

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ УКРАИНЫ  
ДОНЕЦКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
химический факультет**

## **РАДИКАЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ В КЛЕТКЕ**

**УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ**  
для студентов специальности "биохимия"

Печатается по решению ученого совета  
химического факультета  
протокол № 6 от 23 января 2007г.

Донецк-ДонНУ  
2007

ББК Г223.51я73 + Г29я73

Учебно-методическое пособие по спецкурсу "Радикальные реакции в клетке" (для студентов специальности "Биохимия") / Авт.: А.Н. Шендрик, Л.В. Каниболоцкая – Донецк: ДонНУ, 2007. – 152с.

Материал, изложенный в данном методическом пособии, касается влияния кислорода и его активных интермедиатов на процессы окисления органических веществ в жидкой фазе; деструктивных для живой материи свойств активных форм кислорода; неспециализированных и специализированных (для защитных целей) механизмов генерации активных метаболитов кислорода, механизмов противостояния действию таких агентов у аэробных организмов. Предназначено для самостоятельного освоения студентами теоретического материала курса.

Авторы: А.Н. Шендрик, профессор,  
Л.В. Каниболоцкая, доцент.

Рецензенты: Н.М. Олейник, заведующий кафедрой органической химии ДонНУ, доктор химических наук, профессор  
Й.А. Опейда, заведующий отделом исследования радикальных реакций ИнФОУ НАН Украины  
им. Л.М. Литвиненко, доктор химических наук, профессор

## СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	5
1. СВОБОДНЫЕ РАДИКАЛЫ.....	10
1.1. Открытие свободных радикалов.....	10
1.2. Пространственная структура радикалов.....	11
1.3 Энергия диссоциации связей и энтальпии образования радикалов.....	11
1.4. Магнитные свойства свободных радикалов. Методы обнаружения и исследования свободных радикалов.....	12
1.4.1. Метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР).....	12
1.4.2. Спиновая ловушка.....	15
1.4.3. Магнитный момент и магнитная восприимчивость.....	17
1.5. РЕАКЦИИ, ПРОТЕКАЮЩИЕ С УЧАСТИЕМ СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ.....	17
1.5.1. Молекулярные и радикальные реакции.....	17
1.5.2. Цепные реакции - пример реакций, идущих с участием свободных радикалов.....	20
1.5.3. Особенности реакционной способности молекулярного кислорода.....	25
2. РЕАКЦИИ ОКИСЛЕНИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ МОЛЕКУЛЯРНЫМ КИСЛОРОДОМ В ЖИДКОЙ ФАЗЕ.....	31
2.1. Элементарные реакции окисления.....	31
2.2. Катализ окисления органических соединений.....	35
2.4. Механизм действия ингибиторов.....	44
2.4.1. Фенолы и ароматические амины - эффективные ингибиторы окислительных реакций.....	46
2.4.2. Многократный обрыв цепей на ингибиторах окисления.....	48
2.4.3. Антиоксиданты, разрушающие гидропероксиды.....	49
2.4.4. Синергизм действия антиоксидантов.....	50
3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ РАДИКАЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ.....	51
3.1. Импульсные методы.....	51
3.1.1. Импульсный фотолиз.....	51
3.1.2. Импульсный радиолиз.....	52
3.2. Лазерный магнитный резонанс (ЛМР).....	52
3.3. Иницированная и автоиницированная цепная реакция.....	53
3.3.1. Иницированная цепная реакция.....	53
3.3.2. Метод смешанного иницирования.....	54
3.3.3. Автоиницированный режим цепной реакции.....	54
3.4. Фотохимические методы изучения элементарных стадий.....	55
3.4.1. Секторный метод (метод прерывистого освещения).....	55
3.4.2. Метод фотохимического преддействия и последствия.....	56
3.5. Хемилюминесцентные методы.....	57
3.6. Методы изучения ингибиторов цепных реакций.....	59
3.6.1. Начальная скорость ингибированного окисления (полимеризации).....	59
3.6.2. Скорость ингибированного окисления как функция времени.....	59
3.7. Изучение реакций радикалов, образующихся из ингибитора.....	61
4. ПРОЦЕССЫ ОКИСЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ МОЛЕКУЛ.....	63
4.1. Возбужденные формы молекулярного кислорода.....	65
4.2. Свободнорадикальные интермедиаты одноэлектронного пути восстановления кислорода.....	69
4.3. Функциональная роль активных метаболитов кислорода в системе защитных реакций организма.....	81
4.3.1. Специализированные системы генерации активных метаболитов кислорода.....	82
4.3.2. Лактоферрин как потенциальный фактор каталитической продукции $\text{HO}^\bullet$ и дезорганизации антиоксидантной системы патогенных микроорганизмов.....	97

4.3.3. Индуцибельная NO-синтаза лейкоцитов.....	98
4.3.4. Ксантинооксидаза.....	101
4.4. Участие активных форм кислорода в патологических процессах.....	103
4.5. Взаимодействие активных форм кислорода (АФК) с биологическими молекулами	107
4.5.1. Окислительное повреждение ДНК.....	107
4.5.2. Окислительная деструкция белков.....	111
4.5.3. Перекисное окисление липидов (ПОЛ).....	125
4.5.4. Углеводы как мишень окислительной деструкции.....	131
4.6. Взаимодействие нативных и окисленных биоструктур.....	133
5. СИСТЕМА АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ ОРГАНИЗМА.....	138
5.1. Антиоксиданты, преимущественно действующие на клеточном уровне.....	140
5.2. Антиоксиданты, действующие во внеклеточной среде.....	148
Рекомендуемая литература.....	151

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

A – предэкспоненциальный множитель	АИБН - азодиизобутиронитрил
ADP - аденозиндифосфат	АМК - активные метаболиты кислорода
АН <sub>2</sub> – аскорбиновая кислота	АО - атомная орбиталь
АТФ - аденозинтрифосфат	АФК - активные формы кислорода
CoQ - коэнзим Q	(Г)КС - (гипо)ксантин
D – энергия диссоциации связи, Дж·моль <sup>-1</sup>	ДАГ - диацилглицерол
DAR - дегидроаскорбатредуктаза	КД - ксантиндегидрогеназа
E - редокс-потенциал, эВ	КО - ксантинооксидаза
E <sub>a</sub> - энергия активации, Дж·моль <sup>-1</sup>	ЛМР-лазерный магнитный резонанс
FAD - флавинадениндинуклеотид	ЛФ - лактоферрин
f - стехиометрический коэффициент ингибирования	МДА - малоновый диальдегид
ΔG - энергия Гиббса, Дж·моль <sup>-1</sup>	МО - молекулярная орбиталь
GPO - глутатионпероксидаза	МПО - миелопероксидаза
GR - глутатионредуктаза	Нф-нейтрофил
GSH - глутатион	ПОЛ - перекисное окисление липидов
GST - глутатион-S-трансфераза	СОД - супероксиддисмутаза
ΔH - энтальпия реакции, Дж·моль <sup>-1</sup>	ТФ - трансферрин
I - интенсивность хемилюминесценции	ФТ - ферритин
i - инициатор	ЦП - церулоплазмин
InH - ингибитор окисления	ЭДТА - этилендиаминтетраацетат
IP <sub>3</sub> - инозитол-1,4,5-трифосфат	ЭПР-электронный парамагнитный резонанс
K <sub>m</sub> - константа Михаэлиса, моль·л <sup>-1</sup>	
k - константа скорости	
K - константа равновесия	
NAD(P)H – никотинамидадениндинуклеотид(фосфат)	
pO <sub>2</sub> - парциальное давление кислорода	
R - универсальная газовая постоянная	
RH - окисляемый субстрат	
ROOH - гидропероксид	
ΔS - энтропия реакции, Дж·моль <sup>-1</sup> ·К <sup>-1</sup>	
TDR - тиоредоксинредуктаза	
V - скорость реакции, моль·л <sup>-1</sup> ·с <sup>-1</sup>	
τ - период индукции, с	
v - длина цепи	

Радикальные реакции играют важную роль в промышленности (получение полимеров, синтез кислородсодержащих и галогенсодержащих соединений, крекинг углеводородов, хемолазеры), биологии и медицине. В основе ведущих метаболических процессов в клетках живых организмов лежат окислительно-восстановительные реакции. Среди них особую роль играют свободнорадикальные реакции. Окислительная модификация клеточных структур и ферментов является одним из механизмов их деструкции. Процесс радикального окисления связан с обменом белков, липидов, нуклеиновых кислот, простагландинов и др. Физиологическая роль свободных радикалов велика. Большая часть их генерируется фагоцитами, Т-лимфоцитами при воспалительных реакциях и выполняет защитную функцию, лизируя патогенные микроорганизмы, мутировавшие клетки. Для координации образования свободных радикалов в организме существует система антиоксидантной защиты, представленная ферментативными и неферментативными системами. Про- и антиоксидантные системы находятся в состоянии динамического равновесия. Чрезмерная активация свободнорадикальных процессов влечет за собой целый каскад негативных реакций и патологических процессов, лежащих в основе ряда заболеваний, например: атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, онкологические заболевания и др. Поэтому изучение радикальных реакций окислительной трансформации биоструктур и защитных реакций является актуальной задачей подготовки специалистов биохимического профиля.

Основная цель данного спецкурса - формирование системных знаний о взаимосвязи строения, химических свойств окисляемых субстратов и особенностей протекания радикальных реакций как *in vitro*, так и *in vivo*, в качестве основы для понимания сути окислительного метаболизма биоструктур, его регуляции.

В основу данного спецкурса положен материал, касающийся влияния кислорода и его активных интермедиатов на процессы окисления органических веществ в жидкой фазе, а также деструктивных для живой материи свойств химически активных форм кислорода, механизмов противостояния действию таких агентов у аэробных организмов, а также неспециализированных и специализированных (для защитных целей) механизмов генерации активных форм кислорода.

Материал разбит на 5 тематических модулей:

1. Свободные радикалы и их реакционная способность.
2. Реакции окисления органических соединений молекулярным кислородом в жидкой фазе.
3. Экспериментальные методы изучения радикальных реакций.
4. Процессы окисления биологических молекул.
5. Система антиоксидантной защиты организма.

Представленный в данном курсе материал тесно связан с химической кинетикой, физической химией и биологией.

*Задачи изучения данного спецкурса сводятся к формированию:*

- а) знаний основных закономерностей протекания радикальных процессов, влияния на такие процессы катализаторов и ингибиторов, особенностей протекания таких процессов в клетке, функционирования основных про- и антиоксидантных систем, методов исследования радикалов и реакций, идущих с участием радикальных интермедиатов;
- б) умений использовать знания указанных закономерностей, гипотез, методов для решения биохимических проблем;

В результате изучения данного курса химии студент должен

**Иметь представление:**

- о радикальных реакциях и их влиянии на окислительные процессы в живых системах;
- о современных физико-химических методах исследования структуры и свойств радикальных интермедиатов;
- о новейших достижениях в области изучения радикальных процессов в живых системах;
- об организации системы про- и антиоксидантной защиты.

**Знать и уметь использовать:**

- основные фундаментальные законы химии, необходимые для объяснения радикальных процессов, протекающих в живых организмах;
- общие химические закономерности, лежащие в основе радикальных процессов, протекающих в организме.

**Иметь навыки:**

- проведения исследований, направленных на обнаружение и идентификацию продуктов окислительной деградации биомолекул;
- использования справочников физико-химических величин и табличных данных.

## ПРОГРАММА КУРСА **РАДИКАЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ В КЛЕТКЕ**

### **1. Свободные радикалы и их реакционная способность.**

Открытие свободных радикалов. Пространственная структура радикалов. Энергия диссоциации связей и энтальпии образования радикалов. Магнитные свойства свободных радикалов. Методы обнаружения и исследования свободных радикалов: метод ЭПР, спиновая ловушка, магнитный момент и магнитная восприимчивость.

Реакции, протекающие с участием свободных радикалов. Молекулярные и радикальные реакции. Цепные реакции - пример реакций, идущих с участием свободных радикалов. Условия реализации цепной реакции. Цепная неразветвленная реакция. Особенности реакционной способности молекулярного кислорода.

### **2. Реакции окисления органических соединений молекулярным кислородом в жидкой фазе.**

Элементарные реакции окисления. Катализ окисления органических соединений, особенности катализа окислительных реакций в биологических системах. Ингибирование процессов окисления. Кинетическая классификация антиоксидантов. Механизм действия антиоксидантов. Многократный обрыв цепей на ингибиторах окисления. Синергизм действия ингибиторов окисления.

### **3. Экспериментальные методы изучения радикальных реакций.**

Импульсные методы: импульсный фотолиз, импульсный радиолиз.

Лазерный магнитный резонанс (ЛМР).

Инициированная и автоинициированная цепная реакция.

Фотохимические методы изучения элементарных стадий: секторный метод (метод прерывистого освещения), метод фотохимического преддействия и последствия.

Хемилюминесцентные методы.

Методы изучения ингибиторов цепных реакций: начальная скорость ингибированного окисления (полимеризации), скорость ингибированного окисления как функция времени, кинетика ингибированного окисления, измерение константы скорости реакции взаимодействия ингибитора с радикалами по кинетике расходования ингибитора, хемилюминесцентные методы измерения этой константы. Методы изучения реакций радикалов, образующихся из ингибитора: кинетика ингибированного окисления, кинетика образования радикала ингибитора.

### **4. Процессы окисления биологических молекул.**

Радикальные реакции в клетке. Активные формы кислорода. Возбужденные формы молекулярного кислорода. Свободнорадикальные интермедиа-ты одноэлектронного пути восстановления кислорода.

Функциональная роль активных метаболитов кислорода в системе защитных реакций организма. Специализированные системы генерации активных метаболитов кислорода: NADPH-оксидаза лейкоцитов, пероксидаза нейтрофильных гранулоцитов (миелопероксидаза, МПО), лактоферрин как потенциальный фактор каталитической продукции гидроксильных радикалов и



дезорганизации антиоксидантной системы патогенных микроорганизмов, индуцибельная NO-синтаза лейкоцитов, ксантинооксидаза. Участие активных форм кислорода в патологических процессах.

Влияние активных форм кислорода на биологические молекулы. Окислительное повреждение ДНК. Окислительная деструкция белков: механизмы окислительного повреждения белков, образование ковалентных связей между полипептидными цепями, фрагментация полипептидных цепей, окислительная модификация аминокислотных остатков, гидропероксидные производные как продукты окислительной модификации аминокислотных остатков, механизм сайт-специфического повреждения белков. Перекисное окисление липидов (ПОЛ). Углеводы как мишень окислительной деструкции. Взаимодействие нативных и окисленных биоструктур.

### **5. Система антиоксидантной защиты организма.**

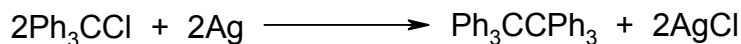
Функционирование системы антиоксидантной защиты организма. Антиоксиданты, преимущественно действующие на клеточном уровне: супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионовый цикл (глутатион, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза), липоевая кислота, тиоредоксинредуктаза, глутатионтрансфераза, низкомолекулярные антиоксиданты, механизм антиоксидантного действия. Антиоксиданты, действующие во внеклеточной среде: церулоплазмин, трансферрин, ферритин, гаптоглобин и гемопексин, альбумин, мочевая кислота, аскорбат,  $\alpha$ -токоферол, механизм их действия.

Синтетические и природные антиоксиданты. Их применение в промышленности, медицине.

# 1. СВОБОДНЫЕ РАДИКАЛЫ

## 1.1. Открытие свободных радикалов

Впервые идея о возможности образования свободных радикалов была высказана 1900 году Мозесом Гомбергом. При проведении синтеза гексафенилэтана по реакции:

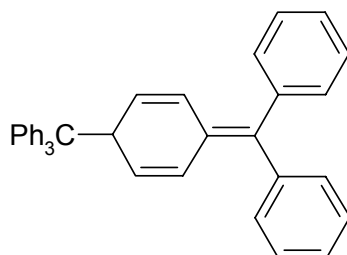


было получено вещество, резко отличающееся по химическим свойствам от ожидаемого. Оно быстро реагировало с кислородом, образуя пероксид, быстро вступало в реакцию с молекулярным йодом и т. д. На основании полученных результатов М. Гомберг предположил, что полученное вещество содержит трехвалентный углерод, т.е. является свободным трифенилметильным радикалом  $\text{Ph}_3\text{C}^\bullet$ <sup>1</sup>.

После работ Гомберга возник вопрос: является ли трифенилметил исключением, или могут существовать в свободном состоянии другие «осколки» молекул, например, метил или даже отдельные атомы - водорода, кислорода, серы и других элементов. Такие осколки, в которых один из электронов не имеет пары (неспаренный электрон часто обозначают точкой), химики назвали свободными радикалами - в отличие от «обычных» молекул, которые являются валентнонасыщенными. Наличие неспаренного электрона обуславливает высокую активность свободных радикалов, а также трудности в их обнаружении и определении.

Доказательством существования свободных радикалов стали опыты по термолизу тетраметилсвинца, которые провели немецкие химики Фридрих Адольф Панет со своим учеником Вильгельмом Хофедицем (1929г.). Пропуская по трубке азот, насыщенный парами тетраметилсвинца, в нагретой трубке наблюдалось образование металлического свинцового зеркала, а на выходе в потоке азота содержался этан. Когда горелка передвигалась вдоль трубки навстречу току газа, то в новом месте нагрева появлялось новое зеркало, а старое постепенно исчезало. Все эти явления Панет и Хофедиц объяснили тер-

<sup>1</sup> История открытия Гомберга имела интересное продолжение. Полученные им результаты и их трактовка были достаточно убедительными; трифенилметил получил даже название радикала Гомберга. Однако в 1968 г. методом ЯМР было установлено строение продукта реакции хлористого трифенилметана с серебром. Этим продуктом оказалось соединение хиноидной структуры:



находящееся в равновесии с трифенилметильным радикалом в отсутствие кислорода.

молизом  $\text{Me}_4\text{Pb}$  и образованием свободных метильных радикалов:  $(\text{CH}_3)_4\text{Pb} \rightarrow 4\text{CH}_3^\bullet + \text{Pb}$ ; в токе инертного азота они могут «жить» некоторое время, а исчезают либо за счет рекомбинации, превращаясь в этан:  $2\text{CH}_3^\bullet \rightarrow \text{C}_2\text{H}_6$ , либо реагируя с металлическим зеркалом:  $4\text{CH}_3^\bullet + \text{Pb} \rightarrow (\text{CH}_3)_4\text{Pb}$ ;  $2\text{CH}_3^\bullet + \text{Zn} \rightarrow (\text{CH}_3)_2\text{Zn}$  и т.д.

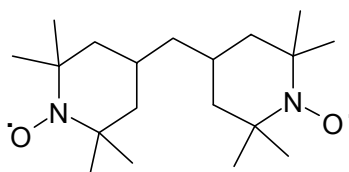
## 1.2. Пространственная структура радикалов

Свободный радикал (монорадикал) можно определить как нейтральную частицу с нечетным числом электронов на внешней электронной оболочке ( $\text{CH}_3^\bullet$ ,  $\text{HO}^\bullet$ ,  $\text{RO}_2^\bullet$ ).

Если в радикале неспаренный электрон локализован преимущественно на  $2p$ - или  $\pi$ -орбиталях, то это  $\pi$ -радикал. Например, этильный  $\text{CH}_3\text{CH}_2^\bullet$ , бензильный  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2^\bullet$ , аллильный  $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2^\bullet$ . Превращения молекулы, где атом С имеет  $sp^3$ -гибридизацию орбиталей и тетраэдрическое строение (например,  $\text{CH}_4$ ) в  $\pi$ -радикал с  $sp^2$ -гибридизацией у атома С (например,  $^\bullet\text{CH}_3$ ) сопровождается изменением пространственного расположения атомов (метан имеет тетраэдрическое строение с углом  $\text{HCH}$  в  $109^\circ$ , а метильный радикал имеет плоское строение с углом  $\text{HCH}$  в  $120^\circ$ ).

Если в радикале неспаренный электрон локализован на  $\sigma$ -орбитали и сохраняет электронную конфигурацию исходной молекулы, то это  $\sigma$ -радикал (фенильный  $\text{C}_6\text{H}_5^\bullet$ , винильный  $\text{CH}_2=\text{CH}^\bullet$ , формильный  $\text{HC}^\bullet=\text{O}$ ).

Кроме монорадикалов встречаются бирадикалы, которые имеют в своем составе два неспаренных электрона, например молекулярный кислород, бис(2,2,6,6-тетраметилпиперидоксил)метан:



## 1.3 Энергия диссоциации связей и энтальпии образования радикалов

В двухатомной молекуле энергия диссоциации связи ( $D$ ) определяется атомами, которые ее образуют. Энергия диссоциации молекул, в которых атомы связаны одинарной  $\sigma$ -связью, меняется в широких пределах:

$\sigma$ -связь	I-I	F-F	Br-Br	Cl-Cl	H-H
$D$ , кДж/моль	151	159	193	243	436
$\sigma$ -связь	Br-Cl	H-I	H-Br	H-Cl	H-F
$D$ , кДж/моль	217	298	366	432	570

В молекулах с кратными связями наблюдается упрочнение связи:

Кратн. связь	N=N	O=O	C=O	N=O	S=O
D, кДж/моль	945	498	1076	630	522

Энергия диссоциация связи в многоатомной молекуле зависит от атомов, ее образующих:

Молекула	HO- H	H <sub>2</sub> N- H	CH <sub>3</sub> - H	HS- H	H <sub>3</sub> Si- H
D, кДж/моль	498	449	440	381	378

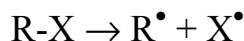
Существенное влияние оказывают и заместители у атома, образующего эту связь, например

Молекула	H <sub>3</sub> C- H	MeH <sub>2</sub> C- H	Me <sub>2</sub> HC- H	Me <sub>3</sub> C- H	PhH <sub>2</sub> C- H
D, кДж/моль	440	422	412	400	375

Важное значение имеет степень гибридизации атомных орбиталей атома С, образующего связь:

Молекула	Me <sub>2</sub> CH-Н	CH <sub>2</sub> =CH-Н	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -Н	HC≡C-Н
Тип гибридизации	sp <sup>3</sup>	sp <sup>2</sup>	sp <sup>2</sup>	sp
D, кДж/моль	412	464	474	548

Свободный радикал R<sup>•</sup> образуется в результате разрыва связи R-X. Энтальпию его образования можно оценить через энтальпию гомолитического расщепления R-X-связи, а последняя равна ее D:



$\Delta H(RX) + D(R-X) = \Delta H(R^{\bullet}) + \Delta H(X^{\bullet})$ . В свою очередь,  $\Delta H(X^{\bullet}) = 0.5D(X-X)$  и  $\Delta H(R^{\bullet}) = \Delta H(RX) - 0.5D(X-X) + D(R-X)$ . При сравнении  $\Delta H(R^{\bullet})$  с  $\Delta H(RH)$  видно, что энтальпия образования радикала намного превышает энтальпию образования материнских молекул. Это означает, что радикал несет в себе высокий запас химической энергии в виде неспаренного электрона. Стандартные энтальпии образования для многих радикалов определены.

## **1.4. Магнитные свойства свободных радикалов. Методы обнаружения и исследования свободных радикалов**

### **1.4.1. Метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР)**

Свободный радикал имеет неспаренный электрон на внешней электронной оболочке и, соответственно, спин  $S = 1/2$ . Это свойство свободных радикалов и атомов лежит в основе электронного парамагнитного резонанса, как метода обнаружения и изучения свободных радикалов. В отсутствие магнитного поля спины неспаренных электронов ориентированы хаотично. В магнитном поле спины электронов взаимодействуют с полем и ориентируются параллельно или антипараллельно силовым линиям магнитного поля. Энергия

этого взаимодействия  $\Delta E$  прямо пропорциональна напряженности магнитного поля  $H$ :

$$\Delta E = -g\mu_B H \quad (1)$$

где  $g$  - т. н.  $g$ -фактор или фактор Ланде,  $\mu_B$  - магнетон Бора.

В магнитном поле происходит распределение частиц по энергиям их взаимодействия с магнитным полем в соответствии с ориентацией спина: параллельно ( $m_s = +1/2$ ) или антипараллельно ( $m_s = -1/2$ ) линиям напряженности поля. Энергия такого взаимодействия лежит в микроволновом диапазоне (длина волны от 1 мм до 100 см). При облучении системы, в которой имеются свободные электроны, микроволновым излучением происходит его поглощение на частоте  $\nu$ , которая удовлетворяет равенству:

$$h\nu = g\mu_B H \quad (2)$$

Поглощая энергию, частица с неспаренным электроном переходит с нижнего на верхний энергетический уровень. Больцмановское равновесие поддерживается за счет обратного безизлучательного релаксационного перехода частиц с верхнего энергетического уровня на нижний.

Современные ЭПР радиоспектрометры работают на длине волны 3 см ( $\nu = 9500$  Гц) в области напряженности магнитного поля около 3500 Га. ЭПР спектрометр включает в себя следующие основные узлы: источник микроволнового излучения (клистрон); ячейку, в которой находится образец со свободными радикалами, поглощающий излучение; электромагнит, создающий в пространстве, куда помещена ячейка, постоянное магнитное поле; детектор, где измеряется поглощенная энергия, и системы управления, регистрации и записи. На основании полученных спектров проводится анализ радикальных интермедиатов. На рис. 1 приведены ЭПР-спектры токоферильных радикалов и радикала убихинона.

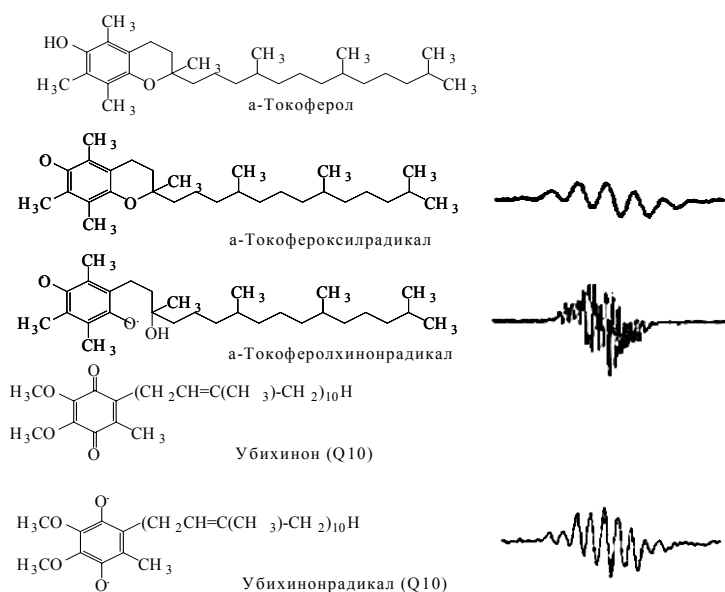


Рис. 1. ЭПР-спектры токоферильных радикалов и радикала убихинона.

Полученные спектры позволяют не только детектировать радикалы, но и определять их строение.

**g-Фактор.** Этот фактор является физической характеристикой каждой индивидуальной частицы и может существенно меняться от одной частицы к другой. Величина g-фактора зависит как от спина электрона, так и от его орбитального момента. Этот фактор несет информацию об электронной структуре частицы и симметрии ее электронной оболочки. g-Фактор вычисляется по формуле (2) при известных (измеренных)  $\nu$  и  $H$ .

**Сверхтонкое расщепление.** Если в состав частиц входит один или несколько атомов, имеющих ядерный спин, то в такой частице возникает взаимодействие между спином электрона и ядерным спином (спин-спиновое взаимодействие). В магнитном поле ядерные спины также ориентируются параллельно или антипараллельно напряженности магнитного поля. В силу этого неспаренный электрон радикала находится в поле, созданном внешним электромагнитом и собственным магнитным моментом ядра атома, находящегося по соседству.

В зависимости от ядерного спина  $I$ , который приобретает в магнитном поле ряд  $(2I + 1)$  дискретных ориентаций, линия поглощения неспаренного электрона расщепляется на  $2I + 1$  линию (сверхтонкое расщепление). Ядро протона имеет спин  $1/2$ . Поэтому в ЭПР спектре атомарного водорода наблюдается дублет (две линии поглощения). В метильном радикале неспаренный электрон взаимодействует со спинами ядер трех эквивалентных атомов водорода, и поэтому в спектре ЭПР наблюдается квартет линий, из которых 2 более интенсивные.

Количественное измерение величины сверхтонкого расщепления дает подробные сведения о молекулярной орбите, на которой локализован неспаренный электрон. По интенсивности линий ЭПР-спектра сверхтонкого расщепления  $\pi$ -радикалов можно судить об электронной плотности на том атоме углерода, с которым связан атом водорода.

**Ширина линии поглощения ЭПР-спектра.** На ширину линии ЭПР-спектра радикала влияют следующие 3 фактора.

1. Спин-решеточное взаимодействие, при котором спины передают избыток своей энергии окружающим частицам за время спин-решеточной релаксации  $T_1$ .

2. Дипольное спин-спиновое взаимодействие между спинами двух радикалов; время такого взаимодействия  $T_2$ . Чем выше концентрация радикалов в образце, тем чаще они взаимодействуют и тем меньше  $T_2$ .

3. Обменное взаимодействие.

**Интегральная интенсивность линий ЭПР-спектра.** Площадь под кривой поглощения ЭПР-спектра прямо пропорциональна концентрации свободных радикалов в образце.

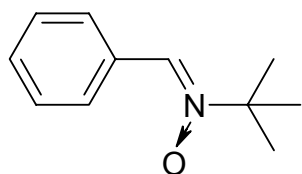
Для абсолютной калибровки ЭПР-спектрометра используют стандартный образец с известным числом спинов. Если нужно оценить только относительную концентрацию радикалов, то можно использовать высоту линии поглощения.

**Уширение линии поглощения ЭПР-спектра, вызванное насыщением.** Поглощение микроволнового излучения сопровождается переходом радикалов из основного в возбужденное состояние (с низшего на высший энергетический уровень). Чем интенсивнее излучение, тем быстрее происходит заселение высшего зеемановского уровня. Пока процесс релаксации протекает быстро (много быстрее, чем возбуждение под действием излучения), соотношение между концентрациями радикалов с параллельными и антипараллельными ориентациями спинов подчиняется закону распределения Больцмана. Однако при очень интенсивной накачке верхнего уровня это соотношение нарушается: скорость релаксации становится соизмеримой со скоростью возбуждения спинов. При таких условиях облучения происходит уширение полосы поглощения ЭПР-спектра и нарушается пропорциональность между высотой ЭПР-сигнала и концентрацией свободных радикалов в образце.

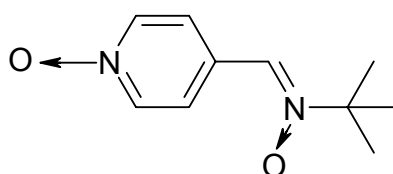
#### 1.4.2. Спиновая ловушка.

Многие радикалы ( $\text{HO}^\bullet$ ,  $\text{RO}^\bullet$ ,  $\text{CH}_3^\bullet$ ) и атомы ( $\text{H}^\bullet$ ,  $\text{D}^\bullet$ ) очень активны и быстро реагируют с растворителем. Для их детектирования применяется метод спиновых ловушек.

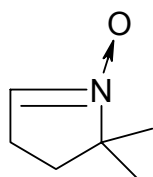
Спиновые ловушки – это индивидуальные химические вещества (диамагнитные), способные реагировать с короткоживущими радикалами, образуя персистентные парамагнитные соединения - спиновые аддукты, регистрируемые с помощью спектроскопии ЭПР. Эти соединения применяются для изучения различных процессов, протекающих с участием свободных радикалов. ЭПР спектры образующихся спиновых аддуктов позволяют устанавливать строение генерируемых в системе свободных радикалов, и получать данные о кинетике и механизме протекающих в системе свободнорадикальных реакций. В качестве спиновых ловушек чаще используют две группы соединений: нитроны и нитрозосоединения:



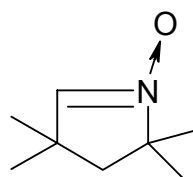
фенилбутилнитрон



1-пиридин-N-оксидбутилнитрон

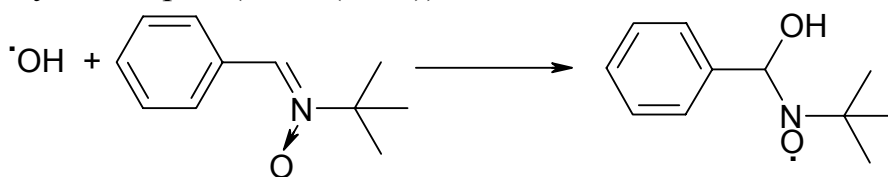


5,5-диметил-1-пирролин-N-оксид



3,3,5,5-тетраметил-1-пирролин-N-оксид

Спиновые ловушки добавляют к изучаемому образцу (например, к суспензии клеток, ткани или к раствору, где протекают реакции с участием свободных радикалов). Например, для захвата радикалов гидроксила  $\text{HO}^\bullet$  используют фенилбутилнитрон (ФБН (PBN)):



При взаимодействии ловушки с радикалом происходит присоединение радикала к ловушке с образованием нового, стабильного радикала - спинового аддукта (от англ. add - добавлять). Сигналы ЭПР спиновых аддуктов разных радикалов слегка различаются по форме. Это позволяет идентифицировать радикалы, образующиеся в изучаемой системе. На рис. 2 приведены примеры ЭПР-спектров спиновых аддуктов гидроксильного радикала с фенилбутилнитроном в различных системах.

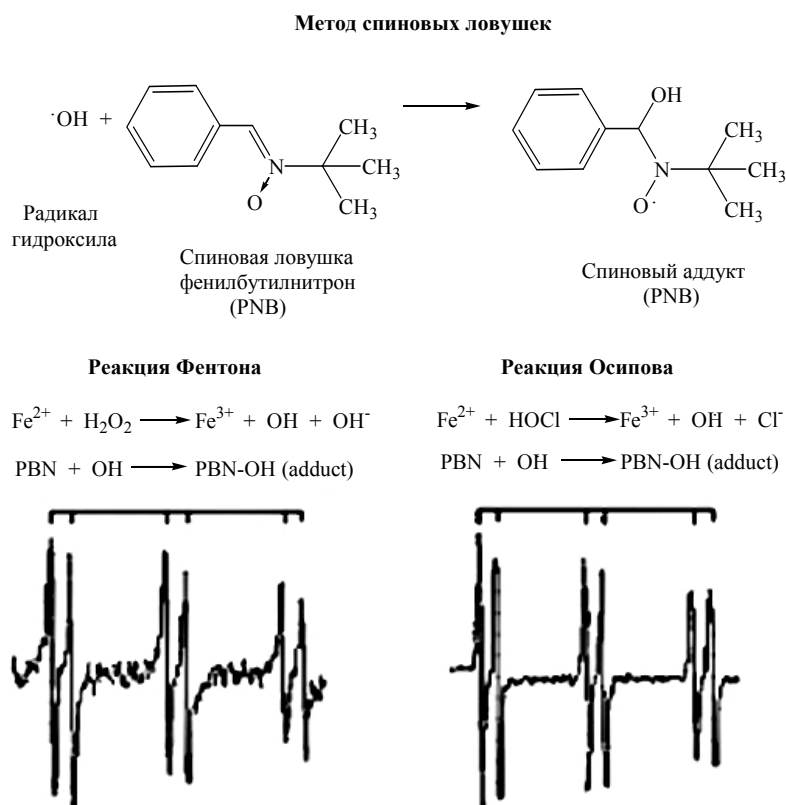


Рис. 2. ЭПР-спектры спиновых аддуктов гидроксильного радикала, образующегося в реакциях Фентона и Осипова с фенилбутилнитроном.

Метод спиновых ловушек имеет следующие преимущества:

1. Он позволяет измерять скорость генерирования радикалов в самых разнообразных условиях.



2. Этот метод делает возможным детектировать в водном растворе, радикалы:  $O_2^{\bullet-}$ ,  $HO_2^{\bullet}$ ,  $RO^{\bullet}$ ,  $RO_2^{\bullet}$ ,  $RS^{\bullet}$ , которые не удается детектировать непосредственно.

3. Метод спиновых ловушек - интегральный метод. Поскольку время жизни спинового аддукта много больше времени жизни детектируемого радикала, то этот метод позволяет накапливать аддукт в высокой концентрации и детектировать его.

4. Спиновый аддукт несет в своем спектре информацию о том, какой радикал к нему присоединяется. Эта информация заключена в структуре сверхтонкого расщепления спин-аддукта.

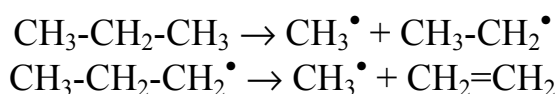
### 1.4.3. Магнитный момент и магнитная восприимчивость

Свободные радикалы обладают неспаренным электроном, который придает всей частице постоянный магнитный момент. Когда образец, содержащий свободные радикалы, помещается в неоднородное магнитное поле, магнитные моменты радикалов взаимодействуют с магнитным полем, в результате чего возникает сила, втягивающая образец в область сильного магнитного поля. Если образец не содержит частиц с неспаренным электроном, а его молекулы диамагнитны, то возникает обратный эффект: магнитное поле выталкивает диамагнитный образец. Выталкивающее действие магнитного поля есть результат взаимодействия магнитного поля с магнитными моментами, наведенными этим полем в диамагнитных молекулах. Таким образом, парамагнетизм является экспериментальным доказательством того, что в образце существуют частицы (свободные радикалы), обладающие магнитным моментом, а, следовательно, и неспаренным электроном. Исключение составляет небольшое число молекул, имеющих магнитный момент при четном числе электронов в электронной оболочке (например, молекула кислорода  $O_2$ , основное электронное состояние которой - триплетное). Магнитную восприимчивость образца можно измерить экспериментально.

## 1.5. РЕАКЦИИ, ПРОТЕКАЮЩИЕ С УЧАСТИЕМ СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ

### 1.5.1. Молекулярные и радикальные реакции

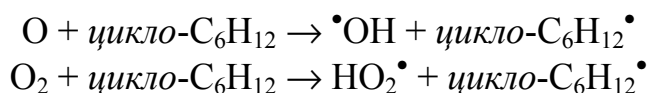
Сравним мономолекулярный распад молекулы и аналогичного по строению свободного радикала: пропана и *n*-пропильного радикала:



Первая реакция протекает при 500 К с константой скорости  $k = 6 \cdot 10^{-19} \text{ с}^{-1}$ , а вторая с  $k = 4 \text{ с}^{-1}$ . Такое огромное различие в константах скорости (19 порядков) обусловлено тем, что при распаде *n*-пропильного радикала разрыв С-С-связи компенсируется образованием  $\pi$ -С-С-связи (прочность этой связи

240 кДж/моль), а при распаде пропана такой компенсации нет. В свою очередь, образование  $\pi$ -С-С-связи предопределено наличием у пропильного радикала неспаренного электрона, который и принимает участие в образовании двойной связи при разрыва С-С-связи. Аналогичная ситуация наблюдается, если сравнивать распад спирта и алкоксильного радикала, альдегида и ацильного радикала и т. п.

Различия в константах скоростей наблюдаются и для реакций молекулярного и атомарного кислорода.



Окислитель	$k$ , л·моль·с <sup>-1</sup>	lgA	$E_a$ , кДж/моль	$\Delta H^0$ , кДж/моль
O	$5.6 \cdot 10^7$	10.12	13.6	-22
O <sub>2</sub>	$5.7 \cdot 10^{-17}$	12.90	169	167

И в этом примере наблюдается огромное различие в активности атома и молекулы. Сравним термодинамические характеристики этих двух частиц:

Окислитель	$\Delta G^0$ , кДж/моль	$\Delta H^0$ , кДж/моль	$\Delta S^0$ , Дж/моль
O	-61.5	0	205
O <sub>2</sub>	200.7	249	161

Видно, что O и O<sub>2</sub> различаются по величине  $\Delta G^0$ . Такое различие связано с разницей в энтальпиях образования частиц. Атом кислорода несет в себе большой запас химической энергии, что и проявляется в реакции отрыва: в случае O<sub>2</sub> эта реакция эндотермична, а в случае O - экзотермична. Отсюда такое большое различие в энергиях активации и константах скорости.

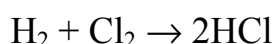
Высокую активность атомы и радикалы проявляют и в реакциях присоединения. Ниже приведены константы скорости реакций присоединения к стиролу атома водорода, *трет*-бутоксильного радикала, пероксидного радикала, образующегося при окислении стирола, алкильного макрорадикала стирола, полимеризующегося в растворе и кислорода (реакции протекают в растворе при 313 К):

Частица, X <sup>•</sup>	H <sup>•</sup>	Me <sub>3</sub> CO <sup>•</sup>	R <sup>•</sup>	RO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	O <sub>2</sub>
$k$ , л·моль·с <sup>-1</sup>	$5 \cdot 10^9$	$10^3$	89	68	$5.6 \cdot 10^{-10}$
$E_a$ , кДж/моль	~0	~0	30	35	125
$\Delta H^0$ , кДж/моль	-156	-104	-84	-60	125
D(X-H), кДж/моль	396	344	324	300	115

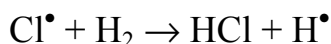
Атом водорода реагирует очень быстро. Достаточно быстро присоединяются свободные радикалы. Очень медленно присоединяется молекулярный кислород. Главная причина - экзотермичность реакций радикального присое-

динения, что обусловлено высокой прочностью вновь образующейся связи. Для всех приведенных радикалов энергия образующейся связи выше энергии разрывающейся  $\pi$ -C-C-связи, равной 240 кДж/моль. Иная ситуация в реакции присоединения  $O_2$  по двойной связи. Энергия образующейся связи (115 кДж/моль) меньше, чем таковая  $\pi$ -C-C-связи, поэтому реакция эндотермична. Ее энергия активации высока, а константа скорости очень мала.

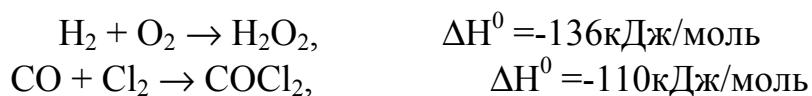
Различия в протекании реакций с участием атомов и радикалов также связаны с энергией активации процесса. Во многих случаях экзотермические молекулярные реакции требуют для своего протекания очень высокой энергии активации и поэтому практически не осуществляются. Например, реакция



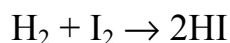
протекает с высоким выделением тепла, ее энтальпия  $\Delta H^0 = -181$  кДж/моль, т.е. реакция весьма экзотермична, но ее энергия активации (по квантово-химическому расчету) превышает 150 кДж/моль. В то же время термонейтральная реакция



протекает с энергией активации в 23 кДж/моль и константой скорости  $k = 8 \cdot 10^6 \text{ л}^{-1} \cdot \text{моль} \cdot \text{с}$  (300К). Не осуществляются также такие термодинамически выгодные реакции как



Это вызвано тем, что при адиабатическом протекании каждой реакции обязательно должен соблюдаться принцип сохранения орбитальной симметрии. Согласно этому принципу, реакция разрешена при условии совпадения квантовых чисел, характеризующих электронные орбитали реагентов и продуктов, т.е. симметрии квантовых характеристик рвущихся и образующихся связей. Если такая симметрия нарушена, то в образовании переходного состояния должны принимать участие незанятые высокоэнергетические орбитали реагентов, а это ведет к очень высокой энергии активации. Реакция  $H_2 + O_2 \rightarrow H_2O_2$  запрещена, например, потому, что в ней молекула кислорода находится в триплетном состоянии, а образующийся  $H_2O_2$  в синглетном, т.е. формально нарушается закон сохранения спина. Для протекания такой реакции необходим синглетный кислород, т.е. требуется возбуждение  $O_2^2$ . Реакция



также протекает с нарушением симметрии орбиталей. В переходном состоянии происходит конфигурационное смещение этих орбиталей, что и приводит к высокой энергии активации такой реакции. Аналогичная ситуация наблюдается для реакций  $H_2 + Cl_2$ , и многих других. В случае реакций атомов и свобод-

<sup>2</sup>Напомним, что основное электронное состояние  $O_2$  – триплетное.

ных радикалов с молекулами принцип сохранения симметрии орбиталей обычно выполняются, так как у радикала всегда есть одна не заполненная связывающая орбиталь, что и обеспечивает непересечение орбиталей при образовании продуктов. Это, в свою очередь, приводит к невысоким энергиям активации для реакций с  $\Delta H \leq 0$ .

Таким образом, свободные атомы и радикалы как реагенты имеют два важных преимущества перед молекулами.

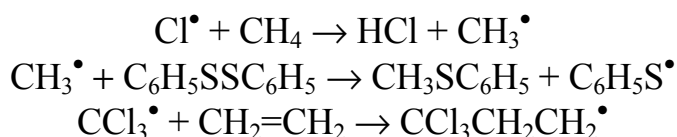
- Во-первых, они обладают высоким запасом химической энергии и поэтому многие реакции с их участием протекают с  $\Delta H \leq 0$ , в то время как аналогичные реакции с участием только молекул часто эндотермичны.
- Во-вторых, наличие у свободного радикала незаполненной связывающей орбитали снимает с радикальных реакций квантово-химические запреты, вытекающие из принципа сохранения симметрии молекулярных орбиталей, справедливые для многих молекулярных реакций.

Поэтому экзотермические или термонейтральные радикальные реакции протекают с невысокой энергией активации. Правда, в соответствии с этими же двумя особенностями очень быстро (с очень малой энергией активации) протекает рекомбинация, а также диспропорционирование свободных радикалов.

### 1.5.2. Цепные реакции - пример реакций, идущих с участием свободных радикалов.

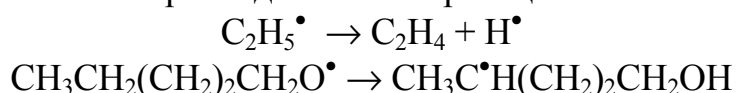
**Условия реализации цепных реакций.** Среди разнообразных радикальных реакций особое место занимают цепные процессы как класс специфических химических превращений<sup>3</sup>. Большой опыт их изучения позволил сформулировать условия, при выполнении которых реализуется цепной радикальный процесс. Эти условия вытекают из общих свойств радикальных превращений, из строения реагирующих веществ, а также из условий проведения реакции.

Принцип сохранения (неуничтожимости) свободной валентности. Свободный атом или радикал (монорадикал) имеет нечетное число электронов. Исключение составляют атомы благородных газов. Валентнонасыщенные молекулы, как правило, имеют четное число электронов. Поэтому в реакциях радикала или атома с молекулой неизбежно образуется атом или радикал, например:

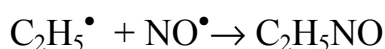


<sup>3</sup> Цепные реакции - химические реакции, идущие путем последовательного чередования одних и тех же элементарных стадий, в каждой из которых возникает одна или несколько активных частиц (атомов, свободных радикалов, ион-радикалов). По цепному механизму протекают реакции крекинга, горения, полимеризации, окисления и ряд других реакций.

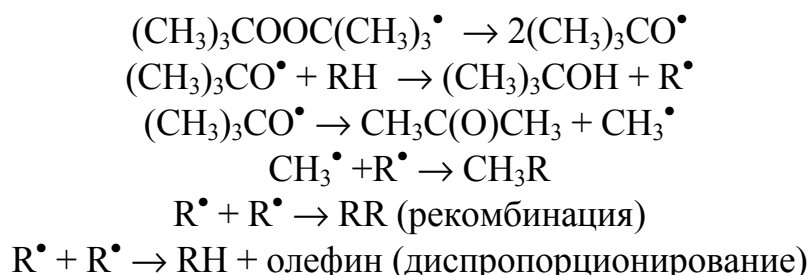
Сохраняется свободная валентность и в мономолекулярных реакциях монарадикалов, таких как распад или изомеризация:



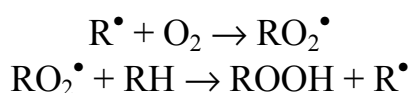
Таким образом, во всех реакциях, в каждой из которых принимает участие один атом или радикал, свободная валентность не исчезает, а сохраняется. Этот принцип неуничтожимости свободной валентности в реакциях, где атом или монарадикал превращается мономолекулярно или реагирует с валентнонасыщенными (имеющими четное число электронов) молекулами, является естественным следствием сохранения числа электронов при превращении реагентов в продукты. Это условие не выполняется, если реагирующая с радикалом частица имеет нечетное число электронов:



Принцип цикличности радикальных стадий. Из рассмотрения разнообразных радикальных реакций следует, что далеко не всегда среди реагентов, где возникают свободные радикалы, реализуется цепная реакция. Например, при распаде трет-бутилпероксида в углеводороде RH протекают следующие реакции:

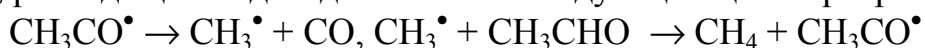


В результате распада пероксида образуется ряд продуктов взаимодействия радикалов  $(\text{CH}_3)_3\text{CO}^\bullet$ ,  $\text{C}^\bullet\text{H}_3$  и  $\text{R}^\bullet$ , а цепной процесс в такой системе не возникает. Но если в систему пероксид–RH ввести еще и кислород, то возникает цепь реакции окисления:



Различие между системами инициатор–RH и инициатор–RH–O<sub>2</sub> в том, что в первом случае не может осуществиться цикл превращений с возрождением радикалов R<sup>•</sup>, а во втором случае возникает последовательность элементарных превращений с регенерацией исходного радикала R<sup>•</sup>. Анализ аналогичных систем приводит к следующему выводу: Цепная реакция возникает только в такой системе, где радикалы вступают в последовательные превращения с сохранением свободной валентности, образуя цикл (звено цепи). Многократное повторение такого цикла в реагирующей системе представляет собой цепную реакцию. В звено цепного процесса могут входить разнообразные ради-

кальные реакции распада, присоединения, отрыва, замещения, изомеризации. Например, распад ацетальдегида включает следующий цикл превращений:



хлорирование метана

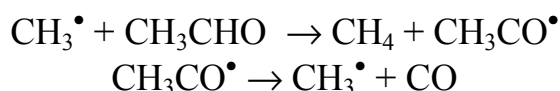


сульfoxлорирование углеводорода RH



Последовательность элементарных реакций радикального процесса, приводящая к регенерации исходной формы радикала, называется звеном цепи, а каждая из этих стадий - актом продолжения цепи.

Условие приоритетности реакции продолжения цепи. Когда среди реагентов возникают свободные радикалы, то неизбежно протекают два принципиально разных типа реакций: реакции с сохранением свободной валентности и реакции радикалов (атомов) друг с другом (рекомбинация или диспропорционирование), в которых происходит гибель частиц со свободной валентностью. Например, возникающие в парах ацетальдегида ацильные радикалы либо распадаются, вызывая цикл превращений, описанный выше, либо рекомбинируют, образуя диацетил. Цепной распад ацетальдегида возникает в таких условиях, когда быстрее протекает последовательность реакций



чем рекомбинация ацетильных радикалов. Для этого необходима, прежде всего, достаточно высокая температура, так как распад ацетильного радикала - эндотермический процесс. Следовательно, для цепного процесса необходимо создание таких условий, когда образующиеся в системе радикалы преимущественно вступают в реакции с сохранением свободной валентности.

Наконец, существует еще одно важное условие реализации цепного процесса. Первые три условия обуславливают осуществление процесса по цепному механизму, когда в системе уже появились свободные радикалы. Реализоваться такой процесс может лишь при непрерывном образовании радикалов в системе. Так, например, виниловые мономеры  $\text{CH}_2=\text{CHX}$  начинают полимеризоваться только после введения инициатора - термически нестойкого соединения или облучения светом, перекисное окисление липидов начинается в присутствии ионов металлов переменной валентности, в частности  $\text{Fe}^{2+}$ . Достаточно интенсивное иницирование часто достигается повышением температуры, что приводит к образованию радикалов из реагентов.

Таким образом, цепные радикальные реакции реализуются в силу принципа неуничтожимости свободной валентности в реакциях радикалов с молекулами при таком подборе реагентов, когда в системе становятся возможными

циклические реакции с регенерацией исходной радикальной формы. Реализуются цепные реакции при непрерывном генерировании радикалов и таких условиях, когда цикл радикальных реакций с сохранением свободной валентности протекает быстрее, чем реакции гибели частиц - носителей свободной валентности.

**Цепная неразветвленная реакция.** Цепная реакция состоит, как правило, из большого числа стадий. Эти стадии в зависимости от их роли и места в совокупном цепном процессе делят на стадии зарождения, продолжения и обрыва цепей.

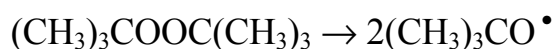
*Зарождение цепи.* Как уже отмечалось, для осуществления цепного процесса необходимо непрерывное генерирование в системе свободных радикалов. Элементарные реакции или физические процессы образования свободных радикалов из молекул называются стадиями зарождения цепей. Источником радикалов могут быть исходные реагенты. Например, крекинг бутана начинается с распада его молекулы на свободные радикалы:



Так как С-С-связь прочная, то такой распад идет очень медленно. Если в исходных реагентах радикалы возникают медленно, то вводят *инициаторы* - молекулы, сравнительно быстро распадающиеся на свободные радикалы.

Инициаторы свободно-радикальных реакций - соединения, достаточно легко распадающиеся на радикалы в условиях эксперимента или технологического процесса. Инициаторами являются органические соединения, которые имеют в своей структуре слабые связи, такие как N-N, N-C, O-O, N-O и др. В качестве инициаторов свободно-радикальных реакций широко применяют соединения следующих классов.

1. Пероксиды, имеющие в своем составе O-O связь. Диалкилпероксиды, например,  $(\text{CH}_3)_3\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$  (дитрет.бутилпероксид или пероксид, 1,1-диметилэтил-), распадающийся по O-O-связи с образованием двух алкоксильных радикалов:



Диацилпероксиды, например, дибензоилпероксид  $\text{C}_6\text{H}_5\text{C}(\text{O})\text{OOC}(\text{O})\text{C}_6\text{H}_5$ .

Перэфиры, например, трет.бутилбензоилперэфир  $(\text{CH}_3)_3\text{COOC}(\text{O})\text{Ph}$ .

Гидропероксиды, например, кумилгидропероксид,  $\text{PhMe}_2\text{COOH}$ .

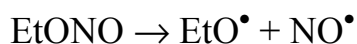
2. Азосоединения  $\text{R-N=N-R}$ , например, азодиизобутиронитрил  $(\text{CH}_3)_2(\text{CN})\text{CN}=\text{NC}(\text{CN})(\text{CH}_3)_2$ :



3. Полифенилалканы, например, 2,2,3,3-тетрафенилбутан:

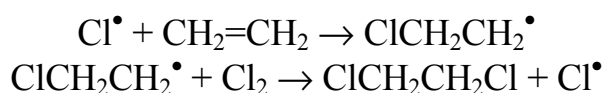


4. Нитриты, например, этилнитрит:

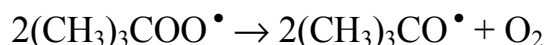


Для инициирования цепной реакции необходимо генерировать в системе такие радикалы, которые затем вступают в реакцию с реагентом и начинают цикл стадий продолжения цепи. Если этого не происходит, то цепная реакция не развивается. Например, динитрил азоизомасляной кислоты инициирует полимеризацию виниловых мономеров, так как возникающие из него радикалы быстро присоединяются по двойной связи непредельных соединений. Однако, этот инициатор не инициирует сульфоокисление алканов, так как цианозпропильные радикалы не реагируют с  $\text{SO}_2$ . Поэтому генерирование цианозпропильных радикалов в системе  $\text{RH-SO}_2\text{-O}_2$  не вызывает появления радикалов  $\text{R}^\bullet$  и, следовательно, не запускает цикл цепных превращений.

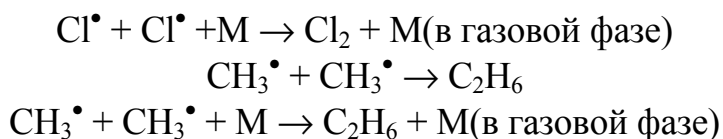
*Продолжение цепи.* Как уже отмечалось выше, цепная реакция может возникнуть в таких реагентах, где свободный радикал или атом вызывает цикл превращений с регенерацией исходной радикальной формы. Например, в смеси хлора с этиленом реализуется последовательность реакций:



в результате которой хлор и этилен превращаются в дихлорэтан с регенерацией атома хлора, начинающего цепной процесс. Цикл радикальных реакций, в которых сохраняется свободная валентность и является, как уже сказано выше, звеном цепной реакции. Иногда в цепных процессах встречаются реакции двух радикалов с сохранением свободной валентности, как, например:

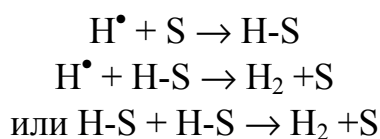


*Обрыв цепей.* Реакция (или совокупность реакций), в результате которой погибают ведущие цепную реакцию радикалы, называется стадией обрыва цепей. Стадии обрыва цепей достаточно разнообразны. Это прежде всего рекомбинация атомов и радикалов, например:



где M – третья частица.

хемосорбция атомов и радикалов на стенке (S) с последующей их рекомбинацией, например:



или диспропорционирование





*Длина цепи (v).* От соотношения скоростей реакций продолжения и обрыва цепей зависит такая важная характеристика цепного процесса, как длина цепи. Длина цепи - это среднее число звеньев, приходящихся на каждый радикал (атом), инициирующий цепную реакцию. Длина цепи (v) показывает, сколько раз (в среднем) регенерируется данный атом или радикал в стадии продолжения цепи с момента зарождения цепи до ее обрыва, то есть v представляет собой отношение скорости реакции продолжения цепи ( $V_{\text{пр}}$ ) к скорости реакции обрыва цепи ( $V_{\text{обр}}$ ).

$$v = V_{\text{пр}} / V_{\text{обр}}$$

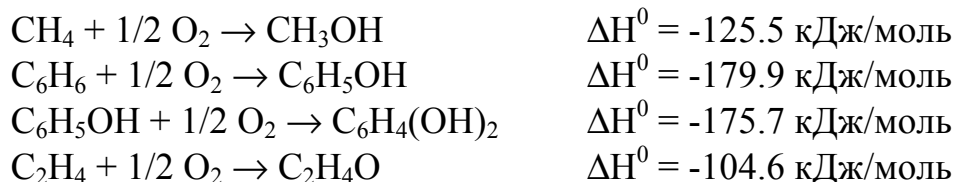
Длина различных конкретно взятых цепей различна. Поэтому длина цепи, характеризующая данный цепной процесс в заданных условиях, является статической величиной.

*Лимитирующая стадия продолжения цепи.* В тех случаях, когда продолжение цепи состоит из двух или более стадий, ведущие цепь активные центры обычно различаются по своей активности. Например, цепную реакцию водорода с хлором ведут атомы  $\text{H}^\bullet$  и  $\text{Cl}^\bullet$ . Атом водорода реагирует с молекулой хлора с константой скорости  $k_1 = 6.2 \cdot 10^9$  л/моль·с (300 К), а атом хлора реагирует с молекулой водорода с  $k_2 = 7.1 \cdot 10^6$  л/моль·с (300 К). Скорость определяющей стадией цепной реакции является самая медленная стадия реакции продолжения цепи. В ней участвует активный центр, ответственный за гибель цепей. В силу невысокой активности он присутствует в наиболее высокой концентрации, и поэтому обрыв цепей происходит именно с его участием. К смене лимитирующей стадии может привести: изменение соотношения концентраций реагентов (меняется соотношение между концентрациями активных центров), изменение температуры.

### 1.5.3. Особенности реакционной способности молекулярного кислорода

Общеизвестна высокая реакционная способность кислорода, которая находит свое отражение в существовании его соединений практически со всеми химическими элементами, за исключением гелия и неона. В большинстве химических реакций этот элемент выступает окислителем, что определяется его положением в электрохимическом ряду. В соответствие со шкалой электроотрицательности Полинга по этому параметру кислород уступает лишь фтору: соответственно 3.44 и 4.0. Для сравнения отметим, что ближайший электрофильный "аналог" кислорода - сера обладает электроотрицательностью 2.58. Высокая химическая активность кислорода как окислителя определяется его большим сродством к электрону: 1.467 эВ (при потенциале ионизации 13.2 эВ). Что касается молекулярного кислорода, то его активность во многом зависит от природы субстратов-восстановителей. Например, если реакции молекулярного кислорода с металлами переходной группы или их ионами в низких степенях окисления, а также комплексами таких ионов обычно протекают с высокими скоростями, то с органическими соединениями моле-

кула  $O_2$  обычно не вступает в прямые химические реакции (в отсутствие катализатора), либо такие реакции характеризуются чрезвычайно низкими константами скоростей. И это при том, что энтальпия образования окисленных продуктов органических соединений обычно достигает очень высоких отрицательных значений:



Исключением является довольно ограниченный круг веществ (например, гидрохиноны и катехоламины), а также радикальные интермедиаты органических молекул. В последнем случае реакции не только энергетически выгодны ( $\Delta G^0 \cong -80$  кДж/моль), но и не требуют энергии активации и идут со скоростями, ограниченными практически лишь диффузионным пределом:  $k=10^8-2 \cdot 10^9$  л·моль<sup>-1</sup>·с<sup>-1</sup>. Образующиеся пероксильные радикалы ( $ROO^\bullet$ ) являются более разрушительными, чем исходные алкильные ( $R^\bullet$ ) и играют важную роль в реализации токсичности кислорода биологических систем.

О кинетической инертности молекулярного кислорода свидетельствует также и повседневный опыт: длительное сохранение органических веществ и существование самой жизни на Земле, в атмосфере которой имеется довольно высокая концентрация  $O_2$  (21%). Для того, чтобы инициировать окисление органических молекул, не обладающих свободнорадикальной природой, требуется первоначально подвести энергию, после чего процесс окисления приобретает самопроизвольный характер в соответствии с высокими редокс-потенциалами кислорода и его интермедиатов восстановления до воды:



Четырехэлектронный путь восстановления молекулы кислорода в кинетическом плане является крайне маловероятным, хотя термодинамически он и благоприятен:



С другой стороны, одноэлектронное восстановление молекулы  $O_2$ , напротив, характеризуется низким редокс-потенциалом, что термодинамически весьма неблагоприятно. Этот факт является одной из причин, которая также лимитирует активность этой молекулы, и является важнейшим условием существования аэробной жизни:



Причина же кинетической инертности кислорода как двухэлектронного окислителя (второе важнейшее условие для существования аэробной жизни) кроется в самой природе молекулы этого элемента: 2 внешних валентных электрона у молекулы  $\text{O}_2$  размещены на двух энергетически эквивалентных (вырожденных) разрыхляющих орбиталях (схема 1):

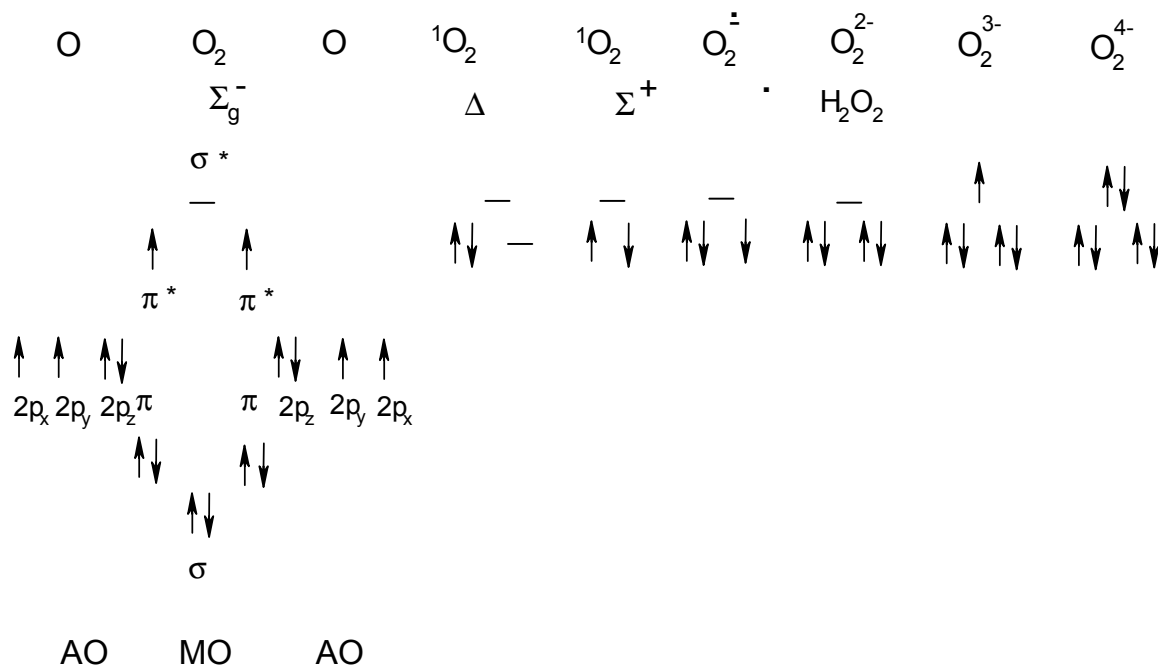


Схема 1. Спин-орбитальная диаграмма различных состояний молекулярного кислорода и интермедиатов его восстановления<sup>5</sup>.

С одной стороны, заселение электронами разрыхляющих молекулярных орбиталей, во всех случаях повышает реакционную способность молекул благодаря ослаблению связи между атомами. Это же справедливо и в отношении молекулы  $\text{O}_2$  (табл. 1). Дефицит же электронов на разрыхляющих МО всегда ведет к упрочнению связи между атомами. Действительно, если удалить один из внешних (разрыхляющих) электронов у молекулы  $\text{O}_2$ , то связь между атомами кислорода у катиорадикала  $\text{O}_2^{+\bullet}$  усилится (порядок связи: 2,5; энергия диссоциации: 623 кДж/ моль), а расстояние между ними сократится до  $1.12\text{Å}$ <sup>6</sup>.

<sup>4</sup> Поскольку, как известно, электродом сравнения при определении окислительно-восстановительных потенциалов выступает "водородный электрод", и на его основе построены общепринятые в (био)химии шкалы редокс-потенциалов - легко заметить, что молекулярный кислород в качестве одноэлектронного окислителя является гораздо более слабым, чем даже  $\text{H}^+$  ( $E_0=0$ ).

<sup>5</sup> 1) АО-атомная орбиталь; МО-молекулярная орбиталь;  $2p(x, y \text{ или } z)$  - электронный подуровень;  $\sigma$  и  $\pi$  - МО; знак \* у обозначения МО указывает на ее разрыхляющий характер.

2) Состояние восстановления  $\text{O}_2^{3-}$  крайне неустойчиво (вклад одного электрона на  $\sigma$ -связывающей МО недостаточен для образования полноценной связи между атомами: дестабилизирующий эффект электрона на разрыхляющей орбитали превышает связывающий эффект электрона на связывающей МО).

3) Существование формы  $\text{O}_2^{4-}$  тем более невозможно (число заполненных валентных связывающих МО равно числу заполненных разрыхляющих МО).

Таблица 1. Физико-химические свойства кислорода, его возбужденных форм (синглетных) и продуктов восстановления

Частица	Степень окисления	Межатомное расстояние, Å <sup>o</sup>	Энергия диссоциации (D, кДж/моль)	Порядок связи
<sup>3</sup> O <sub>2</sub>	0	1.20	490	2
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	0	1.22	397	2
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	-1/2	1.27	368	1.5
HO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	-1/2	1.33	268	1.5
O <sub>2</sub> <sup>2-</sup>	-1	1.35	-	1
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-1	1.49	213*	1
ROOR	-1	-	159	1

\*) в водных растворах величина энергии диссоциации O-O-связи пероксида водорода составляет около 180 кДж/моль.

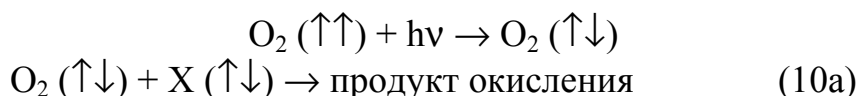
Однако, с другой стороны, в случае молекулы кислорода, благодаря вырожденности его разрыхляющих орбиталей и в соответствии с принципом максимальной мультиплетности (правило Гунда), оба внешних электрона обладают параллельными спинами. Вследствие этого основное электронное состояние молекулы O<sub>2</sub> является триплетным состоянием (<sup>3</sup>O<sub>2</sub>). Это обстоятельство накладывает ограничения на взаимодействие кислорода с молекулами, не обладающими свободной валентностью и все электроны которых являются спаренными, иными словами - когда основное состояние таких молекул является синглетным.

Как правило, химические реакции с участием триплетных и синглетных молекул характеризуются высокими значениями энергии активации.

Упомянутую выше ситуацию - запрет на окисление синглетных (↑↓) молекул (например, органических веществ) молекулярным триплетным (↑↑) кислородом - можно изобразить следующим образом:



Таким образом, для того, чтобы реакция осуществилась требуется затратить энергию на обращение спина одного из электронов в молекуле O<sub>2</sub> (конверсия молекулы кислорода в возбужденное синглетное состояние) либо в молекуле X (конверсия ее в триплетное возбужденное состояние). То есть, на первый взгляд формальной задачей подведения энергии для преодоления энергетического барьера реакции (10) является обращение спина одного из ее участников, например, у кислорода:



В терминах теории абсолютных скоростей реакций (теории Эйринга-Поляни) энергия активации (E<sub>a</sub>) соответствует энтальпии образования активированного (промежуточного) состояния (ΔH<sup>‡</sup>). Поскольку обращение спина

электрона - это простой процесс и не требует распределения энергии между различными степенями свободы активированного состояния молекулы  $O_2$ , то энтропийный экспоненциальный член в уравнении Эйринга для константы скорости реакции окисления наиболее чувствительных к действию синглетного кислорода органических молекул должен равняться или быть близок единице (то есть,  $\Delta S^\ddagger = 0$ ):

$$k = \chi kT/h \cdot \exp(\Delta S^\ddagger/R) \exp(-\Delta H^\ddagger/RT) = \chi kT/h \cdot \exp(-\Delta H^\ddagger/RT), \quad (106)$$

где  $k$  - постоянная Больцмана,  $h$  - постоянная Планка,  $\chi$  - трансмиссионный коэффициент. Предэкспоненциальный множитель  $kT/h$  - характеризует время жизни переходного состояния. Оно оценивается величиной одного периода колебания и составляет примерно  $1 \cdot 10^{-13}$  с. Строго говоря,  $\Delta H^\ddagger = E_a - RT$ . Однако, при невысоких температурах  $RT$  составляет незначительную поправку к  $E_a$ . Так, например, разность между изменением свободной энергии при образовании синглетного кислорода и энергией (энтальпией) активации этого процесса составляет крайне незначительную величину: около 0.4 кДж/моль. То есть, скорость реакции (10), казалось бы, должна была бы зависеть в основном от энергии возбуждения  $O_2$  в синглетное состояние и от частоты его взаимодействия с молекулами-мишенями -  $kT/h$ : следовательно, быть ограниченной лишь диффузионным пределом. Теоретически, верхняя граница частоты столкновений по порядку величины значений соответствует множителю  $kT/h$  уравнения Эйринга. Однако не каждый комплекс синглетного кислорода с молекулой-мишенью обладает необходимой геометрией для образования активированного комплекса. Движение, приводящее к такой геометрии (стереоселективная дискриминирующая стадия) представляет собой процесс, обусловленный уже энтропийным фактором ( $\Delta S^\ddagger < 0$ ). Например, показано, что для ряда олефинов при взаимодействии их с синглетным кислородом энтальпия активации составляет от -0.8 до +8.0 кДж/моль, тогда как энтропия активации достигает относительно высоких отрицательных значений и находится в интервале от -112 до -184 Дж/(моль·град). Это обстоятельство является весьма существенным, поскольку синглетный кислород в первую очередь взаимодействует именно с двойными связями, наличие которых - характерная черта для наиболее важных в функциональном отношении биологических молекул.

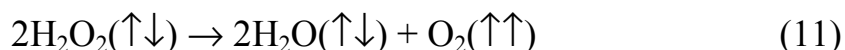
Таким образом, подвод энергии для осуществления экзергонических реакций окисления органических веществ молекулярным кислородом не ограничивается даже в случае молекул с двойными связями лишь их расходованием на обращение спина одного из электронов молекулы  $O_2$  или атакуемого ею субстрата. Однако, выделяющаяся уже в ходе реакции окисления энергия вполне обеспечивает протекание процесса по самопроизвольному типу.

Напротив, взаимодействие молекулярного кислорода в его основном (триплетном) состоянии со свободнорадикальными формами органических молекул характеризуется практически нулевой энергией (энтальпии) активации и константы скоростей соответствующих реакций определяются, в основном, предэкспоненциальным множителем (уравнение 106). Эта ситуация

( $\Delta H^\ddagger=0$ ) типична для межрадикальных реакций: их рекомбинации или диспропорционирования. Причем, взаимодействие триплетного  $O_2$ , вследствие его бирадикальной природы (наличие двух неспаренных электронов), со свободными радикалами ведет к тому, что свободная валентность не уничтожается и продукт реакции сохраняет свободно-радикальный характер.

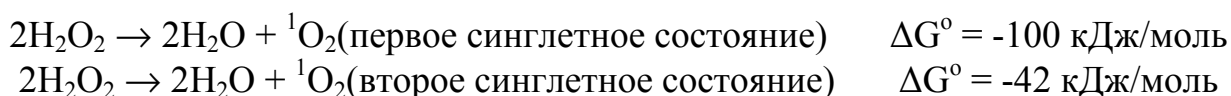
Следовательно, для живых организмов именно спиновый запрет делает возможным их существование в присутствии атмосферного кислорода.

Следует отметить также, что запрет по спину часто накладывает ограничения и на процессы, результатом которых в стандартных условиях и в отсутствие катализатора является образование свободного кислорода. Например, это реакция диспропорционирования пероксида водорода:



хотя изменение свободной энергии ( $\Delta G^\circ = -197$  кДж/моль) и благоприятствует этому процессу.

Для осуществления такого типа реакций в отсутствие катализатора необходима энергия, которая затем могла бы быть аккумулирована в синглетном состоянии молекулы  $O_2$ . Для выше приведенного примера даже этого не требовалось бы, поскольку в данном случае реакция остается строго экзергоничной и при образовании кислорода в его синглетной форме, и могла бы протекать самопроизвольно:



Как показывает повседневный опыт в лабораторной практике, высокие концентрации растворов  $H_2O_2$  (обычно 30%) могут храниться в отсутствие света и в темной посуде довольно длительное время даже при комнатной температуре. Поэтому не случайно, что в живых системах, наряду с водой,  $H_2O_2$  выступает в качестве конечного продукта восстановления кислорода (реакции (3) и (8)). Энергия активации реакции (11) в отсутствие катализатора составляет около +75 кДж/моль.

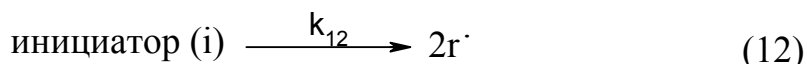
Гомолитический же распад молекулы  $H_2O_2$  самопроизвольным путем на свободные  $HO^\bullet$  - радикалы практически невозможен. Так, при энергии диссоциации связи O-O равной 180 кДж/моль (что соответствует энергии активации для этого типа реакций), константа скорости разложения перекиси составляет при 37°C очень низкую величину:  $k=5 \cdot 10^{-16} \text{ с}^{-1}$ . А это уже составляет период полупревращения ( $t_{1/2} = \ln 2/k$ ) около 1 млрд. лет!

## 2. Реакции окисления органических веществ молекулярным кислородом в жидкой фазе

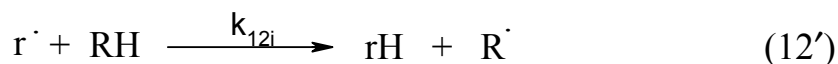
### 2.1. Элементарные реакции окисления

Окисление органических соединений (RH) молекулярным кислородом протекает по двум принципиально различным механизмам: как цепная неразветвленная реакция и как цепной вырожденно-разветвленный процесс.

В *режиме инициированной цепной неразветвленной реакции* зарождение цепей окисления протекает в присутствии иницирующих добавок (инициаторов):



К иницирующим добавкам или инициаторам окисления относятся азодиизобутиронитрил, 2,2'-азобис(2-амидинопропан)дигидрохлорид, пероксид бензоила, пероксид лаурила и т.д. Эти вещества при определенных температурах распадаются с образованием радикалов. Образующие при распаде инициатора радикалы атакуют окисляющее вещество RH. При этом из RH возникают алкильные радикалы R<sup>•</sup>.



Реакции (12) и (12') называются *реакциями иницирования цепи*.

Далее происходит присоединение кислорода к алкильному радикалу:



В растворах такие реакции протекают очень быстро с константой скорости: (2 - 5 · 10<sup>9</sup> М<sup>-1</sup> · с<sup>-1</sup>).

Образующиеся пероксильные радикалы отрывают атом водорода от окисляющегося субстрата, в результате чего образуются первичные продукты окисления субстратов - гидропероксиды.



Причем легкость отрыва атома водорода от углеродного атома увеличивается в ряду:

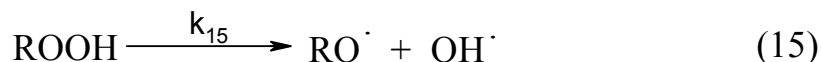
*первичный < вторичный < третичный.*

Структура образующихся пероксидных соединений зависит от строения исходного вещества. Так при окислении *n*-парафинов среди первичных продуктов окисления образуется достаточно много β-кетогидропероксидов. При окислении непредельных углеводородов пероксидные радикалы вступают в разнообразные реакции. В тех случаях, когда исходное соединение имеет СН-

связь в  $\alpha$ -положении по отношению к двойной связи, то происходит отрыв атома водорода и образование гидропероксидов. Для виниловых мономеров пероксидный радикал присоединяется по двойной связи соединений, в результате чего образуются полипероксидные соединения. Для многих непредельных соединений реакции отрыва и присоединения протекают параллельно, что приводит к образованию смеси гидропероксидов и алкилпероксидов.

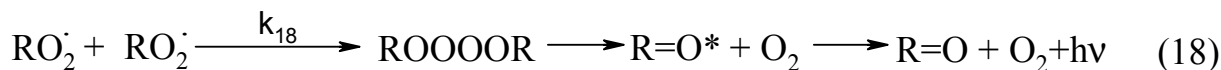
Реакции (13) и (14) называются *реакциями продолжения цепи*.

Далее образующийся в реакции (14) гидропероксид может распадаться по следующей реакции:



Эта реакция носит название *разветвления цепи* и обычно в условиях цепной неразветвленной реакции не играет существенной роли вследствие малой скорости распада гидропероксида из-за его небольшой концентрации.

Образующиеся в реакциях зарождения и продолжения цепи радикалы достаточно активны и они могут рекомбинировать между собой по трем направлениям:



В реакции между пероксильными радикалами образуется неустойчивый тетраоксид. Его образование весьма экзотермично и протекает очень быстро. Высокая экзотермичность такого процесса является причиной хемилюминесценции, возникающей в окисляющихся соединениях. Источником света является карбонильное соединение ( $\text{R=O}^*$ ), образующееся в триплетно-возбужденном состоянии.

Реакции (16), (17), (18) называются *реакциями обрыва цепи*.

Так как реакция (13) протекает с высокой константой скорости ( $10^7 - 10^9$  л/моль·с), то в присутствии растворенного кислорода в концентрации, превышающей  $10^{-3}$  моль/л, алкильные радикалы очень быстро превращаются в пероксильные. Поэтому  $[\text{R}\cdot] \ll [\text{RO}_2\cdot]$  и обрыв цепей происходит только по реакции (18), а продолжение цепи лимитируется реакцией (14). В присутствии инициатора, как правило, распад гидропероксида не играет заметной роли, так что скорость инициирования  $V_i = k_i[i] + k_{15}[\text{ROOH}] \approx k_i[i]$ . В квазистационарном режиме<sup>6</sup>  $V_i = V_{18} = k_{18}[\text{RO}_2\cdot]^2$  и при длинных цепях ( $k_{14}[\text{RH}] [\text{RO}_2\cdot] \gg V_i$ ) скорость цепного окисления  $V = k_{14} [\text{RH}][\text{RO}_2] = k_{14}[\text{RH}](V_i/k_{18})^{1/2}$ .

<sup>6</sup> Квазистационарный режим достигается при равенстве скоростей образования и гибели радикалов в каждый момент времени.



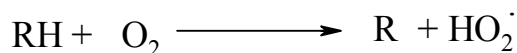
Длина цепи  $\nu = k_{14}[\text{RH}][\text{RO}_2\cdot]/V_i = k_{14}/(k_{18})^{1/2}[\text{RH}]V_i^{1/2}$ , так что с увеличением скорости инициирования длина цепи  $\nu$  уменьшается и при выполнении условия  $V_i > k_{14}^2/k_{18}[\text{RH}]^2$  окисление протекает как нецепной радикальный процесс, среди продуктов которого преобладают соединения, образовавшиеся в актах обрыва цепи. С понижением температуры окисление может протекать как нецепной процесс.

При изменении парциального давления кислорода могут реализоваться такие условия, когда заметный вклад в обрыв цепей вносят реакции (16) и (17). В этом случае наблюдается зависимость скорости окисления от парциального давления кислорода. При очень низкой концентрации растворенного кислорода продолжение цепи лимитирует реакция (13), а цепи обрываются по реакции (16), так что скорость цепной реакции

$$V = k_{13}[\text{O}_2][\text{R}\cdot] = k_{13}k_{16}^{1/2}[\text{O}_2]V_i^{1/2}$$

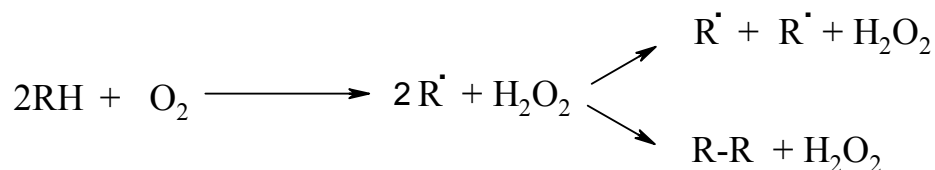
**В режиме цепной вырожденно-разветвленной реакции автоокисления** в исходном не окисленном и не содержащем инициирующих примесей органическом соединении свободные радикалы образуются в его реакции с кислородом. Свободные радикалы генерируются в системах  $\text{RH} + \text{O}_2$  и  $\text{CH}_2=\text{CHX} + \text{O}_2$  в следующих реакциях:

1. По бимолекулярной реакции наиболее слабой  $\text{CH}$  - связи с кислородом:



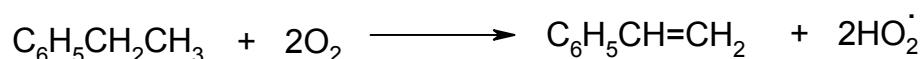
Однако такая реакция эндотермична, так как  $D_{\text{C-H}} > D_{\text{H-O}_2}$ , и протекает медленно с энергией активации, близкой к теплоте реакции:

2. По тримолекулярной реакции:

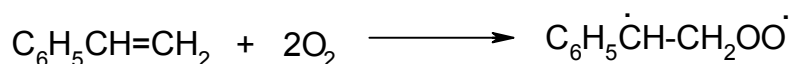


Эта реакция эндотермична, энергетически она становится более выгодной, чем бимолекулярная реакция, при  $D_{\text{R-H}} < 370$  кДж/моль.

3. Для зарождения цепей в этилбензоле установлена тримолекулярная реакция:



4. Виниловые мономеры реагируют с кислородом по двойной связи по бимолекулярной реакции. Энергия активации этой реакции близка к ее эндотермичности.



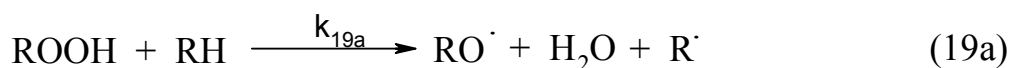
Все реакции зарождения цепей эндотермичны и протекают с достаточно высокой энергией активации. При контакте с воздухом концентрация растворенного кислорода в органических соединениях достаточно мала ( $\approx 2 \cdot 10^{-3}$  моль/л), так что скорости зарождения цепей при умеренных температурах низки ( $10^{-10}$  -  $10^{-13}$  моль/л с при 400 К).

Образующиеся при окислении гидропероксиды имеют слабую O-O - связь ( $D_{\text{O-O}} = 165$  кДж/моль), и в газовой фазе они генерируют радикалы, распадаясь мономолекулярно по O-O - связи:



В жидкой фазе их распад на радикалы происходит быстрее и с меньшей энергией активации. Механизмы распада гидропероксидов в органической фазе различны.

1. В насыщенных и алкилароматических углеводородах гидропероксиды реагируют с C-H - связями:

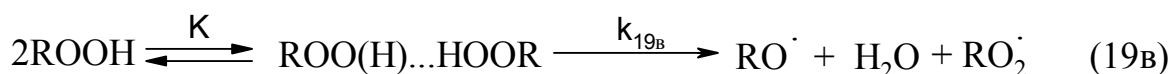


Чем слабее C-H - связь, тем выше константа скорости.

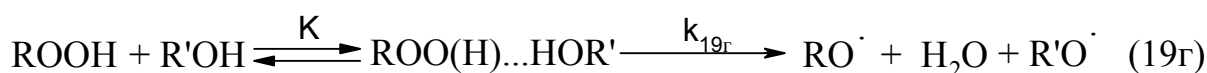
2. Гидропероксид реагирует с  $\pi$ -связью непредельных соединений, реакция сопровождается разрывом O-O - связи:



3. Гидропероксиды распадаются на радикалы через предварительное образование ассоциата посредством водородной связи:



4. Аналогичным образом, видимо, реагируют гидропероксиды со спиртами:



5. Ускоряют распад гидропероксидов и карбонильные соединения (альдегиды, кетоны, карбоновые кислоты).

Таким образом, в окисляющемся углеводороде, где образовались и присутствуют разнообразные продукты окисления, распад гидропероксидов происходит параллельно по ряду реакций. И по мере накопления ROOH скорость инициирования возрастает, а при достаточно высокой концентрации ROOH главным источником радикалов становится распад гидропероксида на радикалы.

лы. Если ROOH распадается на радикалы, реагируя с RH, концентрация которого на начальных стадиях постоянна, то можно рассматривать генерирование радикалов из ROOH как псевдомномолекулярный процесс со скоростью  $V_i = k_{19\Sigma} [\text{ROOH}]$ , где  $k_{19\Sigma} = k_{19} + k_{19a} [\text{RH}] + k_{19б} [\text{CH}_2=\text{CHX}] + k_{19в} [\text{ROOH}] + k_{19г} [\text{R}'\text{OH}]$ .

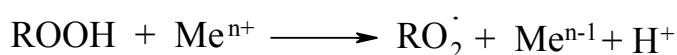
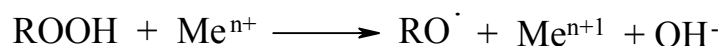
На глубоких стадиях окисления углеводов часто наблюдается самоторможение процесса, вызванное:

- образованием и накоплением таких продуктов, как кислоты, оксикислоты, кетоспирты, которые вызывают гетеролитический распад гидропероксидов и образование с ними водородных связей;
- накоплением разнообразных промежуточных продуктов, приводящих к образованию других радикалов различной структуры, различающихся своей активностью (если образуются радикалы менее активные, чем исходные, то происходит торможение процесса окисления);
- накопление фенольных соединений, которые являются ингибиторами окислительных реакций.

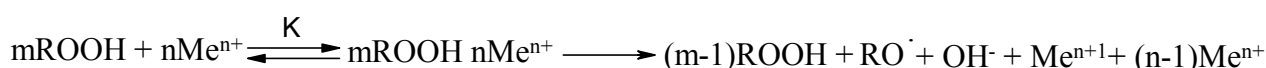
Часто наблюдается одновременное действие этих факторов, что ведет к самоторможению процесса при глубинах превращения в 40 - 50%.

## 2.2. Катализ окисления органических соединений

Жидкофазное окисление органических веществ молекулярным кислотом ускоряют соединения металлов переменной валентности. Ускорение обусловлено каталитическим распадом гидропероксидов под действием металлов переменной валентности, в результате чего возникают свободные радикалы, инициирующие окисление. Ионы металлов переменной валентности вступают с гидропероксидом в окислительно-восстановительные реакции (цикл Габера - Вейса), в результате чего резко возрастает скорость реакций окисления.



Реакции гидропероксида с металлом предшествует, часто, комплексообразование:



Чаще всего образуются комплексы состава 1:1, так что реакция протекает как бимолекулярная со скоростью  $V_i = k[\text{ROOH}]^m[\text{Me}^{n+}]^n$ . При высокой концентрации ROOH, когда все катионы катализатора связаны в комплексе с гидропероксидом, реакция имеет первый порядок по катализатору и нулевой по гидропероксиду, а в общем случае скорость распада ROOH

$$V_{\text{ROOH}} = 2k[\text{ROOH}][\text{Me}^{n+}](1 + K[\text{ROOH}])^{-1}$$

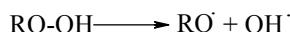
Соединения таких металлов, как Co, Mn, Ce вызывают гомолитический распад<sup>7</sup> гидропероксидов с выходом на распавшийся ROOH, близким к 100%. Однако, соединения других металлов переменной валентности, например, Cr, V, Mo, разрушают ROOH с очень низким выходом радикалов. Очевидно, эти катализаторы ведут распад ROOH по двум направлениям: гетеролитическому (основной) ( $k_m$ ) и гомолитическому (побочный) ( $k_i$ ). Соотношение между гомолитическим и гетеролитическим направлениями зависит от металла и лигандного окружения. Если преобладает распад ROOH на молекулярные продукты ( $k_m \gg k_i$ ), то такие соединения не будут ускорять автоокисление.

В окисляющемся углеводороде ROOH - не единственный окислитель, в нем образуются такие активные окислители, как пероксидные радикалы. Они также вступают в реакцию с соединениями металлов. Это приводит к тому, что в каталитическом окислении углеводородов только часть  $RO_2^\bullet$  превращается в гидропероксид, а часть  $RO_2^\bullet$  по реакции с катализатором превращается в спирт или кетон. Способность соединений переходных металлов быстро реагировать как с  $RO_2^\bullet$ , так и с ROOH приводит к их двойственной функции при окислении углеводородов. Когда соль металла переменной валентности (Co, Mn, Ce, Cu, Fe) вводится в углеводород, где уже есть гидропероксид, то наблюдается ускоренное протекание реакции, т. е. катализ, обусловленный гомолитическим разрушением гидропероксида и инициирующим действием системы: катализатор - гидропероксид. Если солевой катализатор вводится в углеводород, не содержащий ROOH, то в ряде случаев наблюдается не ускоряющее, а тормозящее действие такого соединения. Это объясняется тем, что возникающие в системе пероксильные радикалы погибают, реагируя с металлом переменной валентности, и такой обрыв цепей сдерживает цепной процесс окисления, пока не образуется гидропероксид в количестве, достаточном для инициирования окисления.

В биологических системах ионы металлов переходной группы также инициируют окислительные реакции. Инициирование происходит за счет образования комплексных соединений с кислородом. Это обусловлено:

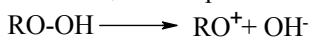
1) перекрыванием в таких комплексах внешних орбиталей металла и кислорода, что ведет к трансформации характера реакций окисления органических субстратов со спин-запрещенных в спин-разрешенные. Более того, если молекула кислорода вступает в несимметричное взаимодействие с ионом металла, то энергетическое вырождение ее разрыхляющих орбиталей снимается и термодинамически выгодным может оказаться (как это имеет место при

<sup>7</sup> Гомолитический разрыв связи - разрыв связи, при котором каждый атом получает по одному электрону из общей пары:

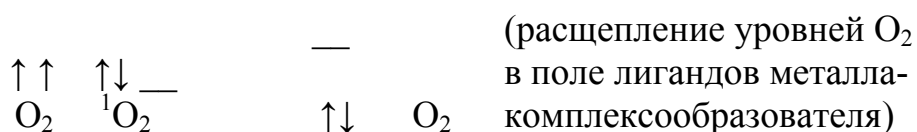


В результате гомолитического разрыва образуются сходные по электронному строению частицы, каждая из которых имеет неспаренный электрон - *свободные радикалы*.

Гетеролитический распад – при разрыве связи общая электронная пара остается у одного атома (аниона):



фиксации кислорода в поле лигандов гема) спаривание обоих внешних электронов на одной разрыхляющей орбитале:

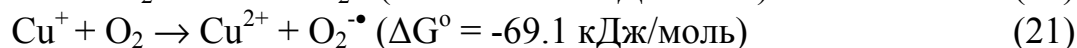
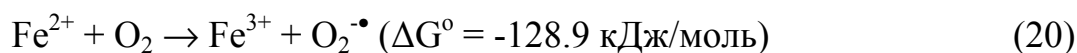


Действительно, в большинстве случаев комплексы кислорода с переходными металлами диамагнитны, что прямо указывает на снятие в таких комплексах вырождения  $\pi$ -разрыхляющих орбиталей  $\text{O}_2$ , а расщепление их уровней становится настолько большим, что оба электрона переходят на одну из этих орбиталей (на ту или иную - в зависимости от геометрии образующегося комплексного соединения).

Как правило, молекулярный кислород достаточно эффективно взаимодействует лишь с ионами металлов, находящихся в низких степенях окисления: например, с  $\text{Fe}^{2+}$  или  $\text{Cu}^+$ , но не с  $\text{Fe}^{3+}$  или  $\text{Cu}^{2+}$ . Даже если комплексы  $\text{Fe}^{3+}$  и  $\text{Cu}^{2+}$  являются ненасыщенными (то есть, когда они обладают пустой координационной позицией, доступной для связывания соответствующего лиганда), связывания  $\text{O}_2$  не происходит. Это не удивительно, так как "хорошими" лигандами для высокоокисленных ионов металлов являются обычно относительно сильные основания, к которым молекулярный кислород не принадлежит.

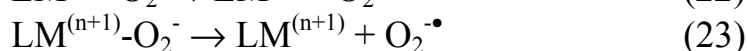
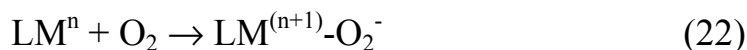
2) Поскольку суммарный заряд комплекса металл-кислород является положительным, то такой комплекс значительно более «охотно» акцептирует электроны при окислении субстратов, чем нейтральная молекула кислорода, что также приводит к усилению активности молекулы кислорода.

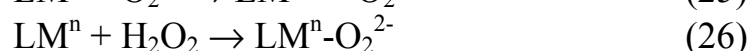
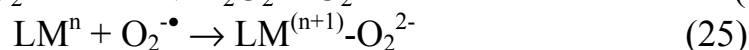
В результате взаимодействия  $\text{O}_2$  с низкоокисленными ионами металлов переходной группы, последние, помимо описанной выше активации этой молекулы, выступают также и донорами электронов для  $\text{O}_2$ , что благоприятствует дальнейшей активации кислорода для осуществления им более эффективного окисления органических субстратов. При одноэлектронном восстановлении кислорода даже некомплексированными ионами металлов эта реакция термодинамически выгодна:



(в качестве примера изображены наиболее биологически значимые ионы металлов).

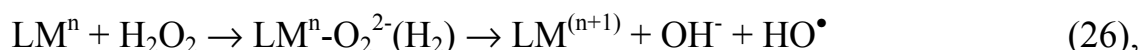
Типичный путь активации молекулярного кислорода неспецифически комплексированными ионами металлов, осуществляемый через серию нескольких редокс-этапов, можно изобразить следующим образом (где  $\text{M}^n$  - ион металла переходной группы в низкой степени окисления, L - лиганд, LM - комплексное соединение):





Именно образующиеся металл-перекисные интермедиаты (реакции (25) и (26)) и являются ответственными за дальнейшую продукцию наиболее мощных из так называемых «активных форм кислорода» (АФК), которые в дальнейшем выступают объектом нашего рассмотрения.

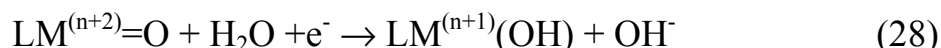
Общепризнанный механизм металл-комплексной активации пероксид-лиганда может включать как гомолитический распад перекиси на свободные радикалы (реакция Фентона):



так и осуществляться путем гетеролитического расщепления связи O-O:



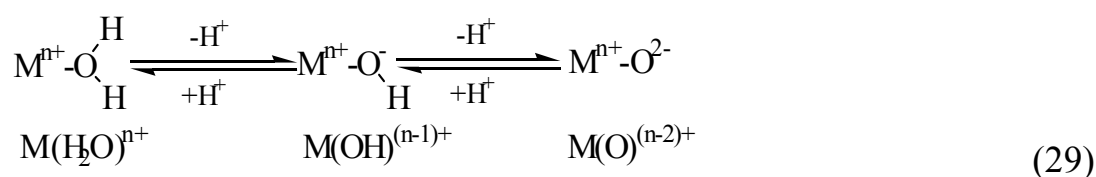
В результате двухэлектронного восстановления ионами металла-комплексообразователя продуцируются металл-оксокомплексы высоких степеней окисления, которые действуют уже аналогично гидроксильному радикалу ( $\text{HO}^{\bullet}$ ) в отношении реакций отрыва атома водорода или электрона:



По сути металл-оксокомплексы - это координационные соединения, у которых оксид-анион ( $\text{O}^{2-}$ ) является лигандом, непосредственно связанным с металлом-комплексообразователем.

В свободном состоянии ион  $\text{O}^{2-}$ , так же как и другие многозарядные анионы, существовать не может. Если для атома кислорода сродство к электрону составляет около 142 кДж/моль, то между ионом  $\text{O}^-$  и электроном возникает электростатическое отталкивание: на кривой изменения потенциальной энергии системы  $\text{O}^- + e^- = \text{O}^{2-}$  потенциальной ямы нет (ни одно положение  $e^-$  вблизи  $\text{O}^-$  не может быть устойчиво). Нейтрализация же заряда у  $\text{O}^-$  протоном ведет к образованию мощнейшего акцептора  $e^-$  - гидроксильного радикала,  $\text{HO}^{\bullet}$ .

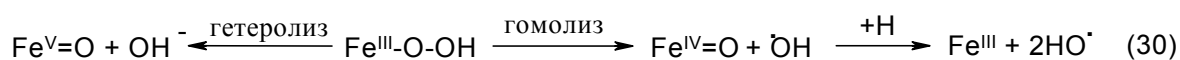
Формально эти структуры можно представить себе как результат депротонирования молекулы воды (выступающей в качестве лиганда в аквакомплексах):



Кроме того, эти электрондефицитные субстанции, наряду с отрывом электронов у субстрата-восстановителя, способны выступать и в качестве поставщиков атома кислорода при их взаимодействии с органическими молекулами.

Забегая далеко вперед, отметим, что у пероксидаз – ферментов, утилизирующих наиболее устойчивые к окислению органические молекулы и других субстанции (например, галоидные ионы), в качестве активного центра активных форм таких ферментов (Соединений I и II - см. функциональная роль активных метаболитов кислорода в системе защитных реакций организма) выступает оксоферрильная группировка:  $Fe^{IV}=O$ . Очевидно, что этим обстоятельством и определяется исключительно высокая окислительная способность таких ферментов ( $E_0 \geq +1.0$  В), играющих ведущую роль как в уничтожении инфицирующих микроорганизмов лейкоцитами, так и на биосферном уровне - в разложении микроорганизмами лигнина.

Оба рассмотренных выше пути металл-зависимой активации молекулы  $O_2$  (гомо- и гетеролитический), в случае наиболее распространенного *in vivo* металла - железа, ведут к образованию высоко активных Fe-оксосоединений, отличающихся только степенью окисления; но лишь гомолитический механизм продуцирует  $HO^\bullet$ -радикалы:

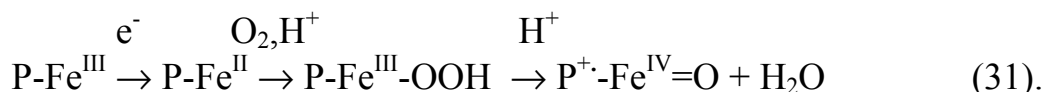


Аналогичные процессы, по-видимому, реализуются и в активных центрах ферментов, утилизирующих молекулярный кислород для осуществления оксидазных и оксигеназных реакций<sup>8</sup> в живых системах. В ходе этих реакций промежуточные токсические интермедиаты восстановления кислорода не выделяются в окружающее пространство, а подвергаются превращению до конечных продуктов  $H_2O_2$  и  $H_2O$  (реакции (3) и (8)).

Механизм активации молекулярного кислорода в активных центрах ферментов можно проиллюстрировать на примере цитохрома P450. Как известно, цитохром P450 является монооксигеназой, способной окислять с использованием молекулярного кислорода даже такие химически относительно инертные субстанции как насыщенные углеводороды. Активный центр этого фермента содержит геминую группировку - железо-порфириновый комплекс. В результате взаимодействия цитохрома P450 с  $O_2$  в активном центре фермента образуется  $\pi$ -катионный радикал порфирина ( $P^{+\bullet}$ ) и моноокислородный комплекс железа. Последний по своей структуре подобен широко известным в химии окислителям - оксокомплексам и оксоосолям металлов (например, перманганатам и бихроматам), и представляет собой феррил:  $Fe^{IV}=O$ . Аналогичная оксоферрильная группировка, как уже упоминалось выше, присутствует и в активном центре реактивных форм пероксидаз. Процесс образования такого сильного окислителя в активном центре цитохрома P450 является более сложным, чем у пероксидаз (см. функциональная роль активных метаболитов кислорода в системе защитных реакций организма). Для своей реализации он требует переноса электрона от внешнего источника (для перевода ге-

<sup>8</sup> Оксигеназные реакции – реакции, идущие с участием ферментов класса оксидоредуктаз - оксигеназ, катализирующих присоединение 2 атомов кислорода к молекуле субстрата. Оксидазные реакции – реакции, идущие с участием ферментов класса оксидоредуктаз - оксидаз, катализирующих окислительно-восстановительные реакции, акцептором водорода в которых служит кислород.

минового железа  $\text{Fe}^{\text{III}}$  в гемовое  $\text{Fe}^{\text{II}}$ , обеспечивающего связывание молекулы  $\text{O}_2$ ) и осуществляется через разложение перекисного интермедиата:

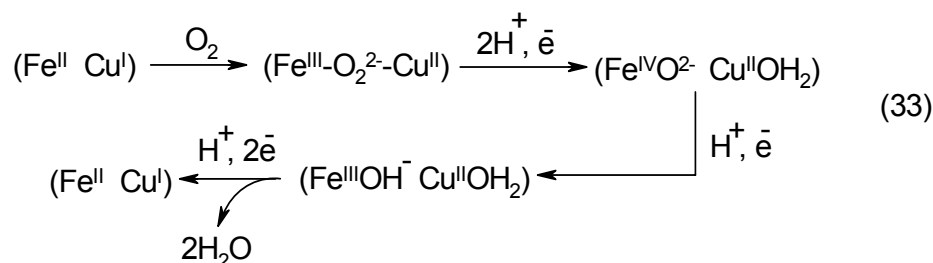


В результате активный центр этого фермента приобретает оксеноидные свойства, то есть может рассматриваться как комплекс атома кислорода (оксена) с железо-порфирином, окислительные свойства которого усилены  $\pi$ -катионовым радикалом. Как и в случае других оксеноидов, упомянутых выше (перманганаты и бихроматы), атом кислорода оксоферрильного комплекса может переноситься на субстрат (например, алканы):



$\pi$ -Катионовый радикал порфирина образуется в каталитическом цикле и у геминовых пероксидаз - ферментов, специализированных, как уже отмечалось, для окислительной трансформации и метаболизма в организме наиболее устойчивых к окислению эндогенных и экзогенных веществ.

На основе металл-комплексных соединений в процессе эволюции живых систем был сформирован и механизм, обеспечивающий возможность реализации аэробными формами жизни маловероятного события: четырехэлектронного восстановления кислорода до воды. Механизм этот реализуется цитохромоксидазой. Цепь событий в активном центре данного фермента может быть изображена следующим редокс-циклом (где главными участниками являются железо и медь):



Возможность осуществления в живых организмах процессов неконтролируемого окисления органических субстратов молекулярным  $\text{O}_2$  сведена к минимуму, как уже отмечалось, экстремально низкой концентрацией свободных ионов металлов даже в сравнении со следовыми количествами их примесей в химических системах (порядка 10нМ). В первую очередь это касается железа как наиболее распространенного металла переменной валентности в живых организмах.

В организме связывание железа обеспечивается специализированными биокомплексами (металлопротеидами). Однако существуют они и в слабо хелатированном состоянии, образуя неспецифические комплексы с высоко- и низкомолекулярными структурами. В первом случае в качестве неспециализированных носителей таких ионов могут выступать ДНК, белки, полярные группировки (фосфо)липидов (см. Процессы окисления биологических моле-



кул), во втором - различные органические кислоты (например, цитрат) и другие низкомолекулярные соединения. Среди последних основная роль принадлежит молекулам, элементами структуры которых являются фосфатные группировки (АТР, АDР, GTP, NAD(P)H и др.). Отличительной особенностью неспецифических металлорганических комплексов по сравнению с металлопротеидами является их значительно более высокая склонность к самопроизвольным редокс-превращениям с образованием АФК. В специализированных комплексах связывание этого химического элемента обеспечено тем, что он входит в состав железопорфириновых комплексов, выступающих активными центрами ферментов (пероксидаз, каталаз, цитохромоксидазы и др.), цитохромов и белков-переносчиков кислорода (гемоглобина и миоглобина), а также в состав железо-серных комплексов - активных центров таких ферментов как, например, ксантиндегидрогеназа (ксантинооксидаза), NADH-дегидрогеназа и другие. В тканях ионы этого элемента ( $Fe^{3+}$ ) депонируются в виде белкового комплекса с ферритином, переносятся в крови и внеклеточной жидкости в соединении с трансферрином и лактоферрином, а также аккумулируются в митохондриях в виде нерастворимых гранул гемосидерина.

Из общего содержания железа в организме человека (3-5 г), 70% сосредоточено в эритроцитах (его концентрация в этих клетках около 20 мМ). В остальных тканях уровень железа составляет около 0.3 мМ (это его резервные формы в виде комплексов с белками (ферритином, трансферрином и др.)). Суммарная концентрация ионов железа в ферментах и электронтранспортных цепях не превышает 0.01 мМ, хотя его локальные концентрации могут быть значительно выше.

Наличие в организме ионов железа, а также ионов других металлов переменной валентности, в иммобилизованном виде является эволюционно отобранным признаком и может служить в качестве конститутивного фактора системы антиоксидантной защиты (см. Система антиоксидантной защиты организма). Даже незначительное повышение концентрации свободных ионов металлов переходной группы в организме провоцирует нежелательные реакции молекулярного кислорода и его интермедиатов, что выступает в качестве одного из патогенетических факторов при заболеваниях, связанных с так называемым окислительным стрессом.

Поэтому существование *in vivo* свободных ионов железа ( $Fe^{2+}$  - как его растворимой формы), хотя бы и внутри замкнутых мембранных компартментов, маловероятно. Тем более, что в липидной фазе растворимость молекулярного кислорода почти на порядок превышает его растворимость в водных растворах. Двухвалентные же ионы железа легко взаимодействуют с  $O_2$ , выступая к тому же для последнего донорами электронов (реакции (20), (22) и (25)). Результатом такого взаимодействия является образование супероксидного анион-радикала ( $O_2^{\cdot-}$ ), а также последующая цепь реакций, описанная выше.

В химических реакциях такого типа (с механизмом попеременного окисления-восстановления иона металла) - скорость-лимитирующей стадией является окисление субстрата металлом, находящимся в высшей степени окисления. Значительно реже встречаются реакции, в которых самая медлен-

ная стадия представлена окислением восстановленной формы иона металла. Именно поэтому основным источником образования свободнорадикальных форм АФК ( $\text{HO}^\bullet$ ) в организме и выступает ион  $\text{Fe}^{2+}$ .

### **2.3. Кинетическая классификация антиоксидантов**

Цепной процесс окисления можно затормозить или полностью подавить введя специальные добавки, которые называют антиоксидантами. Вещества, которые тормозят процессы окисления выполняют эту функцию по различным механизмам. Поэтому их можно подразделить на определенные группы или типы по этому признаку. В частности, один из возможных способов – это расположение их в ряд: антиоксиданты – ингибиторы радикальных реакций – ловушки радикалов. Наиболее широкое понятие – антиоксидант – это вещество, которое тормозит окисление органического соединения молекулярным кислородом по какому-либо известному или неизвестному механизмам. Иными словами, антиоксидант – это любое вещество, защищающее от окисления. Среди антиоксидантов можно выделить более узкую группу- ингибиторов радикальных реакций, отличительной особенностью которых является подавление циклических стадий радикально-цепных процессов. Механизм их действия основан на том, что молекулы ингибитора "перехватывают", ведущие цепи окисления активные радикалы, и превращаются в малоактивные (не способные продолжать окислительный процесс) радикалы, которые утилизируются в стадии обрыва цепей с образованием конечных молекулярных продуктов. И, наконец, среди ингибиторов радикальных реакций, можно выделить более специфическую группу – ловушек радикалов. Последние, так же как и ингибиторы, перехватывают активные радикальные центры и превращаются в относительно стабильные радикальные аддукты, которые накапливаются в системе и их легко можно исследовать методом ЭПР. В отличие от малоактивных радикалов ингибиторов радикальные аддукты оказываются практически неактивными не только в стадии продолжения, но и в стадии обрыва цепей. Такая классификация не является единственно возможной, но она наиболее часто используется.

По механизму действия антиоксиданты делятся на следующие шесть групп.

1. *Антиоксиданты (ингибиторы), обрывающие цепи по реакции с пероксильными радикалами.* Такими ингибиторами являются ароматические соединения со сравнительно слабыми O-H и N-H - связями (фенолы, нафтолы, ароматические амины, аминифенолы, диамины). Такого типа соединения обладают восстановительными свойствами и быстро реагируют с пероксильными радикалами.

2. *Антиоксиданты (ингибиторы), обрывающие цепи по реакции с алкильными радикалами.* К ним относятся соединения, быстро реагирующие с алкильными радикалами: хиноны, иминоквиноны, метиленихиноны, стабильные нитроксильные радикалы, молекулярный иод. Алкильные радикалы быстро реаги-

руют с кислородом. Поэтому такого типа ингибиторы эффективны в условиях, когда концентрация растворенного кислорода в окисляемом веществе низкая.

3. *Антиоксиданты, разрушающие гидропероксиды.* К такого типа соединениям относятся вещества, быстро реагирующие с гидропероксидами без образования свободных радикалов: сульфиды, фосфиты, арсениты и т. д., а также тиофосфаты и карбаматы металлов, разнообразные комплексы металлов.

4. *Антиоксиданты - дезактиваторы металлов.* Соединения металлов переменной валентности разрушают гидропероксиды с образованием свободных радикалов, что ускоряет окисление (см. катализ окисления органических соединений). Такое катализированное окисление удастся замедлить, вводя комплексообразователь, который образует с металлом комплекс, неактивный по отношению к гидропероксиду. В качестве такого типа антиоксидантов используются диамины, гидроксикислоты и другие бифункциональные соединения, образующие прочные комплексы с металлами.

5. *Антиоксиданты (ингибиторы) многократного действия.* При окислении некоторых классов веществ (спирты, алифатические амины) образуются пероксидные радикалы, обладающие как окислительным, так и восстановительным действием. В таких системах ряд ингибиторов, обрывая цепи, снова регенерируются в актах обрыва цепи: происходит каталитический обрыв цепей. Число обрывов цепей зависит от соотношения скоростей реакций регенерации ингибитора и его обратимого расходования. Многократный обрыв цепей наблюдается в ряде случаев и в полимерах. Ингибиторами многократного действия являются ароматические амины, нитроксильные радикалы, соединения металлов переменной валентности.

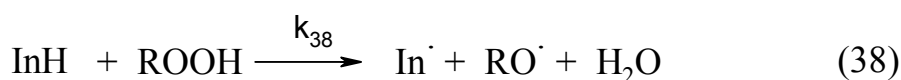
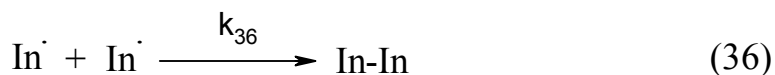
6. *Антиоксиданты комбинированного действия.* Некоторые соединения тормозят окисление, одновременно вступая в несколько реакций. Например, они реагируют и с алкильными, и с пероксидными радикалами (антрацен, метиленхинон), разрушают гидропероксиды и обрывают цепи по реакции с  $RO_2^\bullet$  (карбаматы и тиофосфаты металлов). Такие соединения являются антиоксидантами комбинированного действия. В параллельные реакции может вступать одна и та же группа. Например, с двойной связью метиленхинона реагирует и  $R^\bullet$  и  $RO_2^\bullet$ . Часто в молекуле имеются две или более функциональных группы, каждая из которых вступает в соответствующую реакцию. Например, фенолсульфид реагирует с гидропероксидом своей сульфидной группой и с  $RO_2^\bullet$  своей фенольной группой. Наконец, в разного типа реакции могут вступать исходный антиоксидант и продукты его превращения. Комбинированным действием часто обладают смеси антиоксидантов. Например, при введении в окисляющийся углеводород смеси фенола и сульфида, первый тормозит окисление, обрывая цепи по реакции с  $RO_2^\bullet$ , а второй снижает скорость вырожденного разветвления цепей, разрушая гидропероксид.

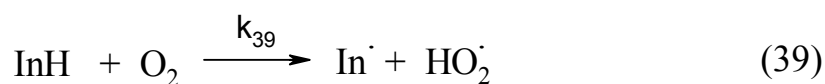
Итак, антиоксидант тормозит окисление. Тормозящее действие завершается после его полного израсходования. Время, в течение которого антиоксидант тормозит либо полностью останавливает процесс окисления, называется *периодом индукции* ( $\tau$ ). Длительность тормозящего эффекта зависит от механизма действия антиоксиданта, совокупности реакций, приводящих к торможению, и побочных реакций, которые ведут к непроизводительному расходованию антиоксиданта. Для оценки эффективности ингибитора используется понятие емкости ингибитора. Емкость ингибитора характеризуется *коэффициентом ингибирования* ( $f$ ) - это число свободных радикалов, которые погибают на одной молекуле ингибитора и продуктах его превращения. Для ингибиторов однократного действия, емкость равна 2. Если ингибитор регенерируется в актах обрыва цепи то  $f \gg 2$ . Эффективность характеризуется также скоростью взаимодействия пероксидных радикалов окисляющегося субстрата с молекулой ингибитора (реакция 34). Более эффективен тот ингибитор, у которого выше  $k_{34}$ .

Сила ингибитора определяется активностью радикала ингибитора  $In\cdot$ , образующегося в реакции с радикалом. Чем ниже активность  $In\cdot$ , тем сильнее ингибитор тормозит окисление и при достаточно большой концентрации может полностью остановить его. Силу ингибитора можно охарактеризовать его предельным тормозящим действием, выраженным отношением  $V_0/V_\infty$ , где  $V_\infty$  - скорость ингибированного окисления при  $[InH] \rightarrow \infty$ , а  $V_0$  - скорость, полученная в опытах без ингибитора.

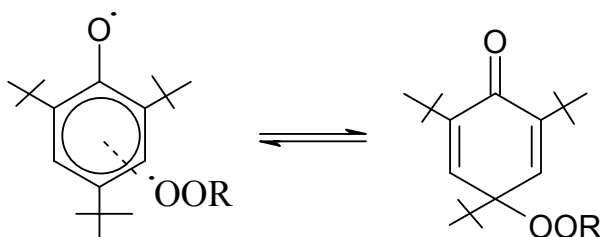
## 2.4. Механизм действия ингибиторов

При введении в окисляющийся субстрат ингибитора происходит торможение процесса окисления. При условии, что в системе  $[RO_2\cdot] \gg [R\cdot]$ , механизм тормозящего действия ингибиторов можно представить следующей последовательностью реакций:





Все ингибиторы являются восстановителями. Реакции 34, 35 приводят к обрыву цепей окисления. Реакция 35 ведет к образованию так называемого хинолидного пероксида ROOIn, строение которого подтверждено экспериментально. Иногда он достаточно стабилен и может быть выделен, в частности, в реакции присоединения  $\text{RO}_2^\cdot$  к 2,4,6-триалкилфеноксильному радикалу:



В зависимости от строения ингибитора и условий окисления кинетические схемы механизма действия ингибитора могут быть разными. Это позволяет идентифицировать по кинетическим данным основные ключевые реакции, которые определяют механизм ингибированного окисления (табл. 2).

Таблица 2. Скорость ингибированного окисления  $V$  и кинетика поглощения кислорода  $\Delta[\text{O}_2](t)$  при разных механизмах ингибированного окисления.

Скорость окисления $V$ , моль $\text{л}^{-1} \text{с}^{-1}$	Период индукции, $\tau$ , с	$\Delta[\text{O}_2](t)$ , моль $\text{л}^{-1}$
Лимитирующие стадии: 14, 34, 35		
$V_i \left\{ 1 + \frac{k_{14}[\text{RH}]}{fk_{34}[\text{InH}]} \right\}$	$\frac{f[\text{InH}]_0}{V_i}$	$V_i t - \frac{k_{14}}{k_{34}} [\text{RH}] \ln(1 - t/\tau)$
Лимитирующие стадии: 14, 34, 35, 37		
$k_{14}[\text{RH}]^{3/2} \sqrt{\frac{k_{37}V_i}{fk_{34}k_{35}[\text{InH}]}}$	$\frac{f[\text{InH}]_0}{V_i}$	$2V_0\tau \left\{ 1 - \sqrt{1 - t/\tau} \right\}$
Лимитирующие стадии: 14, 34, -34, 35		
$k_{14}[\text{RH}] \sqrt{\frac{k_{-34}V_i[\text{ROOH}]}{fk_{34}k_{35}[\text{InH}]}}$	$\frac{f[\text{InH}]_0}{V_i}$	$\left( 1 - \sqrt{\frac{\tau - t}{\tau}} \right) \left( \frac{V_0^2 \tau^2}{[\text{ROOH}]_0} + 2V_0\tau \right)$
Лимитирующие стадии: 14, 34, 35, 38		
$\frac{k_{14}[\text{RH}](V_i + k_{38}[\text{ROOH}][\text{InH}])}{fk_{34}[\text{InH}]}$	$\frac{\ln(1 + 2k_{38}\tau_0[\text{ROOH}]_0)}{2k_{38}[\text{ROOH}]_0}$	$\frac{k_{14}[\text{RH}]}{fk_{34}} \left( bt + \ln \frac{2b\tau_0}{1 + 2b\tau_0 - \exp(-bt)} \right)$

**Ингибирование цепной вырожденно-разветвленной реакции.** Если окисление протекает без инициатора, т.е. в режиме автоокисления, то оно идет с автоускорением из-за нарастающей в ходе реакции скорости иницирования (накопление гидропероксида). Темп ускорения зависит от скорости цепного окисления, т.е. существует положительная обратная связь между процессами автоиницирования и цепного окисления  $RH$ . Эта связь проявляется и в ингибированном окислении органических соединений.

Если в цепной иницированной реакции, когда  $V_i = \text{const}$ , период индукции (время торможения реакции) не зависит от эффективности тормозящего действия ингибитора, а определяется его концентрацией, то при автоокислении чем эффективнее ингибитор обрывает цепи, тем он медленнее расходуется. Обусловлено это тем, что в присутствии ингибитора медленнее накапливается  $ROOH$ , а следовательно, и увеличивается период торможения. Кроме того, если иницированное окисление углеводородов тормозят соединения, обрывающие цепи, то автоокисление тормозят и такие соединения, которые разрушают гидропероксиды. Такой распад, если он не сопровождается образованием свободных радикалов, снижает концентрацию накапливающегося гидропероксида, а, следовательно, и скорость автоиницирования.

Для ингибированного автоокисления часто характерны критические явления, причиной которых является автокаталитический характер реакции и упоминавшаяся выше обратная связь. Поскольку гидропероксид в ходе окисления распадается, возникают два разных режима ингибированного окисления: нестационарный и квазистационарный по гидропероксиду.

Рассмотрим более детально группы ингибиторов окисления.

#### **2.4.1. Фенолы и ароматические амины - эффективные ингибиторы окислительных реакций**

Наиболее распространенными и эффективными ингибиторами окисления являются ингибиторы окисления первой группы - фенолы и ароматические амины. Главным действующим началом антиоксидантов этой группы, обеспечивающим их способность тормозить окисление, является гидроксильная или аминогруппа у ароматического ядра. Энергии связей  $O-H$  и  $N-H$  в фенолах и ароматических аминах относительно низкие, поэтому, образующиеся в ходе окисления радикалы  $RO_2^\bullet$  насыщают свою свободную валентность путем взаимодействия с молекулой ингибитора по реакции (34). В результате на смену активным пероксирадикалам приходят малоактивные радикалы ингибитора, не способные, в общем случае, вести цепной процесс. Следствием этого является замедление или полное прекращение (если ингибитор перехватывает алкильные радикалы  $R^\bullet$ ) процесса окисления. После израсходования всего ингибитора заканчивается период индукции, и реакция окисления развивается практически с той же скоростью, что и без ингибитора.

Важной особенностью электронного строения антиоксидантов фенольного типа является сопряжение  $\pi$ -электронов ароматической системы с р-электронами неподеленной пары электронов атома кислорода. В наибольшей

степени сопряжение проявляется, когда гидроксильная группа компланарна с плоскостью ароматического кольца. *o*-Алкильное замещение вызывает некоторое нарушение компланарности, что приводит к существенным изменениям физико-химических свойств фенолов. Прочность связи О-Н ( $D_{OH}$ ) для различных фенолов можно найти в справочниках. При сравнении значений  $D_{OH}$  для замещенных в кольце фенолов - фенола ( $370 \text{ кДж}\cdot\text{моль}^{-1}$ ), 2,6-диметилфенола ( $354 \text{ кДж}\cdot\text{моль}^{-1}$ ), 2,6-дитретбутилфенола ( $343 \text{ кДж}\cdot\text{моль}^{-1}$ ) видно, что особенно сильные изменения в молекуле наблюдаются, когда *ortho*-положения замещены объемными трет-алкильными группами. Нарушение компланарности приводит к некоторому изменению связи О-Н и, как следствие, к снижению ее прочности.

Влияние природы заместителей на реакционную способность фенолов и соответствующих радикалов будет двояким: с одной стороны - увеличение объема *o*-алкильных заместителей снижает прочность О-Н связи, что увеличивает активность фенола в реакции с пероксирадикалом. С другой - экранирование реакционного центра объемными заместителями создает стерические препятствия для подобных реакций.

Другой важный фактор, от которого зависят свойства фенолов, в том числе их реакционная способность - распределение электронной плотности. Оно в значительной степени определяется электронодонорной (электроноакцепторной) способностью заместителей. Электронодонорные заместители увеличивают антиоксидантную активность фенольных соединений, электроноакцепторные заместители снижают.

Реакция (34) - ключевая в ингибированном окислении, она определяет саму способность ароматических аминов и фенолов тормозить цепное окисление органических веществ. В результате этой реакции в окисляющейся системе снижается концентрация  $RO_2^\bullet$  и, следовательно, скорость реакции (14) продолжения цепи. Константы скорости большого числа фенолов и ароматических аминов с различными пероксидными радикалами лежат в интервале  $10^4$ - $10^6$  л/моль.

В процессе ингибированного окисления органических веществ из ингибитора образуются свободные радикалы  $In^\bullet$ . Феноксильные радикалы многих фенолов сравнительно устойчивы, что позволяет изучать их свойства и определять строение образующихся из них продуктов. При больших концентрациях радикалов  $RO_2^\bullet$  в системе продуктами рекомбинации являются, главным образом, соединения  $ROOIn$  - хинолидные пероксиды были выделены при ингибировании процессов окисления углеводородов 2,4,6 - триалкилфенолами. Выход хинолидных пероксидов при окислении низкомолекулярных углеводородов в присутствии пространственно - затрудненных фенолов достигает 100%.

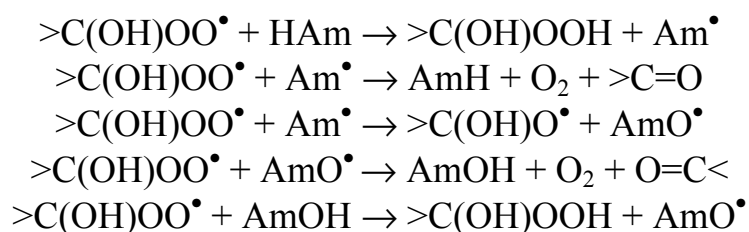
Эффективность ингибитора в общем случае определяется величиной константы скорости реакции  $RO_2^\bullet + InH$ . Однако, если отрыв атома водорода протекает слишком легко, то это может привести к прямому взаимодействию

ингибитора с кислородом, что снижает его эффективность и увеличивает вероятность дополнительных реакций радикалообразования.

#### 2.4.2. Многократный обрыв цепей на ингибиторах окисления

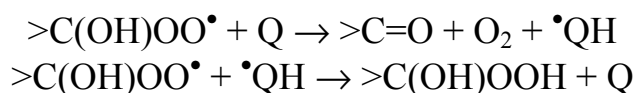
В некоторых системах одна молекула ингибитора может обрывать большое число цепей ( $f \gg 2$ ). Это наблюдается, когда по реакции активного центра ( $R^\bullet$  или  $RO_2^\bullet$ ) с продуктом превращения ингибитора ( $In^\bullet$ ) снова образуется исходный ингибитор или ингибитор действует каталитически, переводя активный  $RO_2^\bullet$  в малоактивный радикал. Такие явления характерны для следующих систем:

1. В окисляющихся спиртах (первичных и вторичных) образуются гидропероксидные радикалы, обладающие восстановительным действием. В присутствии ингибиторов (ароматических аминов  $AmH$ ) возникают циклические реакции обрыва цепей с участием аминильных и нитроксильных радикалов:



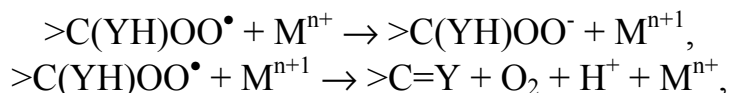
Аналогичные реакции протекают при введении ароматических аминов в окисляющиеся алифатические амины, пероксидные радикалы которых также обладают восстановительным действием.

2. Хиноны ( $Q$ ) и иминоквиноны тормозят окисление спиртов, вступая с пероксидными радикалами в циклические реакции:



Многократный обрыв на хинонах наблюдается и в процессах окисления органических веществ, в которых цепи ведут радикалы  $HO_2^\bullet$ . Они восстанавливают хинон в семихинонный радикал (например, при окислении циклогексадиена, полипропилена и др.)

3. Соли металлов переменной валентности при окислении спиртов и аминов:

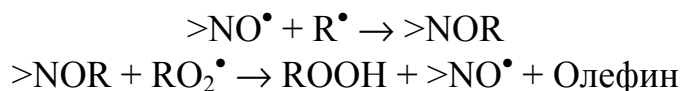


где  $Y = N, O$ .

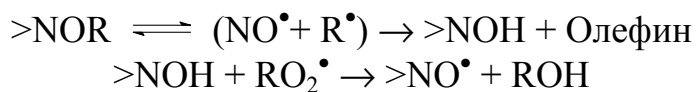
4. Стабильные нитроксильные радикалы ( $>NO^\bullet$ ) многократно обрывают цепи при окислении полимеров, что лежит в основе высокой эффективности стерически затрудненных аминов как светостабилизаторов. Известны три механизма циклического обрыва цепей с участием нитроксильных радикалов:



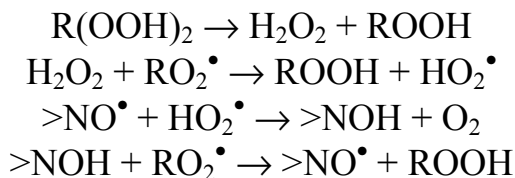
Первый:



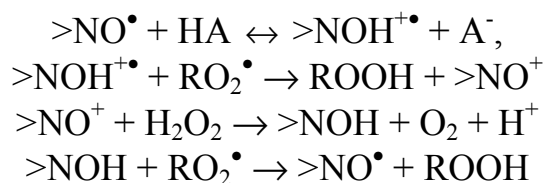
Второй:



Третий:



5. Многократный обрыв цепей с участием стабильного нитроксильного радикала обеспечивает трехкомпонентная система: нитроксильный радикал + пероксид водорода + кислота (НА). Важную роль в этом механизме выполняет кислота. Механизм действия следующий (RH - углеводород):

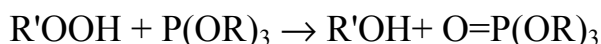


В этой системе нитроксил и кислота выступают как катализаторы, а  $\text{H}_2\text{O}_2$  расходуется. Аналогичный циклический механизм обрыва цепей реализуется при введении смесей: спирт + нитроксил + кислота, а также системы: пероксид водорода + хинонимин + кислота.

### 2.4.3. Антиоксиданты, разрушающие гидропероксиды

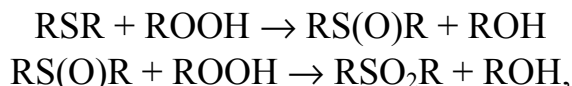
При автоокислении органических соединений главным источником свободных радикалов являются образующиеся в реакции гидропероксиды. Скорость автоокисления можно замедлить, если снизить концентрацию гидропероксида путем его разрушения. При этом следует иметь в виду, что возможны два принципиально разных направления распада  $\text{ROOH}$ : гомолитический и гетеролитический. Первый приводит к образованию свободных радикалов, и поэтому интенсификация гомолитического распада только ускорит окисление. Наоборот, гетеролитическое превращение  $\text{ROOH}$  в молекулярные продукты (молекулярный распад) снизит концентрацию гидропероксида и соответственно скорость его распада на радикалы.

**Фосфорорганические антиоксиданты.** Среди разнообразных фосфорорганических соединений в качестве ингибиторов окисления применяются арилфосфиты. Фосфиты достаточно быстро окисляются гидропероксидами до фосфатов по реакции:



Реакция является бимолекулярной и протекает со стехиометрией 1:1. Триалкилфосфиты реагируют с ROOH быстрее, чем арилфосфиты, энергия активации зависит от структуры фосфита. Строение гидропероксида слабо отражается на скорости его реакции с фосфитом.

**Серосодержащие соединения.** Серосодержащие соединения используются как составная часть антиоксидантных присадок для топлив и масел. Механизм тормозящего действия серосодержащих антиоксидантов является достаточно сложным. Например, диалкилсульфиды окисляются гидропероксидами до сульфоксидов, а последние - до сульфонов:



Гидропероксид в таких реакциях восстанавливается до спирта.

#### 2.4.4. Синергизм действия антиоксидантов

Механизм действия антиоксидантов при окислении органических соединений разнообразен. Ингибиторы обрывают цепи по реакциям с  $\text{RO}_2^\bullet$  или с  $\text{R}^\bullet$ . Образующиеся из них радикалы неактивны или участвуют в продолжение цепи по реакциям с ROOH и RH; в ряде случаев возникают циклические реакции обрыва цепей. Антиоксидант может восстанавливать гидропероксид или каталитически его разрушать. Поэтому при использовании смесей двух или более антиоксидантов возникают самые разные механизмы их взаимного тормозящего действия.

По воздействию на окислительный процесс случаи торможения смесями антиоксидантов сводятся к следующим трем: *аддитивное действие*, когда тормозящее действие смеси равно сумме тормозящих воздействий каждого из компонентов ( $\tau_1 + \tau_2 = \tau_{1,2}$ ); *антагонизм*, когда ингибиторы ослабляют друг друга ( $\tau_1 + \tau_2 > \tau_{1,2}$ ); и *синергизм*, когда действие смеси больше, чем сумма тормозящих воздействий отдельных компонентов ( $\tau_1 + \tau_2 < \tau_{1,2}$ ).

Чаще всего синергизм проявляется в следующих смесях антиоксидантов:

1. Один ингибитор обрывает цепи, второй снижает скорость автоиницирования, разрушая ROOH или дезактивируя катализатор, который активирует распад ROOH на радикалы.

Совместное введение ингибитора, обрывающего цепи, и вещества, разрушающего гидропероксиды, широко используют для эффективного торможения окислительных процессов в полиолефинах, каучуках, смазочных маслах, пищевых жирах, и т.д. В качестве акцептора  $\text{RO}_2^\bullet$  применяют фенолы, бисфенолы, ароматические амины, а для разрушения ROOH вводят арилфосфиты, эфиры тиопропионовой кислоты, диалкилдитиопропионаты, тиофосфаты цинка и никеля и другие аналогичные соединения. Обычно измеряют период индукции окисляющегося субстрата при введении смесей антиоксидантов с различным соотношением компонентов и находят такое соотношение, которое вызывает наиболее длительное торможение.

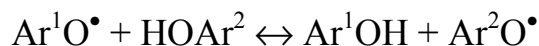
2. Два исходных вещества, реагируя, образуют эффективный антиоксидант.
3. Промежуточные радикальные продукты превращения ингибиторов, взаимодействуя между собой, усиливают тормозящее действие друг друга.

Этот вид синергизма наблюдается при использовании бинарных смесей некоторых фенолов и ароматических аминов. Он связан с взаимодействием ингибиторов и образующихся из них радикалов. Так, например, в смеси фенил-N-β-нафтиламина и 2,6-дитретбутилфенола сначала расходуется фенол, и только после его исчезновения начинает расходоваться амин, хотя  $\text{RO}_2^\bullet$  с амином реагирует быстрее, чем с фенолом. Обусловлено это явление быстро устанавливаемым равновесием:



Оно сдвинуто вправо, если  $D_{\text{N-H}} > D_{\text{O-H}}$ . Это равновесие при совместном введении амина и фенола снижает концентрацию аминильных радикалов, если  $D_{\text{O-H}} < D_{\text{N-H}}$ . Аминильные радикалы продолжают цепь по реакции с  $\text{ROOH}$ , а образующиеся из фенола стерически затрудненные Феноксильные радикалы не участвуют в продолжении цепи и погибают только по реакции с  $\text{RO}_2^\bullet$ , что и приводит к синергизму при автоокислении углеводорода.

Синергизм обнаружен и при совместном введении двух фенолов, один из которых обязательно 2,6-дитретбутилфенол. Период индукции удваивается, если ввести оба фенола в одинаковой концентрации, т.е. в обрыве цепей участвуют оба фенола, если они введены вместе. Это объясняется быстрой обменной реакцией:



### 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ РАДИКАЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ

#### 3.1. Импульсные методы

##### 3.1.1. Импульсный фотолиз

В реакционной смеси мощной вспышкой света генерируют атомы, радикалы или возбужденные молекулы, за превращением которых следят методами скоростной спекрофотометрии. Вспышку генерирует газоразрядная лампа, на которую разряжают конденсаторы большой емкости. Вспышка длится несколько микросекунд. Метод применим как к газам, так и жидкостям, он позволяет наблюдать реакции со временем полупревращения до  $10^{-5}$  с. Мощная вспышка позволяет получить высокую концентрацию активных частиц. За их превращением следят спекрофотометрически. Метод позволяет изучать ре-

комбинацию атомов и радикалов, их реакции с молекулами, реакции молекул в триплетном состоянии.

Для успешного использования метода должны выполняться следующие условия: время жизни исследуемой частицы должно быть много больше, чем длительность вспышки; растворитель должен быть прозрачен в области длин волн, где поглощают изучаемые частицы; должна быть известна или выяснена схема реакций, в которые вступает изучаемый радикал.

### **3.1.2. Импульсный радиолиз**

Этот метод является радиационно-химическим аналогом импульсного фотолиза. Для идентификации детектирования частиц используют скоростную спектрофотометрию. Активные частицы генерируют путем электронного удара коротким импульсом высокоэнергетических электронов, которые вызывают ионизацию и электронное возбуждение молекул, а возбужденные молекулы диссоциируют с образованием радикалов и атомов. Для создания импульса электронов используют микроволновый линейный ускоритель (энергия электронов 2-12 МэВ, длительность импульса 100-1000 нс), ускоритель Ван-де-Граафа (электроны с энергией 2-4 МэВ, длительность 1-100 нс), фобетрон (электроны с энергией 0.6-2 МэВ, длительность 10-50 нс). Реакционную ячейку изготавливают из кварца, который достаточно устойчив к радиационному окрашиванию. Поскольку электроны быстро тормозятся в жидкости и теряют свою способность ионизовать молекулы, толщина ячейки не должна превышать 1-2 см. Энергия электронов в пучке обычно составляет от 1 до 30 МэВ. Чем выше эта энергия, тем равномернее по сосуду происходит иницирование.

Методом импульсного радиолиза подробно изучены реакции частиц, возникающих в воде при ее облучении электронами: атомов водорода, радикалов гидроксила и  $\text{HO}_2^\bullet$ . Исключительно ценные данные получены о реакциях гидратированного электрона с разнообразными ионами, радикалами и молекулами. Например, при захвате электрона ароматической молекулой образуется анион-радикал, реакции с его участием также изучены методом импульсного радиолиза.

### **3.2. Лазерный магнитный резонанс (ЛМР)**

Метод предназначен для спектроскопических и кинетических исследований химически активных атомов, радикалов и ионов в газовой фазе. В химической кинетике он применяется для изучения элементарных и разветвленных цепных реакций. Метод ЛМР является аналогом метода ЭПР, однако имеет значительно более высокую чувствительность детектирования двухатомных радикалов в газе.

В ЛМР наблюдают поглощение лазерного излучения парамагнитными частицами газа, помещенными в магнитное поле. В случае радикалов поглощение лазерного излучения обусловлено электрическими дипольными переходами между магнитными подуровнями двух разных вращательных или колебательно-вращательных уровней. При этом линия генерации лазера выбира-

ется так, чтобы с помощью магнитного поля можно было скомпенсировать разность энергий излучения лазера ( $h_{vL}$ ) и вращательного или колебательно-вращательного переходов ( $h_{vR}$ ) радикала:

$$h_{vL} - h_{vR} = g_{1\beta}VM_1 - g_{2\beta}VM_2$$

где  $g_1$  и  $g_2$  - факторы верхнего и нижнего вращательных (колебательно-вращательных) уровней;  $M_1$  и  $M_2$  - магнитные квантовые числа этих уровней;  $\beta$  - магнетон Бора;  $V$  - индукция магнитного поля. Электрическое дипольное поглощение имеет место  $M_1 - M_2 = \pm 1$ .

Для повышения чувствительности метода ЛМР кювету с исследуемыми радикалами помещают в резонатор лазера, а режим работы лазера подбирают таким образом, чтобы получить дополнительный выигрыш по сравнению с числом проходов луча в резонаторе (обычно 10 проходов). Эффективная длина пути поглощения в этом случае для внутррезонаторного ЛМР оказывается не в 10, а в тысячу раз больше геометрической.

### 3.3. Иницированная и автоиницированная цепная реакция

Изучение кинетики цепной реакции позволяет установить лимитирующую стадию продолжения цепи, характер обрыва цепей и получить количественную кинетическую характеристику цепного процесса. Важное значение имеет изучение скорости цепного процесса в зависимости от скорости иницирования.

#### 3.3.1. Иницированная цепная реакция

В системе, где возможно развитие цепной реакции, иницирование с известной заданной скоростью создается или путем введения инициатора, который распадается на радикалы с известной константой скорости, или фотохимически, или под действием проникающей радиации ( $\beta$  -лучи,  $\gamma$  -лучи). Зависимость скорости цепной реакции  $V$  от скорости иницирования  $V_i$  позволяет судить о характере обрыва цепей. Если  $V \sim V_i$ , то реакция обрыва цепей имеет первый порядок по активным центрам; если  $V \sim V_i^{1/2}$  - то второй. В жидкой фазе в отсутствие ингибитора обрыв цепей происходит бимолекулярно, и скорость цепной реакции, например полимеризации мономера  $M$ , составляет

$$V = V_i + k_p(2k_t)^{1/2}[M]v_i^{1/2},$$

где  $k_p$  - константа скорости реакции продолжения цепи,  $k_t$  - константа скорости обрыва цепи,  $[M]$  - концентрация мономера.

Эмпирическая зависимость  $V$  от  $[M]v_i^{1/2}$  позволяет определить параметр  $a = k_p(2k_t)^{1/2}$ , характеризующий скорость цепного процесса. Зная этот параметр, можно найти значение  $k_p$ , если известна или независимым методом измерена константа скорости  $k_t$  или отношение  $k_p/2k_t$ . По параметру  $a$  можно измерить скорость иницирования для неисследованного источника радикалов. Если

такой источник - инициатор, то  $V_i = k_i[i]$ , и по серии опытов с разной начальной концентрацией инициатора находят  $k_i$  по уравнению

$$k_i = V_i^2/a^2[M]^2[i]_0$$

### 3.3.2. Метод смешанного иницирования

Достаточно часто встречаются случаи, когда компоненты системы участвуют как в иницировании, так и в продолжении цепи. Например, введение в окисляющийся углеводород спирта и гидропероксида вызывает, во-первых, дополнительное иницирование и, во-вторых, изменяет отношение  $k_p(2k_t)^{1/2}$  из-за участия обоих компонентов в продолжении цепи (пероксидные радикалы углеводорода реагируют с ROH и ROOH, что изменяет состав и концентрацию радикалов). Метод исследования заключается в следующем. В системе, где развивается цепная реакция, например, окисляется RH и генерируются радикалы с неизвестной скоростью  $V_{ix}$ , вводят инициатор  $i$ , для которого известна  $k_i$  (константа скорости реакции иницирования цепи). Проводят серию опытов с разными концентрациями  $i$  и в каждом опыте измеряют скорость цепной реакции. Если обрыв цепей квадратичный, то скорость цепной реакции ( $V \gg V_i$ ) связана с концентрацией инициатора соотношением

$$V^2 = k_p^2(2k_t)^{-1}[RH]^2(V_i + k_i[I])$$

По линейной зависимости  $V^2$  от  $[i]$ , которая имеет вид  $V^2 = A + B[i]$ , определяют коэффициенты А и В и следующие величины:  $V_{ix} = k_i A/B$ ,  $k_p^2(2k_t)^{1/2} = B/k_i[RH]$ . Условия подбирают такими, чтобы, во-первых, реакция протекала цепным путем, во-вторых, за время опыта  $V_i \approx \text{const}$ .

### 3.3.3. Автоиницированный режим цепной реакции

Противоположная ситуация наблюдается в реакциях автоокисления органических соединений, когда скорость генерирования радикалов нарастает в ходе реакции из-за образования гидропероксидов. Если ROOH распадается на радикалы по реакции первого порядка, то в начальный период окисления, когда скорость образования ROOH много больше скорости его распада,

$$V = k_p(2k_t)^{1/2}[RH]^{1/2}, \quad V_i = V_{i0} + k_i[ROOH]$$

и кинетика накопления гидропероксида описывается формулой:

$$[ROOH]/t = 0,25a^2[RH]^2k_it + a[RH]V_{i0}$$

где  $V_{i0}$  - скорость генерирования радикалов без участия ROOH;  $a = k_p(2k_t)^{1/2}$ . Очень часто скорость зарождения цепей настолько мала, что при достаточно больших временах реакции членом  $a[RH]V_{i0}$  в последнем выражении можно пренебречь. Тогда кинетика накопления ROOH описывается простым выражением

$$\Delta[O_2]^{1/2} = [ROOH]^{1/2} = 0.5a[RH]k_i^{1/2}t$$

Так как коэффициент  $a$  легко определить в экспериментах по инициированному окислению  $RH$ , то спрямление последней зависимости позволяет определить константу скорости  $k_i$ . Спрямяя экспериментальные результаты по предыдущему уравнению, можно оценить скорость зарождения цепей  $V_{i0}$ .

### 3.4. Фотохимические методы изучения элементарных стадий

Изучение кинетики цепных реакций в стационарном режиме позволяет определить отношения констант скорости  $k_p(2k_i)^{1/2}$  при бимолекулярном обрыве цепей и  $k_p/k_t$  при обрыве цепей по реакции первого порядка. Для оценки абсолютных значений констант скорости необходимо использовать нестационарные кинетические методы.

#### 3.4.1. Секторный метод (метод прерывистого освещения)

Метод применяют для измерения времени жизни активных центров (атомов и радикалов) в цепных реакциях с квадратичным обрывом цепей. Принцип метода заключается в том, что в системе периодически инициируют светом образование активных центров и от опыта к опыту изменяют длительность светового и темнового периодов. Чередование световых и темновых периодов осуществляют с помощью вращающегося диска с прорезями (секторами). Когда длительность темнового периода меньше времени жизни активного центра (сектор вращается быстро), реакция идет быстро, как при непрерывном инициировании со скоростью  $V_i(1+r)^{-1}$ , где  $r$  - отношение темнового периода к световому, а скорость  $V_0 \sim V_i^{1/2}(1+r)^{-1/2}$ . При большой длительности темнового периода (сектор вращается медленно) реакция идет только в периоды освещения и средняя скорость  $V_M \sim (1+r)^{-1} V_i^{-1/2}$ . Переход от одного режима к другому происходит при таком темновом периоде, длительность которого соизмерима со временем жизни активного центра, ведущего цепную реакцию. В основе метода лежит зависимость длины цепи от скорости инициирования при квадратичном обрыве цепей ( $v \sim V_i^{-1/2}$ ). При непрерывном освещении скорость цепного превращения  $RH$ :

$$V_0 = k_p(V_i/2k_i)^{1/2}[RH]$$

При быстром вращении диска, когда темновой период  $t_T \ll (2k_i V_i)^{-1}$ , концентрация радикалов соответствует средней скорости инициирования  $V_i(1+r)^{-1}$ , где  $r = t_T/t_{CB}$  и  $v_0 = v_0(1+r)^{-1/2}$ . При медленном вращении диска реакция протекает только в период освещения, и средняя скорость за много периодов

$$V_M = V_0(1+r)^{-1}.$$

Отношение  $V_0/V_M = (1+r)^{1/2} = 2$  при  $r = 3$ . Переход от одного режима к другому происходит при  $t_T \approx (2k_i V_i)^{1/2}$ .

Эксперимент проводят следующим образом (см. рис. 3). Реакционную смесь помещают в термостатированный сосуд  $b$  с прозрачными плоскопараллельными стенками.

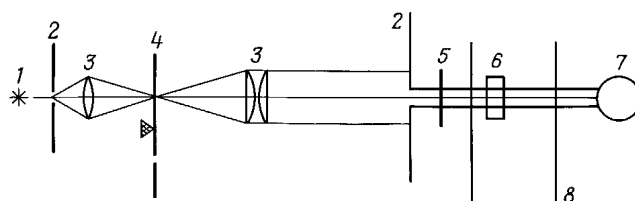


Рис. 3. Схема секторной установки: 1-источник света; 2-диафрагмы; 3-линзы; 4-вращающийся диск; 5-фильтр; 6-реакционная ячейка; 7-фотоумножитель; 8-термостат.

Сосуд освещается светом такой длины волны, которая вызывает генерирование радикалов. Диск 4 помещают в точку, где фокусируются лучи света, и приводят его во вращение. От опыта к опыту измеряют тем или иным способом скорость реакции и строят эмпирическую зависимость отношения  $V/V_0$  от  $\lg t_T$ ,  $t_T$  находят из скорости вращения диска и соотношения между размерами темного и светового секторов (обычно  $r = 3$ ). Эту эмпирическую зависимость сопоставляют с теоретической и из сопоставления находят  $2k_t V_i$ , откуда вычисляют  $2k_t$ . Скорость инициирования измеряют отдельно методом ингибиторов или через скорость цепной реакции и отношение  $k_p/2k_t$ .

Секторный метод дает надежные результаты при выполнении таких условий, как равномерное инициирование по всему объему реактора, прямоугольная (или близкая к ней) форма светового импульса (это достигается сведением светового пучка в точку, где световой пучок пересекается диском), длинные цепи, квадратичный характер обрыва цепей, отсутствие (или низкая скорость) темновой реакции. Секторный метод можно использовать и в тех случаях, когда цепи обрываются и квадратично, и линейно.

### 3.4.2. Метод фотохимического преддействия и последействия

При фотохимическом инициировании цепной реакции после включения света проходит некоторый отрезок времени, пока установятся стационарная концентрация радикалов и постоянная скорость реакции. Это используется для измерения константы скорости обрыва цепей. Если цепи обрываются линейно, то после включения света

$$d[R^\bullet]/dt = V_i - k_t [R^\bullet], [R^\bullet]_0 = 0, d\Delta[R'H]/dt = k_p [R'H][R^\bullet] \text{ и } [R^\bullet] = V_i (k_t)^{-1} (1 - e^{-k_t t})$$

При небольшой степени превращения  $[R'H] = [R'H]_0$  имеем

$$\Delta[R'H] = k_p (k_t)^{-1} V_i [R'H]_0 [t + k_t^{-1} (e^{-k_t t} - 1)] \approx k_p (k_t)^{-1} V_i [R'H]_0 [t - (k_t)^{-1}]$$

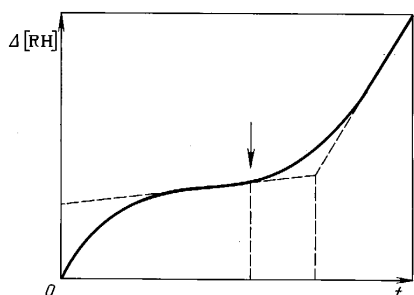


Рис. 2. Кинетическая кривая цепной реакции при выключении ( $t = 0$ ) и включении света (момент отмечен стрелкой) в методе фотохимического последействия (при больших  $t$ ), что позволяет найти  $k_t'$ , экстраполируя асимптотическую прямую накопления  $\Delta[R'H]$  к  $t=0$ .



Использование метода ограничено такими системами, где за время жизни активного центра  $\tau$  вступает в реакцию такое количество вещества  $\Delta[R'H]=V\tau$ , которое превышает чувствительность аналитического метода контроля.

### 3.5. Хемилюминесцентные методы

Жидкофазное окисление органических соединений сопровождается слабой хемилюминесценцией, которая была обнаружена в 1959 г. Р.Ф.Васильевым, В.Я.Шляпнотом и О.Н.Карпухиным. Хемилюминесценция обусловлена тем, что при диспропорционировании вторичных пероксильных радикалов образуется кетон в триплетно-возбужденном состоянии. Выход возбужденных молекул кетона составляет  $10^{-3}$ - $10^{-2}$  на один акт диспропорционирования. Квантовый выход составляет  $10^{-5}$ - $10^{-3}$  квантов на одну возбужденную молекулу, то есть интенсивность свечения очень низкая.

Для изучения хемилюминесценции стеклянный термостатированный реактор помещают в светонепроницаемую камеру, вводят субстрат, источник радикалов (инициатор), фотосенсибилизатор (если это необходимо) и ведут окисление при непрерывном барботировании кислорода. В качестве сенсбилизатора используют 9,10-дибромантрацен или хелат европия (тристеноилтрифторацетонат европия с фенантролином). Возникающее в ходе реакции свечение концентрируют зеркальным отражателем, усиливают фотоумножителем и регистрируют. Интенсивность свечения, возникающего при окислении, прямо пропорциональна скорости диспропорционирования  $RO_2^\bullet$ , а в квазистационарном режиме скорости инициирования

$$I=2k_t\eta_{хл}[RO_2^\bullet]^2=\eta_{хл}V_i$$

где  $\eta_{хл}$  - квантовый выход хемилюминесценции. Для определения неизвестной скорости инициирования проводят в идентичных условиях опыты с известной  $V_i'$  и неизвестной скоростью инициирования  $V_i$ , измеряя интенсивности хемилюминесценции  $I_{хл}'$  и  $I_{хл}$  соответственно. Скорость инициирования находят по формуле:

$$\xi=V_i/V_i'$$

Хемилюминесцентный метод широко использовали для изучения распада инициаторов. Поскольку  $I_{хл}=\eta_{хл}V_i$ ,  $V_i=2ek_d[i]$  (где  $e$  – вероятность выхода радикалов из клетки), то по мере распада инициатора  $I_{хл}$  падает во времени, так что по кинетике хемилюминесценции можно измерить  $k_d$  и  $e$ :

$$\ln(I_{хл}/I_{0,хл})=-k_d t \text{ и } e=V_i/2k_d[i]_0,$$

где  $V_i$  определяют по предыдущей формуле.

Хемилюминесценцию можно использовать для контроля за  $[RO_2^\bullet]$  и в нестационарном режиме. Если вести окисление, инициируя радикалы светом со скоростью  $V_i$ , то такому режиму соответствует  $[RO_2^\bullet]=(V_i/2k_t)^{1/2}$  и интен-

сивность свечения  $I_{0,хл}$ . После выключения света концентрация  $RO_2^\bullet$  уменьшается в соответствии с уравнениями:

$$-d[RO_2^\bullet]/dt = 2k_t[RO_2^\bullet]^2, [RO_2^\bullet]_0/[RO_2^\bullet] - 1 = 2k_t[RO_2^\bullet]_0 t.$$

Спад интенсивности свечения описывается соответственно формулой

$$(I_{0,хл}/I)^{1/2} - 1 = (2k_t V_i)^{1/2} t.$$

По наклону прямой в координатах  $(I_{0,хл}/I_{хл})^{1/2} - t$  определяют время жизни  $RO_2^\bullet$ :  $\tau = (2k_t V_i)^{-1/2}$ , и при известной  $V_i$  находят  $2k_t$ .

В хемилюминесцентном методе должен выполняться ряд условий:

1. Опыты следует проводить в веществе, при окислении которого возникает хемилюминесцентное свечение (метод хорошо опробован на этилбензоле).
2. Важно, чтобы все радикалы инициатора реагировали с углеводородом, обмениваясь в итоге на пероксильные радикалы субстрата.
3. Инициатор не должен тушить хемилюминесценцию.
4. Так как тушащим действием обладает кислород, опыты нужно проводить при таких парциальных давлениях  $O_2$ , которые обеспечивают быстрое превращение  $R^\bullet$  в  $RO_2^\bullet$ , но тушащее действие  $O_2$  минимально.

Хемилюминесценция используется также для изучения процессов пероксидации липидов. Интенсивность этой хемилюминесценции (ХЛ) очень мала, поэтому ее иногда называют "сверхслабым свечением". Интенсивность свечения пропорциональна квадрату концентрации свободных радикалов в мембранах, а скорость перекисного окисления прямо пропорциональна концентрации тех же радикалов. Поэтому интенсивность "сверхслабого" свечения однозначно отражает скорость липидной пероксидации в изучаемом биологическом материале, и измерение хемилюминесценции довольно часто используется при изучении перекисного окисления липидов в различных объектах. Измерение хемилюминесценции широко применяется также для изучения образования активных форм кислорода клетками крови и перитонеальными макрофагами. В присутствии фотосенсибилизаторов (люминола и люцигенина) наблюдается хемилюминесценция изолированных лейкоцитов крови, макрофагов или просто разведенной цельной крови, если клетки-фагоциты продуцируют гипохлорит и радикалы кислорода (супероксидный + гидроксидный радикалы). Интенсивность хемилюминесцентных ответов клеток увеличивается в несколько раз при появлении очагов некроза в организме, например, после инфаркта миокарда, и напротив, угнетается при тканевой гипоксии; поэтому измерение клеточной хемилюминесценции может быть использовано в ряде случаев с целью выявления заболевания, оценки тяжести состояния больного и эффективности назначенного лечения.

### 3.6. Методы изучения ингибиторов цепных реакций

Механизм действия ингибиторов подробно изучали в цепных реакциях окисления разнообразных соединений, прежде всего углеводов. Детально он исследован для фенолов.

#### 3.6.1. Начальная скорость ингибированного окисления (полимеризации)

В тех случаях, когда образующийся из ингибитора InH радикал In<sup>•</sup> не участвует в продолжении цепи, обрыв цепей происходит по реакции



и скорость цепной ингибированной реакции ( $k_{14}$  относится к стадии продолжения цепи) составляет

$$V = V_i + (k_{14}[\text{RH}]/fk_{34}[\text{InH}])/V_i$$

Если измерить начальную скорость окисления, когда за время измерения  $[\text{InH}] \approx [\text{InH}]_0$ , то можно определить отношение констант

$$k_{34}/k_{14} = (V_i/(V - V_i))([\text{RH}]/f[\text{InH}]_0)$$

Взяв серию ингибиторов и зная для данной системы RH-RO<sub>2</sub><sup>•</sup> константу скорости  $k_{14}$ , можно определить  $k_{34}$ . Таким образом, было измерено подавляющее большинство констант скорости реакций пероксидных радикалов с ингибиторами окисления. Полученные выражения справедливы и в том случае, когда все цепи обрываются на ингибиторе, т. е. выполняется условие

$$fk_{34}[\text{InH}] \gg (k_{18}V_i)^{1/2}$$

Для эффективного использования этого метода необходимо выполнение следующих условий:

1. Ингибированное окисление должно протекать в цепном режиме, иначе разница  $V - V_i$  будет очень мала и ее не удастся точно измерить.
2. За время измерения начальной скорости (время опыта  $t$ ) должна израсходоваться только небольшая часть ингибитора (например, 15%). Это означает, что ингибитор надо вводить в достаточно высокой концентрации.

#### 3.6.2. Скорость ингибированного окисления как функция времени

В ходе цепной реакции ингибитор расходуется. Если все цепи обрываются на ингибиторе, то он расходуется с постоянной скоростью, равной  $V_i/f$ . Поэтому обратная скорость ингибированного окисления линейно убывает во времени:

$$\frac{1}{V - V_i} = \frac{k_{34}f[\text{InH}]_0}{k_{14}V_i[\text{RH}]} - \frac{k_{34}f}{k_{14}[\text{RH}]}$$

По графику  $(V-V_i)^{-1}-t$  можно определить как  $k_{34}/k_{14}$ , так и  $V_i$ . Метод накладывает менее жесткие ограничения на систему RH-InH и позволяет расширить диапазон  $k_{34}/k_{14}$ , который можно измерить.

*Кинетика ингибированного окисления.* Оценку отношения  $k_{34}/k_{14}$  можно провести и по кинетике окисления, измеряя во времени количество поглощенного кислорода. Затем по зависимости изменения количества поглощенного кислорода от различных начальных концентраций антиоксиданта определить значения  $k_{34}/k_{14}$ :

$$\Delta[O_2] = \frac{k_{14}[RH]}{k_{34}} \ln \left( 1 - \frac{V_i t}{f[InH]_0} \right)$$

Предложен и другой более простой прием: кинетическая кривая строится в обратных координатах:  $\Delta[O_2]^{-1} - t^{-1}$ . При этом начальный участок кинетической кривой превращается в прямую линию, по наклону которой и определяется отношение  $k_{34}/k_{14}$ :

$$\frac{\Delta[O_2]}{\Delta t^{-1}} = \frac{k_{34} f [InH]_0}{k_{14} [RH] V_i}$$

*Оценка  $k_{34}$  по кинетике расходования ингибитора.* Когда ингибитор введен в такой концентрации, что на нем обрываются все цепи, скорость его расходования не зависит от его концентрации и равна  $V_i/f$ . Это используется для определения скорости инициирования. При достаточно малой концентрации InH скорость его расходования зависит от его концентрации, что можно использовать для определения константы скорости  $k_{34}$ . Если концентрация InH настолько мала, что в его присутствии пероксильные радикалы погибают по реакции друг с другом, то скорость его расходования

$$-d[InH]/dt = k_{34}[RO_2^\bullet][InH] = k_{34}/(k_{18})^{-1/2}[InH]V_i^{1/2},$$

и ингибитор расходуется по реакции первого порядка:

$$[InH] = [InH]_0 e^{-kt}, \quad k = k_{34} k_{18}^{1/2} V_i^{1/2}.$$

В общем случае пероксильные радикалы погибают по двум реакциям  $RO_2^\bullet + RO_2^\bullet$  и  $RO_2^\bullet + InH$ , так что

$$k = \frac{k_{34} V_i^{1/2}}{\sqrt{k_{18}}} \ln \left( 1 - \frac{k_{34} [InH]}{\sqrt{k_{18}} V_i} \right)$$

Для определения  $k_{34}$  выбирают такое соединение, для пероксильных радикалов которого известна  $k_{18}$ , вводят инициатор и по ходу опыта следят (например, спектрофотометрически) за расходованием ингибитора. Из каждого опыта определяют  $k$ , а экстраполируя  $k$  к  $[InH]_0 = 0$ , находят  $k_{34}/(k_{18})^{-1/2}$  и вычисляют  $k_{34}$ .

*Хемилюминесцентные методы измерения  $k_{34}$ .* Для жидкофазного окисления характерна хемилюминесценция, когда в реакции обрыва цепей образуется триплетно-возбужденный кетон. Интенсивность хемилюминесценции  $I \sim [R'OO^*]^2 \sim V_i$  (в квазистационарном режиме). При введении ингибитора уменьшается концентрация  $RO_2^{\bullet}$  и соответственно падает интенсивность хемилюминесценции. Изменение интенсивности с введением ингибитора, например, фенола, связано с  $[InH]$  соотношением:

$$(I_0/I)^{1/2} = (1 \pm 0.1)k_{34}/(V_i k_{18})^{1/2}$$

где  $I_0$  и  $I$  – интенсивности хемилюминесценции в окисляющемся  $RH$  в отсутствие и в присутствии ингибитора соответственно.

По зависимости  $I$  от  $[InH]$  находят  $k_{34}$  при известных  $V_i$  и  $k_{18}$ . В ходе опыта ингибитор расходуется, поэтому интенсивность хемилюминесценции возрастает. Кинетическая кривая хемилюминесценции имеет  $s$ -образную форму. Максимальный угловой коэффициент кривой хемилюминесценции равен

$$[d(I/I_0)/dt]_{max} = 0.22k_{34}V_i^{1/2}k_{18}^{-1/2}$$

Выражение справедливо в тех случаях, когда продукты превращения ингибитора не активны в качестве ингибиторов или инициаторов. В некоторых случаях введение ингибитора (амин) в окисляющееся вещество не тушит, а усиливает хемилюминесценцию.

### **3.7. Изучение реакций радикалов, образующихся из ингибитора**

В механизме ингибирования цепного окисления важную роль играют не только реакции ингибитора (такие, как  $RO_2^{\bullet} + InH$ ), но и реакции образующегося из ингибитора радикала  $In^{\bullet}$ . Наряду с традиционными методами изучения быстрых радикальных реакций (импульсные, струевые) создан ряд методов, где используется специфика ингибированного окисления углеводов.

*Кинетика ингибированного окисления.* Если радикалы ингибитора не участвуют в продолжении цепи, то обрыв цепей лимитирует реакция пероксидных радикалов с ингибитором и реакционная способность  $In^{\bullet}$  себя никак не проявляет. Однако, можно подбором  $RH$  и  $InH$  создать такие условия ингибированного окисления, при которых радикалы  $In^{\bullet}$  активно реагируют с  $RH$  и таким образом участвуют в продолжении цепи. Для создания таких условий используются  $RH$  со слабыми  $C-H$  связями, в частности 9,10-дигидроантрацен, который имеет слабые  $C-H$  связи ( $D_{C-H} = 297$  кДж/моль) и поэтому достаточно быстро реагирует с радикалами ингибитора. Скорость окисления, когда  $In^{\bullet}$  продолжает цепь по реакции с  $RH$  (реакция 37), имеет вид:

$$V = 2k_{14}[RH]^{3/2}(k_{37}V_i/fk_{34}k_{35}[InH])^{1/2}$$

На опыте измеряют (или экстраполируют) начальную скорость окисления при разных  $[RH]$ ,  $[InH]$  и определяют отношение  $k_{37}/k_{35}$ . При известной  $k_{35}$  находят  $k_{37}$ .

Аналогичным образом изучают реакцию радикалов ингибитора с гидропероксидом. Проводят опыты по окислению RH с инициатором, ингибитором и гидропероксидом. Измеряют начальную скорость окисления. Условия подбирают такими, чтобы радикал ингибитора достаточно энергично реагировал с ROOH. Тогда

$$V = k_{14}[\text{RH}](k_{-34}[\text{ROOH}]v_i/fk_{34}k_{35}[\text{InH}])^{1/2}$$

По зависимости  $V$  от  $V_i$ ,  $[\text{ROOH}]$  и  $[\text{InH}]$  проверяют справедливость этой зависимости и находят  $k_{-34}$  (характеризует реакцию  $\text{In}^\bullet$  с ROOH) при известных  $k_{14}$ ,  $k_{34}$ ,  $k_{35}$  и  $f$ .

*Кинетика образования радикала ингибитора.* Образующиеся по реакции  $\text{RO}_2^\bullet$  с InH радикалы (например, феноксильные из фенола) часто достигают в системе RH-O<sub>2</sub>-InH-I (I-инициатор) такой концентрации, когда их можно исследовать методом ЭПР. Это обстоятельство используется для измерения такой важной константы, как константа скорости реакции  $\text{RO}_2^\bullet + \text{In}^\bullet$ . Если образующиеся по реакции  $\text{RO}_2^\bullet + \text{InH}$  (реакция 34) радикалы  $\text{In}^\bullet$  исчезают только по реакции  $\text{In}^\bullet$  с  $\text{RO}_2^\bullet$  (реакция 35), то максимальная концентрация  $\text{In}^\bullet$  определяется простым соотношением:

$$[\text{In}^\bullet]_{\text{max}} = k_{34}[\text{InH}]/k_{35}.$$

Поступают следующим образом. В бензол вводят инициатор (азобисизобутиронитрил) и ингибитор окисления (фенол) и при барботировании кислорода следят методом ЭПР за концентрацией феноксильных радикалов  $\text{In}^\bullet$ . По максимальной концентрации  $\text{In}^\bullet$  находят отношение  $k_{34}/k_{35}$  и вычисляют  $k_{35}$ .

#### 4. ПРОЦЕССЫ ОКИСЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ МОЛЕКУЛ

Наличие в атмосфере Земли свободного кислорода обеспечивает жизнедеятельность аэробных биологических систем. В силу мощного деструктивного потенциала кислорода живая природа создала эффективные механизмы, позволяющие противостоять его разрушительному действию. Эволюционно приобретенная адаптация живых систем к кислороду как повреждающему фактору окружающей среды нашла свое отражение на генетическом уровне. При нормальном парциальном давлении  $O_2$  в атмосфере - 159 мм рт.ст. (это соответствует его концентрации 0.22 М) парциальное давление кислорода в клетках, определяющее граничные условия их функционирования, лежит в пределах 1-10 мм рт.ст. При небольшом увеличении парциального давления против физиологической нормы в живых клетках происходит индукция генов, ответственных за синтез группы белков, участвующих в защитных реакциях. В частности, среди этих белков синтезируется и такой ключевой фермент антиоксидантной защиты как митохондриальная <sup>9</sup> Mn-супероксиддисмутаза, инактивирующая супероксидный радикал - родоначальник всех остальных активных производных  $O_2$ .

Основную роль в повреждающем действии кислорода в отношении молекулярных структур в организме выполняют его свободнорадикальные производные, образующиеся на пути восстановления молекулы  $O_2$  до  $H_2O$  (супероксидный ( $O_2^{\cdot-}$ ), гидроксидный ( $HO^{\cdot}$ ) радикалы, синглетный кислород ( $^1O_2$ ), ряд металлоксомплексов высоких степеней окисления, приближающихся по своей окислительной способности к гидроксильному радикалу) в ходе осуществления самопроизвольных окислительных процессов.

*Основные процессы, ведущие к образованию свободных радикалов в организме:*

- последовательное присоединение электронов к кислороду в присутствии металлов переменной валентности;
- микросомальное и митохондриальное окисление, фагоцитоз;
- ферментативные реакции с участием гидролаз, оксидаз, дегидрогеназ;
- реакции автоокисления (тиолы, катехоламины и т.д.) и биосинтеза;
- окисление чужеродных соединений – ксенобиотиков (например, некоторых лекарственных препаратов);
- действие негативных факторов окружающей среды (физические и химические инициаторы окисления);
- фотохимические процессы;
- пероксидация липидов.

Основными инициаторами таких процессов выступают ионы металлов переменной валентности.

---

<sup>9</sup> Митохондрии выступают в качестве главного источника образования токсических форм кислорода в организме (за исключением лейкоцитов, оснащенных специализированной системой генерации таких форм для борьбы с инфицирующими микробами).

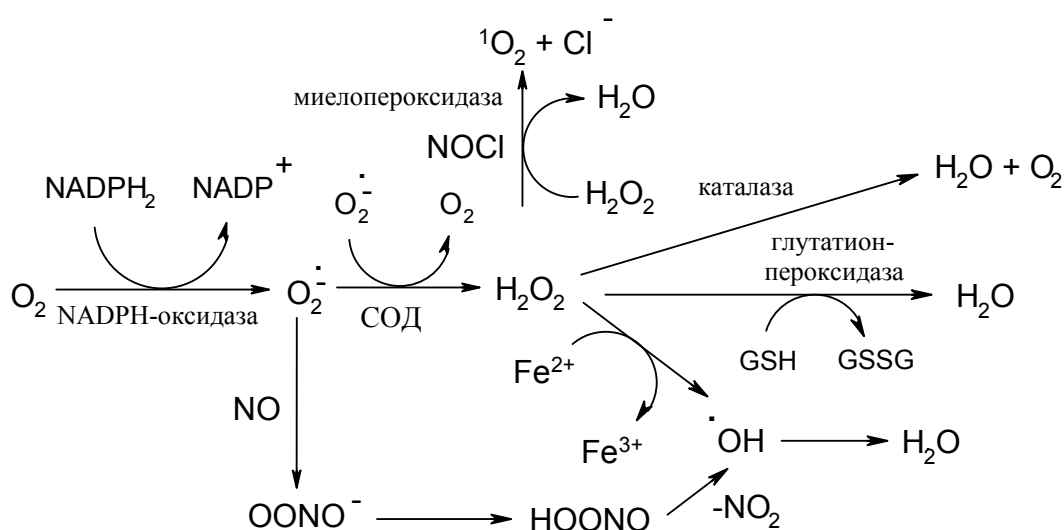
Свойство осуществлять окислительное повреждение и деструкцию компонентов живых систем, обусловленное активными производными кислорода определяют таким понятием, как "токсичность кислорода". А упомянутые эффекты такой токсичности (супероксидный, гидроксидный, гидропероксидный радикалы, синглетный кислород, ряд металлокомплексов высоких степеней окисления, радикалы липидов) называются "активными формами кислорода" (АФК) (табл. 3).

Таблица 3. АФК, образующиеся в клетках организма

Радикал	Основной источник образования	Токсичные реакции
Супероксид ( $O_2^{\bullet-}$ )	Митохондрии, микросомальные электронтранспортные цепи, автооксидабельные вещества, клетки-фагоциты	$O_2^{\bullet-} + Fe^{3+} \rightarrow O_2 + Fe^{2+}$
Радикал гидроксила ( $OH^{\bullet}$ )	$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + HO^- + HO^{\bullet}$ (реакция Фентона) $HOCl + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + Cl^- + HO^{\bullet}$ (реакция Осипова)	Повреждение ДНК и РНК, углеводов, аминокислот, цепное окисление липидов
Гидропероксидный радикал ( $HO_2^{\bullet}$ )	NADPH-оксидаза	Вызывает перекисное окисление липидов
Радикалы липидов ( $L^{\bullet}$ , $LO_2^{\bullet}$ , $LO^{\bullet}$ )	Цепное окисление липидов	Повреждение липидного бислоя и мембранных ферментов
Радикалы антиоксидантов ( $In^{\bullet}$ )	Цепное окисление липидов	Прооксидантное действие
Семихиноны	Цепи переноса электронов	$HQ^{\bullet} + O_2 \rightarrow Q + HO_2^{\bullet}$
Радикалы, образующиеся при метаболизме ксенобиотиков	Промышленные токсины и некоторые лекарства	Образование радикалов
Радикалы, образующиеся при действии света	Поглощающие свет вещества	Образование радикалов
Синглетный кислород ( $^1O_2$ )	Фагоцитирующие нейтрофилы	Окисление биомолекул
Монооксид азота (NO)	Клетки эндотелия и многие другие	$NO^{\bullet} + 2O_2^{\bullet-} \rightarrow OONO^{\bullet}$ (пероксинитрит)
Пероксид водорода ( $H_2O_2$ )	Микросомальные электронтранспортные цепи	Источник $OH^{\bullet}$
Пероксинитрит ( $OONO^{\bullet}$ )	Лейкоциты	Цитотоксический эффект, нитрование тирозильных остатков в белках, иницирование ПОЛ, расщепление ДНК, окисление SH-группы, инактивация аконитазы, подавление транспорта электронов в митохондриях
Гипохлорит ( $OCl^-$ )	Фагоцитирующие нейтрофилы	Окисление аминокислот белков, нуклеиновых кислот, коферментов



Схема биологических механизмов образования АФК:



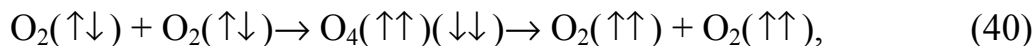
Рассмотрим механизмы образования АФК.

#### 4.1. Возбужденные формы молекулярного кислорода

Молекулярный кислород в возбужденном состоянии образуется в фото-реакциях, в процессе окислительного метаболизма в живых системах, как побочный токсический агент в специализированных реакциях. Рассмотрим основные характеристики возбужденного кислорода, несовместимая с жизнью высокая химическая активность которого используется высшими организмами для уничтожения инфицирующих микробов.

Наиболее изучены 4 формы возбужденного молекулярного кислорода: две из них - синглетные ( ${}^1\Delta_g, {}^1\Sigma_g^+$ ) и две - триплетные ( ${}^3\Sigma_u^+, {}^3\Sigma_u^-$ ), энергия которых превышает основное триплетное состояние молекулы  $O_2$  ( ${}^3\Sigma_g^-$ ) соответственно на 94.2; 150.7; 418.6 и 586 кДж/моль. Учитывая энергетический выход экзергонических реакций *in vivo*, для живой материи значение могут иметь лишь синглетные формы и в первую очередь  ${}^1\Delta_g$ - как наиболее долгоживущая субстанция. Обусловлено это тем обстоятельством, что переходы из первого возбужденного состояния в основное по типу триплет  $\rightarrow$  синглет и наоборот, формально запрещены по спину и требуют гораздо больше времени ( $1-10^{-3}$ с), чем однотипные переходы: синглет  $\rightarrow$  синглет или триплет  $\rightarrow$  триплет ( $10^{-9}-10^{-7}$ с). Время релаксации кислорода из второго возбужденного состояния в первое (оба синглетные) также составляет  $10^{-9}$ с.

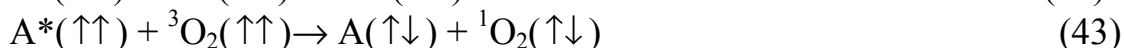
Механизм перехода первого возбужденного синглетного (метастабильного) состояния  ${}^1\Delta_g$  в основное триплетное, в отсутствие молекул-«гасителей», осуществляется рекомбинацией синглетов через образование так называемых эксимеров - промежуточной формы  $O_4$ :



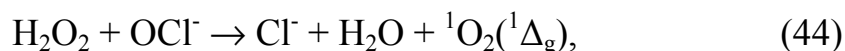
что сопровождается люминесценцией при длинах волн 634 нм и 703 нм. Спин-запрещенный переход характеризуется инфракрасной люминесценцией (1268 нм) и временем релаксации -  $10^{-3}$  с:



Формально, с учетом правила Гунда, обе формы синглетного кислорода ( $^1\text{O}_2$ ) должны образовываться лишь через стадию продукции триплетных возбужденных состояний, которые при переходе в синглетное состояние часть энергии затрачивали бы на безизлучательный процесс - обращение спина одного из электронов. Однако в живых организмах отсутствуют экзергонические реакции, способные продуцировать порциями такие количества энергии. Реально энергетически более благоприятной оказывается ситуация для продукции синглетных форм. Так, в присутствии фотосенсибилизатора (порфирины, полициклические ароматические углеводороды и др.) удается обойти стадию образования триплетных возбужденных форм в соответствии со следующим механизмом (где А - фотосенсибилизатор, А\* - его возбужденные синглетное и триплетное состояния):

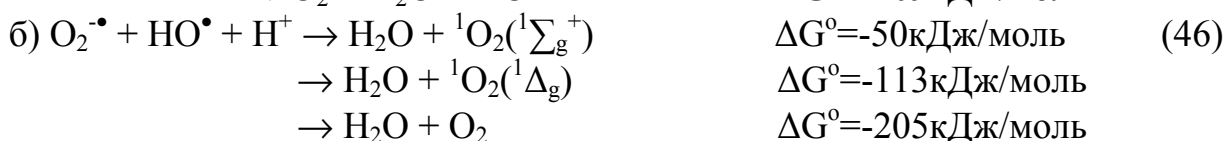


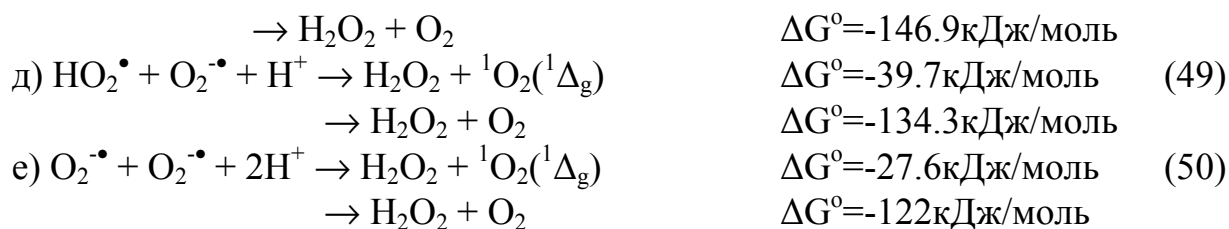
Перенос энергии от триплетно-возбужденного А\* к  ${}^3\text{O}_2$  является разрешенным по спину процессом. Примером химической продукции  ${}^1\Delta_g$  является реакция окисления пероксида водорода гипохлоритом:



Процесс этот термодинамически благоприятен (что следует из величин редокс-потенциалов соответствующих полуреакций двухэлектронного переноса:  $\text{OCl}^-/\text{Cl}^-$  (+1.07 В) и  $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}_2$  (+0.28 В)). В результате реализации данной реакции выход  ${}^1\text{O}_2$  составляет около 80% от образующегося  $\text{O}_2$ . Данная реакция выполняет одну из ключевых ролей в уничтожении инфицирующих микроорганизмов фагоцитирующими лейкоцитами.

В качестве источника синглетного кислорода в биологических системах могут выступать и ряд других реакций с участием химически активных интермедиатов восстановления молекулярного кислорода до воды:



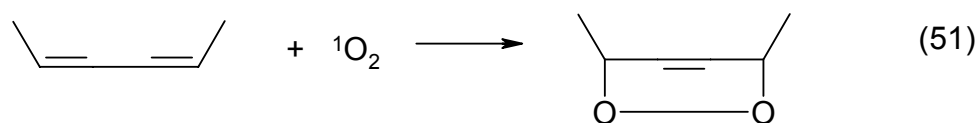


Метаболический аппарат аэробных организмов организован столь совершенным образом, что позволяет эффективно утилизировать около 98% молекулярного кислорода без образования его свободнорадикальных производных, участвующих в приведенных выше реакциях и губительных, аналогично синглетному кислороду, для живых клеток.

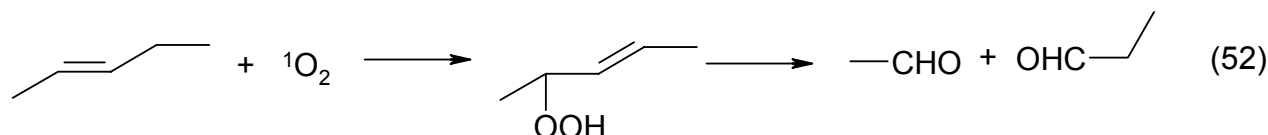
До последнего времени единственным примером существования специализированного механизма генерации  ${}^1\text{O}_2$  в живых системах был белок церкоспорин грибов вида *Cercospora*, вызывающий фотоиндуцированное образование этого агента (а также супероксидного радикала  $\text{O}_2^\bullet$ ) для защиты гриба. Имеются данные, свидетельствующие в пользу существования ферментативного механизма продукции синглетного кислорода нейтрофильными лейкоцитами млекопитающих также специализированного для выполнения защитной (антимикробной) функции.

Механизм взаимодействия синглетного кислорода (здесь и далее - только  ${}^1\Delta_g$ ) с органическими субстратами осуществляется либо путем переноса энергии (где субстраты выступают молекулами-«гасителями»), либо химически - с переносом заряда и энергии. "Спиновый запрет" у этого энергизированного состояния молекулы кислорода в отношении валентнонасыщенных органических биосубстратов отсутствует. Реагируя, в первую очередь, с различными ненасыщенными молекулами, он окисляет их весьма специфическим образом:

1. (2-4)-циклоприсоединение к сопряженным диенам:

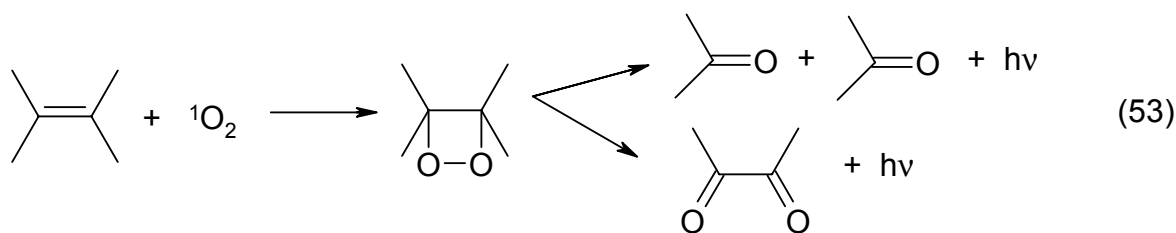


2. Аллильное замещение в олефинах:



Образующийся гидропероксид спонтанно разлагается с образованием в живых системах токсичных альдегидов.

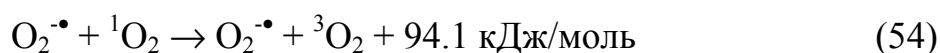
3. (2-2)-Циклоприсоединение к двойным связям. Разложение 1,2-диоксетановых производных ведет как к окислительному расщеплению биоструктур, так и к локальному выделению значительных количеств энергии:



Причем, образование энергетически возбужденных интермедиатов в ходе реализации процесса (53) предполагает возможность осуществления и других химических реакций, где такие интермедиаты могут выступать инициаторами и участниками превращений. Образование пероксидных соединений при взаимодействии  ${}^1\text{O}_2$  с двойными связями во всех случаях служит предпосылкой для инициации цепных реакций перекисного окисления и генерации свободнорадикальных форм. Следовательно - и вовлечения в прямые окислительные процессы молекулярного кислорода в его основном триплетном состоянии как субстанции, обладающей (би)радикальной природой.

4. Взаимодействие с гетероатомами (сера или азот) ведет к образованию сульфоксидов или N-оксидов (четвертичные амины могут подвергаться деалкилированию).

Альтернативой химическим реакциям с участием синглетного кислорода является его «тушение», то есть переход в основное триплетное состояние без высвечивания фотона. Тушение осуществляется в результате переноса энергии возбуждения  ${}^1\text{O}_2$  к молекуле тушителя. То есть этот процесс противоположен эффекту фотосенсибилизаторов, где энергия фотонов затрачивается на возбуждение последних в триплетное состояние с последующим переносом ее молекулярному кислороду в основном состоянии. Одним из самых эффективных гасителей синглетного кислорода в клетке является  $\beta$ -каротин, одна молекула которого способна "потушить" около 1000 молекул  ${}^1\text{O}_2$  прежде, чем  $\beta$ -каротин подвергнется окислительной деструкции. Причем константа скорости тушения имеет высокие значения ( $k=3 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ ). С высокой скоростью протекает тушение синглетного кислорода супероксидным радикалом (см. Свободно-радикальные интермедиаты одноэлектронного пути восстановления кислорода):

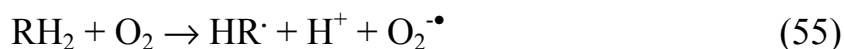


Однако основным гасителем синглетного кислорода в живых системах выступает вода ( $k = 0.5 \cdot 10^6 \text{ c}^{-1}$ ) благодаря ее высокой концентрации как химического реагента (55.55 M). Опасность образования  ${}^1\text{O}_2$  для живой материи вполне реальна, так как время существования этого реагента в водных растворах составляет примерно 2 мкс, что определяет радиус его действия около 0.3 мкм (3000  $\text{\AA}$ ). Тем не менее, в живых организмах, по-видимому, отсутствуют условия для непосредственной активации молекулярного кислорода в его синглетное состояние. В этой форме он может возникать лишь как про-

дукт химических реакций (например, в результате реакций (44)-(50)), а также в виде переходного состояния в активных центрах ферментов, использующих молекулярный кислород в качестве субстрата.

#### **4.2. Свободнорадикальные интермедиаты одноэлектронного пути восстановления кислорода**

Ранее рассмотренным реакциям двухэлектронного восстановления молекулы  $O_2$  в общем случае благоприятствует изменение термодинамического потенциала ( $\Delta G^0 < 0$ ), но ограничение на их реализацию накладывает спиновый запрет. Иная ситуация наблюдается для процесса одноэлектронного восстановления кислорода:



Этот процесс не ограничен спиновым запретом, но в данном случае кислород выступает как очень слабый окислитель, что обусловлено низким редокс-потенциалом окислительно-восстановительной пары  $O_2/O_2\cdot^-$  ( $E_0 = -0.33V$ )<sup>10</sup>. Следовательно, в биологических системах этот путь окисления субстратов является термодинамически весьма неблагоприятным. Это обстоятельство, наряду со спиновым запретом двухэлектронного пути окисления биоструктур, выступает в качестве условия инертности молекулярного кислорода. То есть, возможности для осуществления реакции (55) являются более или менее благоприятными для реальных условий живой клетки при наличии соответствующих субстратов-восстановителей.

Важной особенностью одноэлектронного восстановления кислорода является как образование свободнорадикальных форм субстрата-восстановителя, так и сохранение свободнорадикальной природы самого кислорода (в форме супероксидного радикала -  $O_2\cdot^-$ ). Свободнорадикальные продукты соединений ароматической природы или соединений, обладающих развитой системой сопряженных связей, довольно стабильны (из-за делокализации неспаренного электрона), и такие соединения в живых системах часто выполняют функцию антиоксидантов. Эти "стабильные" радикалы характеризуются относительно низкой активностью (токоферолы и др.) и, в основном, вступают в реакции диспропорционирования или рекомбинации друг с другом и с другими радикалами (см. Система антиоксидантной защиты организма).

Радикальные соединения реагируют с высокими скоростями. Так если энергии активации реакций между насыщенными молекулами составляют обычно (в отсутствие ферментов или других катализаторов) несколько десят-

---

<sup>10</sup> Отметим, что за исключением специально сделанных оговорок, в пособие представлены, в основном, стандартные «биохимические» редокс-потенциалы (в отличие от «физико-химических», оценка их ведется не при рН0, а при рН7). Упомянутые «оговорки» будут касаться условий, близких к физиологическим. В частности, для большинства клеток и тканей млекопитающих редокс-потенциал пары  $O_2/O_2\cdot^-$  составляет около +0.2В, а не -0.33В, поскольку стандартные условия ( $[O_2\cdot^-]=1M$  при  $pO_2=1атм$  и рН7) не соответствуют физиологическим. С другой стороны, в апротонных средах (например, в липидном окружении биомембран) редокс-потенциал этой окислительно-восстановительной пары гораздо ниже: -0.6В.

ков ккал/моль, то величины  $E_a$  для реакций между свободным радикалом и валентнонасыщенным реагентом оказываются во много раз ниже:



Наиболее низкие величины энергий активации (а значит, и наиболее высокие значения констант скоростей) присущи реакциям взаимодействия валентнонасыщенных молекул с гидроксильным радикалом:



Между тем скорости межрадикальных реакций (реакции рекомбинации и диспропорционирования свободных радикалов) приближаются к частоте столкновений (так как эти реакции уже не требуют энергии активации). Поэтому концентрация радикалов в реакционной среде обычно не превышает 10 нМ. Для того, чтобы иницируемые свободными радикалами реакции с другими соединениями могли конкурировать с межрадикальными, они должны осуществляться со скоростями сходного порядка величин. Такие реакции и протекают, поскольку концентрация валентнонасыщенных молекул-мишеней на многие порядки значений превышает концентрацию атакующих их радикалов.

В живых системах мишенью свободных радикалов выступают практически все наиболее важные в функциональном отношении биомолекулы, но наиболее интенсивно протекает окисление липидов клеточных мембран (см. Влияние АФК на биологические молекулы). Данное обстоятельство обусловлено преимущественным концентрированием молекулярного кислорода в липидной фазе, а также его бирадикальной природой. Благодаря последней  $\text{O}_2$  взаимодействует с радикальными продуктами окисления липидов с очень высокими скоростями, поскольку межрадикальные реакции практически не требуют энергии активации.

Образующийся в ходе одноэлектронного восстановления кислорода супероксидный анион-радикал ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) диспропорционирует (дисмутирует) лишь в присутствии протонов. В противном случае наличие одинакового заряда у взаимодействующих частиц не позволяет им сблизиться на дистанцию, обеспечивающую эффективность перекрывания их орбиталей. То есть, константа скорости этого процесса очень зависит от значения pH реакционной среды:



Максимальная скорость дисмутации супероксидных радикалов соответствует эквимольному соотношению их протонированных и депротонированных форм ( $pK_a=4.8$ ):



При нейтральных значениях pH скорость дисмутации этого радикала характеризуется значительно более низкой константой ( $k=5 \cdot 10^5 M^{-1} c^{-1}$ ).

Константа скорости протонирования  $O_2^{\bullet-}$  (реакции (65)) является важной характеристикой супероксидного анион-радикала при его взаимодействии в первую очередь с субстратами-донорами протонов. Абсолютное значение энергии Гиббса для протонирования  $O_2^{\bullet-}$  при 25°C приблизительно составляет -27.4 кДж/моль.

Время жизни супероксидного радикала в биологическом материале составляет  $10^{-6}$ с, что определяет радиус его действия около 0.3мкм. При нейтральных условиях доля его протонированной формы  $HO_2^{\bullet}$  очень незначительна: при pH 7.4 она достигает лишь 0.25% от общего количества супероксидного радикала. Поскольку основная доля супероксидного радикала находится в заряженной и, следовательно, в гидратированной форме - это обстоятельство препятствует преодолению данным анион-радикалом клеточных мембран и поэтому является основным условием накопления  $O_2^{\bullet-}$ , образовавшегося внутри клеток.

Основным источником внутриклеточной генерации супероксидного радикала являются митохондрии, где до 2% от потребляемого  $O_2$  восстанавливается в  $O_2^{\bullet-}$  (преимущественно на  $CoQH_2$ , и на цитохроме  $B_{556}$ ). Дополнительным источником  $O_2^{\bullet-}$  выступают компоненты микросомальной электрон-транспортной цепи (преимущественно - цитохром P450), а также соединения (катехоламины и др.), способные к автоокислению молекулярным кислородом.

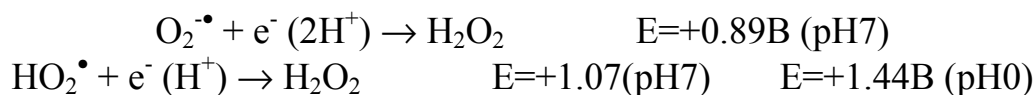
Аналогично другим межрадикальным реакциям, процесс дисмутации супероксидных радикалов (особенно его протонированных форм - пероксирадикалов) является строго экзергоничным (реакции (48)-(50)). В результате чего образуется и некоторое количество молекулярного кислорода в синглетном состоянии (около 0.1% от общей продукции  $O_2$ ).

В зависимости от химической природы субстратов, с которыми реагирует,  $O_2^{\bullet-}$  ( $O_2^{\bullet-}/HO_2^{\bullet}$ ) способен выполнять роль как одноэлектронного окислителя ( $E_0 O_2^{\bullet-}/H_2O_2 = +0.89V$ ), так и восстановителя ( $E_0 O_2/O_2^{\bullet-} = -0.33V$ ). Причем в качестве более сильного окислителя выступает его протонированная форма. Это является следствием участия иона водорода в большинстве окислительно-восстановительных реакций с участием супероксидного радикала:

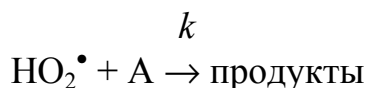
$$E = E_0 + (RT/nF) \ln([O_2^{\bullet-}]/[H_2O_2]) + (RT/F) \ln[H^+] \quad n=1 \quad \text{или}$$

$$E = E_0 + (RT/F) \ln([O_2^{\bullet-}]/[H_2O_2]) - 2.303(RT/F) pH$$

То есть, реальное значение редокс-потенциала E с увеличением доли  $HO_2^{\bullet}$  (то есть, с уменьшением pH) будет нарастать, например,



В соответствие с этим, при увеличении доли протонированной формы супероксидного радикала будут нарастать и наблюдаемые (кажущиеся) константы скоростей ( $k_{набл}$ ) реакций окисления субстратов-восстановителей (А):



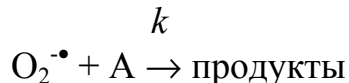
В этом случае общая скорость реакции, определяемая протонированной формой, равна  $V = k[\text{HO}_2^{\bullet}][\text{A}]$  (а).

Так как  $[\text{HO}_2^{\bullet}] = [\text{O}_2^{\bullet-}][\text{H}^+]/K_a$  (где  $K_a=10^{-4.8}\text{M}$ ), то  $V = k[\text{O}_2^{\bullet-}][\text{H}^+][\text{A}]/K_a$ . Из уравнения материального баланса  $[\text{O}_2^{\bullet-}]_t = [\text{O}_2^{\bullet-}] + [\text{HO}_2^{\bullet}]$  следует, что  $[\text{O}_2^{\bullet-}] = [\text{O}_2^{\bullet-}]_t - [\text{HO}_2^{\bullet}] = [\text{O}_2^{\bullet-}]_t - [\text{O}_2^{\bullet-}][\text{H}^+]/K_a$  и далее  $[\text{O}_2^{\bullet-}](1 + [\text{H}^+]/K_a) = [\text{O}_2^{\bullet-}]_t$  или

$$[\text{O}_2^{\bullet-}] = [\text{O}_2^{\bullet-}]_t / (1 + [\text{H}^+]/K_a) \quad (\text{б})$$

Подставляя (б) в (а), получаем окончательное выражение для скорости реакции (в):  $V = k[\text{A}][\text{H}^+][\text{O}_2^{\bullet-}]_t / K_a(1 + [\text{H}^+]/K_a) = k_{набл}[\text{A}][\text{O}_2^{\bullet-}]_t$ , где  $k_{набл} = k[\text{H}^+] / (K_a + [\text{H}^+])$  (г).

В случае атаки субстрата-восстановителя (А) депротонированной формой супероксидного радикала, наблюдаемая константа скорости реакции



(после аналогичных преобразований) имеет следующий вид:

$$k_{набл} = kK_a / (K_a + [\text{H}^+]) \quad (\text{д})$$

Из последнего выражения (д) следует, что при  $\text{pH} > \text{p}K_a (=4.8)$  (то есть, когда  $K_a \gg [\text{H}^+]$ ) константа скорости реакции не зависит от pH ( $k_{набл} = k$ ) и ход реакции практически полностью определяется депротонированной формой супероксидного радикала (анион-радикалом). Обратная ситуация имеет место для гидропероксильного радикала  $\text{HO}_2^{\bullet}$  (уравнение г)). То есть, при физиологических условиях в реакционной среде скорость реакции практически полностью зависит от  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , а вкладом  $\text{HO}_2^{\bullet}$  вполне можно пренебречь.

Как константы скоростей ( $k$ ) таких реакций, так и их наблюдаемые константы для двух форм супероксидного радикала в отношении реакций взаимодействия последних с одним и тем же субстратом могут не совпадать. Для  $\text{HO}_2^{\bullet}$ , выступающего в качестве окислителя (или для  $\text{O}_2^{\bullet-}$  - как восстановителя), эти константы должны быть выше, поскольку  $E(\text{HO}_2^{\bullet}) > E(\text{O}_2^{\bullet-})$ . Действительно, комбинируя уравнение Гиббса ( $\Delta G^0 = -n\Delta E_0 F$ ) с уравнением Эйринга ( $k = \kappa T / \text{hexp}(-\Delta G^\ddagger / RT)$ ), получаем следующее неравенство констант скоростей для обеих форм супероксидного радикала, выступающих в качестве окислителя:



$$k(\text{HO}_2^\bullet) = \kappa T / h \exp(n\Delta E_0 F / RT) > k(\text{O}_2^{\bullet-}) = \kappa T / h \exp(n\Delta E_0 F / RT)$$

или

$$k(\text{HO}_2^\bullet) = \kappa T / h \exp(n\Delta E_0 F / RT) < k(\text{O}_2^{\bullet-}) = \kappa T / h \exp(n\Delta E_0 F / RT),$$

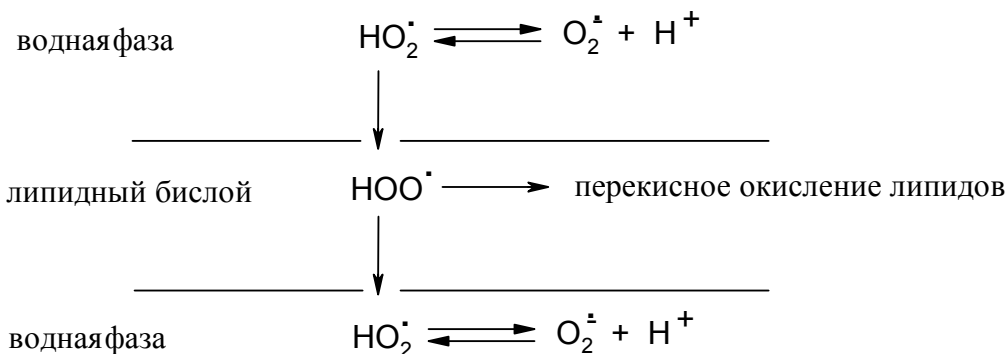
если они, напротив, являются донорами электронов в данном окислительно-восстановительном процессе.

Отметим, что аналогичный подход (замена в уравнении Эйринга параметра  $\Delta G^\ddagger$  на  $\Delta G$ ) был успешно использован для анализа результатов изучения взаимодействия свободнорадикальных и валентнонасыщенных форм глутатиона с различными производными (гидро)бензохинона. Однако такой подход справедлив лишь в том случае, если эти реакции подчиняются теории Маркуса, то есть когда кинетические параметры ( $k$ ) действительно функционально связаны с термодинамическими ( $\Delta G^0$ ). Функциональная же зависимость  $k$  от  $\Delta G^\ddagger$  очевидна уже по определению (уравнение Эйринга).

Сродство к электрону у  $\text{HO}_2^\bullet$  (70 ккал/моль) почти соответствует атомарному иоду (75 ккал/моль) и является более высоким, чем у таких радикалов как фенильный (50 ккал/моль) и  $\bullet\text{CH}_3$  (25 ккал/моль). Благодаря тому, что  $\text{HO}_2^\bullet$ , в отличие от несущего заряд  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , является преимущественно гидрофобной субстанцией, то в присутствии в среде липидов равновесие в реакции (65) будет сдвинуто вправо, а гидропероксидный радикал станет аккумулироваться в липидной фазе. В этих условиях  $\text{HO}_2^\bullet$  может выступать инициатором цепных реакций перекисного окисления липидов биологических мембран (см. Перекисное окисление липидов).

Еще одним из условий более высокой химической активности  $\text{HO}_2^\bullet$  по сравнению  $\text{O}_2^{\bullet-}$  является наличие у него более слабой связи между атомами кислорода, чем у анион-радикала: 267.8 кДж/моль против 368.2 кДж/моль (см. таблицу 1).

Протонированная форма, к тому же, способна не только проникать в липидное окружение, но и преодолевать мембранные барьеры клеток, диссоциируя в замембранном пространстве в соответствии со значением его pH:

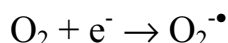


В неполярной среде значительно возрастает и химическая активность анион-радикала  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . Во-первых, в этих условиях (в отсутствие  $\text{H}^+$ ) реакции с его участием не вступают в конкуренцию с протон-зависимой реакцией дис-

мутации этого радикала. Во-вторых, в неполярной среде  $O_2^{\bullet}$  выступает как сильное основание с высокой нуклеофильностью и редуцирующей активностью. Этому благоприятствует отсутствие у такого аниона сольватной (гидратной) оболочки, что ведет к усилению его поляризующей активности:

$$F = q_1 \cdot q_2 / \varepsilon \cdot r^2,$$

где  $\varepsilon$  - диэлектрическая постоянная (равная для воды 80, для липидной фазы - от 2 до 6). Источником образования депротонированного супероксидного радикала в гидрофобном окружении выступает процесс шунтирования электрон-транспортных цепей биологических мембран молекулярным кислородом (например, в митохондриях, в участке локализации коэнзима Q):



Этому способствует растворимость  $O_2$  в неполярных средах, которая является почти 10-кратно более высокой, чем в водной фазе. Значительно более низкая растворимость в воде, чем в органических жидкостях не является особенностью только кислорода. Любые вещества при растворении в воде вызывают в ней нарушение структуры ближнего порядка, определяемое водородными связями между ближайшими молекулами  $H_2O$ . Если такие вещества не вступают в специфические взаимодействия с  $H_2O$  или этими взаимодействиями можно пренебречь, то их растворение требует затрат энергии. Поэтому растворимость в воде указанных веществ оказывается приблизительно на порядок меньше, чем в органических жидкостях. Напротив, аномально высокая растворимость  $CO_2$  обусловлена его взаимодействием с  $H_2O$ :



Однако подчеркнем еще раз, что в апротонной среде молекулярный кислород выступает существенно более слабым окислителем: редокс-потенциал пары  $O_2/O_2^{\bullet}$  составляет лишь -0.6В (вместо -0.33В при рН7).

Между двумя формами супероксидного радикала - протонированной (пероксирадикалом) и непротонированной - существуют определенные качественные отличия. Для определения их вклада в суммарный процесс, а также для предсказания ожидаемого конечного эффекта необходимо оценить долю и содержание обоих этих реагентов в реакционной среде. Используя уравнение Гендерсона-Гассельбаха, соотношение обеих форм супероксидного радикала можно легко установить для любого значения рН:

$$\lg([O_2^{\bullet}]/[HO_2^{\bullet}]) = \text{pH} - 4,8 \quad (66), \text{ или}$$

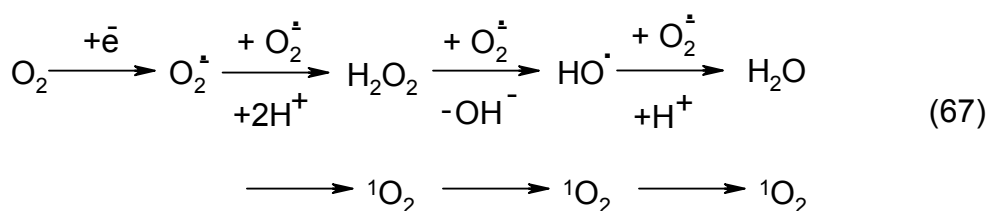
$$[O_2^{\bullet}]/[HO_2^{\bullet}] = 10^{\text{pH}-4,8} \quad (66a)$$

Концентрацию  $O_2^{\bullet}$  или  $HO_2^{\bullet}$  в зависимости от рН среды легко оценить, используя следующие соотношения (где  $[O_2^{\bullet}]_t$  - суммарная концентрация обеих форм супероксидного радикала):

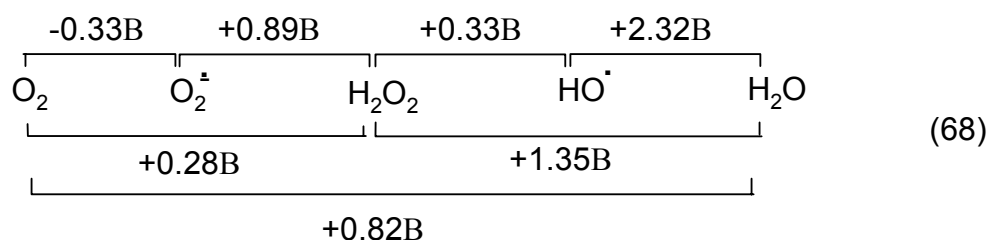
$$[HO_2^{\bullet}] = 10^{-\text{pH}} [O_2^{\bullet}]_t / (10^{-\text{pH}} + 10^{-4,8}) \quad (66b)$$

$$[O_2^{\bullet-}] = 10^{-4,8} [O_2^{\bullet-}] / (10^{-pH} + 10^{-4,8}) \quad (66в)$$

Тем не менее, собственный повреждающий эффект обеих форм супероксидного радикала при его непосредственном взаимодействии с органическими мишенями (как окислителя или восстановителя) является незначительным по сравнению с его вкладом в деструктивные процессы по механизмам, описанным ниже. В ходе осуществления этих процессов супероксидный радикал реализует только лишь свои восстановительные свойства. Во-первых, в этом качестве радикал  $O_2^{\bullet-}/HO_2^{\bullet}$  выступает непосредственным родоначальником других токсических производных молекулярного кислорода:



что в термодинамическом варианте ( $E_0$  при pH 7):

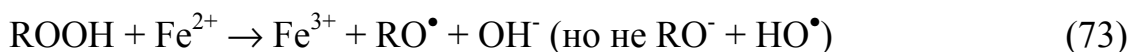


Во-вторых, супероксиданионрадикал способствует восстановительному освобождению ионов переходных металлов, и в особенности железа, из их комплексов с биологическими молекулами. Поэтому, в живых системах концентрация спонтанно образующегося  $O_2^{\bullet-}$  и поддерживается на уровне не более  $10^{-12}$ - $10^{-11}$ М (см. Система антиоксидантной защиты организма). Например, в составе ферритина и трансферрина железо представлено в форме  $Fe^{3+}$ , которое в результате восстановления  $O_2^{\bullet-}$ -радикалами до  $Fe^{2+}$  покидает белок. В этой степени окисления железо является, в частности, инициатором образования наиболее разрушительного из всех токсических форм кислорода - гидроксильного радикала ( $HO^{\bullet}$ ):

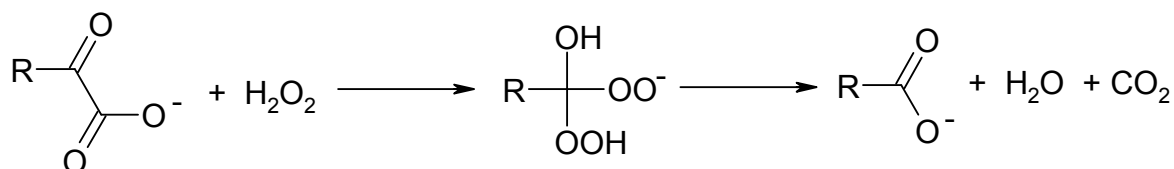


Практически во всех случаях генерации гидроксильного радикала в живых системах источником его образования выступает пероксид водорода, но не гидропероксиды органических молекул. В последнем случае, в качестве свободнорадикального эквивалента  $HO^{\bullet}$ , образуется алкокси(алки)льный радикал ( $RO^{\bullet}$ ), обладающий высокой реакционной способностью, однако усту-

пающий по своим разрушительным свойствам гидроксильному радикалу. Обусловлено это гораздо более высоким сродством к электрону  $\text{HO}^\bullet$ , чем  $\text{RO}^\bullet$ :



Разрушительная роль пероксида водорода, образующегося при восстановлении кислорода, и его цитотоксический эффект реализуется лишь в присутствии соответствующих доноров электронов посредством образования гидроксильного радикала. Непосредственно молекула  $\text{H}_2\text{O}_2$  окисляет лишь ограниченный круг веществ, таких как тиолы, аскорбат и др. Причем, в этом случае заметный эффект пероксида водорода наблюдается лишь при довольно значительных его концентрациях ( $>50\text{мкМ}$ ), гораздо более высоких, чем физиологические ( $10^{-9}$ - $10^{-7}\text{М}$ ). Пероксид водорода может участвовать и в процессах окислительного декарбоксилирования аминокислот и  $\alpha$ -кетокислот (наряду с их ферментативным декарбоксилированием). Реализуется этот процесс через образование промежуточного аддукта, разлагающегося далее на карбоновую кислоту,  $\text{CO}_2$  и молекулу воды:

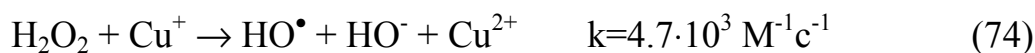


Поскольку  $\alpha$ -кетокислоты выполняют важнейшую роль в метаболических реакциях в организме (как анаболических, так и катаболических), увеличение внутриклеточного уровня  $\text{H}_2\text{O}_2$  может причинять существенный вред даже без учета негативных эффектов радикальных производных пероксида водорода. Молекула  $\text{H}_2\text{O}_2$  относительно стабильна в присутствии многих органических молекул и не несет электрический заряд. Сочетание этих ее качеств позволяет перексиду водорода накапливаться (в отсутствие разлагающих его катализаторов) и легко преодолевать биологические мембраны. Возможности локального накопления пероксида водорода, наряду с отмеченным, благоприятствует и ограничение по спину реакции его диспропорционирования на воду и молекулярный (триплетный) кислород.

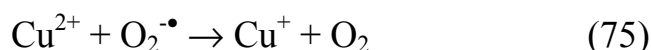
$\text{H}_2\text{O}_2$ , проникая внутрь клеток и взаимодействуя с ионами железа или меди, способен выполнять уже описанную выше роль источника  $\text{HO}^\bullet$  (а также стабилизированных хелатированием окисленных форм этих металлов, химическая активность которых в координационных комплексах может быть сопоставима с активностью самого гидроксильного радикала. Именно поэтому стационарная концентрация пероксида водорода и поддерживается в клетках на уровне не более  $10^{-9}$ - $10^{-7}\text{М}$ . И это притом, что 13-20% молекулярного кислорода, поглощаемого организмом млекопитающих, превращается в  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Причем, до 75% образующегося пероксида водорода продуцируется в печени - органе, где в основном и осуществляется дезактивация экзо- и эндогенных токсических факторов. В уничтожении же инфицирующих микроорганизмов лейкоцитами животных и человека пероксид водорода занимает особое место

как субстрат для производства наиболее разрушительных среди АФК субстанций.

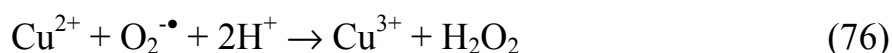
Реакция (71) протекает довольно быстро уже при 0°C (где в отсутствие ионов металла пероксид водорода совершенно устойчив) и значительно эффективнее идет при комнатной температуре ( $k=76\text{M}^{-1}\text{c}^{-1}$ ,  $\Delta G^0=-50\text{ккал/моль}$ ), чем прямой процесс восстановления  $\text{H}_2\text{O}_2$  супероксидным радикалом (реакция (45) и аналогичная ей в цепи превращений (67):  $k=0.35\text{M}^{-1}\text{c}^{-1}$ ). Еще более энергичное разложение перекиси идет в присутствии восстановленного иона меди:



Содержание этого элемента в живых системах значительно уступает содержанию железа и не составляет ему конкуренцию в процессах (69) и (71) (реакция Фентона или катализируемая ионами металла реакция Хабера-Вейса). В отношении комплексов двухвалентной меди супероксидный радикал может выступать не только в качестве восстановителя, регенерирующего одновалентные ионы:



но и в качестве окислителя, что ведет к продукции мощного оксиданта -  $\text{Cu}^{+3}$ :



Гидроксильный радикал может генерироваться не только в реакциях Фентона (69) и (70), но и продуцироваться через образование пероксида по реакции ионов железа с  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , где последний, как и в предыдущем примере с ионами меди, также способен выступать в качестве окислителя двухвалентного железа:



Поскольку константа скорости этой реакции гораздо выше, чем аналогичная константа реакции (71) ( $k=76 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$ ), то наблюдаемый процесс образования  $\text{HO}^\bullet$  зависит от природы соединений, хелатирующих ионы железа, их наличия и доступности в биологическом материале. Например, комплекс  $\text{ADP-Fe}^{2+}$  в первую очередь взаимодействует с  $\text{H}_2\text{O}_2$ , тогда как цитратный комплекс двухвалентного железа преимущественно окисляется супероксидным радикалом.

Непосредственная  $\text{H}_2\text{O}_2$ -редуцирующая активность  $\text{O}_2^{\bullet-}$  значительно уступает активности ионов металлов:



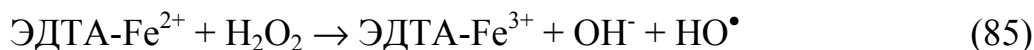
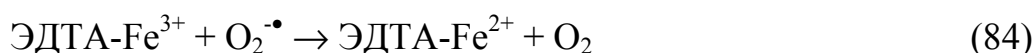
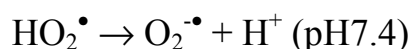
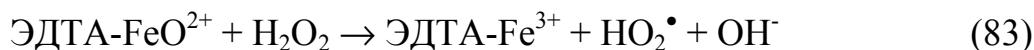
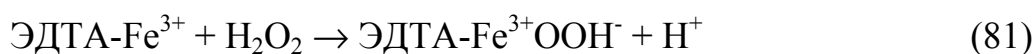
Образование гидроксильного радикала в ходе реакции (78) (в цепи превращений (67)), (71) и (74) во всех вариантах является процессом термодинамически благоприятным:

$$E_0(\text{H}_2\text{O}_2/\text{HO}^\bullet, \text{H}_2\text{O}) = 2E_0(\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}) - E_0(\text{HO}^\bullet/\text{H}_2\text{O}) = 2 \times 1.32\text{В} - 2.31\text{В} = +0.33\text{В} \quad (79)$$

В соответствии с уравнением Нернста:  $E = E_0 - RT/nF \ln([\text{ox}]/[\text{red}])$  - термодинамически разрешена продукция гидроксильного радикала, инициируемая и ионом  $\text{Fe}^{3+}$ , но уже в качестве окислителя пероксида водорода (с последующим восстановлением  $\text{H}_2\text{O}_2$  до  $\text{HO}^\bullet$  образующимся  $\text{Fe}^{2+}$  и супероксидным радикалом в ходе реакций (71) и (78):



Рассмотренные ранее пути образования гидроксильного радикала являются основными, однако гидроксильный радикал может генерироваться и в реакциях с хелатированными ионами. В этом случае суммарная реакция генерации  $\text{HO}^\bullet$  осуществляется лишь в координационной сфере металла (гидрат-ионы трехвалентного железа не растворимы в воде) и является менее зависимой от действия таких антиоксидантов как супероксиддисмутаза (см. Система антиоксидантной защиты организма). Поэтапная реализация этой реакции на примере ЭДТА-феррильного комплекса может быть представлена следующей цепью превращений:



Несмотря на то, что ЭДТА может выступать и перехватчиком  $\text{HO}^\bullet$ -радикалов ( $k = 2.8 \cdot 10^9 \text{М}^{-1} \text{с}^{-1}$ ), «открытость структуры» ферри-ЭДТА комплекса позволяет значительной доле этих радикалов освобождаться во внешнюю среду.

Возможно образование  $\text{OH}^\bullet$  и по следующему пути превращений с участием других комплексов железа:



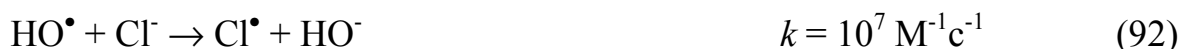
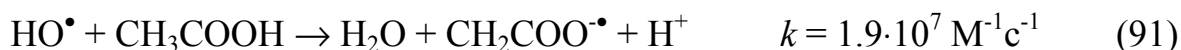
Феррильный ион (то есть,  $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$  или  $\text{FeO}^{2+}$ ) является значительно более мощным окислителем, чем перферрильный (резонансный «гибрид» формальных структур:  $\text{Fe}^{3+}-\text{O}_2^{\cdot-} \leftrightarrow \text{Fe}^{2+}-\text{O}_2$ ), и часто выступает в качестве альтернативы гидроксильному радикалу в реакциях, осуществляемых по механизму Фен-

тона. В частности, аналогично  $\text{HO}^\bullet$ -радикалу, он способен отрывать атом водорода у метилена. Кроме того, феррильный ион способен окислять пероксид до  $\text{HO}_2^\bullet$ , тогда как перферрил, аналогично  $\text{HO}_2^\bullet$ , восстанавливает его до  $\text{HO}^\bullet$ .

Благодаря очень высокому редокс-потенциалу гидроксильного радикала ( $E_0=+2.32\text{В}$ ), он способен атаковать практически любое органическое соединение с очень высокими скоростями ( $k=10^7\text{-}10^{10}\text{ М}^{-1}\text{с}^{-1}$ ). Константа скорости его рекомбинации составляет  $0.55\cdot 10^{10}\text{ М}^{-1}\text{с}^{-1}$ . Все это определяет время жизни  $\text{HO}^\bullet$  в биологическом материале не более  $10^{-9}\text{с}$  и радиус миграции - менее  $0.01\text{мкм}$  ( $<100\text{А}^\circ$ ). Поскольку такое расстояние сопоставимо с размерами биологических молекул, то действие  $\text{HO}^\bullet$  *in vivo* практически осуществляется лишь в участке его образования.

По своей реакционной способности гидроксильный радикал превосходит даже атомарный кислород (почти в 300 раз). Последний не может генерироваться в живых системах прямым путем из молекулярного кислорода. Субстратам он передается лишь в процессе ферментативного катализа как элемент структуры переходного состояния, например, в активном центре цитохромов P450 и др. По сравнению с протонированной формой супероксидного радикала ( $\text{HO}_2^\bullet$ ) гидроксильный радикал на 5-6 порядков более реакционно-способен. Благодаря своим мощным разрушительным свойствам, именно  $\text{HO}^\bullet$  выполняет роль основного окислительного «чистильщика» в тропосфере. Хотя его концентрация там и невелика (около  $5\cdot 10^5$  молекул/ $\text{см}^3$ ), именно он определяет окислительную способность атмосферы, реагируя с метаном, другими углеводородами и прочими восстановленными соединениями природного и антропогенного происхождения.

Взаимодействуя с органическими молекулами и многими неорганическими ионами, гидроксильный радикал легко отрывает у них атомы, группы атомов и электроны, например:



Во всех случаях реакция отрыва атома водорода гидроксильным радикалом является экзотермической, поскольку прочность образуемой связи Н-ОН составляет  $491.6\text{ кДж/моль}$ , что превышает прочность связей R-Н у атакуемых им органических молекул на величину  $41.8\text{-}104.6\text{ кДж/моль}$ .

Атакуя С-Н-связи,  $\text{HO}^\bullet$  преимущественно окисляет третичный атом углерода ( $>\text{CH}-$ ), затем - вторичный ( $-\text{CH}_2-$ ), а первичный углерод ( $-\text{CH}_3$ ) - в последнюю очередь. Например, при взаимодействии гидроксильного радикала с полипептидным остовом белков отрыв атома водорода осуществляется, в основном, от  $\alpha$ -углеродного атома. Это же наблюдается и в отношении боковых группировок аминокислотных остатков (валина, лейцина, изолейцина). Если же молекулы обладают сопряженными двойными связями, то  $\text{HO}^\bullet$ , аналогично другим радикалам, способен присоединяться к таким молекулам:

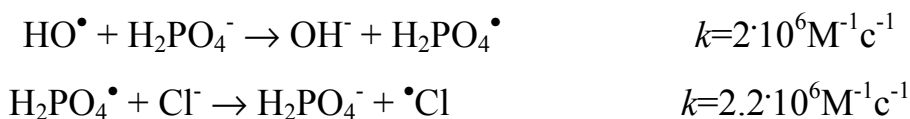


Образующиеся продукты сохраняют радикальную природу (принцип неуничтожимости свободной валентности).

Атомарный хлор, источником которого выступает реакция (92), окисляет органические субстраты по радикальному механизму, а продукт его рекомбинации -  $\text{Cl}_2$  ( $k = 8.75 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), помимо хлорирующей активности, может участвовать в образовании и синглетного кислорода:

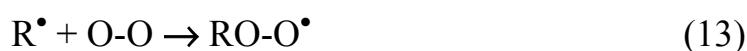


Реакция (92) является не единственно возможным потенциальным источником образования *in vivo* атомарного хлора. Его генерация может быть опосредованной и через взаимодействие гидроксильного радикала с другими низкомолекулярными составляющими внутренней среды организма, например, через образование фосфатного радикала:



Большинство образующихся органических радикалов хотя и менее активны, чем  $\text{Cl}^\bullet$  и  $\text{HO}^\bullet$ , но все-таки весьма реакционноспособны и их константы скоростей бимолекулярных реакций с молекулами нерадикальной природы достигают величины порядка  $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Энергии активации таких реакций при физиологических интервалах температуры не превышают 24-32 кДж/моль (что легко показать, применив уравнение Аррениуса и используя, например, данные из выражений (83) и (90)).

Активность органических радикалов меньше, чем неорганических. Она увеличивается при их комбинации с молекулярным кислородом (как бирадикалом) с сохранением свободнорадикальной природы продукта:



Эта реакция является одной из ключевых в развитии цепных реакций перекисного окисления липидов.



### **4.3. ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ АКТИВНЫХ МЕТАБОЛИТОВ КИСЛОРОДА В СИСТЕМЕ ЗАЩИТНЫХ РЕАКЦИЙ ОРГАНИЗМА**

Аэробные организмы, обитающие в атмосфере с содержанием кислорода 21%, надежно защищены от повреждающего действия этого элемента системой антиоксидантной защиты. Однако, несмотря на всеобщую тенденцию в живой природе избежать появления активных форм кислорода или инактивировать их, в ходе эволюции были созданы и специализированные системы генерации АФК для использования их разрушительных свойств против инфицирующих микроорганизмов. В данном случае АФК выступают в качестве естественных продуктов метаболизма и могут быть определены как активные метаболиты кислорода (АМК). Одна из самых совершенных систем для образования АМК представлена у нейтрофильных гранулоцитов и мононуклеарных фагоцитов млекопитающих. На системном уровне основная функция этих клеток крови заключается в формировании резистентности организма против инфекций, в поддержании тканевого гомеостаза и процессов регенерации тканей. 50-70% общего количества лейкоцитов в крови у человека составляют зрелые нейтрофильные гранулоциты, которые являются высокодифференцированными, не способными к дальнейшей пролиферации тканевыми клеточными эффекторами, содержащими богатый набор готовых к употреблению биологически активных субстанций. Количество депонированных в синусах костного мозга зрелых нейтрофилов в 10-25 раз больше, чем в циркуляции. В кровеносном русле нейтрофилы образуют пристеночный (маргинальный) пул, который у человека равен  $(0.17 \pm 0.08) \cdot 10^9$  клеток/кг массы, и циркулирующий -  $(0.22 \pm 0.05) \cdot 10^9$  клеток/кг массы тела. Следовательно, общее количество этих клеток в организме взрослого человека, массой 70 кг, составляет около 0.5 кг(!), что, безусловно, отражает первостепенное значение нейтрофилов в поддержании жизни человека (да и представителей других видов млекопитающих). Средний период нахождения нейтрофилов в циркуляции составляет 6-8 часов, в тканях - 4-5 дней. Суточная продукция нейтрофилов костным мозгом составляет от 0.62 до 4 млрд. клеток/кг веса тела, то есть, от 43 до 280 г у здорового человека.

Главными и основными компонентами кислородзависимой микробицидной системы нейтрофилов являются два генератора АМК - NADPH-оксидаза и миелопероксидаза.

Что касается моноцитов - другого типа «профессиональных» фагоцитов, то для них аналогичные показатели существенно ниже. Циркулирующий их пул насчитывает  $0.18 \cdot 10^8$  клеток/кг массы, в то время как маргинальный -  $0.63 \cdot 10^8$  клеток/кг. Продолжительность циркуляции моноцитов колеблется от 36 до 104 часов. При этом пополняющийся ими внесосудистый пул в 25 раз превышает внутрисосудистый. После выхода в ткани эти клетки трансформируются (функционально и морфологически) в макрофаги. Будучи, аналогично нейтрофилам, также оснащенными специализированной системой генерации активных метаболитов кислорода, моноциты, в результате их дифференциров-

ки в тканевые макрофаги, лишаются продуцента наиболее химически активных из этих субстанций - миелопероксидазы (МПО).

#### 4.3.1. Специализированные системы генерации активных метаболитов кислорода

Наличие у лейкоцитов специализированной системы для целенаправленной продукции АМК является одной из отличительных черт этих клеток. Перечень соединений, продуцируемых лейкоцитами, включает весь спектр интермедиатов восстановления  $O_2$  ( $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $HO^{\bullet}$ ), его возбужденные формы ( $^1O_2$  - синглетный кислород), гипохлорит ( $OCl^-$ ) и пероксинитрит ( $OONO^-$ ), которые называют активными метаболитами кислорода. Весь спектр образуемых лейкоцитами АМК является продуктом деятельности NADPH-оксидазы и МПО (при участии индуцибельной NO-синтазы как кофактора образования  $OONO^-$ ). К АМК относится и оксид азота, хотя образование NO осуществляется по принципиально иному механизму, но генерировать эту субстанцию способны также клетки нелейкоцитарного типа.

Таким образом, при взаимодействии инфекционного агента с организмом хозяина мы сталкиваемся с проблемой токсичности кислорода, но уже с диаметрально противоположной стороны, а именно - с вопросами, связанными с позитивной ролью процессов образования АМК *in vivo*: для обеспечения жизнедеятельности организма. АМК участвуют и в процессах биорегуляции, выступая в качестве естественных молекул-сигнализаторов, внутриклеточных мессенджеров и потенциальных факторов межклеточной коммуникации.

Поскольку в общем плане накопление АМК все же несет разрушительный потенциал, то их образование для борьбы с инфекцией осуществляется с помощью высоко организованных ферментных систем. Последние находятся под жестким контролем и локализуются в специальных компартментах клетки в латентном состоянии (в «разобранном» виде или в ситуации, обеспечивающей невозможность их функционирования: отсутствие субстрата). При этом этими системами оснащена строго ограниченная группа защитных клеток. Мобилизация, самосборка и активация компонентов специализированных генераторов АМК, а также обратный процесс, приводящий к прекращению продукции АМК, обеспечивается на клеточном уровне под воздействием на рецепторный аппарат лейкоцита сложного комплекса регуляторных факторов (интерлейкинов и других медиаторов воспаления). Если сложность организации кислород-зависимой биоцидной системы лейкоцитов, а также систем, регулирующих ее деятельность, направлена на предотвращение условий неконтролируемого образования АМК (процесса термодинамически самопроизвольного), то она же обладает и некоторыми слабыми сторонами. Это дало возможность ряду форм инфицирующих микроорганизмов (при взаимной эволюции взаимодействующих популяций патогена и хозяина) для создания механизмов (факторов патогенности), позволяющих им избежать воздействия АМК. Например, некоторые микробы способны предотвращать слияние фагосомы лейкоцита (содержащую поглощенный им патоген) с органеллами, где

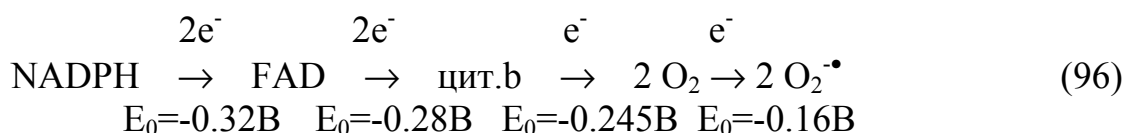
локализуется продуцент наиболее активных форм АМК - миелопероксидаза. Факторы патогенности других инфекционных агентов способны тормозить захват лейкоцитом микроорганизма и т.д.

#### 4.3.1.1. NADPH-оксидаза лейкоцитов

Первичным продуктом кислород-зависимой биоцидной системы лейкоцитов является супероксидный радикал ( $O_2^{\bullet}$ ). В основе его микробицидного и повреждающего действия лежат реакции, в которых  $O_2^{\bullet}$  выступает в роли как хорошего восстановителя ( $E_0 O_2/O_2^{\bullet} = -0.33V$ ), так и сильного окислителя ( $E_0 O_2^{\bullet}/H_2O_2 = +0.89V$ )<sup>11</sup>.

Специализированным генератором  $O_2^{\bullet}$  в лейкоцитах служит уникальный по своим свойствам фермент - NADPH-оксидаза, использующий в качестве источника восстановительных эквивалентов для  $O_2$  NADPH. Этот фермент представлен низкопотенциальным ( $E_0' = -0.245V$ ) цитохромом b, состоящим из двух субъединиц: (22 kDa) и (91 kDa), и обладающим FAD-связывающим участком в тяжелой субъединице. В отличие от большинства известных электрон-транспортных цепей организация NADPH-оксидазы не требует участия убихинона для осуществления трансформации двухэлектронного переноса от пиридиннуклеотида на одноэлектронный к цитохрому.

Простейшая схема механизма генерации  $O_2^{\bullet}$  NADPH-оксидазой может быть представлена следующей цепью редокс-взаимодействий:



Специфичность фермента к его субстратам и кофакторам (по параметру  $K_m$ ) характеризуется следующими значениями: FAD - 60 нМ; NADPH - 0.05 мМ (NADH - 1.0 мМ);  $O_2$  - 0.03 мМ. Активность NADPH-оксидазы по числу оборотов в отношении восстановления  $O_2$  составляет 1000 - 2000 мин<sup>-1</sup>. Следует подчеркнуть, что такое значение  $K_m$  NADPH-оксидазы характерно для первых трех минут от момента активации клетки, после чего наступает пролонгированная фаза продукции  $O_2^{\bullet}$ , характеризующаяся на порядок меньшей величиной константы Михаэлиса ( $K_m = 0.004 мМ$ ). Благодаря этому обеспечивается эффективность продукции супероксидного радикала даже на поздних (гипоксических) этапах развития воспалительного процесса. Концентрация  $O_2$  в этих условиях составляет около 12 мкМ. Внутри же фагосомы концентрация кислорода составляет лишь  $11.2 \pm 3.4 мкМ$  даже в аэробных условиях.

<sup>11</sup> Время жизни этого радикала в биологическом материале составляет 10<sup>-6</sup> сек, что определяет радиус его действия около 0.3 мкм. В основном повреждающий потенциал этого радикала реализуется в качестве молекулы-восстановителя. В естественных (не стандартных) условиях, соответствующих концентрации  $O_2$  в атмосфере, значение редокс-потенциала  $O_2^{\bullet}$  составляет -0.16В. Мембранотропный эффект этого радикала реализуется преимущественно его протонированной формой -  $HO_2^{\bullet}$ . Однако в физиологических условиях доля  $HO_2^{\bullet}$  составляет лишь 0.25-0.40%.

Для нейтрофилов как продуцентов  $O_2^{\bullet}$  приведенное выше значение константы Михаэлиса фермента в отношении NADPH реализуется лишь в условиях закисления среды (при pH6), что имеет место в фаголизосоме фагоцита или в очагах воспаления - области функционирования этих клеток. Напротив, при физиологических pH, например, в системном кровотоке (где активация нейтрофилов не просто нежелательна, но и опасна), эта константа выше:  $K_m=0.3$ мМ. В данных условиях снижается сродство NADPH-оксидазы к кислороду как ее субстрату. В тоже время значение  $K_m$  для NADH (1.0мМ), который не является специализированным субстратом NADPH-оксидазы, не зависит от величины pH реакционной среды.

В целом стимулированные нейтрофилы генерируют супероксидный радикал со скоростью  $117 \pm 30$  наномолей  $O_2^{\bullet}$ /мин/ $10^7$ клеток. Примерно 80% от этого количества  $O_2^{\bullet}$  подвергается спонтанной дисмутации до  $H_2O_2$ . Темп производства нейтрофилами супероксидного радикала сильно зависит от концентрации этих клеток, напоминая эффект «групповой супрессии», регистрируемый в микробиологических и клеточных культурах.

Поскольку цитохром  $b_{0.245}$  всегда локализован на поверхности мембраны клетки, а источник электронов для него - в ее цитозоле, то активация NADPH-оксидазы ведет к деполяризации мембраны (около 30-50 мВ). Для удаления из цитозоля  $H^+$  (в качестве противоионов  $O_2^{\bullet}$ ) NADPH-оксидаза ассоциирована с протонными каналами. Причем, активность как фермента, так и  $H^+$ -каналов сопряжены общей регуляцией посредством арахидоновой кислоты, что обеспечивает стехиометрию процесса (подкисление области функционирования  $O_2^{\bullet}$ ):  $8 H^+/10 O_2^{\bullet}$ . В физиологических условиях это соотношение ионов полностью соответствует эквивалентности их концентрационных активностей. Суммарная "энергия активации" процесса генерации супероксидного радикала нейтрофилом оценивается в интервале значений, равном 13-15 ккал/моль.

NADPH-оксидаза активируется множеством растворимых и корпускулярных агентов, реализующих свое действие через специфические рецепторы на поверхности лейкоцита. Другая группа активаторов представлена искусственными субстанциями и осуществляет свое действие внутриклеточно (форболовые эфиры, ионы фтора и др.), либо путем неспецифического возмущения клеточной мембраны. Все это ведет к многократному увеличению потребления клеткой молекулярного кислорода, который практически весь (около 90%) трансформируется в  $O_2^{\bullet}$ .

Рассмотрим молекулярный механизм активации  $O_2^{\bullet}$  нейтрофилами. В плазматической мембране клетки активированная NADPH-оксидаза представлена более сложной (надмолекулярной) структурой, чем это было представлено выше (субъединичной). В ее состав включены еще три компонента, локализующиеся в цитоплазме неактивированных клеток и необходимые для активации процесса генерации  $O_2^{\bullet}$ . Два компонента специфичны только для NADPH-оксидазы: 47кДа-белок и 67 кДа-белок, а третий - представлен G-белком семейства  $g_{i2}$  с молекулярной массой 21 кДа (классифицируемый как p21gac2). При активации NADPH-оксидазы происходит очень быстрая самосборка всего

ферментного комплекса (например, при стимуляции клетки хемоаттрактантом - в течение 2 сек.). G белок оказывается вовлеченным в трансдукцию сигнала для генерации  $O_2^{\bullet}$  от рецепторов к различным лигандам-медиаторам воспаления (C5a, PAF, N-формилметиониловые пептиды и др.), что сопряжено с активацией фосфоинозитидазы C (варианта фосфолипазы C; фC). Это провоцирует фC-зависимое расщепление в мембране лейкоцита инозитол-4,5-дифосфата с освобождением двух вторичных мессенджеров: диацилглицерола (ДАГ) и инозитол-1,4,5-трифосфата ( $IP_3$ ). В дальнейшем процесс активации  $O_2^{\bullet}$ -продукции лейкоцитами осуществляется по двум разным путям.  $IP_3$ , как очень кислая гидрофильная молекула, освобождаясь в цитозоль, индуцирует транзиторийный выброс  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных компартментов. Увеличение уровня  $Ca^{2+}$  в цитозоле инициирует множество Ca-зависимых процессов, включая фосфолипаза  $A_2$ -зависимое освобождение арахидоновой кислоты (сопрягающей действие протонного насоса с NADPH-оксидазой) и кальмодулин-зависимое фосфорилирование белков.

С другой стороны, освобожденный под действием фC ДАГ связывается с  $Ca^{2+}$ /фосфолипидзависимой протеинкиназой и активирует ее. В результате фермент фосфорилирует целую группу белков - участников защитных реакций, включая и рецепторы для IL-2, трансферрина, а также антигены главного комплекса гистосовместимости. Аналогично другим типам клеток, в покоящихся нейтрофилах эта протеинкиназа C также слабо взаимодействует с мембраной, аффинитет которой значительно возрастает в результате активации фермента ДАГ-ом и в ассоциации с фосфатидилсеринем (кофактор протеинкиназы C). Как степень транслокации фермента в мембрану, так и усиление кофакторных свойств фосфатидилсерина зависят от  $Ca^{2+}$ . Кооперация двух путей процесса активации  $O_2^{\bullet}$ -продукции лейкоцитами реализуется на уровне их протеинкиназ: кальмодулин-зависимой и протеинкиназы C. Эксперименты *in vitro* с очищенными компонентами NADPH-оксидазы показали, что ее активация может осуществляться фосфорилированием этого фермента в области FAD-связывающего участка большой субъединицы. Активация NADPH-оксидазы осуществляется путем фосфорилирования ее цитоплазматического компонента - 47кДа-белка, что и обеспечивает быструю самосборку этой многокомпонентной системы. Дефосфорилирование же этого белка специфической протеинфосфатазой ведет к быстрому разложению указанной надмолекулярной структуры.

Производство  $O_2^{\bullet}$  лейкоцитами является дозозависимой по отношению к данному конкретному стимулятору. Кроме того, эффективность производства клетками супероксидного радикала усиливается при стимуляции нейтрофилов лигандами через различные рецепторы, проявляя признаки аддитивности или синергизма. Причем, в последнем случае наблюдается так называемый праймирующий эффект, когда предобработка клеток субоптимальными или неэффективными дозами одного стимулятора резко усиливает ответ на другой.

Механизмы терминации активности NADPH-оксидазы до конца не исследованы. Одним из элементов системы терминации изученным в настоящее

время является специфическая протеинфосфатаза, дефосфорилирующая 47 кДа-компонент NADPH-оксидазы, что ведет к разборке всей надмолекулярной структуры, другим - является семейство диацилглицеролкиназ (ДАГ-киназ), фосфорилирующих ДАГ и, таким образом, предотвращающих активацию протеинкиназы C. Известны также молекулы-сигнализаторы (ингибиторы), «оповещающие» нейтрофил о включении механизмов терминации  $O_2^{\bullet}$ -продукции. Такую роль выполняют комплексы  $\alpha_1$ -антихимотрипсина с соответствующими протеиназами. Причем, комплексы с ферментами другой антипротеиназы,  $\alpha_2$ -макроглобулина, ингибируют продукцию  $O_2^{\bullet}$  моноцитами/макрофагами. В отношении этой же группы клеток аналогичную функцию выполняет и IL-4.

Существуют альтернативные механизмы активации лейкоцитов для продукции  $O_2^{\bullet}$ . Например, сфингомиелиновый путь, где в результате взаимодействия сигнальной молекулы с рецептором активируется сфингомиелиназа, гидролизующая сфингомиелин на фосфохолин и церамид, который является вторичным мессенджером. Некоторые из сигнальных молекул (например, цитокин) могут использовать оба пути активации  $O_2^{\bullet}$ -продукции. Идентифицирована и особая форма протеинкиназы C, активация которой может осуществляться протеолитически, где в качестве протеиназы выступает калпаин.

Исходно NADPH-оксидаза локализуется на внешней стороне плазматической мембраны и генерируемые ею  $O_2^{\bullet}$ -радикалы поступают во внеклеточную среду - это может служить одним из механизмов упреждающего поражения микроба еще до его захвата фагоцитом. Но это может играть и негативную роль: быть причиной повреждения тканей в очаге воспаления. Тем более, что закисление среды создает условие для образования и других форм АМК (реакции 62, 65, 67, 78).

Таким образом, образование супероксидного радикала при помощи специализированного механизма является высокоорганизованным процессом, в отличие от самопроизвольно протекающих реакций окисления, описанных выше. Механизм этот в системе антимикробных факторов фагоцитов выполняет стратегическую роль и его дефекты, как правило, являются несовместимы с жизнедеятельностью (грануломатозная болезнь новорожденных). Во многом это обусловлено и тем обстоятельством, что помимо собственной биоцидной функции NADPH-оксидаза вступает в кооперацию с наиболее мощным микробицидным фактором защитных клеток - миелопероксидазой (МПО), локализующейся в пероксидазосомах нейтрофила, где NADPH-оксидаза является поставщиком субстрата -  $H_2O_2$  (продукта дисмутации  $O_2^{\bullet}$ ) для деятельности этого фермента, а также субстрата и кофактора ( $O_2^{\bullet}$ ), контролирующего эффективность антимикробного действия миелопероксидазы.

#### **4.3.1.2. Пероксидаза нейтрофильных гранулоцитов (миелопероксидаза (МПО))**

МПО представляет собой гемсодержащий белок с четвертичной структурой типа  $\alpha_2\beta_2$  и состоит из двух протомеров ( $\alpha\beta$ ), включающих большую (57-

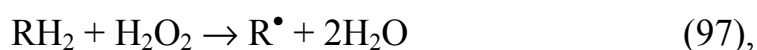
59 кДа) и малую (10.5-13.5 кДа) субъединицы. Протомеры соединены одной дисульфидной связью в области больших субъединиц, каждая из которых содержит по одной геминовой группировке и небольшому углеводному компоненту. Молекулярная масса белка составляет около 150 кДа, изоэлектрическая точка его находится в области высоких значений pH (ИЭТ>10). Спектр поглощения МПО, в отличие от других геминовых пероксидаз, характеризуется резким сдвигом полосы Соре в более длинноволновую область спектра (430 нм). В настоящее время для МПО человека полностью расшифрована первичная структура, выяснены основные этапы процессинга этого белка и установлена локализация гена, кодирующего этот фермент. Определена и пространственная организация МПО. В нейтрофилах имеется три (реже более) изоформ миелопероксидазы, незначительно отличающихся своей активностью в отношении ряда субстратов-восстановителей, молекулярной массой, а также электрофоретической подвижностью (все эти изоформы кодируются в геноме одним и тем же геном).

МПО локализуется в азурофильных гранулах нейтрофила и по содержанию составляет около 5% от сухого веса клетки (для лейкоцитов человека). В количественном выражении это соответствует 22 млн. молекул этого фермента на клетку. Уже одно это обстоятельство предполагает первостепенное значение МПО для реализации нейтрофилами их защитной функции. В значительно меньших количествах МПО представлена в моноцитах - другом типе фагоцитирующих лейкоцитов крови, теряющим этот фермент в результате их дифференцировки в тканевые макрофаги.

Основная функция МПО в качестве микробицидного фактора осуществляется в фаголизосоме нейтрофила вслед за слиянием МПО-содержащих гранул с фагосомами, заключающими внутри себя объект фагоцитоза - поглощенные микробы. Однако, благодаря способности нейтрофилов секретировать содержимое их гранул в околкеклеточное пространство, МПО может использоваться и для упреждающего поражения патогена. Этот же механизм является одной из основных причин повреждения собственных тканей в очаге воспаления.

Мощные разрушительные свойства МПО полностью базируются на ее физико-химических характеристиках, в частности, на высокой окислительной способности активных интермедиатов фермента ( $E_0 > +1.0V$ ) и особенностях пероксидазного катализа, а также на способности МПО кооперировать с другими деструктивными и поражающими объект фагоцитоза факторами.

Аналогично другим пероксидазам МПО катализирует следующую реакцию:



где  $RH_2$  - субстрат-восстановитель, в качестве которого для геминовых пероксидаз могут выступать соединения различной химической природы.

Высокие значения редокс-потенциалов активных интермедиатов геминовых пероксидаз ( $E_0 \geq 1.0V$ ) связаны с участием этой группы ферментов в

окислении наиболее устойчивых структур. Механизм пероксидазной реакции впервые был предложен Б.Чансом и полностью подтвержден экспериментальными данными:

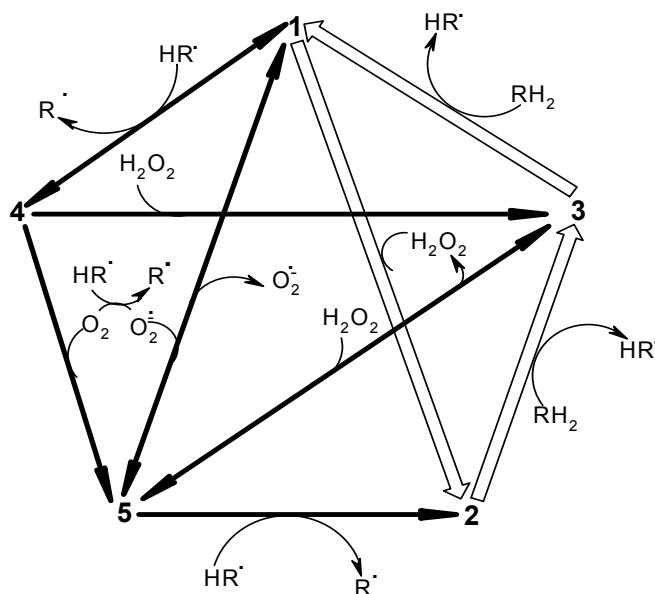


где E - исходная ферри-форма фермента; Соединения I и II - его промежуточные редокс-формы. Причем, Соединение I обладает двумя окислительными эквивалентами, а Соединение II - одним по сравнению с исходной формой E.  $HR^\bullet$  - первичный свободнорадикальный продукт катализа. В Соединении I эти окислительные эквиваленты представлены в виде  $\pi$ -катионового радикала порфирина и оксоферрильной группировки  $Fe^{IV}=O$ , в Соединении II - только в виде  $Fe^{IV}=O$ .

В том случае, когда свободнорадикальные продукты субстратов (например, индолуксусная кислота и др.) или сами субстраты обладают достаточно высокими электронодонорными свойствами для восстановления молекулярного кислорода до  $O_2^{\bullet-}$  и/или исходной ферри-формы фермента в ферро-форму, пероксидазный катализ трансформируется в пероксидазно-оксидазный. Выбор между двумя маршрутами (или их совместном осуществлении) в реализации этого типа реакций определяется и значением редокс-потенциала окислительно-восстановительной пары: ферри-/ферро-форм пероксидаз (0.5В или 0.02В). Вследствие этого в реакционной среде возникают еще две редокс-формы фермента, что связано с тем, что ферро-форма фермента, аналогично гемоглобину, способна связывать молекулярный кислород, а  $O_2^{\bullet-}$  - ассоциироваться с исходной ферри-формой, что ведет к формированию и в первом, и во втором случае окси-формы пероксидазы (аналог оксигемоглобина).

Участие всех редокс-форм пероксидазы в каталитическом оксидазно-пероксидазном процессе можно представить в виде пентагональной схемы:





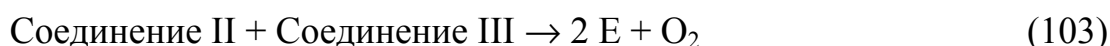
где 1-5 - редокс-состояния фермента, 1- его исходная ферри-форма ( $\text{Fe}^{\text{III}}$ ), 2 - Соединение I (феррильная форма:  $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$  и  $\pi$ -катионовый радикал порфирина), 3 - Соединение II (феррильная форма), 4 - ферро-форма фермента ( $\text{Fe}^{\text{II}}$ ) - акцептор молекулярного кислорода, 5 - окси-форма фермента (резонансная структура:  $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2 \leftrightarrow \text{Fe}^{\text{III}}\text{O}_2^{\cdot-}$ ). Стрелками указаны пути конверсии редокс-форм пероксидазы. Жирными стрелками показан маршрут осуществления пероксидазного катализа.

Скорость-лимитирующей стадией в пероксидазном катализе (механизм Чанса) является регенерация исходной формы фермента (реакция (100)). Значение константы  $k_{+98}$  составляет величину порядка  $(1.2-1.8) \cdot 10^7 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ . Так как величина константы  $k_{-98} < 0.2 \text{s}^{-1}$ , то реакцию (98) можно рассматривать как практически необратимую. Энергия ее активации составляет около 14.6 кДж/моль. Величины констант скоростей реакций (99) и (100) для различных геминовых пероксидаз в зависимости от природы субстратов-восстановителей колеблются в пределах:  $k_{99}$  - от  $2.3 \cdot 10^8 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  до  $5 \cdot 10^4 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ,  $k_{100}$  - от  $5 \cdot 10^7 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  до  $2.5 \cdot 10^3 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ .

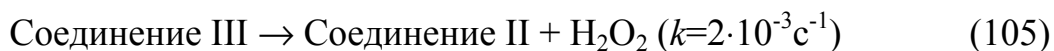
Как правило, для различных геминовых пероксидаз реакционная способность Соединения I в отношении конкретного субстрата превышает таковую для Соединения II в 50 - 100 раз. Тем не менее редокс-потенциалы одно-электронного восстановления этих форм близки и составляют около +1.0В. Существование корреляции между редокс-потенциалами субстратов-восстановителей и значениями  $k_{99}$  показывает, что для Соединения I величина  $k_{99}$  определяется только относительной легкостью окисления субстрата. Верхние пределы значений констант  $k_{99}$  и  $k_{100}$  близки (аналогично  $k_{+98}$ ) константам скоростей реакций, ограниченных лишь диффузионным пределом, что свидетельствует о транзиторном характере протекания реакций (98), (99) и (100) без заметного образования фермент-субстратного комплекса.

Однако, для ряда доноров электронов (п-крезол и др.) спектрально зарегистрировано комплексообразование с Соединениями I и II. Тем не менее, и

для таких субстратов описание поведения пероксидаз строго в терминах кинетики Михаэлиса не правомочно. Во-первых, невозможно достичь насыщающих концентраций второго субстрата ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) из-за образования нового редокс-состояния фермента - Соединения III (оксиформа), обладающего низкой активностью и инактивируемого при дальнейшем увеличении концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Во-вторых, различные редокс-формы фермента способны взаимодействовать друг с другом, что противоречит основному требованию кинетической модели Михаэлиса - независимому функционированию молекул фермента в ходе катализа:



В-третьих, происходит разложение Соединения III с переходом фермента в другое редокс-состояние - Соединение II:



Механизм Чанса, предложенный для пероксидаз, справедлив и для МПО. Отличительной особенностью этого фермента от других геминных пероксидаз, наряду с его субъединичной организацией, является способность МПО эффективно окислять ионы  $\text{Cl}^-$  (по двухэлектронному механизму) с образованием гипохлорита:



Причем, Соединение II такими свойствами не обладает из-за невозможности осуществления двухэлектронного переноса и недостаточно высокого редокс-потенциала для одноэлектронного окисления  $\text{Cl}^-$  ( $E_0$  для пары  $\text{Cl}/\text{Cl}^-$  составляет +1.36В).

Благодаря тому обстоятельству, что исходным субстратом для образования гипохлорита является молекулярный кислород (в результате сложной цепи его превращений с участием NADPH-оксидазы и МПО), продуцируемый нейтрофилами  $\text{OCl}^-$  принято включать в состав АМК.

**Гипохлорит - каталитический продукт и эффектор биоцидного действия МПО.** Благодаря способности геминных пероксидаз атаковать наиболее устойчивые к окислению структуры, создаются условия не только для непосредственного воздействия этих ферментов на субстраты, но и для использования продуктов окисления субстратов в качестве эффекторов-окислителей. Такие продукты обладают выраженными электроноакцепторными свойствами. Это обстоятельство и было использовано для создания в результате эволюции наиболее мощных факторов антимикробной защиты - ряда пероксидаз, выполняющих микробицидную функцию в организме: МПО, лактопероксидаза и эозинофильная пероксидаза.

В качестве кофакторов биоцидного действия этих ферментов выступают, главным образом, ионы галогенов (J, Br<sup>-</sup>) и псевдогалоид - тиоцианат (SCN<sup>-</sup>). Однако среди указанных ферментов только МПО способна окислять Cl<sup>-</sup> и использовать продукт его окисления, ОСl<sup>•</sup>, для поражения мишени (ОСl<sup>•</sup> является основным эффекторным фактором биоцидного действия МПО). Для эффективной продукции гипохлорита миелопероксидазой NADPH-оксидаза выступает не только в качестве поставщика предшественника перекиси водорода - O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, но и как фактор, потенцирующий биоцидную функцию МПО. Образующееся в ходе функционирования МПО Соединение II не способно катализировать продукцию гипохлорита. Накапливаясь и выступая в этом процессе "инертной" редокс-формой МПО, Соединение II тормозит образование ОСl<sup>•</sup>. Однако, регенерация исходной ферри-формы фермента из Соединения II под воздействием O<sub>2</sub><sup>•-</sup> как субстрата-восстановителя (первичного продукта катализа NADPH-оксидазой) возобновляет каталитический процесс продукции гипохлорита.

Аналогично супероксидному радикалу, регенерировать исходную ферриформу фермента из Соединения II способен и аскорбат, то есть в данном случае проявляется прооксидантная роль этого классического антиоксиданта.

Количество образуемого ОСl<sup>•</sup> под действием МПО очень велико: на его долю приходится около 30% от потребляемого нейтрофилом кислорода и до 35% от генерируемой лейкоцитом H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Именно это обстоятельство и послужило основанием для отнесения гипохлорита в состав активных метаболитов кислорода (как одного из важнейших биоцидных продуктов кислород-зависимой антимикробной системы нейтрофильных лейкоцитов).

При физиологических pH соотношение концентраций ОСl<sup>•</sup> и НОСl приблизительно одинаково (pK<sub>a</sub>=7.53). В условиях закисления среды в фаголизосоме клетки или в очаге воспаления (pH<6.0) вклад протонированной и более активной формы гипохлорита возрастает. Для оценки такого вклада соотношение обеих форм гипохлорита и их концентрацию при любом значении pH можно определить, используя известное уравнение Гендерсона-Гассельбаха:

$$pH - pK_a = \lg([OCl^{\bullet}]/[HOCl]) \quad (106)$$

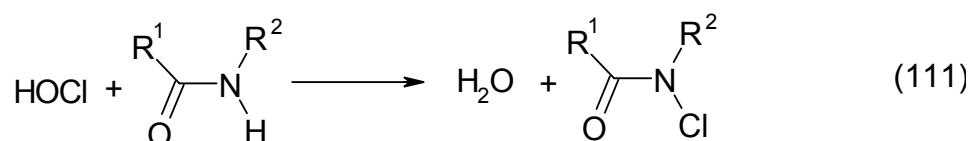
$$[HOCl] = 10^{-pH}[\text{гипохлорит}]_t / (10^{-pH} + 10^{-7.53}) \quad (106a)$$

$$[OCl^{\bullet}] = 10^{-7.53}[\text{гипохлорит}]_t / (10^{-pH} + 10^{-7.53}) \quad (106b),$$

где [гипохлорит]<sub>t</sub> - суммарная концентрация протонированной и депротонированной форм окислителя. По своему результирующему термодинамическому эффекту гипохлорит, благодаря высокой окислительной способности (E<sub>0</sub> НОСl/Cl<sup>-</sup>=+1.07В) и двухэлектронному пути окисления субстратов, приближается (в соответствии с выражением ΔG<sup>0</sup>=-nΔEF, где n=2) к гидроксильному радикалу (E<sub>0</sub> HO<sup>•</sup>/H<sub>2</sub>O= +2.4В; n=1).

Из-за высокой химической активности гипохлорит способен окислять широкий круг веществ различной химической природы. В результате деструкции таких молекул образуются вторичные токсические соединения. Наиболее

подробно в этом плане исследованы продукты окисления первичных и вторичных аминов как элементов важнейших биологических структур (белков, нуклеиновых кислот, коферментов и т.п.). В результате действия гипохлорита наблюдается не только деструкция жизненно важных субстанций, но и преобразование их в хлорирующие агенты (хлорамины и хлорамиды):

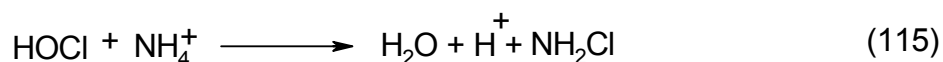
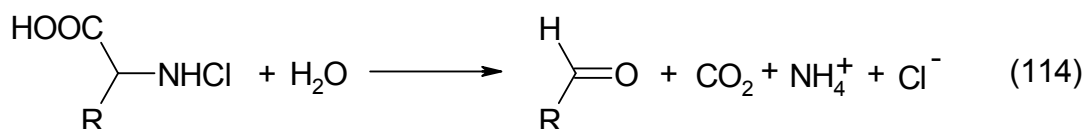
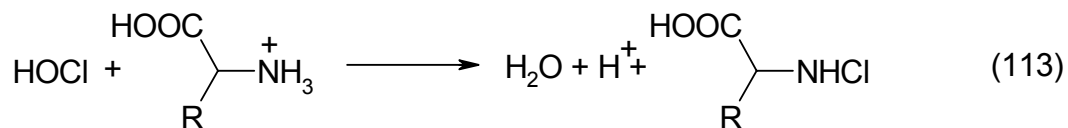


Эмпирически было установлено, что эффективность хлорирования аминов миелопероксидазой (следовательно, и продукция гипохлорита) определяется следующей зависимостью между рН реакционной среды и концентрациями субстратов МПО:

$$\text{pH} = 560 \cdot \lg[\text{Cl}^-]/[\text{H}_2\text{O}_2] \quad (112)$$

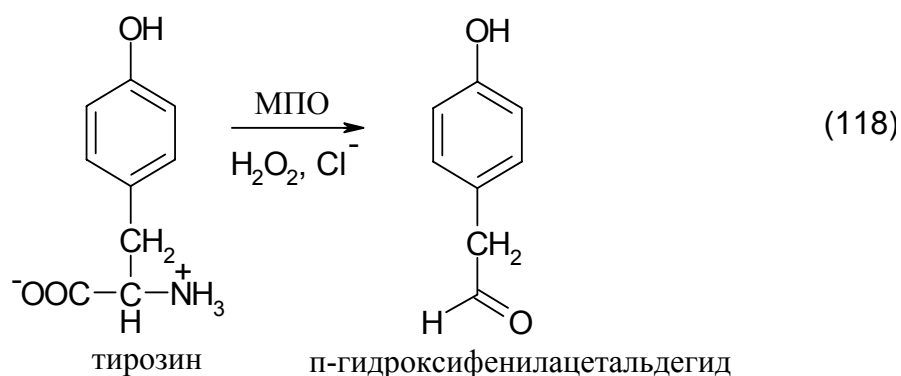
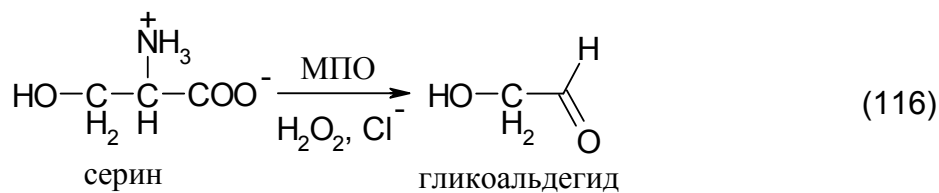
Используя это выражение легко показать, что рН-оптимум реакции хлорирования имеет место в интервале рН 4.0-7.4, то есть в области функционирования этого фермента, что, по-видимому, является особенностью организации МПО как биоцидного фактора лейкоцитов.

При взаимодействии HOCl со свободными аминокислотами (суммарная их концентрация в плазме крови достигает 4мМ), наряду с моно- и дихлораминами (хлорирующие агенты), образуются и такие токсические вещества как альдегиды:

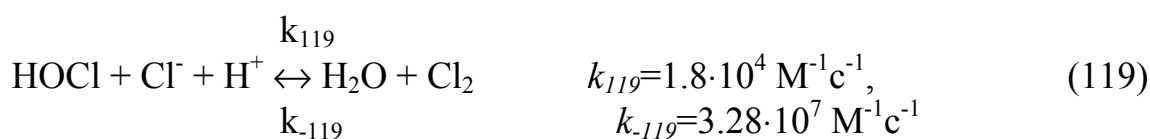


Хлорирование гипохлоритом аминокислот практически не зависит от типа аминокислоты (значения соответствующих констант скоростей близки и составляют около  $10^7 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ). Образующийся в ходе этих превращений простейший монохлорамин ( $\text{NH}_2\text{Cl}$ ) является даже более токсичным агентом, чем сам

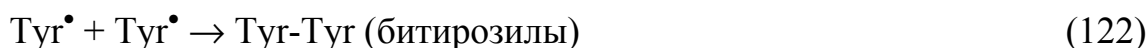
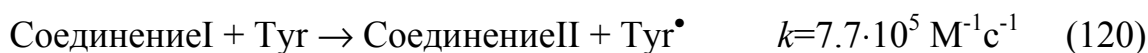
ОСГ. Что касается альдегидов, то наиболее реакционноспособные среди них - это производные серина, треонина ( $\alpha$ -гидрокси- и  $\alpha,\beta$ -ненасыщенные альдегиды), а также тирозина (п-гидроксифенилацетальдегид):



В случае тирозина, наряду с продуктом реакции (118), образуется и 3-хлортирозин. Причиной этого является реакция (119), которая ведет к образованию сильнейшего окислителя и хлорирующего агента -  $\text{Cl}_2$  (хотя в стандартных условиях ее равновесие и сдвинуто в сторону гидролиза молекулярного хлора):



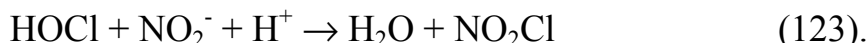
Важно отметить, что тирозин способен и непосредственно выступать в качестве субстрата-восстановителя миелопероксидазной реакции, продуктом которой являются высоко активные тирозил-радикалы:



Это является основной причиной не только конъюгации свободного тирозина с белками, но и возникновения межмолекулярных ковалентных сшивок полипептидных цепей под действием геминовых пероксидаз. Конечный же продукт

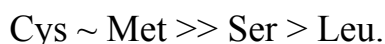
окислительной трансформации тирозина с участием гипохлорита (п-гидроксифенилацетат) в результате аналогичного процесса, где он также выступает в качестве субстрата-восстановителя в пероксидазной реакции, может превращаться в возбужденную (триплетную) форму бензальдегида с отщеплением муравьиной кислоты (НСООН). Однако данный процесс требует участия молекулярного кислорода и осуществляется по механизму пероксидазно-оксидазных реакций.

Сильным хлорирующим агентом, помимо указанных выше (реакции (107)-(111), (119)), выступает и  $\text{NO}_2\text{Cl}$  (продукт взаимодействия гипохлорита с нитритом), обладающий к тому же и нитрирующей активностью:



При непосредственном окислении МПО-зой в ее каталитическом цикле, нитрит трансформируется в активный свободный радикал -  $\text{NO}_2^\bullet$ . В каталитический цикл МПО в качестве субстрата вовлекается и пероксинитрит ( $\text{HONO}_2$ ). В результате нитрирующая активность  $\text{HONO}_2$  возрастает на порядки.

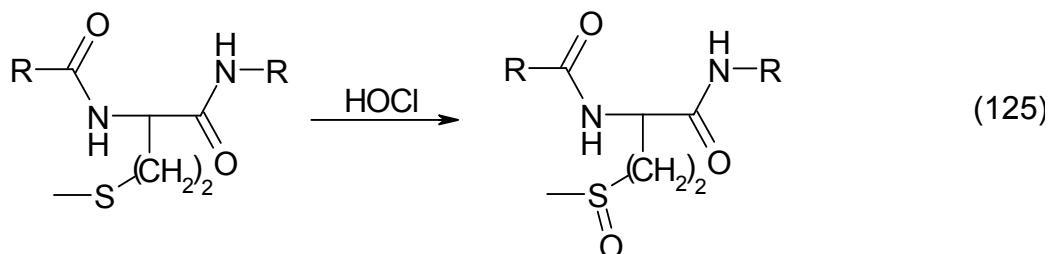
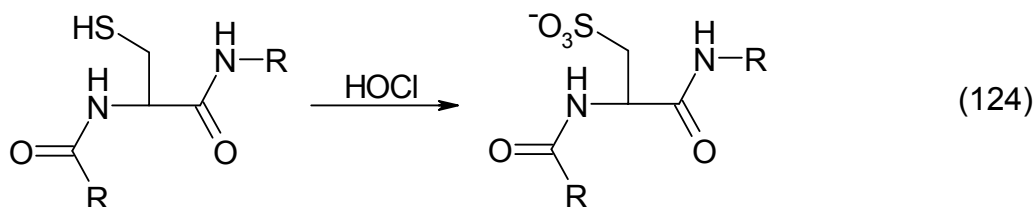
По устойчивости к действию  $\text{OCl}^-$  свободные аминокислоты можно расположить в следующем порядке:



Цистеин и метионин в 100 раз более чувствительны к действию гипохлорита, чем ближайшие в этом ряду к ним аминокислоты. Соединения с дисульфидной связью (цистин и окисленный глутатион) более устойчивы. Только одна из аминокислот - метионин, будучи трансформированной под действием  $\text{OCl}^-$  в метионинсульфоксид, может быть восстановлена до исходного состояния. Цистеин и другие тиолы в результате воздействия этого окислителя трансформируются в соответствующие сульфоновые, сульфиновые и сульфеновые кислоты, и только лишь в небольшое количество регенерируемых продуктов - дисульфидов.

Превращение других аминокислот под воздействием  $\text{OCl}^-$  (в концентрациях агента, модифицирующих их структуру и встречающихся в очаге воспаления) заключается в образовании нестабильных хлораминов. Последние подвергаются декарбоксилированию и дезаминированию (как описано выше) с образованием токсичных альдегидов.

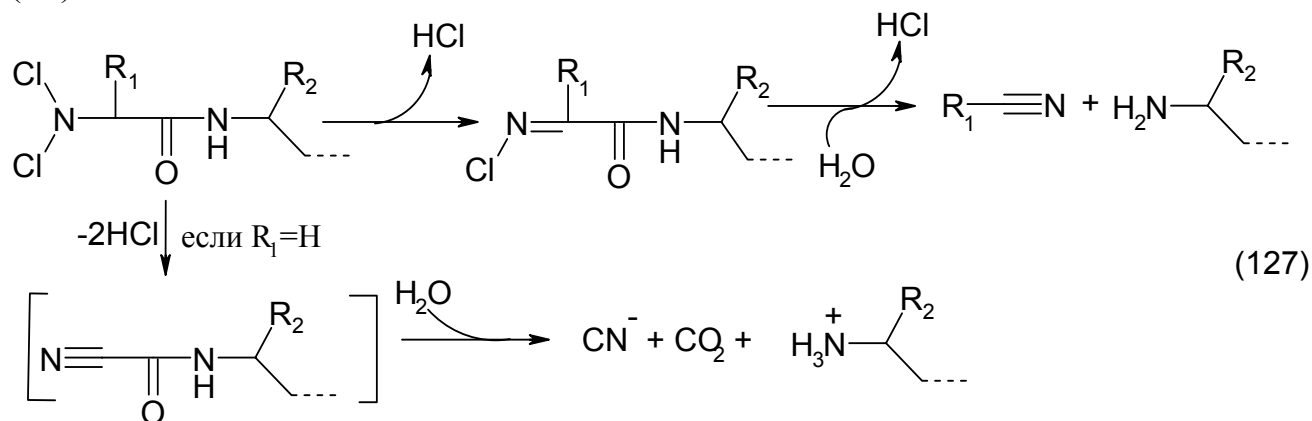
Характер продуктов окислительной модификации аминокислотных остатков в структуре белков и свободных аминокислот может не совпадать. Тем не менее, можно полагать, что наиболее подверженные окислению аминокислоты будут подвергаться в первую очередь окислительной модификации и в структуре белка. Так цистеин и метионин оказались теми критическими остатками, окисление которых происходит при более низких концентрациях окислителя ( $\text{OCl}^-$ ) и отражается на функциональной активности белков:



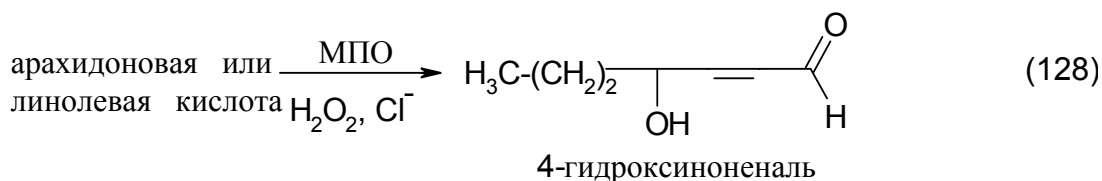
Наряду с хлорирующей активностью и ролью в качестве предшественников альдегидов, упомянутые выше хлорамины способны осуществлять и конъюгацию полипептидных цепей путем окисления тиоловых групп белков:



Дисмутация хлораминов (реакция (108)) или атака их гипохлоритом (реакция (109)), с образованием дихлораминов N-концевых аминокислотных остатков, приводит к формированию Шиффовых оснований (с отщеплением хлоридных ионов), гидролизующихся до нитрилов или цианид-ионов и оксида углерода (IV):



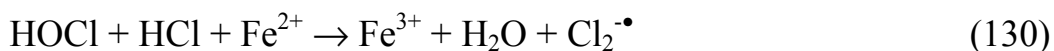
Источником биологически активных альдегидов выступают и продукты взаимодействия гипохлорита с липидами мембран и липопротеидами крови, например:



$\text{OCl}^-$  участвует в образовании гидроксильного радикала и синглетного кислорода:



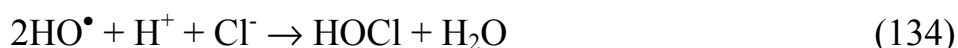
Альтернативным или дополнительным к указанному механизму МПО-зависимой продукции  $\text{HO}^{\bullet}$  служит реакция образования дихлоридрадикала с участием  $\text{Fe}^{2+}$ :



При  $\text{pH} > 4$  этот анион-радикал быстро превращается в гидроксильный радикал:



Образующийся в ходе этих (а также уже ранее рассмотренных) реакций гидроксильный радикал частично может расходоваться и на некаталитический путь генерации гипохлорита:



Реакция эта высоко экзергонична и характеризуется разностью редокс-потенциалов, равной +1.24В.

Дихлоридный анион радикал способен участвовать и в следующих превращениях:



Наряду с реакцией полной дисмутации дихлоридных радикалов, при их взаимодействии наблюдается образование и нового окислителя:

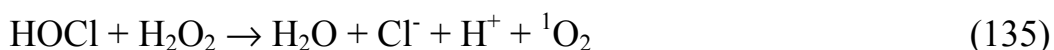


Причем, эта реакция протекает быстрее по сравнению с предыдущей, что следует из сопоставления величин констант скоростей.

МПО может выступать и эффективным ингибитором образования  $\text{HO}^{\bullet}$  (осуществляемого по «неуправляемому» механизму Фентона). Константа скорости взаимодействия МПО с  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $k=2.5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) на порядки выше, чем аналогичная константа реакции восстановления пероксида ионами железа и меди (см. реакции (71) и (74)). Таким образом, этот фермент способен не только служить продуцентом АМК (и других повреждающих) факторов, но и минимизировать общее биоцидное действие "несанкционированно" образующихся АФК, канализируя их действие в микробицидное.



Основным источником образования синглетного кислорода фагоцитирующими нейтрофилами выступают реакции:

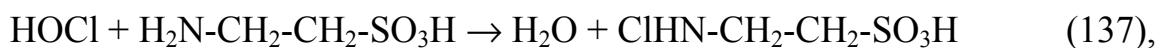


(энергетический выход этой реакции до  $\text{O}_2$  в его основном триплетном состоянии составляет:  $\Delta G^0 = -156.5$  кДж/моль и  $\Delta H^0 = -145.6$  кДж/моль), а также:



( $\Delta G^0 = -199.2$  кДж/моль,  $\Delta H^0 = -162.8$  кДж/моль - для  $\text{O}_2$  в основном состоянии).

Нейтрофилы содержат значительные количества одной из неканонических аминокислот - таурина. Таурин играет роль как фактора, сдерживающего развитие гипохлоритзависимых повреждений, так и фактора их иницирующего. Продукт взаимодействия  $\text{OCl}^-$  с таурином - тауринхлорамин:



обладает собственным окислительным потенциалом, но гораздо более узконаправленным, а именно, будучи долгоживущей субстанцией, по сравнению с  $\text{OCl}^-$ , тауринхлорамин преимущественно воздействует на метиониловые остатки белков, трансформируя их в метионилсульфоксид. Последний является той формой окисления метионила, которая может быть регенерирована в исходный аминокислотный остаток в белках и пептидах с помощью специализированного фермента – метионилсульфоксидредуктазы. В данном случае таурин выполняет функцию кофактора метионилсульфоксидредуктазной системы, обеспечивающего переориентацию деструктивного потенциала МПО в сторону редокс-регуляторных процессов.

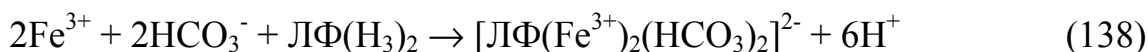
#### **4.3.2. Лактоферрин как потенциальный фактор каталитической продукции $\text{HO}^\bullet$ и дезорганизации антиоксидантной системы патогенных микроорганизмов**

Лактоферрин (ЛФ) - маркерный белок специфических гранул нейтрофильного гранулоцита, освобождающих свое содержимое в фагосому, содержащую объект фагоцитоза (ранее МПО-содержащих азурофильных гранул). Функционально ЛФ представляет собой биоконплексон ионов металлов переходной группы, то есть металлов переменной валентности (прежде всего – железа), выполняющих ключевую роль в живых системах. Прочность связи железа с лактоферрином значительно выше, чем с трансферрином - белком, обладающим высокой степенью гомологии с ЛФ. Эта связь является и более устойчивой по отношению к изменениям среды. Например, освобождение ионов  $\text{Fe}^{3+}$  из комплекса с ЛФ наблюдается при понижении рН среды до 4, тогда как в случае трансферрина - при более высоком рН (около 5.6).

Именно способностью ЛФ эффективно экстрагировать ионы железа и ионы других металлов переменной валентности из функционально важных

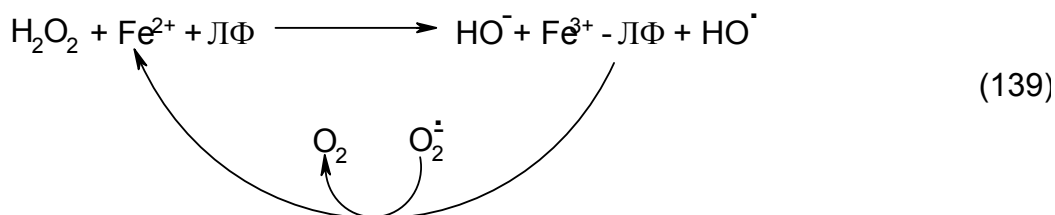
биоструктур микробной клетки, а также из окружающей среды и определяется бактериостатический эффект данного белка. Этим же обеспечивается, в частности, и повышенная уязвимость микроорганизма к действию других микробицидных факторов как самого лейкоцита, так и плазмы крови.

Реакцию связывания ЛФ-ном ионов переменной валентности можно представить на примере ионов  $\text{Fe}^{3+}$ :



Этот процесс осуществляется при обязательном участии бикарбонат-анионов. Аналогичный механизм связывания ионов железа осуществляется и апотрансферрином.

ЛФ является эффективным комплексоном в первую очередь таких металлов как  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{3+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$ . Поэтому, действие ЛФ сказывается, прежде всего, на системе антиоксидантной защиты микроорганизмов, так как эти металлы формируют активные центры супероксиддисмутаза (Fe-, Mn- и Cu-Zn-содержащих), каталазы и пероксидаза. Кроме того, эти металлы являются элементами активных центров и других ферментов - участников окислительно-восстановительных реакций и т. п. Сенсбилизация этим белком объекта фагоцитоза к действию кислород-зависимой биоцидной системы лейкоцита сопряжена с его способностью катализировать реакцию Габера-Вейса (реакцию (78)) и 5000-кратно ускорять реакцию Фентона:

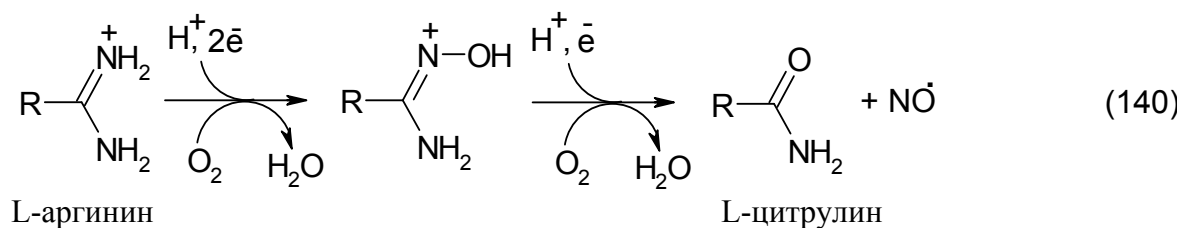


#### 4.3.3. Индуцибельная NO-синтаза лейкоцитов

Оксид азота (NO), несмотря на его свободнорадикальную природу, непрерывно продуцируется ферментативным путем в организме животных и человека, выполняя функции одного из универсальных регуляторов метаболизма. Эта роль во многом обеспечивается способностью NO связываться с гемовой группой важнейшего регуляторного фермента - растворимой гуанилатциклазы, образованием нитро- и нитрозосоединений, вовлечением в регуляцию активности генетического аппарата, как на уровне факторов транскрипции, так и на уровне самих механизмов транскрипции и трансляции. Этот агент участвует в контроле многих физиологических процессов: в регуляции тонуса кровеносных сосудов (как антагонист адренергической нервной системы), тормозит агрегацию и сосудистую адгезию тромбоцитов, вызывает расслабление гладких мышц желудочно-кишечного тракта, функционирует в центральной и вегетативной нервной системе, регулирует деятельность дыхательной и мочеполовой системы, и др.

Генерация NO во всех этих системах обеспечивается конститутивными формами NO-синтаз - эндотелиальной и нейрональной, использующих для этой цели в качестве субстратов L-аргинин и молекулярный кислород, а в качестве донора электронов - NADPH. Для активации NO-синтаз необходимо несколько кофакторов и простетических групп: тиолатсвязанный гем, FAD, FMN, кальмодулин и  $Ca^{2+}$  (только для конститутивных форм фермента), а также (6R)-5,6,7,8-тетрагидро-L-биоптерин. Структурная организация всех форм NO-синтаз (конститутивных и индуцибельной) одинакова и представлена гомодимерами субъединиц с молекулярной массой: 160кДа (для нейронального фермента), 135кДа (для эндотелиальной NO-синтазы) и 130кДа (для индуцибельной изоформы). Каждая из субъединиц, начиная с C-конца, содержит редуктазный домен (высокой степени гомологии с цитохром P450-редуктазой), кальмодулинсвязывающий домен и оксигеназный домен, а также N-концевую последовательность, специфичную для каждой из изоформ.

Суммарная реакция образования NO, катализируемая этими ферментами может быть представлена следующей схемой:



По аналогии с цитохром P450-редуктазой в этой реакции первичным акцептором электронов, донором которых является NADPH, выступает FAD, передающий их затем FMN. Оба флавиновых кофермента локализуются в редуктазном домене. После чего электроны переносятся на гем в оксигеназном домене. Возможность внутримолекулярного электронного транспорта от редуктазного к оксигеназному домену и стимуляция внутридоменного (в пределах редуктазного) потока электронов от FAD к FMN, контролируется кальмодулином. Если для каталитической активности конститутивных изоформ необходим  $Ca^{2+}$ , то для индуцибельной NO-синтазы этого не требуется. В последнем случае кальмодулин исходно связан с ферментом столь прочно, что благодаря этому уже достигнуто нужное конформационное состояние, делающее возможным внутримолекулярный перенос электронов.

Роль тетрагидробиоптерина в функционировании NO-синтаз заключается в стимулировании димеризации субъединиц, индуцировании трансформации гема из низко- в высокоспиновое состояние и увеличении сродства фермента к L-аргнину, выступающему в качестве субстрата.

Функционально интактные (димерные) формы NO-синтаз содержат по два эквивалента каждого из кофакторов, за исключением тетрагидробиоптерина, представленного только одним эквивалентом по отношению к двум гемам.

Оксид азота влияет на метаболические процессы как в самих клетках-продуцентах этого фактора, так и в клетках, расположенных на расстоянии по меньшей мере - нескольких клеточных диаметров. Транспортируется NO к клеткам-мишеням в стабилизированных формах: в виде динитрозильных ком-

плексов железа с тиолсодержащими лигандами или в виде S-нитрозотиолов. Эти формы, обеспечивающие возможность защиты NO при его транспортировке к клеткам-мишеням, а также возможность его депонирования, способны к взаимопревращению друг в друга.

Наряду с регуляторными функциями, NO обнаруживает и цитотоксическую/цитостатическую активность, выступая в качестве одного из биоцидных эффекторов лейкоцитов, либо предшественника таких субстанций. Биоцидная функция NO обеспечивается индуцибельной NO-синтазой защитных клеток, синтез которой инициируется цитокинами и рядом других иммуномодуляторов. Причем, в отличие от конститутивных форм, этот фермент не требует  $\text{Ca}^{2+}$ . Кроме того, если концентрация «регуляторного» NO приближается к наномолярному уровню, который соответствует и концентрации СОД в клетках, то стационарный уровень NO, продуцируемый индуцибельным ферментом активированных макрофагов, достигает десятков (приближаясь к ста) микромолей.

Возможно, что реальным агентом NO-опосредованной цитотоксичности выступает не оксид азота, а продукт его взаимодействия с  $\text{O}_2^{\bullet-}$  ( $k_{141} = 6.7 \cdot 10^9 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) - пероксинитрит ( $\text{OONO}^{\bullet}$ ), значительно превосходящий как NO, так и  $\text{O}_2^{\bullet-}$  по своим разрушительным свойствам:

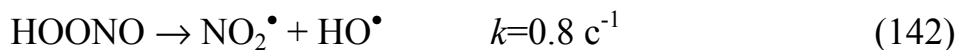


Пероксинитрит осуществляет нитрование тирозиновых остатков в белках, инициирует перекисное окисление липидов, инактивирует аконитазы, подавляет транспорт электронов в митохондриях, окисляет SH-группы, выступает ДНК-расщепляющим агентом и др.

Образующийся в реакции (141) пероксинитрит может спонтанно разлагаться на нетоксические продукты:



Данная реакция разложения пероксинитрита является строго рН-зависимой. Альтернативный механизм разложения пероксинитрита (также строго рН-зависимый), связан с образованием более токсичных форм АМК:



Реакционная способность самого пероксинитрита уступает гипохлориту.

Пероксинитрит является продуктом сопряжения двух лейкоцитарных систем, автономно генерирующих NO - с одной стороны, с другой - супероксидный радикал. При включении пероксинитрита в каталитический цикл МПО в качестве субстрата-восстановителя возрастает на несколько порядков его повреждающее действие. То есть имеется тесная кооперация между различными биоцидными факторами внутри кислородзависимой антимикробной системы лейкоцитов.

Активность NO в отношении  $O_2^{\bullet-}$ , более чем трехкратно превышает эффективность СОД ( $k=1.9 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). То есть оксид азота является конкурентом этого антиоксидантного фермента в отношении супероксидного радикала. Именно поэтому одним из условий минимизации токсического действия NO (как продукта конститутивных регуляторных NO-синтаз) и является сопоставимость концентраций СОД и оксида азота (II) в клетках. При массивной выработке оксида азота индуцибельной NO-синтазой лейкоцитов СОД уже не составляет конкуренцию NO в отношении супероксидного радикала, а, следовательно - и продукции пероксинитрита. Напротив, в условиях накопления  $OONO^-$  роль этого фермента оказывается разрушительной.

С другой стороны, СОД, наряду с антиоксидантной функцией может выполнять и редокс-регуляторную роль - о чем свидетельствуют одного порядка величины констант скоростей реакций ферментативной дисмутации  $O_2^{\bullet-}$  и образования  $OONO^-$ . Поэтому, конкурируя с оксидом азота за  $O_2^{\bullet-}$ , СОД способна осуществлять тонкий контроль уровня содержания NO в тканях. С позиции биохимии свободных радикалов - конечным результатом его регуляторных эффектов при взаимодействии с мишенями должно быть исчезновение нежелательной для живых систем свободной валентности. Отсюда следует, что все регуляторные эффекты NO должны быть очень зависимы от его концентрации и быть пропорциональны ее квадрату ( $[NO]^2$ ). Даже при взаимодействии с биорадикальным кислородом (при близких к физиологическим концентрациям реагентов) характерное время нейтрализации свободной валентности составляет десятки минут, поскольку такой процесс является реакцией третьего порядка:

$$V \sim [NO]^2[O_2]$$

И только при взаимодействии оксида азота со свободнорадикальными субстанциями скорость исчезновения его свободной валентности будет линейно зависеть от концентрации NO и определяться скоростью диффузии. Поэтому, учитывая относительно стабильный характер оксида азота, в литературе обсуждается и потенциальная роль NO в качестве одного из эндогенных антиоксидантов.

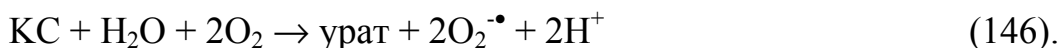
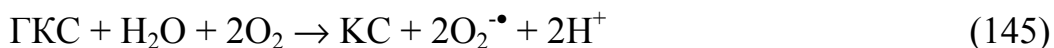
#### 4.3.4. Ксантиноксидаза

Наряду с лейкоцитами, обладающими специализированным генератором супероксидного радикала, источником массивной продукции  $O_2^{\bullet-}$  может выступать и ксантиноксидаза (КО). В тканях организма (преимущественно на эндотелиальных клетках) этот белок представлен, в основном, в форме мембранно-связанной ксантиндегидрогеназы (КД), катализирующей превращение гипоксантина (ГКС) и ксантина (КС) в мочевую кислоту:

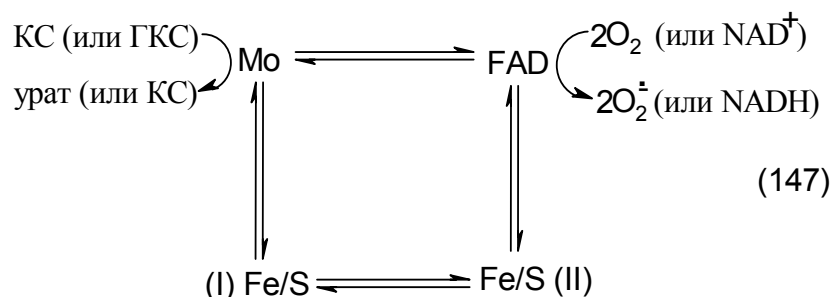




И лишь около 10% от суммарного содержания этого белка на эндотелии находится в трансформированной оксидазной форме, использующей в качестве акцептора электронов не пиридиннуклеотид, а молекулярный кислород:



Фермент (в форме КД или КО) представляет собой двухсубъединичный металлофлавопротеид, каждая из субъединиц которого содержит один атом молибдена (Mo), одну молекулу FAD и два атома железа (в виде FeS-центров). Все перечисленные субстанции в процессе катализа находятся в редокс-взаимодействии, формируя автономную внутрисубъединичную электрон-транспортную систему:

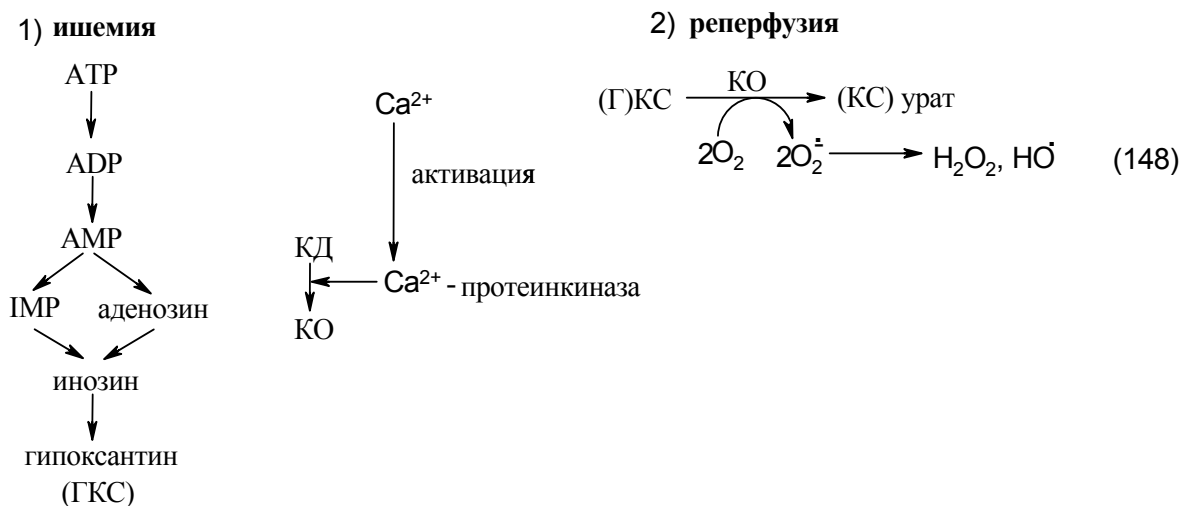


Скорость переноса электронов между этими редокс-центрами фермента велика ( $k > 200 \text{ с}^{-1}$ ) и равновесие между ними устанавливается настолько быстро, что скорость процесса в целом определяется реакцией окисления ГКС или КС (по-видимому, разрывом С-Н-связи). Значения редокс-потенциалов указанных центров характеризуются следующими величинами:  $\text{Fe/S(I)} = +0.343\text{В}$ ,  $\text{Fe/S(II)} = +0.303\text{В}$ ,  $\text{FADH/FADH}_2 = +0.236\text{В}$ ,  $\text{Mo}^{6+}/\text{Mo}^{5+} = +0.44\text{В}$ ,  $\text{Mo}^{5+}/\text{Mo}^{4+} = +0.48\text{В}$ . Различные степени окисления атома молибдена реализуются в процессе катализа. Различия же в значениях редокс-потенциалов пары  $\text{Mo}^{6+}/\text{Mo}^{5+}$  определяются тем обстоятельством - находится или нет ион молибдена во взаимодействии с железо-серным центром.

Массированная трансформация КД в КО (преимущественно на эндотелии) имеет место в гипоксических условиях. Последовательность событий, связанных с таким превращением фермента и последующая генерация супероксидного радикала при реоксигенации ишемизированных тканей, заключается в следующем. В результате гипоксии подавляется продукция АТР, но продолжается его утилизация. В соответствие с этим, богатые энергией АТР и АДФ деградируют до АМР и далее - до аденозина. Последняя субстанция быстро диффундирует во внеклеточное пространство, где через образование инозина деградирует до гипоксантина. Гипоксантин, не подвергаясь дальнейшей трансформации, накапливается в ишемизированной ткани в качестве субстрата КО для продукции  $\text{O}_2^{\bullet}$  в условиях реоксигенации при реперфузии такой ткани.

Параллельно с этим, КД (катализирующая превращение гипоксантина в мочевую кислоту с использованием в качестве акцептора электронов  $\text{NAD}^+$ ) конвертируется в КО. Пусковым механизмом этого процесса является  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимый протеолиз. В условиях дефицита АТФ и связанного с ним неэффективного функционирования кальциевых насосов, в клетках возрастает уровень  $\text{Ca}^{2+}$ . Это ведет к активации кальмодулин-регулируемых внутриклеточных протеиназ. Трансформацию КД в КО способны осуществлять и протеиназы нейтрофильных лейкоцитов, которые накапливаются в ишемизированной ткани и секретируют эти ферменты в околоклеточное пространство. В результате реализации этих параллельных процессов, при реоксигенации и использовании  $\text{O}_2$  в качестве акцептора электронов, и осуществляется продукция  $\text{O}_2^{\bullet-}$ .

Процесс трансформации КД можно суммировать в виде следующей схемы:



Трансформация КД в КО может осуществляться и с помощью обратимого процесса: окислением SH-групп этого фермента до дисульфидов.

#### 4.4. Участие активных форм кислорода в патологических процессах

В настоящее время выявлена патогенетическая роль АФК приблизительно для 100 заболеваний человека. Наиболее выражено их действие проявляется при легочной и сердечно-сосудистой патологии, ишемически-реперфузионных повреждениях нервной ткани и других органов, в развитии атеросклероза, патогенезе катаракты и других офтальмологических заболеваниях. Особенно негативно действуют АФК при эмфиземе легких, других хронических легочных заболеваний, но наиболее опасно их действие при дистресс-синдроме.

Источником АФК в организме выступают, в первую очередь, внутриклеточные электрон-транспортные цепи, клетки, оснащенные специализированными механизмами генерации таких агентов (лейкоциты), ксантиноксидаза (КО) и ряд других окислительно-восстановительных ферментов, а также ионы металлов переменной валентности, которые выходят из структуры бел-

ков-комплексонов в результате истощения последними их антиоксидантного "ресурса" и деструкции белков такими мощными АМК как гипохлорит.

Большинству патологий, течение которых осложняется участием АФК, присуще так называемое состояние окислительного стресса, характеризующееся увеличением образования АФК. На клеточном уровне состояние окислительного стресса является следствием интенсификации образования АФК и увеличения их внутриклеточного содержания в результате усиления "утечки" электронов к  $O_2$ , преимущественно, в системе окислительного фосфорилирования. Окислительный стресс имеет место и при физиологических состояниях, приближающихся к экстремальным (интенсивной физической и психоэмоциональной нагрузках, переутомлении и др., а также при старении организма).

Для нормального функционирования живых систем в условиях физиологического оптимума в ходе эволюции было выработано и существует про- и антиоксидантное равновесие ("окислительный гомеостаз") между неизбежно протекающими самопроизвольными окислительными реакциями и противодействующей им системой антиоксидантной защиты. Это равновесие носит динамический характер, представляя собой равнодействующую разнонаправленных процессов, и, поэтому, находится в колебательном режиме функционирования с амплитудой колебания (максимальной и минимальной концентрациями АФК), совместимой с нормальной жизнедеятельностью организма.

При заболеваниях, где в качестве обязательного компонента выступает воспалительная реакция, ведущую роль в повреждении собственных структур организма выполняют АМК, продуцируемые лейкоцитами, главным образом - нейтрофилами. Хотя наиболее разрушительные формы АМК этих клеток (генерируемые в процессе или в результате функционирования МПО) действуют в фаголизосомах лейкоцита, однако в очаге воспаления активированные нейтрофилы способны секретировать этот фермент и в околоклеточное пространство. Одной из задач формирующегося очага воспаления является обеспечение локализации инфекционного агента в участке его внедрения и в предотвращении его распространения в организме хозяина. При развитии воспалительного процесса уничтожение инфекционного агента может обеспечиваться и ценой попутного повреждения собственных тканей в очаге воспаления.

Кислородзависимое повреждение тканей нейтрофилами в очаге воспаления носит как прямой, так и опосредованный характер. Если в первом случае генерируемые во внеклеточное пространство АМК реализуют свой разрушительный потенциал непосредственно, то опосредованное их действие осуществляется путем модификации регуляторных и эффекторных молекул. Например, важной мишенью в этом отношении для АМК являются некоторые протеиназы и ингибиторы протеиназ. Так, АМК могут инициировать или усиливать протеолитические процессы в очаге воспаления, прямо активируя латентные формы коллагеназы и желатиназы, секретлируемые нейтрофилами,



а также инактивируя универсальный ингибитор протеиназ  $\alpha_2$ -макроглобулин и полиспецифический ингибитор сериновых протеиназ  $\alpha_1$ -антитрипсин.

Это обстоятельство имеет критическое значение для деструктивных процессов в очаге воспаления, так как доминирующую роль здесь играют секретированные нейтрофилами эластаза и катепсин G. Причем, деструктивный протеолиз с участием АМК приобретает некоторые признаки, присущие разветвленным цепным реакциям. В качестве амплифицирующего механизма в данном случае выступает способность секретированных лейкоцитами сериновых протеиназ разрушать ингибиторы цистеиновых и металлопротеиназ, то есть ферментов, в свою очередь атакующих ингибиторы сериновых протеиназ.

Усилению воспалительного протеолиза благоприятствует и окислительная модификация белков (субстратов протеиназ) окислителями нейтрофилов - процесс, аналогичный окислительной «маркировке» и сенсibilизации цитоплазматических белков, подлежащих катаболизму.

АМК, наряду с двумя вышеупомянутыми относительно универсальными ингибиторами протеиназ ( $\alpha_1$ -антитрипсин и  $\alpha_2$ -макроглобулин) инактивируют также и более узко специализированные ингибиторы каскадных систем крови.

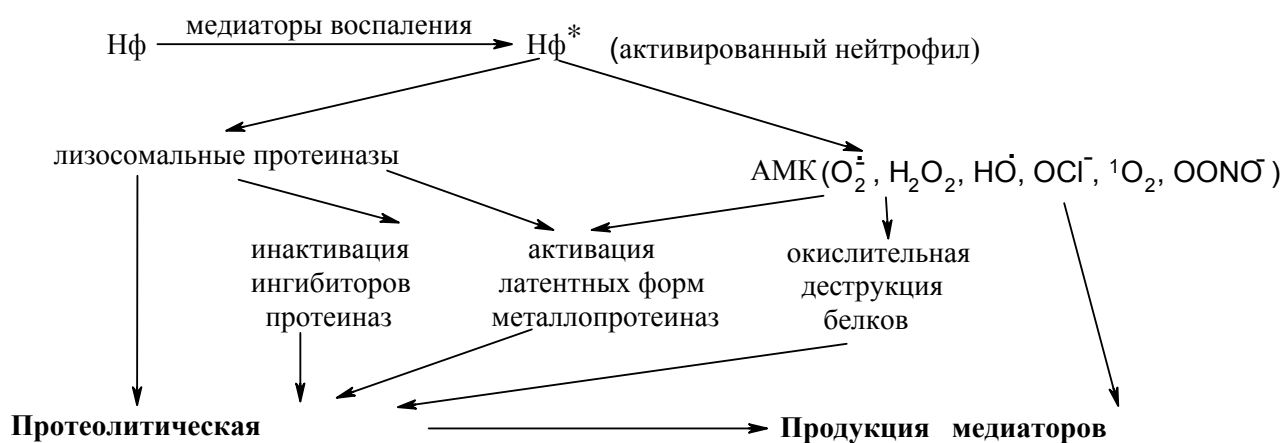
Генерация лейкоцитами редокс-факторов в окологлеточное пространство способствует внесению шума в нормальное функционирование регуляторных редокс-механизмов клетки. В этом случае негативный эффект АМК проявляется и при их нецитотоксических концентрациях.

Способность АМК, генерируемых различными источниками в организме (специализированными и неспециализированными) и преодолевающих мембранные барьеры, вмешиваться в нормальное функционирование внутриклеточных редокс-регуляторных систем является дополнительным, наряду с их прямым повреждающим действием, неблагоприятным фактором для жизнедеятельности клеток.

Негативное воздействие АМК заключается и в способности осуществлять структурную модификацию компонентов гуморальных систем и других белков плазмы крови, которые трансформируются в биологически активные субстанции.

АМК нейтрофилов могут стимулировать интенсификацию и собственно окислительной деструкции, выступая инициаторами цепных реакций перекисного окисления, подвергая ксантиндегидрогеназу окислительной трансформации в генератор  $O_2^{\bullet -}$  и  $H_2O_2$  (то есть, в ксантиноксидазу). Восстанавливая металлы переходной группы (что сопровождается их демобилизацией из связанного состояния), генерируемый нейтрофилами и КО супероксидный радикал  $O_2^{\bullet -}$  создает условия для генерации  $HO^{\bullet}$  (реакция 71).

Суммируя изложенные факты, можно привести следующую упрощенную схему кислород-зависимого деструктивного действия нейтрофилов в очаге воспаления:



В качестве основного механизма реперфузионных повреждений выступает образование  $O_2^{\bullet-}$  ксантиноксидазой.

Другие аспекты проблемы продукции АМК в медицине связаны с ишемически-реперфузионными повреждениями органов при их консервации и трансплантации. Важную роль АМК-опосредованные механизмы повреждения играют при различных вариантах эфферентной терапии. Наиболее выражено такой эффект имеет место при экстракорпоральной гемосорбции, так как используемые носители обладают сильно развитой поверхностью контакта с лейкоцитами перфузируемой крови и с компонентами ее гуморальных систем. Одним из основных препятствий широкого использования гемосорбции в клинической практике является индукция системы белков контактной активации. Активированные компоненты этой системы способны как непосредственно, так и через активацию компонентов других гуморальных систем крови стимулировать лейкоциты, что ведет к продукции последними АМК уже прямо в системном кровотоке.

Таким образом, генерируемые лейкоцитами АМК определяют образование сопутствующих повреждений или усиливают их при большинстве заболеваний воспалительного характера. Следовательно, поиск путей и способов не только стимулирования антимикробных защитных систем организма, но и возможности минимизации их негативного действия имеет важное значение для практической медицины. Уровень деструктивных процессов при воспалении в непатологических ситуациях эффективно контролируется компенсаторными механизмами. Одним из таких механизмов выступает система антиоксидантной защиты организма.

Существующая в настоящее время стратегия противовоспалительной терапии предусматривает разработку средств, направленных на снижение вероятности активации лейкоцитов и аккумуляции их в патологических очагах. То есть, ее действие направлено на регуляторное звено защитных реакций.

#### **4.5. Взаимодействие активных форм кислорода (АФК) с биологическими молекулами**

Объектами неспецифических (несанкционированно протекающих в организме) окислительных реакций с участием АФК служат биомолекулы различной природы, что приводит к окислительной деструкции и модификации компонентов живых клеток, внеклеточного матрикса и жидких сред организма. Особенно опасным является разрушительное действие АФК в отношении четырех основных типов биополимеров живых организмов: *нуклеиновых кислот, белков, липидов и углеводов*, составляющих основу структурно-функциональной организации живой материи.

Рассмотрим радикальные реакции, в которых молекулярный кислород и его активные формы принимают участие. Большинство свободнорадикальных реакций, в том числе с участием АФК, представляют собой цепные процессы. Подобные превращения на отдельных этапах ускоряются продуктами реакций, поэтому для них характерен автокаталитический характер.

##### **4.5.1. Окислительное повреждение ДНК**

В результате взаимодействия АФК с молекулой ДНК происходит:

- а) структурная модификация азотистых оснований;*
- б) разрушение пятичленного кольца дезоксирибозы;*
- в) расщепление фосфодиэфирных связей, что ведет к фрагментации этого полимера.*

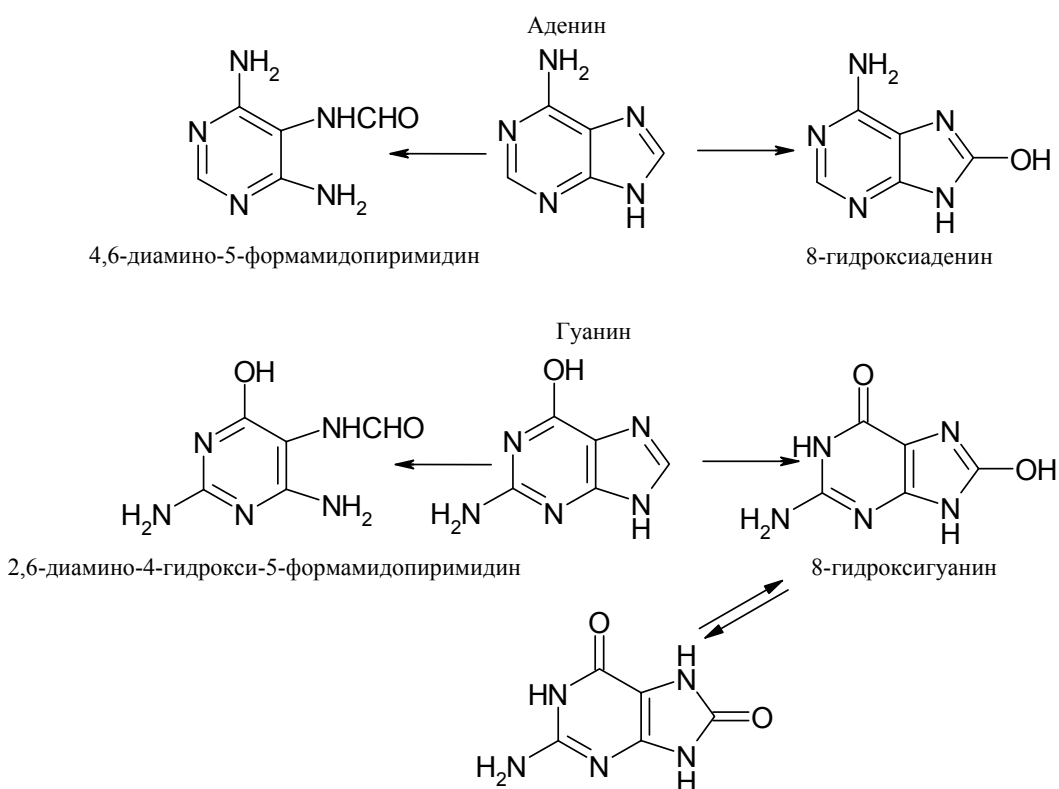
*In vivo* окислительное повреждение ДНК вызвано рядом причин, среди которых немаловажная роль принадлежит так называемому окислительному стрессу, характеризующимся увеличением внутриклеточного уровня АФК. Но даже в нормальных условиях ядерная ДНК постоянно подвергается действию АФК. Около 90000 окислительных повреждений ядерной ДНК происходит в день в одной клетке и устраняется с помощью эффективных механизмов репарации.

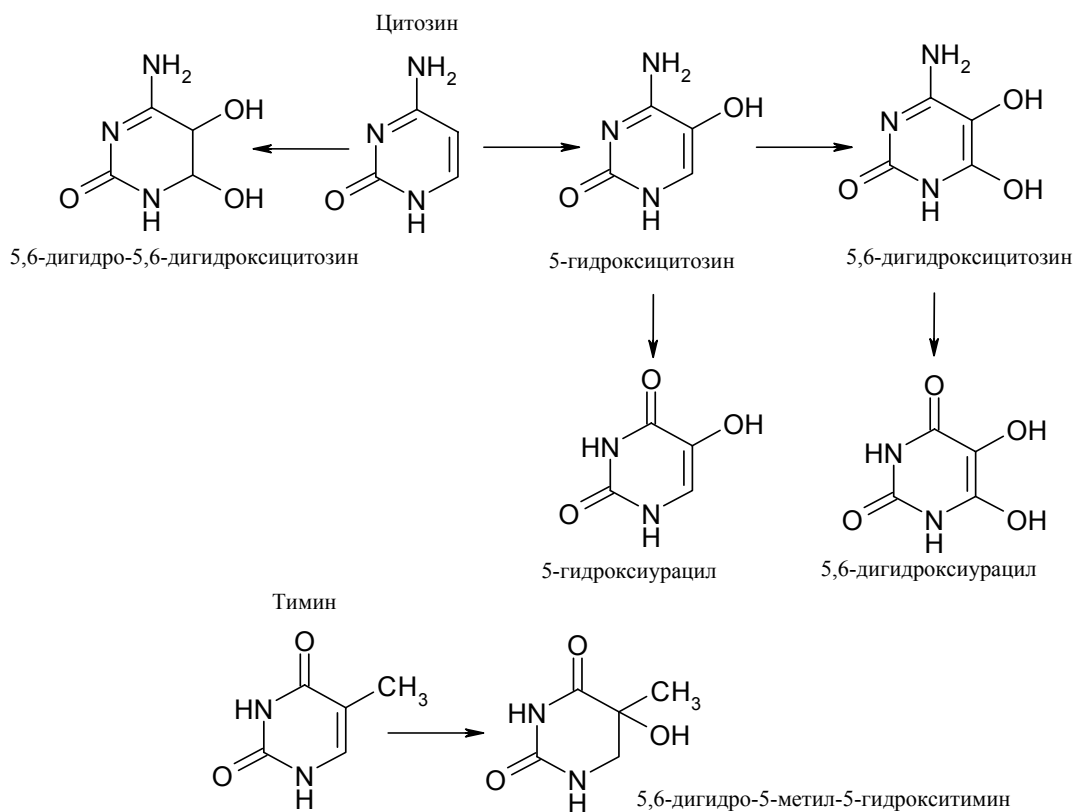
Основным источником  $O_2$  в клетке является аппарат окислительного фосфорилирования: из-за "утечки" электронов в результате шунтирования электронтранспортной цепи молекулярным кислородом - преимущественно на полувосстановленном коэнзиме Q (убисемихиноне  $CoQH^{\bullet}$ ). В равновесных условиях реакция окисления молекулярным кислородом этой свободнорадикальной структуры характеризуется необычайно малой для межрадикальных процессов константой скорости:  $k=40 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Очевидно, что данное обстоятельство является эволюционно отобранным признаком. Однако, даже в пределах физиологической нормы около 2% от утилизируемого в митохондриях кислорода превращается в супероксидный радикал. При избыточном давлении кислорода наблюдается почти линейная зависимость образования  $O_2^{\bullet}$  от концентрации  $O_2$  в митохондриях. Поэтому окисление митохондриальной ДНК в условиях избыточной продукции АФК протекает на порядок интен-

сивнее, чем ядерной. Аналогичная ситуация касается и других митохондриальных структур.

Наиболее вероятным инициатором окислительных повреждений ДНК является  $\text{HO}^\bullet$  (образующийся в ходе реакции взаимодействия  $\text{O}_2^\bullet$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$  с металлами переходной группы, поскольку сами эти окислители не реагируют достаточно эффективно с ДНК). Гидроксильный радикал вызывает разнообразные повреждения дезоксирибозы и оснований в ДНК. Основной мишенью действия этого радикала являются азотистые основания. Объектом атаки гидроксильного радикала в структуре ДНК выступают и фосфатные группировки. Однако их вклад в общую картину деградации этого полимера весьма незначителен. Если значения констант скоростей реакций взаимодействия  $\text{HO}^\bullet$  с углеводами близки к диффузионному пределу ( $k \sim 10^{11} \text{M}^{-1} \text{c}^{-1}$ ), то величина аналогичной константы в отношении фосфата составляет только  $2 \cdot 10^6 \text{M}^{-1} \text{c}^{-1}$ . Следовательно, скорость взаимодействия этого радикала даже не с основанием, а с углеводным компонентом ДНК будет на много порядков выше, чем с фосфатным (учитывая одинаковое их содержание в структуре этого биополимера).

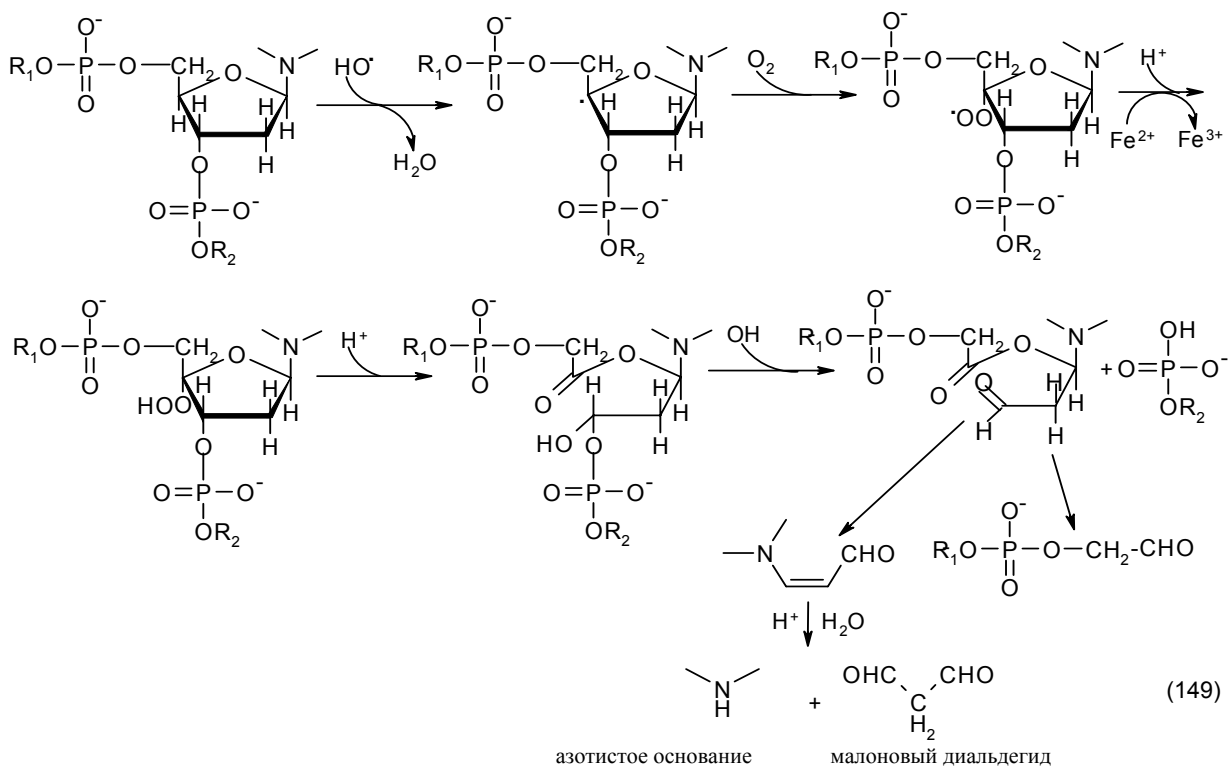
Первичным продуктом взаимодействия  $\text{HO}^\bullet$  с гуанином, цитозином, аденином и тиминем являются их радикальные формы, которые в дальнейшем подвергаются окислительной деструкции, с образованием следующих конечных продуктов:





Среди азотистых оснований окислительной деструкции в наибольшей степени подвергается гуанин, модифицированные формы которого составляет около 45% от общего количества окисленных оснований.

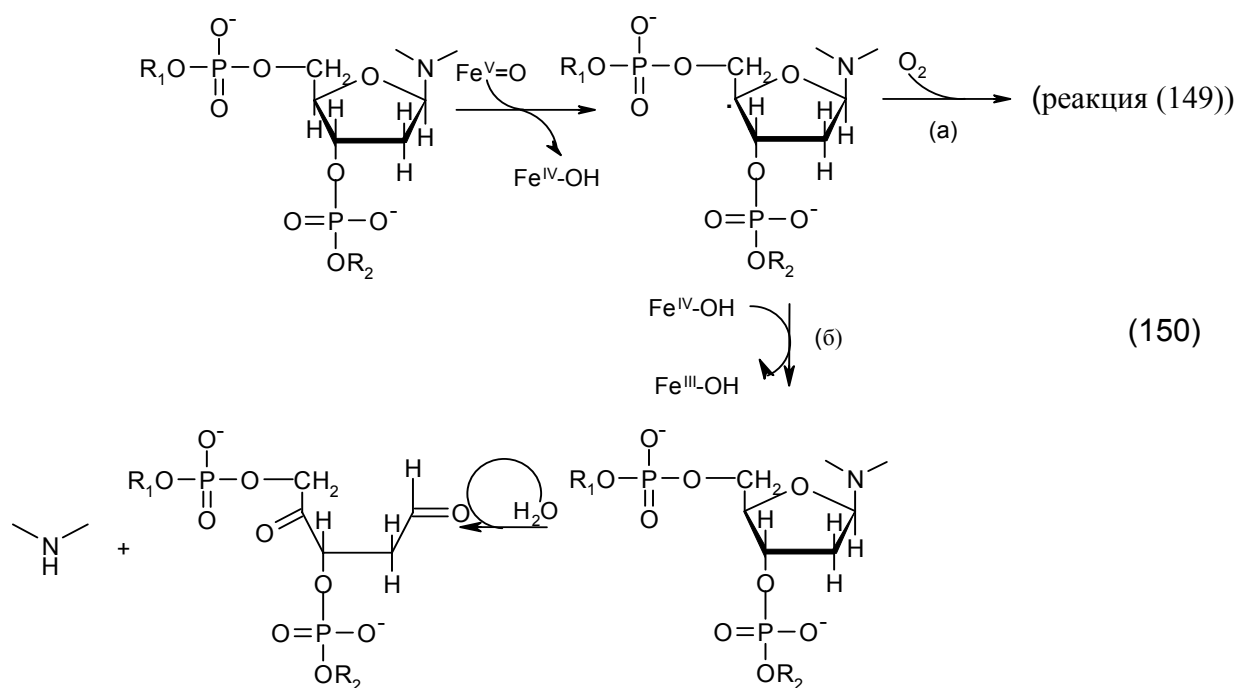
При взаимодействии гидроксильного радикала с молекулой ДНК в присутствии ионов двухвалентного железа происходит расщепление ее сахарно-фосфатного остова и фрагментация. Первичным продуктом такой реакции является радикальная форма  $C_4$ -углеродного атома дезоксирибозы:



Чувствительность к фрагментации сахарно-фосфатного остова молекулы ДНК оказалась более высокой, чем у полипептидной цепи белков и пептидов вследствие большей экспонированности углевода нуклеиновой кислоты по сравнению с  $\alpha$ -углеродным атомом аминокислотных остатков.

Однако,  $C_4$ -углеродный атом атакует лишь незначительная доля  $HO^\bullet$ -радикалов (хотя и с очень высокой скоростью:  $k = 1.9 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ ). В случае нуклеиновых кислот эти радикалы атакуют азотистые основания пиримидиновой природы с последующим переносом заряда и свободной валентности (свободного катион-радикала) на  $C_4$ -углеродный атом. После чего процесс фрагментации сахарно-фосфатного остова молекулы ДНК осуществляется по выше приведенной схеме превращений.

Прямая атака  $C_4$ -углеродного атома с отрывом атома водорода может осуществляться и высокоокисленными оксокомплексами - продуктами взаимодействия молекулярного кислорода с ионами металлов переходной группы. Таким окислителем выступает образовавшийся по гетеролитическому механизму комплекс железа, ион которого формально находится в максимальной степени окисления +5 ( $Fe^V=O$  - см. раздел 2.1). Это также ведет к возникновению  $C_4$ -радикального интермедиата, который затем деградирует в соответствии с двумя конкурирующими между собой процессами:



далее превращения идут по пути реакций (149). Выбор между двумя путями последующих превращений этого интермедиата определяется конкуренцией за радикальный центр на  $C_4$ -углеродном атоме дезоксирибозы между молекулярным кислородом и  $Fe^{IV}OH$  (продуктом первоначального взаимодействия оксокомплекса железа с  $C_4$ -углеродным атомом). Причем, в зависимости от выбора пути превращений, результатом окислительной трансформации нуклеиновой кислоты (помимо ее структурной модификации) будет либо расще-

пление сахарно-фосфатного остова, либо отщепление азотистого основания (последовательность превращений (150)).

Биологические последствия взаимодействия АФК с ДНК:

1) наличие в структуре молекулы 8-гидроксигуанина при репликации ДНК ведет к возникновению точечной мутации (трансверсии GC в ТА), поскольку в ходе этого процесса инкорпорируется в растущую цепь не dCMP, а dAMP;

2) раскрытие пятичленного кольца пуринов является "стоп-сигналом" для ДНК-полимеразы и летальным событием для клетки;

3) некоторые из модифицированных форм азотистых оснований (например, наиболее представительная из них форма - 8-гидроксигуанин) очень быстро удаляются из состава молекулы ДНК, тогда как другие (тимингликоли, например) сохраняются в структуре нуклеиновой кислоты значительно более продолжительное время. Связано это со спецификой ДНК-репаративных ферментов, в первую очередь нацеленных на более вероятные редокс-модификации. На прокариотической модели (*Escherichia coli*) было установлено, что исходным этапом репарации окисленных оснований в ДНК является катализируемое ДНК-гликозилазами отщепление модифицированных остатков. Ферменты эти гидролизуют связь N-C, соединяющую азотистое основание с C1-углеродным атомом. В отношении модифицированных пуринов эту роль выполняет Frg-белок, а в отношении пиримидинов - эндонуклеаза III. В случае же отщепления 8-гидроксигуанина пурин-специфическая гликозилаза (Frg-белок) вступает в кооперацию с еще одним ферментом - MutY-белком. Хотя последний и не способен атаковать окисленные азотистые основания, однако он также обладает ДНК-гликозилазной активностью, но нацеленной на неокисленный аденин, образующий "псевдопары" с 8-гидроксигуанином и 8-гидроксиаденином.

Таким образом, гидроксильный радикал, действуя на ДНК, способен отрывать атом Н от дезоксирибозофосфатного остова (что ведет к его расщеплению и освобождению азотистых оснований), способен связываться с основаниями ДНК, формируя радикальные аддукты, подвергающиеся дальнейшим превращениям. В результате все это ведет к нежелательным изменениям наследственного материала. В процессе и в результате окисления ДНК (окислительной модификации азотистых оснований, дезоксирибозы и фрагментации самого биополимера) образуются высокотоксичные производные - альдегиды, которые способны вступать в различные химические реакции с биополимерами с образованием соответствующих аддуктов (посредством образования Шиффовых оснований либо путем рекомбинации образующихся свободнорадикальных структур).

#### **4.5.2. Окислительная деструкция белков**

Окислительное повреждение белков АФК ведет к модификации боковых группировок аминокислотных остатков, фрагментации полипептидных цепей, к образованию ковалентных связей (сшивок) как внутри молекул, так и между ними, к изменению функциональной активности белков. Вплоть до

полной инактивации этих молекул. Данное обстоятельство справедливо и в случае тех белков, в отношении латентных предшественников которых активные формы кислорода могут первоначально выступать индукторами их функциональной активности. В свою очередь такой способ активации, не обусловленный триггерными механизмами организма, сам по себе несет негативный эффект.

Для оценки степени окислительной модификации белков под воздействием АФК используют уровень остаточной функциональной активности окисленного белка. Например, для ферментов - степень (глубину) и динамику их инактивации. Подход этот достаточно хорошо разработан на примере других повреждающих факторов (температурная или кислотная денатурация белков и др.). В этом случае процесс инактивации белка достаточно хорошо описывается экспоненциальной кривой падения его функциональной активности как от времени экспозиции белка в присутствии повреждающего фактора, так и от концентрации последнего (при фиксированном времени обработки инактивирующим фактором).

Для характеристики стабильности ферментов часто используются и эмпирические параметры, например, константы скоростей катализируемых ими реакций на определенной глубине инактивации этих биокатализаторов (обычно на глубине 50% или 75%). Сравнение величин констант скоростей реакций ( $k$ ) для нативных и модифицированных ферментов дополняется и сопоставлением между собой таких параметров как  $\Delta G^\ddagger$ ,  $\Delta H^\ddagger$  ( $E_a$ ) или  $\Delta S^\ddagger$ . Причем, если после модификации белка величина  $\Delta H^\ddagger$  (следовательно, и  $E_a$ ) изменяется незначительно, то эффект повреждающего фактора обусловлен лишь увеличением  $\Delta S^\ddagger$ .

Высокой устойчивостью к окислительной деструкции обладают антиоксидантные ферменты и специализированные белки-генераторы АФК. Среди ферментов-антиоксидантов наибольшей устойчивостью к окислительной деструкции обладает супероксиддисмутаза (СОД), наименьшей – глутатионпероксидаза, каталаза занимает промежуточное положение. СОД сохраняет способность катализировать диспропорционирование радикалов кислорода даже в условиях частичной окислительной фрагментации.

#### 4.5.2.1. Механизмы окислительного повреждения белков

Как и в случае ДНК наиболее мощным инициатором окислительной деструкции белков и повреждающим агентом выступает гидроксильный радикал<sup>12</sup>.

Результатом взаимодействия  $\text{HO}^\bullet$  с белками являются:

- их внутри- и межмолекулярные ковалентные сшивки как следствие рекомбинации образующихся свободно-радикальных структур в отсутствие  $\text{O}_2$  и  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ;

<sup>12</sup> Исключением являются два белка - IgG подкласса 1 ( $\text{IgG}_1$ ) и коллаген, каждый из которых под влиянием супероксидного радикала способен образовывать агрегаты. Причем, в случае с коллагеном, наряду с продуктами конъюгации его молекул, наблюдается и расщепление белка с выделением 4-гидроксипролинсодержащих фрагментов.

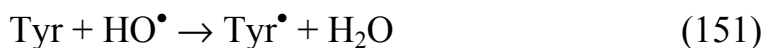


- фрагментация молекул;
- модификация аминокислотных остатков;
- в том числе и образование гидроперекисных группировок, способных в присутствии доноров электронов приводить к дальнейшим превращениям по типу цепных реакций.

Процессы эти усиливаются в присутствии молекулярного кислорода и  $\text{HO}_2^\bullet/\text{O}_2^{\bullet-}$ , увеличивающих преимущественно содержание пероксидных ( $\text{ROO}^\bullet$ ) радикалов и гидропероксидов ( $\text{ROOH}$ ), однако подавляющих в то же время образование ковалентных сшивок.

#### 4.5.2.1.1. Образование ковалентных связей между полипептидными цепями

Причиной образования внутри- и межмолекулярных сшивок является рекомбинация тирозил-радикалов ( $\text{Tyr}^\bullet$ ), образующихся либо в результате непосредственного взаимодействия  $\text{HO}^\bullet$  с тирозиновым остатком ( $\text{Tyr}$ ):



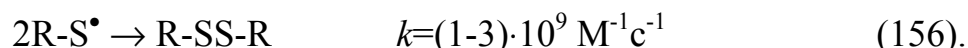
либо гидрокселированием фенилаланина ( $\text{Phe}$ ) до тирозил-радикала:



либо вследствие переноса свободной валентности с соседнего окисленного аминокислотного остатка, например, триптофанил-радикала ( $\text{Trp}^\bullet$ ) или метионил-радикала ( $\text{Met}^\bullet$ ):



Переносу свободной валентности на остаток тирозина благоприятствуют более высокие значения редокс-потенциалов радикальных форм других остатков (за исключением цистеина) как акцепторов электронов. Даже у ароматического остатка триптофана эта величина составляет около +1.0В ( $E_0 \text{ Trp}^\bullet/\text{Trp}$ ). В случае реакции (154) процесс одноэлектронного переноса ( $k = 450 \text{ c}^{-1}$ ) осуществляется и в том случае, когда эти ароматические остатки разделены пятью другими. Образующиеся (либо по сходному механизму, либо в результате прямой атаки цистеинила свободными радикалами) тиольные радикалы ( $\text{R-S}^\bullet$ ) могут рекомбинировать друг с другом, формируя внутри- и межмолекулярные S-S-связи. Таким образом, наряду с образованием 2,2'-бифенольных сшивок (реакция (152)), вклад в поперечносвязывающие процессы вносят и такие производные продуктов свободнорадикального окисления белков как S-S-связи:



Ковалентные шивки между полипептидными цепями могут формироваться также за счет Шиффовых оснований, образующихся в результате взаимодействия альдегидных производных некоторых аминокислотных остатков (вследствие их окислительной модификации) с NH<sub>2</sub>-группами белков:



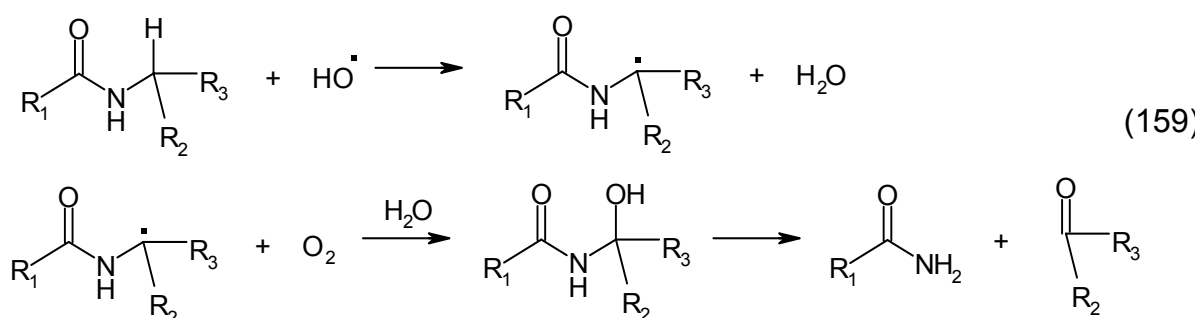
и в результате атаки такими альдегидами SH-групп белков. В последнем случае конъюгация реагентов будет происходить по механизму образования полумеркапталей:



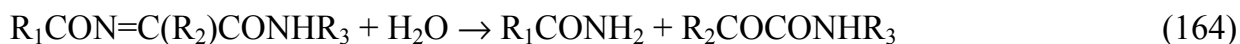
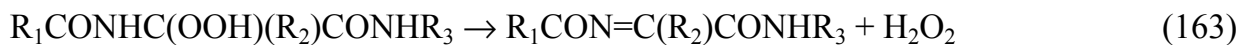
Однако роль битирозинов в конъюгации белков является ведущей, поскольку в присутствии O<sub>2</sub> (или O<sub>2</sub><sup>•</sup>) поперечно-связывающие процессы подавляются и главным образом наблюдается расщепление пептидных связей (с сопутствующим ему образованием карбонильных группировок).

#### 4.5.2.1.2. Фрагментация полипептидных цепей

Процесс фрагментации белков инициируется гидроксильным радикалом путем отрыва водорода у α-углеродного атома полипептидного остова молекулы с локализацией на этом атоме свободной валентности. Причем, α-углеродный атом в составе полипептидной цепи (но не у свободных аминокислот) является одним из главных участков молекулы для атаки гидроксильным радикалом. Для осуществления свободнорадикального расщепления полипептидной цепи обязательным условием является наличие в среде кислорода. Общая схема фрагментации белка при комбинированном действии гидроксильного радикала и молекулярного кислорода может быть представлена в следующем виде (где R<sub>2</sub> - боковая группировка аминокислоты у атакуемого α-углеродного атома):



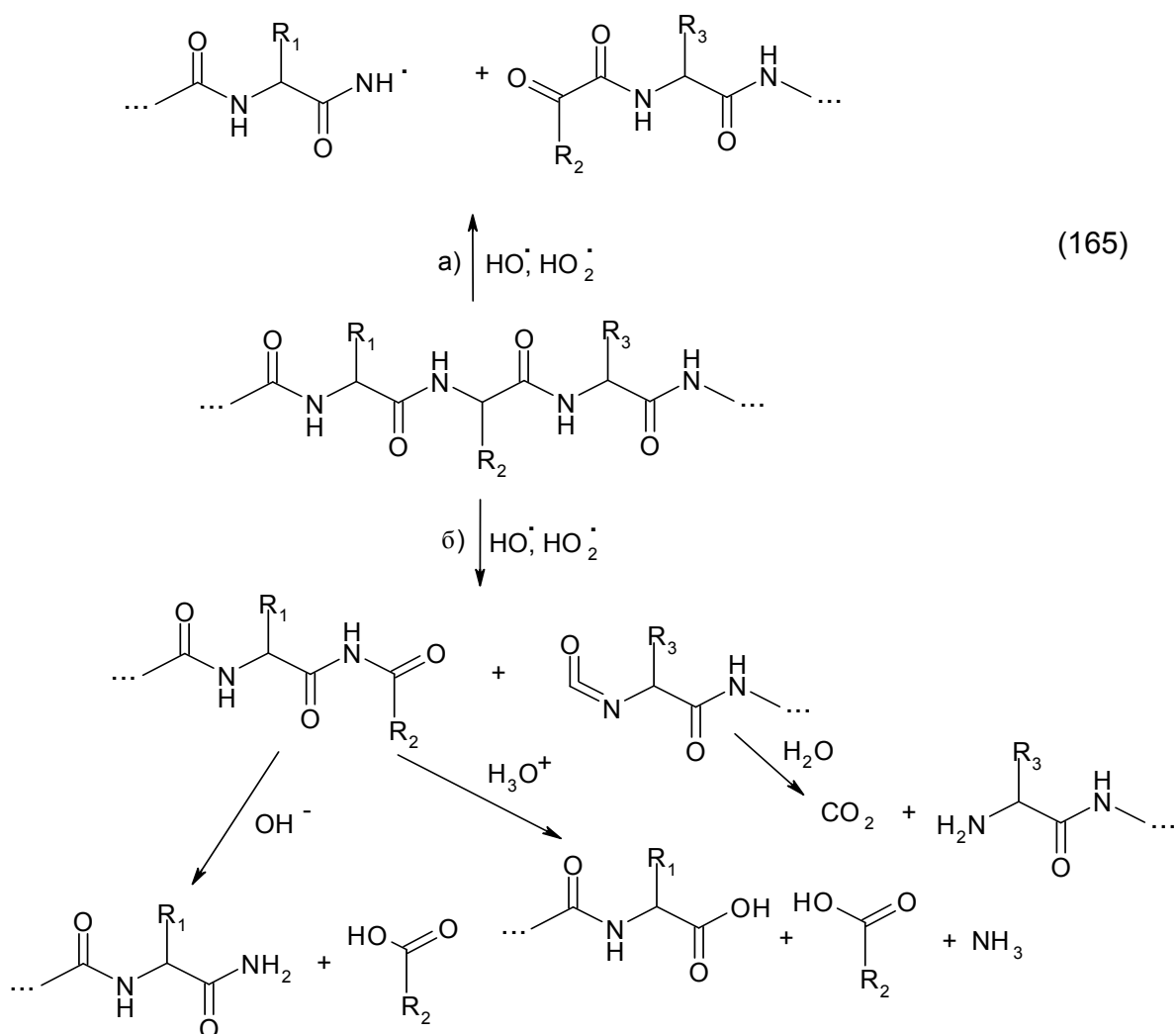
В аэробных условиях, но уже при участии O<sub>2</sub><sup>•</sup>, атака полипептидной цепи гидроксильным радикалом ведет к образованию пероксирадикальных интермедиатов, облегчающих расщепление пептидных связей до амидного и карбонильного пептидов. Механизм этого процесса предложен Гаррисоном (1962 г):



Образование гидропероксида аминокислотного остатка происходит и в результате непосредственного взаимодействия супероксидного радикала с радикалом на  $\alpha$ -углеродном атоме. Наблюдается конкуренция между молекулярным кислородом и  $\text{HO}_2^\bullet$  за радикальный центр, что не отражается на конечном результате - расщеплении полипептидного остова белка.

Механизм фрагментации полипептидных структур может включать и стадию образования алкоксильных радикалов ( $\text{RO}^\bullet$ ) на  $\alpha$ -углеродном атоме. В этом случае  $\alpha$ -С-гидропероксид, в присутствии ионов железа и меди разлагается на  $\alpha$ -С-алкоксильный радикал с выделением  $\text{HO}^\bullet$  (см. реакцию (73)). Радикалы этого типа вызывают быструю реакцию расщепления полипептидного остова (константа скорости которой составляет около  $10^7 \text{ c}^{-1}$ ) в участке между  $\alpha$ -углеродом и углеродом карбонила с образованием радикала  $^\bullet\text{C}(\text{O})\text{NHR}$ . Если же  $\alpha$ -С-радикал принадлежит С-концевому остатку - наблюдается реакция декарбоксилирования с выделением анион-радикала  $\text{CO}_2^\bullet$ . Последний очень быстро окисляется молекулярным кислородом до  $\text{CO}_2$  с образованием супероксидного радикала ( $k = 4.2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$ ). В случае же локализации свободной валентности на  $\alpha$ -С-атоме N-концевого остатка полипептидной цепи - освобождается  $^\bullet\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ -радикал.

Обобщенную схему окислительного разложения полипептидных цепей под воздействием АФК можно изобразить в следующем виде:



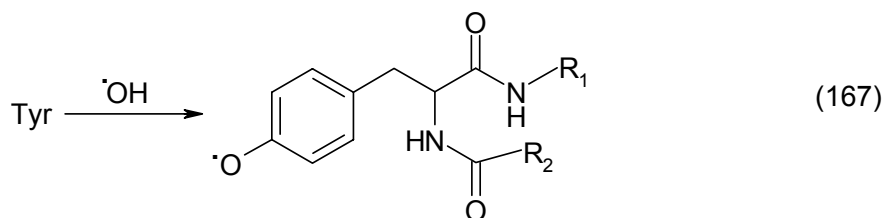
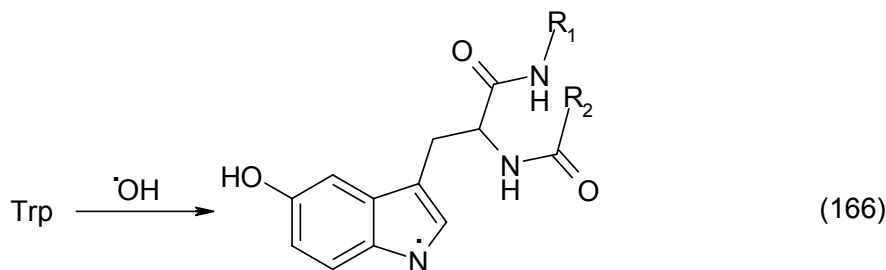
Оба пути окислительной фрагментации полипептидного остова белка, (а) и (б), являются равноценными и осуществляются в аэробных условиях параллельно.

Особо подвержены окислительному разложению пептидные ацилпролиновые связи, чувствительные к окислительной атаке  $\text{O}_2\cdot^-$ . Обусловлено это более легким окислением третичной амидной связи, чем вторичной, которую формируют другие аминокислотные остатки.

#### 4.5.2.1.3. Окислительная модификация аминокислотных остатков

Характер продуктов окислительной модификации боковых группировок аминокислотных остатков в структуре белков и свободных аминокислот может полностью не совпадать (только в структуре белков, подвергнутых действию АФК, обнаруживаются относительно стабильные пероксидные группировки, а также модификации, проявившие выраженную редуцирующую (то есть, электронодонорную) активность). Однако, наиболее подверженные окислению аминокислоты будут подвергаться в первую очередь окислительной модификации и в структуре белка: цистеин и метионин являются теми аминокислотными остатками, окисление которых требует не только на один-два порядка более низких концентраций окислителя, но и отражается на

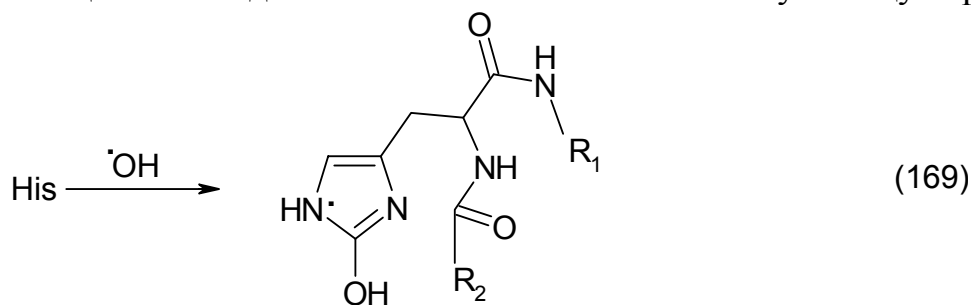
функциональной активности белков. В конечном счете, модифицирующему воздействию гидроксильного радикала подвержены любые аминокислотные остатки в структуре белков. Причем, наряду с отрывом электрона таким радикалом и образованием гидроксила ( $\cdot\text{OH}$ ), формируются и свободнорадикальные аддукты. В качестве субстратов для связывания  $\text{HO}\cdot$  выступают аминокислотные остатки, обладающие развитой системой двойных связей - Trp, Phe, Tyr и His (гистидинил) (с образованием соответствующих гидроксильных радикалов - точкой обозначена локализация свободной валентности): (у тирозина преимущественно осуществляется отрыв водорода от ОН-группы)



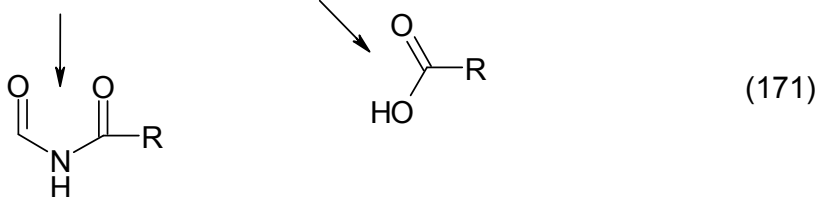
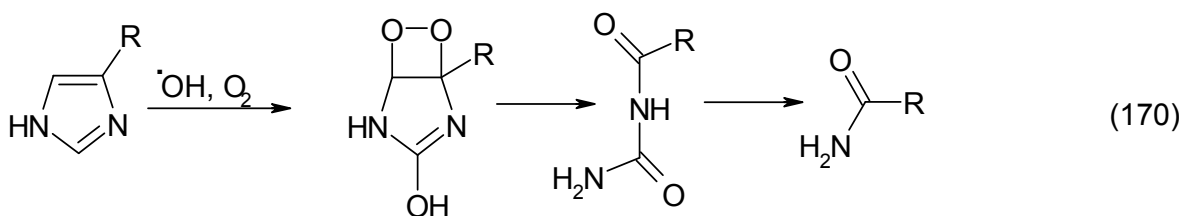
$\text{HO}\cdot$



(с делокализацией свободной валентности по бензольному кольцу тирозина).



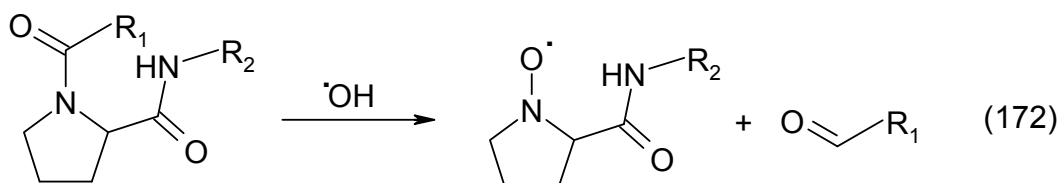
Однако в присутствии молекулярного кислорода боковые группировки этих остатков подвергаются дальнейшей трансформации. В случае гистидина окислительная модификация его боковой группировки в аэробных условиях приводит к разложению его пентагональной кольцевой группировки с образованием ряда карбонильных форм. Причем, даже столь глубокая деградация этого остатка не приводит к расщеплению полипептидного остова молекулы:



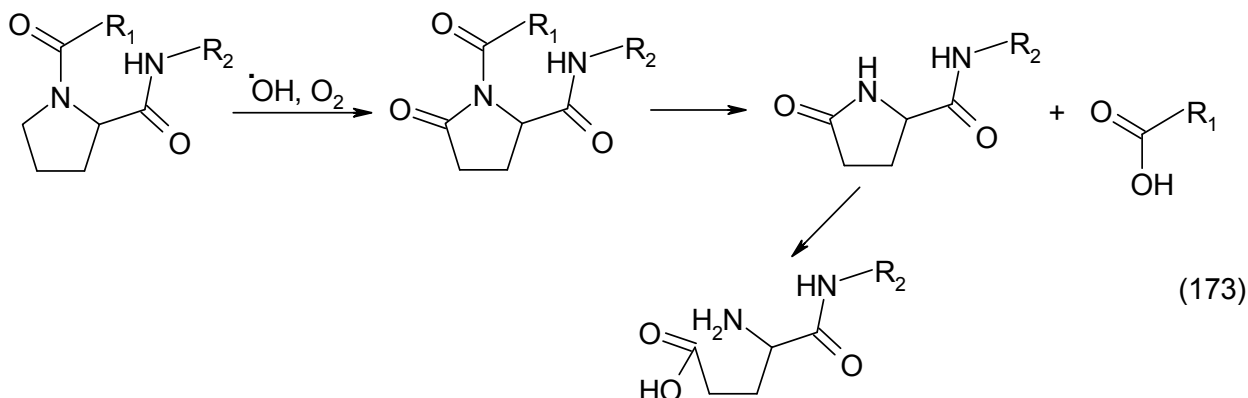
(171a)

Окислительная деградация пролина осуществляется по следующим схемам:

- 1) При взаимодействии пролина с гидроксильным радикалом образуется нитроксильный радикал (N-O<sup>•</sup>) пролина и наблюдается разложение ацилпролиновой связи, то есть, фрагментация полипептидной цепи:

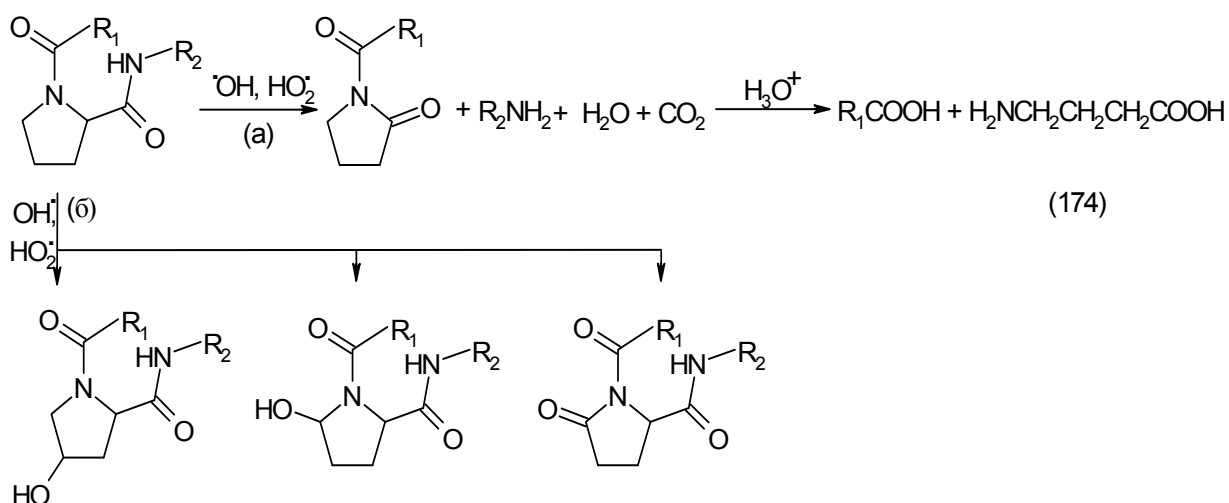


- 2) в присутствии O<sub>2</sub> осуществляется расщепление полипептидного остова белка:



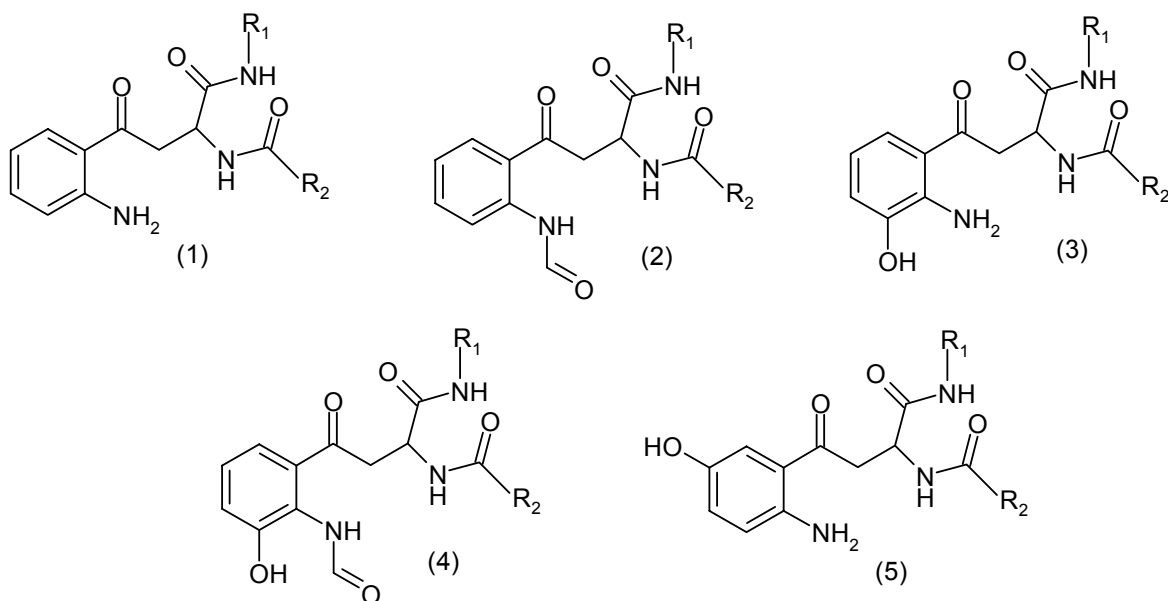
В реакциях (172) и (173) для окислительной деградации пролинового остатка для разложения полипептидной цепи не требуется отрыва атома водорода от α-углеродного атома.

- 3) при одновременной атаке гидроксильным и супероксидным радикалами аминокислотного остатка пролина происходит расщепление полипептидной цепи одновременно по двум механизмам - "а" и "б":



Расщепление полипептидного остова наблюдается и при окислительной модификации в аэробных условиях остатка глутаминовой кислоты.

Атака гидроксильным радикалом триптофана ведет к образованию 5-гидрокситриптофанильного радикала с делокализацией свободной валентности на атоме азота индольного цикла. Дальнейшее окисление триптофана приводит к разрыву пятичленной структуры с образованием следующих конечных продуктов нерадикальной природы: кинуренину (1), N-формилкинуренину (2), 3-гидроксикинуренину (3), 3-гидрокси-N-формилкинуренину (4) и 5-гидроксикинуренину (5):



Образующиеся при окислении альдегиды способны участвовать в двух конкурирующих процессах. Во-первых, модифицируя аминокетильные группы до оснований Шиффа, участвовать в деструкции белка совместно с радикальными формами. Во-вторых, подвергаться гидролизу до кенуренина с отщеплением формильной группировки. Окислительная трансформация триптофанового остатка ведет к специфической флуоресценции, используемой в качестве критерия оценки радикального повреждения различных типов белков. Окислительная модификация Trp во всех случаях приводит к существенному снижению

функциональной активности белка, значительному уменьшению его устойчивости к денатурирующим воздействиям.

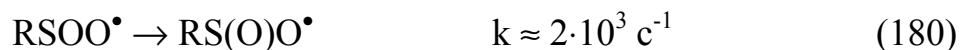
Наряду с триптофаном наиболее чувствительными к действию окислителей являются остатки Met и Cys в составе белков. Некоторые реакции окисления Met и Cys являются обратимыми (для чего существуют специальные ферментативные системы):



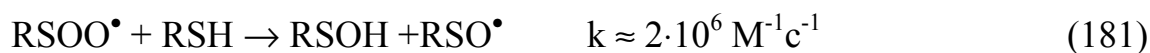
Наряду с «каноническими» продуктами окисления этих остатков, образуются и активные радикальные интермедиаты. В случае тиольного радикала, основными процессами, протекающими в клеточных системах при аэробных условиях, являются его реакции с молекулярным кислородом и глутатионом, GSH (концентрация которого в живых клетках составляет миллимолярные значения):



После чего тиилпероксидный радикал трансформируется либо в сульфинильный радикал:



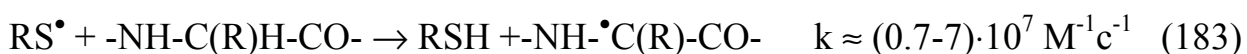
либо, взаимодействуя с SH-содержащими соединениями (преимущественно с GSH), превращается в сульфеновую кислоту и сульфинильный радикал):



В то же время дисульфидный анион-радикал комплекса белка с глутатионом отдает свой лишний электрон молекулярному кислороду, трансформируя последний в супероксиданион-радикал и превращаясь в валентнонасыщенный аддукт:



Образующийся в реакции (177) тиольный радикал способен атаковать белки, преимущественно отрывая атом водорода от  $\alpha$ -углерода полипептидных цепей:

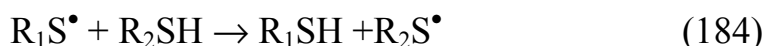


Следовательно, в присутствие кислорода происходит фрагментация белков не только в результате атаки их только гидроксильным радикалом или продуктом его взаимодействия с белками - алкоксильным радикалом, но и при



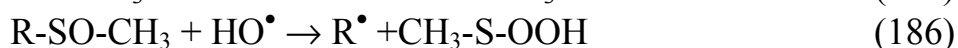
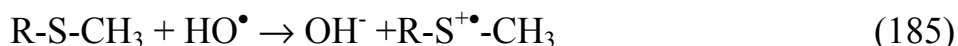
участии в этом процессе тиольного радикала - продукта окисления низкомолекулярных SH-соединений.

Простой обмен свободной валентности с атомом серы цистеинильных остатков является второй по своему значению реакцией взаимодействия тиольного радикала с белками (из-за меньшего представительства свободных SH-групп у этих молекул, по сравнению с имеющимися у них  $\alpha$ -углеродными атомами), ведущей к миграции свободной валентности между полипептидными цепями:

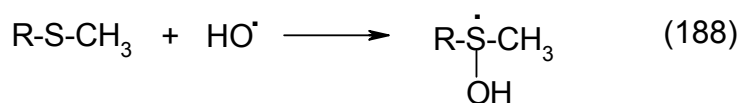


При взаимодействии гидроксильного радикала с метионом и его обратимым производным - метионилсульфоксидом наблюдаются следующие превращения:

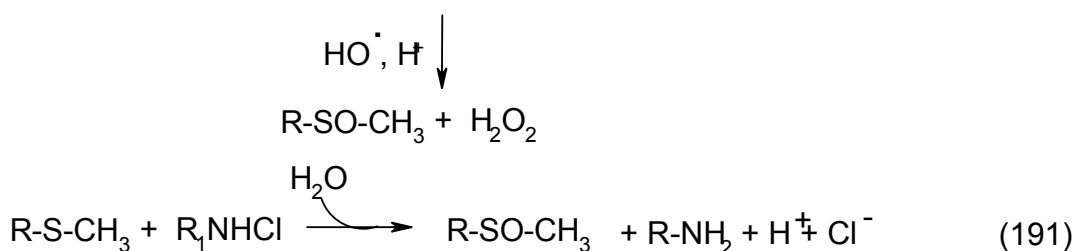
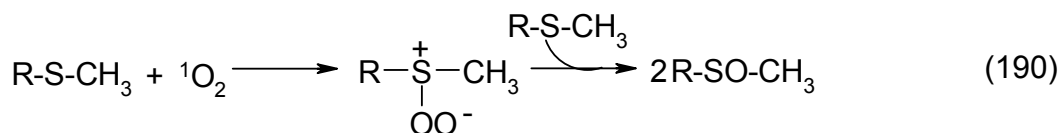
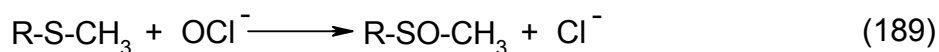
а) отрыв электрона или группировки атомов:



б) присоединение  $HO^\bullet$ :



То есть, гидроксильный радикал, реагируя с этими соединениями, способен как отрывать электрон от исходной тиоэфирной группы (или отрывать группу атомов от метионилсульфоксида), так и формировать гидроксильированный свободнорадикальный аддукт с метиононовым остатком. Met по критерию незаменимости занимает вторую позицию после Tgr в структуре белков. Вследствие слабого нуклеофильного характера тиоэфирной группы этой аминокислоты (по сравнению с другими нуклеофильными аминокислотными остатками в белках) при низких значениях pH она не протонируется. И в кислой среде метеонин окисляется уже при низких концентрациях окислителей. Трансформация Met в метионилсульфоксид происходит в присутствии  $HO^\bullet$ ,  $^1O_2$ ,  $H_2O_2$ , гипохлорита и хлорамина, причем механизм генерации метионилсульфоксида в каждом случае имеет свои особенности:



Следующими по своей "незаменимости" аминокислотными остатками являются Tyr, His и Phe. При атаке  $\text{HO}^\bullet$ , этих аминокислотных остатков происходит их окислительная трансформация. Такие неконтролируемые самопроизвольные процессы окисления с участием АФК являются опасными для живых систем.

#### 4.5.2.1.5. Гидропероксидные производные как продукты окислительной модификации аминокислотных остатков

Наиболее интенсивно образование гидропероксидов<sup>13</sup> протекает с участием 6 аминокислот: Glu, Ile, Leu, Pro и Val в составе аминокислотных остатков белков. Остальные аминокислоты либо инертны в этом отношении, либо гораздо менее чувствительны. В целом механизм образования гидропероксидов белков аналогичен перекисному окислению липидов и включает следующую цепь преобразований (где RH - нативный белок):

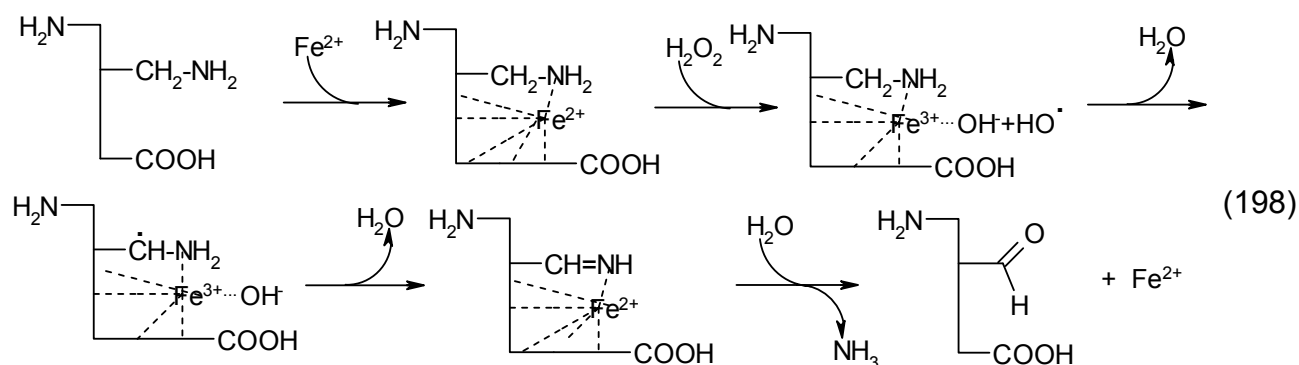


Такие гидропероксиды способствуют накоплению в структуре белков гидроксильных производных (наряду с упомянутыми ранее гидроксильными продуктами ароматических остатков), а также алкоксильных радикалов:

<sup>13</sup> Речь идет не о гидропероксидах, образующихся на  $\alpha$ -углеродном атоме аминокислотных остатков в процессе окислительной фрагментации белков, а о гидропероксидах боковых группировок аминокислот (один из вариантов окислительной модификации аминокислотных остатков в молекулах белков).

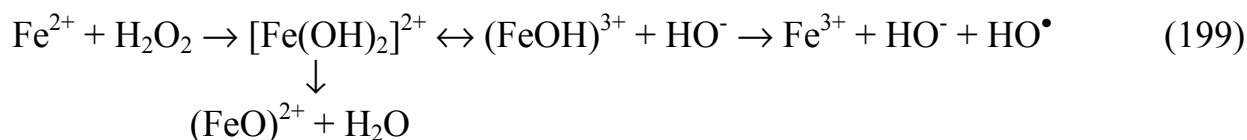


Вероятный механизм сайт-специфического повреждения предложен Стадтманом. Для иллюстрации этого механизма приведем схему, где в качестве примера металл-связывающего агента и одновременно мишени гидроксильного радикала выступает остаток лизина (Lys):



Образующийся вследствие восстановительной демобилизации железа из белка-комплексона (например, трансферрина) жидкофазный  $\text{Fe}^{2+}$  связывается с белком-мишенью и формирует координационный комплекс. В участке иммобилизации металла  $\epsilon$ -аминогруппа лизила служит одним из лигандов  $\text{Fe}^{2+}$ . После реакции восстановления диффундирующей  $\text{H}_2\text{O}_2$  образуется  $[\text{HO}^\bullet, \text{HO}^-, \text{Fe}^{3+}, \text{-NH}_2\text{-}]$ -комплекс. Затем  $\text{HO}^\bullet$  отрывает атом водорода у углеродного атома при  $\epsilon$ -аминогруппе с образованием радикала, где свободная валентность принадлежит этому же углероду. Неспаренный электрон радикала восстанавливает железо, регенерируя  $\text{Fe}^{2+}$  с одновременной конверсией  $\epsilon$ -аминогруппы в иминопроизводное. Наконец, иминопроизводное подвергается гидролизу с выделением  $\text{NH}_3$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  и образованием альдегидного производного  $\epsilon$ -аминогруппы. В приведенном выше примере металл выступает в качестве истинного катализатора, поскольку в процессе осуществления реакции регенерируется его исходное состояние. В дальнейшем ион металла может включиться в аналогичный сайт-специфический процесс (то есть, с участием "жидкофазного" пероксида -  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), либо в реакцию (197) ("иммобилизованный" гидропероксид), или генерировать гидроксильный радикал в объеме реакционной среды.

Все превращения происходят внутри координационного комплекса и малодоступны жидкофазным антиоксидантам. В координационном комплексе, наряду с  $\text{HO}^\bullet$  и в соответствии со следующей цепью превращений:

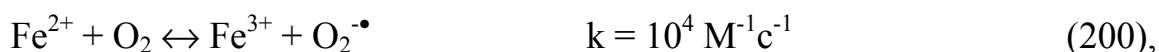


активными интермедиатами в процессах окислительной деструкции белков выступают  $(\text{FeO})^{2+}$ ,  $[\text{Fe}(\text{OH})_2]^{2+}$ , а также  $(\text{FeOH})^{3+}$ .

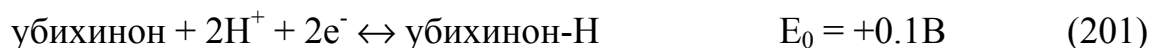
Верхняя строка цепи превращений (199) представляет собой по сути молекулярный механизм реализации реакции Фентона, тогда как ее ответвле-

ние вниз - механизм образования феррильного иона (деструктивного аналога гидроксильного радикала иммобилизованного на полипептидной цепи).

Сайт-специфическое окисление белков, катализируемое ионами металлов (как наиболее представительный процесс повреждения биополимеров) не ограничивается лишь участием в таких реакциях  $H_2O_2$ . Молекулярный кислород способен немедленно реагировать с радикальными продуктами боковых группировок аминокислот (в результате отрыва атома водорода гидроксильным радикалом или феррилом -  $(FeO)^{2+}$ ). Молекула  $O_2$  способна и непосредственно активироваться восстановленным ионом железа, иммобилизованным на белке (или др. ионами металлов переходной группы). Наиболее эффективно "активация" молекулы  $O_2$  идет в присутствии доноров электронов, в качестве которых в живых системах могут выступать аскорбат, NAD(P)H и др. В результате одноэлектронного или двухэлектронного восстановления кислорода (до  $O_2^{\bullet-}$  или  $H_2O_2$ ) и при наличии металла, например,  $Fe^{3+}/Fe^{2+}$ , разворачиваются все ранее описанные превращения. Редуцирующими "активаторами" кислорода способны выступать и ионы металлов, в первую очередь - железа:



эффективными восстановителями которого до ферросостояния могут служить биомолекулы с высокой редуцирующей способностью (pH7):



### 4.5.3. Перекисное окисление липидов (ПОЛ)

Опасность окислительных повреждений липидов для организма связана с тем, что они представляют собой основной материал клеточных мембран (для эукариотических организмов вся организация внутриклеточного метаболизма, реализуемая компартиментализацией его отдельных процессов, обеспечивается именно биологическими мембранами). Отличительной особенностью окислительного повреждения липидов в составе биологических мембран является аккумуляция молекулярного кислорода в гидрофобной области их жирнокислотных остатков. В результате этого, а также тесного и параллельного расположения друг по отношению друга соседних жирнокислотных ос-

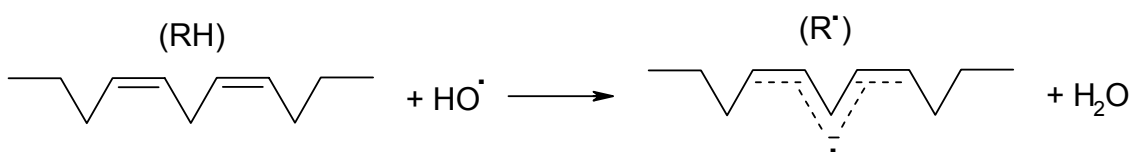
татков создаются условия для реализации окислительных повреждений по типу цепных реакций. Благодаря ключевой роли в таком процессе органических гидропероксидов (пероксидов (перекисей)) данный процесс получил название перекисного окисления липидов (ПОЛ).

Перекисное окисление липидов является одним из основных типов повреждения биологических мембран и происходит при многих патологических процессах в живом организме.

Основная цепь превращений при перекисном окислении липидов (ПОЛ) может быть представлена четырьмя этапами: 1) инициирование цепи (инициация) процесса ПОЛ; 2) продолжение (рост) цепи ПОЛ; 3) разветвление цепи (амплификация процесса); 4) обрыв цепей (терминация процесса).

Иницируют ПОЛ следующие процессы: разложение присутствующих в материале гидропероксидов в результате акцепции электрона у восстановленных ионов переходных металлов или их окисления гидропероксидным (супероксидным) и другими радикалами, либо окисленным ионом металла; присоединение свободного радикала к двойной связи ненасыщенной жирной кислоты; присоединение синглетного кислорода к двойной связи с последующим разложением образовавшегося пероксида и др.

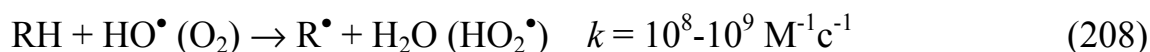
Полиненасыщенные жирные кислоты фосфолипидов клеточных мембран особенно легко подвергаются атаке свободными радикалами. Обусловлено это тем, что двойные связи у таких кислот соединены друг с другом через цис-метиленовые структуры (-CH<sub>2</sub>-). Такие бис-аллильные участки позволяют электрону делокализоваться на пяти углеродных атомах и обеспечивают более легкий отрыв радикалом атома водорода у метилена, чем у -CH<sub>2</sub>- насыщенной структуры (энергия диссоциации С-Н-связи в бис-аллильном участке (около 314 кДж/моль) значительно ниже, чем у вторичного углерода, который не окружен двойными связями (около 397 кДж/моль)):



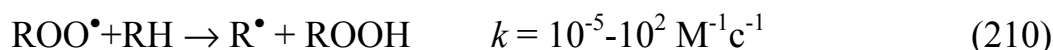
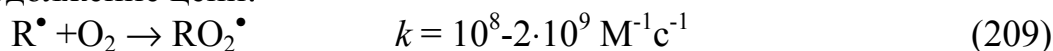
Поэтому бис-аллильные участки полиненасыщенных жирных кислот атакуются гидроксильным, алкоксильным, пероксидным радикалами, что является важным условием как для продолжения, так и развития процесса ПОЛ. Менее эффективен в этом отношении гидропероксильный радикал (HO<sub>2</sub>•), сродство к электрону у которого (293 кДж/моль) лишь несколько уступает значению энергии диссоциации С-Н связи в бис-аллильном участке жирных кислот.

Последовательность реакций развития процесса ПОЛ можно представить следующей схемой:

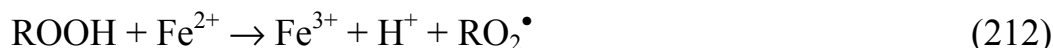
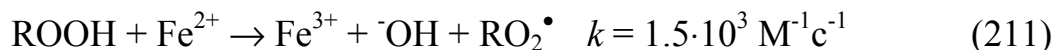
1) Инициирование цепи:



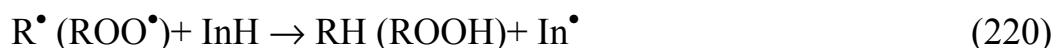
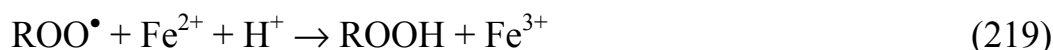
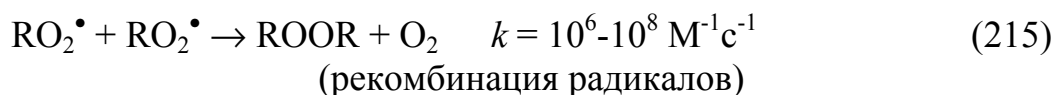
2) Продолжение цепи:



3) Разветвление цепи (амплификация процесса):

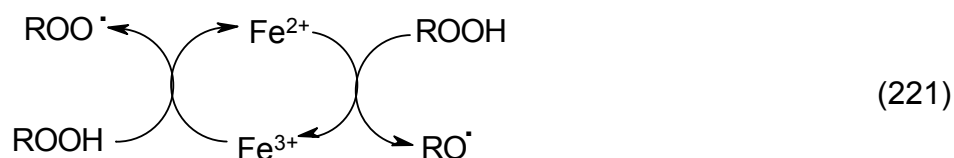


4) Обрыв цепей:



(взаимодействие с антиоксидантами - "ловушками" радикалов, где InH – антиоксидант).

На основе металлзависимых реакций (211) и (212) формируется своеобразный "реактор" для редокс-каталитической наработки свободных радикалов:



среди которых алкоксильные радикалы ( $RO^{\bullet}$ ) обладают достаточной способностью окислять интактные молекулы и интенсифицировать процессы ПОЛ. Аналогичную роль в качестве каталитических центров в таком реакторе могут выполнять и ионы меди ( $Cu^+/Cu^{2+}$ ).

Реакция роста цепи (210) определяет скорость всего суммарного процесса, как самая медленная стадия. В присутствии кислорода концентрация  $ROO^{\bullet}$ , как правило, превышает концентрацию  $R^{\bullet}$ , то есть обрыв цепи осуще-

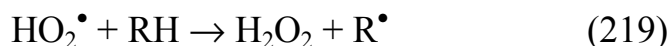




шунтируемые молекулярным кислородом. В свою очередь, образуемая в результате этой реакции протонированная форма супероксидного радикала при взаимодействии с аналогичным гидропероксидом дает пероксидный радикал:



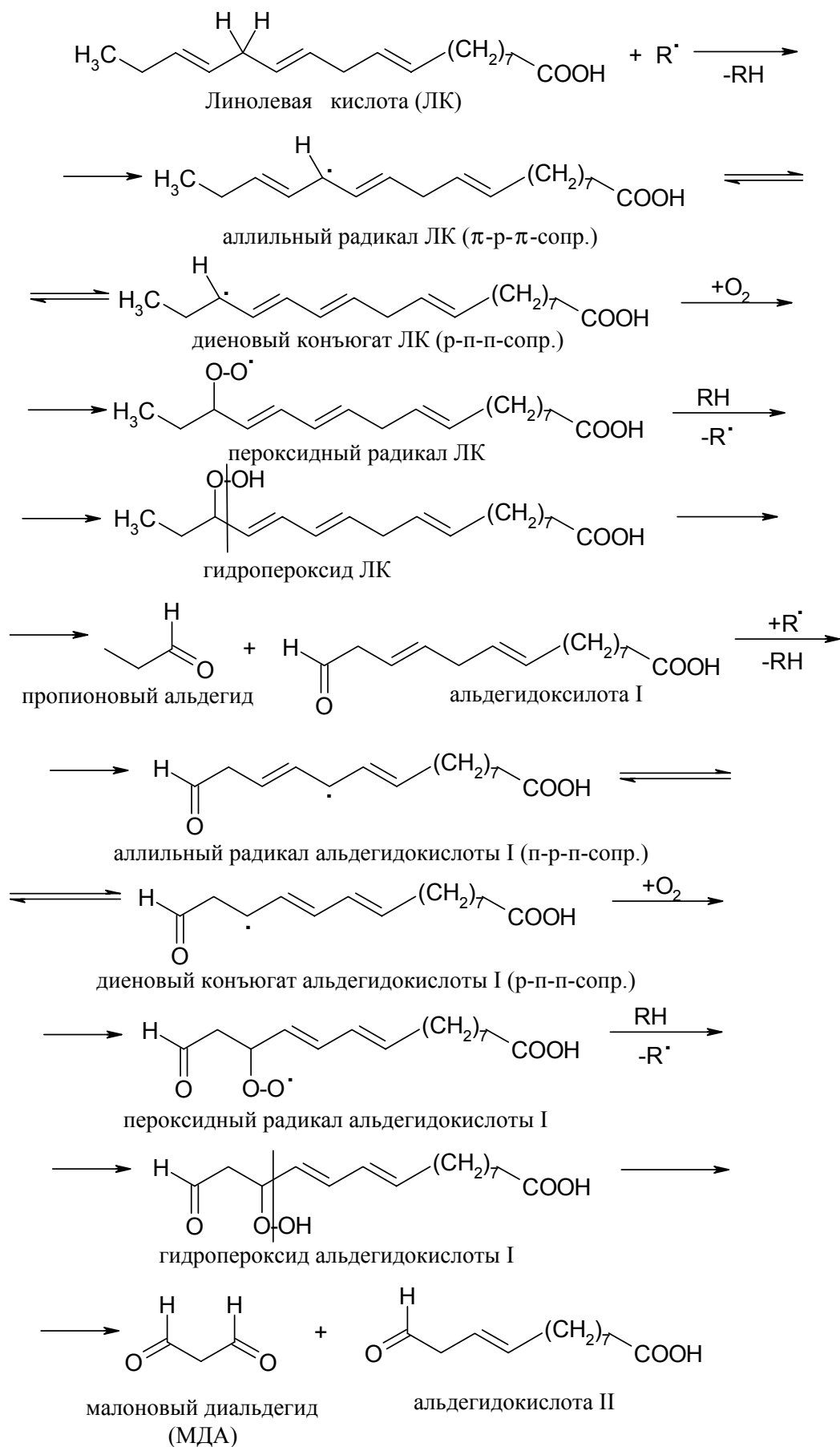
Если  $\text{O}_2^{\bullet-}$  не способен непосредственно инициировать процессы ПОЛ, реагируя с нативным липидом, то этим свойством обладает его протонированная форма - гидропероксидный радикал:



По современным представлениям липиды биологических мембран, в структуре которых в качестве обязательного компонента присутствуют полиненасыщенные жирные кислоты, являются более чувствительными к окислению описанного типа, чем белки, сахара или нуклеиновые кислоты. В случае липидов длина цепи свободно-радикальной цепной реакции является более протяженной, чем при аналогичном процессе для белков, углеводов или нуклеиновых кислот. Обусловлено это тем, что полиненасыщенные жирные кислоты в подавляющем большинстве случаев этерифицируют глицерольную часть фосфолипида в позиции sn-2. В результате становится возможным оптимальный перенос свободного радикала (точнее - свободной валентности) между «параллельно» расположенными бис-аллильными структурами жирнокислотных цепей в липидном бислое.

Образующиеся в качестве первичных продуктов диеновые гидропероксиды нестабильны и могут, подвергаясь вторичным реакциям, приводить к образованию эпоксидов, альдегидов, кетонов, спиртов и карбоновых кислот. Часто эти производные являются высоко токсичными. В конечном счете для самих биомембран описанный процесс ведет к структурной модификации их липидов. Однако такая модификация не ограничивается только убылью неокисленных и нарастанием гидроксигированных жирных кислот, а также увеличением количества относительно стабильных гидропероксидов (в отсутствие восстановленных ионов металлов переходной группы или  $\text{HO}_2^\bullet/\text{O}_2$ ). Среди продуктов окисления полиненасыщенных жирных кислот образуются такие биологически активные соединения как малоновый диальдегид и  $\alpha,\beta$ -ненасыщенные альдегиды (акролеин, 4-гидрокси-2-алкенали), а также  $\alpha$ -гидроксиальдегиды. Определение количеств образующихся диеновых конъюгатов, малонового диальдегида и других продуктов ПОЛ используется для оценки интенсивности процессов перекисного окисления в биологическом материале (липиды биомембран).

На примере окисления линолевой кислоты процесс окисления можно представить следующий последовательностью реакций:



Таким образом, окисление приводит к повреждению биомембран. Биологические последствия такого повреждения мембран для жизнедеятельности клетки следующие:

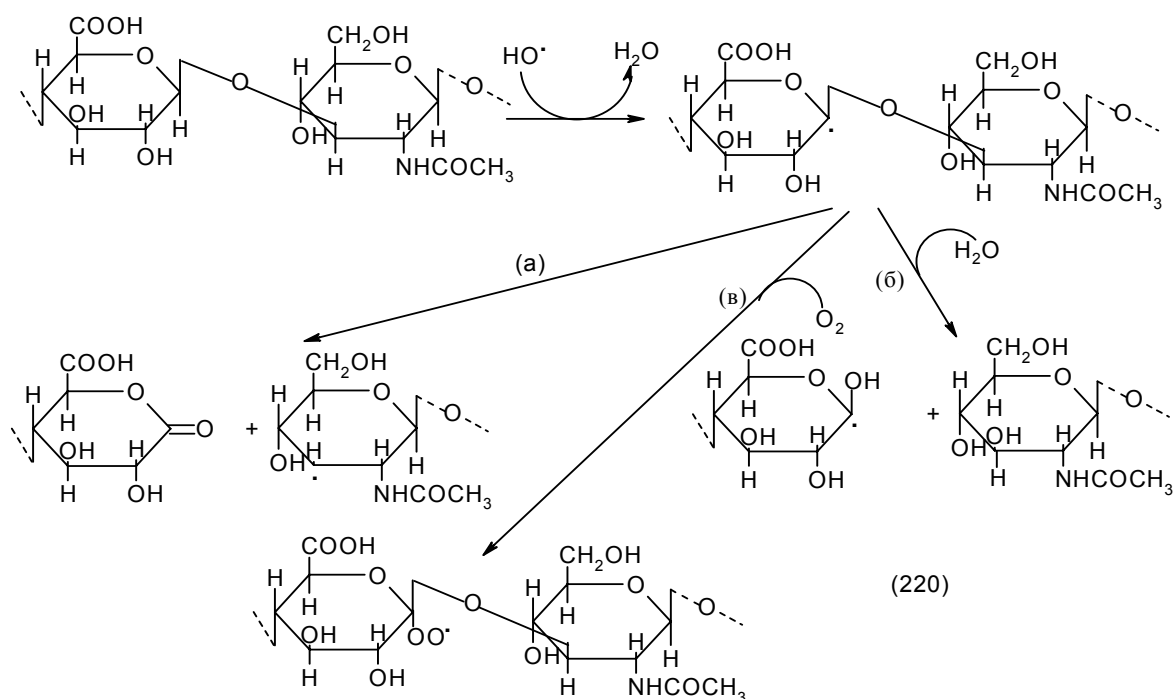
- *действие перекисного окисления на мембранные белки*: окисление SH-групп белков; повреждение переносчиков; появление проницаемости для ионов; повреждение транспортных АТФаз;
- *действие перекисного окисления на липидный слой мембран*: увеличение микровязкости мембран; изменение поверхностного заряда мембран и липопротеидов; уменьшение гидрофобного объема; увеличение полярности липидной фазы; увеличение проницаемости для ионов водорода и кальция.

Несмотря на то, что перекисное окисление приводит к деструктивным процессам в биологических мембранах, некоторое количество продуктов ПОЛ постоянно присутствует в мембранах клеток, и уровень их содержания связан с функциональным состоянием клетки. Следовательно, продукты ПОЛ являются обязательными структурными элементами клеточных мембран, количественное содержание которых находится под строгим контролем. Продукты ПОЛ оказывают влияние на фазовое состояние липидного бислоя, усиливают гидратацию поверхности клетки, модифицируют проводимость мембраны для ионов и малых молекул и др. В организме существует физиологический путь генерации пероксидов липидов, механизм которого принципиально отличается от выше описанного механизма самопроизвольных цепных реакций ПОЛ. "Санкционированно" продуцируемые гидро- и эндоперекиси липидов образуются в активных центрах специализированных для этой цели ферментов (циклооксигеназа и липоксигеназа). Структурно они строго стереоспецифичны и обладают важнейшими биологическими функциями.

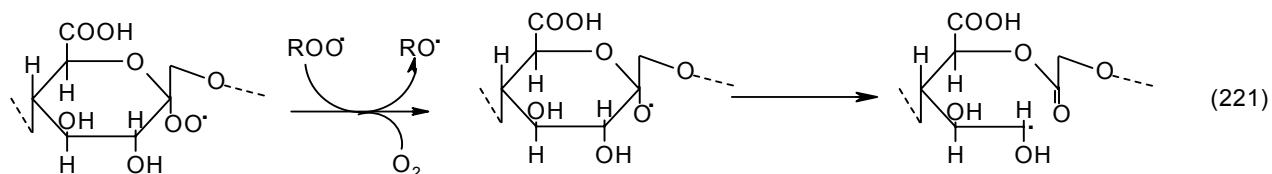
#### **4.5.4. Углеводы как мишень окислительной деструкции**

Наряду с белками, липидами и нуклеиновыми кислотами объектом окислительной деструкции в организмах выступают и углеводы.

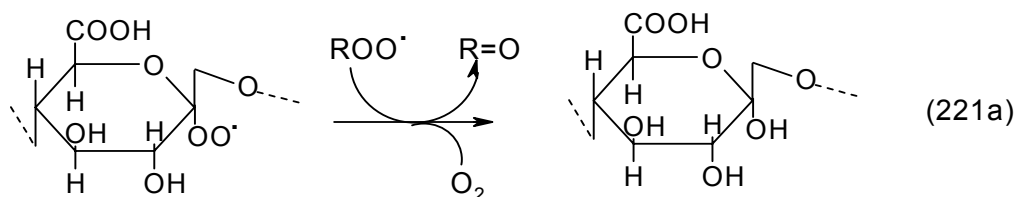
Окислительную деструкцию таких биополимеров рассмотрим на примере взаимодействия гидроксильного радикала с гиалуроновой кислотой. Окислительное расщепление гиалуроновой кислоты сопровождается разрывом гликозидной связи. Существует два механизма реализации такого процесса, заключающиеся в отрыве гидроксильным радикалом атома водорода у C<sub>1</sub>-углеродного атома, один из которых осуществляется по типу β-расщепления, а второй - через гидролитическую реакцию (соответственно, реакции (220а и б) - см. ниже). Реакция (220в) представляет собой первый этап предполагаемого механизма фрагментации гиалуроната для аэробных условий, где молекулярный кислород рекомбинирует (в качестве бирадикала) с радикалом на C<sub>1</sub>-углероде:



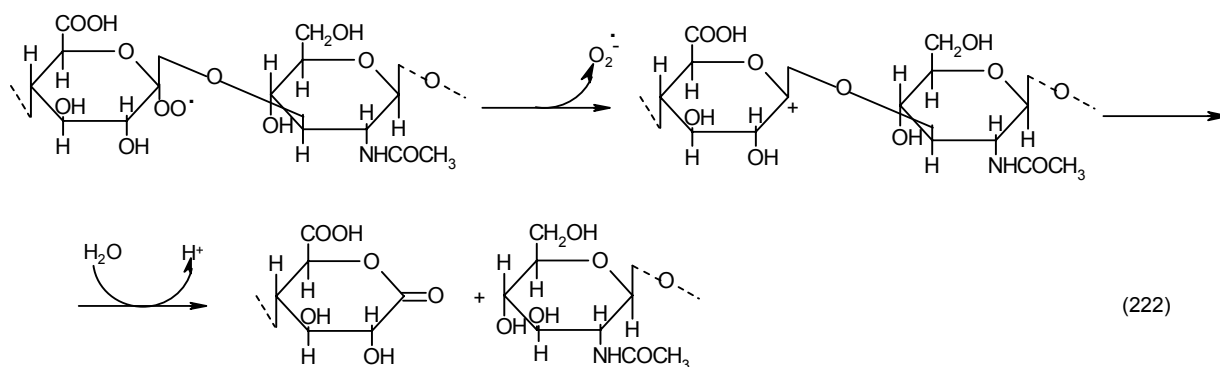
Образовавшийся пероксирадикал углевода (как промежуточный продукт цепи реакций аэробного разложения гликозидной связи (220a), (221) и (222)) способен взаимодействовать с другими пероксирадикалами, что ведет к отщеплению молекулярного кислорода с последующим разложением гетероцикла:



Диспропорционирование этих пероксидных радикалов может осуществляться и без образования высокоактивной алкоксильной радикальной группировки. Однако и в этом случае имеет место модификация (гидроксилирование) моносахаридного звена:



В рамках аэробного механизма существует возможность и непосредственного отщепления  $O_2^{\bullet-}$  от углеводного пероксирадикала, что ведет к образованию карбкатиона. Результатом последующего взаимодействия карбкатиона с  $H_2O$  является гидролитическое разложение гликозидной связи:



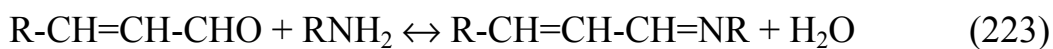
Таким образом, все основные полимерные структуры живых организмов вне зависимости от их химической природы являются удобной мишенью для активных производных кислорода. Под воздействием последних они подвергаются окислительной модификации и фрагментации с образованием чуждых живому организму соединений. Более того, среди продуктов окислительной модификации биологических молекул могут формироваться соединения, обладающие высокой химической активностью, что также благоприятствует усилению деструктивных процессов в клетках и тканях.

#### 4.6. Взаимодействие нативных и окисленных биоструктур

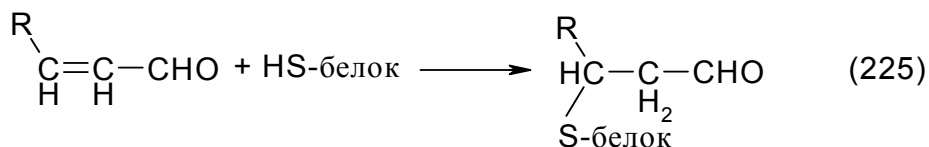
Продукты окислительной модификации биомолекул, будучи химически высоко активными агентами, способны реагировать с нативными структурами биомолекул. Молекулами-мишенями для таких агентов выступают биополимеры, в результате «повреждающих реакций» происходит ковалентное связывание реагентов. Образующиеся высокомолекулярные структуры являются чужеродными для организма и могут персестировать в нем более длительное время, чем низкомолекулярные.

Среди продуктов ПОЛ наиболее активными являются свободно-радикальные формы и альдегиды (в первую очередь -  $\alpha$ -гидроксиальдегиды и  $\alpha,\beta$ -ненасыщенные альдегиды). Поскольку в аэробных условиях свободнорадикальные формы липидов представлены в основном перокси(алки)льными радикалами (алкокси(алки)льными радикалами) - именно они (наряду с  $\text{HO}^\bullet$ ) и являются основными действующими агентами, поражающими преимущественно гидрофобные области мембранных белков и белков липопротеидов. По сути, белки способны включаться в цепи перекисного окисления (реакции (208)- (219)) с внесением особенностей, присущих этим молекулам.

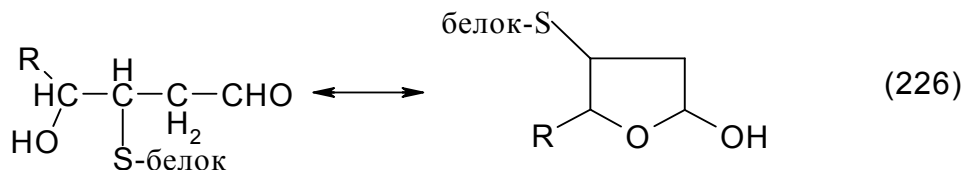
В случае альдегидов имеет место ковалентная сшивка между окислительно модифицированным липидом и белком по типу Шиффового основания, а в случае  $\alpha,\beta$ -ненасыщенного альдегида - еще и присоединение по двойной связи:



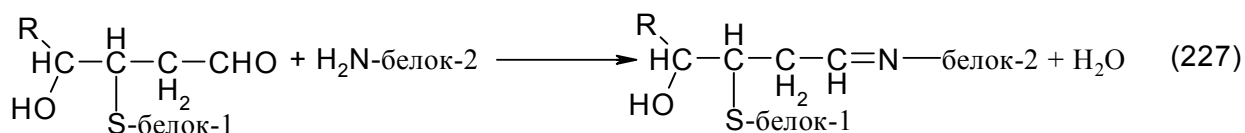
Наряду с конъюгацией продуктов ПОЛ с белками такого типа,  $\alpha,\beta$ -ненасыщенные альдегиды, а также 4-гидроксиалкенали способны модифицировать белки, образуя тиоэфирные аддукты:



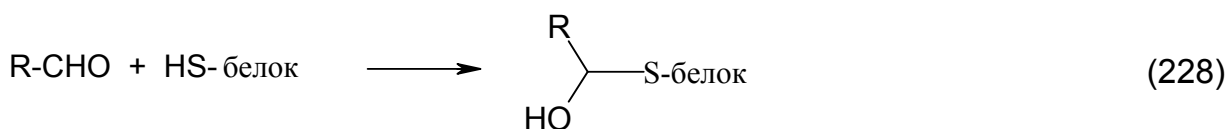
В случае 4-гидроксиалкеналей их тиоэфирные производные с белком подвергаются циклизации:



Поскольку данные продукты конъюгации белков с окисленными производными липидов сохраняют альдегидные группы, они формируют шивки со следующими молекулами белков:

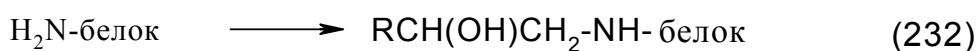
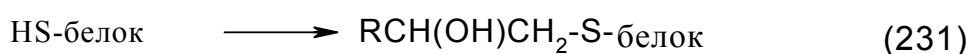
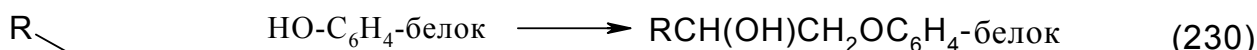
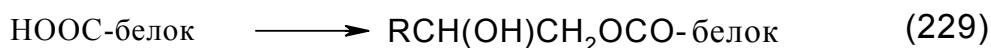


Объектом атаки альдегидов в белках выступают и непосредственно SH-группы. В этом случае конъюгация реагентов будет происходить по механизму образования полумеркапталей:



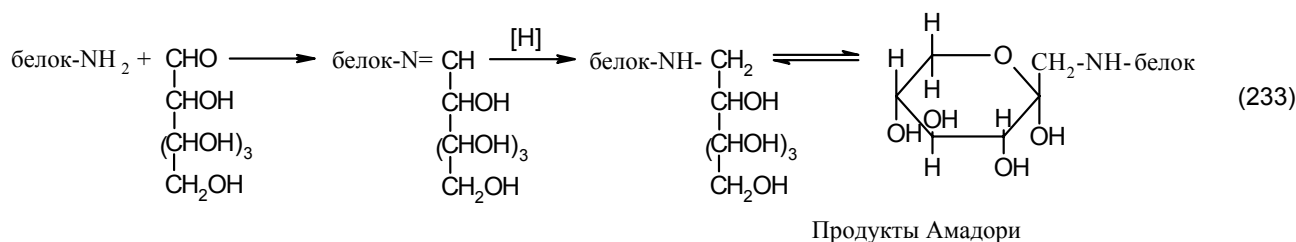
Аналогичные превращения наблюдаются для альдегидных производных и других молекул, подвергавшихся воздействию АФК.

Конъюгация продуктов ПОЛ с белками осуществляется и посредством эпоксидных производных ненасыщенных липидов (продуктов превращения нестабильных диеновых пероксидов):

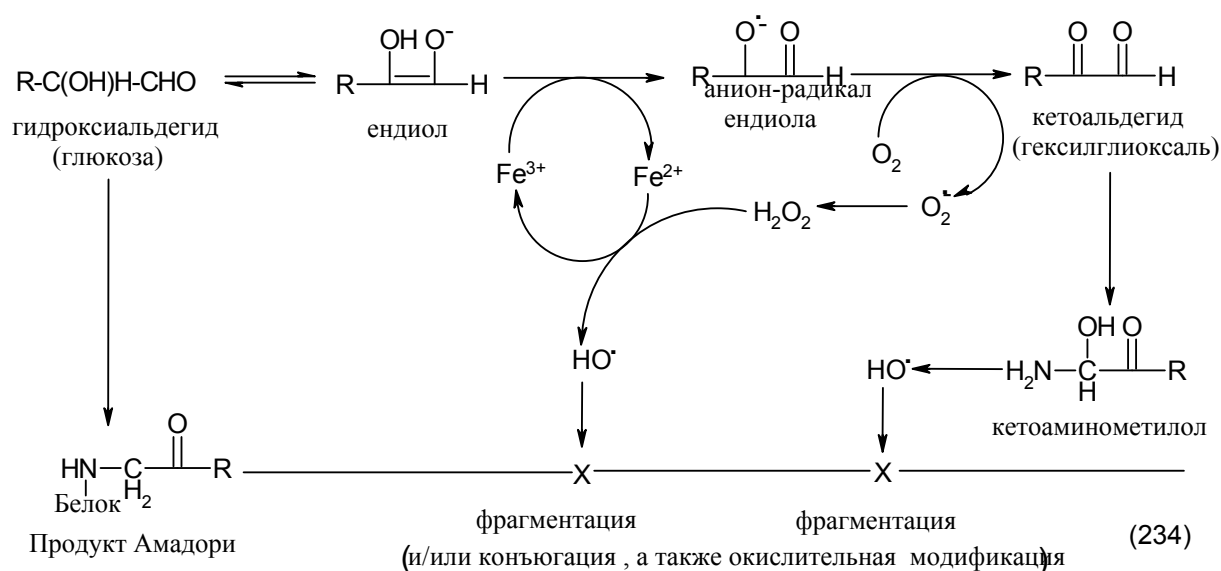


Эффективными модифицирующими агентами белков в присутствии АФК являются и углеводы. Результатом взаимодействия этих молекул с гидроксильным радикалом, как правило, является отрыв у них водорода с образованием свободного радикала:  $RH + HO^{\bullet} \rightarrow R^{\bullet} + H_2O$ . Эта реакция лежит в основе как окислительной деструкции моносахаридов, так и окислительной деполимеризации высокомолекулярных углеводов, в том числе и таких гетерополисахаридов как гиалуроновые кислоты и гепарин. Эта же реакция определяет и процесс окислительной фрагментации нуклеиновых кислот. Рекомбинация свободнорадикальных интермедиатов окисления углеводов и белков, а также взаимодействие этих форм с их нативными партнерами приводит к образованию ковалентных сшивок между такими молекулами.

Наиболее физиологически значимыми в плане повреждающего действия являются продукты окисления сахаров, в первую очередь - глюкозы. Реакции низкомолекулярных углеводов (таких как глюкоза, фруктоза, галактоза, манноза и др.) с  $HO^{\bullet}$  характеризуются сходными и очень высокими значениями констант скоростей ( $k = 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). Здесь необходимо отметить и следующее обстоятельство, связанное с повреждающим действием самой глюкозы при повышенных (патофизиологических) ее концентрациях. Как и другие альдозы и кетозы, этот сахар существует как в циклической полуацетальной (преимущественно), так и в карбонильной форме, способной образовывать Шиффовы основания с аминокруппами белков (и др. соединений):

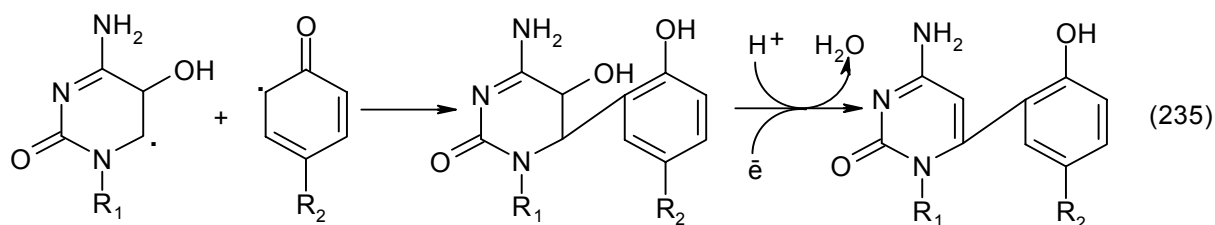


Неферментативное гликозилирование (гликирование) белков составляет одну из патогенетических основ такого заболевания как диабет. В аэробных условиях процесс гликирования идет более интенсивно и не ограничивается лишь конъюгацией сахара к белку. В присутствии ионов металлов переменной валентности глюкоза способна вызывать генерацию супероксидного и гидроксильного радикалов, а также фрагментацию белка-мишени. Предполагаемый механизм этого процесса:

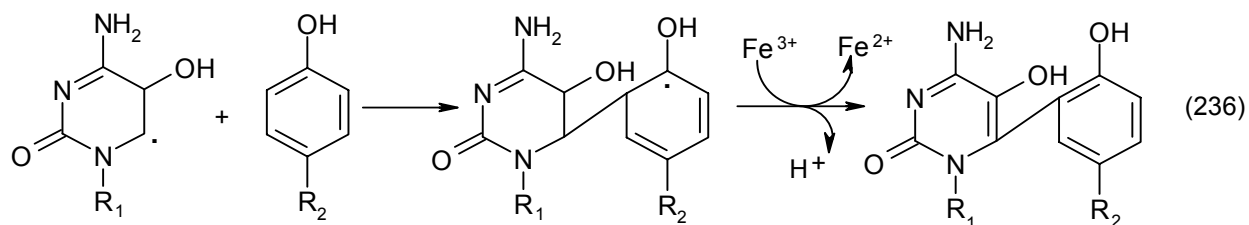


Существует вероятность образования в рамках этого механизма  $O_2^{\bullet-}$  а также анион-радикала эндиола, и при непосредственном взаимодействии молекулярного кислорода с енольной формой моносахарида (ендиолом).

Гидроксильный радикал способен инициировать образование ковалентных сшивок между белками и нуклеиновыми кислотами. В качестве иллюстрации формирования таких аддуктов рассмотрим взаимодействие между цитозином и тирозином. Механизм образования ковалентной связи между этими реагентами может осуществляться как в результате рекомбинации их свободнорадикальных форм (продуктов модификации  $HO^{\bullet}$  радикалом):



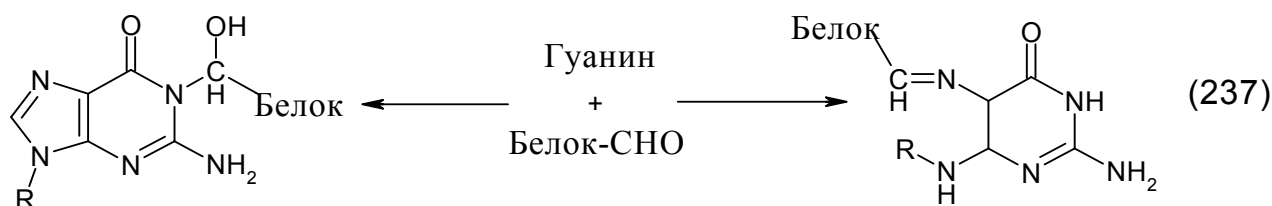
так и путем атаки радикала одного из партнеров нативной структуры другого:



Последний конъюгат (как и предпоследний в предыдущем примере), также подвергается спонтанной модификации с отщеплением молекулы  $H_2O$ . В связывании белков с ДНК могут принимать участие и карбонильные производные окислительно модифицированных аминокислотных остатков. Например, в случае гуанина, объектом атаки окисленной  $\epsilon$ -аминогруппы лизина (альде-



гида!) могут выступать как N<sub>7</sub>-, так и N<sub>1</sub> -атомы азота данного азотистого основания:



Продукты окисления аминокислотных остатков белков способны модифицировать ДНК и без ее конъюгации с белковыми молекулами. Например, такие метилированные аддукты ДНК как N<sub>7</sub>-метилгуанин и C<sub>8</sub>-метилгуанин являются продуктами взаимодействия этого азотистого основания с метильным радикалом. Последний образуется в результате окислительного разложения метионилсульфоксида под действием HO<sup>•</sup>.

Причиной образования нефизиологических аддуктов ДНК выступают и продукты окислительной деструкции липидов. Например, эпоксициклическая форма 4-гидрокси-2-ноненаля (жидкофазный продукт ПОЛ) формирует с адеином и гуанином, соответственно, 1,N<sub>6</sub>- и 1,N<sub>2</sub>-этинопроизводные.

Таким образом, неспецифическая окислительная модификация структуры биомолекул ведет к нарушению их целостности, возникновению деструктивных процессов. Специфическая же окислительная модификация структуры биомолекул является нормальным метаболическим процессом.

Суммируя всевышесказанное, свободнорадикальное окисление

В норме	При патологии
<ul style="list-style-type: none"> <li>• необходимое звено метаболизма, обеспечивающее нормальную жизнедеятельность;</li> <li>• модификация физико-химических свойств биологических мембран;</li> <li>• защитные функции, окисление ксенобиотиков, микробицидное действие;</li> <li>• обмен веществ, аккумуляция и трансформация энергии;</li> <li>• влияние на иммунитет, передачу информации.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• неспецифическая основа патогенеза различных заболеваний;</li> <li>• нарушение проницаемости, структуры, функции биомембран;</li> <li>• повреждение белков, липидов, нуклеиновых кислот;</li> <li>• нарушение биоэнергетики, регуляторных и защитных функций;</li> <li>• общетоксическое и канцерогенное действие.</li> </ul>

Поскольку окислительные реакции на клеточном уровне относятся к доминирующему типу самопроизвольных процессов, они находятся под строгим контролем, ограничивающим их развитие. Скорость окисления поддерживается на постоянном уровне сложной многоступенчатой системой регуляции:

## Регуляция свободно-радикального окисления

<i>Неспецифические факторы</i>	<i>Специфические факторы</i>
<ul style="list-style-type: none"><li>• механизмы, регулирующие количество и структуру субстратов окисления и их доступность;</li><li>• факторы, влияющие на инициаторы окисления, в частности на состояние металлов переменной валентности;</li><li>• физико-химические свойства биологических мембран;</li><li>• механизмы, поддерживающие низкое содержание кислорода в тканях;</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• ферменты, ответственные за образование и метаболизм активных форм кислорода (СОД, каталаза и др.);</li><li>• системы, утилизирующие пероксидные интермедиаты (глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, и др.);</li><li>• ловушки активных форм кислорода (метионин, гистамин и т.д, биоантиоксиданты (токоферол, убихинон, церулоплазмин и др.));</li></ul>

## 5. СИСТЕМА АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ ОРГАНИЗМА

Система антиоксидантной защиты является одной из важнейших в ряду систем, направленных на поддержание целостности организма и химического постоянства его внутренней среды<sup>14</sup>. Система эта включает различные молекулярные факторы, способные как предотвращать образование свободных радикалов и инициацию цепных реакций, так и ликвидировать уже образовавшиеся субстанции этой природы.

В составе первой группы факторов (см. табл. 4), препятствующих образованию активных производных кислорода, особое место принадлежит комплексу эндогенных соединений, обеспечивающих практическое отсутствие "свободных" ионов металлов переменной валентности в организме (биохелаторы), а также механизмам, стабилизирующим редокс-состояние связанных ионов металлов на должном восстановленном или окисленном уровне. Хотя по своему содержанию в организме ионы металлов в восстановленном состоянии и преобладают в составе биоккомплексов (в гемоглобине и миоглобине), однако окисленные их формы представлены более разнообразными металлорганическими соединениями (каталаза, геминные пероксидазы, цитохромы, трансферрин, лактоферрин, ферритины, супероксиддисмутаза и др.), что снижает возможность одноэлектронного восстановления молекулярного кислорода и пероксида водорода до соответствующих радикальных форм.

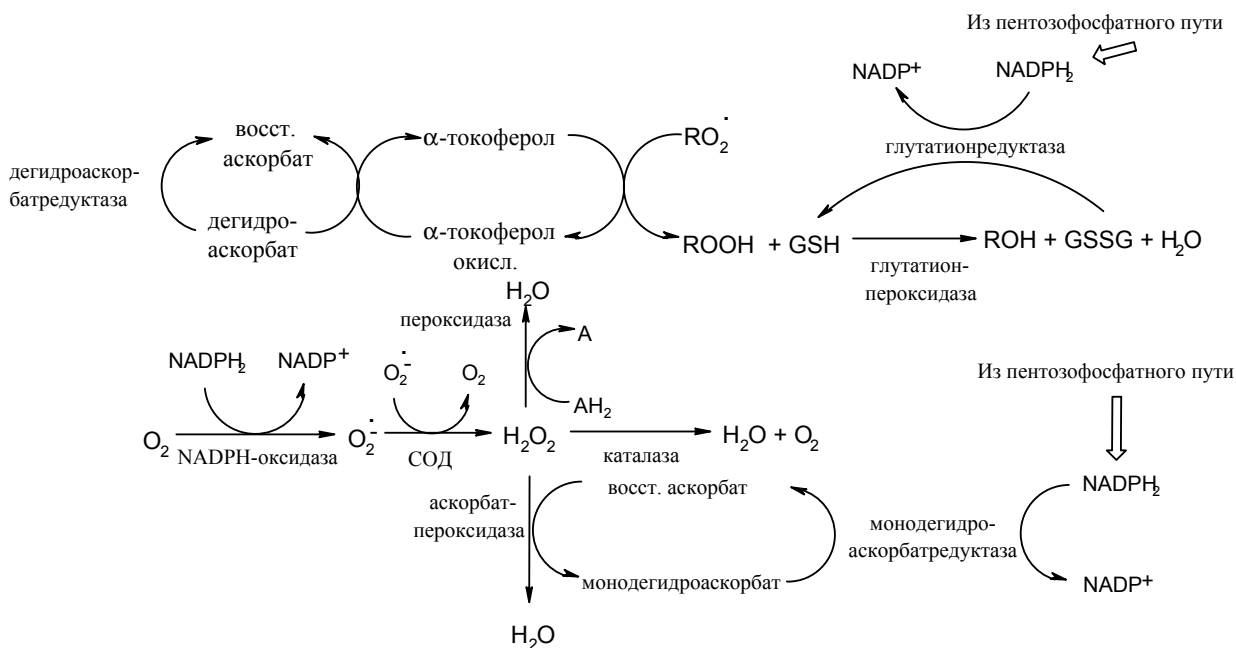
<sup>14</sup> Установлено, организм здорового взрослого человека за сутки прокачивает через легкие около 7200 л воздуха. Из этого объема безвозвратно изымается около 720 л O<sub>2</sub> на потребности основного обмена. Учитывая тот факт, что около 1-3% от потребляемого кислорода трансформируется в супероксидный радикал, годовая продукция этого токсиканта и родоначальника АФК (без учета специализированных механизмов их генерации) составляет около 2 кг. Причем в состоянии интенсивной физической нагрузки темп образования O<sub>2</sub><sup>•-</sup> в 20 раз выше, чем в состоянии покоя. Именно на нейтрализацию таких количеств O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, а также его более разрушительных производных и нацелена в первую очередь система антиоксидантной защиты.

Таблица 4. Эндогенные и экзогенные антиоксиданты

Антиоксидант	Действие
Церулоплазмин (плазма крови)	Окисляет $Fe^{2+}$ до $Fe^{3+}$ молекулярным кислородом
Апо-белок трансферрина (плазма крови)	Связывает $Fe^{3+}$
Ферритин (цитоплазма)	Окисляет $Fe^{2+}$ и депонирует $Fe^{3+}$
Карнозин	Связывает $Fe^{2+}$
Супероксиддисмутаза (повсеместно)	Удаляет супероксиданион-радикал с образованием пероксида водорода
Каталаза (внутри клеток)	Разлагает пероксид водорода с выделением кислорода
Глутатион-пероксидазы (в цитоплазме)	Удаляет пероксид водорода за счет окисления глутатиона Удаляет гидроперекиси липидов
Глутатионредуктаза	Восстанавливает окисленный глутатион
Фосфолипаза	Отщепление от фосфолипидов окисленных жирных кислот, содержащих гидропероксидные группы
Токоферол (вит. Е), тироксин, стероиды	Реагируют с радикалами липидов
Убихинон (коэнзим Q)	Реагирует с радикальными интермедиатами
Аскорбиновая кислота	Регенерирует, окисляющиеся токоферол и убихинон
Глутатион	Используется для восстановления пероксидов

Ко второй группе факторов относятся ферменты, детоксицирующие АФК (супероксиддисмутаза, каталаза и др.), а также неферментативные перехватчики свободной валентности, действующие либо в липидной фазе (токоферолы, каротиноиды, убихиноны), либо в водной среде (главным образом - это аскорбат и мочевая кислота). Эти молекулярные компоненты системы антиоксидантной защиты, выступающие "ликвидаторами" образовавшихся активных форм кислорода.

Схематически система антиоксидантной защиты (с участием ферментативных и неферментативных антиоксидантов) может быть представлена в следующем виде:

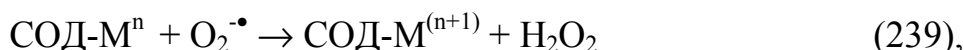
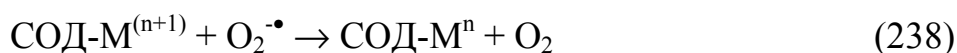


Рассмотрим действие антиоксидантов вне- и внутри клетки.

### 5.1. Антиоксиданты, преимущественно действующие на клеточном уровне

1) специализированный фермент – супероксиддисмутаза (СОД), катализирующая диспропорционирование (дисмутацию)  $O_2^{\bullet-}$ .

Действие СОД направлено на остановку развития первой стадии цепи реакций (67), предотвращения реакций (45), (46), (50) и (78), а также освобождения восстановленных ионов железа из состава биоккомплексов в живых организмах. Ферментативная реакция дисмутации протекает быстро и не зависит от рН в интервале 5.3-9.0 ( $k = 1.6 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) в отличие от спонтанной дисмутации  $O_2^{\bullet-}$  при физиологических значениях рН ( $k = 5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). Столь широкий рН-оптимум действия СОД свидетельствует о том, что в активном центре этого фермента реальным его субстратом выступает депротонированная форма супероксидного радикала (см. термодинамическую константу равновесия  $HO_2^{\bullet} \Leftrightarrow H^+ + O_2^{\bullet-}$ ):

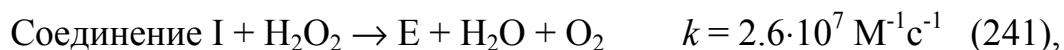
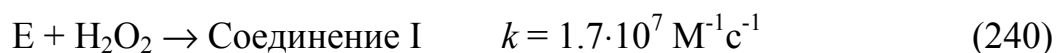


где М - ион металла переходной группы (медь, цинк, железо или марганец), находящийся в исходном редокс-состоянии фермента в высокой степени окисления.

В организме человека СОД представлена тремя вариантами, которые кодируются отдельными генами, локализованными в разных хромосомах. Во-первых, это димерный медь- и цинк-содержащий белок (Cu,Zn-СОД), локализуемый в цитозоле клеток и кодирующийся геном *sod1* (хромосома 21). Индуцибельный митохондриальный фермент, содержащий в активном центре марганец, является тетрамерным белком (Mn-СОД), чей ген (*sod2*) локализуется в хромосоме 6. По эффективности дисмутации супероксидного радикала Mn-СОД является в 1,5-2 раза менее активной, чем Cu,Zn-СОД, что обусловлено преимуществом меди перед марганцем в качестве редокс-катализатора. Наконец, еще одна форма фермента представлена экстрацеллюлярным тетрамерным медь-содержащим белком (ЕС-СОД), который кодируется геном *sod3* (хромосома 4). Поскольку ЕС-СОД обладает способностью связывать гепарин-сульфат, который, как известно, локализуется на плазматических мембранах клеток, предполагается, что этот фермент в основном реализует свою антиоксидантную функцию на клеточной поверхности. Тем более что в жидкофазном состоянии ЕС-СОД является значительно менее активным «ликвидатором» супероксидного радикала, чем две другие изоформы фермента.

2) *специализированный фермент – каталаза, катализирующая разложение пероксида водорода.*

Результатом реакции СОД с супероксиданионрадикалом является образование пероксида водорода (реакции (238), (239)), который ускоряет развитие окислительных реакций. Без соответствующего баланса между каталитическим разложением  $O_2^{\bullet -}$ , с одной стороны, и удалением  $H_2O_2$  - с другой имело бы место усиление процессов окислительной деструкции в клетках. Поэтому в клетках, вслед за дисмутацией супероксидных радикалов, удаление продукта данной реакции -  $H_2O_2$ , также осуществляется посредством каталитического механизма. Наиболее известным примером такого катализатора является пероксисомальный фермент - каталаза, действующий в соответствии со следующим двухстадийным механизмом:



где E - исходная ферри-форма фермента, Соединение I - его промежуточное редокс-состояние (обладающее двумя окислительными эквивалентами, "приобретенными" у первой молекулы пероксида водорода).

Среди ферментов каталаза является одним из наиболее активных: число ее оборотов -  $10^8/\text{мин}$ <sup>15</sup>. Эффективность действия этого фермента обеспечивается значительным снижением энергии активации разложения пероксида водорода: с 75 кДж/моль (для некаталитического процесса) до 23 кДж/моль (а для некоторых каталаз - даже до 6.3 кДж/моль).

<sup>15</sup> По сравнению с каталитическим разложением  $H_2O_2$  простыми гидратированными ионами  $Fe^{3+}$  скорость реакции диспропорционирования пероксида водорода с помощью каталазы возрастает почти в  $10^8$  раз.

Железосодержащие ферменты, использующие пероксид водорода в качестве субстрата-окислителя (для собственной трансформации в редокс-состояние Соединение I), в своей исходной ферри-форме обладают ионом этого металла, формально соответствующего той же степени окисления -  $Fe^{3+}$  (или более строго:  $Fe^{III}$ ). Структурная организация активного центра таких ферментов (каталазы и геминовых пероксидаз) обеспечивает возможность реализации механизма двухэлектронного переноса. Благодаря этому предотвращается возможность одноэлектронного восстановления молекулы  $H_2O_2$  с образованием гидроксильного радикала. Напротив, при наличии иона металла в низкой степени окисления (например, у гемоглобина) всегда существует риск образования такого радикала.

3) *глутатионовый цикл (глутатион, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза)*

Разложение  $H_2O_2$  осуществляется также и ферментативным редокс-циклом, компоненты которого представлены восстановленным глутатионом (GSH), глутатионпероксидазой (GPO: фермент негеминовой природы) и глутатионредуктазой (GR). Восстановительные эквиваленты для функционирования этого цикла (NADPH) генерирует пентозомонофосфатный путь. Процесс разложения  $H_2O_2$  этим редокс-циклом осуществляется следующим образом:



В отличие от каталазы, глутатионовый цикл специализирован для разложения низких концентраций пероксида<sup>16</sup>.

Глутатионпероксидаза представлена двумя вариантами: GPO и PHGPO. Первый из них является тетрамером и кодируется геном *grx1*, локализованном на хромосоме 3, а второй - это мономерный белок, ген которого (*grx4*) находится на хромосоме 19. В отличие от GPO, эффективно восстанавливающей гидропероксида жирных кислот лишь после их удаления из мембран клеток фосфолипазой  $A_2$ , PHGPO атакует преимущественно гидропероксиды фосфолипидов в составе клеточных мембран. Глутатионпероксидазы, наряду с АФК-нейтрализующей функцией, выполняют и жизненно важную роль в образовании ключевых биорегуляторов в организме: метаболитов арахидоновой кислоты. Липоксигеназный и циклооксигеназный пути превращения арахидоната ведут к продукции гидропероксиэйкозатетраеновых кислот, которые только с помощью указанных ферментов и могут быть редуцированы в процессе синтеза простагландинов, лейкотриенов и липоксина. Более того, нако-

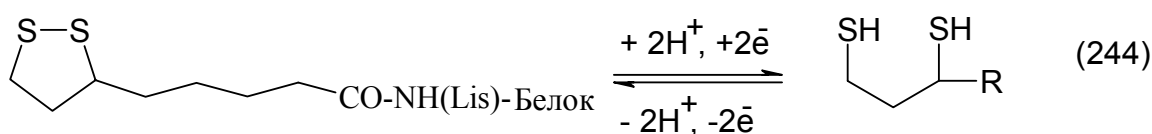
<sup>16</sup> В этих условиях каталаза использует окислительные эквиваленты  $H_2O_2$  преимущественно для пероксидазного катализа ( $k=10^3 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ ), проявляя цитотоксический эффект. То есть, при низких концентрациях пероксида водорода функция этого фермента может трансформироваться прямо на противоположную: из общепризнанной антиоксидантной в прооксидантную. Однако последнее вряд ли реализуется *in vivo*, так как действие каталазы в тканях ограничено лишь пероксисомами, то есть, органеллами, где и происходит основной вал продукции  $H_2O_2$  (около 45%) и которую необходимо нейтрализовать.)

пление таких липопероксидав нарушает регламентированный *in vivo* синтез простаглицлина и увеличивает накопление тромбосана, что усиливает агрегацию тромбоцитов и ведет к кардиоваскулярным осложнениям.

Глутатионовый редокс-цикл в первую очередь приспособлен для разложения органических гидропероксидов, в отношении которых каталаза является полностью неэффективной. В состав глутатион-зависимого звена системы антиоксидантной защиты часто включают и мультифункциональный фермент - глутатионтрансферазу, также способную разлагать гидропероксиды с помощью GSH.

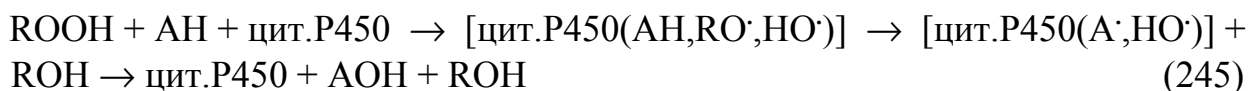
*Глутатион* (в норме стационарный уровень его восстановленной формы внутри клеток достигает достаточно высоких значений: 5-10 мМ). Антиоксидантное действие глутатиона ( $\gamma$ -L-Glu-L-Cys-Gly) ( $E_0 = -0.25$  В) обусловлено защитой SH-группы биомолекул от окисления и сохранения их в восстановленном состоянии. Высокая концентрация GSH, с одной стороны, и низкое значение его редокс-потенциала, с другой, свидетельствуют о достаточно высоких скоростях нейтрализации им окислителей даже в отсутствие катализаторов этого процесса в клетках. То есть этот трипептид как индивидуально, так и в составе ферментативных антиоксидантных редокс-циклов может выполнять *in vivo* функцию окислительно-восстановительного буфера.

Наряду с глутатионом (например, в липопротеидах низкой плотности) или вместо него аналогичную роль редокс-буфера, поддерживаемого восстановительными эквивалентами пиридиннуклеотида, способен выполнять и *дигидролипоат*. Его восстановительный потенциал хотя и ниже ( $E_0 = -0.30$ В), чем у глутатиона ( $E_0 = -0.25$  В), но все же он несколько выше, чем редокс-потенциал окислительно-восстановительной пары  $NAD(P)^+ / NAD(P)H$  ( $E_0 = -0.32$  В). Восстановительные свойства липоевой кислоты обусловлены наличием в ее окисленной форме напряжения в пятичленном кольце (+16 - +24 кДж/моль), "замыкающемся" при образовании дисульфидной связи:



Помимо выраженного антиоксидантного действия липоевая кислота, благодаря близкому расположению SH-групп друг к другу, способна эффективно связывать ионы тяжелых металлов и другие токсиканты, взаимодействующие с сульфидными группировками белков и иных биомолекул.

Разложение гидропероксидов (в мембранах эндоплазматического ретикулума) способен катализировать и терминальный компонент микросомальной электрон-транспортной гидроксилазной системы - цитохром P450. Как и для монооксигеназной функции, этому ферменту для осуществления в данном случае уже пероксидазного действия также требуется наличие донора водорода (NADPH или другого автооксидабельного субстрата - АН):



Напротив, в условиях дефицита доноров водорода цитохром P450 способен инициировать ROOH-зависимый процесс ПОЛ путем разложения гидропероксидов на гидроксильный и алкоксильный радикалы:



Данный процесс носит саморазрушительный характер, поскольку ведет не только к инициации ПОЛ, но и к деструкции самого фермента под воздействием генерируемых им радикалов (специфическую функцию предотвращения развития этого нежелательного цитохром P450-опосредованного процесса в микросомальных мембранах выполняет аскорбат). Семейство полисубстратных оксигеназ, известное под общим наименованием - цитохром P450, нацелено в первую очередь на детоксикацию природных и синтетических ксенобиотиков.

Реакции разложения  $\text{H}_2\text{O}_2$  и гидропероксидов (ROOH) в клетках организма четко скоординированы с нейтрализацией  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . В противном случае СОД инактивируется продуктом своего катализа - пероксидом водорода, разлагающегося с образованием гидроксильного радикала из-за акцепции "лишнего" электрона у восстановленного иона металла в активном центре фермента. В свою очередь, супероксидный радикал ингибирует каталазу, трансформируя ее в неактивные формы.

Среди селен-содержащих белков (в настоящее время их известно около 30) - катализаторов оксидоредуктазных реакций и потенциальных компонентов системы антиоксидантной защиты - наибольший интерес привлекает *тиоредоксинредуктаза* (TDR). Фермент этот, также как и GPO, разлагает пероксиды липидов и  $\text{H}_2\text{O}_2$ , причем, действуя, более эффективно, чем GPO. Однако основное внимание к этому белку вызвано его участием в редокс-регуляторных процессах.

В отличие от глутатионпероксидазы и TDR, содержащих в активном центре селен, селен-независимый фермент – *глутатион-S-трансфераза* (GST) разлагает лишь гидропероксиды, но не способна восстанавливать  $\text{H}_2\text{O}_2$ . GST представлена во всех эукариотических клетках большой группой свободных и мембраносвязанных детоксифицирующих ферментов, изоформы которых различаются по каталитическим свойствам. Изоформы GST цитозоля кодируются, по меньшей мере, пятью семействами генов:  $\alpha$ -,  $\mu$ -,  $\pi$ -,  $\sigma$ - и  $\tau$ -gst, тогда как мембраносвязанные ферменты (микросомальная GST и лейкотриен-C4-синтаза) кодируются отдельными несвязанными на одной хромосоме генами.

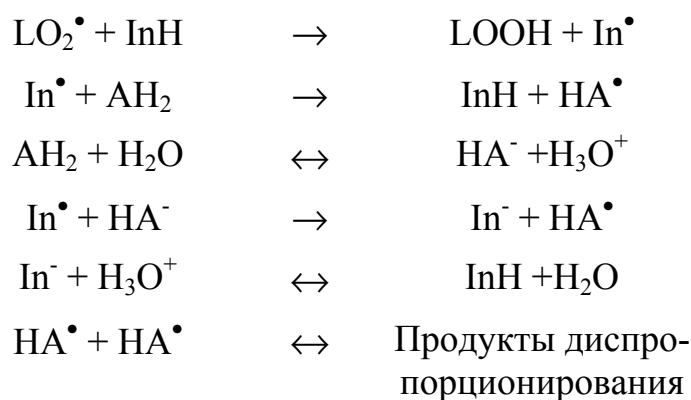
Уровень экспрессии GST является важнейшим условием в определении устойчивости клеток не только к АФК, но и к широкому спектру химических токсикантов различной химической природы. Поскольку система антиоксидантной защиты выступает в качестве лишь одного (хотя и важнейшего) из



элементов системы поддержания химического гомеостаза в организме, участие в ней GST отражает лишь частную сторону функциональной специализации этого фермента. В рамках антиоксидантной системы, наряду с гидропероксидами, этот фермент способен детоксифицировать и такие токсические продукты взаимодействия АФК с биоструктурами как эпоксиды и карбонилы в первую очередь - альдегидные производные.

Специфические ферменты для ликвидации более токсичных АФК, чем  $O_2^{\bullet}$  и  $H_2O_2$ , а именно:  $HO^{\bullet}$ ,  $RO^{\bullet}$ , гипохлорита и ряда других пока не известны. Эту роль выполняют низкомолекулярные соединения: аскорбат, токоферолы, каротиноиды, убихинон (коэнзим Q).

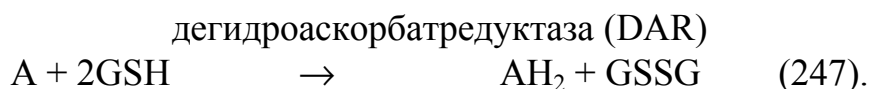
Механизм ингибирующего действия акцепторов свободных радикалов (InH) в окисляющихся липидах (LH) подобен таковому в окисляющихся углеводородах и включает следующие реакции (AH<sub>2</sub> - аскорбиновая кислота)



Стехиометрический коэффициент ингибирования антиоксидантов ( $f$ ) и их вклад в торможение окисления в плазме распределяются следующим образом:

$\alpha$ -Токоферол	Аскорбиновая кислота	Мочевая кислота	Протеинтиолы
$f = 2.0$	$f = 1.7$	$f = 1.3$	$f = 0.3$
7 %	14 %	58 %	21 %

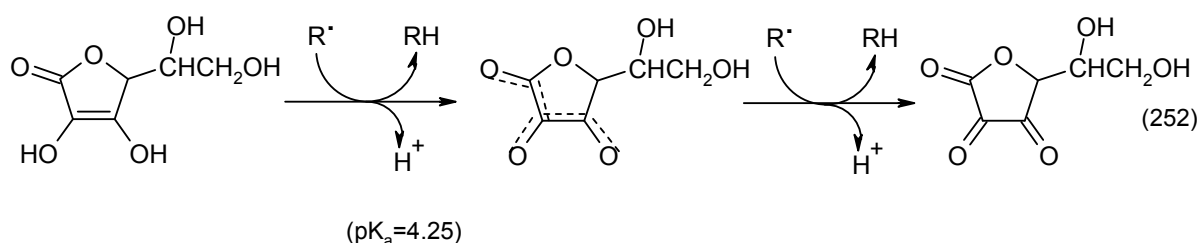
В последние годы стали накапливаться сведения, прямо указывающие на участие низкомолекулярных антиоксидантов в деятельности ферментных систем, нацеленных на решение задач антиоксидантной защиты. Аналогично глутатиону такие антиоксиданты могут выступать в качестве редокс-кофакторов ферментативных окислительно-восстановительных циклов. Например, функцию нейтрализации  $HO^{\bullet}$  и гипохлорита, а также  $O_2^{\bullet}$ ,  $HO_2^{\bullet}$  и тильного радикала может осуществлять дегидроаскорбатредуктазный редокс-цикл, использующий для регенерации расходуемого аскорбата восстановительные эквиваленты глутатиона:



Процесс взаимодействия аскорбата ( $\text{AH}_2$ ) с радикальными формами АФК можно продемонстрировать на примере его реакций с  $\text{O}_2^{\bullet-}$  и  $\text{HO}^{\bullet}$ :

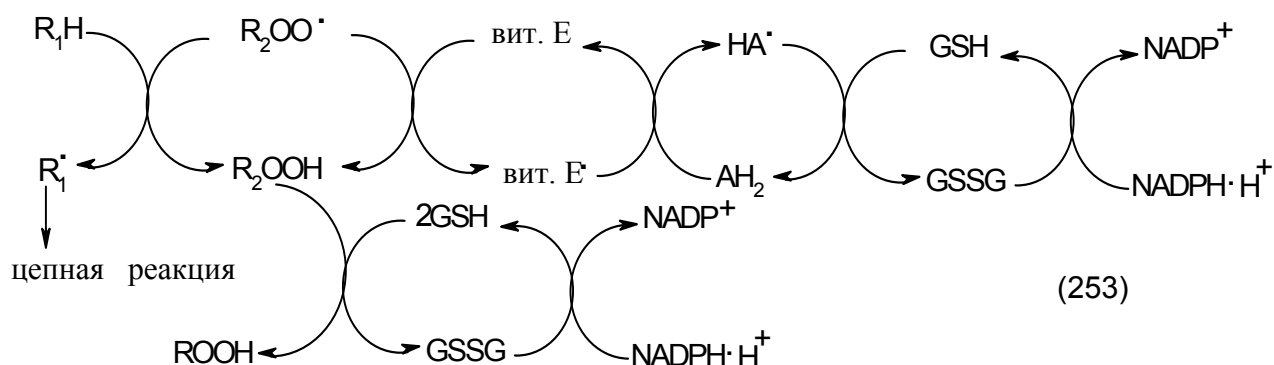


Стабилизация органического свободного радикала в форме  $\text{HA}^{\bullet}$  (семидегидроаскорбата) обеспечивается делокализацией свободной валентности в его структуре между тремя атомами кислорода:

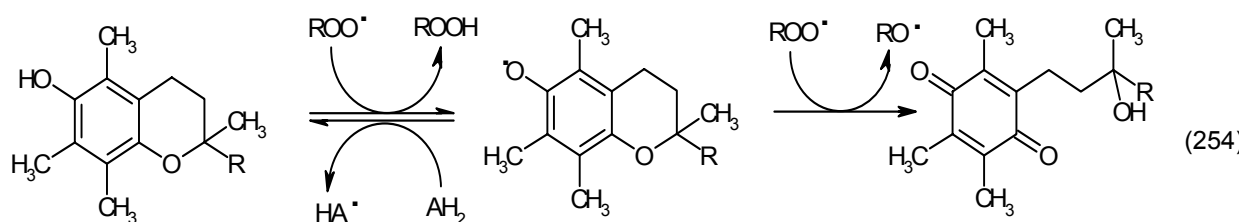


Редокс-потенциал у витамина С для двухэлектронного переноса (редокс-пара дегидроаскорбат/аскорбат ( $\text{A}/\text{AH}_2$ )) составляет +0.058В при рН7, что почти в пять раз ниже, чем аналогичный параметр для указанного ранее одноэлектронного процесса.

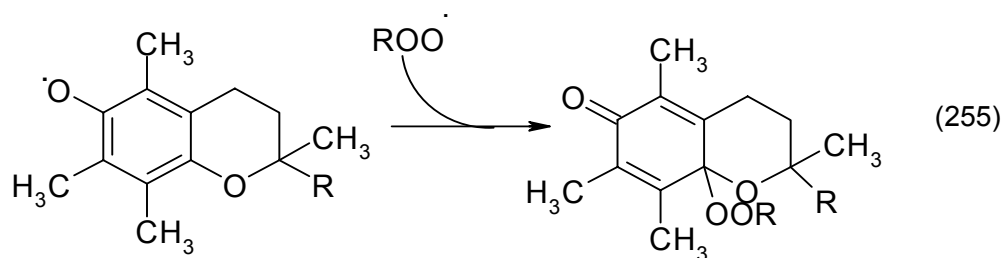
Восстановительные эквиваленты аскорбата могут использоваться не только для ликвидации окислителей, но и для регенерации токоферола (синергизм). Последний расходуется на нейтрализацию органических радикалов, образующихся в процессе ПОЛ. В этом случае токоферол, локализующийся в мембранах клеток, при посредничестве цитозольного аскорбата кооперирует с GPO для восстановления («репарации») продуктов ПОЛ (где вит.  $\text{E}^{\bullet}$  - токоферильный радикал):



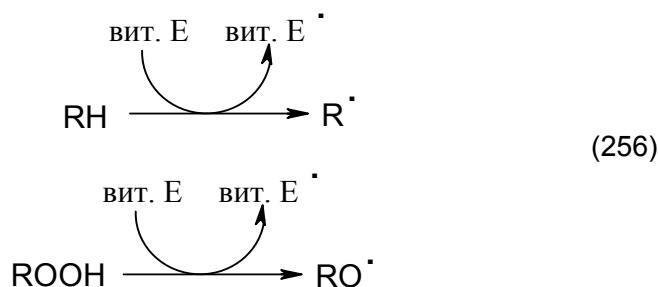
Редокс-взаимодействие аскорбата с токоферолом позволяет предотвратить как необратимую окислительную деградацию последнего из-за расщепления гетероцикла с образованием токоферильного хинона:



димеризацию токоферильного радикала или его рекомбинацию с другими органическими радикалами:



так и прооксидантный эффект токоферильного радикала в отношении полиненасыщенных жирных кислот ( $E_0$  вит.  $E^\bullet$ /вит.  $E=+0.8V$ , что превышает значение редокс-потенциала аллильной пары  $R^\bullet/RH$ , равной примерно  $+0.6V$ ):



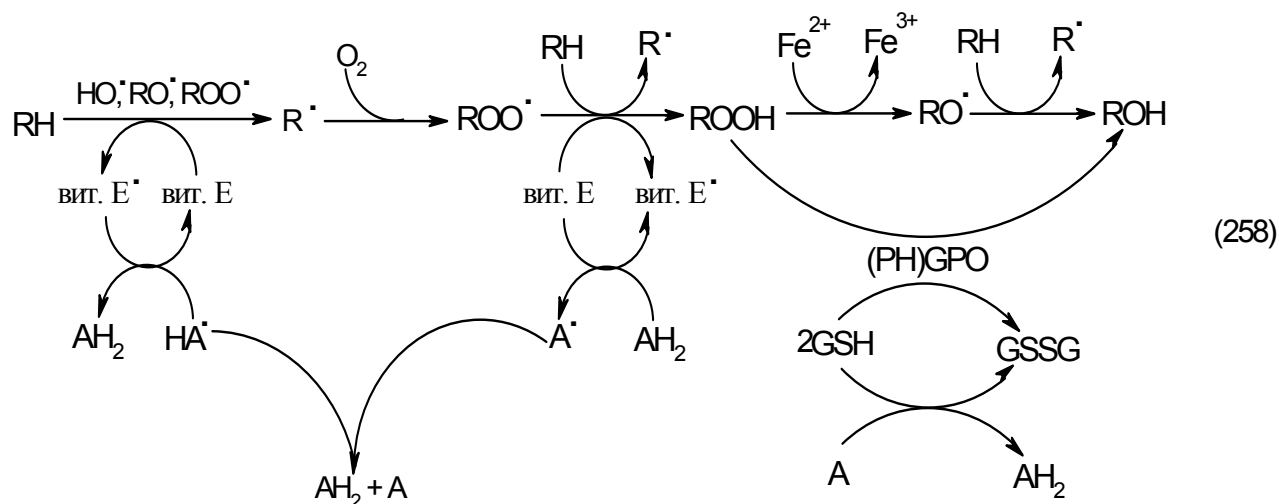
Прооксидантный эффект витамина E через образование токоферильного радикала могут инициировать и ионы металлов переменной валентности. Причем в качестве таких инициаторов способны выступать и ионы меди, уступающие по своей окислительной способности ( $E_0=+0.15V$ ) ионам железа ( $E_0=+0.77V$ ):



Однако в мембранах клеток восстановление токоферильного радикала в витамин E осуществляется преимущественно более мембранотропной субстанцией - убихиноном. По своей эффективности регенерировать токоферол этот важный элемент электронтранспортных цепей клеточных мембран не уступает аскорбату: константы скоростей обеих реакций восстановления радикалов витамина  $E^\bullet$  близки и составляют величину порядка  $2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ .

Наряду с токоферолами в качестве терминального перехватчика свободных радикалов в мембранах клеток способны выступать и каротиноиды, в частности ретинолы (витамины группы А), предшественником которых, как известно, и выступает  $\beta$ -каротин.

Таким образом, кооперация низкомолекулярных антиоксидантов (а также ферментативных редокс-циклов, в рамках которых они могут функционировать), во многом несет регламентированный характер по отношению к объекту их воздействия. Проиллюстрировать это можно на следующем примере (развития цепи процессов ПОЛ):



В качестве потенциальных молекул-антиоксидантов, преимущественно действующих в мышечных тканях, рассматривается группа необычных в структурном отношении дипептидов, представленных карнозином ( $\beta$ -аланил-L-гистидин), гомокарнозином ( $\gamma$ -аминобутирил-L-гистидин) и ансеринем ( $\beta$ -аланил-1-метил-L-гистидин). Антиоксидантный эффект этих эндогенных субстанций обусловлен гистидиновым остатком. В свободном виде эта аминокислота является перехватчиком  $\text{HO}^\bullet$ -радикалов и одним из наиболее эффективных «гасителей» синглетного кислорода. Однако указанные пептиды - карнозин и ансерин, а также гомокарнозин - обладают очень слабой  $\text{O}_2^{\bullet-}$ -нейтрализующей активностью ( $k < 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ ). Еще более незначительным является их взаимодействие с  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $k < 10 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ ). Неэффективными они оказались и в отношении нейтрализации гипохлорита. Высокие же константы скоростей реакций этих пептидов с гидроксильным радикалом (соответственно:  $4 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ ,  $5.2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$  и  $2.6 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ ) по порядку значений соответствуют константам взаимодействия  $\text{HO}^\bullet$  с другими органическими молекулами и отражают лишь реакционную способность самого радикала.

## 5.2. Антиоксиданты, действующие во внеклеточной среде

Плазма крови млекопитающих также обладает антиоксидантными свойствами. Только 10-15% антиоксидантной активности обеспечивается высоко-

молекулярной (белковой) областью. Основной же вклад в реализацию антиоксидантного действия вносят низкомолекулярные компоненты. В качестве белков-антиоксидантов в плазме крови выступают альбумин, церулоплазмин, трансферрин, ферритин, гаптоглобин и гемопексин.

Альбумин не только способен ассоциировать ионы металлов (например, около 5% меди в плазме крови связано с этим белком), но и благодаря чрезвычайно высокой концентрации в крови, он является неспецифическим перехватчиком различных АФК. Основные же функции ферритина (действующего и в клетках, но секретируемого макрофагами в форме кислых изоферритинов), гемопексина и гаптоглобина в системе антиоксидантной защиты - это связывание, соответственно, свободных ионов железа, железопорфириновых комплексов и свободного гемоглобина в плазме крови из разрушенных эритроцитов.

В перечень антиоксидантных белков могут быть включены и металло-тионеины - белки, обладающие низкой молекулярной массой (6-10 кДа) и высоким аффинитетом к тяжелым металлам и металлам переходной группы (Ag~Hg>Cu>Cd>Zn;  $K=10^{-24}$  М для Cu,  $K=10^{-22}$  М для Cd и  $K=10^{-18}$  М для Zn). Низкая концентрация этих белков в биологических жидкостях (для металло-тионеина – 0.01-1.0 нг/мл плазмы крови) полностью компенсируется их высоким сродством к ионам металлов.

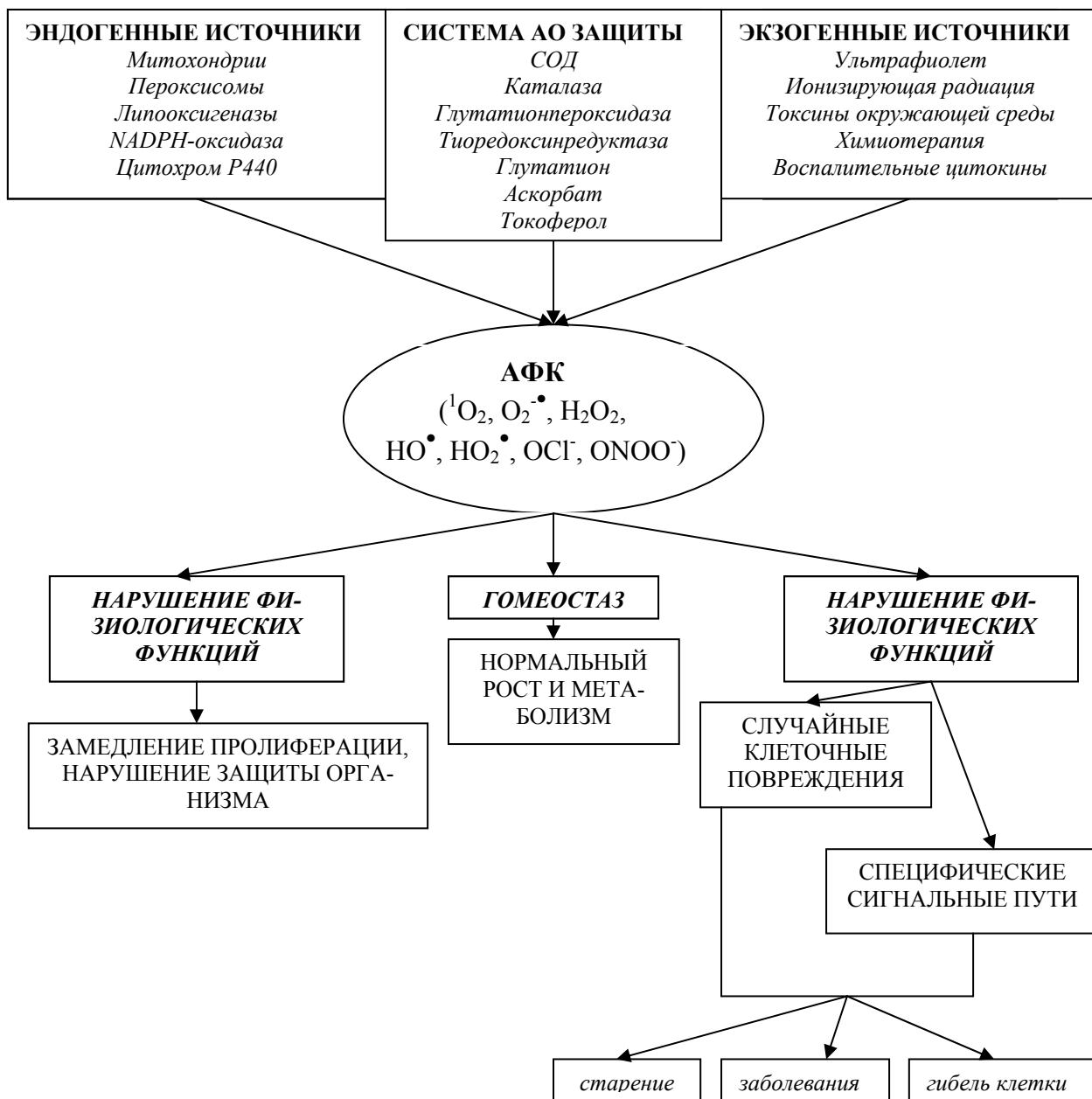
Низкомолекулярные антиоксиданты плазмы крови представлены следующими соединениями: мочевая кислота, аскорбат,  $\alpha$ -токоферол. У человека в плазме крови концентрация урата как конечного продукта метаболизма пуринов, в норме может достигать очень больших значений: до 0.6 мМ (в среднем же она колеблется в интервале 0.25 – 0.45 мМ). Таким образом, среднее содержание мочевой кислоты в плазме крови человека превышает количество аскорбата в 5-10 раз. Среди этих трех ключевых низкомолекулярных антиоксидантов в организме человека лишь мочевая кислота имеет внутреннее происхождение.  $\alpha$ -Токоферол (а также его 8 других минорных вариантов), локализующийся преимущественно в липопротеиновой фракции плазмы крови, синтезируется исключительно лишь в растительных клетках.

Антиоксидантная активность урата связана с нейтрализацией синглетного кислорода,  $\text{НО}^\bullet$  и пероксидных радикалов, а также способностью формировать стабильные комплексы с ионами железа. Константы ассоциации ( $K_a$ ) эквимольных комплексов урат- $\text{Fe}^{3+}$  и урат- $\text{Fe}^{2+}$  равны, соответственно,  $2.4 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$  и  $1.9 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ .

По антиоксидантной активности в плазме крови низкомолекулярные ингибиторы окисления располагаются в следующем ряду: аскорбат = тиолы > биллирубин > мочевая кислота > токоферол.

### Заключение

Таким образом, суммируя все вышесказанное, образование АФК и их влияние на процессы жизнедеятельности можно представить в виде схемы



## Рекомендуемая литература

### Основная литература:

1. Денисов Е. Т., Саркисов О. М., Лихтенштейн Г.И. Химическая кинетика. - М.: Химия, 2000. - 568с.
2. Азатян В. В., Денисов Е. Т. Ингибирование цепных реакций. - Черноголовка: ИХФ РАН, 1997. - 267с.
3. Владимиров Ю.А., Азизова О.А., Деев А.И., Козлов А.В., Осипов А.Н., Рощупкин Д.И. Свободные радикалы в живых системах. - Итоги Науки и Техники, серия Биофизика. - 1992. -Т.29. - С. 3-250.
4. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. - М.: Наука, 1972. - 252с.
5. Денисов Е. Т., Ковалев Г. И. Окисление и стабилизация реактивных топлив. - М.: Химия, 1983. - 270с.
6. Арчаков А.И. Микросомальное окисление. - М.: Наука, 1975. - 328с.
7. Рогинский В. А. Фенольные антиоксиданты. Реакционная способность и эффективность. - М.: Наука, 1988. - 248с.
8. Янковский О.Ю. Токсичность кислорода и биологические системы (эволюционные, экологические и медико-биологические аспекты). - Санкт-Петербург: Игра, 2000. - 294с.

### Дополнительная литература:

1. Уоллинг Ч. Свободные радикалы в растворе. - М.: ИИЛ, 1960.
2. Нонхибел Д., Уолтон. Д. Химия свободных радикалов. - М.: Мир, 1977. - 606с.
3. Бучаченко А. Х., Вассерман А. М. Стабильные радикалы. Электронное строение, реакционная способность и применение. - М.: Химия, 1973. - 408 с.
4. Пармон В. Н., Кокорин А. И., Жидомиров Г. М. Стабильные бирадикалы. - М.: Наука, 1980. -240с.
5. Alfassi Z. E. General Aspects of the Chemistry of Radicals. - New York: Wiley, 1999. - 175p.
6. Денисов Е. Т. Константы скорости гомолитических жидкофазных реакций. - М.: Наука, 1971. - 711с.
7. Сталл Д., Вестрам Э., Зинке Г. Химическая термодинамика органических соединений. - М.: Мир, 1971. - 807с.
8. Справочник. Энергии разрыва химических связей. Потенциалы ионизации и сродство к электрону. - М.: Наука, 1974. - 351с.
9. Семенов Н. Н. Цепные реакции. - М.: Наука, 1986. - 535с.
10. Эмануэль Н. М., Кнорре Д. Г. Курс химической кинетики. - М.: Высшая школа, 1984. - 463с.
11. Денисов Е. Т. Кинетика гомогенных химических реакций. - М.: Высшая школа, 1988. - 391с.
12. Эмануэль Н. М., Лясковская Ю. Н. Торможение процессов окисления жиров. - М.:Пищепромиздат, 1961. - 358с.

13. Эмануэль Н. М., Денисов Е. Т., Майзус З. К. Цепные реакции окисления углеводородов в жидкой фазе. - М.: Наука, 1965. - 375с.
14. Landberg W. O. Autooxidation and Antioxidants. - New York: Interscience, 1962. - Vol. 1, 2.
15. Scott G. Atmospheric Oxidation and Antioxidants. - Amsterdam.: Elsevier, 1993. - Vol. 1-3.
16. Эмануэль Н. М., Заиков Г. Е., Майзус З. К. Роль среды в радикально-цепных реакциях окисления органических соединений. - М.: Наука, 1973. - 297с.