

## Зміст

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ .....	5
ВІД АВТОРІВ .....	6
<b>РОЗДІЛ 1. ДЖЕРЕЛА УТВОРЕННЯ АКТИВНИХ ФОРМ КИСНЮ І АЗОТУ В ОРГАНІЗМІ .....</b>	<b>8</b>
1.1. Супероксидний аніон-радикал.....	8
1.2. Гідроксильний радикал .....	18
1.3. Перекис водню .....	18
1.4. Нітроген (II) оксид.....	20
1.5. Пероксинітрит .....	32
1.6. Нітритний радикал.....	33
<b>РОЗДІЛ 2. ОСНОВНІ ЛАНКИ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ КЛІТИНИ .....</b>	<b>35</b>
2.1. Супероксиддисмутазно-каталазна система .....	35
2.2. Система глутатіону .....	42
2.3. Тіоредоксинова система .....	53
2.4. Неферментативні антиоксиданти.....	56
<b>РОЗДІЛ 3. МЕХАНІЗМИ АВТОРЕГУЛЯЦІЇ РІВНЯ ОКСИДУ АЗОТУ В ОРГАНІЗМІ ССАВЦІВ .....</b>	<b>66</b>
<b>РОЗДІЛ 4. МЕХАНІЗМИ РОЗВИТКУ ОКСИДАТИВНО- НІТРОЗАТИВНОГО УШКОДЖЕННЯ КЛІТИН (СТРЕСУ) .....</b>	<b>71</b>
4.1. Основні причини розвитку оксидативно-нітрозативного стресу .....	72

4.2. Механізми ушкодження клітин активними формами кисню.....	82
4.3. Механізми ушкодження клітин активними формами азоту.....	96
<b>РОЗДІЛ 5. МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ ПАРАМЕТРІВ ОКСИДАТИВНО-НІТРОЗАТИВНОГО СТРЕСУ .....</b>	<b>107</b>
5.1. Дослідження продукції активних форм кисню та азоту.....	108
5.2. Дослідження функціонального стану антиоксидантної системи.....	120
5.3. Дослідження маркерів оксидативно-нітрозативного ушкодження.....	133
<b>СПИСОК ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ .....</b>	<b>146</b>

## СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АК	– аскорбінова кислота
АФА	– активні форми азоту
АФК	– активні форми кисню
ГЛ	– глутатіон
ГПО	– глутатіонпероксидаза
ГР	– глутатіонредуктаза
ДАК	– дегідроаскорбат
ЕТЛ	– електронотransпортний ланцюг
ЕТФ	– електронотransпортний флавопротеїн
КДГ	– ксантиндегідрогеназа
КО	– ксантиноксидаза
КОР	– ксантиноксидоредуктаза
ЛОГ	– ліпоксигеназа
МДА	– малоновий діальдегід
НАД	– нікотинамідаденідинуклеотид
НАДФ	– нікотинамідаденідинуклеотидфосфат
НОС	– NO-синтаза
НФО	– НАДФН-оксидаза
ПНЖК	– поліненасичені жирні кислоти
ПОЛ	– перекисне окиснення ліпідів
САР	– супероксидний аніон-радикал
СОД	– супероксиддисмутаза
ТО	– тиреоїдна оксидаза
ФАД	– флавінаденідинуклеотид
ФМН	– флавіномононуклеотид
ФНП-α	– фактор некрозу пухлин-α
МК I	– мітохондріальний комплекс I
МК II	– мітохондріальний комплекс II
МК III	– мітохондріальний комплекс III
ЦОГ	– циклооксигеназа
CoQ	– коензим Q
5-НРЕТЕ	– 5-гідропероксиейкозатетраснова кислота
4-ННЕ	– 4-гідроксиноненал
4-НРNE	– 4-гідропероксиноненал

## ВІД АВТОРІВ

Навчально-методичний посібник написаний для студентів та аспірантів, які бажають поглибити свої знання про механізми розвитку патологічних процесів, які супроводжуються оксидативно-нітрозативним ушкодженням органів та тканин.

Життя як процес є одвічною боротьбою двох протилежностей: руйнування та відновлення. Продовження життя можливе лише при переважанні відновлення над руйнуванням. При значній перевазі останнього можливий розвиток захворювань та закінчення процесу життя (смерть). Варто розуміти, що життя неможливе без процесів руйнування, і вони є рушійною силою для розвитку організму, біологічного виду та біосфери в цілому.

На клітинному рівні процеси руйнування набувають форми різних ушкоджувальних механізмів, спрямованих на порушення функціонування різних субклітинних структур (ядро, мембрана, мітохондрія тощо). Прикладами таких механізмів можуть бути збільшення електролітно-осмотичного тиску на мембрану клітини, збільшення концентрації кальцію в окремих компартментах клітини, електричний самопробій та розвиток оксидативного стресу.

Процеси відновлення на клітинному рівні є різними генетично детермінованими адаптивними реакціями. Як приклад можна навести синтез антиоксидантних ферментів, активацію транскрипційних факторів або регенерацію субклітинних структур, які зазнали ушкодження.

Цей посібник має на меті створити або розширити уявлення читачів про руйнівні процеси, які відбуваються на клітинному рівні в живому організмі, шляхом детального опису такого процесу як оксидативно-нітрозативний стрес. Цей вид стресу супроводжує організм протягом усього життя та являє собою переважання руйнівних процесів над відновними. У посібнику детально описані джерела та механізми утворення ініціаторів оксидативно-нітрозативного стресу – активних форм кисню та азоту. Також окремо описані природні механізми, що являють собою процеси нейтралізації ініціаторів та продуктів оксидативно-нітрозативного стресу (антиоксидатна система клітини).

Окрему увагу колектив авторів приділив опису методів дослідження оксидативно-нітрозативного стресу. Цей розділ буде корис-

ний як практикуючим лікарям, так і дослідникам, оскільки дозволяє встановлювати причинно-наслідкові зв'язки в патогенезі захворювань, в основі яких лежить розвиток оксидативно-нітрозативного стресу (інфаркти, інсульти, реперфузійний синдром тощо).

Також цей посібник покликаний полегшити сприйняття студентами та розширити їх уявлення про такий розділ патофізіології як «Патофізіологія клітини».

## РОЗДІЛ 1. ДЖЕРЕЛА УТВОРЕННЯ АКТИВНИХ ФОРМ КИСНЮ І АЗОТУ В ОРГАНІЗМІ

Кисень ( $O_2$ ) є одним із найпоширеніших елементів на Землі. Він входить до складу всіх живих організмів. Найрозповсюдженішою формою кисню є вода ( $H_2O$ ). Приблизно 90 % кисню, який споживає людина, залучається до реакцій окисного фосфорилування чи інших оксидативних процесів. У живому організмі постійно утворюються *активні форми кисню* (АФК).

*Активні форми кисню* – це продукти активації кисню, що мають здатність окиснювати органічні сполуки та біологічні полімери, які молекулярний кисень без участі специфічних ферментів окиснювати не здатен. Поряд із АФК потужний оксидативний потенціал мають *активні форми азоту* (АФА).

*Активні форми азоту* – це продукти активації оксиду азоту (NO), що мають здатність окиснювати органічні сполуки та біологічні полімери, які оксид азоту без участі специфічних ферментів окиснювати не здатен.

До активних форм кисню належать: супероксидний аніон-радикал ( $SO_2^-$ ,  $O_2^{\cdot-}$ ), його гідратована форма ( $HO_2^{\cdot-}$ ), синглетний кисень ( $^1O_2$ ), гідроксильний радикал ( $HO\cdot$ ) та різні гіпогалагеніди (HOCl, HOBr та HOI). До активних форм азоту належать: радикал оксиду азоту ( $NO\cdot$ ), нітритний радикал ( $NO_2\cdot$ ) та пероксинітрит ( $ONOO^-$ ).

*Вільний радикал* – це частинка, яка містить один або декілька «вільних» (не маючих спареного з ними протона) електронів. Наявність одного або декількох надлишкових (неспарених) електронів є характерною особливістю вільних радикалів. Принциповою відмінністю вільного радикала та іона є той факт, що до кожного негативно зарядженого іона (аніона), який містить надлишковий електрон, в хімічній системі (розчині або суміші газів) існує позитивно заряджений іон (катіон), який слугує «донором» електрона. У випадку вільного радикала баланс катіонів/аніонів порушується, електрон втрачає зв'язок із своїм «донором» і стає вільним.

### 1.1. Супероксидний аніон-радикал

Супероксидний аніон-радикал належить до групи хімічних сполук, які носять назву *вільних радикалів*.

Наявність неспареного електрона змінює хімічні властивості САР порівняно із киснем. САР має потужні окисдантні властивості, проте період його напівжиття зменшується до мілісекунд. Структура зовнішньої електронної хмари САР та деяких інших представників активних форм кисню (АФК) представлена на рисунку 1.



**Рис. 1.** Схематичне зображення зовнішньої електронної хмари активних форм кисню.

Основними джерелами продукції САР є *аеробне окиснення у мітохондріях, НАДФН-оксидаза, ксантинооксидаза та цитохром P<sub>450</sub>-оксидаза* [1].

**Механізми продукції САР мітохондріями.** В мітохондріях САР продукується шляхом одноелектронного відновлення молекули кисню. Тому важливо розуміти кінетичні та термодинамічні фактори, що лежать в основі взаємодії потенційних донорів електронів з киснем. Наявність двох неспарених електронів на зв'язкових орбіталях з паралельними спінами обумовлює можливість кисню приймати лише по одному електрону за одну реакцію відновлення [2].

У більшості випадків переносники електронів, такі як НАДН, НАДФН, відновлений коензим Q (CoQH<sub>2</sub>) та відновлений глутатіон (GSH), не реагують з киснем. Продукція САР мітохондріями відбувається в редокс-активних простетичних групах всередині білків або за умови приєднання носіїв електронів, таких як CoQH<sub>2</sub> або НАДН<sub>2</sub>, до білків.

**Мітохондріальний комплекс I (МК I)** є точкою входу електронів, які надходять із НАДН, до мітохондріального електротранспортного ланцюга. При роботі МК I флавінмононуклеотид(ФМН)-вмісний центр приймає електрони від НАДН і передає їх через ланцюжок із семи залізо-сульфурвмісних (FeS) центрів до коензиму-Q, який при цьому відновлюється до CoQH<sub>2</sub>. При зменшенні пулу окис-

неного коензиму-Q та збільшенні різниці потенціалів між зовнішньою та внутрішньою поверхнями мембрани мітохондрій великою концентрацією сукцинату створюються сприятливі умови для утворення САР із МК I. Збільшення співвідношення НАДН/НАД<sup>+</sup> також призводить до збільшення продукції САР від МК I.

Механізм утворення САР від МК I пов'язаний із тим, що лише у повністю відновленого ФМН-центру достатньо потенціалу для передачі електрона на кисень. Таким чином, збільшення співвідношення НАДН/НАД<sup>+</sup> призводить до посилення транспорту електронів у ЦК I із ФМН-центру до коензиму-Q, що збільшує кількість відновленого коензиму-Q. Отже, при збільшенні концентрації НАДН відбувається зменшення окисненого коензиму-Q у ЦК I і, як наслідок, ФМН-центр втрачає можливість віддавати електрони до коензиму-Q і починає передавати їх на кисень із утворенням САР. Цим механізмом можна пояснити вплив такого інгібітора тканинного дихання, як *ротенон*, на продукцію САР. Ротенон зв'язується із центром приєднання коензиму-Q та блокує можливість коензиму-Q відновлюватись.

На нашу думку, іншим механізмом продукції САР у МК I є зворотний потік електронів. Зворотний потік електронів можливий при різкому збільшенні різниці потенціалів між центром приєднання коензиму-Q та ФМН-центром. Джерело продукції САР при зворотному потоку електронів у ЦК I на даний час не встановлене. Частина дослідників вказує на можливість ФМН-центру виступати у ролі продуцента САР, інші дослідники вказують на можливість центру приєднання коензиму-Q продукувати САР, особливо при зниженні рН.

**Мітохондріальний комплекс II (МК II)** здатен продукувати САР не тільки при окисдації сукцинату до фумарату (при роботі циклу Кребса), але і при перебігу реакції у зворотному напрямку (утворенні сукцинату із фумарату при надлишковій концентрації відновленого коензиму-Q).

**Мітохондріальний комплекс III (МК III)** спрямовує потік електронів з коензиму-Q на цитохром с. Він містить два активних центри Q<sub>i</sub> та Q<sub>o</sub>. За фізіологічних умов кількість САР, що продукується МК III, є незначною, порівняно із МК I. Проте, за умов блокади центру Q<sub>i</sub> *антиміцином* та при наявності надлишку відновленого коензиму-Q можливе посилене утворення САР у реакції кисню із убісеміхіноном (семіхіноном), який приєднаний до центру Q<sub>o</sub>.



Коли активність дихального ланцюга низька або коли виник зворотний потік електронів, співвідношення НАДН/НАД<sup>+</sup> може збільшитися, і це може призвести до продукування САР в інших місцях, пов'язаних із метаболізмом НАДН. Наприклад, метаболізм 2-оксоглутарату ( $\alpha$ -кетоглутарату) може супроводжуватись продукцією АФК, внаслідок діяльності 2-оксоглутаратдегідрогенази ( $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогенази) при дефіциті НАД<sup>+</sup>. Компонентом  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогенази, що відповідає за продукцію САР за цих умов, є дигідроліпоаміддегідрогеназа, тому всі комплекси мітохондрій, що містять цей фермент, потенційно можуть бути джерелами продукції САР при недостатній кількості НАД<sup>+</sup>.

*Інші мітохондріальні джерела продукції САР.* Багато потенційних джерел продукції САР взаємодіють із пулом коензиму-Q. Окиснення жирних кислот у матриці зменшує електронотранспортний флавопротеїн (ЕТФ), який передає свої електрони на коензим-Q через ЕТФ : коензим-Q-оксидоредуктазу на поверхні матриці внутрішньої мембрани мітохондрій. Цей трансфер електронів може супроводжуватись продукцією САР. Прикладом мітохондріальних ферментів, які взаємодіють із пулом коензиму-Q та продукують САР, можна також вважати *дигідрооротатдегідрогеназу* та *гліцерол-3-фосфатдегідрогеназу*. Обидва ферменти здатні продукувати САР при окисненні своїх субстратів та відновленні коензиму-Q [3].

У підсумку слід зазначити, що в фізіологічних умовах у мітохондріях завжди утворюється певна кількість САР, як наслідок тканинного дихання та процесів синтезу АТФ.

**Механізми продукції САР від НАДФН-оксидази.** НАДФН-оксидаза (К.Ф. 1.6.3.1, НФО) належить до групи гомологічних трансмембранних ферментів, які переносять електрони крізь клітинну мембрану. Всі НАДФН-оксидази мають центр приєднання НАДФН, центр приєднання ФАД, шість трансмембранних доменів та 4 гемвісних домени, по два домени у третьому та п'ятому трансмембранних доменах (рис. 2) [4]. Виділяють п'ять ізоформ НАДФН-оксидази: НФО-1 (найбільший рівень експресії гена цієї ізоформи НФО спостерігається у клітин товстої кишки), НФО-2 (фагоцити), НФО-3 (клітини внутрішнього вуха), НФО-4 (клітини нирок та судинної стінки) та НФО-5 (лімфоцити та клітини яєчка). Схожу до НФО структуру мають тиреоїдні оксидази (ТО), тому деякі дослідники відносять ТО-1 та ТО-2 до ізоформ НФО.

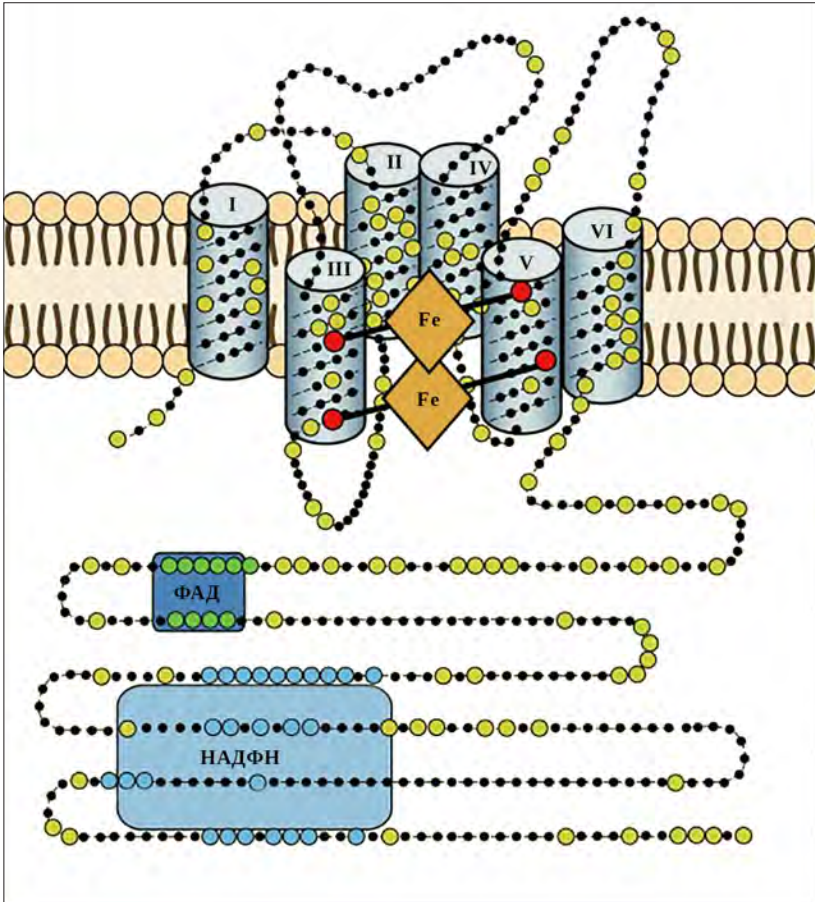


Рис. 2. Типова структура ізоформ НАДФН-оксидази.

**НАДФН-оксидаза-2** вважається еволюційним прототипом НФО. Гени НФО-2 знаходяться у людей на 10 хромосомі. НФО-2 можна розглядати як трансмембранний електротранспортний ланцюг, що з'єднує НАДФН (донор електронів) на цитозольній стороні мембрани з киснем (акцептор електронів) на зовнішній стороні мембрани. Результатом такого переносу електрона є утворення САР на зовнішній поверхні мембрани. Процес утворення САР відбувається у декілька етапів.

На *першому етапі* електрони переносяться з центру приєднання НАДФН до центру приєднання ФАД. НФО-2 є більш селективним до НАДФН ніж до НАДН.  $K_m$  для НАДФН становить 40–45 мкМ, тоді як  $K_m$  для НАДН становить 2,5 мкМ.

На *другому етапі* один електрон переноситься від відновленого ФАДН<sub>2</sub> до залізовмісного центру внутрішнього гема. Оскільки залізо гема може прийняти лише один електрон (відновлюється із Fe<sup>3+</sup> до Fe<sup>2+</sup>), внутрішній гем повинен віддати свій електрон зовнішньому гема до того, як другий електрон може бути прийнятий з частково відновленого ФАДН. Однак передача електрона від внутрішнього гема до зовнішнього гема відбувається проти різниці потенціалів і вимагає витрат енергії. Для створення різниці потенціалів, яка сприятиме такому переносу електрона, атом кисню повинен бути приєднаним до зовнішнього гема, щоб прийняти електрон.

*Третім етапом* утворення САР від НФО-2 є безпосереднє приєднання електрона до кисню на зовнішньому гемовмісному домені.

Варто зазначити, що експресія генів НФО-2 є індукційною та регулюється декількома транскрипційними каскадами. Серед активаторів експресії НФО-2 варто зазначити PU.1, NF-κB та інтерферон-регуляторний фактор 1 та 2 (IRF-1&2). Репресором транскрипції НФО-2 є транскрипційний фактор, що сприяє транслокації фрагмента ССААТ у ДНК.

**НАДФН-оксидаза-1** є першим гомологом НФО-2, що був описаний у науковій літературі. Гени НФО-1 та НФО-2 є результатом відносно недавнього дублювання генів, оскільки кількість і довжина екзонів є практично однаковою у двох генів. Гени НФО-1 розташовані на 10 хромосомі. Окрім конститутивної активності у тканинах, де експресується ФНО-1, можлива також індукція НФО-1 різними регуляторними факторами. Наприклад, у гладких м'язях судин активність НФО-1 може бути індукованою тромбоцитарним фактором росту, простагландінами та ангіотензином II. Варто зазначити, що продукція САР від НФО-1 залежить від цитозольних субодиниць цього ферменту (p67<sup>phox</sup> та p40<sup>phox</sup>).

**НАДФН-оксидаза-3.** НФО-3 має приблизно 56 % схожості із НФО-2 по послідовності амінокислотних залишків. Ген НФО-3 знаходиться у людей на 6 хромосомі. Дуже висока експресія НФО-3 відмічається у внутрішньому вусі, в тому числі у кохлеарному та вестибулярному сенсорному епітелії та у спіральному ганглії. Низький

рівень експресії генів НФО-3 також може бути в інших тканинах, включаючи селезінку плода, нирки плода, кістки черепа та клітини головного мозку.

**НАДФН-оксидаза-4.** НФО-4 спочатку була ідентифікована як гомолог НАДФН-оксидази, що має високий ступінь експресії в нирках. Незважаючи на те, що НФО-1-НФО-3 складають еволюційно тісно пов'язану між собою підгрупу ферментів НФО, НФО-4 є більш віддаленим від них гомологом, який має лише 39 % ідентичності з НФО-2. Ген людської НФО-4 знаходиться у 11 хромосомі. На додаток до сильної експресії в нирках, НФО-4 також експресується в остеокластах, ендотеліальних клітинах, клітинах гладких м'язів, гемопоетичних стовбурових клітинах тощо [5].

Індукція експресії НФО-4 спостерігається за таких умов: у відповідь на стрес ендоплазматичного ретикулу, при емоційному стресі, при пошкодженні каротидної артерії, гіпоксії та ішемії, а також при впливі трансформуючого фактора росту (TGF)-1 $\beta$  та фактора некрозу пухлин- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) на гладенькі м'язи. Всередині клітини НФО-4 локалізується переважно на ендоплазматичному ретикулумі.

**НАДФН-оксидаза-5.** Гени НФО-5 у людей розташовуються на 15 хромосомі. У НФО-5 є 4 гомологічні ізоформи: - $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ , - $\delta$ . Ці ізоформи НФО-5 відрізняються за своєю структурою від НФО-1-4 тим, що мають Ca<sup>2+</sup>-зв'язуючий EF-домен<sup>1</sup>. Існує ще одна ізоформа НФО-5, яка не містить у своїй структурі EF-домену (НФО-5- $\epsilon$ ). Експресія генів НФО-5 виявлена в яєчках, селезінці, лімфатичних вузлах, гладких м'язах судин, кістковому мозку, підшлунковій залозі, плаценті, яєчниках, матці, шлунку та в різних тканинах плода. Усередині яєчка НФО-5 локалізується в пахітенових сперматоцитах. Усередині селезінки НФО-5 має чітко виражену локалізацію в зоні мантиї, яка багата зрілими В-клітинами, і в ділянці періартеріальної лімфоїдної оболонки, яка містить багато Т-лімфоцитів. НФО-5, на відміну від НФО-1 або НФО-3, не залежить від наявності цитозольних активаторних субодиноць.

**Тиреоїдні оксидази 1 та 2.** Гени ТО-1 та ТО-2 розташовані у людей на 15 хромосомі. Структурно ТО-1 та ТО-2 мають гомологічний домен із НФО-1-4 та EF-домен, який є гомологічним до такого у

---

<sup>1</sup> EF-домен – це структурний домен, що має форму спіраль – петля – спіраль, який характерний для білків, що зв'язують кальцій.

НФО-5. Окрім цих двох доменів ТО-1 та ТО-2 містить ще один (сьомий) трансмембранний домен. Експресуються гени ТО-1 та ТО-2 переважно у клітинах цитоподібної залози. Однак експресія генів ТО-1 також була виявлена у епітелії повітряних шляхів та простаті. ТО-2 була виявлена у протоках слинних залоз, ректальному епітелії, у епітелії повітряних шляхів та простаті. Цікавим є той факт, що повністю сформовані та глікозилзовані ТО-1 та ТО-2 продукують перекис водню замість САР, хоча цей феномен може бути результатом швидкої внутрішньоферментної дисмутації САР у перекис водню (детальніше про утворення перекису водню із САР дивись у розділі 1.3).

**Механізми продукції САР від ксантиноксидази.** Ксантиноксидаза (К.Ф. 1.17.3.2; КО) – це гомодимер із молекулярною масою приблизно 300 кДа. Кожна субодиниця складається із пептидного ланцюга, що з'єднується із одним центром, що містить молібдоптерин, два неідентичні центри, які містять  $Fe_2S_2$ , та один центр зв'язку із ФАД. Цей фермент є однією із форм ксантиноксидоредуктази (КОР).

В організмі КОР може перебувати у двох формах, які здатні переходити одна в одну. Перша форма – ксантиндегідрогеназа (К.Ф. 1.1.1.204; КДГ), друга – власне ксантиноксидаза. Ці форми можуть бути перетворені оборотно, при взаємодії з сульфідними реагентами, або безповоротно шляхом протеолізу КДГ. КДГ переважно відновлює  $НАД^+$  до НАДН, але має можливість також відновлювати молекулярний кисень. КО не може відновлювати  $НАД^+$ , проте має можливість відновлювати молекулярний кисень. Відновлення молекулярного кисню будь-якою формою ферменту призводить до утворення САР та перекису водню [6]. Схематично реакція утворення САР при роботі КО показана на рисунку 3.

Виходячи із схеми, наведеної на рисунку 3, при окисненні ксантину або гіпоксантину електрони потрапляють на молібден, далі потік електронів спрямовується на залізо-сульфур-вмісні центри КОР, звідки вони потрапляють на ФАД-вмісний центр, який може відновити або  $НАД^+$  до НАДН (якщо фермент знаходиться у формі КДГ) або може відновити кисень, утворюючи САР (якщо фермент знаходиться у формі КО). Також очевидною є можливість КОР виступати у ролі НАДН-оксидази та спрямовувати потік електронів від НАДН до кисню через ФАД-вмісний центр ферменту з утворенням САР в якості продукту реакції.