

# **Активированные кислородные метаболиты (АКМ)**

Классификация, пути образования АКМ в  
организме

**«Количество свободного кислорода служит химической  
мерой живого вещества». В.И. Вернадский**

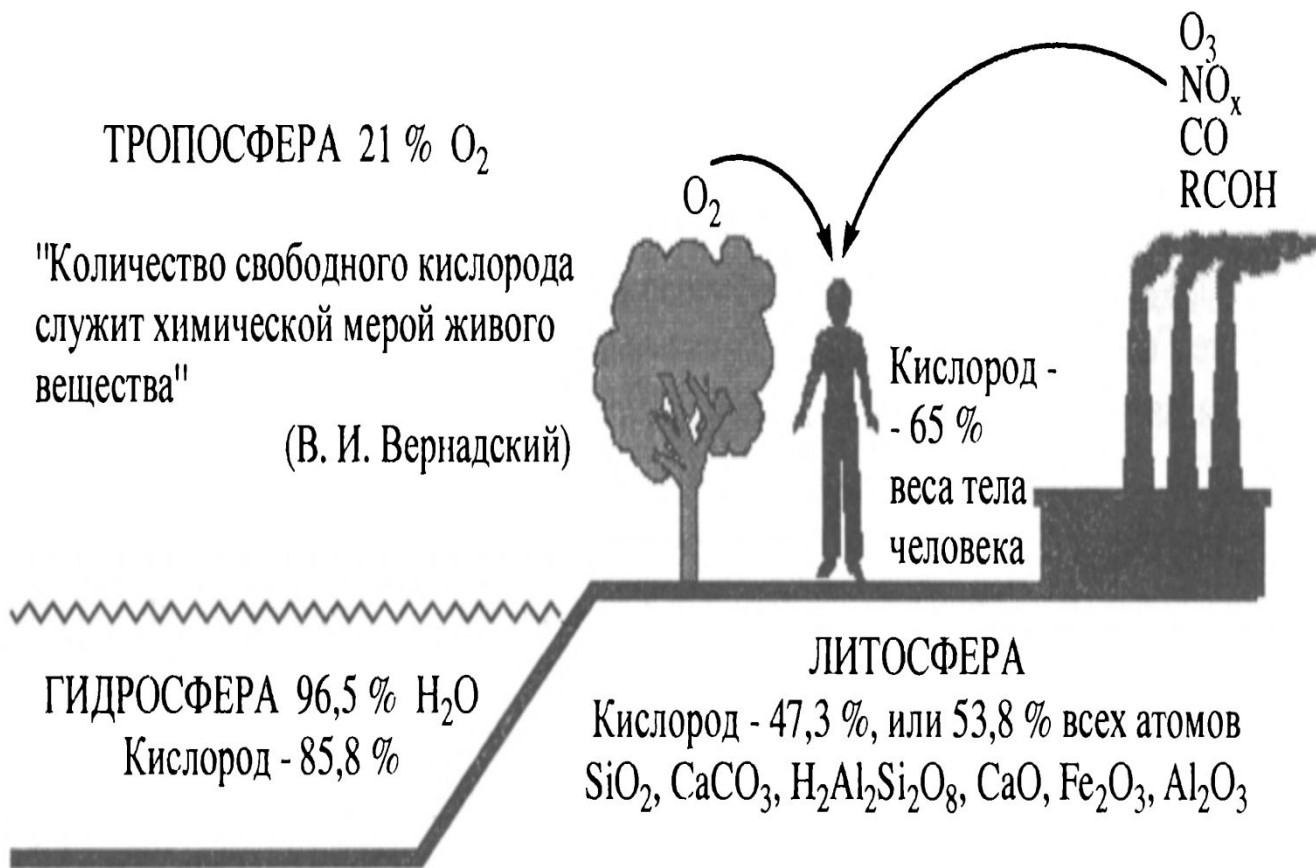


Рис. 1. Распределение кислорода в биосфере

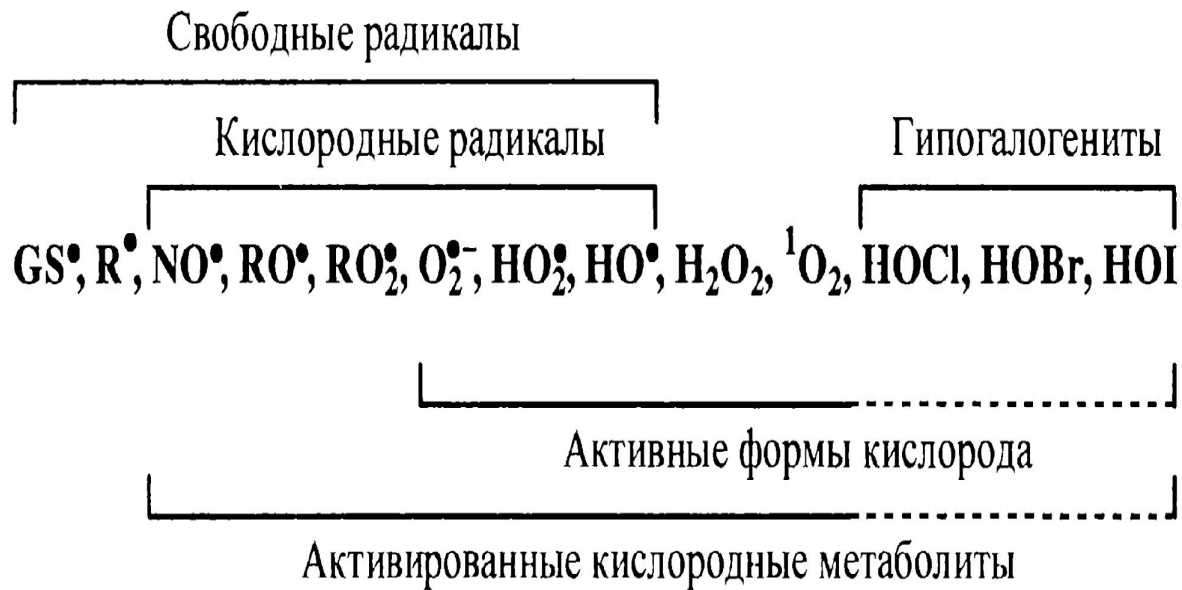


Рис. 2. Активированные кислородные метаболиты, активные формы кислорода и радикалы

**АКМ – высокорреакционные, 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.**

**Это широкий класс кислородных соединений радикальной и нерадикальной природы**

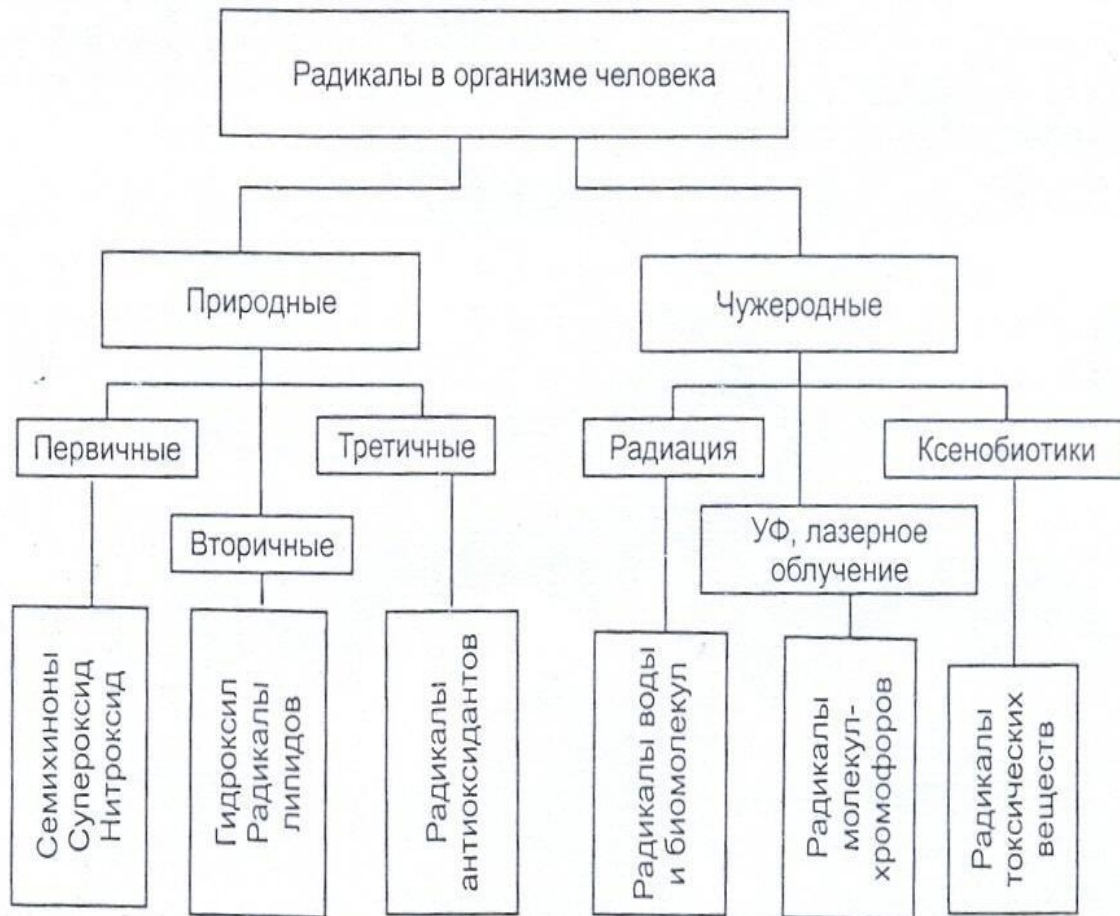
Выявлено от 300 до 800 различных органических радикалов: радикалы липидов, белков, низкомолекулярных пептидов, нуклеиновых кислот, фенолов, неорганических молекул ( $\text{NO}^\bullet$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\text{HO}_2^\bullet$ ,  $\text{OH}^\bullet$  и др.).

## Характерные значения времен жизни и радиусов диффузии АКМ в биологических субстратах

Форма АКМ	Время жизни, с	Радиус диффузии, мкм
$^1\text{O}_2(\Sigma)$ - синглетный кислород в ( $\Sigma$ ) состоянии	$10^{-12}$	0
$\text{OH}\cdot$ – гидроксильный радикал	$10^{-9}$	< 0,01
$\text{O}_2\cdot^-$ – супероксидный анион-радикал	$10^{-6}$	0,3
$^1\text{O}_2$ – синглетный кислород в $\Delta g$ состоянии	$10^{-6}$	0,3
$\text{RO}\cdot$ – алкоксильный радикал	$10^{-6}$	Зависит от R
$\text{HO}_2\cdot$ – пергидроксильный радикал	$10^{-3}$	10
$\text{NO}\cdot$ – оксид азота	$10^{-1}$	100
$\text{NO}_2\cdot$ – диоксид азота	$< 10^{-5}$	0,2
$\text{RO}_2\cdot$ – перекисный радикал	$10^2+10^1$	Зависит от R
$\text{ONOOH}$ – пероксинитрит	2	600
$\text{H}_2\text{O}_2$ – перекись водорода	Зависит от наличия каталазы и глутатионпероксидазы	
$\text{HOCl}$ , $\text{HOI}$ , $\text{HOBr}$ , $\text{HOCN}$ – гипогалогенные кислоты	Зависит от субстрата	

**По оценке Х.Эстербауэра, человек за 70 лет жизни потребляет 17 000 кг кислорода, за это время в его организме вырабатывается 800-1 700 кг АКМ. АКМ, образующиеся в процессе нормальной жизнедеятельности животной клетки, индуцируют в ДНК около 10000 повреждений за сутки.**

# Радикалы в организме человека (Владимиров, 1998)



Природные	Первичные	Семихиноны Супероксид Нитроксид
	Вторичные	Гидроксил Радикалы липидов
	Третичные	Радикалы антиоксидантов



**Рис. 1.** Классификация радикалов, образующихся в клетках человека и животных. Зеленым выделены радикалы, полезные для организма, красным – вредные, синим – радикалы антиоксидантов, которые могут быть полезными или вредными в зависимости от условий



# Метаболизм свободных радикалов (Владимиров Ю.А., 1998)

<b>Образование радикалов</b>	<b>Удаление радикалов</b>
<b>Первичные радикалы: <math>O_2^{\cdot-}</math> <math>NO^{\cdot}</math>, <math>CoQ^{\cdot}</math></b>	<b>Восстановители, СОД, гемоглобин, альбумин</b>
<b>Радикалообразующие молекулы: <math>H_2O_2</math>, <math>LOOH</math>, <math>HOCl</math>, ионы <math>Fe^{2+}</math></b>	<b>Каталаза, пероксидаза, глутатионпероксидаза, церулоплазмин, ферритин, комплексоны</b>
<b>Вторичные радикалы: <math>OH^{\cdot}</math>, <math>L^{\cdot}</math>, <math>LO^{\cdot}</math>, <math>LO_2^{\cdot}</math></b>	<b>Ловушки радикалов</b>
<b>Третичные радикалы: радикалы антиоксидантов и др.</b>	<b>Антиоксиданты и ингибиторы свободнорадикальных процессов</b>



# Биологические эффекты АКМ в живых системах

<b>Физиологические эффекты</b>	<b>Патологические эффекты</b>
<b>Трансдукция сигналов в клетке Вторичные мессенджеры (реакции фосфорилирования, регуляция метаболизма кальция и т.д.)</b>	<b>Окислительная модификация биомолекул: ДНК, белков, липидов</b>
<b>Регуляция тонуса сосудов</b>	<b>Нарушение структуры ДНК и мутагенез</b>
<b>Нейромедиация</b>	<b>Канцерогенез</b>
<b>Неспецифическая иммунная защита Фагоцитоз</b>	<b>Старение (стресс-индуцированное)</b>
<b>Регуляция апоптоза</b>	<b>Окислительный стресс и его составляющие: нитрозильный, галогенирующий, карбонильный стрессы</b>
<b>Регуляция экспрессии генов и клеточной пролиферации</b>	<b>Свободнорадикальные патологии и патологические состояния</b>
<b>Мембраногенез</b>	<b>Гемолиз эритроцитов и окисление гемоглобина</b>
<b>Биотрансформация ксенобиотиков</b>	<b>Нарушение структуры и функции биомембран</b>
<b>Старение (репликативное)</b>	<b>Нарушение фолдинга белков и ЭПР-стресс</b>
<b>Синтез биологически активных соединений (простагландинов, лейкотриенов, тромбоксанов)</b>	<b>Нарушение структуры и функции митохондрий, митоптоз</b>
<b>Метаболизм белков, углеводов, липидов, нуклеиновых кислот</b>	<b>Интенсификация апоптоза и некроз при патологических процессах</b>
<b>Синтез биогенных аминов</b>	<b>Стресс различной этиологии</b>

**Окислительный стресс (ОС)** - состояние сдвига динамического равновесия в системе прооксиданты ↔ антиоксиданты в сторону усиления свободнорадикального окисления на фоне напряженности и нарушения согласованности действия компонентов антиоксидантной системы.

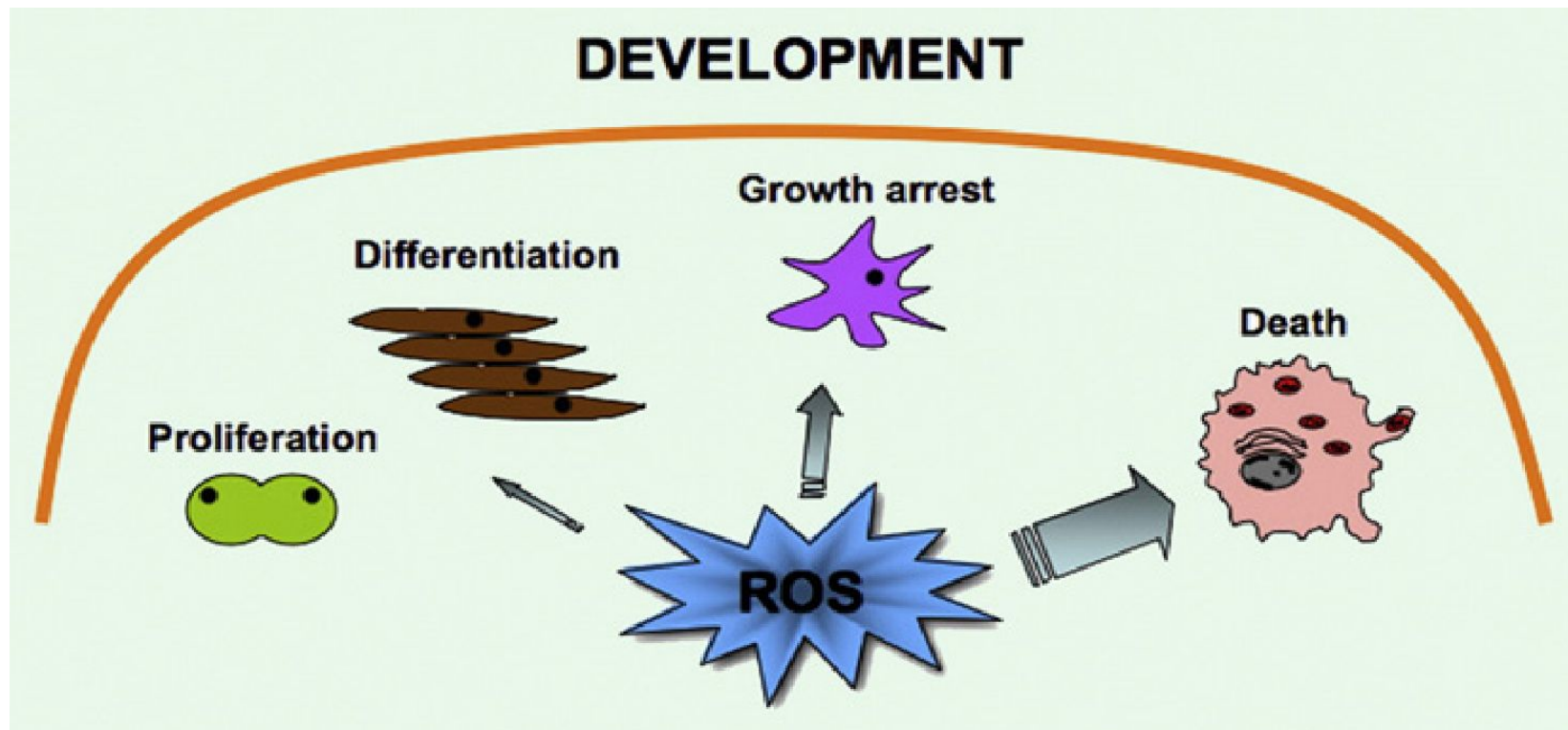
Термин введен Хельмутом Зисом в 1991 г.

В механизмах ОС выделяют:

- собственно ОС (АФК↑);
- нитрозильный стресс (АФА↑);
- галогенирующий стресс (АФГ↑)
- карбонильный стресс (АКС – альдегиды, кетоны ↑)

# Различные уровни АФК индуцируют различные клеточные процессы:

**низкие уровни АФК** являются **сигнальными молекулами**, **митогенами** или **промоторами дифференциации** и **пролиферации**, **высокие уровни АФК** **блокируют рост**, **гиперпродукция АФК** вызывает **ОС**, активирует **апоптоз**



# **Синглетный кислород ( $^1\text{O}_2$ ): пути образования, биологические эффекты**

Важный путь образования  $^1\text{O}_2$  – **фотодинамические реакции** с участием пигментов - сенсibilизаторов.

**Токсичность пигментов и красителей, которая появляется на свету и в присутствии кислорода, называется фотодинамическим действием.** Данный эффект был открыт **Оскар**ом Раабом, студентом профессора **Херманна фон Таппайнера** в Мюнхенском Фармакологическом институте в 1888 г.

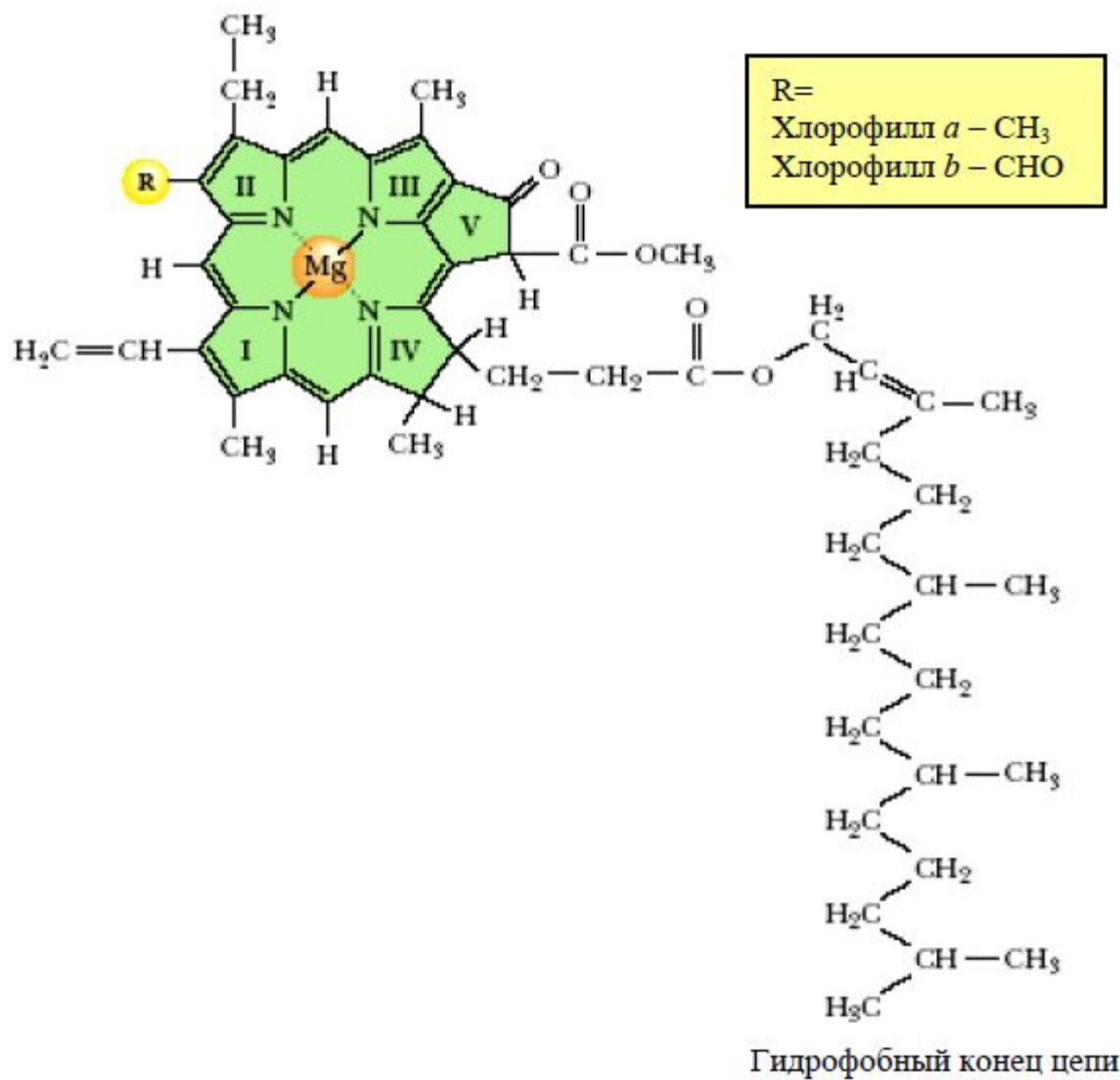
В основе фотодинамического действия лежит явление **фотосенсибилизации**

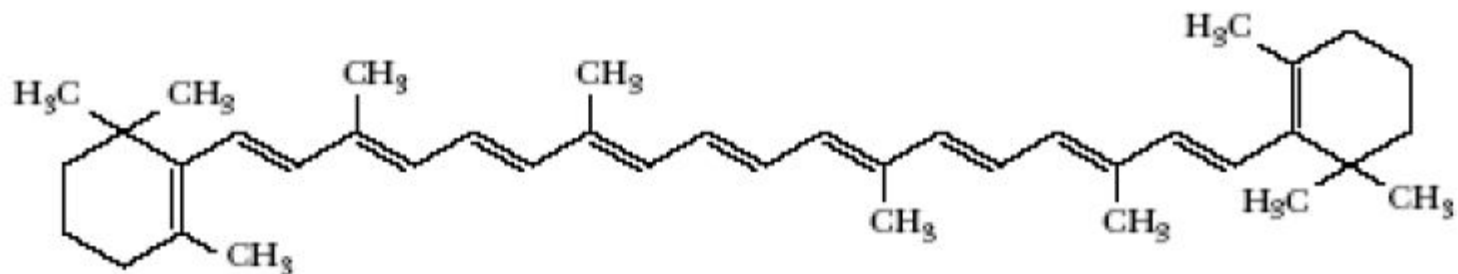
# Схема электронных переходов в молекуле фотосенсибилизатора (ФС).

ФС - это вещества, которые способны "усиливать" действие света за счет передачи его энергии другим веществам и тем самым запускать цепь различных физических и химических процессов.

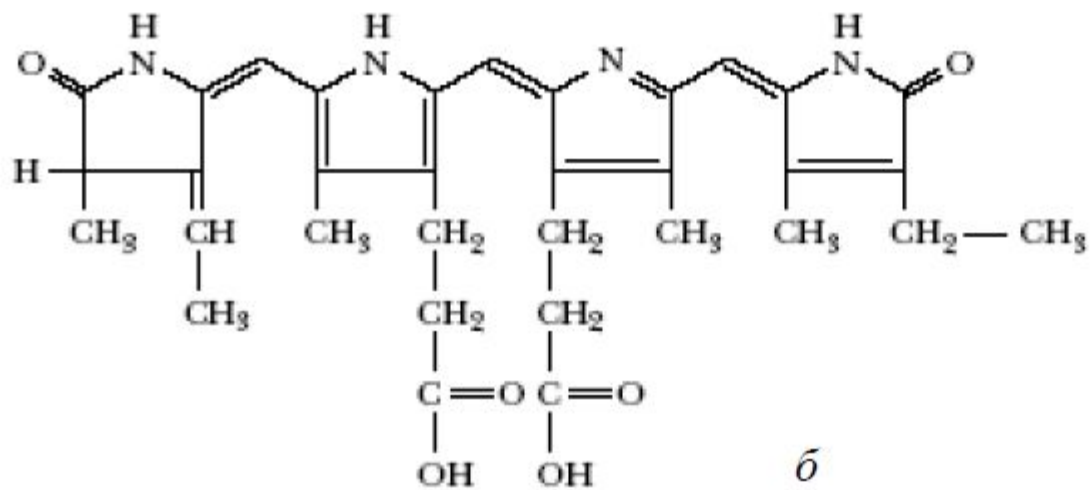








*a*



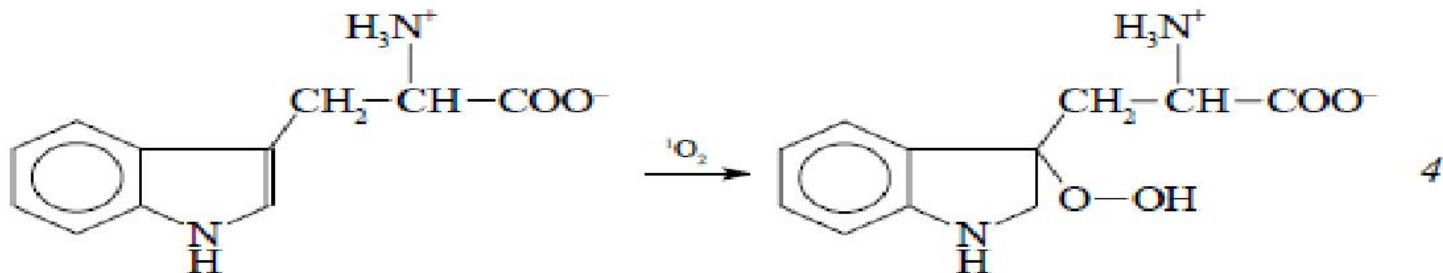
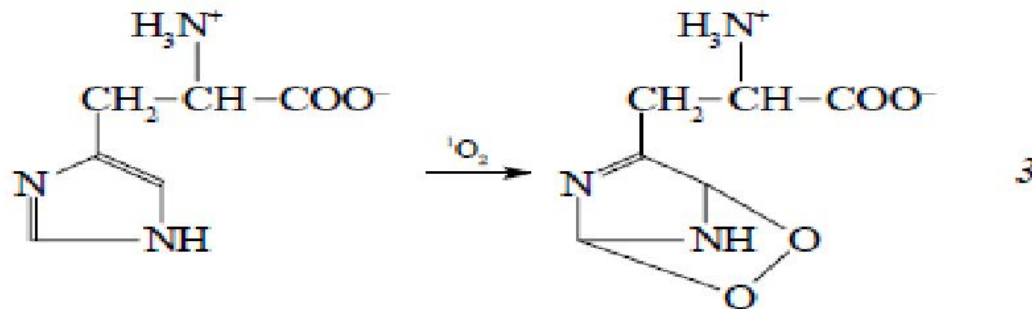
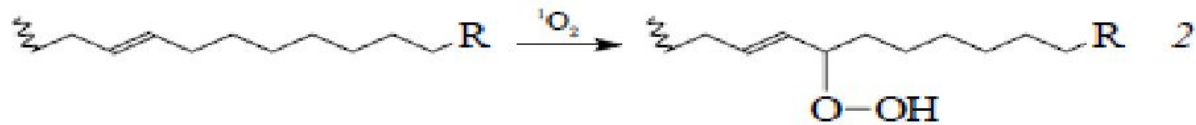
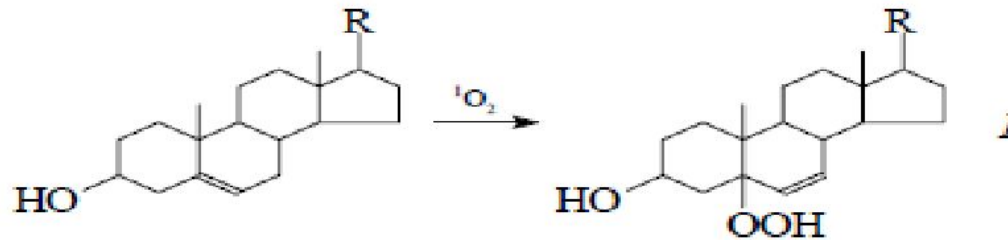
*б*

Рис. 6.11. Структуры представителей вспомогательных пигментов:  
*a* –  $\beta$ -каротин; *б* – фикоцианин

**Простой опыт, демонстрирующий фотодинамическое  
воздействие на микроорганизмы (золотистый  
стафилококк).**



Некоторые реакции  $^1\text{O}_2$  с биомолекулами: окисление холестерина (1), ненасыщенных липидов (2), гистидина (3), триптофана (4).



# Биологическое значение $^1\text{O}_2$

1. Вызывает развитие **фотодинамических болезней** человека, животных, растений (гиперицизм, фагопиризм, порфирии, церкоспороз).
2. Фотодинамическое действие играет важную роль в естественных пигментных системах растений (лазерные гербициды).
3. Создание новых медицинских технологий - **фотодинамическая терапия рака** (Т.Догерти, 1970); **внутривенное лазерное облучение крови (ВЛОК)**.

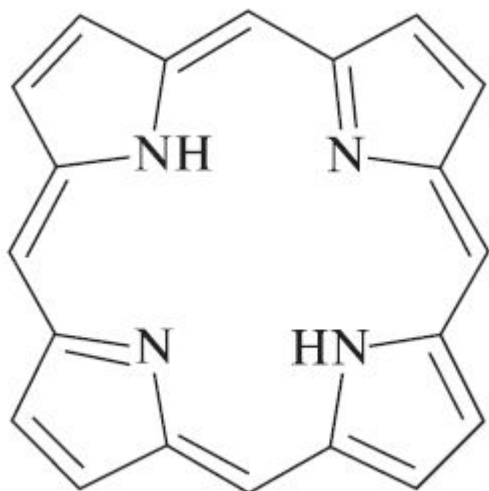
## **Фотодинамические болезни**

**Порфирии** – клинические расстройства, характеризующиеся нарушениями в синтезе гема и сопровождающиеся появлением необычно большого количества фотосенсибилизаторов - порфиринов в крови, тканях и моче.

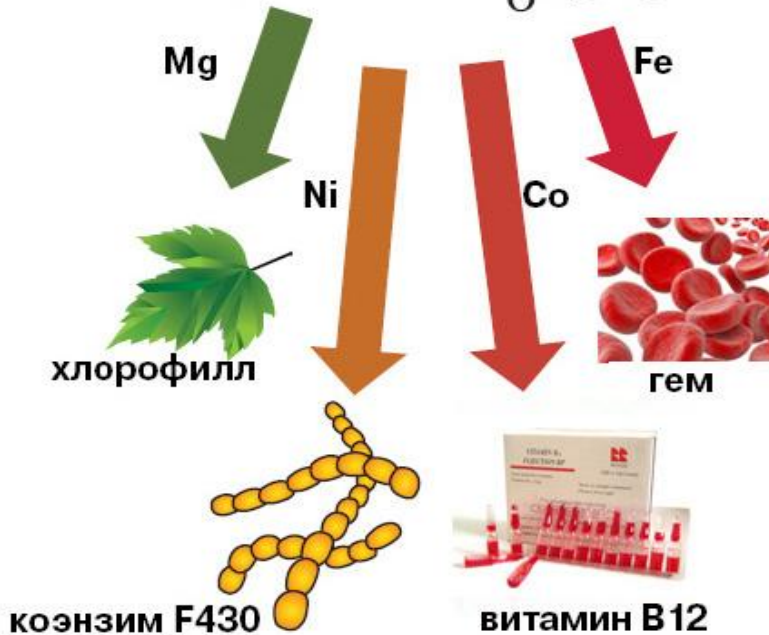
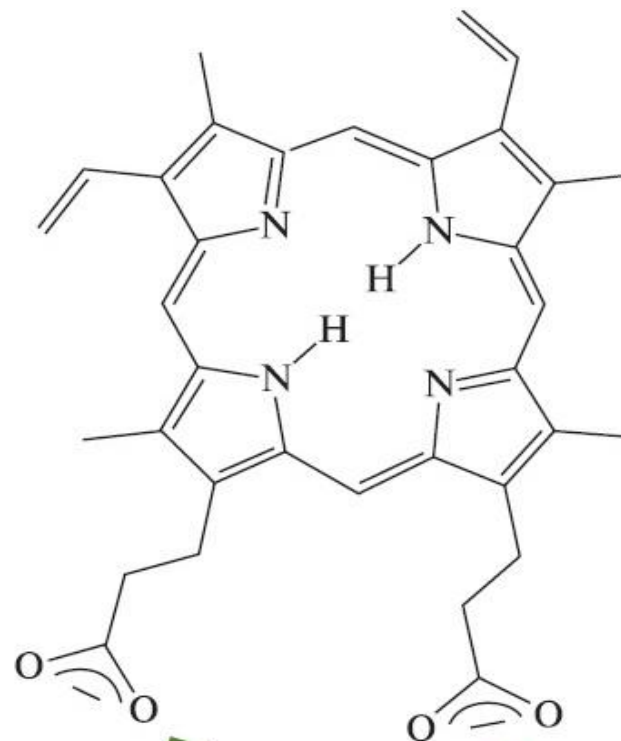
**Промежуточные продукты синтеза гема вызывают большинство симптомов, характерных для порфирии.**

**Важнейшие симптомы:** сверхчувствительность кожи к свету - эритемы, язвы, желудочно-кишечные расстройства, боли, онемения мышц. Некоторые формы порфирии поражают ЦНС (недостаток производного порфирина витамина В<sub>12</sub>), диапазон проявлений: от раздражительности и мрачности до полной психической ненормальности.

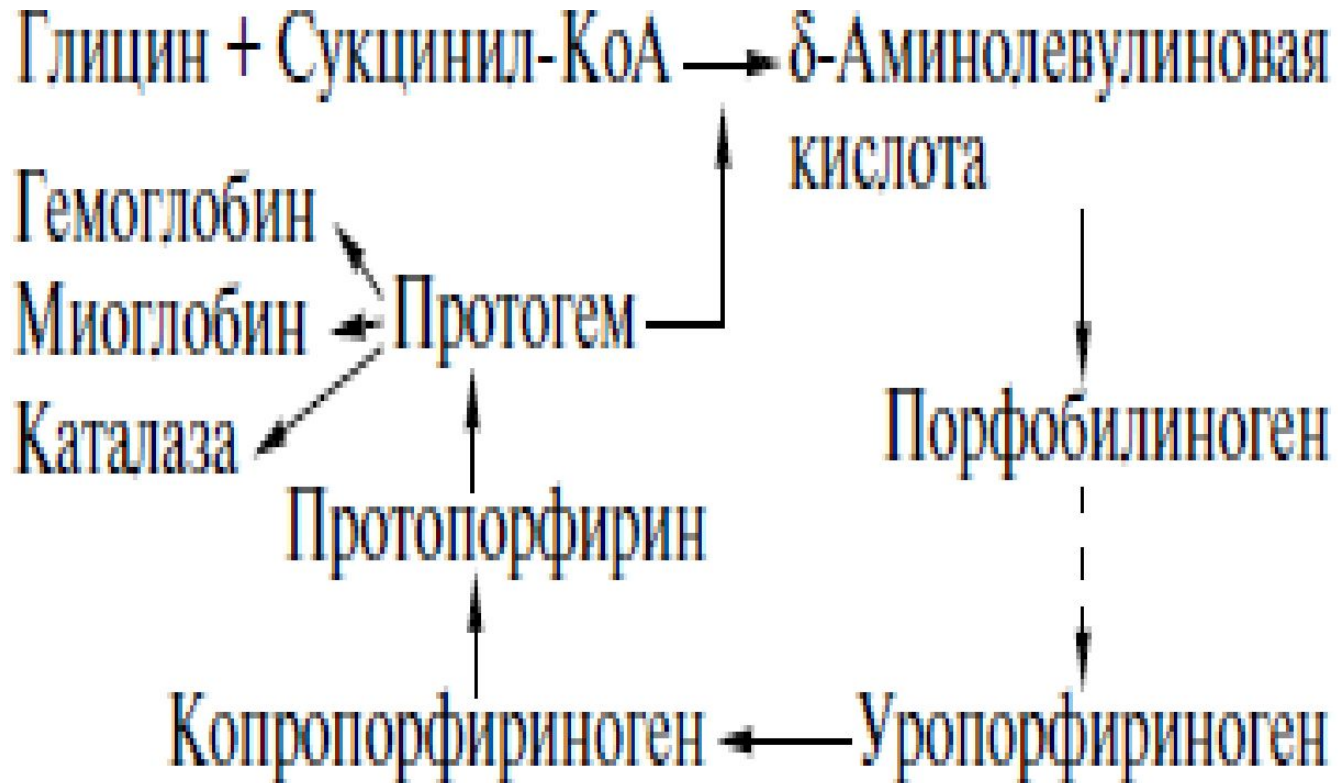
**Порфирины (ПФ)— самые распространенные пигменты в природе. К ним относятся хлорофиллы, гем, ПФ входят в состав цитохромов и других ферментов**



**протопорфирин**

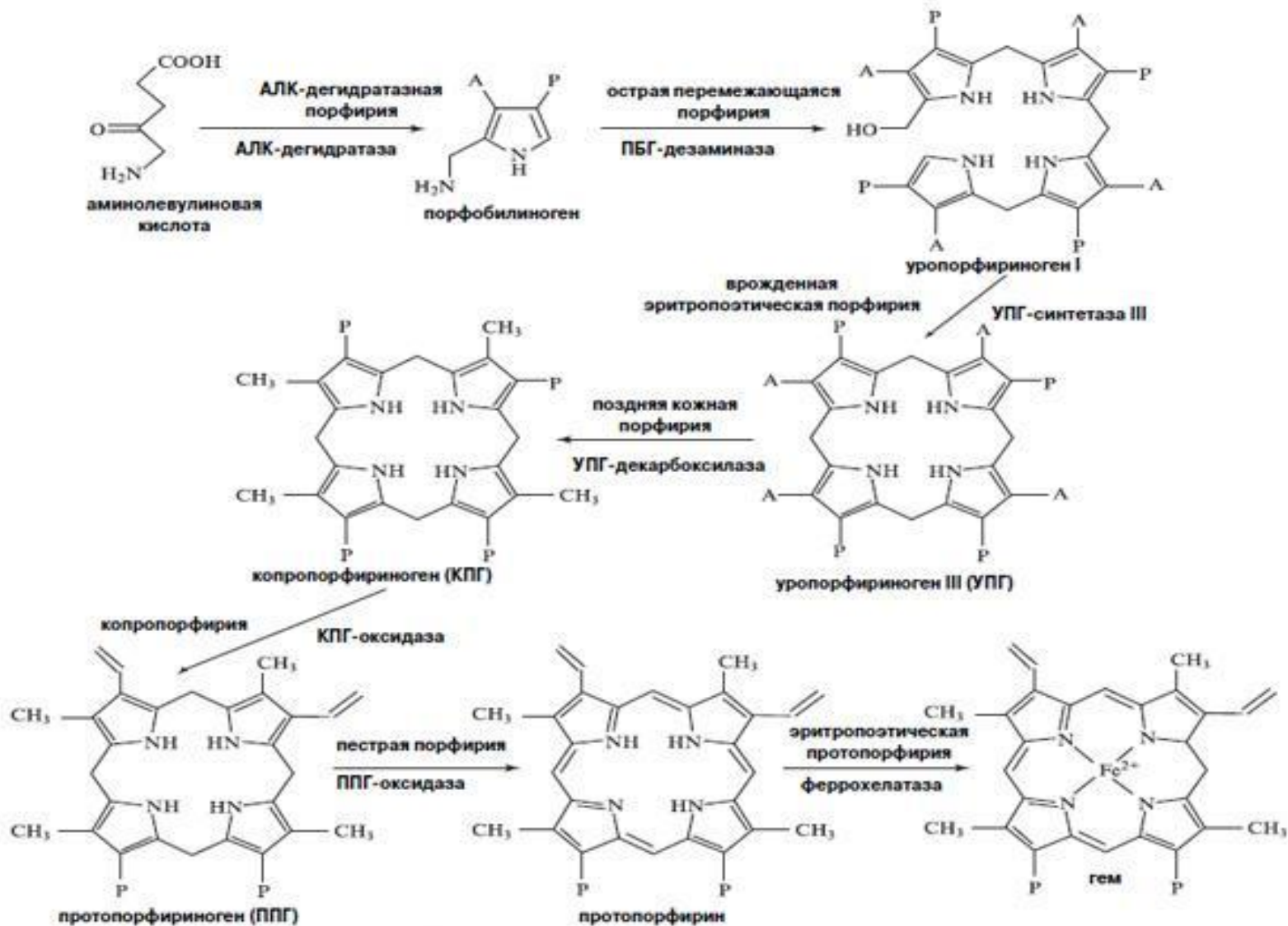


# Схема синтеза порфиринов

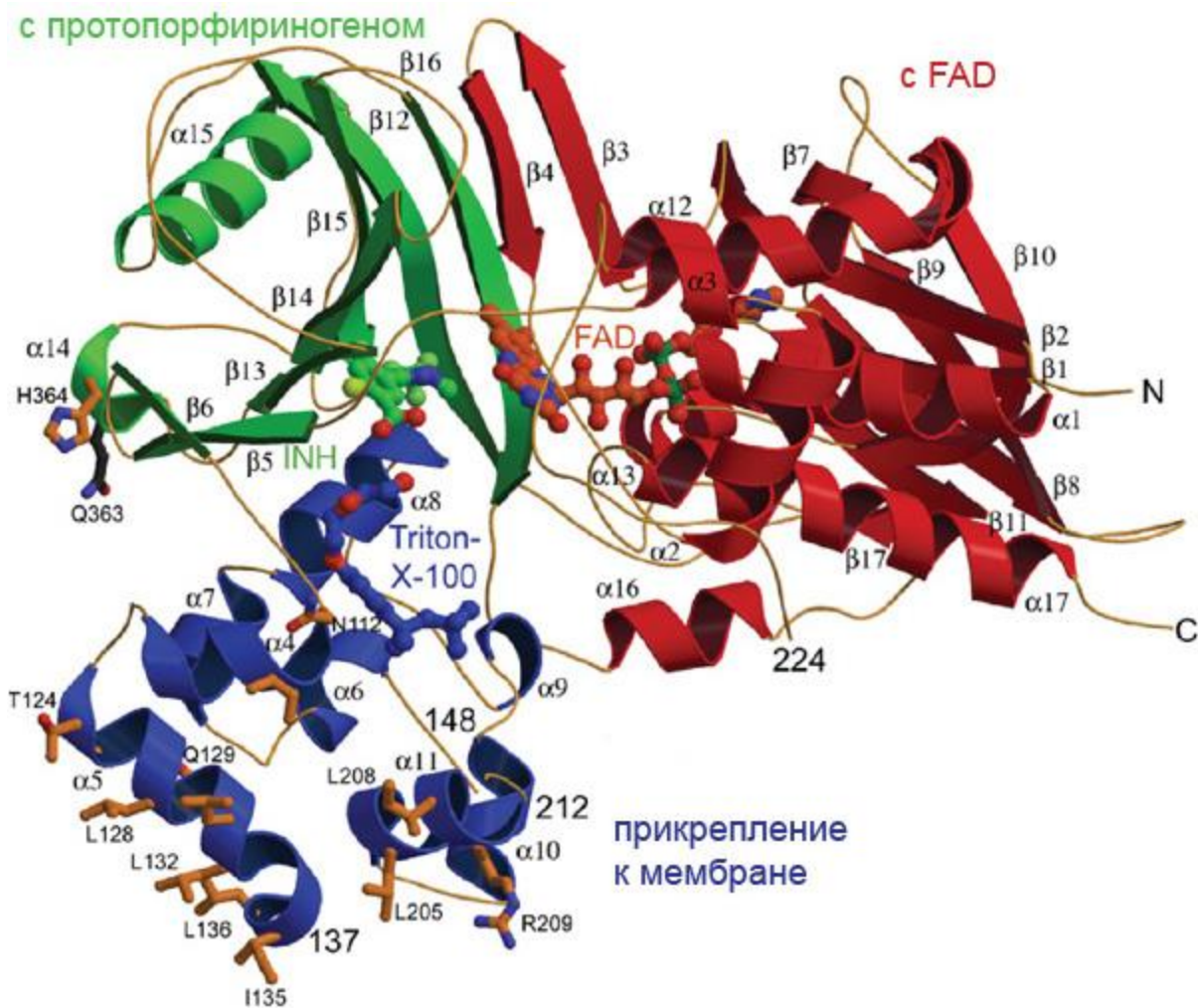




# Цикл образования порфирина. Нарушение любой из стадий вызывают определенную форму порфирии.



# Фермент протопорфириногенаоксидаза (ППО-оксидаза) – катализирует отщепление 6 протонов от протопорфиногена с образованием протопорфина



По мнению канадского врача Дэвида Долфина, люди, которых считали вампирами или оборотнями, могли страдать именно этим редким заболеванием.

*«...попробуйте представить, как в Средние века воспринимали того, кто выходил на улицу только по ночам, а вид его напоминал звериный — повышенная волосатость, крупные зубы, обезображенное лицо. Предполагается (и это более чем вероятно), что таких людей вполне могли считать вампирами и оборотнями.»*

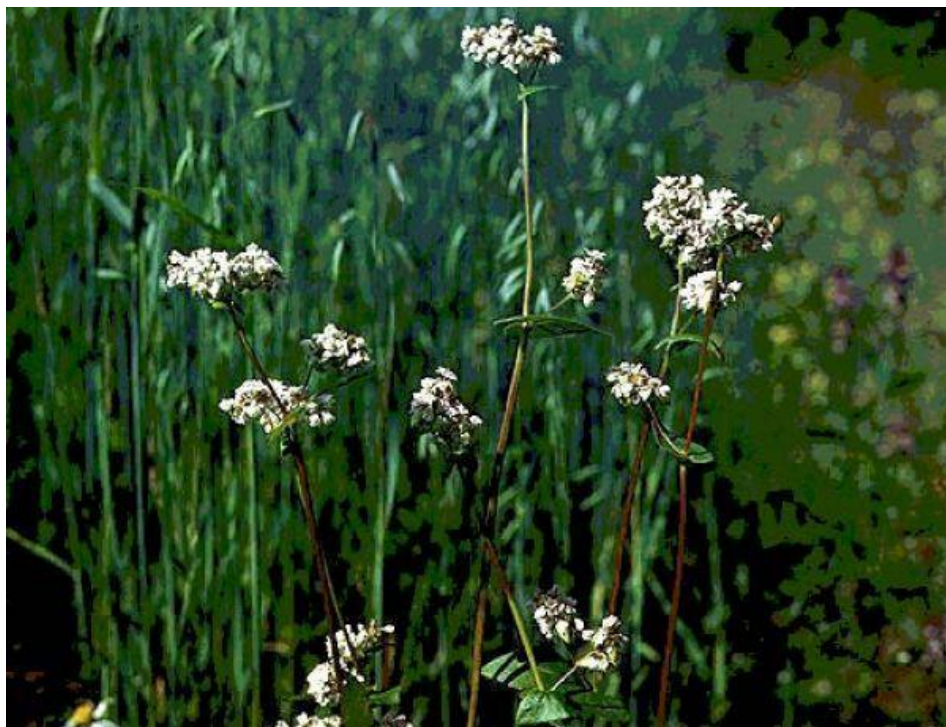
Основной путь снижения клинических проявлений фотосенсибилизации больных различными формами порфирии — **защита от солнечного облучения**. Эффективным средством является **делагил**, образующий комплекс с порфиринами кожи и выводящий их с мочой, а также **антиоксиданты**, которые акцептируют синглетный кислород и другие АФК.



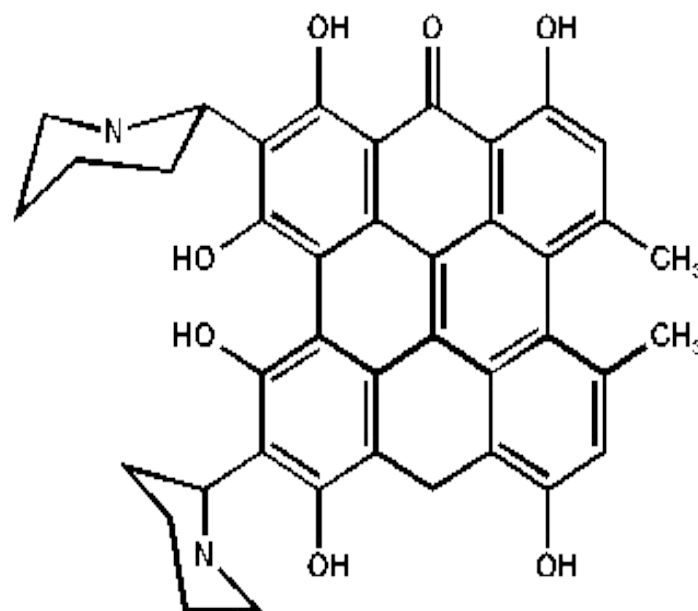
Зверобой содержит **гиперицин** - вещество, повышающее чувствительность кожи к видимому свету и ультрафиолетовым лучам, вызывает заболевание животных **гиперицизм**



Препарат зверобоя - **новоиманин**, содержащий конденсированные антраценопроизводные, обладает высокой антибактериальной активностью.



Гречиха содержит **фагопирин** - пигмент, повышающий чувствительность кожи к видимому свету и ультрафиолетовым лучам, вызывает заболевание животных **фагопиризм**



**Фагопирин**



**Церкоспороз листьев (сероватая пятнистость)**

# **Фотодинамическая терапия (ФДТ) – новый способ лечения некоторых видов рака - активно развивается во многих странах мира**

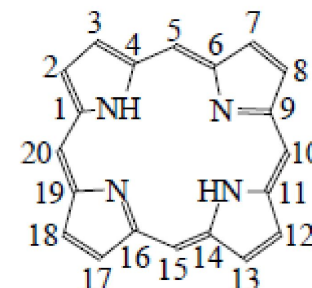
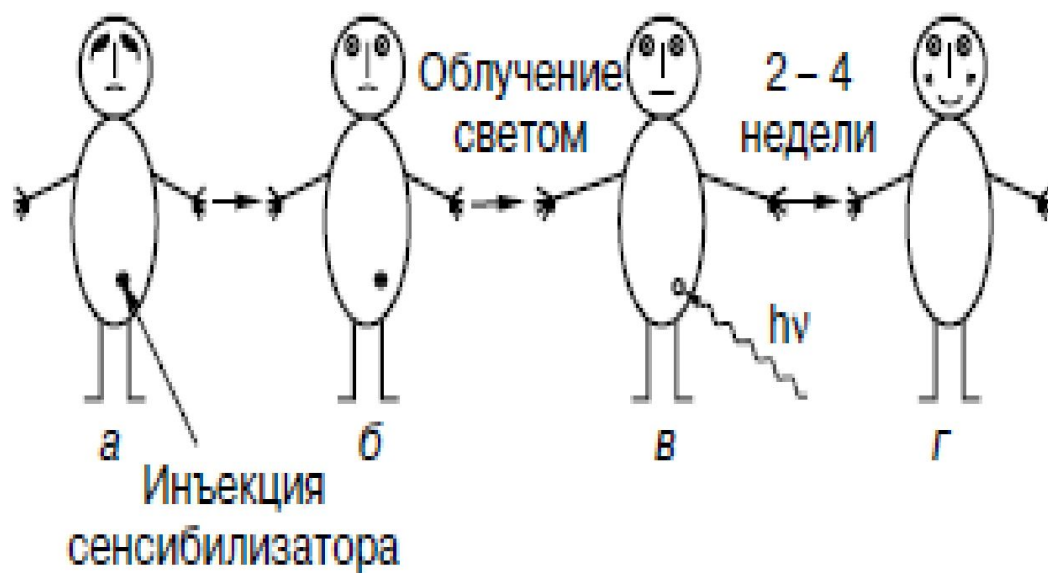
**Принцип метода:** опухолевые клетки разрушаются под действием активных форм кислорода, которые образуются в фотохимической реакции **фотосенсибилизации**.

**Необходимые условия ФДТ :**

- свет** определенной длины волны,
- Фотосенсибилизатор (ФС)**, избирательно накапливающийся в опухолевых клетках,
- **кислород**.

ФС переносит энергию света на кислород, благодаря чему последний переходит в возбужденное **синглетное состояние** и вызывает разрушение опухолевых клеток.

# Основные этапы фотодинамической терапии рака.





## Основные механизмы фотодинамической терапии

1

Селективное накопление фотосенсибилизатора в клетках опухоли



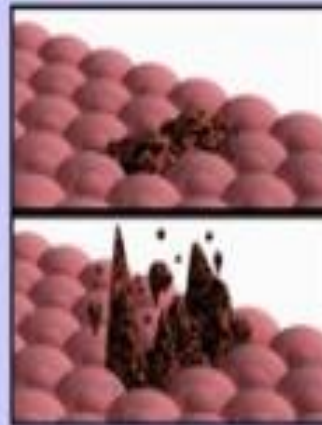
2

Низкоинтенсивное лазерное облучение

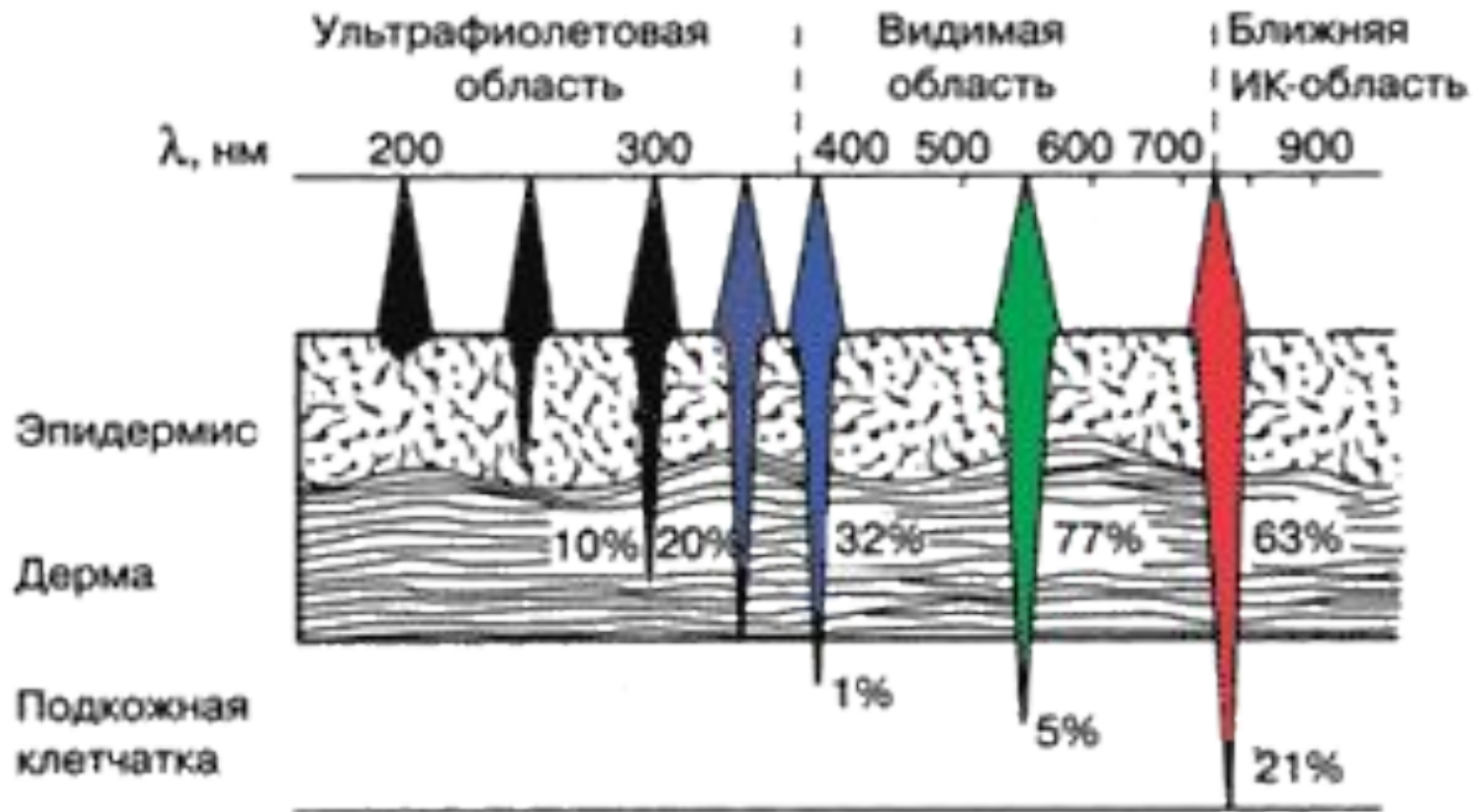


3

Селективное разрушение опухоли с максимальным сохранением окружающих здоровых тканей



# Проницаемость кожи для света разных длин волн.



## Чувствительность злокачественных опухолей к фотодинамической терапии (включая полную и частичную регрессию)



## Лазерные гербициды

Первый гербицид, который содержал ингибитор протопорфириногенаксидазы (ППГ-оксидазы) — **нитрофен**, — появился в 1964 году.



Гербициды, ингибирующие ППГ-оксидазу, вызывают у сорняков обесцвечивание листьев и обезвоживание

Угнетение ППГ-оксидазы вызывает неконтролируемое накопление протопорфириногена, который в растениях проходит через мембрану хлоропласта в цитоплазму, где и превращается в крайне светочувствительный протопорфирин, который на свету образует активный **синглетный кислород**, вызывающий ПОЛ мембраны и ее повреждение. Механизм действия лазерных гербицидов был открыт в 80-ые годы Мишелем Матринжем и соавт.

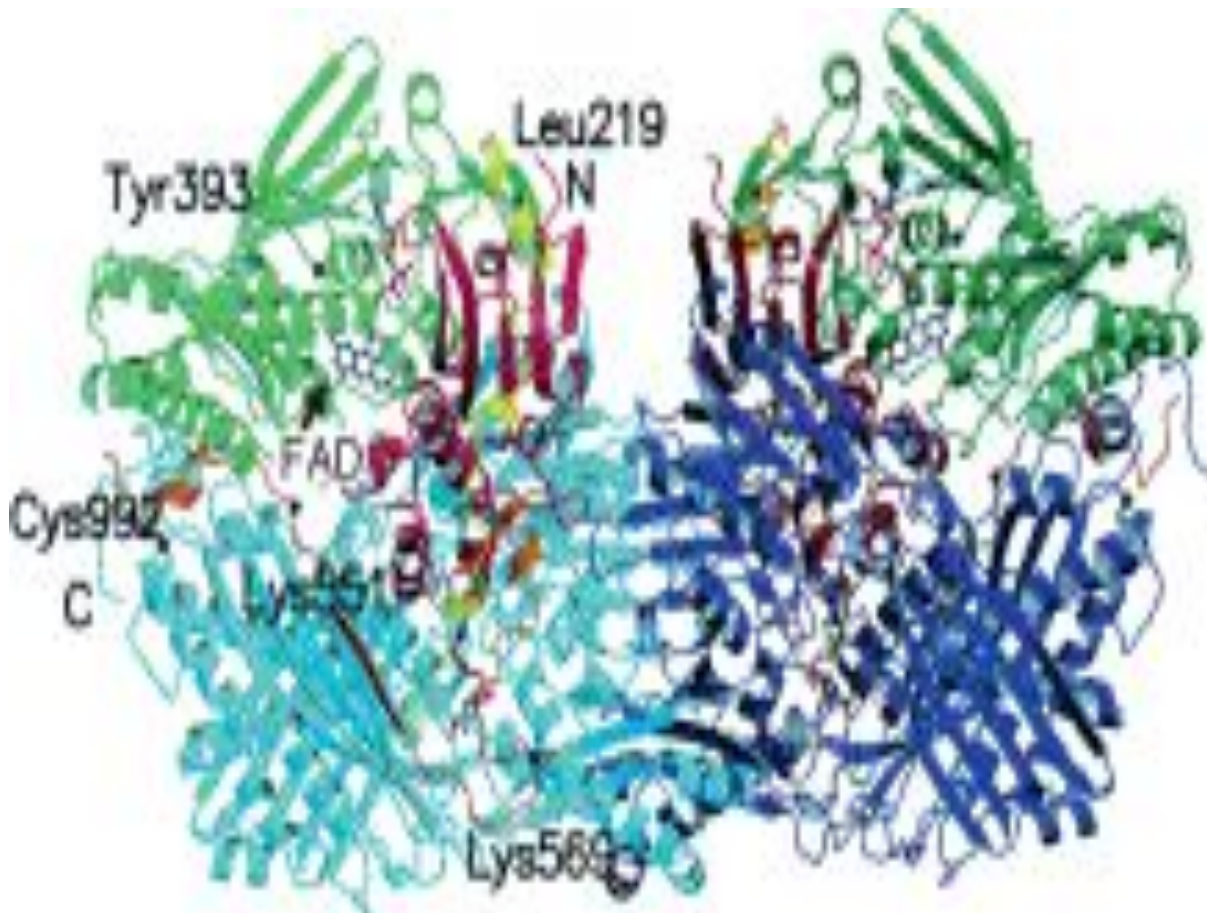
**Супероксидный анион-радикал ( $O_2^{\cdot-}$ ):  
пути образования, биологические  
эффекты**

# **Пути образования супероксидного анион-радикала**

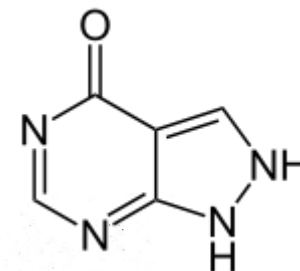
- 1) Аутоокисление биомолекул (гемоглобина, тиоловых соединений, катехоламинов, биоптеринов).**
- 2) Окислительно-восстановительные реакции, катализируемые металлофлавопротеинами (ксантиноксидоредуктаза, оксидазы аминокислот).**
- 3) Электрон-транспортные цепи: а) митохондрий, б) микросом.**
- 4) НАДФН-оксидаза**
- 5) Арахидоновый каскад**

## Окислительно-восстановительные реакции, катализируемые металлофлавопротеинами.

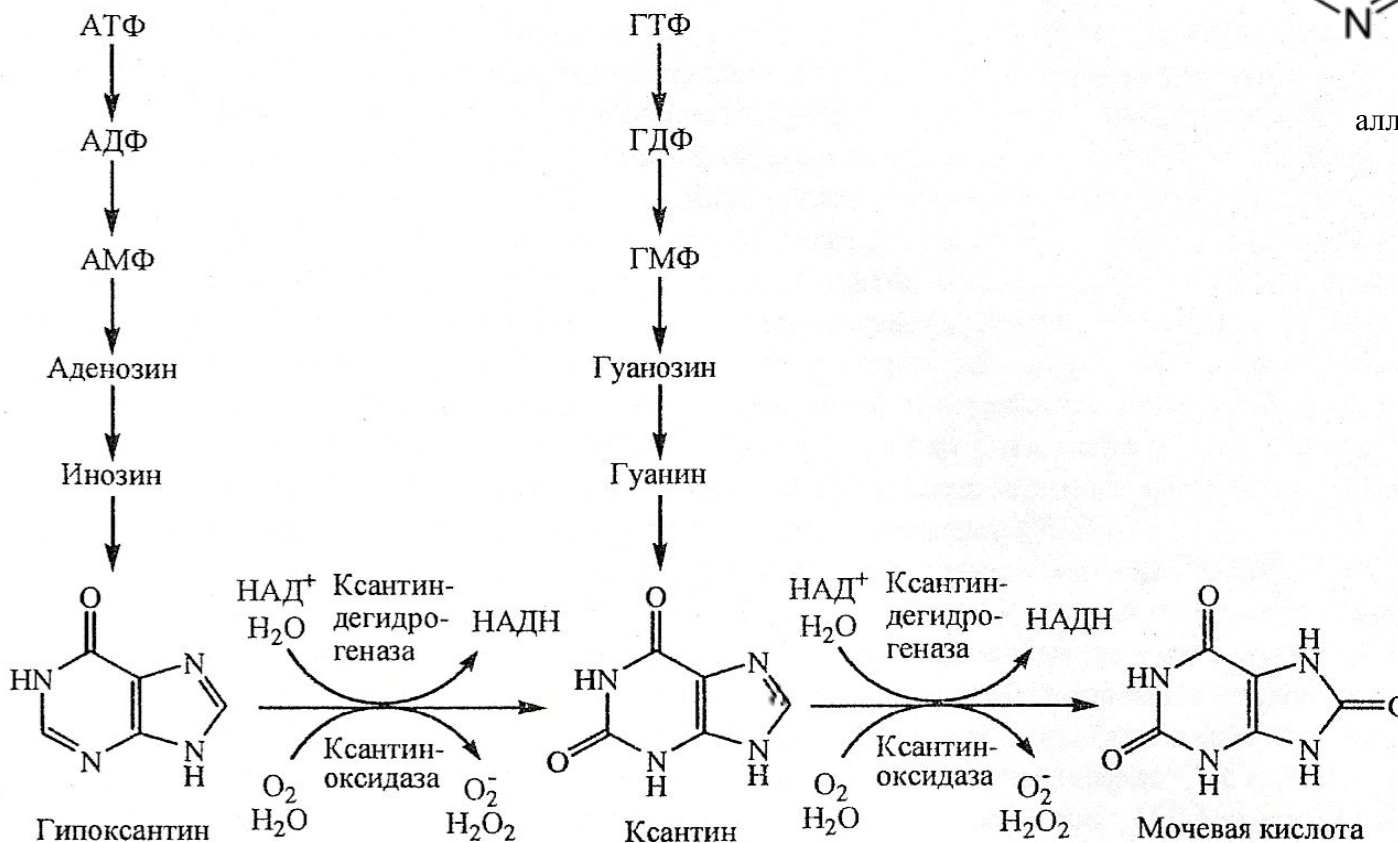
Ксантиноксидоредуктаза (КОР) – это группа из двух близких по структуре  $\text{Mo}^{6+}$  - и  $\text{Fe}^{2+}$  - содержащих изоферментов (КД $\leftrightarrow$ КО) класса оксидоредуктаз



# Схема катаболизма пуринов, катализируемого ксантиноксидоредуктазой



аллопуринол





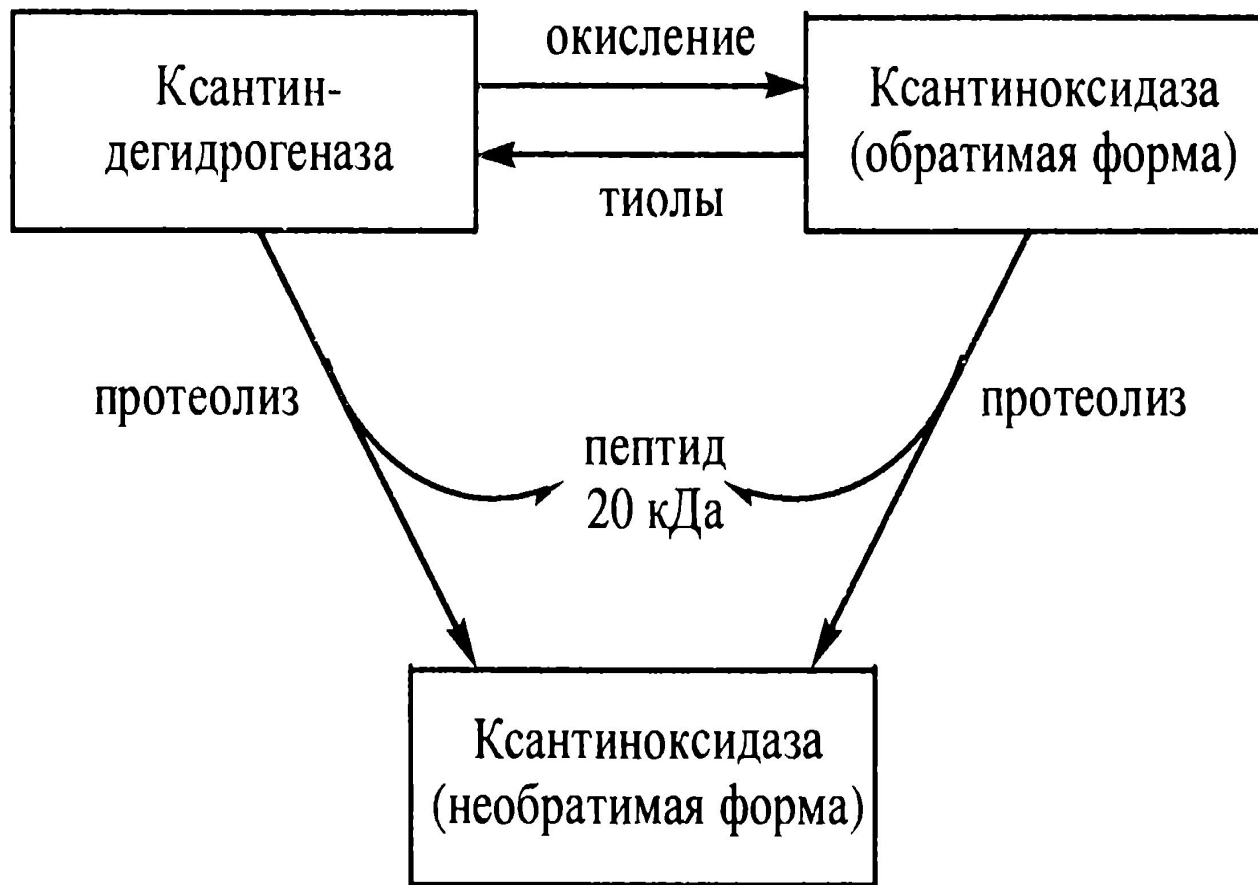
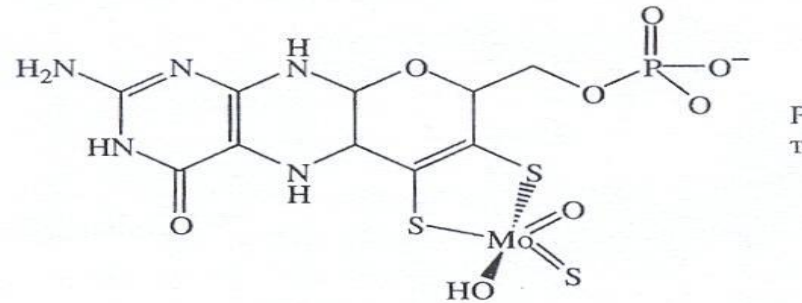
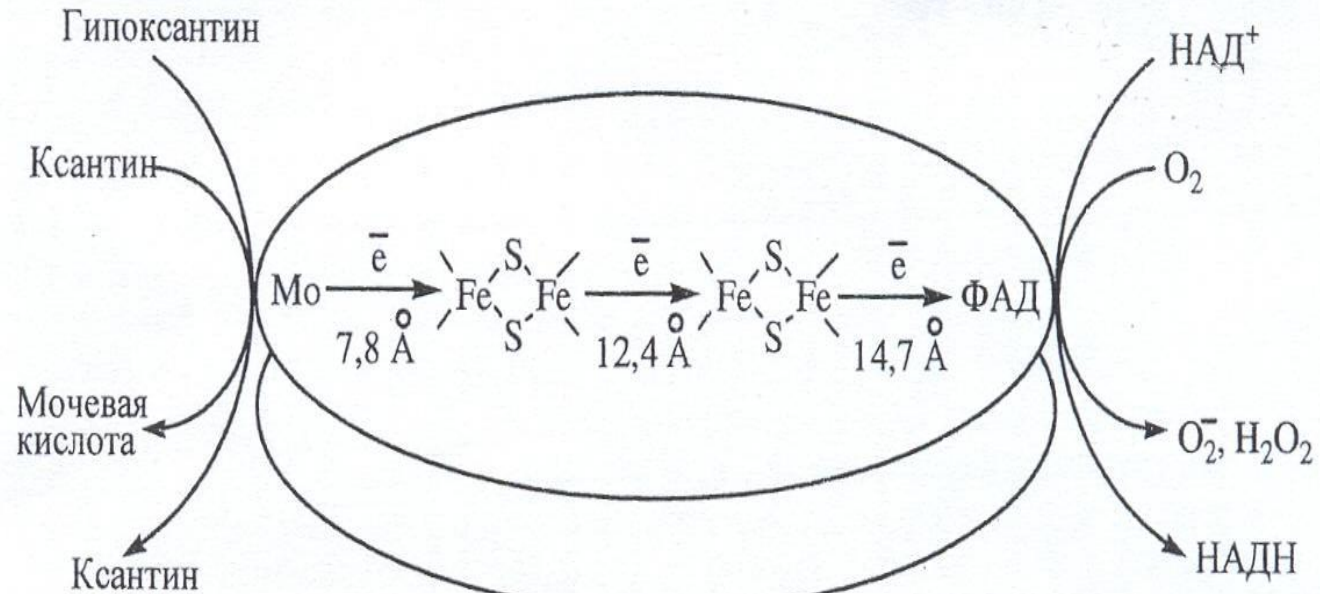


Рис. 14. Взаимопревращения изоформ ксантинооксидоредуктазы

# Схема функционирования ксантиноксидоредуктазы

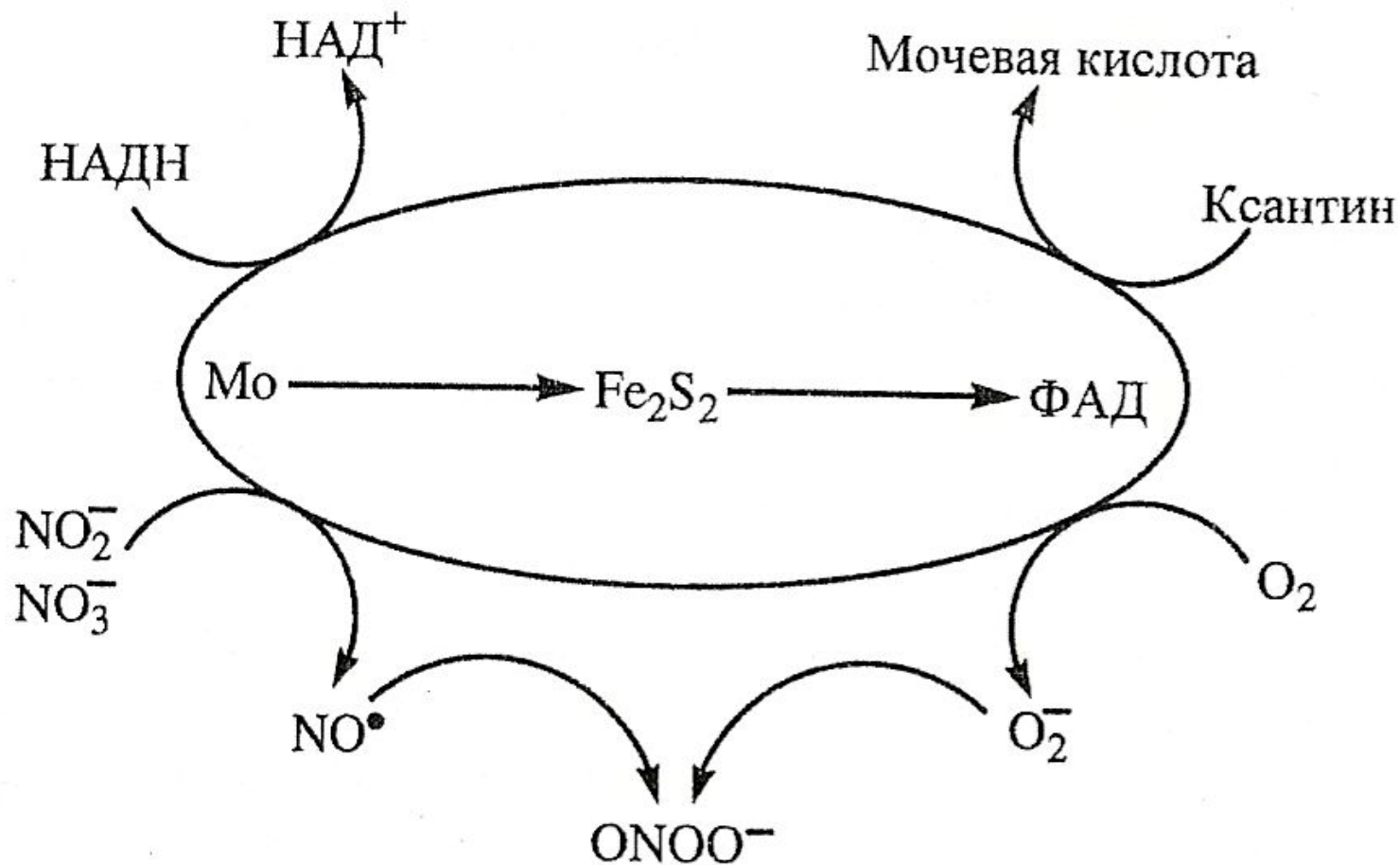


молибденовый кофактор

# Структура КОР

- КО – гомодимер, молекулярная масса субъединицы 150 кДа, а димера – 300 кДа.
- Каждая субъединица содержит **3 домена**, связанные со специфическими кофакторами. **Н-концевой домен** содержит два  $\text{Fe}_2\text{S}_2$  центра, связанные с четырьмя остатками цистеина. **Промежуточный домен** содержит карман для ФАД, а **С-концевой домен** имеет молибденовый кофактор в форме молибденоптерина.
- В состав КОР в расчёте на каждый мономер входит также одна **надсульфидная группа (—S—SH)**, которая, возможно, и служит для связывания молибдена. При этом птерин и надсульфидная группа не принимают непосредственного участия в каталитическом акте. Белковая часть фермента богата **цистеином** и содержит **60–62 свободные SH-группы**.
- Ксантин и гипоксантин **окисляются на Мо-фрагменте**, где  $\text{Mo}^{6+}$  восстанавливается до  $\text{Mo}^{4+}$ , затем электроны через  $\text{Fe}_2\text{S}_2$  центры переносятся на ФАД, а с ФАД-фрагмента на  $\text{НАД}^+$  или  $\text{O}_2$ , в зависимости от изоформы.

# Схема синтеза NO и ONOO<sup>-</sup> под действием КОР



# Регуляция активности КОР

## Индукторы КОР:

- интерферон
- молибдат

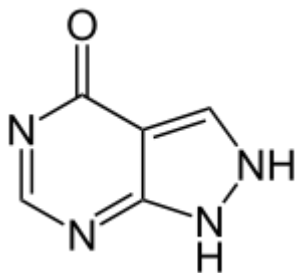
## Активаторы КОР:

- аскорбат
- глутатион
- дитиотреитол

## Конкурентные ингибиторы КОР:

- вольфрамат
- аллопуринол
- 6-меркаптопурин
- кофеин

**Аллопуринол** является неселективным ингибитором КОР, под действием которой аллопуринол превращается в оксипуринол, неокисляемый аналог ксантина.

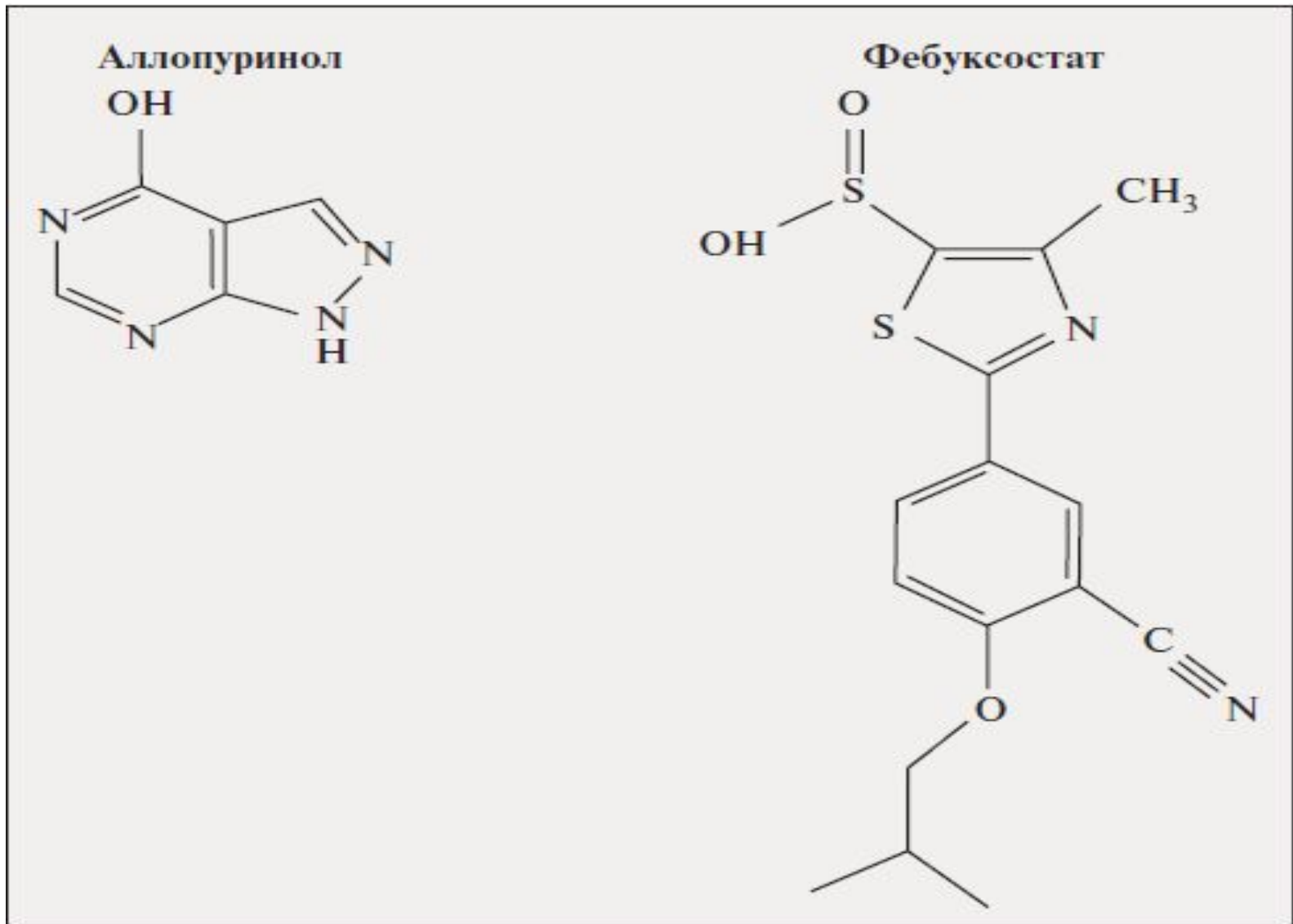


аллопуринол

**Аллопуринол** — лекарственный препарат, используемый в основном при лечении **гиперурикемии** (повышенном уровне мочевой кислоты в крови) и её осложнений, таких как **подагра**.

**Пода́гра** (греч. *ποδάγρα* — ножной капкан) — заболевание, которое характеризуется отложением в различных тканях организма кристаллов **уратов** или **мочевой кислоты**. В основе возникновения лежит **накопление мочевой кислоты** и уменьшение её выведения почками, что приводит к гиперурикемии. Клинически подагра проявляется рецидивирующим острым **артритом** и образованием подагрических узлов — **тофусов**.





**Рис. 1.** Молекулярная структура аллопуринола и фебуксостата

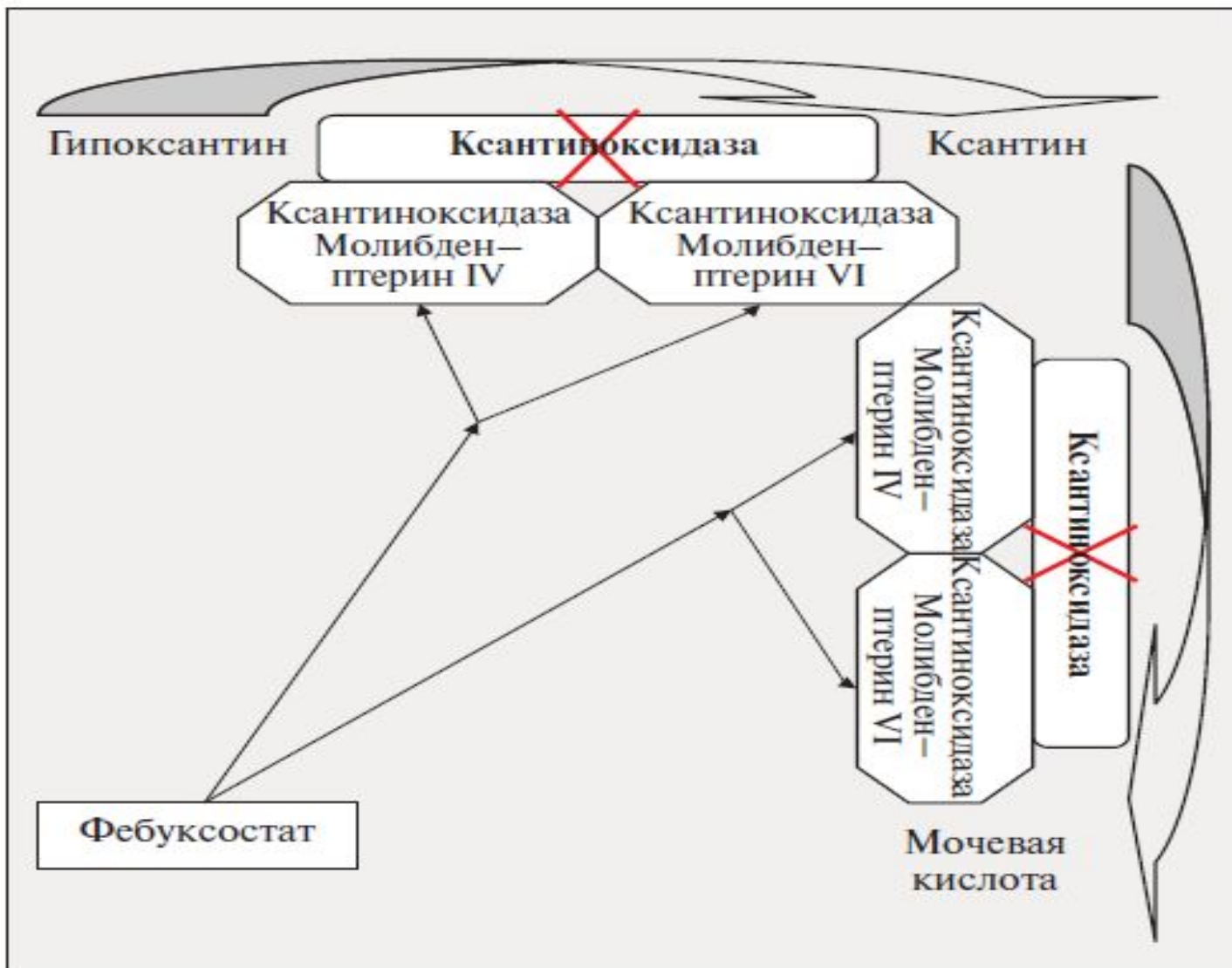


Рис. 2. Схема действия фебуксостата



# Сравнение ингибирующего действия аллопуринола и фебуксостата

<b>Аллопуринол</b>	<b>Фебуксостат</b>
<b>Производное пурина (структурный аналог гипоксантина)</b>	<b>Непуриновая структура</b>
<b>Связывается только с восстановленной формой КОР (Mo IV)</b>	<b>Связывается с обеими формами КОР (Mo IV, Mo VI)</b>
<b>Неселективный ингибитор КОР</b>	<b>Селективный ингибитор КОР</b>
<b>Образует слабые связи с КОР, которая быстро реактивируется</b>	<b>Образует прочные связи с ферментом, ингибирование длительное</b>

# **Биологическая роль ксантиноксидоредуктазы**

**1 Генерация АКМ посредством КО-реакции играет важную роль при различных процессах:**

- метаболизме железа;**
- регуляции тонуса сосудов;**
- клеточной пролиферации;**
- апоптозе;**
- обеспечении бактерицидного потенциала молока.**

**2) Антимикробная роль КОР в обеспечении врожденного иммунитета**

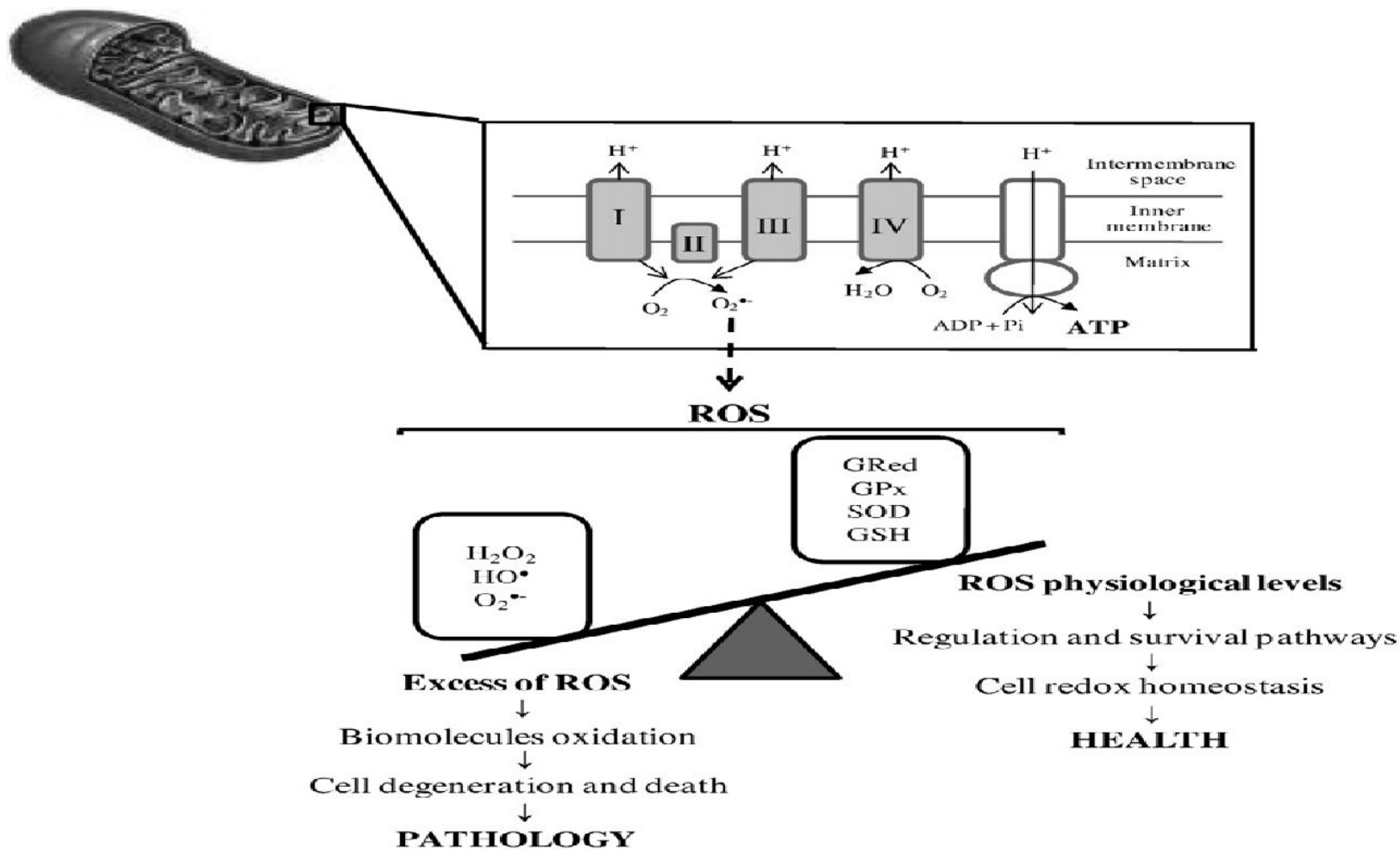
**3) Антиоксидантная роль (источник мочевой кислоты)**

**4) КО – молекулярный переключатель, регулирующий тонус сосудов и адгезию лейкоцитов к эндотелию.**

**5) Супероксид, образующийся в КО-реакции, предшественник других форм АКМ.**

# ЭТЦ митохондрий – источник АФК.

Два лика митохондрий как «силовых станций клетки»  
и важнейших продуцентов АФК



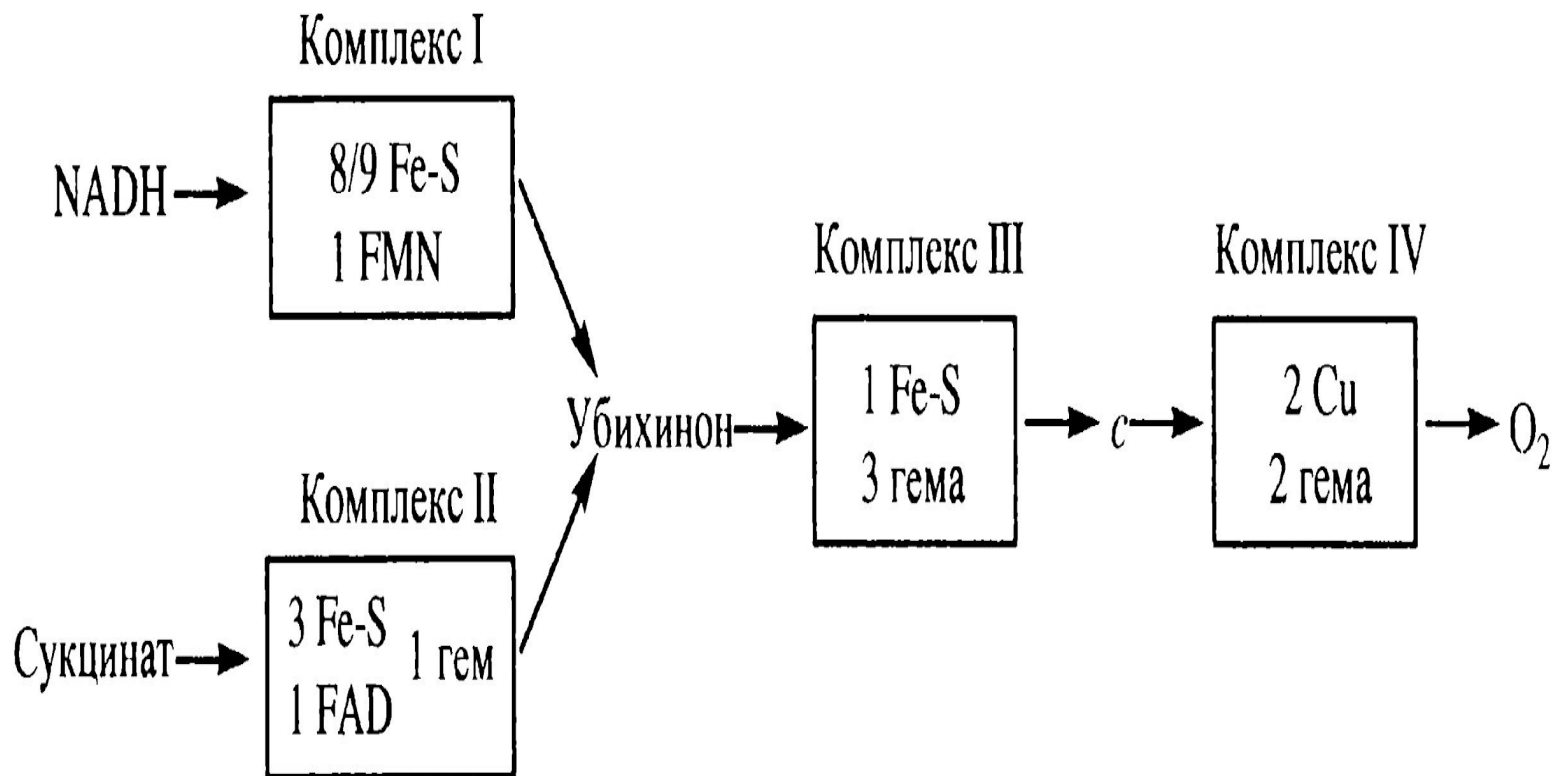
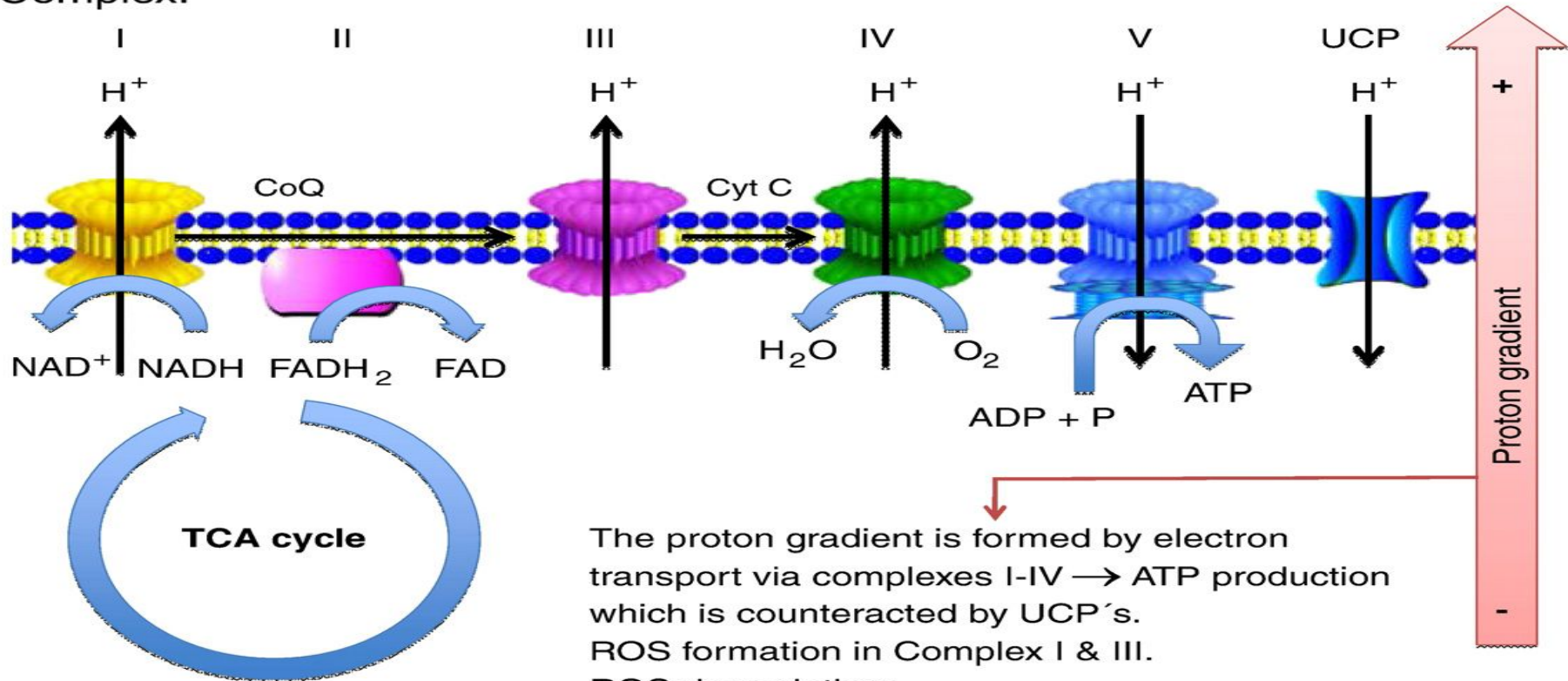


Рис. 19. Электронтранспортная цепь митохондрий

# Роль ЭТЦ митохондрий в образовании супероксидного анион-радикала

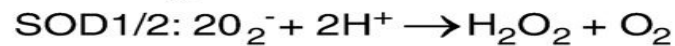
Complex:



The proton gradient is formed by electron transport via complexes I-IV → ATP production which is counteracted by UCP's.

ROS formation in Complex I & III.

ROS degradation:



# Сайты генерации супероксида в ЭТЦ митохондрий (открыто 9 сайтов).

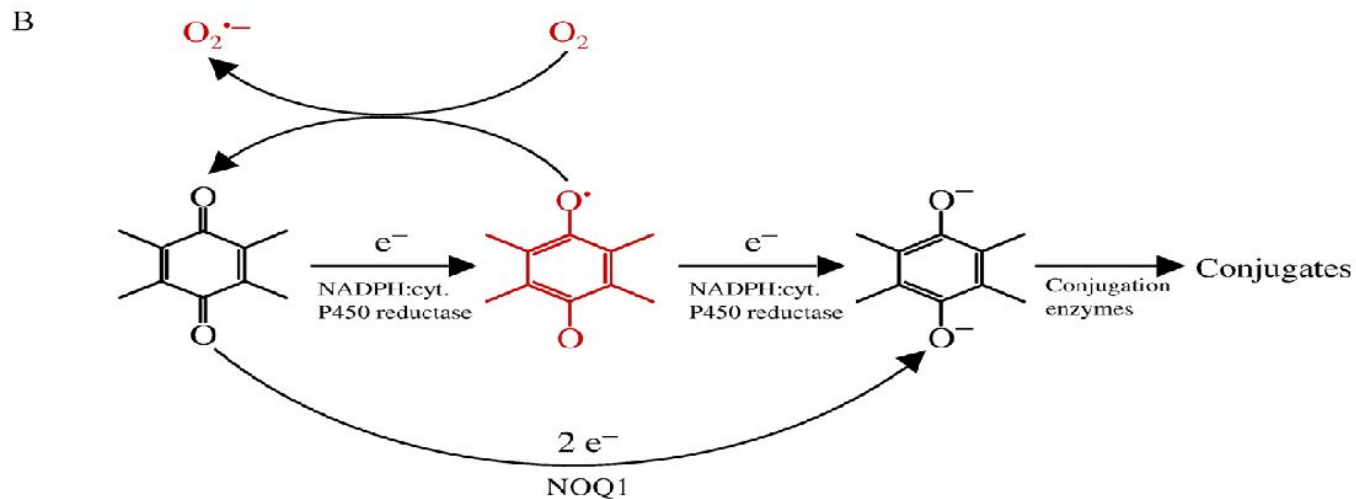
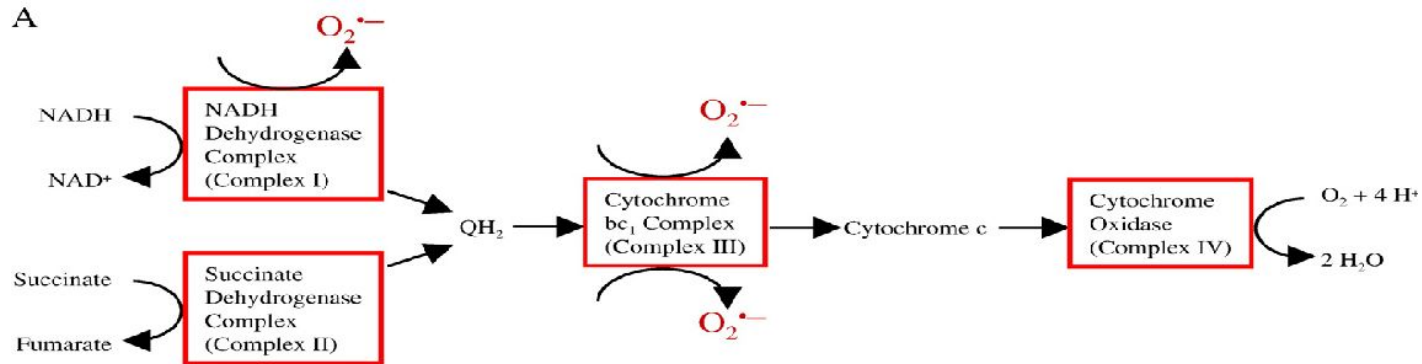
- **Внешняя мембрана:**

- - редуктаза цитохрома  $b_5$
- - моноаминоксидазы А и Б

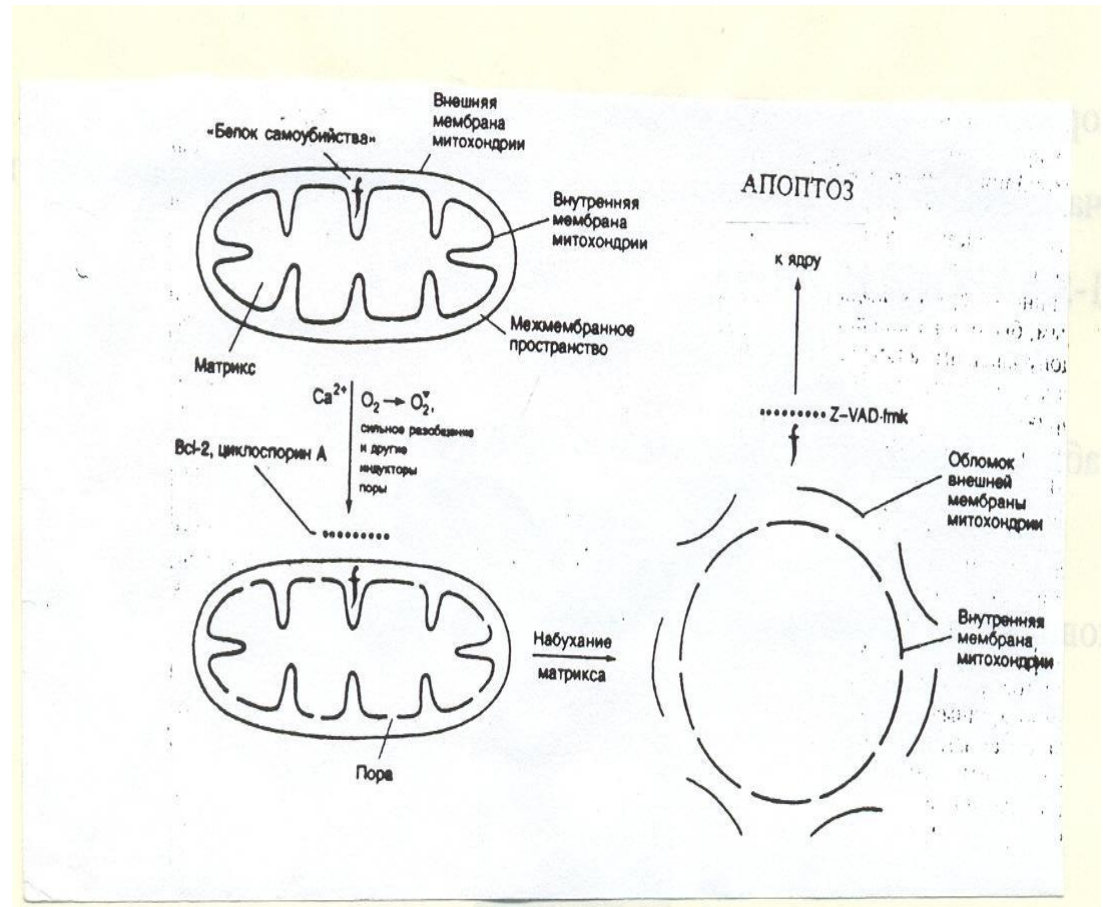
- **Внутренняя мембрана**

- - дегидрогеназа альфа-глицерофосфата
- - сукцинатдегидрогеназа (комплекс II)
- - **комплекс I (НАДН-убихинон-оксидоредуктаза)**
- - **комплекс III (убихинон: цитохром с - редуктаза)**

# Продукция АФК в ЭТЦ митохондрий

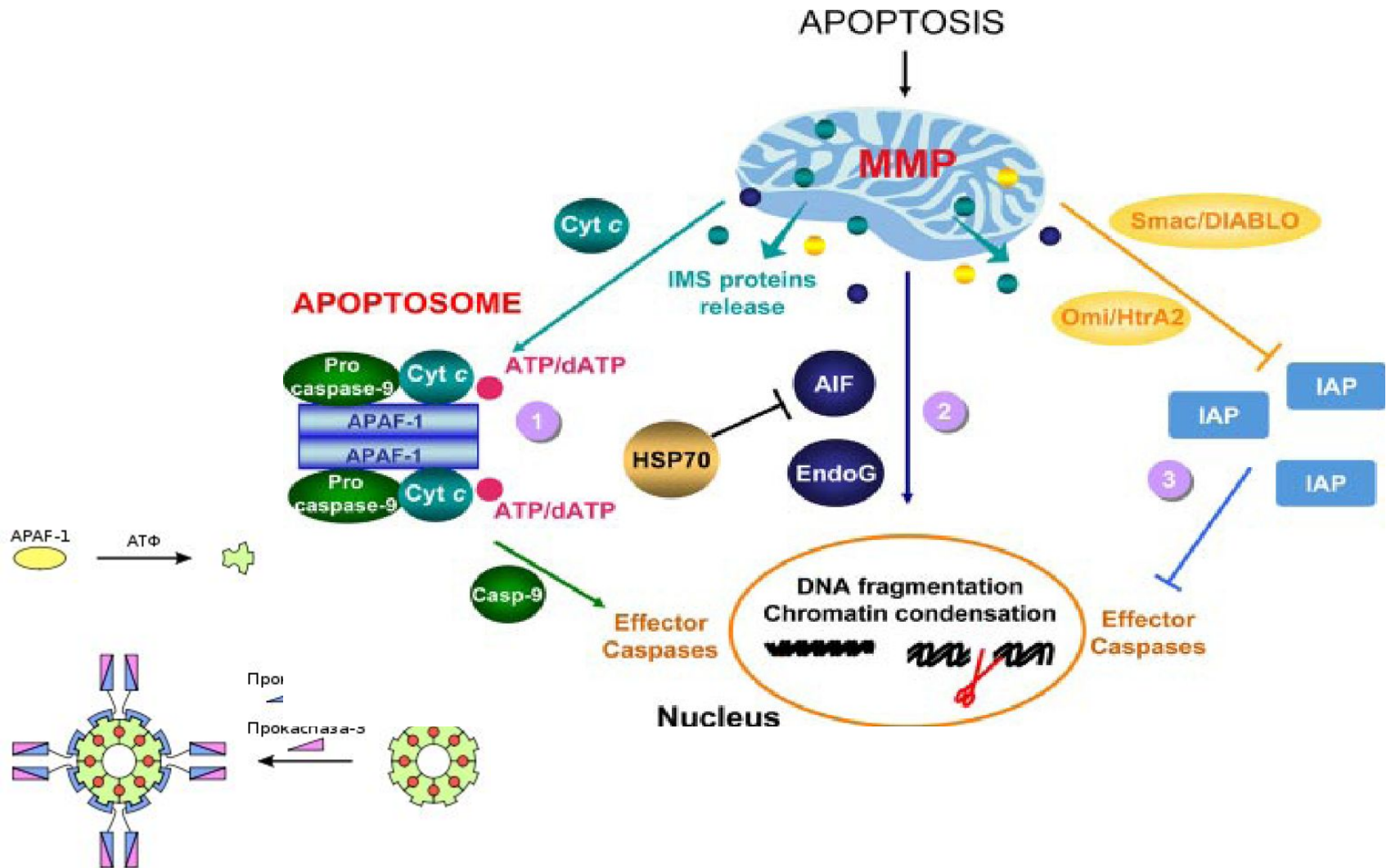


# Роль митохондрий в индукции апоптоза. Открытие апоптоз-индуцирующего фактора (AIF) Гвидо Крэмером (1994)

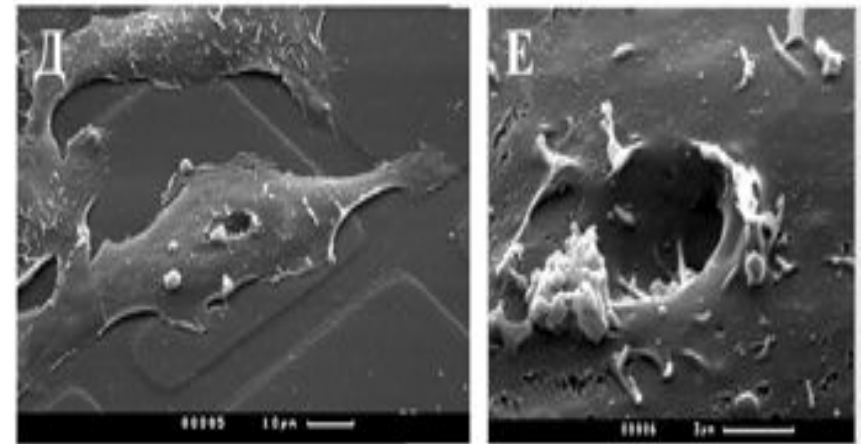
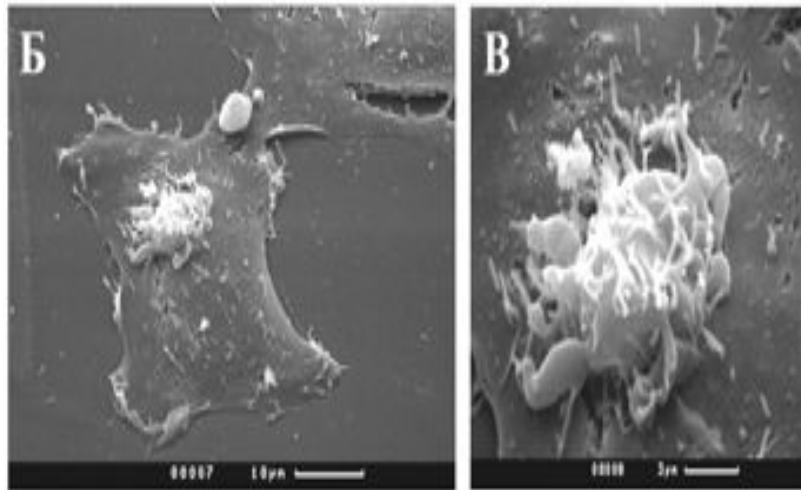
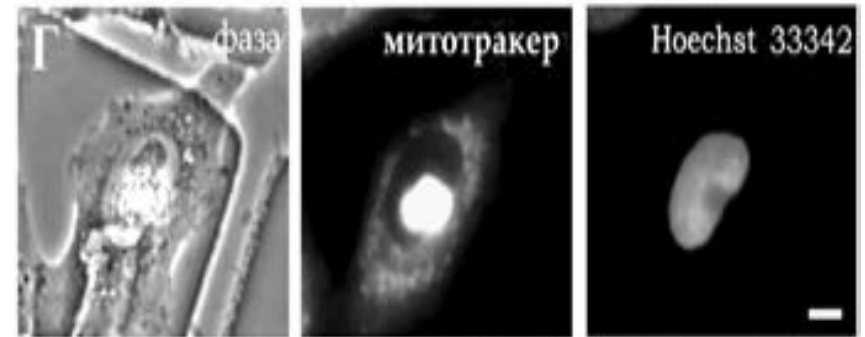
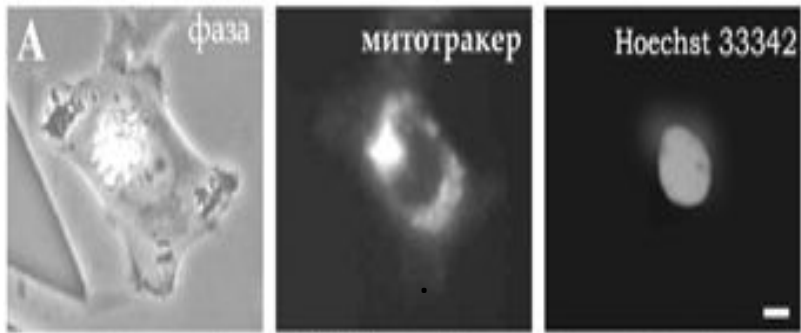




# Митохондриальный (внутренний) путь апоптоза



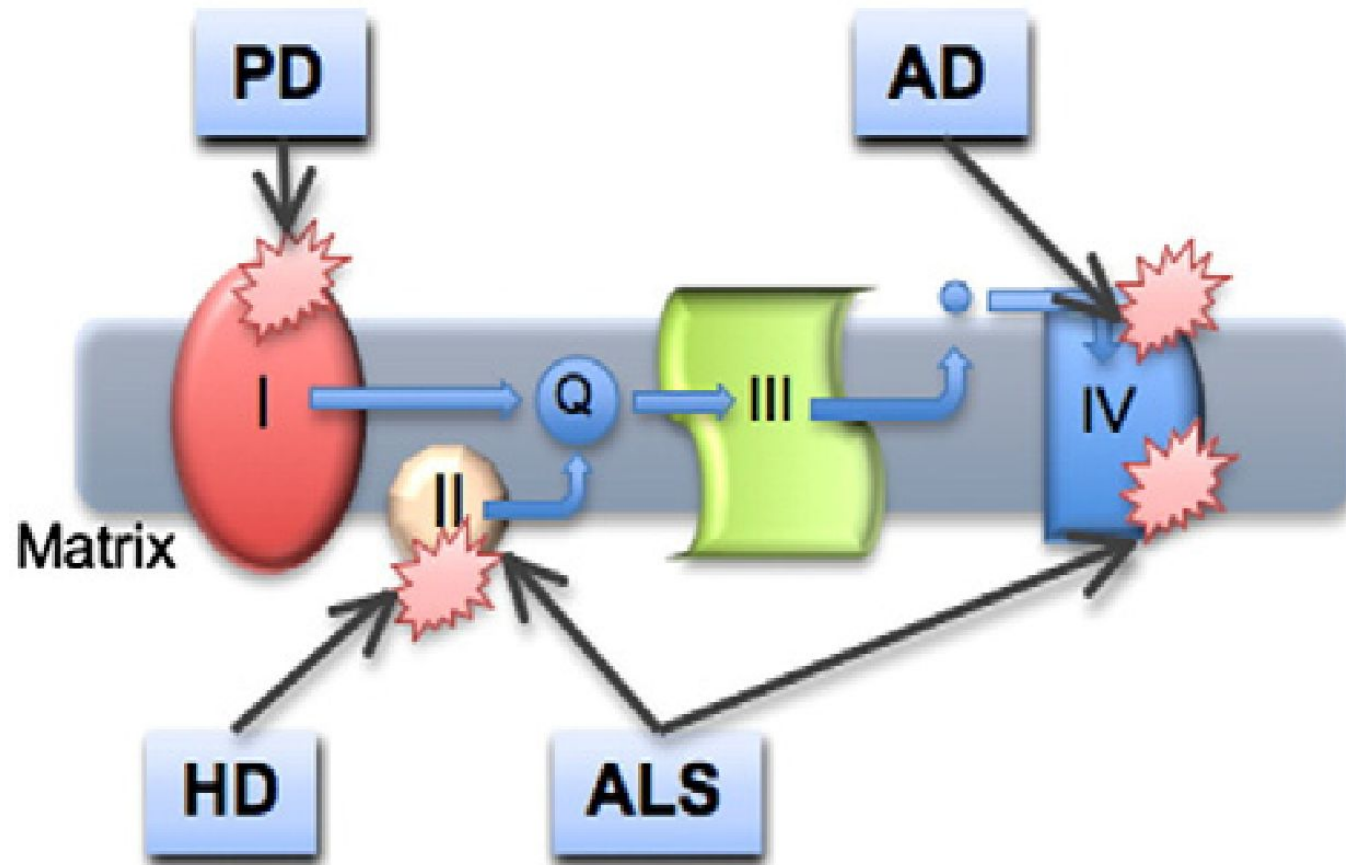
# Образование митоптического тельца и митоптоз



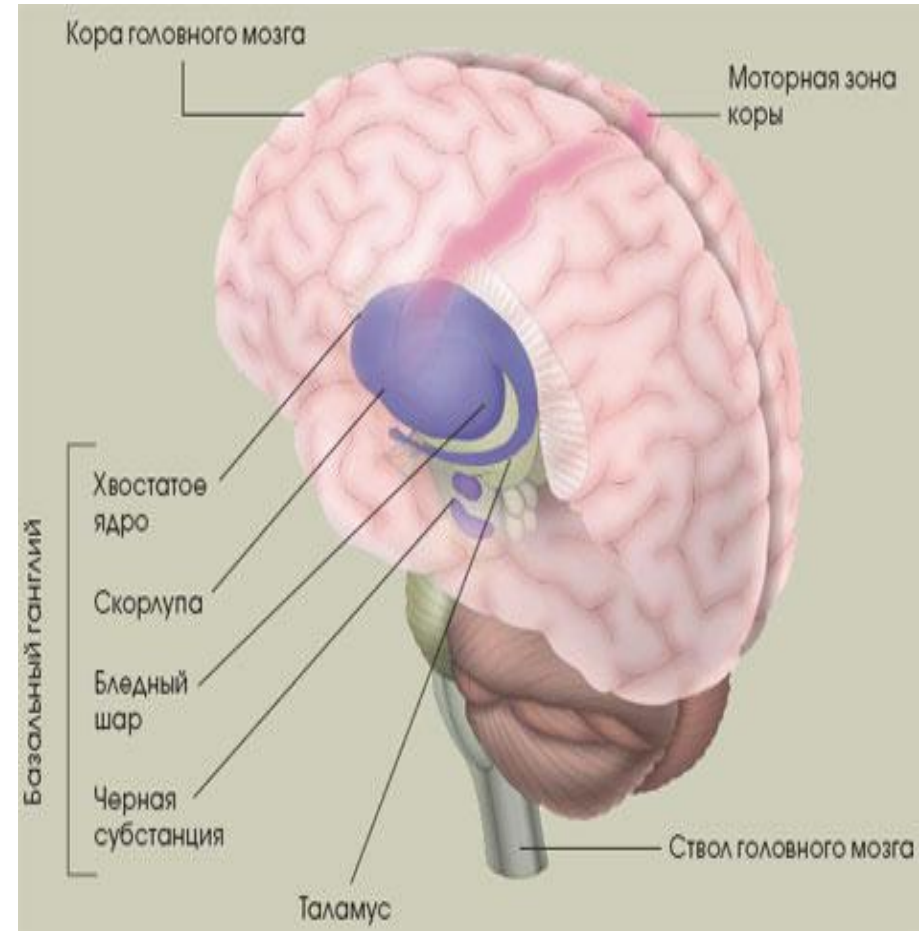
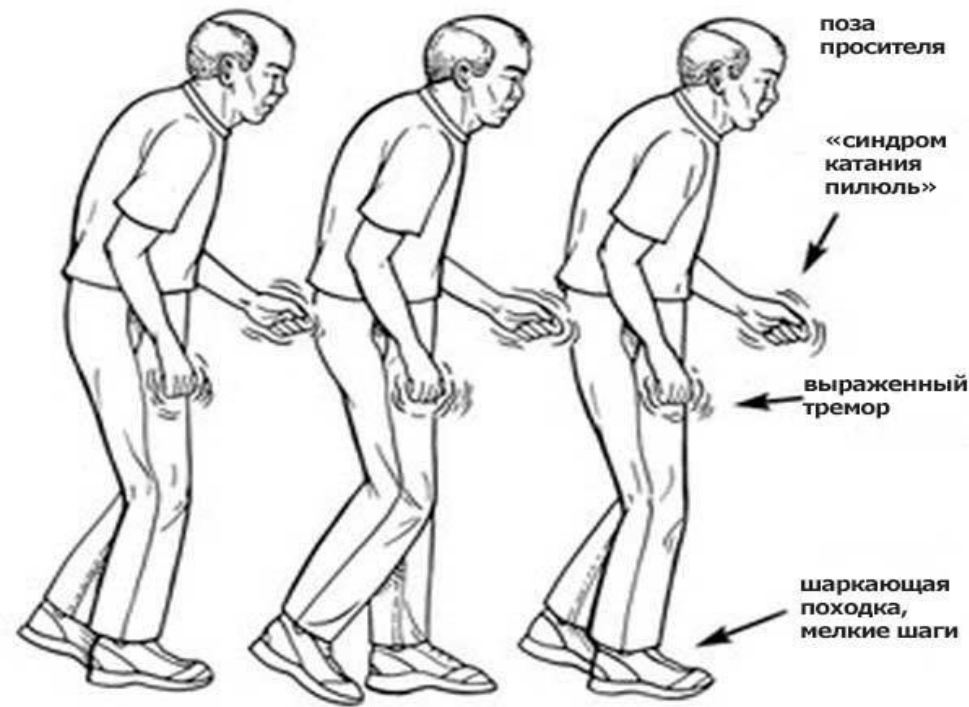
**Конформационные болезни (КБ)** – это заболевания, связанные с нарушением механизмов нативной укладки клеточных белков (фолдинг) в процессе их созревания и выполнения ими физиологических функций.

При всех этих заболеваниях наблюдается **митохондриальная дисфункция**, приводящая к повышенной продукции АФК, которые способствуют нарушению нормального фолдинга белков и накоплению молекул с аномальной конформацией.

**Роль ЭТЦ митохондрий в развитии нейродегенеративных заболеваний – болезни Паркинсона (PD), бокового амиотрофического склероза (ALS), болезни Гентингтона (HD), болезни Альцгеймера (AD)**



**Болезнь Паркинсона – впервые описана Джеймсом Паркинсоном в 1817 году в «Эссе о дрожжательном параличе». Основу клинической картины БП составляет классическая триада: акинезия (гипокинезия), мышечная ригидность и тремор покоя.**

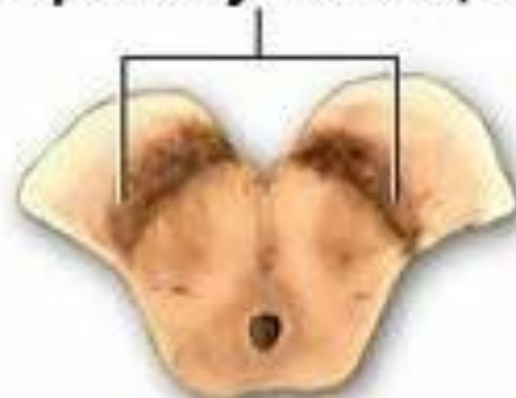




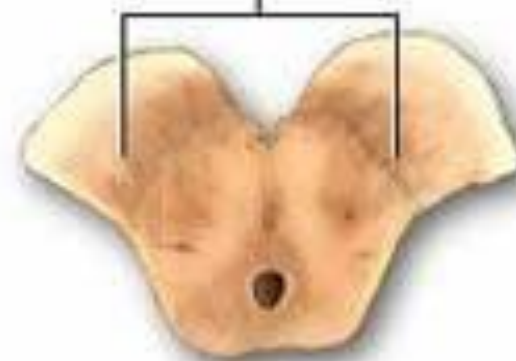
Уровень среза  
мозга на котором  
видно **чёрную  
субстанцию**



**Чёрная субстанция**



Изменение в  
**чёрной субстанции**  
при паркинсонизме



**Болезнь Паркинсона (БП)** - хроническое прогрессирующее заболевание головного мозга с дегенерацией **нейронов черной субстанции** и нарушением функции базальных ганглиев. БП — одна из самых частых форм первичных хронических **нейродегенеративных заболеваний**.

Распространенность БП достаточно высока и колеблется от **67 до 350 случаев на 100 тыс. населения**. Самая высокая распространенность зарегистрирована в США, самая низкая из европейских стран — в Швеции.

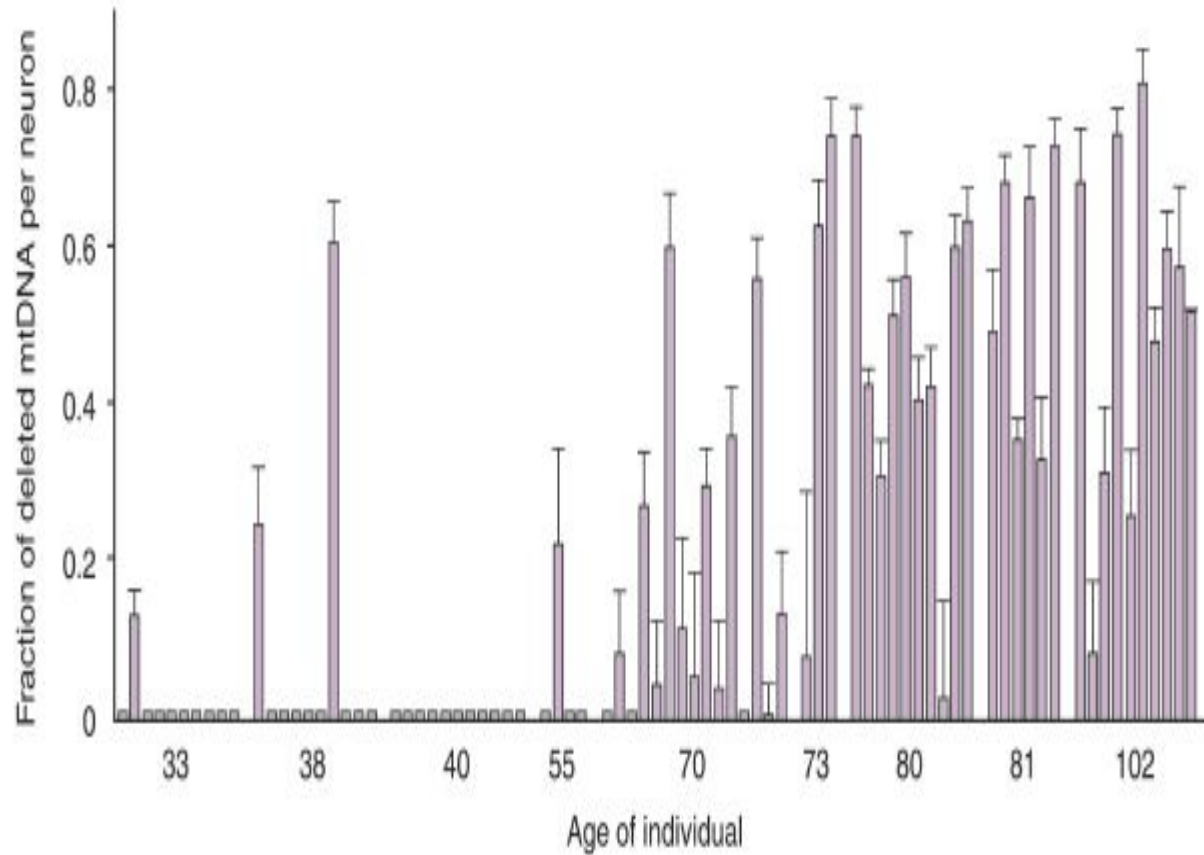
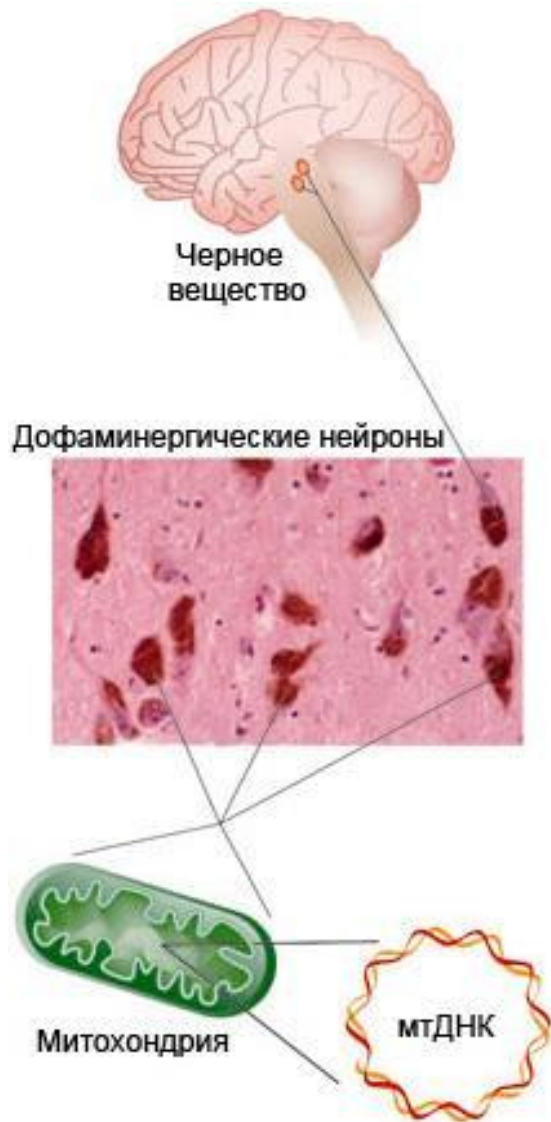
Заболевание может быть спорадическим и наследственным.

В настоящее время идентифицировано более **15 генов** наследственных форм первичного паркинсонизма.

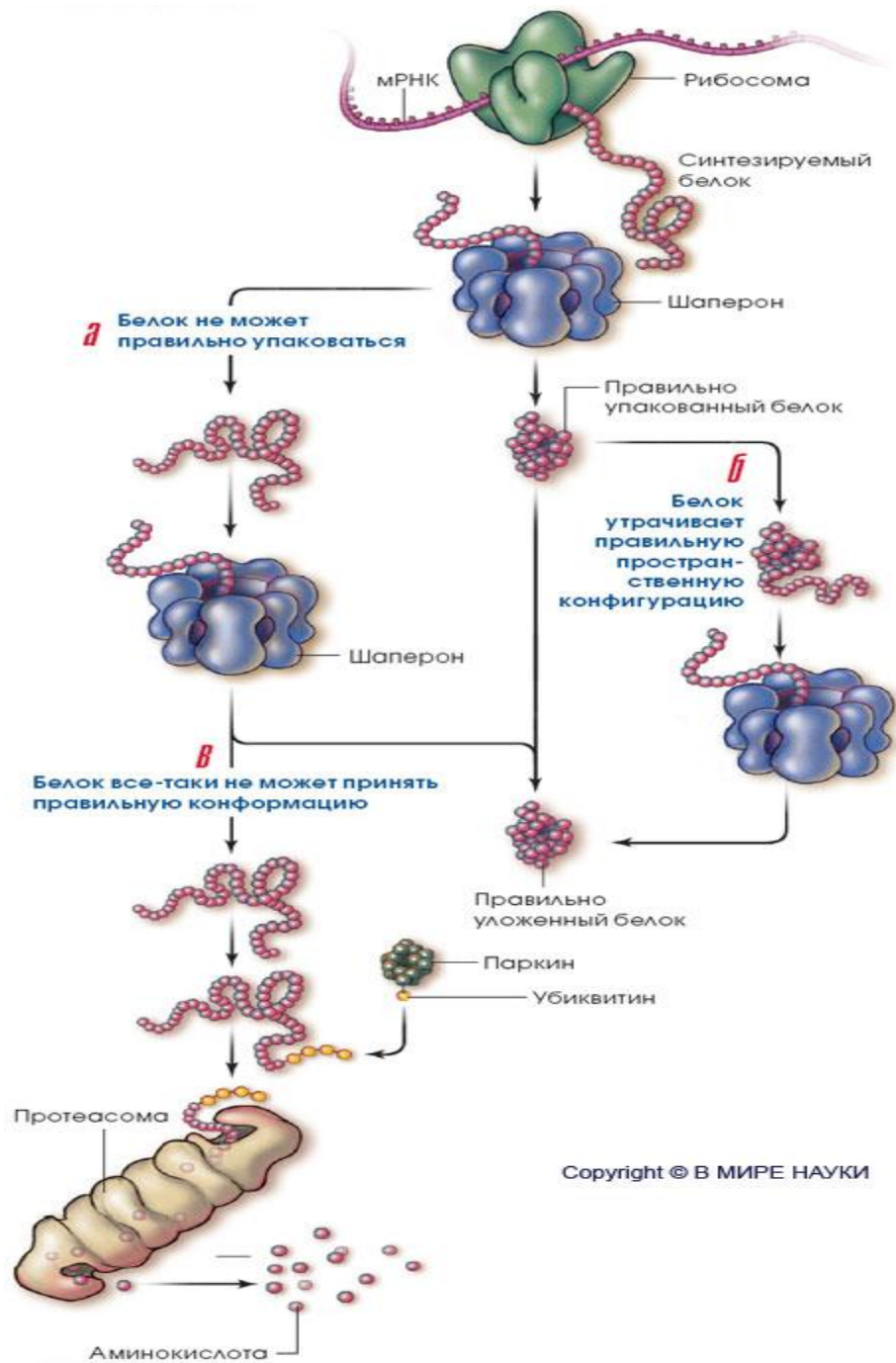
**1.PARK1 ( $\alpha$ -синуклеин).** Белок альфа-синуклеин играет роль в синаптическом везикулярном транспорте и хранении нейротрансмиттеров. Мутации в гене  $\alpha$ -синуклеина  $\rightarrow$  изменение структуры белка  $\rightarrow$  его накопление в нейроне  $\rightarrow$  агрегация белка с образованием **телец Леви**. В настоящее время  **$\alpha$ -синуклеин** - ключевой **молекулярный маркер** БП.

**2.PARK2 (паркин).** Мутации в гене паркина являются частой причиной раннего паркинсонизма. (до 50 % семейных форм и около 15 % спорадических случаев) Паркин представляет собой **убиквитин-протеинлигазу типа E3**, функция которой заключается в доставке аномальных белков в протеасомный комплекс для последующего расщепления.





**Исследования нейронов черной субстанции показали быстрое накопление делеций в мтДНК с возрастом (рисунок из статьи Krauttsberg et al. 2006. *Nature genetics*, 38, 518-520)**



Мутантный белок  $\alpha$ -синуклеин

Мутантный белок паркин



Протеасома



Неправильно уложенный белок



Убиквитин

*a*

*a*



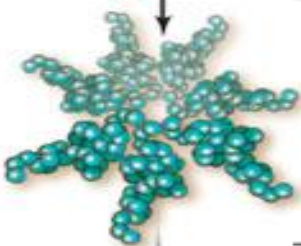
Группа мутантных белков



Протеасома

*b*

*b*



Тельце  
Леви



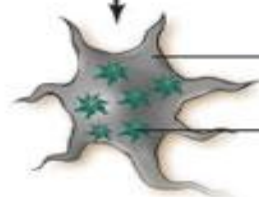
Погибшая  
клетка



Скопление  
аномальных  
белков

*b*

Погибшая  
клетка



Тельце  
Леви

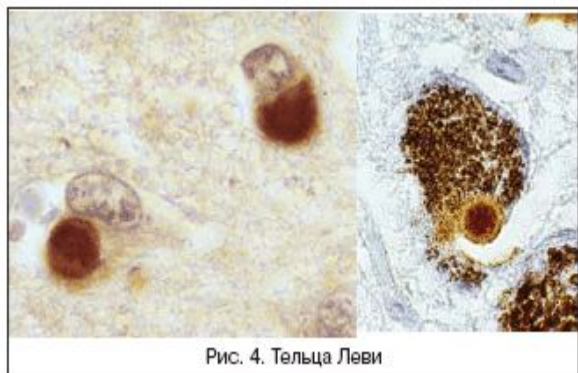
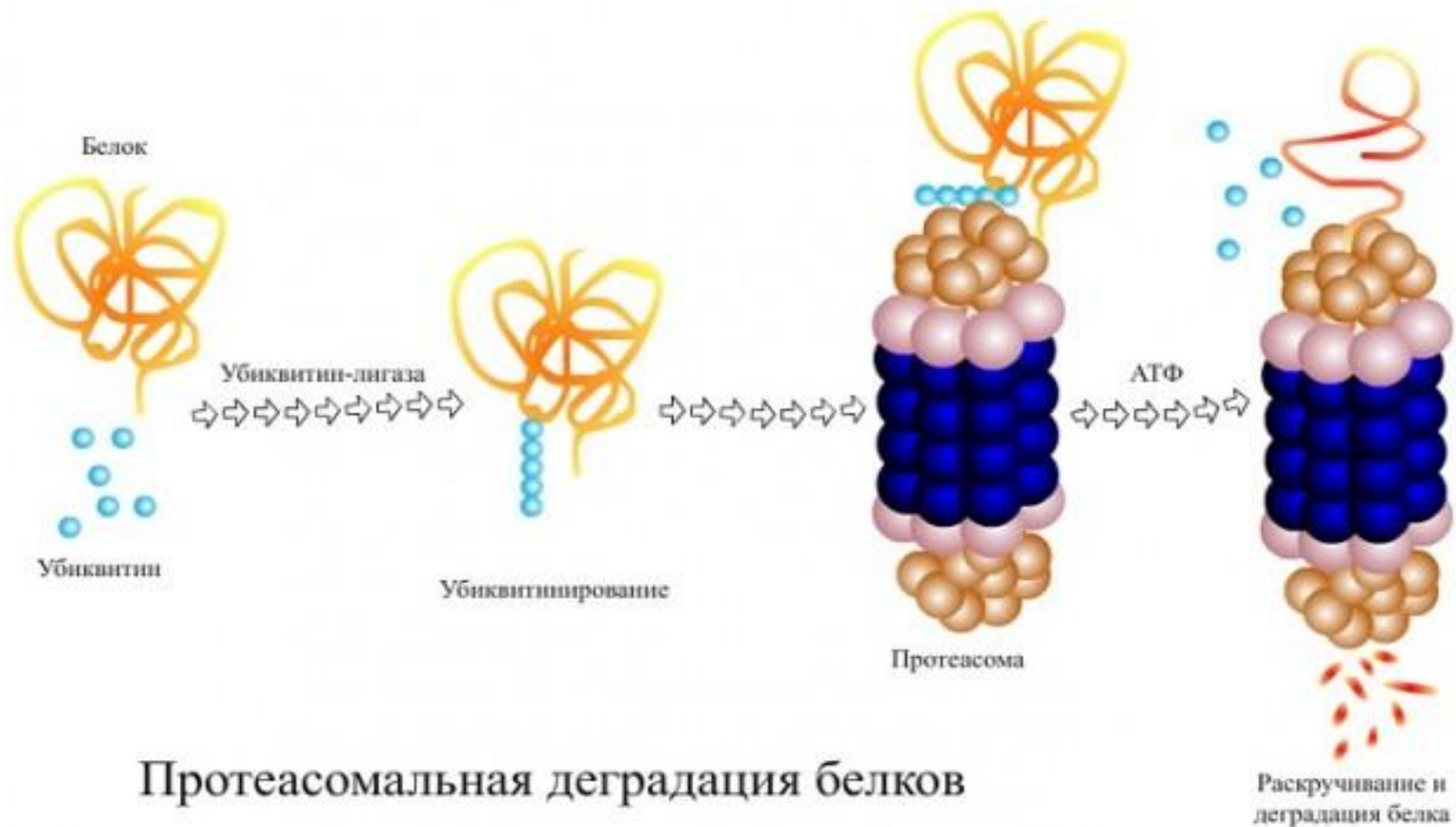
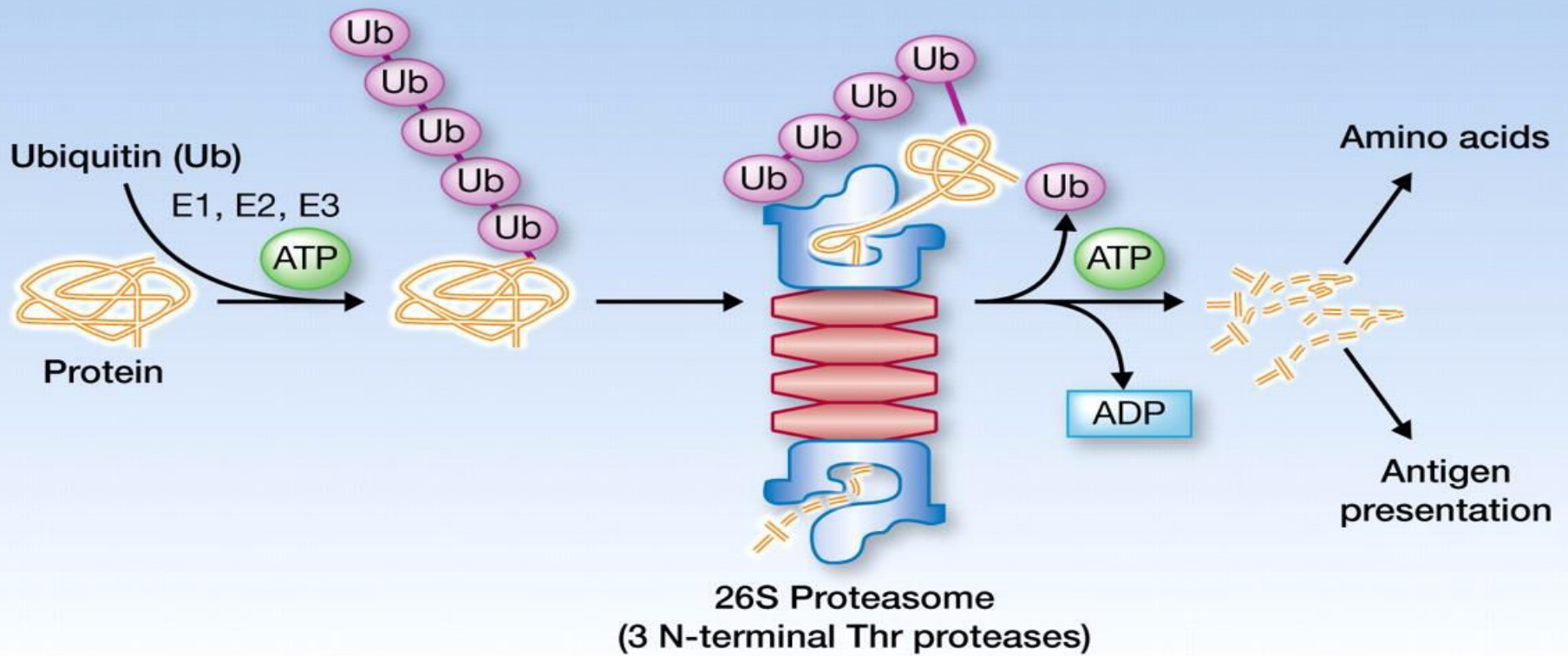


Рис. 4. Тельца Леви



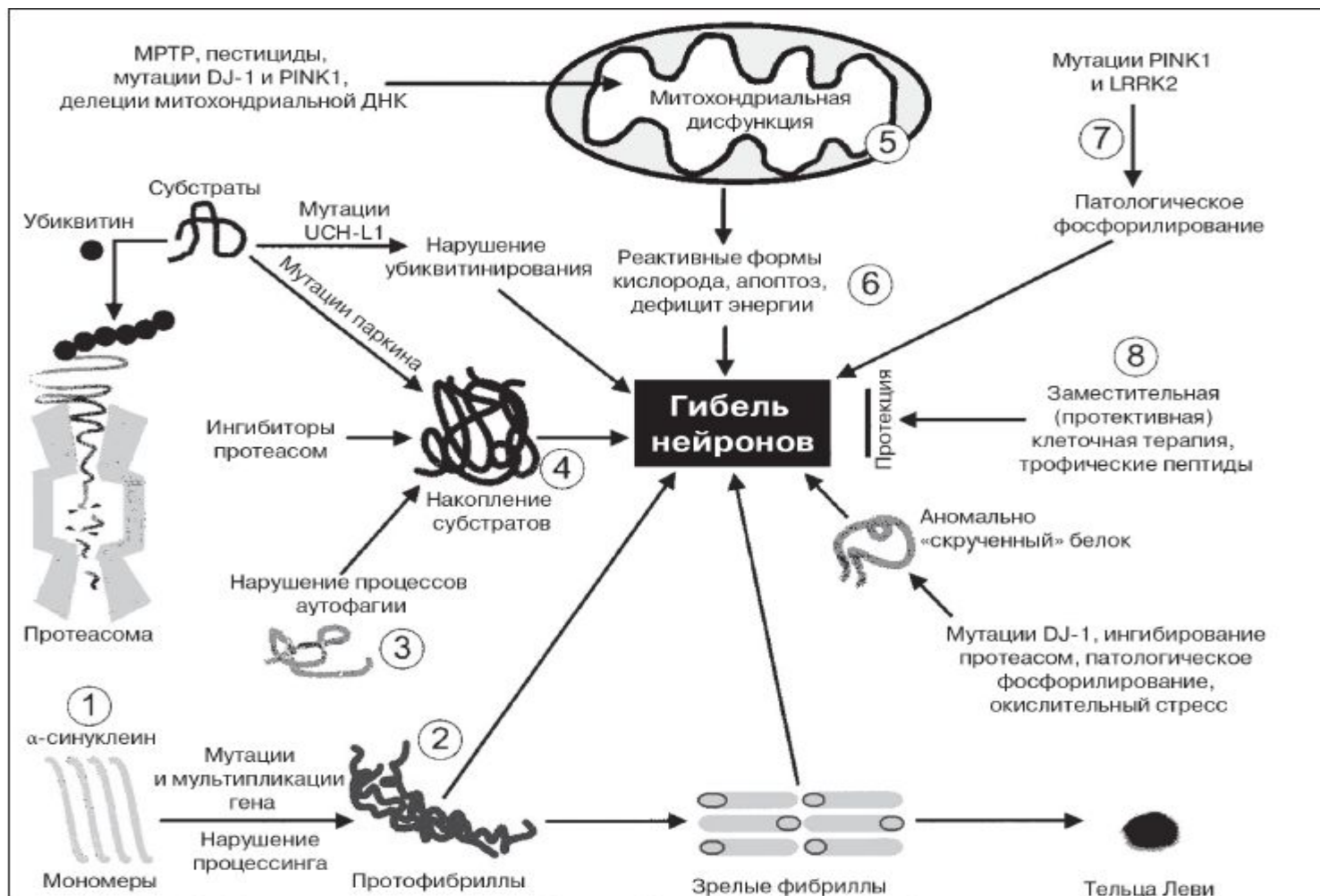
## Протеасомальная деградация белков



- При помощи **убиквитин-лигаз (E1, E2, E3) цепь из 4 или более молекул убиквитинов присоединяется к одному или более остатку лизина на целевом белке.**
- Такой **убиквитинилированный белок транспортируется к протеасоме**, где цепь убиквитинов удаляется, позволяя белку развернуться (unfold) и загрузиться во внутрь протеасомы, где он **деградирует с помощью трёх треониновых протеаз.**

**Расстройства внутриклеточного метаболизма,  
способствующие возникновению  
нейродегенерации (Крыжановский и др., 2000):**

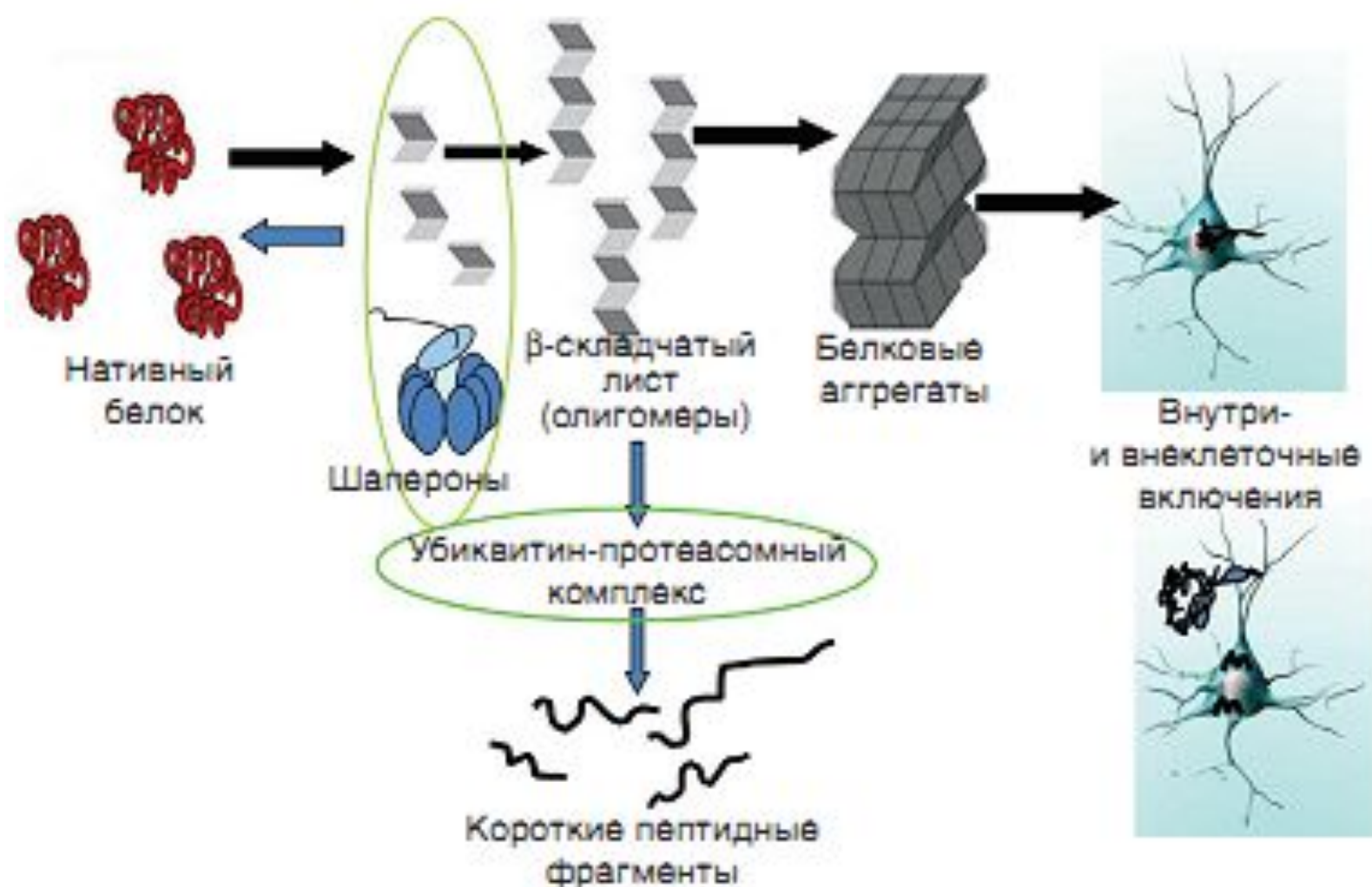
- нарушение ЭТЦ (I ФК ЭТЦ) и повреждение митохондрий (токсин МРТР - N-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидро-пиридин вызывает паркинсонизм в эксперименте);
- энергетический дефицит нейрона;
- усиление свободнорадикального окисления с образованием токсичных продуктов СРО;
- Са-перегрузка нейронов;
- нарушение метаболизма ксенобиотиков.



**Рисунок 2. Молекулярная модель гибели дофаминергических нейронов и возможные уровни терапевтических вмешательств при БП (по J. Savitt et al., с дополнениями С.Н. Иллариошкина)**

**Примечания:** 1 – инактивация гена (подавление экспрессии) и уменьшение уровня α-синуклеина в клетке; 2 – ингибирование агрегации и/или процессинга α-синуклеина; 3 – повышение активности лизосом и интенсивности аутофагии; 4 – расщепление патологических субстратов, повышение экспрессии паркина или активности протеасомного комплекса; 5 – улучшение функции митохондрий (коэнзим Q10, экспрессия DJ-1 или PINK1); 6 – антиоксиданты и «сборщики» свободных радикалов; 7 – блокада активности LRRK2 с помощью ингибиторов киназ или повышение экспрессии PINK1; 8 – применение трофических факторов (GDNF и др.) и клеточной терапии для протекции или замещения «ранимых» нейронов.

Действие нейротоксина МРТП (N-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин) вызывает БП



**Рис. 1. Модель нарушения белковой конформации и формирования внутри- и внеклеточных агрегатов**

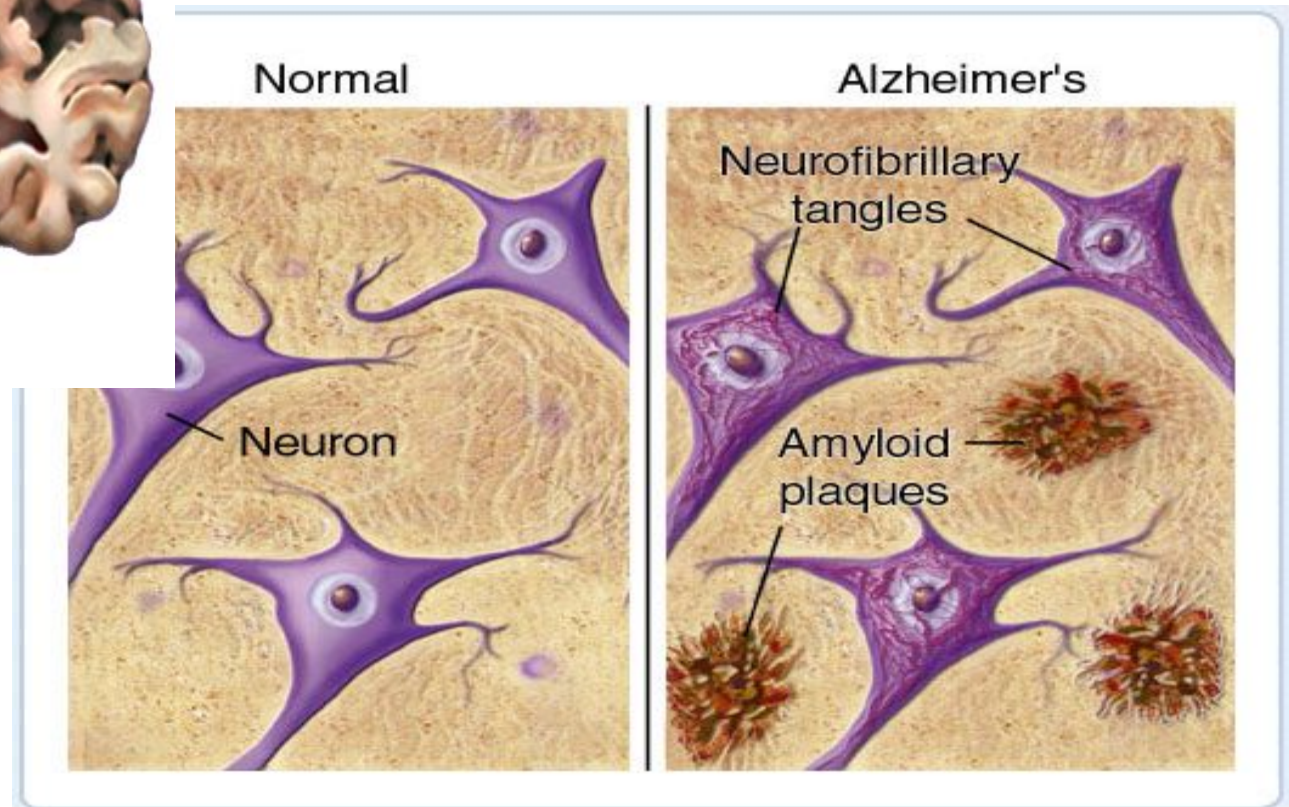
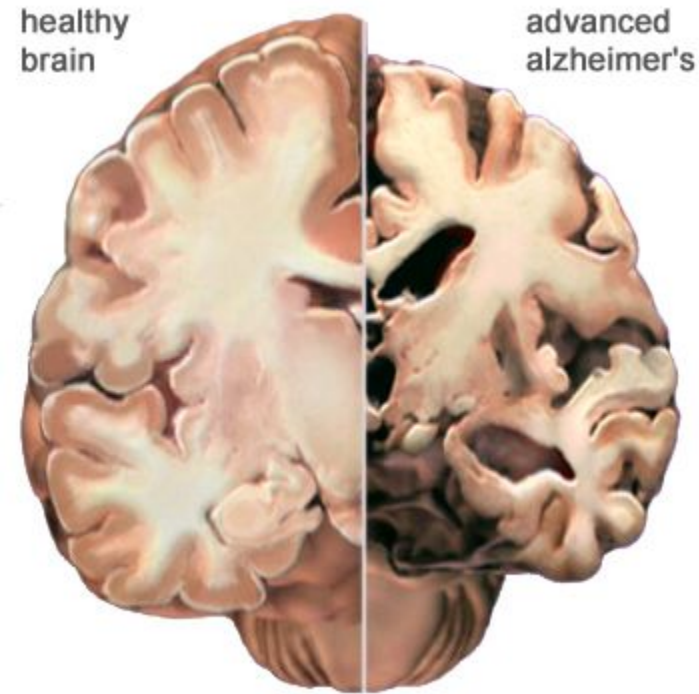




**Рис. 4. Возможность зарождения нейродегенеративного процесса на любом из обозначенных этапов, замыкая порочный круг с исходом в прогрессирующую нейродегенерацию**

# Механизмы болезни Альцгеймера

Наиболее признанной гипотезой развития БА является гипотеза патологического амилоидного каскада и связанного с ним гиперфосфорилирования тау-протеина [Hardy, Higgins, 1992].



**Болезнь Альцгеймера** (сенильная деменция) — **нейродегенеративное заболевание**, впервые описанное в 1906 году немецким психиатром Алоисом Альцгеймером. Как правило, обнаруживается у людей старше 65 лет.

Общемировая заболеваемость на 2006 г. оценивалась в 26,6 млн. человек, а к 2050 году число больных может вырасти вчетверо.

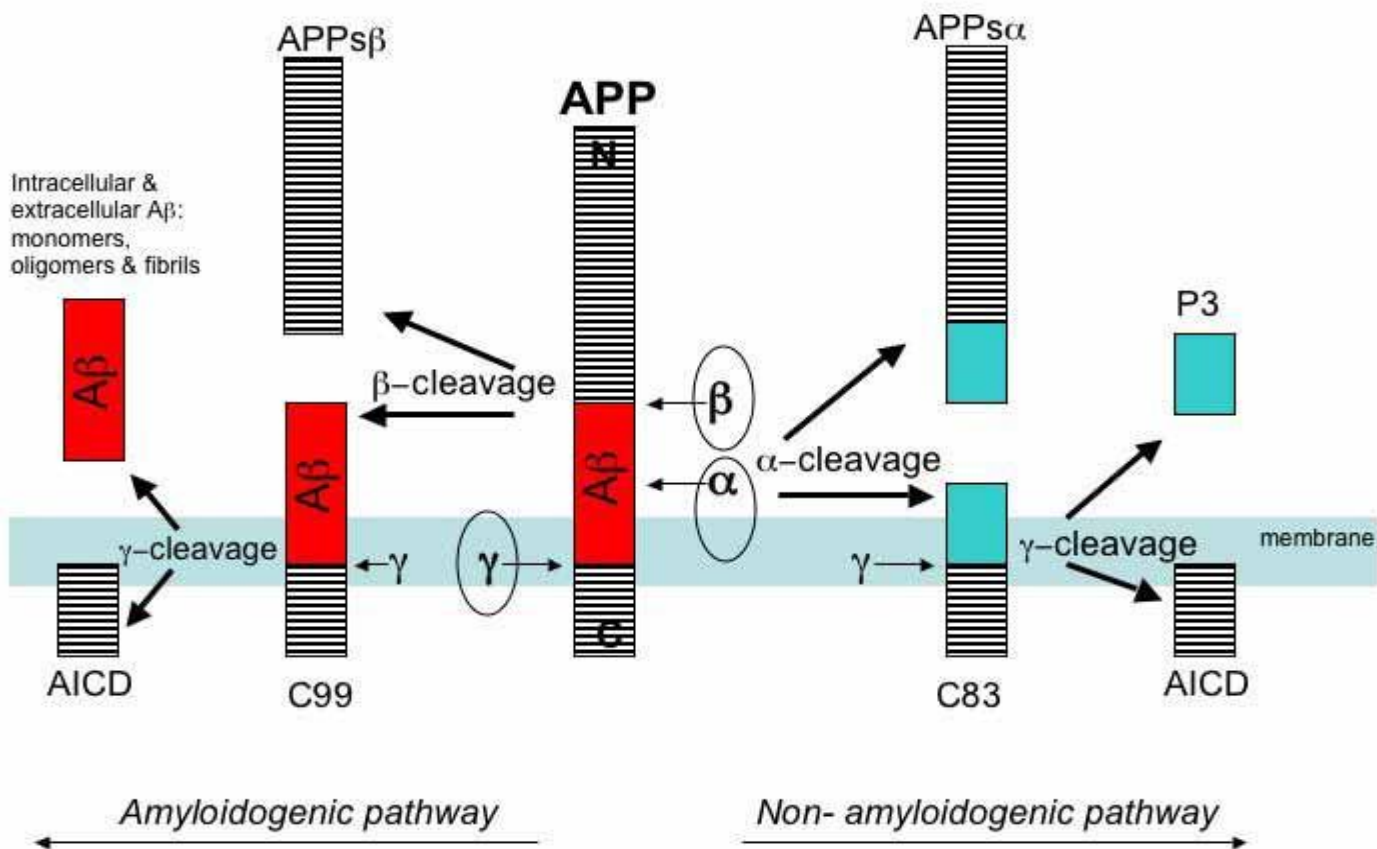
Идентифицировано **4 гена**, мутации которых вызывают БА:

1. **Ген APP** – кодирует белок-предшесивенник  $\beta$ -амилоида (21 хр.)
2. **Ген пресенелина 1 (PSN1)** (14 хр.)
3. **Ген пресенелина 2 (PSN2)** (1 хр.)
4. **Ген изоформы аполипопротеина E** (19 хр.)

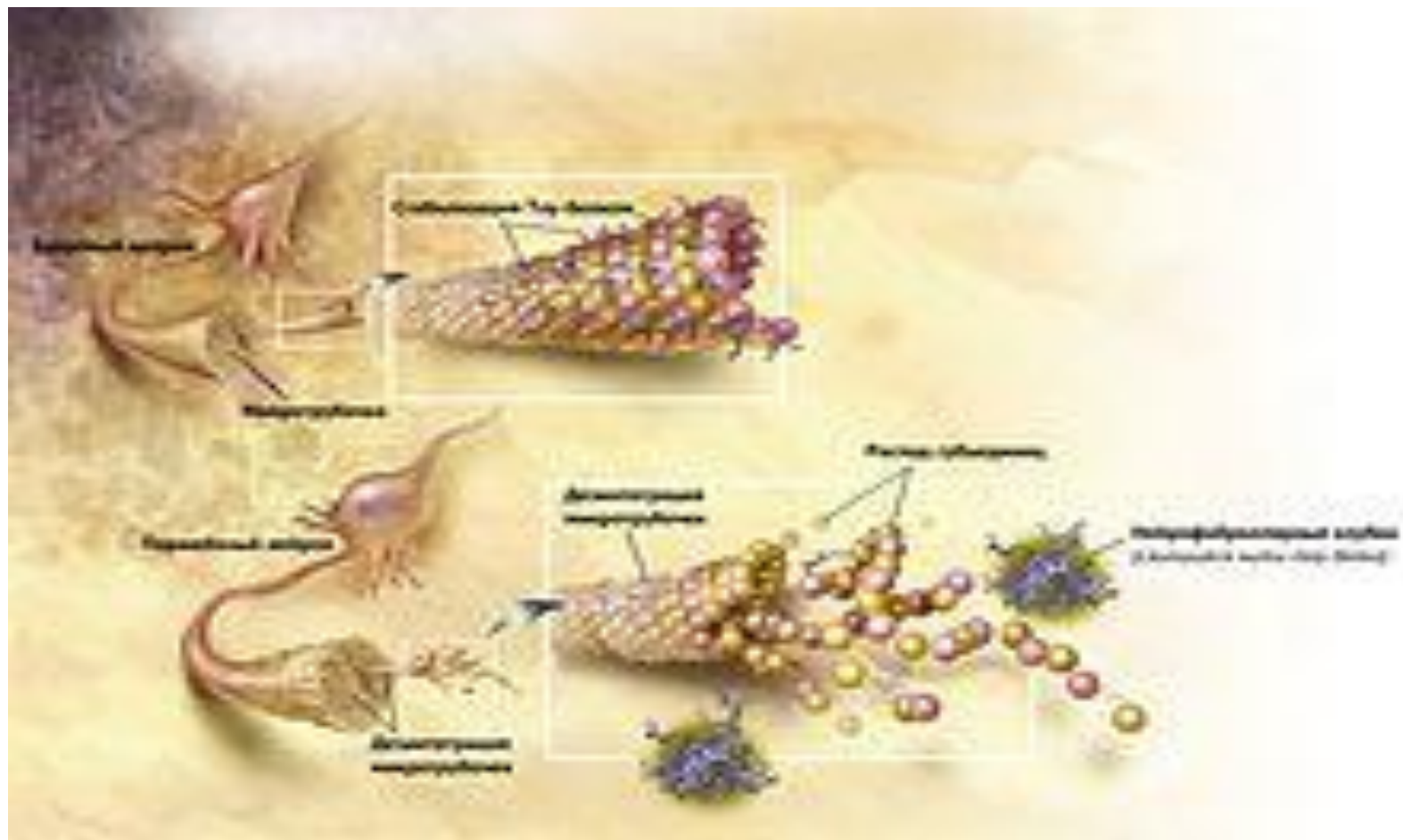
Патоморфологические и биохимические механизмы БА связаны с:

- **митохондриальной дисфункцией (нарушение IV ФК ЭТЦ);**
- **накоплением  $\beta$ -амилоидного пептида и образованием внеклеточных амилоидных бляшек;**
- **гиперфосфорированием тау-белка, ассоциированного с микротрубочками, и образованием внутриклеточных нейрофибрилярных клубочков. Гибель нейронов.**

# Процессинг APP: амилоидогенный (патологический), с участием бета-секретазы, и неамилоидогенный с участием альфа-секретазы



**При болезни Альцгеймера изменения в структуре тау-белка приводят к дезинтеграции микротрубочек в клетках мозга.**



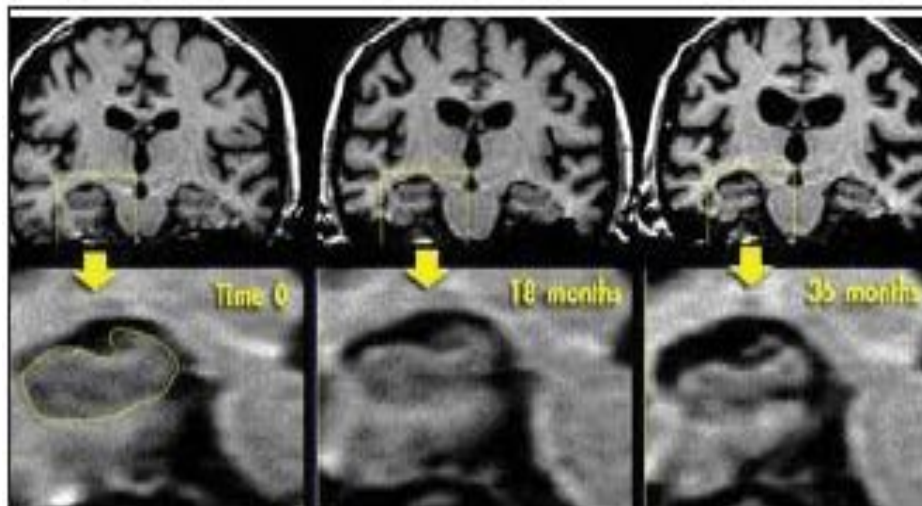
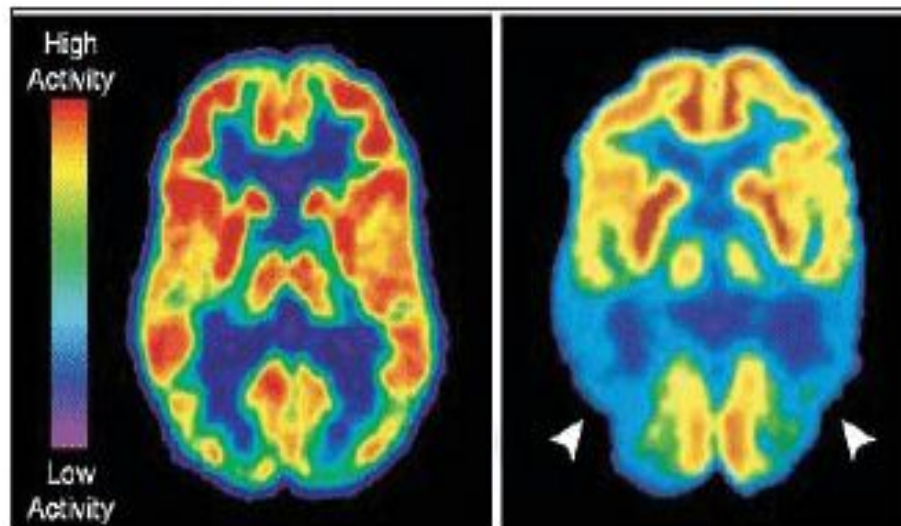


Рис. 6. Прогрессирование атрофии гиппокампа при болезни Альцгеймера (в течение 3 лет)



Норма

Болезнь Альцгеймера

Рис. 8. ПЭТ в норме и при болезни Альцгеймера

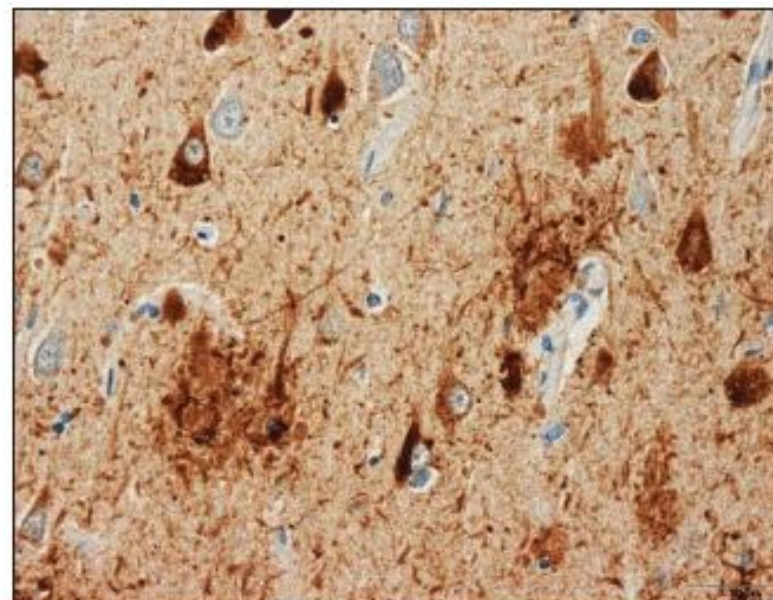


Рис. 3. Морфологические изменения в ткани головного мозга при болезни Альцгеймера (отложение  $\beta$ -амилоида)

В 1998 г. Reisberg с соавт. предложили концепцию (теорию) **ретрогенеза**, согласно которой пациент с деменцией проходит как бы «обратное развитие». Данная теория весьма показательна на анализе работ художников, страдавших деменцией. Наиболее известным является немецкий художник Carolus Horn (1921–1992). В середине 1980–х гг. мастер работает в стиле «наивного искусства», что совпадает с началом его болезни. Его картины как будто рисовал ребенок.



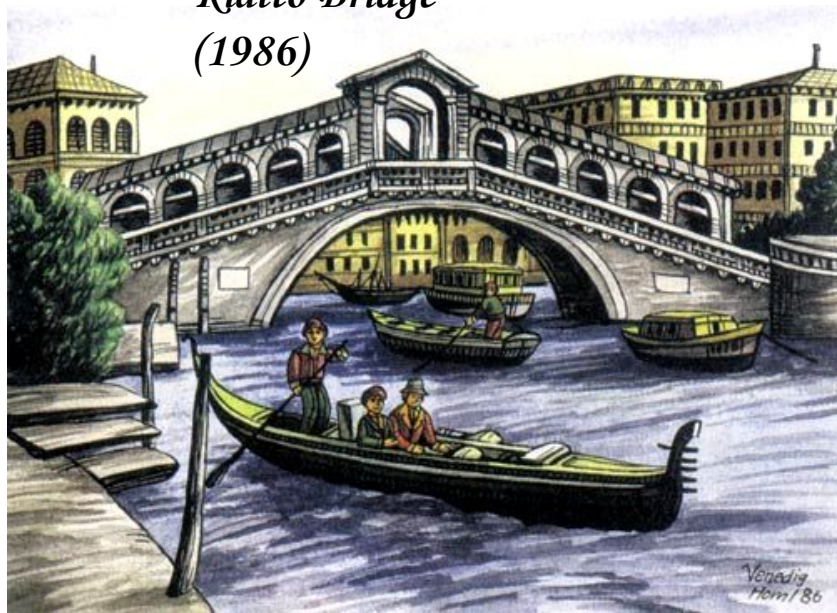
*Rialto Bridge (1978)*



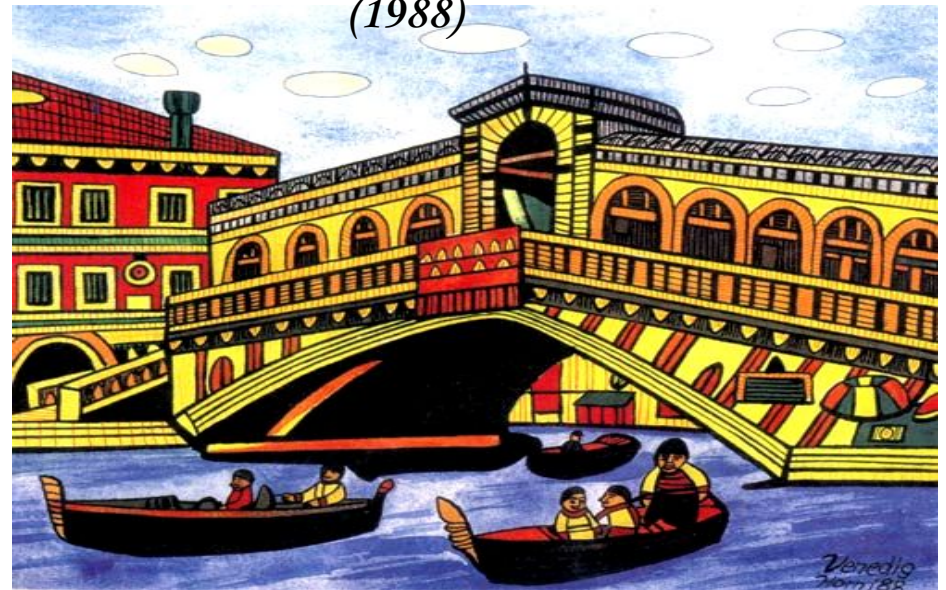
*Rialto Bridge (Mid 1980's)*



*Rialto Bridge (1986)*

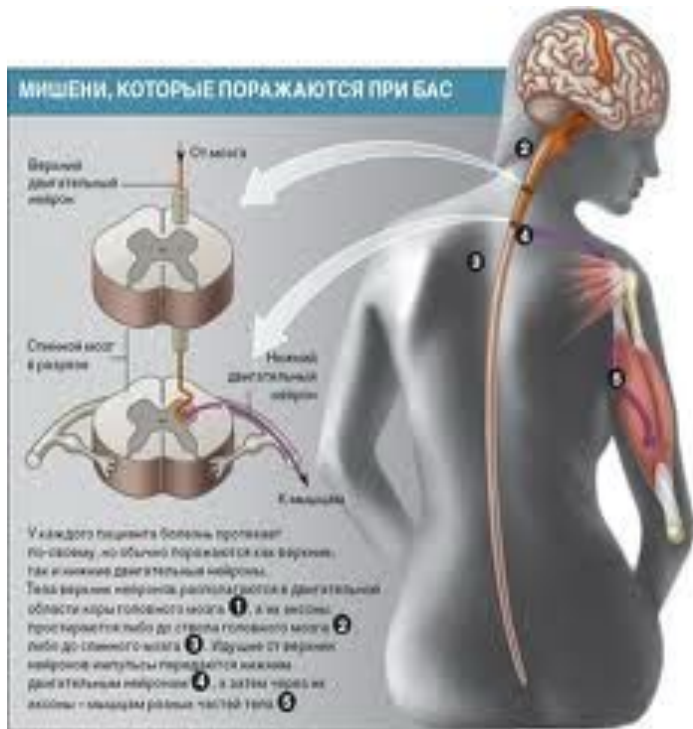


*Rialto Bridge (1988)*

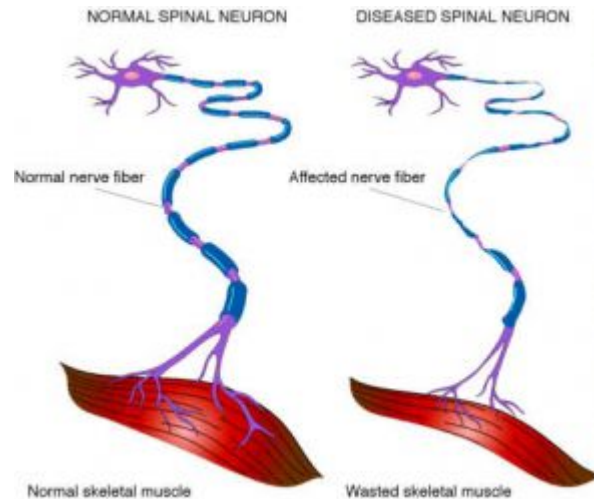


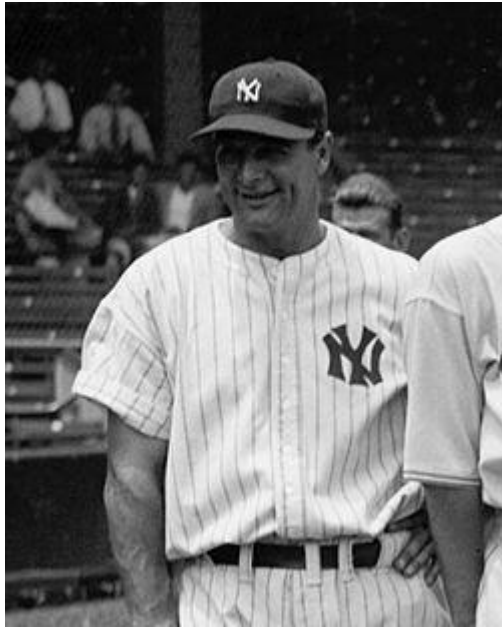


# Боковой амиотрофический склероз (болезнь Лу Герига, болезнь мотонейронов, нарушение II и IV ФК ЭТЦ)



*Белковое скопление в нейроне при болезни Лу Герига*





**Генри Луи Гериг, прозванный за выносливость «Железный конь» — выдающийся бейсболист. В возрасте 36 лет он заболел боковым амиотрофическим склерозом, который широко известен в США и Канаде как «болезнь Лу Герига».**



**Эксперт по черным дырам, Хокинг — один из самых выдающихся астрофизиков. Его достижения еще более значимы потому, что ученый страдает дегенеративным генетическим заболеванием, которое диагностировали, когда Стивену был 21 год; тогда будущему ученому врачи обещали всего несколько лет. Но Хокинг не только прожил полвека, но и сделал множество фундаментальных открытий в области теоретической астрофизики.**

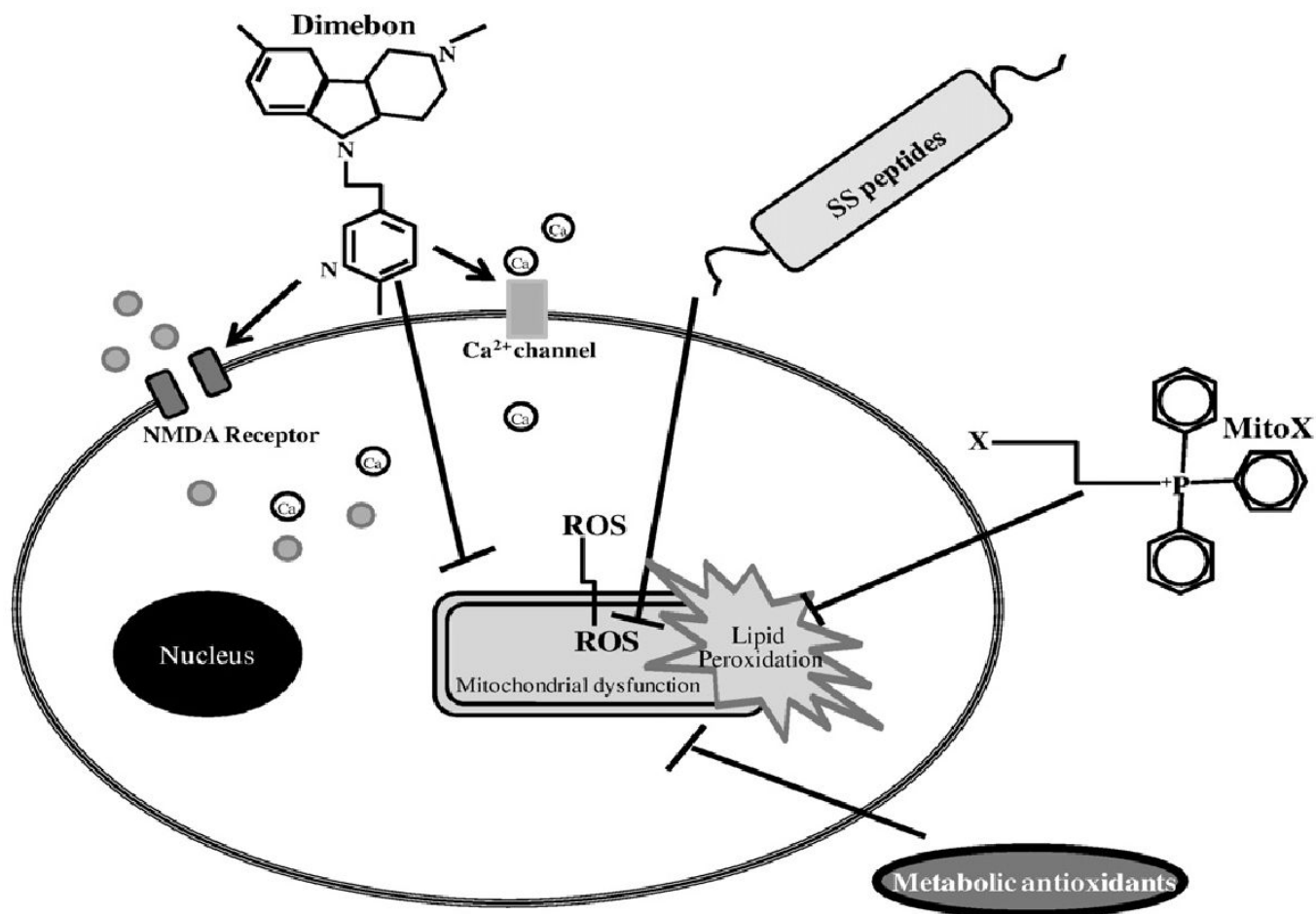


*профессор Стивен Хокинг со своей женой Джейн и детьми Тимом, Робертом и Люси в начале 1980-х*

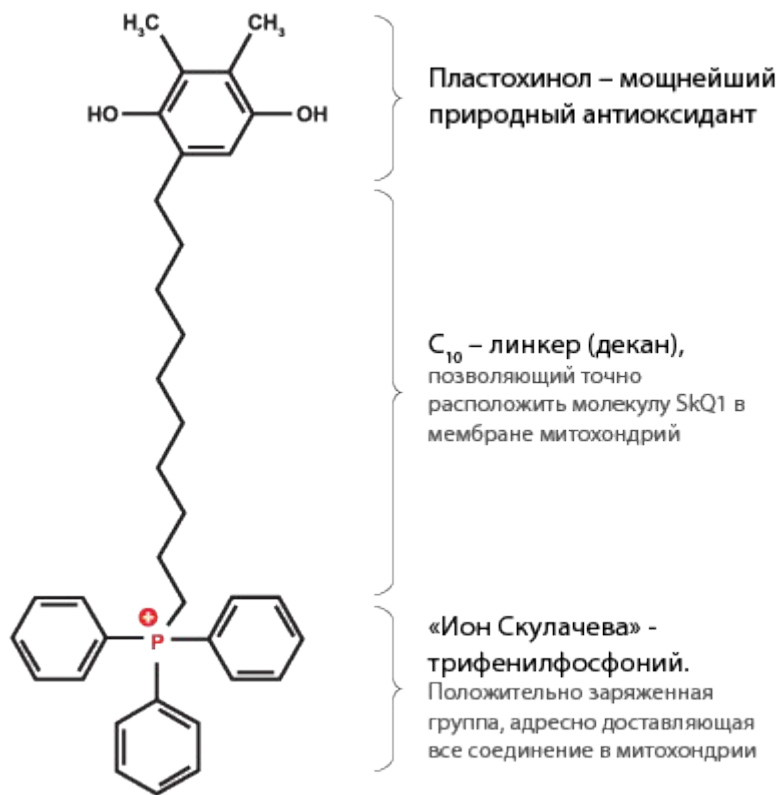
**«Если понимаешь, как работает вселенная, - сказал Стивен Хокинг, - можно контролировать ее движение».**

**В своей записанной речи Хокинг сказал, что объяснение Вселенной широкой публике – это обязанность и это имеет гораздо большее значение, чем просто создание научных теорий.**

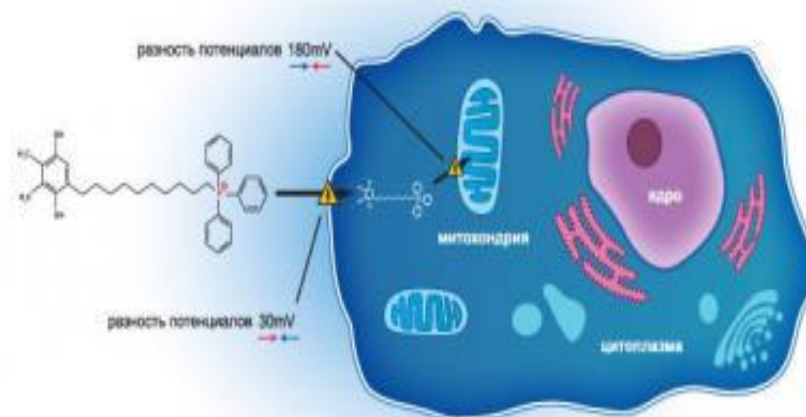
# Митохондриально-направленная терапия нейродегенеративных заболеваний



# Структура и механизм действия митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1.



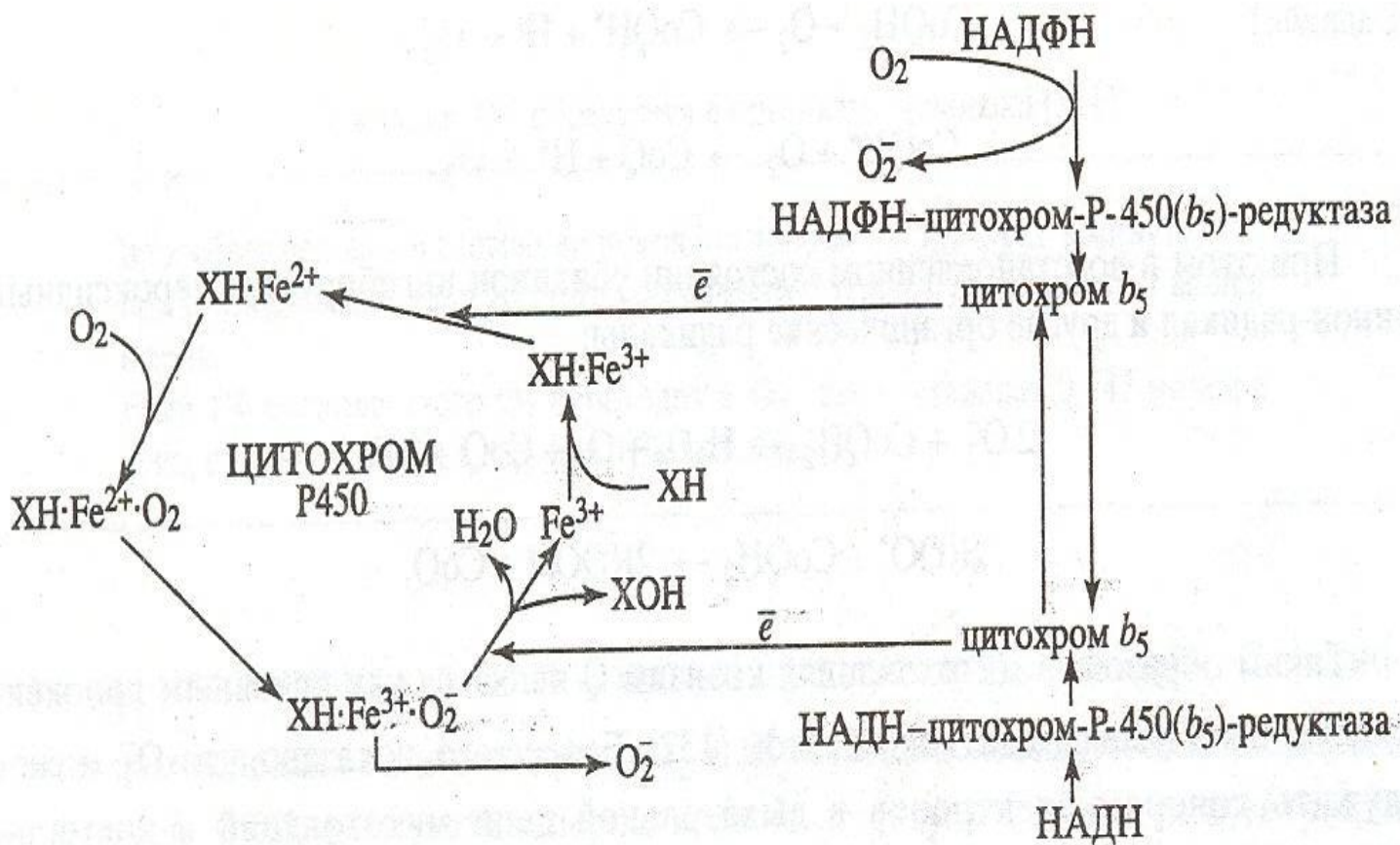
**SkQ1**



## ЭТЦ микросомом – источник АФК

### Образование $O_2^{\cdot -}$ и $H_2O_2$ в системе микросомального окисления (75% АФК)

Главной функцией монооксигеназ является детоксикация ксенобиотиков путем гидроксилирования:



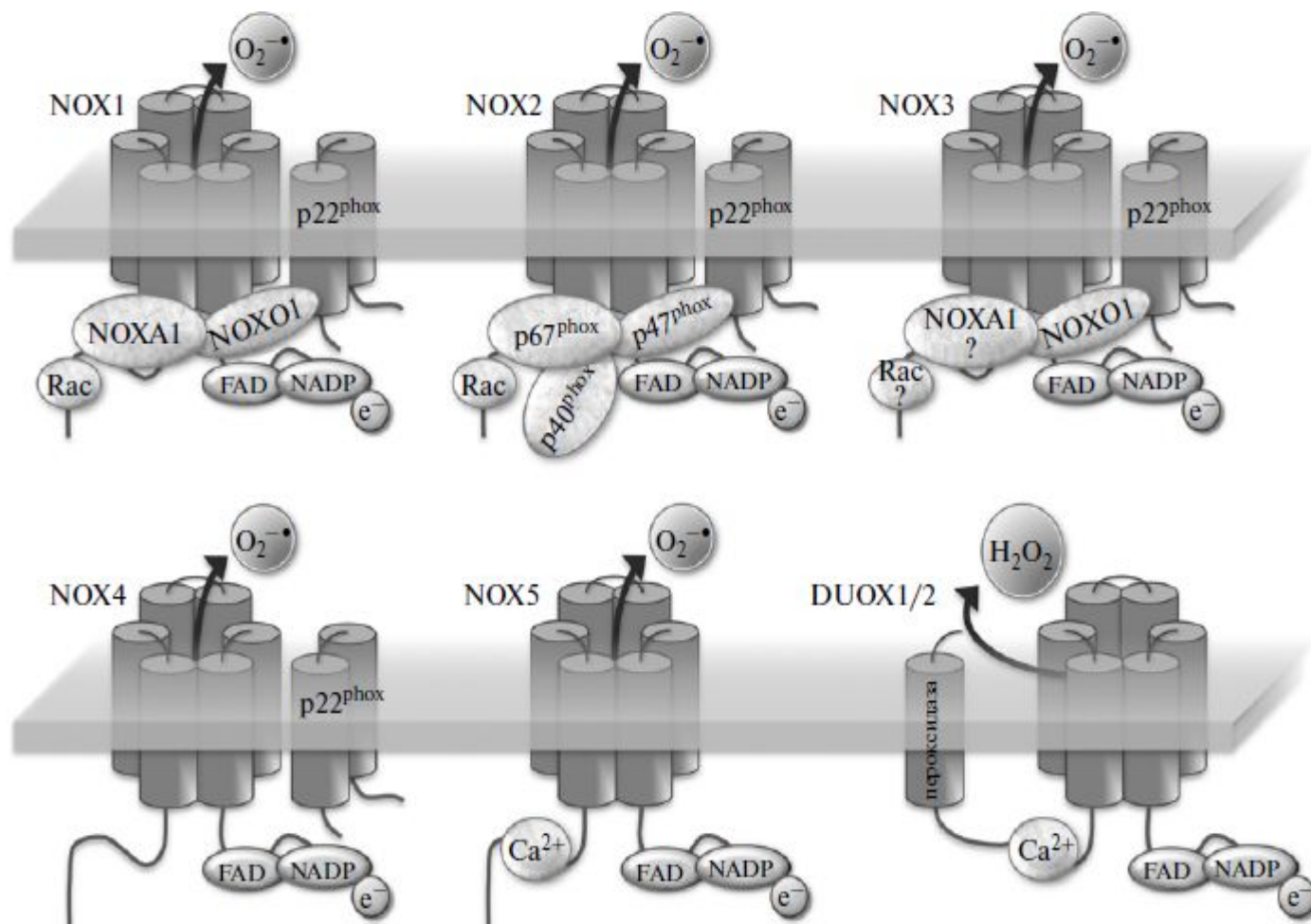
## **Значение АКМ, образующихся в системе микросомального окисления**

**Продукция АКМ монооксигеназами имеет значение для:**

- регуляции тонуса сосудов;**
- синтеза медиаторов и регуляторов при воспалении или ишемии/реперфузии;**
- свободно-радикального повреждения гепатоцитов и развития цирроза печени при алкоголизме;**
- гепатотоксического действия лекарственных препаратов (парацетамола, диклофенака, галотана, вальпроевой кислоты и др.).**

# НАДФН-оксидаза фагоцитов – источник АФК

## Образование супероксида НАДФН-оксидазой фагоцитов





# Образование АФК при респираторном взрыве фагоцитов.



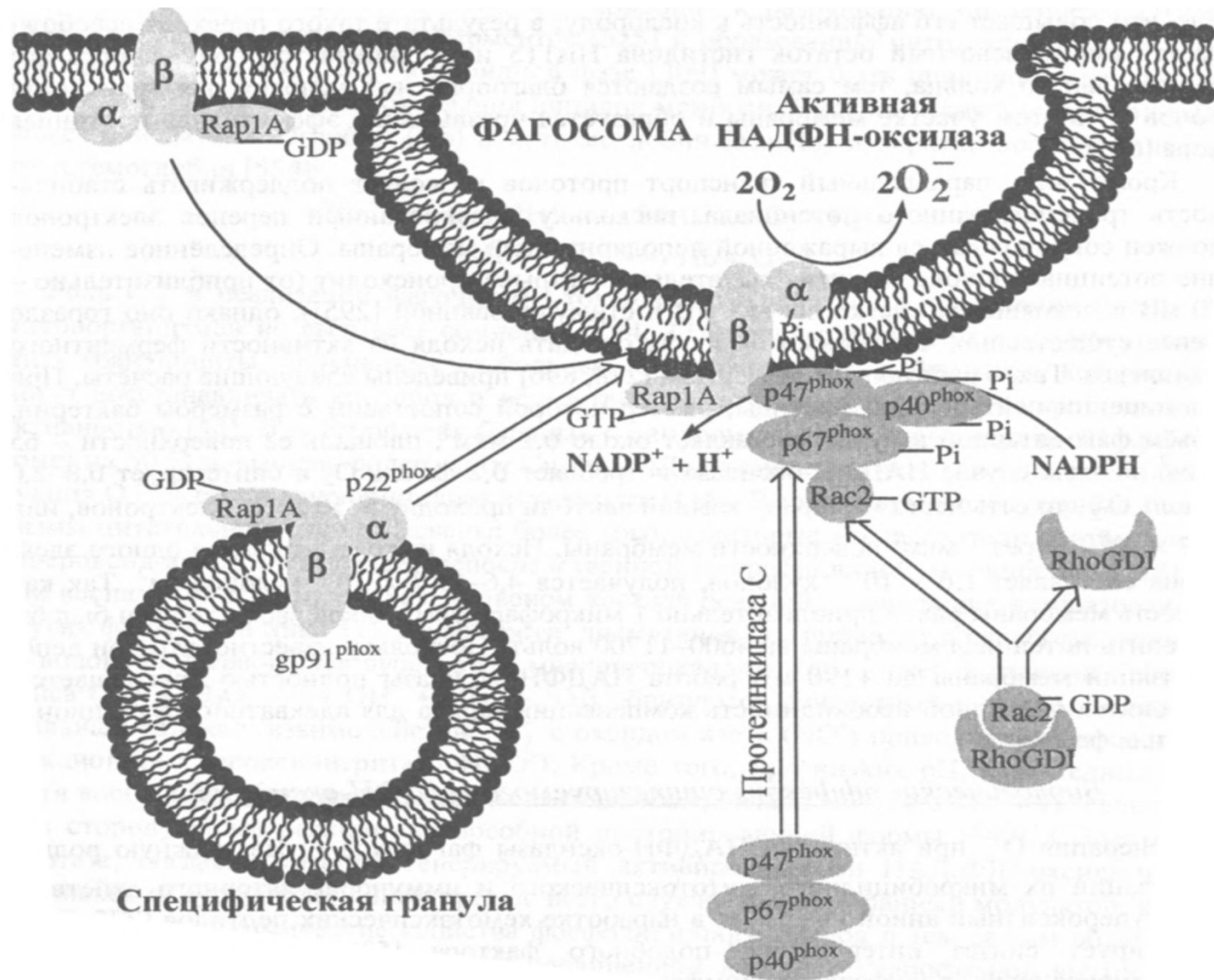
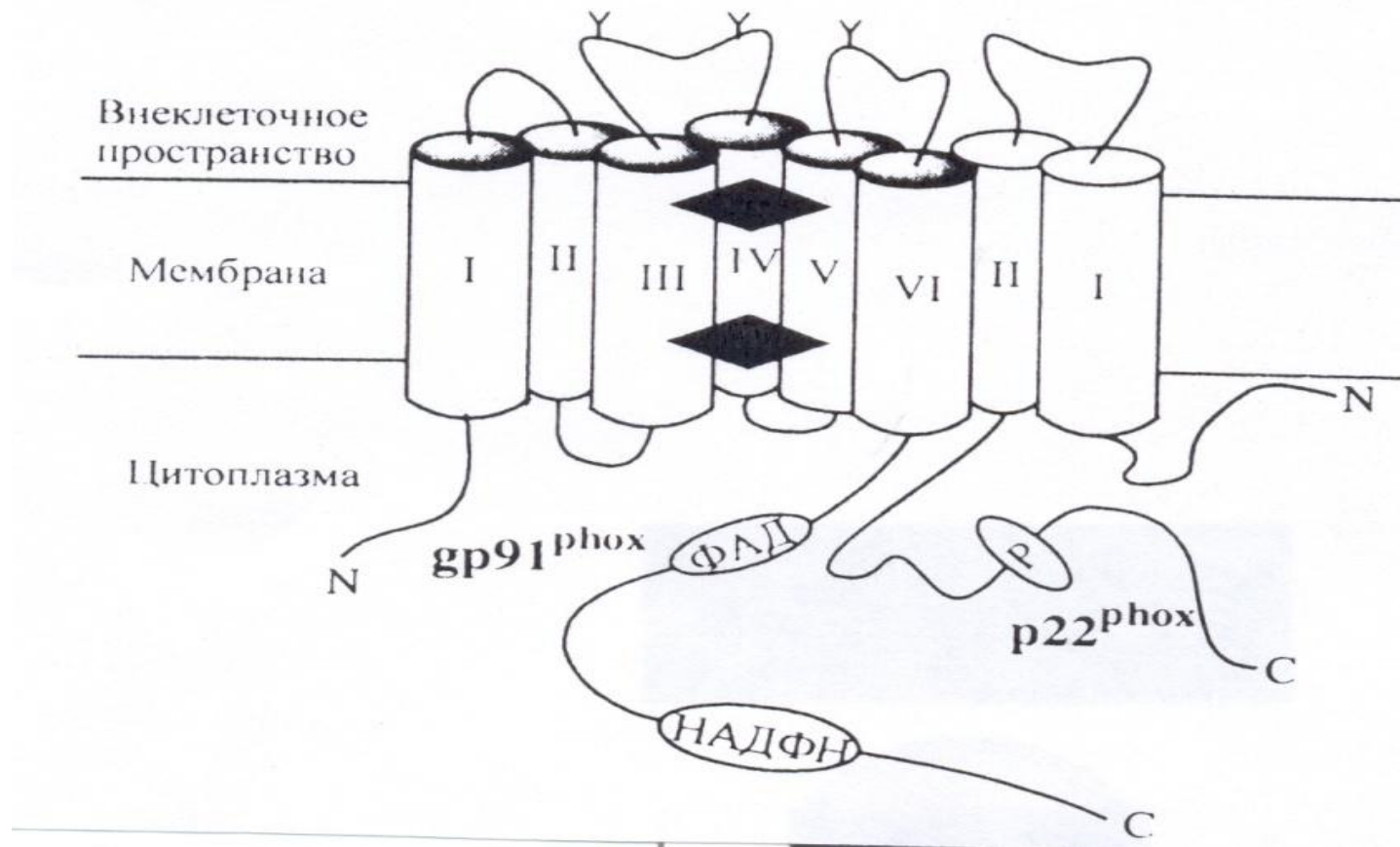
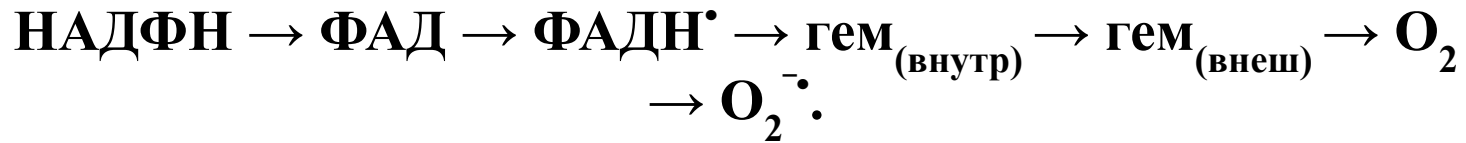


Рис. 10. Самосборка НАДФН-оксидазного комплекса при активации фагоцитов

# Структура НАДФН-оксидазы.

- 1) Состоит из **6 гетерогенных субъединиц**: 2 мембрано-связанных (gp 91, p 22) и 4 цитозольных (p47, p40, p67, Pac), которые под влиянием стимуляторов объединяются в ферментативный комплекс, генерирующий  $O_2^-$ .
- 2) Важнейший компонент НАДФН-оксидазы – **цитохром  $b_{558}$**  состоит из гликопротеина -  $\beta$ -субъединицы (gp91) и  $\alpha$ -субъединицы (p22).  $\beta$ -субъединица (gp91) содержит 6 трансмембранных  $\alpha$ -спиралей на N-конце и участки гликозилирования. C-конец имеет сайты связывания ФАД и НАДФН, в состав цит  $b_{558}$  входит 2 гема

# Модель флавоцитохрома $b_{558}$



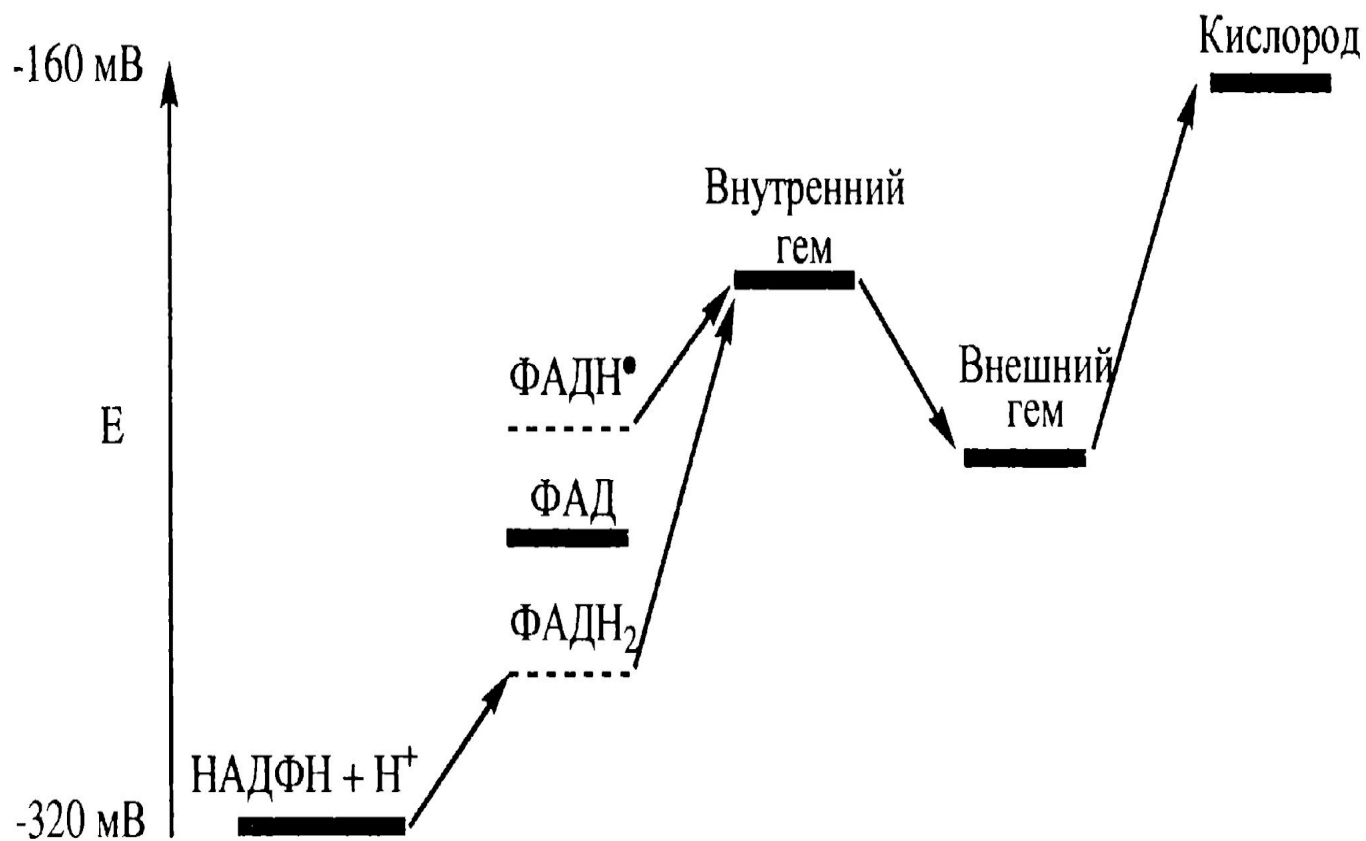
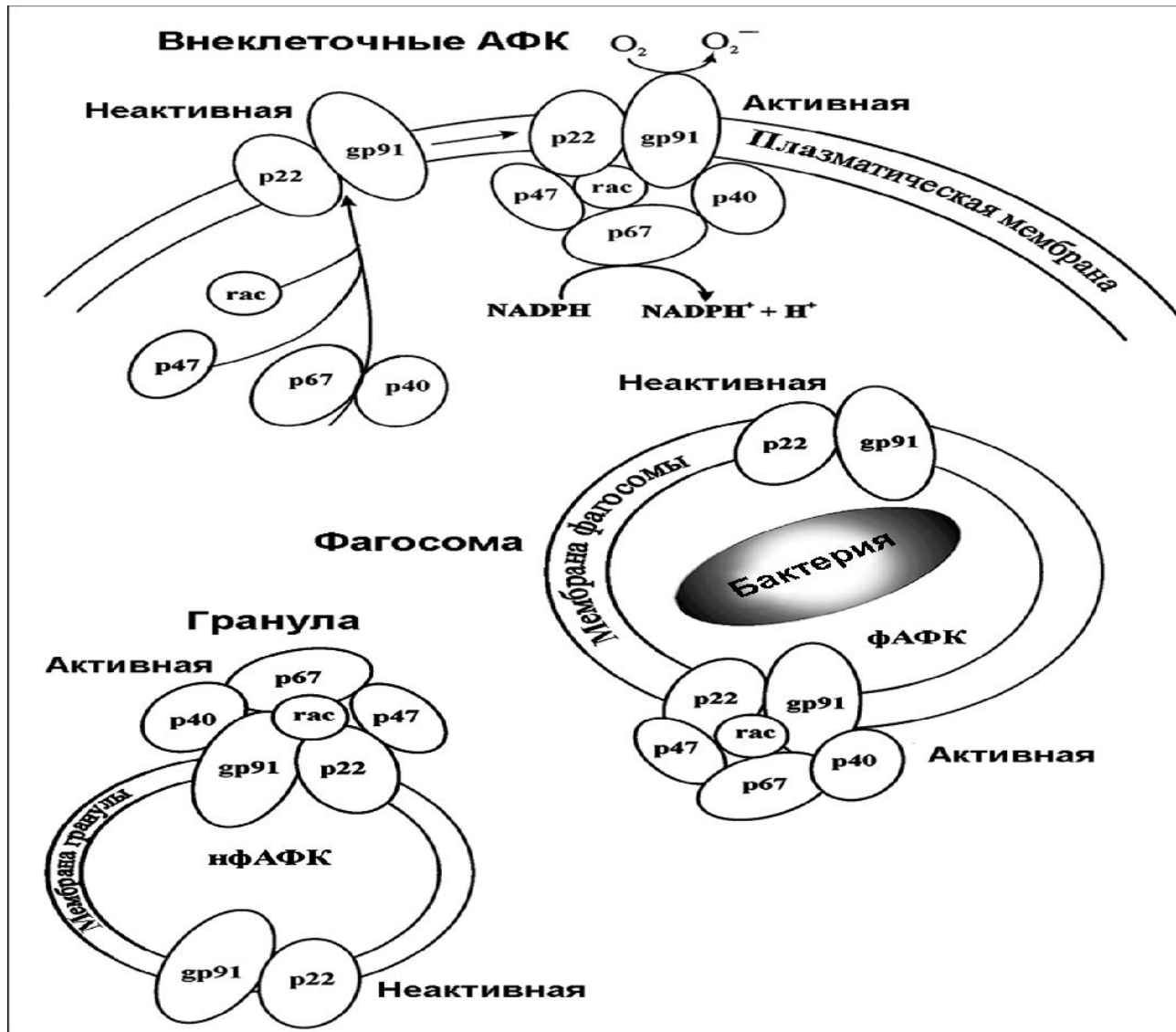


Рис. 7. Электронтранспортная цепь НАДФН-оксидазы. А – схема трансмембранного переноса электронов (указаны стандартные восстановительные потенциалы редокс-пар), Б – энергетика процесса [278, 1021]

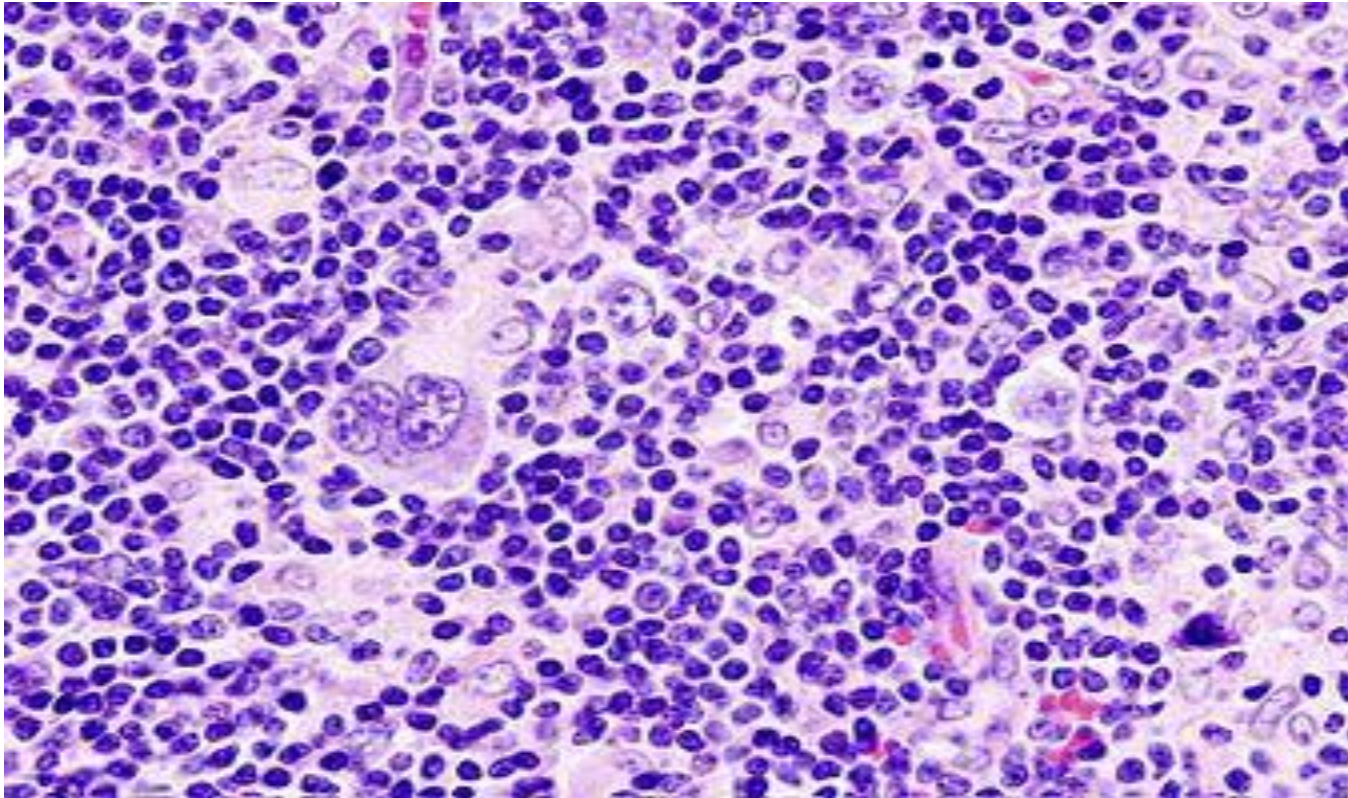
# Структура и сборка NADPH-оксидазы.



# **Роль НАДФН-оксидазы в патогенезе заболеваний.**

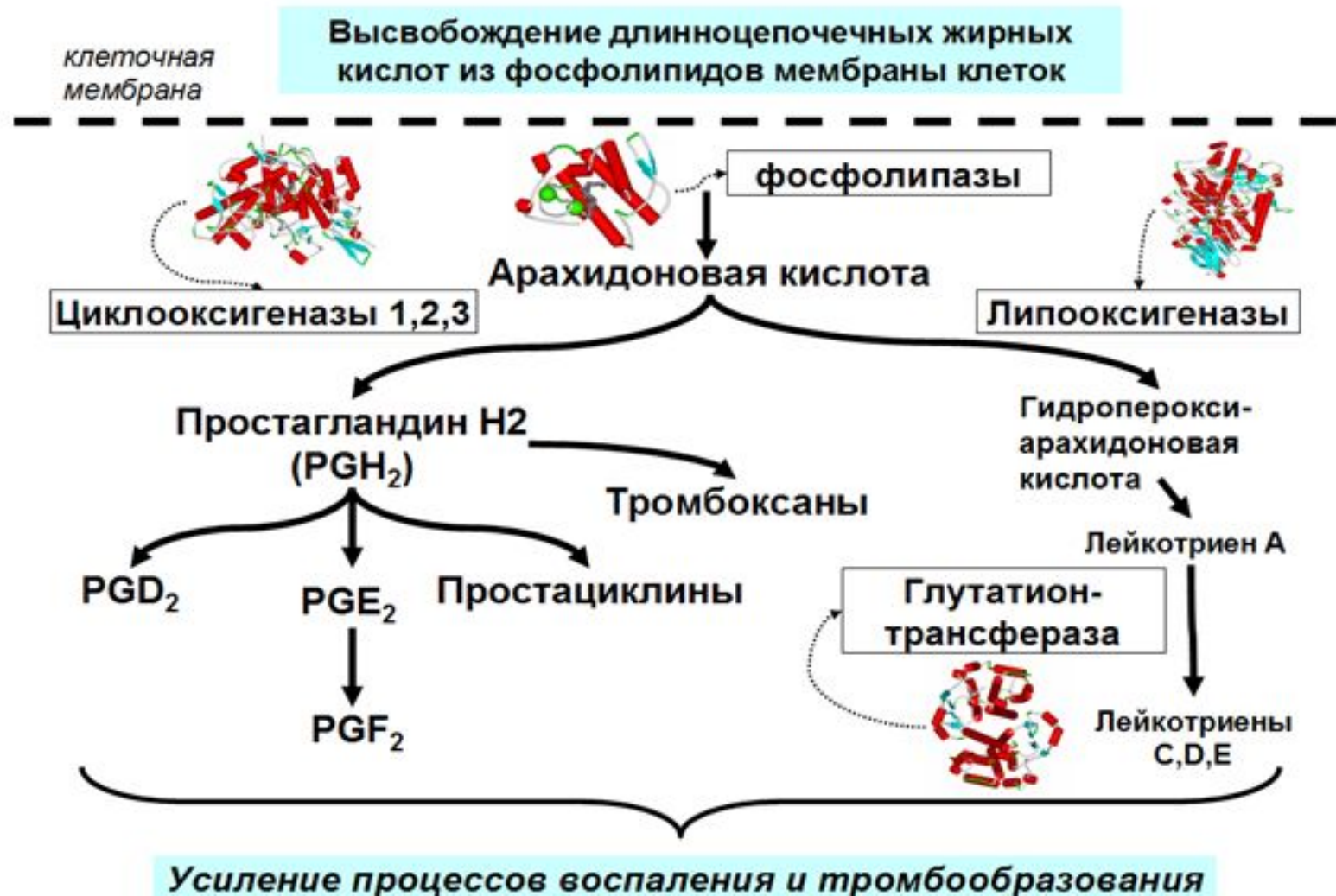
- **Хронический гранулематоз («детский фатальный хронический гранулематоз»; 1:200-250 тыс.)** – генетические дефекты субъединиц НАДФН-оксидазы, невозможность развития дыхательного взрыва лейкоцитов.
- **Лимфогранулематоз (болезнь Ходжкина, злокачественная гранулема)** – злокачественное заболевание лимфоидной ткани, характерным признаком которого является наличие **гигантских клеток Березовского-Штернберга** и ингибирование НАДФН-оксидазы.

**Микропрепарат: биоптат лимфоузла. Характерная клетка  
Рид — Березовского — Штернберга при болезни  
Ходжкина**

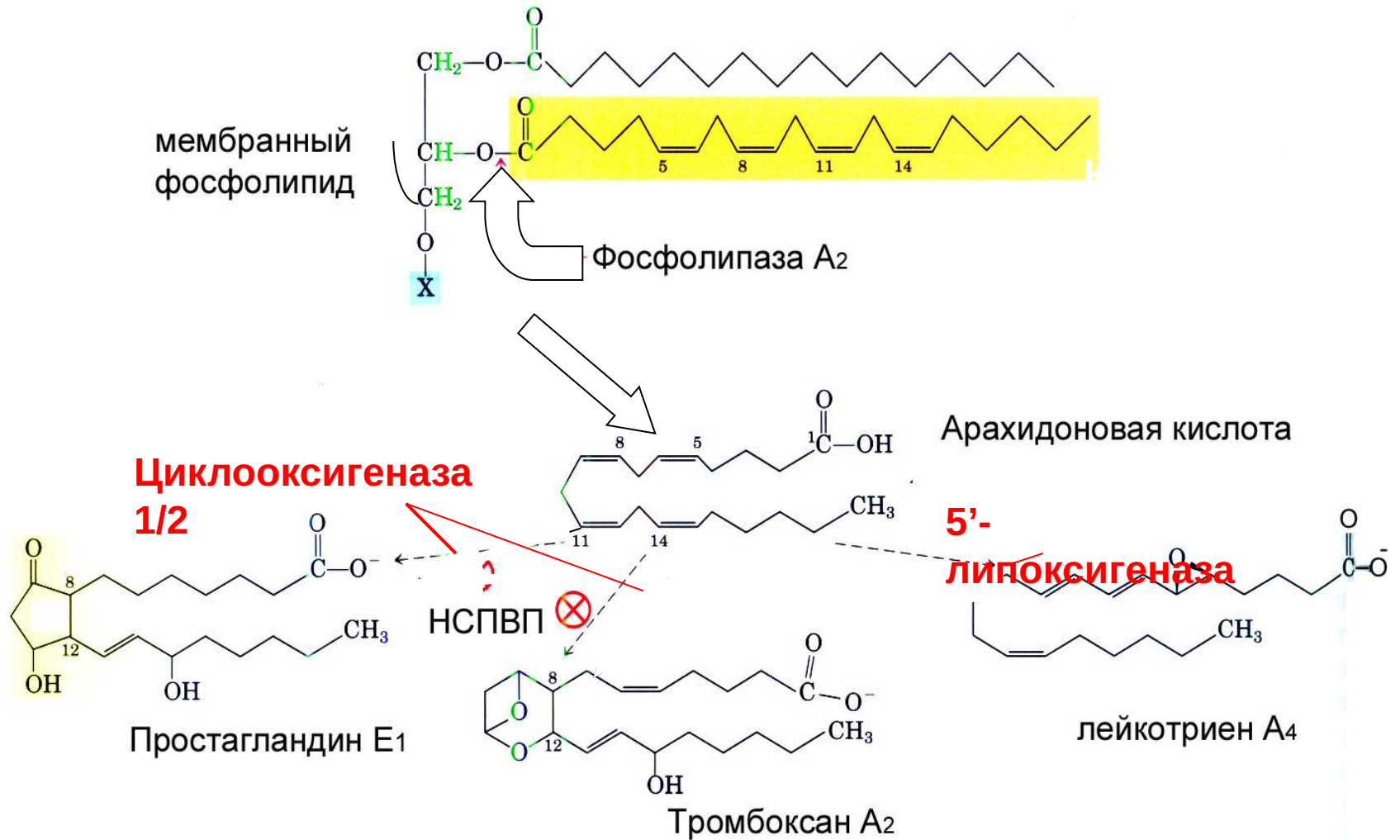




# Арахидоновый каскад – источник АФК



# Синтез эйкозаноидов из арахидоновой кислоты



# Эйкозаноиды

- В середине 30-х годов 20 века шведский ученый Эйлер (V. Euler) обнаружил в экстракте из предстательной железы (простаты) биологически активные вещества, которые он назвал **простагландинами (PG)**, полагая, что они присутствуют только в предстательной железе.
- Позже было установлено, что простагландины образуются практически во всех органах и тканях.
- В 1962 г. была расшифрована химическая структура простагландинов.
- Простагландины вместе с лейкотриенами и тромбоксанами составляют группу **эйкозаноидов** – биологически активных веществ, содержащих 20 атомов углерода (эйкоза по-гречески 20).

# Функции эйкозаноидов

- Эйкозаноиды регулируют тонус гладкой мускулатуры, влияя на артериальное давление, состояние бронхов, кишечника, матки.
- Регулируют секрецию воды и натрия почками, влияют на свертывание крови.
- Регулируют состояние слизистой оболочки желудка.
- Участвуют в формировании процесса воспаления при повреждении тканей и инфекции (боль, отек, лихорадка).
- Избыточная секреция эйкозаноидов приводит к развитию таких заболеваний как бронхиальная астма и других аллергических реакций, а также к тромбозам.
- Недостаточная секреция эйкозаноидов приводит к возникновению язвы желудка.

# Циклооксигеназный и липоксигеназный пути превращения полиеновых жирных кислот

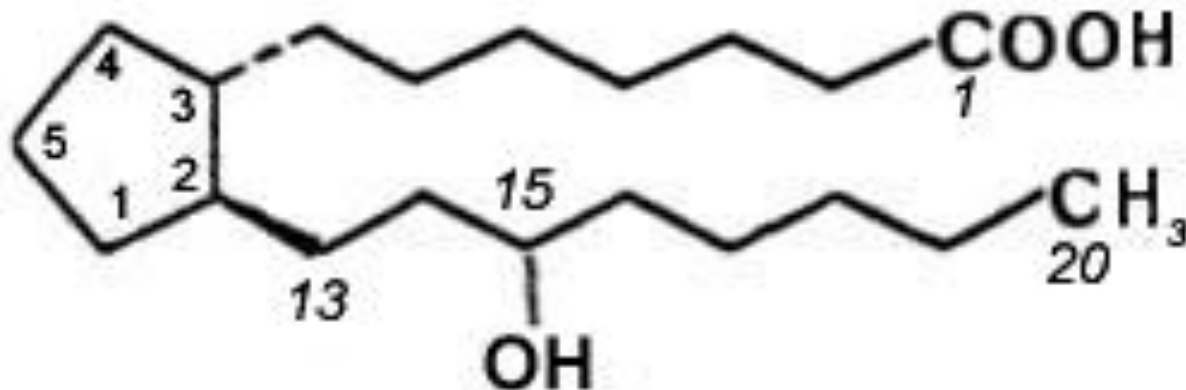
- Синтез простагландинов начинается только после освобождения полиеновых кислот из фосфолипидов мембраны. Активация этого процесса происходит под действием гормонов, цитокинов, гистамина, механического воздействия
- После освобождения полиеновой кислоты в цитоплазму в зависимости от типа клеток происходит ее превращение в простагландины (циклооксигеназный путь) или в лейкотриены (липоксигеназный путь)
- **Циклооксигеназный путь** – включение в арахидоновую кислоту 4 атомов кислорода и формирование 5-членного кольца. Образуется нестабильное гидропероксипроизводное (PGG<sub>2</sub>), которое в результате действия пероксидазы превращается в PGH<sub>2</sub> (восстановленная ОН-группа у 15 атома углерода)
- **Липоксигеназный путь** начинается с присоединения к одному из атомов углерода у двойной связи молекулы кислорода с образованием гидропероксидов

# Циклооксигеназа

- Циклооксигеназа (ЦОГ; простагландин G/H синтаза, КФ 1.14.99.1), катализирует первые 2 стадии синтеза простагландинов.
- Гомодимер из идентичных гликопротеинов (576 и 581 а.к.) с двумя активными центрами, обладающими разной ферментативной активностью. Катализирует включение в арахидоновую кислоту (АА) **4 атомов кислорода** и формирование пятичленного кольца (образование нестабильного PGG<sub>2</sub>). Затем в PGG<sub>2</sub> происходит восстановление гидропероксида у 15 атома углерода до гидроксильной группы (пероксидаза) с образованием стабильного PGH<sub>2</sub>.
- Локализована в ЭПР, каждая субъединица димера содержит **три домена**: домен фактора роста эпидермиса (34–72), мембранный домен (73–116) и каталитический домен с **пероксидазным и циклооксигеназным** активными центрами
- В активном центре циклооксигеназы – тирозин (Tyr385), в активном центре пероксидазы – гем.
- Гем находится на дне неглубокой щели. Благодаря такой структуре к гему имеют доступ многие гидрофильные соединения, препятствие обеспечивается небольшим кластером из нескольких гидрофобных аминокислот, формирующим купол над частью щели. Структура активного центра объясняет широкую субстратную специфичность пероксидазы ЦОГ, которая восстанавливает многие органические пероксиды.

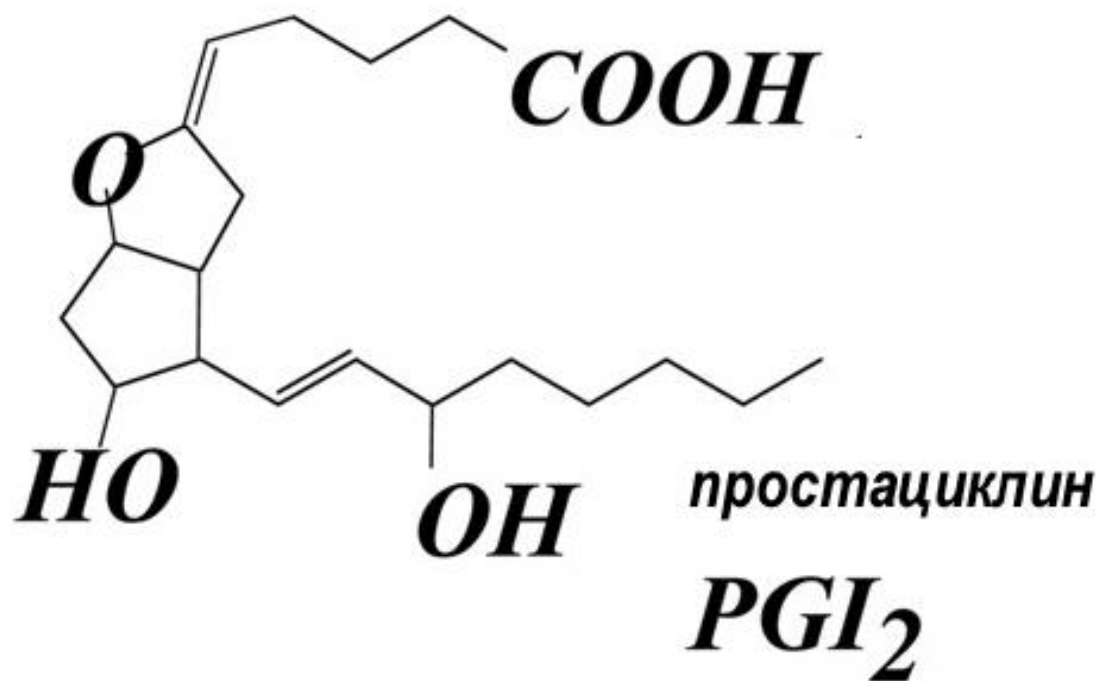
# Что такое простагландины?

- Простагландины – биологически активные вещества, являющиеся производными ненасыщенных жирных кислот, состоящие из 20 атомов углерода. Молекула простагландина содержит пятичленный цикл и две боковые цепи. Обычно в 15-м положении у них имеется гидроксильная группа.



# Простациклины PGI

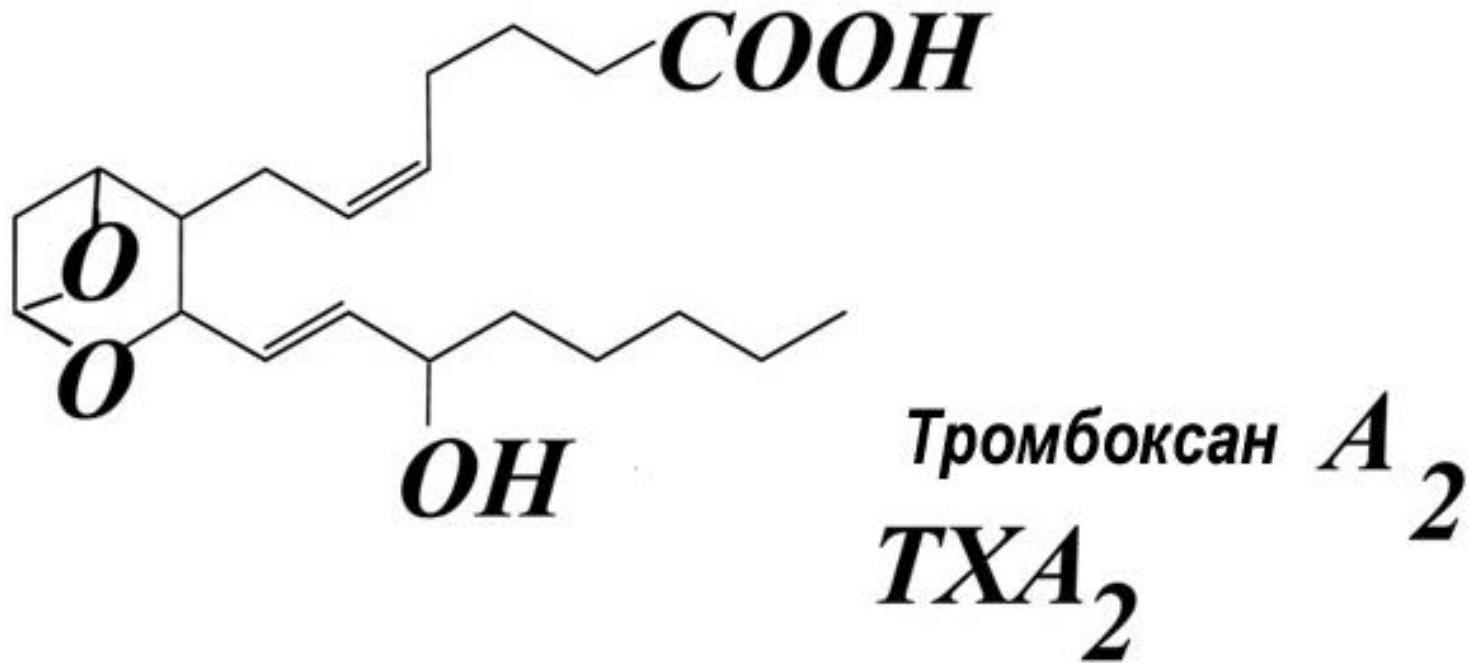
Имеют 2 кольца: одно пятичленное (как другие простагландины), а другое – пятичленное с кислородом в цикле





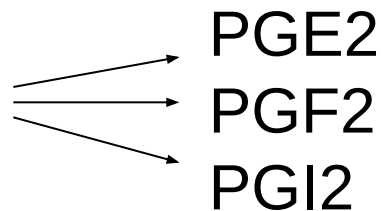
# ТРОМБОКСАНЫ

Имеют шестичленное кольцо, включающее атом кислорода, синтезируются только в тромбоцитах, стимулируя их агрегацию при образовании тромба

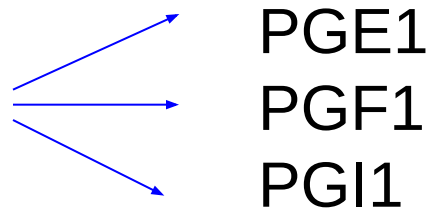


# Синтез простагландинов семейств 1, 2 и 3 из разных субстратов

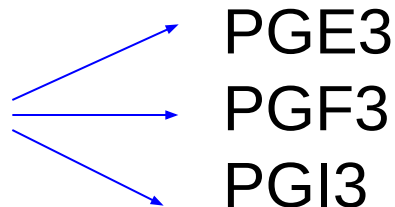
**Арахидоновая кислота**  
(20:4,  $\omega$ -6 ряд)



**Эйкозатриеновая кислота**  
(20:3,  $\omega$ -6 ряд)



**Эйкозапентаеновая кислота**  
(20:5,  $\omega$ -3 ряд)



# Изоформы циклооксигеназы (ЦОГ-2 гипотеза)

## Циклооксигеназа (ЦОГ)



**ЦОГ-1 конститутивный фермент**

**простагландин: PGE2  
и тромбоксан A2**



**Регуляция желудочно-кишечной,  
почечной, сосудистой функций**

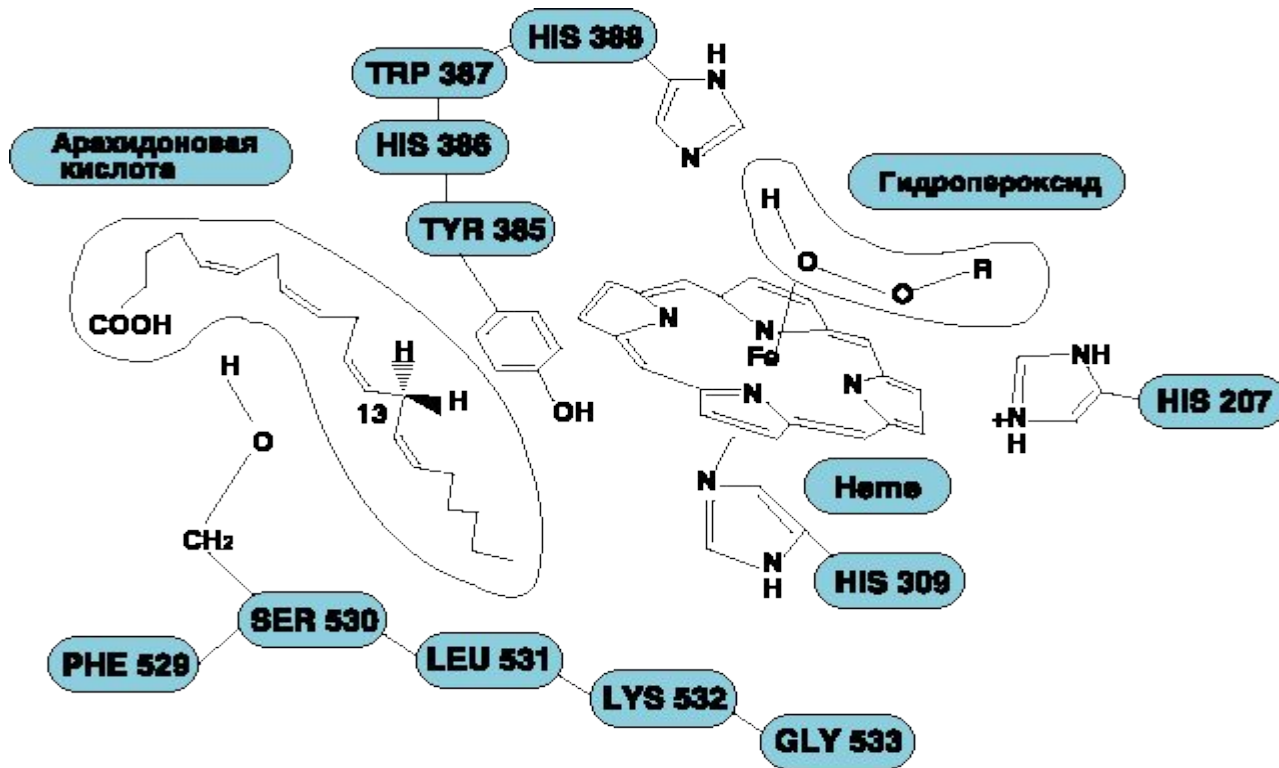
**ЦОГ-2 конститутивный фермент  
в мозге и корковом слое почек, в  
других тканях - индуцибельный  
фермент, активность которого при  
воспалении возрастает в 20-50 раз,  
время полужизни много меньше,  
чем у ЦОГ-1**



**Воспаление и боль (напр.  
ревматоидный артрит),  
активация метастатического  
перерождения клеток**

# Ингибирование циклооксигеназы ацетилсалициловой кислотой.

Необратимое ацетилирование остатка серина в положении 529 (530) в молекуле циклооксигеназы тромбоцитов человека приводит к образованию стерического препятствия для взаимодействия между этим ферментом и его субстратом арахидоновой кислотой (по Shimikawa и Smith , 1992).



# Неспецифические ингибиторы ЦОГ

- **Аспирин** – необратимо ингибирует ЦОГ-1 и ЦОГ-2 за счет ацетилирования серина вблизи активного центра (Ser530) (J. Vein, 1971)
- **Ибупрофен и ацетоминофен** – конкурентные обратимые ингибиторы обеих изоформ ЦОГ
- Считают, что терапевтическое действие этих препаратов связано в основном с ингибированием ЦОГ-1. Однако ингибирование этой изоформы обеспечивает повреждение слизистой оболочки желудка (в США за счет этого 16500 смертей в год)
- Полуселективные ингибиторы – **мелоксикам** (мовалис)

# Специфические ингибиторы изоформ ЦОГ

- Селективные ингибиторы ЦОГ-2 (вальдекоксиб, рофекоксиб, целекоксиб) были синтезированы для уменьшения токсического воздействия на желудочно-кишечный тракт.

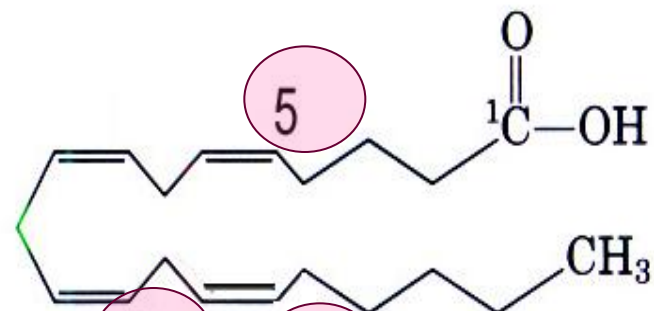
Селективность ингибиторов ЦОГ-2 увеличивается в ряду:  
рофекоксиб > валдекоксиб > парекоксиб > целекоксиб)

- Рофекоксиб был отозван фирмой Merck в связи с повышенным **риском возникновения инфаркта миокарда и инсульта**

# Лейкотриены

- **Характерная особенность лейкотриенов – отсутствие циклической структуры и наличие трех сопряженных связей (три-ен). Вырабатываются они в основном в полиморфноядерных лейкоцитах (5-липоксигеназа), хотя этот процесс происходит также в тромбоцитах (12-липоксигеназа) и эозинофилах (5-липоксигеназа).**
- **Выделяют типы лейкотриенов А, В, С, D и Е, в зависимости от количества двойных связей их делят на серии 3, 4 и 5.**

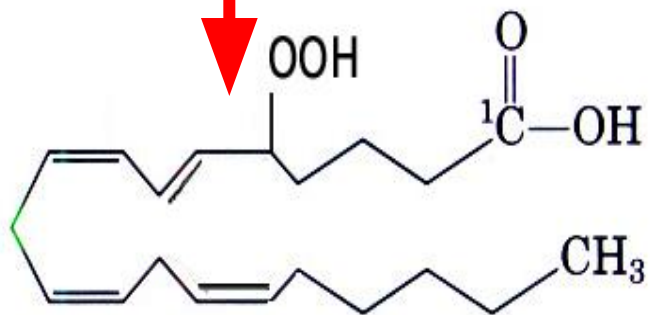
# Образование лейкотриенов



12

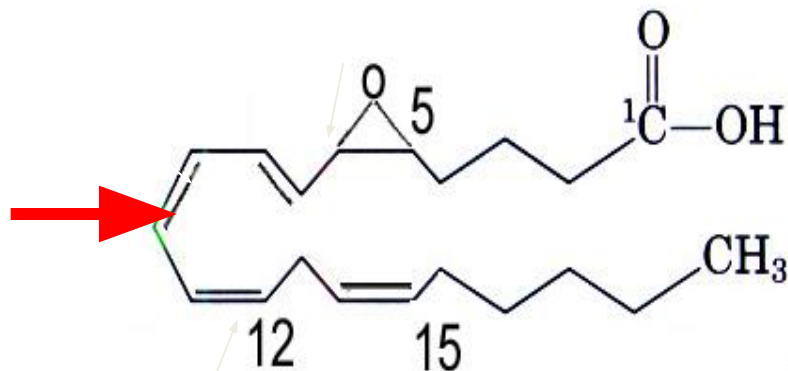
15

5-липоксигеназа



5-ГПЭТЕ (гидроксипероксид-эйкозатетраеноат)

Липоксигеназы проводят окисление 5-го, 12-го и 15-го атома углерода в зависимости от типа ткани



лейкотриен А4

Лейкотриены имеют три сопряженные двойные связи



# Функции лейкотриенов

- LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>, клетки белой крови, альвеолярные макрофаги: расширение сосудов, увеличение их проницаемости, сокращение бронхов, основной «медленный компонент анафилактической реакции»
- LXA<sub>4</sub>, лейкоциты: активация хемотаксиса и образование супероксид аниона в лейкоцитах

# Роль эйкозаноидов в развитии воспаления

- **Воспаление** – реакция организма на повреждение или инфекцию, направленная на уничтожение инфекционного агента и восстановление поврежденных тканей.
- Продукция простагландинов, а также гистамина и кининов активируется каскадами реакций, запускаемых при внедрении инфекционных агентов
- **Результат** – увеличение проницаемости капилляров, перемещение лейкоцитов через сосудистую стенку (хемотаксис). Мощным фактором хемотаксиса является лейкотриен A<sub>4</sub>.

# Биологические эффекты супероксида

- По оценкам Бэрри Холливелла, 1-3 % кислорода, поступающего при дыхании, преобразуется в  $O_2^{\cdot-}$ . в организме человека за год образуется 2 кг  $O_2^{\cdot-}$ .
- $O_2^{\cdot-}$  может быть родоначальником других свободнорадикальных интермедиатов –  $H_2O_2$ ,  $\cdot OH$ ;
- является важным компонентом неспецифической иммунной защиты;
- $O_2^{\cdot-}$  – новый внутриклеточный мессенджер, индуцирует образование пор в митохондриальной мембране и регулирует сопряжение окисления и фосфорилирования в ЭТЦ митохондрий;
- участвует в регуляции апоптоза;
- модулирует экспрессию генов;
- регулирует клеточную пролиферацию;
- участвует в биотрансформации ксенобиотиков;
- управляет процессом вазоконстрикции путем выключения сигнальной функции  $NO^{\cdot}$ ;
- участвует в метаболизме железа,  $O_2^{\cdot-}$  может повышать уровень  $Fe^{2+}$  путем мобилизации его из Fe-содержащих белков;
- $O_2^{\cdot-}$ , образуемый под контролем G-белков, регулирует хлорные каналы париетальных клеток желудка.

# **Перекись водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )**

**Главные источники перекиси водорода в организме:**

- 1. Ферментативные реакции с оксидазами, переносящими два электрона на кислород (ксантиноксидаза, оксидазы L-аминокислот, моноаминоксидаза, цитохром P-450 и др.);**
- 2. Реакции дисмутации, катализируемые СОД**

## Эффекты $\text{H}_2\text{O}_2$ в клетке.

При концентрации больше 1 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  проявляет **цитотоксические эффекты:**

- 1)  $\text{H}_2\text{O}_2$  – источник ОН-радикалов (р. Фентона, р. Габера-Вейса)
- 2)  $\text{H}_2\text{O}_2$  – субстрат ферментативных реакций образования гипогалогенитов (МПО, ЭПО, ЛПО)
- 3)  $\text{H}_2\text{O}_2$  в миллимолярных концентрациях вызывает гибель в культуре фибробластов, гепатоцитов, гладкомышечных клеток.
- 4)  $\text{H}_2\text{O}_2$  индуцирует апоптоз
- 5) Вызывает однонитевые разрывы ДНК
- 6) Вызывает деградацию гемовых белков и высвобождение  $\text{Fe}^{2+}$ , смесь  $\text{H}_2\text{O}_2$  + ВЭГ в плазме крови – **биологический реактив Фентона**
- 7) Отравление  $\text{H}_2\text{O}_2$  на уровне целого организма приводит к газовой эмболии

# При концентрациях $\text{H}_2\text{O}_2$ ниже 50 мкМ - регулятор физиологических функций и сигнальная молекула.

НАДФН-оксидазный аппарат клеток создает в крови и межклеточной среде пул  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

## Эффекты малых доз $\text{H}_2\text{O}_2$ :

- 1) активация  $\text{K}^+$ -каналов плазматической мембраны;
- 2) дозозависимое усиление окислительного взрыва нейтрофилов и макрофагов;
- 3) модуляция циклооксигеназной активности эндотелия и тромбоцитов;
- 4) участие в биосинтезе тиреоидных гормонов;
- 5) стимуляция выброса гистамина из тучных клеток;
- 6) обратимый сдвиг потенциал плазматической мембраны в сторону гипер- или деполяризации в зависимости от типа клеток;
- 7) создание определенного уровня редокс-потенциала в суставе;
- 8) является энергетически ценной молекулой: при распаде 1 М  $\text{H}_2\text{O}_2$  выделяется около 25 ккал энергии, что достаточно для синтеза 2 молекул АТФ;
- 9) вызывает SOS-ответ клетки на окислительный стресс;
- 10) участвует в редокс-сигнализации, вторичный посредник.

# SOS-ответ клетки на окислительный стресс

Показано, что обработка бактерий малыми дозами  $\text{H}_2\text{O}_2$  вызывает синтез более **30 белков** с антиоксидантными свойствами, **9** из которых находятся под контролем гена **oxyR**. Этот ген интересен тем, что регулирует собственную транскрипцию. Ген oxyR связан с белком, имеющим активный сайт, который прямо «ловит» окислители (АКМ), вследствие чего меняется конформация белка. В результате этого комплекс белок-ген распадается и белок связывается с другими генами, находящимися под его контролем. Это показано и для фибробластов человека в культуре.

**Редокс-сигнализация** – это процесс трансдукции сигнала, при котором передача информации осуществляется путем окислительно-восстановительной модификации хотя бы одного их участников сигнального каскада путем химической реакции с АФК, играющими при этом роль **вторичных посредников**. Эта реакция должна быть обратимой при физиологических условиях и/или катализироваться ферментами.

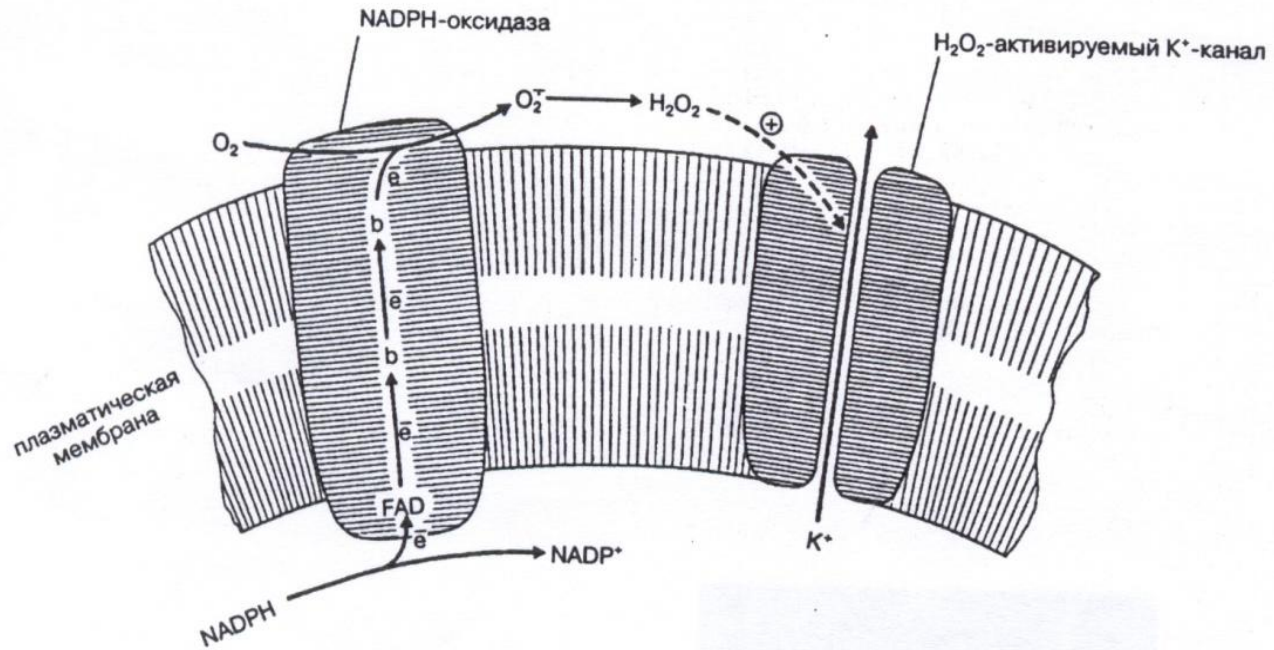
$\text{H}_2\text{O}_2$  в малых дозах может активировать транскрипционные факторы NF- $\kappa$ B, AP-1, а также ферменты сигнальных путей – тирозинкиназы, тирозинфосфатазы, митоген-активируемые протеинкиназы (MAP-киназы).



# $\text{H}_2\text{O}_2$ -сенсоры регулируют поступление кислорода в организм и образование АФК

## Строение $\text{H}_2\text{O}_2$ -сенсора в плазматической мембране клеток

Переход от отдыха к работе  $\rightarrow$  потребление кислорода в тканях  $\uparrow \rightarrow [\text{O}_2] \downarrow \rightarrow [\text{H}_2\text{O}_2] \downarrow \rightarrow \text{K}^+$ -канал  $\downarrow \rightarrow \phi \downarrow$  на клеточной мембране  $\rightarrow$  выделение серотонина  $\rightarrow$  расширение дыхательных путей.



Устройство  $\text{H}_2\text{O}_2$ -сенсора в плазматической мембране клеток нейроэпителиальных телец легкого и клеток каротидного синуса

# Жук-бомбардир и перекись водорода

