

Редокс-статус клетки, окислительный стресс и МИТОХОНДРИИ

*Карманова Е. Е.
магистратура 1 курс
УЦ - биофизики и биомедицины (ИТЭБ РАН)
Пущино - 2016*

Содержание

ВЕДЕНИЕ. РЕДОКС-СТАТУС КЛЕТКИ.

АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА (АФК)

- Синглетный кислород
- Пероксид водорода
- Супероксид-анион радикал
- Гидроксил-радикал

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС

- Окислительная модификация липидов. ПОЛ.
 - Окислительная модификация белков. ДЖРБ.
 - Окислительная модификация нуклеиновых кислот.
- Повреждение ДНК.

**АНТИОКСИДАНТНАЯ И ПРООКСИДАНТНАЯ СИСТЕМЫ
ОРГАНИЗМА**

Основные редокс-пары клетки

- **GSSG / 2GSH**
- **TrxSS / Trx(SH)₂**
- **NAD⁺ / NADH**
- **NADP⁺ / NADPH**
- **ФЛАВИНЫ**

Прооксиданты

- **NAD(P)H-оксидазы**

Антиоксиданты

- **Ферментативная АОС**
- **Другие антиоксиданты**

МИТОХОНДРИИ, ИХ СТРОЕНИЕ И ФУНКЦИИ.

ЦИКЛ КРЕБСА, ЭТЦ И АФК.

- НАНАDНАD(P)Н-ОКСИДАЗА (NOX₄)
- Моноаминооксидаза
- Ацил-СоА дегидрогеназа
- Дыхательный комплекс I
- Комплекс II
- Комплекс III
- Дигидролипоамиддегидрогеназа

МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ ГЕНОМ. ПОВРЕЖДЕНИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА

И МИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ БОЛЕЗНИ.

- Мутации митохондриальной ДНК
- Митохондриальная дисфункция
- Митохондриальные болезни

ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ГЕНЕРАЦИИ АФК МИТОХОНДРИЯМИ.

- Митохондрии, апоптоз и АФК

Баланс окислительно-восстановительных процессов в клетке определяет клеточный редокс-статус (от англ. redox – *reduction-oxidation reaction*).

Аэробная энергетика:

- Реакция между восстановителем и окислителем – кислородом
- редокс- потенциал кислорода при нейтральных значениях pH равен примерно **+800 мВ**.
- внутриклеточная среда, усредненный редокс потенциал которой составляет примерно **-320 мВ**
- РЕАКЦИЯ
$$\text{O}_2 + 4 \text{e} + 4 \text{H}^+ = 2 \text{H}_2\text{O}$$
- термодинамически необратима

Молекулярный кислород имеет спиновый запрет, поэтому

- ▶ Он относительно инертен
- ▶ Главный биологический окислитель
- ▶ Одноэлектронное поэтапное ферментативное восстановление до
- ▶ воды (цитохромоксидазы):



- ▶ перекиси водорода (другие оксидазы):



Поэтапное одноэлектронное восстановление кислорода протекает с образованием промежуточных свободнорадикальных состояний кислорода, в частности, **супероксид-аниона и гидроксильного радикала**:



супероксид-анион радикал

гидроксильный радикал
время полужизни $\approx 10^{-9}$ с

В результате «утечки» промежуточных продуктов этой цепочки образуются АФК

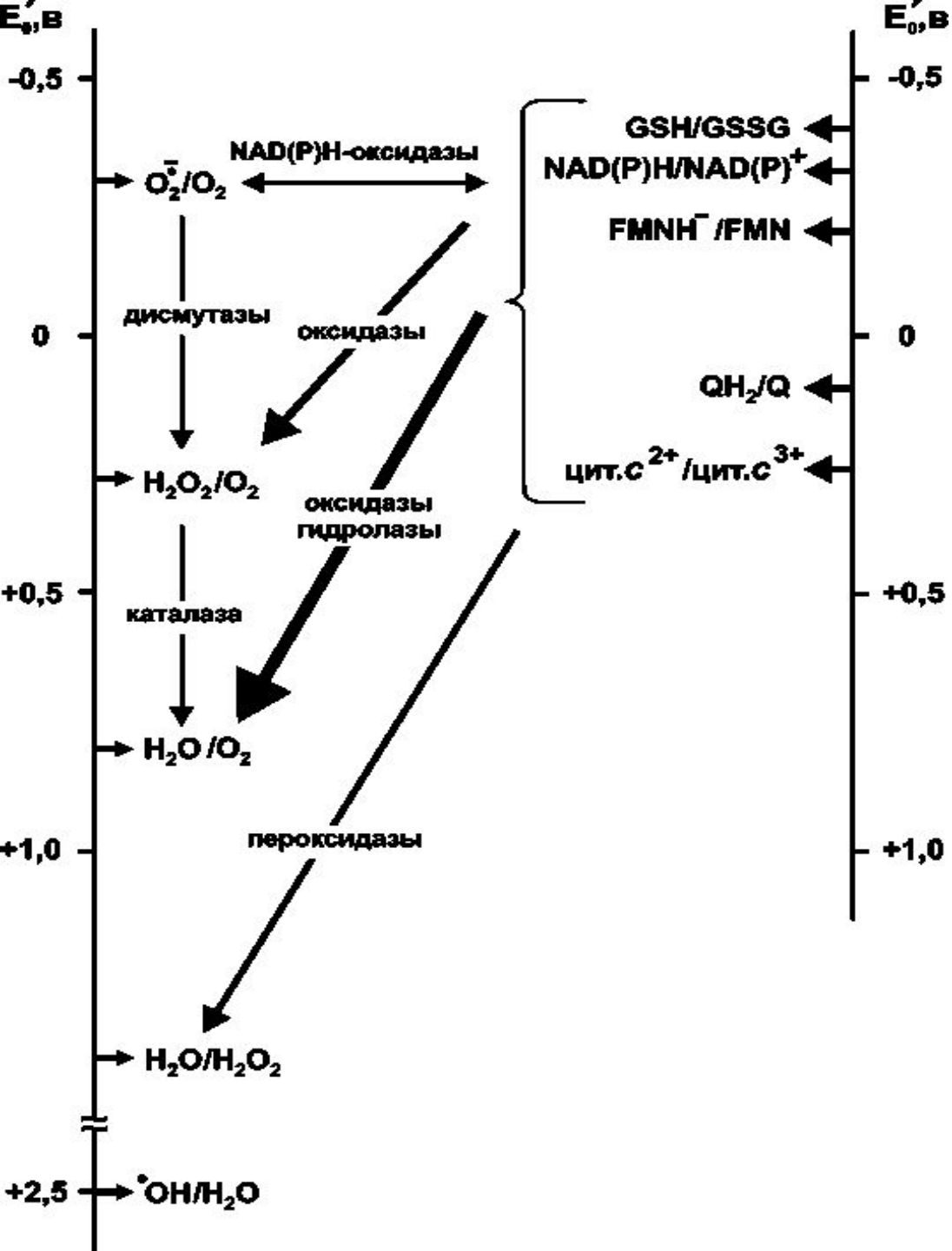


Рис. 1. Диаграмма основных реакций с участием кислорода.

Правая и левая вертикальные линии - шкалы стандартных окислительно-восстановительных потенциалов относительно потенциала водородного электрода при $pH = 7,0$. На левой шкале стрелками помечены потенциалы «кислородных» участников реакций, а на правой - основных субстратов-доноров электронов. Для простоты в составе последних не помечены потенциалы других субстратов-доноров оксидазных реакций: моно- и диаминооксидаз, оксидаз аминокислот, гексозооксидаз, многочисленных субстратов гидроксилаз.

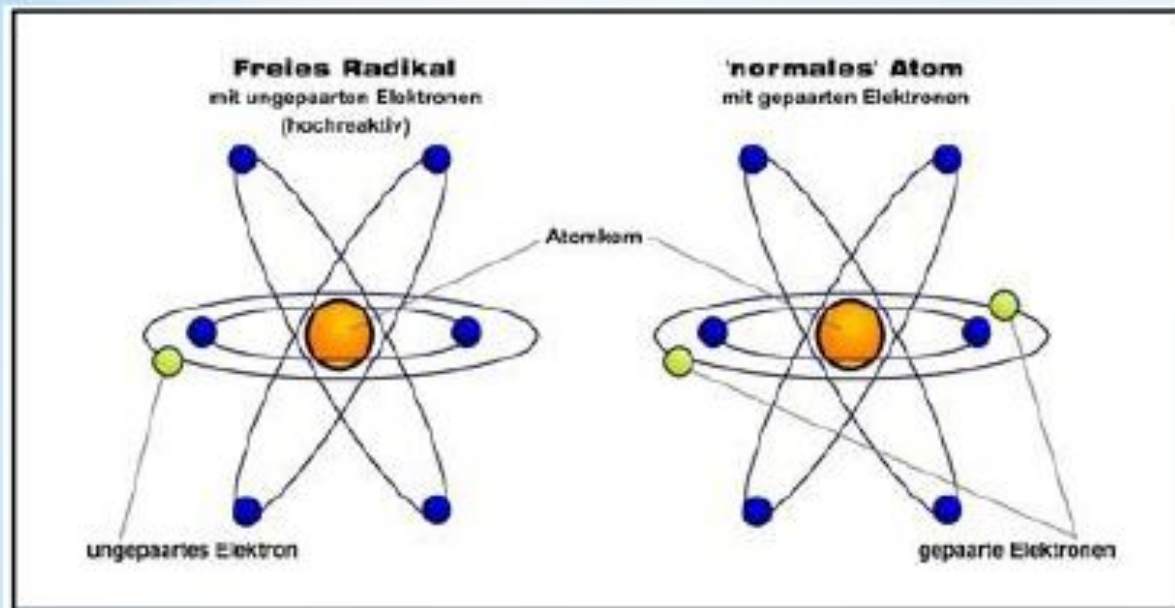
Избыток АФК нарушают редокс-статус клетки, начинается окислительный стресс

Поддержание клеточного редокс-статуса играет важную роль в таких процессах как *синтез ДНК, экспрессия генов, ферментативная активность*.

Изменения редокс-состояния молекул, являющиеся следствием стрессовых воздействий или результатом активности самих клеток, вовлечены в **редокс-регуляцию клеточных процессов**.

Активные формы кислорода (англ. ROS, Reactive Oxygen Species) – это высокореакционные, преимущественно радикальные кислородные соединения, образующиеся в живых организмах в результате неполного восстановления молекулярного кислорода или изменения спина одного из его электронов, находящихся на внешних орбиталях:

- **супероксидный анион-радикал O_2^- ,**
- **пероксид водорода HO_2 ,**
- **гидроксильный радикал OH^\bullet ,**
- **гидроперекисный радикал HO_2^\bullet ,**
- **синглетный кислород 1O_2 ,**
- **озон O_3 ,**
- **алкоксильные RO^\bullet и пероксильные радикалы ROO^\bullet ,**
- **гипогалоиды $HOCl$, $HOBr$, HOI ,**
- **оксид азота NO^\bullet ,**
- **гидропероксил радикал HO_2 ,**
- **пероксинитрит $ONOO^-$ и ряд других соединений.**



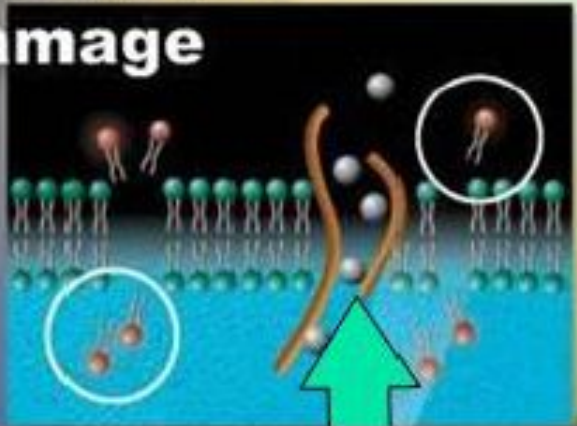
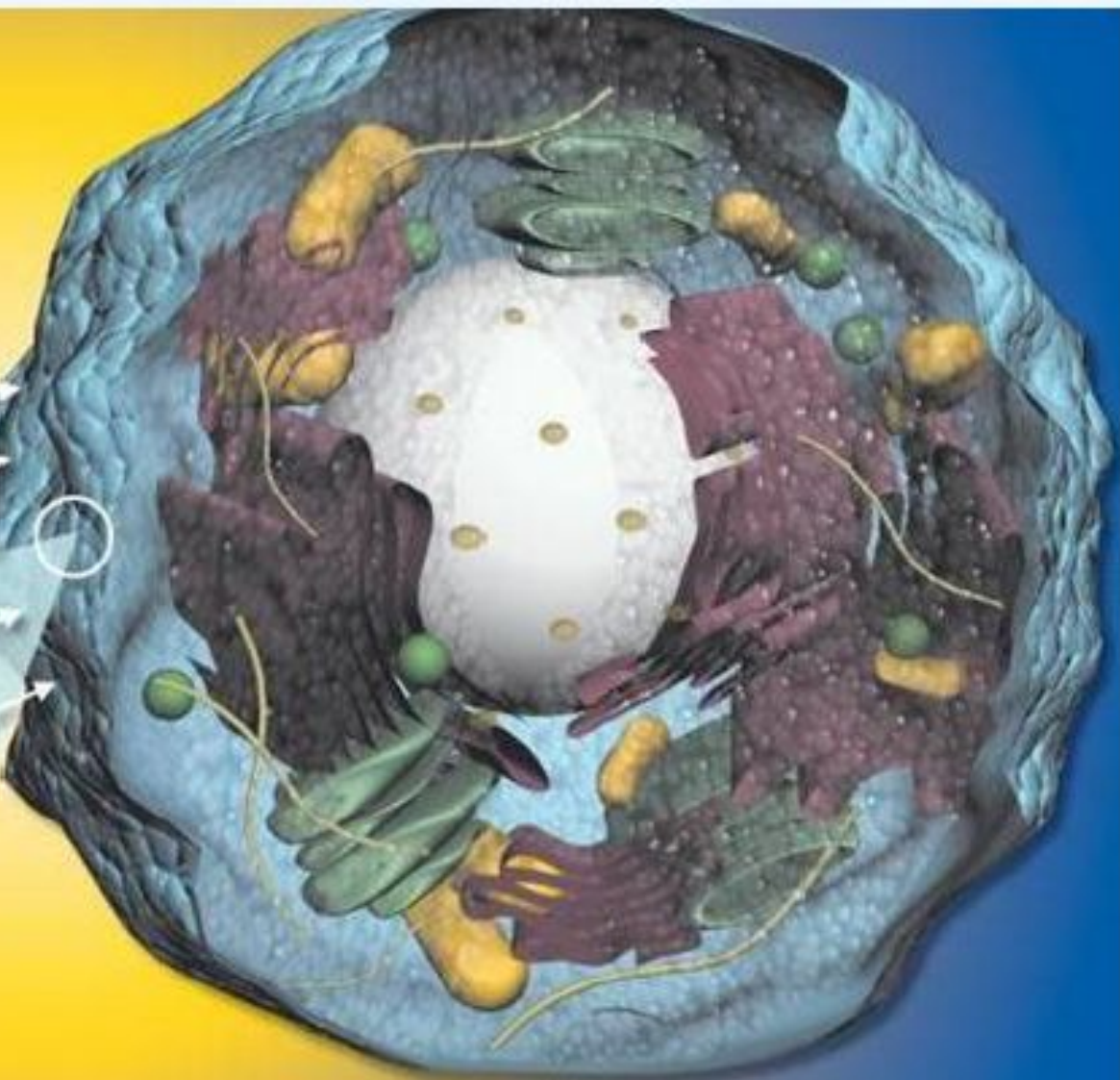
Свободные радикалы — это высокоактивные молекулы или атомы, имеющие один или несколько неспаренных электронов на внешней орбитали, что делает их особенно **активными** и «**агрессивными**».

Свободные радикалы стремятся вернуть себе недостающий электрон, отняв его от окружающих молекул

Cell Attacked by Free Radicals

Cell Membrane Damage

OH^-
 O_2^-
 HO^-
 H_2O_2
 Cl^-
 O_2^{2-}



Основные свойства АФК:

- **высокая реакционная способность,**
- **короткое время жизни,**
- **малый или относительно малый радиус диффузии**
- **относительно низкая концентрация в тканях**

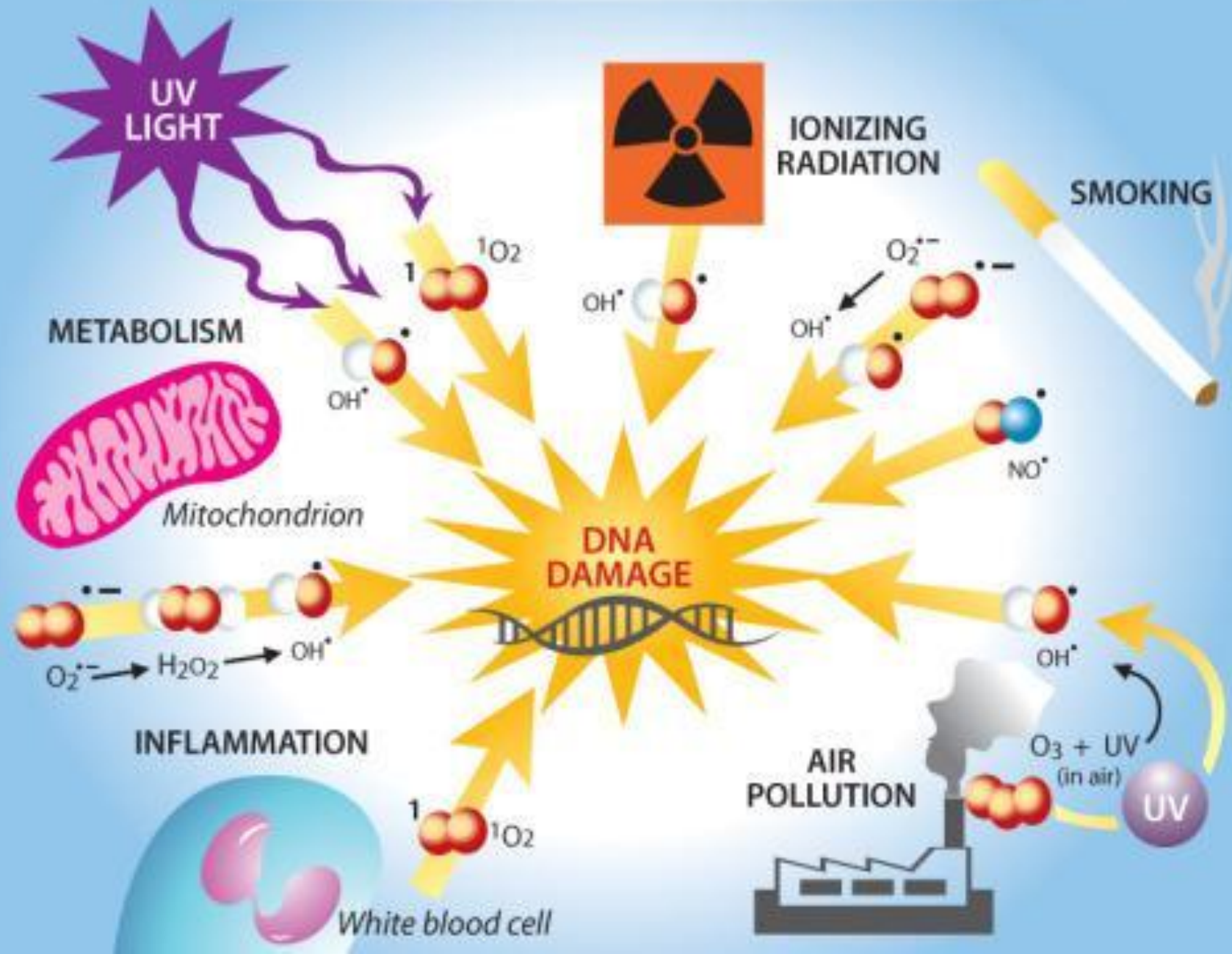
Активные формы кислорода и азота	Время жизни, с	Радиус диффузии, мкм	Концентрация, моль/л
OH [·] - гидроксильный радикал	10 ⁻⁹	< 0,01	< 10 ⁻¹¹
RO [·] - алкоксильный радикал	10 ⁻⁶	зависит от R	
ROO [·] - пероксильный радикал	10 ⁻² ÷10	зависит от R	
R [·] - алкильный радикал	10 ⁻⁸	зависит от R	
O ₂ ^{·-} - супероксид-анион радикал	10 ⁻⁶	0,3	10 ⁻¹¹ ÷10 ⁻⁹
¹ O ₂ - синглетный кислород	10 ⁻⁶	0,3	
HO ₂ [·] - пергидроксильный радикал	10 ⁻³	10	
NO [·] - оксид азота	0,1-15	100-200	10 ⁻⁷ -5x10 ⁻⁶
H ₂ O ₂ - перекись водорода	*	*	10 ⁻⁸
HOCl/OCl ⁻ - гипохлорит	**	**	10 ⁻¹
HOBr/OBr ⁻ - гипобромит	**	**	10 ⁻⁴
HOI/OI ⁻ - гипоиодит	**	**	10 ⁻⁶
HOCSN/OCSN ⁻	**	**	10 ⁻⁴

Время жизни, радиус диффузии и концентрация некоторых активных форм кислорода и азота в биологических жидкостях

* - зависит от каталазы и глутатионпероксидазы;

** - зависит от миелопероксидазы и субстрата.

FORMATION OF FREE RADICALS



Источники АФК

Эндогенные источники:	Экзогенные источники:
<ol style="list-style-type: none">1. Стимуляция фагоцитирующих клеток.2. Нефагоцитирующие клетки.3. Редокс-цикл "хинон-семихинон".4. Индукция синтеза прооксидантных ферментов.5. Ингибирование антиоксидантных ферментов.6. Индукция синтеза CoA - оксидаз жирных кислот.7. Ишемия и реперфузия.	<ol style="list-style-type: none">1. Ионизирующее излучение.2. УФ - излучение.3. Воздействие ксенобиотиков.4. Озон.

Синглетный кислород $^1\text{O}_2$

- ▶ молекулярный кислород в состоянии наименьшего электронного возбуждения (изменение спина одного из электронов, находящихся на p-орбиталях в молекуле кислорода)
- ▶ агрессивен в отношении молекул с двойной связью
- ▶ конечный продукт реакций $^1\text{O}_2$ с биомолекулами – гидроперекиси органических молекул (В первую очередь – продукты ПОЛ)
- ▶ биологическое значение – фотосенсибилизация

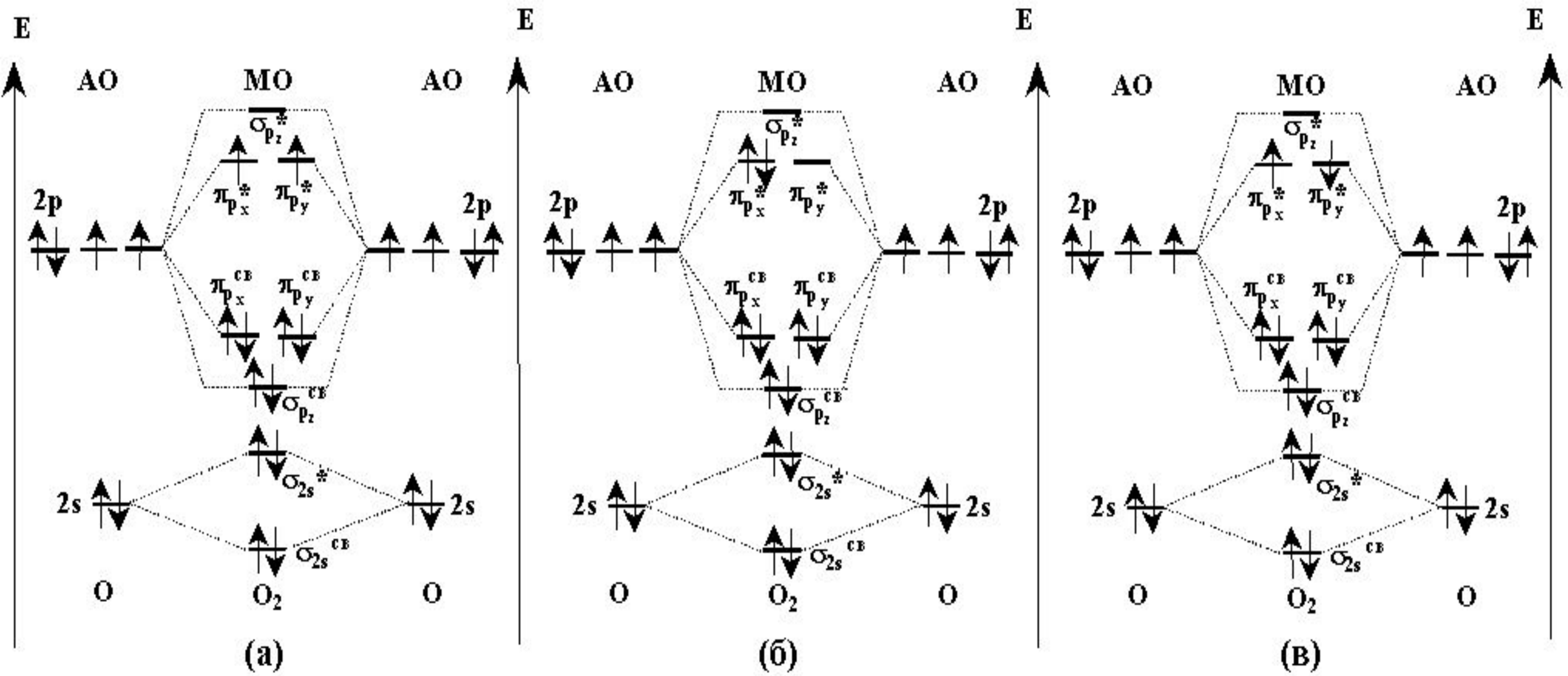
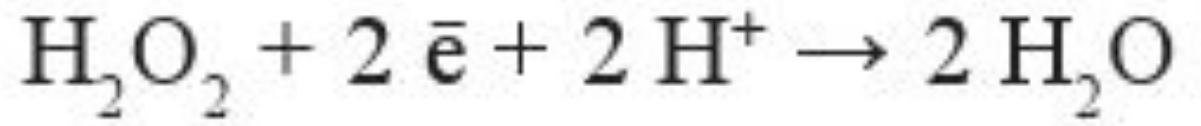
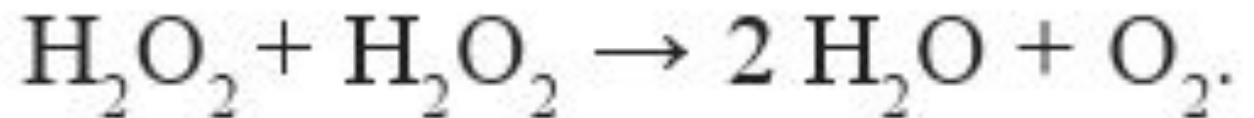


Рис.1. Схема молекулярных орбиталей молекулы кислорода в основном (а) и двух возбужденных состояниях (б) и (в).

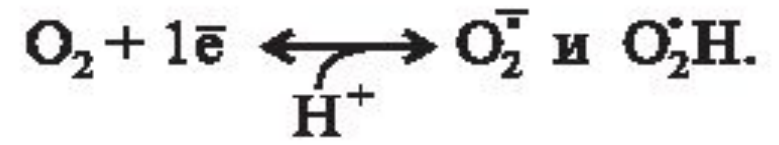


Пероксид водорода H_2O_2

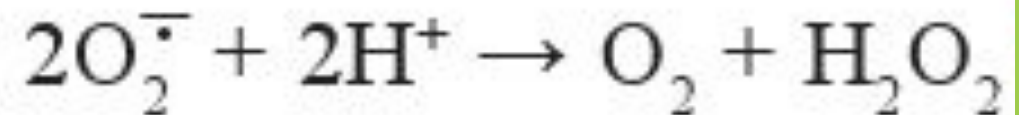
- ▶ субстрат-окислитель для пероксидаз
- ▶ восстановитель и окислитель в реакции дисмутации (каталаза)
- ▶ взаимодействует с веществами как радикальным, так и нерадикальным путем
- ▶ может выступать источником образования $\text{OH}\bullet$ в присутствии двухвалентного железа или превращаться в гипохлорит-анион (OCl^-) ферментом миелопероксидазой
- ▶ принимает участие в возникновении и передаче клеточных сигналов

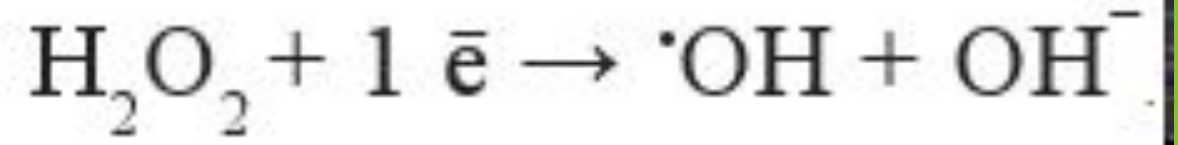


Супероксид-анион радикал $O_2^{\cdot-}$



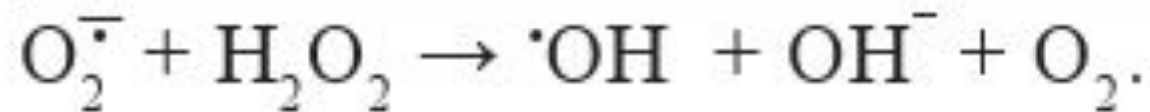
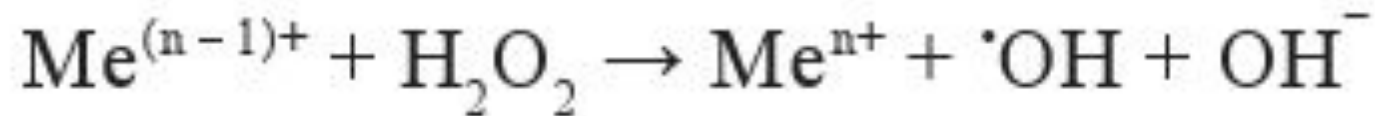
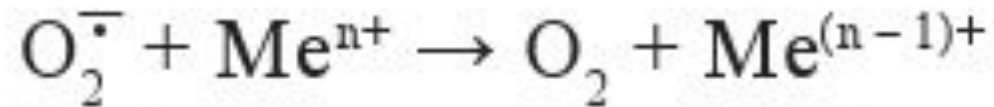
- ▶ Источник - ионы металлов переменной валентности и (или) органические соединений, способных к одноэлектронным реакциям
- ▶ при взаимодействии с протоном приводит к образованию гидроперекисного радикала (HO_2^{\cdot}).
- ▶ достаточно быстро неферментативно дисмутирует
- ▶ Основным источником являются НАДФ-оксидаза, ксантинооксидаза, митохондриальная цитохром-с-оксидаза и микросомальные миелооксидазы
- ▶ снижение уровня супероксид-анион радикала – супероксиддисмутаза (СОД)
- ▶ участие в многочисленных реакциях с образованием различных реактивных соединений





Гидроксил-радикал

- ▶ Результат одноэлектронного восстановления перекиси водорода
- ▶ супероксид-радикал в реакции, катализируемой металлами переменной валентности (Fe^{2+} , Cu^+ , Co^{2+} , Mn^{2+} , V^{2+} , Cr^{4+}) – **реакция Фентона - главный механизм образования $\text{OH}\cdot$.**
- ▶ взаимодействии H_2O_2 и $\text{O}_2^{\cdot-}$ (реакция Хабера-Вайса):



- ▶ является **наиболее реакционноспособным** радикалом среди АФК
- ▶ Основные типы повреждений биомолекул гидроксильными радикалами - это отрыв атома водорода; присоединение к молекулам по двойным связям; отрыв электрона (редко).
- ▶ Способен разорвать любую С–Н связь,
- ▶ Индуцирует перекисное окисление липидов - ПОЛ
- ▶ для его элиминации в клетке не существует специализированных ферментных систем
- ▶ **цитотоксическое действие** кислородных радикалов более чем на **50% обусловлено ОН-радикалами**
- ▶ два критических объекта повреждения: нуклеиновые кислоты и мембранные белки

Образующиеся АФК могут выполнять полезные для клетки функции:

- * участвуют (через АФК-зависимый сигналинг) в регуляции клеточных процессов (клеточное деление, дыхание и др.),
- * бактерицидное действие,
- * активируют иммунные реакции лейкоцитов.

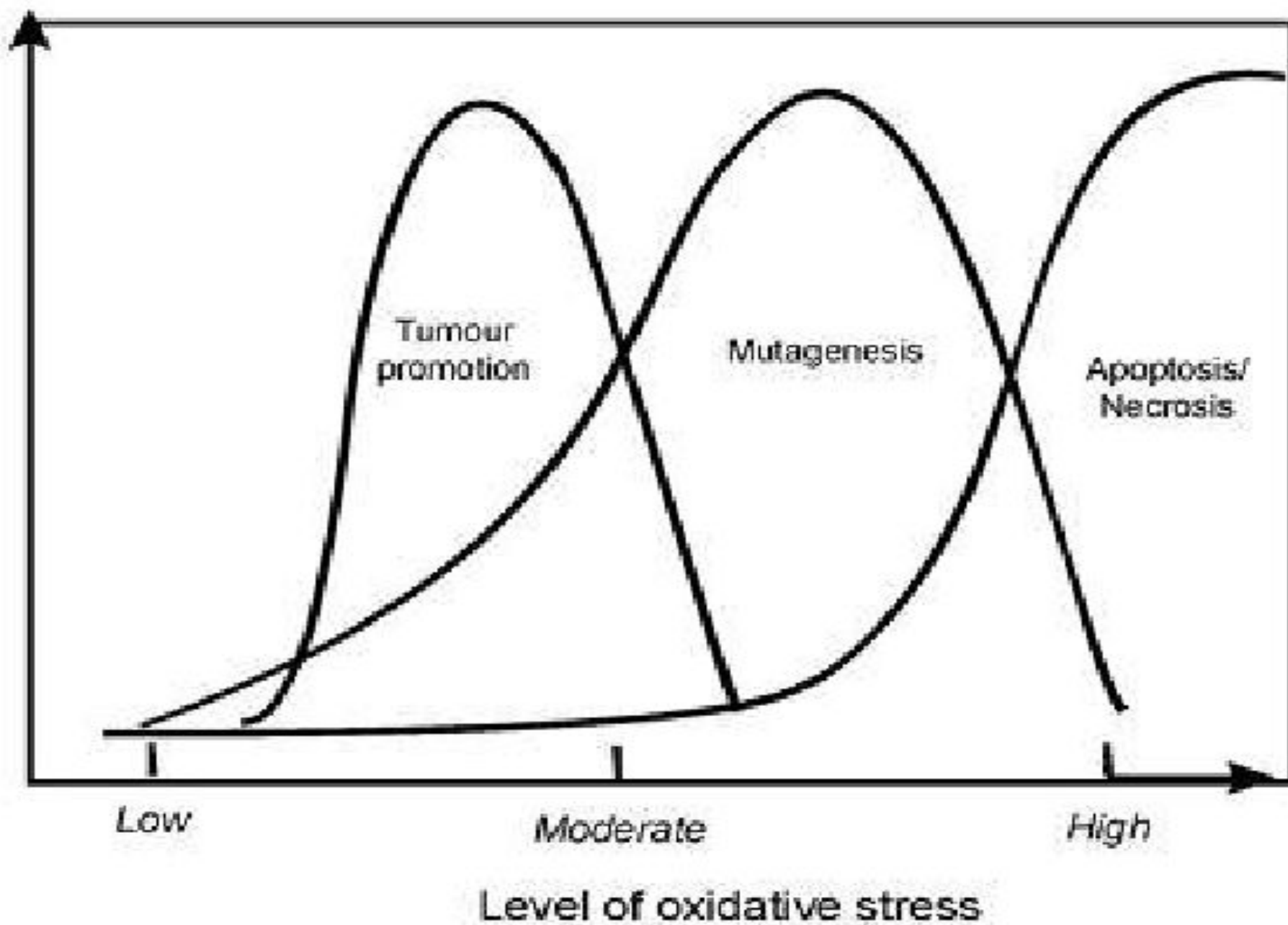
Однако это возможно при низком уровне АФК в клетке.

При высоком уровне АФК развивается окислительный (оксидативный) стресс, который приводит к нарушению функций клетки, развитию ряда заболеваний (атеросклероз, ИБС, диабет, ХОБЛ, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, злокачественные образования и др.), гибели клеток путем апоптоза или некроза.



Избыточную генерацию АФК свыше уровня антиоксидантной защиты, сопровождающуюся повреждением клеточного содержимого, называют *окислительным стрессом*

- ▶ **1. Низкий уровень - клетка обеспечивает себе достаточную защиту. При этом изменения наблюдаются большей частью в синтезе белков. В норме клетки могут длительное время пребывать в состоянии непрерывного окислительного стресса низкого уровня без серьезных последствий.**
- ▶ **2. Средний уровень - клетка осуществляет адаптацию к стрессу.**
- ▶ **3. Высокий уровень - клетка переходит в состояние выживания, клеточный рост и деление в этом случае практически останавливаются. Дальнейшее повышение концентрации активных форм кислорода приводит к массовой гибели клеток.**

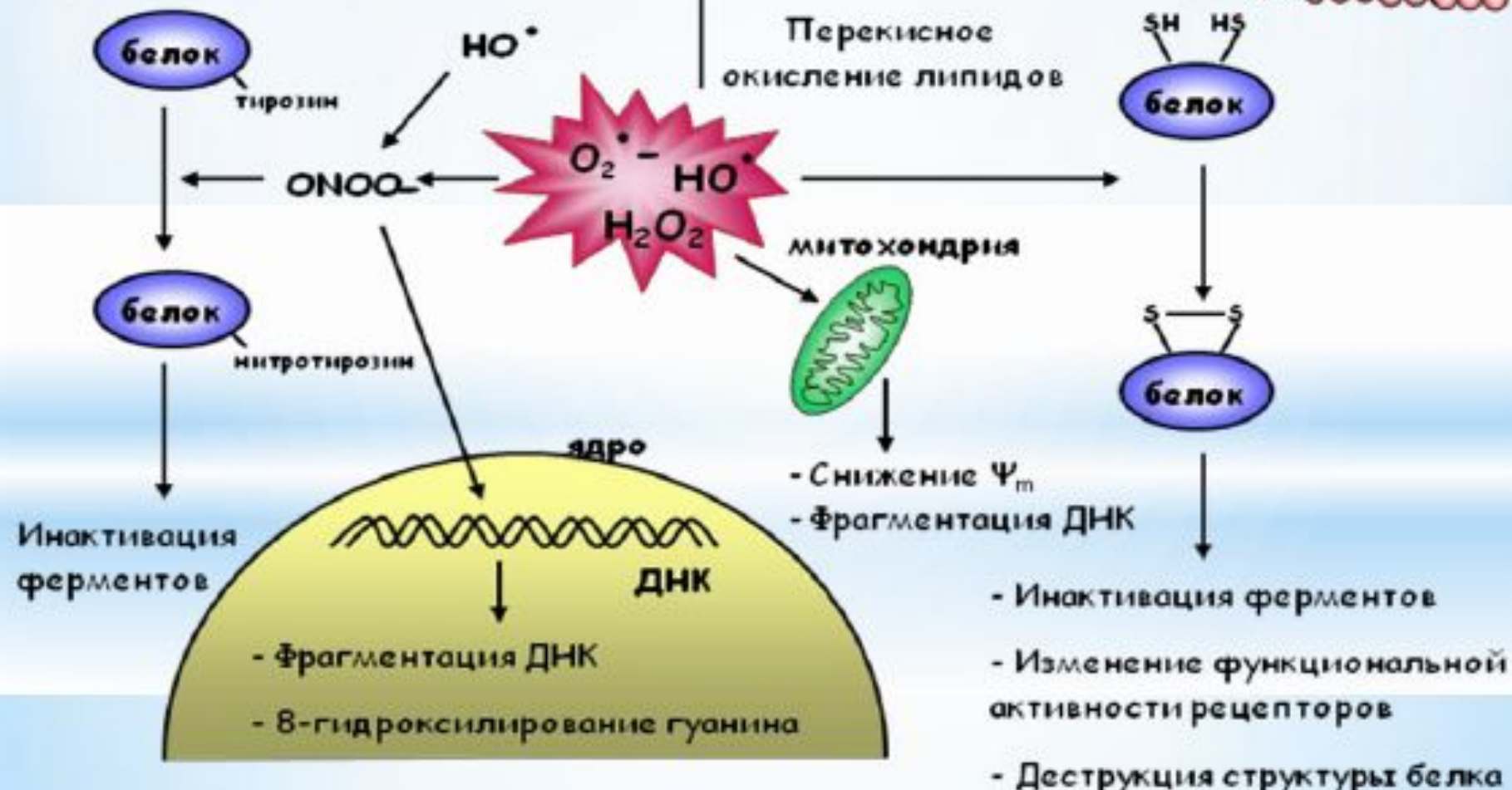
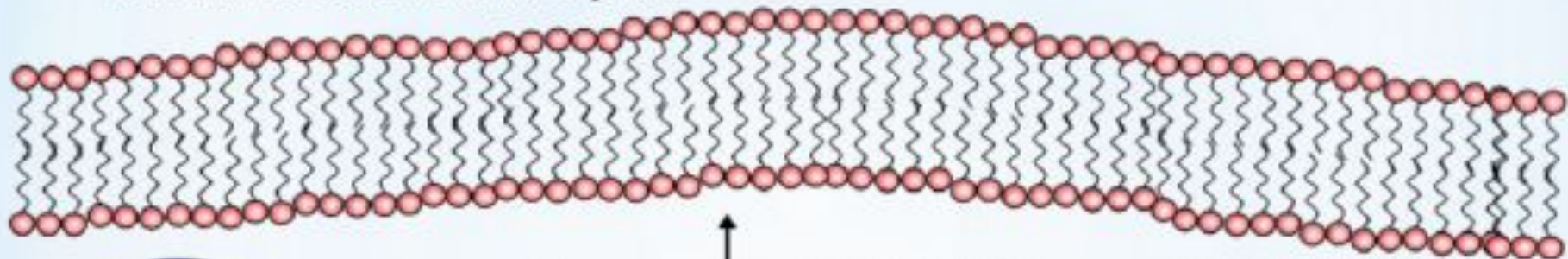


Дозозависимый эффект взаимосвязи между уровнем окислительного стресса и процессом прогрессирования опухоли, процессом мутагенеза и процессом апоптоза/некроза.



Избыточную генерацию АФК свыше уровня антиоксидантной защиты, сопровождающуюся повреждением клеточного содержимого, называют ***окислительным стрессом***.

Цитоплазматическая мембрана



- Инактивация ферментов
- Изменение функциональной активности рецепторов
- Деструкция структуры белка

Окислительный стресс характеризуется тремя основными процессами:

- окислительная модификация липидов;
- окислительная модификация белков;
- окислительная модификация нуклеиновых кислот.

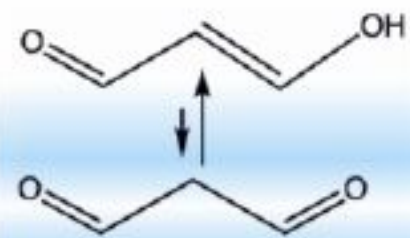
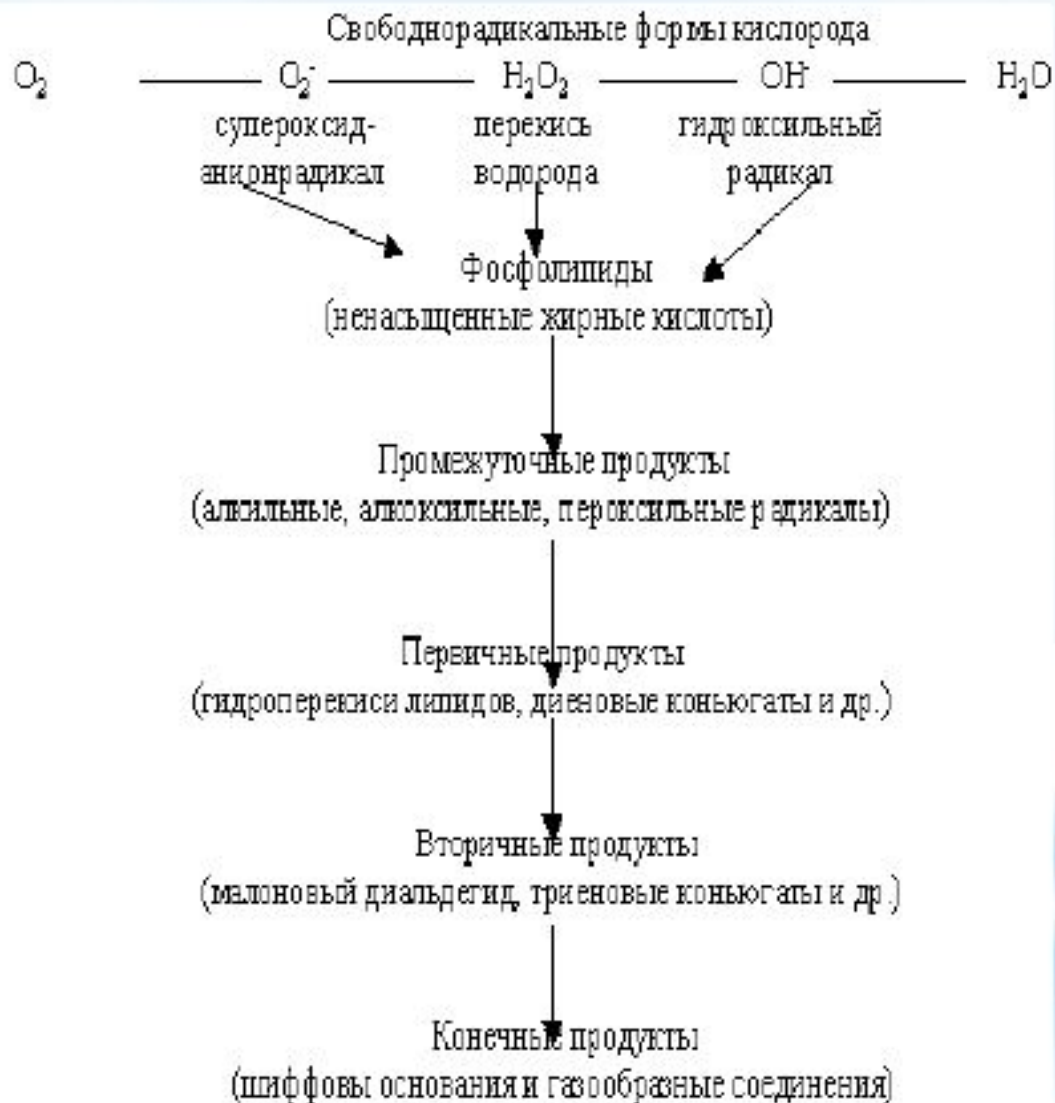
Нарушение баланса АФК/антиоксиданты приводит к развитию окислительного стресса, который сопровождается активацией перекисного (пероксидного) окисления липидов (ПОЛ).

Наиболее чувствительные к ПОЛ полиненасыщенные ВЖК липидного бислоя клеточных мембран

В процессе ПОЛ различают несколько этапов:

- ▶ **1. Атака сопряженных двойных связей ненасыщенных жирных кислот со стороны гидроксильного (HO•) и пероксильного (HO₂•) радикалов, что приводит к появлению липидных радикалов в несколько основных этапов.**
- ▶ **2. Липидный радикал может реагировать с O₂ с образованием пероксильного радикала, который, в свою очередь, взаимодействует с новыми молекулами ненасыщенных жирных кислот и приводит к появлению липидных пероксидов, которые достаточно стабильны при температуре тела.**
- ▶ **3. Образующиеся в процессе ПОЛ липидные радикалы, а также его продукты 4-гидроксиноненаль, кротоноальдегид, и малоновый диальдегид, могут реагировать с молекулами белков и нуклеиновых кислот**

ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ



Малоновый диальдегид

Перекисное окисление липидов (ПОЛ) является важной причиной накопления клеточных дефектов. Основным субстратом ПОЛ являются полиненасыщенные жирные кислоты, входящих в состав клеточных мембран, а также липопротеинов. Атака **кислородными радикалами** приводит к образованию **гидрофобных радикалов**. Образующиеся липидные радикалы, а также **4-гидроксиноненаль и малоновый диальдегид** могут атаковать молекулы белков и нуклеиновых кислот. Альдегидные группы этих соединений образуют **межмолекулярные сшивки**, что сопровождается нарушением структуры макромолекул и их функций.

ПОЛ изменяет свойства мембран:

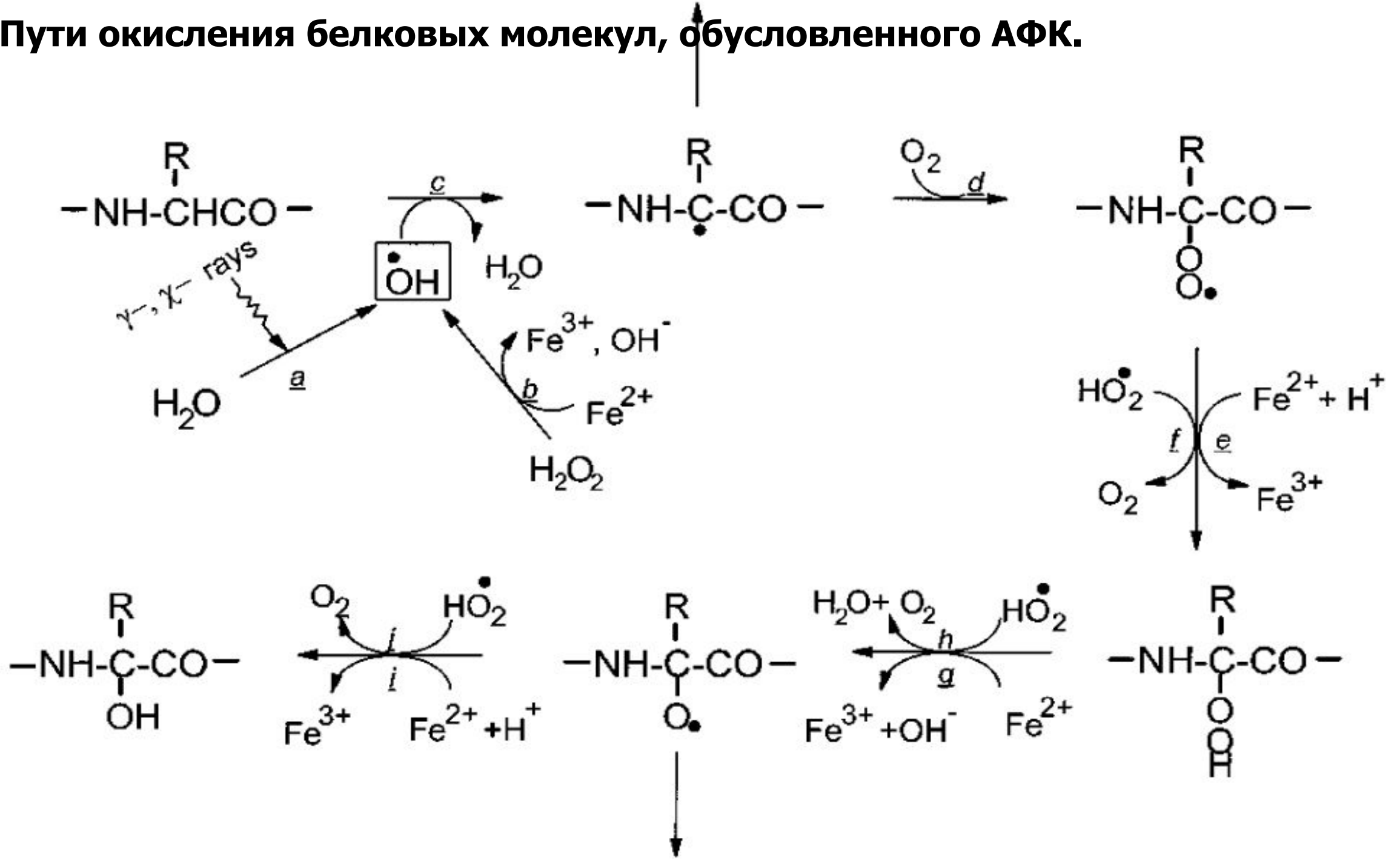
- * нарушается микровязкость (↑)
- * образуются “мега” поры
- * растет проницаемость мембран → набухание
- * изменяется ионная проницаемость (разрушение ионных каналов и ионных насосов, например, Na,K-АТФазы)

Окислительная модификация белков

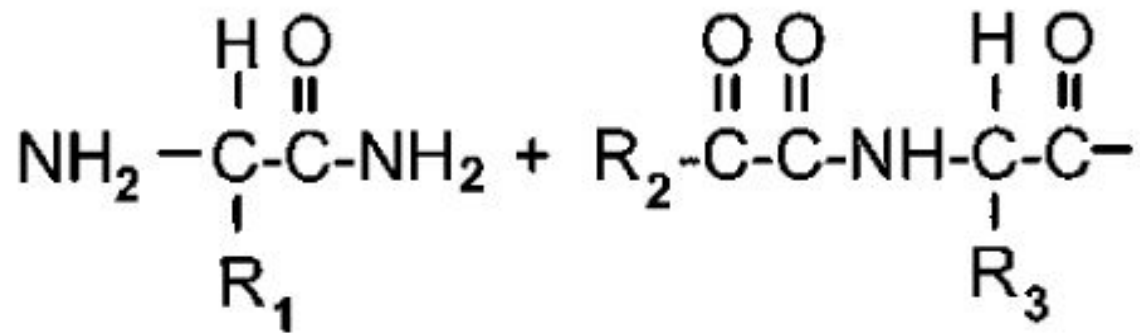
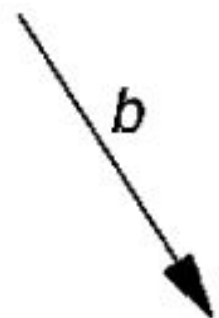
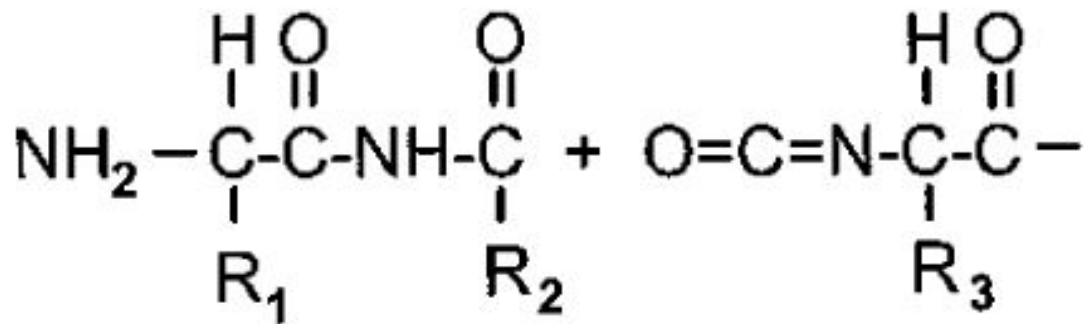
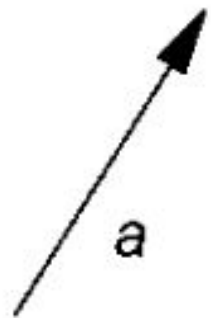
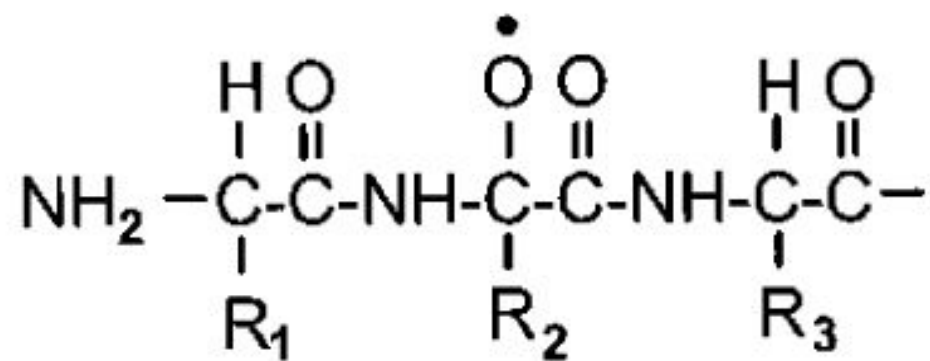
- ▶ **Количественно, белки более повреждаемая мишень, чем ДНК и липиды, они являются главной мишенью в клетках при воздействии наиболее реакционной формы АФК – гидроксильных радикалов**
- ▶ **в молекуле фермента обычно содержится несколько ароматических аминокислот, дисульфидных (-SS-) связей и сульфгидрильных групп (-SH) – главные мишени для АФК**

- ▶ **Взаимодействие пептидов и белков с АФК состоит из следующих ключевых реакций:**
- ▶ $\text{RCHR}_1\text{R}_2 + \text{HO}^\cdot \rightarrow \text{RC}^\cdot\text{R}_1\text{R}_2 + \text{H}_2\text{O}$
- ▶ $\text{RC}^\cdot\text{R}_1\text{R}_2 + \text{O}_2 \rightarrow \text{RC}(\cdot\text{O}_2)\text{R}_1\text{R}_2$
- ▶ $\text{RC}(\cdot\text{O}_2)\text{R}_1\text{R}_2 + \text{HO}_2^\cdot \rightarrow \text{RC}(\text{OOH})\text{R}_1\text{R}_2 + \text{O}_2$
- ▶ $\text{RC}^\cdot\text{R}_1\text{R}_2 + \text{HO}^\cdot \rightarrow \text{RC}(\text{OH})\text{R}_1\text{R}_2$
- ▶ **где R, R₁, R₂ – различные аминокислотные остатки**

Пути окисления белковых молекул, обусловленного АФК.

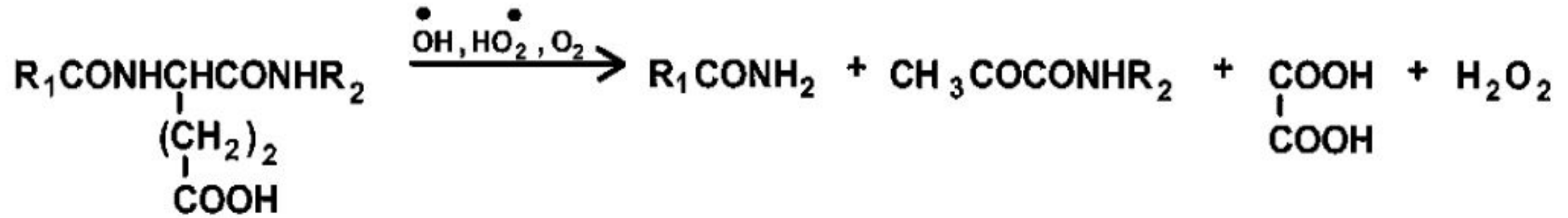


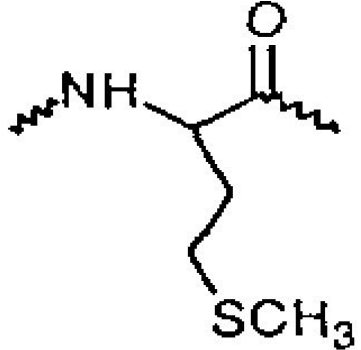
*Пути разрыва пептидной связи
через окисление основной цепи*



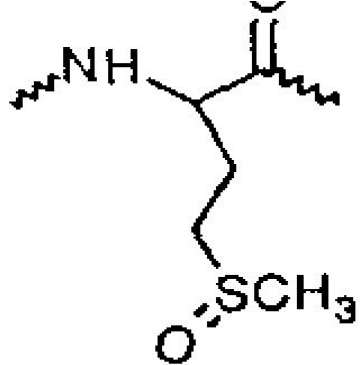
Аминокислота	Продукты окисления
Цистеин	нитрозотиилы, тиоловые радикалы, цистин, конъюгаты с глутатионом
Метионин	метионинсульфоксид, метионинсульфон
Триптофан	кинуренин, 3-гидроксикинуренин, гидропиролиндол, оксииндол, N-формилкинуренин, 3-гидроксилкинуренин
Фенилаланин	2,3-гидроксифенилаланин, 2-,3-,4-гидроксифенилаланин
Тирозин	3,4-дигидроксифенилаланин, дитирозин (2,2'- бифенилпроизводные)
Гистидин	2-оксогистидин, 4-ОН-глутамат, аспартат, аспарагин
Аргинин	глутаминовый полуальдегид
Лизин	2-аминоадипиновый полуальдегид
Пролин	глутаминовый полуальдегид, 2-пирролидон, 4- и 5-гидроксипролин, пироглутаминовая кислота
Треонин	2-амино-3-кетобутиловая кислота
Глутаминовая кислота	пировиноградная кислота

Продукты окислительной модификации остатков наиболее окисляемых аминокислот

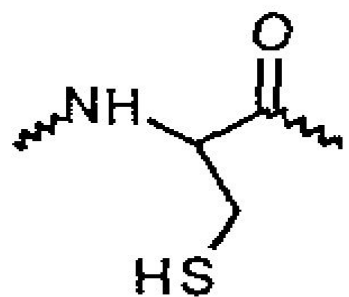




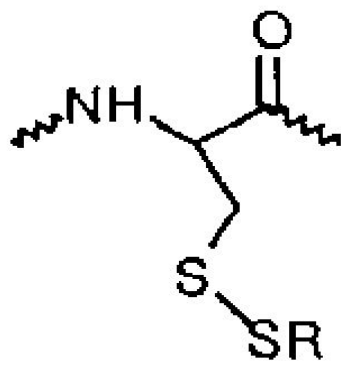
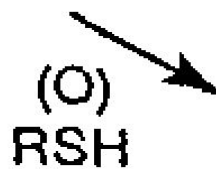
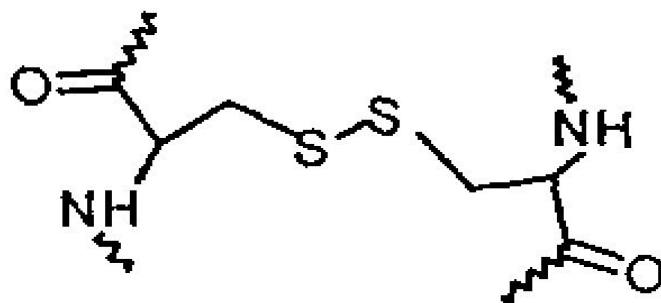
Met



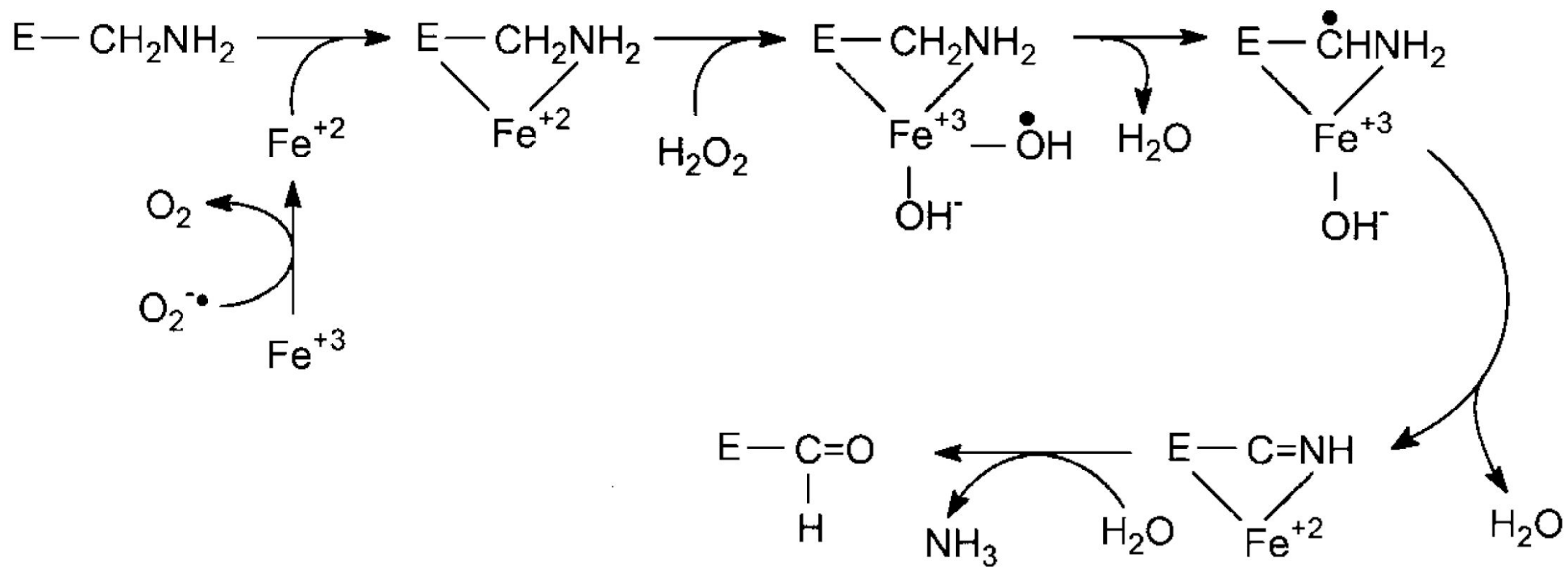
Met-сульфоксид



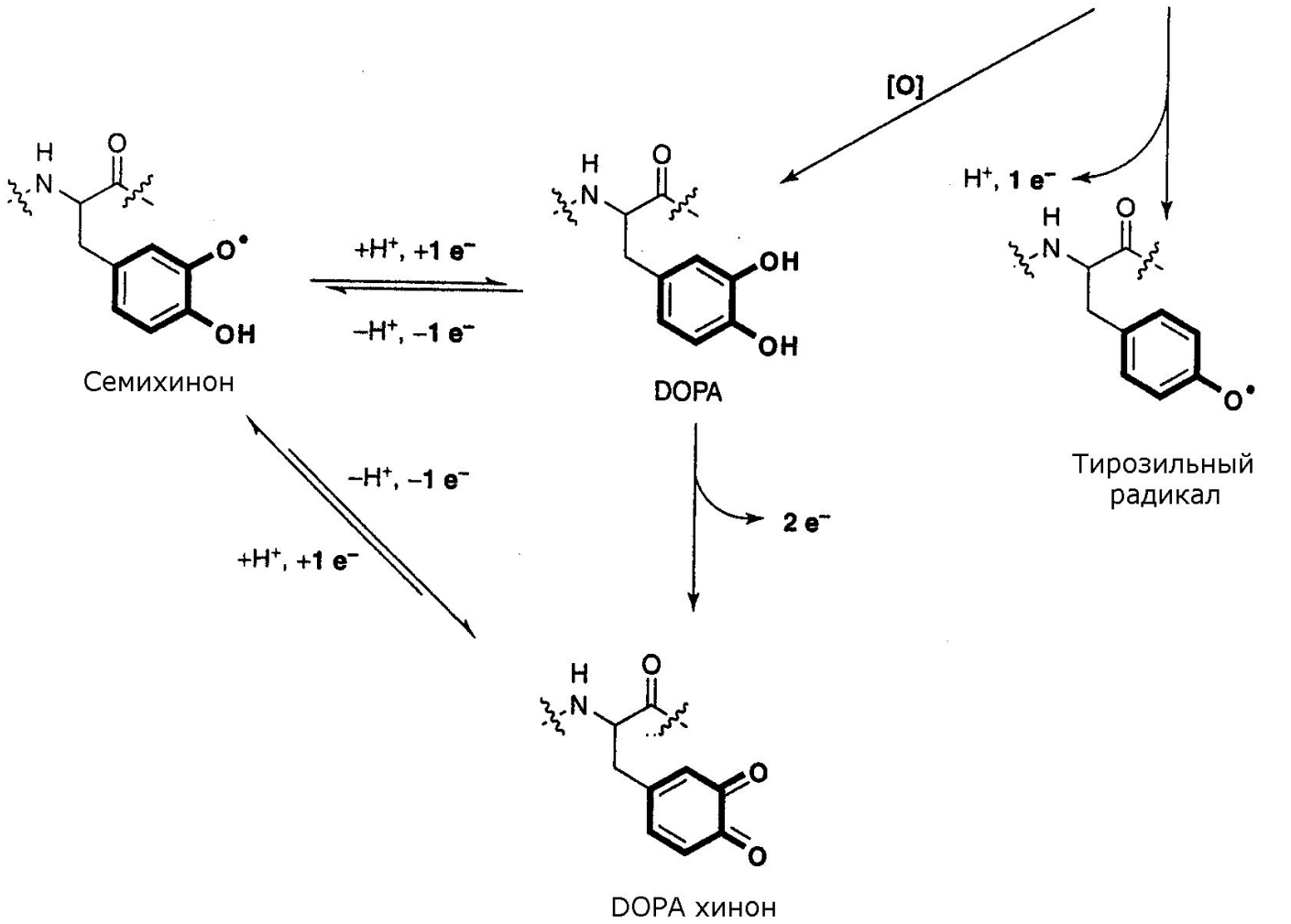
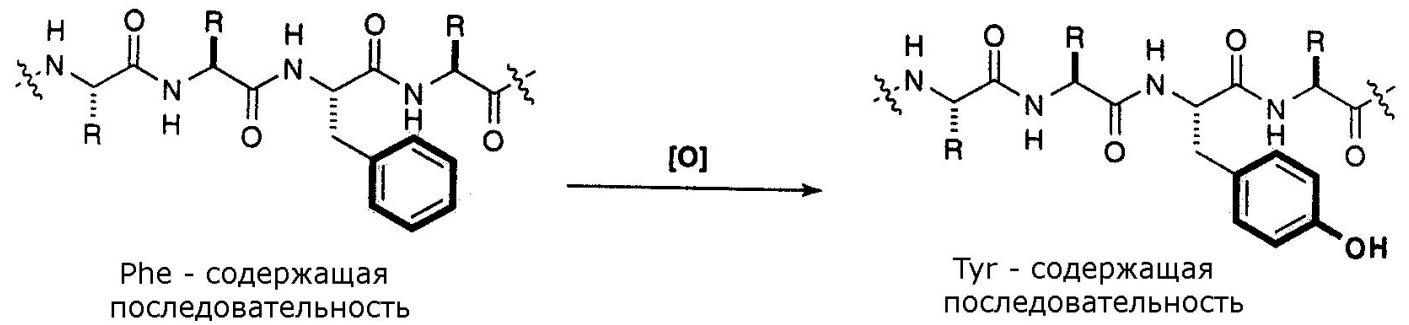
Cys



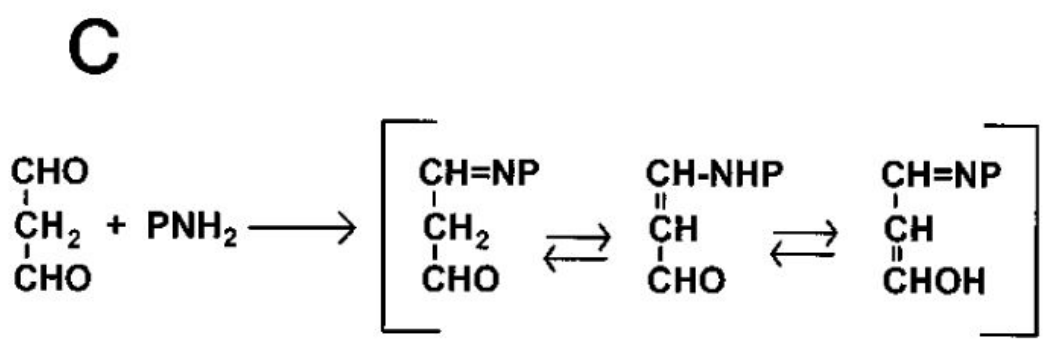
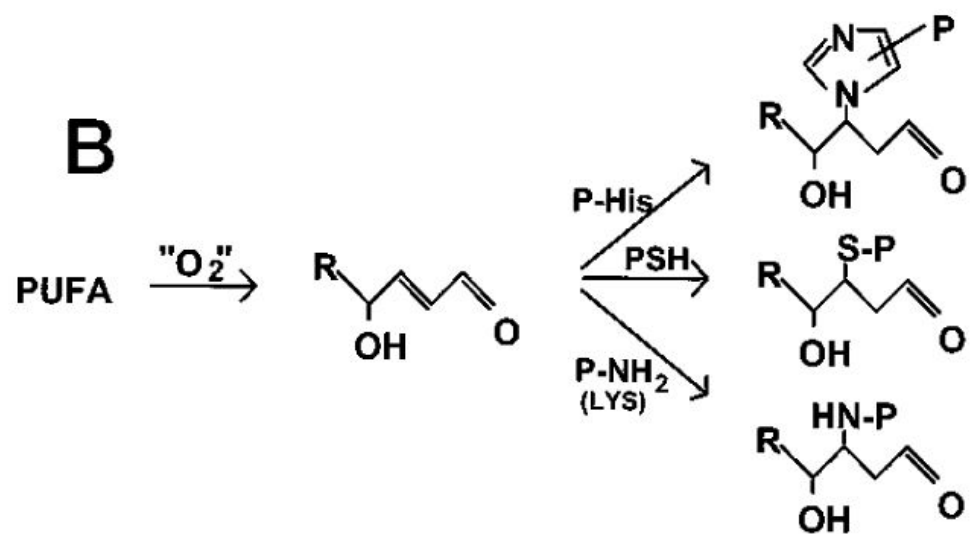
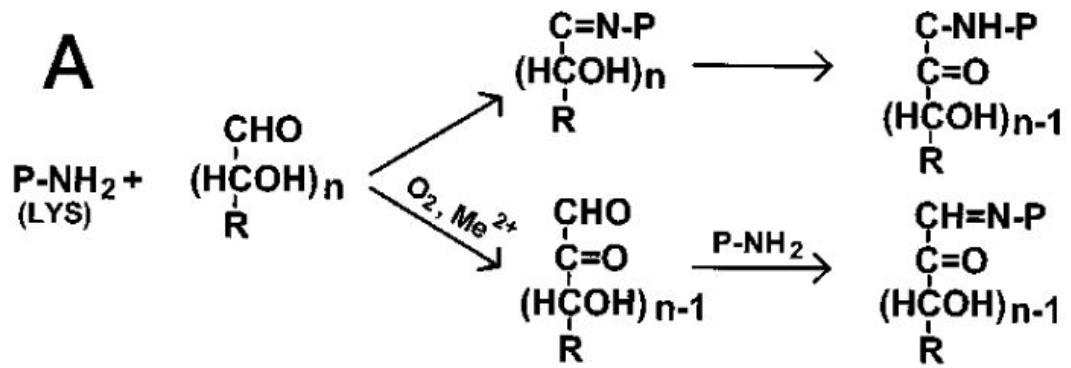
*Окисление
метиониновых и
цистеиновых
остатков*



Сайт-специфичное металл-катализируемое окисление остатка лизина



**Пути окисления тирозина.
Формирование редокс-активных соединений.**



Образование карбонильных групп в реакциях гликирования и взаимодействия с продуктами ПОЛ.

A- реакция соединения сахаров с лизилом белков.

B- реакция 4-гидрокси-2-нонеаля с остатками аминокислот (PUFA-полиненасыщенные жирные кислоты).

C- реакция лизила с малоновым диальдегидом.

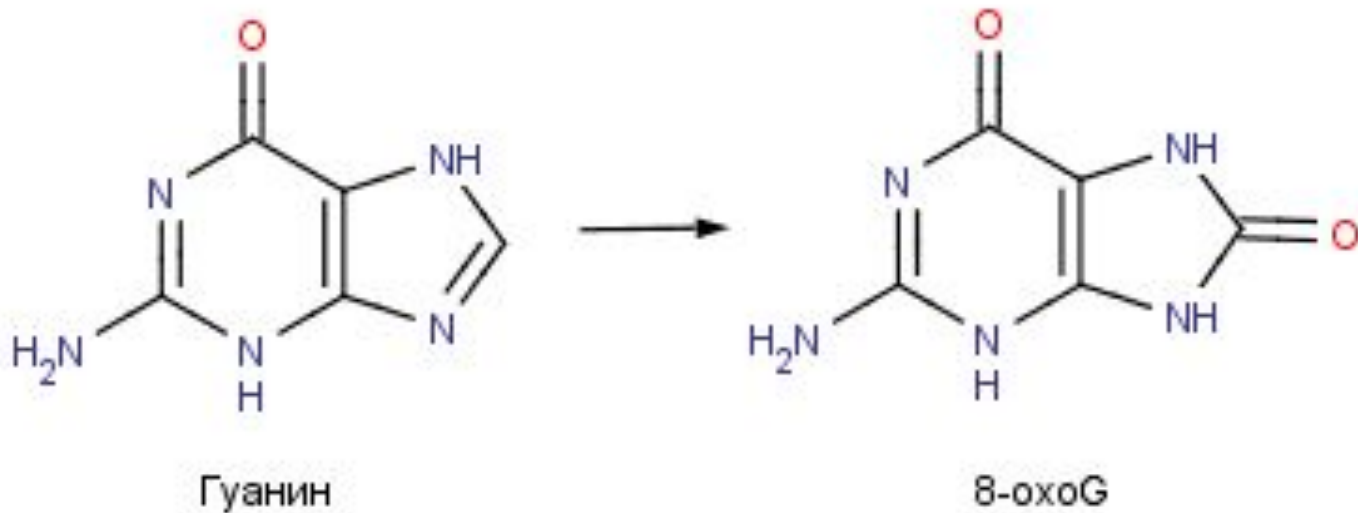
Долгоживущие радикалы белка ДЖРБ

- ▶ **долгоживущие активные формы белков (ДАФБ)**
- ▶ **Времена полужизни ДЖРБ достигают свыше 20 ч.**
- ▶ **ДЖРБ могут вызывать повреждения различных биологических молекулярных структур, так как белки участвуют во всех основных процессах в клетках и тканях**
- ▶ **ДЖРБ способны индуцировать повреждение ДНК с последующим возникновением хромосомных аббераций, мутаций и трансформаций в культурах клеток**
- ▶ **ДЖРБ способны создавать множество интермедиатов (промежуточных веществ) осложняющих протекание окислительного стресса в биологических системах**

Окислительная модификация нуклеиновых кислот. Повреждение ДНК.

- ▶ нарушения в хранении и реализации генетического материала связывают с развитием ряда заболеваний, таких как хроническая дегенерация нейронов, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, а также ряд онкологических заболеваний
- ▶ Основными продуктами окислительного повреждения ДНК являются пиримидиновые димеры, ДНК-белковые сшивки, однонитевые разрывы ДНК, формамидопиримидиновые производные пуринов

- ▶ Наиболее чувствительными к воздействию АФК в составе ДНК являются основания
- ▶ Известно более 200 типов окисленных оснований ДНК



- 1) при включении в ДНК обладает неоднозначными кодирующими свойствами;
- 2) способен включаться в РНК;
- 3) оказывает влияние на клетки за счет связывания с ГТФ-зависимыми регуляторными белками.

Окислительный стресс – это нарушение сбалансированности
антиоксидантной и прооксидантной системы

БАЛАНС АФК В ЖИВЫХ КЛЕТКАХ

ГЕНЕРАЦИЯ
АФК

Дыхательная цепь митохондрий, NADPH-оксидаза нейтрофилов, микросомальное окисление, неферментативное окисление биогенных аминов

ТУШЕНИЕ
АФК

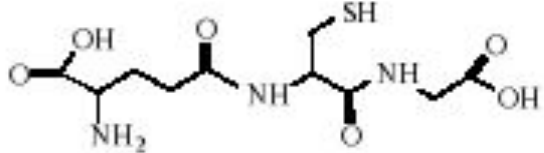
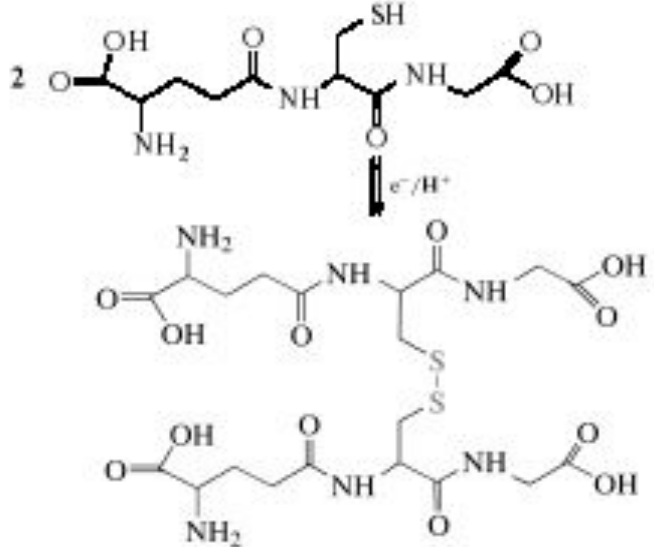

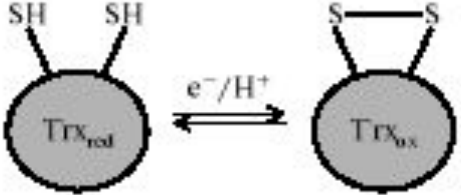
СОД, Каталаза, Пероксидазы, Низкомолек. антиоксиданты (мочевая кислота, таурин, витамины А, С, Е, карнозин, N-ацетилцистеин, глутатион), хелаторы ионов железа

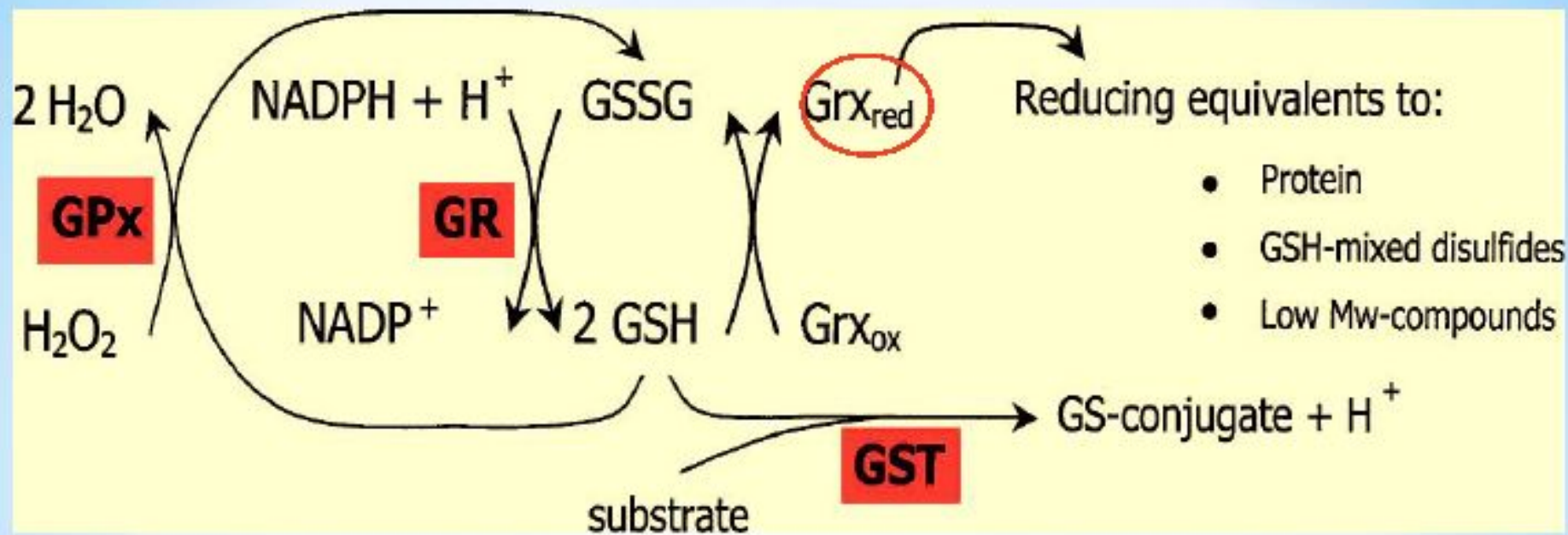
Исторически термин **редокс-состояние (redox-state)** используется для описания соотношения взаимоконвертируемой окисленной и восстановленной формы *специфической редокс-пары*. Для ситуаций, в которых требуется описание сложных систем, коей и является живая клетка, предложено использовать термин **«редокс-окружение» (redox environment)**



Основные редокс-пары клетки

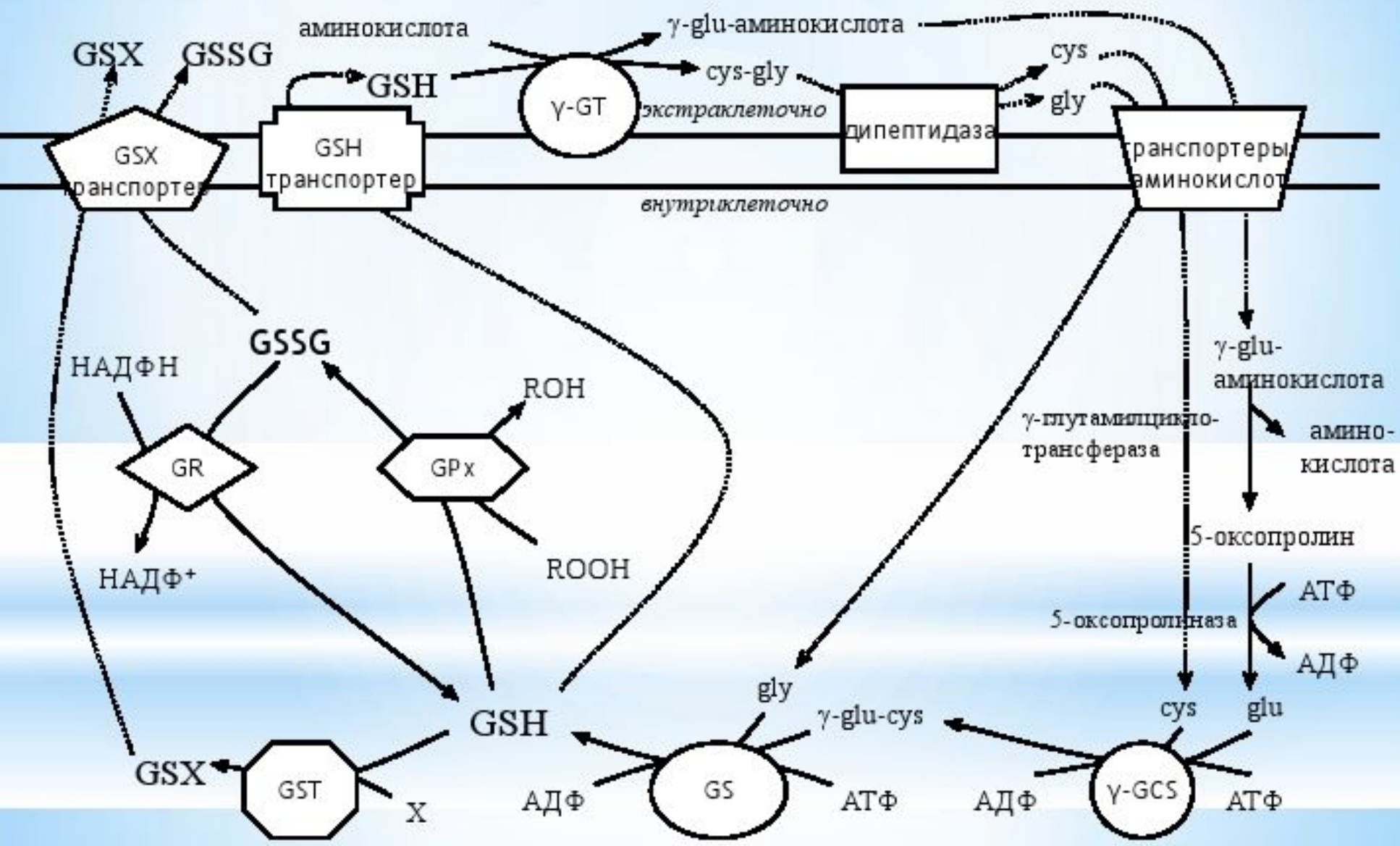
- ▶ **Соединения, существующие одновременно в окисленном и восстановленном состояниях, причем переход из одного состояния в другое обратим**
- ▶ **являются универсальными, поскольку выступают связующими звеньями во многих разных клеточных редокс- процессах**

Редокс-пара	Структура	Реакция	Характеристики
GSSG/2GSH			<p>Стандартный редокс потенциал: -240 мВ [198]; редокс потенциал в компартментах: $-280 \dots -320$ в цитоплазме [20, 21], $-300 \dots -330$ в митохондриях [34], $-170 \dots -190$ в люмене ЭПР [38]. Концентрация в клетке до 15 мМ [5]</p>
Trx(SH) ₂ /TrxSS			<p>Стандартный редокс потенциал: -230 мВ [199]; редокс потенциал в компартментах: $-280 \dots -300$ в цитоплазме и ядре [34], $-340 \dots -360$ в митохондриях [34]. Концентрация в клетках млекопитающих до 10 мкМ [53]</p>



Благодаря высокой внутриклеточной концентрации (от 0,1 до 10 мМ) **GSH** является важным внутриклеточным антиоксидантом, играя роль “ловушки” свободных радикалов и косубстрата в реакциях детоксикации пероксидов, катализируемых **глутатионпероксидазами (GPx)** и **глутатионтрансферазами (GST)**, а также в восстановлении окисленной формы **глутаредоксина (Grx)**. Восстановление **окисленной формы глутатиона (GSSG)** катализирует **глутатионредуктаза (GR)**

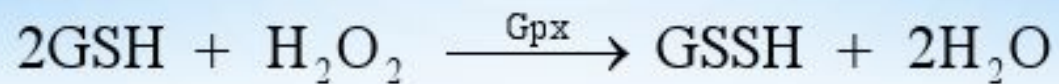
Схема основных путей метаболизма глутатиона



На основании первичной аминокислотной последовательности, субстратной специфичности и субклеточной локализации установлено **7 изоформ глутатион пероксидазы (GPx)** у человека и млекопитающих. Изоформы GPx в положении 21 аминокислоты содержат **селеноцистеин (Sec)**. GPx1 локализована в основном в цитозоле, а также обнаружена и в митохондриях, восстанавливает водорастворимые гидроперекиси и экспрессируется практически во всех типах клеток. Все изоформы GPx катализируют восстановление органических гидропероксидов:



GPx активна по отношению к H_2O_2 и OONO^- :

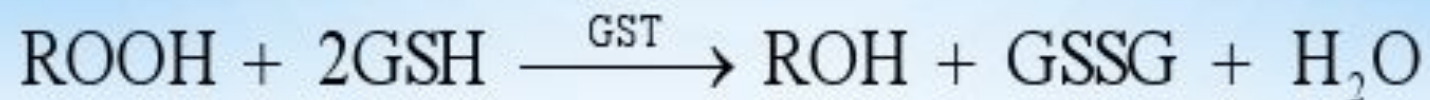


Глутатион S-трансферазы, использующие нуклеофильный GSH для конъюгации с неполярными соединениями, содержащими электрофильные атомы C, N и S.

Суперсемейство GST подразделяется на **три субсемейства**: цитозольные, митохондриальные GST и микросомальные GST.

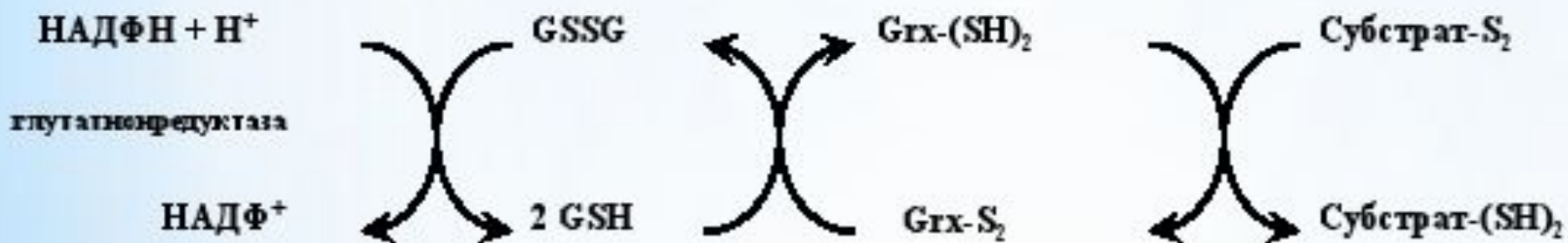
Основными функциями GST являются: а) **детоксикация ксенобиотиков**; б) **редокс-регуляция чувствительности клеток к апоптозу**,

б) **детоксикация продуктов окислительного стресса**:

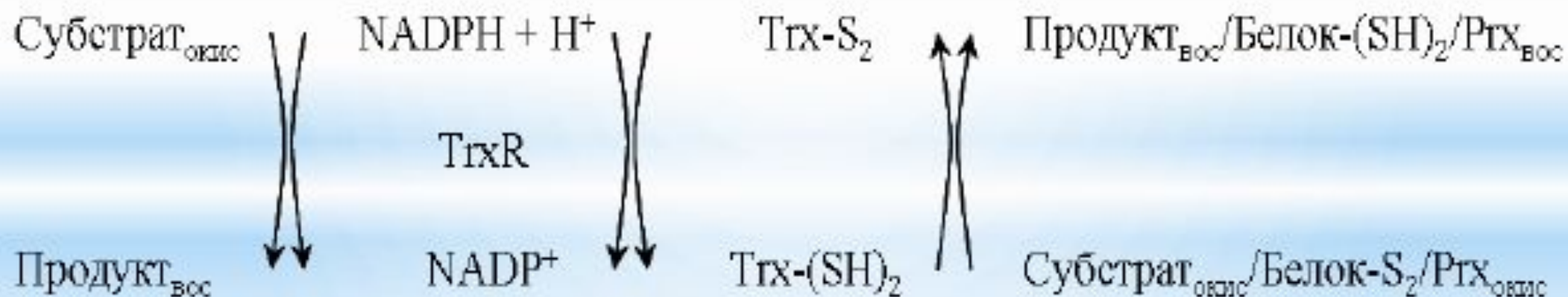


Глутаредоксины (Grx) – GSH-зависимые оксидоредуктазы, играющие важную роль в клеточных редокс-зависимых процессах.

В Grx-зависимой системе перенос электронов происходит от НАДФН-зависимой глутатионредуктазы на окисленный глутатион (GSSG) с образованием GSH, который в свою очередь восстанавливает окисленный Grx. **Субстратами для Grx являются дисульфиды и смешанные дисульфиды.**

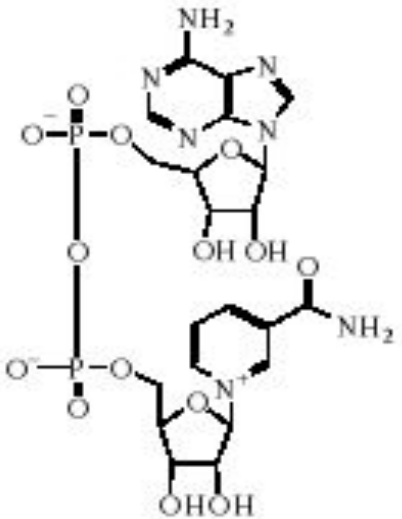
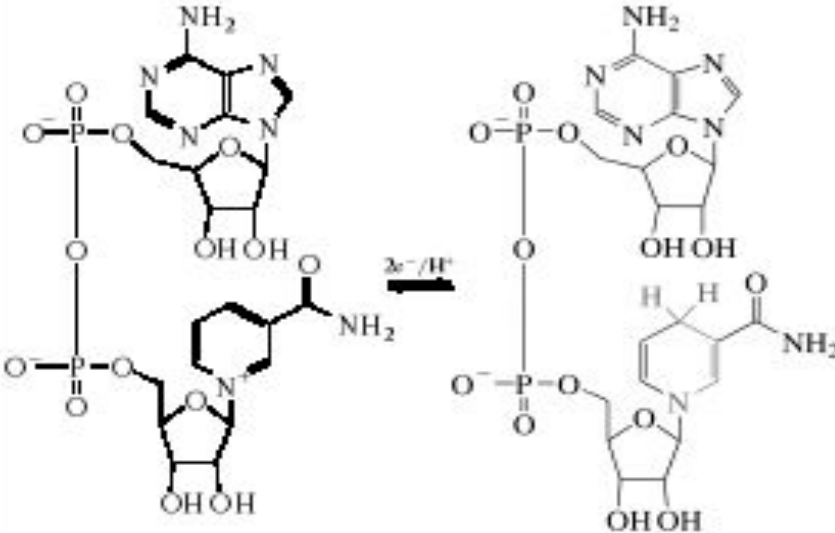
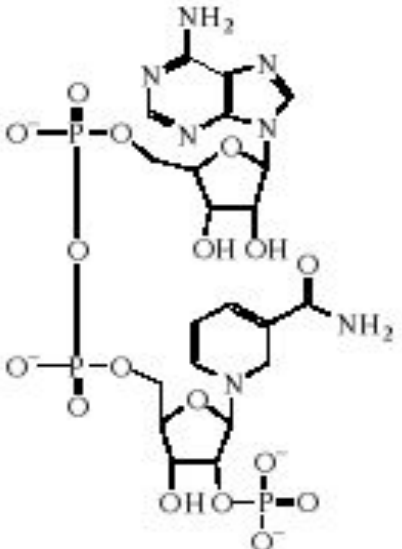
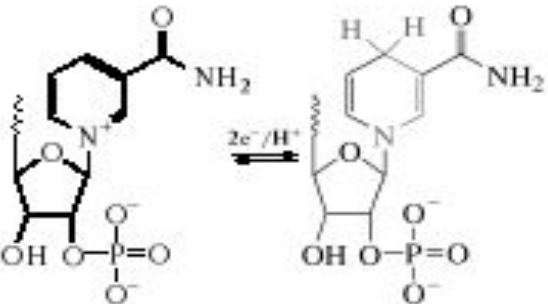


Trx-зависимая система содержит помимо Trx **НАДФ-зависимую тиоредоксинредуктазу (TrxR)**, которая восстанавливает окисленную форму Trx.



Основными изоформами Trx являются цитозольный Trx1 и митохондриальный Trx2.

Таблица. Окончание

Редокс-гара	Структура	Реакция	Характеристики
NAD ⁺ /NADH			<p>Стандартный редокс потенциал: -316 мВ [200]; редокс потенциал в цитоплазме клеток печени -250 мВ [188]. Общая концентрация в большинстве тканей 10⁻⁵ М [90]</p>
NADP ⁺ /NADPH			<p>Стандартный редокс потенциал -315 мВ [200]; редокс потенциал в цитоплазме клеток печени -390 мВ [37, 186, 187]. Общая концентрация в большинстве тканей 10⁻⁶ М [90]</p>

NAD⁺ и NADH

- ▶ Для большинства тканей общая концентрация NAD⁺ и NADH составляет примерно 10^{-5} М
- ▶ В митохондриях соотношение NAD⁺/NADH меняется в пределах от 7–8 до 1, в то время как в цитоплазме этот параметр имеет более широкий диапазон значений – от 700 до 1
- ▶ В клетках существует несколько путей синтеза NAD, в т. ч. *de novo*
- ▶ Является **ГЛАВНОЙ** редокс-парой

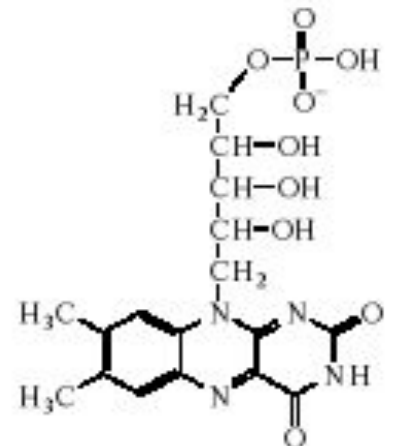
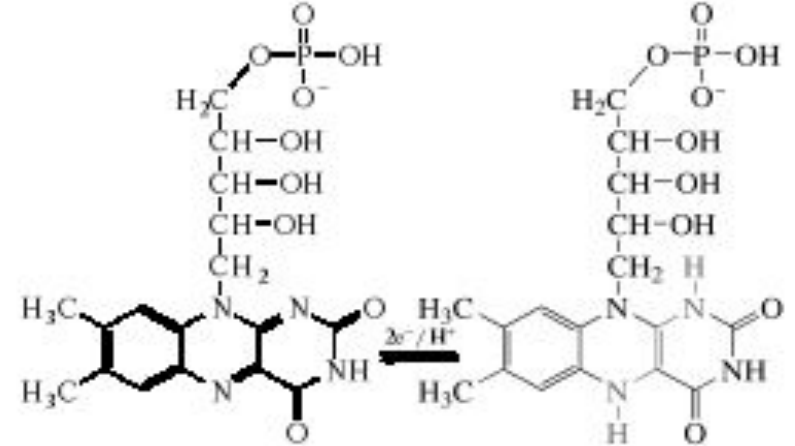
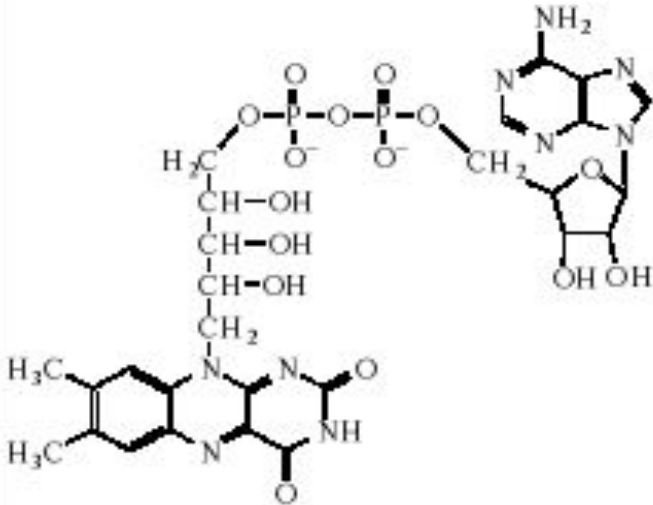
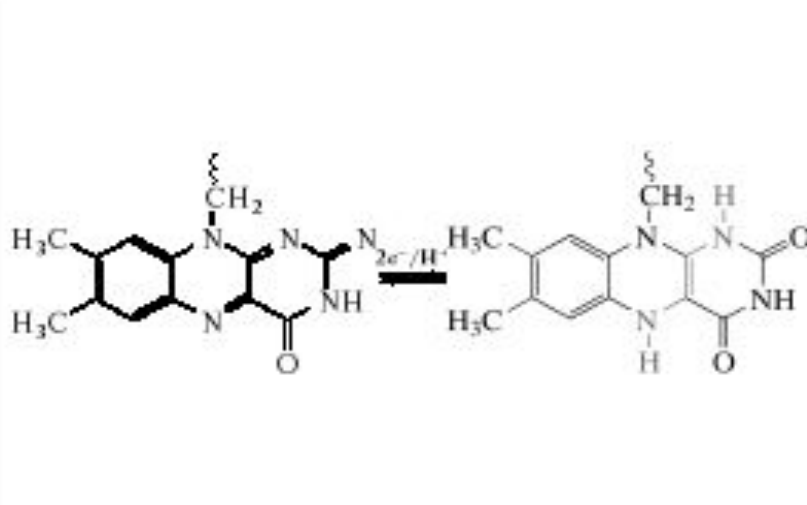
- ▶ Ключевым ферментом синтеза NAD, независимо от того, по какому пути он протекает, является никотинамидмононуклеотид-аденилилтрансфераза (NMNAT). NMNAT осуществляет обратимую реакцию синтеза NAD из никотинамидмононуклеотида (NMN) с использованием энергии АТФ
- ▶ Внутренняя мембрана митохондрий непроницаема для обеих форм NAD. Однако в клетке происходит постоянный обмен восстановительными эквивалентами между цитоплазмой и митохондриями, для этого существуют специализированные челночные механизмы. В зависимости от субстратной пары и типа клеток реализуется глицеролфосфатный или малатаспартатный механизмы



Рис. 3. Участие PARP-1 в клеточной гибели.



Рис. 4. Участие NAD(P) в регуляции уровня клеточного Ca^{2+} .

Редокс-пара	Структура	Реакция	Характеристики
FMN/FMNH ₂			<p>Стандартный редокс потенциал: -219 мВ (для свободного кофермента) [195, 196].</p> <p>Концентрация: 6,6 нмоль/л в плазме крови человека и 44 нмоль/л в эритроцитах [197]</p>
FAD/FADH ₂			<p>Стандартный редокс потенциал: -219 мВ (для свободного кофермента) [195, 196].</p> <p>Концентрация: 74 нмоль/л в плазме крови человека и 469 нмоль/л в эритроцитах [197]</p>

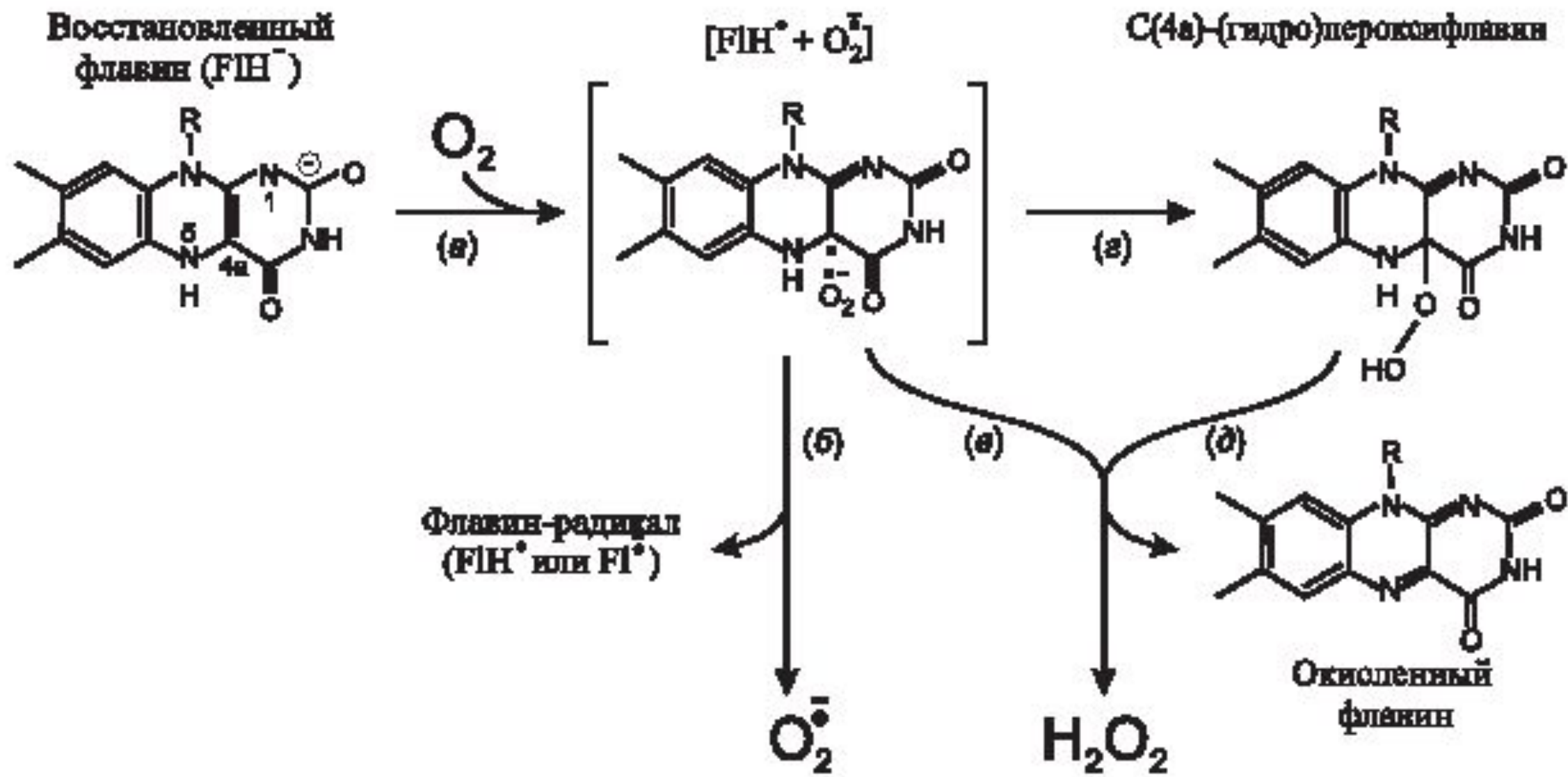


Рис. 2. Образование супероксид-радикала и перекиси водорода при участии восстановленного флавина (адаптировано по [27]). Пояснения в тексте.

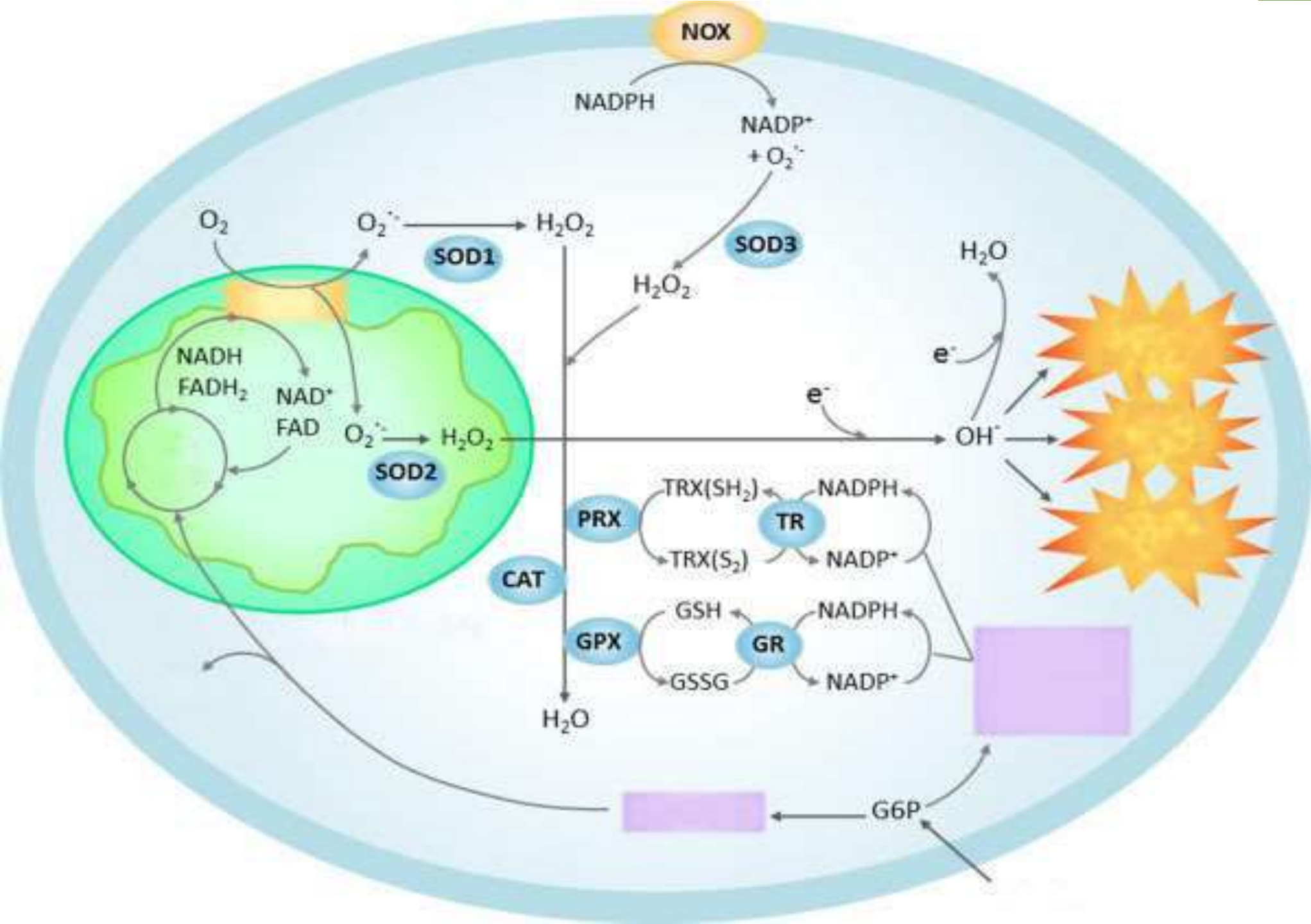
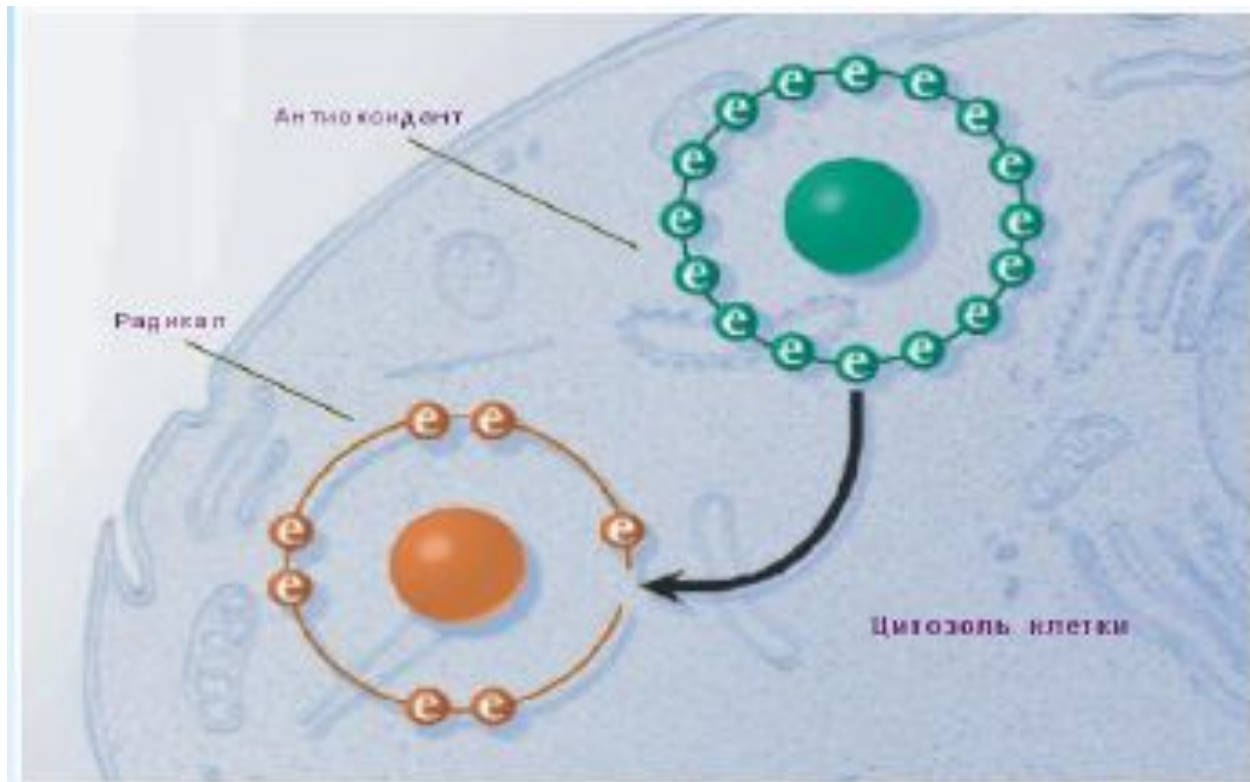


Рис. 1. Схематичная иллюстрация процессов генерации АФК в клетке и путей их элиминации

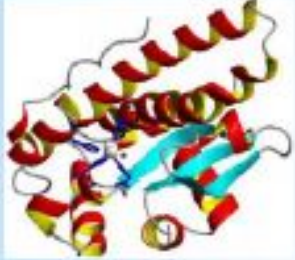
фагоциты (гранулоциты и моноциты крови) и тканевые макрофаги для борьбы с бактериями образуют $O_2^{\bullet-}$ при активации **НАДФН-оксидазного комплекса на цитоплазматической мембране**





Антиоксиданты имеют подвижный атом водорода и поэтому реагируют со СР и с инициаторами свободнорадикального окисления. Подвижность атома водорода обусловлена нестойкой связью с атомами углерода (С-Н) или серы (S-H). В результате взаимодействия возникают малоактивные радикалы самого антиоксиданта, гидроперекиси разлагаются без диссоциации на активные радикалы, образуются комплексоны с металлами переменной валентности.

Ключевыми антиоксидантными ферментами являются супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, глутатионпероксидаза. Они катализируют реакции, в результате которых свободные радикалы и перекиси превращаются в неактивные соединения



Супероксиддисмутаза (разные формы содержат Cu/Zn и Mn):



Каталаза (гемсодержащий фермент):



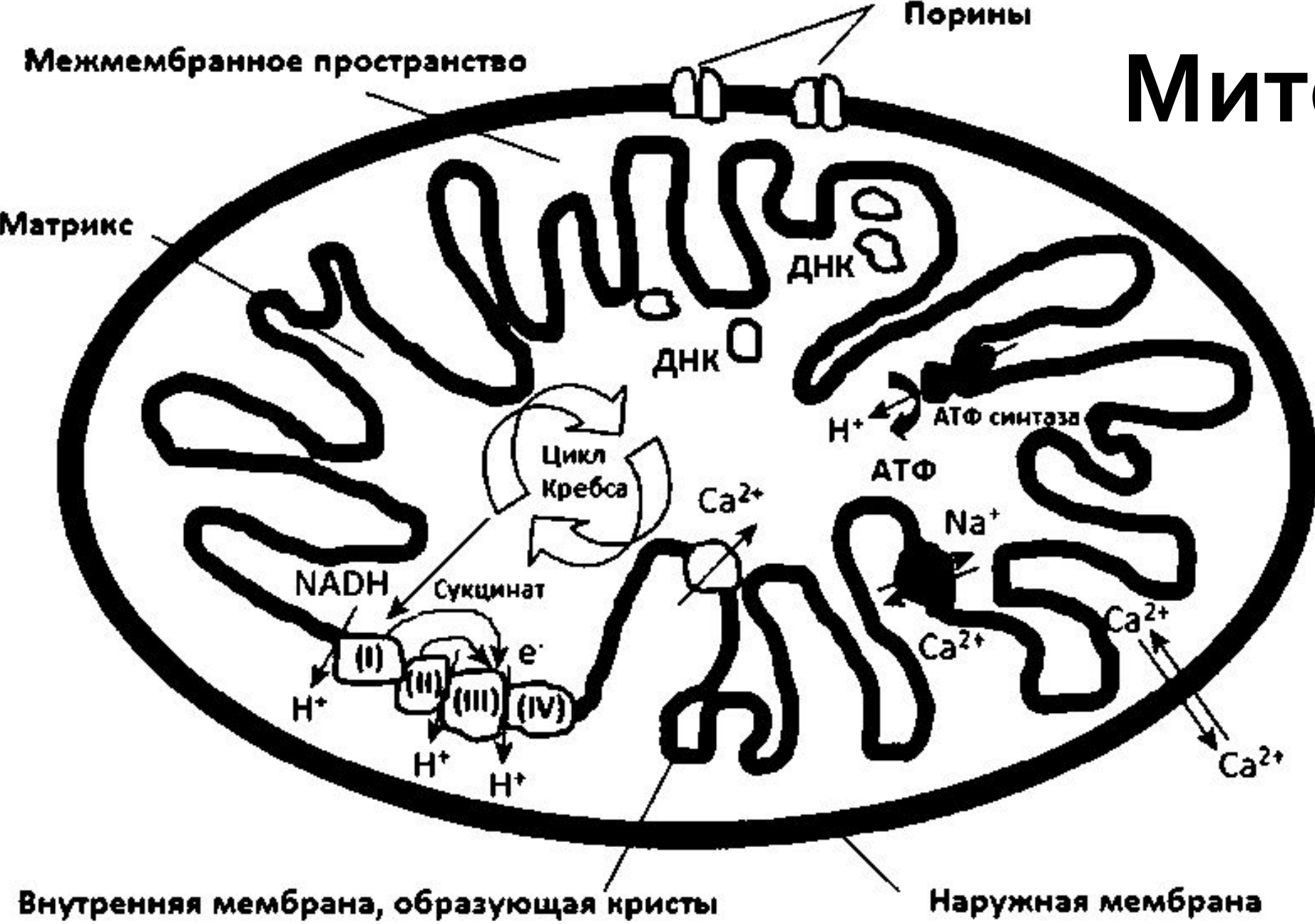
Глутатионпероксидаза (содержит остаток селеноцистеина):



Низкомолекулярные антиоксиданты

- ▶ **фенолы**
- ▶ **полифенолы (токоферолы, эвгенол, конидендрин, пирокатехин, производные галловой кислоты)**
- ▶ **флавоноиды (рутин, кверцетин)**
- ▶ **стероидные гормоны**
- ▶ **витамины E, A, K, стерины, убихинон**
- ▶ **витамины C, B6, PP, серотонин, SH-содержащие соединения**
- ▶ **глутатион**
- ▶ **мочевая кислота**
- ▶ **хелатные соединения**
- ▶ **и др.**

Митохондрии



Межмембранное пространство

Порины

Матрикс

ДНК

ДНК

Цикл Кребса

H^+

АТФ синтаза

АТФ

Ca^{2+}

Na^+

NADH

Сукцинат

e^-

H^+

H^+

H^+

Ca^{2+}

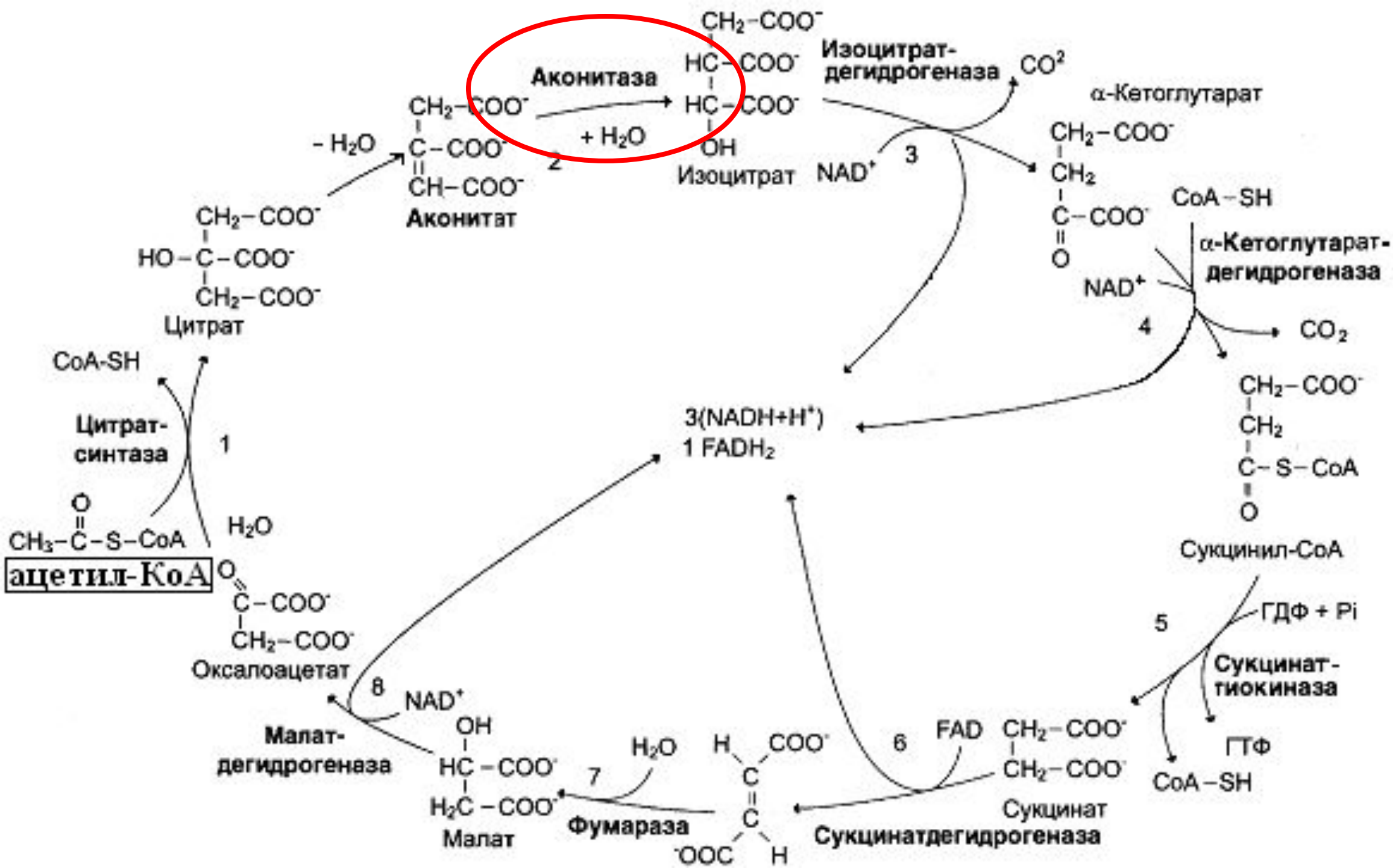
Ca^{2+}

Ca^{2+}

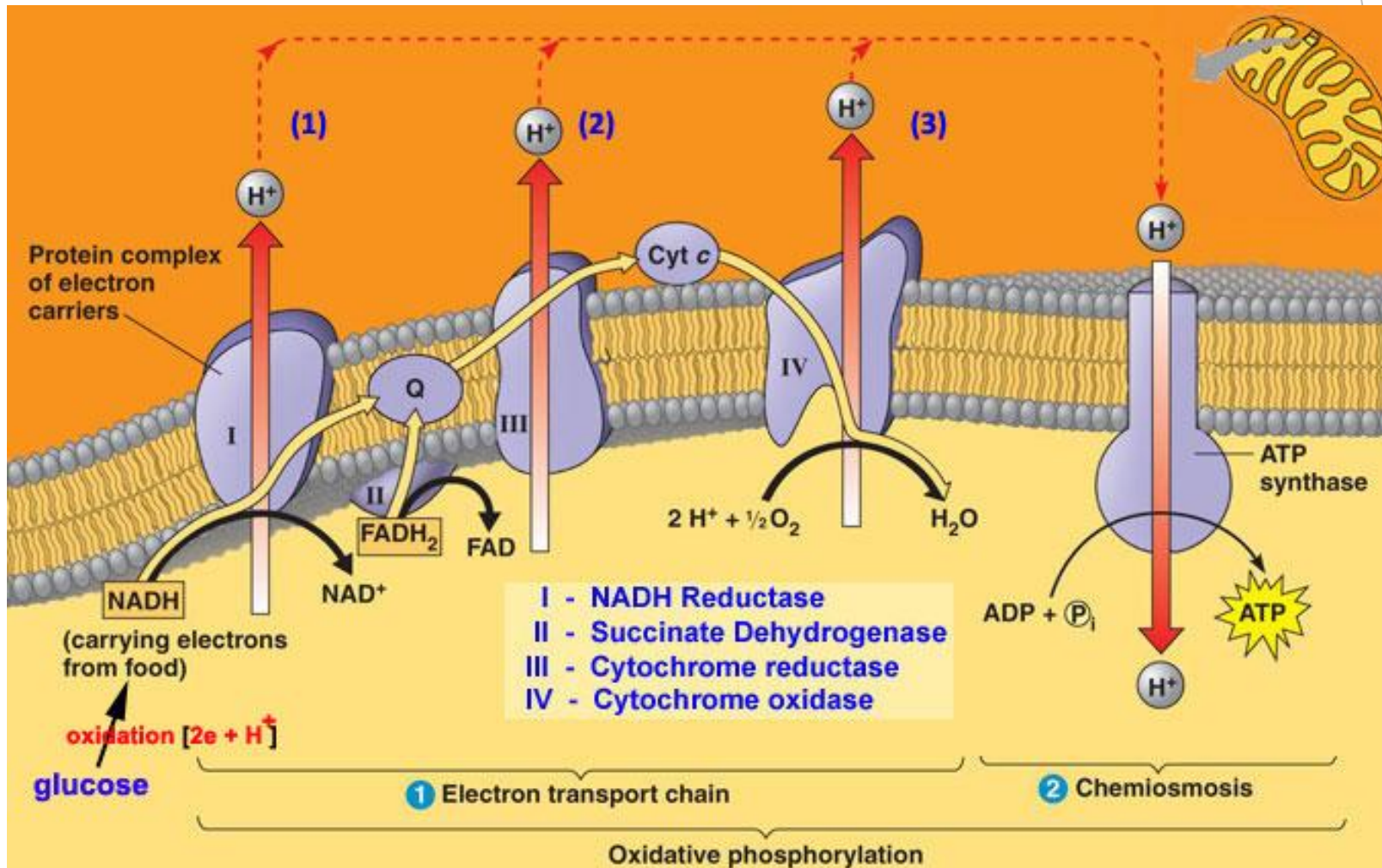
Ca^{2+}

Внутренняя мембрана, образующая кристы

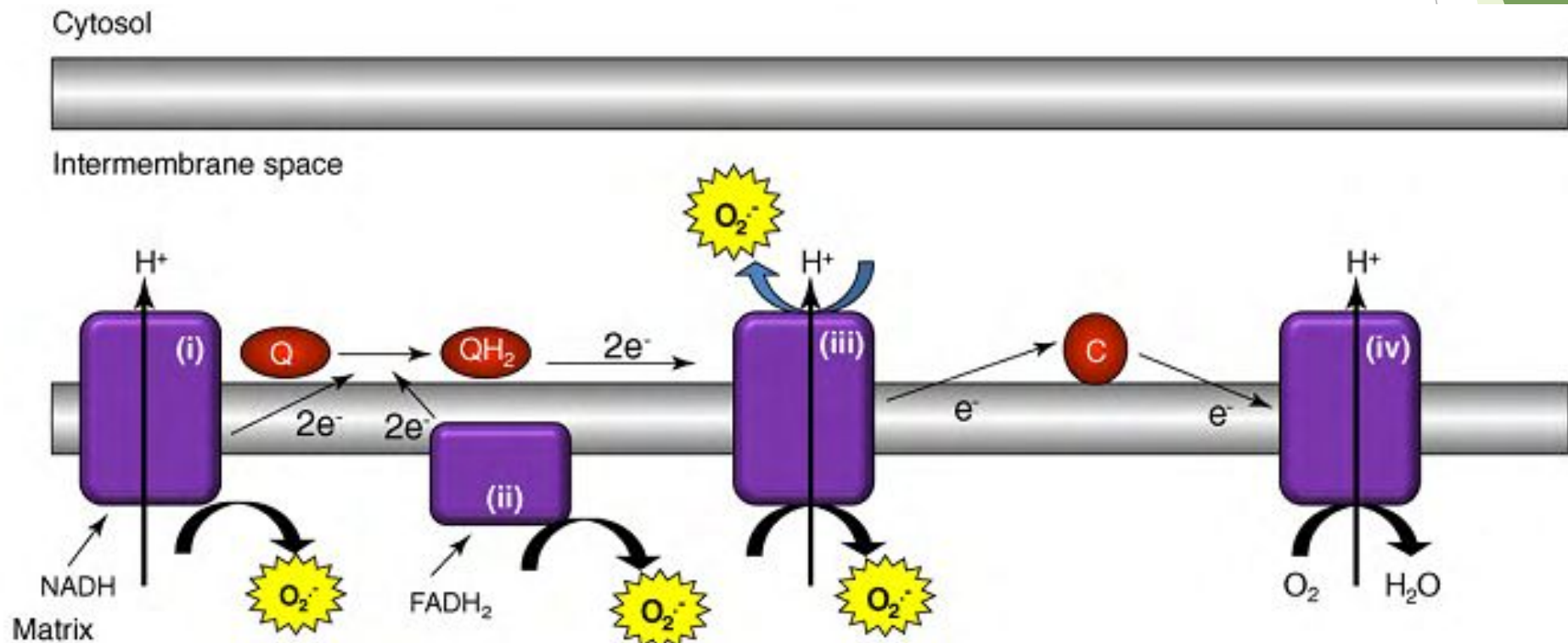
Наружная мембрана



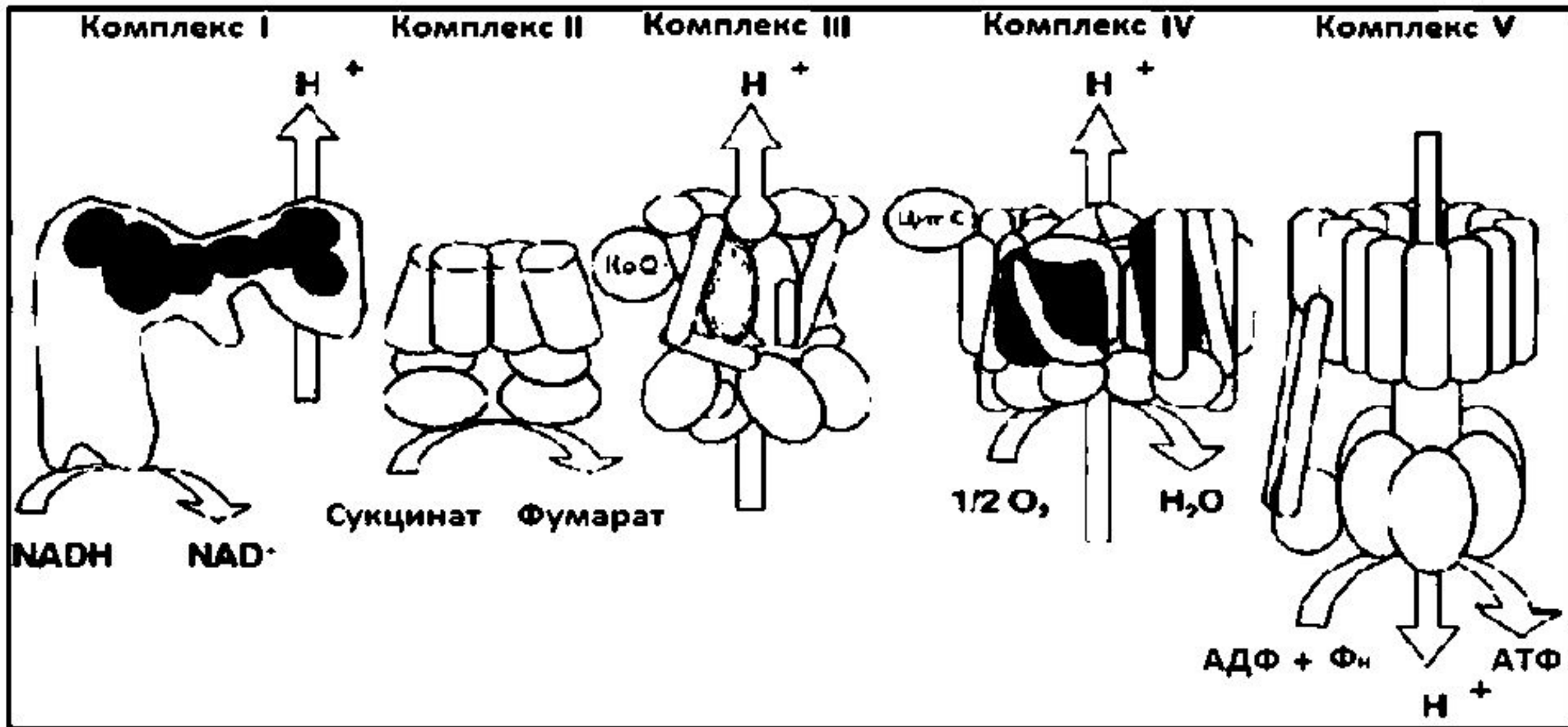
Митохондриальная цепь переноса электронов связывает перенос электронов к конечному акцептору электронов - кислороду, *с одновременным транспортом протонов из митохондриального матрикса через внутреннюю мембрану митохондрий в межмембранное пространство.*



В различных участках митохондриальной электронтранспортной цепи, электроны могут иногда непосредственно **"соскальзывать" на кислород**, образуя супероксид ($O_2^{\cdot -}$) в процессе одноэлектронного восстановления последнего.



TiBS



Ферментативные комплексы системы окислительного фосфорилирования.

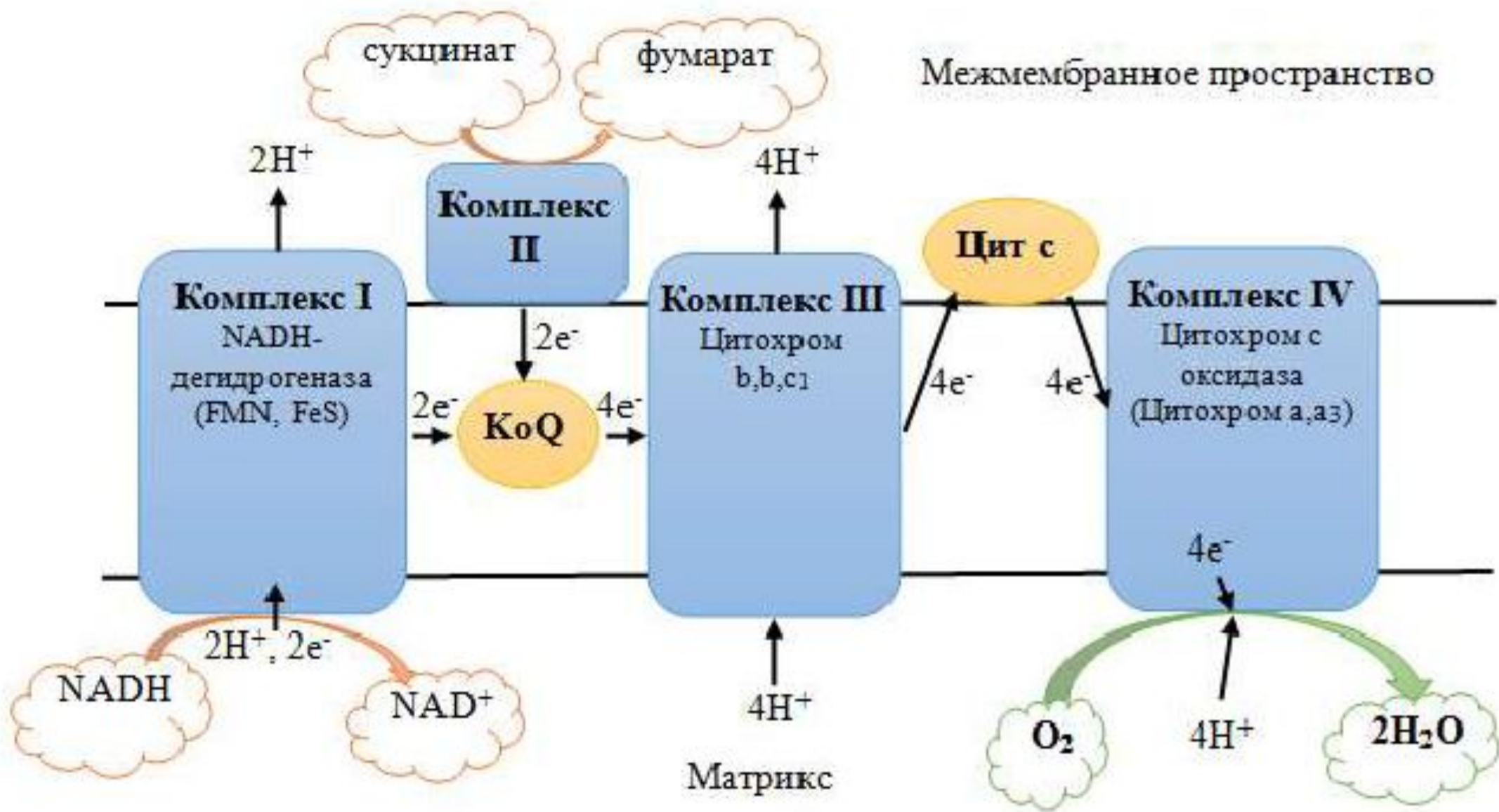
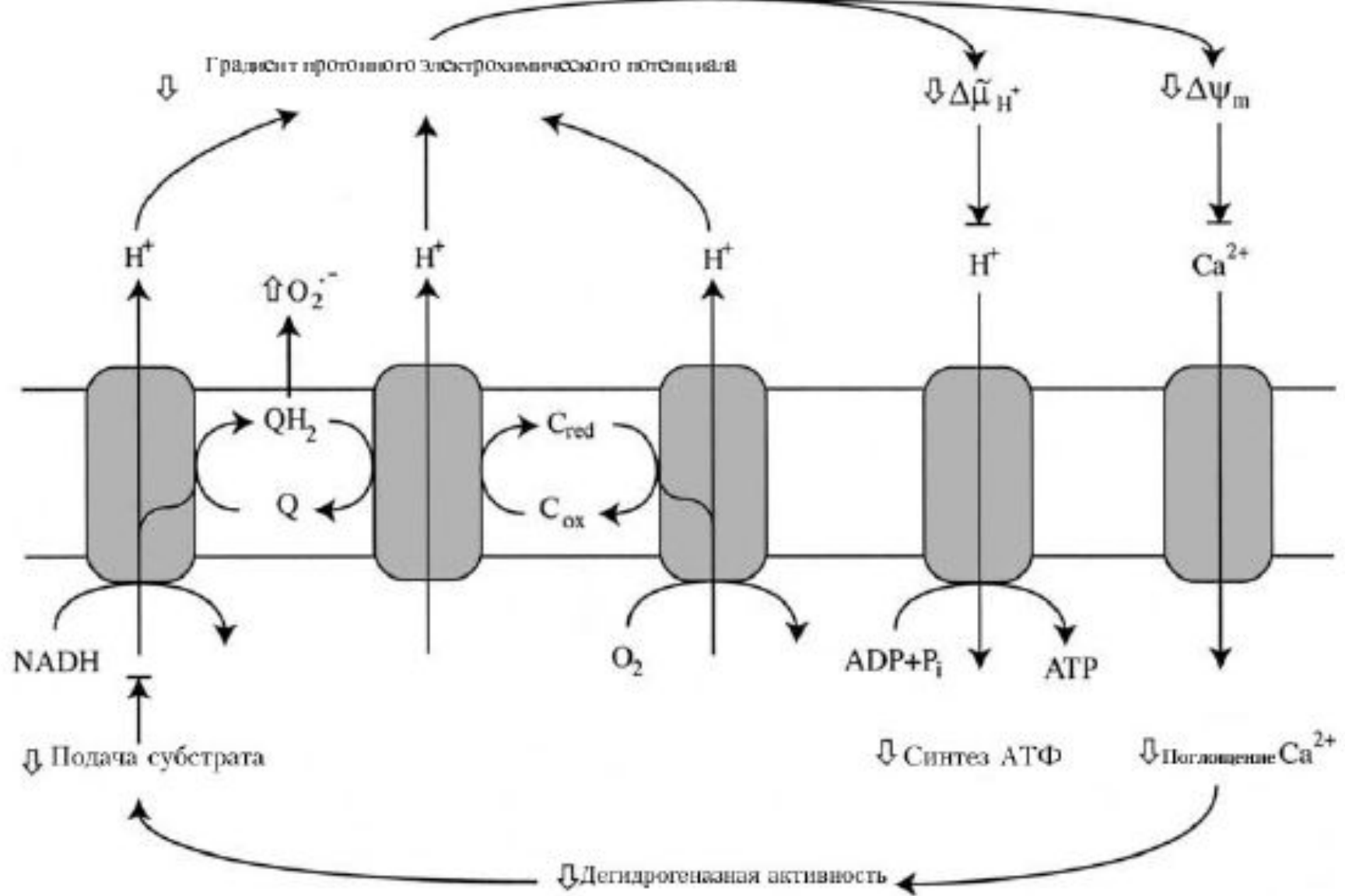


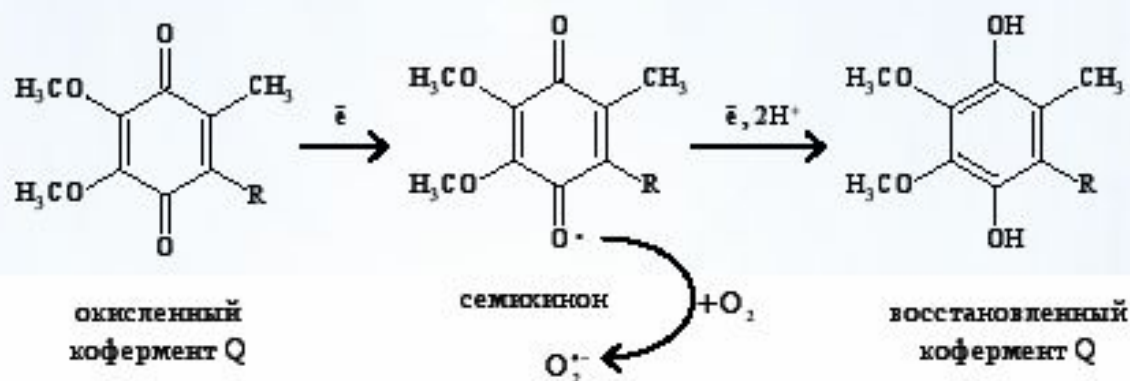
Рис. 1. Схема цепи передачи электронов на внутренней мембране митохондрий.



Q – убинон; QH₂ – убинол; C_{ox} – окисленный феррицитохром c; C_{red} – восстановленный феррицитохром c; Δμ_{H⁺} – движущая сила протона; Δψ_m – потенциал митохондриальной мембраны; P_i – неорганический фосфат.

Около 95% всего потребляемого кислорода в клетке восстанавливается в митохондриях до H_2O в процессе окислительного фосфорилирования. Остальные 5% процентов **в результате различных реакций превращаются в АФК:**

1) в результате «утечки» e^- в электронтранспортной цепи митохондрий (I и III комплексы - НАДН:убихинол-оксидоредуктаза и убихинол:цитохром с-оксидоредуктаза соответственно) с участием **КоQ**.



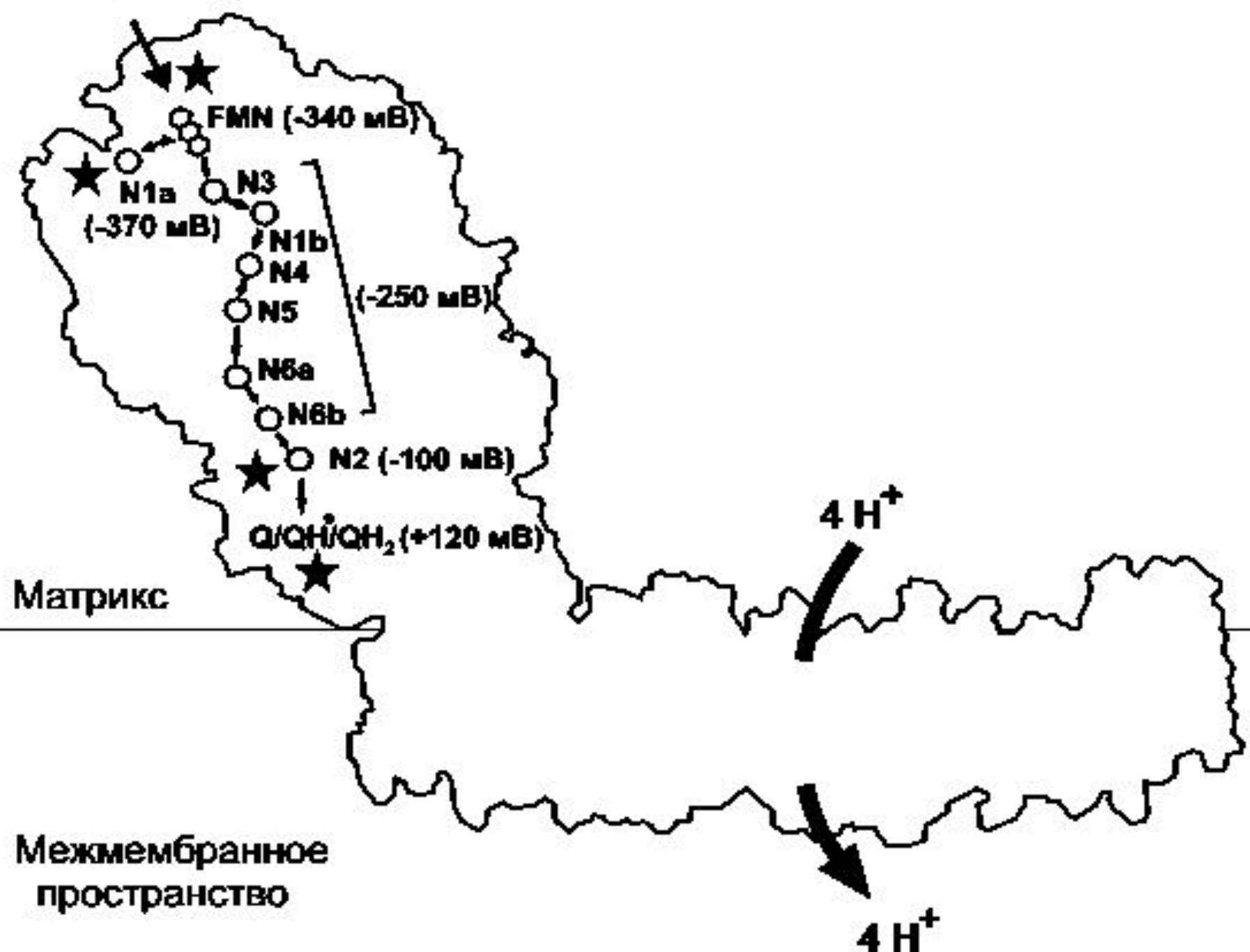
2) в результате «утечки» e^- в электронтранспортной системе мембран эндоплазматического ретикулума и ядра, включающие в себя цитохромы P-450 и b₅, а также НАДФН- и НАДН-зависимые редуктазы (в том числе НАДФН-цитохром P-450-зависимую редуктазу в микросомах).

3) за счет активности ферментов: НАДФН-оксидазы, ксантиноксидазы, циклооксигеназы, липоксигеназы, NO-синтазы, моноаминоксидазы, оксидазы АМК и др.

Ферменты, катализирующие протекание супероксид-радикала и перенос водорода в митохондриях

Фермент	Основная реакция	Редокс-кофакторы	Локализация
1. Комплекс I	$NADH + Q + H^+ + 4H^+ \rightarrow NAD^+ + QH_2 + 4H^+$	FMN, 8 железо-серных центров, связанный убисинон	Внутренняя мембрана митохондрий
2. Комплекс II	$Сукцинат + Q \rightarrow \text{Фумарат} + QH_2$	FAD, 3 железо-серных центра, гем b	Внутренняя мембрана митохондрий
3. Комплекс III	$QH_2 + 2 \text{идт. } c^+ + 2H^+ \rightarrow Q + 2 \text{идт. } c^+ + 2H^+ + 2H^+$	2 гема b, железо-серный центр, гем idт. c ₁	Внутренняя мембрана митохондрий
4. Дигидролипоамид дегидрогеназа	$\text{Дигидролипоамид} + NAD^+ \rightarrow \text{Липоамид} + NADH + H^+$	FAD, редокс активный дисульфид	Матрикс
5. NAD(P)H оксидаза (NOX4)	$NAD(P)H + O_2 + H^+ \rightarrow NAD(P)^+ + H_2O_2$	FAD, 2 гема b	Внешняя мембрана
6. Моноаминооксидаза	$\text{Амин} + O_2 + H_2O + H^+ \rightarrow \text{Альдегид} + H_2O_2 + NH_2^+$	FAD	Внешняя мембрана
7. Ацил-СоА-дегидрогеназа, электронпереносный флавопротеин и его дегидрогеназа	$\text{Ацил-СоА} + Q \rightarrow \text{Еноил-СоА} + QH_2$	FAD, железо-серный центр	Матрикс, внутренняя сторона внутренней мембраны
8. α-глицерофосфат дегидрогеназа	$\alpha\text{-глицерофосфат} + Q \rightarrow \text{фосфодиацетат} + QH_2$	FAD	Внешняя сторона внутренней мембраны
9. Дигидрооротат дегидрогеназа	$\text{Дигидрооротат} + Q \rightarrow \text{Оротат} + QH_2$	FMN	Внешняя сторона внутренней мембраны

NADH (-310 мВ)



Комплекс 1

Матрикс

Межмембранное пространство

4 H⁺

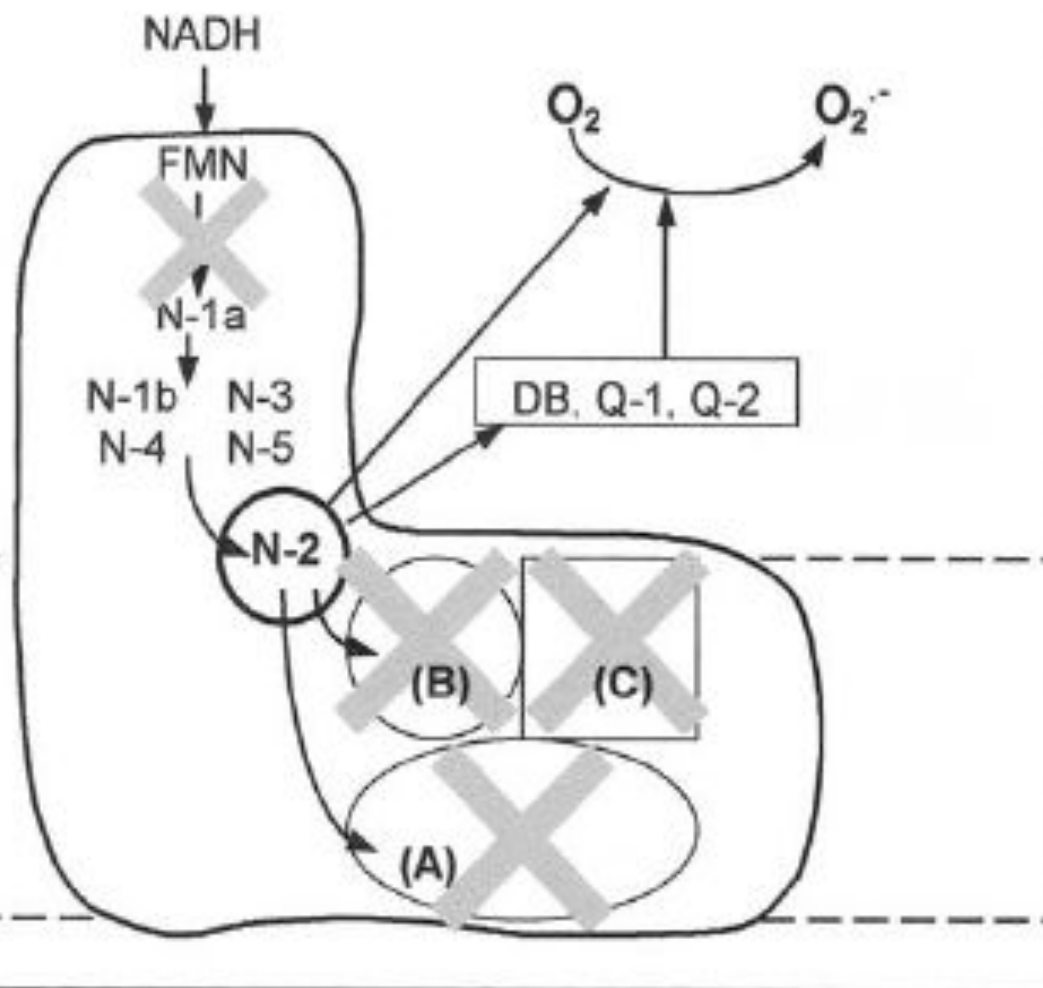


Рис. 2. Модель электронного транспорта и участка Комплекса I, продуцирующего супероксидные анион-радикалы.

Для построения схемы использована модель *Degli Esposti* [12]. Центр N-2 — FeS-кластер, источник электронов для связанного убихинона (центр В) и для молекулы убихинона, поступающей из пула (центр А). Эти два «полувосстановленных» убихинона (убисемихиноны) дисмутируют так, чтобы центр В содержал окисленный убихинон, а восстановленный убисемихинон (убихинол) переместился к центру С, из которого он выделяется в пул. Эффекты различных ингибиторов (на схеме отмечены знаком X) и акцепторов (FMN, N-1a, N-1b, N-3, N-4, N-5) сопряжены с FeS-кластером как источником одного электрона, поставляемого к кислороду или к экзогенным хинонам (DB — децилубихинон, Q-1, Q-2 и др.) которые восстанавливают кислород

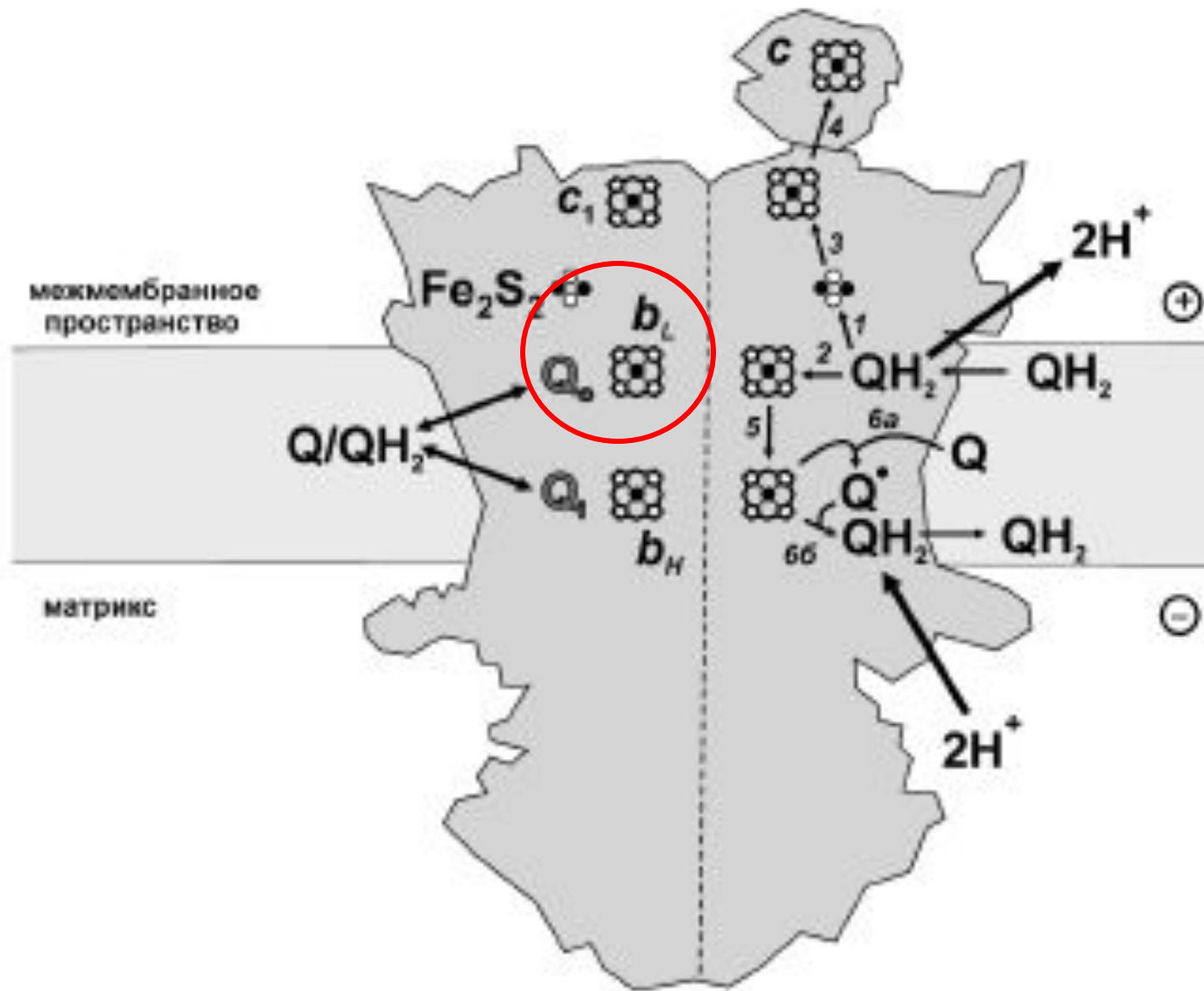
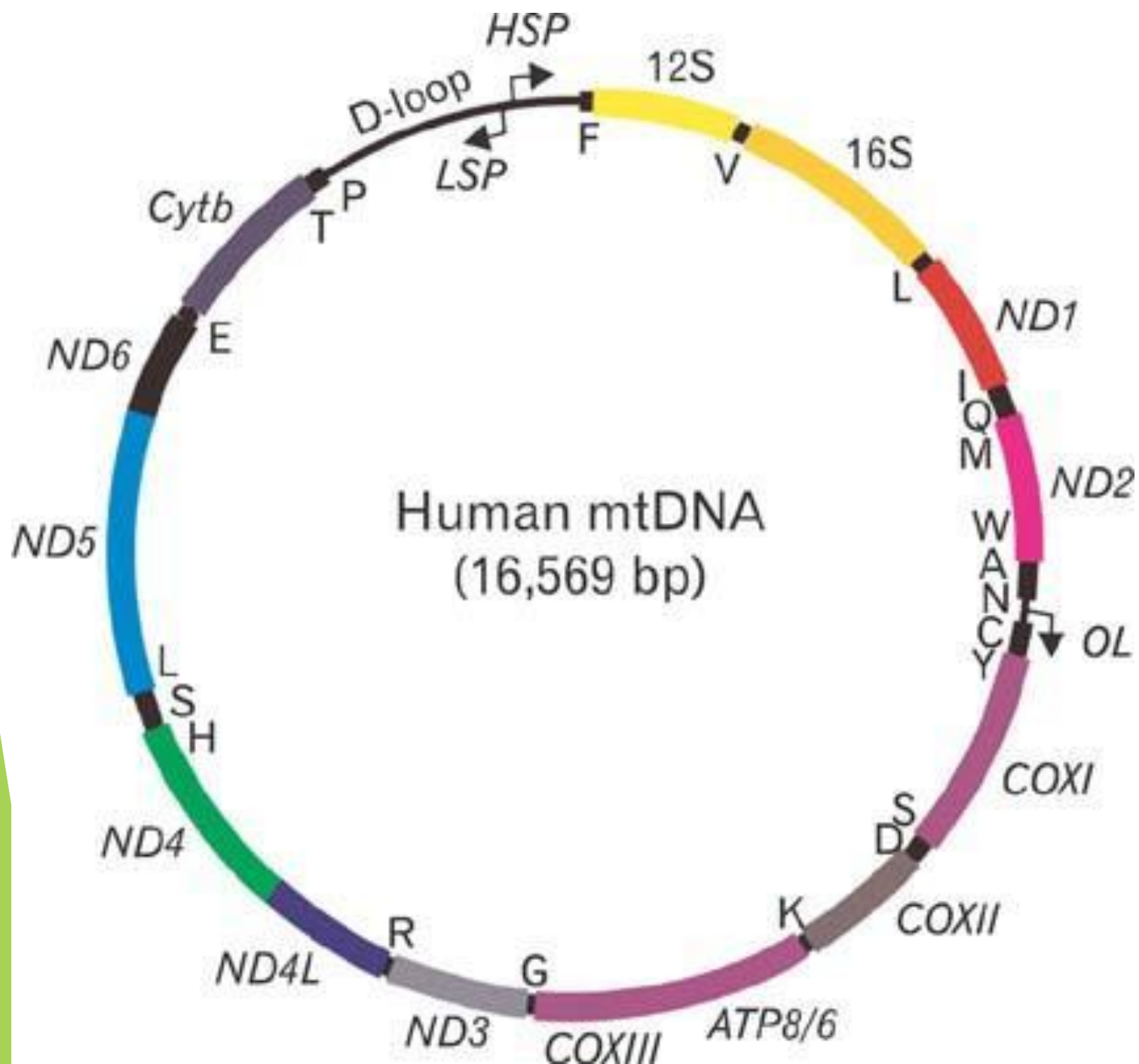
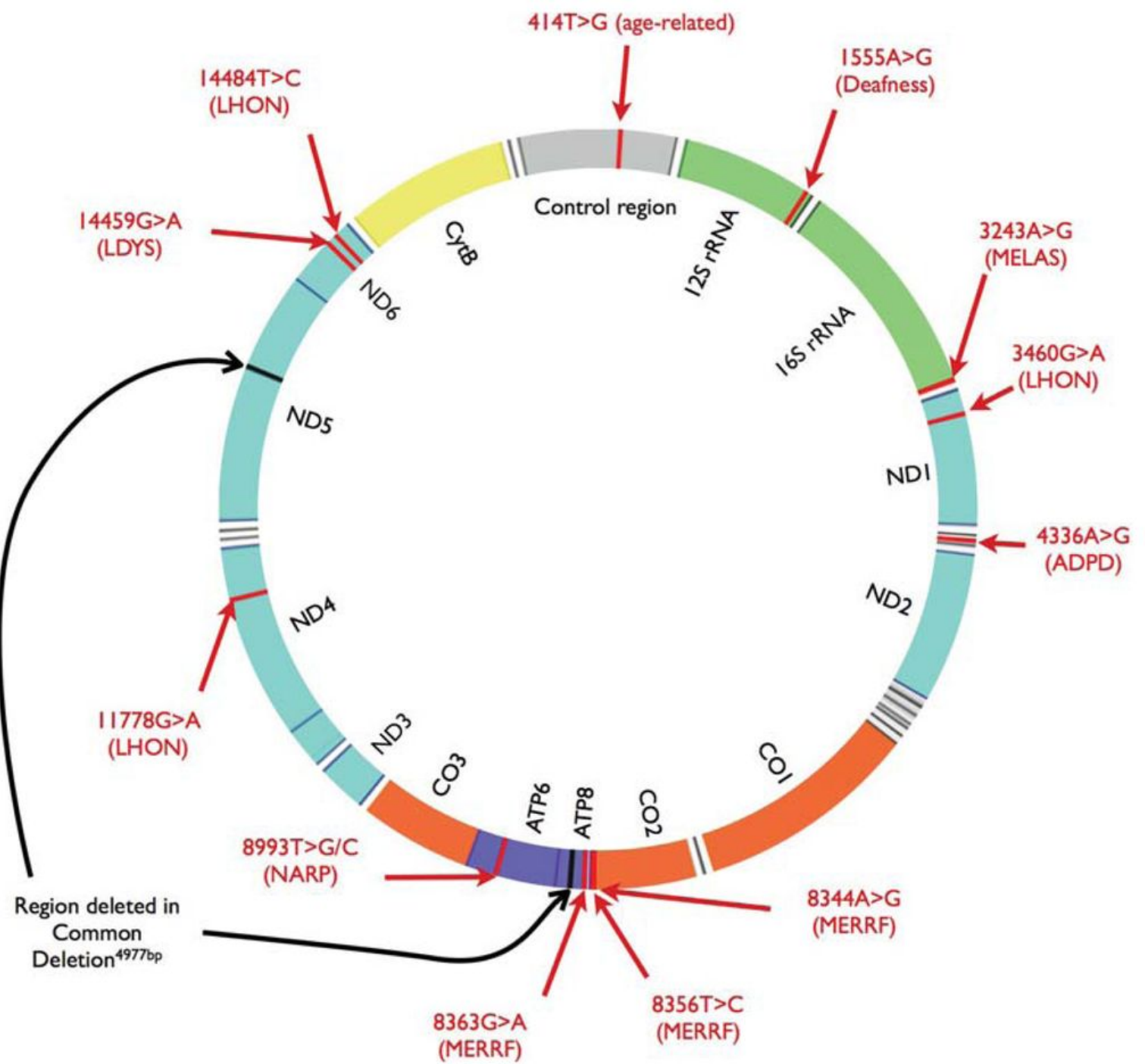


Рис. 4. Протондвижущий Q-цикл.

Гомодимер комплекса III расположен в внутренней мембране митохондрий (выделена светло-серым цветом). См. пояснения в тексте.

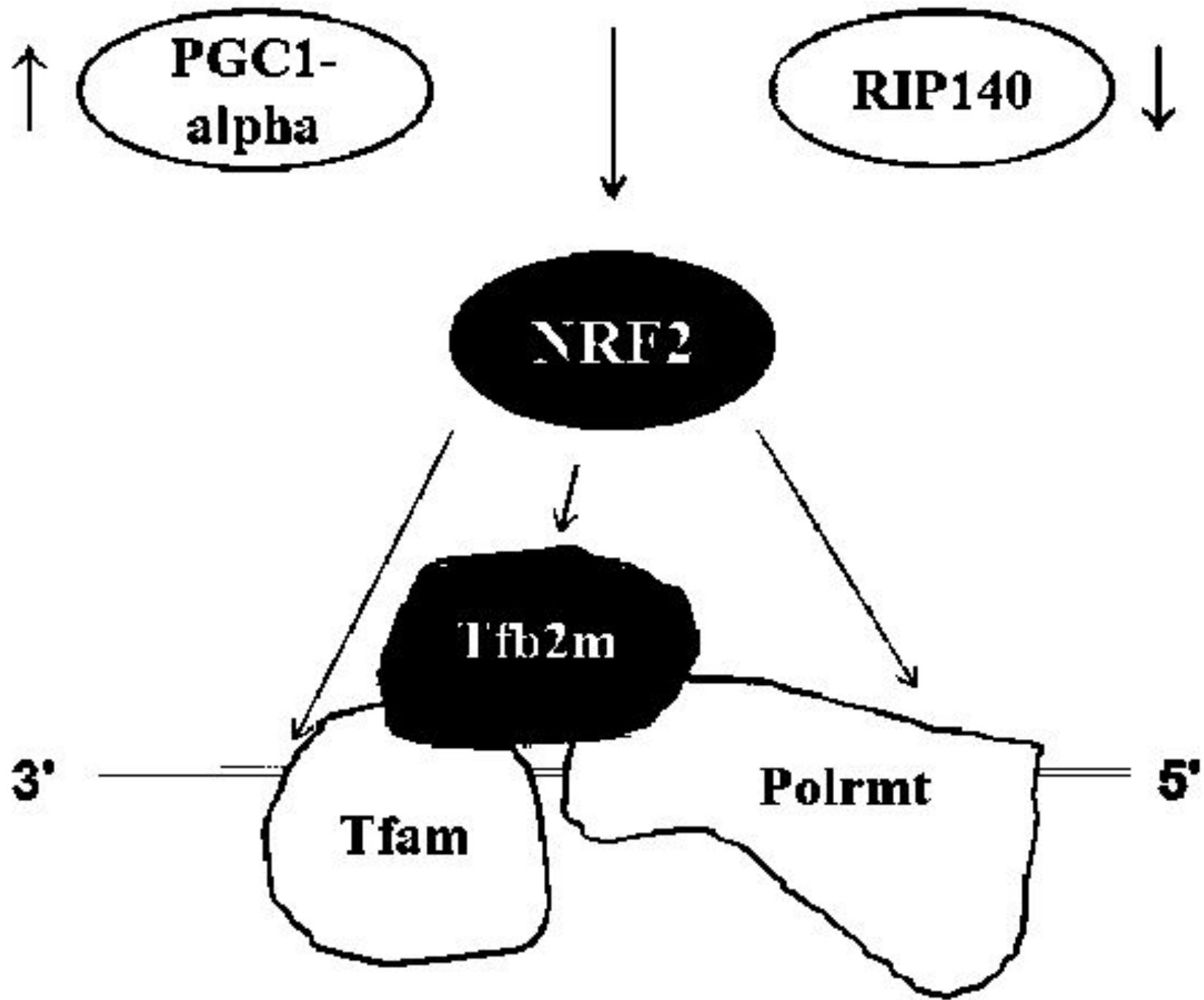




КОМПЛЕКС I (NADH : убихинон окислительная редуктаза)	КОМПЛЕКС III Убихинон : цитохром c-окислительная редуктаза)	КОМПЛЕКС IV Цитохром c-окислительная редуктаза	КОМПЛЕКС V (F ₀ F ₁ АТФ-синтаза)	Ca ²⁺ -транспортер
Количество мтДНК-кодированных субъединиц				
7	1	3	2	-

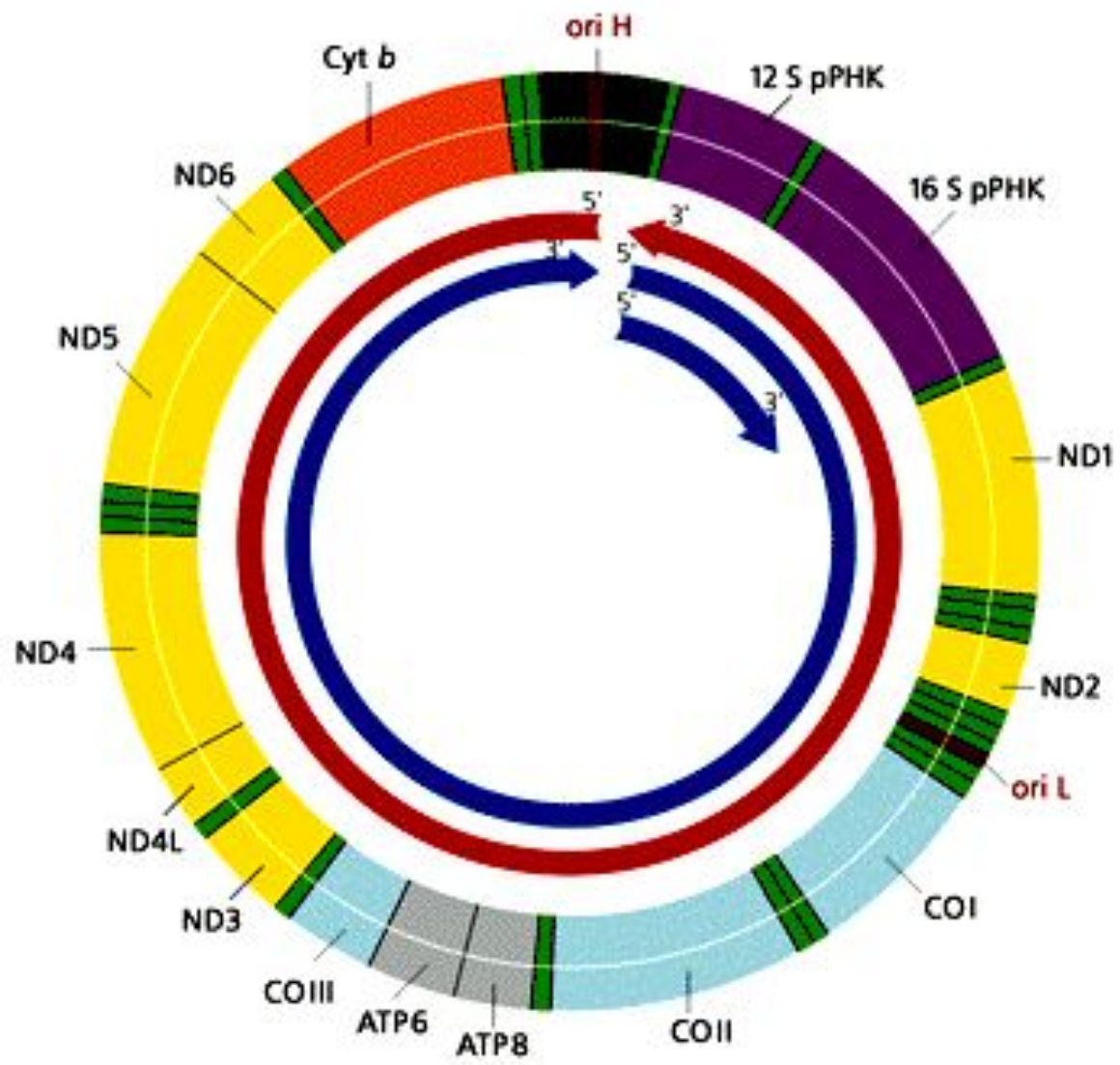
Митохондриальная свободнорадикальная теория старения

Предполагается, что интенсификация утечки электронов из электрон-транспортной системы митохондрий с возрастом, способствует продукции АФК, которые затем могут привести к повреждению компонентов этой системы и митохондриальной ДНК, что приводит, в свою очередь, к дальнейшему увеличению внутриклеточного уровня АФК и снижению эффективности функционирования органелл.



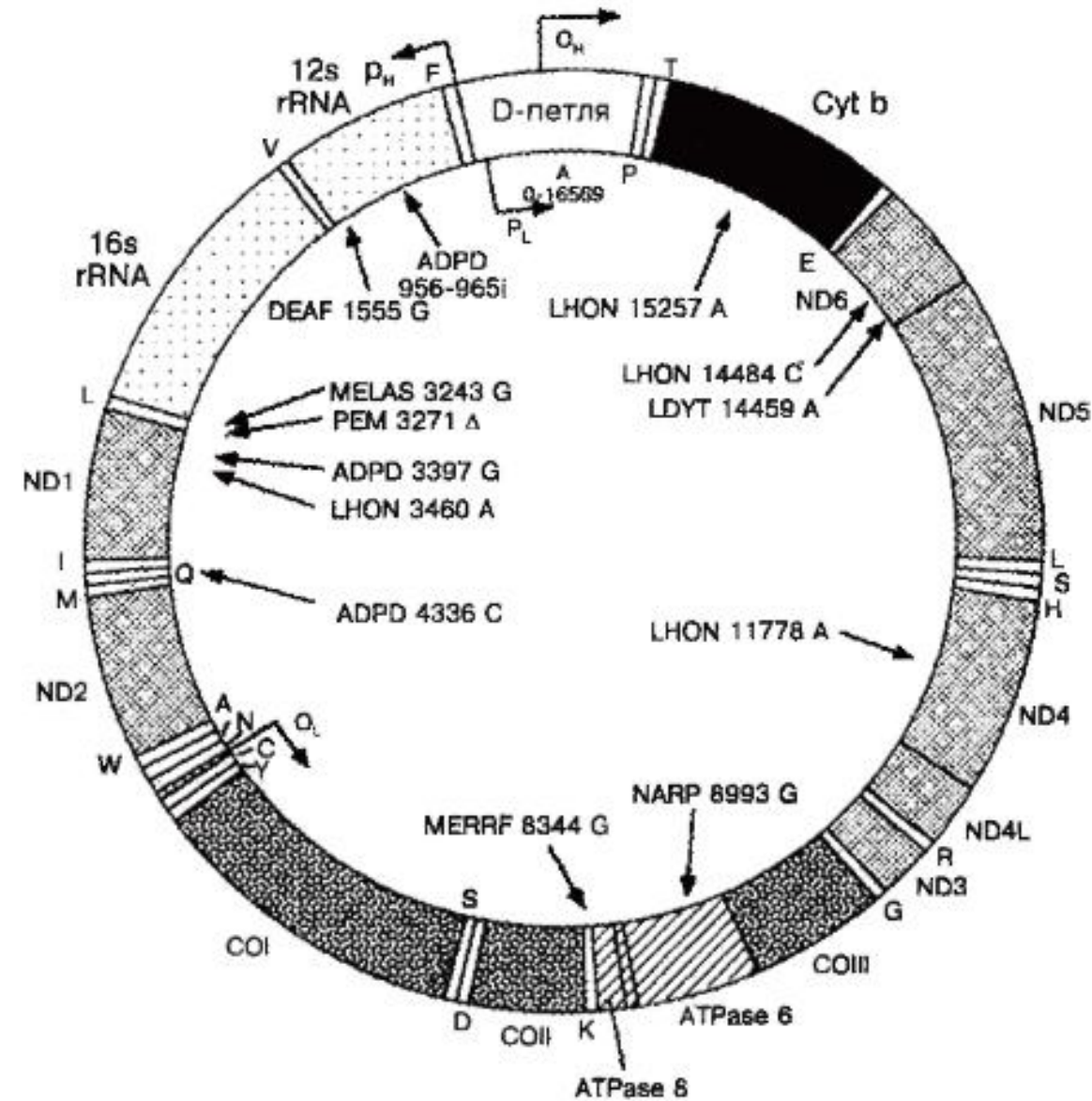
ядерные гены, участвующие в транскрипции мтДНК и регуляции этого процесса.

Polrmt - митохондриальная ДНК-зависимая РНК-полимераза. *Tfam*, *Tfb2m* - факторы инициации транскрипции мтДНК. *NRF2* - ядерный респираторный фактор. *PGC-1 α* - ядерный коактиватор факторов биогенеза митохондрий. *RIP140* - ядерный корепрессор факторов биогенеза митохондрий.

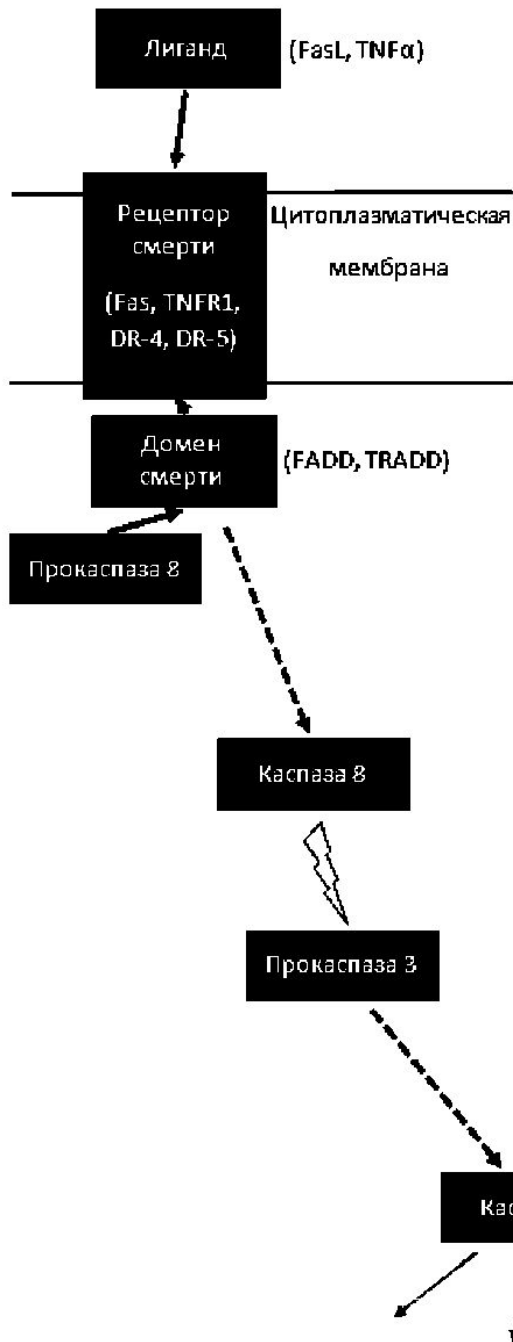


5' → 3' — транскрипт L-цепи

5' → 3' — длинный и короткий транскрипты H-цепи



Рецепторный сигнальный путь



Митохондриальный сигнальный путь

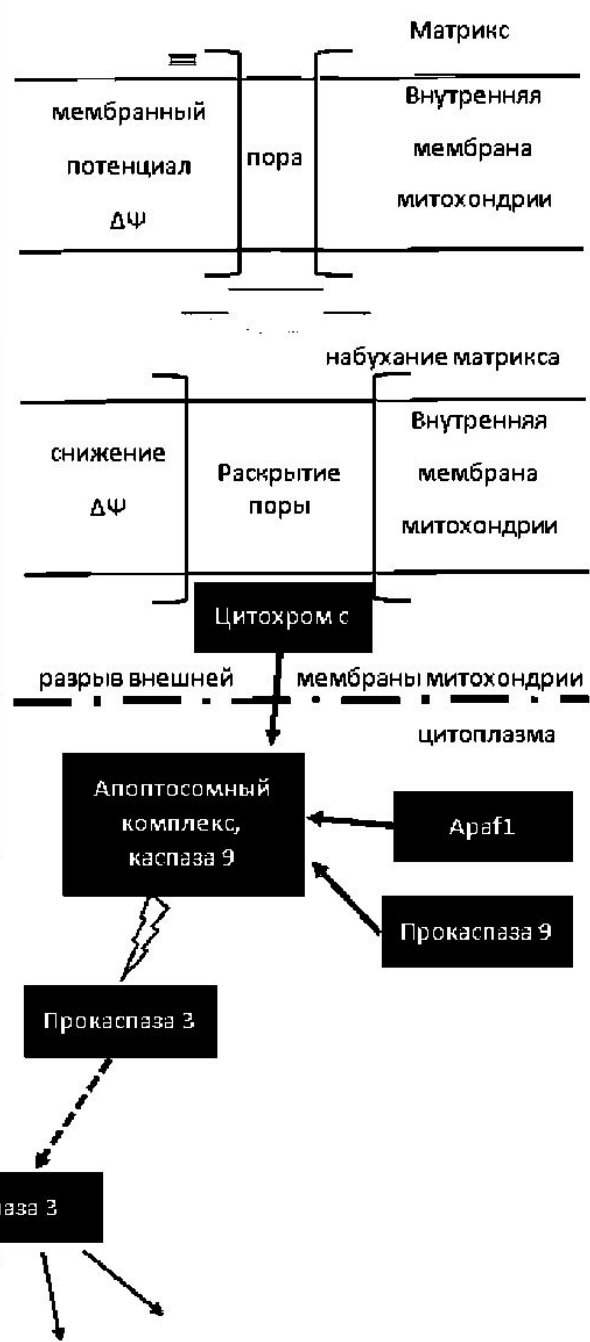


Схема рецепторного и митохондриального каспазного пути апоптоза.

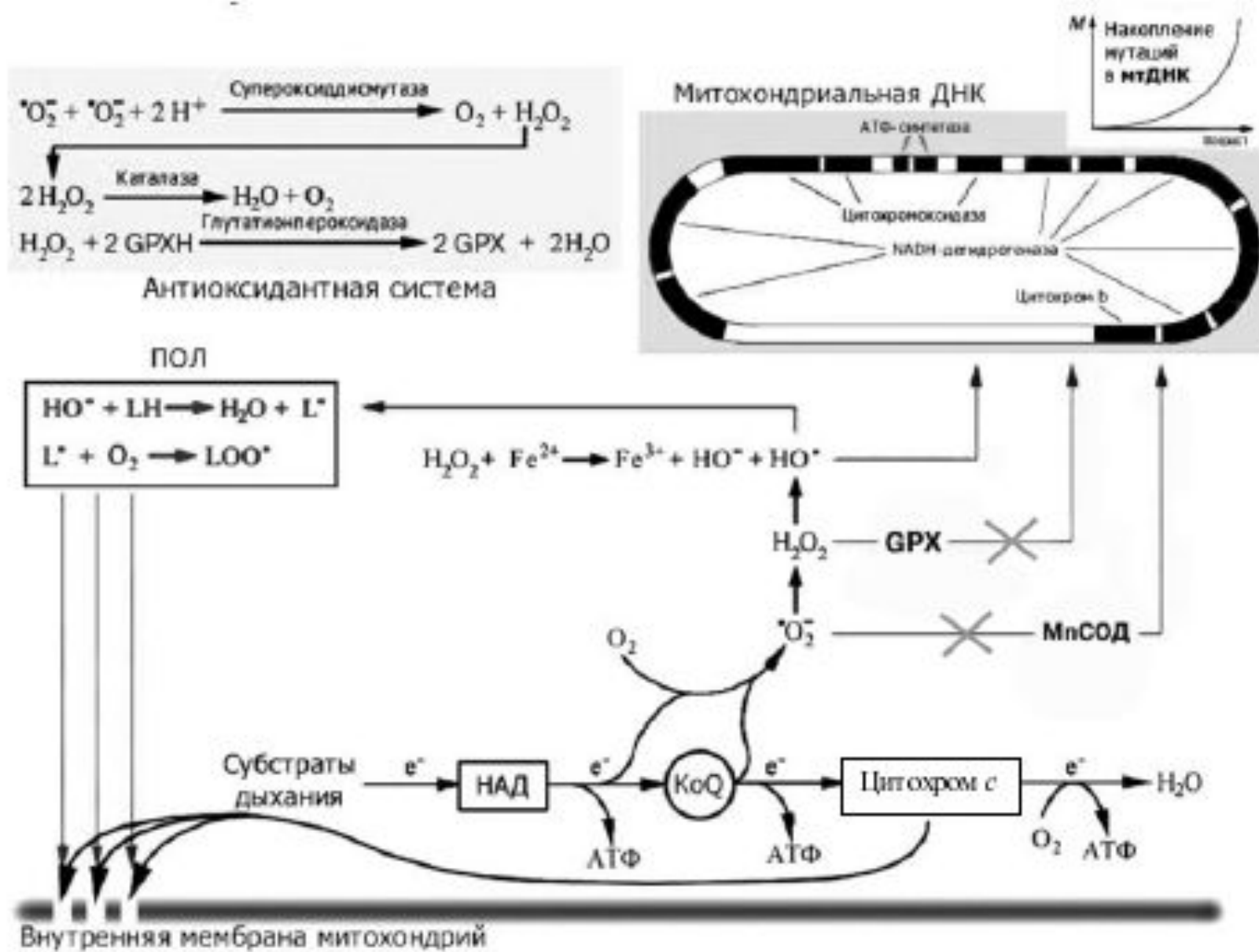
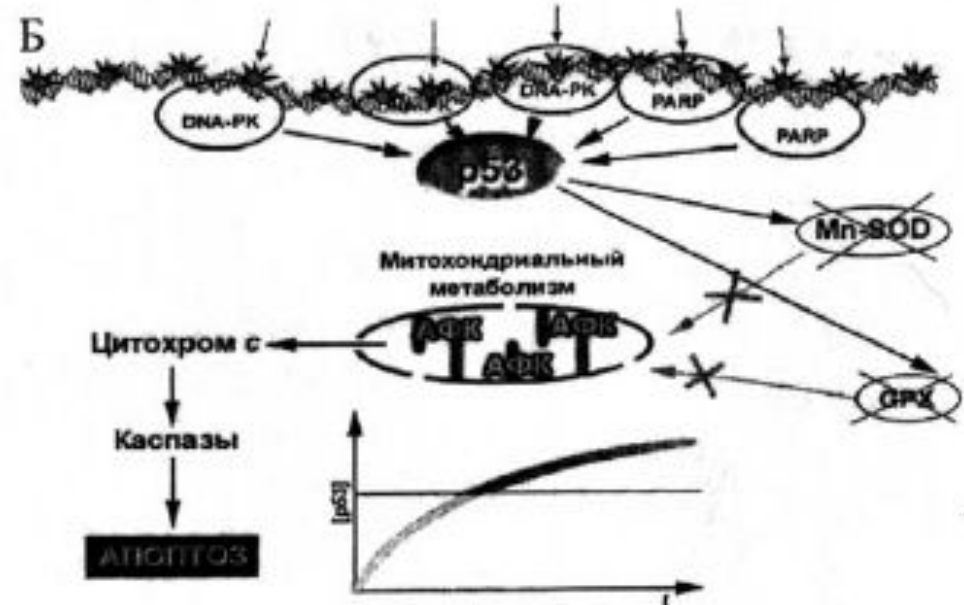
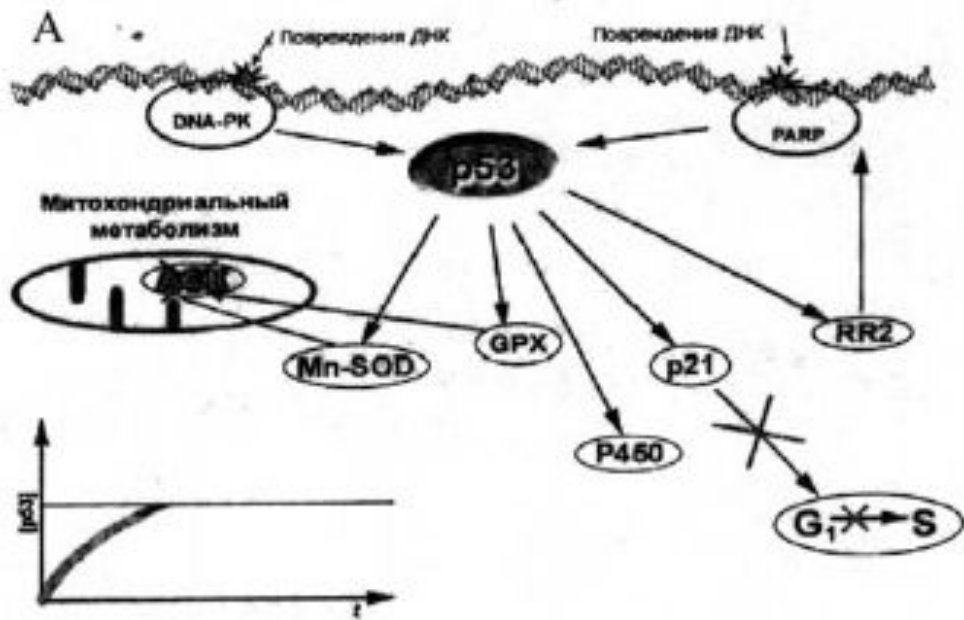


Рис. 3. Пути митохондриального метаболизма:

окислительное фосфорилирование, продукция активных форм кислорода ($\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , HO^{\cdot}), ферментативная антиоксидантная защита (MnСОД, глутатионпероксидаза GPX), пероксидное окисление липидов (ПОЛ), мутагенез мтДНК (его экспоненциальный рост с возрастом), некоторые элементы апоптоза, опосредованные митохондриями.



А — при низком уровне поражений ДНК невысокий уровень активности поли(АДФ-рибозо)полимеразы-1 (PARP) и ДНК-зависимой протеинкиназы (DNA-PK) индуцирует невысокий уровень активности p53. В этих условиях p53 оптимизирует функцию защитных механизмов клетки: антиокислительных — марганцевой супероксиддисмутазы (MnSOD) и глутатионпероксидазы (GPX), защиту от ксенобиотиков — изоферментов P-450, систему репарации — изоформу субъединицы рибонуклеотидредуктазы (RR2). Активность всех этих ферментов непосредственно регулируется p53, что обеспечивает стационарный режим функционирования клетки.

Б — при высоко уровне повреждений ДНК сигналы от PARP и DNA-PK стимулируют повышение содержания и активности p53, соответственно происходят ингибирование защитных систем (MnCOД и GPX), резкое увеличение генерации активных форм кислорода (АФК), активация ПОЛ, последующее нарушение структуры митохондриальной мембраны, выход в цитоплазму проапоптозных факторов — цитохрома с, фактора, индуцирующего апоптоз (AIF), и каспазы 3.

Рис. 5. Взаимосвязь p53 с защитными системами клетки

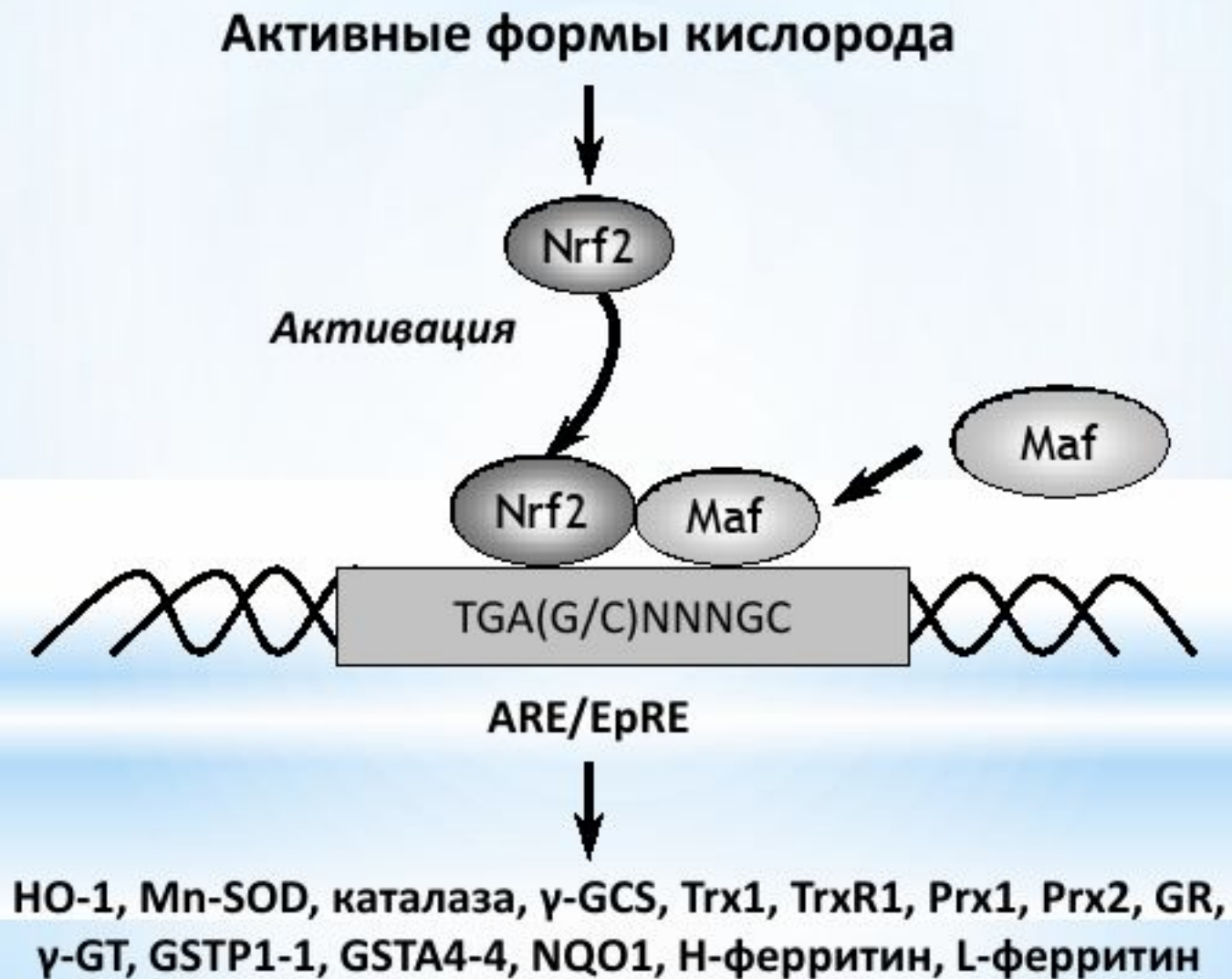
ИСТОЧНИКИ

- ▶ Гармаш С. А. Образование активных форм кислорода под влиянием ионов уранила и их токсическое действие: дис...кандидата биол. наук. ИТЭБ РАН. Пущино - 2013.
- ▶ Гудков С. В. Механизмы образования активных форм кислорода под влиянием физических факторов и их генотоксическое действие: дис...доктора биол. наук. ИТЭБ РАН. Пущино - 2012.
- ▶ Зенков Н.К. Окислительный стресс: биохимический и патофизиологический аспекты. / Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. - М.: МАИК «Наука Интерпериодика», 2001. - 343 с.
- ▶ Меньщикова Е.Б.. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. / Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Круговых Н.Ф., Труфакин В.А. - М.: Слово. - 2006. - 553 с.
- ▶ 42. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З., Бондарь И.А., Труфакин В.А. Окислительный стресс: патологические состояния и заболевания / Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З., Бондарь И.А., Труфакин В.А.; под ред. Е.Б. Меньщиковой. - Новосибирск: АРТА - 2008. - 284 с.
- ▶ Смирнова В. С. Образование 8-оксогуанина и продуктов его окисления в ДНК in vitro по действием тепла, ионов уранила и-излучения : дис...кандидата биол. наук. ИТЭБ РАН. Пущино - 2005.
- ▶ Тодоров И. Н. Митохондрии: окислительный стресс и мутации митохондриальной ДНК в развитии патологий, процессе старения и апоптозе //Российский химический жур нал. - 2007. - Т. 51. - №. 1. - С. 93-106.
- ▶ РОГОВ А. Г. и др. АЛЬТЕРНАТИВНАЯ ОКСИДАЗА: РАСПРОСТРАНЕНИЕ, ИНДУКЦИЯ, СВОЙСТВА, СТРУКТУРА, РЕГУЛЯЦИЯ, ФУНКЦИИ.
- ▶ Пашков А. Н. ОЦЕНКА И КОРРЕКЦИЯ АНТИОКСИДАНТНОГО СТАТУСА И АПОПТОТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ У БОЛЬНЫХ С ДИФFUЗНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ПЕЧЕНИ.
- ▶ Рукша Т. Г., Постникова О. А. ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА КАТАЛАЗЫ НА ИНДУЦИРОВАННЫЙ ОКИСЛИТЕЛЬНЫМ СТРЕССОМ АПОПТОЗ ЛЕЙКОЦИТОВ И КЛЕТОК МЕЛАНОМЫ КОЖИ.
- ▶ БИЛАН Д. С. и др. ОСНОВНЫЕ РЕДОКС-ПАРЫ КЛЕТКИ //БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ. - 2015. - Т. 41. - №. 4. - С. 385.

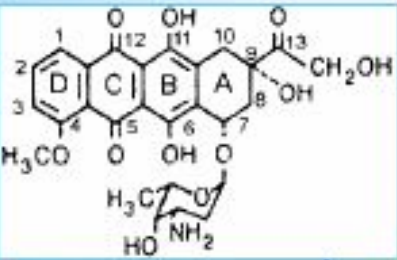
Цитотоксический эффект противоопухолевого препарата **доксорубицина (DOX)** в значительной степени связан с **прооксидантным** действием, обусловленным наличием хинона в его структуре.

При действии ряда флавопротеинов, в том числе NADPH-цитохром P-450-редуктазы, NADH-дегидрогеназы, ксантиноксидазы, катализирующих одноэлектронное восстановление, происходит образование свободнорадикальной семихинонной формы DOX, легко способной к рециклу в присутствии молекулярного кислорода с образованием супероксид-аниона и последующего каскада генерации АФК, включая H_2O_2 и высокореакционноспособные $\cdot OH$ радикалы, образование которых резко ускоряется в присутствии ионов Fe^{2+}

ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ ФАКТОР Nrf2 И АКТИВАЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ АНТИОКСИДАТНЫХ ФЕРМЕНТОВ И ФЕРМЕНТОВ ДЕТОКСИКАЦИИ



Образование АФК в результате редокс-цикла доксорубина



доксорубин

