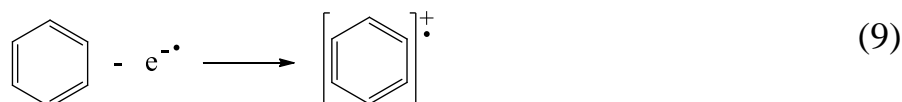
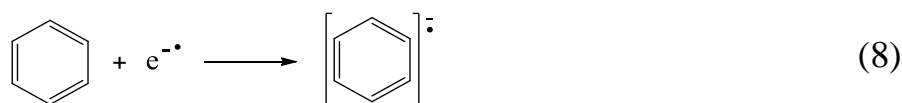
б) O-центровані: гідрокси- (HO^\bullet), алкокси- (RO^\bullet), перокси- (ROO^\bullet), аміноксильні ($\text{R}_2\text{NO}^\bullet$);

в) N-центровані: амінільні ($\text{R}_2\text{N}^\bullet$);

г) S-центровані: тіільні (RS^\bullet).

2. За електронною структурою радикали умовно поділяють на дві групи – π - і σ -радикали. У переважній більшості органічних радикалів неспарений електрон розташований на орбіталі, перпендикулярній до молекулярного каркасу. Такі види класифікуються як π -радикали. Радикали з неспареним електроном на орбіталі, що лежить у площині молекулярного каркасу, класифікуються як σ -радикали [6]. У перших неспарений електрон локалізований переважно на $2p$ - або π -орбіталі. Приклади: етильний $\text{CH}_3\text{C}^\bullet\text{H}_2$, бензильний $\text{C}_6\text{H}_5\text{C}^\bullet\text{H}_2$, алільний $\text{CH}_2=\text{CHC}^\bullet\text{H}_2$, аміноксильний $>\text{NO}^\bullet$ радикали. У σ -радикалах неспарений електрон розташований на σ -орбіталі і зберігає електронну конфігурацію вихідної молекули. Таку будову мають фенільний $\text{C}_6\text{H}_5^\bullet$, вінільний $\text{CH}_2=\text{CH}^\bullet$, формільний $\text{HC}^\bullet=\text{O}$, іміноксильний $>\text{C}=\text{NO}^\bullet$ радикали.

3. Радикали бувають нейтральні і заряджені – іон-радикали. Іон-радикали – це частинки, які мають одночасно неспарений електрон (спін) і заряд. Важливо чітко усвідомлювати, що сам електрон є аніон-радикалом $e^{-\bullet}$, тобто частинкою, яка одночасно несе на собі і елементарний від'ємний заряд, і елементарний спін ($\frac{1}{2}\hbar$). Саме тому органічні іон-радикали зазвичай утворюються внаслідок поширених реакцій одноелектронного переносу. Одноелектронне окиснення нейтральних молекул приводить до утворення катіон-радикалів, а відновлення – аніон-радикалів. Бензол та багатоядерні ароматичні вуглеводні (нафталін, антрацен, фенантрен) здатні досить легко утворювати як аніон-радикали, так і катіон-радикали за реакціями (8) і (9) відповідно:

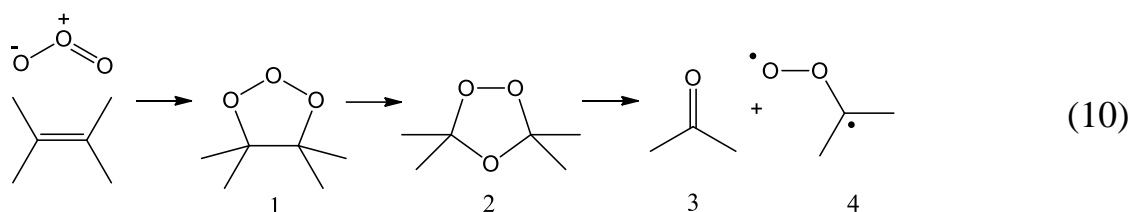


Іон-радикали мають ширший спектр властивостей, ніж радикали або іони. Як радикали вони можуть вступати в реакції димеризації, рекомбінації і диспропорціонування; як заряджені частинки іон-радикали взаємодіють із протилежно зарядженими іонами або розкладаються на іон і радикал.

4. Залежно від кількості неспарених електронів радикали поділяють на моно-, бі- та полірадикали.

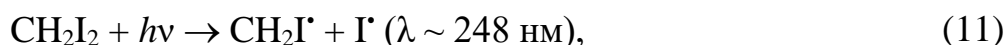
Окрім радикалів з одним реакційним центром, існує велика група радикалів з двома або більше неспареними електронами, наприклад, молекула кисню є бірадикалом через наявність на p^* -розпушуючій молекулярній орбіталі в основному електронному стані двох неспарених електронів з паралельними спінами.

Цікавим прикладом бірадикалів є інтермедіати Кріге, які були вперше описані Р. Кріге та Г. Веннером у 1949 р. [17]. Бірадикали Кріге генеруються в основному шляхом взаємодії озону O_3 з алкенами через утворення первинного циклічного озоніду **1**, який швидко перебудовується у вторинний озонід **2** з подальшим розпадом до карбонілу **3** та бірадикала **4** (10):



Озоноліз є основним механізмом тропосферного видалення ненасичених вуглеводнів, тому дослідження реакції (10) дуже важливі для розуміння радикальних процесів, що відбуваються в атмосфері.

Радикали Кріге мають два неспарені електрони і демонструють дуже високу реакційну здатність. Швидкості утворення радикалів надзвичайно високі, а їх стаціонарна концентрація дуже низька, тому зрозуміло, що довести існування таких інтермедіатів на той час (1949 р.) було неможливо – для цього знадобилося 63 роки. Тільки у 2012 р. група британських і американських дослідників довели існування інтермедіатів Кріге [18], але, як не дивно, не в реакції озонолізу. Науковці провели реакцію метиленйодиду CH_2I_2 з киснем. Реакцію проводили під тиском 4 мм рт. ст. в умовах надлишку кисню, суміш опромінювали світлом з довжиною хвилі 248 нм. Продукти взаємодії аналізували за допомогою фотоіонізаційної мас-спектрометрії. Під дією світла утворюється атомарний йод (I^\bullet) і дуже активний радикал CH_2I^\bullet , який ініціює реакцію з киснем. Внаслідок проведеного дослідження були отримані спектри найпростішого з інтермедіатів Кріге, а саме $\bullet CH_2OO^\bullet$ (11)–(12):



Інтермедіат Кріге має ще два ізомери, які були виявлені в реакційній суміші. Автори дослідження також визначили константи швидкості реакцій інтермедіата

Кріге з водою і монооксидом нітрогену NO, оскільки саме від цих реакцій залежить вплив інтермедіата Кріге на кліматичні процеси.

Інтермедіат Кріге – це дуже сильний окисник. Вчені покладають велику надію на цей радикал у процесах знешкодження промислових викидів та боротьбі з глобальним потеплінням. Він активно окиснює оксиди нітрогену, діоксид сульфуру SO₂, концентрація якого в атмосфері міст доходить до 1,0 мг/м³, а також оцтову CH₃COOH і мурашину HCOOH кислоти (за нормальних умов це рідини, а за низького тиску вони існують у вигляді газу або аерозолу). Ці реакції дуже суттєво впливають на атмосферні процеси, оскільки окиснення органічних та неорганічних сполук за участі інтермедіата Кріге приводять до результатів, протилежних парниковому ефекту. Справа в тому, що продукти окиснення утворюють аерозолі, які частково поглинають сонячне світло, і відповідно менша його кількість доходить до поверхні землі.

Звідки взагалі беруться ці інтермедіати Кріге в атмосфері? Промислові викиди містять ненасичені вуглеводні, які реагують з озоном. З одного боку, навряд чи в атмосфері дуже багато ненасичених сполук, а з іншого – оскільки вчені стверджують, що інтермедіати утворюються швидко і вони надзвичайно активні, – можливо, для значущого ефекту з охолодження планети їх багато і не треба.

Але наявність двох неспарених електронів не завжди свідчить про високу реакційну здатність і нестабільність радикалів. Наприклад, радикал Блаттера (рис. 6), який має два неспарені електрони, можна кип'ятити у хлорбензолі (т. к. 131 °С) без розкладання або нагрівати у твердій фазі до 270 °С. Були синтезовані численні похідні радикала Блаттера, і вивчені їх цікаві магнітні властивості [19].

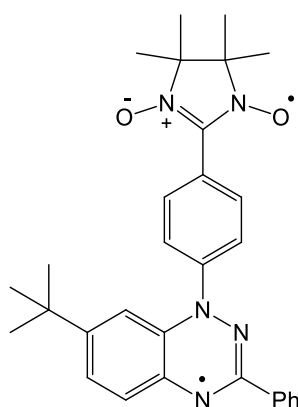


Рис. 6. Структура бірадикала Блаттера

Значний прогрес у синтезі стабільних радикалів дав змогу створювати високоспінові радикали, які мають декілька неспарених електронів, проявляють унікальні фізико-хімічні властивості та мають високий потенціал застосування

в різних галузях, як-от спітроніка, органічний магнетизм, МРТ-контрастні агенти [20].

5. Радикали поділяють також на стабільні і нестабільні, або активні (довгоживучі і короткоживучі). Такий поділ дуже умовний. Активність – поняття кінетичне, мається на увазі швидкість протікання хімічних реакцій з іншими сполуками і визначається насамперед екрануванням радикального центра, тобто стеричними перешкодами. Стабільність – термодинамічний термін, що характеризує рівноважний стан системи і визначається ступенем перекривання напівзайнятої електронної орбіталі з іншими молекулярними орбіталями і властивостями вищої зайнятої молекулярної орбіталі, тобто делокалізацією неспареного електрона. Ці два фактори визначають стабільність у нормальних умовах багатьох вільних радикалів, як було описано вище на прикладах радикалів Гомберга і Кельша.

Як класичний приклад стабільного радикала можна навести фенокиський радикал з трьома об'ємними замісниками (рис. 7) (наприклад, *трет*-бутильними) в *о*- та *п*-положеннях. Такий радикал має три резонансні структури:

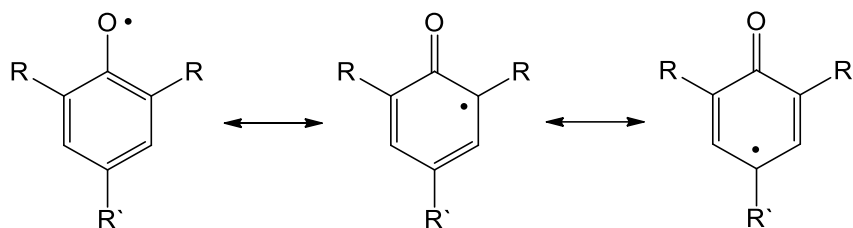


Рис. 7. Резонансні структури тризаміщеного фенокиського радикала

На рис. 8 наведені структури відомих радикалів, стабільність яких обумовлена стеричними перешкодами і розподілом спінової густини:

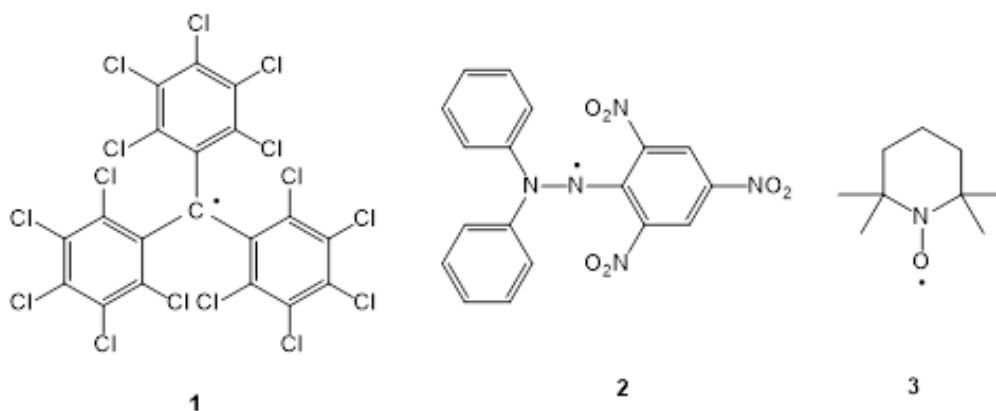


Рис. 8. Структури стабільних радикалів:

1 – перхлортрифенілметильний радикал; 2 – *N,N*-дифеніл-*N*-пікрілгідразильний радикал (ДФПГ);
3 – 2,2',6,6'-тетраметилпіперидин-*N*-окиський радикал (ТЕМПО)

Перхлортрифенілметильний радикал **1** є хлорованим похідним радикала Гомберга і проявляє дуже високу стабільність через повне екранування центрального Карбону шістьма атомами Хлору. Радикал **1** не здатний до димеризації через стеричні перешкоди, він є неактивним відносно кисню та не розкладається у твердому стані під час нагрівання до 300 °С. Радикали **2** та **3** дуже стабільні за умов навколишнього середовища. Радикал **2** зазвичай використовується як ЕПР еталонна сполука [21], а також для вимірювання загальної антиоксидантної ємності органічних сполук [22]. Фізико-хімічні властивості радикала **3** дають змогу застосовувати його як спінову мітку в ЕПР дослідженнях, як інгібітор у процесах полімеризації.

1.6. Генерування радикалів

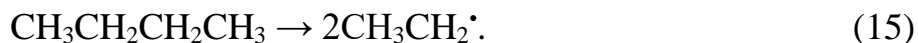
Розрив ковалентних хімічних зв'язків може відбуватися двома способами – шляхом гетеролізу і гомолізу. У результаті гетеролітичного розриву один з атомів несе від'ємний заряд після розщеплення зв'язку, оскільки має обидва електрони, що були залучені під час його утворення. Інший атом взагалі не має електронів на зв'язуючій орбіталі і є позитивно зарядженим (13):



Під час гомолітичного розриву зв'язків кожен атом зберігає свій електрон, внаслідок чого утворюються вільні радикали (14):



Джерелом радикалів можуть бути різні органічні сполуки. Наприклад, крекінг бутану починається з розпаду його молекул на вільні радикали (15):



Оскільки С-С-зв'язок міцний, то такий розпад йде з дуже низькими швидкостями. Якщо у вихідних реагентах радикали виникають повільно, то вводять ініціатори – молекули, які порівняно швидко розпадаються на вільні радикали.

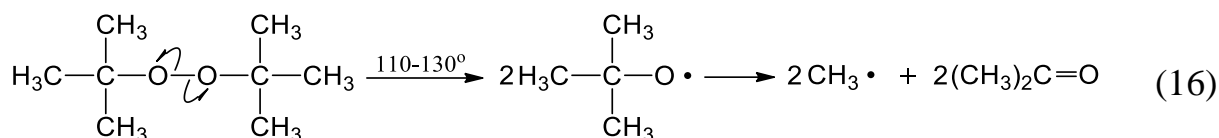
Ініціатори вільно-радикальних реакцій – сполуки, які достатньо легко розпадаються на радикали в умовах експерименту або технологічного процесу. Найбільш розповсюдженими ініціаторами радикальних процесів є органічні сполуки, які мають у своїй структурі слабкі зв'язки, як-от N-C, O-O, N-O та ін. Наприклад, органічні пероксиди з лабільним O-O зв'язком, а також азосполуки

R–N=N–R, що розкладаються з синхронним розривом C–N зв'язків і утворенням C-центрованих радикалів.

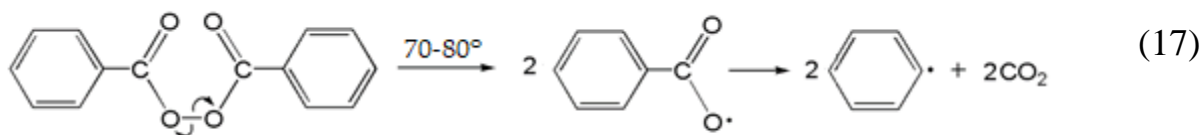
Генерування радикалів може відбуватись у наступних процесах:

1. Термоліз і фотоліз ініціаторів

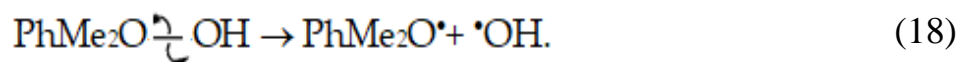
Термічний або фотохімічний розклад пероксидів приводить до появи двох алкоксирадикалів (у разі діалкільних пероксидів) (16) і двох ацилоксирадикалів (у разі діацильних пероксидів), які можуть потім декарбоксилувати до ацильних радикалів (17). Під час розпаду пероксидів виходить радикалів зазвичай досить високі, але діацилпероксиди нестабільні і вибухонебезпечні, їх важко зберігати та транспортувати. Як приклад наведено реакцію (16) розпаду діалкілпероксиду $(\text{CH}_3)_3\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$ (дитрет-бутилпероксид), що розпадається по O–O зв'язку з утворенням двох трет-бутоксильних радикалів з подальшою фрагментацією за C–C зв'язком до метильних радикалів та молекули ацетону:



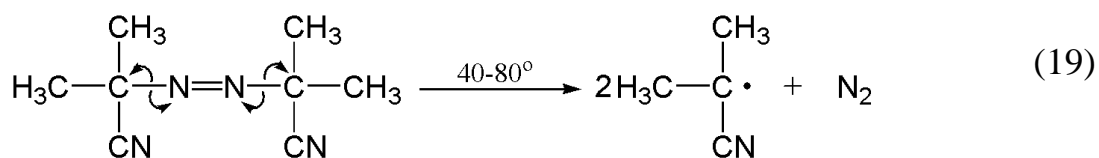
У процесах радикальної полімеризації широко використовується дибензоїлпероксид $\text{C}_6\text{H}_5\text{C}(\text{O})\text{OOC}(\text{O})\text{C}_6\text{H}_5$, що належить до діацильних пероксидів. Під час розпаду пероксиду утворюється бензоїлоксирадикал, який далі декарбоксилує до фенільних радикалів (17):



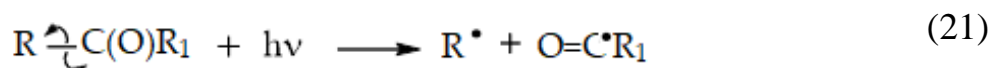
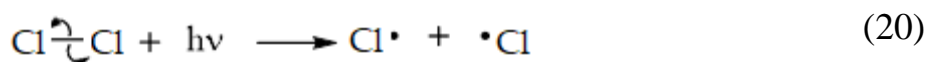
Ефективними ініціаторами також є перестери, наприклад, трет-бутилбензоїлперестер $(\text{CH}_3)_3\text{COOC}(\text{O})\text{Ph}$ та гідроперокси, наприклад, кумілгідропероксид PhMe_2COOH (18):



Під час термолізу і фотолізу азосполук, окрім C-центрованих радикалів, утворюються молекули азоту, що спрощує контроль за реакцією. Водночас азосполуки є одними з найбільш надійних і зручних джерел радикалів через їх стабільність. Для ініціювання радикальних процесів часто використовують азодіізобутиронітрил $(\text{CH}_3)_2(\text{CN})\text{CN}=\text{NC}(\text{CN})(\text{CH}_3)_2$ (19):



За механізмом фотолізу з утворенням радикалів відбувається також гомолітичний розрив зв'язків у молекулах галогенів (20) та кетонів (21):

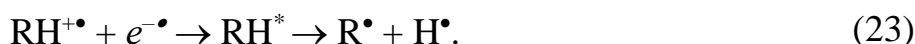


2. Радіаційно-хімічне ініціювання

Під впливом радіації на молекули (рентгенівські промені, прискорені електрони, протони, нейтрони) відбувається складний каскад фізичних перетворень сполук. Фотон високої енергії, стикаючись з молекулою, викликає її іонізацію (22):



Позитивно заряджений катіон-радикал рекомбінує з електроном і утворює електронно-збуджену молекулу, яка розпадається на вільні радикали за реакцією (23):



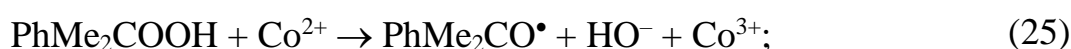
3. Окисно-відновне ініціювання

Радикали утворюються в окисно-відновних реакціях як у хімічних, так і в біологічних системах за участі прооксидантів, як-от метали змінної валентності (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cr^{2+} та ін.). Приклади таких реакцій наведені нижче:

а) розпад гідроген пероксиду на радикали, каталізований іонами Феруму (II) (реакція Фентона) (24):

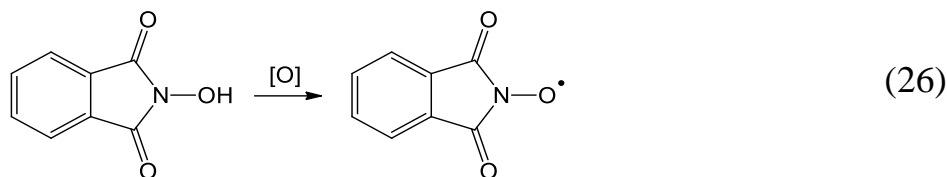


б) розпад гідропероксидів під дією солей металів змінної валентності (25):



в) окиснення гідроксиламінів неорганічними ($\text{Pb}(\text{OAc})_2$, $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$), органічними ($\text{PhJ}(\text{OAc})_2$) окисниками або ферментами з утворенням нітроксильних

радикалів. Наприклад, *N*-гідроксифталімід легко утворює нітроксильні радикали (26):



1.7. Реакції за участі вільних радикалів

Атоми і вільні радикали як реагенти суттєво відрізняються від молекул із закритою оболонкою:

- Радикали мають високий запас хімічної енергії, тому багато реакцій за їх участі є екзотермічними або термонеїтральними, водночас аналогічні реакції за участі лише молекул часто ендотермічні.

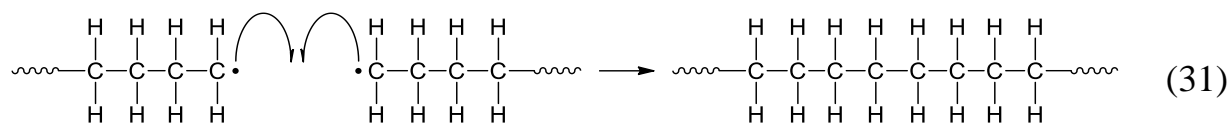
- Наявність у вільного радикала напівзайнятої орбіталі знімає з радикальних реакцій квантово-хімічні заборони, що впливають з принципу збереження симетрії молекулярних орбіталей, справедливі для багатьох молекулярних реакцій.

- В усіх реакціях за участі одного атома або радикала вільна валентність не зникає, а зберігається. Цей принцип *збереження вільної валентності* у реакціях, де атом або монорадикал перетворюється мономолекулярно або реагує з валентнонасиченими (які мають парну кількість електронів) молекулами, є природним наслідком збереження кількості електронів під час перетворення реагентів на продукти.

Найбільш розповсюджені реакції за участі радикалів наведені нижче:

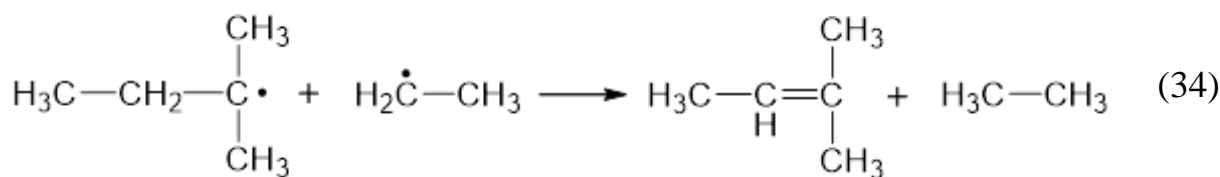
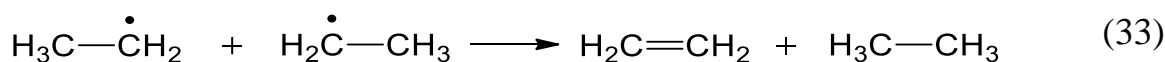
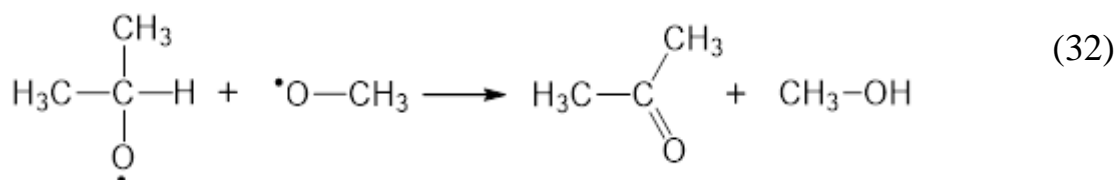
1. Реакції рекомбінації – взаємодія один з одним або з іншими радикалами. По суті, це процес, зворотний до розриву хімічного зв'язку. Під час рекомбінації утворюється ковалентний зв'язок за рахунок неспарених електронів, як це показано в реакціях (27)–(31):





Обрив ланцюгів у процесах радикальної полімеризації та процесах автоокиснення відбувається в основному саме внаслідок реакцій рекомбінації радикалів.

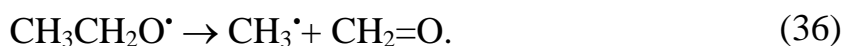
2. Реакція між двома вільними радикалами, яка полягає в перенесенні атома (зазвичай Гідрогену) з одного радикала до іншого, внаслідок чого утворюється дві молекули (32)–(34):



3. Мономолекулярний розпад радикалів. До цього типу реакцій належить фрагментація – розпад радикала на молекулу і радикал з меншою молекулярною масою. Якщо фрагментація можлива за кількома напрямками, реалізується переважно такий, що приводить до більш стабільного радикала. Типовим прикладом є реакції розпаду кисневмісних радикалів, зокрема декарбоксілювання ацилоксирадикалів (35):

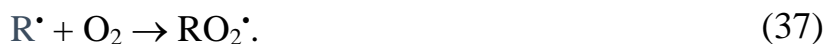


Розпад алкоксильного радикала з утворенням алкільних радикалів (36):



4. Реакції вільних радикалів з молекулами. Бімолекулярні реакції за участі радикалів є складниками важливих процесів хлорування, бромовання, сульфохлорування алканів, автоокиснення, полімеризація та ін., що перебігають за ланцюговим механізмом.

А. Взаємодія з киснем. Внаслідок реакції алкільні радикали перетворюються на пероксильні (37):



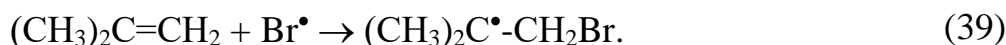
Це дуже швидкі дифузійно-контрольовані реакції (10^8 – 10^9 $M^{-1} \times s^{-1}$), які відбуваються в процесах автоокиснення органічних сполук молекулярним киснем.

Б. Реакція відриву атома Гідрогену, або реакція переносу атома Гідрогену (hydrogen abstraction transfer) (НАТ) (38):



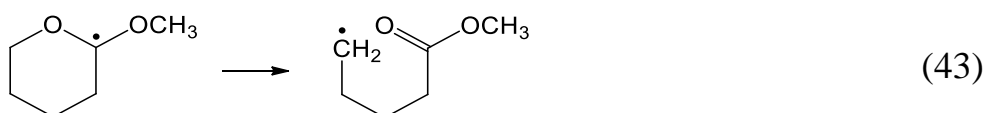
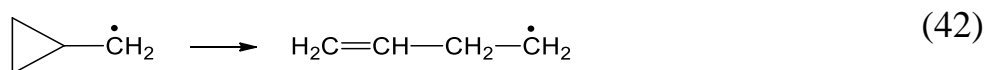
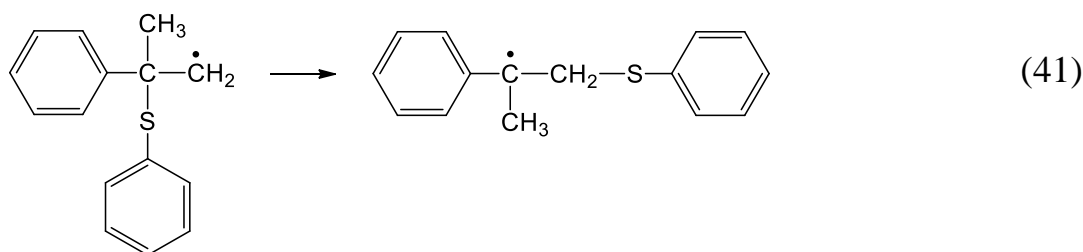
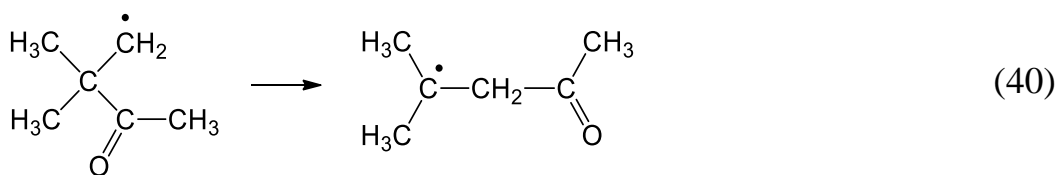
Реакції НАТ відіграють важливу роль у різних хімічних і біологічних процесах. Такі реакції лежать в основі процесу катаболізму в живих клітинах, механізму дії природних і синтетичних антиоксидантів, що запобігають радикальному пошкодженню біомолекул і полімерів, деградації органічних сполук в атмосфері, а також є ключовими в процесах синтезу цінних оксигеновмісних сполук – альдегідів, кетонів, карбонових кислот.

В. Реакції приєднання за подвійним зв'язком (39):



Вільні радикали легко приєднуються до алкенів з утворенням нових радикалів. Далі відбувається послідовне приєднання інших молекул алкену як стадія продовження ланцюгів під час радикальної полімеризації.

1. Реакції ізомеризації, які приводять до перебудови радикалів (40)–(43):



Наведені вище приклади реакцій за участі радикалів зазвичай є окремими стадіями складних і різноманітних радикальних процесів. Дослідження в області хімії вільних радикалів впродовж більше ніж століття показали, що радикали беруть участь у дуже багатьох перетвореннях від великотоннажного і тонкого органічного синтезу до метаболічних процесів у клітинах, що лежать в основі дихання рослин і тварин, трансформації лікарських препаратів, боротьби з чужорідними клітинами всередині організму тощо. Сьогодні можна стверджувати, що вільні радикали займають найважливіше місце в життєво необхідних внутрішньоклітинних процесах. У наступних главах буде розглянуто, як радикали утворюються в живих організмах, як вони можуть здійснювати ті чи інші функції регуляції багатьох окисно-відновних процесів у клітині. До того ж буде приділено увагу ключовим компонентам антиоксидантної системи клітини, а також представлено найбільш розповсюджені методи вивчення вільних радикалів у біологічних системах.

Контрольні питання для самоперевірки знань:

1. Що таке радикали?
2. Який радикал був вперше виділений і доведено його структуру?
3. Наведіть реакції за участі радикала Гомберга.
4. Поясніть, які властивості радикалів обумовлюють їх стабільність.
5. Структура і властивості радикала Кельша.
6. Класифікація радикалів.
7. Генерування радикалів, ініціатори вільно-радикальних реакцій.
8. Наведіть основні типи реакцій за участі радикалів.

Література

1. Lavoisier L. *Traité Élémentaire de Chimie*, Cuchet. *Volume*. 1789. Vol. 1. P. 293 [English Translation by R. Kerr. *Elements of Chemistry*. 1790. R. Kerr. *Elements of Chemistry* / reprinted by Dover Press, New York. 1965. P. 66].
2. Davy H. XIV. The Bakerian Lecture. On some of the combinations of oxymuriatic gas and oxygene, and on the chemical relations of these principles, to inflammable bodies. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. 1811. № 101. P. 1–35. DOI: 10.1098/rstl.1811.0001.
3. Wohler F. Untersuchungen uber das Radikal der Benzoesaure. *Ann*. 1832. Vol. 3. P. 249–287.
4. Von Frankland E. Ueber die Isolirung der organischen Radicale. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*. 1849. Vol. 71, № 2. P. 171–213. DOI: 10.1002/jlac.18490710205.

5. Kolbe H. Untersuchungen über die Elektrolyse organischer Verbindungen. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*. 1849. Vol. 69, № 3. P. 257–294.
6. Bailar Jr. Moses Gomberg. *Biographical Memoirs of the National Academy of Science*. 1970. Vol. 41. P. 141.
7. Gomberg M. An instance of trivalent carbon: Triphenylmethyl. *Journal of the American chemical Society*. 1900. Vol. 22, № 11. P. 757–771. DOI: 10.1021/ja02049a006.
8. Gomberg M. On trivalent carbon. *Journal of the American Chemical Society*. 1901. Vol. 23, № 7. P. 496–502. DOI: 10.1016/S0040-4039(00)75598-5.
9. Gomberg M. On trivalent carbon. *Journal of the American Chemical Society*. 1902. Vol. 24, № 7. P. 597–628. DOI: 10.1021/ja02021a001.
10. Lankamp H., Nauta W. T., MacLean C. A new interpretation of the monomer-dimer equilibrium of triphenylmethyl- and alkylsubstituted-diphenyl methyl-radicals in solution. *Tetrahedron Letters*. 1968. Vol. 9, № 2. P. 249–254. DOI: 10.1016/S0040-4039(00)75598-5.
11. Mohos B., Tüdös F., Jókay L. ESR investigation of the triphenylmethyl radical. *Physics Letters A*. 1967. Vol. 24, № 6. P. 310–312. DOI: 10.1016/0375-9601(67)90597-X.
12. Ballester M. Inert carbon free radicals. *Pure and Applied Chemistry*. 1967. Vol. 15, № 1. P. 123–152. DOI: 10.1002/cber.19290620537.
13. Paneth F., Hofeditz W. Über die Darstellung von freiem Methyl. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)*. 1929. Vol. 62, № 5. P. 1335–1347.
14. Koelsch C. F. Syntheses with triarylvinylmagnesium bromides. α,γ -Bisdiphenylene- β -phenylallyl, a stable free radical. *Journal of the American Chemical Society*. 1957. Vol. 79, № 16. P. 4439–4441. DOI: 10.1021/ja01573a053.
15. Matsui Y. et al. Spectroscopic and electrical characterization of α,γ -bisdiphenylene- β -phenylallyl radical as an organic semiconductor. *Research on Chemical Intermediates*. 2018. Vol. 44, № 8. P. 4765–4774. DOI: 10.1007/s11164-018-3282-7.
16. Ingold K. U. The Only stable organic sigma radicals: Di-tert-Alkyliminoxyls. *Stable Radicals: Fundamentals and Applied Aspects of Odd-Electron Compounds*. 2010. P. 231–244. DOI: 10.1002/9780470666975.ch6.
17. Criegee R., Wenner G. Die Ozonisierung des 9, 10-Oktalins. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*. 1949. Vol. 564, № 1. P. 9–15. <https://doi.org/10.1002/jlac.19495640103>.
18. Welz O., Savee J. D., Osborn D. L., Vasu S. S., Percival C. J., Shallcross D. E., Taatjes C. A. Direct kinetic measurements of Criegee intermediate (CH_2OO) formed by reaction of CH_2I with O_2 . *Science*. 2012. Vol. 335, № 6065. P. 204–207. DOI: 10.1126/science.1213229.
19. Gallagher N. M., Bauer J. J., Pink M., Rajca S., Rajca A. High-spin organic diradical with robust stability. *Journal of the American Chemical Society*. 2016. Vol. 138, № 30. P. 9377–9380. DOI: <https://doi.org/10.1021/jacs.6b05080>.
20. Gallagher N. M., Olankitwanit A., Rajca A. High-spin organic molecules. *The Journal of organic chemistry*. 2015. Vol. 80, № 3. P. 1291–1298. DOI: 10.1021/jo502505r.
21. Ionita P. The chemistry of DPPH· free radical and congeners. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. Vol. 22, № 4. P. 1545. DOI: 10.3390/ijms22041545.
22. Pyrzynska K., Pełkal A. Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples. *Analytical Methods*. 2013. Vol. 5, № 17. P. 4288–4295. DOI: 10.1039/C3AY40367J.

ГЛАВА 2

УТВОРЕННЯ АКТИВНИХ ФОРМ ОКСИГЕНУ В КЛІТИНАХ І ТКАНИНАХ. ОКСИДАТИВНИЙ СТРЕС

Молекулярний кисень в основному стані має два електрони з паралельними спінами на двох еквівалентних (вироджених) розпушуючих орбіталях (див. рис. 1). Кожен з двох неспарених електронів має спін $\frac{1}{2}$, а загальний спін S дорівнює 1, що робить кисень в основному стані триплетом $(2S+1) = 3$ (3O_2). Саме така природа кисню обумовлює його кінетичну інертність як двохелектронного окисника, про що свідчить наш повсякденний досвід: тривале збереження органічних речовин та існування самого життя на Землі, в атмосфері якої є досить висока концентрація O_2 (21 %). Але кисень може бути перетворений у більш реактивні форми за реакцією перенесення електронів або шляхом передачі енергії. У першому випадку відбувається послідовне відновлення кисню до супероксид аніон-радикала ($O_2^{\bullet-}$) і аніона (O_2^{2-}), тоді як під час отримання енергії, достатньої для обернення спіна, утворюються дві форми ($^1\Delta$ і $^1\Sigma$) синглетного кисню 1O_2 (рис. 1).

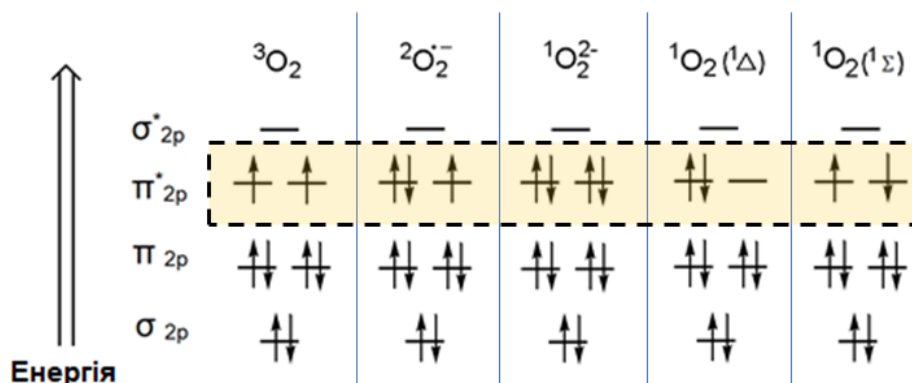


Рис. 1. Спін-орбітальна діаграма різних станів молекулярного кисню та інтермедіатів його відновлення

2.1. Генерація активних форм кисню в клітині

Термін «**активні форми кисню**» (**АФО**), або в англійській літературі «**reactive oxygen species**» (**ROS**), часто використовується в біохімічній і медичній літературі і означає сукупність короткоживучих і високореактивних форм кисню, що генеруються внаслідок його електронного збудження або окисно-відновних реакцій і здатних взаємно перетворюватись. АФО – це загальна назва для нестабільних і високореактивних речовин – супероксидного аніон-радикала ($O_2^{\bullet-}$), гідроксильного радикала (HO^{\bullet}), а також гідроген пероксиду (H_2O_2),

синглетного кисню $^1\text{O}_2$, озону O_3 . До списку АФО також відносять радикали ліпідів L^\bullet , LO^\bullet , LOO^\bullet , гідропероксиди ліпідів LOOH , оксид нітрогену $^\bullet\text{NO}$, гіпохлорну кислоту HOCl , пероксинітрит ONOO^- . АФО – це збірний термін, який включає радикали Оксигену і певних молекул-нерадикалів, але які надзвичайно легко перетворюються на радикали. З іншого боку, гіпохлорит часто відносять до активних форм Хлору. Пероксинітрит та оксид нітрогену називають активними формами нітрогену, інтермедіати ланцюгового окиснення ліпідів – алкільні радикали L^\bullet , алкоксильні LO^\bullet і пероксильні LOO^\bullet – за локалізацією, механізмом утворення та дії відносять до ліпідних радикалів. Це свідчить про те, що АФО різноманітні за хімічною структурою, механізмами та джерелами утворення, властивостями, фізіологічними функціями, механізмами дії на біологічні молекули [1]. Різниця в хімічній реакційній здатності АФО охоплює більш ніж 10 порядків відповідних бімолекулярних констант швидкості з конкретними біомолекулами – мішенями атаки АФО.

Вперше наявність вільних радикалів у біологічних системах підтвердили у 1954 р. за допомогою методу електронного парамагнітного резонансу (ЕПР) [2]. Було висловлено припущення, що утворення вільних радикалів через часткове відновлення молекулярного кисню є розповсюдженим механізмом кисневого отруєння [3], а також процесів старіння [4]. У наступні роки накопичувалась контроверсійна інформація стосовно дії радикалів на біологічні системи. З одного боку, АФО викликають деградацію біологічних структур, а з іншого – стало зрозуміло, що вільні радикали залучені у фізіологічні процеси через різноманітні механізми.

Утворення АФО може відбуватися внаслідок таких фізіологічних клітинних механізмів:

1. *Робота клітинних електронтранспортних ланцюгів є основним джерелом утворення АФО в клітинах* [5, 6]. У процесі катаболізму поживні речовини (білки, жири і вуглеводи) шляхом спеціальних молекулярних механізмів (клітинних електронтранспортних ланцюгів) окиснюються молекулярним киснем до вуглекислого газу і води. Цей процес називається внутрішньоклітинним диханням, у якому вивільняється енергія і акумулюється у формі АТФ (аденозинтрифосфату) (1). АТФ – це «конвертована енергетична валюта клітини», яка синтезується з аденозиндифосфату (АДФ) та фосфорної кислоти.



де AH_2 – субстрат, що окиснюється, А – продукт окиснення.

Утворений АТФ розщеплюється потім під дією ферментів з виділенням енергії (2), яка може бути спрямована на процес анаболізму – синтез важливих біомолекул для оновлення біоструктур:



Внутрішньоклітинне дихання відбувається в спеціалізованих частинках – мітохондріях. Трансформація енергії окиснення здійснюється ферментами, розташованими в строгому порядку у внутрішніх мембранах мітохондрій. Ці ферменти складають так званий дихальний ланцюг (рис. 2) і працюють як генератори, створюючи різницю електрохімічних потенціалів на мембрані, за рахунок якої синтезується АТФ, подібно до того, як це відбувається під час фотосинтезу.

Електронтранспортний ланцюг складається з чотирьох трансмембранних білкових мультиферментних комплексів (I–IV), АТФ-синтази (комплекс V), а також двох переносників електронів між комплексами – коензиму Q (убіхінону, CoQ) та цитохрому С (Cyt C) (див. рис. 2). Комплекси I, III, IV електронтранспортного ланцюга викачують протони з матриксу мітохондрій у міжмембранний простір, що створює різницю електрохімічних потенціалів. Енергія електрохімічного потенціалу використовується АТФ-синтазою (комплекс V) для утворення АТФ.

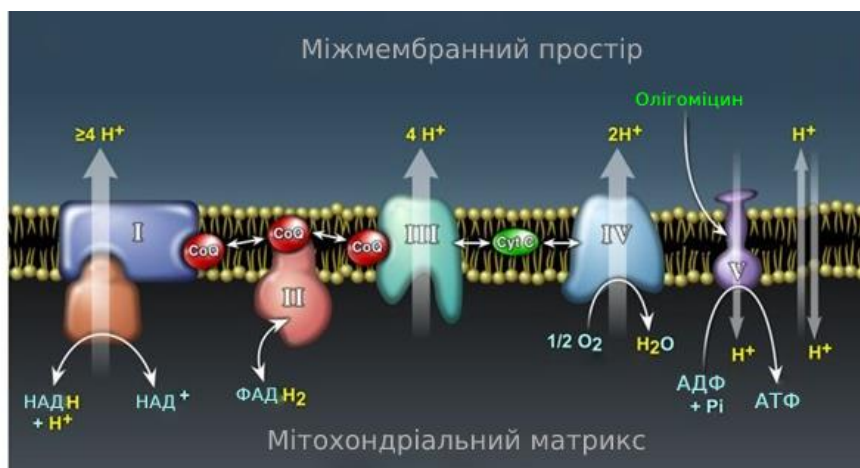


Рис. 2. Робота клітинного електронтранспортного ланцюга [7]

Перенесення чотирьох електронів на молекулярний кисень приводить до утворення води (рис. 3), але можливий витік електронів, тобто неповне відновлення кисню: у разі перенесення тільки одного електрона утворюється супероксидний аніон-радикал (O_2^-), 2-х електронів – гідроген пероксид, який може відновлюватись до гідроксильного радикала (рис. 3), а на заключному етапі утворюється вода. 95–98 % кисню, що ми вдихаємо, витрачається на вироблення енергії і окиснювальний метаболізм субстратів, 2–5 % кисню переходить в АФО.

Гідроген пероксид не є вільним радикалом, але він значно більш активний, ніж молекулярний кисень, і легко утворює гідроксильні радикали, тому його відносять до АФО. Через високу активність мітохондріального дихального ланцюга в аеробних організмах витік електронів є основним джерелом вироблення АФО в клітинах.

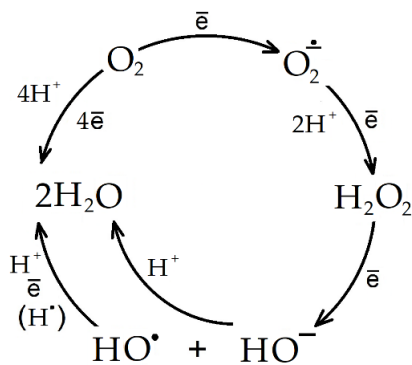


Рис. 3. Шляхи відновлення молекулярного кисню у електронтранспортному ланцюзі електронів

2. Наступне джерело АФО – процес фагоцитозу. Фагоцитоз – це процес поглинання та знищення чужорідних мікроорганізмів за участі АФО клітинами-фагоцитами – гранулоцитами, моноцитами, макрофагами, нейтрофілами, еозинофілами. У процесі зіткнення фагоцитів з бактеріями відбувається активація ферментного трансмембранного комплексу NOX2, який складається з НАДФН-оксидаз (нікотинамід аденін динуклеотид фосфат оксидази). Його основна роль полягає в утворенні супероксиду і гідроген пероксиду шляхом перенесення електронів від цитоплазматичного НАДФН на молекулярний кисень всередину фагосоми (рис. 4).

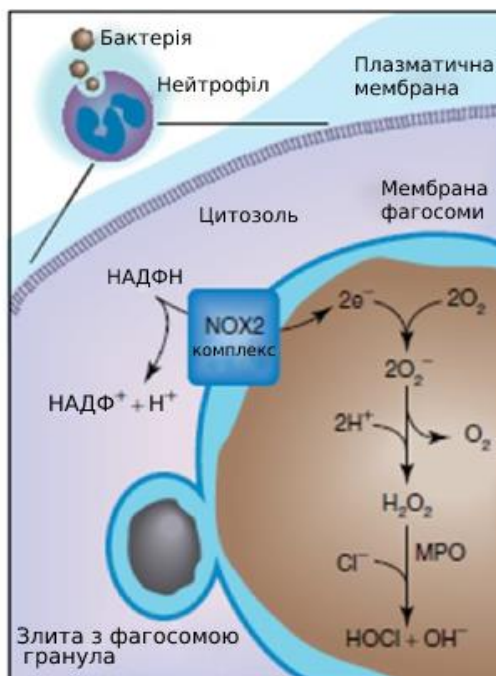


Рис. 4. Механізм генерації АФО НАДФН-оксидазою в нейтрофілах під час фагоцитозу [8]

У процесі фагоцитозу відбувається швидке багаторазове підвищення генерації супероксид-аніона та гідроген пероксиду у фагоцитуючих клітинах з одночасним підвищенням поглинання кисню у 20 разів і більше («оксидативний вибух»). До 90 % кисню йде на утворення $O_2^{\cdot-}$ та H_2O_2 . До того ж фермент мієлопероксидаза нейтрофілів каталізує утворення гіпохлориту. Утворені АФО мають виражену бактерицидну дію і руйнують бактерії, патогенні мікроорганізми і пошкоджені, старі, імунологічно несумісні, злоякісні пухлини.

3. *Ферментативні процеси за участі ксантиноксидази, NO-синтази.* Ферментативна система ксантиноксидази, яка відіграє важливу роль у катаболізмі пуринів, є джерелом супероксид аніона в клітині [9]. Синтази оксиду нітрогену (NO-синтази, NOS), що здійснюють синтез NO в клітині, також у якості побічного продукту генерують $O_2^{\cdot-}$.

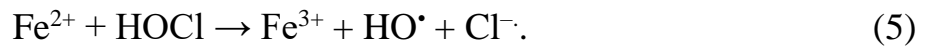
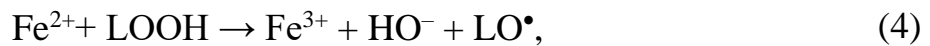
4. *Ензиматичний метаболізм ксенобіотиків – сполук екзогенного походження.* Це чужорідні для живих організмів хімічні речовини, які не входять у кругообіг біогенів і зазвичай прямо або побічно породжені діяльністю людини. До таких сполук належать пестициди, мінеральні добрива, мийні засоби, детергенти, препарати побутової хімії, хімічні лікарські засоби та ін. Метаболізм ксенобіотиків відбувається різними шляхами і каталізується широким спектром ферментів. Значна роль у цих процесах належить системі цитохрому Р-450, яка приводить до гідрофільності ксенобіотиків, зниження їх активності та виведення з організму [10].

5. *Процеси спонтанного (неферментативного) окиснення ендогенних речовин, наприклад, адреналіну, ацетилхоліну.* Хіноїдний шлях окиснення гормону адреналіну до аденохрому супроводжується виділенням супероксид аніон-радикала [11].

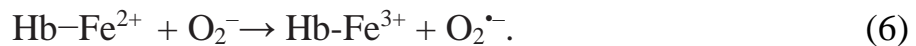
6. *Біологічні системи, що містять іони металів змінної валентності, і насамперед Феруму (II), Купруму (I).*

Радикали та іони металів змінної валентності подібні тим, що мають принаймні одну напівзайняту орбіталь і можуть легко віддавати або приймати електрони з утворенням високореактивних частинок.

Fe^{2+} , найпоширеніший іон металу змінної валентності в нашому організмі, може працювати як каталізатор для генерації АФО під час розвитку патологічних станів. Переважна більшість іонів металів в організмі знаходяться у зв'язаному стані, це є еволюційно відібраною ознакою, оскільки навіть незначне підвищення концентрації Fe^{2+} провокує небажані реакції за участі АФО. Тому окисно-відновний стан клітини підтримується в строгих фізіологічних межах. Основні механізми активації АФО перехідними металами включають розкладання гідроген пероксиду за реакцією Фентона (3), відновлення жирних гідропероксидів (LOOH) до відповідних алкоксирадикалів за механізмом Габера–Вейсса (4), розкладання гіпохлорної кислоти з утворенням гідроксильного радикала (5):



Високий вміст кисню в еритроцитах обумовлює утворення супероксидного аніон-радикала, пероксиду гідрогену і гідроксильного радикала. Постійне джерело АФО в еритроцитах – неферментативне окиснення гемоглобіну до мет-гемоглобіну (6) [12, 13]:



Окрім перерахованих вище фізіологічних механізмів утворення АФО існує низка причин екзогенного походження, які викликають активацію вільно-радикальних процесів у клітинах та тканинах:

1. Зниження надходження в організм антиоксидантів (АО), тобто сполук, що інгібують радикальні процеси, як-от: токоферол, аскорбат, флавоноїди та ін., а також падіння з віком активності антиоксидантних ферментів.

2. Стрес різного генезу, зокрема емоційний. Гормони стресу, адреналін і кортизол, за несприятливих життєвих ситуацій виробляються в підвищених кількостях, порушуючи живлення і нормальне дихання клітини, що призводить до накопичення і поширення радикалів в усьому організмі.

3. Зовнішні хімічні прооксиданти – лікарські окисники, алкоголь, смог, продукти, що утворюються під час куріння (нікотин, смоли).

4. Фізичні фактори – підвищений радіоактивний фон, ультрафіолетове опромінення, електромагнітне поле, ультразвук, а також інші екологічно несприятливі фактори.

5. Проведення низки лікувальних процедур, як-от киснева, гіпербарична оксигенація (лікування киснем під підвищеним тиском) та реперфузія, тобто відновлення кровотоку після його порушення через тромбоз (закупорки судин) або сильного спазму, характерних для інфаркту міокарда або інсульту головного мозку. Значна вираженість запалення з активацією нейтрофілів і макрофагів також неминуче призводить до накопичення АФО.

В умовах узгодженого функціонування систем антиоксидантного захисту вільні радикали є продуктами фізіологічного клітинного механізму і не становлять небезпеки, оскільки відразу ж нейтралізуються антиоксидантною системою. Сьогодні відомо, що АФО є не просто побічними продуктами клітинних окисно-відновних реакцій, а вони беруть участь у регуляції процесів, що відбуваються в клітині, тобто в багатьох випадках генерація АФО є не випадковим, а цілком

контрольованим процесом [14]. Сьогодні добре відомо, що за низької інтенсивності АФО радикально-ланцюгові процеси відносяться до нормальних метаболічних процесів, в яких вільні радикали виконують такі важливі функції:

1) залучення у біохімічні процеси, від експресії генів до трансляції білка [15]. АФО регулюють окисно-відновні процеси в клітинах, беруть участь у внутрішньоклітинній передачі сигналів [16]. Насамперед це стосується гідроген пероксиду завдяки його більш тривалому періоду напіврозпаду, порівняно з іншими АФО, і здатності легко дифундувати через мембрани;

2) індукція апоптозу (запрограмована загибель клітини), участь у формуванні клітинного імунітету, регулювання захисних неспецифічних імунних механізмів організму під час інфекційних та інших запальних процесів;

3) регуляція фізико-хімічного стану мембран. Утворення гідропероксидів жирнокислотних залишків поліненасичених фосфоліпідів призводить до пошкодження бішару і стимулювання роботи фосфоліпаз, сприяє вивільненню жирних кислот зі складу мембранних ліпідів, оновлює і регулює жирнокислотний склад ліпідних молекул у клітинній мембрані;

4) участь у процесах метаболізму білків, ліпідів, вуглеводів, нуклеїнових кислот;

5) участь у процесах фагоцитозу – окиснювального вибуху макрофагів. Серйозною проблемою для багатоклітинних організмів є боротьба з клітинами-ворогами. Важливу роль у цьому відіграють фагоцити, які захоплюють мікроорганізми, а потім вбивають їх, використовуючи АФО як основну зброю. Макрофаги руйнують бактерії і патогенні мікроорганізми шляхом окиснювальної модифікації їх біомолекул і мембран;

б) синтез біологічно-активних сполук. Поліненасичена арахідонова кислота є звичайною мішенню для вільнорадикальної атаки. Внаслідок її ферментативних перетворень утворюються важливі біологічні регулятори: простагландини, лейкотрієни, тромбоксани;

7) знешкодження ксенобіотиків. Радикали беруть участь за допомогою цитохрому Р450, кисню і АФО в детоксикації ліпофільних ксенобіотиків;

8) регуляція судинного тонуусу шляхом генерації ендogenousного оксиду нітрогену;

9) гемоліз еритроцитів і окиснення гемоглобіну. Природний гемоліз являє собою безперервний ланцюг хімічних процесів за участю АФО, внаслідок яких відбувається «фізіологічне» оновлення складу еритроцитів за умови нормального функціонування структур ретикулоендотеліальної системи;

10) резорбція кісток остеокластами. Остеокласти (спеціалізовані макрофаги) застосовують АФО для руйнування кістки – обов'язкової умови її оновлення.

2.2. Оксидативний стрес

Якщо концентрація АФО не перевищує деякої критичної межі, організм сам у змозі нейтралізувати утворені вільні радикали і підтримати рівновагу між антиоксидантними і прооксидантними системами організму. Здорова клітина організму може захистити себе від атак вільних радикалів. Однак часто захисний бар'єр не справляється із зовнішнім впливом, і виникає стан, який називають оксидативним стресом [17, 18].

Оксидативний стрес є однією з відповідей на стресовий вплив абіотичної, біотичної та антропогенної природи, і являє собою *зміну в організмі балансу між утворенням АФО та активністю антиоксидантного захисту на користь першого* [19]. У більшості випадків оксидативний стрес починається з активації триплетного кисню ($^3\text{O}_2$) з утворенням АФО. Надлишкова концентрація АФО призводить до оксидативної модифікації основних біомолекул – нуклеїнових кислот, білків, ліпідів, вуглеводів шляхом ланцюгового вільно-радикального окиснення. Такі процеси супроводжуються накопиченням у клітинах продуктів радикальних процесів – ліпопероксидів, радикалів жирних кислот, кетонів, альдегідів, кетокислот, що, зі свого боку, призводить до пошкодження і збільшення проникності клітинних мембран, окиснювальної модифікації структурних білків, ферментів, нуклеїнових кислот, біологічно активних речовин.

Наслідком біоструктурних трансформацій є «вільнорадикальні хвороби», до яких належать більше 100 патологій, зокрема: мутагенез, злоякісний ріст клітин; різні токсикози; гіпотонія; гіпертонія; стрес і розлади, пов'язані з ним; А- та Е-авітамінози; гострі та хронічні запальні процеси; катаракта, розсіяний склероз; хвороби Паркінсона і Альцгеймера; цукровий діабет; бронхіальна астма та бронхолегеневі патології; артрити, артрози і системні захворювання суглобів; серцево-судинні патології, вади серця, атеросклероз; ішемія мозку, дисциркуляторна енцефалопатія та ін. Старіння організму також протікає на тлі окисного стресу, водночас відбувається прогресуючий і зростаючий характер молекулярних пошкоджень мембран, білків і генетичного апарату клітини, викликаних АФО, ослаблення функції захисних механізмів організму.

Стан окисного стресу фактично відображає співвідношення між процесами генерації АФО, проявом їх токсичної дії і активністю антиоксидантної системи організму.

Оксидативний стрес розвивається за такими стадіями [20]:

1. Адаптація, під час якої посилюється активність антиоксидантної системи захисту. Це означає, що оксидативний стрес є необхідним елементом будь-якої стресорної реакції організму, яка спрямована на включення клітинної адаптації організму в екстремальних умовах. Але під час повторних атак високих концентрацій АФО може відбуватись виснаження антиоксидантної системи.

2. Оксидативна модифікація тканин: окисний стрес може призвести до пошкодження всіх молекулярних мішеней: ДНК, білків і ліпідів. Часто неясно, що є першим на вістрі атаки.

3. Загибель клітин. Можуть реалізовуватись, по суті, два механізми: некроз і апоптоз. Під час некротичної смерті клітини відбувається набухання клітини і розрив із вивільненням вмісту в навколишнє середовище. Вміст може включати ферменти-антиоксиданти, а також прооксиданти, як-от іони Феруму і Купруму. Отже, навіть якщо клітина вмирає через інші причини, ніж оксидативний стрес, некроз може призвести до його розвитку. Під час апоптозу клітини включається власний внутрішній «механізм самогубства», за якого не відбувається пошкодження оточуючих клітин.

Отже, клітина повинна зберігати рівновагу між продукцією АФО і антиоксидантним захистом клітини від потенційних ушкоджень. Ця крихка рівновага може порушуватися за різних несприятливих умов через надмірне генерування АФО або через порушення антиоксидантного захисту. Але навіть якщо оксидативний стрес відбувається, радикали не завжди є причиною захворювання. Вони можуть просто супроводжувати загибель клітин, а не викликати її, а іноді – навпаки формувати імунну відповідь, що підсилює дію антиоксидантів.

Контрольні питання для самоперевірки знань:

1. Що таке АФО? Наведіть основні види АФО.
2. Які важливі функції виконують АФО в нормальних метаболічних процесах?
3. Наведіть основні шляхи продукції АФО в клітині.
4. Запишіть шляхи відновлення молекулярного кисню у електронтранспортному ланцюзі електронів.
5. Що таке фагоцитоз? Які види АФО утворюються у процесі фагоцитозу?
6. Дайте визначення оксидативному стресу. Які його наслідки?

Література

1. Checa J., Aran J. M. Reactive oxygen species: drivers of physiological and pathological processes. *Journal of Inflammation research*. 2020. Vol. 13. P. 1057–1073. DOI: 10.2147/2FJIR.S275595.
2. Commoner B., Townsend J., Pake, G. E. Free radicals in biological materials. *Nature*. 1954. Vol. 174. P. 689–691. DOI: 10.1038/174689a0.
3. Gerschman R., Gilbert D. L., Nye S. W., Dwyer P., Fenn W. O. Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science*. 1954. Vol. 119, № 3097. P. 623–626. DOI: 10.1126/science.119.3097.623.

4. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. // *Science of Aging Knowledge Environment*. 2002. Vol. 37. DOI: 10.1126/sageke. 2002.37.cp14.
5. Murphy M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical journal*. 2009. Vol. 417, № 1. P. 1–13. DOI: 10.1042/BJ20081386.
6. Hernansanz-Agustín P., Enríquez J. A. Generation of reactive oxygen species by mitochondria. *Antioxidants*. 2021. Vol. 10, № 3. P. 415–418. DOI: 10.3390/antiox 10030415.
7. Liu Y., Schubert D. R. The specificity of neuroprotection by antioxidants. *Journal of biomedical science*. 2009. Vol. 16, № 1. P. 1–14. DOI: 10.1186/1423-0127-16-98.
8. Winterbourn C. C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nature chemical biology*. 2008. Vol. 4, № 5. P. 278–286. DOI: 10.1038/nchembio.85.
9. Kuppusamy P., Zweier J. L. Characterization of free radical generation by xanthine oxidase: Evidence for hydroxyl radical generation. *Journal of Biological Chemistry*. 1989. Vol. 264, № 17. P. 9880–9884. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)81740-9.
10. Klotz L. O., Steinbrenner H. Cellular adaptation to xenobiotics: Interplay between xenosensors, reactive oxygen species and FOXO transcription factors. *Redox biology*. 2017. Vol. 13. P. 646–654. DOI: 10.1016/j.redox.2017.07.015.
11. Bindoli A., Rigobello M. P., Deeb J. Biochemical and toxicological properties of the oxidation products of catecholamines. *Free Radical Biology and Medicine*. 1992. Vol. 13, № 4. P. 391–405. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)81740-9.
12. Winterbourn C. C. Free-radical production and oxidative reactions of hemoglobin. *Environmental health perspectives*. 1985. Vol. 64. P. 321–330. DOI: 10.1289/ehp.8564321.
13. Pandey K. B., Rizvi S. I. Biomarkers of oxidative stress in red blood cells. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of Palacky University in Olomouc*. 2011. Vol. 155, № 2. DOI: 10.5507/bp.2011.027.
14. Patel R., Rinker L., Peng J., Chilian W. M. Reactive oxygen species: The good and the bad. *Reactive Oxygen Species (ROS) in Living Cells*. 2018. Vol. 7. DOI: 10.1016/j.redox.2017.07.015.
15. Bigarella C. L., Liang R., Ghaffari S. Stem cells and the impact of ROS signaling. *Development*. 2014. Vol. 141, № 22. P. 4206–4218. DOI: 10.1242/dev.107086.
16. Ray P. D., Huang B. W., Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular signalling*. 2012. Vol. 24, № 5. P. 981–990. DOI: 10.1016/j.cellsig.2012.01.008.
17. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant physiology*. 2006. Vol. 141, № 2. P. 312–322. DOI: 10.1104/pp. 106.077073.
18. Sies H. Oxidative stress: Concept and some practical aspects. *Antioxidants*. 2020. Vol. 9, № 9. P. 852. DOI: 10.3390/antiox9090852.
19. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology: Translation and Integration*. 1997. Vol. 82, № 2. P. 291–295. DOI: 10.1113/expphysiol.1997.sp004024.
20. Halliwell B., Gutteridge, J. M. C. Free radicals, other reactive species and disease. *Free radicals in biology and medicine*. 1999. Vol. 3. P. 617–783. DOI: 10.1038/npg.els.0002269.

3. Синтази оксиду нітрогену каталізують синтез NO в клітині, де як побічний продукт реакції утворюється $O_2^{\cdot-}$ [7].

4. $O_2^{\cdot-}$ генерується в процесі фагоцитозу. Людині, як і всякому багатоклітинному організму, доводиться боротися з мікробами. Фагоцитоз здійснюють клітини фагоцити, які циркулюють в організмі, вишукуючи «чужих». Мікроорганізм гине під впливом агресивних травних ферментів або внаслідок дихального вибуху, під час якого генеруються різні види АФО за участі трансмембранних НАДФН-оксидаз [8–10]. На рис. 2 показано, як відбувається активація НАДФН-оксидазного комплексу NOX2, що здійснює перенос електронів з цитозольного НАДФН на O_2 з утворенням $O_2^{\cdot-}$ (2).

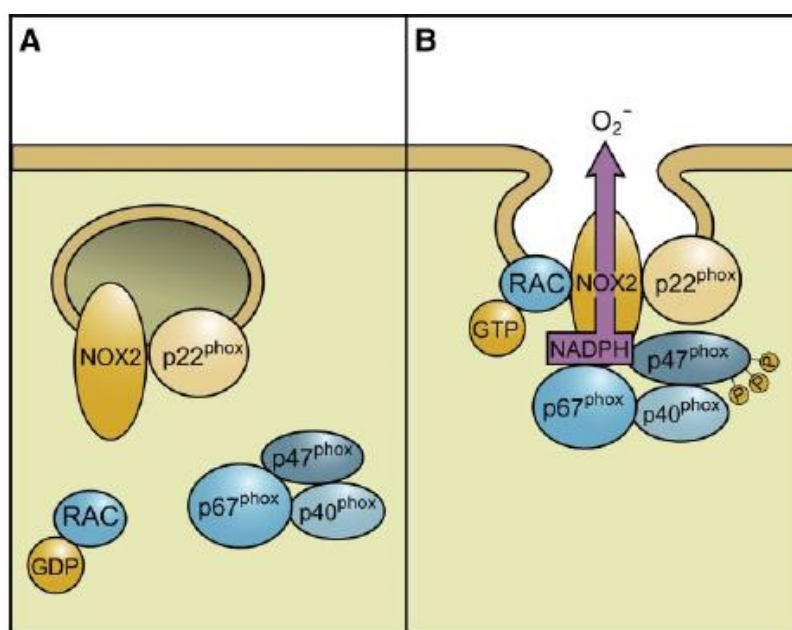


Рис. 2. Комплекс NOX2 в неактивному (А) і активному (В) стані [11]

У процесі фагоцитозу спостерігається різке посилення утворення $O_2^{\cdot-}$ (так, 104 гранулоцити можуть синтезувати 10 нмоль/г радикалів або приблизно 200 000 000 молекул $O_2^{\cdot-}$ в секунду на клітину).



Супероксид-аніон сам може проявляти мікробіцидну активність, а головне – є тригером каскаду реакцій, що приводять до утворення інших більш реакційноздатних форм АФО, наприклад, пероксинітриту.

На рис. 3 представлено загальну схему основних джерел утворення $O_2^{\cdot-}$ в клітинах еукаріот.

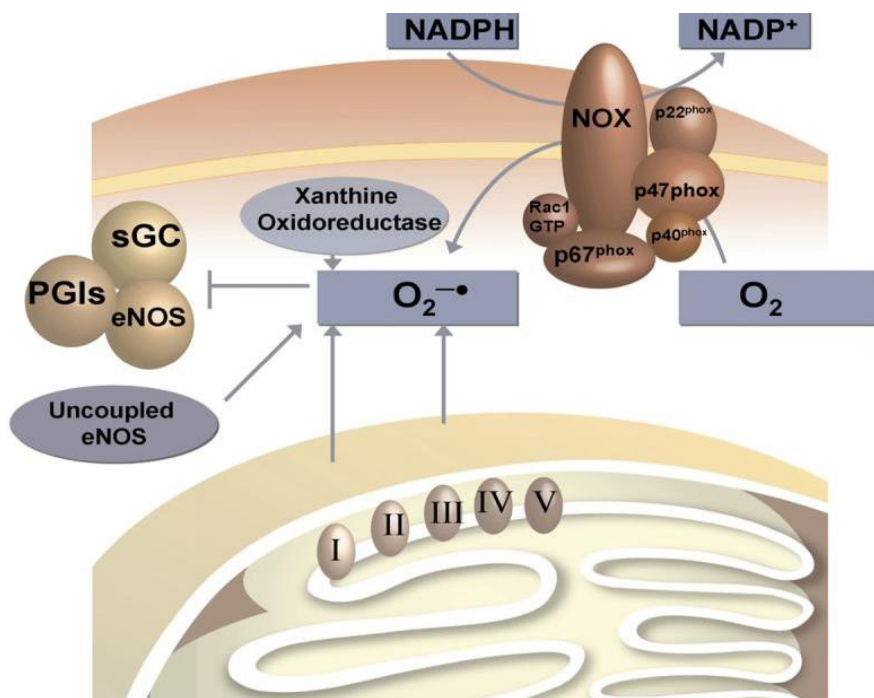


Рис. 3. Основні джерела супероксид аніон-радикала $O_2^{\bullet-}$ [12]

3.1.2. Властивості супероксид аніон-радикала

Молекула кисню – невелика нейтральна молекула, більш розчинна в гідрофобному середовищі (у системі жир / вода кисню приблизно в 10 разів більше в жирі). Тому біологічні мембрани, до складу яких входять жироподібні речовини – фосфоліпіди і гідрофобні білки, не є перепорою для проникнення O_2 . Супероксид аніон-радикал – навпаки, є зарядженою частинкою, а його протонована форма HO_2^{\bullet} – вільний радикал. Час життя $O_2^{\bullet-}$ у клітинах становить 10^{-6} с, що визначає радіус його дії приблизно 0,3 мкм. За нейтральних умов концентрація протонованої форми супероксид аніон-радикала дуже незначна: з умови рН 7,4 вона досягає лише 0,25 % від загальної кількості. Клітина стає пасткою для $O_2^{\bullet-}$, який через наявність заряду оточений молекулами зв'язаної води (гідратований), тобто не може пройти крізь гідрофобний мембранний бар'єр, але може транспортуватися через біологічні мембрани аніонними каналами.

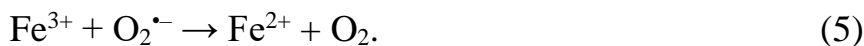
Усі аеробні клітини мають спеціальний фермент – супероксиддисмутазу (СОД), який перетворює $O_2^{\bullet-}$ в нейтральну H_2O_2 , здатну вийти з клітини. Більша частина всього утвореного всередині клітини $O_2^{\bullet-}$ практично відразу спонтанно або завдяки спеціалізованому ферменту СОД перетворюється на гідроген пероксид. Константа швидкості цієї реакції (3) дорівнює $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$:



Реакція дисмутації супероксид аніон-радикала в H_2O_2 запобігає згубному впливу цього радикала. Однак деяка частина $\text{O}_2^{\bullet-}$ може минути реакцію дисмутації і прореагувати, наприклад, з оксидом нітрогену NO з утворенням дуже сильного окисника пероксинітриту ONOO^- . Це одна з токсичних реакцій $\text{O}_2^{\bullet-}$:



Ще одним процесом за участі $\text{O}_2^{\bullet-}$, наслідком якого є утворення реакційних АФО, є реакція з Fe^{3+} . Супероксид аніон-радикал сприяє вивільненню іонів перехідних металів, і особливо Fe , з їх комплексів з біологічними молекулами. Тому в живих системах концентрація спонтанно утвореного $\text{O}_2^{\bullet-}$ підтримується на рівні не більше 10^{-12} – 10^{-11} М. Наприклад, у складі феритину і трансферину Ферум представлено у формі Fe^{3+} , який внаслідок відновлення супероксид аніон-радикалом до Fe^{2+} (5) залишає білок:



Fe^{2+} надалі може брати участь в утворенні найбільш руйнівного з усіх токсичних форм Оксигену – гідроксильного радикала (HO^\bullet). На рис. 4 представлено цикл Фентона / Габера–Вейсса, який приводить до утворення гідроксильного радикала:

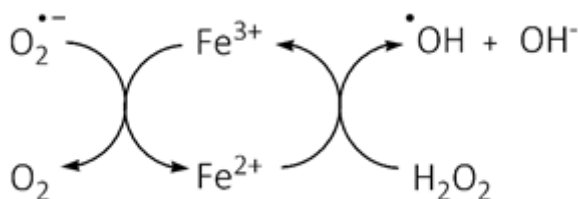


Рис. 4. Цикл Фентона / Габера–Вейсса

Генерування супероксид аніон-радикала і його подальші перетворення представлені на загальній схемі (рис. 5):

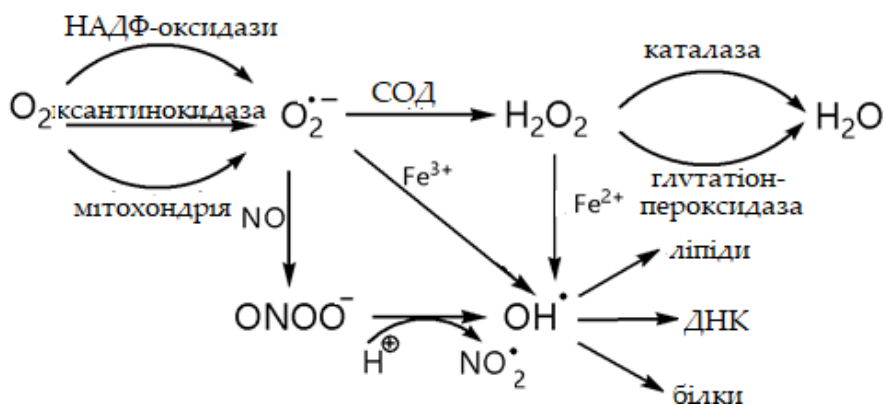


Рис. 5. Шляхи перетворень супероксид аніон-радикала

3.1.3. Дія супероксид аніон-радикала на біологічні структури

У реакціях $O_2^{\cdot-}$ може виступати в ролі як відновника ($E_0 O_2/O_2^{\cdot-} = -0,33$ В), так і окисника ($E_0 O_2^{\cdot-}/H_2O_2 = +0,89$ В). Він має досить великий радіус дії, порівняно з розміром клітини, проте навіть на клітинному рівні його ефект локалізований наявністю високоефективного ферментативного антиоксиданта – СОД. $O_2^{\cdot-}$ – малоактивний радикал і не впливає на функціонування більшості ферментів, хоча і може інактивувати деякі з них. Наприклад, у роботі [1] досліджено інактивацію Fe/S вмісних ферментів, як-от аконітаза і дегідратаза, необхідних для синтезу розгалужених амінокислотних ланцюгів. Одноелектронне окиснення супероксид аніон-радикалом інактивує ферменти і вивільняє Fe^{2+} з утворенням гідроген пероксиду (рис. 6), який може викликати подальше окиснення біомолекул. Ці реакції є швидкими (константи швидкості $> 10^6 M^{-1} \times s^{-1}$) і високоселективними.

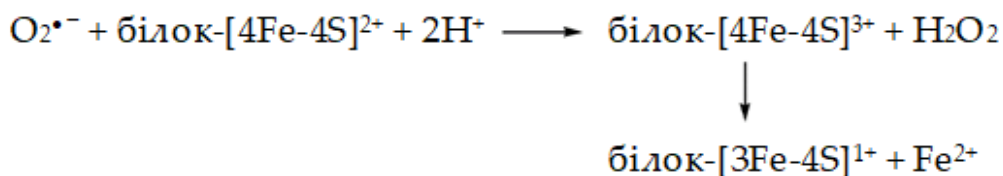


Рис. 6. Схема інактивації білків за участі $O_2^{\cdot-}$

Як нуклеофільна сполука, $O_2^{\cdot-}$ окиснює ліпопротеїни сироватки і фосфоліпиди мембран, що призводить до руйнування еритроцитів, виходу лізосомальних ферментів і утворення цитотоксинів. Токсичність $O_2^{\cdot-}$ відносно клітин і мікроорганізмів не викликає сумніву, яскравим прикладом цього є фагоцити, отримані від хворих на хронічний грануломатоз. Ці фагоцити не відновлюють кисень, і внаслідок цього мають слабку мікробіцидну активність. Водночас молекулярні механізми цитотоксичності $O_2^{\cdot-}$ до кінця не з'ясовані. Супероксид аніон-радикал сам проявляє мікробіцидну активність [14], а також слугує пусковою ланкою каскаду реакцій, що призводять до утворення інших форм АФО. Зокрема, СОД перетворює його в H_2O_2 , а мієлопероксидаза трансформує пероксид у сильний окисник гіпохлорит (активну форму Хлору). Утворені за участі супероксид-аніона реактивні форми активованого кисню викликають пероксидне окиснення ненасичених жирних кислот, окиснення SH-груп, руйнування триптофанових залишків у білках, пошкодження ДНК, деполімеризацію кислих полісахаридів та інші реакції.

3.2. Пероксинітрит аніон

Ендотеліальні клітини, макрофаги і нейтрофіли можуть генерувати супероксид аніон-радикал, а також оксид нітрогену, реакція між ними у водній фазі є дуже швидкою ($6,7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \times \text{с}^{-1}$ [15]) і призводить до утворення *in vivo* надзвичайно цитотоксичного пероксинітрит аніону (ONOO^-) (6) [16]. Пероксинітритна кислота (ONOOH) має pK_a , 6,8 за умови 37°C , є дуже нестійкою і розкладається (6) з періодом напіврозпаду менше 1,0 с [17] за реакцією (6):



Найбільш вірогідним місцем утворення пероксинітриту є клітинні органели, в яких продукується супероксид аніон-радикал, – мітхондрії, мікросоми. До того ж утворення пероксинітриту відбувається під час активації фагоцитуючих клітин, оскільки їх активація пов'язана з підвищенням утворенням супероксидних радикалів.

Пероксинітрит аніон є потужним окисником сульфогідрильних груп білка. Константи другого порядку становлять $5,90 \text{ M}^{-1} \times \text{с}^{-1}$ і $2,60\text{--}2,80 \text{ M}^{-1} \times \text{с}^{-1}$ для реакції пероксинітрит аніону з вільним цистеїном і тіольною групою альбуміну відповідно, за умови pH 7,4 і 37°C [18]. Ці константи швидкості є на 3 порядки більшими, ніж відповідні для гідроген пероксиду за умови pH 7,4. Однак на відміну від H_2O_2 , який окиснює тіолят-аніон, пероксинітрит аніон реагує переважно з недисоційованою формою тіольної групи і окиснює її до цистину. Окрім модифікації цистеїнових залишків, пероксинітрит аніон бере участь у нітруванні білків, пошкодженні нуклеїнових кислот, пероксидному окисненні ліпідів, процесах мітохондріальної дисфункції та загибелі клітин [19–21]. Численні дослідження біологічної дії пероксинітриту в останні роки свідчать про те, що окрім токсичної дії на біоструктури, він виконує важливу біологічну функцію фізіологічного посередника імунної системи [22].

3.3. Гідроген пероксид

H_2O_2 традиційно розглядався як небажаний побічний продукт аеробного дихання, що викликає оксидативний стрес. H_2O_2 – одна з найбільш стабільних молекула з усіх АФО; вона добре розчинна у воді, і на відміну від інших видів АФО, може накопичуватись у клітині завдяки невисокій реакційній здатності [23]. Вважається, що молекула H_2O_2 здатна вільно дифундувати в цитоплазмі і міжклітинному просторі на значні відстані, а також проходити через біологічні мембрани [24].

Як було зазначено вище, H_2O_2 утворюється в реакціях спонтанної або каталітичної дисмутації супероксид-аніона. Остання відбувається за участі фермента СОД (3). У присутності іонів перехідних металів H_2O_2 вступає в реакцію Фентона, під час якої утворюється дуже активний гідроксильний радикал, через що гідроген пероксид є токсичним для клітин, і його концентрація строго контролюється.

Сьогодні відомо, що H_2O_2 бере участь у специфічній регуляції активності деяких білків [25], в основному за рахунок оборотної і специфічної модифікації амінокислотних залишків. Так гідроген пероксид може впливати на конформацію білків, регулюючи цим їх різноманітні функції. Найчастіше такими залишками є цистеїн (рис. 7), але модифікацій з боку H_2O_2 можуть зазнавати й інші амінокислоти.

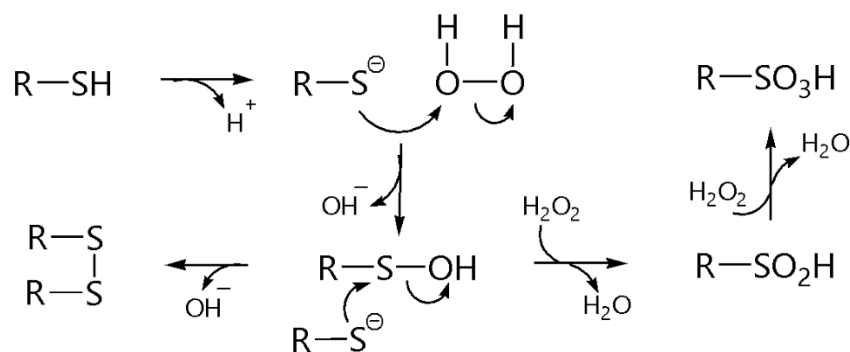


Рис. 7. Оксидативна модифікація цистеїнових залишків під дією гідроген пероксиду з утворенням сульфенової (S-OH), сульфінової (SO_2H) і сульфонової кислот (SO_3H) або дисульфідів (-S-S-)

За допомогою наведеного вище механізму H_2O_2 виконує функції сигнальної молекули, або вторинного посередника (медіатора) [26]. Медіатори – це низькомолекулярні речовини, які не є білками, утворюються і діють всередині клітин і забезпечують передачу сигналу від рецептора до мішеней у клітині. Гідроген пероксид бере участь у регуляції різноманітних фізіологічних і патогенних процесів, як-от робота клітинних ферментів, перебіг окисно-відновних процесів, регуляція просвіту судин, розвиток ішемічної хвороби серця тощо.

Квазістаціонарна внутрішньоклітинна концентрація гідроген пероксиду у клітині складає 10^{-7} – 10^{-9} М і знаходиться під жорстким контролем двох ферментів – каталази і глутатіонпероксидази, які перетворюють H_2O_2 на воду. Наявність таких систем контролю продукції H_2O_2 сприяє підтримці окисно-відновного статусу клітини.

3.4. Гідроксильний радикал

Серед усіх АФО найбільш реактивним є гідроксильний радикал $\text{HO}\cdot$. Розрахований період напіврозпаду гідроксильного радикала дорівнює приблизно 10^{-9} с, а радіус міграції менше 0,01 мкм ($< 100 \text{ \AA}$). Оскільки таку відстань можна порівняти з розмірами біологічних молекул, то $\text{HO}\cdot$ *in vivo* практично діє лише в ділянці його утворення, тобто він не здатний дифундувати. За своєю реакційною здатністю гідроксильний радикал перевершує навіть атомарний Оксиген майже у 300 разів, а порівняно з протонованою формою супероксидного радикала ($\text{HO}_2\cdot$), $\text{HO}\cdot$ на 5–6 порядків більш активний. Завдяки дуже високому редокс-потенціалу гідроксильного радикала ($E_0 = +2,32 \text{ В}$) він здатний атакувати практично будь-яку органічну сполуку з дуже високими швидкостями реакцій ($k = 10^7\text{--}10^{10} \text{ М}^{-1}\times\text{с}^{-1}$) і енергіями активації, які практично дорівнюють нулю. Константа швидкості його рекомбінації становить $0,55\cdot 10^{10} \text{ М}^{-1}\times\text{с}^{-1}$, хоча імовірність зіткнення двох гідроксильних радикалів у біологічних умовах дуже низька.

Через свої потужні руйнівні властивості саме $\text{HO}\cdot$ виконує роль основного окисного «чистильника» в тропосфері. Хоча його концентрація там і невелика (приблизно $5\cdot 10^5$ молекул/см³), саме він визначає окисдазивну здатність атмосфери, реагуючи з метаном, вуглеводнями та іншими відновленими сполуками природного і антропогенного походження.

Гідроксильні радикали генеруються у фізіологічних і патологічних станах, їх утворення тісно пов'язане з різними патологіями, що обумовлені оксидативним стресом [27]. Зараз визнано, що концентрація гідроксильного радикала добре регулюється для підтримки гомеостазу на клітинному рівні в нормальних, здорових тканинах. І навпаки, також відомо, що коли гідроксильні радикали генеруються в надлишку або в умовах дефіциту клітинного антиоксидантного захисту, вони можуть стимулювати ланцюгові реакції вільних радикалів, взаємодіяти з білками, ліпідами і нуклеїновими кислотами, що призводить до пошкодження клітин [28, 29].

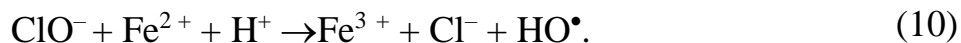
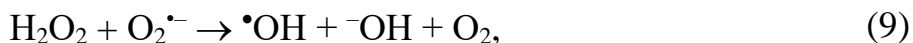
У біосистемах гідроксильний радикал може утворюватися з молекул води під впливом іонізуючого випромінення [30] (7):



Розкладання гідроген пероксиду за реакцією Фентона, каталізоване іонами металів змінної валентності Me^{n+} (насамперед Fe^{2+} або Cu^+), вважається найбільш поширеною реакцією в біологічних системах з утворенням гідроксильного радикала [31] (8):



До того ж гідроксильний радикал може бути генерований за реакцією Габера–Вейсса (9) [32] та за реакцією Fe^{2+} з гіпохлорит-аніоном (10), утвореного під час активації мієлопероксидази [33]. Реакція гіпохлорит-аніона з супероксид-аніон-радикалом також може бути джерелом гідроксильного радикала (11):



Значна кількість гідроксильних радикалів генерується внаслідок взаємодії супероксид-аніон-радикала та оксиду нітрогену за реакцією (6) [34].

Під час взаємодії з органічними молекулами гідроксильний радикал легко відриває у них атоми, групи атомів і електрони. Характерною для нього також є реакція приєднання за подвійним зв'язком. У біологічних умовах найбільш розповсюдженою для гідроксильного радикала є реакція відриву Н-атома від С-Н зв'язків біомолекул. Мішенями гідроксильного радикала можуть бути поліненасичені жирні кислоти, як-от лінолеат, арахідонат, сірковмісні, основні та ароматичні амінокислотні залишки білків і пептидів, 2-дезоксирибоза та азотисті основи ДНК. В усіх випадках ці реакції є екзотермічними, оскільки енергія утвореного зв'язка НОН становить 491,6 кДж/моль, що перевищує енергію R–H зв'язків у атакованих біоорганічних молекул на величину 41–104 кДж/моль. Гідроксильний радикал переважно окиснює третинний С-атом (>СН-), потім – вторинний (-СН₂-), а первинний (-СН₃) – в останню чергу. Наприклад, під час взаємодії гідроксильного радикала з поліпептидним остовом білків відрив Н-атома здійснюється в основному від α-карбонного атома.

3.5. Синглетний кисень

Особливою формою АФО є синглетний кисень $^1\text{O}_2$, який утворюється під час передачі триплетному кисню енергії, достатньої для обернення спіна [35]. Дві форми $^1\text{O}_2$ мають енергію, що відрізняється від основного стану на 95 ($^1\Delta$) і 158 ($^1\Sigma$) кДж/моль, відповідно (глава 2, рис. 1). У першому збудженому стані ($^1\Delta$) електрони спарені. Конфігурація другого збудженого стану ($^1\Sigma$) збігається з конфігурацією основного стану за винятком того, що електрони мають антипаралельні спіни. Час життя синглетного кисню ($^1\Sigma$) 10^{-6} с, радіус дії – 0,3 мкм.

Утворення ендogenous синглетного кисню є звичайним явищем у клітинах і відбувається за допомогою різних механізмів. Основне джерело синглетного

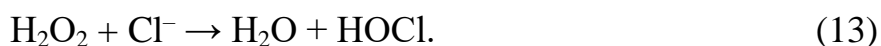
кисню в біологічних системах – реакція гідроген пероксиду з гіпохлорит аніоном під час окиснювального вибуху (12):



Синглетний кисень – дуже сильний окисник, здатний ініціювати оксидативну модифікацію біологічних молекул, як-от ДНК, білки і ліпіди, і може окиснювати речовини, які не взаємодіють з киснем в основному стані. У сучасній медицині використовують методи генерації синглетного кисню під час фотодинамічної терапії раку, для стерилізації донорської крові та для стимуляції антиоксидантного захисту клітин.

3.6. Гіпохлорит аніон

У нормі фагоцити використовують гідроген пероксид для синтезу гіпохлорит аніона під дією спеціального фермента – мієлопероксидази (13):



HOCl – високореактивний окисник і хлоруючий агент. Під час респіраторного вибуху приблизно 30 % від загальної кількості кисню, споживаного нейтрофілами, витрачається на утворення HOCl. Через це гіпохлорит вважають одним із найважливіших біоцидних продуктів оксигензалежної антимікробної системи нейтрофільних лейкоцитів, який проявляє неспецифічну бактерицидну дію.

За умови фізіологічних рН співвідношення концентрацій OCl^- і HOCl приблизно однакове ($pK_a = 7,53$). В умовах закислення середовища в зоні запалення ($pH < 6,0$) внесок протонованої і більш активної форми гіпохлориту зростає. Через високу хімічну активність гіпохлорит аніон здатний окиснювати широке коло речовин різної хімічної природи. Внаслідок деструкції окиснених молекул утворюються вторинні токсичні сполуки. Найбільш детально досліджені продукти окиснення найважливіших біологічних структур (білків, нуклеїнових кислот, ліпопротеїдів високоферментів тощо). Внаслідок дії гіпохлориту на біомолекули спостерігається не тільки деструкція життєво важливих субстанцій, а й їх хлорування. Гіпохлорна кислота проявляє високу реакційну здатність відносно первинних амінів, як-от таурин, етаноламін, амінокислоти. Гіпохлорит модифікує гемоглобін, що призводить до його руйнування і вивільнення Феруму в каталітично активній формі. Ще однією токсичною дією гіпохлориту є утворення гідроксильного радикала. Відомо, що радикали гідроксилу

утворюються не тільки в реакції Фентона, а також під час взаємодії іонів заліза (Fe^{2+}) з гіпохлоритом. Під час цього радикал гідроксилу виділяється навіть з більш високим виходом, ніж у реакції Фентона.

3.7. Радикал убіхінону – семіхінон

Коензим Q10, або убіхінон – мітохондріальний кофермент, що бере участь у процесі клітинного дихання та утворення АТФ під час окисного фосфорилювання [36], тому його найважливішою функцією вважається біоенергетична. У процесі окиснення субстратів у клітинах електрони переносяться по так званому дихальному ланцюгу на кисень. Важливою ланкою ланцюга перенесення електронів слугує убіхінон (коензим Q), радикал якого (семіхінон, $\cdot\text{QH}$) утворюється або під час одноелектронного окиснення убіхінолу (QH_2 , гідрохінон), або під час одноелектронного відновлення убіхінону (Q). У нормі цей радикал не більше ніж рядовий учасник процесу перенесення електронів, але за умови порушення роботи дихального ланцюга він може стати джерелом інших, більш токсичних радикалів, а саме супероксид аніон-радикала (рис. 8).

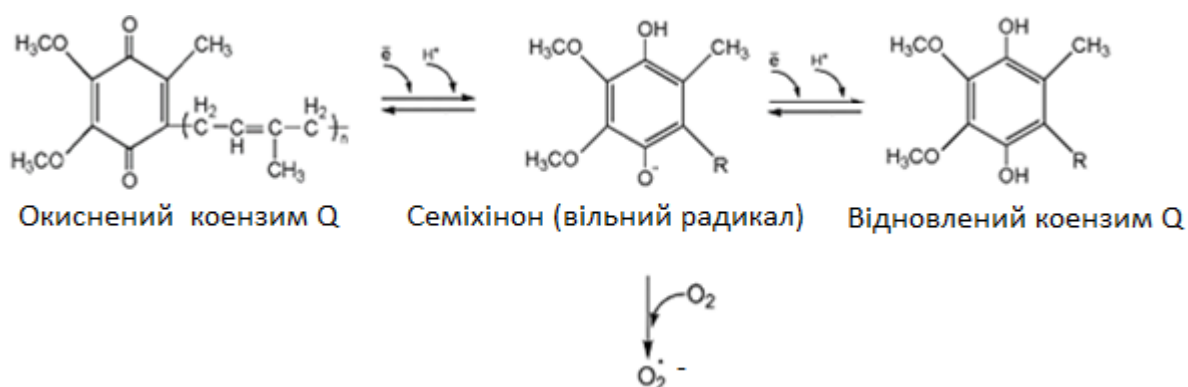


Рис. 8. Відновлення убіхінону (коензиму Q)

Дослідження останніх років показали, що крім перенесення електронів у дихальному ланцюзі, кофермент Q10 виконує ще низку важливих функцій. Так, його метаболіти є найважливішими ендogenousними гідрофобними антиоксидантами, що запобігають пероксидному окисненню ліпідів, оксидативній модифікації білків і накопиченню токсичних продуктів [37]. За антиоксидантною активністю коензим Q10 перевершує всі природні антиоксиданти, і тому вважається найбільш перспективним для застосування в клінічній практиці [38].

3.8. Нітроген оксид

Оксид нітрогену ($\cdot\text{NO}$) – унікальна сполука, яка виробляється різними типами клітин організму і контролює різноманітні метаболічні реакції, що забезпечують життєздатність і функціональну активність клітин і всього організму загалом. Оксид нітрогену є вільним радикалом, і завдяки малим розмірам і відсутності заряду легко перетинає клітинні мембрани органів і тканин організму. У біологічних системах $\cdot\text{NO}$ може зв'язуватися у відносно стабільні сполуки і накопичуватися в клітинах або транспортуватися на відстань, яка у багато разів перевищує розміри клітин.

3.8.1. Історія відкриття оксиду нітрогену

Оксид нітрогену був відкритий британським хіміком Джозефом Прістлі одночасно з його відкриттям кисню в 1776 р. Протягом наступних десятиліть NO вважався небажаним забрудником атмосфери, і тільки з'ясування фізіологічного впливу оксиду нітрогену на біологічні системи кардинально змінили цю думку. Однак історія визнання оксиду нітрогену розвивалася дуже повільно.

У 1846 р. італійський хімік Асканіо Собреро синтезував нітрогліцерин і встановив здатність цієї речовини вибухати від найслабших ударів, струсів і нагрівання. Нітрогліцерин почали широко використовувати як вибухову речовину в гірничодобувній промисловості. Під час транспортування і зберігання тринітрогліцерину траплялось багато смертельних випадків через його високу вибухову силу, яка у два рази перевищує ефективність тротилу. А. Собреро писав: «Коли я думаю про всіх жертв, убитих під час вибухів нітрогліцерину, скільки було завдано збитків, і жахливий хаос, який, ймовірно, буде продовжуватись в майбутньому, мені майже соромно зізнатися про те, що я першовідкривач» [39].

У Європі виробництвом вибухівки займалася родина Нобелів. Альфред, один з чотирьох синів Нобеля, вивчав процес синтезу нітрогліцерину в Петербурзі, працюючи у професора М. Зініна. На заводах Нобелів з виробництва вибухових речовин були великі проблеми: робітники гинули не тільки від вибухів, а й від отруєння. Запрошений доктор Д. Мерілл встановив, що нітрогліцерин – це судинна отрута, яка у разі вдихання парів викликає різке падіння артеріального тиску і призводить до смерті. Нобелю довелося перебудувувати заводи, щоб убезпечити робітників. Саме він винайшов і запатентував динаміт – суміш нітрогліцерину з діатомітом – тонковолокнистою осадовою породою. Така суміш не отруйна і не вибухає від удару, але зберігає вибухові властивості, детонуючи від запалу.

Доктор Д. Мерілл також з'ясував, що нітрогліцерин можна використовувати як ліки, зокрема для усунення спазмів судин серця. Саме застосування нітрогліцерину врятувало Альфреда Нобеля від смерті під час одного з нападів стенокардії. Він писав у листі в 1896 р.: «Хіба це не іронія долі? Мені було призначено нітрогліцерин для внутрішнього прийому! Вони називають його тринітрин, щоб не налякати хіміків і громадськість». Відійшовши від справ, Альфред Нобель все більше захоплювався наукою, працював сам і щедро заохочував перспективні дослідження молодих вчених, особливо в галузі медицини.

З 1879 р. нітрогліцерин почали використовувати для лікування «грудної жаби» (стенокардії), і тільки у 80-ті рр. ХХ ст. було з'ясовано дію нітрогліцерину як судинорозширювального агента внаслідок виділення NO. Саме у 80-х рр. вчені несподівано виявили, що оксид нітрогену синтезується і накопичується в клітинах у досить великих концентраціях. І не просто накопичується, а бере участь у регуляції найважливіших фізіологічних процесів. Оксид нітрогену є високореактивним вільним радикалом з часом життя приблизно декілька секунд і досить великим радіусом дії, оскільки він легко може проходити крізь біологічні мембрани.

Численні публікації з дослідження ролі оксиду нітрогену в біологічних об'єктах дали підставу Американській асоціації розвитку науки і авторитетному науковому журналу «Science» назвати в 1992 р. оксид нітрогену молекулою року [40]. У передмові до статті оксид нітрогену охарактеризований як «незвичайно проста молекула, що об'єднує неврологію, фізіологію, імунологію і робить ревізію розуміння ученими того, як клітини спілкуються і захищаються».

Чим же продиктований щораз більший науковий інтерес до оксиду нітрогену? Виявилось, що ця невелика молекула управляє як внутрішньоклітинними, так і міжклітинними процесами від регуляції травлення та кров'яного тиску до протимікробного захисту. Багато хвороб – гіпертонія, ішемія міокарда, тромбози, рак – викликані порушенням фізіологічних процесів, у яких бере участь оксид нітрогену. Саме тому ця радикальна частинка становить величезний інтерес для біологів і медиків різних спеціальностей.

Основні функції оксиду нітрогену в клітині [41]:

- регуляція судинного тонусу;
- інгібування агрегації тромбоцитів та їх адгезії до судинної стінки;
- активація фагоцитів, що супроводжується цитотоксичним ефектом NO на паразитарні мікроорганізми і певні пухлинні клітини;
- активація викиду нейромедіаторів у процесі синаптичної передачі.

За дослідження властивостей оксиду нітрогену троє вчених отримали Нобелівську премію з фізіології і медицини 1998 р. Точне формулювання звучить

так: «Нобелівська премія з фізіології і медицини присуджена за відкриття ролі оксиду нітрогену як сигнальної молекули в серцево-судинній системі». Нобелівськими лауреатами стали американські вчені Р. Форшготт, Ф. Мьюред і Л. Ігнарро.

А почалося все з відкриття, результати якого були опубліковані Робертом Форшготтом у 1955 р. Вчений проводив фізіологічні експерименти з кровоносними судинами і виявив розслаблюючу дію світла на аорту кролика. Така неочікувана поведінка аорти у відповідь на дію світла стала в подальшому для нього та інших дослідників об'єктом пильної уваги. Результатом досліджень, що тривали чверть століття, стало відкриття Форшготтом у 1980 р. невідомої фізіологічно активної речовини – ендотеліального фактора розслаблення судин (EDRF).

Р. Форшготт виявив, що ацетилхолін, який є одним з медіаторів нервової системи, зазвичай викликає звуження кровоносних судин, але в деяких дослідках він їх чомусь розслаблював. Аналізуючи ці експерименти, Форшготт звернув увагу, що розслаблююча дія ацетилхоліну на судини спостерігалася тільки в тих випадках, коли вони були погано очищені від ендотеліальних клітин, що вистилають внутрішню поверхню судин. Форшготт припустив, що саме присутність ендотелію змінювала фізіологічний ефект ацетилхоліну на протилежний. Після проведення серії дослідів сумнівів не залишалося: зроблено відкриття. Він використовував дві різні частини аорти; одна має інтактний ендотеліальний шар, в іншій – видалений (експеримент «сендвіч») (рис. 9). Так і був виявлений ендотеліальний фактор розслаблення судин (EDRF) [42]. Це наукове досягнення набуло широкого суспільного резонансу і сколихнуло весь учений світ. Більшість учених відразу зрозуміли, наскільки воно важливе для фізіології, патофізіології та практичної медицини.

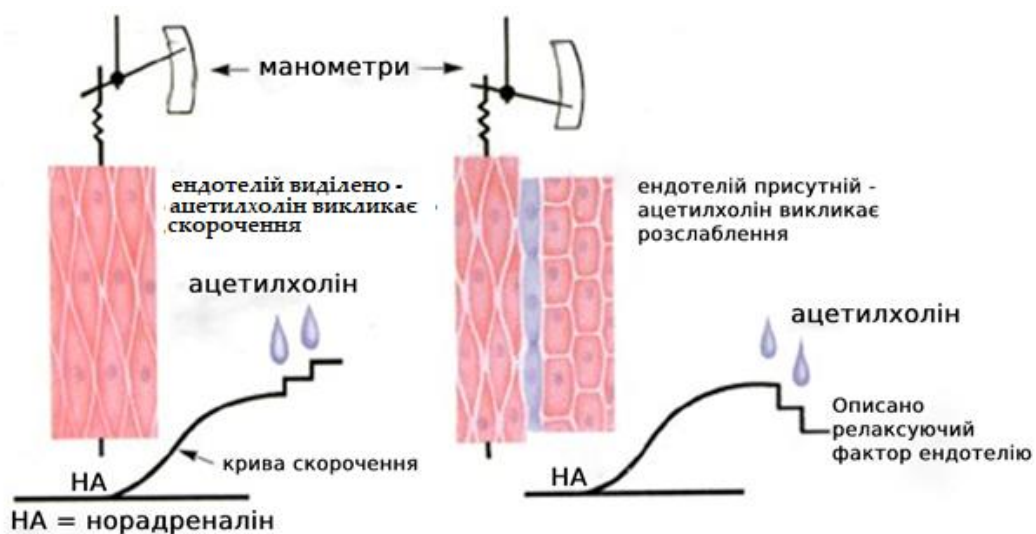


Рис. 9. Експеримент «сендвіч» Роберта Форшготта [43]

Форшготт опублікував цілу серію статей [44, 45], у яких він обґрунтовував твердження, що EDRF – це не що інше, як молекула оксиду нітрогену. Тобто під дією світла у присутності ацетилхоліну відбувається викид NO з ендотелію кровоносних судин, який потім надходить до шару м'язових клітин. І саме молекула оксиду нітрогену відповідальна за розслаблюючу дію на стінки судин.

3.8.2. Утворення оксиду нітрогену

Оксид нітрогену утворюється внаслідок окиснення амінокислоти L-аргініну з одночасним синтезом іншої амінокислоти L-цитруліну під впливом ферменту NO-синтази (рис. 10). Фермент був названий синтазою, а не синтетазою, оскільки для його роботи не потрібно енергії АТФ [46].

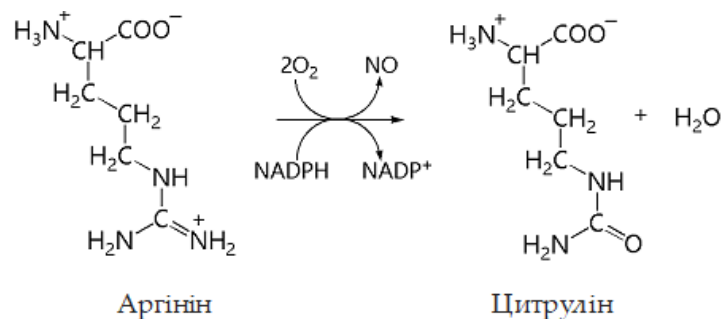


Рис. 10. Окиснення L-аргініну з утворенням оксиду нітрогену

Існує три ізоформи NOS. Дві з них – нейронна NOS (nNOS) та ендотеліальна NOS (eNOS) є конститутивними, тобто синтезуються постійно, тоді як третя індукована, і тому називається індукованою синтазою оксиду нітрогену (iNOS). nNOS каталізує синтез NO, що бере участь у нейрональній сигналізації, водночас eNOS локалізується в ендотелії і необхідна для розширення судин та контролю артеріального тиску. Ці дві ізоформи каталізують утворення наномолярних кількостей NO протягом коротких періодів часу (від секунд до хвилин). Навпаки, iNOS генерує значні кількості оксиду нітрогену – мікромольний діапазон, який бере участь у захисті клітин від збудників, і тому його концентрація є критично важливою під час запальних реакцій і порушень імунної системи.

3.8.3. Механізми дії оксиду нітрогену

Біологічний період «життя» оксиду нітрогену дорівнює приблизно 5 с, і це значний інтервал часу, порівняно з простим нервовим рефлексом або скороченням м'язів. NO легко перетинає клітинні мембрани і бере участь у різноманітних фізіологічних процесах. Аналіз літератури [47, 48] показав, що багато аспектів

щодо дії NO до кінця не вивчені і часто суперечливі. Проте з'ясування механізмів функціональної дії оксиду нітрогену заслуговує пильної уваги і подальшого дослідження, оскільки сприяє вирішенню багатьох фундаментальних проблем біології і має велике практичне значення для медицини.

1. *Оксид Нітрогену як нейромедіатор.* Вища нервова діяльність людини обумовлена проходженням імпульсу з однієї нервової клітини (нейрона) на іншу – це так звана синаптична передача. Під час проходження нервового імпульсу з одного нейрона «викидається» молекула сигнальної речовини – нейромедіатора (наприклад, ацетилхоліну, глутамату), яку «захоплює» спеціальний білок (рецептор) на мембрані нервового закінчення іншого нейрона. Потім складний ланцюг біохімічних і електрохімічних реакцій забезпечує проходження нервового імпульсу з цього нейрона. Коли сигнал досягає нервового закінчення, знову відбувається викид з нього молекули нейромедіатора і так далі. Виявилось, що оксид нітрогену активує процес викиду нейромедіаторів з нервових закінчень під час синаптичної передачі. Навіть більше, молекула оксиду нітрогену сама може виконувати роль нейромедіатора, тобто безпосередньо передавати сигнал з однієї нервової клітини на іншу. Не дивно, що оксид нітрогену присутній в усіх відділах головного мозку людини: гіпоталамусі, середньому мозку, корі, гіпокампі, довгастому мозку та ін.

2. *Участь оксиду нітрогену в захисних імунологічних реакціях.* Численні експерименти підтвердили, що макрофаги здатні продукувати NO-синтази і виділяти велику кількість оксиду нітрогену. Вже зазначалося, що NO-синтаза макрофагів є індукцибельним ферментом і в нормальних умовах клітини не містять цей фермент і не продукують NO. Під час контакту з чужорідними агентами в макрофагах починається синтез індукцибельної ізоформи NO-синтази для генерації великого об'єму NO, який проявляє цитотоксичну дію на бактеріальні та чужорідні клітини.

Сьогодні активно досліджується роль оксиду нітрогену в профілактиці і комплексній терапії COVID-19 [49]. Отримані результати свідчать про те, що NO допомагає боротися з інфекцією дихальних шляхів, інактивує віруси та пригнічуючи їх реплікацію в епітеліальних клітинах.

3. *Оксид нітрогену та кровоносні судини.* NO – потужний судинорозширювальний агент [50]. Ендотелій судин за участі ендотеліальної NOS (eNOS) постійно продукує невеликі кількості NO (так званий базовий фон), а під час різних впливів – механічних (посилення струму або пульсації крові), хімічних, бактеріальних і вірусних – синтез NO в ендотеліальних клітинах значно підвищується.

Розширення судин пов'язано з дифузією NO з ендотелію до сусідніх гладком'язових клітин стінки судини, водночас відбувається активація гуанілатциклази і утворення циклічного гуанозинмонофосфату (цГМФ), як це показано на рис. 11.

Підвищення рівня цГМФ призводить до зниження рівня іонів Кальцію в цитоплазмі клітин і ослаблення зв'язку між міозином і актином, що і дає змогу клітинам розслабитися, тобто прийняти початкову форму і розміри. Розслаблення м'язових клітин обумовлене не внутрішньоклітинними процесами, а зовнішніми механічними факторами.

З NO пов'язують і розвиток септичного шоку, коли велика кількість мікробів, що циркулюють у крові, різко активують синтез NO в ендотелії, що призводить до тривалого і сильного розширення дрібних кровоносних судин і, як наслідок, значного зниження артеріального тиску.

Оксид нітрогену впливає також на взаємодію клітин крові з ендотелієм. Газ перешкоджає прилипанню лейкоцитів і кров'яних пластинок до ендотелію і знижує агрегацію останніх. Така дія NO може мати суттєве значення на ранніх стадіях розвитку тромбів і в генезі атеросклеротичних пошкоджень стінки судин.

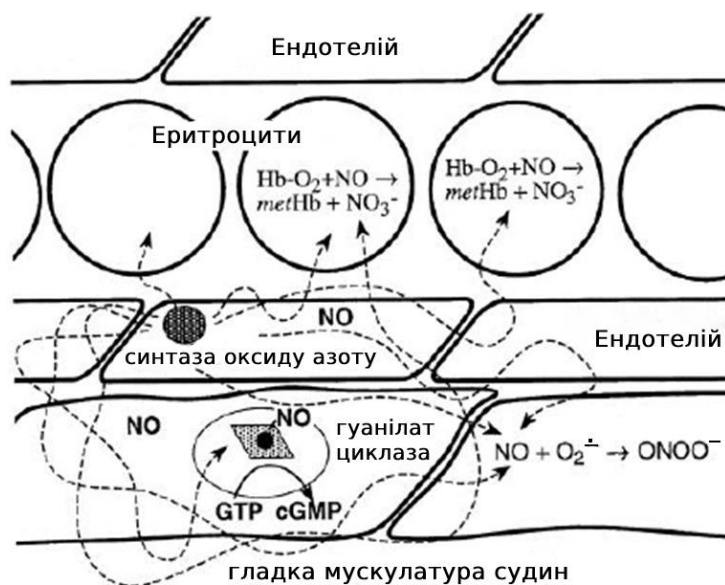


Рис. 11. Механізм дії оксиду нітрогену під час розширення судин [51]

3.8.4. Цитотоксичність нітроген оксиду

У великих концентраціях NO може проявляти токсичний ефект, пов'язаний як із прямою дією на ферумвмісні ферменти, так і з утворенням сильного окисника, дуже реактивного і токсичного пероксинітриду. Добре, якщо шкідливу дію системи ($\text{NO}^\bullet + \text{O}_2^{\bullet-}$) спрямовано на токсичні мікроорганізми; погано, якщо її спрямовано на свої власні клітини і тканини. Тому в тих ділянках кров'яного русла, де виділяється NO (як необхідний регулятор кров'яного тиску), не повинно бути супероксидних радикалів. Для цього, зокрема, в цих місцях синтезується фермент СОД, який видаляє супероксид аніон-радикал.

Контрольні питання для самоперевірки знань:

1. Супероксид аніон-радикал. Утворення, властивості, біологічна роль.
2. Пероксинітрит. Утворення, властивості.
3. Гідроген пероксид. Функції сигнальної молекули.
4. Гідроксильний радикал. Реакції утворення в клітині.
5. Синглетний кисень. Його особливості як реактивної форми кисню.
6. Гіпохлорит-аніон. Властивості окисника.
7. Радикал семіхінон. Утворення з коензиму Q.
8. Оксид нітрогену. Історія відкриття, утворення, механізми дії в клітині.

Література

1. Nayyan M., Hashim M. A., AlNashef I. M. Superoxide ion: generation and chemical implications. *Chemical reviews*. 2016. Vol. 116, № 5. P. 3029–3085. DOI: 10.1021/acs.chemrev.5b00407.
2. Liu Y., Fiskum G., Schubert D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *Journal of neurochemistry*. 2002. Vol. 80, № 5. P. 780–787.
3. Murphy M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical journal*. 2009. Vol. 417, № 1. P. 1–13. DOI: 10.1046/j.0022-3042.2002.00744.x.
4. Battelli M. G., Polito L., Bortolotti M., Bolognesi A. Xanthine oxidoreductase-derived reactive species: physiological and pathological effects. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2016. Vol. 2016. DOI: 10.1155/2016/3527579.
5. Harrison R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radical Biology and Medicine*. 2002. Vol. 33, № 6. P. 774–797. DOI: 10.1016/S0891-5849(02)00956-5.
6. Bray R. C., Vänngård T. ‘Rapidly Appearing’ molybdenum electron-paramagnetic-resonance signals from reduced xanthine oxidase. *Biochemical Journal*. 1969. Vol. 114, № 4. P. 725–734. DOI: 10.1042/bj1140725.
7. Bouloumié A., Bauersachs J., Linz W., Schölkens B. A., Wiemer G., Fleming I., Busse R. Endothelial dysfunction coincides with an enhanced nitric oxide synthase expression and superoxide anion production. *Hypertension*. 1997. Vol. 30, № 4. P. 934–941. DOI: 10.1161/01.HYP.30.4.934.
8. Maghzal G. J., Krause K. H., Stocker R., Jaquet V. Detection of reactive oxygen species derived from the family of NOX NADPH oxidases. *Free Radical Biology and Medicine*. 2012. Vol. 53, № 10. P. 1903–1918. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.09.002.

9. Sedeek M., Nasrallah R., Touyz R. M., Hébert R. L. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and the kidney: friend and foe. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2013. Vol. 24, № 10. P. 1512–1518. DOI: 10.1681/ASN.2012111112.
10. Brandes R. P., Weissmann N., Schröder K. Nox family NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation. *Free Radical Biology and Medicine*. 2014. Vol. 76. P. 208–226. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.046.
11. Bedard K., Krause K. H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological reviews*. 2007. Vol. 87, № 1. P. 245–313. DOI: 10.1152/physrev.00044.2005.
12. Lubos E., Handy D. E., Loscalzo J. Role of oxidative stress and nitric oxide in atherothrombosis. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*. 2008. Vol. 13. P. 5323. DOI: 10.2741%2F3084.
13. Imlay J. A. Pathways of oxidative damage. // *Annual Reviews in Microbiology*. 2003. Vol. 57, № 1. P. 395–418. DOI: 10.1146/annurev.micro.57.030502.090938.
14. Levy M., Courtney C. M., Chowdhury P. P., Ding Y., Grey E. L., Goodman S. M., Nagpal P. Assessing different reactive oxygen species as potential antibiotics: selectivity of intracellular superoxide generation using quantum dots. *ACS Applied Bio Materials*. 2018. Vol. 1, № 2. P. 529–537. DOI: 10.1021/acsabm.8b00292.
15. Huie R. E., Padmaja S. The reaction of NO with superoxide. *Free radical research communications*. 1993. Vol. 18, № 4. P. 195–199. DOI: 10.3109/10715769309145868.
16. Pryor W. A., Squadrito G. L. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 1995. Vol. 268, № 5. P. L699–L722. DOI: 10.1152/ajplung.1995.268.5.L699.
17. Beckman J. S., Beckman T. W., Chen J., Marshall P. A., Freeman B. A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1990. Vol. 87, № 4. P. 1620–1624. DOI: 10.1073/pnas.87.4.1620.
18. Radi R., Beckman J. S., Bush K. M., Freeman B. A. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls: The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Journal of Biological Chemistry*. 1991. Vol. 266, № 7. P. 4244–4250. DOI: 10.1016/S0021-9258(20)64313-7.
19. Bartsaghi S., Radi R. Fundamentals on the biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration. *Redox biology*. 2018. Vol. 14. P. 618–625. DOI: 10.1016/j.redox.2017.09.009.
20. Radi R. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018. Vol. 115, № 23. P. 5839–5848. DOI: 10.1073/pnas.1804932115.
21. Rubbo H., Trostchansky A., O'Donnell V. B. Peroxynitrite-mediated lipid oxidation and nitration: mechanisms and consequences. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2009. Vol. 484, № 2. P. 167–172. DOI: 10.1016/j.abb.2008.11.007.

22. Cao J. An W., Reeves A. G., & Lippert A. R. A chemiluminescent probe for cellular peroxynitrite using a self-immolative oxidative decarbonylation reaction. *Chemical science*. 2018. Vol. 9, № 9. P. 2552–2558. DOI: 10.1039/C7SC05087A.
23. Winterbourn Christine C. Biological production, detection, and fate of hydrogen peroxide. *Antioxidants & redox signaling*. 2018. Vol. 29, № 6. P. 541–551. DOI: 10.1089/ars.2017.7425.
24. Bienert G. P., Møller A. L., Kristiansen K. A., Schulz A., Møller I. M., Schjoerring J. K., Jahn T. P. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *Journal of Biological Chemistry*. 2007. Vol. 282, № 2. P. 1183–1192. DOI: 10.1074/jbc.M603761200.
25. Veal E. A., Day A. M., Morgan B. A. Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Molecular cell*. 2007. Vol. 26, № 1. P. 1–14. DOI: 10.1016/j.molcel.2007.03.016.
26. Holmström K. M., Finkel T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2014. Vol. 15, № 6. P. 411–421. DOI: 10.1038/nrm3801.
27. Halliwell B., Gutteridge J. M. C. Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation An update. *FEBS letters*. 1992. Vol. 307, № 1. P. 108–112. DOI: 10.1016/0014-5793(92)80911-Y.
28. Yamazaki I. Hydroxyl radical formation in biological systems. *Quim Nova*. 1993. Vol. 16. P. 365–369.
29. Cheng F. C., Jen J. F., Tsai T. H. Hydroxyl radical in living systems and its separation methods. *Journal of Chromatography B*. 2002. Vol. 781, № 1–2. P. 481–496. DOI: 10.1016/S1570-0232(02)00620-7.
30. Von Sonntag C. The chemical basis of radiation biology. London: Taylor & Francis, 1987. P. 221–294. DOI: 10.1080/09553008714552571.
31. Kehrer J. P. The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*. 2000. Vol. 149, № 1. P. 43–50. DOI: 10.1016/S0300-483X(00)00231-6.
32. Haber F., Weiss J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A-Mathematical and Physical Sciences*. 1934. Vol. 147, № 861. P. 332–351. DOI: 10.1098/rspa.1934.0221.
33. Liochev S. I. The mechanism of «Fenton-like» reactions and their importance for biological systems. A biologist's view. *Metal ions in biological systems*. 2018. P. 1–39. DOI: 10.1201/9780203747605.
34. Goldstein S., Czapski G., Lind J., Merenyi G. Mechanism of decomposition of peroxynitric ion (O_2NOO^-): evidence for the formation of $O_2^{\bullet-}$ -and $\bullet NO_2$ radicals. *Inorganic chemistry*. 1998. Vol. 37, № 16. P. 3943–3947. DOI: 10.1021/ic980051l.
35. Triantaphylides C., Krischke M., Hoeberichts F. A., Ksas B., Gresser G., Havaux M., Mueller M. J. Singlet oxygen is the major reactive oxygen species involved in photooxidative damage to plants. *Plant physiology*. 2008. Vol. 148, № 2. P. 960–968. DOI: 10.1104/pp.108.125690.
36. Lenaz G., Fato R., Castelluccio C., Genova M. L., Bovina C., Estornell E., Castelli G. P. The function of coenzyme Q in mitochondria. *The clinical investigator*. 1993. Vol. 71, № 8. P. S66–S70. DOI: 10.1007/BF00226843.

37. Navas P., Villalba J. M., de Cabo R. The importance of plasma membrane coenzyme Q in aging and stress responses. *Mitochondrion*. 2007. Vol. 7. P. S34–S40. DOI: 10.1016/j.mito.2007.02.010.
38. Knott A., Achterberg V., Smuda C., Mielke H., Sperling G., Dunckelmann K., Blatt T. Topical treatment with coenzyme Q 10-containing formulas improves skin's Q 10 level and provides antioxidative effects. *Biofactors*. 2015. Vol. 41, № 6. P. 383–390. DOI: 10.1002/biof.1239.
39. Lancaster Jr. J. R. A Concise History of the Discovery of Mammalian Nitric Oxide (Nitrogen Monoxide) Biogenesis. *Nitric Oxide*. Academic Press, 2017. P. 1–7. DOI: 10.1016/B978-0-12-804273-1.00001-6.
40. Culotta E., Koshland Jr. D. E. NO news is good news. *Science*. 1992. Vol. 258, № 5090. P. 1862–1866. URL: <http://www.sciencemag.org>
41. Snyder S. H., Bredt D. S. Biological roles of nitric oxide. *Scientific American*. 1992. Vol. 266, № 5. P. 68–77.
42. Furchgott R. F. An historical survey and prospects of research on EDRF. *Japanese Journal of Smooth Muscle Research*. 1987. Vol. 23, № 6. P. 435–440. DOI: 10.1540/jmsr 1965.23.435.
43. To cite this section MLA style: Furchgott's sandwich. NobelPrize.org. Nobel Media AB 2019. Thu. 17 Jan 2019. URL: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1998/7551-furchgotts-sandwich>
44. Furchgott R. F. The 1989 Ulf von Euler Lecture Studies on endothelium-dependent vasodilation and the endothelium-derived relaxing factor. *Acta Physiologica Scandinavica*. 1990. Vol. 139, № 1–2. P. 257–270. DOI: 10.1111/j.1748-1716.1990.tb08923.x.
45. Furchgott R. F. Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide. *Bioscience reports*. 1999. Vol. 19, № 4. P. 235–251. DOI: 10.1023/A:1020537506008.
46. Förstermann U., Sessa W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European heart journal*. 2012. Vol. 33, № 7. P. 829–837. DOI: 10.1093/eurheartj/ehr304.
47. Lowenstein C. J., Dinerman J. L., Snyder S. H. Nitric oxide: a physiologic messenger. // *Annals of internal medicine*. 1994. Vol. 120, № 3. P. 227–237. DOI: 10.7326/0003-4819-120-3-199402010-00009.
48. Snyder S. H., Bredt D. S. Biological roles of nitric oxide. *Scientific American*. 1992. Vol. 266, № 5. P. 68–77. URL: <https://www.jstor.org/stable/24939060>
49. Parikh R., Wilson C., Weinberg J., Gavin D., Murphy J., Reardon C. C. Inhaled nitric oxide treatment in spontaneously breathing COVID-19 patients. *Therapeutic Advances in Respiratory Disease*. 2020. Vol. 14. DOI: 10.1177%2F1753466620933510.
50. Tousoulis D., Kampoli A. M., Tentolouris N. P., Stefanadis C. The role of nitric oxide on endothelial function. *Current vascular pharmacology*. 2012. Vol. 10, № 1. P. 4–18. DOI: 10.2174/157016112798829760.
51. Beckman J. S., Koppenol W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *American Journal of Physiology-cell physiology*. 1996. Vol. 271, № 5. P. C1424–C1437. DOI: 10.1152/ajpcell.1996.271.5.C1424.

ГЛАВА 4

ФЕРМЕНТАТИВНА АНТИОКСИДАНТНА СИСТЕМА ЗАХИСТУ КЛІТИНИ

Вільні активні радикали в нормі в клітині утворюються постійно, цей процес знаходиться під строгим контролем. Хімічні сполуки, що впливають на швидкість радикальних перетворень, поділяють на прооксиданти і антиоксиданти (АО). До прооксидантів, які викликають або підсилюють радикальні процеси у живій клітині, належать кисень (у високих концентраціях), ферментні системи, що генерують радикали (наприклад, ксантинооксидаза, NO-синтаза, ферменти плазматичної мембрани фагоцитів), іони Fe^{2+} тощо. АО визначають як речовину (низько- або високомолекулярну), яка у разі додавання в невеликій кількості здатна захистити сполуки від окиснення шляхом затримки, уповільнення або зупинки їх автоокиснення. Хоча таке визначення АО стосується молекули в будь-якому розчині, воно також є справедливим для біологічних систем і живих організмів. Для забезпечення максимального захисту від оксидативного стресу клітини мають добре розвинену антиоксидантну систему (АОС), яка містить різні низько- і високомолекулярні сполуки, здатні «перехоплювати» вільні радикали або нейтралізувати джерело їх виникнення.

4.1. Механізми антиоксидантного захисту

На рис. 1 представлено механізм, за яким відбувається окиснення молекулярним киснем органічних молекул, зокрема й біомолекул у складі клітин. Автоокиснення ініціюється радикалами X^{\bullet} , що реагують із субстратом (RH) (найчастіше за механізмом переносу H-атома, HAT) з утворенням алкільного радикала R^{\bullet} , який швидко перетворюється на пероксильний радикал (ROO^{\bullet}) шляхом приєднання молекулярного кисню. Пероксильний радикал ROO^{\bullet} атакує іншу молекулу субстрату, утворюючи первинний продукт окиснення – гідропероксид $ROOH$ та радикал субстрату R^{\bullet} , започатковуючи ланцюг. Ланцюгова реакція перебігає через багато циклів (стадія продовження ланцюгів, k_p), доки два радикали ROO^{\bullet} у реакції рекомбінації не обривають процес (стадія обриву, k_t). Сполуки, здатні порушити радикально-ланцюгову реакцію, називаються прямими АО. Вони поділяються на дві основні групи – профілактичні (або превентивні) АО і пастки радикалів. Профілактичні АО перешкоджають стадії ініціювання. АО-пастки радикалів розривають ланцюг і цим сповільнюють (або блокують) автоокиснення шляхом конкуренції з реакціями продовження ланцюгів. Пастки радикалів реагують із пероксильними радикалами (k_{inh}) швидше, ніж окиснювальний субстрат, і, що дуже важливо, їх продукти реакції не беруть участі в стадії продовження ланцюгів.

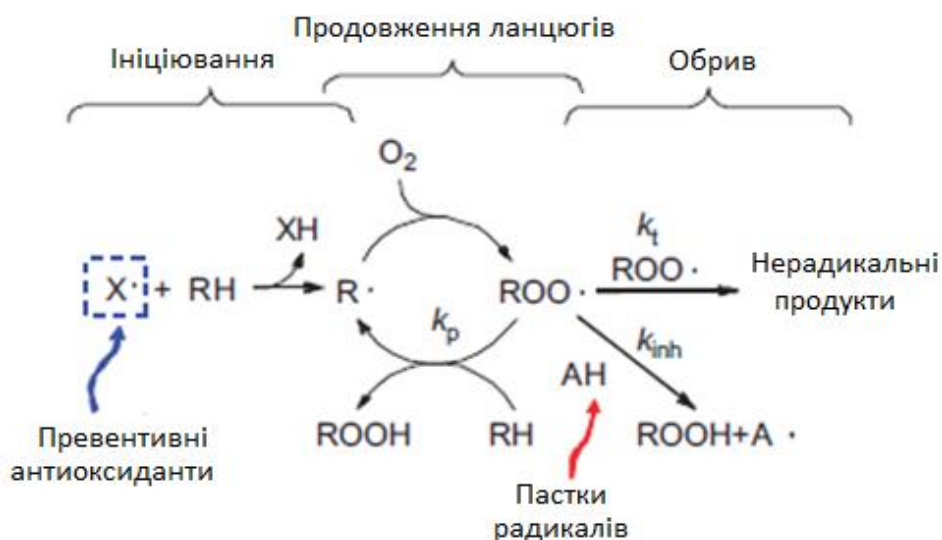


Рис. 1. Механізм автоокиснення органічних сполук [1], де k – константи швидкості реакцій

АО діють на різних рівнях. Прямі АО, як-от превентивні та радикальні пастки, ефективні на першій та другій лініях захисту клітин від АФО, а непрямі АО виконують функції ремонту та адаптації.

Перша лінія захисту – це профілактичні ферментні АО – супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, глутатіон-залежні ферменти. Сюди також відносяться хелатори металів.

Друга лінія захисту – це АО, які є пастками АФО, тобто перехоплюють радикали і відтак інгібують радикально-ланцюгові процеси. Відомі різні ендogenous та екзогенні радикальні АО: деякі є гідрофільними, а інші – ліпофільними. Вітамін С, сечова кислота, білірубін, тіоли є гідрофільними, тоді як вітаміни Е, А та убіхінон є ліпофільними радикальними АО.

Третя лінія захисту – це ремонт окиснених біоструктур. Протеолітичні ферменти – протеази та пептидази, – присутні в цитозолі та в мітохондріях клітин, розкладають і видаляють окисно-модифіковані білки та запобігають їх накопиченню. Системи репарації ДНК також відіграють важливу роль у загальній системі захисту від окисного пошкодження. Наприклад, нуклеази відновлюють пошкоджену ДНК.

Четверта лінія захисту – адаптація організму, коли сигнал для генерації АФО спонукає до утворення та транспортування відповідного АО до потрібного місця. Клітини, які не впоралися із завданням захисту від кисневої небезпеки і цим підставили під удар свій генетичний апарат, «накладають на себе руки», тобто відбувається апоптоз.

Антиоксидантні сполуки інгібують окиснення завдяки своїм властивостям донорів Гідрогену, донорів електронів або хелаторів металів.

Інгібітори (In-H) успішно конкурують із субстратами в реакціях із вільними радикалами за реакціями (1)–(3):



Взаємодія інгібітору з радикалами не приводить до зникнення вільних валентностей у системі, оскільки з'являється вільний радикал інгібітору – In^\bullet , який теоретично може реагувати з новою молекулою субстрату за реакцією (4):



але з огляду на малу активність радикала інгібітору (In^\bullet) більш вірогідним є його взаємодія з вільними радикалами за реакціями перехресної (5) або квадратичної рекомбінації (6) з утворенням молекулярних продуктів:



4.2. Ферменти антиоксидантної системи

До високомолекулярних АО належать мембранозв'язані і цитозольні ферменти (супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, глутатіонзалежні пероксидази, редуктази і трансферази). Ферменти-антиоксиданти локалізуються переважно внутрішньоклітинно і здатні перехоплювати вільні радикали, а також брати участь у розкладанні гідропероксидів нерадикальним шляхом. Ензими антирадикального захисту характеризуються високою вибірковістю дії, спрямованої проти певних радикалів, специфічністю клітинної та органної локалізації. Усі ферменти антиоксидантної системи містять в активному центрі іони металів змінної валентності, які залежно від умов виступають і як окисники, і як відновники.

4.2.1. Супероксиддисмутаза (СОД)

Супероксиддисмутаза (СОД, КФ 1.15.1.1) – один із найважливіших ферментів антиоксидантної системи захисту клітин, який каталізує реакцію дисмутації супероксид радикала з утворенням води та кисню. Уперше виділення ензиму, активність СОД, а також його важливість у процесах кисневого окиснення було описано у 1968 р. І. Фрідовичем [2].

СОД як ключовий фермент АО-захисту [3] має дуже високу каталітичну константу швидкості реакції ($\sim 10^9 \text{ M}^{-1} \times \text{c}^{-1}$). Реакція лімітована тільки частотою зіткнення супероксид аніон-радикала з ферментом (дифузійно-контрольована

реакція), завдяки чому СОД ефективно захищає клітину від шкідливої дії супероксид аніон-радикала. СОД проявляє високу термостійкість, стійкість до дії протеаз, денатуруючих агентів, працює в широкому діапазоні рН. СОД – водорозчинний фермент, тому супероксидний радикал, що генерується в мембрані і викликає процеси пероксидного окиснення ліпідів, є для неї малодоступним. СОД може бути використаний як лікарський засіб для лікування різних захворювань, що виникають внаслідок окисного стресу [4].

В організмі людини синтезується три ізоформи СОД, які дуже розрізняються за місцем локалізації, структурою і молекулярною масою, але каталізують одну реакцію дисмутації (див. табл. 1).

Таблиця 1

Характеристика ізоформ СОД у клітині

Фермент	Місце локалізації	Структура	Метал у структурі фермента	Молекулярна маса
СОД1	Цитозоль, лізосоми, пероксисоми	гомодимер	Cu^{2+} (каталітичний), Zn^{2+} (стабільний)	32,5 кДа
СОД2	Матрикс мітохондрії	гомотетрамер	Mn^{3+}	96 кДа
СОД3	Позаклітинний матрикс, клітинна поверхня	гомотетрамер	Cu^{2+} (каталітичний), Zn^{2+} (стабільний)	135 кДа

Ферментативна активність СОД передбачає відновлення і повторне окиснення каталітичного металу (тобто Cu або Mn) на активному сайті ферменту, як це показано на рис. 2.

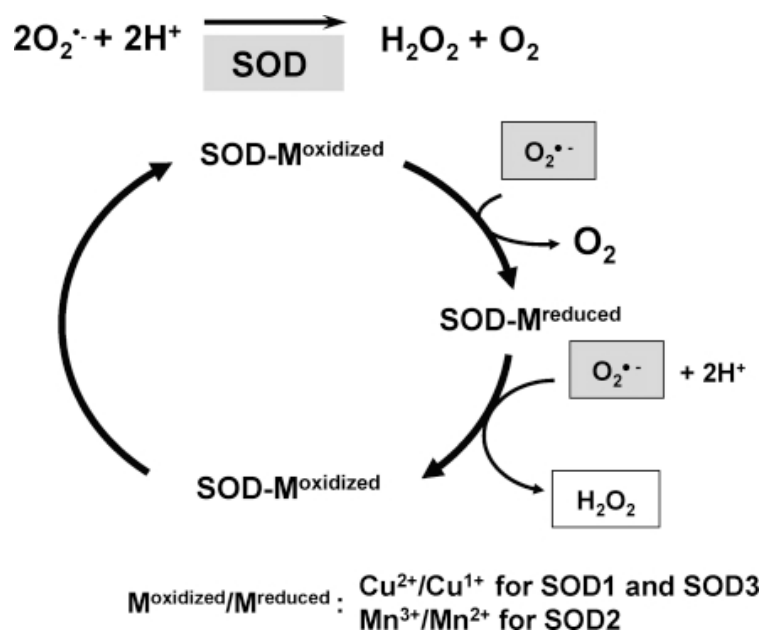


Рис. 2. Загальний механізм перехоплення $\text{O}_2^{\cdot-}$ у присутності СОД [6]

У реакції дисмутації утворюється гідроген пероксид, який здатний інактивувати СОД, тому фермент завжди «працює» в парі з каталазою, яка швидко і ефективно розщеплює гідроген пероксид на абсолютно нейтральні сполуки.

4.2.2. Каталаза

Каталаза (САТ, КФ 1.11.1.6) – гемопротейн, який каталізує реакцію знешкодження гідроген пероксиду, перетворюючи його в кисень і воду без утворення вільних радикалів (1), захищаючи цим клітини від токсичних ефектів H_2O_2 :



Каталаза – один із перших ферментів, структура яких була розшифрована. Більшість каталаз існує як тетрамери, і кожна субодиноця має довжину понад 500 амінокислот [7]. Типова гемова каталаза має велику молекулярну масу (250–300 кДа) і проявляє дуже високу каталітичну активність: одна молекула каталази може розщеплювати мільйони молекул гідроген пероксиду кожну секунду. Каталаза має в активному центрі чотири порфіринові гемові групи із Ферумом, занурені глибоко всередину структури, але доступні з поверхні через гідрофобні канали, які дають змогу ферментові вступати в реакцію з гідроген пероксидом [8]. Оптимальний рН для людської каталази становить приблизно 7. Каталаза є стійкою до розгортання, що робить її унікально стабільним ферментом до зміни рН, термічної денатурації і протеолізу. СОД і каталази мають невисоку активність відносно ліпідних пероксидів, що утворюються під час ланцюгових реакцій ПОЛ. Руйнування цих продуктів здійснюється за участі ферментативної системи глутатіону.

4.2.3. Глутатіонзалежні ферменти антиоксидантного захисту

Важливим складником антиоксидантного захисту є система глутатіону, що нейтралізує гідропероксиди ліпідів, підтримує у відновленому стані SH-групи білків та забезпечує їх функціональну активність [9]. Система глутатіону включає в себе три групи глутатіонзалежних ферментів: глутатіонпероксидази (ГП), глутатіонредуктази (ГР), глутатіонтрансферази (ГТ).

Центральний метаболіт системи – трипептид глутатіон (GSH) – γ -глутамілцистеїл-глїцин (рис. 3), який є одним з основних внутрішньоклітинних низькомолекулярних тіолвмісних сполук, що синтезуються майже в усіх клітинах. Завдяки своїй будові і високій внутрішньоклітинній концентрації (1-10 мМ) GSH виконує антиоксидантні функції, бере участь у підтримці клітинного редокс-статусу, в роботі системи детоксикації, в синтезі ейкозаноїдів, у регуляції багатьох

механізмів клітинної сигналізації, зокрема під час регуляції клітинного циклу, експресії генів, апоптозу.

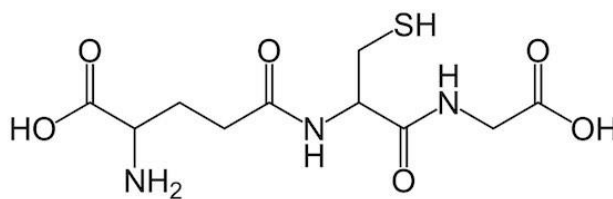
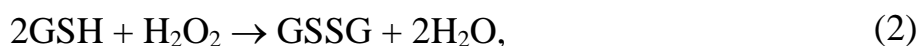


Рис. 3. Структура глутатіону

Саме наявність цистеїну у складі глутатіону обумовлює можливість існування глутатіону як у відновленій (GSH), так і в окисленій формах (GS-SG). GSH виконує функцію протектора білків, тобто речовини, що захищає білки з вільними тиольними групами SH від окиснення з утворенням дисульфідних зв'язків -S-S-. Це стосується білків, для яких такий процес є небажаним. Глутатіон у цих випадках перебирає на себе дію окисника і так «захищає» білок. При окисненні глутатіону відбувається обернене міжмолекулярне зшивання двох трипептидних фрагментів за рахунок дисульфідного зв'язка (рис. 3).

У клітинах глутатіон присутній в основному у відновленій формі, тоді як кількість GSSG не перевищує 1 % від його загального внутрішньоклітинного вмісту. Приблизно 85–90 % GSH знаходиться в цитоплазмі, але деяка його частина після синтезу в цитозолі виявляється в мітохондріях, ядрі, пероксисомах [10]. Підтримка оптимального співвідношення GSH / GSSG в клітині є важливою для її нормального функціонування і виживання. За низьких концентрацій GSH клітини існує ризик окисного пошкодження. Глутатіон постійно синтезується в печінці і виділяється в кров, звідки надходить до всіх тканин, крім еритроцитів. Виділяється відновлений глутатіон у жовч.

Глутатіонпероксидаза (КФ 1.11.1.9.) – селенвмісний фермент системи антиоксидантного захисту клітин, належить до класу оксидоредуктаз. Основна біологічна функція – каталіз реакцій відновлення гідроген пероксиду та гідропероксидів ліпідів з одночасним окисненням глутатіону [11]:



Вперше фермент був виявлений і описаний у 1957 р. Г. Міллсом під час вивчення катаболізму гемоглобіну в еритроцитах [12]. ГП міститься майже в усіх клітинах тварин, основна частка ферменту знаходиться в цитозолі – приблизно 70 %, в мітохондріях до 20–30 %. За структурою ГП є гомотетрамером, кожна його субодиниця має масу 19 кДа і містить один атом Селену,

зв'язаного з цистеїновими залишками. ГП каталізує розпад гідропероксидів ліпідів, як-от лінолева і ліноленова кислоти, холестерин [13].

У деяких тканинах (серце, мозок, легені) активність каталази низька, і тому в цих органах ГП відіграє основну роль під час розкладання гідроген пероксиду. Найбільш висока активність ГП спостерігається в печінці, еритроцитах, надниркових залозах, низька – у м'язах.

Глутатіонредуктаза (КФ 1.8.1.7) каталізує відновлення окисненого глутатіону (GSSG), використовуючи в якості відновленого еквіваленту НАДФН (5):



Окиснення глутатіону в глутатіонпероксидазній реакції поєднане з його відновленням глутатіонредуктазою і є визначальним фактором, що підтримує відновний потенціал глутатіону (рис. 4).

Глутатіон-S-трансферази (КФ 2.5.1.18) – мультифункціональні білки, які використовують GSH для кон'югації з гідрофобними речовинами, їх відновленням або ізомеризацією. Біологічна роль ГТ в організмі [14]:

а) біотрансформація ксенобіотиків RX (6):



б) розкладання токсичних продуктів пероксидного окиснення ліпідів;

в) відновлення гідропероксидів ліпідів (7):

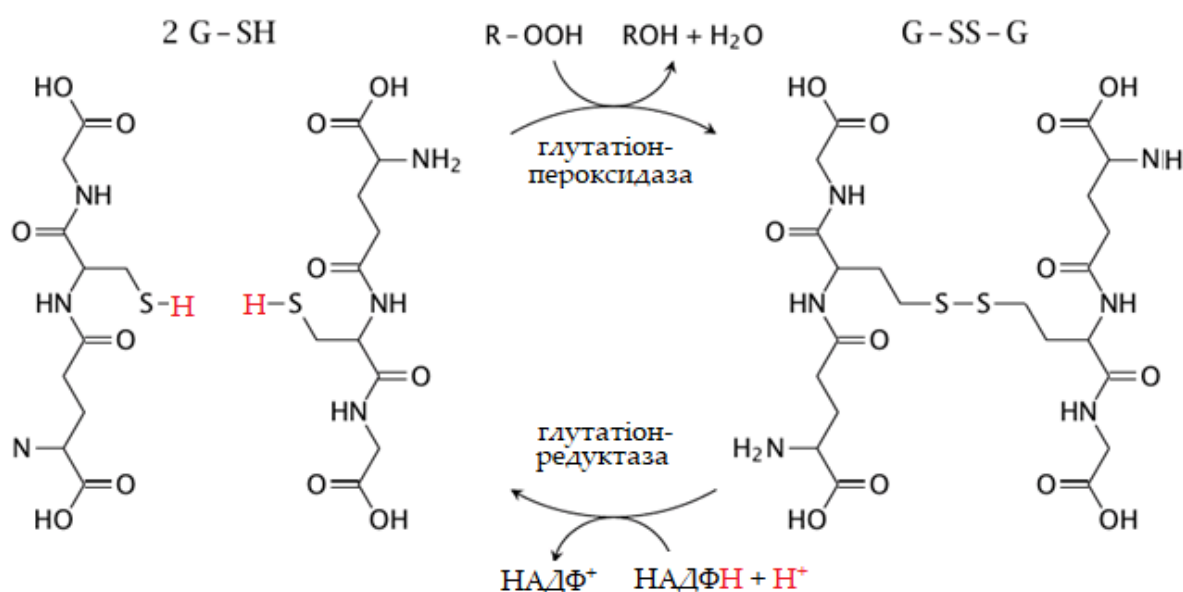


Рис. 4. Механізми дії глутатіонпероксидази та глутатіонредуктази

ГТ містяться переважно в цитоплазмі клітин і не взаємодіють з гідроген пероксидом. ГТ відновлюють тільки ROOH, але важливо, що один з ізоферментів знаходиться безпосередньо в хроматині та відновлює гідропероксида ДНК в ядрі. ГТ відновлюють гідрофобні об'ємні пероксидні сполуки: гідропероксида поліненасичених жирних кислот – ліноленової і арахідонової, а також гідропероксида мононуклеотидів.

Отже, СОД є першою лінією захисту від токсичних супероксид аніон-радикалів, які перетворюються в каталітичній реакції на H_2O_2 . Гідроген пероксид, зі свого боку, відновлюється каталазою і глутатіонпероксидазами.

Контрольні питання для самоперевірки знань:

1. Дайте визначення АО.
2. Наведіть механізм радикально-ланцюгового окиснення органічних сполук. Які основні стадії включає процес автоокиснення?
3. Як поділяють АО за механізмом дії?
4. Ферментативні АО. СОД. Ізоформи СОД. Реакція дисмутації супероксид аніон-радикала.
5. Каталаза. Знешкодження гідроген пероксиду.
6. Глутатіонзалежні ферменти антиоксидантного захисту.

Література

1. Amorati R., & Valgimigli L. Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants. *Free radical research*. 2015. Vol. 49, № 5. P. 633–649. DOI: 10.3109/10715762.2014.996146.
2. McCord J. M., Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemoglobin. *Journal of Biological Chemistry*. 1969. Vol. 244, № 22. P. 6049–6055. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)63504-5.
3. Islam M. N., Rauf A., Fahad F. I., Emran T. B., Mitra S., Olatunde A., Mubarak M. S. Superoxide dismutase: an updated review on its health benefits and industrial applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2021. P. 1–19. DOI: 10.1080/10408398.2021.1913400.
4. Younus H. Therapeutic potentials of superoxide dismutase. *International journal of health sciences*. 2018. Vol. 12, № 3. P. 88–93.

5. Fukai T., Ushio-Fukai M., Fukai T., Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxidants & redox signaling*. 2011. Vol. 15, № 6. P. 1583–1606. DOI: 10.1089/ars.2011.3999.
6. Fukai T., Ushio-Fukai M., Fukai T., Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxidants & redox signaling*. 2011. Vol. 15, № 6. P. 1583–1606. DOI: 10.1089/ars.2011.3999.
7. Chelikani P., Fita I., Loewen P. C., Chelikani P., Fita I., Loewen P. C. Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 2004. Vol. 61, № 2. P. 192–208. DOI: 10.1007/s00018-003-3206-5.
8. Zámocký M., Koller F. Zámocký M., Koller F. Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. *Progress in biophysics and molecular biology*. 1999. Vol. 72, № 1. P. 19–66. DOI: 10.1016/S0079-6107(98)00058-3.
9. Yan F., Yang W. K., Li X. Y., Lin T. T., Lun Y. N., Lin F., Mu Y. A trifunctional enzyme with glutathione S-transferase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2008. Vol. 1780, № 6. P. 869–872. DOI: 10.1016/j.bbagen.2008.03.003.
10. Green R. M., Graham M., O'Donovan M. R., Chipman J. K., Hodges N. J. M. Subcellular compartmentalization of glutathione: correlations with parameters of oxidative stress related to genotoxicity. *Mutagenesis*. 2006. Vol. 21, № 6. P. 383–390. DOI: 10.1093/mutage/gel043.
11. Wendel A. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*. 1981. Vol. 77. P. 325–333. DOI: 10.1016/S0076-6879(81)77046-0.
12. Mills G. C. Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *Journal of Biological Chemistry*. 1957. Vol. 229, № 1. P. 189–197. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)70608-X.
13. Кулинский В. И., Колесниченко Л. С. Система глутатиона 1. Синтез, транспорт глутатионтрансферазы, глутатионпероксидазы. *Биомедицинская химия*. 2009. Т. 55, В. 3. С. 255–277.
14. Armstrong R. N. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chemical Research in Toxicology*. 1997. Vol. 10. P. 2–18. DOI: 10.1021/tx960072x.

ГЛАВА 5

НЕФЕРМЕНТАТИВНА СИСТЕМА АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ

Для захисту клітин від вільних радикалів організм має добре розвинену ферментативну АОС. Однак антиоксидантні ферменти не завжди виконують свою функцію всередині клітини, оскільки їх синтез знаходиться під генетичним контролем і інтенсифікується під впливом низки зовнішніх факторів. Велика молекулярна маса молекул ензимів перешкоджає їх виходу за межі клітин або навпаки – потраплянню всередину клітини. Супероксид аніон-радикал, гідроген пероксид та інші АФО можуть утворюватись або мігрувати з клітини в міжклітинний простір і в плазму крові, де вони не знищуються за допомогою ферментів, оскільки сироватка крові та рідини тканин бідні на СОД, каталазу та глутатіон-пероксидазу. У цих умовах антиоксидантну функцію виконує неферментативна система, яка включає велику кількість низькомолекулярних компонентів: вітаміни А, С і Е, тіоли, гормон мелатонін тощо. Ці речовини локалізуються як у водній (водорозчинні АО), так і в ліпідній (жиророзчинні АО) фазах клітини.

5.1. Вітаміни-антиоксиданти

Вітамін Е (α-токоферол) – один із найпоширеніших і потужних природних антиоксидантів. Це ліпофільна молекула, здатна інгібувати вільно-радикальні процеси безпосередньо у гідрофобному шарі мембран [1, 2]. Основні джерела вітаміну Е: рослинні олії, зелені листові овочі та трави, бобові, горіхи, висівки. Розрізняють 8 типів токоферолів, але α-токоферол є найбільш активним. Вітамін Е віддає Н-атом пероксильному радикалові ліпідів, відновлюючи його до гідропероксиду і відтак зупиняє розвиток ПОЛ (рис. 1).

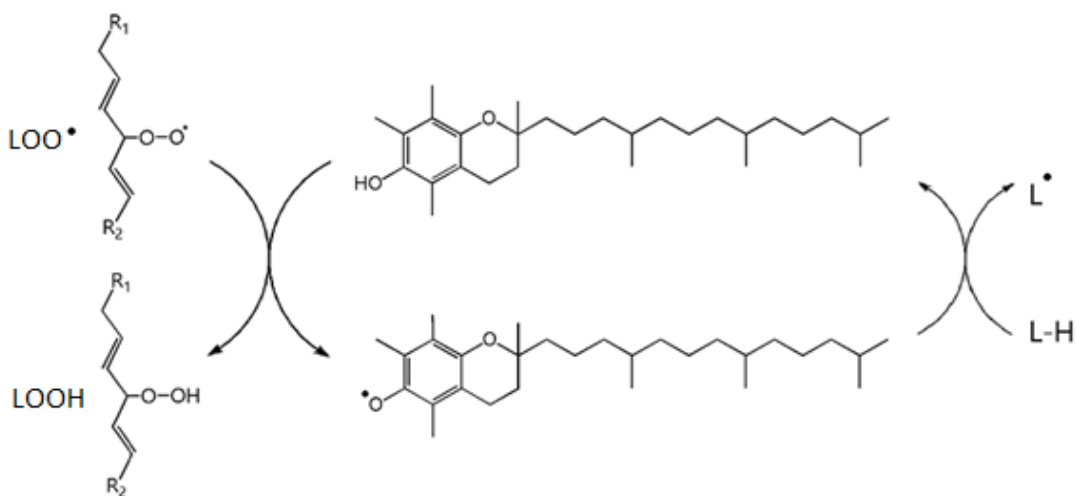


Рис. 1. Механізм перехоплення пероксильних радикалів ліпідів (LOO^{\bullet}) α -токоферолом

Однак радикали α -токоферолу можуть також ініціювати вільнорадикальне окиснення ненасичених ліпідів (ЛН), як це показано на рис. 1. Реалізація подібної реакції в організмі становить певну небезпеку, оскільки викликає окисну модифікацію ліпопротеїдів низької щільності, внаслідок чого вони стають більш атерогенними. Реальна небезпека подібних перетворень існує, тому в організмі діє потужна система регенерації α -токоферолу. Основну роль у цих процесах відіграє аскорбінова кислота.

Вітамін С (аскорбінова кислота) є ефективним гідрофільним антиоксидантом і бере участь у захисті клітин від АФО внаслідок реалізації двох різних механізмів [3; 4]. По-перше, вітамін С як гідрофільний вітамін і сильний відновник взаємодіє з водорозчинними АФО ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , $\bullet OH$) та перехоплює їх у водних середовищах, як-от плазма або цитозоль. Але гідрофільність вітаміну С робить антиоксидант нездатним проникати в біологічні мембрани, а отже, – запобігати ПОЛ. Друга антиоксидантна роль вітаміну С полягає у відновленні α -токоферолу, який окиснюється внаслідок нейтралізації вільних радикалів (рис. 1). Вітамін С відновлює окиснену форму вітаміну Е і так підтримує необхідну концентрацію цього антиоксиданту безпосередньо в мембранах клітин [5]. Як показано на рис. 2, аскорбат редукує α -токоферольний радикал, перетворюючись на аскорбіл-радикал, який зазнає подальшого відновлення до дегідроаскорбінової кислоти. Утворена кислота не проявляє антиоксидантної активності, але за участі глутатіонредуктази відновлює первинну форму вітаміну Е.

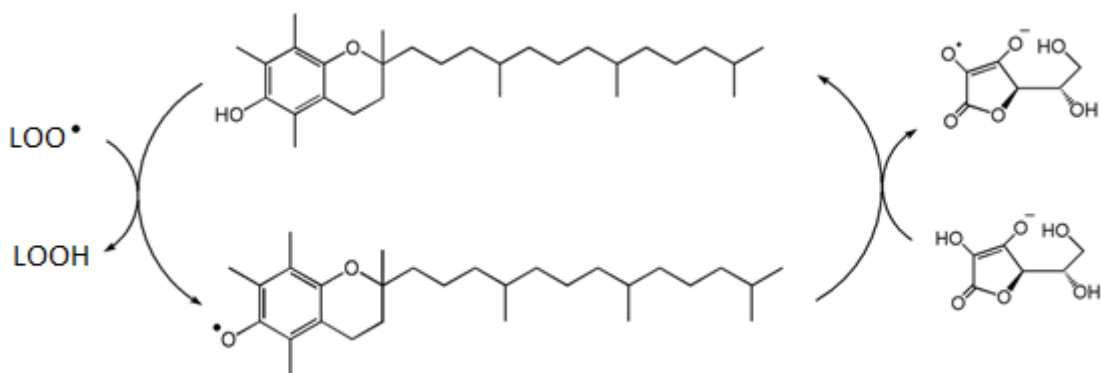


Рис. 2. Синергетична антиоксидантна дія вітамінів А і С

Представлена на схемі система регенерації токоферолу виключає перебіг побічних реакцій токоферол-радикала, що обумовлює високу антирадикальну активність вітаміну Е шляхом перешкоджання розвитку ланцюгів ПОЛ.

β -Каротин, попередник вітаміну А. У 1984 р. Бертон та Інгольд [6] повідомили в журналі Science, що β -каротин може бути ефективним ліпідним антиоксидантом, здатним переривати ланцюги ПОЛ за низьких концентрацій кисню.

Це привело до широких досліджень каротиноїдів як важливих дієтичних антиоксидантів, що мають очевидні переваги для здоров'я людини [7].

До групи яскраво забарвлених каротиноїдів входить більше ніж 600 сполук, які синтезуються клітинами рослин та бактерій. Найбільшу біологічну активність проявляє β -каротин, оскільки він має два іононові кільця і під час розщеплення у кишечнику за участі каротин-діоксигенази у присутності молекулярного кисню з нього утворюються дві молекули вітаміну А (ретинол). Основні джерела вітаміну А: риб'ячий жир, вершкове масло, червоні коренеплоди, овочі і фрукти. Відомо, що вітамін А бере участь у фотохімічному акті зору, поділі та диференціюванні клітин, у синтезі хондроїтинсульфату.

Каротиноїди є ліпофільними молекулами, які ефективно перехоплюють пероксильні радикали, тому відіграють важливу роль у захисті клітинних мембран та ліпопротеїнів від АФО. Висока антиоксидантна активність каротиноїдів обумовлена їх специфічною хімічною структурою, а саме наявністю висококон'югованих подвійних зв'язків. Механізм перехоплення радикалів ліпідів представлено на рис. 3 [8]:

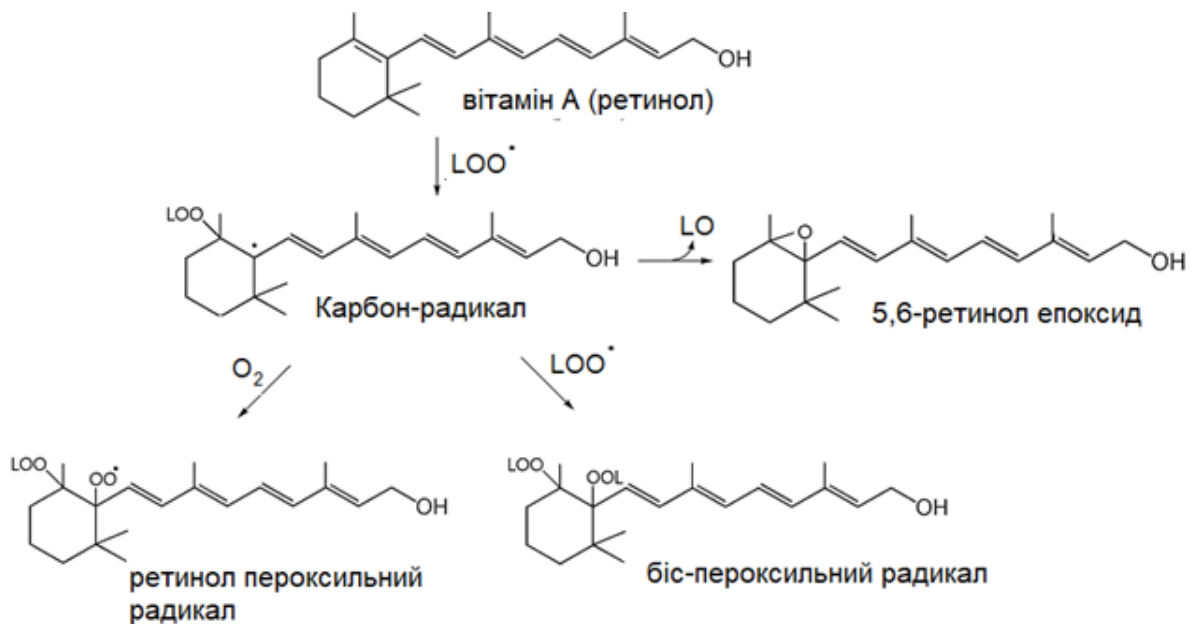


Рис. 3. Механізм антиоксидантної дії вітаміну А

Утворені пероксильні радикали вітаміну А є менш агресивними, ніж радикали ліпідів (LOO^\bullet), однак слід зазначити, що високі концентрації пероксидів можуть викликати окиснювальну ланцюгову реакцію в каротиноїдах, серйозно вплинути на біологічну дію каротиноїдів і надати їм прооксидантних, а не антиоксидантних властивостей.

5.2. Флавоноїди

Флавоноїди – це велика група біологічно активних сполук, які за хімічною природою є поліфенолами. Флавоноїди є фітохімічними речовинами, які синтезуються рослинами і мають високу цінність для здоров'я людини [9, 10]. Поліфеноли здатні перехоплювати і видаляти вільні радикали, жертвуючи Н-атоми для їх стабілізації. До того ж поліфеноли проявляють антибактеріальні і протипухлинні властивості, можуть регулювати кількість оксиду нітрогену, викликати апоптоз, пригнічувати проліферацію клітин. У клітинах тварин і людини флавоноїди не синтезуються, і їх присутність у тканинах повністю залежить від споживання рослинних продуктів. У нашому раціоні рослинні фенольні речовини в основному містяться у фруктах, овочах, злаках та напоях.

Молекули флавоноїдів містять два ароматичні кільця (А і В), які з'єднані через три карбонові атоми. Залежно від структури остова молекули і замісників виділяють флавани, флавони, флавоноли, флаванони, флаваноноли, ізофлавоноли (ізофлавоноїди), халкони, антоціани, аурони, неофлавоноїди, біфлавоноїди тощо.

У молекулах флавоноїдів є три області, які найбільшою мірою відповідальні за реалізацію антиоксидантних властивостей флавоноїдів (рис. 4):

1. Дві сусідні гідроксильні групи В-кільця, так звана катехольна група.
2. Подвійний зв'язок С-кільця, кон'югований з 4-оксо групою.
3. Гідроксильні групи в положеннях 3 і 5, які беруть участь у перехопленні радикалів.

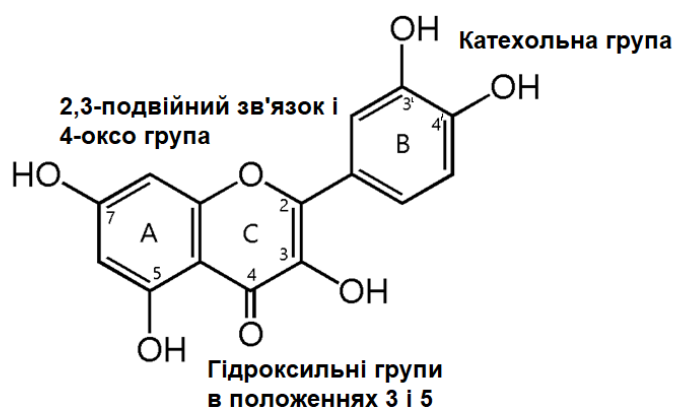


Рис. 4. Групи, найбільшою мірою відповідальні за антиоксидантний потенціал флавоноїдів

Флавоноїди можуть реалізувати свій антиоксидантний ефект через такі механізми:

1. Пряме перехоплення АФО.

Реакції флавоноїдів з вільними радикалами перебігають за НАТ механізмом:



де $\text{R}^\bullet - \text{O}_2^{\bullet-}, \text{RO}^\bullet, \text{ROO}^\bullet, \text{HO}^\bullet$.

Утворений феноксильний радикал (Fl-O^\bullet) надалі може реагувати з наступним радикалом з утворенням стабільних хіноїдних структур.

2. Активація клітинних ферментів-антиоксидантів.

3. Хелатування перехідних металів.

Флавоноїди ефективно хелатують іони металів змінної валентності, які відіграють важливу роль у кисневому обміні. Вільний Ферум та Купрум можуть каталізувати розпад гідроген пероксиду з утворенням високоагресивного гідроксильного радикала, тому зв'язування іонів металів з утворенням комплексів є важливим проявом антиоксидантних властивостей флавоноїдів. Можливі сайти зв'язування металів з флавоноїдами являють собою фрагмент катехолу в кільці В, 3-гідроксил, 4-оксо групи в гетероциклічному кільці та 4-оксо, 5-гідроксильна групи між гетероциклічним кільцем та кільцем А (рис. 4). Однак основний внесок у хелатування металів реалізується за рахунок катехольного фрагмента флавоноїдів.

4. Редукція α -токоферольних радикалів.

5. Посилення антиоксидантних властивостей через синергетичну дію з іншими низькомолекулярними антиоксидантами.

5.3. Мелатонін – гормон-антиоксидант

Гормони – це біологічно активні речовини органічної природи, які виробляються у спеціалізованих клітинах залоз внутрішньої секреції, потім надходять у кров, зв'язуються з рецепторами клітин-мішеней і регулюють обмін речовин і фізіологічні функції. Гормони слугують гуморальними (переносяться з кров'ю) регуляторами певних процесів у різних органах і системах. Гормональна система відповідає за ріст, розвиток, репродуктивну функцію організму, водно-сольовий обмін, адаптаційні процеси. Деякі гормони проявляють антиоксидантну активність і захищають клітини від АФО. Це гормони щитовидної залози, гормони кори надниркових залоз, чоловічі (андрогени) і жіночі (естрогени) статеві гормони, гормон мелатонін.

Мелатонін – гормон сну – має виражену здатність зв'язувати АФО, зокрема й гідроксильні радикали. Мелатонін може локалізуватися не тільки у плазмі крові, але і в ядрах клітин і захищати макромолекули ядра від оксидативного ушкодження [11]. Отже, основні функції антиоксидантної дії мелатоніну спрямовані на захист ДНК, і меншою мірою на захист білків і ліпідів [12].

Відомо, що мелатонін регулює секрецію інсуліну і покращує метаболізм глюкози, а також захищає клітини підшлункової залози від шкідливої дії АФО [13]. До того ж цей гормон є універсальним адаптогеном, знижує стресові реакції організму різного походження (міжсезонні депресії, «синдром хронічної втоми»), регулює сон, відновлює біоритми людини. Секреція мелатоніну підпорядкована добовому ритму і залежить від освітленості – надлишок світла знижує його утворення. У людини на нічні години припадає 70 % добової продукції гормону. Мелатонін взаємодіє з АФО за таким механізмом (рис. 6) [14]:

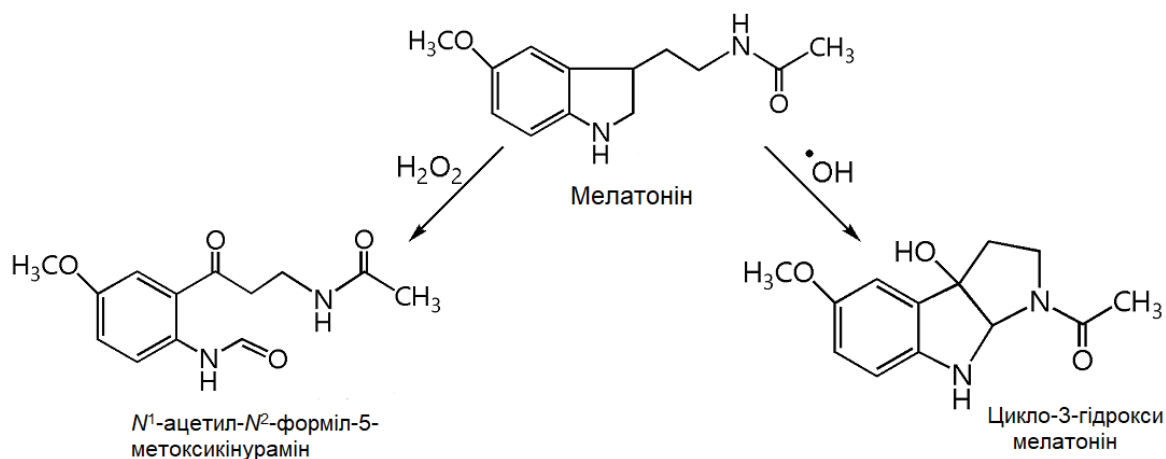


Рис. 6. Механізми антиоксидантної дії мелатоніну

Із рис. 6 видно, що мелатонін перехоплює гідроксильні радикали, водночас відбувається циклізація з утворенням цикло-3-гідроксимелатоніну. А під час взаємодії з гідроген пероксидом спостерігається розкриття п'ятичленного циклу гормону до N¹-ацетил-N²-форміл-5-метоксикінураміну.

5.4. Убіхінон, сечова кислота як ендogenous антиоксиданти

Убіхінон (коензим Q10) присутній у всіх живих клітинах тварин, рослин, грибів і мікроорганізмів. Звідси його назва «убіхінон», або «всюдисущий хінон». У середині клітин убіхінон локалізований в основному в мітохондріях, і відіграє значну роль у генерації енергії, виконуючи роль мобільного носія електронів у ланцюзі транспорту електронів.

Поza мітохондріями він діє як ефективний гідрофобний антиоксидант, перехоплює вільні радикали, а під час взаємодії з іншими антиоксидантами, включно з вітаміном E, спостерігається синергетичний ефект їх дії [15]. Убіхінон є одним

із найбільш важливих антиоксидантів, оскільки він виробляється клітинами організму. Ще однією вагомою особливістю CoQ10 є здатність постійно і самостійно відновлювати свою антиоксидантну активність, тобто з окисленої форми (убіхінон Q10) переходить у відновлену форму (Глава 2, рис. 8). На відміну від α -токоферолу, убіхінон не є вітаміном, тваринні організми синтезують його в достатніх кількостях. Утворені в процесі функціонування окиснені форми убіхінону відновлюються аскорбіною кислотою і редуктазами.

Сечова кислота – це водорозчинний антиоксидант, тому антиоксидантні ефекти сечової кислоти виявляються лише у гідрофільному середовищі біологічних рідин, як-от плазма. Сечова кислота перехоплює пероксинітрит (ONOO^-) у позаклітинній рідині, але не може перехоплювати $\text{O}_2^{\bullet-}$. Утворений радикал сечової кислоти (рис. 7) відновлюється до вихідної форми аскорбіною кислотою або тіолами.

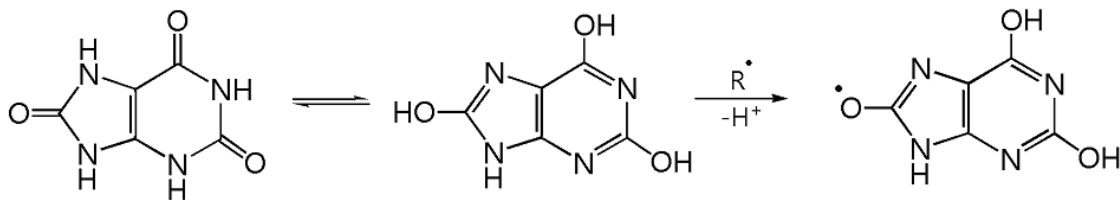
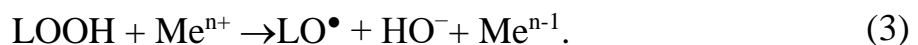


Рис. 7. Механізм антиоксидантної дії сечової кислоти

5.5. Хелатори іонів металів змінної валентності

Особливе місце в антиоксидантному захисті організму займають хелатори іонів металів змінної валентності, що зв'язують ці іони, перешкоджаючи їх каталітичній дії в утворенні АФО.

Іони металів змінної валентності каталізують розпад гідроген пероксиду (2) і ліпопероксидів (LOOH) (3) з утворенням високореактивних вільних радикалів – гідроксильного і алкоксильного (LO^{\bullet}):



Хелатні сполуки, що зв'язують іони металів змінної валентності (феритин, трансферин, церулоплазмін, молочна і сечова кислоти), є важливими складниками антиоксидантної системи організму, оскільки нейтралізують основні каталізатори вільнорадикального окиснення в організмі.

Церулоплазмін – мідьвмісний білок (глікопротеїн), присутній у плазмі крові. Церулоплазмін містить приблизно 95 % загальної кількості Купруму сироватки крові людини. Захисна дія цього білка пояснюється його здатністю зв'язувати іони Fe^{2+} і каталізувати їх окиснення до Fe^{3+} . Така властивість окиснювати іони Fe^{2+} , а також перехоплювати радикали HO^{\bullet} робить його ефективною пасткою вільних радикалів, що циркулюють у крові.

До природних антиоксидантів відносяться також:

Трансферин – білки плазми крові, які здійснюють транспорт іонів Fe^{2+} .

Феритин – глобулярний білковий комплекс, що складається з 24 субодиниць і виконує роль основного внутрішньоклітинного депо Fe^{2+} . Завдяки феритину цитозольні запаси Fe^{2+} підтримуються в розчинній і нетоксичній формі.

Карнозин (бета-аланіл-L-гістидин) – дипептид, що складається із залишків амінокислот бета-аланіну і гістидину. Карнозин виявлено у високих концентраціях у м'язах і тканинах мозку. Доведено активність карнозину у видаленні АФО, а також ненасичених альдегідів, що утворюються під час окиснення жирних кислот клітинних мембран у процесі окиснювального стресу.

Тіоредоксини – білки з масою приблизно 12 кДа. Вони мають специфічну третинну структуру з двома розташованими поруч залишками цистеїну, що обумовлює ефективність тіоредоксину під захисті білкових молекул від токсичної дії АФО.

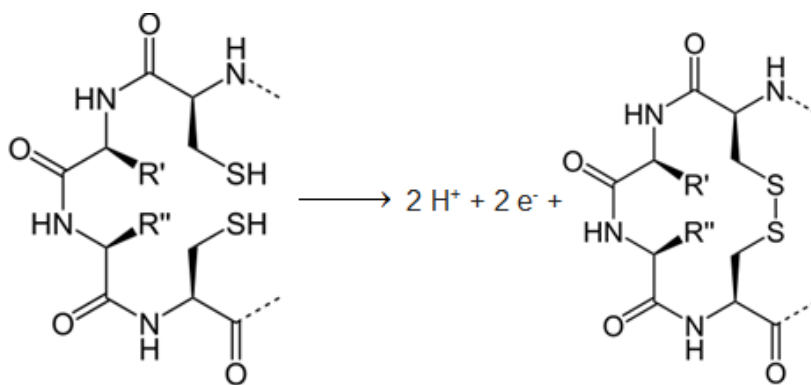


Рис. 8. Схема окиснення тіоредоксину

Отже, складна багатокомпонентна антиоксидантна система (АОС), основні компоненти якої наведено в табл. 1, є своєрідним буфером, що перешкоджає переходу продуктів окиснення з фізіологічного в патологічний стан.

Вплив екстремальних факторів позначається на стані як неферментативної, так і ферментативної частин АОС. Збій у роботі АОС і зниження її ефективності можуть бути викликані не тільки падінням рівня антиоксидантів або пригніченням антиоксидантних ферментів, але і блокуванням процесів під час дії, наприклад, метаболічних отрут чи інших факторів. До того ж, незважаючи на

синергізм дії окремих її компонентів, під час інтенсивної генерації АФО може відбуватися виснаження АОС.

Таблиця 1

Складники АОС

Антиоксидант	Характеристика
Супероксиддисмутаза	вилучає $O_2^{\bullet-}$ з утворенням H_2O_2
Каталаза	розкладає H_2O_2 до води та кисню
Глутатіонпероксидаза	видаляє H_2O_2 завдяки окисненню глутатіону; видаляє гідропероксили ліпідів
Глутатіонредуктаза	відновлює окиснений глутатіон
Глутатіонтрансфераза	знешкоджує ксенобіотики (зокрема канцерогенів і мутагенів); відновлює гідропероксили ліпідів
Церулоплазмін	окиснює Fe^{2+} до Fe^{3+}
Апо-білок трансферин	зв'язує Fe^{3+}
Ферритин	окиснює Fe^{2+} і депонує Fe^{3+}
Карнозин	зв'язує Fe^{2+}
Токоферол, вітамін А	перехоплює радикали ліпідів
Тироксин, статеві гормони	перехоплюють радикали ліпідів
Мелатонін	захищає ДНК від дії радикалів
Аскорбінова кислота	регенерує окиснені токоферол і убіхінон; перехоплює водорозчинні АФО
Глутатіон	субстрат окисно-відновних циклів GSH, видаляє гідроксильні радикали та синглетний кисень, бере участь у відновленні гідропероксидів
Убіхінон	перехоплює радикали ліпідів
Ферменти – протеази, пептидази, ДНК-репарази, лігази	третинна лінія захисту (ферменти) починають функціонувати, коли вже сталися окиснювальні пошкодження і з'являється необхідність швидкого видалення і відновлення пошкоджен- них клітинних структур

Контрольні питання для самоперевірки знань:

1. Вітаміни-антиоксиданти. Класифікація, механізми антиоксидантної дії.
2. Флавоноїди. Структура, механізми антиоксидантної дії.
3. Гормони-антиоксиданти. Механізми дії.
4. Убіхінон, сечова кислота як ендogenousні низькомолекулярні антиоксиданти.
5. Хелатори іонів металів змінної валентності як превентивні антиоксиданти.

Література

1. Azzi A. Reflections on a century of vitamin E research: Looking at the past with an eye on the future. *Free Radical Biology and Medicine*. 2021. Vol. 175. P. 155–160. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2021.07.042.
2. Ranjha M. M. A Critical Review on Alpha Tocopherol: Sources. *RDA And Health Benefits*. 2020. Vol. 12. P. 19–42. DOI: 10.21065/19204159.12.39.
3. Padayatty S. J., Katz A., Wang Y., Eck P., Kwon O., Lee J. H., Levine M. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *Journal of the American college of Nutrition*. 2003. Vol. 22, № 1. P. 18–35. DOI: 10.1080/07315724.2003.10719272.
4. Bendich A., Machlin L. J., Scandurra O., Burton G. W., Wayner D. D. M. The antioxidant role of vitamin C. *Advances in Free Radical Biology & Medicine*. 1986. Vol. 2, № 2. P. 419–444. DOI: 10.1016/S8755-9668(86)80021-7.
5. Im S., Nam T. G., Lee S. G., Kim Y. J., Chun O. K., Kim D. O. Additive antioxidant capacity of vitamin C and tocopherols in combination. *Food science and biotechnology*. 2014. Vol. 23, № 3. P. 693–699. DOI: 10.1007/s10068-014-0094-4.
6. Burton G. W., Ingold K. U. Beta-carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science*. 1984. Vol. 224, № 4649. P. 569–573. DOI: 10.1126/science.6710156.
7. Britton G. Carotenoid research: History and new perspectives for chemistry in biological systems. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2020. P. 158699. DOI: 10.1016/j.bbalip.2020.158699.
8. Nimse S. B., Pal D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC advances*. 2015. Vol. 5, № 35. P. 27986–28006. DOI: 10.1039/C4RA13315C.
9. Pietta P. G. Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*. 2000. Vol. 63, № 7. P. 1035–1042. DOI: 10.1021/np9904509.
10. Panche A. N., Diwan A. D., Chandra S. R. Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*. 2016. Vol. 5. DOI: 10.1017/jns.2016.41.
11. Hacısevki A., Baba B. An overview of melatonin as an antioxidant molecule: a biochemical approach. *Melatonin molecular biology, clinical and pharmaceutical approaches*. 2018. P. 59–85. DOI: 10.1016/S0891-5849(98)00168-3.
12. Antunes F., Barclay L. R. C., Ingold K. U., King M., Norris J. Q., Scaiano J. C., Xi F. On the antioxidant activity of melatonin. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999. Vol. 26, № 1–2. P. 117–128. DOI: 10.1016/S0891-5849(98)00168-3.
13. Lardone P., Alvarez-Sanchez N., Guerrero J., Carrillo-Vico A. Melatonin and glucose metabolism: clinical relevance. *Current pharmaceutical design*. 2014. Vol. 20, № 30. P. 4841–4853. DOI: 10.5772.intechopen.79421.
14. Reiter R. J., Tan D. X., Rosales-Corral S., Galano A., Zhou X. J., Xu B. Mitochondria: central organelles for melatonin's antioxidant and anti-aging actions. *Molecules*. 2018. Vol. 23, № 2. P. 509. DOI: 10.3390/molecules23020509.
15. Hernández-Camacho J. D., Bernier M., López-Lluch G., Navas P. Coenzyme Q10 supplementation in aging and disease. *Frontiers in physiology*. 2018. Vol. 9. P. 44. DOI: 10.3389/fphys.2018.00044.

ГЛАВА 6

ПЕРОКСИДНЕ ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ

Мішенями АФО в окиснювальних реакціях є біомолекули різної природи у складі клітин та позаклітинного матриксу. Особливо небезпечна руйнівна дія АФО щодо чотирьох основних типів біополімерів живих організмів: *ліпідів, білків, нуклеїнових кислот і вуглеводів*, що становлять основу структурно функціональної організації живої матерії.

Серед первинних механізмів ушкодження клітин під час окиснювального стресу лідирує окиснення ліпідів. Ліпіди клітин – це суміш різних класів і типів молекул, як-от фосфоліпіди, тригліцериди, ефіри холестерину тощо, які присутні в мембранах клітин, у біологічних тканинах та рідині живих організмів. Пероксидне окиснення ліпідів (ПОЛ) – це фізіологічний процес, який відбувається у всіх аеробних клітинах і є життєво необхідною ланкою метаболічного обміну. Основні фізіологічні функції ПОЛ полягають у такому:

1. Оновлення складу і підтримка функціональних властивостей біомембран, наприклад, регуляція проникності клітинних мембран.
2. Біосинтез простагландинів, лейкотрієнів і тромбоксанів, який здійснюється через стадію пероксидних похідних арахідонової кислоти – поліненасиченої жирної кислоти у складі фосфоліпідів біомембран.
3. Регуляція активності мембранозв'язаних ферментів.

Під час порушення балансу анти- і прооксидантних систем у бік підвищення останніх розвивається оксидативний стрес, який характеризується надмірним утворенням вільних радикалів. Окисне пошкодження макромолекул (нуклеїнових кислот, білків, ліпідів) – це основний прояв окисного стресу. Вільні радикали ініціюють процеси ПОЛ, наслідком яких є зниження гідрофобності фосфоліпідів, порушення стійкості мембран, лізис клітин, інактивація мембранозв'язаних ферментів, підвищення проникності мембран для іонів тощо [1]. Процеси ПОЛ сьогодні розглядаються як основні молекулярні механізми окиснювального ушкодження клітинних структур, що призводять до загибелі клітин [2, 3].

6.1. Механізм пероксидного окиснення ліпідів

Основним субстратом для вільнорадикальних реакцій у клітинах є молекули поліненасичених жирних кислот (ПНЖК), які у клітинних мембранах знаходяться у складі фосфоліпідів і гліколіпідів. Велика кількість фосфоліпідів з ПНЖК також присутні в оболонці ліпопротеїдів високої, низької і дуже низької щільності. До складу фосфоліпідів клітин людини найчастіше входять

залишки насичених (стеаринова, пальмітинова) та ненасичених (арахідонова, олеїнова, лінолева і ліноленова) вищих жирних кислот. Насичені жирні кислоти надходять в організм із їжею, а також утворюються шляхом біосинтезу. Ненасичені кислоти – олеїнова, лінолева, ліноленова і арахідонова – не утворюються в організмі людини: вони надходять лише з їжею, тому їх називають незамінними.

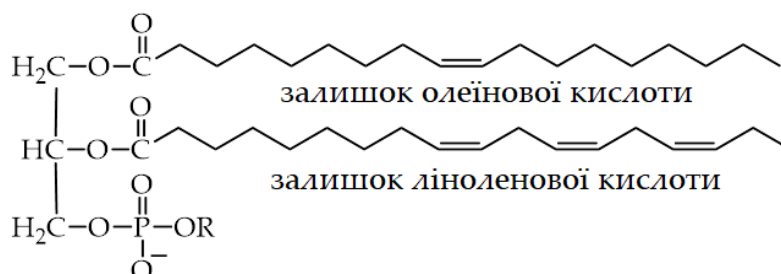


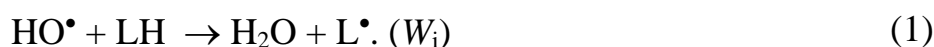
Рис. 1. Структура фосфоліпиду

Одна з гідроксильних груп фосфорної кислоти зазвичай етерифікована нітрогенвмісною сполукою: аміноспиртом (коламіном, холіном), амінокислотою (серином) або циклічним шестиатомним спиртом інозитолом.

Процес ПОЛ можна розділити на чотири етапи:

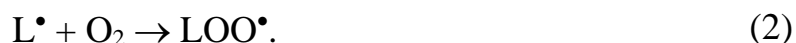
I-й етап – ініціювання

На початковій стадії зародження ланцюгів із валентнонасичених молекул ліпідів (позначені як LH) утворюються вільні радикали (L^\bullet). Найчастіше в ініціюванні приймає участь радикал гідроксилу HO^\bullet , який легко відриває H-атом від C-H зв'язків. Ця невелика за розміром незаряджена частинка, здатна проникати в товщу гідрофобного ліпідного шару і вступати в хімічну взаємодію з ПНЖК, що входять до складу біологічних мембран і ліпопротеїдів плазми крові. Водночас утворюються ліпідні C-центровані радикали (1):

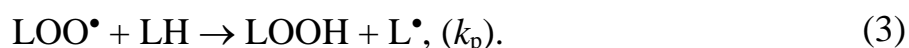


II-й етап – продовження ланцюгів

В аеробних умовах ліпідний радикал (L^\bullet) дуже швидко реагує з розчиненим у середовищі молекулярним киснем, водночас утворюється новий вільний радикал – пероксильний радикал ліпідів (LOO^\bullet) (2):



Пероксильний радикал атакує одну з сусідніх молекул фосфоліпідів з утворенням гідропероксидів ліпідів $LOOH$ і нового радикала L^\bullet (3):



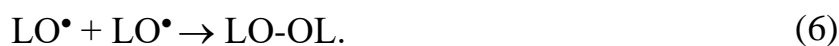
Чергування двох останніх реакцій і є ланцюговою реакцією пероксидації ліпідів. Істотне прискорення ПОЛ спостерігається в присутності невеликих кількостей іонів Fe^{2+} . У цьому випадку відбувається розгалуження ланцюгів внаслідок взаємодії Fe^{3+} з гідропероксидами ліпідів за реакцією Габера–Вейсса (4):



Алкокси-радикал LO^\bullet також може відривати Н-атом від молекули ліпиду, тобто робить свій внесок у стадію продовження ланцюгів.

III-й етап – розрив зв'язків Карбон-Карбон в α -положенні до подвійного зв'язка гідропероксидів, внаслідок чого утворюються еноли й альдегіди, які надалі можуть окиснюватись або взаємодіяти з нуклеофільними сполуками.

IV-й етап – обрив ланцюгів через реакцію рекомбінації пероксильних та алкоксирадикалів (5)–(6):



Загальний механізм ПОЛ під час окиснення ПНЖК представлено на рис. 1 на прикладі лінолевої кислоти. Як видно зі схеми окиснення, у стадії ініціювання радикали атакують метиленову групу ($-CH_2-$) кислоти в біс-алілійному положенні між двома ізольованими подвійними зв'язками. Внаслідок відриву Н-атома гідроксильним радикалом утворюється ліпідний алкільний радикал L^\bullet (1), який стабілізований резонансними структурами внаслідок спряження неспареного електрона з подвійними зв'язками, тобто утворюється дієновий радикал. У стадії продовження відбувається ланцюгова реакція з подальшим утворенням радикалів. Радикал L^\bullet реагує з киснем до пероксильного радикала LOO^\bullet , який може взаємодіяти з іншою молекулою кислоти з утворенням гідропероксиду та нового алкільного радикала L^\bullet . Так відбувається ланцюгова реакція, цикл перезапускається і пошкоджується все більше жирних кислот. Первинним продуктом ПОЛ є гідропероксид жирної карбонової кислоти з кон'югованими подвійними зв'язками. Накопичення гідропероксидів має принципове значення для перебігу процесів ПОЛ. Енергія О-О зв'язка у 2-3 рази менша від енергії С-С або С=С зв'язків, тому гідропероксиди ліпідів легко розкладаються з утворенням більш стабільних вторинних продуктів – високотоксичних ненасичених альдегідів, наприклад, 4-гідрокси-2-ноненаля, дієнових кон'югатів, кетонів тощо [4, 5].

Утворені в процесі ПОЛ радикали можуть взаємодіяти між собою до молекулярних продуктів (реакції (6)–(7)), але в реальних умовах у біологічних системах через низькі концентрації радикалів вірогідність таких реакцій дуже мала,

тому радикали з великими швидкостями реагують із молекулами субстратів або інгібіторів, які завжди присутні в клітині або позаклітинному матриксі. На відміну від вільних радикалів, альдегіди, що утворюються в процесах ПОЛ, є стабільними сполуками, здатними дифундувати на великі відстані. До того ж утворені альдегіди є надзвичайно реактивними електрофільними сполуками. В основі пошкоджуючої дії ендогенних альдегідів лежить їх здатність ковалентно модифікувати макромолекули (наприклад, утворення основ Шиффа) і, як наслідок, змінювати структуру біологічних мембран.

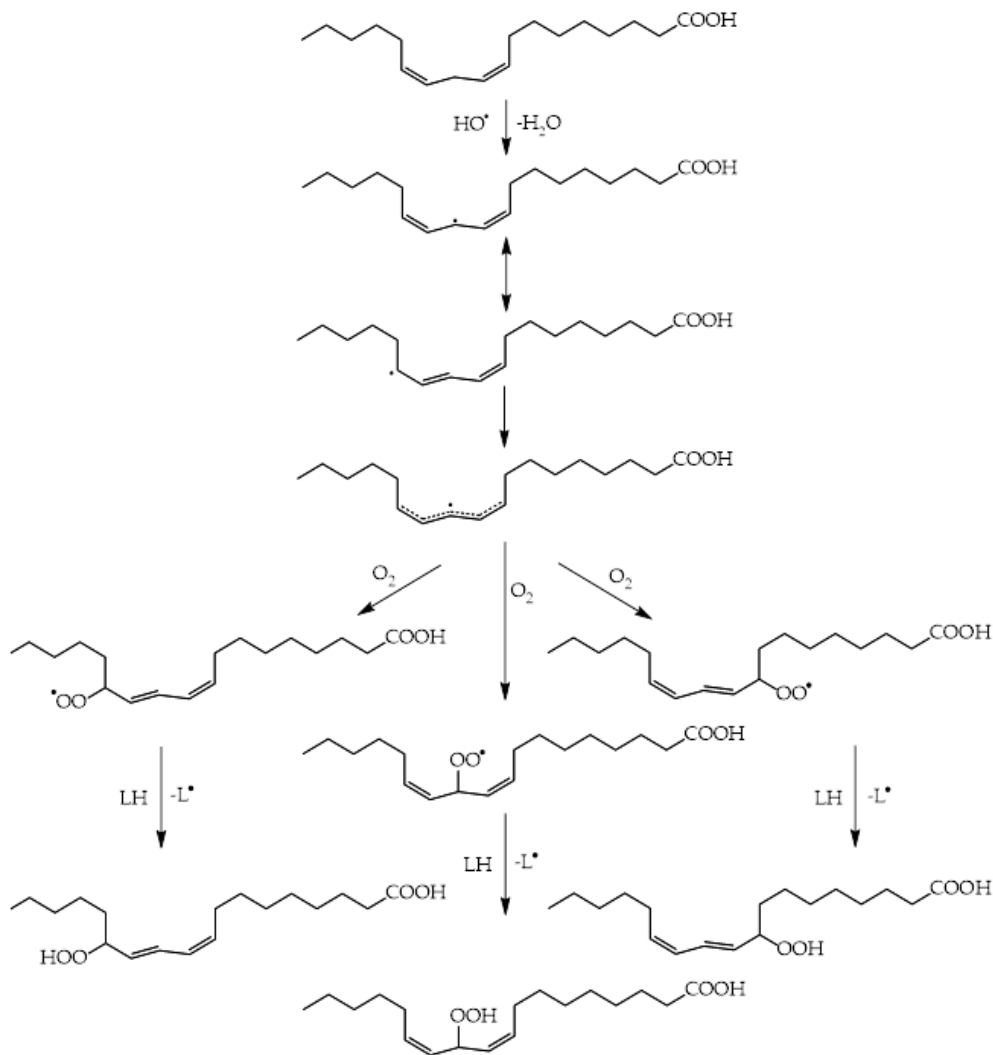


Рис. 1. Механізм пероксидного окиснення лінолевої кислоти до первинних продуктів – гідропероксидів [6]

Слід зауважити, що мононенасичені кислоти (наприклад, олеїнова) окиснюються за іншим механізмом, а для насичених кислот такий процес є термодинамічно несприятливим. Саме невисока енергія С-Н зв'язке в біс-алільних та алільних положеннях, порівняно з метиленовим (310 і 360 проти ~ 400 кДж/ моль, відповідно), а також резонансна стабілізація радикального інтермедіата сприяють легкості окиснення ненасичених жирних кислот.

6.2. Окиснення арахідонової кислоти

Однією з важливих кислот клітинних мембран є арахідонова кислота. Вона містить 20 карбонових атомів і має просторову конфігурацію у формі «шпильки» з 4-ма *цис*-подвійними зв'язками (рис. 3). Високі концентрації арахідонової кислоти виявлено в мозку і м'язах. Арахідонова кислота більш чутлива до окиснення, ніж лінолева, оскільки має три *біс*-алільні позиції, які є можливими сайтами для початкової атаки АФО. У процесі вільнорадикального окиснення арахідонової кислоти беруть участь два ферменти – циклооксигеназа та ліпооксигеназа [7]. Під час окиснення за участю циклооксигенази одночасно з окисненням відбувається циклізація з утворенням циклічних ендо-пероксидів і формуванням п'ятичленного кільця. Пероксиди, як нестійкі сполуки, швидко руйнуються, і в ліпідах утворюється величезна суміш продуктів з гідроксильними та кетогрупами, зокрема ізопростани і малоновий діальдегід (МДА), які використовуються як біомаркери ПОЛ *in vivo*. Рис. 2 демонструє один з можливих шляхів окислювального перетворення арахідонової кислоти під дією АФО:

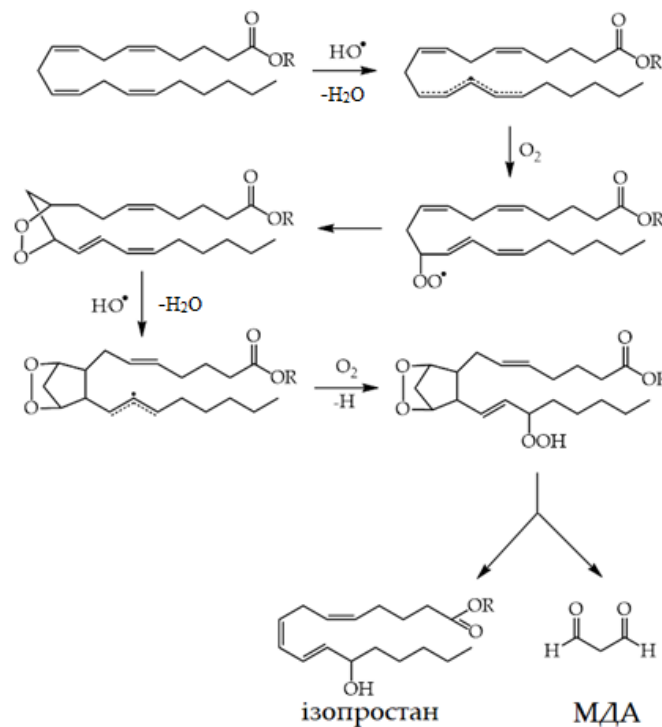


Рис. 2. Пероксидне окиснення арахідонової кислоти

Арахідонова кислота бере участь у передачі клітинних сигналів і є попередником біологічно активних речовин: простагландинів, тромбоксанів, лейкотрієнів – продуктів пероксидного окиснення. Простагландини регулюють обмін речовин у клітинах організму, тобто є «клітинними гормонами». Відомо, що

вони впливають на процеси згортання крові, знижують кров'яний тиск, пригнічують виділення шлункового соку тощо. Найважливішою властивістю простагландинів є їх здатність стимулювати скорочення гладкої мускулатури. Тромбоксани стимулюють агрегацію тромбоцитів. Лейкотрієни регулюють функції лейкоцитів, зокрема стимулюють фагоцитоз, впливають на тонус гладких м'язів.

Найбільш реактивним продуктом пероксидного окиснення поліненасичених кислот з трьома і більше подвійними зв'язками є МДА [8] (рис. 2). МДА утворює ковалентні зв'язки з NH_2 -групами білків та інших молекул, взаємодіє з азотистими основами у складі нуклеїнових кислот з формуванням перехресних зв'язків між нуклеотидами, що призводить до мутацій ДНК [9]. У кінцевому підсумку після окисної атаки в білках з'являються поперечні зшивки всередині однієї молекули, а також між різними білками, між білками і фосфоліпідами (рис. 3). Через це активність ферментативних білків змінюється, можливості структурних і скорочувальних білків зменшуються, мембранні білки деформуються і проникність мембран зростає.

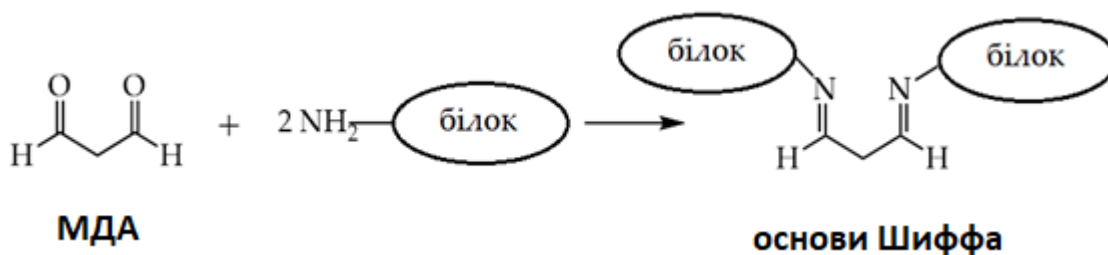


Рис. 3. Утворення основ Шиффа під час взаємодії аміногруп білка та малонового діальдегіду

6.3. Біологічні наслідки ПОЛ

Ліпіди є основним компонентом клітинних мембран, у яких відбувається безліч біохімічних процесів і які забезпечують взаємодію клітини із зовнішнім середовищем. Накопичення продуктів ПОЛ у мембрані призводить до зміни її фізико-хімічних властивостей і впливає на мембранозв'язані білки, які виконують важливі функції. Метаболічні продукти ПОЛ можуть накопичуватися у тканинах і рідинах організму, якщо антиоксидантна система не встигає утилізувати їх з необхідною швидкістю.

Сьогодні найбільш вивченими є два прямі наслідки ПОЛ.

Перший наслідок – зміна гідрофобності і стабільності мембран з втратою бар'єрних функцій. Під дією радикалів у мембранах розриваються ланцюги

ПНЖК, формуються ліпід-ліпідні або ліпід-білкові перехресні зв'язки, утворюються гідропероксиди, ізопростани, ненасичені альдегіди і кетони. Такі процеси призводять до втрати стабільності мембран, впливають на поділ і ріст клітин.

Як видно з рис. 4, утворена гідрофільна полярна пероксильна група рухається до поверхні мембрани («плаваючі пероксильні радикали»). Внаслідок такої дифузії відбувається зниження гідрофобності мембран, збільшується іонна проникність ліпідного бішару, в цитоплазму заходять іони Кальцію, які пошкоджують клітинні структури.

Внаслідок зменшення стабільності ліпідного шару відбувається електричний пробій мембрани під дією різниці електричних потенціалів, що існують на мембранах живої клітини. Електричний пробій призводить до повної втрати мембраною її бар'єрних функцій.

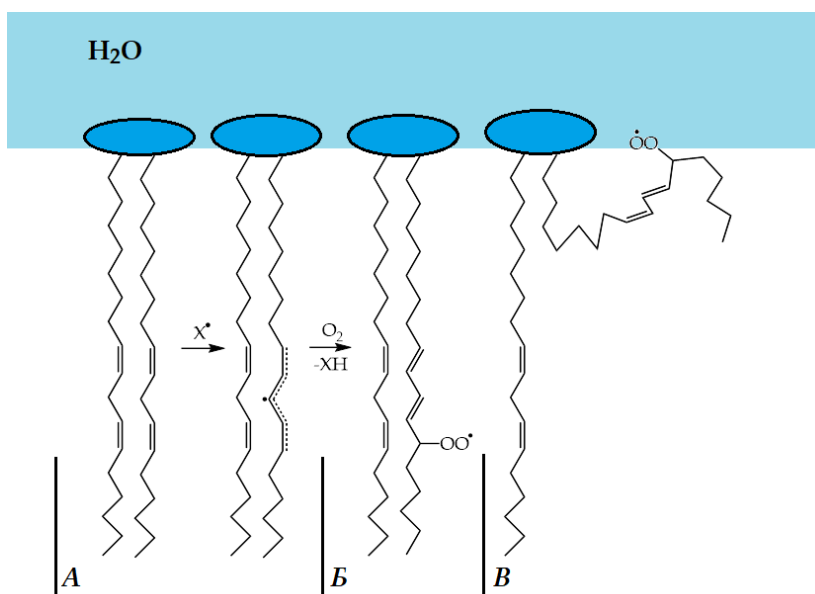


Рис. 4. Схема пероксидного окиснення фосфоліпиду:

A – утворення алкільного радикала фосфоліпиду.

Б – утворення пероксильного радикала.

В – дифузія гідрофільного пероксильного радикала до поверхні мембрани [10]

Другий наслідок – зміна роботи мембранозв'язаних білків. ПОЛ супроводжується окисненням тіолових груп мембранних білків. Процес включає неферментативні реакції SH-груп з вільними радикалами ліпідів (7). Водночас генеруються тійльні радикали ($R-S^{\bullet}$), які потім взаємодіють з утворенням дисульфідів (8) або окиснюються киснем до похідних сульфенової кислоти (9):

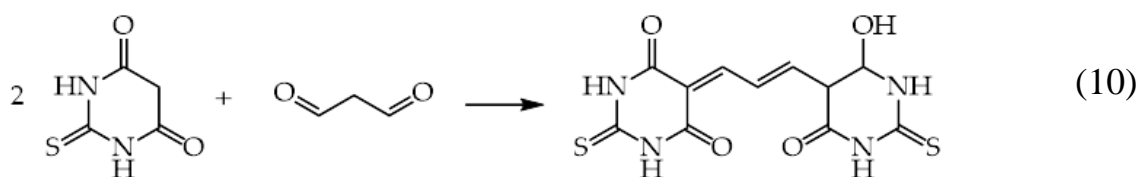




Пов'язана з ПОЛ трансформація білків і утворення білкових агрегатів у кришталіку ока закінчуються його помутнінням. Цей процес відіграє негативну роль у розвитку катаракти очей.

6.4. Аналіз продуктів ПОЛ

Під час ПОЛ формується величезна кількість продуктів окиснення [11]. Вони можуть бути визначені різними методами. Найбільш поширеним серед них є оцінка альдегідних продуктів за їх здатністю реагувати з тіобарбітуровою кислотою (ТБА) з утворенням забарвленого комплексу, концентрацію якого визначають спектрофотометрично. У кислих умовах і за високих температур (~100 °C) ТБА і МДА реагують у співвідношенні 2 : 1, утворюючи аддукт рожевого кольору (10) з сильним поглинанням за умови 532 нм.



Хоча цей аналіз чутливий і широко розповсюджений, він є неспецифічним через можливу взаємодію ТБА з іншими карбонільними сполуками, присутніми у біологічних зразках. Тому цей метод необхідно поєднувати з оцінкою інших продуктів ПОЛ, як-от кон'юговані дієни, гідропероксиди ліпідів, окремі альдегіди тощо [11].

Контрольні питання для самоперевірки знань:

1. Які основні стадії процесу ПОЛ?
2. На прикладі лінолевої та арахідонової кислот наведіть механізм пероксидного окиснення ПНЖК.
3. Як проявляється токсична дія МДА?
4. Наведіть основні біологічні наслідки ПОЛ.
5. Який метод застосовують для визначення МДА?

Література

1. Yin H., Xu L., Porter N. A. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chemical reviews*. 2011. Vol. 111, № 10. P. 5944–5972. DOI: 10.1021/cr200084z.
2. Repetto M., Semprine J., Boveris A. Lipid peroxidation: chemical mechanism, biological implications and analytical determination. *Lipid peroxidation*. 2012. Vol. 1. P. 3–30. DOI: 10.5772/45943.
3. Ayala A., Muñoz M. F., Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2014. Vol. 2014. DOI: 10.1155/2014/360438.
4. Mihaljević B., Tartaro I., Ferreri C., Chatgililoglu C. Linoleic acid peroxidation vs. isomerization: a biomimetic model of free radical reactivity in the presence of thiols. *Organic & biomolecular chemistry*. 2011. Vol. 9, № 9. P. 3541–3548. DOI: 10.1039/C1OB05083D.
5. Lü J. M., Lin P. H., Yao Q., Chen C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2010. Vol. 14, № 4. P. 840–860. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2009.00897.x.
6. Yaakob Z., Narayanan B. N., Padikkaparambil S. A review on the oxidation stability of biodiesel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2014. Vol. 35. P. 136–153. DOI: 10.1016/j.rser.2014.03.055.
7. Gaschler M. M., Stockwell B. R. Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and biophysical research communications*. 2017. Vol. 482, № 3. P. 419–425. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2009.00897.x.
8. Pizzimenti S., Ciamporcerio E. S., Daga M., Pettazzoni P., Arcaro A., Cetrangolo G., Barrera G. Interaction of aldehydes derived from lipid peroxidation and membrane proteins. *Frontiers in physiology*. 2013. Vol. 4. P. 242. DOI: 10.3389/fphys.2013.00242.
9. Niedernhofer L. J., Daniels J. S., Rouzer C. A., Greene R. E., Marnett L. J. Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2003. Vol. 278, № 33. P. 31426–31433. DOI: 10.1074/jbc.M212549200.
10. Buettner G. R. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1993. Vol. 300, № 2. P. 535–543. DOI: 10.1006/abbi.1993.1074.
11. Zielinski Z. A., Pratt D. A. Lipid peroxidation: kinetics, mechanisms, and products. *The Journal of organic chemistry*. 2017. Vol. 82, № 6. P. 2817–2825. DOI: 10.1021/acs.joc.7b00152.

ГЛАВА 7

ОКСИДАТИВНА ТРАНСФОРМАЦІЯ БІЛКІВ І ПЕПТИДІВ ПІД ДІЄЮ АКТИВНИХ ФОРМ ОКСИГЕНУ

Білки є основними компонентами більшості біологічних систем і становлять приблизно 70 % сухої маси клітин та тканин. Процес їх окисної модифікації під впливом АФО має складний і специфічний характер через різноманітність хімічної будови білків та особливості їх структурної організації. Водночас утворюється велика кількість продуктів окиснення радикальної і нерадикальної природи [1]. Окисне пошкодження білків може бути пов'язане з первинними порушеннями або самого скелета поліпептидного ланцюга, або трансформацією окремих амінокислотних залишків. Розділити ці процеси можна суто умовно. Фактично всі амінокислоти можуть піддаватись окисдаивній трансформації під дією АФО, але найбільш чутливими до окиснення є сульфурвмісні (метіонін, цистеїн) і ароматичні (гістидин, триптофан, тирозин і фенілаланін) амінокислотні залишки білків.

7.1. Механізми окисдаивної модифікації білків під впливом АФО

Під час дії АФО відбувається порушення нативної конформації білків, яке супроводжується такими процесами: (А) розгортання (часткове або повне) білка; (Б) розщеплення ланцюга з втратами амінокислот та (С) утворення білкових агрегатів через зшивання білків з суттєвим збільшенням молекулярної маси (рис. 1). Окиснення і розгортання ланцюгів амінокислоти в деяких випадках є оборотними.

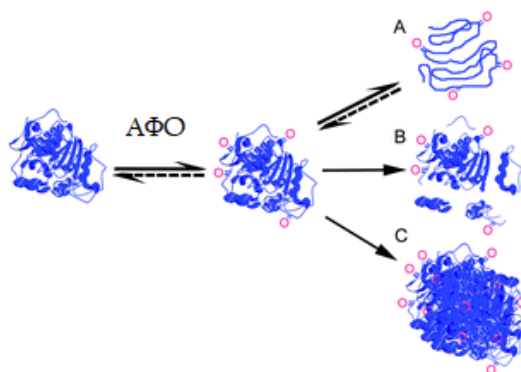


Рис. 1. Вплив АФО на структуру білкової молекули [2]

Вільні радикали атакують білки по всій довжині поліпептидного ланцюга і порушують не тільки третинну структуру білків, а й вторинну і первинну. Це призводить до зміни функціональної активності, аж до повної інактивації білкових молекул [3]. Модифікація і деградація останніх відбувається за такими механізмами:

- 1) фрагментація молекул;

- 2) внутрішньо-і міжмолекулярні ковалентні зшивки;
- 3) окиснення простетических груп білків;
- 4) оксидативна модифікація бічних груп амінокислотних залишків.

7.1.1. Фрагментація поліпептидних ланцюгів

α -Карбоновий атом у складі поліпептидного ланцюга (RH) є одним з головних центрів для атаки АФО (найчастіше гідроксильним радикалом). На першій стадії (рис. 2 (a)) відбувається відрив Н-атома від третинного С-атома з утворенням алкільного радикала **1**, який швидко взаємодіє з молекулярним киснем (b) до пероксильного радикала **2**. Реакція (c) є стадією продовження ланцюгів, яка приводить до утворення гідропероксиду білка **3** та алкільного радикала **1**. Гідропероксид відновлюється під час взаємодії з Fe (II) або Cu (I) за механізмом Габера–Вейсса (d) до алкоксирадикала **4**, який, зі свого боку, може брати участь у реакції продовження ланцюгів (e) з утворенням гідроксипохідних **5**. Фрагментація поліпептидного ланцюга може перебігати різними шляхами ((f) і (g)) до карбонільних і амідних сполук, які є основними продуктами пероксидної деструкції білкової молекули.

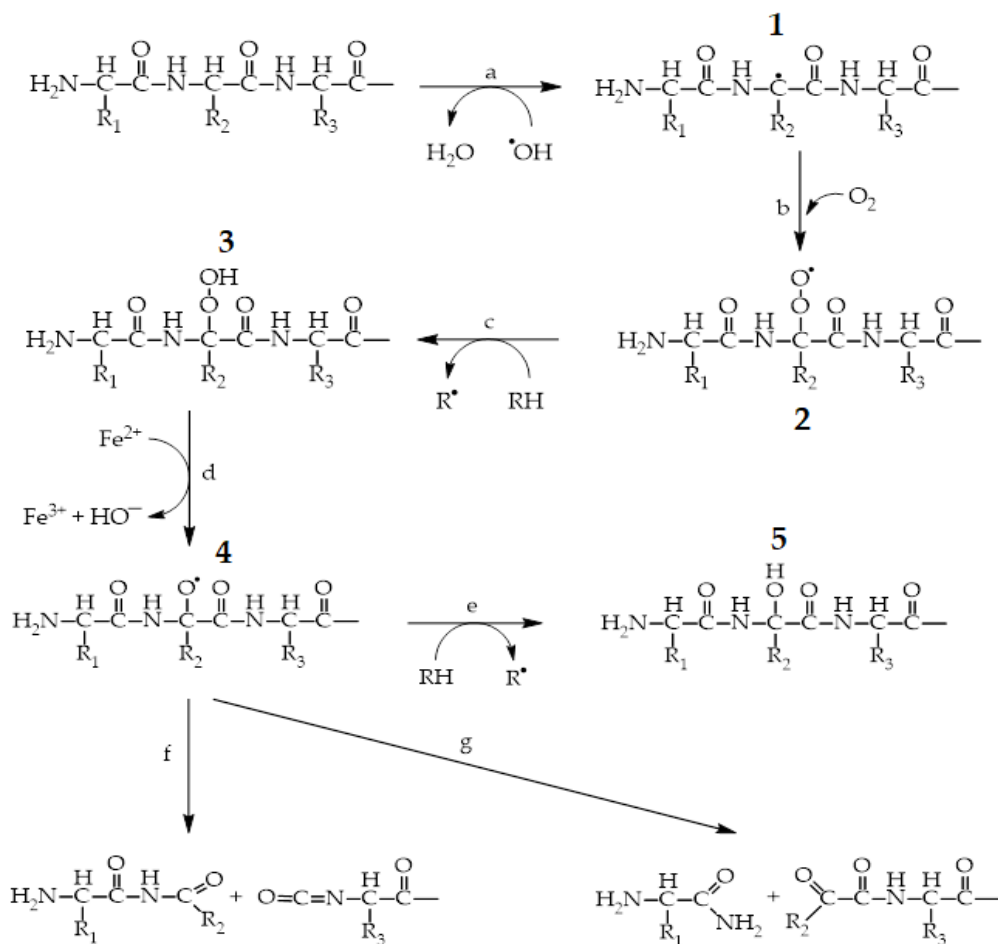
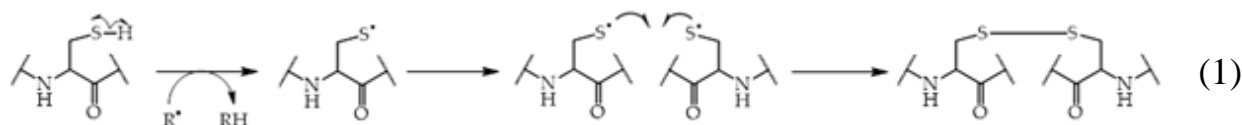


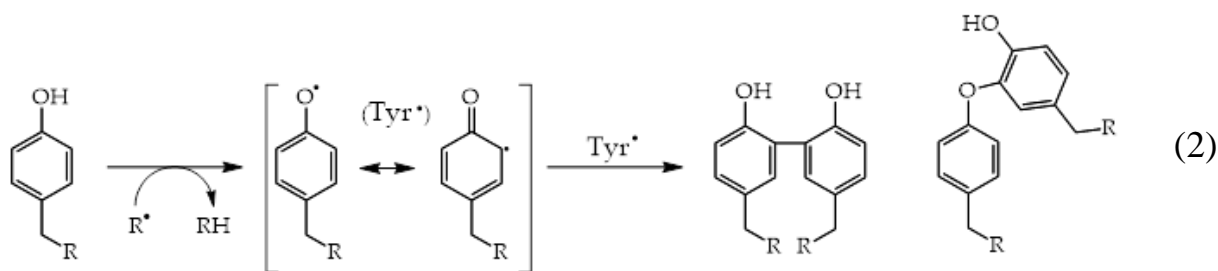
Рис. 2. Механізм фрагментації поліпептидних ланцюгів

7.1.2. Внутрішньо- і міжмолекулярні ковалентні зшивки

Основним джерелом поперечних зв'язків у пептидах і білках є *рекомбінація двох радикалів* з утворенням нового ковалентного зв'язка. Такі реакції зазвичай відбуваються дуже швидко через низькі енергетичні бар'єри. Прикладом міжмолекулярних ковалентних зшивок під час окисдатовної модифікації білків є утворення дисульфідних зв'язків. Під час атаки радикалами цистеїнових залишків (RSH) утворюються тільні радикали (RS[•]), які рекомбінують один з одним, формуючи S-S-зв'язки (1) [4]. Дисульфідні містки можуть виникати як усередині поліпептидного ланцюга, так і між різними поліпептидними ланцюгами:



Наступним прикладом окиснювальної модифікації протеїнів під впливом АФО є утворення внутрішньо- і міжмолекулярних зшивок через рекомбінацію тирозил-радикалів (Tyr[•]), що утворюються або внаслідок безпосередньої взаємодії АФО з тирозиновим залишком (3) або через гідроксилування фенілаланіну [5]:



Реакції рекомбінації за участі алкокси- та пероксирадикалів, що утворюються під час атаки вільними радикалами поліпептидних ланцюгів, також приводять до утворення зшивок. Слід зауважити, що С-центровані радикали (1) (рис. 2), генеровані внаслідок реакцій відриву Н-атома, в реакціях рекомбінації не беруть участі, оскільки дуже швидко реагують з O₂ в дифузійно-контрольованими швидкостями ($k \sim 10^9 \text{ M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$) з утворенням пептидних або білкових пероксильних радикалів (3) (рис. 2).

Внутрішньо- і міжмолекулярні ковалентні зшивки можуть формуватись також внаслідок реакцій між двома молекулами. Константи швидкості таких реакцій значно нижчі, ніж для реакцій рекомбінації радикалів, однак концентрації реагентів часто досить високі, отже, загальні швидкості цих реакцій можуть бути значними, а вихід продуктів більшим, ніж для описаних вище процесів. До такого типу реакцій належать ковалентні зшивання між поліпептидними ланцюгами за рахунок основ Шиффа, що утворюються внаслідок взаємодії

альдегідних похідних деяких амінокислотних залишків (внаслідок їх окиснювальної модифікації) з NH₂-групами білків (4). Такі реакції характерні також для токсичного МДА (глава 6, рис. 3), який може ковалентно зв'язуватися з аміногрупами двох різних білків, особливо на залишках лізину.



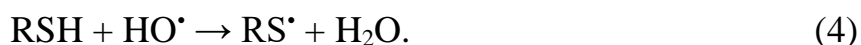
Окиснення і модифікація білків з утворенням ковалентних зшивок призводить до утворення білкових агрегатів, які, зі свого боку, погіршують клітинні функції білків і пептидів, посилюють їх подальші модифікації і сприяють розвитку патологічних процесів.

7.1.3. Окиснення простетичних груп білків

У разі окиснення складних білків деструкція поліпептидного ланцюга протікає аналогічно, але в окиснювальні процеси можуть залучатись і простетичні групи, наприклад, геми білків. Гемовмісні білки виконують важливі біологічні функції, як-от транспорт кисню, електронний транспорт, передача сигналу та антиоксидантний захист. Оксидативна трансформація простетичних груп суттєво впливає на біологічні функції протеїнів, наприклад, на здатність гемоглобіну транспортувати кисень. Це було підтверджено вивченням процесу окиснення гему гемоглобіну під дією екзогенних АФО – гідроген пероксиду та супероксид аніон-радикала [6, 7].

7.1.4. Оксидативна модифікація бічних груп амінокислотних залишків

Найбільш типовим прикладом оксидативної модифікації бічних груп амінокислотних залишків білкових молекул, що протікають у клітинних системах за аеробних умов, є утворення тійльного радикала [8] під час атаки цистеїну гідроксильним радикалом (4):



Тійльні радикали (RS[•]) з високими швидкостями взаємодіють з молекулярним киснем (5):



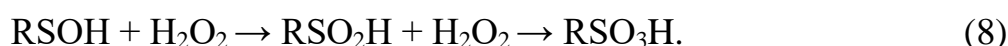
Утворений тійпероксильний радикал (RSOO[•]) трансформується або в тійлацилокси радикал (6):



або в сульфенову кислоту RSOH та сульфінільний радикал (7):



Сульфенова кислота дуже нестійка, вона відразу піддається подальшим модифікаціям або відновлюється. За умови надлишку H_2O_2 сульфенова кислота окиснюється до більш стабільної сульфінової кислоти RSO_2H , яка, зі свого боку, може незворотно перетворюватись у сульфонову кислоту RSO_3H (8):



Оборотна та специфічна модифікація цистеїнових залишків у складі ключових білків впливає на конформацію білків, змінюючи їх функціональність або взаємодію з партнерами. Усі модифікації білків (6)–(10) можуть відбуватись під впливом H_2O_2 і є оборотними в умовах *in vivo*, за винятком утворення сульфенової кислоти. Саме оборотність окисно-відновних трансформацій цистеїнових груп білків є прикладом регуляції клітинних сигналів за участю АФО. До таких процесів можна віднести регулювання роботи деяких іонних каналів, яке відбувається за участі H_2O_2 .

Фактично всі амінокислотні залишки білків чутливі до окиснення АФО. У таблиці 1 представлено встановлені продукти оксидативної модифікації найбільш вразливих амінокислотних залишків.

Таблиця 1

Продукти окиснення амінокислотних залишків білків [9, 10]

Амінокислота	Продукти окиснення амінокислот
Фенілаланін	2,3-дигідроксифенілаланін, 2-, 3- та 4-гідроксифенілаланін
Тирозин	3,4-дигідроксифенілаланін, 3-нітротирозин, хлоротирозин, дитирозин
Триптофан	кінуренін, 3-гідроксикінуренін, <i>N</i> -форміл-кінуренін
Гістидин	2-оксогістидин, аспаргат, аспарагін
Лізін	2-аміноадіпіновий напівацеталь
Аргінін	глутаміновий напівацеталь
Пролін	глутаміновий напівацеталь
Треонін	2-аміно-3-кетобутанова кислота
Глутамінова кислота	піровиноградна кислота
Аспарагінова кислота	піровиноградна кислота
Цистеїн	нітрозотіоли, сульфенова, сульфінова, сульфонові кислоти
Метіонін	метіонін сульфоксид

7.2. Вплив оксидативної модифікації на функціональні властивості білків

Оксидативна модифікація білків під впливом АФО призводить до трансформації амінокислотних залишків, фрагментації поліпептидних ланцюгів, міжбілкових взаємодій, зміни просторової структури, денатурації і агрегації білків [10]. У складних ліпідобілкових структурах, як-от клітинні мембрани і ліпопротеїни, окисна модифікація може ініціюватись не тільки через пряму дію АФО, але і продуктами ПОЛ. Альдегіди, що утворюються під час окиснення поліненасичених жирних кислот, можуть взаємодіяти з функціональними групами амінокислотних залишків з утворенням карбонільних похідних. Очевидно, що наслідками таких процесів є порушення функціональної активності білків, як-от ферментативна, захисна, регуляторна, транспортна тощо. Яскравим прикладом є оксидативна трансформація мембранного білка Са-АТФази, який відповідає за транспорт іона Кальцію. Пошкоджена радикалами Са-АТФаза перестає качати іони Кальцію – з насоса вона перетворюється на канал, і це призводить до підвищення вмісту внутрішньоклітинного Кальцію [11] з подальшим порушенням механізму м'язового скорочення.

Основними кінцевими продуктами окисної деградації білків є карбонільні сполуки, які, порівняно з АФО, відносно стабільні. Відсутність заряду на молекулі та тривалий час життя дають змогу їм дифундувати через клітинну мембрану і атакувати мішені далеко від місця утворення. Карбонільні сполуки є електрофільними і мають високу реакційну здатність відносно біологічних нуклеофільних молекул (меркаптани, імідазоли, гідроксильні групи молекул, пуринові і піримідинові основи). У білках атакуються лізин, гістидин, аргінін і триптофан, які є найбільш вразливими з хімічного погляду, оскільки їх молекули мають вільну аміногрупу ($-NH_2$), гуанідинову групу ($-C(NH_2)_2$), індольне і імідазольне кільця. Взаємодія карбонільів з нуклеофільними групами біомолекул може призвести до незворотної хімічної модифікації білків, нуклеїнових кислот і амінофосфоліпідів з утворенням величезної кількості аддуктів і продуктів зшивання, таких як МДА-Lys, пропаналь-Hys, пропеналь-Lys [12]. Як наслідок, змінюється каталітична активність ферментів, спорідненість до лігандів рецепторних білків.

Високою стійкістю до окисної деструкції відрізняються антиоксидантні ферменти і спеціалізовані білки-генератори АФО: найбільшу стійкість проявляє СОД, найменшу – ГПО, а каталаза займає проміжне положення. СОД зберігає здатність каталізувати диспропорціонування супероксид аніон-радикалів навіть в умовах часткової окисної фрагментації.

Слід зазначити, що дослідження впливу АФО на білкові молекули раніше були зосереджені виключно на згубних ефектах окиснювальних протеїнових модифікацій під час старіння та захворювань [13, 14]. Проте зараз визнано, що

окиснення білків також може відігравати позитивну роль у багатьох клітинних функціях. Це поступове визнання пов'язане з накопиченням доказів того, що АФО є необхідними для виживання клітин [15], відновлення клітинних функцій та подолання смертельних викликів.

7.3. Аналітичний контроль процесу окисної модифікації білків

Білки присутні у всіх тканинах і органах, саме їх модифікація може виступати надійним індикатором патологічних процесів як на локальному, так і на загальному рівні всього організму. Більша частина окисно-модифікованих білків не відновлюється, і вони мають бути вилучені шляхом протеолітичної деградації, а зменшення ефективності протеолізу буде призводити до збільшення у клітині вмісту окиснених білків. Під час широкого спектру патологій найрізноманітнішої етіології окисна модифікація саме протеїнів (а не ліпідів або нуклеїнових кислот) є одним з найбільш ранніх і надійних маркерів оксидативного стресу навіть на початкових стадіях окиснення. До того ж встановлено, що оксигенмодифіковані протеїни досить стабільні і можуть перебувати у живих організмах тривалий час, у той час як продукти ПОЛ існують у вільному стані набагато менш тривало.

Найбільш поширеним неспецифічним типом окисних протеїнових модифікацій є окиснення амінокислотних залишків з утворенням карбонільних груп. Наявність додаткових карбонільних груп внаслідок окисної модифікації вважається надійним показником їх вільно-радикальної модифікації, тому підвищення рівня протеїнових карбонілів виявлено під час широкого переліку патологій, а також передпатологічних станів. Наприклад, одна з фракцій глікованого гемоглобіну (HbA1c) слугує одним з основних біохімічних маркерів діабету, карбоніли білків плазми визначають як маркери інфаркту міокарда [15, 16].

Для кількісного визначення карбонілів білків використовують простий і надійний спектрофотометричний метод по реакції з 2,4-динітрофенілгідразином [17]. Метод дає змогу визначати С=О групи білків у різноманітних біологічних зразках, включно з тканинним білком, клітинними культурами та ліпопротеїнами. Такі вимірювання дають конкретну інформацію про загальний вміст карбонільних груп і ступінь окиснення білків під впливом АФО [18]. Але сьогодні не розроблено стандартних методів оцінки кількості індивідуальних карбонільних сполук як *in vivo*, так і *in vitro* – різні методи оцінки приводять до варіації в межах норм і патологій, що ускладнює порівняння отриманих даних та їх інтерпретацію. До того ж для оцінки ступеня окисної модифікації білків під впливом АФО використовують рівень залишкової функціональної активності окисненого білка.

Хоча утворення продуктів вільнорадикального окиснення залежить від багатьох факторів, як-от інтенсивність генерації АФО, їх інактивація антиоксидантами, ефективність дії репараційних систем, однак у багатьох випадках кількісне визначення продуктів окиснення білків у клітинах, органах і в організмі загалом, є надійним показником рівня оксидативного стресу.

Контрольні питання для самоперевірки знань:

1. Наведіть основні механізми, за якими відбувається модифікація і деградація білків.
2. Як відбувається фрагментація поліпептидних ланцюгів?
3. Наведіть приклади внутрішньо- і міжмолекулярних ковалентних зшивок у білках.
4. За якими реакціями відбувається оксидативна модифікація бічних груп амінокислотних залишків?
5. Як впливає оксидативна модифікація на функціональні властивості білків?

Література

1. Stadtman E. R., Levine R. L. Chemical modification of proteins by reactive oxygen species. *Redox proteomics: from protein modifications to cellular dysfunction and diseases*. 2006. Vol. 9, № 3. P. 1–23.
2. Törnvall U. Pinpointing oxidative modifications in proteins – recent advances in analytical methods. *Analytical Methods*. 2010. Vol. 2, № 11. P. 1638-1650. DOI: 10.1039/C0AY00375A.
3. Davies M. J. Protein oxidation and peroxidation *Biochemical Journal*. 2016. Vol. 473, № 7. P. 805–825. DOI: 10.1042/BJ20151227.
4. Kim H. J., Ha S., Lee H. Y., Lee K. J. ROSics: chemistry and proteomics of cysteine modifications in redox biology. *Mass spectrometry reviews*. 2015. Vol. 34, № 2. P. 184–208. DOI: 10.1002/mas.21430.
5. Houée-Lévin C., Bobrowski K., Horakova L., Karademir B., Schöneich C., Davies M. J., Spickett C. M. Exploring oxidative modifications of tyrosine: An update on mechanisms of formation, advances in analysis and biological consequences. *Free radical research*. 2015. Vol. 49, № 4. P. 347–373. DOI: 10.1042/BJ20151227.
6. Nagababu E., Rifkind J. M. Heme degradation by reactive oxygen species. *Antioxidants & redox signaling*. 2004. Vol. 6, № 6. P. 967–978. DOI: 10.1089/ars.2004.6.967.

7. Li D., Zhang X., Loni Y., Sunz X. Inactivation of hemoglobin by hydrogen peroxide and protection by a reductant substrate. *Life Science Journal*. 2006. Vol. 3, № 1. P. 52–58.
8. Oliveira P. V., Laurindo F. R. Implications of plasma thiol redox in disease. *Clinical Science*. 2018. Vol. 132, № 12. P. 1257–1280. DOI: 10.1042/CS20180157.
9. Stadtman E. R. The role of free radical mediation of protein oxidation in aging and disease. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants. *Pathological and Physiological Significance*. Springer, Boston, MA, 1998. P. 131–143. DOI: 10.1007/978-1-4757-2907-8_13.
10. Kehm R., Baldensperger T., Raupbach J., Höhn, A. Protein oxidation-formation mechanisms, detection and relevance as biomarkers in human diseases. *Redox Biology*. 2021. Vol. 42, P.101901. DOI: 10.1016/j.redox.2021.101901.
11. Görlach A., Bertram K., Hudecova S., Krizanova O. Calcium and ROS: a mutual interplay. *Redox biology*. 2015. Vol. 6. P. 260–271. DOI: 10.1016/j.redox.2015.08.010.
12. Ellis E. M. Reactive carbonyls and oxidative stress: potential for therapeutic intervention. *Pharmacology & therapeutics*. 2007. Vol. 115, № 1. P. 13–24. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2007.03.015.
13. Stadtman E. R. Protein oxidation and aging. *Science*. 1992. Vol. 257, № 5074. P. 1220–1224. DOI: 10.1126/science.1355616.
14. Stadtman E. R. Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2001. Vol. 928, № 1. P. 22–38. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2001.tb05632.x.
15. Groeger G., Quiney C., Cotter T. G. Hydrogen peroxide as a cell-survival signaling molecule. *Antioxidants & redox signaling*. 2009. Vol. 11, № 11. P. 2655–2671. DOI: 10.1089/ars.2009.2728.
16. Hussain M., Ikram W., Ikram U. Role of c-Src and reactive oxygen species in cardiovascular diseases. *Molecular Genetics and Genomics*. 2023. Vol. 298, № 2. P. 315–328. DOI: 10.1007/s00438-023-01992-9.
17. Levine R. L., Williams J. A., Stadtman E. R., Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*. 1994. Vol. 233. P. 346–357. DOI: 10.1016/S0076-6879(94)33040-9.
18. Dalle-Donne I., Rossi R., Giustarini D., Milzani A., Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica chimica acta*. 2003. Vol. 329, № 1–2. P. 23–38. DOI: 10.1016/S0009-8981(03)00003-2.

ГЛАВА 8

ОКСИДАТИВНА МОДИФІКАЦІЯ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ І ВУГЛЕВОДІВ

Окисне пошкодження ДНК *in vivo* викликано низкою причин, серед яких важлива роль належить оксидативному стресу, що характеризується збільшенням внутрішньоклітинного рівня АФО. Але навіть за нормальних умов ядерна ДНК постійно зазнає дії АФО. Величезна кількість окиснювальних пошкоджень ядерної ДНК відбувається на добу в одній клітині та усувається за допомогою ефективних шляхів репарації. З'ясування механізмів окисного пошкодження ДНК є складним завданням, оскільки в клітинах одночасно відбувається генерування АФО, окиснення та репарація ДНК. До того ж у них функціонує система антиоксидантного захисту. Загалом внаслідок атаки АФО на молекули ДНК відбуваються такі процеси:

- структурна модифікація азотистих основ;
- відщеплення азотистих основ;
- руйнування п'ятичленного кільця дезоксирибози;
- розщеплення фосфорноефірних зв'язків.

У межах фізіологічної норми приблизно 2 % від утилізованого в мітохондріях кисню перетворюється в супероксидний радикал, тому окиснення мітохондріальної ДНК за умов надлишкового утворення АФО протікає на порядок інтенсивніше, ніж ядерної. Аналогічна ситуація стосується також інших мітохондріальних структур. Найбільш активним ініціатором окислювальних пошкоджень ДНК є HO^\bullet , який викликає різноманітні пошкодження дезоксирибози і азотистих основ у ДНК (рис. 1). Об'єктом атаки гідроксильного радикала в структурі ДНК виступають також фосфатні угруповання, однак їх внесок у загальну картину деградації цього біополімеру є дуже незначним. Якщо значення констант швидкостей реакцій взаємодії HO^\bullet з вуглеводами відповідають дифузійним процесам ($k \sim 10^{11} \text{M}^{-1} \times \text{c}^{-1}$), то величина аналогічної константи щодо фосфату становить лише $2 \cdot 10^6 \text{M}^{-1} \times \text{c}^{-1}$. Швидкість взаємодії гідроксильного радикала навіть не з азотистою основою, а з вуглеводним компонентом ДНК буде на багато порядків вищою, ніж з фосфатним фрагментом (враховуючи однаковий їх вміст у структурі цього біополімеру).

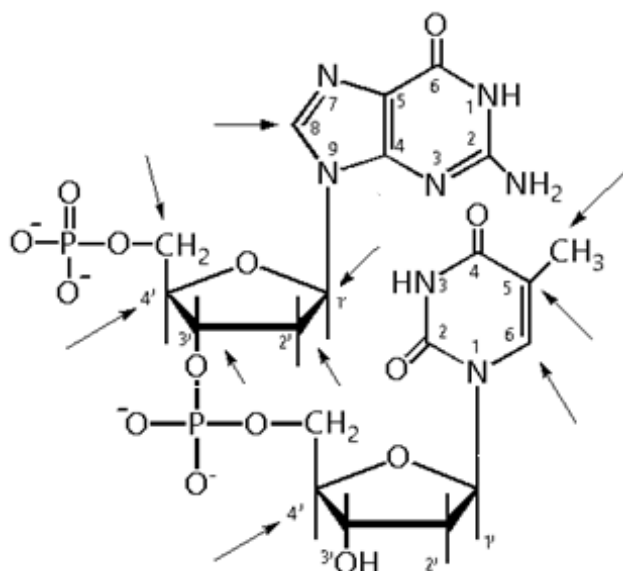


Рис. 1. Вірогідні напрямки атаки АФО в молекулі нуклеїнової кислоти

8.1. Окиснювальна модифікація азотистих основ у складі нуклеїнових кислот

Азотисті основи – гуанін, цитозин, аденін і тимін – як структурні фрагменти нуклеотидів насамперед зазнають атаки АФО. Окиснення відбувається через радикальні інтермедіати, які в подальшому перетворюються на різноманітні кінцеві продукти [1]. Під час окиснення пуринових основ основними продуктами є 8-гідроксипохідні; може також відбуватися розкриття імідазольного циклу, як це показано на рис. 2 і 3.

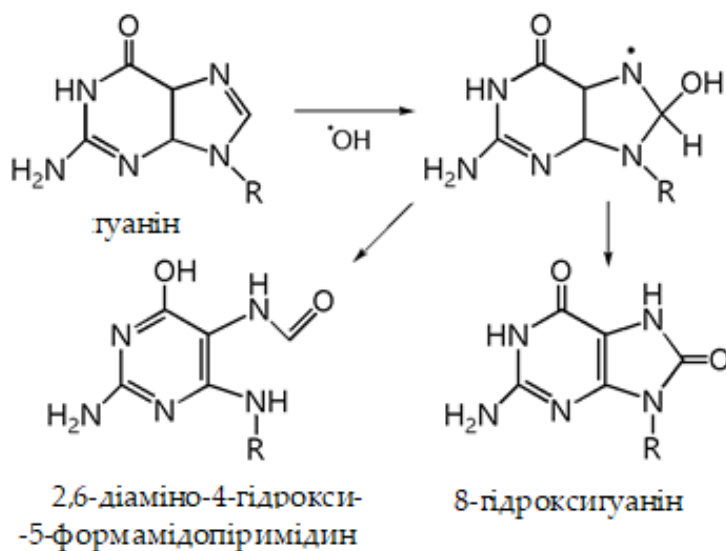


Рис. 2. Окиснення гуаніну під дією гідроксильного радикала

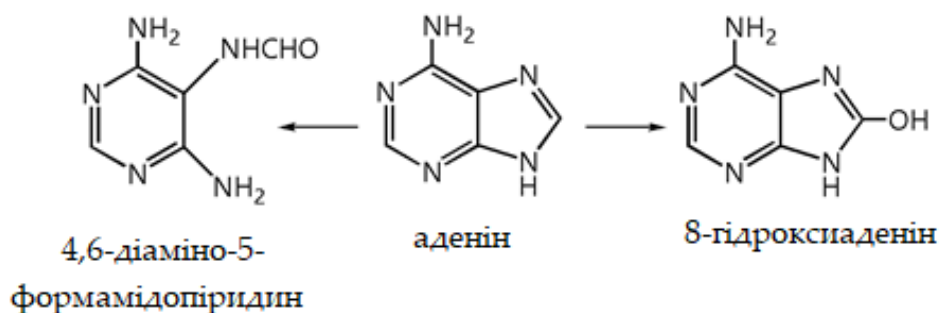


Рис. 3. Продукти окиснення аденіну

Серед азотистих основ окисної модифікації найбільшою мірою зазнає гуанін (рис. 2), модифіковані форми якого становлять приблизно 45 % від загальної кількості окиснених основ. 8-гідроксигуанін є маркером окисативного стресу, оскільки дуже важко підлягає репарації [2]. Окиснення гуаніну відбувається як у ДНК, так і в клітинному пулі нуклеотидів.

Основні механізми дії гідроксильного радикала на піримідинові основи – це приєднання за подвійним зв'язком у 5-му та 6-му положеннях з утворенням дигідроксипохідних тиміну і цитозину (рис. 4 і 5). Характерним для окиснювальних модифікацій є також окиснення аміногруп до карбонільних.

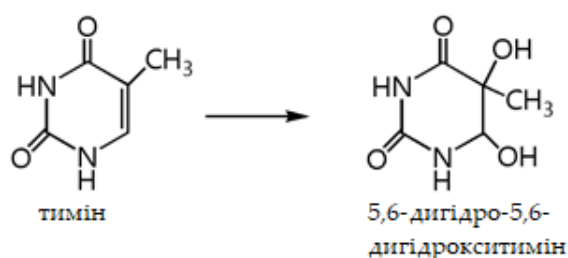


Рис. 4. Механізм окисативної модифікації тиміну

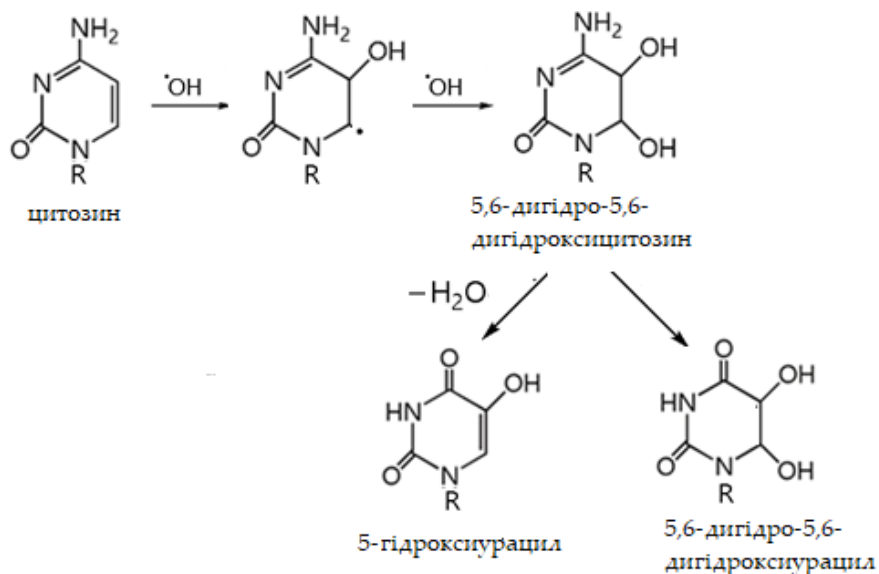


Рис. 5. Механізм окисативної модифікації цитозину

Важливим маршрутом окисдативних трансформацій піримідинових основ у складі нуклеїнових кислот є проміжне утворення гідропероксидів, які розкладаються під дією металів змінної валентності до карбонільних сполук (рис. 6):

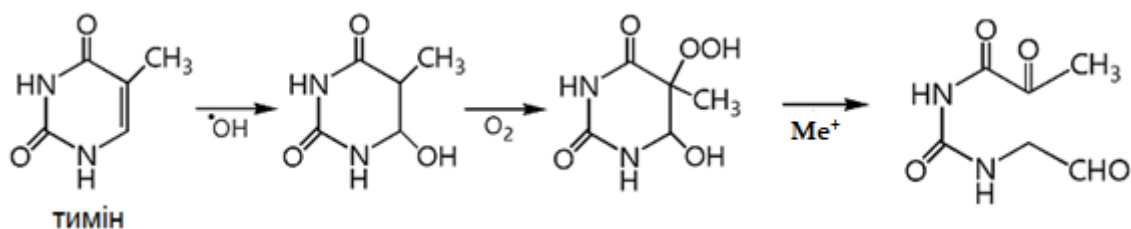


Рис. 6. Утворення гідропероксиду тиміну і розкриття гетероциклу

Ще одним вірогідним маршрутом для тиміну є окиснення метильної групи до спиртової (-CH₂OH) або альдегідної (CH(O)).

8.2. Окиснення цукрових фрагментів у складі нуклеїнових кислот

Окрім окиснення азотистих основ під дією АФО, може відбуватись розщеплення цукрово-фосфатного остову нуклеотидів, яке супроводжується відщепленням азотистої основи і утворенням високотоксичного МДА (рис. 7). Швидкість реакцій взаємодії гідроксильного радикала з рибозою або 2-дезоксирибозою у складі нуклеїнових кислот є у декілька разів меншою, ніж із гетероциклами і відбувається за механізмом відриву Н-атома від С-Н зв'язків фуранозного циклу в положеннях С-1, 2, 3, 4, 5. Порядок реакційної здатності відповідає ряду 4 > 5 > 3 = 2 = 1 [3].

На рис. 7 представлено механізм окиснювальної трансформації цукрово-фосфатного остову ДНК, де першою стадією є відрив Н-атома від С-Н зв'язків у С-4 положенні цукрового фрагмента з утворенням С-центрованого радикала. Подальші радикально-ланцюгові перетворення призводять до розщеплення фуранозного циклу і вивільнення азотистих основ.

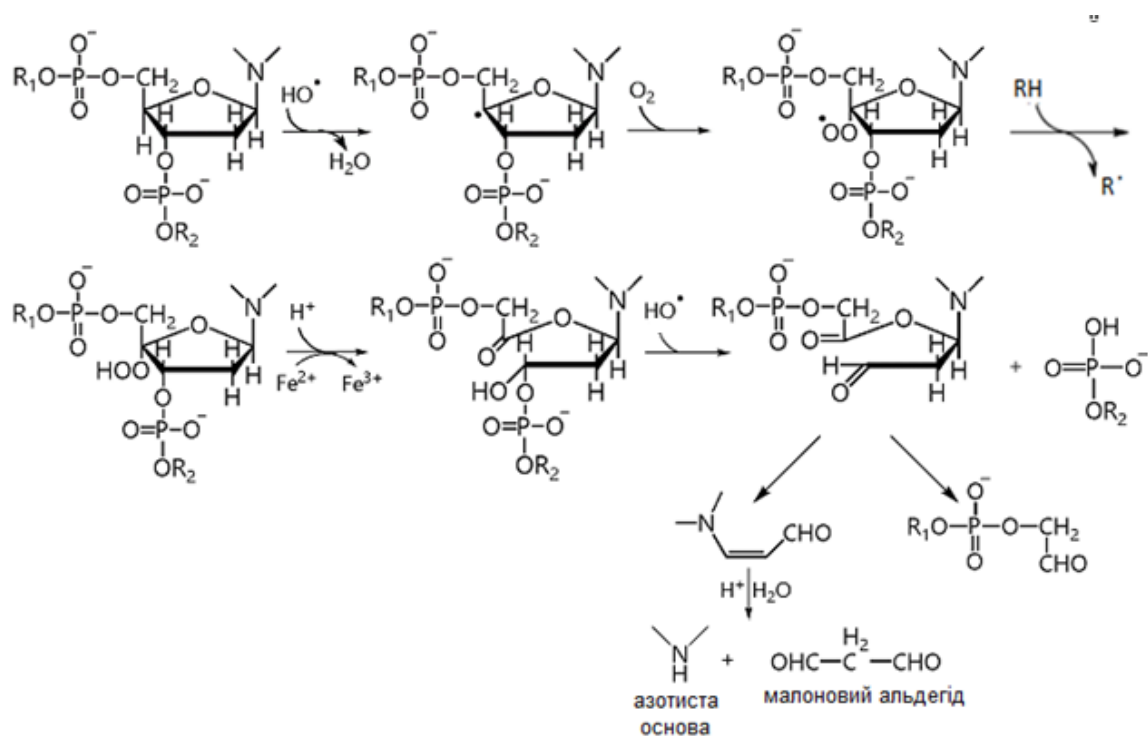


Рис. 7. Оксидативна деструкція нуклеотиду шляхом розщеплення цукрово-фосфатного остову

8.3. Біологічні наслідки дії активних форм кисню на ДНК

Внаслідок окиснення різних сайтів ДНК відбуваються такі структурні трансформації біополімеру:

- розрив ниток ДНК;
- зшивання ДНК-ДНК;
- зшивання ДНК-білок;
- утворення ділянок ДНК, позбавлених азотистих основ;
- окиснювальна модифікація азотистих основ і дезоксирибози.

До того ж внаслідок атаки АФО на нуклеотиди утворюються високотоксичні похідні – альдегіди, які надалі вступають у різні хімічні реакції з біополімерами з формуванням відповідних аддуктів (через утворення основ Шиффа або шляхом рекомбінації вільнорадикальних структур).

Перебіг таких процесів призводить до небажаних змін спадкового матеріалу, тому окисне пошкодження ДНК є одним з найбільш критичних наслідків оксидативного стресу, яке безпосередньо пов'язане з підвищеним ризиком мутагенезу, канцерогенезу, старіння і патогенезу хвороб людей літнього віку. Саме порушення у зберіганні та реалізації генетичного матеріалу пов'язують із розвитком низки захворювань, як-от нейродегенеративні та онкологічні патології. Усі типи

окисних пошкоджень ДНК тою чи іншою мірою виявляються причиною виникнення мутацій, але особливо критичним є наявність у структурі нуклеотиду молекули 8-гідроксиуаніну. До того ж розкриття п'ятичленного кільця пуринів є «стоп-сигналом» для ДНК-полімерази (фермент, який бере участь у реплікації ДНК) і летальною подією для клітини. Якщо кількість пошкоджень ДНК перевищує певний критичний рівень, включається програма апоптозу. Така стратегія обумовлює високий ступінь консерватизму генома, абсолютно необхідну для збереження досягнень біологічної еволюції.

8.4. Окиснення вуглеводів під дією активних форм кисню

Поряд з білками, ліпідами і нуклеїновими кислотами мішенями атаки АФО в клітинах є вуглеводи. У стадії ініціювання за участі радикалів (наприклад, гідроксильного) відбувається відрив Н-атома від С-Н зв'язків з утворенням радикала вуглеводу ($RH + HO\cdot \rightarrow R\cdot + H_2O$). Ця реакція лежить в основі як окисної деструкції моносахаридів, так і окиснювальної деполімеризації високомолекулярних вуглеводів, зокрема і таких гетерополісахаридів, як гіалуронова кислота і гепарин. До того ж може відбуватись рекомбінація вільнорадикальних інтермедіатів окиснення вуглеводів, а також взаємодія радикалів з іншими біополімерами, що призводить до утворення ковалентних зшивок між молекулами. Найбільш фізіологічно важливими в плані шкідливої дії АФО на вуглеводи є продукти окиснення низькомолекулярних вуглеводів (як-от глюкоза, фруктоза, галактоза, манноза та ін.). Реакції з $HO\cdot$ для цих цукрів характеризуються дуже високими значеннями констант швидкостей ($k = 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).

З іншого боку, атака АФО на полісахариди також перебігає з високими швидкостями і призводить до фрагментації біополімерів. Розглянемо це на прикладі окиснення гіалуронової кислоти під дією гіпохлориту, яке супроводжується розривом глікозидного зв'язку. Гіалуронова кислота є одним з найбільш поширених гетерополісахаридів сполучної тканини, вона міститься в хрящах, пуповині, суглобовій (синовіальній) рідині, склоподібному тілі. Повторюваною ланкою гіалуронової кислоти є *D*-глюкуронова кислота і *N*-ацетил-*D*-глюкозамін, з'єднані β -1,3-глікозидним зв'язком.

Гіпохлорна кислота – це біологічний окисник, що генерується на ділянках хронічного запалення і проявляє дуже високу цитотоксичність. $HOCl$ легко проникає через клітинну мембрану, взаємодіє з внутрішньоклітинними компонентами і окиснює білки, ДНК, ліпіди тощо. На рис. 8 представлено механізм хлорування з подальшим окисненням гіалуронової кислоти, що призводить до розриву глікозидного зв'язку та утворення амідів та гідропероксидів вуглеводів.

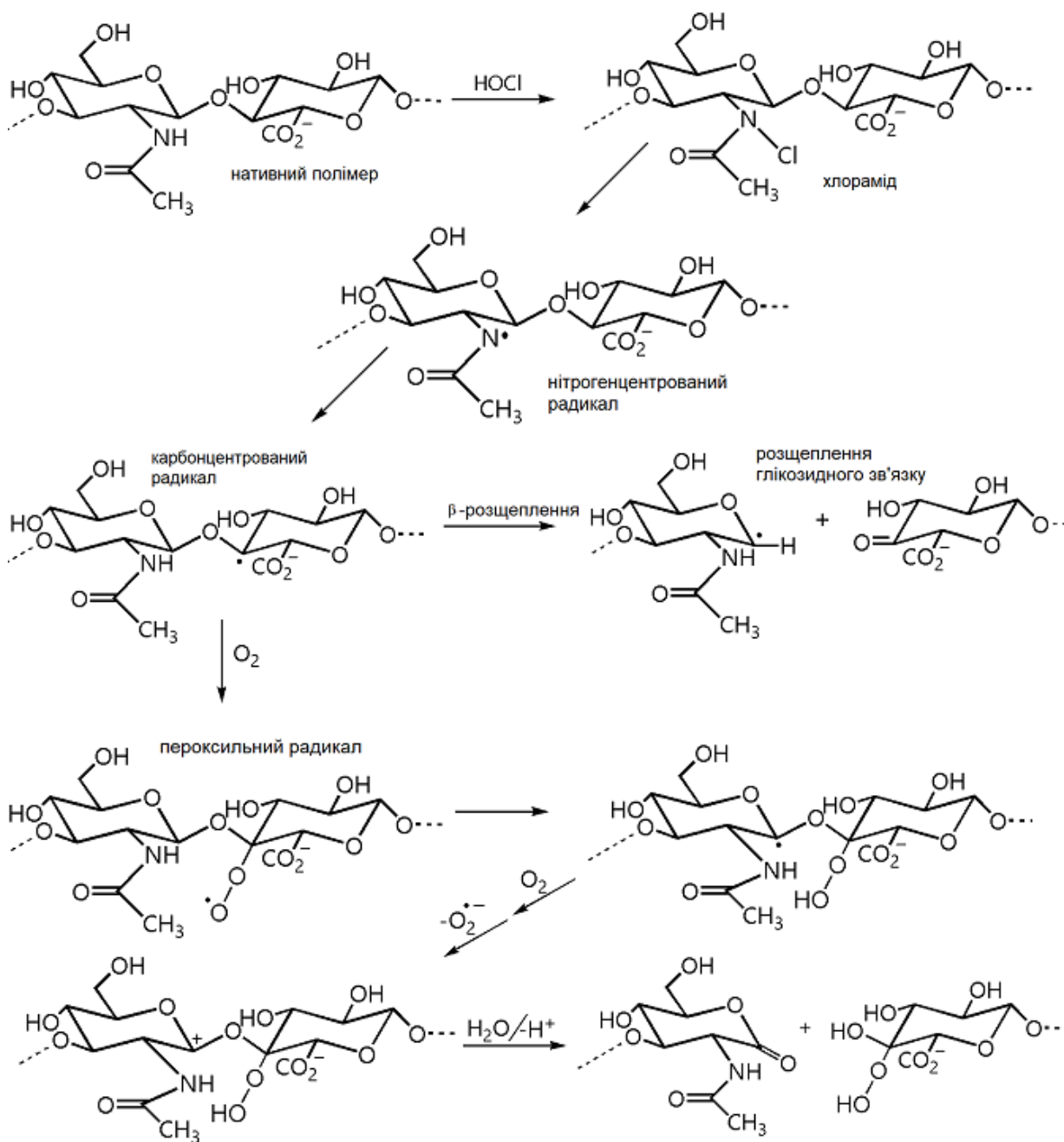


Рис. 8. Можливий механізм оксидативної деградації гіалуронової кислоти під впливом гіпохлорної кислоти [4]

Особливо небезпечним є неферментативне глікозилювання білків, що індукується АФО і становить основу патогенезу захворювання діабету. Реакція взаємодії моносахаридів або відновлюючих олігосахаридів може бути як із крупними молекулами білків, так і з пептидами та окремими амінокислотами. Процес є складним і багатостадійним (рис. 9). Перший його етап – це утворення основ Шиффа внаслідок взаємодії альдегідної групи вуглеводу та вільної NH_2 -групи амінокислотного залишку білка, наприклад, лізину. Другий етап – це утворення продукту Амадорі, який може накопичуватись і надалі розкладатися [5].

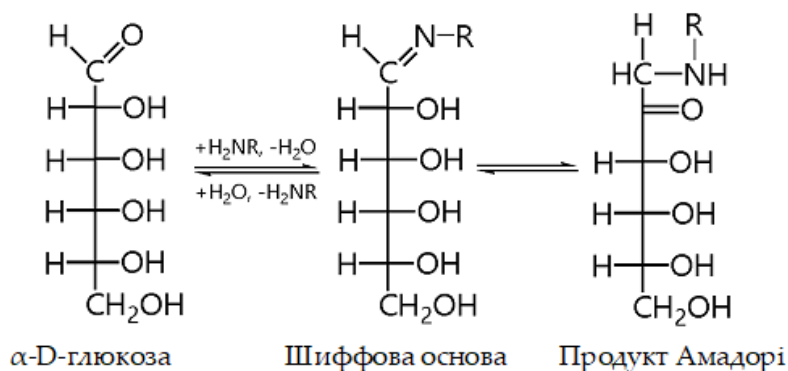


Рис. 9. Процес глікозилювання білка

Може відбуватися процес глікозилювання різних білків, що призводить до зміни структури і порушення функціональності білків. Відомо більше 20 білків та інших біологічно активних аміновмісних сполук, які *in vivo* зазнають неферментативного глікозилювання під час безпосереднього контакту з моносахаридами. Це гемоглобін, альбумін, глобуліни сироватки крові, імуноглобуліни, фібрин, білки оболонки еритроцитів, колаген, кератин, кристалін, тубулін, деякі ферменти, ліпопротеїни низької щільності, антитромбін, інсулін. Вміст неферментативно глікозилюваних біомолекул в організмі здорових людей невеликий, однак під час стійкої гіперглікемії (наприклад, під час некомпенсованого цукрового діабету) концентрація неферментативно глікозилюваних субстратів збільшується у 3–4 рази, а іноді і більше.

Неферментативне глікозилювання білків у багатьох випадках призводить до різкої зміни їх властивостей. Глікозилюваний гемоглобін має більш високу спорідненість до кисню. Альбумін сироватки крові внаслідок неферментативного глікозилювання втрачає свої транспортні та детоксикаційні властивості, перестає зв'язувати білірубін і довголанцюгові жирні кислоти. Колаген сполучотканинних волокон гліколізується по залишках лізину і оксилізину, що перешкоджає утворенню нормальних поперечних зшивок між волокнами і призводить до зниження еластичності. Під час цукрового діабету та старіння часто розвивається катаракта, обумовлена неферментативним глікозилюванням основного білка кришталика ока – кристаліну. Глікозилюваний інсулін втрачає здатність зв'язуватися зі специфічними рецепторами. Більшість неферментативно глікозилюваних білків важко піддаються протеолізу.

Отже, всі основні біомолекули живих організмів, незалежно від їх хімічної природи, є зручною мішенню для АФО. Під впливом останніх вони зазнають

окисної модифікації і фрагментації з утворенням токсичних для живих організмів сполук. Серед продуктів окисної модифікації біологічних молекул можуть формуватися сполуки, які мають високу хімічну активність і підсилюють деструктивні процеси у клітинах і тканинах.

Підсумовуючи вищесказане, можна зазначити, що клітинне вільнорадикальне окиснення **в нормі**:

- 1) необхідна ланка метаболізму, що забезпечує нормальну життєдіяльність клітин: обмін речовин, акумуляцію і трансформацію енергії;
- 2) оновлення біологічних структур;
- 3) здійснення захисних функцій: мікробіцидна дія, окиснення ксенобіотиків;
- 4) індукція апоптозу;
- 5) синтез важливих біологічно активних речовин;
- 6) підтримка тону судин, інгібування утворення тромбів;
- 7) регуляція сигнальних шляхів клітини;
- 8) участь у передачі нервових імпульсів.

За умови патології:

- 1) порушення проникності, структури та функцій біомембран;
- 2) окисне пошкодження білків з порушенням їх функціональності;
- 3) структурні модифікації ДНК з наступним мутагенезом;
- 4) порушення біоенергетики, регуляторних і захисних функцій клітин;
- 5) неспецифічна основа процесів старіння і патогенезу різних захворювань.

Контрольні питання для самоперевірки знань:

1. Які структурні модифікації відбуваються з ДНК внаслідок дії АФО?
2. Наведіть механізми і продукти окисної модифікації пуринових основ у складі нуклеотидів.
3. Наведіть механізми і продукти окисної модифікації піримідинових основ у складі нуклеотидів.
4. У який спосіб відбувається окисне пошкодження цукрових фрагментів у складі нуклеотидів?
5. Які біологічні наслідки дії АФО на нуклеїнові кислоти?
6. Наведіть механізми окисної модифікації вуглеводів під дією АФО в живих клітинах.

Література

1. Cadet J., Wagner J. R. DNA base damage by reactive oxygen species, oxidizing agents, and UV radiation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2013. Vol. 5, № 2. P. a012559. DOI: 10.1101/cshperspect.a012559.
2. Kino K., Hirao-Suzuki M., Morikawa M., Sakaga A., Miyazawa H. Generation, repair and replication of guanine oxidation products. *Genes and Environment*. 2017. Vol. 39, № 1. P. 1–8. DOI: 10.1186/s41021-017-0081-0.
3. Juan C. A., Pérez de la Lastra J. M., Plou F. J., Pérez-Lebeña E. The chemistry of reactive oxygen species (ROS) revisited: outlining their role in biological macromolecules (DNA, lipids and proteins) and induced pathologies. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. Vol. 22, № 9. P. 4642. DOI: 10.3390/ijms22094642.
4. Stern R., Kogan G., Jedrzejewski M. J., Šoltés L. The many ways to cleave hyaluronan. *Biotechnology advances*. 2007. Vol. 25, № 6. P. 537–557. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2007.07.001.
5. Weiss M. F., Erhard P., Kader-Attia F. A., Wu Y. C., Deoreo P. B., Araki A., Monnier V. M. Mechanisms for the formation of glycoxidation products in end-stage renal disease. *Kidney international*. 2000. Vol. 57, № 6. P. 2571–2585. DOI: 10.1046/j.1523-1755.2000.00117.x

ГЛАВА 9

ЕПР-СПЕКТРОСКОПІЯ РАДИКАЛІВ У ХІМІЧНИХ ТА БІОЛОГІЧНИХ СИСТЕМАХ

Дослідження впливу оксидативного стресу на розвиток різноманітних патологій є сьогодні великою частиною нинішньої фундаментальної науки, яка потребує специфічних і високочутливих способів кількісного визначення АФО, що утворюються *in vivo* та *in vitro*, а також можливості точно визначати тип, локалізацію і швидкість утворення радикалів [1].

Через дуже високу реакційну здатність радикалів та їх низьку стаціонарну концентрацію у хімічних і біологічних системах вивчати радикали з використанням багатьох фізико-хімічних методів дуже складно, а інколи неможливо. На практиці дуже часто використовують непрямі методи, в яких вивчаються параметри, пов'язані з радикальною активністю. До них належить метод інгібіторів з використанням природних або синтетичних антиоксидантів, здатних перехоплювати радикали. Класичним прикладом є фермент СОД, який використовують в усіх дослідженнях, де вивчають роль супероксид аніон-радикала в тому чи іншому процесі, як-от біохімічна реакція або розвиток хвороби у людини. Якщо СОД гальмує процес, це свідчить про участь у процесі супероксид аніон-радикала. Інгібіторний аналіз використовують і для вивчення реакцій за участі інших радикалів. Так, під час дослідження процесів ланцюгового окиснення ліпідів використовують жиророзчинні пастки ліпідних радикалів, які «ведуть» ланцюги окиснення. До таких пасток належать токоферол (вітамін Е) і деякі синтетичні сполуки, наприклад, трет-бутилгідрокситолуол (іонол). Водорозчинні радикали ефективно перехоплюються аскорбіною або сечовою кислотами. Треба однак зауважити, що не завжди пастки діють специфічно, і встановити точно природу радикала часто неможливо. Іншим підходом є дослідження продуктів окиснення біомолекул – це можуть бути як радикали (наприклад, радикали білків), так і молекулярні продукти (малоновий діальдегід, гексаналь як продукти ПОЛ, карбоніли як продукти окиснення білків). Ще одним сучасним напрямом вивчення радикально-ланцюгових процесів у біологічних системах є оцінка фізико-хімічних властивостей біомолекул, компартментів клітин, які зазнають впливу АФО.

Зараз доступно безліч аналізів для дослідження АФО, але їх використання та інтерпретація часто складні та схильні до артефактів [2]. Однак прогресу останніми роками було досягнуто під час поєднання сучасних методів біофізики, біохімії і хімії, які дають змогу ідентифікувати різні види АФО, хімічні реакції за їх участі, а також продукти окисного пошкодження, що утворюються під дією АФО.

9.1. Принципи методу електронного парамагнітного резонансу

Прямий метод вивчення вільних радикалів – це метод електронного парамагнітного резонансу (ЕПР), який називають «золотим стандартом» для вивчення радикальних процесів. В основі методу ЕПР лежить взаємодія парамагнітної частинки з магнітним полем. Парамагнітними є частинки, які мають власний магнітний момент (спін). Спін – це внутрішня властивість елементарних частинок, яка визначається як власний незнищений механічний момент імпульсу квантової природи і не має класичних аналогів.

Наявність електронів з неспареним спіном в атомах і молекулах дає змогу вивчати їх методом ЕПР. До таких об'єктів належать:

- 1) вільні радикали;
- 2) метали змінної валентності;
- 3) атоми, що мають на своїх орбіталях непарну кількість електронів – N^{15} , H^1 ;
- 4) молекули з загальною парною кількістю електронів, у яких не всі їх спінові моменти скомпенсовані. Наприклад, молекула кисню в основному електронному стані має два неспарені електрони, тобто є бірадикалом (3O_2).

За наявності, амплітудою та формою сигналів ЕПР можна судити про існування неспарених електронів у зразку, визначати їх концентрацію, хімічну структуру радикалів. Метод ЕПР дає змогу досліджувати кінетику і механізми радикально-ланцюгових реакцій безпосередньо в реакційних системах, а також у процесі функціонування нативних біологічних систем. За допомогою методу ЕПР виявляють неспарені електрони в розчині або речовині, не змінюючи та не руйнуючи їх [3]. Крім сигналів вільних радикалів, у тканинах спостерігаються сигнали металів (Fe, Cu, Mn, Ni, Co) у складі металопротеїнів, що беруть участь у цілому ряді ферментативних процесів.

9.2. Структура і параметри спектрів ЕПР

Для характеристики сигналів ЕПР застосовують набір параметрів (рис. 1). Одним із таких параметрів є інтенсивність сигналу, яка пропорційна до кількості парамагнітних центрів у зразку. Ця величина вимірюється у відносних або абсолютних одиницях.

Величиною, що характеризує ширину сигналу, є ΔH_{\max} – ширина лінії між точками максимального нахилу. Ця величина вимірюється в одиницях магнітного поля – гаусах (Гс) або мілітеслах (мТл). Для вимірювання ΔH_{\max} застосовуються спеціальні еталони.

Добуток ширини сигналу на інтенсивність – площа під кривою поглинання, пропорційна кількості парамагнітних частинок у зразку. На практиці порівнюють досліджений зразок зі стандартом, що містить відому кількість парамагнітних центрів, наприклад, ТЕМПО або ДФПГ ($1,53 \cdot 10^{21}$ несп. Е на 1 г).

Параметр g-фактор є безрозмірною фізичною характеристикою кожної індивідуальної частинки. Його поява пов'язана з розбіжністю у магнітогіричних співвідношеннях для класичної і квантової моделей. Зокрема, для вільного електрона g дорівнює 2 і дуже мало залежить від хімічної структури радикала. Так, для органічних радикалів значення g-фактора – приблизно 2,00232 і зазвичай не відрізняється від цього значення більш ніж на кілька сотих.

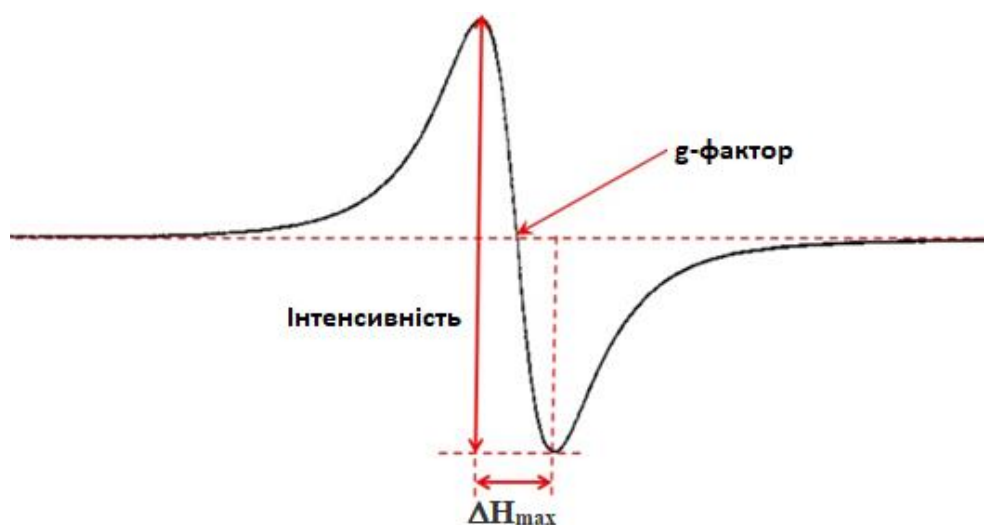


Рис. 1. Основні характеристики ЕПР-сигналу. Використано [4]

Надтонка взаємодія (НВ) – головне джерело інформації про хімічну структуру парамагнітної частинки. Якщо до складу зразка входить один або кілька атомів, що мають ядерний спіни, то в такій частинці виникає взаємодія між спіном електрона і ядерним спіном (спін-спінова взаємодія). У магнітному полі ядерні спіни також орієнтуються паралельно або антипаралельно до ліній напруженості зовнішнього магнітного поля. Неспарений електрон радикала знаходиться в полі, створеному зовнішнім електромагнітом і власними магнітними моментами сусідніх парамагнітних ядер атомів. Залежно від величини сумарного ядерного спіна S , який набуває в магнітному полі ряд $(2S + 1)$ дискретних орієнтацій, лінія поглинання неспареного електрона розщеплюється на $(2S + 1)$ ліній (надтонке розщеплення). Ядро протона має спіни $1/2$, тому в ЕПР спектрі Н-атома спостерігається дублет (дві лінії поглинання).

Якщо поруч із неспареним електроном знаходиться Нітроген в аміноксильному радикалі, то спостерігається триплет. Ядро Нітрогену має спіни $S = 1$, тому, згідно з законами квантової механіки, магнітний момент ядра Нітрогену може

мати три дозволені орієнтації: за полем, перпендикулярно до ліній магнітної індукції і проти поля ($Jz = +1, 0, -1$). Отже, завдяки взаємодії неспарених електрона з ядром Нітрогену кожен із рівнів енергії неспареного електрона розщепиться на три підрівні. Отже, внаслідок надтонкої взаємодії в спектрі ЕПР аміноксильного радикала з'являються три лінії, що відповідають трьом можливим орієнтаціям магнітного моменту ядра Нітрогена, як це показано на рис. 2 на прикладі радикала ТЕМПО. Відстань між лініями спектра дає значення константи надтонкої взаємодії. Для Н-атома вона дорівнює $a_H = 5,12 \cdot 10^{-2}$ Тл.

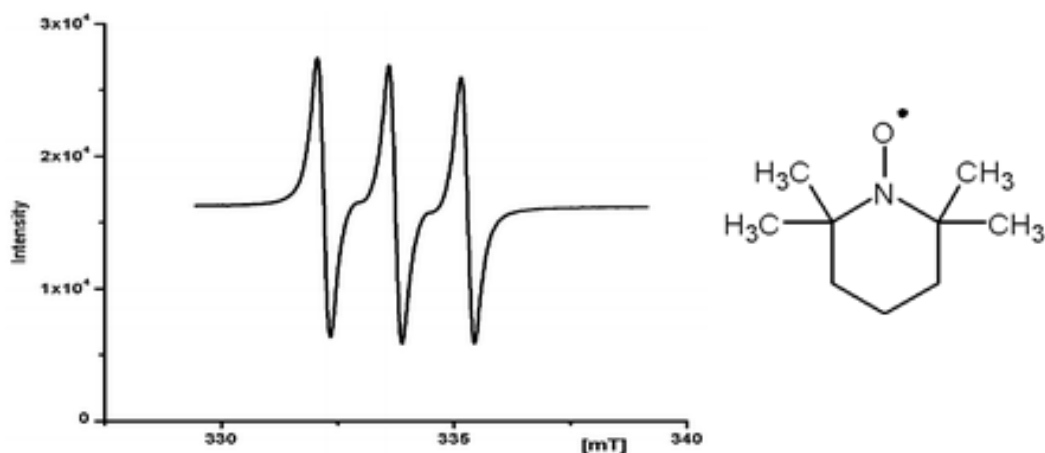


Рис. 2. Формула і спектр ЕПР радикала ТЕМПО [5]

Тобто НВ спектрів ЕПР – це число ліній та їх положення в спектрі, що визначаються двома факторами:

- 1) природою і числом парамагнітних ядер, з якими взаємодіє неспарений електрон;
- 2) енергією електрон-ядерної спінової взаємодії.

9.3. ЕПР-спектроскопія як метод дослідження радикалів у біологічних системах

Під час застосування методу ЕПР у біологічних системах досліджують два основні види парамагнітних центрів – вільні радикали та іони металів змінної валентності. Вивчення АФО у нативних біологічних системах пов'язано з труднощами через низьку концентрацію біорадикалів і дуже короткий термін життя. Їх концентрація в клітинах становить за різними джерелами приблизно 10^{-6} – 10^{-18} М, водночас сучасні спектрометри дають змогу вимірювати концентрації радикалів до 10^{-9} М. Виявлення радикалів за допомогою ЕПР у біологічних системах ускладнюється через одночасний перебіг багатьох процесів за участі

АФО. На концентрацію радикалів також впливають підвищена температура, світло, наявність іонів металів змінної валентності або антиоксидантів, деградація АФО, їх дифузія, маніпуляції із зразком. Пряме дослідження радикалів методом ЕПР обмежено відносно невеликим числом прикладів довгоживучих видів, включно з природними антиоксидантами, як-от аскорбіл та α -токоферол радикали. Для використання ЕПР-спектрів радикалів іноді застосовують заморозку зразків, але така процедура може призводити до руйнування біоструктур. Щоб обійти ці труднощі, були розроблені методи спінових пасток і спінових міток.

9.3.1. Метод спінових пасток

Метод спінових пасток заснований на використанні сполук, які під час взаємодії з активними радикалами утворюють так звані спінові аддукти. Такі продукти приєднання за природою є радикалами, але проявляють значно меншу активність, ніж вихідний радикал. Спінова пастка – діамагнітна сполука, яка вводиться в біологічну систему, не руйнуючи її, водночас реагує швидко і специфічно з вільним радикалом з утворенням стабільного радикала, який можна ідентифікувати за його сигналом ЕПР. Два найбільш часто використовувані класи сполук для дослідження органічних радикалів – нітрозосполуки і нітрони (рис. 3), які реагують з радикалами з утворенням нітроксидів [6, 7].

Спінові пастки, що використовуються під час дослідження біологічних систем повинні задовольняти такі вимоги:

- 1) швидка реакція з радикалами;
- 2) відсутність утворення побічних радикалів;
- 3) утворення стабільних аддуктів;
- 4) відмінність ЕПР сигналів спінових аддуктів різних радикалів.

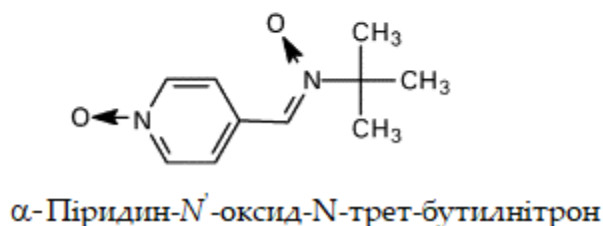
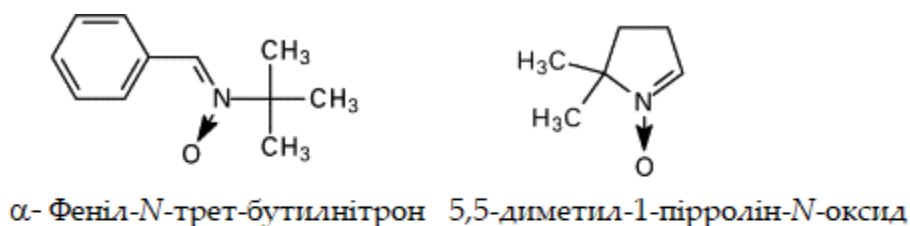


Рис. 3. Структури спінових пасток

Сигнал ЕПР, який відповідає нітроксидному спіновому аддукту, дає цінну кількісну інформацію: допомагає виявляти радикали, визначати їх концентрацію, а також ідентифікувати радикали на основі їх спектральних характеристик (наприклад, констант надтонкого розщеплення, ширини лінії або симетрії). На рис. 4 представлено два різні спектри ЕПР при взаємодії $O_2^{\cdot-}$ або HO^{\cdot} із спіноюю пасткою 5,5-диметилпіролін-*N*-оксидом (DMPO). Отже, під час використання методу спінових пасток можна диференціювати O-центровані радикали, як-от $O_2^{\cdot-}$, HO^{\cdot} і RO^{\cdot} , а також C-, N- і S-центровані радикали один від одного.

Хоча спінові пастки спочатку були розроблені для вивчення реакційоздатних радикалів, що утворюються з низькомолекулярних сполук, дослідження останніх трьох десятиліть показали, що ця методологія також може бути використана для вивчення радикалів білків, нуклеїнових кислот, ліпідів та інших макромолекул як в ізольованих, так і в складних біологічних системах [9].

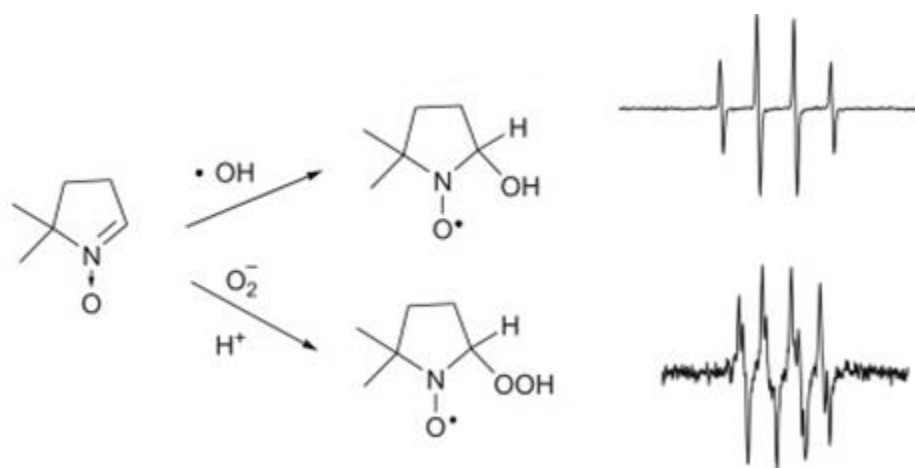


Рис. 4. ЕПР-спектри аддуктів гідроксильного радикала та супероксид аніон-радикала із спіноюю пасткою DMPO [89]

Оскільки пастки радикалів «перехоплюють» вільні радикали, вони гальмують (пригнічують) той процес, який цими радикалами викликається, наприклад, зменшують пошкодження живих клітин радикалами. Отже, спінові пастки використовуються для того, щоб з'ясувати, які радикали утворюються, і які процеси в клітині вони запускають.

9.3.2. Метод спінових міток

Спінові мітки – стабільні радикали (часто аміноксильні) (рис. 5), які хімічним шляхом через функціональні групи «пришивають» до відповідних біологіч-

них молекул, а потім по формі ЕПР спектра спостерігають за змінами, обумовленими структурними перебудовами в молекулі. Технології з використанням спінових міток називаються спіновим маркуванням біомолекул (sitedirected spin marking, SDSL) [10].

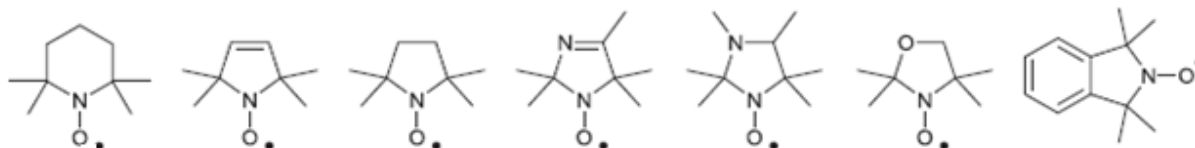


Рис. 5. Структури аміноксильних радикалів – спінових міток

Спінові мітки – це унікальні зонди, здатні проникати в біологічні мембрани та розкривати важливу інформацію, яку нелегко отримати іншими методами. Наприклад, метод спінових міток дає змогу досліджувати структурні і функціональні наслідки окиснення біоструктур в умовах окисного стресу.

Області застосування методу спінових міток у біологічних системах такі:
А. Вивчення конформації білків та білкових комплексів.

За допомогою спінових міток вивчають просторове розташування окремих груп у білках, конформаційні переходи, пов'язані з функціонуванням ферментів, і цілий ряд інших проблем молекулярної динаміки [11].

Для того, щоб слідкувати за конформаційними перебудовами білків під час надмірного утворення АФО використовують аміноксильні радикали, які приєднуються за функціональними групами до амінокислотних залишків молекули білка. З 20 генетично кодованих амінокислот тількина SH-група цистеїну має найбільші можливості для ковалентного спін-маркування, як це показано на рис. 6:

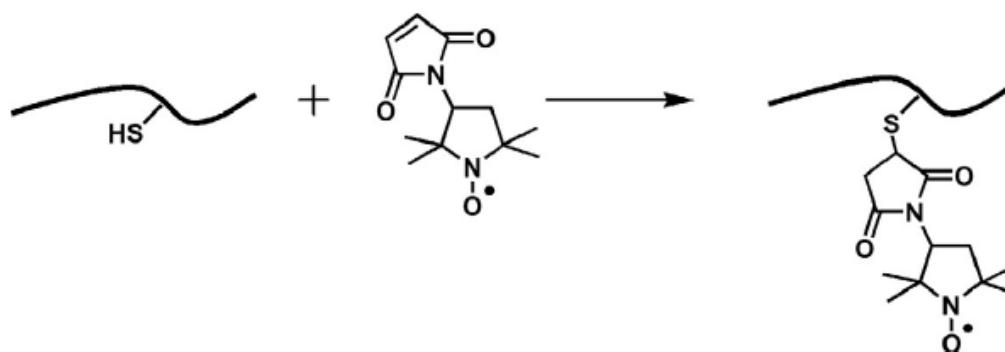


Рис. 6. Структура бічного ланцюга білка, модифікованого за реакцією сульфгідрильної групи залишку цистеїну зі спіноюю міткою 3-малеїмідо-2,2,5,5-тетраметил-1-піролідиніл-1-оксидом [12]

Б. Дослідження нуклеїнових кислот.

Нуклеотиди, що є складниками ДНК і РНК, мають декілька потенційних позицій для спін-маркування – це піримідинові та пуринові основи, вуглеводневий фрагмент або фосфодієфір. Маркування зазвичай проводять на стадії олігонуклеотидного синтезу (рис. 7). Спін-маркування нуклеотидів допомагає отримувати детальну інформацію щодо структурних змін нуклеїнових кислот у динаміці.

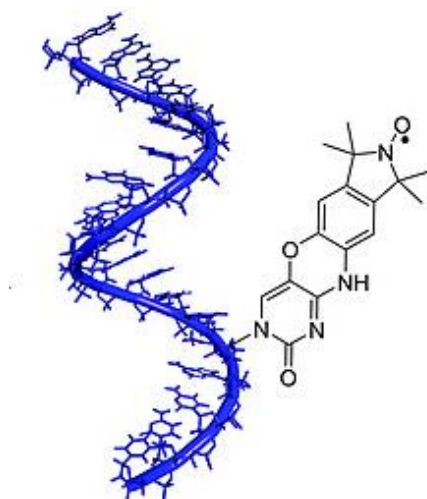


Рис. 7. «Пришивання» спінової мітки до олігонуклеотиду [13]

Г. Дослідження біологічних мембран.

Плинність та функціональний стан мембрани є фундаментальними факторами, що визначають життєздатність клітин. Надмірне утворення АФО впливає на біофізичний стан мембрани, тим самим порушуючи її функції. Пришиваючи спінові мітки до фосфоліпідів, можна зондувати ліпідний бішар на різній глибині і відстежувати взаємозв'язок між фізичним станом ліпідів і функціональністю мембран (рис. 8).

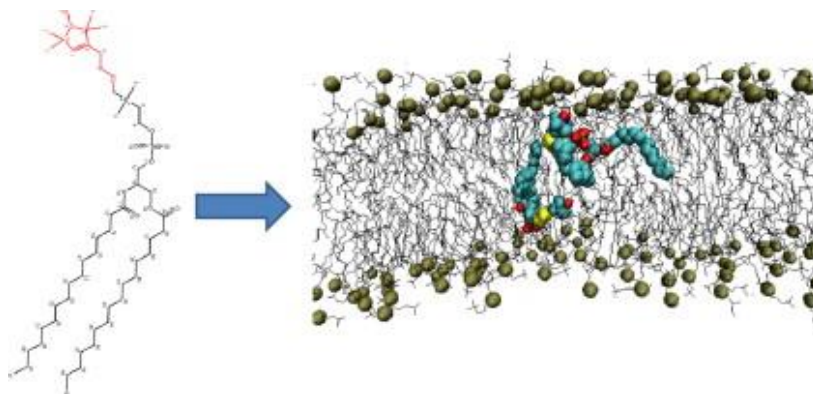


Рис. 8. Структура дипальмітоїлфосфатидилхоліну модифікованого аміноксильним радикалом [16]

Для вивчення властивостей штучних і біологічних мембран зазвичай використовують жиророзчинні мітки, здатні вбудовуватись у ліпідний шар мембран [14, 15].

Аміноксильний радикал пов'язаний з жирнокислотним ланцюгом вбудовується в ліпідну мембрану і за його поведінкою можна стежити за станом мембрани. Якщо під дією АФО, температури або інших факторів в'язкість мембрани змінюється, то це приводить до змін швидкості обертання радикала, тобто до зміни часу кореляції, що відразу відіб'ється на вигляді спектра.

Отже, ЕПР спектроскопія у поєднанні з сайт-спрямованим спін-маркуванням є корисним методом дослідження динамічних змін біомолекул у клітині, як-от білки, ліпіди, нуклеїнові кислоти під впливом АФО.

Контрольні питання для самоперевірки знань:

1. Що таке спін? Які частинки можна досліджувати, використовуючи метод ЕПР?
2. Наведіть параметри сигналів ЕПР, які використовуються для дослідження парамагнітних частинок.
3. Що таке спінові пастки? Наведіть структури найбільш використовуваних спінових пасток.
4. З якою метою використовують метод спінових пасток у біологічних системах?
5. Назвіть області застосування методу спінових міток.

Література

1. Murphy M. P., Bayir H., Belousov V., Chang C. J., Davies K. J., Davies M. J., Halliwell B. Guidelines for measuring reactive oxygen species and oxidative damage in cells and in vivo. *Nature Metabolism*. 2022. Vol. 4, № 6. P. 651–662. DOI: 10.1038/s42255-022-00591-z.
2. Halliwell B. Reactive oxygen species (ROS), oxygen radicals and antioxidants: Where are we now, where is the field going and where should we go? *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2022. Vol. 633. P. 17–19. DOI: 10.1016/j.bbrc.2022.08.098.
3. Spasojević I., Mojović M., Ignjatović A., Bačić G. The role of EPR spectroscopy in studies of the oxidative status of biological systems and the antioxidative properties of various compounds. *Journal of the Serbian chemical society*. 2011. Vol. 76, № 5. P. 647–677. DOI: 10.2298/JSC101015064S.

4. Zdybel M., Pilawa B. Application of electron paramagnetic resonance spectroscopy in ophthalmology. *Ophthalmology-Current Clinical and Research Updates*. 2014. P. 46–56. DOI: 10.5772/5813.
5. Swiech O., Bilewicz R., Megiel E. TEMPO coated Au nanoparticles: Synthesis and tethering to gold surfaces. *RSC advances*. 2013. Vol. 3, № 17. P. 5979–5986. DOI: 10.1039/C3RA23106B.
6. Rosen G. M., Finkelstein E. Use of spin traps in biological systems. *Advances in Free Radical Biology & Medicine*. 1985. Vol. 1, № 2. P. 345–375. DOI: 10.1016/8755-9668(85)90012-2.
7. Hawkins C. L. EPR spin trapping of protein radicals. *Free Radical Biology and Medicine*. 2004. Vol. 36, № 9. P. 1072–1086. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2003.12.013.
8. Villamena F. A., Zweier J. L. Detection of reactive oxygen and nitrogen species by EPR spin trapping. *Antioxidants and redox signaling*. 2004. Vol. 6, № 3. P. 619–629. DOI: 10.1089/152308604773934387.
9. Augusto O., Muntz Vaz S. EPR spin-trapping of protein radicals to investigate biological oxidative mechanisms. *Amino acids*. 2007. Vol. 32. P. 535–542. DOI: 10.1007/s00726-006-0429-4.
10. Klare J. P., Steinhoff H. J. Spin labeling EPR. *Photosynthesis research*. 2009. Vol. 102, № 2. P. 377–390. DOI: 10.1007/s11120-009-9490-7.
11. Abdel-Rahman E., Mahmoud A. M., Khalifa A. M., Ali S. S. Physiological and pathophysiological reactive oxygen species as probed by EPR spectroscopy: The underutilized research window on muscle ageing. *The Journal of physiology*. 2016. Vol. 594, № 16. P. 4591–4613. DOI: 10.1113/JP271471.
12. Smirnova T. I., Smirnov A. I. Peptide–membrane interactions by spin-labeling EPR. *Methods in enzymology*. 2015. Vol. 564. P. 219–258. DOI: 10.1016/bs.mie.2015.08.018.
13. Juliusson H. Y., Segler A. L. J., Sigurdsson S. T. Benzoyl-Protected Hydroxylamines for Improved Chemical Synthesis of Oligonucleotides Containing Nitroxide Spin Labels. *European Journal of Organic Chemistry*. 2019. Vol. 3799. P. 3805. URL: <https://hdl.handle.net/20.500.11815/1973>
14. Camargos H. S., Alonso A. Electron paramagnetic resonance (EPR) spectral components of spin-labeled lipids in saturated phospholipid bilayers: effect of cholesterol. *Química Nova*. 2013. Vol. 36. P. 815–821. DOI: 10.1590/S0100-40422013000600013.
15. Marsh D., Horváth L. I. Structure, dynamics and composition of the lipid-protein interface. Perspectives from spin-labelling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*. 1998. Vol. 1376, № 3. P. 267–296. DOI: 10.1016/S0304-4157(98)00009-4.
16. Kemmerer S., Voss J. C., Faller R. Molecular dynamics simulation of dipalmitoylphosphatidylcholine modified with a MTSL nitroxide spin label in a lipid membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2013. Vol. 1828, № 11. P. 2770–2777. DOI: 10.1016/j.bbamem.2013.07.030.

ГЛАВА 10

МЕТОД ХЕМІЛЮМІНЕСЦЕНЦІЇ

Метод ЕПР дає змогу не тільки виявляти, але й ідентифікувати радикали за допомогою аналізу надтонкої структури сигналів. Однак у біологічних системах він часто виявляється недостатньо чутливим через надзвичайно низьку стаціонарну концентрацію і короткий час життя вільних радикалів у клітинах. Ці обставини сприяли розробці іншого підходу. Замість спроб кількісного визначення вільних радикалів і продуктів їх перетворень часто більш продуктивним є спостереження за кінетикою процесів, що протікають за участі радикалів. Придатним методом дослідження вільнорадикальних процесів виявився метод хемілюмінесценції (ХЛ), який дає змогу вивчати реакції, що перебігають за участі найбільш реакційноздатних та короткоживучих радикалів, недоступних для вивчення іншими методами. До переваг ХЛ належить висока чутливість (визначається 10^{-10} М радикалів), а також можливість проводити дослідження в динаміці, навіть *in vivo*, коли концентрація вільних радикалів і продуктів окиснення може змінюватись.

10.1. Принципи хемілюмінесценції

В основі явища ХЛ лежить утворення продукту хімічної реакції, що знаходиться в електронно-збудженому стані, який характеризується розташуванням одного з електронів на більш високому енергетичному рівні. Такий електрон повертається на основний енергетичний рівень з виділенням надлишкової енергії (у більшості випадків у вигляді тепла). Але для деяких сполук характерним є виділення частини енергії у вигляді світлового випромінювання (рис. 1).

Отже, ХЛ – процес, внаслідок якого під час хімічної реакції виділяється енергія електронного збудження молекул у вигляді фотонів (квантів світла). Інтенсивність світіння ХЛ є пропорційною швидкості реакції, в якій беруть участь радикали.

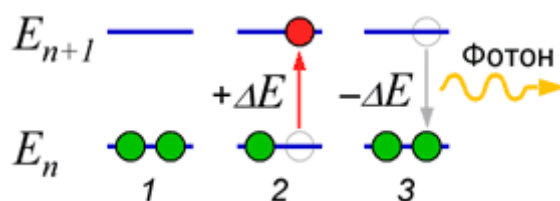


Рис. 1. Перехід електрона зі збудженого стану на основний енергетичний рівень

У загальному випадку процес, у якому реакції утворених радикалів приводять до ХЛ, може бути представленим послідовністю реакцій (1) [1]:



де P^* і P – молекули у збудженому і основному електронному станах відповідно.

ХЛ в біологічних системах класифікують так:

- біоломінесценція;
- неактивована ХЛ;
- активована ХЛ.

10.2. Біоломінесценція

Біоломінесценція – це видиме світіння живих організмів, пов'язане з процесами їх життєдіяльності. Біоломінесценція обумовлена взаємодією фермента, який називається люциферазою, з його субстратом – люциферином. Люцифераза каталізує окиснення люциферину молекулярним киснем, що приводить до його перетворення в молекулу оксилюциферину у збудженому стані [2]. Оксилюциферин повертається до основного стану, випромінюючи видиме світло (2). Інтермедіатами в цих реакціях є АФО:



Час світіння може бути різним – від тривалості протягом годин до коротких спалахів, що вимірюються у деяких організмів частками секунди. Світло під час біоломінесценції різних тонів – від блакитного до червоного. Перші спостереження світіння організмів зустрічаються ще в роботах Плінія Старшого (23–79 рр. н. е.) [3]. У його *Naturalis Historia* є досить докладні описи багатьох тварин, що світяться, але більше половини з усіх біоломінесцентних видів, відомих на сьогодні, було виявлено протягом ХІХ ст. Відомо, що серед наземних тварин біоломінесценція спостерігається рідко, але досить широко розповсюджена серед морських організмів – коралів, глибоководних медуз, кальмарів, каракатиць, деяких видів риб. Світіння моря впродовж століть залишалося загадкою, поки не було виявлено, що причиною є біоломінесценція простих морських організмів, які складають основу планктону Світового океану. Серед наземних організмів світяться окремі види молюсків, черв'яків, равликів, багатоніжок, світляків, грибів. Люмінесценція допомагає тваринам у пошуках їжі, партнера, для відлякування ворогів. Одна з гіпотез пов'язує появу біоломінесценції з

подоланням тваринами окисного стресу або продукування радикалів під час міграції на велику глибину.

Хімічні механізми окиснення люциферинів, які мають різну хімічну структуру у різних класів організмів, істотно відрізняються [4, 5], і сьогодні тривають дискусії щодо шляхів, інтермедіатів та механізмів біоломінесценції [6, 7]. Найбільш вивченою є біоломінесцентна система жуків-світляків (рис. 2). На першій стадії фермент зв'язується зі своїми субстратами – люциферином і аденозин-5'-трифосфатом (АТФ). У такому потрібному фермент-субстратному комплексі люциферин ковалентно зв'язаний з АТФ, утворюються змішаний ангідрид карбонової і фосфорної кислот, люциферил аденілат і пірофосфат (ПФ). Люциферил аденілат у комплексі з ферментом через ряд проміжних стадій окиснюється киснем повітря, перетворюючись у високоенергетичний циклічний пероксид – діоксетанон. Розрив пероксидного -О-О-зв'язку викликає декарбоксилювання діоксетанону і утворення кінцевих продуктів реакції – оксилюциферину – в електронно-збудженому стані. Коли оксилюциферин переходить у свій основний стан, спостерігається світіння. У роботі [8] було показано, що утворенню пероксид-аніона передують формування радикала люциферину та супероксиданіону внаслідок переносу електрона від люциферину на молекулярний кисень.

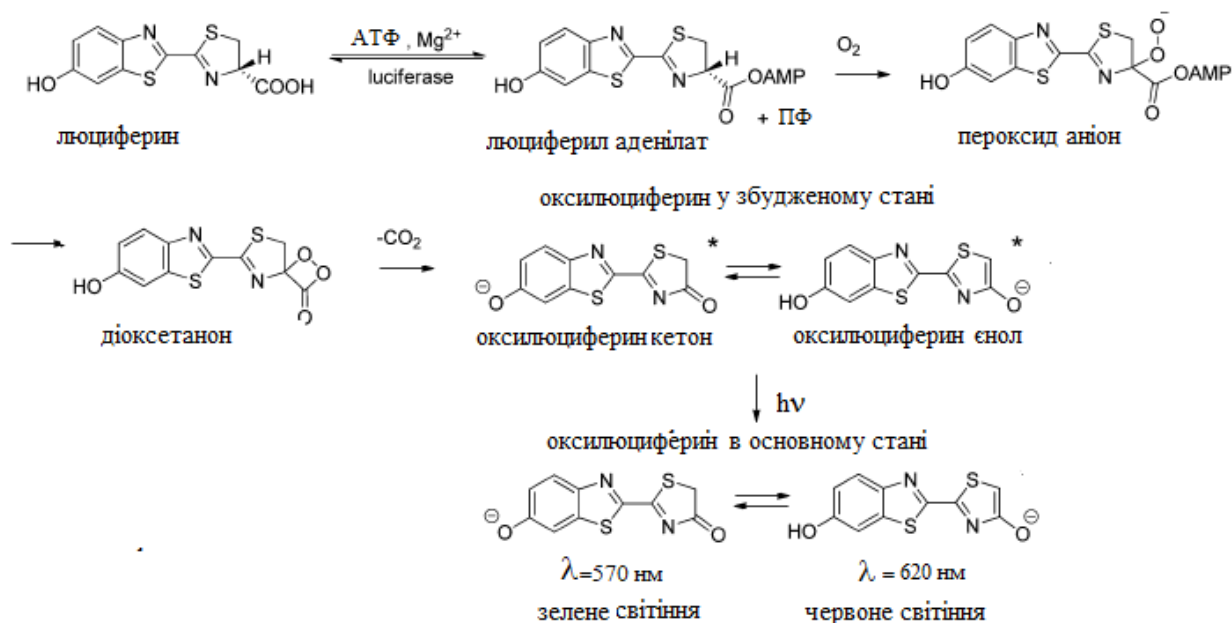


Рис. 2. Механізм біоломінесценції світляків

Є багато гіпотез щодо виникнення світіння організмів, але найбільш визаною є така: світяться (постійно або в імпульсному режимі) клітини, які самі генерують АФО для тієї чи іншої мети, в основному для захисту. Тому біоломінесценція – це результат спадкових змін механізмів, що захищають від самознищення подібного роду клітини. Зв'язок біоломінесценції з АФО підтверджено

в багатьох роботах. Наприклад, відомо, що у багатощетинкових черв'яків із сімейства *Polynoidae* внутрішньоклітинні світлові спалахи супроводжується утворенням супероксид аніон-радикала в люмісомах, а гідроген пероксид H_2O_2 та синглетний кисень утворюються під час механічного стресу рослин [9, 10]. Це дає змогу використовувати біолюмінесценцію для вивчення процесів утворення АФО та їх впливу на біоструктуру, наприклад, для розробки методів оцінки стійкості рослин до несприятливих погодних умов.

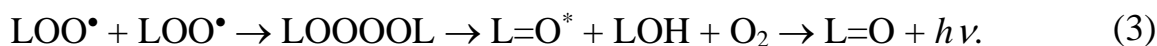
Останніми роками досягнуто великих успіхів у білковій інженерії, синтетичній хімії та фізиці, які дали змогу люциферинам та люциферазам знайти нові галузі застосування. На основі біолюмінесценції створено швидкі методи імуноферментного аналізу, експрес-методи контролю забруднення екосистем, харчових продуктів і напоїв. Біолюмінесценцію використовують для цільового підбору антибіотиків та імуномодуляторів. Використання природних і синтетичних люциферинів дає змогу створювати біосенсорні зонди для візуалізації АФО, активних форм нітрогену, сульфору, карбонільних сполук, які є біомаркерами різноманітних захворювань. Такі підходи розширюють наші знання про виникнення і розвиток хвороб, допомагають під час діагностики та лікування різних патологій [11].

10.3. Неактивована ХЛ

ХЛ, що супроводжує біохімічні реакції в клітинах і тканинах, має дуже низьку інтенсивність, і не випадково отримала назву «надслабкого світіння». Існує декілька причин низької інтенсивності ХЛ, що супроводжує реакції вільних радикалів. По-перше, це дуже мала концентрація радикалів у біологічних системах через їх високу хімічну активність. По-друге, не всяка хімічна взаємодія радикалів неодмінно приводить до утворення електронно-збуджених молекул продуктів реакції. Навпаки, в переважній більшості окисно-відновних взаємодій між молекулами або радикалами електрон переноситься не на рівень збудженого стану, а на найнижчу вакантну молекулярну орбіталь, тому висвітлювання кванта не відбувається. По-третє, навіть якщо і утворилася збуджена молекула продукту, ймовірність того, що висвітлиться квант, а не відбудеться перехід енергії в тепло, теж зазвичай дуже мала.

Процесами, що супроводжуються ХЛ у клітинах і тканинах тварин і людини, є процеси ПОЛ. Субстратами в цих процесах виступають поліненасичені жирні кислоти, що входять до складу ліпідів біологічних мембран та ліпопротеїдів, а також проміжні продукти – гідропероксиди (LOOH). ХЛ у процесах

ПОЛ обумовлена тим, що під час диспропорціонування вторинних пероксильних радикалів утворюється кетон у триплетному електронно-збудженому стані. Заборонений перехід кетону в основний синглетний стан відбувається за механізмом фосфоресценції і супроводжується ХЛ. Вимірювання інтенсивності ХЛ дає змогу оцінити концентрацію ліпідних радикалів, що ведуть ланцюги окиснення (3):



Реєстрація ХЛ під час ланцюгового окиснення дає змогу відслідковувати швидкість квадратичного обриву ланцюгів під час перебігу ПОЛ у кожний конкретний момент часу і оцінювати загальну швидкість окислювального процесу. Зв'язок між концентрацією радикалів LOO^\bullet та інтенсивністю ХЛ описується рівнянням (4):

$$I_{\text{CL}} = Q_{\text{CL}} k_i [\text{LOO}^\bullet]^2. \quad (4)$$

де I_{CL} – інтенсивність ХЛ; k_i , л/(моль·с) – константа швидкості реакції обриву ланцюгів; Q_{CL} – квантовий вихід ХЛ.

Для вивчення ХЛ скляний термостатований реактор поміщають у світло-непроникну камеру, вводять субстрат, ініціатор, фотосенсибілізатор (якщо це необхідно), і проводять окиснення під час безперервного барботування киснем. Сигнал від світіння підсилюють фотомножувачем і реєструють інтенсивність ХЛ [12]. Інтенсивність світіння, що виникає під час окиснення, є прямо пропорційною швидкості диспропорціонування LO_2^\bullet , а в квазістаціонарному режимі – швидкості ініціювання.

Типова крива кінетики ХЛ приведена на рис. 3.

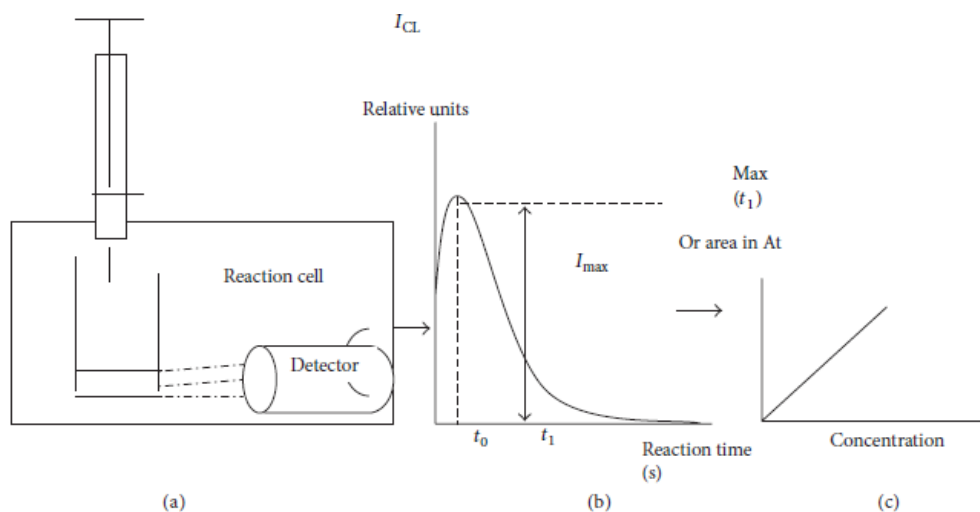


Рис. 3. Схема хемілюмінесцентної комірки (а), кінетична крива хемілюмінесценції (б), калібрувальна крива (с) [13]

Окрім реакції рекомбінації ліпідних пероксильних радикалів, відомі інші хемілюмінесцентні реакції в клітинах за участі АФО. Інтенсивна ХЛ супроводжує реакцію гіпохлориту і гідроген пероксиду [14], в якій утворюється синглетний кисень за реакцією (5):



Синглетний кисень переходить в основний (триплетний) стан з випроміненням кванта світла в інфрачервоній області спектра (довжина хвилі 1 270 нм) (6):



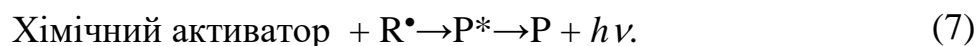
До того ж молекули синглетного кисню можуть утворювати димери (так звані ексимери) кисню, які переходять в основний стан з випроміненням видимого світла (довжини хвиль 635, 580, 535 нм).

10.4. Активована хемілюмінесценція

Для підсилення світіння ХЛ клітин та тканин рослин і тварин використовують метод активованої ХЛ з використанням «активаторів» або «підсилювачів» (enhancer) ХЛ. Інтенсивність світіння в присутності активатора є суттєво вищою, ніж без нього з тієї причини, що квантовий вихід люмінесценції активатора є вищим від квантового виходу люмінесценції електронно-збудженого продукту реакції. За механізмом дії активатори поділяються на хімічні і фізичні.

10.4.1. Хімічні активатори ХЛ

Хімічні активатори ХЛ – це сполуки, що вступають у реакції з АФО або органічними вільними радикалами, внаслідок яких утворюються молекули продуктів у збудженому електронному стані [15]. Спостережувана під час цього ХЛ пов'язана з переходом молекул в основний стан, що приводить до випромінення фотонів (7):



Добре відомими представниками таких активаторів є люмінол (5-аміно-1,2,3,4-тетрагідро-1,4-фталазіндіон, гідрозид 3-амінофталевої кислоти) і люцигенін (динітрат 10,10'-диметил-9,9'-біакридинію).

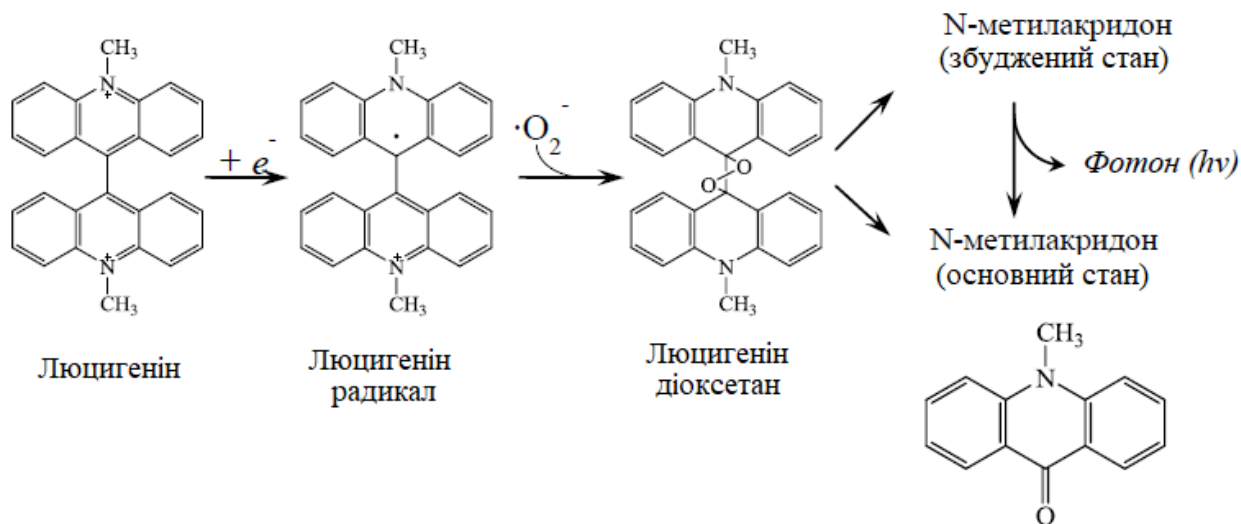


Рис. 5. Хімічні перетворення люцигеніну під дією супероксид аніон-радикала

10.4.2. Фізичні активатори ХЛ

Фізичні активатори не вступають у хімічні реакції і не впливають на перебіг реакцій, що супроводжується ХЛ, але не менш суттєво підсилюють її інтенсивність. В основі дії фізичних активаторів лежить фізичний процес перенесення кванта енергії з електронно-збудженого молекулярного продукту хемілюмінесцентної реакції на активатор (А) за реакцією (8):



До фізичних активаторів належать деякі люмінесцентні сполуки, що підсилюють ХЛ під час ланцюгового окиснення ліпідів, як-от кумарин С-525, родамін Ж6, нільський червоний і нільський синій, а також деякі порфірини. Фізичні активатори не впливають на перебіг реакцій за участі АФО, але суттєво збільшують інтенсивність ХЛ.

10.5. Застосування ХЛ в медицині

У патогенезі багатьох хвороб і патологічних процесів відіграє важливу роль оксидативний стрес. Метод ХЛ є корисним під час вивчення таких патологій, оскільки дає можливість вимірювати рівень вільних радикалів, оцінювати параметри антиоксидантного захисту та вплив антиоксидантів. ХЛ успішно застосовують під час вивчення імунних патологій, порушень метаболізму, дисфункції

ендотелію, ішемії / реперфузії міокарда і мозку, онкологічних і запальних захворювань, а також багатьох інших хвороб, патогенез яких пов'язаний з оксидативним стресом.

Описані методи дослідження є тільки частиною наявних методів для реєстрації різних видів АФО. Деякі з них знайшли успішне застосування в наукових дослідженнях. Втім у цій області залишаються проблеми, пов'язані з недоліками наявних методів. Для розуміння ролі АФО в живих системах потрібні нові сучасні високоселективні і високочутливі індикатори, здатні працювати в живих системах, не викликаючи водночас токсичного ефекту і неспецифічних реакцій.

Контрольні питання для самоперевірки знань:

1. Що таке хемілюмінесценція?
2. Біолюмінесценція. Поясніть значення термінів «люциферин», «люцифераза».
3. Наведіть реакції, що відбуваються в клітині і супроводжуються хемілюмінесценцією.
4. Хімічні і фізичні активатори хемілюмінесценції.

Література

1. Lu C., Song G., Lin J. M. Reactive oxygen species and their chemiluminescence-detection methods. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2006. Vol. 25, № 10. P. 985–995. DOI: 10.1016/j.trac.2006.07.007.
2. Kaskova Z. M., Tsarkova A. S., Yampolsky I. V. 1001 lights: luciferins, luciferases, their mechanisms of action and applications in chemical analysis, biology and medicine. *Chemical Society Reviews*. 2016. Vol. 45, № 21. P. 6048–6077. DOI: 10.1039/C6CS00296J.
3. Lee J. Bioluminescence: the First 3000 years (Review). *Journal of Siberian Federal University. Biology*. 2008. Vol. 3. P. 194–205. URL: <http://elib.sfu-kras.ru/handle/2311/935>
4. Dubinnyi M. A., Kaskova Z. M., Rodionova N. S., Baranov M. S., Gorokhovatsky A. Y., Kotlobay A., Yampolsky I. V. Novel mechanism of bioluminescence: Oxidative decarboxylation of a moiety adjacent to the light emitter of *Fridericia luciferin*. *Angewandte Chemie International Edition*. 2015. Vol. 54, № 24. P. 7065–7067. DOI: 10.1002/anie.201501668.
5. Bechara E. J. H., Stevani C. V. Brazilian bioluminescent beetles: reflections on catching glimpses of light in the Atlantic forest and cerrado. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2018. Vol. 90. P. 663–679. DOI: 10.1590/0001-3765201820170504.

6. Da Silva L. P., da Silva J. C. G. E. Firefly luciferin as a multifunctional chemiluminescence molecule. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2013. Vol. 12, № 9. P. 1615–1621. DOI: 10.1039/c3pp50086a.
7. Marques S. M., Esteves da Silva J. C. G. Firefly bioluminescence: a mechanistic approach of luciferase catalyzed reactions. *IUBMB life*. 2009. Vol. 61, № 1. P. 6–17. DOI: 10.1002/iub.134.
8. Branchini B. R., Behney C. E., Southworth T. L., Fontaine D. M., Gulick A. M., Vinyard D. J., Brudvig G. W. Experimental support for a single electron-transfer oxidation mechanism in firefly bioluminescence. *Journal of the American Chemical Society*. 2015. Vol. 137, № 24. P. 7592–7595. DOI: 10.1021/jacs.5b03820.
9. Chen W. L., Xing D., Tan S., Tang Y., He Y. Imaging of ultra-weak biochemiluminescence and singlet oxygen generation in germinating soybean in response to wounding. *Luminescence: The journal of biological and chemical luminescence*. 2003. Vol. 18, № 1. P. 37–41. DOI: 10.1002/bio.703.
10. Ohya T., Yoshida S., Kawabata R., Okabe H., Kai S. Biophoton emission due to drought injury in red beans: possibility of early detection of drought injury. // *Japanese journal of applied physics*. 2002. Vol. 41, № 7R. P. 4766. DOI: 10.1143/JJAP.41.4766.
11. Syed A. J., Anderson J. C. Applications of bioluminescence in biotechnology and beyond. *Chemical Society Reviews*. 2021. Vol. 50. P. 5668–5705. DOI: 10.1039/D0CS01492C.
12. Bøtter-Jensen L. Luminescence techniques: instrumentation and methods. *Radiation Measurements*. 1997. Vol. 27, № 5–6. P. 749–768. DOI: 10.1016/S1350-4487(97)00206-0.
13. Fereja T. H., Hymete A., Gunasekaran T. A recent review on chemiluminescence reaction, principle and application on pharmaceutical analysis. *International Scholarly Research Notices*. 2013. Vol. 2013. DOI: 10.1155/2013/230858.
14. Arnhold J., Panasenko O. M., Schiller J., Arnold K., Vladimirov Y. A., Sergienko V. Reaction of hypochlorous acid with hydrogen peroxide and tert-butyl hydroperoxide. 1H NMR spectroscopy and chemiluminescence analyses. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 1996. Vol. 51, № 5–6. P. 386–394. DOI: 10.1515/znc-1996-5-616.
15. Guzik T. J., Channon K. M. Measurement of vascular reactive oxygen species production by chemiluminescence. *Hypertension*. Humana Press, 2005. P. 73–89. DOI: 10.1385/1-59259-850-1:073.
16. Bedouhène S., Moulti-Mati F., Hurtado-Nedelec M., Dang P. M. C., El-Benna J. Luminol-amplified chemiluminescence detects mainly superoxide anion produced by human neutrophils. *American journal of blood research*. 2017. Vol. 7, № 4. P. 41.

Умовні позначення

АФО	– активні форми кисигену;
Радикал Гомберга	– трифенілметильний радикал;
Радикал Кельша	– α,γ -бідифенілен- β -фенілаллільний радикал;
НАТ	– перенос атома Гідрогену;
АТФ	– аденозинтрифосфат;
АДФ	– аденозиндифосфат;
Q10	– коензим Q10, убіхінон;
Cyt C	– цитохром С;
НАДФН-оксидаза	– нікотинамід аденін динуклеотид фосфат оксидаза;
NOX2	– НАДФН-оксидазний комплекс;
NOS	– NO-синтаза;
nNOS	– нейронна NO-синтаза;
iNOS	– індукована NO-синтаза;
eNOS	– ендотеліальна NO-синтаза;
СОД	– супероксиддисмутаза;
EDRF	– ендотеліальний фактор розслаблення судин;
цГМФ	– цикло-гуанозинмонофосфат;
АО	антиоксиданти;
АОС	– антиоксидантна система;
k_p	– константа швидкості реакції продовження ланцюгів;
k_t	– константа швидкості реакції обриву ланцюгів;
САТ	– каталаза;
ГПО	– глутатіонпероксидаза;
ГР	– глутатіонредуктаза;
ГТ	– глутатіонтрансфераза;
ПОЛ	– пероксидне окиснення ліпідів;
ПНЖК	– поліненасичені жирні кислоти;
МДА	– малоновий діальдегід;
ТБА	– тіобарбітурова кислота;
ЕПР	– метод електронного парамагнітного резонансу;
ТЕМПО	– 2,2',6,6'-тетраметилпіперидин- <i>N</i> -оксильний радикал;
ДФПГ	– <i>N,N</i> -дифеніл- <i>N</i> -пікрилгідрозильний радикал;
НВ	– надтонка спін-спінова взаємодія;
DMPO	– 5,5-диметилпіролін- <i>N</i> -оксид;
ХЛ	– хемілюмінесценція.

ДЛЯ ПОДАТОК

Навчальне видання

Куш Ольга Василівна
Шендрик Олександр Миколайович

АКТИВНІ ФОРМИ ОКСИГЕНУ

Навчальний посібник
для здобувачів вищої освіти спеціальності 102 Хімія

Редактор О. А. Солдатова
Технічний редактор Т. О. Важеніна-Гопрак

Підписано до друку 25.09.2023
Формат 60 × 84/16. Папір офсетний.
Друк – цифровий. Умовн. друк. арк. 7,44
Тираж 30. Зам. 30

Донецький національний університет імені Василя Стуса
21021, м. Вінниця, 600-річчя, 21
Свідоцтво про внесення суб'єкта видавничої справи
до Державного реєстру
серія ДК № 5945 від 15.01.2018