

# РОЛЬ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В ФИЗИОЛОГИИ И ПАТОЛОГИИ КЛЕТКИ И ИХ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ

УДК 615.015:616-001.8

© **В. Е. Новиков, О. С. Левченкова, Е. В. Пожилова**

ГБОУ ВПО «Смоленская государственная медицинская академия» Минздрава России, Смоленск

## Ключевые слова:

активные формы кислорода (АФК); свободнорадикальное окисление (СРО); гипоксия; ишемия; фармакологическая регуляция процессов СРО.

## Резюме

В обзорной статье представлен анализ современных научных исследований о роли активных форм кислорода (АФК) в физиологии и патологии клетки. Рассмотрены ключевые вопросы генерации АФК, их сигнальная функция, роль в патологии клетки, функционирование антиоксидантной системы. Обосновывается возможность фармакологической регуляции активности реакций свободнорадикального окисления, что имеет важное практическое значение для эффективной фармакотерапии многих заболеваний, в патогенезе которых установлено деструктивное действие АФК.

## ВВЕДЕНИЕ

Согласно современным представлениям, свободные радикалы и другие активные формы кислорода (АФК) играют значительную роль в регуляции основных функций клетки, как в обычных условиях, так и при воздействии на клетку различных патогенных факторов. При этом следует отметить, что АФК в зависимости от силы воздействующего на клетку патогенного фактора могут выступать либо индукторами процессов адаптации, либо индукторами апоптоза. Кроме того, АФК способны оказывать прямое деструктивное действие на клеточные структуры, а также инициировать свободнорадикальное окисление липидов, белков, нуклеиновых кислот, что лежит в основе патогенеза многих заболеваний [24, 29, 30]. Свои физиологические и патологические эффекты АФК реализуют в тесном взаимодействии с другими регуляторными факторами клетки, модулируя их активность [15, 39].

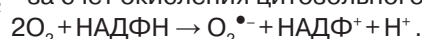
Фармакологическая регуляция активности процессов свободнорадикального окисления (СРО) занимает важное место в современных медико-биологических исследованиях, поскольку позволяет проводить эффективную патогенетическую фармакотерапию заболеваний, в генезе которых деструктивную роль выполняют АФК, например, при заболеваниях, связанных с гипоксией и реоксигенацией, ишемией и реперфузией, дегенеративных пораже-

ниях нервной системы и других [7, 14, 20]. Знание ключевых вопросов генерации АФК, их регуляторной и деструктивной роли в процессах клеточного метаболизма, функционирования антиоксидантной системы клетки необходимы для практической реализации возможности фармакологической регуляции СРО путем таргетного воздействия на отдельные компоненты и этапы этого процесса, что предполагает разработку новых лекарственных средств направленного действия и оптимизацию антирадикальной и антиоксидантной фармакотерапии.

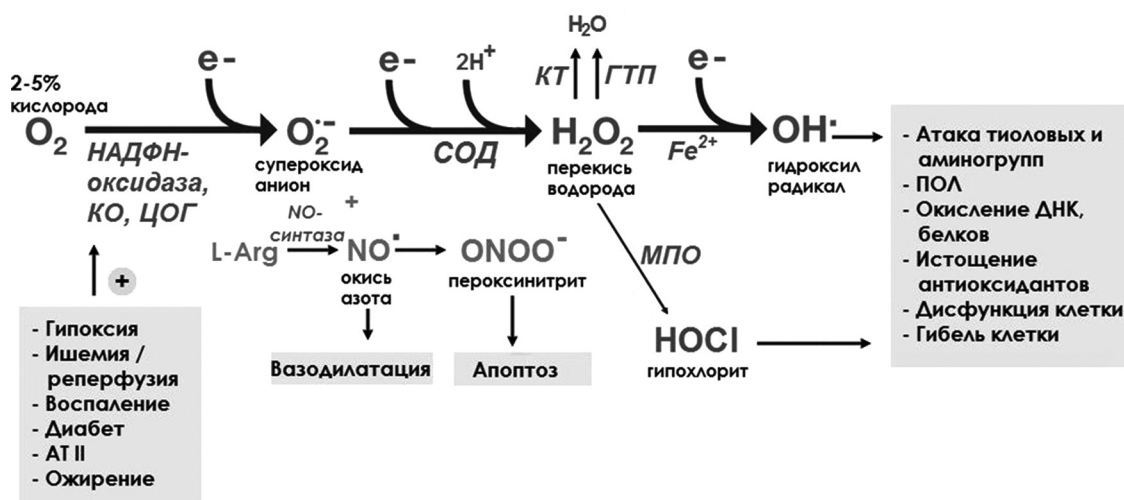
## ГЕНЕРАЦИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В КЛЕТКЕ

В клетке активные формы кислорода образуются в процессе различных окислительно-восстановительных реакций (известно большое количество ферментативных и спонтанных реакций, в результате которых образуются свободные радикалы кислорода). К АФК относятся супероксид анион-радикал ( $O_2^{\bullet-}$ ), перекись водорода ( $H_2O_2$ ), гидроксильный радикал ( $^{\bullet}OH$ ), синглетный кислород ( $^1O_2$ ), гипохлорит ( $HOCl$ ). К АФК также можно отнести окись азота ( $NO$ ) и пероксинитрит ( $ONOO^-$ ), обладающие высокой окислительной активностью.

Источники АФК в клетке хорошо известны. Одним из главных генераторов АФК в клетке являются пероксисомы, в которых локализован целый ряд ферментов, связанных с метаболизмом перекиси водорода. Перекись водорода используется клеткой в основном для детоксикации ксенобиотиков, и практически вся утилизируется внутри этих органелл. В гладком эндоплазматическом ретикулуме локализован ряд цитохром-зависимых оксигеназ, продуцирующих супероксидный радикал. В плазмалемме макрофагов и эндотелиоцитов существует НАД(Ф)Н-оксидазная система, продуцирующая супероксид анион в ходе иммунного и воспалительного ответа. При этом фагоциты быстро поглощают большое количество  $O_2$  (дыхательный «взрыв»), образуя с внешней стороны мембраны супероксид  $O_2^{\bullet-}$  за счет окисления цитозольного НАД(Ф)Н:



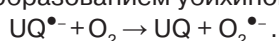
Дыхательная цепь митохондрий служит основным источником активных форм кислорода в клетках [1]. Это объясняется тем, что в дыхательной цепи проис-



■ Рисунок 1. Образование активных форм кислорода и их воздействие на клетку

КО — ксантинооксидаза, ЦОГ — циклооксигеназа, АТ II — ангиотензин II, L-Arg — L-аргинин, СОД — супероксиддисмутаза, КТ — каталаза, ГТП — глутатионпероксидаза, МПО — миелопероксидаза, ПОЛ — перекисное окисление липидов

ходит «утечка» электронов с I и III митохондриальных ферментных комплексов (МФК), за счет чего около 2–5% поступающего кислорода переходит в активную форму, при этом часть АФК идет на окислительную модификацию макромолекул. Продукция  $O_2^{\bullet-}$  в митохондриях осуществляется несколькими путями и значительно зависит от активности дыхания и изменений парциального напряжения кислорода (гипоксия или реоксигенация). Основным местом утечки электронов из дыхательной цепи и, следовательно, образования  $O_2^{\bullet-}$  является убихинол цитохром С оксидоредуктаза, где генерация АФК происходит за счет одноэлектронного восстановления молекулярного кислорода от убисемихинона [32]. В НАДН-убихинон-редуктазе источником  $O_2^{\bullet-}$  служит семихиноновая форма флавина. При изменении интенсивности потока электронов и степени восстановленности компонентов дыхательной цепи митохондрий изменяется и количество выпадающих электронов. Так, например, в присутствии цианида и ротенона продукция супероксида понижается, а при добавлении ингибитора комплекса III антимицина А (приводит к увеличению пула семихинонов), образование АФК вследствие окисления субстрата I или II комплексами увеличивается. Таким образом, одним из главных источников активных форм кислорода в митохондриях является Q-цикл. В двух Q-связывающих сайтах комплекса III происходит генерация убисемихинон анион-радикала, который способен реагировать с молекулярным кислородом с образованием убихинона и супероксида:



АФК реакционноспособны и легко переходят из одной формы в другую, окисляя при этом различные молекулы. Так, в результате утечки электронов из дыхательной цепи и в реакциях НАД(Ф)Н-оксидазы и ксантин-оксидазы первым образуется супероксид анион-радикал, который очень быстро дисмутирует до перекиси водорода (рис. 1).

Перекись водорода является самым стабильным соединением из возможных восстановленных форм кислорода и обладает меньшей реакционной способностью, нежели другие формы. Молекула  $H_2O_2$  способна свободно перемещаться в клетке и довольно долго сохраняться в ней. Перекись водорода не столь активна, чтобы существенно повредить клеточные структуры, и играет роль сигнальной молекулы. При этом в присутствии активаторов (металлов переменной валентности, главным образом  $Fe_2^+$ , а также  $Cu_2^+$  и др., входящих в состав ряда ферментов) из перекиси и супероксида образуется гидроксильный радикал. Гидроксильный радикал является самым опасным и обладает наивысшей реакционной способностью среди всех АФК [1]. Он мог бы разрушить практически все клеточные структуры, но имеет очень короткое время жизни (несколько наносекунд) и не способен диффундировать на значительные расстояния от места образования. Супероксид анион способен реагировать с оксидом азота (II) с образованием активного оксиданта пероксинитрита. При избытке супероксида он может переводить трехвалентное железо в двухвалентное, которое при взаимодействии с  $H_2O_2$ , HOCl и липоперекисями образует гидроксильный радикал ( $\bullet OH$ ) или липидные радикалы ( $L^{\bullet}$ ,  $LO^{\bullet}$ ,  $LOO^{\bullet}$ ).

АФК можно разделить на три типа:

- Первичные (индуцирующие) образуются при окислении некоторых молекул. К ним относятся супероксид анион  $O_2^{\bullet-}$  и оксид азота NO. Обладают регуляторным действием.
- Вторичные образуются вследствие атаки супероксида других молекул. К ним относятся гидроксильный радикал, пероксинитрит и радикалы липидов. Обладают сильным токсическим действием вследствие своей способности необратимо повреждать липиды мембран, молекулы ДНК и белков.

- Третичные образуются вследствие соединения вторичных радикалов с молекулами антиоксидантов и других легко окисляющихся соединений. Их роль может быть различной.

Раньше полагали, что АФК являются исключительно токсичными для клетки метаболитами и поэтому в клетке существует мощная антиоксидантная система для борьбы с ними. Однако по мере изучения их функциональной роли стало ясно, что АФК не всегда пагубно влияют на клетку.

### **СИГНАЛЬНАЯ РОЛЬ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА**

К настоящему времени накопилось немало сведений о сигнальной роли АФК. Они принимают участие в передаче внутриклеточных сигналов от различных факторов роста, способны изменять активность различных транскрипционных белков [27]. Так, например, есть данные, что АФК участвуют в качестве сигнальных молекул при активации транскрипционных ядерных факторов AP-1 (активирующий протеин-1) и NF-κB (nuclear factor κB — ядерный фактор каппа-би) и индукции экспрессии генов при иммунном ответе. АФК могут выступать в качестве индукторов клеточной гибели (апоптоза) или, наоборот, ингибировать цитотоксическое действие лекарственных препаратов на опухолевые клетки [33]. Возможно, что АФК могут выступать в роли митотических стимуляторов, в небольших концентрациях стимулируя деление клеток различных тканей.

Существуют также данные об участии АФК в регуляции редокс-статуса клетки и окислительных модификаций белков. Регуляция редокс-сигнализации может осуществляться как через общий уровень глутатиона (GSH) в клетке, так и через соотношение GSH/GSSH. Глутатион (трипептид Glu-Cys-Gly) находится почти во всех клетках в высокой концентрации и содержит нетипичную γ-связь между Glu и Cys. Восстановителем в этом соединении является тиольная группа цистеинового остатка. Две молекулы восстановленной формы (GSH) при окислении образуют дисульфид (GSSG). Окислительные модификации затрагивают, как правило, остатки цистеина в функциональных доменах различных белков, приводя к инактивации ферментов, изменению способности связывания транскрипционных факторов с ДНК и другим функциональным нарушениям. При понижении уровня восстановленного глутатиона нарушается проведение сигнала от ряда рецепторов факторов роста и связывание транскрипционных факторов с ДНК, подавляется рост и размножение клеток. АФК участвуют в начальных этапах клеточной сигнализации (редокс-сигнализация) в условиях стресса, гипоксии, воспаления и других патологических состояний. Характер клеточного ответа при этом будет зависеть от продолжительности и интенсивности воздействия вышеперечисленных факторов. При умеренном воздействии формиру-

ется неспецифический ответ, повышающий адаптацию организма к новым условиям. Механизм протекторного действия заключен, по-видимому, в окислительно-восстановительных модификациях сульфгидрильных групп сенсорных белков, что приводит к активации тирозинкиназного пути клеточного ответа. При воздействии высокой интенсивности, например, при глубокой гипоксии наступает некроз тканей, в том числе и за счет прямого повреждающего действия АФК, активирующих перекисное окисление липидов и других биологических молекул [23, 24].

Одним из важнейших следствий инициации редокс-сигнализации и АФК-опосредованной передачи сигнала является активация ядерных факторов транскрипции, которые находятся в неактивном состоянии до тех пор, пока в их молекуле не произойдет отщепление ингибиторного домена. После этого ядерные факторы транскрипции оказываются способными индуцировать многочисленные гены. Среди известных к настоящему времени белков, которые синтезируются в ответ на редокс-сигнал от адаптирующего фактора, наибольшее значение имеет, прежде всего, ряд неспецифических молекул, таких как ферменты антиоксидантной защиты, белки семейства HSP и другие белки срочного ответа, которые могут синтезироваться в ответ на гипоксию, стресс, ишемию, реперфузию и т. д. [8, 40].

В процессе адаптации клетки к гипоксии АФК способствуют активации митохондриального АТФ-чувствительного калиевого канала и системы выброса калия из митохондрий, осуществляемого обычно  $K^+/H^+$ -обменником, что свидетельствует об активации калиевого цикла в митохондриях [18, 48]. В то же время известно, что активация калиевого цикла способствует слабому разобщению митохондрий, которое ведет к снижению мембранного потенциала. А даже незначительное снижение мембранного потенциала ведет к существенному уменьшению продукции супероксид аниона [36].

Таким образом, АФК выполняют сигнальную роль в регуляции основных функций клетки, а также участвуют в ауорегуляции образования свободных радикалов кислорода в митохондриях в условиях гипоксии.

### **РОЛЬ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В ПАТОЛОГИИ КЛЕТКИ**

Митохондрии более всех других органелл подвержены атаке АФК и, как следствие, повреждению мембранных липидов, белков, ДНК и даже гибели. Причем для гибели митохондриям не требуется никаких дополнительных белков, кроме тех, которые присутствуют в них самих.

Митохондрии обладают системой защиты от АФК, которая включает ферменты супероксиддисмутазу (нейтрализация супероксид-аниона в перекись во-

дорода), пероксидазу и глутатионпероксидазу (деградация перекиси водорода), а также глутатион, восстановленную форму коэнзима Q, аскорбиновую кислоту и другие низкомолекулярные антиоксиданты. Когда митохондрии перестают справляться с проблемой детоксикации образуемых ими АФК, несмотря на перечисленные механизмы защиты, то в клетке развивается так называемый «окислительный стресс». В результате избыточного образования кислородных радикалов, последние начинают выполнять в основном деструктивные функции, нежели служат в качестве сигнальных молекул. Происходят специфические изменения клеточных компонентов: повреждаются мембранные структуры из-за перекисного окисления липидов (ПОЛ), происходит окисление белков по остаткам тирозина, цистеина и серина, повреждение ДНК, смещение редокс-потенциала клетки из-за окисления глутатиона и НАД(Ф)Н. Наблюдается разрушение митохондриальных структур от мембраны до митохондриальных ДНК (мтДНК) [30, 41].

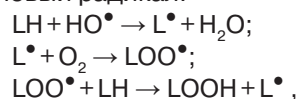
Окислительный стресс является причиной множества дегенеративных заболеваний, старения и гибели клетки. Активные формы кислорода, образующиеся в митохондриях, рассматриваются в качестве основного фактора развития внутриклеточного окислительного стресса под воздействием гипоксии, ишемии и реперфузии [10, 27]. Образование АФК с участием митохондрий играет важную роль в индукции апоптоза при патофизиологических процессах в нейронах, кардиомиоцитах, а также в процессе старения. Считается, что предрасположенность нервной ткани к окислительному стрессу связана с высоким уровнем окислительного метаболизма и повышенной генерацией кислородных радикалов, большим содержанием липидов и прооксидантов, относительно низкой активностью антиоксидантных систем и наличием нейронов с высоким содержанием NO-синтазы [25]. Повышение продукции АФК в митохондриях при недостатке антиоксидантов, например, при ишемии головного мозга, приводит к повреждению электронтранспортной цепи митохондрий, к снижению синтеза АТФ и связанному с этим понижению активности АТФ-зависимых ферментов.

АФК оказывают повреждающее действие, прежде всего, на мембраны митохондрий. В частности, под действием АФК в белке внутренней мембраны митохондрий, который обеспечивает сопряженный перенос АТФ/АДФ, происходит окисление SH-группы Cys-56, что способствует образованию неспецифического митохондриального канала (mPTP), проницаемого для низкомолекулярных веществ [21, 37]. АФК значительно влияют на концентрацию ионов кальция в матриксе митохондрий и цитоплазме клеток, провоцируя закачку  $Ca^{2+}$  в цитоплазму из внеклеточного пространства и внутриклеточных депо, а в матрикс — из цитоплазмы, путем активации кальциевых транспортеров [34].

Митохондриальная ДНК (мтДНК) является еще одной уязвимой мишенью для патогенного действия АФК. Высокая концентрация активных форм кислорода в митохондриях и слабая система репарации этих органелл увеличивают частоту мутаций мтДНК по сравнению с ядерной ДНК. Радикалы кислорода служат причиной специфических замен в молекуле ДНК. Так, гидроксил-радикал оказывает повреждающее действие на ДНК вследствие окисления оснований, их модификации, повреждения хромосом. Подобные мутации могут привести к патологии и гибели клетки или её злокачественному перерождению. Повреждение мтДНК особенно опасно в связи с постепенным накоплением мутаций, длительным эффектом АФК. В митохондриальном геноме закодирован ряд важнейших уникальных митохондриальных белков, и повреждение ответственных за них генов приводит к нарушениям в их экспрессии и последующем функционировании. Установлена четкая корреляция между возрастом и накоплением мутаций в мтДНК, падением эффективности дыхания и увеличением продукции АФК, что легло в основу митохондриальной теории старения [45].

Свободные радикалы кислорода и продукты ПОЛ, образование которых они индуцируют, играют одну из ведущих ролей в патогенезе отека-набухания головного мозга и метаболических нарушений в мозговой ткани в посттравматический и постшемический периоды [20, 30].

В условиях развития окислительного стресса не очень токсичная молекула пероксида водорода в присутствии двухвалентного железа может генерировать гидроксильный радикал или превращаться в гипохлорит-анион ( $OCl^-$ ) ферментом миелопероксидазой. Как гипохлорит-анион, так и гидроксил-радикал являются сильными окислителями. Они способны модифицировать белки, нуклеиновые кислоты, индуцировать ПОЛ, которому наиболее сильно подвергаются полиненасыщенные жирные кислоты, входящие в состав липидов мембран. При перекисном окислении липидов кислородный радикал, чаще всего это бывает гидроксил-радикал, который хорошо проникает в мембраны, будучи незаряженным, отнимает атом водорода от молекулы жирной кислоты с образованием перекисного радикала жирной кислоты. Этот радикал запускает цепную реакцию, взаимодействуя с другой жирной кислотой, в ходе которой образуются перекись кислоты и новый радикал:



и так далее. Такая цепная реакция затрагивает значительное количество клеточных липидов, в результате чего повреждаются мембраны. Кроме того, может происходить и амплификация окислительного повреждения за счет распада гидроперекисей на два новых радикала, каждый из которых запускает свою цепь [43].



В рамках общей концепции окислительного стресса большое значение имеет феномен АФК-индуцированного образования АФК [49]. Согласно этому феномену небольшие количества индуцирующих АФК приводят к падению трансмембранного потенциала и активной генерации вторичных АФК, что ведет к развитию «окислительного взрыва». Предположительно в ходе АФК-индуцированного образования АФК происходит окисление белков и регуляторных тиолов, которые изменяют редокс-статус клетки, иницируя неспецифическую проницаемость мембран. Изменение неспецифической проницаемости носит обратимый характер, но все же приводит к нарушению функционирования электрон-транспортной цепи, изменению свойств мембран и, в конечном счете, к «окислительному взрыву».

При повреждении МФК I дыхательной цепи происходит прямое окисление белков, разрушение железосерных кластеров, нитрозилирование и глутатионилирование, вследствие чего значительно снижается его активность. Такие изменения наблюдаются, например, при ишемической болезни сердца и ишемии-реперфузии. АФК разрушают белки, разделяя их на меньшие пептиды. Это происходит следующим образом. Гидроксильный радикал отнимает протон от -CH(R)- группы белка, образуя воду. Образовавшийся алкил-радикал может связаться со вторым алкил-радикалом, либо прореагировать с кислородом, образовав алкил-пероксид радикал. Далее алкил-пероксид радикал, присоединяя протон, образует алкил-пероксид. Протон он получает, реагируя либо с  $Fe^{2+}$ , либо с пероксильным радикалом ( $HO_2^{\bullet}$ ). Алкил-пероксид белка может реагировать с таким же пероксидом (дисмутация), высвобождая кислород и образуя алкокси-белок. Алкокси-белок может также образовываться путем восстановления алкил-пероксида либо  $Fe^{2+}$ , либо пероксильным радикалом. В итоге исходный белок разделяется на более мелкие пептиды, что приводит к его дисфункции.

Примером действия АФК в условиях их избыточного образования может служить реперфузия миокарда или сосудов мозга после периода ишемии (инфаркт миокарда или инсульт головного мозга), сопровождающаяся развитием повреждений, сопоставимых или даже превышающих по степени возникшие в результате самой ишемии. Механизм образования АФК при реперфузии, вероятно, обусловлен созданием условий, благоприятствующих образованию вторичных радикалов. Во время ишемии парциальное напряжение кислорода в кардиомиоцитах резко снижается, и это сопровождается переходом окисленных атомов железа  $Fe^{3+}$  в восстановленные  $Fe^{2+}$ , а также повышением активности ксантиноксидазы. Оба эти компонента при появлении в цитоплазме больших количеств кислорода в начале реперфузии резко активируют образование  $\bullet OH$ , и возникающее под действием этого

радикала повреждение клеточных структур может приобретать необратимый характер с развитием апоптоза.

Самым распространенным патологическим состоянием, приводящим к значительной вспышке продукции АФК, является гипоксия и последующая реоксигенация. При продолжительной гипоксии существенно изменяется активность ряда клеточных ферментов, происходит истощение и повреждение антиоксидантных защитных систем, и быстрое восстановление компонентов дыхательной цепи за счет обращения АТФ-синтазной реакции, используемой для создания протонного градиента в условиях недостатка кислорода. В результате всех этих изменений при последующей реоксигенации утечка электронов с комплексов дыхательной цепи и генерация супероксид-радикала значительно увеличивается [39].

В условиях нормоксии повышенная генерация активных форм кислорода, приводящая к окислительному стрессу, наблюдается обычно только в очагах воспаления [11]. В данном случае процесс генерации АФК обусловлен функциональной активностью НАДФН-оксидазных систем макрофагов и является жестко регулируемым, оказывая деструктивное влияние только на те клетки, на которые направлена иммунная реакция.

## АНТИОКСИДАНТНАЯ СИСТЕМА КЛЕТКИ

Поскольку образование АФК в клетках аэробных организмов происходит непрерывно, то в клетках существует защитная система против их пагубного влияния. Защита клетки от избытка кислородных радикалов и вызванных ими окислительных повреждений осуществляется функционированием антиоксидантной системы, которая включает антиоксидантные ферменты, низкомолекулярные соединения, образующие редокс-буфер, витамины, альбумины, свободные жирные кислоты и комплексоны ионов металлов.

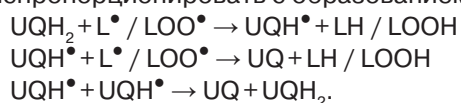
К антиоксидантным ферментам, нейтрализующим АФК, относятся супероксиддисмутаза (СОД), каталаза и пероксидаза. СОД катализирует дисмутацию двух молекул супероксида с образованием перекиси водорода и  $O_2$ . Изоформы этого фермента присутствуют во всех клеточных компартментах, где возможно образование супероксида. Образующаяся при дисмутации супероксида перекись водорода нейтрализуется каталазой или глутатион-тиоредоксин-пероксидазами в пероксисомах.

Внутриклеточный редокс-статус обеспечивается системой тиолов, в первую очередь глутатиона (GSH) и тиоредоксина (TRX), которые создают буферную систему для поддержания более восстановленных по сравнению с внеклеточной средой условий. Глутатион является важнейшим антиоксидантом в клетке, участвует в поддержании редокс-статуса за счет нейтрализации перекиси водорода:  $H_2O_2 + 2GSH \rightarrow 2H_2O + GSSG$ . Регенерация восстановленного глута-

тиона (GSH) из глутатион-дисульфида (GSSG) происходит с помощью глутатион-редуктазы:  $GSSG + НАДФН + H^+ \rightarrow 2GSH + НАДФ^+$ . В условиях окислительного стресса из-за быстрого окисления глутатиона соотношение GSH/GSSG падает, но может быстро восстанавливаться до исходного уровня. В случае истощения GSH в какой-либо ткани, его обеспечение может происходить за счет выброса в кровь из депо (печень) [47]. Тиоредоксин действует как восстановитель дисульфидных связей в белках и донор электронов для TRX-пероксидазы, при этом не оказывает влияния на продукцию АФК или количество восстановленного глутатиона. Восстанавливается тиоредоксин с помощью тиоредоксин-редуктазы и НАДФН [38].

Свободнорадикальные процессы образования гипохлорит-аниона и гидроксил-радикала локализованы в цитоплазме и контролируются цитоплазматическими ферментами или природными водорастворимыми антиоксидантами. Например, таурин способен связывать гипохлорит-анион в форме хлораминового комплекса, дипептид карнозин и его производные нейтрализуют гидроксил-радикал. Большое значение для предотвращения ПОЛ, инициируемое в гидрофобном пространстве клеточных мембран, и уничтожения радикалов жирных кислот имеет локализованный в мембранах  $\alpha$ -токоферол (витамин Е). Его высокая концентрация в биологических мембранах препятствует их повреждению свободными радикалами. Токоферол обрывает цепные реакции образования липидных пероксидов, превращаясь в радикал, который регенерирует как с помощью активных водорастворимых восстановителей типа аскорбата и глутатиона, так и с помощью гидрофобного убихинола.

Активное участие в предотвращении окисления мембранных белков и липидов клетки принимает убихинол ( $UQH_2$ ), являющийся также как и убихинон (UQ), одной из форм коэнзима  $Q_{10}$ . С точки зрения антиоксидантной защиты убихинол является самой эффективной формой коэнзима  $Q_{10}$ . Для нейтрализации свободных радикалов убихинол отдает электрон, в отличие от убихинона, который, наоборот, принимает его. Убихинол проявляет ярко выраженные свойства антиоксиданта, предотвращая перекисное окисление мембранных липидов. Он достаточно эффективно обрывает цепной процесс образования перекисных радикалов, превращаясь в убисемихинон ( $UQH^{\bullet}$ ), который затем может реагировать с новыми липидными радикалами, а также диспропорционировать с образованием UQ и  $UQH_2$ :



Замечательное свойство убисемихинона состоит в том, что он легко включается в Q-цикл, при этом быстро восстанавливаясь в убихинол в ходе постоянно идущего естественного процесса транспорта электронов в дыхательной цепи. В любом случае,

образующиеся формы  $CoQ_{10}$  способны включаться в Q-цикл, и тем самым антиоксидант убихинол постоянно регенерируется [35, 46].

Кроме явного проявления антиоксидантных свойств путем непосредственного взаимодействия с АФК, убихинол восстанавливает другой важнейший жирорастворимый антиоксидант — витамин Е. Убихинол взаимодействует с  $\alpha$ -токофероксил-радикалом с образованием убисемихинон-радикала, который регенерируется за счет взаимодействия с другими радикалами или включения в Q-цикл дыхательной цепи митохондрий.

## ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ОБРАЗОВАНИЯ АФК

Фармакологическая регуляция образования АФК может быть реализована двумя путями: непосредственным воздействием на свободные радикалы кислорода и их связыванием (прямое антирадикальное действие) и путем повышения активности антиоксидантной системы (прежде всего, активности ферментов антиоксидантной защиты). При этом применение фармакологических средств может быть направлено как на устранение первичных АФК-индуцированных повреждений, лежащих в основе патогенеза болезней, так и на блокирование индуцированного ими апоптоза [4].

Отрицательная роль АФК и окислительного стресса показана при многих заболеваниях. Например, при гипоксии она подтверждается на практике тем, что антиоксиданты ослабляют нарушения, связанные с гипоксией [9, 19]. Поэтому в комплексной коррекции гипоксических состояний используются антиоксиданты [7, 13, 28]. Антиоксидантная терапия сегодня широко используется при ишемических заболеваниях в кардиологии и неврологии, при токсических поражениях печени, системных заболеваниях соединительной ткани и других состояниях [5, 12, 29].

Предложено достаточно большое количество природных и синтетических соединений, оказывающих влияние на реакции СРО. Ряд таких веществ внедрен в клиническую практику и с успехом применяется в медицине [7, 22]. Пристальное внимание в научных исследованиях привлекают так называемые «физиологически совместимые антиоксиданты» (ФСАО), представляющие собой модифицированные природные антиоксиданты [6, 14]. ФСАО являются сопрягающими редокс-факторами, поддерживающими показатели гомеостаза в физиологических границах в нормальном состоянии и возвращающими его показатели к нормальным значениям в патологических или экстремальных ситуациях. Особенностью ФСАО является их способность к физиологической совместимости, что представляется более важным в сравнении с антиоксидантной активностью. Они способны в качестве составной части той или иной физиологической системы воздействовать на моле-

кулярные мишени и вызывать сдвиги окислительно-восстановительного потенциала клетки, синхронизировано с клеточными и другими биологическими циклами. ФСАО эффективно регулируют реакции СРО и редокс-статус клетки. В экспериментальных исследованиях они показали широкий спектр фармакологической активности [16].

Следует отдельно выделить антиоксиданты под общим названием SkQ, являющиеся митохондриально-адресованными антиоксидантами. Адресная доставка антиоксиданта в митохондрию — подход, основанный на представлении, что митохондрии являются основным местом, где образуется наибольшее количество АФК [2]. В молекуле соединений SkQ антиоксидантная часть представлена пластохиноном (вещество из хлоропластов растений), различаются они между собой связанными с пластохиноном проникающими катионами (трифенилфосфоний, родамин). *In vitro* на бислойных фосфолипидных мембранах продемонстрирована высокая проникающая способность некоторых соединений skQ. Анти- и прооксидантные свойства соединений изучены на митохондриях. Продемонстрировано, что соединение SkQI быстро восстанавливается I и II митохондриальными ферментными комплексами, то есть является регенерируемым антиоксидантом многократного действия. На клетках человеческих фибробластов и культуре клеток HeLa установлено, что SkQI и SkQR1 в чрезвычайно низких концентрациях блокируют апоптоз [26].

В экспериментах на животных показано, что митохондриально-адресованный антиоксидант SkQR1 проявляет нейропротекторный эффект. Введение SkQR1 до и после индукции фокальной ишемии головного мозга крыс достоверно снижает объем ишемического повреждения и вызывает восстановление неврологического дефицита. Одним из механизмов нейропротекторного действия может быть повышение содержания эритропоэтина (возможно, вследствие предшествующей активации регуляторного фактора адаптации к гипоксии) и фосфолирированной формы гликогенсинтазы-киназы 3-бета (GSK-3 $\beta$ ) в мозге [25]. В настоящее время обсуждается ключевая роль фермента GSK-3 $\beta$  в регуляции работы митохондриальной мегапоры [44].

Активно исследуется возможность применения митохондриально-адресованных антиоксидантов при катаракте и ретинопатии, инфаркте миокарда, для замедления процессов старения головного мозга [2, 3]. Так, например, образование в митохондриях АФК, индуцированное бета-амилоидом, может способствовать гиперфосфорилированию тау-белка при болезни Альцгеймера. Митохондриально-адресованные антиоксиданты предотвращают такое гиперфосфорилирование [48]. SkQ1 и SkQR1 предотвращают нарушения электрической активности нейронов, вызванные скоплениями бета-амилоида.

С помощью фармакологических агентов можно стимулировать образование АФК в митохондриях и, тем самым, вызывать гибель клетки, что может иметь важное практическое значение, например, для таргетной терапии опухолей [17, 31].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный анализ литературы показал, что в сложной системе регуляции многообразных функций клетки в физиологических условиях и в условиях воздействия на клетку патогенных факторов самое активное участие принимают активные формы кислорода. Основным местом образования АФК в клетке являются митохондрии. Скорость образования АФК и активность индуцируемых ими реакций СРО зависят от силы действия на клетку патогенного фактора и определяют ответную реакцию клетки на это воздействие. АФК вместе с антиоксидантной системой клетки образуют единую равновесную регуляторную систему, призванную модулировать основные функции клетки. Равновесие этой системы нарушается при окислительном стрессе, когда деструктивная роль АФК преобладает над их сигнальной функцией. Например, при гипоксии и ишемии в зависимости от тяжести поражения АФК активируют реакции адаптации к воздействию гипоксического фактора либо запускают цепные реакции перекисидации и инициируют апоптоз клетки. Эти процессы, как и судьба самой клетки, напрямую зависят от функциональной активности митохондрий, образуемых в них АФК, которые выступают в качестве сигнальных молекул, индуцирующих синтез белковых регуляторных факторов.

АФК тесно функционально взаимосвязаны с другими регуляторными факторами клетки в различных сигнальных путях регуляции ключевых функций и участвуют в реализации компенсаторно-адаптационных реакций клетки на экстремальные воздействия. Знание патофизиологических и патохимических процессов, индуцируемых АФК непосредственно в клетке и её органеллах, позволяет проводить патогенетическую коррекцию метаболических и функциональных изменений на уровне клеточных структур, предупреждая развитие органических и системных нарушений и, как следствие, развитие многих заболеваний. Не случайно антиоксидантная фармакотерапия все чаще используется в клинической медицинской практике.

Объекты образования АФК в клетке и реакции СРО можно использовать в качестве специфических мишеней для фармакологического воздействия. Такой подход открывает новые возможности эффективной фармакотерапии с использованием лекарственных средств направленного регулирования процессов СРО. Это в свою очередь повышает возможности фармакологической адаптации организма, в частности, к состояниям гипоксии и ишемии с помощью антиоксидантов, а также лечение опухо-

лей с помощью прооксидантов [16]. Большой интерес представляют митохондриально-адресованные антиоксиданты, которые могут быть использованы в качестве средств таргетной терапии при широком круге заболеваний, связанных с деструктивным действием свободных радикалов и других АФК.

## ЛИТЕРАТУРА

- Гривенникова В. Г., Виноградов А. Д. Генерация активных форм кислорода митохондриями // Успехи биол. химии. — 2013. — Т. 53. — С. 245–296.
- Зоров Д. Б., Исаев Н. К., Плотников Е. Ю., Силачев Д. Н. Перспективы митохондриальной медицины // Биохимия. — 2013. — Т. 78, № 9. — С. 1251–1264.
- Исаев Н. К., Стельмашук Е. В., Стельмашук Н. Н. и др. Старение головного мозга и митохондриально-адресованные антиоксиданты класса skq // Биохимия. — 2013. — Т. 78, № 3. — С. 391–397.
- Киричек Л. Т., Зубова Е. О. Молекулярные основы окислительного стресса и возможности его фармакологической регуляции // Междунар. мед. журнал. — 2004. — № 1. — С. 144–148.
- Крюкова Н. О., Новиков В. Е. Гастропротекторные свойства антигипоксантов. — Смоленск: Изд-во Смоленская гор. типография, 2013. — 112 с.
- Левченкова О. С., Новиков В. Е., Парфенов Э. А. Антигипоксическая активность новых производных кумарина // Вятский медицинский вестник. — 2004. — № 2–4. — С. 40–43.
- Левченкова О. С., Новиков В. Е., Пожилова Е. В. Фармакодинамика и клиническое применение антигипоксантов // Обз. по клин. фармакол. и лек. терапии. — 2012. — Т. 10, № 3. — С. 3–12.
- Лукьянова Л. Д. Современные проблемы адаптации к гипоксии. Сигнальные механизмы и их роль в системной регуляции // Пат. физиол. и эксперим. терапия. — 2011. — № 1. — С. 3–19.
- Маркова Е. О., Новиков В. Е., Парфенов Э. А., Пожилова Е. В. Комплексное соединение аскорбиновой кислоты с антигипоксантными и антиоксидантными свойствами // Вестник Смоленской гос. мед. академии. — 2013. — Т. 12, № 1. — С. 27–32.
- Миронова Г. Д. Использование модуляторов ионных каналов как возможный путь лечения сердечно-сосудистых заболеваний, окислительного стресса и нейродегенеративных нарушений // Патогенез. — 2011. — Т. 9, № 3. — С. 47.
- Новиков В. Е., Илюхин С. А., Пожилова Е. В. Влияние метапрота и гипоксена на развитие воспалительной реакции в эксперименте // Обз. по клин. фармакол. и лек. терапии. — 2012. — Т. 10, № 4. — С. 63–66.
- Новиков В. Е., Климкина Е. И. Гепатопротекторы. — Смоленск: Изд-во Смоленская гор. типография, 2006. — 120 с.
- Новиков В. Е., Крюкова Н. О., Новиков А. С. Гастропротекторные свойства мексидола и гипоксена // Эксперим. и клин. фармакология. — 2010. — Т. 73, № 5. — С. 15–18.
- Новиков В. Е., Левченкова О. С. Фармакология гипоксии. — Смоленск: СГМА, 2007. — 130 с.
- Новиков В. Е., Левченкова О. С. Гипоксией индуцированный фактор как мишень фармакологического воздействия // Обз. по клин. фармакол. и лек. терапии. — 2013. — Т. 11, № 2. — С. 8–16.
- Новиков В. Е., Левченкова О. С. Новые направления поиска лекарственных средств с антигипоксической активностью и мишени для их действия // Эксперим. и клин. фармакология. — 2013. — Т. 76, № 5. — С. 37–47.
- Новиков В. Е., Левченкова О. С. Ингибиторы регуляторного фактора адаптации к гипоксии // Вестник Смоленской гос. мед. академии. — 2014. — Т. 13, № 1. — С. 47–53.
- Новиков В. Е., Левченкова О. С., Пожилова Е. В. Роль митохондриального АТФ-зависимого калиевого канала и его модуляторов в адаптации клетки к гипоксии // Вестник Смоленской гос. мед. академии. — 2014. — Т. 13, № 2. — С.
- Новиков В. Е., Маркова Е. О., Дьяков М. Ю., Парфенов Э. А. Антигипоксическая активность комплексных соединений на основе аскорбиновой кислоты // Обз. по клин. фармакол. и лек. терапии. — 2011. — Т. 9, № 2. — С. 35–41.
- Новиков В. Е., Понамарева Н. С., Шабанов П. Д. Аминотиоловые антигипоксанты при травматическом отеке головного мозга. — Смоленск — СПб.: Элби-СПб, 2008. — 176 с.
- Пожилова Е. В., Левченкова О. С., Новиков В. Е. Регуляторная роль митохондриальной поры и возможности её фармакологической модуляции // Обз. по клин. фармакол. и лек. терапии. — 2014. — Т. 12, № 3. — С. 13–19.
- Пожилова Е. В., Новиков В. Е., Новикова А. В. Фармакодинамика и клиническое применение препаратов на основе гидроксипиридина // Вестник Смоленской гос. мед. академии. — 2013. — Т. 12, № 3. — С. 56–66.
- Сазонтова Т. Г., Архипенко Ю. В. Роль свободнорадикальных процессов в адаптации организма к изменению уровня кислорода // Проблемы гипоксии/Ред. Л. Лукьянова, И. Ушаков. — М.: Изд-во Истоки, 2004. — С. 112–138.
- Сазонтова Т. Г., Архипенко Ю. В. Роль свободнорадикальных процессов и редокс-сигнализации в адаптации организма к изменению уровня кислорода // Рос. физиол. журн. им. И. И. Сеченова. — 2005. — Т. 91, № 6. — С. 636–655.
- Силачев Д. Н. Изучение новых нейропротекторов на модели фокальной ишемии головного мозга: Автореф. дис... канд. биол. наук. — М., 2009. — 22 с.
- Скулачев В. П. Попытка биохимиков атаковать проблему старения: «мегапроект» по проникающим ионам. Первые итоги и перспективы // Биохимия. — 2007. — Т. 72, № 12. — С. 1700–1714.
- Судаков Н. П., Никифоров С. Б., Константинов Ю. М. и др. Механизмы участия митохондрий в развитии патологических процессов, сопровождающихся ишемией и реперфузией // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. — 2006. — Т. 51, № 5. — С. 332–336.
- Чекман И. С., Беленичев И. Ф., Горчакова Н. А. и др. Антиоксиданты: клинико-фармакологический аспект // Украинск. мед. часопис. — 2014. — № 1 (99) — I/II. — С. 22–28.
- Шабанов П. Д., Зарубина И. В., Новиков В. Е., Цыган В. Н. Метаболические корректоры гипоксии. — СПб.: Информ-Навигатор, 2010. — 916 с.
- Яснецов В. В., Новиков В. Е. Фармакотерапия отека головного мозга. — М.: ВИНТИ, 1994. — 176 с.
- Bouchier-Hayes L., Lartigue L., Newmeyer D. D. Mitochondria: pharmacological manipulation of cell death // Journal Clin. Invest. — 2005. — Vol. 115, N 10. — P. 2640–2647.
- Chen Q., Vazquez E. J., Moghaddas S. et al. Production of reactive oxygen species by mitochondria // J. Biol. Chem. — 2003. — Vol. 278, N 38. — P. 36027–36031.
- Fluery C., Mignotte B., Vayssiere J. L. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling // Biochimie. — 2002. — Vol. 84, N 2–3. — P. 131–141.
- Ghosh A., Greenberg M. E. // Calcium signaling in neurons, molecular mechanisms and cellular consequences // Science. — 1995. — Vol. 268 (5208). — P. 239–247.
- Kelso G. F., Porteous C. M., Coulter C. V. et al. Selective targeting of a redox-active ubiquinone to mitochondria within cells: antioxidant and antiapoptotic properties // J. Biol. Chem. — 2001. — Vol. 276, N 7. — P. 4588–4596.
- Korshunov S., Skulachev V., Starkov A. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive



- oxygen species in mitochondria // FEBS Lett. — 1997. — Vol. 416. — P. 15–18.
37. Kuo M. T. Redox regulation of multidrug resistance in cancer chemotherapy: molecular mechanisms and therapeutic opportunities // Antioxid. Redox Signal. — 2009. — Vol. 11, N 1. — P. 99–133.
  38. Li C., Jakson R. M. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury // Amer. J. Physiol. Cell Physiol. — 2002. — Vol. 282. — P. 227–241.
  39. Lukyanova L. D., Sukoyan G. V., Kirova Y. I. Role of proinflammatory factors, nitric oxide, and some parameters of lipid metabolism in the development of immediate adaptation to hypoxia and HIF-1 $\alpha$  accumulation // Bull. Exp. Biol. Med. — 2013. — Vol. 154, N 5. — P. 597–601.
  40. Maulic N., Goswami S., Galang N., Das D. Differential regulation of Bcl-2, AP-1 and NF-kappaB on cardiomyocyte apoptosis during myocardial ischemic stress adaptation // FEBS Lett. — 1999. — Vol. 443. — P. 331–336.
  41. Murphy M. P. Investigating mitochondrial radical production using targeted probes // Biochem. Soc. Trans. — 2004. — Vol. 32, N 6. — P. 1011–1014.
  42. Papa S., Skulachev V. P. Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging // Mol. Cell. Biochemistry. — 1997. — Vol. 174. — P. 305–319.
  43. Ross M. F., Ross T. D., Blaikie F. H. et al. Accumulation of lipophilic dications by mitochondria and cells // Biochem. J. — 2006. — Vol. 400. — P. 199–208.
  44. Silachev D., Pevzner I., Zorova L., Plotnikov E. New generation of penetrating cations as potential agents to treat ischemic stroke // FEBS J. — 2012. — Vol. 279. — P. 364.
  45. Skulachev V. P. Mitochondria targeted antioxidants as promising drugs for treatment of age-related brain diseases // J. Alzheimers Dis. — 2012. — Vol. 28, N 2. — P. 283–289.
  46. Smith R. A., Kelso G. F., James A. M., Murphy M. P. Targeting coenzyme Q derivatives to mitochondria // Methods Enzymol. — 2004. — Vol. 382. — P. 45–67.
  47. Urso M. L., Clarkson P. M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation // Toxicology. — 2003. — Vol. 189. — P. 41–54.
  48. Zhang D., Chen Y., Campbell W. et al. Characteristics and superoxide-induced activation of reconstituted myocardial mitochondrial ATP-sensitive potassium channel // Circ. Res. — 2001. — Vol. 89. — P. 1177–1173.
  49. Zorov D. B., Filburn C. R., Klotz L. O. et al. Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release, a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes // J. Exp. Med. — 2000. — Vol. 192. — P. 1001–1014.

**ROLE OF REACTIVE OXYGEN SPECIES IN CELL PHYSIOLOGY AND PATHOLOGY AND THEIR PHARMACOLOGICAL REGULATION**

*V. E. Novikov, O. S. Levchenkova, Ye. V. Pozhilova*

◆ **Summary:** This review is devoted to analysis of modern scientific investigations about role of reactive oxygen species (ROS) in physiology and pathophysiology of cell. Key issues of ROS generation, their function in signaling pathways, role in the cellular pathology, functioning of antioxidant system are discussed in the paper. The review also summarizes literature data about possibility of pharmacological regulation of the activity of free radical oxidation reactions, which have practical value for effective pharmacotherapy of diseases in pathogenesis of which destructive action of ROS is present.

◆ **Key words:** reactive oxygen species (ROS); free radical oxidation; hypoxia; ischemia; pharmacological regulation of free radical oxidation.

◆ Информация об авторах

*Новиков Василий Егорович* — д. м. н., профессор, заведующий кафедрой фармакологии. ГБОУ ВПО Смоленская государственная медицинская академия Минздрава РФ. 214019, Смоленск, ул. Крупской, д. 28. E-mail: nau@sgma.info.

*Левченкова Ольга Сергеевна* — к. м. н., старший преподаватель кафедры фармакологии. ГБОУ ВПО Смоленская государственная медицинская академия Минздрава РФ. 214019, Смоленск, ул. Крупской, д. 28. E-mail: os.levchenkova@gmail.com.

*Пожилова Елена Васильевна* — соискатель кафедры фармакологии. ГБОУ ВПО Смоленская государственная медицинская академия Минздрава РФ. 214019, Смоленск, ул. Крупской, д. 28. E-mail: nau@sgma.info.

*Novikov Vasily Egorovich* — Doctor of Medical Sciences, professor, Head of the Department of Pharmacology. Smolensk State Medical Academy, Krupskaya St., 28, Smolensk, 214019, Russia, E-mail: nau@sgma.info.

*Levchenkova Olga Sergeevna* — PhD (Pharmacology), Senior Lecturer, Dept. of Pharmacology. Smolensk State Medical Academy, Krupskoy St., 28, Smolensk, 214019, Russia. E-mail: OS.Levchenkova@gmail.com.

*Pozhilova Yelena Vasilyevna* — Postgraduate Fellow, Dept. of Pharmacology. Smolensk State Medical Academy, Krupskoy St., 28, Smolensk, 214019, Russia. E-mail: nau@sgma.info.