

1 Свободные радикалы в биологических системах

1.1 Введение

Исторически свободные радикалы «пришли» в биологию из фотохимии. Первое сообщение о существовании частицы с неспаренным электроном было сделано еще в 1900 году Громбергом, но основной интерес к ним как к промежуточным продуктам органических реакций возник в конце двадцатых годов прошлого столетия. В тридцатые годы уже не было сомнений в том, что свободные радикалы являются промежуточными продуктами фотохимических и пиролизических реакций. Среди отечественных ученых А. Гурвич первым высказал идею о роли свободных радикалов в действии митогенетических лучей. О том, что свободные радикалы могут быть первичными продуктами *фотобиологического процесса* (фотосинтеза), А. А. Красновский доложил на 2-й Всесоюзной конференции по фотосинтезу, проходившей в Москве в самом начале 1956 года. Докладчик рассматривал механизм ставшей теперь знаменитой *реакции Красновского* – реакции фотовосстановления хлорофилла. Эта реакция, по данным автора, протекает по такой схеме:

Поглощение хлорофиллом (X) кванта света и переход его в триплетное бирадикальное состояние: $X + h\nu \rightarrow X^* \rightarrow X^{\cdot -}$;

Присоединение электрона от донора (НА) с образованием ион-радикалов:

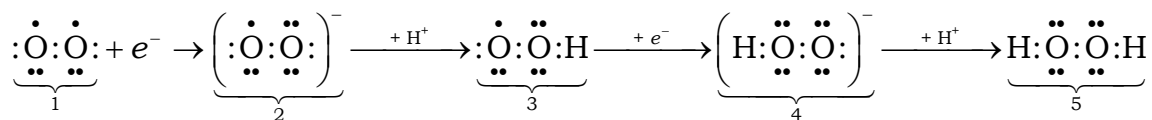
$X^{\cdot -} + НА \rightarrow X^- + НА^{\cdot +}$; (зеленая форма фотовосстановленного хлорофилла, устойчивая при температурах не выше -40°C);

Присоединение протона с образованием окончательной восстановленной (красной) формы хлорофилла: $X^- + АН^+ \rightarrow ХН + А$.

В сущности, в этой схеме (предложенной еще в 1950 году) была заложена основная концепция первичных стадий не только фотосинтеза, но и ряда других фотобиологических процессов: *свободные радикалы образуются первыми* в химической реакции, непосредственно следующей за поглощением фотона и переходом молекулы-хромофора в возбужденное состояние. Более устойчивые молекулярные продукты образуются позже. В пятидесятых годах прошлого столетия появились первые публикации Д. Хармана об участии свободных радикалов в старении организма. С тех пор количество публикаций, посвященных роли свободных радикалов в различных патологических процессах, неуклонно возрастает. Выявлена ключевая роль радикалов в развитии многих болезней – раковых заболеваниях, болезнях мозга, нарушениях иммунной системы, болезнях сердца, атеросклероза, диабета, болезнях легких, печени, почек, крови, глазных болезнях и др.

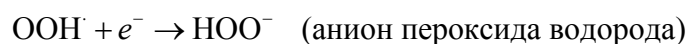
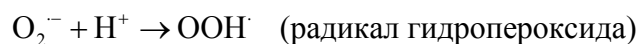
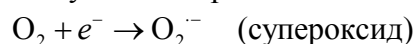
1.1.1 Что такое радикалы

Хорошо известно, что в обычных молекулах на электронных орбиталях имеются по два электрона. Именно взаимодействие магнитных моментов этих парных электронов обеспечивает стабильность молекулы и устойчивость химических соединений. У свободных радикалов на внешней электронной оболочке имеется непарный (одиночный) электрон. Это делает радикалы химически активными частицами, поскольку радикал стремится вернуть себе недостающий электрон, «отбирая» его у других молекул, с которыми он сталкивается. В живых клетках в сравнительно большом количестве образуются радикалы при одноэлектронном восстановлении молекулярного кислорода. Молекула кислорода (называемого иногда *диоксигеном*), по сути дела, тоже является радикалом, лучше сказать, бирадикалом, поскольку имеет два неспаренных электрона, что придает ей, кстати сказать, повышенную химическую активность. Как видно из приведенной ниже схемы, при одноэлектронном восстановлении из диоксигена (1) образуется «настоящий» радикал (имеется один неспаренный электрон), который одновременно является анионом, поскольку частица в целом имеет отрицательный заряд (2). Точное название этой молекулярной частицы – диоксид радикал, или диоксил, но обычно употребляется устоявшееся название супероксид-анион или попросту *супероксид*.



Супероксид обладает свойствами и окислителя и восстановителя одновременно, в зависимости от партнера. Если других партнеров нет, две молекулы супероксида охотно реагируют, одна в качестве окислителя, другая – в качестве восстановителя. Правда, этому препятствует электростатическое отталкивание двух анионов, но в нейтральной и кислой среде анионы супероксида быстро присоединяют протон, превращаясь в нейтральный радикал гидропероксида (3). Реакция окисления-восстановления двух супероксидов (дисмутация) может идти и ферментативным путем, за счет катализа ферментом *супероксиддисмутазой* (СОД). Рассмотрим судьбу супероксидного радикала, который подвергся восстановлению. Как видно из той же схемы, при одноэлектронном восстановлении гидропероксид-радикала образуется анион пероксида водорода (4); это уже не радикал, а молекула, несущая отрицательный заряд. Присоединив протон этот анион превращается в нейтральную молекулу пероксида водорода (5).

На данном примере, помимо всего прочего, можно видеть, что быть ионом и быть радикалом – это два свойства молекулярной частицы, которые могут присутствовать или отсутствовать независимо друг от друга. Молекула может быть анионом, катионом или нейтральной молекулой, не имея при этом неспаренных электронов. Радикал, т.е. частица, имеющая неспаренный электрон на внешней орбитали, может также быть электронейтральным, положительно (катион-радикал) или отрицательно заряженным (анион-радикал). После такого разъяснения мы не будем в дальнейшем выписывать всю структуру внешней электронной оболочки атомов в молекулах и радикалах, а ограничимся тем, что будем радикалы обозначать точкой. Схема приведенных выше реакций будет теперь выглядеть следующим образом:



При одноэлектронном восстановлении пероксида водорода (например, ионами металлов переменной валентности, скажем Fe^{2+}) молекула H_2O_2 распадается с образованием иона гидроксила и исключительно агрессивного химически *радикала гидроксила*:



Все приведенные на этом примере радикалы входят в семейство активных форм кислорода (АФК). Наибольшей активностью из этих веществ обладает гидроксильный радикал, обладающий свойствами мощного окислителя. Он реагирует с большинством органических молекул, включая белки, нуклеиновые кислоты и липиды, всюду производя разрушение.

1.1.2 Классификация радикалов

Предлагаемая нами классификация свободных радикалов приведена на рисунке 5.1. Прежде всего радикалы, образующиеся в нашем организме, можно разделить на *природные* и *чужеродные*.



Рис. 5.1. Радикалы в организме человека.

Вначале остановимся на чужеродных радикалах. Разнообразные радикалы могут образовываться под действием неблагоприятных факторов окружающей среды – радиационного облучения, ультрафиолета, химических веществ и т.д. Так, например, жесткая радиация приводит к образованию радикалов воды и органических веществ. Ультрафиолетовое облучение также приводит к образованию радикалов веществ-хромофоров. Например, под действием ультрафиолетового облучения происходит фотоионизация ароматических аминокислотных остатков в белках, в результате чего образуются радикалы тирозина, триптофана и фенилаланина. Первичное действие УФ-излучения заключается в фотоионизации, т.е. «выбивании» электрона из молекулы. Например, после поглощения фотона молекулой тирозина образуются сначала катион-радикал, а затем нейтральный радикал тирозина:



Формулы радикалов ароматических аминокислот приведены на рис. 5.2.

Образовавшиеся радикалы могут реагировать с соседними аминокислотами, что приводит к повреждению белка, либо к реакциям цепного окисления белков или липидов мембранных структурах клеток.

Разные яды и токсины в большинстве своем метаболизируют в организме с образованием свободных радикалов, разрушающих клетки и ткани. Например, в печени происходит окисление различных отслуживших свой век веществ (микросомальное окисление). В норме процесс окисления происходит через стадию образования свободных радикалов в активном центре цитохрома P450, причем ни один из продуктов этого сложного процесса не выходит за пределы активного центра. Однако, при наличии в организме гепатотропных токсинов, например, четыреххлористого углерода CCl_4 , радикалы могут выходить из активного центра P450 и инициировать цепное окисление липидов, приводящее к разрушению тканей печени.

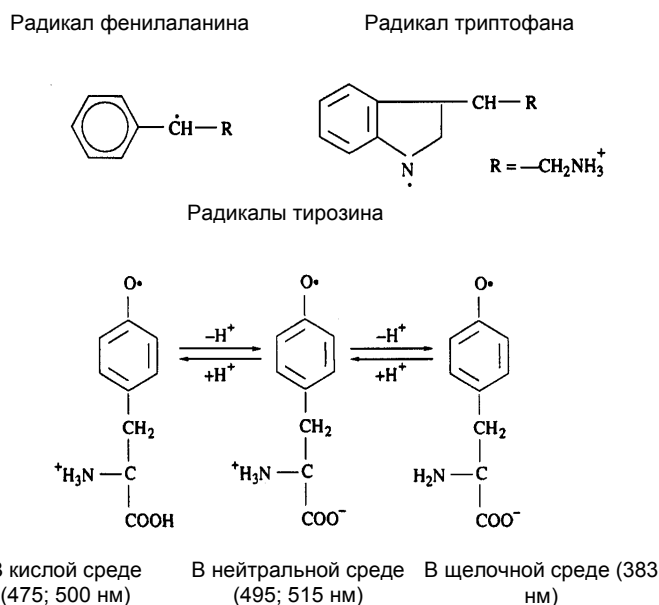


Рис. 5.2. Радикалы, образующиеся при УФ-облучении ароматических аминокислот.

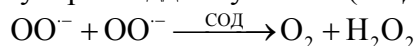
(Владимиров, Ю.А., Свободные радикалы в первичных фотобиологических процессах, Биологические мембраны, 1998, т. 15, № 5, с. 517).

Природные радикалы можно разделить на первичные, вторичные и третичные.

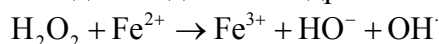
Первичные радикалы специально образуются в организме в результате ферментативных реакций. Они необходимы для нормального функционирования живых клеток и организма в целом. К таким радикалам относятся:

1. Радикалы переносчиков электронов в дыхательной цепи: убисемихинон (радикал коэнзима Q) и флавиновые радикалы, например, такие как радикал флавинадениндинуклеотида (ФАД).
2. Супероксид, образующийся ферментом NADPH-оксидазой в мембранах ряда клеток, в первую очередь, фагоцитов, либо в дыхательной цепи митохондрий. Супероксид-радикал является источником других активных форм кислорода – гидропероксида водорода, гидроксильного радикала, синглетного кислорода, гипохлорита.
3. Монооксид азота NO, который синтезируется группой ферментов, называемых NO-синтазами. Это вещество является естественным фактором расслабления сосудов, фактором регулирования кровяного давления. В частности, действие важнейшего препарата нитроглицерина, применяемого при коронарной недостаточности, основано на образовании NO.

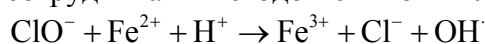
К свойствам и метаболизму первичных радикалов мы еще вернемся. В силу высокой реакционной способности и наличия ферментных систем, ответственных за их дальнейшее превращение, первичные радикалы быстро превращаются в молекулярные продукты, как правило, тоже весьма активные химически. Так супероксид превращается в пероксид водорода и молекулярный кислород в результате реакции, катализируемой супероксиддисмутазами (СОД):



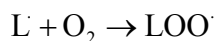
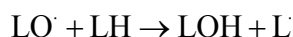
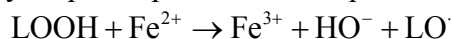
Вторичные радикалы образуются при реакциях расщепления молекул пероксидов и некоторых других активных соединений при реакциях одноэлектронного восстановления или окисления. Наиболее важную роль играют, по-видимому, радикалы гидроксила и липидов. Радикалы гидроксила образуются в реакции Фентона:



И в реакции ионов Fe^{2+} с гипохлоритом, которая была изучена А.Н. Осиповым и сотрудниками методом спиновых ловушек:

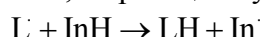


Липидные радикалы ($LO\cdot$, $L\cdot$ и $LOO\cdot$) образуются при взаимодействии ионов Fe^{2+} с гидропероксидами липидов ($LOOH$), что приводит к разветвлению цепей окисления и резко ускоряет процесс липопероксидации.



Вторичные радикалы обладают высокой химической активностью и, как правило, наносят вред окружающим молекулам, клеткам и организму в целом.

Третичные радикалы – это радикалы антиоксидантов. К числу антиоксидантов относятся так называемые «ловушки радикалов», соединения, которые вступают во взаимодействие со свободными радикалами, превращая их в молекулы, более безобидные для нас с вами. Но при этом ловушки сами превращаются в радикалы: Если обозначить молекулу ловушки как InH , то реакция будет выглядеть таким образом:



Радикалы ловушек $In\cdot$, могут приносить либо пользу, либо вред, в зависимости от обстоятельств.

1.2 Методы исследования свободных радикалов

1.2.1 Биофизические методы: Электронный парамагнитный резонанс и хемилюминесценция

Используемые для исследования радикалов методы можно разделить на две главные категории – биохимические и биофизические, к последним относится метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) и хемилюминесценция (см. рис. 5.3).



Рис. 5.3. Методы исследования свободных радикалов.

Метод хемилюминесценции был подробно рассмотрен в разделе **Ошибка! Источник ссылки не найден.**, поэтому мы сейчас не будем на нем останавливаться. Два вида хемилюминесценции – собственная и активированная, – используются для изучения липидных систем (липопротеины крови, антиоксидантная активность) и клеток (в частности, для изучения механизма терапевтического действия лазерного излучения, в диагностике). Методу ЭПР тоже посвящен отдельный раздел **Ошибка! Источник ссылки не найден.** Поэтому более подробно мы остановимся на биохимических методах. Среди биохимических методов остановимся на методе диеновой конъюгации, анализе биомаркеров и на ингибиторном анализе.

1.2.2 Диеновая конъюгация

Диеновая конъюгация относится к немногим биохимическим методам, которые дают прямое доказательство участия радикалов в изучаемом процессе. Он применим, правда, только к обнаружению радикалов, ответственных за цепное окисление полиненасыщенных жирных кислот, но это достаточно важный процесс в нормальном метаболизме клеток и особенно – при развитии патологических состояний. Кроме того, этот метод широко распространен благодаря специфичности и простоте реализации.

В липидах, входящих в состав биологических мембран и липопротеинов крови, содержится довольно много полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК). Особенность химического строения этих веществ заключается в том, что они содержат двойные связи, которые разделены в цепи так называемым «метиленовым мостиком» $-\text{CH}_2-$. На первой стадии молекула кислоты атакуется радикалом, обычно это гидроксильный радикал. В силу квантово-механических причин, атака происходит по углероду, находящемуся в α -положении по отношению к обоим двойным связям (стадия 1 на рис. 5.4).

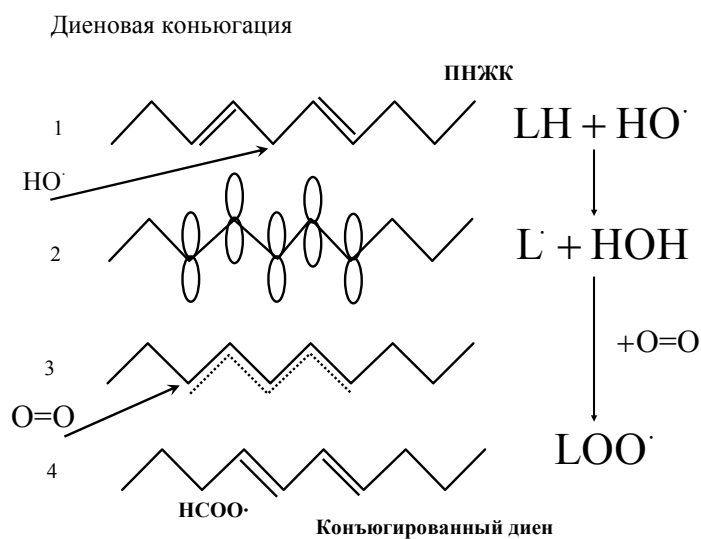


Рис. 5.4. Схема реакций при диеновой конъюгации.

Именно с этим углеродом водородные атомы оказываются наиболее слабо связанными. Протон от этого атома углерода переходит на гидроксильный радикал, вследствие чего на атоме углерода кислоты остается неспаренный π -электрон (стадия 2). По всем свойствам этот электрон ничем не отличается от других четырех π -электронов, ранее образывавших соседние двойные связи. В сущности, теперь становится бессмысленным вопрос, какой из пяти π -электронов можно считать неспаренным: перед нами π -электронная система из пяти идентичных электронов. При появлении молекулярного кислорода в окружающей среде, происходит его атака на радикал кислоты. Термодинамически выгодно, чтобы в результате реакции образовалась система сопряженных двойных связей. Это происходит, если атакуется крайний углеродный атом в системе (стадия 3). В итоге, в цепи молекулы кислоты появляется новый радикал $-\text{COO}\cdot$, причем неспаренный электрон принадлежит атому кислорода в этой группе. (Это может быть доказано методом ЭПР, поскольку сигнал радикалов, в которых неспаренный электрон принадлежит углероду, отличается от сигнала радикалов, в которых одиночный электрон «центрирован» на кислороде). Оставшиеся четыре π -электрона образуют сопряженную систему (конъюгированный диен). Обнаружение диеновой конъюгации легко осуществить методом спектрофотометрии. Несопряженные двойные связи обладают поглощением в очень коротковолновом ультрафиолете (менее 200 нм), тогда как конъюгированные диены поглощают при 234 нм. Ценность метода диеновой конъюгации заключается, помимо всего прочего, в том, что появление конъюгированных диенов, как можно видеть из рассмотренной схемы реакций,

может произойти *только* в результате образования радикала в изучаемой системе. Другие биохимические методы анализа продуктов реакции не дают обычно уверенности в том, что данный продукт не мог образоваться в результате тех или иных реакций, в которых принимали участие не радикалы, а просто достаточно агрессивные химические соединения.

1.2.3 Биомаркеры

Термин «биомаркеры» широко используется в клинических исследованиях. Это химическое вещество (достаточно устойчивое, поскольку состоит не из радикалов, а из обычных молекул), которое появляется в биологической жидкости (крови, моче, слюне, и др.) больного в результате какого-либо патологического процесса. Биомаркеры образуются в результате атаки свободными радикалами биологически важных соединений: белков, нуклеиновых кислот, липидов. Так при действии гидроксильного радикала на фенилаланин образуется окисленный продукт – гидроксифенилаланин. Фенилаланин может окисляться в клетке ферментативным путем без участия радикалов, но в этом случае образуется *пара*-гидроксифенилаланин, т.е. природная аминокислота тирозин. Если же белки, содержащие фенилаланин, атакованы гидроксильным радикалом, то образуются различные изоформы гидроксифенилаланина, в том числе *орто*-гидроксифенилаланин (его называют иногда *орто*-тирозином), который в норме не присутствует в человеческом организме (рис. 5.5).

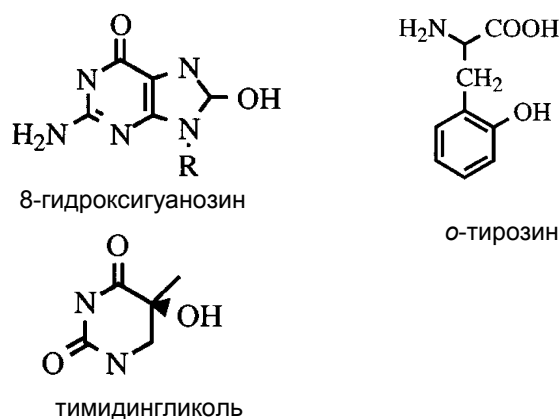


Рис. 5.5. Маркеры окисдательного повреждения нуклеиновых кислот (слева) и белков (справа).

Другой пример. Если гидроксильный радикал атакует нуклеиновые кислоты, то происходит образование необычных производных азотистых оснований, таких как Тимин или гуанидин. На рисунке приведены структурные формулы 8-гидроксигуанозина и тимидингликоля, веществ, которые в нормальных условиях в крови отсутствуют.

Известны биомаркеры, свидетельствующие о липидной пероксидации, например, появление в крови малонового диальдегида и его производных. В выдыхаемом воздухе обнаруживаются летучие углеводороды – пентан, октан. Более подробно основные маркеры липидной пероксидации приведены на схеме 5.6 – наряду с различными альдегидами и алканами, большое значение имеют конъюгированные диены (углеводороды с сопряженными двойными связями). Все эти вещества можно количественно определить хроматографическими методами.

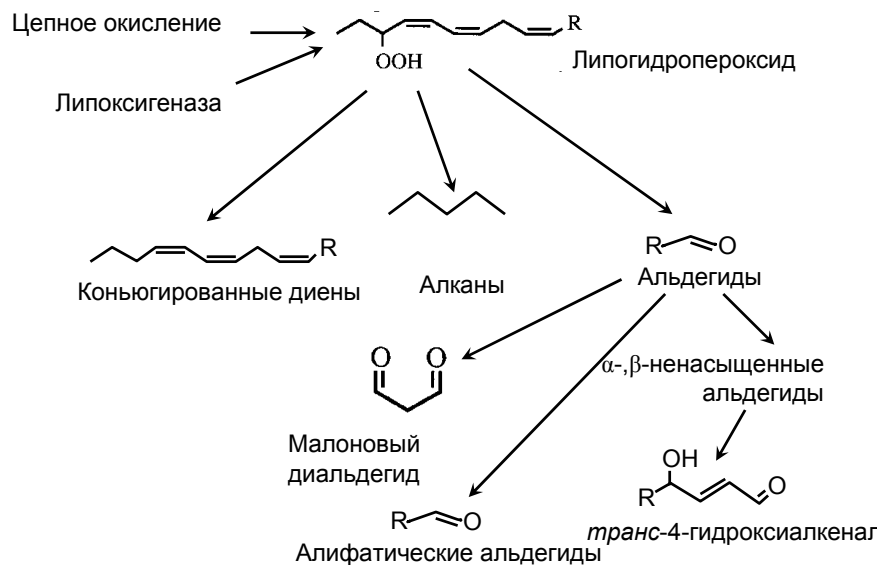


Рис. 5.6. Маркеры липидной пероксидации

В качестве примера на рис. 5.7 приведены результаты исследования биомаркеров у курильщиков (справа) и некурящих людей (слева). Видно, что уровень липидной пероксидации у некурящих людей в среднем ниже, чем у курящих. Эта одна из причин того, что средняя продолжительность курильщиков по данным ВОЗ на 10 лет меньше, чем продолжительность жизни некурящих людей.

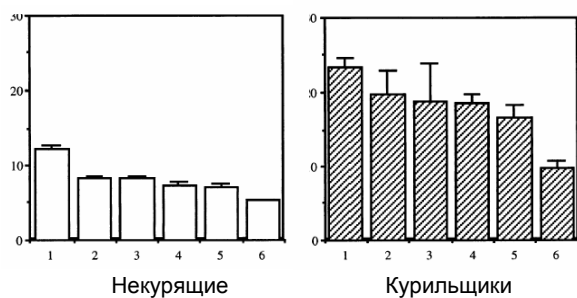


Рис. 5.7. Результаты исследования биомаркеров липидной пероксидации у курильщиков и некурящих людей.

1.2.4 Ингибиторный анализ

Принцип ингибиторного анализа довольно прост: в систему вводят вещество, перехватывающее радикалы, и смотрят, что произойдет. Например, мы хотим проверить, играют ли радикалы супероксида какую-либо роль в разрушении клеток бактерий фагоцитами. Добавляем в систему супероксиддисмутазу, которая убирает супероксид, и проверяем, уменьшилось ли при этом число убитых бактерий. Для разных радикалов можно подыскивать тот или иной перехватчик-ингибитор. В случае супероксидного радикала – это фермент супероксиддисмутазы, для перекиси водорода – это каталаза, ловушками липидных радикалов может служить α -токоферол или каротиноиды. Для перехватывания гидроксильного радикала используют маннитол, бензойную кислоту или этанол. В качестве примера ингибиторного анализа можно привести опыты Хармана по изучению влияния свободных радикалов на продолжительность жизни. Одна группа мышей (контрольная) получала обычную пищу, для них определяли продолжительность жизни (результат – преждевременное старение). Другая группа мышей получала вместе с пищей

антиоксиданты – витамины Е (токоферол), А и С, в результате чего продолжительность жизни этих животных увеличилась на 25% (подавление преждевременного старения). Таких примеров можно привести множество, поскольку метод ингибиторного анализа очень широко распространен при исследовании роли свободных радикалов в развитии болезней.

1.3 Активные формы кислорода

Термин *активные формы кислорода* (АФК) чрезвычайно широко распространен в научной литературе, разные авторы по-разному определяют это понятие, и важно четко понимать, что под ним подразумевается и какие именно радикалы относят к активным формам кислорода. Максимально широкий набор радикалов и молекул, относимых к активным формам приведен в таблице 5.1. Иногда используют и другие термины, такие как *активные формы азота* и другие (см. столбец 3).

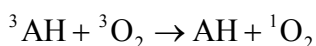
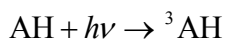
Таблица 5.1

Радикалы и молекулы, относимые к активным формам кислорода

Формула	Название	Альтернативная классификация ¹
$^1\text{O}_2$	Синглетный кислород	АФК
$\cdot\text{O}_2^-$	Супероксидный радикал	АФК
H_2O_2	Пероксид водорода	АФК
$\cdot\text{OH}$	Гидроксильный радикал	АФК
ClO^-	Гипохлорит	АФХ
$\cdot\text{NO}$	Монооксид азота (оксид азота)	
ONOO^-	Пероксинитрит	АФА
$\cdot\text{L}$	Алкил (липоалкил)	АФЛ
$\text{LO}\cdot$	Алкоксил (липоксил)	АФЛ
$\text{LOO}\cdot$	Диоксил (пероксил, липопероксил)	АФЛ
LOOH	Гидропероксид (липогидропероксид)	АФЛ

Синглетный кислород

Синглетный кислород принимает активное участие в фотохимических реакциях. Например, существует фотодинамическая терапия опухолей, который заключается в том, что пациенту дают для приема фотодинамические сенсibilизаторы (гематопорфирин, фталоцианины), затем облучают участок опухоли светом лазера, при этом происходит селективное разрушение ткани опухоли. Этот очень эффективный метод, особенно в послеоперационном периоде после хирургического удаления основной опухоли. При облучении молекула сенсibilизатора (АН) переходит в возбужденное триплетное состояние ($^3\text{АН}$), реагирует с молекулярным кислородом (который находится в основном, триплетном состоянии $^3\text{O}_2$) и при этом образуется чрезвычайно химически активный синглетный кислород ($^1\text{O}_2$), который дальше участвует в процессах повреждении раковых клеток.



¹ В качестве альтернативы можно отнести данные соединения к активным формам хлора (АФХ), азота (АФА) и липидов (АФЛ).

Молекулы воды активно «тушат» синглетный кислород, т.е. переводят его в основное, триплетное состояние. По этой причине маловероятно участие синглетного кислорода в реакциях, которые протекают в отсутствие внешнего облучения в водной среде, хотя это участие постулировалось многими авторами.

1.3.1 Супероксидный анион-радикал

До последнего времени считалось, что основным источником супероксидного радикала в организме человека и животных являются клетки – фагоциты, к которым относятся гранулоциты и моноциты крови и тканевые макрофаги. Встретив чужеродную частицу, например, бактерию, фагоцит прикрепляется к ней и начинает выделять активные формы кислорода, первая из которых – супероксидный радикал. Супероксидный радикал образуется в результате переноса электрона от НАДФН-оксидазного комплекса, встроенного в мембраны фагоцита, на растворенный молекулярный кислород (рис. 5.8).

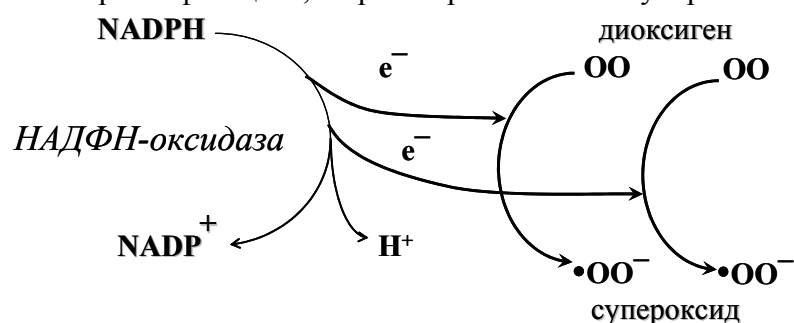


Рис. 5.8. Образование супероксида происходит при переносе двух электронов от НАДФН к кислороду. Эта реакция катализируется ферментным комплексом НАДФН-оксидазой, которая содержится в плазматической мембране фагоцитов, а также в мембранах внутриклеточных везикул — фагосом.

При этом каждая молекула НАДФН, окисляясь, отдает два электрона в цепь переноса электронов, а каждый из этих электронов присоединяется к молекуле кислорода, в результате чего образуется супероксид-радикал. Как видно на схеме 5.9, ферментный комплекс НАДФН оксидазы состоит из нескольких субъединиц.

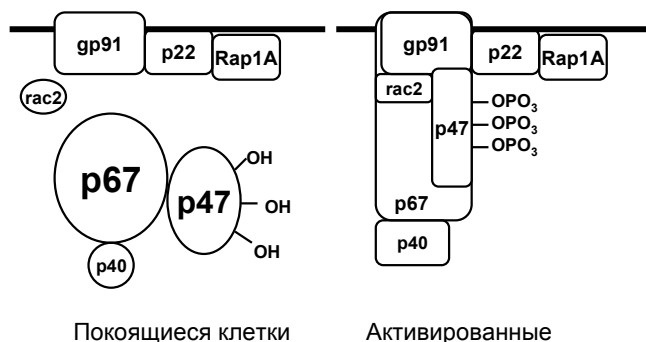


Рис. 5.9. Активация НАДФН оксидазы лейкоцитов (В.М. Babior, NADPH Oxidase: An Update. *Blood*, т. 93, № 5, 1999, с. 1464.)

В покоящихся клетках, субъединицы оксидазы распределены между цитозолем (p40PHOX, p47PHOX, p67PHOX и Rac2) и мембранами (Rap1A и cytochrome b558, комплекс p22PHOX gp91PHOX). Rac2 и Rap1A – это низкомолекулярные белки, связывающие гуанидиннуклеотид, которые участвуют помимо активации оксидазы также и в других процессах. Остальные 5 белков участвуют только в работе НАДФН оксидазы. Когда клетка активируется, p47PHOX сильно фосфорилируется и цитозольные субъединицы мигрируют к мембране, где они связываются с цитохромом b558, формируя таким образом активную оксидазу. Супероксидные радикалы превращаются затем в пероксид водорода (фермент СОД) и в гипохлорит (фермент миелопероксидаза), которые разрушают бактериальную стенку и способствуют умерщвлению бактерий.

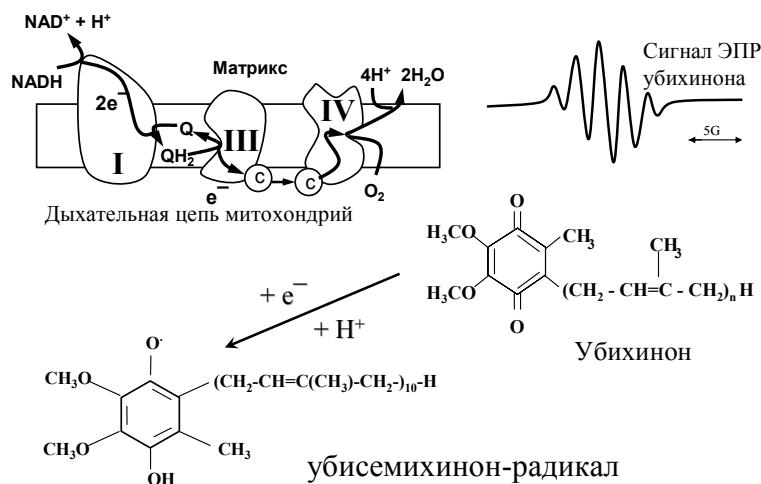


Рис. 5.10. Общее строение дыхательной цепи и семихинон коэнзима Q.

В последние годы стало ясно, что этот путь возникновения супероксидных радикалов в организме не единственный, и даже не главный. Гораздо больше количество супероксида образуется всеми клетками в результате сбоя в работе митохондрий. В норме митохондрии потребляют кислород главным образом (на 98-99%) для окисления органических веществ, в патологии – для образования супероксидного радикала (до 30% от всего потребляемого кислорода). К сожалению, точный механизм образования супероксида в митохондриях недостаточно выяснен. По-видимому, он может образовываться не в одном, а в нескольких местах дыхательной цепи в результате прямого переноса электрона на молекулярный кислород с одного из переносчиков электрона в цепи. Общее строение дыхательной цепи показано на рисунке 5.10. Высказывалось предположение, что донором электрона при этом может быть радикал коэнзима Q (убисемихинон). Образование этого радикала происходит во внутренней мембране митохондрий в реакциях, схема которых приведена на рис. 5.11.

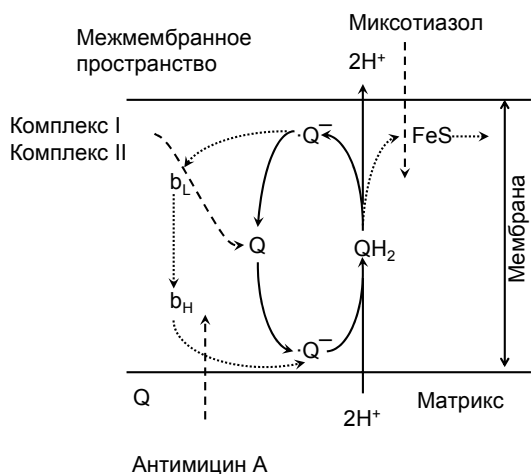
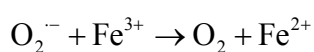


Рис. 5.11. Схема образования убисемихинон-радикала во внутренней мембране митохондрий.

Как видно на схеме, коэнзим Q восстанавливается по одноэлектронному механизму, образуя полувосстановленную форму – убисемихинон-радикал. Второй электрон переводит этот радикал в полностью восстановленный гидрохинон. Показано, что увеличение концентрации убисемихинона, например, путем введения антимицина А, тормозящего реакцию его восстановления в убихинон QH₂, приводит одновременно к росту выделения супероксида митохондриями. Уменьшение образования радикалов убихинона путем торможения миксотиазолом оттока электронов на железо-серные комплексы FeS, напротив, приводит к снижению продукции супероксида. Однако такая корреляция между концентрацией

убисемихинона и выделением супероксида еще не означает, что именно прямое взаимодействие убисемихинона с кислородом приводит к образованию супероксида. В модельных опытах супероксид с большей вероятностью образуется в реакции с другим радикалом, также образующимся в дыхательной цепи – радикалом флавина в составе ФАД, который образуется при одноэлектронном восстановлении окисленного флавина. Имеются данные, что нарушение структуры белков – переносчиков электронов, содержащих ФАД (например сукцинат-дегидрогеназного комплекса II в дыхательной цепи), приводит к накоплению электронов на молекуле ФАД (т.е. увеличению концентрации флавиновых радикалов) и резкому усилению образования супероксида. Причиной нарушений структуры этого белка могут быть определенные генетические болезни человека, при которых избыток образования радикалов приводит к тяжелым патологическим состояниям.

Сам по себе супероксидный радикал нельзя назвать слишком агрессивным, потому что он является весьма слабым окислителем и не менее вялым восстановителем. Его роль в патологии определяется, скорее всего, двумя реакциями, которые приводят к появлению по-настоящему опасных и вредных продуктов. Это реакции супероксида с ионами трехвалентного железа и с монооксидом азота:

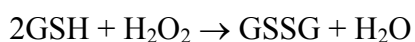


В первой реакции из связанного с белками трехвалентного железа (в частности из ферритина) выделяются ионы свободного двухвалентного железа, которые весьма цитотоксичны за счет реакций образования радикалов гидроксила при взаимодействии Fe^{2+} с пероксидом водорода (реакция Фентона) и радикалов липидов при взаимодействии с липогидропероксидами. Во второй из приведенных реакций образуется пероксинитрит – исключительно токсическое соединение, которое играет большую роль в развитии ряда патологических процессов.

Торможение обеих вредных реакций супероксида достигается тем, что его удаляют ферменты – супероксиддисмутазы, широко представленные в клетках практически всех живых организмов.

1.3.2 Пероксид водорода и радикалы гидроксила

Продукт дисмутации супероксидных радикалов – пероксид водорода – играет, по-видимому, роль регулятора уровня тиоловых соединений в клетках и окислительно-восстановительного потенциала. Оба этих процесса осуществляются в результате активности фермента глутатион-пероксидазы, катализирующего реакцию:



Снижение уровня основного резервуара сульфгидрильных групп в клетке, глутатиона, приводит к окислению тиолов белков, изменению активности ряда ферментов, а также к понижению редокс-потенциала в клеточном соке. Таким образом, супероксидные радикалы и образующийся из них пероксид водорода играют роль своего рода мессенжеров. В развитии патологических процессов большую роль играет реакция Фентона при которой образуются радикалы гидроксила. Они оказывают разрушительное действие на все жизненно-важные клеточные компоненты:

В белках гидроксильные радикалы окисляют тиоловые группы и гистидиновые остатки, тем самым инактивируя большинство ферментов.

Действуя на нуклеиновые кислоты, гидроксильные радикалы вызывают мутации. Многие известные мутагены действуют благодаря тому, что в ходе их метаболизма образуются гидроксильные радикалы.

Проникая в толщу биологических мембран, гидроксильные радикалы инициируют реакции цепного окисления липидов, что приводит к потере мембранами их функций, в первую очередь, функции барьера для ионов и водорастворимых молекул.

1.3.3 Другие активные формы кислорода

К активным формам кислорода многие авторы относят также гипохлорит, который образуется при взаимодействии пероксида водорода с хлорид-ионами под действием фермента миелопероксидазы. Строго говоря, гипохлорит можно было бы отнести к активным формам хлора, так же как и пероксинитрит – к активным формам азота. К радикалам липидов относятся три типа радикалов – алкильные, алкоксильные и диоксильные радикалы. Эти радикалы появляются при цепной окислении липидов. Многие авторы также относят их к активным формам кислорода, хотя по сути дела это скорее активные формы липидов. А активным формам липидов можно также отнести и липидные гидропероксиды (LOOH).

1.4 Цепное окисление липидов

Выше мы уже упоминали о том, что неферментативное окисление ненасыщенных жирных кислот, входящих в состав липидов наших тканей, представляет собой цепную реакцию (рис. 5.12). Эта цепная реакция инициируется свободным радикалом, например, гидроксильным радикалом $\text{OH}\cdot$. В результате развития цепи происходит перекисное окисление цепей ненасыщенных жирных кислот в фосфолипидах мембран с образованием гидроперекисей LOOH. В присутствии ионов железа цепи разветвляются, поскольку протекает реакция ионов железа с гидроперекисями и суммарная скорость реакции перекисного окисления липидов многократно возрастает.

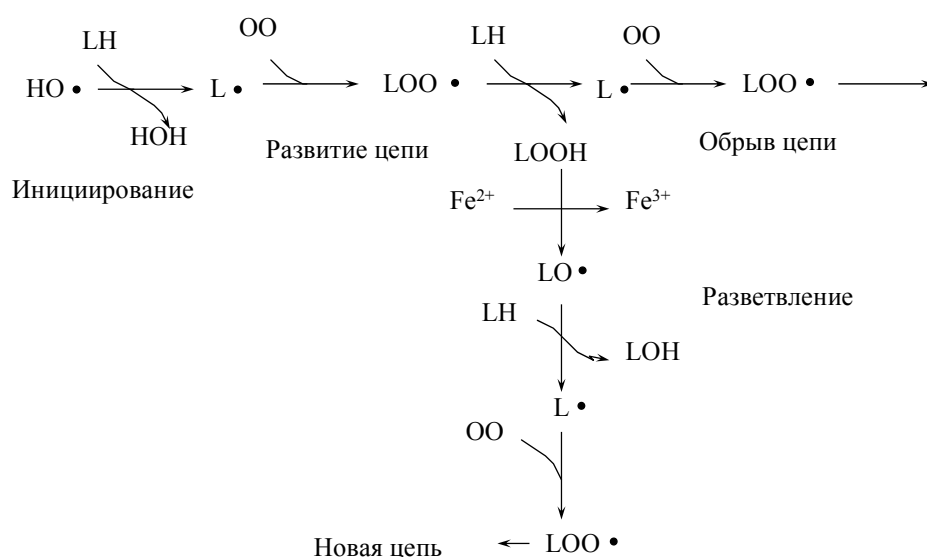
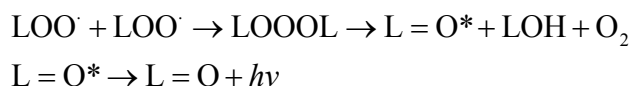


Рис. 5.12. Реакции цепного окисления липидов.

Важный биофизический метод изучения кинетики (а следовательно и механизма) цепного окисления липидов оказался метод измерения хемилюминесценции, сопровождающей этот процесс. Было показано, что хемилюминесценция возникает в результате взаимодействия двух липидных диоксидных радикалов $\text{LOO}\cdot$, в ходе которой образуются возбужденные молекулы продукта реакции, содержащего кето-группу.



Интенсивность свечения отражает концентрацию радикалов в системе, а это, в свою очередь, определяет скорость цепной реакции окисления липидов. Возможность непрерывной регистрации свечения без какого-либо вмешательства в химические реакции делает хемилюминесценцию удобным методом наблюдения за процессом перекисного окисления липидов, а точнее – за контролем скорости цепного окисления и уровня радикалов в системе в каждый данный момент времени.

1.5 Нестационарная кинетика перекисного окисления липидов и хемилюминесценции, индуцированной ионами Fe^{2+}

В исследованиях изучение кинетики перекисного окисления липидов существенный вклад внесли отечественные ученые.

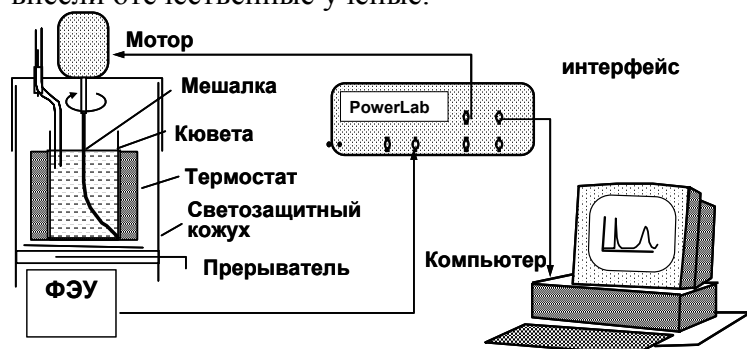


Рис. 5.13. Измерение сверхслабой люминесценции: в термостатируемой стеклянной кювете находится перемешиваемый образец; сигнал от фотоумножителя после предварительного усиления преобразуется при помощи специального интерфейса и обрабатывается компьютером.

В этих исследованиях использовали установку (рис. 5.13), состоящую из неохлаждаемого фотоэлектронного умножителя (ФЭУ), соединенного с самописцем или, позднее, с персональным компьютером через интерфейс. Большинство данных было получено при исследовании суспензий митохондрий, частично – при исследовании фосфолипидных везикул липосом. Для инициирования процесса перекисного окисления липидов к суспензиям добавляли ионы Fe^{2+} . Кинетические кривые, полученные для митохондрий (рис. 2.27), сходны с кривыми, полученными для липосом (рис. 5.14).

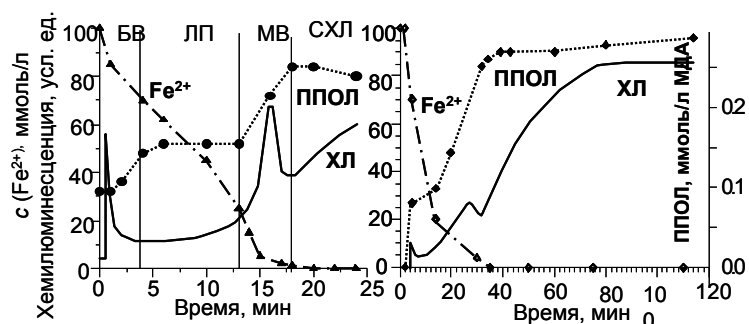


Рис. 5.14. Кинетика хемилюминесценции (ХЛ) окисления Fe^{2+} и накопления продуктов перекисного окисления липидов (ППОЛ) в суспензии липосом после добавления 100 мкмоль $FeCl_2$; БВ — быстрая вспышка, ЛП — латентный период, МВ — медленная вспышка, СХЛ — стационарная хемилюминесценция, МДА — малоновый диальдегид.

В таких системах можно различить четыре стадии развития перекисного окисления липидов и хемилюминесценции: (1) быстрая вспышка хемилюминесценции, (2) латентный период, (3) медленная вспышка хемилюминесценции, (4) стационарная хемилюминесценция. Анализ каждой из стадий внес определенный вклад в понимание механизма реакций цепного окисления липидов в биологических мембранах.

1.5.1 Быстрая вспышка хемилюминесценции

При добавлении ионов Fe^{2+} к раствору ненасыщенной жирной кислоты или к суспензии биомембран, содержащей липидные гидроперекиси ($LOOH$), наблюдается довольно короткая вспышка люминесценции (быстрая вспышка), которая возникает в результате разложения $LOOH$. Считается, что в этой реакции образуется по крайней мере три различных радикала: $LO\cdot$, L и $LOO\cdot$. Последний может образовываться только в

присутствии молекулярного кислорода, что и было использовано для выявления ключевой реакции, ответственной за свечение. Экспериментальная установка, использованная в этих опытах, показана на рис. 5.15.

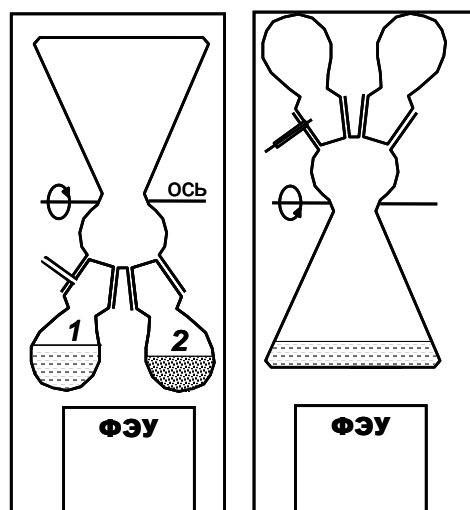
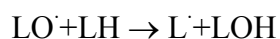
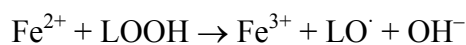


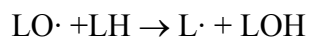
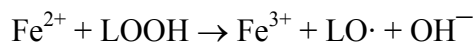
Рис. 5.15. Схема эксперимента для изучения быстрой вспышки хемилюминесценции.

В специальном стеклянном сосуде раствор FeSO_4 и раствор, содержащий липидные гидроперекиси, до начала эксперимента были разделены (рис. 5.15, слева). Затем сосуд изолировали при помощи светозащитного кожуха. После включения фотоэлектронного умножителя сосуд переворачивали, и оба раствора быстро перемешивались (рис. 5.15, справа). В отсутствие кислорода воздуха и в присутствии кислорода происходили различные реакции:

В вакууме:



В присутствии кислорода воздуха:



Было показано, что и в растворе окисленной олеиновой кислоты, и в митохондриальной суспензии, содержащей перекиси липидов, быстрая вспышка хемилюминесценции наблюдалась при добавлении ионов Fe^{2+} только в присутствии кислорода (рис. 5.16).

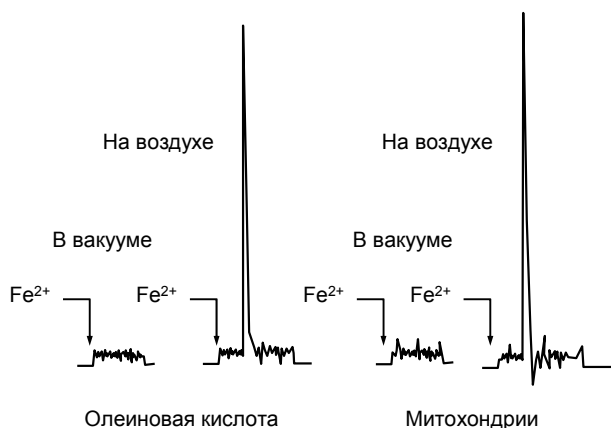


Рис. 5.16. Влияние кислорода на быструю вспышку хемилюминесценции.

Это означает, что радикалы $\text{LOO}\cdot$ являются обязательными участниками хемилюминесцентной реакции; наиболее вероятной является следующая реакция



где L=O^* – возбужденная молекула, а ${}^1\text{O}_2$ – возбужденная молекула кислорода (синглетный кислород) в мономерной или димерной форме. Интенсивность хемилюминесценции I в вышеозначенной реакции будет пропорциональна скорости реакции w , которая, в свою очередь, является произведением константы скорости реакции k_6 и концентрации участвующих радикалов:

$$I = \eta k_6 [\text{LOO}\cdot]^2 \quad (5.1)$$

где η – квантовый выход хемилюминесценции. Его значение довольно мало – от 10^{-9} до 10^{-15} .

Уравнение (5.1) показывает зависимость между интенсивностью хемилюминесценции и стационарной концентрацией липидных диоксид-радикалов. Измеряя интенсивность хемилюминесценции, можно определить концентрацию $\text{LOO}\cdot$ в любой момент времени:

$$[\text{LOO}\cdot] = \sqrt{I / \eta k_6} = A\sqrt{I} \quad (5.2)$$

где A – константа, зависящая от чувствительности прибора. Действительно, на этом уравнении основаны многочисленные приложения собственной хемилюминесценции при изучении реакций перекисного окисления липидов.

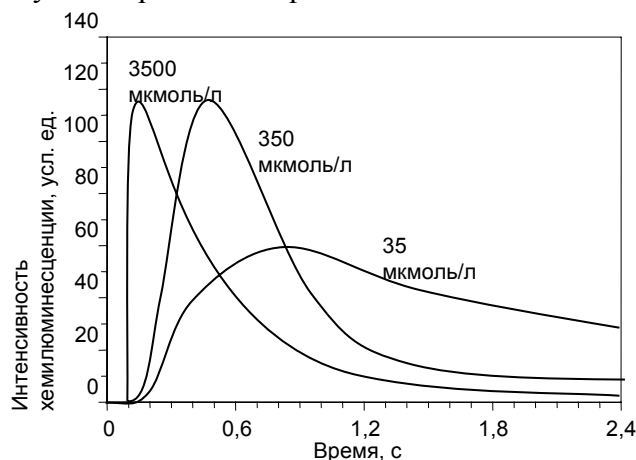


Рис. 5.17. Быстрая вспышка при разных начальных концентрациях Fe^{2+} в системе.

Амплитуда и длительность быстрой вспышки зависит как от количества липидных гидроперекисей, так и от концентрации добавленного Fe^{2+} (рис. 5.17). Если исходная концентрация ионов железа $[\text{Fe}^{2+}]_0$ низка, то все добавленные ионы Fe^{2+} расходуется на

реакции с гидроперекисями LOOH. Если исходная концентрация радикалов LOO· равна $[Fe^{2+}]_0$, то изменение концентрации радикалов описывается кинетикой реакции второго порядка. В случае, когда концентрация $[Fe^{2+}]_0$ гораздо больше концентрации [LOOH], начальная концентрация LOO· будет равна концентрации LOOH в изучаемой системе. Затем LOO· исчезнет в соответствии со скоростями их реакций с другими веществами. Скорость исчезновения радикалов возрастает, если в системе присутствуют некоторые вещества – антиоксиданты. Ионы железа Fe^{2+} сами по себе также являются антиоксидантом, и это может объяснить наблюдаемое в экспериментах уменьшение длительности быстрой вспышки при увеличении концентрации добавленного Fe^{2+} .

1.5.2 Медленная вспышка хемилюминесценции

Обычно медленная вспышка хемилюминесценции развивается вслед за латентным периодом в мембранных системах после добавления Fe^{2+} . Во время медленной вспышки быстро накапливаются продукты перекисного окисления липидов. Различные реакции определяют развития медленной вспышки и ее угасания. Прооксидантное действие Fe^{2+} вызывает автокаталитическое развитие хемилюминесценции на ранней стадии медленной вспышки:



С помощью одновременного измерения интенсивности хемилюминесценции I и концентрации Fe^{2+} была вычислена константа скорости приведенной выше реакции (k_p) в суспензиях митохондрий.

Затухание медленной вспышки является результатом снижения концентрации ионов Fe^{2+} до такого низкого уровня, что скорость реакции дальнейшего образования радикалов становится ниже скорости спонтанной рекомбинации этих радикалов (или их реакции с другими антиоксидантами помимо Fe^{2+}). На заключительных стадиях медленной вспышки только последние реакции определяют кинетику угасания хемилюминесценции.

1.5.3 Латентный период развития хемилюминесценции

Длительность латентного периода возрастает с увеличением $[Fe^{2+}]_0$ как в митохондриях, так и в липосомах.

Само существование данного феномена подразумевает антиоксидантную активность ионов Fe^{2+} как результат их взаимодействия с липидными радикалами, в частности, LOO·. При этом радикалы расходуются со скоростью

$$w_9 = k_9 [Fe^{2+}] [LOO\cdot], \quad (5.3)$$

где k_9 – константа скорости реакции между Fe^{2+} и LOO·.

С другой стороны, основным источником новых радикалов в присутствии LOOH является реакция разветвления цепей, протекающая со скоростью

$$w_p = k_p [Fe^{2+}] [LOOH], \quad (5.4)$$

В течение латентного периода скорость перекисного окисления липидов меняется медленно, так что можно предположить, что образование и исчезновение радикалов происходит с равными скоростями (приближение стационарного состояния):

$$w_9 = w_p \Rightarrow k_9 [Fe^{2+}] [LOO\cdot] = k_p [Fe^{2+}] [LOOH] \quad (5.5)$$

Следовательно, существует линейная зависимость между концентрацией свободных радикалов и стационарными концентрациями липидных гидроперекисей при сравнительно высоких концентрациях Fe^{2+} .

$$[\text{LOO}\cdot] = \frac{k_p}{k_9} [\text{LOOH}] \quad (5.6)$$

Концентрация радикалов $\text{LOO}\cdot$, участвующих в цепи окисления липидов в течение латентного периода, находится в зависимости от концентрации Fe^{2+} . Чтобы найти эту функцию, необходимо более подробно рассмотреть кинетику накопления липидных гидроперекисей. Основной реакцией образования LOOH является взаимодействие между ненасыщенными липидами и радикалами $\text{LOO}\cdot$ (развитие цепей), происходящее в аэробных условиях со скоростью

$$w_3 = k_3[\text{LH}][\text{LOO}\cdot] \quad (5.7)$$

Расходование LOOH в присутствии Fe^{2+} происходит со скоростью w_p (уравнение (5.4)). Скорость накопления LOOH – это разность между w_3 и w_p

$$\frac{d[\text{LOOH}]}{dt} = w_3 - w_p = k_3[\text{LH}][\text{LOO}\cdot] - k_p[\text{Fe}^{2+}][\text{LOOH}], \quad (5.8)$$

Принимая во внимание уравнение (5.6), получаем

$$\frac{d[\text{LOOH}]}{dt} = k_p \left(\frac{k_3[\text{LH}]}{k_9} - [\text{Fe}^{2+}] \right) [\text{LOOH}]$$

Или

$$\frac{d[\text{LOOH}]}{dt} = k_p \gamma [\text{LOOH}] \quad (5.9)$$

$$\text{где } \gamma = k_p \left(\frac{k_3[\text{LH}]}{k_9} - [\text{Fe}^{2+}] \right).$$

Решение дифференциального уравнения (5.9) возможно, если допустить, что $[\text{Fe}^{2+}]$ является константой, т.е. концентрация железа примерно постоянна и известна в каждый небольшой промежуток времени. Тогда

$$\ln \frac{[\text{LOOH}]}{[\text{LOOH}]_0} = \gamma t \quad (5.10)$$

Принимая во внимание уравнения (5.6) и (5.10), можно записать:

$$\begin{aligned} [\text{LOO}\cdot] &= [\text{LOO}\cdot]_0 e^{\gamma t} \\ I &= I_0 e^{2\gamma t} \end{aligned} \quad (5.11)$$

1.5.4 Ионы Fe^{2+} как про- и антиоксиданты

Из уравнения (5.9) следует, что при определенной *критической* концентрации ионов железа $[\text{Fe}^{2+}]^* = k_3[\text{LH}]/k_9$ показатель $\gamma = 0$, и следовательно концентрации $[\text{LOOH}]$ и радикалов $\text{LOO}\cdot$ не изменяются со временем (уравнение (5.11)). При концентрации ионов железа $[\text{Fe}^{2+}] < [\text{Fe}^{2+}]^*$ $\gamma > 0$, и концентрация LOOH будет возрастать с увеличивающейся скоростью (см. уравнение). Значит, железо в этом случае действует как *прооксидант*. При высоких концентрациях ($[\text{Fe}^{2+}] > [\text{Fe}^{2+}]^*$) $\gamma < 0$, и железо будет служить *антиоксидантом*. В результате, автоокисление Fe^{2+} в липид-содержащей системе (липосомы или суспензия клеточных органелл) приводит к тому, что затухающий процесс затухания ($[\text{Fe}^{2+}] > [\text{Fe}^{2+}]^*$) переходит в автоускоряющийся ($[\text{Fe}^{2+}] < [\text{Fe}^{2+}]^*$).

Точка, в которой $[Fe^{2+}] = [Fe^{2+}]^*$, соответствует минимуму на кривой хемилюминесценции между быстрой вспышкой и последующим ростом хемилюминесценции (началом медленной вспышки). Измерение концентраций ионов железа в этой точке, $[Fe^{2+}]^*$, позволило получить значение отношения констант скорости реакций $k_3[LH]/k_9 = [Fe^{2+}]^*$.

Время между добавлением Fe^{2+} и минимумом на кривой хемилюминесценции является теоретическим значением *латентного периода* хемилюминесценции. Время до максимума медленной вспышки хемилюминесценции часто используется в экспериментах как эквивалент времени латентного периода.

1.5.5 Экспериментальное определение эффективных констант скорости

Биомембраны являются в основном гетерогенной системой, и использование химических законов кинетики, подходящих для растворов, в этом случае довольно условно. Тем не менее, путем измерения кинетики хемилюминесценции стало возможным определить “эффективные” константы скорости некоторых важнейших реакций перекисного окисления липидов. Пример подобного эксперимента приведен на рис. 5.18.

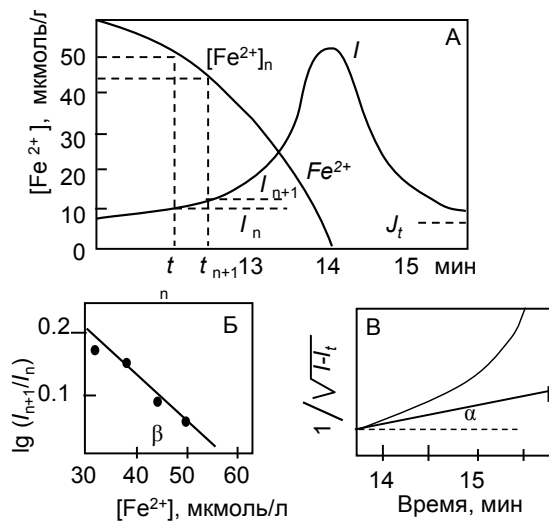


Рис. 5.18. Экспериментальное определение констант скоростей частичных реакций, участвующих в процессе перекисного окисления липидов. А и Б — разложение гидроперекисей ионами железа (k_p) и критическая концентрация ионов железа $[Fe^{2+}]^*$. В — реакция диспропорциональности радикалов $LOO\cdot$ (k_6).

А — экспериментальная кривая кинетики хемилюминесценции во время медленной вспышки (1) и окисления ионов железа (2); Б — логарифм соотношения интенсивностей хемилюминесценции (I_{n+1}/I_n) в зависимости от концентрации ионов железа, точка пересечения графика с осью абсцисс обозначает критическую концентрацию ионов железа $[Fe^{2+}]^*$; наклон прямой дает значение $k_p\Delta t$, где Δt — данный интервал времени ($t_{n+1} - t_n$); В — угасание хемилюминесценции на заключительном этапе медленной вспышки.

Константу скорости реакции разветвления цепей измеряли в суспензии митохондрий путем сравнения кинетических кривых для концентрации Fe^{2+} и интенсивности хемилюминесценции для того же образца (рис. 18а). Временную шкалу делили на небольшие интервалы времени Δt и определяли соотношение интенсивностей хемилюминесценции I_{n+1}/I_n для каждого момента времени t_n . Затем определяли концентрацию Fe^{2+} в то же время t_n , а логарифм I_{n+1}/I_n откладывали как функцию $[Fe^{2+}]_n$ (рис. 5.18б).

Из уравнений (5.10) и (5.11) следует, что

$$\lg \frac{[LOO\cdot]_{n+1}}{[LOO\cdot]_n} = \frac{1}{2} \lg \frac{I_{n+1}}{I_n} = k_p \{ [Fe^{2+}]^* - [Fe^{2+}]_n \} (t_{n+1} - t_n) \quad (5.12)$$

$$\lg \frac{[LOO\cdot]_{n+1}}{[LOO\cdot]_n} = 2k_p \{ [Fe^{2+}]^* - [Fe^{2+}]_n \} \Delta t \quad (5.13)$$

Таким образом, тангенс угла наклона прямой на рис. 5.18б дает нам величину $2k_p\Delta t$, и теперь можно рассчитать k_p . В данной системе $k_p = (3,2 \pm 0,4) \cdot 10^{-2} \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$.

С другой стороны, можно рассматривать $[\text{Fe}^{2+}]^*$ как пересечение прямой с осью абсцисс. Критическая концентрация железа, полученная по этому способу, равнялась $[\text{Fe}^{2+}]^* = 63 \pm 13$ мкмоль/л.

На стадии затухания медленной вспышки ионы Fe^{2+} в системе не обнаруживаются, а затухание хемилюминесценции очевидно является результатом реакции 6 (взаимодействие радикалов $\text{LOO}\cdot$). Скорость этой реакции описывается уравнением:

$$\frac{d[\text{LOO}\cdot]}{dt} = -2k_6[\text{LOO}\cdot]^2 \quad (5.14)$$

Напомним, что интенсивность хемилюминесценции зависит от концентрации радикала $\text{LOO}\cdot$ следующим образом:

$$I = Ak_6[\text{LOO}\cdot]^2 \quad (5.15)$$

где A – фактор, зависящий от квантового выхода хемилюминесценции геометрии системы и чувствительности приемника света. Таким образом,

$$[\text{LOO}\cdot] = \sqrt{\frac{I}{Ak_6}} \Rightarrow \frac{d\sqrt{I}}{dt} = -2 \frac{I\sqrt{Ak_6}}{A} \Rightarrow \frac{d\sqrt{I}}{dt} = -2\sqrt{\frac{k_6}{A}} \cdot I \quad (5.16)$$

Решение уравнения (5.16) дает

$$[\text{LOO}\cdot] = \sqrt{\frac{I}{Ak_6}} \Rightarrow \frac{d\sqrt{I}}{dt} = -2 \frac{I\sqrt{Ak_6}}{A} \Rightarrow \frac{1}{\sqrt{I}} = \frac{1}{\sqrt{I_0}} + 2\sqrt{\frac{k_6}{A}} \cdot t \quad (5.17)$$

Построив график зависимости $1/\sqrt{I}$ от времени t , можно найти тангенс угла наклона ($\text{tg}\alpha$ на рис. 5.18) и затем рассчитать $k_6 = 0,25A\text{tg}^2\alpha$. Величину A оценивали как площадь под кривой хемилюминесценции (общее количество излучения), отнесенную к количеству молей продукта, образованного при рекомбинации радикалов $\text{LOO}\cdot$.

Предполагалось, что ионы Fe^{2+} вступают в реакцию только с гидроперекисями, образуя один радикал $\text{LOO}\cdot$ в каждом случае, и все эти радикалы расходуются исключительно в реакции 6. Тогда полное количество возбужденного продукта, образованного в литре суспензии, будет $A[\text{Fe}^{2+}]_0$, а суммарное количество излучения

$$S = 1/2A[\text{Fe}^{2+}]_0 \quad (5.18)$$

где $[\text{Fe}^{2+}]_0$ – концентрация ионов железа в начале медленной вспышки. Из этого уравнения определяется значение A , а k_6 находят по уравнению (5.17). Определенное таким образом среднее значение (из 31 параллельного эксперимента) было $k_6 = (1,1 \pm 0,2) \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1} = 0,65 \text{ мкмоль}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$.

Таким образом, константы $k_2[\text{O}_2]$, k_p , k_6 , а также соотношение $k_3[\text{LH}]/k_9 = [\text{Fe}^{2+}]^*$, были получены прямо из экспериментов с суспензиями митохондрий. Тем не менее, следует отметить, что при разных экспериментальных условиях оцениваемые константы скоростей могут быть различными. Одним из примеров является влияние концентрации суспензии. Было обнаружено, что при добавлении к суспензии липосом ионов Fe^{2+} в концентрациях выше критических ($[\text{Fe}^{2+}]^*$) в развитии перекисного окисления липидов наблюдался латентный период, продолжительность которого возрастала с увеличением концентрации железа (рис. 5.19).

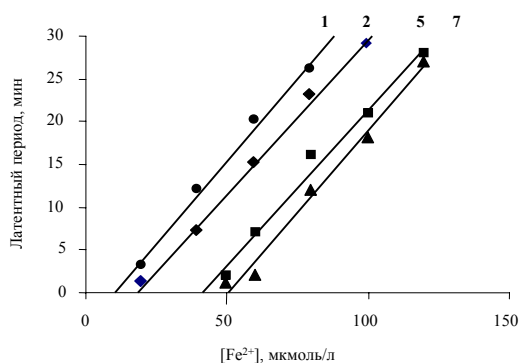


Рис. 5.19. Влияние концентрации липосом на “критическую” концентрацию ионов железа $[Fe^{2+}]^*$, числа у кривых обозначают концентрацию липосом в суспензии, мг/мл. Продолжительность латентного периода определяли как время между максимумами быстрой и медленной вспышки хемиллюминесценции. Точки пересечения прямых линии с осью абсцисс определяют “критическую” концентрацию ионов железа $[Fe^{2+}]^*$. Видно, что $[Fe^{2+}]^*$ возрастает с увеличением концентрации липосом в суспензии.

Был разработан метод оценки $[Fe^{2+}]^*$, основанный на зависимости продолжительности латентного периода от $[Fe^{2+}]$. Было обнаружено, что значение $[Fe^{2+}]^*$ не постоянно, а изменяется от 10 до 50 мкмоль/л при изменении концентрации фосфолипидов в суспензии ([LH]) от 1 до 4 мг/мл, так что соотношение $[Fe^{2+}]^*/[LH]$ сохранялось приблизительно постоянным. Это явление можно объяснить тем, что мембраны предположительно связывают большую часть добавленного Fe^{2+} .

1.6 Математическое моделирование кинетики реакций

Наряду с экспериментальными исследованиями, можно проводить математическое моделирование кинетики реакций перекисного окисления липидов.

Набор химических уравнений, описывающих процесс перекисное окисление липидов, довольно сложен и даже в отсутствие антиоксидантов включает в себя по крайней мере 12 частных реакций:

- 1) $HO \cdot + LH \rightarrow HOH + L \cdot$
- 2) $L \cdot + O_2 \rightarrow LOO \cdot$
- 3) $LOO \cdot + LH \rightarrow LOOH + L \cdot$
- 4) $L \cdot + L \cdot \rightarrow LL$
- 5) $L \cdot + LOO \cdot \rightarrow LOOL$
- 6) $LOO \cdot + LOO \cdot \rightarrow L=O + LOH + \text{фотон}$
- 7) $L \cdot + InH \rightarrow LH + In \cdot$
- 8) $In \cdot + In \cdot \rightarrow In - In$
- 9) $Fe^{2+} + L \cdot + H^+ \rightarrow Fe^{3+} + LH$
- 10) $Fe^{2+} + LOO \cdot + H^+ \rightarrow Fe^{3+} + LOOH$
- 11) $Fe^{2+} + LOOH \rightarrow Fe^{3+} + LO \cdot + OH^-$
- 12) $LO \cdot + LH \rightarrow LOH + L \cdot$

В гомогенных системах скорость химической реакции является произведением концентраций исходных веществ и константы скорости реакции. Например, для реакций 1 и 2 в приведенной выше схеме:

$$\begin{aligned} v_1 &= k_1[\text{HO}\cdot][\text{LH}] \\ v_2 &= k_2[\text{L}\cdot][\text{O}_2] \end{aligned} \quad (5.19)$$

Скорость накопления участника реакции – это алгебраическая сумма скоростей частных реакций, в которых участник образуется или расходуется. Например, скорость накопления гидроперекиси (LOOH) на вышеуказанной схеме такова:

$$\frac{d[\text{LOOH}]}{dt} = k_3[\text{LH}][\text{LOO}\cdot] + k_9[\text{Fe}^{2+}][\text{LOO}\cdot] - k_p[\text{Fe}^{2+}][\text{LOOH}] \quad (5.20)$$

В нашей системе реакций участвуют по меньшей мере 7 реагентов (LH, LOOH, L·, LO·, LOO·, Fe²⁺, Fe³⁺), текущие концентрации которых определяют скорость реакции в каждый данный момент времени. Для того, чтобы рассчитать концентрации этих участников в зависимости от времени, нужно решить систему, содержащую, по меньшей мере, 7 дифференциальных уравнений. Это слишком много для аналитического решения, а также не слишком удобно для численного решения системы дифференциальных уравнений. Таким образом, в схему реакций следует ввести некоторые разумные упрощения.

1.6.1 Упрощение системы химических уравнений за счет замены нескольких реакций одной

Можно существенно упростить систему химических, а значит - и дифференциальных уравнений кинетики, если использовать два важных правила химической кинетики:

Правило 1: Скорость нескольких последовательных реакций равна скорости самой медленной из них.

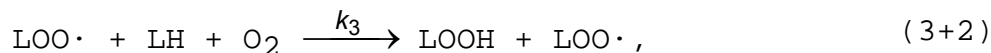
Это правило позволяет заменить последовательные реакции одной обобщённой реакцией, приняв константу скорости этой реакции равной константе скорости самой медленной из последовательных реакций. Так, например, в нашем случае реакции 2 и 3 – это последовательные реакции. Вопрос о том, какую из них считать более медленной, вызывает, однако споры. В реакциях цепного окисления органических соединений, с которыми имеют дело химики, более медленная реакция – это реакция взаимодействия диоксид радикала с молекулой окисляющегося субстрата, аналогичная реакции 3 на вышеприведенной схеме. Это обусловлено тремя обстоятельствами:

Низкой, по сравнению с реакцией 2, величиной константы скорости процесса,

Относительно низкой концентрацией субстрата окисления (LH)

Значительной концентрацией кислорода в хорошо аэрируемых растворах

В этом случае уравнение реакции продолжения цепи можно записать так:



а константа скорости этой реакции k_3 приблизительно равна константе скорости реакции 3.

Возможно, что в случае цепного окисления липидов реакцией, лимитирующей скорость продолжения цепи, окажется не реакция 3, а реакция 2, поскольку концентрация окисляющегося субстрата (полиненасыщенных жирных кислот) в липидной фазе мембран очень высока, а кислорода в клетках существенно меньше, чем в водных растворах. Впрочем, сейчас для нас это не особенно принципиально.

Правило 2: Из нескольких параллельных реакций наибольшую роль играет самая быстрая; поэтому для простоты остальными реакциями иногда можно пренебречь.

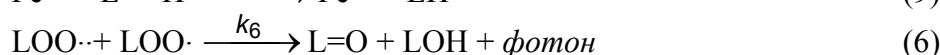
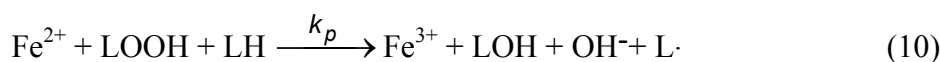
Это правило позволяет заметно упростить приведенную выше схему реакций.

1) В присутствии кислорода воздуха радикалов LO· и L· гораздо меньше, чем радикалов LOO·; поэтому реакциями 4 и 5 можно пренебречь, оставив только одну реакцию взаимодействия радикалов – реакцию 6.

2) При наличии в среде ионов Fe²⁺ и при незначительной концентрации других антиоксидантов часто можно пренебречь реакцией 7, оставив реакцию 9. Реакцию 10 мы тоже не будем пока принимать во внимание.

3) В отсутствие иных источников свободных радикалов, образование новых радикалов происходит только в реакции 11 (реакция разветвления цепей). Обозначим константу скорости этой реакции как *k_p*. Реакцией 1 можно пренебречь, если нет источника радикалов HO·.

После всех этих упрощений получаем систему химических уравнений цепного окисления липидов, содержащую всего четыре реакции:



Впрочем, при отсутствии липидных гидропероксидов в исходном материале, первоначальное образование радикалов, сначала радикалов кислорода, а потом радикалов липидов, обусловлено аутоокислением на воздухе ионов двухвалентного железа, так что минимальный набор химических уравнений будет состоять все же не из четырех, а из пяти химических реакций (См. первый столбец в таблице 5.2).

1.6.2 Числовое решение системы дифференциальных уравнений

Для решения сложной системы дифференциальных уравнений кинетики приходится использовать численные методы. Самый простой метод - Эйлера и Коши, при котором бесконечно малые заменяются на достаточно малые приращения, а интегрирование заменяется суммированием. Процедура вычислений сводится к следующему. (см. таблицу 5.2):

1. Составляем систему дифференциальных уравнений скоростей всех частных (или *парциальных*) реакций. При этом концентрации веществ, которые во времени мало изменяются, например, субстрата окисления LH, считаем постоянными (Столбец 2 в Таблице 5.2).

Таблица 5.2

Скорости реакций перекисного окисления липидов

Химические реакции	Уравнение скорости	Константы скорости
$\text{Fe}^{2+} + \text{O}_2 \rightarrow \text{LOO}\cdot$	$v_0 = k_0[\text{O}_2][\text{Fe}^{2+}]$	$k_0[\text{O}_2] = 0,042^*$
$\text{LOO}\cdot + \text{LH} \rightarrow \text{L}\cdot + \text{LOOH}$	$v_3 = k_3[\text{LH}][\text{LOO}\cdot]$	$k_3[\text{LH}] = 18^*$
$\text{LOOH} + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{LOO}\cdot$	$v_p = k_p[\text{LOOH}][\text{Fe}^{2+}]$	$k_p = 0,019^{**}$
$\text{LOO}\cdot + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{LOOH}$	$v_9 = k_9[\text{LOO}\cdot][\text{Fe}^{2+}]$	$k_9 = 0,3^{**}$
$\text{LOO}\cdot + \text{LOO}\cdot \rightarrow \text{P}^* \rightarrow h\nu$	$v_6 = k_6[\text{LOO}\cdot]^2$	$k_6 = 0,13^{**}$

$LO\cdot + InH \rightarrow In + LOOH$	$v_7 = k_7[LOO\cdot][InH]$	Значения различаются
---------------------------------------	----------------------------	----------------------

Размерность констант: * – мин^{-1} , ** – $\text{мкмоль/л}\cdot\text{мин}$

2. Находим скорости приращения концентрации основных участников реакции. Она равна алгебраической сумме скоростей тех парциальных реакций, в которых эти участники образуются либо расходуются.

Так для гидропероксида, радикала диоксида и ионов двухвалентного железа имеем такие скорости приращения концентрации:

$$\begin{aligned}\frac{d[LOOH]}{dt} &= v_3 - v_p; \\ \frac{d[LOO\cdot]}{dt} &= v_p - v_6 - v_9; \\ \frac{d[Fe^{2+}]}{dt} &= -v_9 - v_p.\end{aligned}\quad (5.21)$$

3. Переписываем систему дифференциальных уравнений в виде обычных алгебраических уравнений с использованием очень малых приращений концентраций веществ и времени:

$$\begin{aligned}\Delta[LOOH] &= (v_3 - v_p)\Delta t; \\ \Delta[LOO\cdot] &= (v_p - v_6 - v_9)\Delta t; \\ \Delta[Fe^{2+}] &= (-v_9 - v_p)\Delta t\end{aligned}\quad (5.22)$$

4. Подставляем в правые части уравнений значения констант скоростей реакций (см. столбцы 2 и 3 в Таблице 5.2) и начальные значения концентраций $[LOOH]_0$, $[LOO\cdot]_0$ и $[Fe^{2+}]_0$, взятые из экспериментальных данных. Задаём достаточно малую величину Δt и рассчитываем величины приращений концентраций участников $\Delta_1[LOOH]$, $\Delta_1[LOO\cdot]$ и $\Delta_1[Fe^{2+}]$. Временной интервал Δt должен быть достаточно коротким, скажем 1/1000 или 1/10000 от всей шкалы времени.

5. Находим концентрации участников для времени $t_1 = 0 + \Delta t$:

$$\begin{aligned}[LOOH]_1 &= [LOOH]_0 + \Delta_1[LOOH]; \\ [LOO\cdot]_1 &= [LOO\cdot]_0 + \Delta_1[LOO\cdot]; \\ [Fe^{2+}]_1 &= [Fe^{2+}]_0 + \Delta_1[Fe^{2+}].\end{aligned}\quad (5.23)$$

6. Исходя из значений текущих концентраций: $[LOOH]_1$, $[LOO\cdot]_1$ и $[Fe^{2+}]_1$, рассчитываем новые значения приращений концентраций $\Delta_2[LOOH]$, $\Delta_2[LOO\cdot]$ и $\Delta_2[Fe^{2+}]$.

7. Находим концентрации участников для времени $t_2 = t_1 + \Delta t$:

$$\begin{aligned}[LOOH]_2 &= [LOOH]_1 + \Delta_2[LOOH]; \\ [LOO\cdot]_2 &= [LOO\cdot]_1 + \Delta_2[LOO\cdot]; \\ [Fe^{2+}]_2 &= [Fe^{2+}]_1 + \Delta_2[Fe^{2+}].\end{aligned}\quad (5.24)$$

8. Повторяя операции 4 – 7, рассчитываем концентрации участников реакции перекисного окисления липидов при каждом данном значении времени.

9. Строим рассчитанные кинетические кривые и сравниваем их с данными эксперимента.

В качестве такого рода экспериментальных данных могут служить кривые тапа приведенных на рис. 2.22 (суспензия митохондрий) или на рис. 5.22 (суспензия фосфолипидных везикул - липосом).

Примером программного обеспечения, с помощью которого можно реализовать расчеты кинетики сложных систем химических реакций, служит программа “Kinetic Analyzer”, разработанная Д.И. Измайловым и Ю. А. Владимировым для среды Windows 95-98. На рисунках 5.20 и 5.21 показан вид экранов программы, на которых отражены ступени моделирования кинетики реакции.

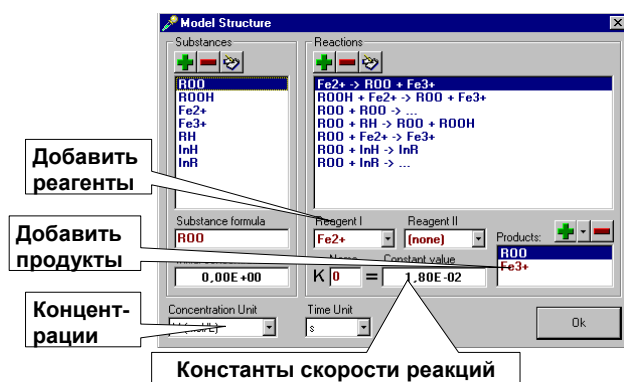


Рис. 5.20. Окно программы Kinetic Analyzer

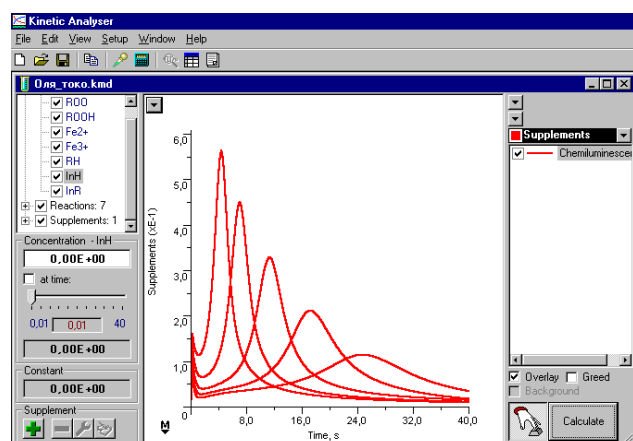


Рис. 5.21. Окно программы Kinetic Analyzer

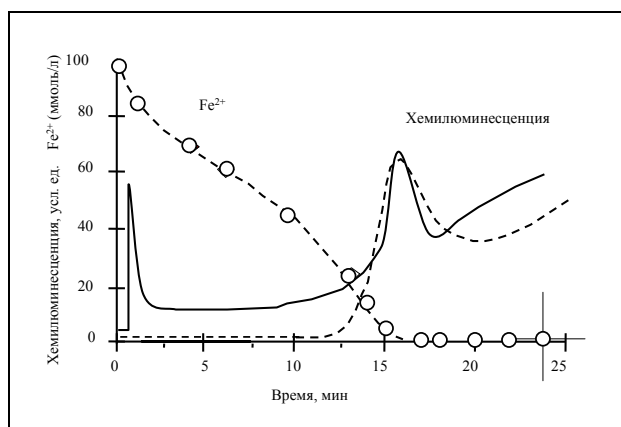


Рис. 5.22. Сравнение экспериментальных данных (1, 2) с расчетными (3). Измерения проводили на суспензиях липосом после добавления 10 мкмоль/л Fe^{2+} .

На рис. 5.22 приведены экспериментальная кривая хемилюминесценция для липосом и кривая, рассчитанная с помощью констант скоростей (табл. 5.2). Видно, что есть хорошее совпадение кинетики окисления Fe^{2+} , но нет хорошей корреляции между измеренной экспериментально и рассчитанной кинетикой хемилюминесценции. Люминесценция,

измеренная в экспериментах на самых ранних стадиях процесса, была более интенсивной, чем это следовало из расчетов.

Для такого несоответствия, скорее всего, есть две причины. Прежде всего, существует не единственная, а вероятнее всего две хемилюминесцентные реакции, причем вторая реакция развивается постепенно в ходе накопления липидных гидроперекисей. Эта вторая реакция доминирует на стадии "стационарной хемилюминесценции". Недавно в экспериментах был использован кумариновый краситель С-525, мощный усилитель хемилюминесценции, селективный для реакции диспропорциональности липидного диоксид-радикала см. раздел **Ошибка! Источник ссылки не найден.**) На рис. 5.23 показаны экспериментальные данные (слева) и рассчитанные кривые (справа) для липосом в присутствии С-525. Соответствие очевидно.

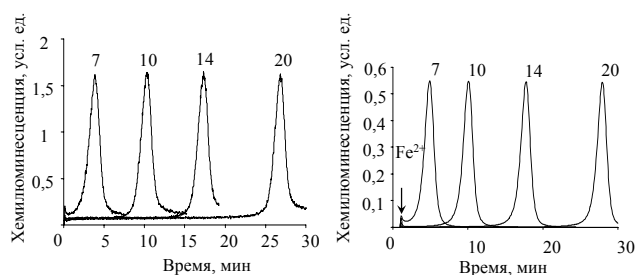


Рис. 5.23. Математическое моделирование кинетики хемилюминесценции, вызванной перекисным окислением липидов; числа у кривых показывают концентрации LOOH, ммоль/л. Кривые слева — эксперимент, справа — расчетные данные.