

Міністерство освіти і науки України  
Чернівецький національний університет  
імені Юрія Федьковича

О.М. Волощук

# Біохімічні механізми ушкодження клітин

Навчально-методичний посібник



Чернівці

Чернівецький національний університет  
імені Юрія Федьковича

2022

УДК 576.32/.36(075.8)  
В 686

*Друкується за ухвалою вченої ради  
Чернівецького національного університету імені Юрія Федьковича  
(протокол № від)*

**Рецензенти:**

**Кашуба В.І.** д.б.н., проф. член-кореспондент НАН  
України (Інститут молекулярної біології і генетики);

**Дорошко В.А.**, к.м.н., доц. (Буковинський  
державний медичний університет)

**Волощук О.М.**

В 686 Біохімічні механізми ушкодження клітин : навч.-метод  
посіб., 2022. 164 с.  
ISBN 978-966-423-708-3

Видання містить дидактичні матеріали, необхідні для самостійної підготовки до практичних занять з дисципліни Біохімічні механізми ушкодження клітин та для аудиторних занять. Наведена базова інформація про біохімічні механізми ушкодження та загибелі клітин, внутрішньоклітинні адаптивні механізми при ушкодженні, способи генерації активних форм кисню й азоту в організмі, маркери оксидативних ушкоджень біомолекул та біохімічні механізми функціонування ферментативних та неферментативних компонентів антиоксидантної системи.

Для студентів вищих закладів освіти, аспірантів, наукових працівників у галузі біології та медицини.

УДК 576.32/.36(075.8)

ISBN 978-966-423-708-3 © О.М. Волощук, 2022  
© Чернівецький національний університет  
імені Юрія Федьковича, 2022

## Передмова

Навчально-методичний посібник підготовлений згідно з програмою вибіркового курсу «Біохімічні механізми uszkodження клітин» для студентів денної та заочної форм навчання. Дидактичні матеріали, наведені у посібнику, необхідні для самостійної підготовки до практичних занять з дисципліни та для аудиторних занять. Кожний розділ містить завдання для самостійної роботи у позааудиторний час: запитання та завдання для самопідготовки, тестові завдання різного рівня складності, ситуаційні завдання.

Головна мета видання – формування у студентів самостійності як особистісної риси, яка базується на умінні систематизувати набуті теоретичні знання, застосовувати їх для виконання практичних завдань, планувати та контролювати свою діяльність.

У посібнику наведені базові поняття про біохімічні механізми uszkodжень та загибелі клітин, внутрішньоклітинні адаптивні механізми при uszkodженні, способи генерації активних форм кисню й азоту в організмі, маркери оксидативних uszkodжень біомолекул та біохімічні механізми функціонування ферментативних та неферментативних компонентів антиоксидантної системи. Детально розглянуті механізми  $\text{Ca}^{2+}$ -опосередкованого, електролітно-осмотичного, ішемічного, ацидотичного та токсичного uszkodження клітин. Окрім того, описані біохімічні особливості апоптозу, некрозу, аноїкісу, піроптозу, онкозу, ентозу, корніфікації як різновидів загибелі клітин. Окрема увага приділяється питанням біохімічної суті компенсаторних реакцій, спрямованих на відновлення порушеного внутрішньоклітинного гомеостазу.

Використання видання під час самопідготовки сприятиме глибшому розумінню студентами теоретичних і практичних проблем сучасної біохімії, полегшить опанування програми навчальної дисципліни.

## **ТЕМА 1. БІОХІМІЧНІ МЕХАНІЗМИ УШКОДЖЕННЯ КЛІТИН**

**Мета** – сформуванати уявлення про біохімічні механізми ушкодження клітин.

### **Запитання та завдання для самопідготовки:**

1. Наведіть визначення поняття «ушкодження клітин» та розкрийте біохімічні особливості різних видів ушкодження.
2. Розкрийте біохімічну суть ліпідних механізмів ушкодження клітини.
3. Охарактеризуйте вклад активації фосфоліпази  $A_2$  в ушкодженні мембран клітини.
4. Опишіть основні шляхи підвищення вмісту вільних жирних кислот у клітині.
5. Поясніть механізми ушкодження клітинних мембран амфифільними сполуками та детергентами.
6. Які механізми порушення бар'єрної функції мембран?
7. Вкажіть біохімічні особливості  $Ca^{2+}$ -опосередкованих механізмів ушкодження клітин.
8. За яких умов спостерігається різке підвищення концентрації іонів кальцію в цитоплазмі?
9. Поясніть суть електролітно-осмотичних механізмів ушкодження клітин.
10. Охарактеризуйте наслідки дисбалансу електролітного складу клітини.
11. Розкрийте суть механізмів ушкодження клітини за умов ацидозу.
12. Окресліть особливості протеїнових механізмів ушкодження клітини.
13. Сформулюйте особливості нуклеїнових механізмів ушкодження клітини.
14. Опишіть механізми токсичного ушкодження клітини.
15. Які існують механізми порушення рецепторної функції клітини?
16. Назвіть фактори, які призводять до порушення процесів енергозабезпечення клітин.
17. Опишіть особливості метаболізму та функціональної активності клітин за умов порушення їхнього енергозабезпечення.

18. Розкрийте суть механізмів ішемічного ушкодження клітин.

19. Охарактеризуйте механізми реперфузійного ушкодження клітин.

20. Охарактеризуйте шляхи ушкодження клітинних структур лізосомними гідролазами.

21. Заповніть таблицю:

<b>Ознаки ушкодження клітин</b>	<b>Приклади</b>
Структурні	
Функціональні	
Фізико-хімічні	
Біохімічні	
Термодинамічні	

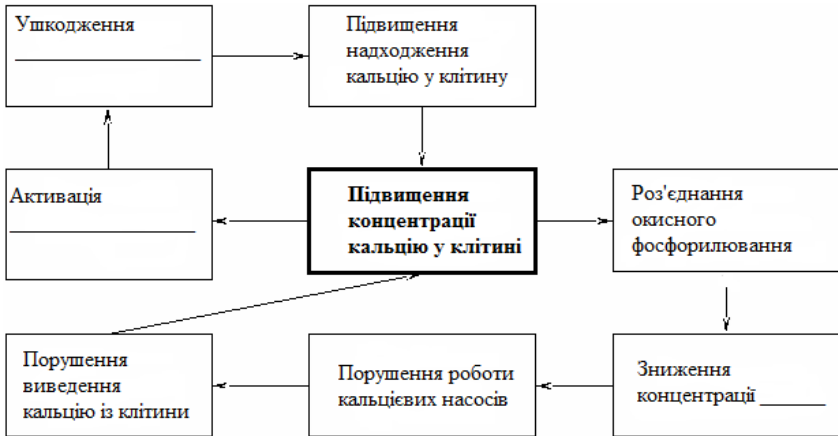
22. Заповніть таблицю:

<b>Ушкоджувальні фактори</b>	<b>Приклади</b>
Фізичні фактори	
Хімічні фактори	
Біологічні фактори	

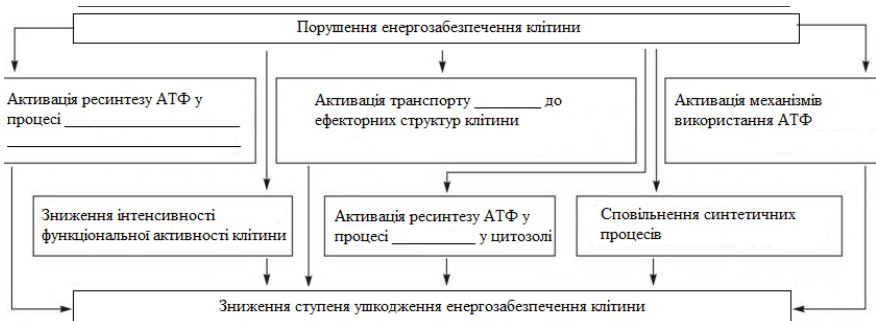
23. Заповніть таблицю:

<b>Біохімічні механізми ушкодження клітин</b>	<b>Особливості</b>
Ліпідні механізми	
Кальцієві механізми	
Електролітно-осмотичні механізми	
Ацидотичні механізми	
Протеїнові механізми	
Нуклеїнові механізми	

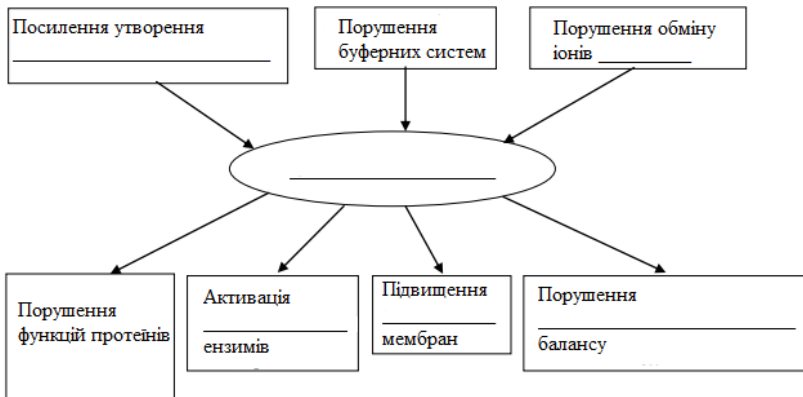
24. Заповніть пропуски:



25. Заповніть пропуски:



26. Заповніть пропуски:



### **Основні базові поняття, якими має оволодіти студент**

**Ушкодження клітин (альтерація)** – це процес, оснований на порушенні гомеостазу. Ушкодження клітин супроводжується структурними, фізико-хімічними, біохімічними, функціональними змінами, а також активацією адаптивних захисних механізмів, спрямованих на обмеження впливу ушкоджувального фактору для відновлення гомеостазу.

**Первинне (безпосереднє) ушкодження** – різновид ушкодження клітини, яке виникає через безпосередній вплив ушкоджувального агента на клітину.

**Вторинне (опосередковане) ушкодження** – різновид ушкодження клітини, яке виникає внаслідок виникнення порушень гомеостазу самого організму. Опосередковане ушкодження виникає внаслідок формування ланцюга вторинних реакцій, утворення речовин-посередників, які реалізують ушкоджувальну дію певного первинного патогенного фактору. Його дія може опосередковуватися через зміни нервових або ендокринних впливів на клітину, наприклад при стресі, порушенні кровообігу (при серцевій недостатності), відхиленні від норми фізико-хімічних параметрів клітини. Опосередковане ушкодження клітини виникає при гіповітамінозах, гіпоксії, гіпер- і гіпотермії, гіпер- і гіпоосмії, гіпоглікемії, підвищенні вмісту в організмі кінцевих продуктів метаболізму, які мають токсичну дію (білірубін, аміак).

**Чинники фізичного ушкодження клітини** – чинники фізичної природи: *механічні* (удари, розтягнення, стискання); *температурні* (дія високої і низької температур); *зміна осмотичного тиску* в клітині (при надлишковому надходженні іонів, накопиченні продуктів неповного окислення органічних субстратів); *радіаційні*.

**Чинники хімічного ушкодження клітини** – чинники хімічної природи: *неорганічні речовини* (кислоти, луги, солі важких металів); *низькомолекулярні органічні сполуки* (феноли, альдегіди); *високомолекулярні сполуки* (гідролітичні ферменти, основні катіонні білки, імуноглобуліни, комплекси антиген-антитіло, комплемент).



**Чинники біологічного ушкодження клітини** – чинники біологічної природи: *віруси, бактерії, найпростіші, гриби, фактори імунних та алергічних реакцій.*

**Зворотне ушкодження** – різновид ушкодження клітини, прояви якого зникають після припинення дії ушкоджувального фактору.

**Незворотне ушкодження** – різновид ушкодження клітини, прояви якого не зникають після припинення дії ушкоджувального фактору, що, переважно, призводить до загибелі клітини.

**Гостре ушкодження** – це ушкодження клітини, яке виникає внаслідок одноразового інтенсивного впливу ушкоджувального фактору і проявляється гіперактивністю (активацією метаболічних процесів та посиленням синтезу АТФ) з наступним тотальним ушкодженням клітини, що може завершитися її загибеллю.

**Хронічне ушкодження** – ушкодження клітини, яке характеризується повільним перебігом і виникає внаслідок слабких багаторазових ушкоджувальних впливів.

**Специфічне ушкодження** клітин – це зміни, які виникають у будь-яких клітинах і залежать тільки від природи ушкоджувального чинника або клітинах певного типу незалежно від природи ушкоджувального фактору.

**Неспецифічні (стереотипні) прояви** ушкодження – спостерігаються за дії різних факторів на клітини будь-якого типу. До найпоширеніших неспецифічних проявів ушкодження клітин належать: набухання клітин, підвищення проникності плазматичних мембран, зміна параметрів мембранного потенціалу, гальмування активності мембранних молекулярних насосів, іонний дисбаланс, ацидоз, сповільнення метаболічних перетворень у клітині, інтенсифікація вільнорадикальних реакцій.

**Ca<sup>2+</sup>-опосередковане ушкодження клітин** – ушкодження, яке виникає або внаслідок *надмірного надходження іонів кальцію у цитоплазму* (через неушкожену плазматичну мембрану за умови підвищення градієнта концентрації іонів кальцію, наприклад при гіперкальціємії; через ушкожену плазмолему при порушенні її бар'єрної здатності) або

порушення видалення надлишкових іонів кальцію з цитоплазми (внаслідок недостатньої активності  $\text{Ca}^{2+}$ -насосів плазмолемі й ендоплазматичного ретикулуму,  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінного механізму або порушення  $\text{Ca}^{2+}$ -акумуляуючої здатності мітохондрій).

**Ліпідні механізми uszkodження клітини** – механізми, які опосередковуються активацією фосфоліпази  $A_2$ ; пероксидним окисленням ліпідів (ПОЛ) (активується або надлишковим продукуванням вільних радикалів, або порушенням функціонування антиоксидантних систем клітини); детергентною дією вільних жирних кислот (вільні жирні кислоти у значних концентраціях, а також лізофосфоліпіди проявляють детергентну дію, зумовлюючи порушення цілісності ліпідного бішару мембран); порушенням процесу синтезу фосфоліпідів.

**Електролітно-осмотичні механізми uszkodження клітин** – механізми uszkodження, які виникають унаслідок формування дисбалансу іонів  $\text{Na}^+$  і  $\text{K}^+$  (через посилену дифузію іонів через плазматичну мембрану або порушення механізмів активного транспорту  $\text{Na}^+$  і  $\text{K}^+$ , які забезпечують підтримку концентраційних градієнтів вказаних іонів).

**Ацидотичне uszkodження клітин** – uszkodження, котре виникає внаслідок підвищення концентрації протонів у цитоплазмі клітини (через надлишкове утворення кислих продуктів у клітині; надмірне надходження протонів у клітину з позаклітинного середовища (спостерігається за умов загальних змін кислотного-основного гомеостазу в організмі); порушення зв'язування протонів унаслідок недостатності буферних систем клітини; порушення виведення надлишку протонів із клітини).

**Токсичне uszkodження клітин** – uszkodження, яке виникає внаслідок впливу на клітину хімічних речовин. Значна частина водорозчинних сполук може проявляти безпосередній uszkodжувальний вплив через зв'язування з низкою клітинних молекул. Наприклад, за умов потрапляння в організм меркурію хлориду відбувається зв'язування тіолових білкових груп плазматичних мембран, наслідком чого буде підвищення їх проникності та гальмування активності мембранозв'язаних АТР-аз. При цьому найвираженіші прояви uszkodження спостерігаються у клітинах, які використовують, абсорбують чи

виділяють ці хімічні сполуки. Тому при потраплянні в організм ртуті хлориду найбільше ушкоджуються клітини шлунково-кишкового тракту та нирок. Водночас ціанід здатний проявляти безпосередню ушкоджувальну дію на мітохондріальні ензими. Ліпофільні ксенобіотики біологічно не активні і тому спочатку перетворюються на токсичні метаболіти, які вже безпосередньо впливають на клітинні мішені. Хоча ці метаболіти можуть викликати ушкодження мембран і загалом клітин через пряме ковалентне зв'язування з мембранними білками чи ліпідами, найважливіший механізм їхньої ушкоджувальної дії – це утворення активних метаболітів кисню з наступним окисненням біомолекул клітини.

**Протеїнові механізми ушкодження клітини** – механізми, які опосередковуються денатурацією клітинних протеїнів; інгібуванням активності ензимів (зворотнім чи незворотнім); активацією протеолізу за дії лізосомальних гідролітичних ферментів (катепсинів) і  $\text{Ca}^{2+}$ -активованих протеїназ.

**Нуклеїнові механізми ушкодження клітин** – механізми, які опосередковуються порушенням реплікації, транскрипції, трансляції, наслідком чого може стати порушення структури генів із появою їх дефектних продуктів; дерепресія генів, відповідальних за прояв певних патологічних ознак; репресія життєво важливих генів.

**Механізми порушення рецепторного апарату клітини** – механізми, які базуються на:

- порушенні рецепції регуляторних молекул (медіаторів, гормонів, пептидів);
- порушенні фосфорилування протеїнкіназ у клітині;
- порушенні утворення та дії вторинних внутрішньоклітинних месенджерів ( $\text{Ca}^{2+}$ , cAMP, cGMP, простагландинів тощо).

**Механізми порушення енергозабезпечення клітин** – механізми, які опосередковуються порушенням їх енергозабезпечення, яке може виникати на етапах синтезу, транспорту АТФ та утилізації його енергії. Спостерігається за умов *дефіциту нутрієнтів*, які є джерелом енергії для клітини (вуглеводів, жирів, білків); *гіпоксії*, котра виникає через порушення оксигенації крові чи транспорту кисню до клітин і

тканин; *мітохондріальної дисфункції*, зумовленої інгібуванням ензимів дихального ланцюга, роз'єднанням окислення та фосфорилування, впливом мембранотропних речовин; *дефіцитом коферментів*, причиною якого здебільшого є гіповітамінози (В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, РР).

### Ситуаційні завдання

1. Відомо, що транспорт речовин через плазматичну мембрану пов'язаний із затратою енергії. За умов патології Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-залежна АТФ-аза може бути інгібована. Які зміни виникнуть за таких умов у клітині?

2. У фазі, яка передує діастолічному розслабленню міокарда, різко знижується концентрація іонів кальцію у саркоплазмі кардіоміоцитів і у період діастолі їх майже немає у вільному вигляді. Як зміниться акумуляція кальцію при значному зниженні рівня АТФ у міокарді?

3. В експерименті з використанням гіперкальцимічного середовища викликано ушкодження культури клітин непосмугової м'язової тканини. Поясніть механізми ушкоджувальної дії іонів кальцію на клітину. Які механізми задіяні у захисті клітини від надлишку кальцію?

4. В організмі тварини, яка зазнала радіаційного опромінення, відбувається ушкодження клітин. Які з указаних речовин будуть сприяти, а які – гальмувати розвиток ушкодження: оубайн (інгібітор Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-АТФ-ази), іонол (антиоксидант), верапаміл (блокатор кальцієвих каналів), етилмеркурхлорид (інгібітор SH-груп ензимів), актиноміцин D (порушує процеси транскрипції)?

5. Чи правильно наведена суть та послідовність процесів, які спостерігаються при розвитку гіпоксичної загибелі клітин при ішемії: ішемія → підвищення синтезу макроергів → активація іонних насосів → надходження у клітину іонів калію і вихід із клітини натрію, кальцію і води → внутрішньоклітинний алкалоз, дегідратація + зниження концентрації кальцію у клітині → гальмування активності ліпаз, фосфоліпаз і процесів ПОЛ → ушкодження мембран і ферментних систем → загибель клітини? Наведіть власний варіант.

## Тестові завдання для самоконтролю

### 1. Під терміном «специфічне ушкодження» розуміють:

- а) зміни властивостей клітин, характерні для певного ушкоджувального фактору при його дії на різні клітини;
- б) ушкодження, властиві для певного виду клітин при дії на них різних ушкоджувальних факторів;
- в) ушкодження, прояв яких не залежить від природи ушкоджувального фактору.

### 2. Наслідком термічного ушкодження клітин є ...

- а) інактивація ферментів;
- б) порушення внутрішньоклітинної регуляції;
- в) ушкодження клітинних мембран і міжклітинних контактів;
- г) інтенсифікація утворення вільних радикалів.

### 3. До неспецифічних проявів ушкодження клітин належить ...

- а) ацидоз;
- б) активація вільнорадикальних реакцій;
- в) порушення скоротливості м'язових волокон;
- г) підвищення проникності клітинних мембран;
- д) порушення проведення імпульсу нервовими клітинами.

### 4. Серед запропонованих варіантів оберіть можливі причини порушення кальцієвого гомеостазу:

- а) надлишкове надходження іонів кальцію у цитоплазму через порушення бар'єрної функції мембран;
- б) надлишкове надходження іонізованого кальцію в цитоплазму через неушкоджену плазматичну мембрану у разі підвищення градієнта його концентрації;
- в) активація  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних ферментів;
- г) порушення видалення іонів кальцію з цитоплазми.

### 5. Вкажіть, унаслідок недостатності яких кальціє транспортувальних систем клітини може порушуватися видалення іонів $\text{Ca}^{2+}$ з цитоплазми ...

- а)  $\text{Ca}^{2+}$ -насосів плазматичної мембрани і ендоплазматичного ретикулуму;
- б)  $\text{Ca}^{2+}$ -акумуляуючої здатності лізосом;

- в)  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінного механізму;
- г)  $\text{Ca}^{2+}$ -акумуляуючої здатності мітохондрій.

**6. До причин надлишкового надходження іонів кальцію у цитоплазму належить ...**

- а) надлишкове надходження іонів кальцію у цитоплазму через неушкоджену мембрану при підвищенні градієнта їх концентрації внаслідок гіперкальціємії;
- б) порушення бар'єрної функції мембрани;
- в) дисбаланс іонів  $\text{K}^+$ .

**7. Наслідком підвищення концентрації кальцію у цитозолі клітини є активація ферментів ...**

- а) фосфоліпаз;
- б) ендонуклеаз;
- в) амінотрансфераз;
- г) протеаз.

**8. Ліпідні механізми ушкодження клітин ґрунтуються на ...**

- а) пероксидному окисленні мембранних ліпідів;
- б) активації триацилгліцерололіпази;
- в) активації мембранної фосфоліпази  $\text{A}_2$ ;
- г) детергентній дії вільних жирних кислот;
- д) порушенні метаболізму холестеролу.

**9. Основою порушення функцій ліпідного бішару є ...**

- а) зміна ліпідного мікрооточення мембранних ферментів;
- б) утворення «зшивок» між молекулами білків та фосфоліпідів;
- в) ущільнення мембрани.

**10. Основа іонофорного механізму порушення бар'єрної функції мембран – це ...**

- а) поява сполук, які полегшують дифузію іонів через мембрану;
- б) порушення електроізолювальних властивостей ліпідного бішару.

**11. Іонофори – це речовини, які ...**

- а) індукують ПОЛ;

- б) зменшують проникність мембрани;
- в) підвищують проникність мембрани;
- г) мають детергентні властивості.

**12. Електролітно-осмотичні механізми ушкодження клітин базуються на ...**

- а) посиленій дифузії іонів  $\text{Na}^+$  і  $\text{K}^+$  через плазматичну мембрану;
- б) збільшенні концентрації іонів  $\text{H}^+$  у клітині;
- в) порушенні механізмів активного транспорту  $\text{Na}^+$  і  $\text{K}^+$ .

**13. До наслідків порушення електролітного складу клітини належать ...**

- а) набухання клітини;
- б) втрата клітиною потенціалу спокою;
- в) порушення синтезу АТФ.

**14. Основа ацидотичних механізмів ушкодження клітин – це ...**

- а) надлишкове утворення кислих метаболітів у клітині;
- б) надлишкове надходження іонів водню в клітину з позаклітинного середовища;
- в) порушення зв'язування іонів водню через недостатність буферних систем клітини;
- г) порушення виведення іонів водню з клітини;
- д) усі відповіді правильні.

**15. До наслідків підвищення внутрішньоклітинної концентрації іонів водню належить ...**

- а) підвищення активності гідролітичних ферментів лізосом;
- б) виникнення гіпоксії;
- в) підвищення проникності мембран;
- г) зміна конформації клітинних білків.

**16. Набухання клітин супроводжується ...**

- а) денатурацією білків;
- б) інактивацією ферментів;
- в) порушенням контактів між сусідніми клітинами;
- г) активацією лізосомальних ферментів.

**17. Із запропонованого переліку оберіть прояви дисбалансу іонів та рідини при ушкодженні клітини ...**

- а) накопичення іонів калію в клітині;
- б) накопичення іонів натрію у клітині;
- в) вихід іонів калію із клітини;
- г) вихід іонів натрію із клітини;
- д) вихід іонів кальцію із клітини;
- е) накопичення іонів кальцію у клітині;
- є) гіпергідратація клітини.

**18. При підвищенні вмісту вільного іонізованого кальцію у клітині спостерігається:**

- а) активація фосфоліпази A<sub>2</sub>;
- б) інактивація фосфоліпази C;
- в) підвищення вмісту вільного кальмодуліну;
- г) підвищення виходу іонів калію з клітини;
- д) гіпергідратація клітини.

**19. Про ушкодження клітини свідчить:**

- а) прижиттєве зафарбовування трипановим синім;
- б) активація синтезу білка;
- в) активація ПОЛ;
- г) вихід цитоплазматичних ферментів у кров;
- д) підвищення внутрішньоклітинної концентрації Na<sup>+</sup>.

**20. Як впливають на мембрани клітин амфіфільні сполуки у високих концентраціях?**

- а) знижують проникність мембран;
- б) підвищують проникність мембран;
- в) вбудовуються у мембрану і витісняють іони кальцію з мембрани;
- г) підвищують упорядкованість структури мембрани;
- д) порушують цілісність ліпідного бішару мембрани.

**21. Один із наслідків ушкодження клітини – порушення регуляції внутрішньоклітинних процесів через ...**

- а) порушення взаємодії біологічно активних речовин із рецепторами клітин;
- б) порушення ефектів вторинних месенджерів, які утворюються у відповідь на дію гормонів та нейромедіаторів;



- в) збільшення проникності мембран;
- г) порушення синтезу білків;
- д) зміни активності цитозольних ферментів.

**22. Ушкодження клітини, зумовлене порушенням енергетичного забезпечення, може виникнути внаслідок ...**

- а) зниження інтенсивності ресинтезу АТР;
- б) підвищення спряження окислення і фосфорилування;
- в) зниження активності АТР-аз;
- г) зміни розміру клітини.

**23. Виберіть із переліку правильне твердження:**

- а) внутрішньоклітинний ацидоз належить до специфічних проявів ушкодження клітини;
- б) підвищення проникності мембран належить до специфічних проявів ушкодження клітини;
- в) підвищення проникності мембран спостерігається при будь-якому ушкодженні клітини;
- г) здатність до забарвлення специфічними барвниками при ушкодженні клітини зменшується.

**24. До набухання клітини призводить ...**

- а) підвищення концентрації внутрішньоклітинного натрію;
- б) підвищення концентрації внутрішньоклітинного калію;
- в) підвищення проникності цитоплазматичної мембрани для іонів;
- г) пригнічення анаеробного гліколізу.

**25. Виберіть із переліку процеси, які призводять до ушкодження клітини ...**

- а) підвищення спряженості окислення і фосфорилування;
- б) підвищення активності ферментів системи репарації ДНК;
- в) інтенсифікація вільнорадикального окислення мембранних ліпідів;
- г) вихід лізосомальних ферментів у цитозоль;
- д) ацидоз.

**26. Порушення цілісності клітинних мембран спостерігається насамперед при ушкодженні ...**

- а) хімічному;
- б) термічному;

- в) механічному;
- г) радіаційному.

**27. Виберіть із переліку процеси, які призводять до ушкодження клітинних мембран ...**

- а) активація мембранних трансфераз;
- б) активація ПОЛ;
- в) адсорбція макромолекулярних білкових комплексів на клітинних мембранах;
- г) активація фосфоліпази  $A_2$ .

**28. Вкажіть основні причини активації фосфоліпаз при ушкодженні клітини ...**

- а) підвищення внутрішньоклітинного вмісту іонів  $Na^+$ ;
- б) підвищення внутрішньоклітинного вмісту іонів  $Ca^{2+}$ ;
- в) зниження внутрішньоклітинного вмісту іонів калію;
- г) підвищення внутрішньоклітинного вмісту води;
- д) зниження внутрішньоклітинного рН.

**29. Підвищення проникності клітинних мембран призводить до ...**

- а) виходу із клітини іонів натрію;
- б) надходження у клітину іонів калію;
- в) виходу із клітини іонів кальцію;
- г) виходу із клітин ферментів чи проферментів;
- д) зменшення зафарбовування клітин барвниками.

**30. Вставте пропущений компонент механізму ушкодження клітини: ушкодження мембрани → іонний дисбаланс → підвищення у клітині вмісту ...?... → активація мембранних фосфоліпаз, роз'єднання окисного фосфорилування.**

- а) натрію;
- б) калію;
- в) кальцію;
- г) магнію;
- д) водню.

**31. Вставте пропущений компонент механізму ушкодження клітини: ушкодження мембрани → іонний**

дисбаланс, зокрема ...?... → підвищення осмотичного тиску → гіпергідратація клітини:

- а) зменшення у клітині вмісту  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ;
- б) підвищення у клітині  $\text{Na}^+$ , зменшення  $\text{Ca}^{2+}$ ;
- в) підвищення у клітині  $\text{Na}^+$  і  $\text{Ca}^{2+}$ ;
- д) підвищення у клітині вмісту  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ .

**32. До специфічних проявів радіаційного ураження належать ...**

- а) активація лізосомальних ензимів;
- б) утворення вільних радикалів;
- в) ацидоз;
- г) ушкодження генома;
- д) порушення електролітного балансу.

**33. До ознак ушкодження клітин належать ...**

- а) підвищення вмісту лактату у крові;
- б) підвищення вмісту кальцію у клітині;
- в) підвищення рівня натрію у плазмі крові;
- г) підвищення активності внутрішньоклітинних ензимів у крові;
- д) підвищення вмісту калію у клітині.

**34. До набухання клітин призводить ...**

- а) підвищення внутрішньоклітинної концентрації натрію;
- б) підвищення внутрішньоклітинної концентрації калію;
- в) підвищення проникності плазматичної мембрани;
- г) пригнічення анаеробного гліколізу;
- д) зниження гідрофільності цитоплазми.

**35. При ушкодженні клітини у її цитоплазмі підвищується вміст ...**

- а) калію;
- б) кальцію;
- в) вільних радикалів;
- г) АТФ;
- д) гідролітичних ензимів.

**36. Буферна система клітини попереджає про зміни у цитоплазмі концентрації ...**

- а) протонів;

- б) глюкози;
- в) пероксиду водню;
- г) натрію і калію;
- д) триацилгліцеролів.

**37. Денатурація протеїнів та протеїново-ліпідних комплексів клітини – це специфічний прояв для ушкодження ...**

- а) механічним чинником;
- б) ультразвуком;
- в) іонізуючою радіацією;
- г) високою температурою;
- д) вірусами.

**38. Ушкодження лізосом супроводжується:**

- а) інтенсифікацією синтезу протеїнів у клітині;
- б) активацією роботи  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -наосу;
- в) накопиченням у клітині АТФ;
- г) активацією протеолізу і ліполізу у клітині;
- д) активацією окисного фосфорилування.

**39. Причина активації фосфоліпази  $\text{A}_2$  у клітині при ушкодженні – це:**

- а) зниження чутливості рецепторів клітини до тиреокальцитоніну;
- б) зниження інтенсивності вільнорадикальних реакцій;
- в) підвищення концентрації іонів  $\text{Ca}^{2+}$  у цитоплазмі;
- г) підвищення концентрації іонів  $\text{K}^+$  у цитоплазмі;
- д) підвищення синтезу біогенних амінів у клітині.

**40. Вкажіть механізми ушкодження клітинних мембран:**

- а) інтенсифікація вільнорадикальних реакцій;
- б) вивільнення лізосомальних гідролаз у цитоплазму;
- в) активація транспорту глюкози у клітину;
- г) набухання клітин;
- д) адсорбція протеїнів на мембрані.

**41. Які із вказаних процесів супроводжуються порушеннями бар'єрних властивостей плазматичних мембран?**

- а) активація гліколізу;

- б) активація фосфоліпаз;
- в) пригнічення синтезу протеїнів;
- г) активація пероксидного ушкодження ліпідів;
- д) активація аденілатциклази.

**42. Специфічний прояв ушкодження клітини при отруєнні ціанідами – це ...**

- а) денатурація протеїнів;
- б) активація ПОЛ;
- в) порушення активності цитохромоксидази;
- г) порушення активності сукцинатдегідрогенази;
- д) ацидоз.

**43. Виберіть із переліку правильні твердження ...**

- а) внутрішньоклітинний ацидоз та набухання клітини – винятково специфічний прояв ушкодження клітин;
- б) підвищення проникності плазматичної мембрани – це прояв специфічного ушкодження клітини;
- в) підвищення проникності клітинних мембран спостерігається при будь-якому ушкодженні клітини;
- г) здатність до зафарбовування ушкодженою клітиною знижується;
- д) електропровідність ушкоджених клітин зазвичай знижується.

**44. Наслідком яких із вказаних процесів буде ушкодження клітини?**

- а) підвищення спряженості окислення і фосфорилування;
- б) підвищення активності ензимів системи репарації ДНК;
- в) активація ПОЛ;
- г) вивільнення лізосомальних ензимів у цитозоль;
- д) ацидоз.

**45. Які із вказаних показників свідчать про ушкодження трансмембранних іонних насосів?**

- а) підвищення внутрішньоклітинної концентрації кальцію;
- б) зниження внутрішньоклітинної концентрації натрію;
- в) підвищення внутрішньоклітинної концентрації калію;
- г) зниження внутрішньоклітинної концентрації калію;
- д) підвищення внутрішньоклітинної концентрації натрію.

**46. Показником ушкодження клітини є ...**

- а) підвищення рН цитоплазми;
- б) підвищення мембранного потенціалу клітини;
- в) підвищення внутрішньоклітинної концентрації калію
- г) підвищення внутрішньоклітинної концентрації кальцію;
- д) зниження внутрішньоклітинної концентрації натрію.

**47. Підвищення вмісту вільного іонізованого кальцію у клітині призводить до ...**

- а) активації фосфоліпази А<sub>2</sub>;
- б) інактивації фосфоліпази С;
- в) гіперполяризації плазматичної мембрани;
- г) підвищення вмісту вільного кальмодуліну;
- д) роз'єднання окислення і фосфорилування.

**48. Насамперед порушення клітинних мембран спостерігається при ушкодженні...**

- а) механічному;
- б) термічному;
- в) хімічному;
- г) радіаційному;
- д) біологічному.

**49. Вкажіть наслідки активації ПОЛ:**

- а) зниження гідрофобності ліпідів;
- б) зниження іонної проникності мембран;
- в) набухання клітини;
- г) підвищення внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію;
- д) порушення структурної цілісності цитоплазматичної мембрани.

**50. Які механізми лежать в основі реперфузійного ушкодження клітини?**

- а) активація ПОЛ;
- б) активація ферментів синтезу АТФ;
- в) зростання надходження в ушкоджену клітину кисню;
- г) підвищення у клітині вмісту вільних радикалів.

## ТЕМА 2. ВИДИ ЗАГИБЕЛІ КЛІТИН

**Мета** – сформуванати уявлення про основні види та особливості загибелі клітин.

### Запитання та завдання для самопідготовки

1. Опишіть біохімічні особливості внутрішньоклітинних шляхів апоптозу.

2. Охарактеризуйте особливості зовнішнього та внутрішнього шляху активації апоптозу.

3. У чому біохімічна суть ролі каспаз у апоптозі?

4. Опишіть основні механізми регуляції апоптозу.

5. Розкрийте біохімічні аспекти некротичної загибелі клітин.

6. Охарактеризуйте відмінності апоптозу від апоптозу.

7. Сформулюйте біохімічні особливості піроптозу як форми загибелі клітини.

8. Поясніть механізми загибелі клітин через онкоз.

9. Аргументуйте біологічну роль та біохімічні механізми корніфікації.

10. Які біохімічні особливості ентозу як форми загибелі клітин?

11. Опишіть біохімічні механізми різних видів аутофагії.

12. У чому біохімічна суть різних видів дистрофій?

13. Заповніть таблицю:

<b>Вид загибелі клітин</b>	<b>Біохімічні особливості</b>
Апоптоз	

Онкоз	
Піроптоз	
Ентоз	
Корніфікація	

14. Заповніть таблицю:

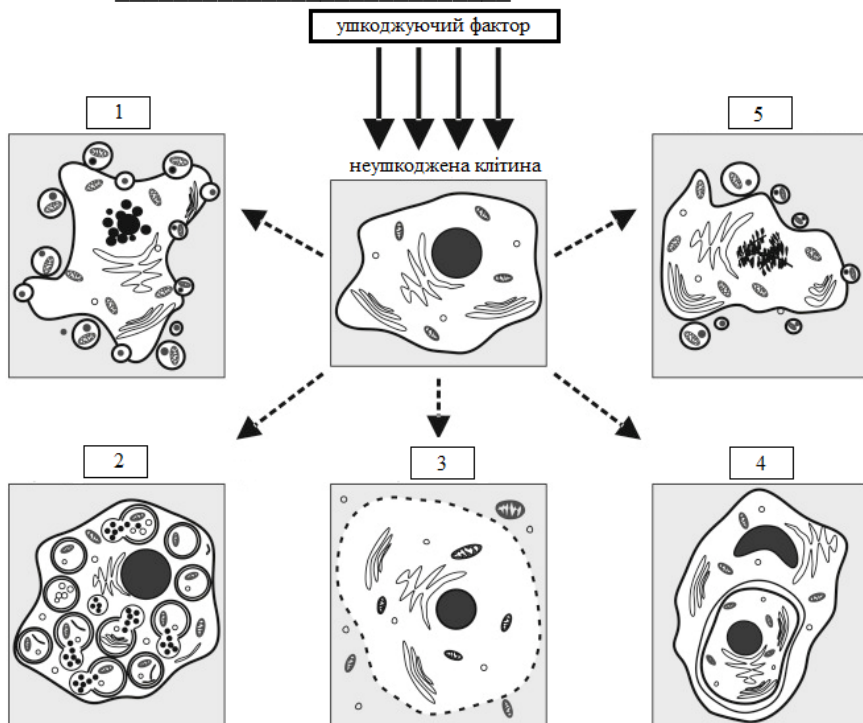
<b>Ознака</b>	<b>Апоптоз</b>	<b>Некроз</b>
Індукція		
Біохімічні зміни		
Фрагментація ДНК		



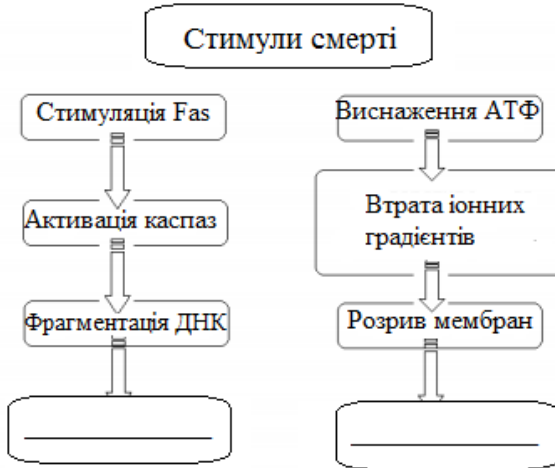
Цілісність клітинної мембрани		
Морфологія клітин		

15. Вкажіть, які варіанти загибелі клітин відображені на рисунку.

- 1 – \_\_\_\_\_  
 2 – \_\_\_\_\_  
 3 – \_\_\_\_\_  
 4 – \_\_\_\_\_  
 5 – \_\_\_\_\_



16. Заповніть пропуски (вказіть варіант загибелі клітини):



17. Заповніть пропуски (вказіть наслідки активації відповідних ензимів):



## ***Основні базові поняття, якими має оволодіти студент***

**Дистрофія** – це кількісні та якісні структурні зміни в клітинах і/або міжклітинній речовині органів і тканин, зумовлені порушенням обмінних процесів. Дистрофія розглядається як морфологічне вираження метаболічних порушень клітини.

**Інфільтрація** – процес надмірного проникнення продуктів обміну з крові та лімфи з подальшим накопиченням у клітинах або тканинах (наприклад накопичення багатих на холестерол ліпопротеїнів у артеріях при атеросклерозі).

**Декомпозиція (фанероз)** – процес руйнування клітин або компонентів міжклітинної речовини з подальшим накопиченням у тканинах продуктів розпаду (наприклад накопичення низькомолекулярного гіалуронату, який вивільняється при ферментативній деградації протеогліканів за умов мукоїдного набухання).

**Апоптоз** – запрограмована загибель клітин, яка забезпечує знищення дефектних (ушкоджених, мутованих, інфікованих) клітин, участь у процесах диференціації та морфогенезу, у підтримці клітинного гомеостазу, функціонуванні імунної системи. Апоптична загибель складається з таких етапів:

- 1) індукція, або запуск програми апоптозу;
- 2) активація проапоптичних білків;
- 3) активація каскаду каспаз, які розщеплюють білки-мішені;
- 4) руйнування внутрішньоклітинних органел або їхня перебудова;
- 5) фрагментація клітини на апоптичні тільця;
- 6) підготовка клітини та її фрагментів до фагоцитозу макрофагами або сусідніми клітинами.

Індукція апоптозу і активація проапоптичних білків призводить до активації каспаз (цистеїнових протеаз). Розрізняють ініціаторні каспази (8, 2, 10, 9) і ефекторні каспази (3, 7, 6), тобто каспази функціонують як протеолітичні каскади. Внаслідок роботи ефекторних каспаз руйнуються білки, задіяні у підтримці гомеостазу і в репарації компонентів клітини, білків-регуляторів клітинного циклу, структурних білків тощо. Ефекторні каспази здатні також активувати інші ензими чи білки (ендонуклеази, гельзолін), які забезпечують руйнування

внутрішньоядерної ламіни, порушують цілісність ДНК, забезпечують специфічну компактизацію хроматину, руйнування елементів цитоскелета, мітохондрій, апарату Гольджі, ЕПР тощо. Окрім каспазного, виділяють некаспазний механізм апоптичної загибелі, при якому відбувається вихід із мітохондрій і міграція у ядро флавопротеїну AIF та ендонуклеази G, які викликають розпад ядерної ДНК на великі фрагменти. Характерна для цього механізму конденсація хроматину і експозиція фосфатидилсерину у зовнішньому шарі плазматичної мембрани відповідає ознакам апоптозу.

**Рецепторний шлях апоптозу** починається з активації на мембрані клітин рецептора Fas (CD95), котрий належить до родини TNF (рецептор фактора некрозу пухлин) і є компонентом цитоплазматичного домену, так званого «домену смерті» (за участь в активації процесу апоптозу). При його взаємодії з Fas лігандом (FasL) відбувається зшивання між собою 3-х чи більше молекул і утворення FADD (Fas асоційованого домену смерті). FasL є цитокіном родини фактору некрозу пухлини, який експресується на активованих Т-лімфоцитах і натуральних кілерах, що дає змогу елімінувати будь-яку Fas-експресуючу клітину. FADD, взаємодіючи з прокаспазою 8, утворює апоптосому (комплекс FasL-Fas-FADD-прокаспаза 8), у якій відбувається активація каспази 8. На цьому етапі апоптоз є ще зворотнім процесом. Каспаза 8 активує каспазу 3 через протеоліз прокаспази 3, після чого процес апоптозу стає незворотнім. Каспаза 3 активує ряд протеаз родини каспаз, а також ензими, які фрагментують ДНК, що призводить до незворотнього розпаду ДНК на нуклеосомні фрагменти.

**Мітохондріальний шлях апоптозу** активується при порушенні мембранного потенціалу мітохондрій і виходу мітохондріальних проапоптичних молекул у цитоплазму без участі рецепторів смерті. Фактори, які викликають зниження мембранного потенціалу мітохондрій, різноманітні: виснаження у клітині пулу відновленого глутатіону, NADPH, утворення активних форм кисню, роз'єднання окисного фосфорилування протонофорами, підвищення вмісту  $Ca^{2+}$  у цитоплазмі. Наслідком розкриття пор є набухання мітохондрій і

вивільнення розчинних білків міжмембранного простору: цитохрому *c*, прокаспаз 2, 3 і 9, білка АІФ. Утворення пор – не єдиний механізм виходу міжмембранних білків мітохондрій у цитоплазму. Припускають, що розрив зовнішньої мітохондріальної мембрани можливий унаслідок гіперполяризації внутрішньої мембрани.

Вивільнений із мітохондрій цитохром *c* разом із цитоплазматичним білком Араф-1 (апоптоз активуючий фактор) активують каспазу 9. Араф-1 білок, який містить CARD-домен (домен активації і рекруції каспаз), утворює комплекс з прокаспазою 9 (котрий також містить CARD-домен) за участю цитохрому *c* і АТР. Із цих субодиниць збираються структури на зразок віяла чи пропелера, що є апоптосою. Через частковий протеоліз прокаспазу 9 відбувається утворення активованої каспази 9. Зріла каспаза 9 розщеплює та активує каспазу 3, яка своєю чергою активує низку протеаз родини каспаз, фактор фрагментації ДНК, що призводить до незворотнього розпаду ДНК на нуклеосомні фрагменти.

**Каспази** – протеолітичні ензими, які належать до родини цистеїнових протеаз, розщеплюють протеїни тільки після аспартату. Розрізняють ініціаторні каспази (8, 2, 10, 9) й ефекторні каспази (3, 7, 6), тобто каспази функціонують як протеолітичні каскади. Внаслідок роботи ефекторних каспаз руйнуються білки, задіяні у підтримці гомеостазу і в репарації компонентів клітини, білків-регуляторів клітинного циклу, структурних білків тощо. Ефекторні каспази здатні також активувати інші ензими чи білки (ендонуклеази, гельзолін), які забезпечують руйнування внутрішньоядерної ламіни, порушують цілісність ДНК, забезпечують специфічну компактизацію хроматину, руйнування елементів цитоскелета, мітохондрій, апарату Гольджі, ЕПР тощо.

**«Апоптична драбинка»** – феномен, який спостерігається при апоптозі і характеризується фрагментацією ДНК на нуклеосомні фрагменти, розміри яких кратні 180 нуклеотидним парам.

**Некроз** – насильницька загибель клітини, котра виникає внаслідок надмірного впливу ушкоджувального фактору. Причиною загибелі клітин при некрозі вважають різке

зниження АТР до рівня, несумісного із життям. Достатній рівень АТР необхідний для ініціації активації каспаз, натомість виснаження клітинних запасів макроергів призводить до некротичної загибелі клітин. Морфологічні ознаки некрозу – це набухання клітин та їх мембранних органел, неспецифічна компактизація хроматину, вакуолізація цитоплазми, порушення цілісності плазматичної мембрани і вихід вмісту клітин у позаклітинний простір. Унаслідок таких змін у ділянці некрозу формується осередок запалення.

Виділяють 5 основних механізмів некрозу:

- активація генів PARP, CypD, RIP 1;
- дефіцит АТР;
- генерація АФК;
- порушення кальцієвого гомеостазу;
- втрата клітинними мембранами селективної проникності.

**Аутофагія** – різновид запрограмованої загибелі клітин, яка супроводжується деградацією клітинних компонентів у так званих аутофагічних вакуолях всередині самої клітини (такий тип загибелі ще називають *лізосомною клітинною смертю*). Аутофагія виступає не тільки як варіант реалізації танатогенної програми, але і як програми виживання клітини.

**Аноїкис** – різновид запрограмованої загибелі клітин, подібний до апоптичного, котрий виникає внаслідок втрати контакту клітини з базальною мембраною (так званий детечмент) або іншою клітиною. Настає у відповідь на неправильну адгезію клітин із позаклітинним матриксом або через її втрату. Видалення клітин, котрі втратили зв'язок зі своїм оточенням, випереджає їх зв'язування з неправильною основою та подальший ріст. Біологічне значення цього варіанта загибелі клітин полягає у перешкодженні перенесення клітин певного типу по організму. У клітинах злоякісних пухлин відбувається уникнення реалізації програми аноїкису, через що з'являється здатність до метастазування.

**Онкоз** – варіант запрограмованої загибелі клітини, характерними ознаками якої є набухання клітини та її органел, а також підвищення проникності мембрани. Вид загибелі, за якої відбувається прелетальне набухання органел із послідовною втратою бар'єрних функцій їхніх мембран,

вважається прозапальним. Онкоз ініціюється такими патологічними стимулами як ішемія та/або реперфузія. Основна причина – наростаючий енергодефіцит.

**Піроптоз** – різновид запрограмованої некротичної загибелі клітин, під час якої унаслідок активації каспази 1 відбувається порушення цілісності плазматичної мембрани і швидко вивільнення назовні вмісту клітини. Характерна ознака піроптозу – залежне від каспази 1 активне виділення клітиною інтерлейкінів ІЛ-1 $\beta$  та ІЛ-18, що призводить до виникнення запалення. Це прозапальний шлях загибелі клітин, який охоплює формування так званої *інфламасоми*, активацію каспаз та індукцію процесингу прозапальних цитокінів та інтерлейкінів. Піроптоз слугує захисним механізмом вродженого імунітету, котрий обмежує розмноження внутрішньоклітинних патогенів.

**Корніфікація (кератинізація)** – загибель поверхневих епітеліальних клітин – так званих кератиноцитів – супроводжується перетворенням їх на мертві, заповнені гіалуронатом та кератином, корнеоцити, з подальшим їх злушчуванням. При цьому кератиноцити більш глибоких шарів епітелію сплющуються, втрачають ядро і органели, перетворюючись на рогові лусочки, або корнеоцити. Вони інтенсивно видаляються з поверхні шкіри. Під час корніфікації втрачаються всі органели, зокрема ядро, а на фінальних стадіях процесу клітини злушчуються з поверхні шкіри у процесі десквамації.

**Ентоз** – явище так званого «клітинного канібалізму», коли клітиною поглинається інша жива клітина тієї ж тканини. При цьому феномені клітина відкріплюється від субстрату, в неї проникає інша жива клітина, індукуючи загибель першої.

**Міотична катастрофа** – різновид загибелі клітини, яка виникає унаслідок порушень мітозу, переважно під час мета- і анафази. При цьому не відбувається фрагментація і конденсація хроматину, проте морфологічно виявляються одне чи кілька мікроядер. Цей вид загибелі клітин реалізується за дії іонізуючого опромінення, деяких протипухлинних препаратів, а також речовин, котрі діють на мікротрубочки веретена поділу (колхіцин, вінбластин, вінкрисдин).

## Тестові завдання для самоконтролю

### 1. Дистрофія супроводжується ...

- а) накопиченням чи зменшенням кількості речовин, які містяться в організмі у нормі;
- б) збільшенням або зменшенням кількості органел;
- в) зміною фізико-хімічних властивостей метаболітів;
- г) появою звичайних речовин у незвичайному місці;
- д) появою і накопиченням нових речовин;
- е) зміною проникності мембран.

### 2. Серед механізмів, які призводять до розвитку характерних дистрофічних змін, розрізняють ...

- а) інфільтрацію;
- б) маргінацію;
- в) декомпозицію;
- г) вакуолізацію;
- д) трансформацію;
- е) спотворений синтез.

### 3. При жировій дистрофії у клітинах накопичується переважно ...

- а) холестерол;
- б) триацилгліцероли;
- в) сфінголіпіди;
- г) фосфоліпіди.

### 4. Паренхіматозні вуглеводні дистрофії пов'язані з порушеннями обміну ...

- а) глікогену;
- б) фруктози;
- в) лактози;
- г) глікопротеїнів;
- д) галактози;
- е) глюкози.

### 5. Декомпозиція виникає внаслідок ...

- а) надмірного проникнення продуктів обміну з крові та лімфи з подальшим накопиченням у клітинах або тканинах;



б) руйнування клітин або компонентів міжклітинної речовини з подальшим накопиченням у тканинах продуктів розпаду;

в) надмірного утворення нормальних метаболітів/речовин.

**6. До причин розвитку дистрофій належать фактори, які порушують ауторегуляцію клітин, а саме ...**

а) гіпоксія;

б) токсини;

в) захворювання ендокринних органів;

г) віруси.

**7. Аутофагія ...**

а) супроводжується розвитком запальної реакції;

б) не супроводжується розвитком запальної реакції.

**8. У процесі аутофагії деградація клітинних компартментів відбувається у:**

а) аутофагічних вакуолях всередині самої клітини;

б) цитозолі;

в) позаклітинному просторі.

**9. До стимулів запуску процесів аутофагії належить ...**

а) наявність у цитоплазмі ушкоджених органел;

б) нутрієнтне або енергетичне голодування;

в) внутрішньоклітинне паразитування мікроорганізмів.

**10. У процесі мікроаутофагії відбувається ...**

а) селективна деградація цитозольних білків;

б) ізоляція та поглинання органел чи ділянок цитоплазми лізосомами;

в) ізоляція та поглинання цитоплазматичних макромолекул лізосомами.

**11. Клітинний дебрис – залишок клітини, оточений плазматичною мембраною, який далі фагоцитується макрофагами, утворюється у процесі ...**

а) некрозу;

б) ентозу;

в) піроптозу;

г) аутофагії.

**12. Як механізм виживання клітин за несприятливих умов розглядається ...**

- а) апоптоз;
- б) мітотична катастрофа;
- в) аутофагія;
- г) некроз.

**13. Явище так званого «клітинного канібалізму», коли клітиною поглинається інша жива клітина тієї ж тканини, має назву ...**

- а) аноїкису;
- б) ентозу;
- в) корніфікації;
- г) онкозу.

**14. Ентоз характерний для ...**

- а) пухлинних клітин;
- б) гепатоцитів;
- в) міозитів;
- г) лейкоцитів.

**15. Після закінчення інтерналізації у процесі ентозу поглинаюча клітина для деградації поглинутої використовує ...**

- а) каспази;
- б) лізосомальні катепсини;
- в) лептини;
- г) нуклеази.

**16. Аноїкис виникає внаслідок ...**

- а) втрати контакту клітини з базальною мембраною або іншою клітиною;
- б) внутрішньоклітинного інфікування;
- в) підвищення проникності плазматичних мембран.

**17. Біологічне значення аноїкису полягає у ...**

- а) елімінації інфікованих клітин;
- б) елімінації ушкоджених клітин;
- в) перешкодженні перенесення клітин певного типу по організму.

**18. Характерними ознаками якого варіанта загибелі клітин є набухання органел та підвищення проникності мембран?**

- а) ентоз;
- б) онкоз;
- в) аноїкис.

**19. Онкоз належить до варіантів загибелі клітини ...**

- а) прозапальних;
- б) протизапальних.

**20. Характерною ознакою піроптозу є активація ...**

- а) каспази 3;
- б) каспази 8;
- в) каспази 1;
- г) каспази 9.

**21. У процесі піроптозу каспаза 1 індукує синтез ...**

- а) інтерлейкіну IL-1 $\beta$ ;
- б) фактору некрозу пухлин;
- в) інтерлейкіну IL-18;
- г) інтерлейкіну та IL-6.

**22. За умов загибелі клітин через піроптоз відбувається**

...

- а) формування інфламасоми;
- б) активація каспази 3;
- в) синтез інтерлейкінів IL-1 $\beta$  та IL-18;
- г) формування апоптосоми.

**23. Загибель клітин через піроптоз відбувається за умов**

...

- а) впливу на клітину іонізаційної радіації;
- б) інтенсифікації генерації АФК;
- в) інфікування клітини внутрішньоклітинними паразитами;
- г) старінні клітини.

**24. Корніфікація – це загибель ...**

- а) гепатоцитів;
- б) нервових клітин;
- в) лейкоцитів;

г) поверхневих епітеліальних клітин.

**25. У процесі загибелі епітеліоцитів через корніфікацію задіяна ...**

- а) каспаза 1;
- б) каспаза 3;
- в) каспаза 8;
- г) каспаза 9;
- д) каспаза 14.

**26. Мітотична катастрофа переважно виникає під час ...**

- а) інтерфази;
- б) метафази;
- в) анафази;
- г) G<sub>0</sub>-фази.

**27. Під час загибелі клітини через мітотичну катастрофу процеси фрагментації і конденсації хроматину ...**

- а) відбуваються;
- б) не відбуваються.

**28. Причиною мітотичної катастрофи вважають порушення процесів контролю поділу у клітинах, в яких відбулося ...**

- а) ушкодження ДНК;
- б) порушення збирання веретена поділу;
- в) підвищення проникності мембран.

**29. Усунення мітотичної катастрофи може призводити до появи ...**

- а) клітин з генетичною нестабільністю та подальшої їх злоякісної трансформації;
- б) поліплоїдних клітин;
- в) клітин великого розміру.

**30. Виберіть із переліку ознаки апоптозу ...**

- а) відсутність запалення;
- б) вивільнення гідролітичних ферментів із лізосом;
- в) порушення цілісності клітинної мембрани;
- г) агрегація хроматину та фрагментація ядра.

**31. Функція фізіологічного апоптозу полягає у ...**

- а) оновленні клітинних популяцій через елімінацію застарілих клітин;
- б) захисті організму від наслідків перебування у ньому ушкоджених клітин;
- в) регуляція кількості та дозрівання клітин у кортексі тимуса, печінки, інших тканин;
- г) регуляції функціонування ендокринних залоз та клітин-мішеней гормонів;
- д) забезпеченні балансу між проліферацією та диференціацією клітин різних тканин;
- е) індукції нейродегенеративних захворювань.

**32. До морфологічних проявів апоптозу належать ...**

- а) конденсація (ущільнення) і фрагментація хроматину;
- б) ущільнення плазмолем без виходу внутрішньоклітинного вмісту в позаклітинне середовище;
- в) фрагментація клітини на мембранні везикули з внутрішнім вмістом (апоптичні тільця);
- г) порушення цілісності клітинної мембрани.

**33. При рецепторозалежному сигнальному способі активації апоптозу ефекторні каспази активуються за участю ...**

- а) каспази 3;
- б) каспази 8;
- в) каспази 9.

**34. Формування апоптосоми при мітохондріальному сигнальному способі відбувається за участю білків ...**

- а) Araf-1;
- б) цитохром c;
- в) Bcl-2;
- г) Вах.

**35. Ефекторні каспази за будовою – це ...**

- а) гетеродимери;
- б) тетраметри;
- в) гексамери.

**36. При фрагментації ДНК у процесі апоптозу утворюються фрагменти розміром ...**

- а) 2000 – 3000 п.н.;
- б) 50 – 300 п.н.;
- в) 450 – 600 п.н.;
- г) 5 – 25 п.н.

**37. Апоптичні тільца містять частину ...**

- а) цитоплазми;
- б) щільно розташованих органел;
- в) фрагментів органел;
- г) фрагментів ядра.

**38. Для апоптозу характерне ...**

- а) набухання клітин;
- б) зморщення клітин;
- в) сплюснення клітин;
- г) збереження форми клітин.

**39. Експресія ...?... на мембранах апоптичних тілець розглядається як сигнал «з'їш мене» для фагоциту:**

- а) фосфатидилетаноламіну;
- б) фосфатидилхоліну;
- в) фосфатидилсерину.

**40. Виберіть із переліку ознаки некрозу ...**

- а) відсутність запалення;
- б) вивільнення гідролітичних ферментів із лізосом;
- в) порушення цілісності клітинної мембрани;
- г) агрегація хроматину та фрагментація ядра.

**41. Вкажіть варіанти успішного завершення некрозу ...**

- а) рубцювання;
- б) сепсис;
- в) петрифікація;
- г) інкапсуляція.

**42. Каріопікноз – це ...**

- а) зморщування й утворення гіперхромного ядра, зумовлене конденсацією ДНК;
- б) фрагментація або розпад ядра на грудочки;

в) скупчення фрагментів ядра в некротичному полі.

**43. Основні прояви некрозу такі ...**

- а) ферментативний гідроліз компонентів клітини;
- б) денатурація білків;
- в) зморщення клітини;
- г) зміна кількості органел.

**44. У процесі некрозу джерело гідролітичних ферментів, які забезпечують руйнування клітин, – це ...**

- а) гідролітичні ферменти лізосом ушкодженої клітини;
- б) гідролітичні ферменти лізосом лейкоцитів;
- в) гідролітичні ферменти пероксисом;
- г) цитоплазматичні гідролітичні ферменти.

**45. Макроскопічно ділянка некрозу від навколишніх живих тканин відрізняється ...**

- а) кольором;
- б) щільністю;
- в) наявністю виростів;
- г) блиском.

**46. Клінічні прояви некрозу такі ...**

- а) гангрена;
- б) алергія;
- в) пролежні;
- г) інфаркт.

**47. Вкажіть ознаки, характерні для апоптозу клітин ...**

- а) хаотичні розриви ДНК;
- б) розщеплення ДНК у певних ділянках;
- в) вивільнення й активація лізосомальних ферментів;
- г) формування структур, які містять фрагменти ядра й органели;
- д) гіпергідратація клітин.

**48. Апоптичну загибель клітини викликають ...**

- а) інволюційні зміни органел;
- б) безпосередній вплив ушкоджувальних факторів;
- в) індуктори гіпоксії;
- г) ушкодження ДНК;

- д) інтенсифікація вільнорадикальних процесів;
- е) індуктори алергії;
- є) індуктори запуску внутрішньоклітинних суїцидальних механізмів.

**49. Апоптоз – це ...**

- а) природна загибель клітини;
- б) насильницька загибель клітини.

**50. Прояв апоптозу на клітинному рівні – це ...**

- а) набухання клітини;
- б) зморщування клітини;
- в) розрив клітини.

**51. Прояв апоптозу на молекулярному рівні – це ...**

- а) деградація ДНК;
- б) реплікація ДНК;
- в) підвищення трансмембранного потенціалу мітохондрій;
- г) зниження трансмембранного потенціалу мітохондрій;
- д) ущільнення мембран;
- е) розривлення мембран.

**52. Характерні ознаки некрозу ...**

- а) стимуляція фізіологічними факторами;
- б) стимуляція патологічними стимулами;
- в) насильницький характер загибелі;
- г) природний характер загибелі;
- д) регульований процес;
- е) нерегульований процес;
- є) первинні структурні порушення відбуваються у ядрі;
- ж) первинні структурні порушення локалізовані у мембранах;
- з) вміст клітини вивільняється у позаклітинний простір;
- к) вміст клітини не вивільняється у позаклітинний простір.

**53. Характерні ознаки апоптозу...**

- а) стимуляція фізіологічними факторами;
- б) стимуляція патологічними стимулами;
- в) насильницький характер загибелі;
- г) природний характер загибелі;



- д) регульований процес;
- е) нерегульований процес;
- є) первинні структурні порушення відбуваються у ядрі;
- ж) первинні структурні порушення локалізовані у мембранах;
- з) вміст клітини вивільняється у позаклітинний простір;
- к) вміст клітини не вивільняється у позаклітинний простір.

**54. За умов некрозу спостерігається ...**

- а) посилене продукування АТР;
- б) виснаження пула АТР.

**55. Виберіть із переліку функції апоптозу:**

- а) підтримання постійності чисельності клітин;
- б) участь у процесах визначення форми організму та його частин;
- в) визначення правильного співвідношення клітин різних типів;
- г) видалення генетично дефектних клітин;
- д) запуск запальної реакції.

**56. Термін «некроз» означає:**

- а) аутоліз клітини або частини її структур;
- б) незворотне припинення життєдіяльності клітини;
- в) виражені, але зворотні зміни структури та функції клітини;
- г) незворотні зміни життєдіяльності організму;
- д) біологічна смерть організму.

### **ТЕМА 3. ЗАГАЛЬНІ КОМПЕНСАТОРНІ МЕХАНІЗМИ ПРИ УШКОДЖЕННІ КЛІТИНИ**

**Мета** – сформуванати уявлення про біохімічні механізми компенсаторних реакцій за ушкодження клітин.

#### **Запитання та завдання для самопідготовки:**

1. Які існують підходи до класифікації захисно-компенсаторних реакцій клітини у відповідь на її ушкодження?

2. Розкрийте суть внутрішньоклітинних адаптивних механізмів при ушкодженні.

3. У чому полягає біохімічна суть компенсаторних реакцій, спрямованих на відновлення порушеного внутрішньоклітинного гомеостазу?

4. Поясніть біохімічну суть компенсаторних реакцій, спрямованих на відновлення функціонального спокою ушкодженої клітини.

5. Від яких механізмів залежать компенсація порушень енергетичного забезпечення клітин?

6. Наведіть приклади пасивних захисно-компенсаторних механізмів.

7. Опишіть механізми захисту мембран від ушкодження.

8. Охарактеризуйте механізми, які забезпечують зменшення ступеня або усунення дисбалансу іонів і рідини в клітинах.

9. Вкажіть, які механізми забезпечують компенсацію розладів механізмів регуляції внутрішньоклітинних процесів.

10. Розкрийте суть клітинної та субклітинної форм регенерації.

11. Охарактеризуйте реакції міжклітинної адаптації за рівнем реалізації (органно-тканинної, внутрішньосистемної, міжсистемної).

12. На прикладі гіпоксії поясніть механізми залучення в адаптивні реакції різних систем органів.

13. Поясніть основні принципи терапевтичного впливу на ушкоджені клітини.

14. Охарактеризуйте основні внутрішньоклітинні системи як мішені дії терапевтичних засобів.

15. Заповніть таблицю:

<b>Внутрішньоклітинний адаптивний механізм</b>	<b>Способи реалізації</b>
Компенсація порушень енергетичного забезпечення клітин	
Захист клітинних мембран	
Зменшення ступеня або усунення дисбалансу іонів і рідини в клітинах	
Усунення порушень генетичної програми клітин	
Компенсація розладів механізмів регуляції внутрішньоклітинних процесів	
Зниження функціональної активності клітин	
Регенерація	

***Основні базові поняття, якими має оволодіти студент***

**Компенсаторно-приспосувальні процеси** – це морфологічні та функціональні зміни в організмі, спрямовані на відновлення втрачених функцій, які забезпечують пристосування організму до змінених умов існування за умов патології.

**Атрофія** – патологічний стан, який супроводжується зменшенням розміру, маси та об'єму цілого органа, клітин або субклітинних структур із наступним порушенням їхнього функціонування.

**Гіпертрофія** – збільшення об'єму тканини або органа через збільшення об'єму їх клітин та міжклітинних структур. При цьому в гіпертрофованому органі не з'являються нові клітини, а лише збільшуються в розмірах наявні. Збільшення об'єму клітин зумовлене не їх набуханням, а посиленням синтезом структурних компонентів клітин.

**Гіперплазія** – збільшення кількості структурних елементів тканини або клітин через їх надмірне новоутворення.

**Регенерація** – відновлення структурних елементів тканини замість відмерлих.

## Тестові завдання для самоконтролю

**1. Необхідна умова для активації захисно-компенсаторних реакцій клітини у відповідь на її ушкодження – це ...**

- а) достатнє енергетичне забезпечення;
- б) збереження цілісності клітинних мембран;
- в) достатня активність антиоксидантних ферментів.

**2. Механізми, спрямовані на відновлення функціонального спокою ушкодженої клітини, охоплюють:**

- а) усунення змін внутрішньоклітинного гомеостазу;
- б) активацію механізмів активного транспорту іонів;
- в) репаративний синтез ушкоджених компонентів клітини;
- г) зведення до мінімуму енергетичних витрат на виконання специфічних функцій клітини.

**3. Компенсація порушень енергетичного забезпечення клітин полягає в ...**

- а) інтенсифікації ресинтезу АТФ в процесі гліколізу, а також окисного фосфорилування в неушкоджених мітохондріях;
- б) активації механізмів транспорту АТФ;
- в) посиленні синтезу АМР та АDР;
- г) зміні механізмів утилізації енергії АТФ.

**4. Суть субклітинної форми регенерації полягає у ...**

- а) розмноженні клітин через мітоз;
- б) відновленні кількості органел.

**5. За рівнем реалізації реакції міжклітинної адаптації при ушкодженні клітин поділяються на ...**

- а) субклітинні;
- б) органно-тканинні;
- в) внутрішньосистемні;
- г) міжсистемні;
- д) організмені.

**6. Основна причина загибелі клітин при ішемії – це ...**

- а) порушення гомеостазу кальцію;
- б) посилена генерація АФК;
- в) втрата мітохондріями піридинонуклеотидів;
- г) втрата вибіркової проникності плазматичної мембрани.

**7. Причини втрати вибіркової проникності плазматичної мембрани такі ...**

- а) дефіцит АТР;
- б) активація фосфоліпаз;
- в) пряма дія ушкоджувальних факторів;
- г) активація ендонуклеаз.

**8. До основних принципів терапевтичного впливу на ушкоджені клітини належать ...**

- а) обмеження і пригнічення молекулярних механізмів ушкодження;
- б) активація метаболічних процесів;
- в) створення функціонального спокою;
- г) енергетичне і пластичне забезпечення гомеостатичних механізмів клітини.

**9. Взаємодія клітин і органів в організмі забезпечується функціонуванням ...**

- а) міжклітинних контактів;
- б) систем кровообігу;
- в) імунобіологічного нагляду;
- г) ендокринними і нервовими впливами.

**10. Компенсація розладів механізмів регуляції внутрішньоклітинних процесів передбачає ...**

- а) зміну числа функціональних рецепторів клітини;
- б) зміну спорідненості рецепторів клітини до регулювальних факторів;
- в) зміну активності аденілат- і/або гуанілатциклазної систем;
- г) усунення розривів у нитках ДНК;
- д) зміна активності і/або вмісту внутрішньоклітинних регуляторів метаболізму;
- е) активація буферних систем.

**11. До механізмів, які забезпечують відновлення порушеного внутрішньоклітинного гомеостазу, належать ...**

- а) зведення до мінімуму енергетичних витрат на виконання специфічних функцій клітини;
- б) активація механізмів активного транспорту іонів;
- в) репаративний синтез ушкоджених компонентів клітини;

г) посилена регенерація антиоксидантних систем.

**12. До механізмів, котрі забезпечують захист мембран клітини при ушкодженні, належать ...**

- а) підвищення активності факторів системи антиоксидантного захисту;
- б) активація буферних систем;
- в) підвищення активності мікосомальних ферментів детоксикації;
- г) активація механізмів репарації компонентів мембран.

**13. Усунення дисбалансу іонів і рідини в клітинах досягається ...**

- а) зниженням порушення енергозабезпечення іонних насосів;
- б) зниженням пошкодження мембран і мембранних ферментів;
- в) зміною активності аденілат- і/або гуанілатциклазної систем;
- г) активацією буферних систем (карбонатної, фосфатної, білкової).

**14. Пригнічення молекулярних механізмів ушкодження клітини за дії терапевтичних засобів ґрунтується на ...**

- а) блокаді  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів;
- б) застосуванні антиоксидантів;
- в) дієті;
- г) застосуванні інгібіторів фосфоліпази  $\text{A}_2$  і протеаз;
- д) введенні енергетичних і пластичних субстратів.

**15. До адаптаційних механізмів клітини належить ...**

- а) каріорексис;
- б) розрив крист мітохондрій;
- в) зниження інтенсивності окисного фосфорилування;
- г) підвищення активності лізосомальних ферментів;
- д) гіпертрофія або гіперплазія внутрішньоклітинних структур.

**16. Із запропонованого переліку виберіть внутрішньоклітинні адаптивні механізми:**

- а) посилене надходження іонів кальцію у клітину;

- б) активація буферних систем гіалоплазми;
- в) активація антиоксидантних ферментів;
- г) вихід у гіалоплазму лізосомальних ферментів та їх активація;
- д) активація ДНК-полімераз і лігаз.

**17. Атрофія – це стан, який супроводжується ...**

- а) збільшенням об'єму тканини або органа через збільшення об'єму їхніх клітин і міжклітинних структур;
- б) збільшенням кількості структурних елементів тканини або клітин через їх надмірне новоутворення;
- в) зменшенням розміру, маси та об'єму цілого органа, клітин або субклітинних структур із наступним порушенням їхнього функціонування.

**18. Гіпертрофія – це стан, котрий супроводжується ...**

- а) збільшенням об'єму тканини або органа через збільшення об'єму їхніх клітин і міжклітинних структур;
- б) збільшенням кількості структурних елементів тканини або клітин через їх надмірне новоутворення;
- в) зменшенням розміру, маси та об'єму цілого органа, клітин або субклітинних структур із наступним порушенням їхнього функціонування.

**19. Зниження метаболічної та функціональної активності клітин і її субклітинних структур належить до ...**

- а) активних захисно-компенсаторних механізмів;
- б) пасивних захисно-компенсаторних механізмів.

**20. Активація генетичного апарату клітини (індукція синтезу біологічно активних білків, гормонів, нейромедіаторів) належить до ...**

- а) активних захисно-компенсаторних механізмів;
- б) пасивних захисно-компенсаторних механізмів.



## ТЕМА 4. ПОНЯТТЯ ПРО АКТИВНІ ФОРМИ КИСНЮ

**Мета** – сформувати уявлення про різновиди активних форм кисню.

### Запитання та завдання для самопідготовки

1. Розмежуйте поняття «активні форми кисню», «вільні радикали» та «реактивні молекули».

2. Поясніть електронні механізми активації молекулярного кисню.

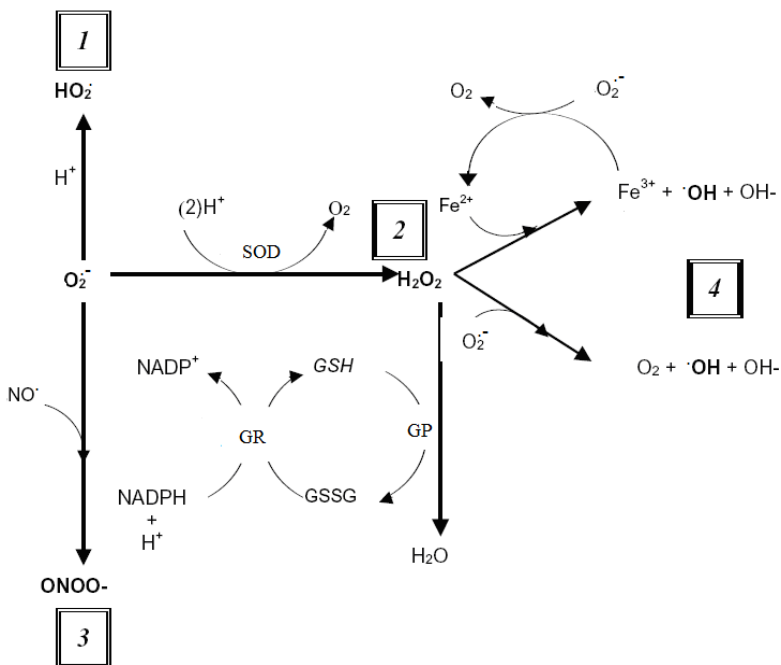
3. Які існують підходи до класифікації вільних радикалів.

4. Окресліть відмінності між первинними, вторинними та третинними радикалами.

5. Охарактеризуйте способи утворення в організмі двовалентного заліза.

6. Сформулюйте основні принципи номенклатури радикалів.

7. Укажіть, які активні форми кисню позначені цифрами:



- 1- \_\_\_\_\_
- 2- \_\_\_\_\_
- 3- \_\_\_\_\_
- 4- \_\_\_\_\_

8. Заповніть таблицю:

<b>Вільні радикали</b>	<b>Хімічна формула</b>	<b>Біологічна роль</b>
Первинні радикали		
Вторинні радикали		
Третинні радикали		

9. Назвіть шляхи утворення синглетного кисню.
10. Яка відмінність між синглетним і молекулярним киснем?
11. Яка біологічна роль синглетного кисню?
12. Вкажіть шляхи утворення супероксид-аніон радикала.
13. Поясніть, яким перетворенням може підлягати супероксид в організмі людини?
14. Вкажіть основні джерела утворення пероксиду водню.

15. У чому особливості пероксиду водню порівняно з іншими АФК?

16. Напишіть реакції утворення гідроксильного радикала.

17. Вкажіть, які типи ушкоджень біомолекул може викликати гідроксильний радикал.

18. Розкрийте біологічну роль гіпохлориту.

19. Заповніть таблицю:

	<b>Представники</b>	<b>Реакція утворення</b>
Активні форми хлору		

20. Заповніть таблицю:

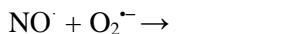
<b>АФК</b>	<b>Хімічна формула</b>	<b>Реакції утворення</b>
Супероксид-аніон радикал		
Пероксид водню		

Гідроксильний радикал		
Синглетний кисень		

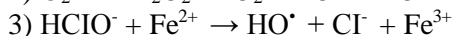
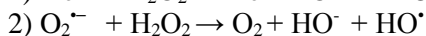
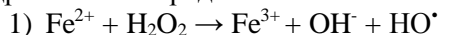
21. Вкажіть час напівжиття основних АФК.

<i>Активна форма</i>	<i>Час напівжиття</i>
Синглетний кисень	
Супероксидний радикал	
Пероксид водню	
Гідроксильний радикал	

22. Вкажіть, яка АФК утворюється при взаємодії  $O_2^{\cdot-}$  з оксидом азоту  $NO$ :



23. Установіть відповідність між реакцією утворення гідроксильного радикала та її назвою:



а) реакція Осипова

б) реакція Хабера-Вейса

в) реакція Фентона

## *Основні базові поняття, якими має оволодіти студент*

**Реактивні молекули** – активні похідні кисню, нітрогену, хлору нерадикальної природи (наприклад пероксид водню, пероксинітрит, гіпохлорит).

**Вільні радикали** – атоми чи молекули, які мають на зовнішній орбіталі неспарений електрон (наприклад супероксид-аніон радикал, гідроксильний радикал). Наявність неспареного електрона робить радикали хімічно активними, оскільки радикал прагне або повернути електрон, якого не вистачає, забравши його від довколишніх молекул, або позбутися «зайвого» електрона, віддаючи його іншим молекулам.

**Первинні радикали** – радикали, утворення яких відбувається за участю ензиматичних систем за фізіологічних умов. До первинних належать супероксид-аніон радикал і оксид нітрогену, а також радикал убіхінону. Первинні радикали виконують фізіологічні функції (захист від мікроорганізмів, регуляція кров'яного тиску тощо). Водночас первинні радикали, у разі їхньої надмірної генерації, виявляють цитотоксичну дію.

**Вторинні радикали** – радикали, утворені з реактивних молекул (пероксиду водню, гідропероксидів ліпідів) за наявності іонів металів змінної валентності, насамперед – двовалентного заліза ( $Fe^{2+}$ ). До вторинних належать гідроксильний радикал і радикали ліпідів. Вторинні радикали утворюються в неензиматичних реакціях і не виконують фізіологічних функцій.

**Третинні радикали** – радикали антиоксидантів, утворені внаслідок взаємодії молекул антиоксидантів із вільними радикалами.

**Синглетний кисень** ( $^1O_2$ ) – реакційноздатна форма кисню, яка на зовнішніх молекулярних орбіталах має два неспарені електрони з протилежно спрямованими спінами. Утворюється внаслідок взаємодії молекули кисню (яка перебуває переважно у триплетному стані) з молекулою фотосенсибілізатора (вона перебуває у триплетному збудженому стані), при цьому через поглинання енергії в молекулі кисню змінюється спін електрона на зв'язувальних орбіталах, що зменшує енергію хімічного зв'язку і забезпечує високу реакційну здатність

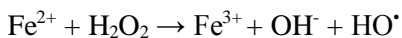
утвореного продукту. Час напівжиття становить  $10^{-6}$  с, може слугувати внутрішньоклітинним вторинним посередником.

**Супероксидний аніон-радикал ( $O_2^{\cdot-}$ )** – один із основних видів АФК, попередник інших АФК.  $O_2^{\cdot-}$  утворюється при одноелектронному відновленні  $O_2$ , має високу хімічну активність завдяки наявності неспареного електрона. Час напівжиття становить  $10^{-6}$  с.  $O_2^{\cdot-}$  не дифундує на значні відстані від місця утворення, оскільки нерозчинний у ліпідах, але може діяти як вторинний посередник у внутрішньоклітинній сигналізації.

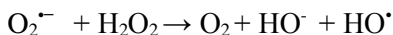
**Пероксид водню ( $H_2O_2$ )** – реактивна молекула, яка утворюється в результаті дисмутації  $O_2^{\cdot-}$  і в реакціях, які каталізуються оксидазами (наприклад за участю моноамінооксидаз у реакціях знешкодження біогенних амінів).  $H_2O_2$  – це досить стійка сполука, концентрація якої в клітині становить  $10^{-8}$  М, а період напівжиття – близько 4 хв. Особливість  $H_2O_2$  – здатність дифундувати у воді та ліпідах, проникати через мембрани і вступати в реакції з компонентами клітини, віддаленими від місця його утворення, що дає змогу йому діяти як вторинний посередник, зокрема у сигнальних шляхах NF- $\kappa$ B та мітогенактивованої протеїнкінази (MAP).

**Гідроксильний радикал ( $HO^{\cdot}$ )** – вільний радикал, продукт одноелектронного відновлення  $H_2O_2$ , котрий має найвищу реакційну здатність порівняно з іншими АФК. Період напівжиття для  $HO^{\cdot}$  в умовах живої клітини становить лише  $10^{-9}$  с, він не дифундує через мембрани, а тому первинна дія  $HO^{\cdot}$  проявляється в місці його генерації. Утворюється  $HO^{\cdot}$  у реакціях:

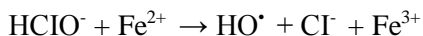
1) Фентона:



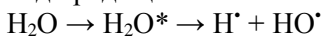
2) Хабера-Вейса:



3) Осипова:



4) радіолізу води за дії радіації:



В основі ушкоджувальної дії гідроксильного радикала – його здатність відривати атом гідрогену від органічної молекули або приєднуватися до молекул за місцем подвійного зв'язку.

**Гіпохлорит-аніон** ( $\text{ClO}^-$ ) – активна форма хлору, утворена за участю ферменту мієлопероксидази лейкоцитів, яка відіграє важливу біологічну роль як один із компонентів неспецифічного імунного захисту. Викликає галогенізацію (хлорування) компонентів клітинних стінок мікроорганізмів, у результаті чого гинуть бактерії; гіпохлорит-аніон не тільки сам проявляє бактерицидну дію, а також здатен до взаємодії з амонієм чи амінами з утворенням бактерицидних хлорамінів.

## Тестові завдання для самоконтролю

### 1. До первинних вільних радикалів належать ...

- а) пероксид водню;
- б) супероксид;
- в) гідроксильний радикал;
- г) оксид нітрогену.

### 2. Установіть відповідність (запишіть пару буква – цифра):

- а) пероксид водню;
  - б) супероксид;
  - в) гідроксильний радикал;
  - г) оксид нітрогену;
  - д) пероксинітрит;
  - е) синглетний кисень.
1. АФА;  
2. АФК.

### 3. До вторинних вільних радикалів належать ...

- а) пероксид водню;
- б) гідроксильний радикал;
- в) гіпохлорит;
- г) радикали ліпідів.

### 4. До третинних радикалів належать ...

- а) гідроксильний радикал;
- б) радикали антиоксидантів;
- в) гіпохлорит;
- г) радикали ліпідів.

### 5. При окисненні ненасичених жирних кислот за участю синглетного кисню утворюється ...

- а) пероксид водню;
- б) гідропероксид;
- в) діоксиетан.

### 6. Метаболіт кисню, який є попередником інших АФК – це

...

- а) супероксид;
- б) пероксид водню;
- в) гідроксильний радикал;
- г) пероксинітрит;
- д) синглетний кисень;



- е) оксид нітрогену;
- є) гіпохлорит.

**7. При протонуванні супероксиду утворюється ...**

- а)  $\text{H}_2\text{O}_2$ ;
- б)  $\cdot\text{OH}$ ;
- в)  $\text{HO}_2\cdot$ .

**8. Напівперіод життя  $\text{H}_2\text{O}_2$  становить ...**

- а)  $10^{-6}$  с;
- б)  $10^{-9}$  с;
- в) 1 – 10 с;
- г) 1 – 4 хв.

**9. Через клітинні мембрани здатний дифундувати ...**

- а) супероксид;
- б) пероксид водню;
- в) гідроксильний радикал;
- г) пероксинітрит;
- д) синглетний кисень.

**10. Попередник гідроксильного радикалу – це ...**

- а) супероксид;
- б) пероксид водню;
- в) пероксинітрит;
- д) синглетний кисень.

**11. Вкажіть, напівперіод життя якої із АФК найтриваліший ...**

- а) супероксиду;
- б) пероксиду водню;
- в) гідроксильного радикала;
- г) пероксинітриту;
- д) синглетного кисню.

**12. Оберіть, які молекули належать до реактивних.**

- а) пероксид водню;
- б) супероксид;
- в) пероксинітрит;
- г) оксид азоту;
- д) синглетний кисень.

**13. Синглетний кисень на зовнішніших молекулярних орбіталях має два неспарені електрони ...**

- а) з протилежно спрямованими спінами;
- б) з паралельно спрямованими спінами.

**14.  $\text{H}_2\text{O}_2$  має властивість:**

- а) слабого окисника;
- б) слабого відновника;
- в) сильного окисника.

**15. Укажіть серед запропонованих реакцію Фентона ...**

- а)  $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{HO}^\bullet$ ;
- б)  $\text{O}_2^{\bullet-} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + \text{HO}^- + \text{HO}^\bullet$ ;
- в)  $\text{HClO}^- + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{HO}^\bullet + \text{Cl}^- + \text{Fe}^{3+}$ ;
- г)  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{O}^* \rightarrow \text{H}^\bullet + \text{HO}^\bullet$ .

**16. Попередник гіпохлориту – це ...**

- а) синглетний кисень;
- б) супероксид-аніон радикал;
- в) пероксид водню;
- г) оксид нітрогену.

**17. Сформулюйте, які АФК утворюються при активації фагоцитуючих клітин.**

- а) синглетний кисень;
- б) супероксид-аніон радикал;
- в) пероксид водню;
- г) оксид нітрогену.

**18. Гіпохлорит утворюється за участю ферменту ...**

- а) моноамінооксидази;
- б) глутатіонпероксидази;
- в) мієлопероксидази;
- г) супероксиддисмутази.

**19. Продукт реакції Хабера-Вейса – це ...**

- а) гідроксильний радикал;
- б) супероксид-аніон радикал;
- в) пероксид водню.

**20. Основним гасником синглетного кисню у клітині є ...**

- а) вітамін С;
- б) вітамін Е;
- в) вода.

**21. Укажіть серед запропонованих реакцію Хабера-Вейса.**

- а)  $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{HO}^\bullet$ ;
- б)  $\text{O}_2^{\bullet-} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + \text{HO}^- + \text{HO}^\bullet$ ;
- в)  $\text{HClO}^- + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{HO}^\bullet + \text{Cl}^- + \text{Fe}^{3+}$ ;
- г)  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{O}^* \rightarrow \text{H}^\bullet + \text{HO}^\bullet$ .

**22. До головних типів пошкоджень біомолекул за участю  $\text{HO}^\bullet$  належать ...**

- а) відрив атома гідрогену від органічної молекули;
- б) галогенізація компонентів клітинних стінок мікроорганізмів;
- в) приєднання до молекул за місцем подвійного зв'язку.

**23. Найвищу реакційну здатність порівняно з іншими АФК має:**

- а) супероксид;
- б) пероксид водню;
- в) гідроксильний радикал;
- г) синглетний кисень.

**24. Оберіть, якій АФК властиво дифундувати у воді та ліпідах, проникати через мембрани і вступати в реакції з компонентами клітини, віддаленими від місця утворення:**

- а) супероксиду;
- б) пероксиду водню;
- в) гідроксильному радикалу;
- г) пероксинітриту.

**25. Унаслідок взаємодії молекули кисню, яка перебуває переважно у триплетному стані, з молекулою фотосенсибілізатора, котра перебуває у триплетному збудженому стані, утворюється ...**

- а) супероксид;
- б) пероксид водню;
- в) синглетний кисень.

## ТЕМА 5. АКТИВНІ ФОРМИ НІТРОГЕНУ

**Мета** – сформувати уявлення про способи утворення та особливості біологічної дії активних форм нітрогену.

### Запитання та завдання для самопідготовки:

1. Порівняйте особливості будови та функціонування різних ізоформ NO-синтази.

2. Опишіть етапи синтезу NO<sup>•</sup>. Вкажіть необхідні фактори, необхідні для цього процесу.

3. Напишіть загальне рівняння синтезу NO<sup>•</sup>.

4. Охарактеризуйте шляхи перетворення NO<sup>•</sup> у клітині.

5. Назвіть фізіологічні функції NO<sup>•</sup>.

6. Поясніть, за яких умов реалізується прямий вплив NO<sup>•</sup> на біомолекули.

7. Вкажіть, через які процеси реалізується непрямая дія NO<sup>•</sup>?

8. Заповніть таблицю:

	Пероксинітрит	Оксид нітрогену
Хімічна формула		
Реакції утворення		
Біологічна роль		

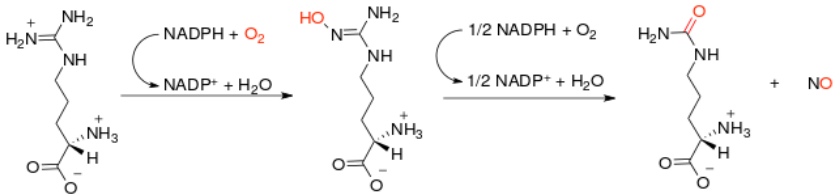
9. Поясніть біохімічний механізм регуляції NO<sup>•</sup> тону судин.

10. Охарактеризуйте редокс-форми NO<sup>•</sup>. Вкажіть, за яких умов вони утворюються?

11. Які функціональні групи біомолекул – мішень дії нітрозонієвого катіона?

12. Поясніть вклад NO<sup>•</sup> у формування патологічних станів.

13. Вкажіть назви учасників NO-синтазної реакції.



14. Опишіть механізм утворення та біологічні ефекти пероксинітриду.

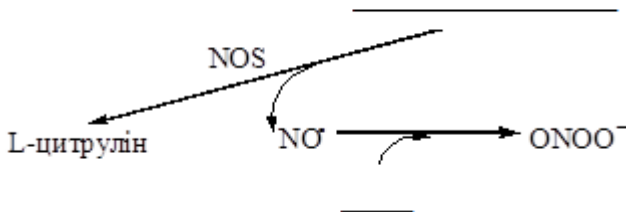
15. Поясніть, за яких умов посилюється утворення пероксинітриду в організмі.

16. Учому полягає патологічна роль пероксинітриду?

17. Вкажіть, попередником якого радикала може виступати пероксинітрид? Напишіть реакцію.

18. Висвітліть способи перетворення оксиду нітрогену в організмі.

19. Заповніть пропуски у схемі утворення пероксинітриду.



## **Основні базові поняття, якими має оволодіти студент**

**Оксид нітрогену (NO<sup>•</sup>)** – газоподібний месенджер, який у фізіологічних концентраціях відіграє роль універсального модулятора різноманітних функцій організму. NO<sup>•</sup> – молекула з періодом напіврозпаду до 10 с, це нейтральний радикал із неспареним електроном. Він має найвищий порівняно з іншими молекулами організму коефіцієнт дифузії (навіть більший, ніж у O<sub>2</sub> і CO<sub>2</sub>) і легко проникає через клітинні мембрани. NO<sup>•</sup> легко реагує із залізом, киснем і, особливо, зі супероксидом. Така реакційна здатність обмежує час його життя і радіус дії у тканинах.

**Синтази оксиду нітрогену** (скорочено NOS, від англ. *Nitric oxide synthase*) – родина ферментів, які забезпечують синтез NO<sup>•</sup> із L-аргініну. У ссавців наявні три ізоформи NO-синтази: *ендотеліальна eNOS* (NOS-3), *нейрональна nNOS* (NOS-1) й *індуцибельна iNOS* (NOS-2). Перші дві конститутивно експресуються у відповідних типах клітин і активуються у разі підвищення цитоплазматичної концентрації кальцію. Синтез iNOS індукується тільки за умов патології. Перша NO-синтаза була виділена із нейронів, тому має назву нейрональна, проте вона наявна також у скелетних м'язах, нейтрофілах, острівцях підшлункової залози, ендотелії, а також епітелії дихальних шляхів і травного тракту. Друга – індукційна форма – виділена із макрофагів, проте може експресуватись у різних типах клітин. Третя – ендотеліальна NOS, окрім ендотеліоцитів, виявлена і в нейронах.

Усі ізоформи – гомодимерні білки із субодиницями від 125 до 160 кДа. Кожна субодиниця має два домени.

- *N-кінцевий* домен (оксигеназний, гемовий) складається із приблизно 500 амінокислотних залишків і має близьку структуру в трьох ізоферментів NO-синтази. Цей домен містить поверхню взаємодії субодиниць. Окрім того, у цій ділянці відбувається зв'язування субстратів: L-аргініну та кисню, а також двох простетичних груп: Fe(III)-гему і 5,6,7,8-тетрагідробіоптерину (BH<sub>4</sub>).

- *C-кінцевий* (редуктазний) домен складається із близько 600 амінокислотних залишків, приєднує NADPH, а також дві

протетичні групи (FAD та FMN) завдяки трьом нуклеотидозв'язуючим модулям.

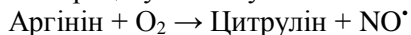
**Стадії синтезу NO<sup>•</sup>** – синтез оксиду нітрогену відбувається за дві стадії, проміжним продуктом є N $\omega$ -гідрокси-L-аргінін (NOHA):

1) на першому етапі NADPH, приєднаний до редуцтазного домена, передає два електрони через FAD і FMN до гему оксигеназного домену іншої субодиниці, після чого відбувається реакція з киснем, продуктами якої є NOHA і вода;

2) на другій стадії використовується тільки один електрон NADPH і ще одна молекула кисню. Кінцевими продуктами є оксид нітрогену, L-цитрулін і вода.

Для проходження обох етапів реакції необхідна наявність BH<sub>4</sub>, який функціонує як внутрішній редокс-агент. Як під час утворення NOHA, так і під час утворення NO<sup>•</sup>, 5,6,7,8-тетрагідробіоптерин спочатку окислюється до радикальної форми (BH<sub>4</sub><sup>•+</sup>), а потім знову відновлюється.

Загальне рівняння процесу синтезу NO<sup>•</sup>:



Висока активність NO-синтази спричиняє накопичення NO<sup>•</sup> та ініціацію патологічних процесів у клітині (інгібування мітохондріальних ферментів, пошкодження ДНК тощо). Підвищене утворення NO<sup>•</sup> при відторгненнях трансплантатів, артритах, септичному шоці, запальних процесах; NO<sup>•</sup> призводить до руйнування нервових клітин і навіть до хвороби Альцгеймера, пригнічує проліферацію та посилює апоптоз лімфоцитів і макрофагів, зумовлює формування вторинних імунодефіцитів. Даний механізм пов'язаний із реакцією нітрифікації ДНК чи РНК клітин безпосередньо NO<sup>•</sup>.

**Способи перетворення оксиду нітрогену** – 1. Основний спосіб метаболізму NO<sup>•</sup> – реакція з гемопротейнами. Клітинні ефекти NO<sup>•</sup> здійснюються через зв'язування з гемовмісним ферментом гуанілатциклазою, при цьому збільшується утворення циклічного гуанозинмонофосфату (цГМФ) у гладком'язових клітинах, тромбоцитах. цГМФ – головний внутрішньоклітинний месенджер у серцево-судинній системі і зумовлює розслаблення судин, пригнічення активності тромбоцитів і макрофагів, регулює роботу мембранних іонних

каналів тощо, оскільки через активацію протеїнази стимулює фосфорилування відповідних регуляторних білків. Окрім того,  $\text{NO}^{\bullet}$  реагує з гемоглобіном еритроцитів, утворюючи нітрозилгемоглобін. Унаслідок цього  $\text{NO}^{\bullet}$  перетворюється на іон нітриту ( $\text{NO}_2^-$ ), а за наявності гемового  $\text{Fe}^{2+}$  – у стабільніший іон нітрату ( $\text{NO}_3^-$ ).

2. Реакція  $\text{NO}^{\bullet}$  зі супероксид-аніоном із подальшим утворенням реакційноздатних пероксинітриту ( $\text{OONO}^-$ ) і гідроксилрадикала ( $\text{OH}^{\bullet}$ ).

3. Утворення нітрозотіолів і динітрозольних комплексів негемового заліза, які являють собою депо-форму  $\text{NO}^{\bullet}$ .

**Прямий вплив  $\text{NO}^{\bullet}$**  – реалізується при безпосередній взаємодії  $\text{NO}^{\bullet}$  з біомолекулами. Основною мішенню при цьому слугує гемове залізо гемоглобіну, міоглобіну, гуанілатциклази та інших гемовмісних білків.  $\text{NO}^{\bullet}$  також взаємодіє з негемовим залізом, яке входить до складу залізо-сірчаних кластерів, і вільним залізом ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Оксид нітрогену інгібує опосередковані  $\text{Fe}^{3+}$  оксидативні реакції і тим самим справляє антиоксидантну дію. Мішенню прямої дії  $\text{NO}^{\bullet}$  є  $\text{Cu}$  і  $\text{Zn}$  у складі ферментів. Прямі ефекти  $\text{NO}^{\bullet}$  реалізуються в організмі за фізіологічних умов, коли синтезується конститутивною NOS у низьких концентраціях. При цьому концентрація  $\text{NO}^{\bullet}$  в тканинах становить 0,1 – 1 мкмоль. Завдяки прямій дії  $\text{NO}^{\bullet}$  здійснюється більшість його фізіологічних функцій.

**Непрямий вплив  $\text{NO}^{\bullet}$**  – опосередковується через його реактивні форми, які утворюються від взаємодії оксиду нітрогену з киснем, супероксидом і пероксидом водню. Непрямий вплив  $\text{NO}^{\bullet}$  відбувається при посиленні його синтезу, зв'язаного з індукцією iNOS, яка спостерігається при запальних процесах різної етіології (при активації фагоцитів концентрація  $\text{NO}^{\bullet}$  біля них може зростати до 10 мкмоль) і поєднується з посиленням утворенням АФК.

Непряма дія реалізується через:

- S-, N- і O-нітרוзування, при якому катіон нітронію ( $\text{NO}^+$ ) приєднується до амінів, тіолів чи гідроксильних груп ароматичних сполук;



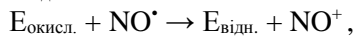
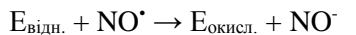
- через нітрування, яке здійснюється через приєднання нітрогрупи (NO<sub>2</sub>) до біомолекул (найчутливішими до нітрування ароматичні кільця, зокрема тирозину);
- через окислення або гідроксилування біомолекул.

У результаті вказаних реакцій утворюються модифіковані білки, які відіграють важливу роль у патогенезі гострих і хронічних захворювань.

Співвідношення між указаними типами модифікацій насамперед залежить від окисно-відновного потенціалу, рН і балансу між утворенням NO<sup>•</sup> і АФК у клітинних компартментах.

**Нітрозонієвий катіон (NO<sup>+</sup>)** – одна з редокс-форм NO<sup>•</sup>, утворюється із NO<sup>•</sup> у результаті окислення O<sub>2</sub> і Fe<sup>3+</sup>, є потужним нітрузуючим агентом. *Мишень дії* NO<sup>+</sup> – нуклеофільні групи активних тіолів, амінів, карбоксилів, гідроксилів і ароматичних кілець. Особливо легко підлягають нітрузуванню сульфгідрильні групи протеїнів. Процес утворення S-нітросполук зворотній. Вміст у клітині S-нітросполук розглядається як біомаркер інтенсивності синтезу NO<sup>+</sup>. Джерелом утворення NO<sup>+</sup> слугує N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, реакції окислення NO<sup>•</sup> за участю Fe<sup>3+</sup>-вмісних металопротеїнів (зокрема каталази) й утворення динітрозилних комплексів заліза або пероксинітриту.

Установлено, що в результаті реакції NO<sup>•</sup> з SOD (Mn або Fe, але не Cu-Zn-SOD) утворюються обидва іони оксиду нітрогену згідно зі схемою:



де E – ензим.

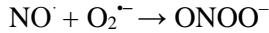
Аніон нітроксилу може утворюватись у процесі окислення L-аргініну NOS за умов дефіциту тетрагідробіоптерину, при деградації ONOO<sup>-</sup> і S-нітрозотіолів. Останні вступають у реакцію з іншими тіолами, які не підлягали нітрозилуванню, з утворенням відповідних дисульфідів і NO<sup>•</sup>. NO<sup>•</sup> може утворюватися із NO<sup>•</sup> через відновлення за участю цитохрому c, убіхінону, або Mn- чи Fe-SOD. NO<sup>•</sup> вибірково взаємодіє з

амінами і тіолами, але не взаємодіє з кисневмісними електрофілами.

**Фізіологічні функції NO<sup>•</sup>** – оксид азоту задіяний у реалізації таких фізіологічних функцій, як регуляція дихання, підтримання серцево-судинного гомеостазу, регуляція судинного тонуусу, сприяння діастолічному розслабленню міокарда, скорочення гладеньких м'язів, підтримання імунного статусу організму (блокує стимульовану цитокінами експресію адгезивних молекул, знижує агрегацію нейтрофілів і моноцитів, забезпечує перетворення їх на макрофаги). Окрім того, оксид нітрогену бере участь у забезпеченні механізмів пам'яті, вивільненні нейромедіаторів, виконує роль нейромодулятора в центральній нервовій системі, а також у нервово-м'язових синапсах, проявляє протизапальний та антитромбогенний ефекти. Також оксид нітрогену регулює функціонування мембранних іонних каналів і процеси фосфорилування білків, інгібує опосередковані Fe<sup>3+</sup> оксидативні реакції (гальмуючи процеси пероксидного окиснення ліпідів), виступає фактором антимікробного захисту організму (NO<sup>•</sup> виділяється клітинами-фагоцитами і разом із супероксидом використовується для елімінації багатьох вірусів, бактерій, грибів, найпростіших). Окрім того, оскільки NO<sup>•</sup>-синтаза наявна в тих утвореннях центральної нервової системи, які контролюють прояви харчової мотивації, припускають, що оксид нітрогену бере участь у регуляції процесів споживання й усмоктування поживних речовин.

Отже, міжклітинний та внутрішньоклітинний месенджер NO<sup>•</sup> бере участь у регуляції різноманітних метаболічних реакцій, які забезпечують життєздатність і функціональну активність клітин і всього організму, але за певних умов він задіяний у перебігу патологічних процесів. Така різна дія NO<sup>•</sup> визначається хімічними властивостями молекули і реалізується залежно від його концентрації, часу впливу й умов обміну в різних типах клітин і тканин організму.

**Пероксинітрит (ONOO<sup>-</sup>)** – високореакційна активна форма нітрогену, якій властива окислювальна активність, подібна до реакційної здатності гідроксильного радикала. Утворюється при взаємодії оксиду нітрогену з супероксидним радикалом:



Середній період напівжиття пероксинітриду становить 1 – 2 с, тому він здатний легко і з високою швидкістю проникати через біологічні мембрани. Сприятливі умови для синтезу  $\text{ONOO}^-$  створюються у клітинних компартментах з високою активністю NO-синтази (NOS) і ферментів, відповідальних за утворення супероксиду: ксантиноксидази, циклооксигенази, цитохрому P-450 і дихального ланцюга мітохондрій.

**Фізіологічна роль  $\text{ONOO}^-$**  полягає в інгібуванні та попередженні агрегації тромбоцитів (за рахунок нітрування білків, які в результаті набувають антиагрегаційних властивостей).

**Патологічна роль  $\text{ONOO}^-$**  пов'язана з його здатністю:

1. Зумовлювати нітрування деяких органічних сполук (наприклад залишки тирозину до 3-нітротирозину).

2. Окислювати аскорбінову кислоту, тіоли.

3. Окислювати NH- і SH-групи білків, і, як наслідок, викликати інактивацію багатьох ферментів (наприклад  $\alpha_1$ -інгібітора протеїназ, тканинного інгібітора металопротеїназ-1, SOD).

4. Індукувати утворення радикалів глутатіону ( $\text{GS}^{\cdot}$ ), внаслідок чого глутатіон перетворюється на прооксидант.

5. Індукувати процеси пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ) у мембранах і ліпопротеїнах.

6. Викликати утворення одониткових розривів і 8-гідроксидезоксигуанозину в ДНК.

7. Виступати попередником гідроксильного радикала за умов зниження рН середовища, що особливо виражено в організмі в умовах ацидозу, в ішемізованих тканинах, а також активованих фагоцитуючих клітинах:



## Тестові завдання для самоконтролю

### 1. До активних форм азоту належить ...

- а) пероксинітрит;
- б) гіпохлорит;
- в) оксид нітрогену;
- г) пероксид водню.

### 2. Пероксинітрит утворюється в реакції ...

- а) взаємодії оксиду нітрогену з  $\text{H}_2\text{O}_2$ ;
- б) взаємодії оксиду нітрогену з супероксидом;
- в) взаємодії аргініну з молекулярним киснем.

### 3. Період напівжиття пероксинітриту становить ...

- а) 1 – 2 с;
- б) 5 с;
- в)  $10^{-9}$  с.

### 4. Чи здатний проникати через мембрани пероксинітрит?

- а) так;
- б) ні.

### 5. Сприятливі умови для синтезу $\text{ONOO}^-$ створюються у клітинних компартментах з високою активністю ...

- а) супероксиддисмутази;
- б) NO-синтази;
- в) каталази;
- г) глутатіонпероксидази.

### 6. Пероксинітрит викликає нітрування ...

- а) тирозину;
- б) гістидину;
- в) фенілаланіну;
- г) проліну.

### 7. Пероксинітрит може виступати попередником ...

- а) супероксиду;
- б) пероксиду водню;
- в) гідроксильного радикала;
- г) синглетного кисню.

**8. Період напіврозпаду оксиду азоту становить ...**

- а) 1 – 2 с;
- б) 6 – 30 с;
- в)  $10^{-6}$  с.

**9. Клітинні ефекти  $\text{NO}^{\bullet}$  здійснюються за рахунок зв'язування з ...**

- а) аденілатциклазу;
- б) гуанілатциклазою;
- в) олігоаденілатсинтетазою.

**10. Головним внутрішньоклітинним месенджером у серцево-судинній системі, який опосередковує ефекти  $\text{NO}^{\bullet}$ , слугує:**

- а) цАМФ;
- б) цГМФ;
- в) пероксинітрит.

**11. Який фермент забезпечує синтез  $\text{NO}^{\bullet}$ ?**

- а) NO-синтаза;
- б) NO-синтетаза.

**12. Які ізоформи NO-синтаз розрізняють?**

- а) ендотеліальна eNOS;
- б) нейрональна nNOS;
- в) індукцибельна iNOS;
- г) епітеліальна eрNOS;
- д) гепатоцитарна hNOS.

**13. Ізоформи NO-синтаз – це ...**

- а) гомодимерні білки;
- б) гетеродимерні білки;
- в) гетеротетрамерні білки.

**14. Проміжним продуктом синтезу  $\text{NO}^{\bullet}$  слугує ...**

- а)  $\text{N}\omega$ -гідрокси-L-цитрулін;
- б)  $\text{N}\omega$ -гідрокси-L-аргінін;
- в)  $\text{N}\omega$ -гідрокси-L-аспарагін.

**15. Донором електронів для синтезу  $\text{NO}^{\bullet}$  слугує ...**

- а) NADH;
- б)  $\text{FADH}_2$ ;
- в) NADPH.

**16. Концентрація  $\text{NO}^{\bullet}$  у нормі в тканинах становить ...**

- а) 0,1 – 1 мкмоль;
- б) 0,01 – 0,1 мкмоль;
- в) 2 – 10 мкмоль.

**17. У яких редокс-формах може існувати  $\text{NO}^{\bullet}$ ?**

- а) оксиду азотного радикала ( $\text{NO}^{\bullet}$ );
- б) нітрозонієвого катіона ( $\text{NO}^{+}$ );
- в) нітроксильного радикала ( $\text{NO}^{\ominus}$ );
- г) всі відповіді правильні.

**18. Біомаркером інтенсивності синтезу  $\text{NO}^{+}$  у клітині є утворення ...**

- а) O-нітрозосполук;
- б) N-нітрозосполук;
- в) S-нітрозосполук.

**19. За умов дефіциту тетрагідробіоптерину в процесі окислення L-аргініну NOS утворює ...**

- а) оксид азотного радикала ( $\text{NO}^{\bullet}$ );
- б) нітрозонієвий катіон ( $\text{NO}^{+}$ );
- в) нітроксильний радикал ( $\text{NO}^{\ominus}$ ).

**20. З віком активність NOS ...**

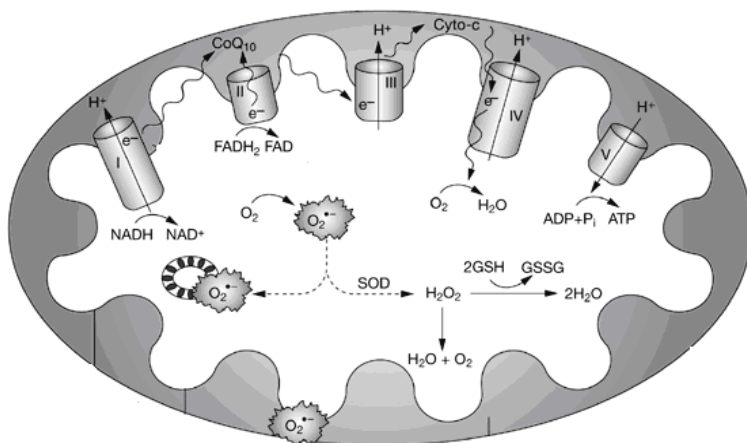
- а) підвищується;
- б) знижується;
- в) не змінюється.

## ТЕМА 6. СПОСОБИ УТВОРЕННЯ АФК У КЛІТИНІ

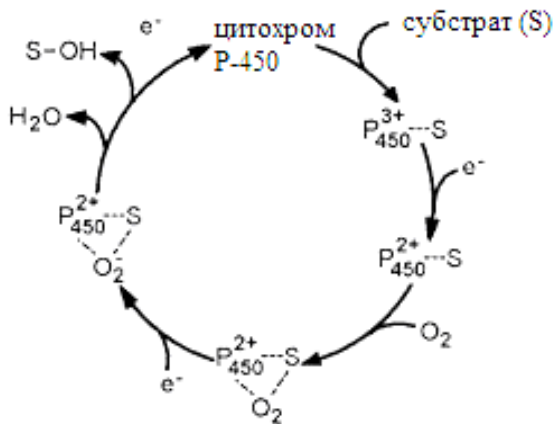
**Мета** – сформуванати уявлення про основні шляхи генерації АФК у клітині.

### Запитання та завдання для самопідготовки

1. Охарактеризуйте мітросомальний електронно-транспортний ланцюг як генератор АФК.
2. Опишіть способи утворення  $\text{H}_2\text{O}_2$  в каталітичному циклі Р-450-залежних моноксигеназних систем.
3. Вкажіть, які АФК можуть утворюватися в каталітичному циклі Р-450-залежних моноксигеназних систем.
4. Позначте ділянки дихального ланцюга, функціонування яких супроводжується утворенням супероксиду.



5. Поясніть, які компоненти дихального ланцюга мітохондрій є основними генераторами АФК.
6. Які мітохондріальні ферменти можуть бути джерелом АФК?
7. Позначте ділянки у мітросомальному електронно-транспортному ланцюгу, функціонування яких супроводжується утворенням АФК.



8. Опишіть механізм утворення АФК за участю ксантиноксидази.

9. Наведіть приклади оксигеназних реакцій, побічним продуктом яких є супероксид.

10. Охарактеризуйте участь ліпооксигенази у вільнорадикальних реакціях.

11. Які цитозольні ферменти можуть виступати продуцентами АФК?

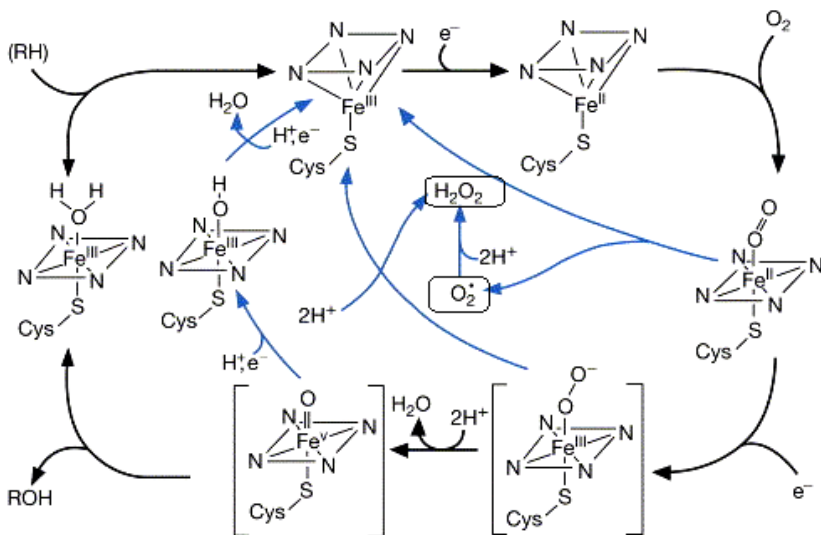
12. Поясніть механізм утворення АФК при окисненні гемоглобіну на метгемоглобін.

13. Розкрийте механізм продукування АФК у фагоцитуючих клітинах.

### ***Основні базові поняття, якими має оволодіти студент***

**Мікросомальні електронно-транспортні ланцюги як генератори АФК** – у процесі гідроксилювання субстрату за участю цитохрому Р-450 можливе відхилення від типової стехіометрії реакцій. При цьому не весь кисень включається у молекулу субстрату, а частина його вивільняється у формі супероксидного радикала, який стає ініціатором окислювальної модифікації білків (ОМБ), процесів ПОЛ і, як наслідок, окислювальної інактивації цитохрому Р-450.





*Ділянки утворення АФК у каталітичному циклі мітросомальних монооксигеназ*

У каталітичному циклі цитохрому Р-450 можливе утворення не лише  $O_2^{\cdot-}$ , але й  $H_2O_2$  і  $\cdot OH$ . Якщо утворення  $O_2^{\cdot-}$  спостерігається при розпаді оксикомплексу Р-450, то утворення  $H_2O_2$  в каталітичному циклі Р-450-залежних монооксигеназних систем можливе як за рахунок протонування та розпаду пероксикомплексу Р-450 (прямий шлях утворення  $H_2O_2$ ), так і в результаті дисмутації  $O_2^{\cdot-}$ . Крім того, джерелом  $H_2O_2$ , який окислює гем цитохрому Р-450 і цим сприяє його інактивації, може бути NADPH-специфічний флавопротеїн.

Пероксид водню і супероксидний радикал можуть перетворюватися в реакціях Фентона і Хабера-Вейса, які каталізуються іонами перехідних металів у окисленому стані, і слугувати джерелом реакційноздатнішого гідроксильного радикала. Важливою особливістю цитохрому Р-450 є те, що він не тільки генерує АФК, але й і сам інактивується за їх дії. Під час оксигеназних реакцій цитохром Р-450 може самоінактивуватися за дії реакційноздатних метаболітів двох типів:

- *перший тип* включає реакційноздатні інтермедіати субстратів, які підлягають окисленню (епоксиди, N-оксиди, S-

оксидами), а також радикальні форми субстратів. Основу механізму такого типу інактивації становить ковалентна модифікація гема активними метаболітами;

- *другий тип* включає продукти неповного відновлення кисню, які утворюються в активному центрі цитохрому P-450 унаслідок відхилення від монооксигеназного циклу.

Прийнято вважати, що супероксид – побічний продукт діяльності цитохрому P-450. Проте в останні роки з'явилися дані, що генерація цитохромом P-450 супероксиду необхідна, наприклад, для синтезу стероїдних гормонів у сім'яниках.

**Мітохондрії як продуценти АФК** – мітохондрії концентрують у собі більшу частину окиснювальних метаболічних шляхів, і тому містять численні редокс-переносники і центри, потенційно придатні до одноелектронного відновлення кисню до супероксид-аніона. За нормальних умов у мітохондріях менше 5 %  $O_2$  перетворюється в АФК, однак генерація останніх може значно зростати при порушенні перенесення електронів. У дихальному ланцюгу мітохондрій АФК утворюється невелика кількість у фізіологічних умовах унаслідок «втечі» електронів, які транспортуються по ЕТЛ.

Основним місцем генерації АФК у мітохондріях є *I та III комплекси* дихального ланцюга. Місце утворення супероксиду в комплексі I невідоме: потенційно всі редокс-компоненти ферменту – FMN, залізо-сірчані кластери, убісеміхінон в аеробних умовах можуть генерувати  $O_2^{\cdot-}$ . Утворені в комплексі I супероксидні радикали потрапляють у матрикс, де відбувається їх миттєва реакція з мітохондріальною супероксиддисмутазою з утворенням  $H_2O_2$ . Джерелом  $O_2^{\cdot-}$  в комплексі III є нестабільний радикал семіхінону ( $Q^{\cdot}$ ). Супероксид, який генерується в комплексі III, швидко дисмутує до  $H_2O_2$ .

Установлено, що комплекс I генерує супероксид векторно і виключно в напрямку мітохондріального матриксу, тоді як комплекс III виділяє супероксид і в матрикс, і в бік цитозолу. АФК, які генеруються в комплексах I і III дихального ланцюга, зумовлюють їх окислювальну інактивацію. Найчутливіший до

токсичної дії вільних радикалів комплекс I, значно менше чутливі – комплекси II і III.

На зовнішній мембрані мітохондрій розташовується ядерний транскрипційний фактор NrF2, який слугує сенсором концентрації супероксиду, при зростанні якого відбувається транслокація цього фактору у ядро й активація експресії антиоксидантних ферментів: (NAD(P)H-хіноноксидоредуктази-1, глутатіон-S-трансферази, гем-оксигенази-1, пероксиредоксину-1 та тіоредоксину) через антиоксидантний респонсивний елемент (ARE).

Джерелом АФК у мітохондріях виступають також ферменти *зовнішньої мітохондріальної мембрани* – редуктаза цитохрому  $b_5$ , моноамінооксидази А і В, дигідрооротатдегідрогеназа,  $\alpha$ -гліцерофосфатдегідрогеназа; *внутрішньої мітохондріальної мембрани* – сукцинатдегідрогеназа; *матриксу* – аконітаза,  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназний комплекс.

Основні АФК-генеруючі ферменти мітохондрій:

1. *Редуктаза цитохрому  $b_5$*  може ефективно генерувати супероксид з питомою активністю 300 нмоль/хв на мг білка.

2. *Моноамінооксидази А і В (MAO-A, MAO-B)* каталізують реакції окислення різних біогенних амінів, які супроводжуються продукцією пероксиду водню. У мітохондріях мозку MAO-A і MAO-B відіграють важливу роль в обміні нейромедіаторів класу моноамінів. Здатність цих ферментів до генерації  $H_2O_2$  може значно перевищувати можливості інших мітохондріальних джерел. Наприклад, при окисленні тираміну мітохондріями мозку утворюється  $H_2O_2$  зі швидкістю у понад 50 разів вищою, ніж його може генерувати комплекс III. Моноамінооксидази можуть бути основним джерелом  $H_2O_2$  у тканинах при ішемії, старінні організму й окисленні екзогенних амінів. Значне збільшення активності моноамінооксидаз і відповідно до цього підвищення продукування  $H_2O_2$  – важливі фактори ушкодження мітохондрій при хворобі Паркінсона.

3. *Дигідрооротатдегідрогеназа* каталізує одну із реакцій у синтезі піримідинових нуклеотидів у мітохондріях, а саме окислення дигідрооротату в оротат. Реакція супроводжується відновленням окисленого убіхінону, наявного на внутрішній мембрані мітохондрій, і який є природним акцептором

електронів для дигідрооротатдегідрогенази. При нестачі окисленого убіхінону відновлена дигідрооротатдегідрогеназа може генерувати  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

4.  *$\alpha$ -гліцерофосфатдегідрогеназа* містить флавін і каталізує окислення  $\alpha$ -гліцерофосфату до дигідроксиацетонфосфату, використовуючи мітохондріальний убіхінон як акцептор електронів. Даний фермент генерує пероксид водню.

5. *Сукцинатдегідрогеназа (SDH)* – флавіновмісний білковий комплекс, розміщений на внутрішній поверхні внутрішньої мембрани мітохондрій. SDH окислює бурштинову кислоту (сукцинат) до фумарової з використанням убіхінону як акцептора електронів. Виділена і реконструйована в ліпосоми SDH генерує АФК через окислення відновленого флавіну ферменту киснем, що в реконструйованій системі викликається нестачею убіхінону, природного акцептора для SDH. Дискусійним залишається питання здатності SDH до генерації АФК у нативному непошкодженому дихальному ланцюгу.

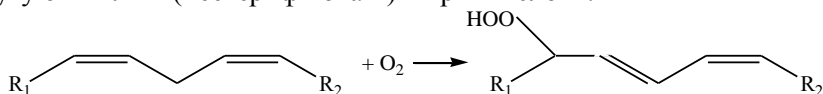
6.  *$\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназний комплекс* каталізує перетворення  $\alpha$ -кетоглутарату до сукциніл-КоА. Комплекс складається із трьох окремих ферментів:  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогенази, дигідроліпоамідсукцинілтрансферази, ліпоаміддегідрогенази. Доведено, що даний ферментативний комплекс здатний генерувати супероксид і пероксид водню. Безпосереднім джерелом АФК є ліпоаміддегідрогеназа. Генерація АФК  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназним комплексом зростає при зниженні концентрації природного акцептора електронів –  $\text{NAD}^+$ .

7. *Аконітаза* каталізує перетворення лимонної кислоти на ізолімонну в одній із основних реакцій циклу трикарбонових кислот (цикл Кребса). Супероксид може інактивувати аконітазу через окислення FeS-кластера ферменту, що призводить до його порушення і вивільнення з нього заліза. При інактивації аконітаза може індукувати генерацію гідроксильного радикала за участю вивільненого заліза.

Окрім безпосереднього продукування АФК, мітохондрії опосередковано контролюють їх генерацію іншими системами через регуляцію вмісту молекулярного кисню в клітинних компартментах (активним його використанням).

У нормі аеробна клітина має спеціальні механізми попередження надлишкового утворення  $O_2^{\cdot-}$  в мітохондріях і продуктів його наступних перетворень. При порушенні цих механізмів мітохондрії стають дефектними, що супроводжується зростанням кількості  $O_2^{\cdot-}$  і, як наслідок, – утворенням пор у внутрішній мітохондріальній мембрані. Через незворотне відкриття пор відбувається зниження мембранного потенціалу і одночасний вихід цитохрому *c*,  $Ca^{2+}$ -залежна активація нуклеаз, протеаз, ліпаз і початок деградації мітохондрій. Генеровані в мітохондріях АФК пошкоджують молекулярні структури самих мітохондрій. Насамперед інактивуються мембранозв'язані та ліпідозалежні ферменти дихального ланцюга, відбувається пероксидне окислення ліпідів і пошкодження мтДНК.

**Ліпооксигенази** – це негемовмісні діоксигенази, які окислюють поліненасичені жирні кислоти з утворенням гідропероксидів. Субстратом для ліпооксигеназ переважно слугують вільні (неетерифіковані) жирні кислоти.



#### *Утворення гідропероксидів за участю ліпооксигенази*

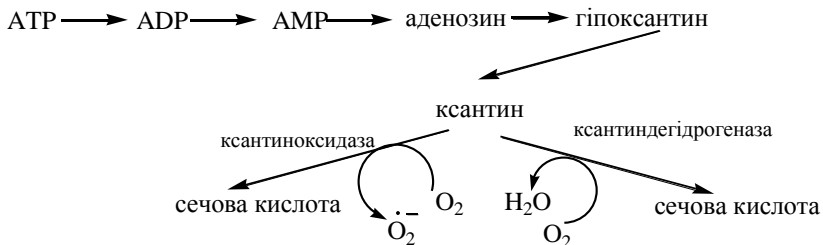
У клітинах тварин ці ферменти відповідають за синтез лейкотрієнів, які утворюються при окисленні арахідонової кислоти.

**Циклооксигенази** – гемовмісні мембранозв'язані ферменти, котрі окислюють арахідонову кислоту за участю молекулярного кисню. У результаті утворюються простагландини та нестабільні проміжні продукти – ендперокси. Субстрат для цих ферментів – неетерифікована арахідонова кислота, утворена під час активації фосфоліпази  $A_2$ . При ферментативному окисленні арахідонової кислоти формуються пероксидні та вільнорадикальні ейкозаноїди, за участю яких також утворюються АФК. Активність циклооксигеназ і ліпооксигеназ регулюється продуктами їх реакції; невелика кількість пероксидів активують ці ферменти, натомість накопичення значної кількості продуктів пероксидного

окислення ліпідів може призводити до незворотного інгібування як циклооксигеназ, так і ліпооксигеназ.

**Ксантиноксидаза** – молібден/залізо/мідевмісний флавопротеїн, який каталізує кінцеву стадію окислення пуринів, а також окислювальну трансформацію птеридинів і деяких аліфатичних та ароматичних альдегідів. Фермент каталізує реакцію утворення сечової кислоти із ксантину та перетворює молекулярний кисень на пероксид або супероксид залежно від рівня відновленості ферменту. За умов дефіциту кисню ксантиноксидаза функціонує як  $\text{NAD}^+$ -залежна ксантин-дегідрогеназа.

Ксантиноксидаза – потужний продуцент супероксидного радикала (на кожний мономер ферменту припадає тільки 1 молекула FAD і два залізо-сірчані центри, тому супероксид може утворюватися у надлишку).

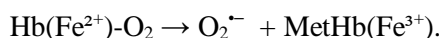


*Схема утворення АФК за участю ксантиноксидази*

Механізм дії ксантиноксидази досить складний. Спочатку відбувається окислення заліза у складі залізо-сірчаного центру ферменту з утворенням супероксидного радикала. FAD дегідрує субстрат, перетворюючись на активний семіхінон, здатний дегідрувати воду з утворенням  $\text{FADH}_2$ , який відновлює супероксид в  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Електрон, котрий залишився у FAD, може відновлювати окислений залізо-сірчаний центр. Два гідроксильні, утворені під час дегідрування води на двох мономерах ксантиноксидази, конденсуються в молекулу  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Молібден (компонент ксантиноксидази), віддаючи електрон, розщеплює пероксид водню до  $\cdot\text{OH}$  і  $\text{OH}^-$ , змінюючи при цьому свою валентність. Збуджений молібден зв'язується з гідроксил-аніоном, відбирає у нього електрон і гідроксильне субстрат, передаючи останньому гідроксильний радикал.

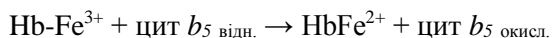
Підвищення активності ксантинооксидази викликає підвищення активності SOD і каталази, а також активності глутатіонпероксидази.

**Утворення АФК при окисненні гемоглобіну на метгемоглобін** – великий уміст кисню в еритроцитах визначає високу швидкість утворення в них супероксиду, пероксиду водню і гідроксильного радикала. Водночас еритроцити містять ферментативну систему, яка запобігає токсичному впливу АФК і руйнуванню мембран еритроцитів. Постійне джерело АФК в еритроцитах – неферментативне окислення гемоглобіну на метгемоглобін:

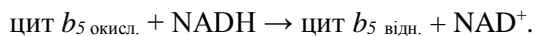


Частина гемоглобіну навіть за нормальних умов може перетворюватися на метгемоглобін. Однак метгемоглобін-редуктазна система постійно відновлює метгемоглобін у гемоглобін. Метгемоглобінредуктазна система складається із цитохрому  $b_5$ -редуктази, донором водню для якої слугує NADH, утворений у гліцеральдегіддегідрогеназній реакції гліколізу.

Цитохром  $b_5$  відновлює  $\text{Fe}^{3+}$  метгемоглобіну в  $\text{Fe}^{2+}$ :



Окислений цитохром  $b_5$  далі відновлюється цитохром  $b_5$ -редуктазою:



Утворений у цьому процесі супероксидний аніон за участю ферменту супероксидисмутази перетворюється на пероксид водню. Пероксид водню руйнується каталазою і глутатіонпероксидазою. Донором водню в цій реакції слугує глутатіон, який відновлюється NADPH-залежною глутатіонредуктазою.

## Тестові завдання для самоконтролю

**1. Фізіологічною функцією якого ферменту є синтез АФК?**

- а) ксантинооксидаза;
- б) супероксиддисмутаза;
- в) NADPH-оксидаза;
- г) ліпооксигеназа.

**2. У результаті функціонування NADPH-оксидази макрофагів утворюється ...**

- а) пероксид водню;
- б) синглетний кисень;
- в) супероксид-аніон радикал;
- г) гідроксильний радикал;
- д) оксид азоту.

**3. Які АФК утворюються в каталітичному циклі цитохрому P-450?**

- а) супероксид;
- б) пероксид водню;
- в) гідроксильний радикал;
- г) пероксинітрит;
- д) синглетний кисень.

**4. Укажіть основне місце генерації АФК у мітохондріях ...**

- а) комплекс I;
- б) комплекс II;
- в) комплекс III;
- г) комплекс IV.

**5. Утворення  $H_2O_2$  в каталітичному циклі P-450-залежних моноксигеназних систем можливе за рахунок ...**

- а) протонування та розпаду пероксикомплексу P-450;
- б) в результаті дисмутації  $O_2^{\cdot-}$ ;
- в) вивільнення із потрійного комплексу субстрат-P-450 –  $(RH)Fe^{3+}(O_2^-)$ .

**6. Комплекс III мітохондрій генерує супероксид у напрямку ...**

- а) мітохондріального матриксу;
- б) цитозолю ;



в) обидві відповіді правильні.

**7. Найчутливіший до дії АФК у мітохондріях:**

- а) Комплекс I дихального ланцюга;
- б) Комплекс II дихального ланцюга;
- в) Комплекс III дихального ланцюга;
- г) усі ферментативні комплекси однаково чутливі.

**8. Основний продуцент пероксиду водню у мітохондріях – це**

...

- а) редуктаза цитохрому b5;
- б) моноамінооксидази A і B ;
- в) дегідрогеназа дигідрооротату;
- г) дегідрогеназа  $\alpha$ -гліцерофосфату;
- д) сукцинатдегідрогеназа;
- е) аконітаза.

**9. Ксантинооксидаза – потужний продуцент ...**

- а) супероксиду;
- б) пероксиду водню;
- в) гідроксильного радикала;
- г) пероксинітриту;
- д) синглетного кисню.

**10. Накопичення продуктів пероксидного окислення ліпідів призводить до ...**

- а) активації циклооксигеназ та ліпооксигеназ;
- б) незворотнього інгібування циклооксигеназ та ліпооксигеназ.

**11. У процесі метаболізму арахідонової кислоти утворюються ...**

- а) супероксид;
- б) пероксид водню;
- в) гідроксильний радикал;
- г) пероксинітрит;
- д) синглетний кисень.

**12. Які з указаних ферментів є продуцентами АФК?**

- а) ліпооксигеназа;
- б) ксантинооксидаза;

- в) циклооксигеназа;
- г) цитохромоксидаза;
- д) ксантиндегідрогеназа.

**13. У процесі метаболізму якого гормону утворюється супероксид-аніон радикал?**

- а) інсуліну;
- б) адреналіну;
- в) соматостатину;
- г) вазопресину.

**14. Яка АФК утворюється при неферментативному окисненні гемоглобіну у метгемоглобін?**

- а) супероксид;
- б) пероксид водню;
- в) гідроксильний радикал;
- г) пероксинітрит;
- д) синглетний кисень.

**15. При зниженні концентрації NADH генерація АФК  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназним комплексом ...**

- а) зростає; б) знижується.

**16. Сенсором концентрації супероксиду у мітохондріях слугує ...**

- а) ядерний транскрипційний фактор NrF2;
- б) ядерний транскрипційний фактор Nf-kB;
- в) антиоксидантний респонсивний елемент.

**17. Найчутливіші мішені для дії АФК у мітохондрія – це ...**

- а) ензими матриксу;
- б) ензими дихального ланцюга;
- в) транспортери внутрішньої мембрани.

**18. Ліпооксигеназа – продуцент ...**

- а) супероксиду; б) пероксиду водню;
- в) гідроксильного радикала.

**19. При метаболізмі супероксиду утворюється ...**

- а) супероксид;
- б) пероксид водню;
- в) гідроксильний радикал;

г) пероксинітрит.

**20. Запобігає токсичному впливу АФК і руйнуванню мембран еритроцитів переважно ...**

- а) супероксиддисмутаза;
- б) система глутатіонзалежних ензимів;
- в) метгемоглобінредуктазна система.

## ТЕМА 7. БІОЛОГІЧНА РОЛЬ АФК

**Мета** – сформувати уявлення про біохімічні механізми фізіологічної дії АФК.

### **Запитання та завдання для самопідготовки:**

1. Опишіть, у чому полягає фізіологічна роль АФК.
2. Поясніть біохімічні механізми фізіологічної дії АФК.
3. Розкрийте роль АФК у неспецифічному імунітеті.
4. Сформулюйте, що Ви розумієте під поняттям «дихальний вибух»?
5. Уточніть, чи можна називати АФК сигнальними молекулами?
6. Охарактеризуйте, яким вимогам повинні відповідати АФК як сигнальні молекули.
7. Наведіть приклад участі АФК у передачі сигналу за посередництвом мембранних рецепторів.
8. Поясніть, які способи існують у клітині для впливу АФК на внутрішньоклітинні системи трансдукції сигналу.
9. У чому полягає відмінність між АФК і класичними вторинними месенджерами?
10. Аргументуйте роль АФК у регуляції  $Ca^{2+}$ -сигналів.
11. Розкрийте роль АФК у регуляції вмісту циклічних нуклеотидів.
12. Наведіть приклади регуляції активності генів за участю АФК.
13. Які молекули є мішенню ушкоджувальної дії АФК? Опишіть негативні наслідки впливу АФК на клітинні структури.

### ***Основні базові поняття, якими має оволодіти студент***

**АФК як сигнальні молекули** – активні форми кисню, з одного боку, здатні окислювати будь-які молекули в живому організмі: ДНК і РНК, протеїни, ліпіди. З іншого – в незначній кількості АФК пр одуковуються в будь-якому живому аеробному організмі завдяки спеціальним ферментам, які відповідають за одноелектронне відновлення кисню в процесі дихання і необхідні для виконання багатьох фізіологічних функцій. АФК

здатні виявляти найрізноманітніші *регуляторні ефекти* й опосередковувати загальні адаптаційні реакції клітини. Пропонується гіпотеза, що утворювані мітохондріями АФК *беруть участь у передачі внутрішньоклітинних сигналів і регуляції клітинних функцій* (є сигнальними молекулами), тобто можуть бути задіяними в сигнальних шляхах. Тому збільшення продукування АФК справляє на клітину не лише ушкоджувальний, але і регуляторний ефект. Основне значення в цьому процесі відводиться *пероксиду водню*, молекули якого легко дифундують через мітохондріальні мембрани.

Теоретично АФК ідеально годяться для виконання ролі сигнальних молекул, оскільки:

- вони малі за розміром,
- можуть дифундувати на короткі дистанції,
- є механізми їх синтезу та елімінації.

Як потенційно сигнальні молекули, АФК повинні:

- синтезуватися клітиною у відповідь на сигнал, тобто бути задіяними у передачі сигналу від первинного ліганду;
- брати участь у подальшій передачі сигналу у клітині, яка їх синтезує;
- вилучатися після закінчення дії сигналу.

Таким вимогам повністю відповідають пероксид водню і супероксид-аніон. Якщо розглядати АФК із позицій їхньої дії як вторинних посередників, то вони повинні вироблятися у відповідь на певний подразник (ліганд), тобто їх синтез при передачі сигналу повинен бути опосередкованим ліганд-рецепторною взаємодією. Такими лігандами можуть виступати: гормони (інсулін, ангіотензин, паратиреоїдний гормон), вітамін D<sub>3</sub>, цитокіни, деякі нейромедіатори.

Як приклад вкладу АФК у передачу сигналу за участю мембранних рецепторів, можна розглянути участь АФК у внутрішньоклітинній передачі сигналу інсуліну. Дія інсуліну починається з його зв'язування зі специфічним глікопротеїновим рецептором на поверхні клітини-мішені. Встановлено, що внаслідок взаємодії інсуліну з його рецептором через подальше фосфорилування певних внутрішньоклітинних білків відбувається опосередкована активація NADPH-оксидази. Результатом її дії – синтез

супероксид-аніона та пероксиду водню, які відіграють корегуляторну функцію в активації інсулінового рецептора, посилюючи сигнали інсуліну і забезпечуючи позитивний зворотний зв'язок. Тобто активація синтезу АФК через інсуліновий рецептор зумовлює кооперативність між інсуліновим рецептором та іншими мембранними рецепторами.

АФК залучені у передачу сигналів від цитокінів, зокрема, інтерлейкінів, інтерферону, тромбоцитарного фактору росту, епідермального фактору росту, фактору некрозу пухлин, фактору росту нервів, фактору росту тромбоцитів. Цитокіни через свої рецептори здатні викликати синтез АФК, активуючи NADPH-оксидазу через сигнальний білок Rac 1. АФК залучені як у внутрішньоклітинну передачу сигналу від цих цитокінів, так і у регуляцію активності їх рецепторів, забезпечуючи позитивний зворотний зв'язок у передачі сигналу.

**Біохімічні механізми дії АФК** – АФК здатні впливати на внутрішньоклітинні системи трансдукції сигналу двома способами:

1) *змінювати внутрішньоклітинний редокс-статус клітини.* На відміну від позаклітинного середовища, внутрішньоклітинний матрикс значно «відновленіший» (має негативніше значення редокс-потенціалу) та характеризується сталим окисно-відновним гомеостазом завдяки буферним властивостям внутрішньоклітинних тіолів, в основному глутатіону та тіоредоксину. У клітині зберігається високе редокс-співвідношення глутатіону та тіоредоксину, що підтримується активністю глутатіон- і тіоредоксинредуктаз. Обидві тіолові редокс-системи протидіють внутрішньоклітинному оксидативному стресу, зменшуючи вміст  $H_2O_2$  і ліпідних пероксидів через реакції, які каталізуються пероксидазами. Встановлено, що, крім виконання антиоксидантних функцій, глутатіон і тіоредоксин беруть участь у сигнальних процесах. Показано, що тіоредоксин здатний регулювати активність деяких білків, безпосередньо зв'язуючись з ними;

2) *зумовлювати окиснювальні модифікації білків.*

АФК можуть змінювати структуру та функції білків, модифікуючи певні амінокислотні залишки, викликаючи

білкову димеризацію і взаємодіючи з Fe-S або іншими комплексами металів. Окиснювальні модифікації амінокислот у межах функціональної ділянки білків можуть відбуватися кількома способами. Наприклад, сульфгідрильна група (-SH) окремого залишку цистеїну може бути окисленою з утворенням -SOH, -SO<sub>2</sub>H, -SO<sub>3</sub>H і дисульфідних похідних. Такі модифікації змінюють активність ферменту, якщо цистеїн розташований у його активному центрі, або впливають на здатність фактору транскрипції зв'язуватися з ДНК, якщо цистеїн розміщений у межах його ДНК-зв'язуючої ділянки. Формування внутрішньомолекулярних і міжмолекулярних дисульфідних зв'язків призведе до зміни структури білків чи спричинить їхню димеризацію і, отже, вплине на передачу сигналів у клітині.

Реалізація участі АФК у внутрішньоклітинних процесах передачі сигналу відбувається на *двох рівнях*. Доведено, що АФК можуть бути задіяними як у каскадах, які закінчуються на рівні активації відповідних внутрішньоклітинних білків (тобто на рівні цитоплазми), так і у сигнальних шляхах, котрі ведуть до індукції експресії відповідних генів (у ядрі).

Важлива ланка участі АФК у сигнальних шляхах – їхня роль у процесах фосфорилування білків. Фосфорилування білків здійснюється відповідними протеїнкіназами та зумовлює зміни (активацію чи інгібування) їхньої активності. Субстратами протеїнкіназ виступають численні білки – ферменти, іонні транспортери, скоротливі білки, білки цитоскелета тощо. У багатьох випадках фосфорилуються білки, які залучають до роботи ті чи інші гени, і тоді зовнішній інформаційний сигнал транслюється зі зміною спектра білків, які синтезує клітина. Для нормальної роботи сигнальних каскадів необхідне не лише їх увімкнення, а і своєчасне вимкнення після виконання завдання. Такі реакції каталізуються протеїнфосфатазами, функціонування яких також регулюється численними білковими та іншими факторами.

Нині найдетальніше вивчений вплив АФК на функціонування систем тирозинкіназ/фосфатаз та серин-треонінкіназ/фосфатаз. Наприклад, високі концентрації пероксиду водню й сильні прооксидантні зміни у

внутрішньоклітинному тіол-дисульфідному співвідношенні призводять до підвищення фосфорилування тирозину в білках. Цей ефект, як припускають, – результат окиснювального інгібування тирозинових протеїнфосфатаз. Тирозинові протеїнфосфатази протидіють ефекту тирозинових протеїнкіназ. Всі тирозинові протеїнфосфатази в активному центрі мають цистеїн, окислення якого пероксидом водню або окисленим глутатионом призводить до інгібування каталітичної активності. Тобто тирозинові протеїнфосфатази – типовий приклад білків, активність яких залежить від зміни концентрацій АФК або внутрішньоклітинного тіол-дисульфідного співвідношення.

**Відмінності між АФК і класичними вторинними месенджерами** – для всіх класичних месенджерів є білки-мішені, котрі мають специфічні зв'язувальні центри, при взаємодії з якими регуляторні молекули реалізують свою дію через зміну їх конформації (для АФК білків-мішеней немає).

- Швидкість як утворення, так і розпаду справжніх месенджерів набагато нижча, ніж швидкість продукування та розпаду АФК (це забезпечує надійну взаємодію ліганду з активним центром мішені).

- Стаціонарний рівень АФК дуже низький, що забезпечується наявністю системи їх ефективного вилучення.

**Роль АФК у регуляції  $Ca^{2+}$ -сигналів** – зміни внутрішньоклітинного рівня  $Ca^{2+}$  задіяні у регуляції багатьох внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, зокрема залучені в апоптичні процеси.

Механізм АФК-індукованої активації іон-транспортних шляхів охоплює:

- окислення сульфгідрильних груп іонотранспортних протеїнів,
- зміну їх ліпідного оточення внаслідок активації процесів ПОЛ;
- інгібування мембранозв'язаних регуляторних ферментів;
- модифікацію швидкості окисного фосфорилування та рівня АТР.

АФК збільшують внутрішньоклітинний рівень кальцію у різних видах клітин через мобілізацію внутрішньоклітинних

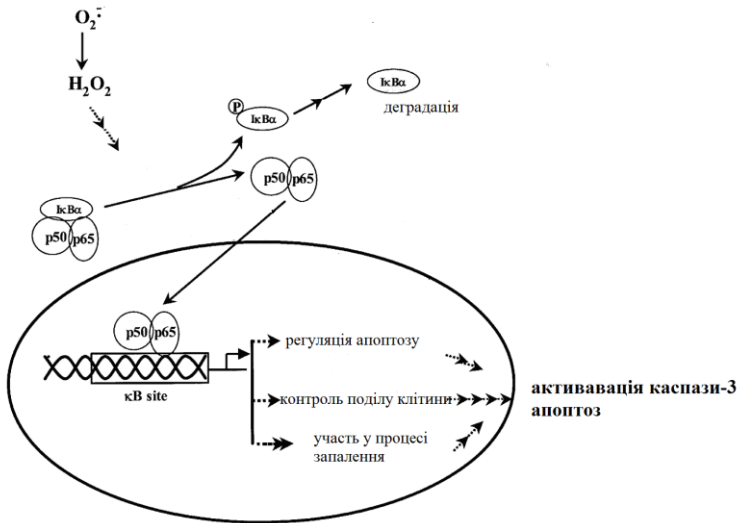


кальцієвих депо й/або через посилення надходження позаклітинного кальцію.

**Роль АФК у регуляції вмісту циклічних нуклеотидів** – супероксид і пероксид водню можуть безпосередньо або опосередковано брати участь у регуляції вмісту циклічних нуклеотидів (сАМР і сGMP). Показано, що АФК здатні активувати гуанілатциклазу, продукт якої – сGMP – регулює активність протеїнкіназ, фосфодіестераз, іонних каналів. Установлено, що АФК опосередковано здатні регулювати синтез сАМР. Оскільки аденілатциклаза – інтегральний білок плазматичної мембрани, АФК через регуляцію рівня  $\text{Ca}^{2+}$  здатні впливати на активність аденілатциклази.

**Роль АФК у регуляції активності генів** – АФК залучені у регуляцію активності низки генів. Відомо, що пероксид водню викликає посилення експресії майже 100 генів. АФК також необхідні для активації багатьох транскрипційних факторів, які беруть участь у експресії генів.

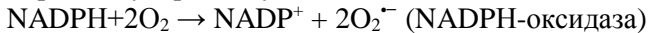
Першим виявленим редокс-чутливим фактором транскрипції був NF- $\kappa$ B, який індукує експресію гена інтерлейкіну-1 $\beta$ , відповідального за численні реакції, зокрема задіяного у розвитку запальних реакцій, контролі росту й апоптозу. Нині відомо, що цей ядерний фактор регулює експресію фактору некрозу пухлин  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), деяких цитокінів та індукцйбельної синтази оксиду азоту. NF- $\kappa$ B у цитоплазмі перебуває у неактивному стані та складається з 2-х субодиниць (p50 і p65) й інібіторного білка I $\kappa$ -Ba. Для того, щоб відбулася активація NF- $\kappa$ B та його транслокація до ядра, необхідно, щоб відбулося відщеплення I $\kappa$ -Ba (через фосфорилування). Мікромольні концентрації пероксиду водню та прооксидантні зміни глутатіонового співвідношення активують NF- $\kappa$ B, натомість антиоксиданти його інгібують. Механізм такої АФК-опосередкованої активації оснований на зростанні деградації I $\kappa$ -Ba через АФК-опосередковане зростання його фосфорилування. У результаті відбувається дисоціація I $\kappa$ -Ba від NF- $\kappa$ B та транслокація NF- $\kappa$ B до ядра з наступною експресією відповідного гена.



*Участь АФК у регуляції активності гена фактору транскрипції NF-κB*

Приклад ще одного транскрипційного фактору, частково чутливого до оксидативного стресу, – це активаторний білок 1 (AP-1). AP-1 у клітинах ссавців, подібно до NF-κB, індукується АФК і є гетеродимерним транскрипційним фактором, який складається з білків c-Fos та c-Jun. Його функціонування охоплює регуляцію експресії генів, які контролюють диференціацію, проліферацію та апоптоз.

**Участь АФК у неспецифічному імунітеті** – АФК беруть участь у процесі фагоцитозу. Фагоцити активуються бактеріями чи іншими антигенними стимулами, що супроводжується активацією ферментного комплексу плазматичної мембрани фагоцитів – NADPH-оксидази з утворенням супероксиду. NADPH-оксидаза – єдиний відомий спеціалізований фермент синтезу АФК. Цей фермент уперше виявлено у нейтрофілах, у яких при антигенній стимуляції зростає споживання кисню у 20 і більше разів (спостерігається так званий «дихальний, або респіраторний вибух»), при цьому до 90 % спожитого кисню іде на утворення супероксиду:



NADPH-оксидаза фагоцитуючих клітин – ферментативний комплекс, який каталізує відновлення молекулярного кисню до

$O_2^-$ . Ферментативний комплекс складається з мембранозв'язаних і цитозольних компонентів. Мембранозв'язаний низькопотенційний цитохром  $b_{558}$  складається із 2 субодиниць  $\alpha$  і  $\beta$  з молекулярними масами 22 кДа і 91 кДа відповідно ( $p22^{phox}$  і  $gp91^{phox}$ ); їх стехіометричне співвідношення становить 1:1.  $\alpha$ -субодиниця містить гем,  $\beta$ -субодиниця є FAD-вмісним флавопротеїном.

У неактивованих нейтрофілах людини 85 % цитохрому  $b_{558}$  локалізовано у мембранах специфічних гранул, близько 5 % – у цитоплазматичній мембрані, інші 10 % зв'язані зі секреторними везикулами. Для генерації супероксиду також необхідні 2 цитозольні білки з молекулярними масами 47 і 67 кДа ( $p47^{phox}$  і  $p67^{phox}$  відповідно), які у неактивній клітині перебувають у комплексі з цитоплазматичним білком з молекулярною масою 40 кДа ( $p40^{phox}$ ); молекулярна маса комплексу становить 240–250 кДа. Генетично зумовлена нестача або дисфункція будь-якого із компонентів призводить до втрати здатності NADPH-оксидази генерувати супероксид. В активації NADPH-оксидази бере участь мембранний GTP-зв'язувальний білок (G-білок) Rap-1 і цитозольні білки із родини малих цитозольних G-білків  $p21^{rac1}$  і  $p21^{rac2}$ ; останній у стані спокою утворює комплекс із інгібітором дисоціації Rho GDP. Це гетеродимер із молекулярною масою 45–50 кДа і у людини є GTP-азою, яка зв'язується з  $p40^{phox}$ .

При стимуляції фагоцитів відбувається швидке збирання із мембранних і цитозольних компонентів NADPH-оксидазного комплексу, який здійснює перенесення електрона від цитозольного NADPH на  $O_2$  з утворенням супероксиду. Індукція хемотаксичними пептидами відбувається протягом 2 с. Уже через 1 хв після стимуляції фагоциту більша частина NADPH-оксидазної активності виявляється на внутрішньоклітинних циліндричних гранулах, які також містять лужну фосфатазу; проте уже через 5 хв основна активність NADPH-оксидази локалізується на зовнішньому боці цитоплазматичної мембрани, що є наслідком екзоцитозу  $O_2^-$ -продукуючих гранул.

У результаті активації NADPH-оксидази за 1 секунду продукується близько 200 мільйонів молекул супероксиду (на 1 клітину). Проте супероксид-аніон радикал безпосередньо не

має протимікробної дії, а є тригером каскаду реакцій, які призводять до утворення пероксиду водню та реакційно здатного гіпохлориту. Ці реакції потребують залучення інших ферментів (супероксиддисмутази, мієлопероксидази).

$2 O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$  (каталізується супероксиддисмутазою)

$H_2O_2 + Cl^- \rightarrow H_2O + ClO^-$  (каталізується мієлопероксидазою).

Вивільнені АФК у результаті дихального вибуху руйнують бактерії та пошкоджені, старі, імунологічно несумісні пухлинні клітини. Зниження активності NADPH-оксидази у фагоцитах призводить до інфекції та сепсису. Для власного захисту від АФК нейтрофіли містять каталазу і глутатіонпероксидазу.

Окрім того, роль АФК у функціонуванні імунної системи полягає у:

- стимуляції фагоцитозу, регуляції запалення;
- стимуляції специфічного імунітету (активації Т-лімфоцитів);
- стимуляції протипухлинного імунітету.

**Негативна роль АФК:** 1. АФК викликають різноманітні ушкодження білків і нуклеїнових кислот, які призводять до порушення їхнього функціонування. Зумовлюють гальмування процесів синтезу білків та нуклеїнових кислот.

2. АФК ініціюють реакції пероксидного окислення ліпідів, що призводить до порушення мембранної проникності, перешкоджають нормальному функціонуванню мембранних білкових комплексів. Накопичення АФК може спричинювати порушення ріднокристалічної структури ліпопротеїнів мембран, зниження щільності біологічних мембран, їх руйнацію.

3. Викликають порушення механізму перенесення кальцію і здатності мітохондрій утримувати кальцій, що призводить до збільшення вмісту кальцію в цитоплазмі, пошкодження елементів цитоскелета, активації фосфоліпаз, протеаз і некрозу клітини.

4. Зумовлюють дезорганізацію транспортних механізмів перенесення іонів та різноманітних метаболітів між цитозолем, мітохондріями та рибосомами.

5. Зумовлюють накопичення (внаслідок порушення окисно-відновних процесів) продуктів проміжного обміну, зокрема лактату, окси- та кетокислот, індукують розвиток ацидозу.

## Тестові завдання для самоконтролю

### 1. Які АФК – регулятори тонуусу судин?

- а) пероксид водню;
- б) синглетний кисень;
- в) супероксид-аніон радикал;
- г) гідроксильний радикал;
- д) оксид азоту.

### 2. Які АФК відіграють роль вторинних месенджерів?

- а) пероксид водню;
- б) синглетний кисень;
- в) супероксид-аніон радикал;
- г) гідроксильний радикал;
- д) оксид азоту.

### 3. АФК придатні для виконання ролі сигнальних молекул, оскільки ...

- а) малі за розміром;
- б) великі за розміром;
- в) можуть дифундувати на короткі дистанції;
- г) існують механізми їх синтезу й елімінації.

### 4. АФК здатні брати участь у передачі сигналу вітаміну ..

- а) В<sub>1</sub>;
- б) К;
- в) D<sub>3</sub>;
- г) Е.

### 6. АФК залучені у передачу сигналів від ...

- а) окремих цитокінів;
- б) окремих гормонів;
- в) антигенів.

### 7. АФК здатні впливати на внутрішньоклітинні системи трансдукції сигналу в такий спосіб:

- а) через зміну внутрішньоклітинного редокс-статусу клітини;
- б) через окислювальне пошкодження ліпідів;
- в) через окислювальне пошкодження білків;
- г) через окислювальне пошкодження нуклеїнових кислот.

**8. Основний біохімічний механізм участі АФК у процесі сигнальної трансдукції – це їхня участь у ...**

- а) окисленні білків;
- б) фосфорилуванні білків;
- в) гідроксилюванні білків;
- г) ацетилюванні білків.

**9. Високі концентрації пероксиду водню призводять до підвищення фосфорилування амінокислоти ...?... у білках**

- а) триптофану;
- б) тирозину;
- в) фенілаланіну.

**10. АФК збільшують внутрішньоклітинний рівень кальцію у різних видах клітин через ...**

- а) мобілізацію внутрішньоклітинних кальцієвих депо;
- б) посилення надходження позаклітинного кальцію;
- в) обидві відповіді правильні.

**11. Механізм АФК-індукованої активації іон-транспортних шляхів включає:**

- а) окислення сульфгідрильних груп іонотранспортних протеїнів;
- б) інгібування мембранозв'язаних регуляторних ферментів;
- в) активацію  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних протеаз, фосфатаз, нуклеаз.

**12. Основу механізму АФК-опосередкованої активації NF- $\kappa$ B становить ...**

- а) зростання деградації I $\kappa$ -B $\alpha$  через АФК-опосередковане зростання його фосфорилування;
- б) об'єднання субодиниць p50 і p65 з утворенням активуючого комплексу.

**13. У регуляції вмісту циклічних нуклеотидів беруть участь:**

- а) пероксид водню;
- б) синглетний кисень;
- в) супероксид-аніон радикал;
- г) гідроксильний радикал;
- д) оксид азоту.

**14. Основну роль у регуляції активності генів відіграє**

- а) пероксид водню;
- б) синглетний кисень;
- в) супероксид-аніон радикал;
- г) гідроксильний радикал;
- д) оксид азоту.

**15. NADPH-оксидаза – єдиний відомий спеціалізований фермент синтезу АФК – забезпечує утворення ...**

- а) пероксиду водню;
- б) синглетного кисню;
- в) супероксид-аніон радикала;
- г) гідроксильного радикала;
- д) оксиду азоту.

**16. У фагоцитах реакційноздатний гіпохлорит утворюється за участю ...**

- а) супероксиддисмутази;
- б) каталази;
- в) мієлопероксидази;
- г) глутатіонпероксидази.

**17. Для власного захисту від АФК нейтрофіли використовують ...**

- а) моноамінооксидазу;
- б) каталазу;
- в) мієлопероксидазу;
- г) глутатіонпероксидазу.

**18. До негативних наслідків дії АФК належать ...**

- а) окиснювальне ушкодження білків і нуклеїнових кислот;
- б) ініціація реакцій пероксидного окислення ліпідів;
- в) участь у реакціях фагоцитозу;
- г) участь у регуляції вмісту циклічних нуклеотидів;
- д) порушення біосинтезу макроергічних сполук;
- е) гемоліз еритроцитів;
- є) індукція розвитку ацидозу.

**19. Роль АФК у функціонуванні імунної системи полягає у ...**

- а) стимуляції фагоцитозу, регуляції запалення;
- б) стимуляції специфічного імунітету (активації Т-лімфоцитів);
- в) стимуляції протипухлинного імунітету;
- г) гальмуванні фагоцитозу.

**20. Мішенню дії АФК, утворених у фагоцитах, є ...**

- а) бактерії;
- б) ушкоджені, старі клітини;
- в) пухлинні клітини;
- г) еритроцити;
- д) лімфоцити.



## ТЕМА 8. ОКСИДАТИВНІ УШКОДЖЕННЯ ОСНОВНИХ БІОМОЛЕКУЛ КЛІТИНИ

**Мета** – сформуванати уявлення про біохімічні механізми та маркери оксидативних ушкоджень основних біомолекул клітини.

### Запитання та завдання для самопідготовки

1. Дайте визначення поняттю «окиснювальний стрес».
2. Назвіть причини виникнення окиснювального стресу.
3. Вкажіть, які біомолекули є мішенню дії АФК.
4. Поясніть відмінності між ферментативним і неферментативним ПОЛ.
5. Які фактори впливають на інтенсивність ПОЛ?
6. Охарактеризуйте стадії ПОЛ.
7. Які продукти утворюються в результаті ПОЛ?
8. Поясніть, у яких випадках спостерігається активація ПОЛ.
9. Вкажіть, які механізми становлять основу порушень бар'єрних функцій клітинних мембран при активації ПОЛ.
10. У чому полягає фізіологічна роль ПОЛ?
11. Охарактеризуйте стадії окиснювальної модифікації білків.
12. Від яких факторів залежить ступінь чутливості різних амінокислот до окиснювального ушкодження?
13. Опишіть внесок різних АФК у процеси окиснювального ушкодження білків.
14. Вкажіть, які амінокислоти чутливі мішені для дії АФК.
15. Наведіть приклади продуктів ОМБ.
16. Сформулюйте наслідки окиснювальної модифікації білків.
17. Вкажіть, які компоненти нуклеотидів можуть бути мішенню дії АФК.
18. Назвіть, які молекулярні продукти утворюються в результаті окиснювального ушкодження пуринів.
19. Вкажіть, які зв'язки у молекулах піримідинів найчутливіші до дії АФК.
20. Які атоми карбону дезоксирибози переважно є мішенню дії АФК?

21. Поясніть, до яких наслідків може призводити окиснювальне ушкодження ДНК.

22. У чому полягає непрямий вплив АФК на ДНК?

23. Наведіть приклади регуляторної ролі АФК.

24. Охарактеризуйте основні типи окиснювального ушкодження мтДНК.

25. Напишіть формули маркерів окиснювального ушкодження ДНК.

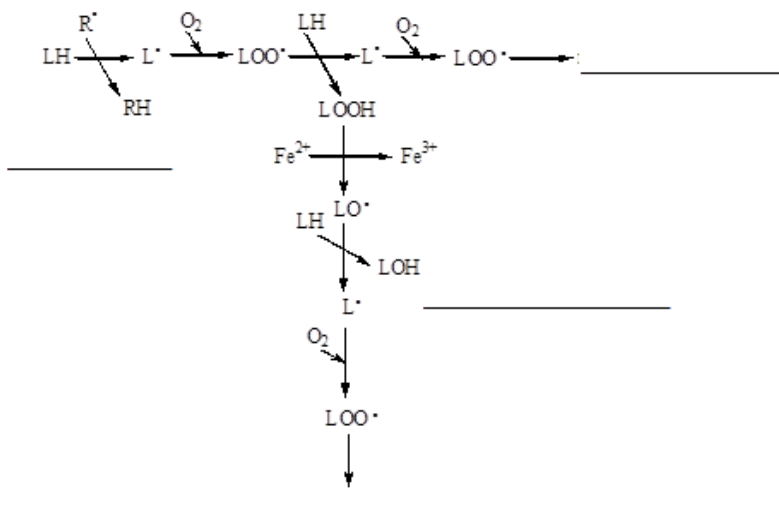
26. Заповніть таблицю:

<b>Стадія ПОЛ</b>	<b>Реакція</b>

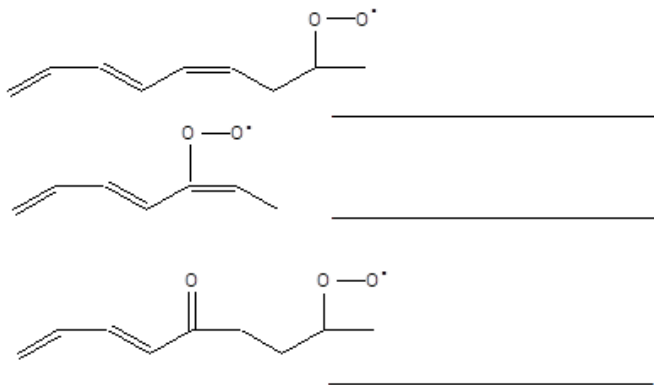
27. Заповніть таблицю:

Продукти ПОЛ	Назва
Первинні	
Вторинні	
Третинні	

28. Позначте на схемі відповідні стадії процесу ПОЛ (ініціювання ланцюга, подовження ланцюга, розгалуження ланцюга, обрив ланцюга).



29. Зазначте, формули яких продуктів ПОЛ зображені на рисунку.



### *Основні базові поняття, якими має оволодіти студент*

**Окиснювальний (оксидативний) стрес** – стан, при якому спостерігається порушення балансу між утворенням і знешкодженням АФК. Окиснювальний стрес виникає у двох випадках:

- унаслідок інтенсифікації генерації АФК у разі активації АФК-продукуючих систем;
- унаслідок зниження здатності клітини до нейтралізації АФК.

У процесі окиснювального стресу відбувається ушкодження ДНК, білків і ліпідів – усіх без винятку клітинних структур. У клітинах ушкоджені макромолекули надалі або підлягають репарації, або елімінуються, проте темпи репарації при окиснювальному стресі значно відстають від накопичення порушень, унаслідок чого у клітині накопичуються ушкоджені молекули.

**Пероксидне окислення ліпідів (ПОЛ)** – складний процес, який відбувається як у тваринних, так і в рослинних клітинах. Під час ПОЛ утворюються ліпідні радикали, вбудовується у ліпіди попередньо активований кисень, реорганізуються

подвійні зв'язки і, як наслідок, відбувається деструкція мембранних ліпідів і власне мембран.

### **Різновиди пероксидного окислення ліпідів:**

1) *неферментативне*, або аскорбат залежне, активоване іонами металів змінної валентності (переважно двовалентним залізом);

2) *ферментативне*, або NADPH-залежне ПОЛ.

Процеси неферментативного ПОЛ локалізовані в усіх біологічних мембранах, а ферментативного – тільки у мембранах ендоплазматичного ретикулума. Крім того, ферментативне і неферментативне ПОЛ виконують у клітині різні функції. Ферментативне ПОЛ необхідне для синтезу простагландинів, тромбоксанів, простациклінів у циклооксигеназному шляху окислення арахідонової кислоти та лейкотрієнів у ліпооксигеназному шляху окислення арахідонової кислоти. Водночас неферментативне вільнорадикальне окислення може бути початковим етапом деградації не тільки біомолекул мембранних структур, але й інших клітинних білків, ліпідів і нуклеїнових кислот. Ініціатором неферментативного ПОЛ переважно виступає гідроксильний радикал.

Усі компоненти клітин можуть ушкоджуватися внаслідок активації пероксидного окислення, але з максимальною швидкістю цей процес відбувається у ліпідному бішарі мембран, особливо в ненасичених і поліненасичених жирних кислотах: як у вільних, так і у складі фосфоліпідів. Основні мішені дії АФК – лінолева, арахідонова та докозагексаєнова жирні кислоти.

### **Стадії реакцій ПОЛ у біологічних мембранах:**

1) утворення активних форм кисню;

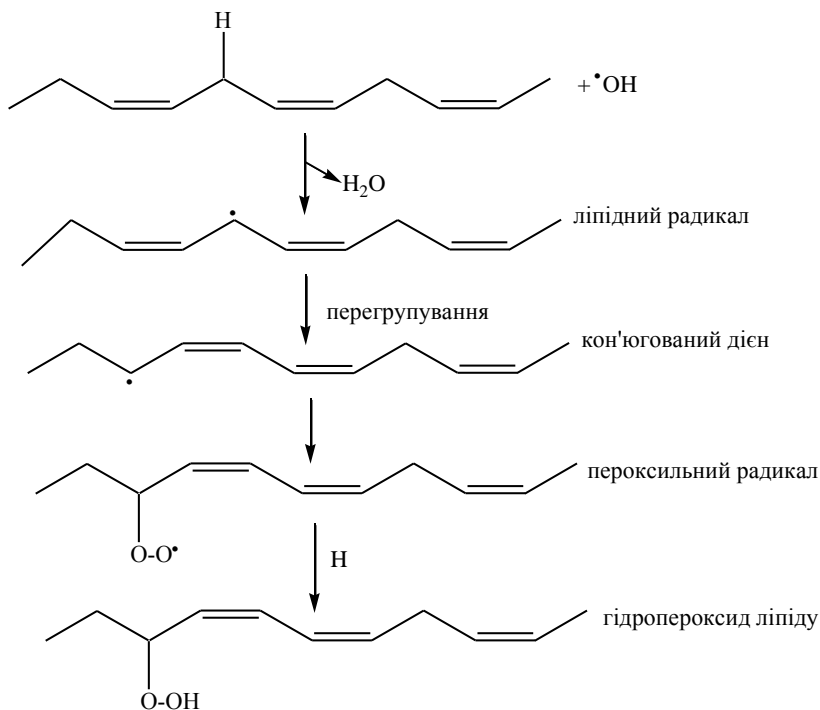
2) ініціювання ланцюга окислення, внаслідок якого залишки ненасичених жирних кислот атакуються вільними радикалами, що призводить до утворення жирнокислотних радикалів;

3) подовження ланцюга реакцій пероксидного окислення, що супроводжується взаємодією жирнокислотних радикалів із молекулярним киснем, унаслідок чого утворюються пероксидні радикали;

4) утворення нових жирнокислотних і пероксидних радикалів унаслідок подальших реакцій між пероксидними радикалами та новими залишками жирних кислот;

5) розпад нестабільних пероксидів жирних кислот і поява нових, коротших сполук, які також вступають у реакції пероксидного окислення;

6) обрив ланцюга реакцій пероксидного окислення ліпідів, утворення кінцевих продуктів ПОЛ.



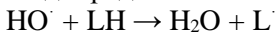
*Механізм вільнорадикальної ланцюгової реакції пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ)*

### **Механізм ПОЛ**

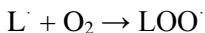
#### *Стадія ініціювання ланцюга*

Радикал гідроксилу, проникаючи в товщу гідрофобного ліпідного шару, вступає в хімічну взаємодію з поліненаси-

ченими жирними кислотами (LH). При цьому в ліпідному шарі мембран утворюються ліпідні радикали:

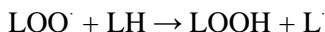


Ліпідний радикал ( $\text{L}^\cdot$ ) вступає в реакцію з молекулярним киснем з утворенням нового вільного радикала – радикала ліпопероксиду ( $\text{LOO}^\cdot$ ):



#### *Подовження ланцюга*

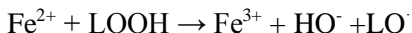
Радикал  $\text{LOO}^\cdot$  атакує одну із сусідніх молекул фосфоліпиду з утворенням гідропероксиду ліпиду  $\text{LOOH}$  і нового радикала  $\text{L}^\cdot$ :



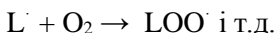
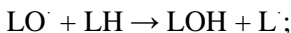
Чергування двох останніх реакцій і є ланцюговою реакцією пероксидного окислення ліпідів.

#### *Розгалуження ланцюга*

Прискорення пероксидації ліпідів спостерігається за наявності невеликої кількості іонів двовалентного заліза. У цьому разі відбувається розгалуження ланцюгів у результаті взаємодії  $\text{Fe}^{2+}$  з гідропероксидами ліпідів:

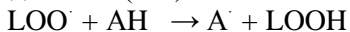


Утворені радикали  $\text{LO}^\cdot$  ініціюють утворення нових ланцюгів окислення ліпідів:



#### *Обрив ланцюга*

Ланцюг обривається в результаті взаємодії вільних радикалів з антиоксидантами (AH):

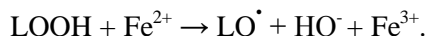


#### **Особливості ПОЛ:**

- реакції ПОЛ мають *ланцюговий характер*, тобто під час реакцій ПОЛ у процес залучаються дедалі нові молекули ненасичених жирних кислот;

- реакції ПОЛ мають *розгалужений характер*, тобто у реакціях ПОЛ у зростаючій кількості з'являються радикали жирних кислот, джерелом яких є власне проміжні продукти ПОЛ. Приклад – утворення вільних радикалів із гідропероксидів

ліпідів при їхній взаємодії з наявними в клітині іонів металів змінної валентності:



**Первинні продукти ПОЛ** – гідропероксиди ліпідів (дієнові кон'югати, кетодієни, спряжені трієни), *вторинні продукти* ПОЛ – ТБК-активні сполуки (МДА), *кінцеві продукти* ПОЛ – шифові основи, які утворюються під час окислювальної сополімеризації ліпідів і білків та здатні до флуорисценції.

**Причини активації ПОЛ** – активація ПОЛ відбувається у 2-х випадках:

1. При надмірному утворенні первинних вільних радикалів, при цьому наявні в клітині антиоксидантні системи не в змозі зупинити реакції пероксидного окислення ліпідів.

За таким механізмом відбувається активація ПОЛ при дії на клітини:

- а) ультрафіолетового й іонізаційного випромінювання;
- б) деяких отрут (чотирихлористий вуглець);
- в) стресу, при якому вільні радикали утворюються як продукти метаболізму катехоламінів;
- г) гіпервітамінозу D, оскільки вільні радикали утворюються при аутоокисленні кальциферолів.

2. При порушенні функціонування антиоксидантних систем клітин. У цьому разі ініціатори ПОЛ – первинні вільні радикали, які утворюються в процесі метаболізму. Нестача антиоксидантів може бути зумовлена:

- а) спадковими і набутими порушеннями їхнього синтезу;
- б) дефіцитом металів (заліза, міді, селену), необхідних для функціонування антиоксидантних ферментів;
- в) гіпо- й авітамінозом вітамінів E і C;
- г) порушенням пентозофосфатного циклу і циклу Кребса, що призводить до зменшення утворення NADPH і NADH, які за нормальних умов забезпечують відновлення антиоксидантів.

#### **Наслідки ПОЛ:**

1) порушується гідрофобність фосфоліпідного бішару внаслідок появи більше гідрофільних гідропероксидів ліпідів, утворених як продукти вільнорадикального окислення;



2) підвищується пасивна проникність фосфоліпідного бішару для іонів завдяки утворенню пероксидних кластерів – полярних каналів проникності;

3) змінюються фізико-хімічні властивості фосфоліпідного бішару: відбувається деліпідизація мембран та зміна їхнього поверхневого заряду, зменшується плинність мембран;

4) продукти ПОЛ включаються до фосфоліпідного бішару мембран, у результаті чого структура мембран змінюється так, що фосфоліпіди стають більше доступними для фосфоліпази, а білки – для протеїназ;

5) окислюються сульфгідрильні групи мембранних білків, що призводить до порушень структури та функцій цих білків, особливо ферментів;

6) утворюються поперечні зшивки з аміногрупами білків завдяки вторинним продуктам ПОЛ (МДА), що призводить до незворотної полімеризації й агрегації білкових молекул;

7) порушуються білок-ліпідні взаємодії, внаслідок чого мембранні білки виходять із мембран.

### **Фізіологічна роль ПОЛ:**

1. Пероксидне окислення ліпідів має важливе значення для оновлення біологічних мембран (унаслідок видалення фосфатидилсерину, фосфатидилетаноламіну, фосфатидилінозитулу, які легко окислюються), ротації їхніх білкових й ліпідних компонентів, регуляції фізико-хімічних властивостей мембран клітин і субклітинних структур.

2. Пероксили ліпідів і низькомолекулярні продукти деградації окислених ліпідів можуть брати участь у сигнальній трансдукції, що визначає можливість виживання клітини або її загибелі при стресових реакціях.

### **Стадії окиснювальної деструкції білків**

1. Ініціація (початок утворення ланцюга) – взаємодія альфа-карбону поліпептидного ланцюга з гідроксильним радикалом з утворенням альфа-карбон-радикала.

2. Подовження ланцюга – взаємодія альфа-карбон-радикала з молекулярним киснем й утворення альфа-карбон-пероксильного радикала. Останній може взаємодіяти з фрагментом нового поліпептидного ланцюга. При цьому утворюється альфа-карбон-гідропероксид білка і новий альфа-

карбон-радикал, який подовжує ланцюг через взаємодію з молекулярним киснем.

3. Розгалуження ланцюга відбувається на стадії відновлення альфа-карбон-гідропероксиду іонами металів зі змінною валентністю (найчастіше  $\text{Fe}^{2+}$ ) або при розпаді альфа-карбон-пероксильного радикала з подальшим утворенням пероксиду водню й основ іміну.

4. Утворення продуктів деградації поліпептидного ланцюга.

**Фактори, які визначають ступінь чутливості амінокислот до окиснювального пошкодження**

- природа діючих АФК,
- амінокислотний склад,
- доступність амінокислотних залишків для радикальних продуктів (структурної організації білка).

1) *залежність від природи АФК.*

Основний радикал, який відповідає за всі амінокислотні модифікації, – *гідроксильний*. Зміна первинної структури, викликана  $\cdot\text{OH}$ , становить основу всіх модифікацій білкових молекул.

*Супероксидний аніон-радикал* і кисень посилюють дію гідроксильного радикала, сприяють трансформації початкових продуктів гідроксильної реакції. Так, радикал  $\cdot\text{OH}$  найчастіше викликає *агрегацію* білків зі збільшенням молекулярної маси, а в комбінації з  $\text{O}_2^{\cdot-}$  або  $\text{O}_2$  – *фрагментацію* з розщепленням на дрібніші поліпептиди. Комбінація  $\cdot\text{OH}$  і  $\text{O}_2^{\cdot-}$  зумовлює зміни первинної, вторинної та третинної структури білків. У першому разі утворюються ковалентно зв'язані білкові агрегати у вигляді високомолекулярних форм – димерів, тримерів і навіть тетрамерів. Під дією АФК відбувається руйнування триптофану й утворення бітирозин-фенолу. Так, утворення 90 % агрегатів білків зумовлене міжмолекулярними бітирозиноутвореннями, і тільки 10 % агрегатів утворюється за рахунок дисульфідних або інших нековалентних зв'язків.

Процес *фрагментації* білка під впливом  $\cdot\text{OH}$  і  $\text{O}_2^{\cdot-}$  пов'язаний із відщепленням  $\text{H}^+$  від карбоксильної групи амінокислот за участю  $\cdot\text{OH}$  і утворенням у подальшому при взаємодії з  $\text{O}_2^{\cdot-}$  або  $\text{O}_2$  пероксидних сполук. Утворені радикали в певних ділянках поліпептидного ланцюга можуть взаємодіяти

з іншими радикалами, беручи участь у генерації нових радикальних продуктів. Фрагментацію білків можуть викликати також радикали ліпідів. Органічні радикали ліпідів, які утворюються під час ПОЛ, здатні взаємодіяти з білками суміжних гідрофобних ділянок, руйнуючи при цьому пептидні зв'язки. Фрагментація білків супроводжується утворенням низькомолекулярних пептидів з відносною молекулярною масою близько 5 кДа. При цьому новоутворені пептидні деривати не виконують жодних функцій і підлягають утилізації.

Унаслідок атаки вільних радикалів у певних ділянках поліпептидного ланцюга можуть виникати нові радикали, які, взаємодіючи з іншими амінокислотними залишками, беруть участь в утворенні нових радикальних продуктів. У такий спосіб утворюються *алкіл-пероксильні*, *алкіл-пероксидні* й *алоксильні* радикали.

*Оксид азоту* і *пероксинітри*т здатні викликати нітрозилування сульфгідрильних груп білків. Крім цього, ці АФА ефективно взаємодіють із залишками тирозину і лізину білків.

*Пероксид водню*, порівняно з іншими АФК, проявляє слабку модифікуючу дію на білки. Найчутливіші до окислення  $H_2O_2$  – SH-групи білків, однак ушкоджувальна дія  $H_2O_2$  на біологічні структури посилюється його здатністю проникати через клітинні та субклітинні мембрани.

2) *залежність від амінокислотного складу білка*. Акцепторними групами, які здатні перехоплювати електрони, взаємодіючи з АФК, і утворювати аніон-радикали, є *дисульфідні*, *сульфгідрильні*, *карбонільні*, *карбоксильні* та *амінні групи*. Серед амінокислот найбільшу реакційну здатність мають *цистеїн* і *цистин*, помірною реакційною здатністю характеризуються *тирозин*, *фенілаланін*, *триптофан*, *гістидин*.

Висока реакційна активність сірковмісних амінокислот зумовлена здатністю до поляризації SH- та SC- груп як місця приєднання електронів. Сірковмісні амінокислотні залишки – мішень для атаки  $\cdot OH$ . При різних стресових впливах спостерігається окиснювальна модифікація SH-груп, яка призводить до збільшення кількості дисульфідних містків і оберігає від окиснення інші функціональні групи та молекули.

Чутлива мішень до дії АФК – транспортні АТФ-ази, котрі містять SH-групи –  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-ази (окислення SH-груп призводить до порушення транспорту іонів кальцію через мембрану) і  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-ази (порушується гомеостаз одновалентних катіонів).

Карбонільні похідні (карбонілдеривати) – загальні продукти окиснювальної модифікації білків.

**Металокаталізоване окиснення білків (МКО)** – це різновид окиснювальної модифікації білків, яке відбувається у тій частині білкової молекули, яка бере участь у зв'язуванні іонів металів змінної валентності ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ). Особливо чутливі до МКО пролін, гістидин, аргінін і лізин. Механізм вибіркової модифікації залишку лізину в металозв'язувальній ділянці білка:

1) на 1 етапі відбувається зв'язування  $\text{Fe}^{2+}$  з ферментом (Е) з утворенням координаційного комплексу, в якому  $\epsilon$ -аміногрупа лізину в металозв'язувальній ділянці – один із лігандів, до яких приєднується  $\text{Fe}^{2+}$ ;

2) при взаємодії пероксиду водню з іонами  $\text{Fe}^{2+}$ , котрі перебувають у комплексі з ферментом, утворюється  $\text{HO}^\bullet$ ,  $\text{HO}^-$  і комплекс фермент- $\text{Fe}^{3+}$  (етап 2). Вивільнений гідроксильний радикал відриває атом водню від атома карбону, розміщеному поряд з  $\epsilon$ -аміногрупою лізину, при цьому утворюється вода і радикал ферменту ( $\text{E}^\bullet$ ) (етап 3);

3) радикал ферменту реагує своїм неспареним електроном з  $\text{Fe}^{3+}$  і відновлює його до  $\text{Fe}^{2+}$ -комплексу і води, при цьому аміногрупа перетворюється на імінопохідне (етап 4);

4) імінопохідне підлягає спонтанному гідролізу, внаслідок чого вивільняється аміак,  $\text{Fe}^{2+}$  і похідне ферменту, який містить альдегідну групу (карбонільне похідне) (етап 5). Такий окисномодифікований білок надалі підлягає протеолітичному розщепленню.

**Незворотне окиснення білків** – утворення білкових карбонілів та нітритозинів.

*Білкові карбоніли (карбонільні похідні білків)* можуть утворюватися з кількох амінокислотних залишків, насамперед аргініну, гістидину, лізину, проліну, треоніну і цистеїну. Цей вид модифікації широко використовується як біомаркер для

оцінки ступеня окиснювального ушкодження білка й окисдативного стресу при старінні та різних захворювань. Оскільки ця модифікація відбувається з багатьма амінокислотними залишками у визначених білках-мішенях, частота цієї модифікації значно вища, ніж інших видів модифікацій, що стосується в основному специфічних амінокислотних залишків.

*Білкові нітротирозини* утворюються при взаємодії активних форм азоту та білкових залишків тирозину. Це високоселективний процес, оскільки не всі білки та не всі залишки тирозину можуть бути мішенню нітрування.

**Зворотне окиснення цистеїну у складі білків** – при нейтральних значеннях рН у фізіологічних умовах величина рК<sub>a</sub> вільних цистеїнових залишків перебуває у межах 8,5, що унеможлиблює окиснювальну модифікацію цього залишку. Для підвищення сприйнятливості цистеїнового залишку до окиснення величина рК повинна бути нижча від фізіологічних значень рН (рН 7,4), при яких SH-група цистеїну стає тіольована (тіолатний аніон). Такі тіольовані залишки цистеїну набувають редокс-активності. Через це окислення редокс-активних залишків цистеїну надзвичайно селективний процес.

Окислення цистеїну розпочинається з утворення сульфенової кислоти, з якої в подальшому утворюються різноманітні продукти окиснення. Серед окиснювальних модифікацій цистеїну розрізняють: формування дисульфідів (-S-S-), S-глутатіонілювання (білок-SSG), S-нітрозилювання (R-SNO), S-сульфенування (утворення сульфенової кислоти – R-SOH). Усі із зазначених модифікацій залучені у редокс-регуляцію функцій білка за дії АФК та АФА. Всі ці модифікації відіграють позитивну роль у нормі та при патологіях, оскільки захищають білки-мішені від подальшого окиснення, що однозначно призвело б до ушкодження білка.

*S-сульфенування.* Продукт сульфургідроксилування (білок-SOH) високоредоксактивний і відіграє ключову роль у редокс-регуляції функцій багатьох білків. Його утворення в основному індукується такими АФК, як H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> й алкільні гідропероксида, а також пероксинітрит. Сульфенування відіграє критичну роль у функціонуванні білків. Позитивна роль -SOH у білках показана

в дослідженнях протекторної ролі S-сульфенування редуктази альдоз при ішемічних ушкодженнях серця (сульфенування залишку цистеїну-298). В інших дослідженнях сульфенування білків розглядається як необхідний фактор проліферації та росту Т-лімфоцитів, оскільки блокування цього процесу унеможлиблює їхнє дозрівання. Ще один приклад позитивної ролі утворення SOH у білках – сульфенування нітритгідратази за залишком цистеїну-114, що необхідно для прояву каталітичної активності цього ферменту.

*S-нітрозилювання.* Білкове S-нітрозилювання індукується оксидом азоту та пероксинітридом. Ця модифікація розглядається як функціонально-еквівалентна фосфорилуванню/дефосфорилуванню білків. Крім того, що ця модифікація відбувається із залишками цистеїну (на відміну від фосфорилування, яке стосується залишків тирозину, серину та треоніну), S-нітрозилювання відмінне від фосфорилування ще й тим, що не супроводжується активацією каскадних ферментативних реакцій. У будь-якому разі S-нітрозилювання – ключова модифікація залишків цистеїну при різноманітних фізіологічних і патофізіологічних станах.

*Білкове S-глутатіонування.* Глутатіон, крім виконання антиоксидатних функцій, може модифікувати білки через утворення змішаних дисульфідів (білок-SSG), що призводить до функціональних змін білків-мішеней. Ця зворотна модифікація залишків цистеїну в білках залучена до оксидативної передачі сигналу, контролю генної експресії, клітинної проліферації, апоптозу та клітинної відповіді, яка проявляється у захисті ключових регуляторних молекул від оксидативного ушкодження. Подібно до S-сульфенування та S-нітрозилювання, білкове S-глутатіонування часто пов'язане з негативними ефектами функціонування білків-мішеней, але також може захищати білки-мішені від незворотних і постійних ушкоджень.

Нині увага дослідників привернена до глутатіонування як можливого механізму редокс-регуляції функцій білків у відповідь на оксидативний стрес за фізіологічних і патофізіологічних умов. Наприклад, глутатіонування актину регулює його динаміку у поліморфноядерних нейтрофілах.

Використання глутатіонування щодо білків термогенінів розглядається як стратегія протиракової боротьби, а глутатіонування ядерної транслокази аденіну запобігає підвищенню проникності мітохондріальної мембрани й апоптозу.

*Білкові дисульфідиди.* Природне утворення дисульфідів зазвичай залучене у правильний білковий фолдинг і каталізується дисульфідізомеразою в ендоплазматичному ретикулумі та міжмембранному просторі мітохондрій. Водночас дисульфідні зв'язки можуть утворюватися між залишками цистеїну при оксидативному стресі за дії АФК і АФА та відіграють позитивну роль у системі клітинного захисту від різноманітних стресових чинників. Наприклад, внутрішньомолекулярне утворення дисульфідів у деяких циклінзалежних кіназах за дії пероксиду водню здатне регулювати стабільність білка, а у креатинкіназі мозку утворення дисульфїду між залишками цистеїну 74 та 254 відіграє роль клітинного захисного механізму. Так, утворення дисульфідного зв'язку у білку Кеар 1 у відповідь на зростання концентрації оксидантів, необхідне для активації фактору NF-E2, який підвищує експресію ферментів II фази детоксикації за різних фізіологічних і патофізіологічних станів.

### **Наслідки ОМБ:**

1. Утворення uszkodжених, каталітично неактивних або малоактивних ферментів і функціонально неповноцінних білків. Гальмування активності ферментів за дії АФК пов'язане з локальними порушеннями структури в ділянці активного центру за рахунок окиснювальної модифікації амінокислот. У деяких випадках відбувається порушення структури гемопротейнів через втрату або руйнування гема.

2. Різке зростання чутливості білків до протеолітичної деградації. Внутрішньоклітинний рівень окисномодифікованих білків відображає баланс між темпом оксидації та темпом деградації окислених білків. Їх накопичення – комплексна функція численних факторів, які регулюють синтез і оксидацію протеїнів, з одного боку, і активність різних протеїназ, які селективно деградують окисдовані форми, – з іншого. Показано, що конформаційні зміни у структурі молекул білків,

які відбуваються при їх взаємодії з АФК, збільшують доступність пептидних зв'язків для дії протеїназ. АФК можуть впливати на процеси внутрішньоклітинної деградації білків не лише через модифікацію структури молекул білків, але й зміну рівноваги між протеазами та їх інгібіторами. Наприклад, при взаємодії з вільними радикалами інактивуються інгібітори протеаз  $\alpha_1$ -антитрипсин та  $\alpha_2$ -макроглобулін.

**Окиснювальна модифікація нуклеїнових кислот** – процес оксидативного ушкодження нуклеїнових кислот. Ідентифіковано близько 100 варіантів ушкодження ДНК вільними радикалами та модифікацій пентоз і азотистих основ. При цьому мітохондріальна ДНК пошкоджується у  $10^4$  разів частіше, ніж ядерна. Це, очевидно, зумовлено тим, що більша частина АФК у клітині утворюється у мітохондріях. Аналіз окиснювальних модифікацій ДНК за дії АФК показав, що, крім розриву фосфодиефірних зв'язків, з'являються десятки продуктів. Наслідок окиснювальної модифікації ДНК – ушкодження азотистих основ, ушкодження дезоксирибози або поява нових ковалентних зв'язків («зшивок»).

Основна причина окиснення як вільних нуклеотидів, так і у складі високомолекулярних біополімерів – це дія вільних радикалів на ці сполуки. При цьому окиснення може відбуватися як у вуглеводному, так і в азотистому фрагменті нуклеотиду.

**Окиснювальне ушкодження азотистих основ** – у пуринах до дії АФК чутливі зв'язки  $C_8-N_7$ , у піримідинах  $C_6=C_5$ . Чутливість азотистих основ ДНК залежить від оточення. Так, в експериментальних умовах встановлено, що у розчині найбільшу чутливість до окиснювального стресу має dCMP, але у складі ДНК найчутливішим виявляється TMP.

Дія АФК на *пурини* досить часто призводить до розриву імідазольного кільця з утворенням формагід-піримідинових залишків. Перетворення цих первинних макрорадикалів зводиться до утворення  $C_8$ -оксопохідних і до розщеплення зв'язків  $C_8=N_9$  в імідазольному кільці пуринів. Науковий інтерес привертають так звані аддукти азотистих основ з  $\cdot OH$ -гідроксилом – група сполук, які мають окисно-відновну амбівалентність і здатні вступати у складні реакції. Наприклад,



у випадку аденіну формується щонайменше два типи аддуктів – C<sub>4</sub>-ОН та C<sub>8</sub>-ОН. Відомі також пуринові C<sub>5</sub>-ОН аддукти.

Основними продуктами окиснювальної модифікації пуринів є 8-оксогуанін (8oxoG) та його таутомерна форма – 8-гідроксигуанін. Утворення 8oxoG відбувається постійно та зростає при різноманітних ушкоджувальних впливах і розглядається як *маркер окиснювального стресу*. Окрім того, за дії кисневих радикалів може відбуватися дезамінування гуаніну й аденіну, що супроводжується появою у складі ДНК відповідно ксантину і гіпоксантину з вираженою мутагенною дією. За дії АФК на *піримідини* спостерігається їх фрагментація та утворення похідних піримідинів – сполук із насиченими зв'язками C<sub>6</sub>-C<sub>5</sub>.

*Тимін* унаслідок взаємодії з вільними радикалами здатний утворювати різні радикальні сполуки, причому 95 % всього пулу окисненого тиміну припадає на тиміновий гліколь. Утворення тимінгліколю блокує реплікацію і потенційно летальний для клітини.

*Цитозин* через взаємодію з вільними радикалами утворює чимало модифікованих основ, проте переважно виникають гідроксильовані форми цитозину. Деякі модифіковані основи самі стають вільними радикалами та призводять до ланцюгових реакцій.

**Ушкодження дезоксирибози** – окиснювальному ушкодженню дезоксирибоза найчастіше підлягає у положенні C<sub>1</sub>'<sup>1</sup>, що веде до апуринізації – утворення ділянки молекули нуклеїнової кислоти без азотистої основи (AP-ділянки), і C<sub>4</sub>'<sup>1</sup>, яка викликає фрагментацію дезоксирибози. Такі модифікації насамперед здатний викликати гідроксильний радикал.

На початкових етапах взаємодії з вільними радикалами утворюються радикали вуглеводних фрагментів нуклеотидів. Ця реакція може відбутися з будь-яким із п'яти атомів карбону рибози чи дезоксирибози. У подальшому утворений вуглеводний радикал викликає розрив фосфодієфірних зв'язків при C<sub>3</sub> та C<sub>5</sub>, а також відщеплення азотистої основи.

**Поперечні шивки** – ковалентні зв'язки між ДНК і білками (наприклад, між метильною групою тиміну і киснем тирозину, між сусідніми піримідиновими та пуриновими

залишками). Найчастіше трапляються тимін-тирозинові та тимін-лізинові взаємодії. Тимін також може взаємодіяти з гліцином, аланіном, валіном, лейцином, ізолейцином і треоніном. З тирозином інколи взаємодіє цитозин.

### **Наслідки окиснювального ушкодження ДНК:**

- Тимінові гліколі та формамід-піримідини блокують реплікацію, вони цитотоксичні, але їх мутаційний потенціал обмежений.

- 8oxoG викликає мутації, оскільки, якщо він наявний у матриці, то ДНК-полімерази комплементарно приєднують до нього dAMP і відбувається трансверсія GC→TA.

- АФК можуть безпосередньо викликати однострункові розриви в ДНК, руйнуючи фосфодіестерні зв'язки. Якщо в обох ланцюгах ДНК AP-ділянки розміщуються навпроти одна одної або фрагментація дезоксирибози відбулася поряд, то утворюються двострункові розриви ДНК.

- Окиснювальні ушкодження ДНК можуть блокувати реплікацію і транскрипцію, викликати заміну нуклеотидів.

Ці ушкодження відбуваються щосекундно, і їх кількість значно підвищується при різноманітних впливах. За приблизними підрахунками кількість окиснювальних ушкоджень ДНК для однієї клітини за день становить 100000 у щурів і 10000 – у людини.

Усі типи окиснювальних ушкоджень нуклеотидів, якщо вони відбуваються у складі ДНК, підлягають вилученню за дії специфічних ферментів ендонуклеаз. Однак сам процес репарації не завжди безпомилковий, що може стати причиною виникнення мутацій. Крім того, навпроти модифікованої основи може включитися некомплементарний нуклеотид.

**Непрямий вплив АФК на ДНК.** Відомо, що за дії на клітини АФК виникають розриви у ДНК. Проте розриви молекули ДНК викликаються й непрямую дією АФК. Наприклад, АФК здатні призводити до порушень іонного гомеостазу, спричинити вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  із мітохондрій, що зумовлює активацію нуклеаз. Доведено, що внутрішньоклітинне зв'язування іонів  $\text{Ca}^{2+}$  проникаючим хелатором запобігає виникненню розривів у ДНК і

цитотоксичному ефекту при додаванні до клітин пероксиду водню.

**Ушкодження мітохондріальної ДНК (мтДНК).** Мішенню для дії АФК є мтДНК, яка вважається вразливішою, ніж ядерна ДНК, оскільки не захищена гістонами, не містить некодуючих ділянок і перебуває в безпосередній близькості до місця утворення АФК. Супероксидний і гідроксильний радикали викликають появу в мітохондріях окиснених форм пуринових і піримідинових основ ДНК. Найпоширеніші 8-оксо-7,8-дигідроеоксигуанін (8-ОН-dG), який ініціює в мтДНК переважно трансверсії  $G \rightarrow T$ . Інший можливий продукт окиснювальних реакцій ДНК у мітохондріях – 5-гідроксицитозин (5-ОН-dC), який ініціює транзиції  $G \rightarrow A$ . В результаті спонтанної втрати основ або за дії окиснювального стресу, неензиматичних (гідроліз метильованих основ) або ензиматичних (за дії ДНК-глікозилаз) процесів, які призводять до ушкодження мтДНК, можуть з'являтися апуринові/апіримідинові сайти.

«Гарячими» точками в мтДНК є ділянки, котрі кодуєть субодиниці комплексу I та некодуюча ділянка D-петлі. У ділянці D-петлі найчастіше мутації виникають між нуклеотидами 100 і 600, у нуклеотиді 263 – перехід  $G \rightarrow A$ , у нуклеотиді 489 – перехід  $T \rightarrow C$ , між нуклеотидами 311 і 312 – вставка C.

При окиснювальній модифікації мтДНК частково фрагментується, деякі із фрагментів можуть вийти з мітохондрій і модифікувати ядерний геном. Імовірність рекомбінації між ядерними та мітохондріальними генами особливо зростає на початкових етапах канцерогенезу. Включення фрагменту мтДНК у ділянку розміщення протоонкогену може активувати його транскрипцію.

## Тестові завдання для самоконтролю

### 1. Окиснювальний стрес виникає у разі ...

- а) інтенсифікації генерації АФК;
- б) зниження здатності клітини до нейтралізації АФК;
- в) підвищення активності антиоксидантних ферментів.

### 2. Чим зумовлена нестача антиоксидантів ?

- а) спадковими і набутими порушеннями їхнього синтезу;
- б) дефіцитом металів, необхідних для функціонування антиоксидантних ферментів;
- в) гіпо- й авітамінозом вітамінів Е і С;
- г) стресом;
- д) порушенням пентозофосфатного циклу і циклу Кребса.

### 3. Окисномодифіковані макромолекули ...

- а) підлягають репарації;
- б) продовжують виконувати специфічні функції;
- в) елімінуються;
- г) усі відповіді правильні.

### 4. Установіть відповідність (запишіть пару буква:цифра) ...

- |                           |                       |
|---------------------------|-----------------------|
| 1) Первинні продукти ПОЛ; | а) МДА;               |
| 2) Вторинні продукти ПОЛ; | б) кетодієни;         |
| 3) Третинні продукти ПОЛ. | в) дієнові кон'югати; |
|                           | г) шифові основи;     |
|                           | д) спряжені трієни.   |

### 5. Виберіть правильні твердження, які стосуються ПОЛ ...

- а) реакції ПОЛ мають ланцюговий характер;
- б) кінцевим продуктом ПОЛ є МДА;
- в) реакції ПОЛ мають розгалужений характер;
- г) реакції ПОЛ мають лінійний характер;
- д) активація ПОЛ спостерігається при гіпервітамінозі D;
- е) у перебігу ПОЛ не беруть участь метали змінної валентності.

### 6. Процеси неферментативного ПОЛ відбуваються в ...

- а) усіх біологічних мембранах;
- б) тільки в мембранах ендоплазматичного ретикулума;
- в) тільки в мембранах мітохондрій.

**7. Ініціатором неферментативного ПОЛ переважно виступає**

- а) супероксид;
- б) пероксид водню;
- в) гідроксильний радикал;
- г) пероксинітрит;
- д) синглетний кисень.

**8. Що є мішенню дії АФК у ліпідах?**

- а) спирти;
- б) ненасичені жирні кислоти;
- в) насичені жирні кислоти.

**9. Розташуйте по порядку стадії ПОЛ ...**

- а) подовження ланцюга;
- б) розгалуження ланцюга;
- в) ініціювання ланцюга;
- г) обрив ланцюга.

**10. Розгалуження ланцюгів ПОЛ відбувається за наявності**

...

- а) супероксиду;
- б) молекулярного кисню;
- в) іонів металів змінної валентності.

**11. ТБК-активні сполуки належать до ...**

- а) первинних продуктів ПОЛ;
- б) вторинних продуктів ПОЛ;
- в) третинних продуктів ПОЛ.

**12. До наслідків ПОЛ належить:**

- а) порушення гідрофобності фосфоліпідного бішару;
- б) активація протеолітичних ферментів;
- в) порушення матричних реакцій;
- г) підвищення пасивної проникності фосфоліпідного бішару для іонів;
- д) зміни фізико-хімічних властивостей фосфоліпідного бішару;
- е) утворення поперечних зшивок між аміногрупами мембранних білків і вторинними продуктами ПОЛ;
- є) порушення білок-ліпідних взаємодій.

**13. Який основний радикал відповідає за амінокислотні модифікації?**

- а) супероксид;
- б) пероксид водню;
- в) гідроксильний радикал;
- г) пероксинітрит;
- д) синглетний кисень.

**14. Гідроксильний радикал викликає ...**

- а) агрегацію білків зі збільшенням молекулярної маси;
- б) фрагментацію білків із розщепленням на дрібніші фрагменти.

**15. АФА здатні викликати окиснювальні ушкодження ...**

- а) фенілаланіну;
- б) тирозину;
- в) аргініну;
- г) лізину.

**16. Найчутливіші до окиснення пероксидом водню ...**

- а)  $\text{NH}_2$ -групи білків;
- б)  $\text{SH}$ -групи білків;
- в)  $\text{OH}$ -групи білків;
- г)  $\text{COOH}$ -групи білків.

**17. Найвищу чутливість до металокаталізованого окиснення мають ...**

- а) триптофан;
- б) пролін;
- в) валін;
- г) гістидин;
- д) аргінін;
- е) лізин.

**18. Загальними продуктами ОМБ є ...**

- а) гідроксильні похідні;
- б) карбонільні похідні;
- в) сульфопохідні;
- г) кінуренін.

**19. Найчутливіші до окиснювального ушкодження групи**

...

- а) дисульфідні;
- б) сульфгідрильні;
- в) карбонільні;
- г) карбоксильні;
- д) амінні;
- е) всі відповіді правильні.

**20. Ступінь чутливості до окиснювальних перетворень у різних амінокислот залежить від ...**

- а) характеру діючих АФК;
- б) концентрації АФК;
- в) амінокислотного складу білка;
- г) доступності амінокислотних залишків для радикальних продуктів.

**21. Фрагментація білків у результаті ОМБ супроводжується утворенням низькомолекулярних пептидів з молекулярною масою близько ...**

- а) 12 кДа;
- б) 5 кДа;
- в) 8 – 10 кДа.

**22. Продуктами окиснювальної модифікації фенілалініну та тирозину є ...**

- а) кінуренін;
- б) гідроксильні похідні;
- в) дисульфідні похідні;
- г) сульфопохідні.

**23. Окислення амінокислот до карбонільних похідних призводить до ...**

- а) зниження ізоелектричної точки білка;
- б) підвищення ізоелектричної точки білків.

**24. Прикладами незворотного окиснення білків є ...**

- а) утворення білкових карбонілів;
- б) S-сульфенування;
- в) S-нітрозилювання;
- г) S-глутатіонування;

д) утворення білкових дисульфідів.

**25. До наслідків ОМБ належать ...**

а) утворення каталітично неактивних або малоактивних ферментів;

б) утворення функціонально неповноцінних білків;

в) зростання чутливості білків до протеолітичної деградації;

г) зниження чутливості білків до протеолітичної деградації.

**26. Маркерами окиснювального ушкодження нуклеїнових кислот слугують ...**

а) тиміновий гліколь;

б) 8-оксо-7,8-дигідроксигуанін;

в) кількість одностичастих розривів;

г) кількість двонитчастих розривів.

**27. У пуринових азотистих основах найчутливіші до дії АФК зв'язки ...**

а) N<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;

б) C<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>;

в) C<sub>4</sub>-C<sub>5</sub>;

г) C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>;

д) C<sub>8</sub>-N<sub>9</sub>.

**28. У піримідинових азотистих основах найчутливіші до дії АФК зв'язки ...**

а) N<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>;

б) N<sub>3</sub>-C<sub>2</sub>;

в) C<sub>4</sub>-C<sub>5</sub>;

г) C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>.

**29. Основний продукт окиснювального ушкодження тиміну – це ...**

а) тимідин; б) дигідротимідин; в) тиміновий гліколь.

**30. За умов окиснювального ушкодження ДНК активується ...**

а) ДНК-залежна-ДНК-полімераза;

б) ДНК-залежна-ДНК-полімераза;

в) полі(ADP-рибоза)-полімераза.



**31. Найвразливіша до дії АФК ...**

- а) ядерна ДНК;
- б) мітохондріальна ДНК;
- в) вразливі однаково.

**32. Модифікації дезоксирибози найчастіше викликає ...**

- а) супероксид; б) пероксид водню;
- в) гідроксильний радикал;
- г) синглетний кисень.

## ТЕМА 9. ФЕРМЕНТАТИВНІ КОМПОНЕНТИ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ

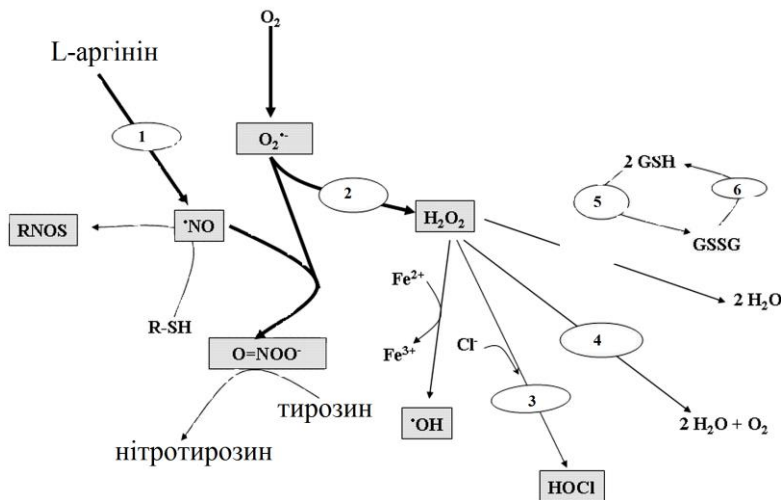
**Мета** – сформуванати уявлення про будову та закономірності функціонування ферментів антиоксидантного захисту.

### **Запитання та завдання для самопідготовки:**

1. Розкрийте поняття «окиснювальний стрес».
2. Поясніть, що таке буферна антиоксидантна система.
3. Охарактеризуйте способи реалізації антиоксидантного захисту організму.
4. Назвіть фактори, від яких залежить інтенсивність АОС.
5. Охарактеризуйте основні механізми антиоксидантного захисту.
6. Опишіть будову та функції супероксидисмутази.
7. Напишіть реакцію, яку каталізує СОД.
8. У чому полягає біологічна роль та особливості будови каталази?
9. Від яких аліментарних факторів залежить активність каталази?
10. Розкрийте особливості будови та механізму дії глутатіонпероксидази.
11. Скільки розрізняють ізоформ глутатіонпероксидази та чим вони відрізняються?
12. Які сполуки є субстратом для глутатіонпероксидази?
13. Укажіть відсотковий вміст глутатіонпероксидази-1 (класичної) у цитозолі клітини і мітохондріях.
14. Поясніть роль селену у функціонуванні глутатіонпероксидази.
15. Що означає поняття «відновлювальний цикл глутатіону»?
16. Охарактеризуйте особливості будови та функціонування глутатіонтрансферази.
17. Напишіть реакцію, яку каталізує каталаза.
18. Яку реакцію каталізує глутатіонпероксидаза?
19. Напишіть реакцію, яку каталізує глутатіонредуктаза.
20. Заповніть таблицю:

Фермент антиоксидантного захисту	Каталізована реакція	Особливості будови
Супероксиддисмутаза		
Каталаза		
Глутатіонпероксидаза		
Глутатіонредуктаза		

21. Назвіть, які ферменти каталізують реакції, вказані на рисунку цифрами 1 – 6.



- 1 – \_\_\_\_\_
- 2 – \_\_\_\_\_
- 3 – \_\_\_\_\_
- 4 – \_\_\_\_\_
- 5 – \_\_\_\_\_
- 6 – \_\_\_\_\_

### ***Основні базові поняття, якими має оволодіти студент***

**Буферна антиоксидантна система** – сукупність усіх антиоксидантів у клітині.

**Антиоксидантний статус організму** – співвідношення прооксидантних і антиоксидантних систем.

**Окиснювальний (оксидативний) стрес** – стан, який супроводжується інтенсифікацією окиснювальних процесів у клітині за участю активних форм кисню. При оксидативному стресі спостерігається зміна рівноваги між анти- і прооксидантною системами в бік виснаження антиоксидантного захисту і порушення його збалансованості.

На початкових стадіях окиснювального стресу рівень вільнорадикальних продуктів незначно підвищується, що зумовлює стимуляцію природної сигнальної трансдукції у тканинах. Це супроводжується, насамперед, активацією багатьох факторів транскрипції та відповідних генів, які кодують ферменти-антиоксиданти, зокрема супероксиддисмутазу. Водночас спостерігається активація ПОЛ. Ступінь руйнівної дії АФК на тканини залежить від потенційних можливостей організму мобілізувати антиоксидантний захист.

#### **Способи реалізації антиоксидантного захисту організму:**

1) через зниження рівня генерованих АФК за рахунок обриву ланцюгів вільнорадикальних реакцій, що забезпечується дією специфічної ферментативної та неферментативної ланки антиоксидантного захисту (АОЗ);

2) через вилучення пулу металів зі змінною валентністю (насамперед заліза і міді) за рахунок зв'язування їх із білками (у складі трансферину, лактоферину, церулоплазміну), а також з низькомолекулярними сполуками, наприклад сечовиною, яка запобігає можливості їхньої участі у вільнорадикальних реакціях;

3) через репарацію ушкоджень.

### **Фактори, які впливають на стан АОС:**

1. *Вік.* При старінні відбувається зменшення вмісту окремих антиоксидантів і сумарної антиоксидантної активності. Найбільша активність АОС спостерігається під час поділу клітин, росту тканин і організму.

2. *Генетичні фактори.* Активність АОС залежить від здатності організму синтезувати її складові компоненти.

3. *Сезонні фактори.* Це пов'язано з сезонною забезпеченістю організму речовинами, необхідними для функціонування антиоксидантної системи, а також надходженням із продуктами харчування екзогенних антиоксидантів.

### **Механізми антиоксидантного захисту:**

1. Антиоксидант набуває властивостей окислювача – радикала або електроннозбудженої молекули. Антиоксидантний ефект досягається тоді, коли реактивність відновника така низька, що він не може в наступній реакції виступити як окислювач і продовжити ланцюг вільнорадикальних реакцій.

2. Антирадикальний ефект – молекула антиоксиданту реагує з радикалом, «забирає» у нього неспарений електрон, а сам антиоксидант стає малоактивним радикалом.

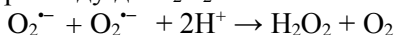
3. Антипероксидний ефект полягає в руйнуванні за дії антиоксидантів органічних пероксидів зі зниженням їхнього окисного потенціалу.

4. Гасіння – розрядка збуджених електронних станів за впливу антиоксидантів.

5. Дисмутазний ефект – у реакції дисмутації радикали перетворюються на нейтральні молекули.

6. Хелатування іонів металів зі змінною валентністю – зв'язування іонів металів та обмеження їхньої активності.

**Супероксиддисмутаза** (SOD; супероксид:супероксид-оксидоредуктаза, КФ 1.15.1.1.) – один із найважливіших ферментів антиоксидантного захисту, який забезпечує перетворення супероксиду до  $H_2O_2$ :



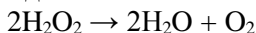
За умов окиснювального стресу клітина швидко реагує підвищенням активності SOD. SOD розглядається навіть як

стрес-білок, котрий синтезується у відповідь на окиснювальний стрес.

Розрізняють три різні форми SOD, які експресуються на високому рівні в еритроцитах і цитозолі (SOD1), мітохондріях (SOD2) та позаклітинна (SOD3). Цитозольна (SOD1) та позаклітинна (SOD3) потребують для прояву ферментативної активності іони  $\text{Cu}^+/\text{Zn}^{2+}$ , тоді як мітохондріальна SOD2 є  $\text{Mn}^{2+}$ -металопротеїном. SOD2 кодується мітохондріальною ДНК, натомість інші ізоформи – ядерною ДНК. У бактерій виявляється також Fe-залежна SOD.

Найпоширеніша ізоформа SOD – Cu, Zn-залежна SOD, це єдина комерційно доступна форма ферменту, яку отримують або з еритроцитів, або із печінки бика. Cu,Zn-SOD – це гомодимер, молекулярна маса 32,5 кДа. Мідь і цинк з'єднані з білковою частиною ферменту через залишки гістидину. При цьому мідь входить до активного центру ферменту, а цинк забезпечує стабілізацію конформації ферменту. Найвищу активність має Cu,Zn-SOD, виділена із печінки.

**Каталаза** ( $\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}_2$ -оксидоредуктаза, КФ 1.11.1.6.) каталізує реакцію знешкодження пероксиду водню, розщеплюючи його до води та кисню:

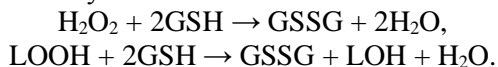


За структурою каталаза – тетрамер, кожна субодиниця якого складається близько з 500 амінокислот. Молекулярна маса становить 250 кДа. У своєму активному центрі каталаза містить гем. У клітинах каталаза в основному зосереджена в пероксисомах, в яких одночасно містяться ферменти, які продукують пероксид водню, що необхідно для багатьох процесів життєдіяльності організму, зокрема в системах неспецифічної імунної відповіді. У пероксисомах гепатоцитів частка каталази становить 40 % усіх білків.

Каталаза наявна в різних тканинах організму людини і тварин. Максимальна її кількість виявлена в печінці, еритроцитах і нирках. Каталаза тривалий час зберігає свою активність, швидкість реакції лімітується швидкістю дифузії субстрату до активного центру. Каталаза здатна розщепити 44 000 молекул  $\text{H}_2\text{O}_2$  за 1 секунду.

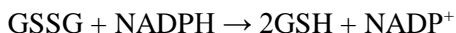
До аліментарних факторів, які призводять до зниження каталазної активності, належить нестача вітамінів, зокрема фолієвої й пантотенової кислот, рибофлавіну, біотину, ретиноїдів. Також зниження активності каталази спостерігається при надлишку метіоніну, тирозину, міді, цинку.

**Глутатіонпероксидаза** (глутатіон:  $\text{H}_2\text{O}_2$ -оксидоредуктаза, КФ 1.11.1.9.) каталізує реакцію відновлення пероксиду водню і ліпідних гідропероксидів за участю глутатіону до нейтральних і малотоксичних сполук:



Під час цих реакцій глутатіон відновлює пероксид водню і органічні радикали до води та гідроксипохідних і переходить у окиснену форму.

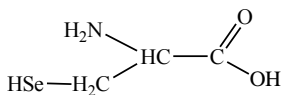
Окиснений глутатіон знову відновлюється за участю глутатіонредуктази:



Глутатіонпероксидаза складається із 4 субодиниць, кожна із яких містить атом селену. В клітинах цей фермент наявний у цитозолі та матриксі мітохондрій (у цитозолі – 70 %, у мітохондріях – 20 – 30 %). Активність глутатіонпероксидази залежить від вмісту глутатіону.

*Механізм дії глутатіонпероксидази:* в активному центрі ферменту є залишок амінокислоти селеноцистеїну. Атом селену має ступінь окислення -1 і окислюється пероксидом до  $\text{SeOH}$ . Потім  $\text{SeOH}$  з'єднується з молекулою відновленого глутатіону, утворюючи  $\text{Se-SG}$  і далі з'єднується з другою молекулою глутатіону. При цьому регенерується  $\text{Se}^-$  й утворюється окислений глутатіон.

**Роль селену у функціонуванні глутатіонпероксидази** – для ефективної роботи глутатіонпероксидази необхідний селен, який входить до складу активного центра ферменту (у вигляді селеноцистеїну).

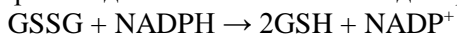


*Селеноцистеїн*

Дефіцит селену порушує роботу глутатіонпероксидази. Джерелом селену для людей є злаки, які накопичують селен із

грунту (проте ґрунти України збіднені на селен). Добова потреба селену становить приблизно 70 мкг для чоловіків й 50 мкг для жінок. У крові частина селену зв'язується з білками, концентрація його в тканинах органів значно зростає. Із організму селен в основному виділяється екскрецією із сечею. Дефіцит селену знижує активність глутатіонпероксидази у всіх клітинах і плазмі крові, проте ступінь зниження зменшується у ряду: печінка, сітківка і кришталик → серце → легені → сім'яники → нирки і головний мозок.

**Глутатіонредуктаза** (NADPH: окислений глутатіонредуктаза, КФ 1.6.4.2) забезпечує підтримання в організмі певного рівня відновленого глутатіону через відновлення його дисульфідної форми за допомогою NADPH як донора водню:



Необхідний для цієї реакції NADPH генерується переважно у реакціях глюкозомонофосфатного шунта за участю D-глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (D-глюкозо-6-фосфат: NADP<sup>+</sup>-1-оксидоредуктаза, КФ 1.1.1.49.).

Глутатіонредуктаза – гомодимерний флавопротеїн із молекулярною масою 100 – 120 кДа, кожна із субодиниць нековалентно зв'язує FAD, необхідний для роботи ферменту. У молекулі є 2 активні центри, в утворенні яких беруть участь обидві субодиниці. У ссавців GR міститься в усіх тканинах, її активність висока у нирках, тонкому кишечнику, печінці, ендокринних залозах, найнижча – в серці, м'язах і еритроцитах. GR переважно локалізована в цитозолі, але виявлена і в мітохондріях, і в ядрі.

Основне біологічне значення GR полягає у підтриманні високого рівня відновленого глутатіону і низького рівня окисленого глутатіону. Важливість GR можна довести 3-ма фактами:

- 1) швидкість відновлення глутатіону вища, ніж синтезу;
- 2) у клітині вміст відновленого глутатіону значно переважає вміст окисленого;
- 3) GR утилізує більше NADPH, ніж альтернативні реакції (в печінці в 6 разів більше, ніж синтез жирних кислот чи мікросомальні оксигенази).



За несприятливих умов активність GR змінюється менше, ніж інших ферментів обміну глутатіону. Отже, відновлення глутатіону глутатіонредуктазою – це найшвидший шлях регенерації глутатіону всередині клітини. У цілому весь цей процес називається *відновлювальним циклом глутатіону*.

Відновлювальний цикл глутатіону відіграє важливу роль і в інших метаболічних і фізіологічних функціях: синтезі та розпаді білків, активації та інактивації ферментів, синтезі дезоксирибозних метаболітів, необхідних для утворення ДНК, стабілізації клітинної мембрани, відновленні дисульфідів і дегідроаскорбінової кислоти. Зниження рівня відновленого глутатіону в органах і тканинах призводить до окиснювального стресу.

**Глутатіонтрансферази** – це родина мультифункціональних ферментів, які використовують GSH для метаболізму гідрофобних речовин. Серед глутатіонтрансфераз є гомо- чи гетеродимери з молекулярною масою 430 – 457 кДа, кожна субодиниця має свій активний центр. В активному центрі розрізняють дві ділянки (субцентри) – G і H:

- G ділянка взаємодіє з глутатіоном (містить гістидин і аргінін);

- H ділянка зв'язує гідрофобний субстрат (містить гліцин).

Глутатіонтрансферази поділяються на 3 основні родини: цитозольну, мітохондріальну і мікросомальну.

**Цитозольні глутатіонтрансферази** – димери, субодиниці яких складаються зі 199 – 244 амінокислотних залишків. За особливостями амінокислотних послідовностей розрізняють сім класів цитозольних глутатіонтрансфераз – GT $\alpha$ , GT $\mu$ , GT $\pi$ , GT $\theta$ , GT $\omega$ , GT $\sigma$ , GT $\xi$ . Три перші класи специфічні для ссавців, наступні чотири є у комах, у рослин виявлено 6 класів. У ссавців до цих класів належать 16 – 18 ізоформ, які кодуються різними генами. GT $\alpha$  і GT $\mu$  – гетеродимери, інші – гомодимери.

**Мітохондріальна глутатіонтрансфераза** представлена одним класом GT $\kappa$ , димером із субодиницями із 226 амінокислотних залишків. Проявляє високу активність щодо арилгалідів.

**Мікросомальна глутатіонтрансфераза** (фермент MAPEG) – мембраноасоційований білок, задіяний у метаболізмі

ейкозаноїдів і глутатіону, містить 4 субпідгрупи. Ці ензими по-різному розподілені між тканинами організму й індукуються дією різних чинників. Максимальна концентрація виявлена у печінці. У печінці виявлені ізоферменти 5 типів: А, В, С, Е і АА, які складаються з двох субодиниць, котрі відрізняються за амінокислотним складом.

#### **Функції глутатіонтрансфераз. Вони:**

- здійснюють детоксикацію ксенобіотиків, а також пероксидів;

- зв'язують і транспортують лейкотриєн С<sub>4</sub>, жовчні кислоти, білірубін;

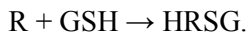
- захищають організм від окисного стресу через відновлення гідропероксидів жирних кислот, фосфоліпідів, білків, АФК (крім H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>);

- беруть участь у реакціях кон'югації з GSH вторинних метаболітів окиснювального стресу – альдегідів, хінонів, епоксидів;

- беруть участь в утворенні і метаболізмі гормонів (естрогенів).

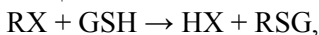
#### **Типи реакцій, які каталізують глутатіонтрансферази:**

1. Приєднання до субстрату (R) молекули відновленого глутатіону:



Субстратами у таких реакціях можуть виступати алкени, особливо  $\alpha,\beta$ -ненасичені карбоніли й епоксиди, зокрема лейкотриєн А, епоксиди бенз(а)триєну і холестеролу.

2. Нуклеофільне заміщення:



де група, яка відщеплюється, представлена  $NaI^-$ ,  $NO_2^-$ ,  $HSO_4^-$ ,  $RO^-$ ,  $RS^-$  тощо. Ці реакції відбуваються за електрофільним механізмом через атом:

а) карбону (наприклад 1-хлор-2,4-динітробензол),  
б) нітрогену (тринітрогліцерол),  
в) сульфуру (органічні тиоціонати та незаряджені дисульфідні),

г) фосфору (триєфіри фосфатів та тіофосфатів).

3. Відновлення органічних пероксидів (гідропероксидів жирних кислот та ендпероксидів) до відповідних спиртів:



4) Ізомеризації (стероїдів, простагландинів). Механізм реакції передбачає проміжне приєднання відновленого глутатіону.

У реакціях першого і другого типів утворюються тіоефіри RSG (кон'югати), а глутатіон втрачається незворотно. У реакціях третього типу утворюється окислений глутатіон, який відновлюється глутатіонредуктазою. У реакціях 4 типу глутатіон функціонує як кофермент.

Спільна дія глутатіонпероксидази і глутатіонтрансферази запобігає подальшому прогресуванню пероксидації, накопиченню вторинних метаболітів. GSH, глутатіонпероксидаза і глутатіонтрансфераза гальмують пероксидне окиснення ліпідів у мікросомах.

## Тестові завдання для самоконтролю

**1. Що утворюється у результаті дисмутації супероксиду за участю СОД?**

- а) вода;
- б) пероксид водню;
- в) молекулярний кисень;
- г) гідроксильний радикал.

**2. Встановіть відповідність (запишіть пару буква:цифра) ...**

*Форма SOD*

*місце функціонування*

- |                        |                 |
|------------------------|-----------------|
| 1) Fe-залежна SOD;     | а) цитозоль;    |
| 2) Cu, Zn-залежна SOD; | б) мітохондрії; |
| 3) Mn-залежна SOD.     | в) бактерії.    |

**3. Основним місцем локалізації каталази у клітині слугує ...**

- а) цитозоль;
- б) ядро;
- в) мітохондрії;
- г) пероксисоми.

**4. Доповніть речення: При дії каталази на пероксид водню утворюється ...**

**5. Окислений глутатіон відновлюється за участю ферменту:**

- а) глутатіонпероксидази;
- б) глутатіонредуктази;
- в) глутатіонтрансферази.

**6. До складу активного центру глутатіонпероксидази належить ...**

- а) магній;
- б) селен;
- в) глутатіон.

**7. Кожна субодиниця глутатіонредуктази нековалентно зв'язує ...**

- а)  $\text{NAD}^+$ ;
- б) FMN;
- в) FAD;
- г) глутатіон.

**8. Який відновлювальний еквівалент використовує глутатіонредуктаза для відновлення окисленого глутатіону?**

- а) NADH;
- б) FMNH<sub>2</sub>;
- в) FADH<sub>2</sub>;
- г) NADPH.

**9. Антирадикальний ефект антиоксидантів полягає у ...**

- а) руйнуванні під впливом антиоксидантів органічних пероксидів;
- б) взаємодії з радикалом з перетворенням його на малоактивний радикал;
- в) розрядці збуджених електронних станів під впливом антиоксидантів;
- г) приєднанні антиоксидантів до окиснювачів, що призводить до втрати окисних властивостей.

**10. Cu, Zn-SOD за будовою ...**

- а) гетеродимер;
- б) гетеротетрамер;
- в) гомодимер.

**11. В еритроцитах каталаза проявляє активність за умов ...**

- а) високої швидкості утворення пероксиду водню;
- б) низької швидкості утворення пероксиду водню.

**12. У відновленні пероксиду водню та ліпідних гідропероксидів до нейтральних і малотоксичних сполук бере участь ...**

- а) каталаза;
- б) глутатіонпероксидаза;
- в) глутатіонредуктаза.

**13. У активному центрі глутатіонпероксидази є селен у вигляді ...**

- а) вільних іонів;
- б) комплексу із залишками гістидину;
- в) селеноцистеїну.

**14. При патологічних станах найменше змінюється активність:**

- а) глутатіонпероксидази;
- б) глутатіонтрансферази;
- в) глутатіонредуктази.

**15. Глутатіонтрансфераза забезпечує відновлення гідропероксидів жирних кислот до ...**

а) альдегідів; б) спиртів.

**16. Загальна кількість антиоксидантів у клітині – це ...**

а) антиоксидантний статус організму;

б) буферна антиоксидантна система.

## ТЕМА 10. НЕФЕРМЕНТАТИВНІ КОМПОНЕНТИ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ

**Мета** – сформувати уявлення про біологічну роль та механізм дії неферментативних антиоксидантів.

### **Запитання та завдання для самопідготовки**

1. Розмежуйте поняття «антиоксиданти» та «прооксиданти».
2. Поясніть, які властивості повинна мати речовина, щоб виступати у ролі антиоксиданту.
3. Вкажіть, які є підходи до класифікації антиоксидантів.
4. Поясніть, що означає поняття «синергізм» антиоксидантів.
5. У якому разі антиоксиданти проявляють прооксидантну дію?
6. Вкажіть відомі Вам антиоксиданти вітамінної групи.
7. Розкрийте механізм антиоксидантної дії вітаміну Е.
8. Поясніть, у чому полягає антиоксидантна роль аскорбінової кислоти.
9. Охарактеризуйте каротиноїди як антиоксиданти.
10. Які вітаміни об'єднують під терміном «антиоксидантна вітамінна група»?
11. Розкрийте механізми антиоксидантної активності біофлавоноїдів.
12. Сформулюйте, у чому полягає відмінність убіхінону від інших жиророзчинних антиоксидантів.
13. Яка форма убіхінону має антиоксидантні властивості?
14. Охарактеризуйте антиоксидантні функції глутатіону.
15. Поясніть участь сечової кислоти в антиоксидантному захисті організму.
16. Розкрийте антиоксидантну роль сечовини.
17. Вкажіть, які стероїдні гормони мають антиоксидантні властивості.
18. У чому полягає антиоксидантна роль мелатоніну?
19. Чим зумовлені антиоксидантні властивості ліпоевої кислоти?
20. Опишіть, які сульфуровмісні сполуки – компоненти антиоксидантної системи.

21. Укажіть сполуки, які належать до позаклітинних антиоксидантів.

22. Які антиоксиданти називають комплексонами?

23. Наведіть приклади синтетичних антиоксидантів.

24. Які існують підходи до класифікації синтетичних антиоксидантів?

25. Поясніть, з якою метою використовують антиоксиданти в харчовій промисловості.

26. Які сполуки найчастіше використовують як харчові антиоксиданти?

27. Заповніть таблицю:

<b>Антиоксиданти</b>	<b>Приклади</b>
Справжні	
Допоміжні	

28. Заповніть таблицю:

<b>Антиоксиданти</b>	<b>Приклади</b>
Гідрофобні	
Гідрофільні	



29. Заповніть таблицю:

<b>Неферментативний компонент антиоксидантного захисту</b>	<b>АФК, які знешкоджує</b>	<b>Механізм дії</b>


***Основні базові поняття, якими має оволодіти студент***

**Антиоксиданти (антиокислювачі)** – це природні або синтетичні речовини, які сповільнюють чи припиняють окиснення органічних сполук через нейтралізацію АФК; речовини, здатні інгібувати процеси вільнорадикального окислення біомолекул.

Речовина може виступати в ролі антиоксиданту, якщо виконується три умови:

1. Можлива взаємодія антиоксиданту з оксидантами і радикалами.
2. Продукт цієї взаємодії менш токсичний, ніж оксидант, який він знешкоджує.
3. Антиоксидант повинен бути у достатньо великій кількості, забезпечуючи високу швидкість реакції.

**Підходи до класифікації неферментативних антиоксидантів**

*І. За біологічною важливістю:*

- «справжні» антиоксиданти, до яких належать токоферолі, убіхінони, флавоноїди, стероїдні гормони тощо. Інактивують радикали жирних кислот;

- «допоміжні» антиоксиданти, до яких належать аскорбінова кислота і сульфуровмісні сполуки. Відновлюють (регенерують) «справжні» антиоксиданти.

### *II. За розчинністю:*

- гідрофільні (водорозчинні) антиоксиданти, до яких належать відновлений глутатіон, аскорбінова кислота, карнозин, ансерин, які захищають молекули гіалоплазми та мітохондрій;

- гідрофобні антиоксиданти (вітамін Е, каротиноїди, убіхінон), локалізовані в мембрані і там же інактивують АФК, захищаючи від окисних ушкоджень основні структурні компоненти мембран.

### *III. За механізмом дії:*

- «сміттярі» – антиоксиданти, які очищають організм від усіх вільних радикалів, відновлюючи їх до стабільних неактивних продуктів;

- «пастки» – антиоксиданти, які мають спорідненість з певним вільнорадикальним продуктом (пастки синглетного кисню, гідроксильного радикала тощо);

- антиоксиданти, які обривають ланцюги – речовини, молекули яких більше реакційноздатні, ніж радикали. Найчастіше це феноли, які легко віддають свої електрони, перетворюючи радикал, з яким вони прореагували, на молекулярний продукт, а самі при цьому перетворюються на слабкий феноксил-радикал, який уже не здатний брати участь у продовженні ланцюгової реакції.

### *IV. За порядком участі в антиоксидантному захисті:*

- первинні – попереджають утворення нових АФК (до первинних належать антиоксидантні ферменти SOD, каталаза).

- вторинні – знешкоджують уже утворені АФК.

### *V. За розміром:*

- макромолекулярні антиоксиданти – трансферин, церулоплазмін, гаптоглобін, гемопексин (тобто різні білки крові);

- низькомолекулярні антиоксиданти – жіночі статеві гормони, тироксин, флавоноїди, стероїдні гормони, вітаміни Е, К, убіхінон, низькомолекулярні SH-сполуки, аскорбінова кислота.

**Синергізм антиоксидантів** – сумарний ефект взаємодії антиоксидантів. Молекула антиоксиданту руйнується під час реакції з вільними радикалами. Щоб антиоксидант ефективно працював, необхідна наявність відновників, які будуть переводити його в активний стан (наприклад, вітамін С відновлює вітамін Е, але сам при цьому окислюється). Потім тіолові сполуки відновлюють вітамін С, а біофлавоноїди відновлюють як вітамін Е, так і вітамін С. Такий же синергізм спостерігається між вітаміном Е і каротиноїдами, а також між вітаміном Е і селеном. Припускають, що альфа-токоферол захищає від окиснення селеновмісні і негемові залізопротейни, тому необхідний для підтримання біологічної форми селену в активному стані. Водночас селен знижує потребу в токоферолі і підтримує збереження його рівня у клітині.

Важливу роль відіграють антиоксиданти для біохімічних процесів, які відбуваються у печінці. Печінка бере участь у якісному та кількісному регулюванні ендогенних і екзогенних антиоксидантів. Окрім цього, печінка – це головне депо багатьох антиоксидантів (церулоплазмін, глутатіон, жиророзчинні вітаміни тощо).

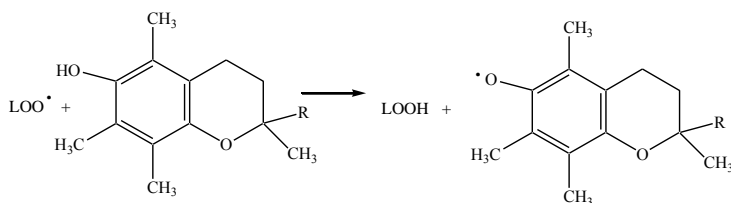
Отже, функціональний синергізм антиоксидантів допомагає досягати максимального захисного ефекту і високої стабільності при меншій їх концентрації.

**Альфа-токоферол (вітамін Е)** – основний жиророзчинний антиоксидант, розміщений у клітинній мембрані. Токоферол має 60 % антирадикальної дії всіх жиророзчинних ендогенних антиоксидантів. Нині виділені із природних джерел і вивчені вісім різних сполук, які проявляють Е-вітамінну активність: 4 токофероли та 4 токотриєноли, що в різних комбінаціях утворюють 64 ізомери. Усі вони за хімічною будовою – похідні хроману та відрізняються за кількістю, наявністю і положенням метильних груп. Міститься вітамін Е у всіх злаках, паростках пшениці і в рослинних оліях. Проте лише 20 – 40 % аліментарного вітаміну Е засвоюється організмом.

*Механізм антиоксидантної дії:*  $\alpha$ -токоферол містить фенольне кільце зі системою спряжених подвійних зв'язків, тому він легко віддає електрон вільним радикалам, відновлюючи їх до стабільних продуктів. Феноксил-радикал,

який при цьому утворюється, достатньо стабільний і у подовженні ланцюга окиснення участі не бере (час напівжиття становить 12,5 с). Крім цього, наявність у токоферолів бічного ізопренового ланцюга, який відповідає за довжиною жирнокислотним ланцюгам фосфоліпідів, забезпечує їх здатність вбудовуватися в мембрану з наступним утворенням комплексів між метильними групами бічного ланцюга і подвійними зв'язками жирних кислот.

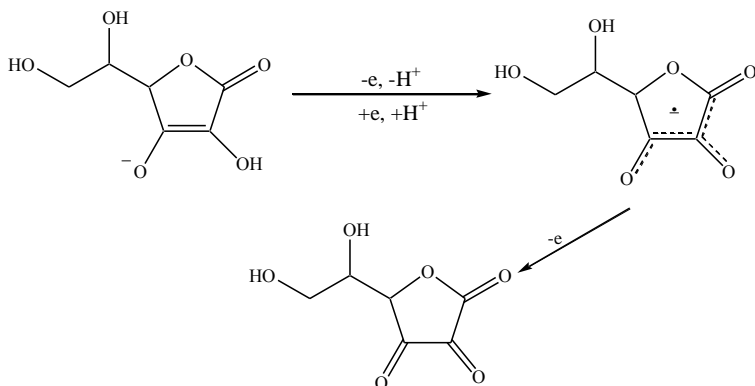
Токоферол знешкоджує *синглетний кисень* і цим запобігає пероксидному окисненню ліпідів мембран. Цей механізм захисту клітинних мембран від АФК важливий для клітинних структур, позбавлених ферментативної системи захисту (SOD), наприклад мембран ЕПР гепатоцитів. Вітамін Е також бере участь у стабілізації клітинних мембран, чим обмежує проникнення АФК у гідрофобний шар мембрани. Молекули вітаміну Е локалізуються у внутрішній мембрані мітохондрій, захищають її від ушкоджувальної дії пероксидів, підтримують функціональну цілісність зовнішньої цитоплазматичної мембрани клітин і є основним фактором резистентності еритроцитів до гемолітичних отрут.



### *Антиоксидантна активність вітаміну Е*

Антиоксидантна дія токоферолів зберігається також при високих концентраціях кисню, тому вони накопичуються в багатих на ліпіди ділянках, які контактують із середовищем, де підтримується високий парціальний тиск кисню (мембрани еритроцитів, клітини дихальних шляхів тощо), і є найбільша імовірність активації ПОЛ. Певна кількість токоферолів накопичується також у ядрі клітини, що є необхідною передумовою захисту ядерного хроматину та безпосередньо ДНК від ушкоджувальної дії вільних радикалів. Альфа-токоферол – синергіст убіхінону та селену.

**Аскорбінова кислота (АК)** – інактивує АФК, утворюючи неактивний радикал (семідегідроаскорбат). Цей радикал хімічно неактивний і в подальшому диспропорціонує з утворенням молекул аскорбінової та дегідроаскорбінової кислоти.



#### *Антиоксидантна роль аскорбінової кислоти*

Антиоксидантні функції аскорбінової кислоти:

- АК – косубстрат ферменту *аскорбатпероксидази* та використовується для відновлення пероксиду водню.
- АК – основний гідрофільний відновник клітини, його концентрація вища, ніж інших антиоксидантів. АК прямо відновлює АФК, пероксидні сполуки і знешкоджує вторинні метаболіти окислення.

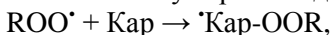
Важлива біологічна роль АК полягає у відновленні  $Fe^{3+}$  до  $Fe^{2+}$ . Відомо, що організм людини здатний засвоювати лише двовалентне залізо ( $Fe^{2+}$ ), натомість тривалентне залізо не лише не засвоюється, але й ініціює реакції ПОЛ.

• Як важливий компонент антиоксидантної системи вітамін С взаємозв'язаний із глутатіоном і токоферолом. Вітамін С виступає синергістом вітаміну Е. Він інгібує процес ПОЛ (хоча основну роль у цьому процесі відіграє альфа-токоферол), нейтралізує окислювачі, які надходять із забрудненим повітрям, знешкоджує канцерогенні нітроаміни.

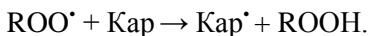
- АК запобігає пероксидації холестеролу ліпопротеїнів низької щільності і цим запобігає прогресуванню атеросклерозу.

- Дефіцит вітаміну С в організмі супроводжується зниженням антиоксидантного захисту.

**Каротиноїди** – ефективні знешкоджувачі вільних радикалів. Каротиноїди – червоні й оранжеві рослинні пігменти, які належать до жиророзчинних антиоксидантів. Усі каротиноїди певною мірою – це пастки для синглетного кисню. Антиоксидантна дія каротиноїдів пов’язана з наявністю полієнового ланцюга та делокалізованої  $\pi$ -електронної структури з низьким енергетичним рівнем триплетного збудженого стану. Енергетична характеристика молекулярної структури каротиноїдів робить можливою передачу збудженого неспареного електрона зі синглетного кисню або пероксид-радикала на молекулу каротиноїдів. При збільшенні довжини полієнового ланцюга зростає ступінь його стабілізації та зменшується енергія триплетного  $\pi$ -електронного стану, що призводить до підвищення імовірності перенесення неспареного електрона на молекулу каротиноїдів, а отже, до збільшення антиоксидантної активності. На антиоксидантну активність впливає також наявність іононових кілець, які порушують єдність основної структури делокалізованих  $\pi$ -електронів. Тому у лікопіну, який має 11 подвійних зв’язків, але у вигляді планарної структури, більше збалансована  $\pi$ -електронна система, що і визначає збільшення його антиоксидантної активності майже удвічі порівняно з  $\beta$ -каротином, у молекулі якого також є 11 подвійних зв’язків, але наявні два іононові кільці. Взаємодія каротиноїдів із пероксидними радикалами, крім віддачі або приєднання електронів, може зумовлювати приєднання вільного радикала в місці подвійного зв’язку каротиноїдів:



а також перенесення атома водню від молекули каротиноїдів:

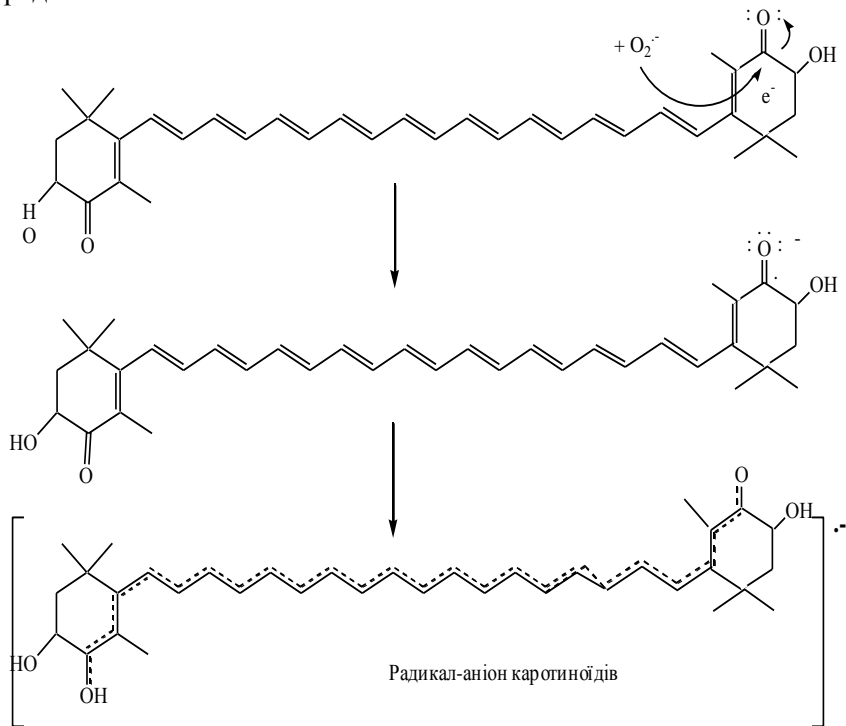


Напрямок реакції пероксидних радикалів з каротиноїдами залежить від кількох факторів:

- структури молекули каротиноїду,

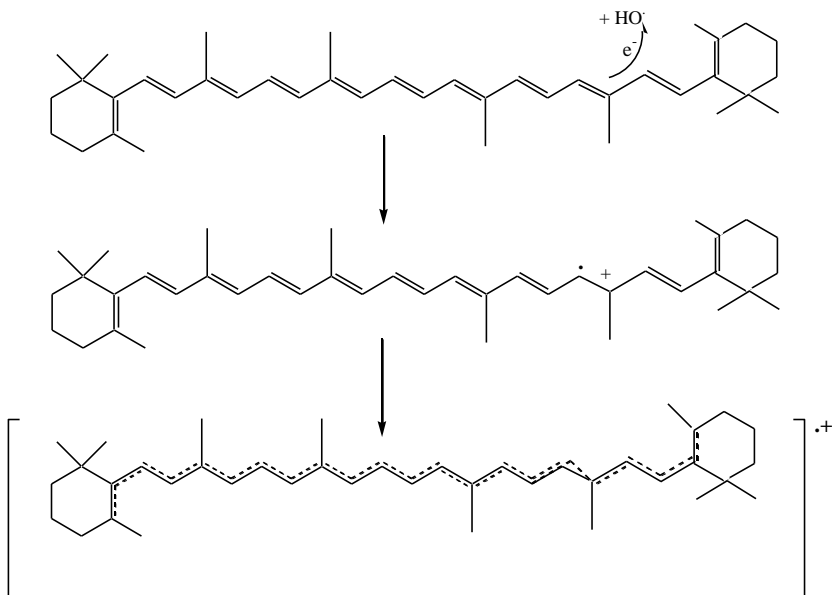
- активності пероксидного радикала,
- оточення молекули каротиноїду.

Неполярні та полярні каротиноїди в органічних розчинах проявляють майже однакові антиоксидантні властивості, проте при вбудовуванні у мембрану полярні каротиноїди значно ефективніше нейтралізують вільні радикали, ніж неполярні. Молекула каротиноїдів може віддавати або приймати електрон від відповідних речовин з утворенням аніон- або катіон-радикалів.



*Взаємодія каротиноїдів зі супероксидним аніон-радикалом*





*Взаємодія каротиноїдів із гідроксильним радикалом*

При взаємодії з вільними радикалами каротиноїди можуть перетворюватися на пероксиди, епоксиди, спирти, кетони.

Окиснені проміжні сполуки  $\beta$ -каротину здатні виявляти прооксидантні властивості. Встановлено, що  $\beta$ -каротин найвищу антиоксидантну активність виявляє при низькому парціальному тиску в крові. При високому вмісті кисню та при високих концентраціях  $\beta$ -каротин може виявляти прооксидантну активність. Механізм прооксидантної дії каротиноїдів полягає у взаємодії радикалів каротиноїдів із молекулами кисню та в утворенні відповідних пероксидних радикалів.

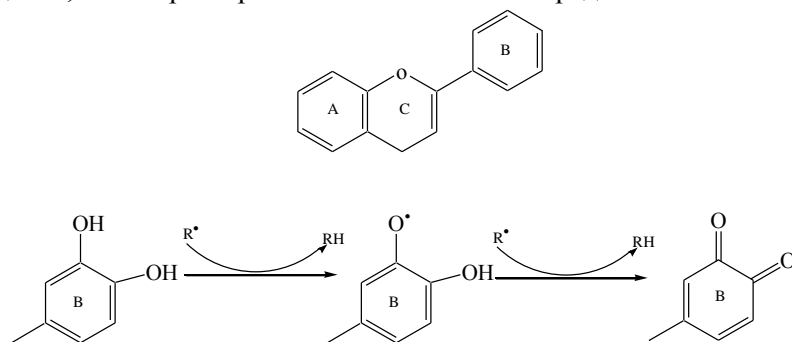
$\beta$ -каротин бере участь у знешкодженні окисномодифікованих ліпопротеїнів низької щільності, синглетного кисню. Проте проміжні радикали дериватів  $\beta$ -каротину можуть взаємодіяти з молекулярним киснем, утворюючи пероксидні радикали, ініціюючи ланцюгову реакцію пероксидації ліпідів.

$\beta$ -каротин витрачається в організмі після використання запасів токоферолів.  $\beta$ -каротин та інші каротиноїди як антиоксиданти діють разом із вітамінами Е і С. Ці вітаміни – Е, С, а також  $\beta$ -каротин утворюють так звану *антиоксидантну вітамінну групу*. Їх надходження в організм знижує ризик розвитку раку, серцево-судинних захворювань, катаракти.

Антиоксидантні властивості каротиноїдів зумовлюють їхню фотозахисну, радіопротекторну, антимуtagenну й антиканцерогенну дію.

**Біофлавоноїди** – велика група поліфенолів, які містяться у водних екстрактах різних рослин. Деякі біофлавоноїди діють як пастки гідроксилрадикала (катехін, епікатехін, рутин). Інші (кверцетин) не знижують вмісту гідроксилу, проте інгібують продукування супероксиду. Треті не впливають ані на гідроксил, ні на супероксид, проте мають високу антиоксидантну активність. Для біофлавоноїдів характерні *два механізми АОО*. Вони:

- інактивують вільні радикали;
- утворюють стабільні комплекси з металами (залізом, міддю, кобальтом, цинком, молібденом) і усувають їх дію. Молекули фенольних сполук, нейтралізуючи й інактивуючи радикал, самі перетворюються на малоактивні радикали.



### *Антиоксидантна роль біофлавоноїдів*

Фенольні сполуки – синергісти аскорбінової кислоти. Головним механізмом дії фенольних сполук, з яким пов'язані біологічні ефекти, – це їхня властивість вступати в окисно-відновні реакції. Рослинні феноли в організмі під впливом

ферментів фенолоксидаз та пероксидаз перетворюються на хінони, які за дії відновників здатні швидко віддавати водень, приєднувати протони та переходити у фенол.

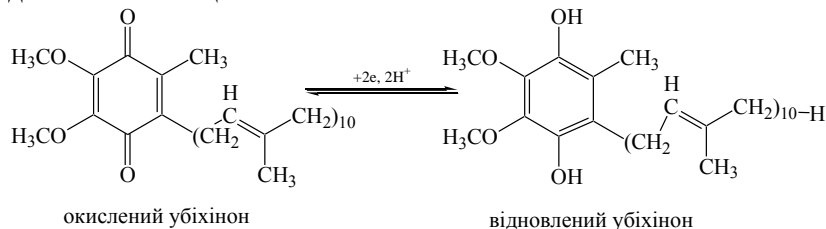
В антиоксидантному ефекті фенольних сполук виділяють такі механізми:

- антирадикальний (перехоплення вільних радикалів);
- антиліпопероксидний (перехоплення радикалів ПОЛ);
- антикисневий;
- інактивація пероксинітриту;
- інгібування радикалопродукуючих ензимів;
- хелатування металів.

Флавоноїди за силою антиоксидантного ефекту перевищують токоферолі та каротиноїди. Максимально активні лейкоантоціаніди, катехіни, флавоноли, антоціаніди, кумарини. Кверцетин у 90 разів виявляє сильнішу антиоксидантну дію порівняно з вітаміном Е. Найкраще проявляє активність кверцетин у ліпідних розчинах. У водному середовищі ефективніше діє рутин.

Серед продуктів харчування, багатих на біофлавоноїди, найвища антиоксидантна активність характерна для чаю, потім продукти розташовуються так: часник, шпинат, брюссельська капуста, брокколі, червоний солодкий перець, баклажани, цвітна капуста, картопля.

**Убіхінон (коензим Q)** – фенол, за структурою подібний до токоферолів. Міститься в мітохондріях, де бере участь у роботі дихального ланцюга.



### *Убіхінон*

Убіхінон має високу антиоксидантну активність, причому його ефективність у 5 разів перевищує антиоксидантну дію вітаміну Е. Це дуже важливо для мітохондрій, де відбуваються активні окиснювальні процеси і постійно утворюються АФК.

Антиоксидантом є відновлена форма убіхінону. Відновлений убіхінон – єдиний жиророзчинний антиоксидант, який синтезується в клітинах живого організму.

Убіхінон – інгібітор радикалів фенольного типу, безпосередньо реагує з пероксидними радикалами, зменшує їхню концентрацію, стабілізує мембрани. Вітамін Е у мембранах здійснює первинний захист від пероксидного окислення, а убіхінони відіграють антиоксидантну роль при зменшенні кількості у мембранах вітаміну Е.

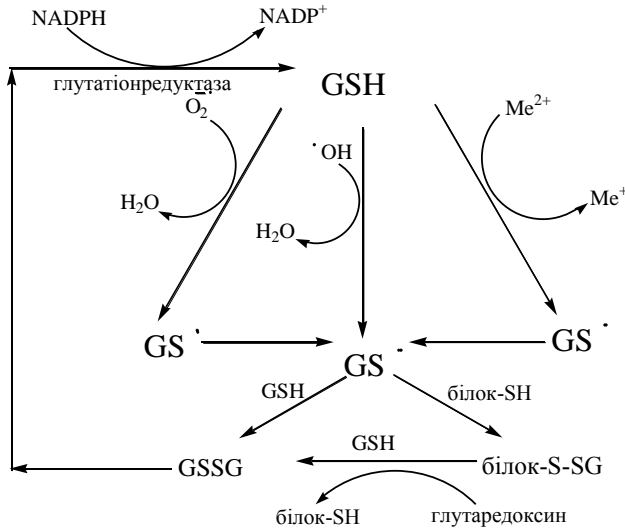
**Сульфуровмісні сполуки.** Важлива ланка антиоксидантного захисту – біомолекули, які містять сульфгідрильні групи. До них належать цистеїн, тіоредоксин, таурин. Сульфуровмісні сполуки входять до складу білків, активних центрів ферментів, окремих гормонів, слугують попередниками глутатіону, коензиму А тощо. Основний фонд сульфгідрильних груп представляє трипептид глутатіон.

*Глутатіон* міститься у всіх тканинах тварин, рослин, в одноклітинних еукаріот і більшості прокаріот. Глутатіон – головний низькомолекулярний тіол, на його частку припадає 90 – 95 % тіолів клітини. Найбільше його у печінці та кристалику – 5 – 9 мкмоль/г. У клітині основна частина глутатіону розміщена у цитозолі, 9 – 15 % – у мітохондріях.

Глутатіон існує в окисленій і відновленій формах. Молекулярна маса становить відповідно 307,33 і 612,63 Да. Глутатіон має нетиповий зв'язок між глутаматом і цистеїном. Наявність глутамільного зв'язку захищає трипептид від деградації внутрішньоклітинними пептидазами, а сульфгідрильна група цистеїну може слугувати донором електронів, надаючи при цьому глутатіону властивості відновника і здатність знешкоджувати вільні радикали.

*Антиоксидантна роль* глутатіону пов'язана з його здатністю:

1. Слугувати відновником у глутатіонпероксидазній реакції. Крім безпосередньої взаємодії з радикалами кисню, глутатіон – це косубстрат глутатіонпероксидази і глутатіонредуктази, тому здатний вилучати із клітини пероксид водню.



#### *Антиоксидантна роль глутатіону*

2. Бути відновником вітаміну С, при цьому відновником є тільнона група цистеїнового залишку.

3. Слугувати акцептором гідроксильних радикалів і синглетного кисню.

4. Брати участь у підтриманні активного стану багатьох ферментів.

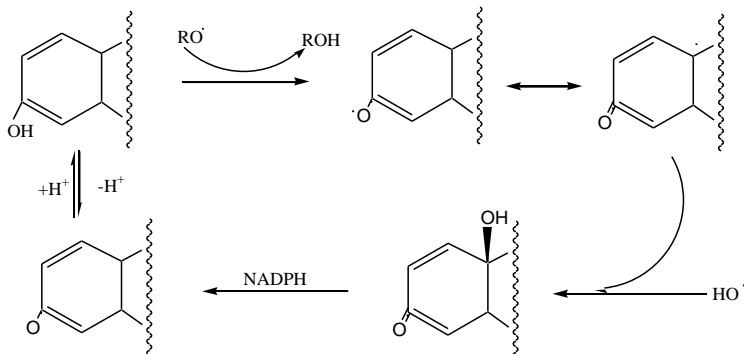
**Сечова кислота** – кінцевий продукт пуринового обміну. Це ефективний акцептор синглетного кисню і гідроксильних радикалів. Вона інгібує утворення пероксидних радикалів і захищає ліпопротеїни сироватки крові від окиснення. Окисно-відновні реакції сечової кислоти можливі лише за участю аскорбінової кислоти. Сечова кислота може інгібувати процеси ПОЛ.

**Сечовина** – продукт знешкодження аміаку в печінці. Антиоксидантна роль сечовини полягає у:

- здатності гальмувати окиснення заліза киснем;
- пригніченні утворення малонового альдегіду через зв'язування карбоксильних груп білків.

Внесок сечовини в загальну антиокиснювальну здатність пероксидів становить 30 – 65 %, а гідропероксидів – 10 – 15 %.

**Естрогени.** Зі стероїдних гормонів антиоксидантні властивості мають естрогени. Відомо, що інтенсивність вільнорадикального окислення підвищується в період менструального циклу, коли концентрація естрогенів низька, і навпаки.



### *Антиоксидантна роль естрогенів*

Естрогени регулюють мітросомальне окислення, підтримуючи активність монооксигеназної системи. При патологічних станах, які супроводжуються активацією процесів вільнорадикального окислення, естрогени запобігають порушенню мітросомального окислення, протидіючи пошкодженню біомембран. Крім цього, виявлений антирадикальний ефект естрогенів, який полягає в інгібуванні вільнорадикального окислення нуклеїнових кислот, що і зумовлює антимутагенні властивості гормонів.

Проте антиоксидантна активність естрогенів виявляється у дозах, вищих за фізіологічні. Водночас естрогени відомі як канцерогени, тож їхнє використання як антиоксидантів обмежене.

**Глюкокортикоїди** інгібують транскрипцію індукцибельної синтази оксиду азоту і знижують вміст кінцевих метаболітів цієї сполуки у крові, що, очевидно, й визначає їх високу антирадикальну активність за умов патологічних станів, які характеризуються гіперпродукцією оксиду азоту.

**Катехоламіни** – адреналін, норадреналін виявляють антиоксидантну або прооксидантну дію. За звичайних умов або

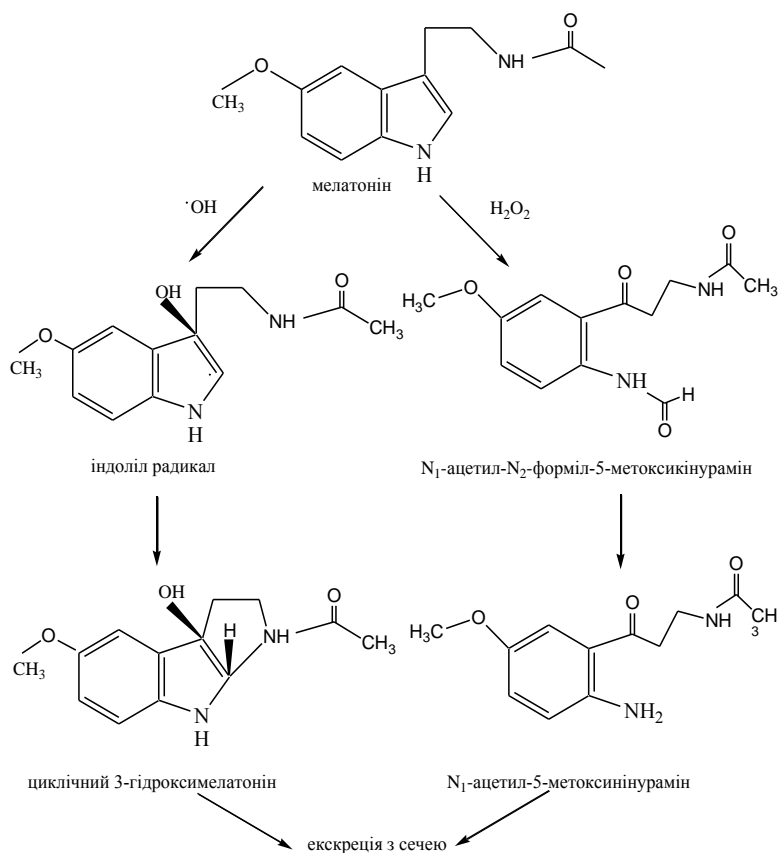
короткотривалого стресу антиоксидантна дія катехоламінів становить 10 – 12 %, а в разі тривалого та важкого оксидативного стресу прооксидантна дія посилюється і вони з антиоксидантів перетворюються на фактор активації ПОЛ і виснаження антиоксидантних резервів. Стимуляція катехоламінами вільнорадикальних процесів може бути наслідком двох причин:

- виникнення в організмі під впливом катехоламінів генералізованих ішемічних порушень гемодинаміки в окремих органах, які ведуть до генералізованого посилення вільнорадикальних процесів;

- індукція вільнорадикальних процесів безпосередньо самими катехоламінами або продуктами їхнього метаболізму.

**Мелатонін** – індольний амін (N-ацетил-5-метокситриптамін) – виробляється пінеальною залозою (епіфізом) і апудоцитами шлунково-кишкового тракту (ЕС-клітини), клітинами повітроносних шляхів, коркового шару наднирників, парагангліїв, жовчного міхура, яєчників, ендотелію плаценти. Мелатонін також виявлено й у неендокринних утвореннях – мастоцитах, еозинофілах, тромбоцитах, ацинарних клітинах підшлункової залози, ретикулоепітеліальних клітинах тимуса.

Пінеальний мелатонін виявляє широкий спектр біологічної активності (антигонадотропна, імуностимулювальна, цитостатична, антипроліферативна, антидепресивна) і, окрім цього, контролює циркадні ритми. Недостаньо вивчені антиоксидантні властивості мелатоніну. З'ясовано, що мелатонін проявляє унікальні нейроантиоксидантні властивості, що дало змогу назвати його «ідеальним інгібітором вільних радикалів». Мелатонін інгібує  $\text{OH}$  і гідропероксиди ліпідів, регулює активність глутатіонпероксидази. За умов ішемії головного мозку антиоксидантний ефект пінеального мелатоніну проявляється через специфічне інгібування нейрональної NO-синтетази та пероксинітриду ( $\text{ONOO}^-$ ). У багатьох наукових роботах відзначається, що мелатонін посилює експресію генів, відповідальних за синтез антиоксидантних ферментів, особливо глутатіонпероксидази та супероксиддисмутази.

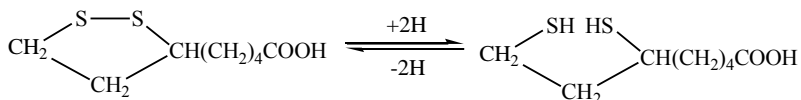


### *Механізм антиоксидантної активності мелатоніну*

Також мелатонін стимулює активність фенольних та тіолових антиоксидантів. Синергісти мелатоніну – аскорбат та токоферол.

**Ліпосва кислота** – антиоксидант, який функціонує як окисно-відновна система: вона може існувати в окисленій і відновленій формі, реалізуючи свої коферментні функції. Бере участь у окиснювальному декарбоксілюванні  $\alpha$ -кетокислот (ПВК, кетоглутарової), є простетичною групою ферментів піруват- та  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназних комплексів.





*Ліпоєва та дигідроліпоєва кислота*

Антиоксидантні властивості ліпоєвої кислоти зумовлені наявністю тіолових груп у її складі. Ліпоєва кислота посилює антиоксидантну дію вітамінів С і Е.

**Церулоплазмін** – мідевмісний білок плазми крові, який синтезується в печінці та слугує транспортною формою міді (транспортують мідь у тканини для синтезу цитохром-с-оксидази, Cu,Zn-SOD та інших мідевмісних білків). Це універсальний клітинний гасник вільних радикалів, здатний відновлювати у крові супероксидні радикали до кисню і води, захищаючи у такий спосіб ліпідні структури мембран. Одна із важливих функцій церулоплазміну – нейтралізація вільних радикалів, які вивільняються макрофагами і нейтрофілами під час фагоцитозу, а також при інтенсифікації вільнорадикального окиснення в місцях запалення. Церулоплазмін – фактор природного захисту організму при запальних, алергічних процесах, стресових станах, ушкодженнях тканин, зокрема при інфаркті міокарда, ішемії.

**Білірубін** у крові зв'язується з альбуміном і проявляє антиоксидантну активність, захищаючи альбумін та інші білки крові від дії вільних радикалів.

**Позаклітинні антиоксиданти** – трансферин (залізотранспортувальний протеїн), лактоферин (залізовв'язувальний протеїн). У складі вказаних протеїнів залізо не бере участі у вільнорадикальних реакціях.

**Комплексо́ни** – група антиоксидантів, які сповільнюють утворення радикалів, зв'язуючи іони заліза, котрі беруть участь у реакціях утворення радикалів із пероксидів. До таких сполук належить ЕДТА, ортофосфати й особливо пірофосфати, антибіотик тетрациклін та інші комплексо́ни. До природних сполук, які зв'язують іони двовалентного заліза, належить дипептид карнозин (β-аланіл-гістидин).

**Синтетичні антиоксиданти** розрізняють за *характером дії*:

1. *Антиоксиданти прямої дії*:

- жиророзчинні антиоксиданти – токоферолу ацетат, убіхінони, іонол, аевіт,
- водорозчинні антиоксиданти – аскорбінова кислота, рутин, кверцетин, флакумін,
- тіолові антиоксиданти – відновлений глутатіон, ліпамід, цистеамін.

2. *Антиоксиданти непрямой дії*:

- попередники глутатіону – глутамат, цистеїн, метіонін,
- попередники піридин-нуклеотидів – препарат нікотинової кислоти – компламін,
- індуктори пероксидаз – натрію селеніт.

**Харчові антиоксиданти** – антиоксиданти, які насамперед містяться в різних свіжих фруктах, а також продуктах, виготовлених з них (свіжовичавлені соки, морси та ін.). До багатих антиоксидантами фруктів належать чорниця, виноград, журавлина, горобина, смородина, гранати. Усі вони мають кислий або кисло-солодкий смак і червоний (червонувато-синій, синій) колір. Серед інших продуктів, які містять антиоксиданти, виділяють какао, червоне вино, зелений чай і менше чорний чай.

У харчовій промисловості найчастіше використовують вітаміни С і Е. *Альфа-токоферол* (як харчова добавка має позначення Е-307) – жиророзчинний антиоксидант, здатний захистити харчові продукти від зміни забарвлення внаслідок інгібування окиснювальних процесів. Е-307 належить до природних речовин і додається у продукти з високим вмістом жирів і масел для збільшення термінів їх зберігання.

*Вітамін С* – водорозчинний антиоксидант. Застосовується в харчовій промисловості як антиоксидант Е300 – Е305, який запобігає окисненню продуктів.

У харчовій промисловості антиоксиданти використовують, оскільки вони:

- запобігають окисненню жиру в харчових продуктах і косметичних виробках;
- збільшують термін зберігання масел і жирів, зокрема у складі продуктів;

- запобігають зміні та погіршенню смаку, аромату, кольору, структури та харчової цінності продукту;
- зберігають постійну якість продукту від партії до партії.

Антиоксиданти використовують у *виробництві*:

- рослинних олій та тваринних жирів, маргарину, майонезу, комбінованих масел, соусів і подібних продуктів, ефірних олій;
- жирів для смаження, снєків, картоплі-пюре сушеної, продуктів для дитячого харчування, косметики та подібних продуктів, хлібобулочних виробів, кондитерських виробів, соків, напоїв, безалкогольних напоїв.

## Тестові завдання для самоконтролю

### 1. Антиоксидантами називають речовини, які ...

- а) посилюють вільнорадикальні процеси;
- б) інгібують вільнорадикальні процеси.

### 2. До гідрофільних антиоксидантів належать ...

- а) відновлений глутатіон;
- б) каротиноїди;
- в) аскорбінова кислота;
- г) вітамін А.

### 3. Гідрофобні антиоксиданти локалізовані в ...

- а) цитозолі;
- б) матриксі мітохондрій;
- в) мембранах.

### 4. «Пастками» називають антиоксиданти, які ...

- а) знешкоджують усі вільні радикали, відновлюючи їх до стабільних неактивних продуктів;
- б) мають спорідненість із певним вільнорадикальним продуктом;
- в) обривають ланцюги, оскільки їхні молекули реакційноздатніші, ніж радикали.

### 5. До макромолекулярних антиоксидантів належать ...

- а) трансферин;
- б) вітамін А;
- в) убіхінон;
- г) церулоплазмін;
- д) аскорбінова кислота.

### 6. Синергістом вітаміну Е виступають ...

- а) каротиноїди;
- б) біофлавоноїди;
- в) аскорбінова кислота;
- г) селен;
- д) ліпоева кислота.

**7.Що є основним жиророзчинним антиоксидантом клітини?**

- а) аскорбінова кислота;
- б) вітамін А;
- в) вітамін Е;
- г) сечова кислота;
- д) ліпоєва кислота.

**8. Токоферол знешкоджує ...**

- а) гідроксильний радикал;
- б) синглетний кисень;
- в) оксид азоту.

**9. При взаємодії аскорбінової кислоти з АФК утворюється неактивний радикал, який називається ...**

**10. Основну роль у захисті ліпідів мембран від вільнорадикального пошкодження відіграє ...**

- а) вітамін Е;
- б) вітамін С;
- в) вітамін А.

**11. Каротиноїди виступають «пастками» для ...**

- а) супероксиду;
- б) пероксиду водню;
- в) гідроксильного радикала;
- г) пероксинітриту;
- д) синглетного кисню.

**12. Антиоксидантні властивості має...**

- а) відновлена форма убіхінону;
- б) окислена форма убіхінону.

**13. Який жирозчинний антиоксидант синтезується в організмі людини?**

- а) убіхінон;
- б) вітамін Е;
- в) в організмі людини не синтезується жодний жиророзчинний антиоксидант.

**14. Синтез глутатіону відбувається у ...**

- а) цитозолі;
- б) мітохондріях;
- в) ядрі;
- г) лізосомах.

**15. Антиоксидантна роль глутатіону полягає у тому, що він ...**

- а) слугує відновником у глутатіонпероксидазній реакції;
- б) необхідний для відновлення вітаміну С до активної форми;
- в) є акцептором гідроксильних радикалів і синглетного кисню, а також може здійснювати детоксикацію пероксиду водню і гідропероксидів ліпідів;
- г) слугує відновником убіхінону;
- д) усі відповіді правильні.

**16. Сечова кислота виступає акцептором ...**

- а) синглетного кисню;
- б) пероксиду водню;
- в) супероксид-аніон радикала;
- г) гідроксильного радикала.

**17. Антиоксидантні властивості ліпосвої кислоти зумовлені наявністю:**

- а) тіолових груп;
- б) подвійних зв'язків;
- в) гідроксильної групи.

**18. Церулоплазмін здатний відновлювати в крові ...**

- а) супероксид;
- б) пероксид водню;
- в) синглетний кисень;
- г) оксид азоту.

**19. Початкову стадію аутоокислення в мембранах пригнічує:**

- а) токоферол;
- б) аскорбінова кислота;
- в) поліфеноли.

**20. Комплексиони – це антиоксиданти, які знижують швидкість утворення вільних радикалів через ...**

- а) зв'язування вільних радикалів;
- б) зв'язування іонів заліза, які беруть участь у реакціях утворення радикалів;
- в) активації антиоксидантних ферментів.

**21. У різних тканинах співвідношення різних антиоксидантів:**

- а) однакове;
- б) різне;
- в) в нормі однакове, однак при патології змінюється.

**22. У харчовій промисловості як харчові антиоксиданти найчастіше використовують ...**

- а) вітамін А;
- б) вітамін С;
- в) вітамін Е;
- г) інол.

## РЕКОМЕНДОВАНА НАВЧАЛЬНА ТА МЕТОДИЧНА ЛІТЕРАТУРА

1. Афонина Г.Б., Куюн Л.А. Липиды, свободные радикалы и иммунный ответ. К.: Нац. мед. ун-т, 2000. 285 с.
2. Березнякова А.И. и др. Патологическая физиология: учебник для студ. высш. фарм. учеб. учрежд. и фарм. ф-тов высш. мед. учеб. учрежд. / Березнякова А.И., Кононенко Н.Н., Крыжная С.И., Тищенко И.Ю., Тюпка Т.И., Шевцов И.И. Х.: Изд-во НФаУ, 2007. 491 с.
3. Біохімічні показники в нормі і при патології: навч. довідник / за ред. Складарова О.Я. К.: Медицина, 2007. 320 с.
4. Бурлака А.П., Сидорчик Є.П. Радикальні форми кисню та оксиду азоту при пухлинному процесі. К.: Наукова думка, 2006. 227 с.
5. Волощук О.М. Біохімія вільнорадикальних процесів: курс лекцій. Чернівці: Чернівецький нац. ун-т, 2016. 128 с.
6. Копильчук Г.П., Волощук О.М. Біохімічні механізми ушкодження клітин: монографія, Чернівці : Чернівецький нац. ун-т ім. Ю.Федьковича, 2019. 144 с.
7. Губский Ю.И. Смерть клетки: свободные радикалы, некроз, апоптоз. Винница: Нова Книга, 2015. 360 с.
8. Мхітарян Л.С., Кучменко О.Б. Окислювальний стрес: механізми розвитку і роль в патології. К.: Вид-во НПУ ім. М.П. Драгоманова, 2004. 223 с.
9. Остапченко Л.І., Гребіник Д.М. Біохімічні механізми ушкодження клітин. Молекулярні механізми клітинної загибелі: курс лекцій. ВПЦ «Київський університет», 2014. 92 с.
10. Остапченко Л.І., Синельник Т.Б., Рибальченко Т.В., Рибальченко В.К. Біохімічні механізми апоптозу. ВПЦ «Київський університет», 2010. 310 с.



## ЗМІСТ

Передмова .....	3
Тема 1. Біохімічні механізми ушкодження клітин .....	4
Тема 2. Види загибелі клітин.....	23
Тема 3. Загальні компенсаторні механізми при ушкодженні клітини .....	42
Тема 4. Поняття про активні форми кисню.....	49
Тема 5. Активні форми нітрогену.....	60
Тема 6. Способи утворення АФК у клітині.....	71
Тема 7. Біологічна роль АФК.....	84
Тема 8. Оксидативні ушкодження основних біомолекул клітини.....	97
Тема 9. Ферментативні компоненти антиоксидантного захисту.....	122
Тема 10. Неферментативні компоненти антиоксидантного захисту.....	135
Рекомендована навчальна та методична література .....	160

**ДЛЯ ПОТАТОК**

**ДЛЯ ПОДАТОК**

*Навчально-методичне видання*

**Волощук Оксана Миколаївна**

## **Біохімічні механізми ушкодження клітин**

Навчально-методичний посібник

Відповідальний за випуск

Літературний редактор

***Ряднова В.П.***

Комп'ютерний набір і верстка

***Волощук О.М.***

Підписано до друку 12.04.2022. Формат 60x84/16.  
Папір офсетний. Друк різнографічний. Умов.-друк. арк. 9,0.  
Обл.-вид. арк. 9,6. Тираж 50. Зам. Н-042.

Видавництво та друкарня Чернівецького національного університету.  
58002, Чернівці, вул. Коцюбинського, 2

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 891 від 08.04.2002.