

ЛУЧШИЙ ЗАРУБЕЖНЫЙ УЧЕБНИК



И. Бертини, Г. Грей
Э. Стифель
Дж. Валентине

БИОЛОГИЧЕСКАЯ НЕОРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

СТРУКТУРА И РЕАКЦИОННАЯ
СПОСОБНОСТЬ

2



БИНОМ

БИОЛОГИЧЕСКАЯ
НЕОРГАНИЧЕСКАЯ
ХИМИЯ

Biological Inorganic Chemistry

Structure and Reactivity

Ivano Bertini

University of Florence

Harry B. Gray

California Institute of Technology

Edward I. Stiefel

Princeton University

Joan Selverstone Valentine

UCLA



UNIVERSITY SCIENCE BOOKS
Sausalito, California

Оглавление

XI.	Метаболизм кислорода	5
XI.1.	Реакционная способность и токсичность кислорода	5
XI.1.1.	Введение	5
XI.1.2.	Химия диоксида	6
XI.1.2.1.	Термодинамика	6
XI.1.2.2.	Кинетика	8
XI.1.2.3.	Свободнорадикальное автоокисление	10
XI.1.2.4.	Каким образом ферменты преодолевают кинетические барьеры?	12
XI.1.3.	Токсичность диоксида	12
XI.1.3.1.	Введение	12
XI.1.3.2.	Образование реакционноспособных активных метаболитов кислорода <i>in vivo</i> .	13
XI.1.3.3.	Низкомолекулярные антиоксиданты	14
XI.1.3.4.	Окислительное повреждение биологических молекул.	16
XI.1.3.5.	Связь между биохимией оксида азота и молекулярного кислорода	20
Литература		20
XI.2.	Супероксиддисмутазы и супероксидредуктазы.	21
XI.2.1.	Введение	21
XI.2.2.	Химия супероксида	22
XI.2.3.	Механизм действия супероксиддисмутазы и супероксидредуктазы.	24
XI.2.3.1.	Окисление супероксида с образованием молекулярного кислорода.	24
XI.2.3.2.	Восстановление супероксида с образованием пероксида водорода.	24
XI.2.4.	Ферменты супероксиддисмутазы и супероксидредуктазы	26
XI.2.4.1.	Медь/цинк-зависимая супероксиддисмутаза	26
XI.2.4.2.	Марганец-зависимая супероксиддисмутаза и железо-зависимая супероксиддисмутаза	30
XI.2.4.3.	Никель-зависимая супероксиддисмутаза	32
XI.2.4.4.	Супероксидредуктаза	33
Литература		34

XI.3. Пероксидаза и каталазы.	35
XI.3.1. Введение	35
XI.3.2. Общая структура	37
XI.3.3. Структура активного центра	38
XI.3.4. Механизм	40
XI.3.5. Восстановление соединений I и II	43
Литература	48
XI.4. Переносчики диоксида.	50
XI.4.1. Введение: биологическая система транспорта диоксида	50
XI.4.2. Термодинамические и кинетические аспекты транспорта диоксида	51
XI.4.2.1. Термодинамические аспекты связывания диоксида	53
XI.4.2.2. Кинетические аспекты связывания молекулярного кислорода	55
XI.4.3. Кооперативный эффект и транспорт диоксида	56
XI.4.3.1. Некооперативное связывание диоксида	56
XI.4.3.2. Кооперативное связывание диоксида	56
XI.4.3.3. Физиологические выгоды кооперативного связывания кислорода	58
XI.4.3.4. Модель кооперативного эффекта Моно–Уаймена–Шанжэ.	59
XI.4.4. Биологические переносчики диоксида	60
XI.4.4.1. Семейство гемоглобинов	60
XI.4.4.2. Семейство гемоцианинов	68
XI.4.4.3. Семейство гемэритринов	70
XI.4.5. Белковый контроль химии молекулярного кислорода, железа, меди и кобальта	74
XI.4.5.1. Роль белка в защите фрагмента $M-O_2$.	74
XI.4.5.2. Модулирование сродства к лиганду при помощи белка	77
XI.4.6. Структурное обоснование сродства к лигандам для переносчиков кислорода	84
XI.4.6.1. Избирательность связывания молекулярного кислорода и монооксида углерода с миоглобинами	85
XI.4.6.2. Структурное обоснование очень высокого сродства к молекулярному кислороду	90
XI.4.6.3. Структурное обоснование кооперативного связывания лигандов в гемоглобинах млекопитающих	91
XI.4.7. Заключение	95
XI.4.7.1. Будущее модельных систем	95
XI.4.7.2. Осталось ли что-то неясное в механизме биологического транспорта и накопления кислорода?	95
Литература	96

XI.5. Ферменты, активирующие молекулярный кислород	100
XI.5.1. Введение: превращение переносчиков в активаторы	100
XI.5.1.1. Цитохром P450: парадигма гема	101
XI.5.1.2. Моноксигеназы с биядерными активными центрами	109
XI.5.2. Моноядерные негемовые металлоцентры, активирующие молекулярный кислород	116
XI.5.2.1. Противоопухолевый препарат блеомицин	117
XI.5.2.2. Медьсодержащие гидроксилазы: DBN и РНМ	119
XI.5.2.3. Ферменты, содержащие Fe(II) и фациальную триаду 2-His-1-карбоксилат	121
XI.5.2.4. Fe(III)-Диоксигеназы: исключение из общей модели механизма	128
Литература	130
XI.6. Восстановление дикислорода до воды: цитохром-с-оксидаза	135
XI.6.1. Введение	135
XI.6.2. Кристаллическая структура цитохром-с-оксидазы бычьего сердца . . .	137
XI.6.2.1. Структура белковой части	137
XI.6.2.2. Структуры металлоцентров в самой крупной субъединице . . .	139
XI.6.2.3. Структура Cu _A -центра	142
XI.6.3. Механизм реакции	142
XI.6.3.1. Перенос электронов внутри фермента	142
XI.6.3.2. Восстановление молекулярного кислорода.	144
XI.6.3.3. Перенос протонов в цитохром-с-оксидазе	145
XI.6.3.4. Идентификация путей переноса протонов посредством сайт-направленного мутагенеза	148
XI.6.3.5. Перенос протонов.	149
Литература	151
XI.7. Восстановление O₂ до воды: мультимедные оксидазы	154
XI.7.1. Введение.	154
XI.7.2. Распространенность и общие свойства	155
XI.7.2.1. Аскорбатоксидаза	155
XI.7.2.2. Лакказы	155
XI.7.2.3. Церулоплазмин	155
XI.7.2.4. Нитритредуктаза	155
XI.7.3. Функции	156
XI.7.3.1. Аскорбатоксидаза	156
XI.7.3.2. Лакказы	156
XI.7.3.3. Церулоплазмин	156
XI.7.3.4. Нитритредуктаза	157
XI.7.4. Кристаллические структуры	157
XI.7.4.1. Общая молекулярная организация	157
XI.7.4.2. Медные центры	160

XI.7.5.	Взаимосвязь структуры и функций	165
XI.7.5.1.	Аскорбатоксидаза и лакказы	165
XI.7.5.2.	Церулоплазмин	167
XI.7.6.	Перспективы	169
Литература	170
XI.8.	Механизмы восстановления дикислорода до H_2O	173
Литература	176
XII.	Метаболизм водорода, углерода, азота и серы	177
XII.1.	Метаболизм водорода и гидрогеназы	177
XII.1.1.	Введение: микробиология и биохимия водорода	177
XII.1.2.	Структуры гидрогеназ	178
XII.1.2.1.	Fe–Fe-Гидрогеназы	178
XII.1.2.2.	Ni–Fe-Гидрогеназы	180
XII.1.3.	Биосинтез	182
XII.1.4.	Механизм действия гидрогеназ	182
XII.1.5.	Регуляция молекулярным водородом	186
Литература	187
XII.2.	Роль металлоферментов в восстановлении соединений с одним атомом углерода	190
XII.2.1.	Введение: участие металлоферментов в восстановлении соединений с одним атомом углерода до CH_4 и CH_3COOH	190
XII.2.2.	Доноры и акцепторы электронов в окислительно-восстановительных реакциях одноуглеродных соединений	193
XII.2.2.1.	Водород как донор электронов для окислительно-восстановительных реакций одноуглеродных соединений.	193
XII.2.2.2.	Акцепторы электронов	194
XII.2.3.	Двухэлектронное восстановление CO_2 до формиат-иона	194
XII.2.3.1.	СО-Дегидрогеназа	194
XII.2.3.2.	Формиатдегидрогеназа	197
XII.2.3.3.	Формилметанофурандегидрогеназа	197
XII.2.4.	Превращение между окислительными уровнями формиат \rightarrow формальдегид \rightarrow метанол	198
XII.2.5.	Перенос метильной группы: метилтрансферазы	199
XII.2.6.	Восстановление или карбонилирование метильной группы	201
XII.2.6.1.	Ацетил-СоА-синтаза	202
XII.2.6.2.	Метил-СоМ-редуктаза	203
XII.2.6.3.	Гетеродисульфидредуктаза	205
XII.2.7.	Заключение	206
Литература	206

XII.3. Биологическая фиксация азота и нитрификация	211
XII.3.1. Введение.	211
XII.3.2. Биологическая фиксация азота:	
когда и как она появилась в процессе эволюции	212
XII.3.2.1. Биологическая фиксация азота и фотосинтез	213
XII.3.2.2. Типы нитрогеназ	213
XII.3.3. Азотфиксирующие микроорганизмы и злаковые культуры	215
XII.3.4. Взаимосвязь между нитрогеназами	216
XII.3.4.1. Мо-Нитрогеназа.	217
XII.3.4.2. V-Нитрогеназа и железосодержащая нитрогеназа	219
XII.3.4.3. Нитрогеназа бактерий <i>Streptomyces thermoautotrophicus</i>	219
XII.3.5. Структуры белковых компонентов Мо-нитрогеназы и их комплекса	220
XII.3.5.1. Fe-Белок.	220
XII.3.5.2. МоFe-Белок	222
XII.3.5.3. Простетическая группа FeMo-кофактора	224
XII.3.5.4. Простетическая группа Р-кластера	225
XII.3.5.5. Комплекс МоFe-белка с Fe-белком	227
XII.3.6. Механизм действия нитрогеназы	229
XII.3.6.1. Модель Лоу–Торнели (Lowe–Thorneley model)	229
XII.3.6.2. Роль MgATФ в катализе	231
XII.3.6.3. Где и как происходит связывание субстратов и ингибиторов?	232
XII.3.6.4. Каким образом поставляются протоны и электроны?	233
XII.3.7. Нерешенные вопросы в механизме фиксации азота	235
XII.3.8. Что такое биологическая нитрификация?	236
XII.3.9. Ферменты нитрификации у автотрофов	237
XII.3.9.1. Аммиакмонооксигеназа	237
XII.3.9.2. Гидроксиламиноксидоредуктаза	238
XII.3.9.3. Нитритоксидоредуктаза	242
XII.3.10. Нитрификация у гетеротрофов	242
XII.3.11. Анаэробное окисление NH_3 (процесс Anammox)	244
XII.3.12. Нерешенные вопросы в механизме нитрификации	244
Литература	245
XII.4. Метаболизм азота: денитрификация.	249
XII.4.1. Введение	249
XII.4.2. Ферменты денитрификации	250
XII.4.2.1. Диссимиляционные нитратредуктазы	250
XII.4.2.2. Диссимиляционные нитритредуктазы	251
XII.4.2.3. Редуктазы оксида азота(II)	260
XII.4.2.4. Редуктаза оксида азота(I).	262
XII.4.3. Заключение	263
Литература	265

ХII.5. Метаболизм серы.	269
ХII.5.1. Введение	269
ХII.5.2. Биологическая роль соединений серы	270
ХII.5.3. Биологический цикл серы	272
ХII.5.3.1. Диссимиляция	274
ХII.5.3.2. Ассимиляция	278
ХII.5.3.3. Металлоферменты сульфатвосстанавливающих бактерий	279
Литература	281
ХII.6. Ферменты, содержащие молибден	283
ХII.6.1. Введение.	283
ХII.6.2. Активные центры ферментов, содержащих Мо	286
ХII.6.2.1. Семейства Мо-содержащих ферментов	287
ХII.6.2.2. Оксомолибденовые центры и перенос атома кислорода	288
ХII.6.2.3. Лиганд МРТ и связывание дитиолоновых лигандов на Мо-центрах	294
ХII.6.3. Молибденсодержащие ферменты	299
ХII.6.3.1. Семейство ДМСО-редуктазы	299
ХII.6.3.2. Семейство сульфитоксидазы	304
ХII.6.3.3. Семейство ксантиндегидрогеназы/оксидазы	308
ХII.6.3.4. СО-Дегидрогеназы	312
ХII.6.4. Заключение	315
Литература	315
ХII.7. Ферменты, содержащие вольфрам	318
ХII.7.1. Введение	318
ХII.7.2. Биохимические свойства W-содержащих ферментов	320
ХII.7.2.1. Семейство альдегид-ферредоксин-оксидоредуктаз.	320
ХII.7.2.2. Семейство формиатдегидрогеназ.	323
ХII.7.2.3. Семейство ацетиленгидратаз	324
ХII.7.3. Структурные свойства W-содержащих ферментов	325
ХII.7.4. Спектральные свойства W-содержащих ферментов	328
ХII.7.5. Механизм действия W-содержащих ферментов	330
ХII.7.6. Модельные комплексы вольфрама	330
ХII.7.7. Сравнение вольфрама и молибдена	331
Литература	333
ХIII. Металлоферменты с радикальными интермедиатами	335
ХIII.1. Введение в химию свободных радикалов	335
ХIII.1.1. Введение	335
ХIII.1.2. Стабильность и реакционная способность свободных радикалов	337

XIII.1.3. Спектроскопия электронного парамагнитного резонанса	338
XIII.1.4. Биологические радикальные комплексы	339
Литература	340
XIII.2. Кобаламины	341
XIII.2.1. Введение.	341
XIII.2.2. Номенклатура и химические свойства	342
XIII.2.3. Ферментативные системы, использующие AdoCbl	343
XIII.2.3.1. Общие сведения о механизмах AdoCbl-зависимых ферментов	343
XIII.2.3.2. Диолдегидраза и метилмалонил-CoA-мутаза	346
XIII.2.3.3. Этаноламин-аммиак-лиаза: определение структуры интермедиатов методами ЭПР и ENDOR	349
XIII.2.4. Нерешенные вопросы функционирования AdoCbl-зависимых ферментов.	351
XIII.2.4.1. Механизм гомолиза связи углерод–кобальт остается неизвестным	351
XIII.2.4.2. Термодинамика гомолиза связи углерод–кобальт остается неизвестной	351
XIII.2.4.3. 5'-dA [•] : интермедиат или переходное состояние?	352
XIII.2.4.4. Механизмы перегруппировок остаются неизвестными	352
XIII.2.5. MeCbl-Зависимая метионинсинтаза в качестве примера	352
XIII.2.6. Нерешенные вопросы механизма реакций переноса метильной группы с участием MeCbl	355
Литература	355
XIII.3. Рибонуклеотидредуктазы	360
XIII.3.1. Введение: три класса рибонуклеотидредуктаз	360
XIII.3.1.1. Различные металлы-кофакторы и свободные радикалы	360
XIII.3.1.2. Химическое обоснование необходимости образования радикалов	362
XIII.3.2. Механизмы образования радикалов.	362
XIII.3.2.1. I класс: активация молекулярного кислорода и образование тирозильного радикала.	363
XIII.3.2.2. II класс: активация аденозилкобаламина и образование радикала цистеинила	364
XIII.3.2.3. III класс: активация S-аденозилметионина и образование глицильного радикала	366
XIII.3.3. Заключение	367
Литература	368
XIII.4. Роль Fe–S-кластеров в генерировании радикалов	369
XIII.4.1. Введение.	369
XIII.4.1.1. Использование SAM	370
XIII.4.1.2. Железосерные кластеры	370
XIII.4.1.3. Механизмы катализа	373

XIII.4.2. Образование глицильного радикала.	376
XIII.4.2.1. Активирующий фермент пируват-формат-лиазы	377
XIII.4.2.2. Активирующий фермент анаэробной рибонуклеотидредуктазы	378
XIII.4.2.3. Активирующий фермент бензилсукцинатсинтазы	379
XIII.4.3. Реакции изомеризации	379
XIII.4.4. Биосинтез коферментов	380
XIII.4.4.1. Биотинсинтаза.	380
XIII.4.4.2. Синтаза липоевой кислоты	382
XIII.4.4.3. Копропорфириноген-III-оксидаза	382
XIII.4.5. Репарация ДНК	383
XIII.4.6. SAM-Радикальные ферменты: общие свойства	385
Литература	386
XIII.5. Галактозооксидаза	387
XIII.5.1. Введение	387
XIII.5.2. Структура активного центра.	388
XIII.5.3. Окислительно-восстановительные реакции	388
XIII.5.4. Механизм каталитического цикла	391
XIII.5.5. Механизм биогенеза кофермента	393
Литература	395
XIII.6. Аминоксидазы	396
XIII.6.1. Введение.	396
XIII.6.2. Описание структуры	396
XIII.6.3. Взаимосвязь структуры и функций	398
XIII.6.4. Обсуждение механизмов	398
XIII.6.5. Биогенез аминоксидаз	401
XIII.6.6. Заключение	401
Литература	403
XIII.7. Липоксигеназа.	404
XIII.7.1. Введение.	404
XIII.7.2. Структура	405
XIII.7.3. Механизм	406
XIII.7.4. Кинетика.	409
Литература	410
XIV. Рецепторы ионов металлов и передача сигнала	412
XIV.1. Металлорегуляторные белки.	412
XIV.1.1. Введение: сайты структурных ионов металлов	412

XIV.1.2. Структурные цинковые домены	413
XIV.1.3. Передача сигнала с участием ионов металлов.	419
XIV.1.4. Металлорегуляторные белки	422
XIV.1.5. Регуляция транскрипции металлами	423
XIV.1.6. Регуляция посттранскрипционных процессов металлами	430
XIV.1.7. Регуляция металлами посттрансляционных процессов	431
Литература	433
XIV.2. Структурные цинк-связывающие домены.	434
XIV.2.1. Введение.	434
XIV.2.2. Молекулярные и макромолекулярные взаимодействия	435
XIV.2.3. Координация и замещение металла	437
XIV.2.3.1. Цинк и кобальт	437
XIV.2.3.2. Мышьяк, кадмий и свинец	440
XIV.2.4. «Цинковые пальцы» и дизайн белков	441
Литература	442
XIV.3. Кальций в клетках млекопитающих	445
XIV.3.1. Введение.	445
XIV.3.2. Концентрации Ca^{2+} в высших организмах	445
XIV.3.3. Внутриклеточная Ca^{2+} -система передачи сигнала	447
XIV.3.4. Распространенный сайт связывания Ca^{2+} : EF-рука	450
XIV.3.5. Структурные изменения белков-модуляторов (кальмодулина, тропонина С), индуцированные Ca^{2+}	452
XIV.3.6. Связывание Ca^{2+} в буферных или транспортных белках	458
Литература	461
XIV.4. Монооксид азота	462
XIV.4.1. Введение: физиологическая роль и химические свойства оксида азота.	462
XIV.4.2. Химия активации кислорода.	465
XIV.4.3. Общие сведения о структуре NO-синтазы	466
XIV.4.4. Механизм действия NO-синтазы	470
Литература	470

Дополнительный материал

Д.1. Биология, биохимия и эволюция клетки	474
Д.1.1. Многообразие жизни	474
Д.1.2. Эволюция	479

Д.І.3.	Геномы и протеомы	487
Д.І.4.	Клеточные компоненты	489
Д.І.4.1.	Нуклеиновые кислоты: ДНК и РНК	491
Д.І.4.2.	Белки	497
Д.І.4.3.	Липиды и мембраны	503
Д.І.4.4.	Углеводы	506
Д.І.5.	Метаболизм	509
Д.І.5.1.	Запасание энергии	514
Д.І.5.2.	Гликолиз.	515
Д.І.5.3.	Цикл лимонной кислоты	516
Д.І.5.4.	Дыхание.	516
Д.І.5.5.	Брожение	518
Д.І.5.6.	Фотосинтез	518
Литература		520
Д.ІІ.	Основы координационной химии	522
Д.ІІ.1.	Введение	522
Д.ІІ.2.	Комплексообразование в воде	522
Д.ІІ.3.	Влияние ионов металлов на pK_a лигандов	525
Д.ІІ.4.	Специфичность лигандов: жесткие и мягкие	526
Д.ІІ.5.	Координационная химия и теория поля лигандов.	528
Д.ІІ.5.1.	Октаэдрическое поле	528
Д.ІІ.5.2.	Тетраэдрическое поле.	529
Д.ІІ.5.3.	Другие случаи: аксиально искаженные октаэдрические и плоско-квадратные поля	530
Д.ІІ.5.4.	Расщепление полем лигандов: спектروхимический ряд	531
Д.ІІ.6.	Следствия из теории поля лигандов	532
Д.ІІ.6.1.	Электронная спектроскопия поглощения	532
Д.ІІ.6.2.	Парамагнетизм	534
Д.ІІ.6.3.	Энергии стабилизации полем лигандов и периодические свойства	535
Д.ІІ.6.4.	Эффект Яна–Теллера и комплексы с искаженной координацией	536
Д.ІІ.7.	Кинетические аспекты связывания ионов металлов	538
Д.ІІ.7.1.	Скорость обмена лигандов	538
Д.ІІ.7.2.	Механизмы обмена	540
Д.ІІ.8.	Окислительно-восстановительные потенциалы и реакции переноса электронов	540
Д.ІІ.8.1.	Окислительно-восстановительные реакции	540
Д.ІІ.8.2.	Механизмы реакций переноса электронов	542
Д.ІІ.8.3.	Внешнесферный механизм	542
Д.ІІ.8.4.	Внутрисферный механизм	542
Литература		544

Приложения

П.I.	Список сокращений	546
П.II.	Перечень основных понятий	556
П.III.	Литература по бионеорганической химии	575
П.IV.	База данных по структурам белков (PDB): введение	579
	Предметный указатель	581

XI

Метаболизм кислорода

XI.1. Реакционная способность и токсичность кислорода

Дж. Селверстоун Валентине

XI.1.1. Введение

Энергия, которая питает большую часть нефотосинтетических биологических процессов, образуется при ферментативном восстановлении сильно-го окислителя, молекулярного кислорода (O_2), до воды (см. разделы X.3 и X.4). Молекулярный кислород должен, таким образом, непрерывно поглощаться дышащими клетками. Простая диффузия O_2 может удовлетворить эту потребность в одноклеточных и других небольших организмах, но она недостаточна для обеспечения каждой клетки многоклеточных организмов без дополнительной помощи. Вследствие этого в процессе эволюции появились специальные белки, например гемоглобин или миоглобин, которые связывают, переносят, накапливают и высвобождают O_2 , чтобы обеспечить более быструю его доставку (см. раздел XI.4). Молекулярный кислород используется также как источник атомов кислорода для разнообразных ферментативных биосинтетических реакций с участием молекул органических субстратов (см. раздел XI.5).¹⁻⁴

Однако та же окислительная способность O_2 , которая является основой дыхания, превращает O_2 в токсический агент, инициирующий окислительный стресс. Внутри живых клеток поддерживается восстановительная среда, и комбинация O_2 со многими жизненно важными компонентами клетки термодинамически нестабильна. К счастью, по причинам, которые обсуждаются ниже, большинство реакций O_2 имеют достаточно высокие активационные барьеры в отсутствие катализаторов или радикальных инициаторов, и таким образом, представляют собой минорные пути биологического потребления O_2 . В противном случае клетка бы «сгорела», и аэробная жизнь, такая как мы ее знаем, была бы невозможна. Тем не менее в аэробных клетках в неферментативных и ферментативных реакциях молекулярного кислорода образуются небольшие, но значимые количества частично восстановленных форм O_2 , например супероксид-анион-радикала ($O_2^{\cdot-}$) и пероксида водорода (H_2O_2). Эти формы

восстановленного O_2 и частицы, образующиеся из них в последующих реакциях, называются «активными метаболитами кислорода» (АМК) или ROS (reactive oxygen species). Эти частицы вызывают окислительное повреждение *in vivo*.^{1, 4} Установлено, что для защиты организм использует антиоксидантные ферменты и низкомолекулярные антиоксиданты. В случае пероксида водорода этими ферментами являются каталазы и пероксидазы (см. раздел XI.3), а в случае супероксида – супероксиддисмутазы (см. раздел XI.2).

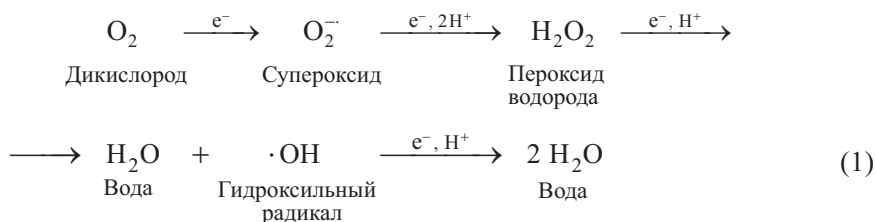
Столь сложная реакционная способность простой двухатомной молекулы O_2 фундаментально важна для понимания, каким образом устроена аэробная жизнь.² Многое известно о факторах, которые управляют реакционной способностью O_2 и ROS.¹⁻⁴ Особый интерес исследователей к метаболическим реакциям кислорода во многом связан с тем, что механизмы биологических ферментативных реакций очень сильно отличаются от механизмов некатализируемых реакций O_2 или даже реакций O_2 , катализируемых различными небιологическими металлсодержащими катализаторами.^{3, 4} Следовательно, сначала мы рассмотрим факторы, которые определяют характеристики некатализируемых реакций O_2 с переносчиками электронов, а также с типичными органическими и неорганическими субстратами.

XI.1.2. Химия дикислорода

XI.1.2.1. Термодинамика

Молекулярный кислород является мощным окислителем и, следовательно, термодинамически способен реагировать с разнообразными субстратами. В этом разделе мы разделили химические реакции O_2 на две категории в зависимости от сложности образующихся продуктов. Первая категория включает те реакции переноса электрона, в которых продукты, образующиеся из O_2 , содержат только атомы кислорода или атомы кислорода и водорода (например, O_2^- , H_2O_2 и H_2O). Термодинамику таких реакций можно оценить с использованием таблиц стандартных восстановительных потенциалов. Вторая категория включает реакции переноса атома, в которых по крайней мере один атом кислорода оказывается связанным с элементом X, отличным от кислорода или водорода. Для оценки термодинамики таких реакций требуется дополнительная информация, например прочность образующихся связей O–X. Оба типа реакций обсуждаются ниже.

Реакции переноса электрона. Потенциал четырехэлектронного восстановления O_2 (реакция (1)) является мерой рассматриваемой окислительной силы молекулы O_2 . Однако реакция включает перенос четырех электронов, процесс, который редко, если вообще происходит в одну согласованную стадию. Так как большинство восстановителей способно переносить за один акт только один или два электрона окисляющему агенту, для понимания всего механизма следует рассматривать термодинамику одно- и двухэлектронного восстановления O_2 .



В водном растворе некатализируемые реакции переноса электрона, включающие быстрый и согласованный перенос более чем одного электрона, относительно редки. Таким образом, наиболее простым путем восстановления O_2 электронтранспортным агентом в отсутствие какого-либо катализатора является одноэлектронное восстановление с образованием супероксида. Однако одноэлектронное восстановление термодинамически наименее предпочтительная реакция из всех стадий, составляющих полное четырехэлектронное восстановление O_2 , и, следовательно, требует наличия относительно сильных восстановителей (табл. XI.1.1).

Таким образом, если только одноэлектронный маршрут доступен для восстановления O_2 , то низкий потенциал одноэлектронного восстановления O_2 до $\text{O}_2^{\cdot -}$ представляет собой барьер, который предохраняет чувствительные частицы от полного окисления под действием O_2 , так как эта реакция не может начаться. Если $\text{O}_2^{\cdot -}$ действительно образуется, он быстро диспропорционирует в водном растворе (за исключением случая очень высоких значений pH) с образованием H_2O_2 и O_2 , так что стехиометрия реакции в целом такая же, что и для процесса двухэлектронного восстановления. При нормальных условиях невозможно различить одно- и двухэлектронные стадии восстановления O_2 в водном растворе только на основании стехиометрии.

Одноэлектронное восстановление дикислорода с образованием супероксида:



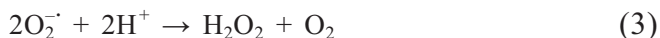
Таблица XI.1.1. Стандартные потенциалы восстановления дикислородных частиц в воде, (pH 7, 25 °C)

Реакция	E° (В) относительно NHE ^a
$\text{O}_2 + \text{e}^- \rightarrow \text{O}_2^{\cdot -}$	- 0.33 ^b
$\text{O}_2^{\cdot -} + \text{e}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$	+ 0.89
$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{e}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{HO}^\cdot$	+ 0.38
$\text{HO}^\cdot + \text{e}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}$	+ 2.31
$\text{O}_2 + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$	+ 0.281 ^b
$\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O}$	+ 1.349
$\text{O}_2 + 4\text{e}^- + 4\text{H}^+ \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O}$	+ 0.815 ^b

^a NHE – нормальный водородный электрод.

^b Для стандартного состояния с единичным давлением; чтобы перейти к единичной активности O_2 , редокс-потенциал реакций с этими частицами должен быть скорректирован на +0.17 В.

Диспропорционирование супероксида с образованием кислорода и пероксида водорода:



Двухэлектронное восстановление кислорода с образованием пероксида водорода:



Реакции переноса атома. Среди этих реакций O_2 наиболее важны для биологических процессов те, в которых образуются новые связи углерод–кислород. Чтобы оценить термодинамику таких реакций, рассматривают реакции молекулярного кислорода с молекулярным водородом с образованием воды ($2\text{H}_2 + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}$, $\Delta G^\circ = -58$ ккал/моль), с метаном с образованием метанола ($2\text{CH}_4 + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{CH}_3\text{OH}$, $\Delta G^\circ = -30$ ккал/моль) и с бензолом с образованием фенола ($2\text{C}_6\text{H}_6 + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$, $\Delta G^\circ = -43$ ккал/моль). Несмотря на то что все три реакции высокоэкзергонические, ни одна из них не протекает самопроизвольно и быстро при комнатной температуре, если только не присутствует катализатор или свободнорадикальный инициатор. Таким образом, чтобы понять, почему реакции O_2 с органическими субстратами медленные, важно рассмотреть их кинетические барьеры в дополнение к термодинамическим характеристикам.

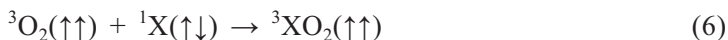
XI.1.2.2. Кинетика

Главный кинетический барьер для прямой реакции O_2 с органическими субстратами определяется тем, что молекула O_2 в основном состоянии содержит два неспаренных электрона и, таким образом, в основном состоянии представляет собой триплет. Обычные органические молекулы, которые являются представителями биологических субстратов, в основном состоянии не содержат неспаренных электронов, т.е. они являются синглетами, и продукты, образующиеся в результате их оксигенирования, также представляют собой синглеты. Триплет-синглетные спиновые переходы запрещены, согласно квантовой механике, и следовательно, протекают медленно. Столкновения между молекулами происходят гораздо чаще, чем переориентация спина, так что эта реакция не может быть согласованной. Число неспаренных электронов остается одинаковым до и после каждого элементарного акта химической реакции, а переориентации спинов должны рассматриваться как кинетически отдельные акты. Следовательно, мы знаем, что запрещенная по спину реакция не может протекать в одну согласованную стадию.



(Стрелками обозначены спины электронов, т.е. $(\uparrow\downarrow)$ означает синглетную молекулу со спаренными электронами, $(\uparrow\uparrow)$ – триплетную молекулу с двумя неспаренными электронами; (\uparrow) представляет собой дублетную молекулу, также называемую свободным радикалом, с одним неспаренным электроном.)

Стадии, в которых не нарушается спиновой запрет, энергетически «дороги» из-за высоких активационных барьеров. Например, реакция диоксида в основном триплетном состоянии (т.е. $^3\text{O}_2$) с синглетным субстратом с образованием возбужденного триплетного состояния окисленного продукта разрешена по спину, и можно представить механизм, по которому за этим процессом следует переориентация спина и образуется синглетный продукт.



Но такой реакционный путь имеет высокий активационный барьер, так как возбужденные триплетные состояния даже для ненасыщенных соединений обычно на 40–70 ккал/моль менее стабильны, чем основное состояние, а для насыщенных углеводов эта разница гораздо больше.

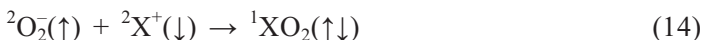
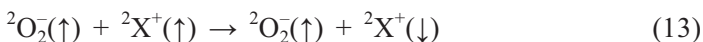
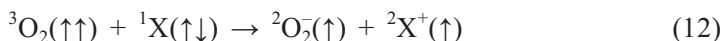
Подобным образом путь, в котором O_2 возбуждается сначала до синглетного состояния, а затем реагирует с субстратом, вполне возможен. Однако такой путь реакции для O_2 , который первоначально находится в основном триплетном состоянии, также требует высокой энергии активации, так как наиболее низкое по энергии синглетное состояние O_2 на 22.5 ккал/моль менее стабильно, чем основное триплетное состояние диоксида.



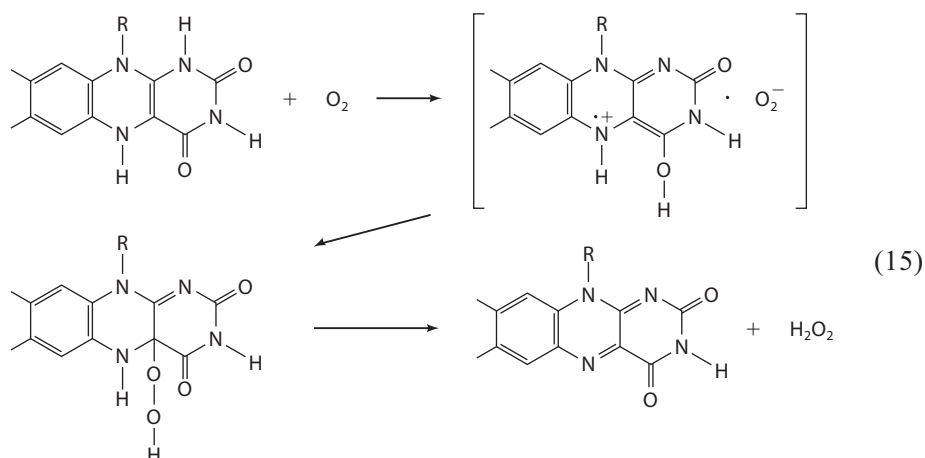
Аналогичный высокий активационный барьер существует для маршрута, в котором субстрат X сначала возбуждается до триплетного состояния, а затем следует реакция с триплетным кислородом:



Путь прямой реакции O_2 в основном триплетном состоянии с органическим субстратом в основном синглетном состоянии, который может осуществляться легче без катализатора, – это механизм, в котором первой стадией является одноэлектронное окисление субстрата кислородом. Продукты такой реакции были бы двумя дублетами, а именно супероксид-анион-радикал и одноэлектронно окисленный субстрат – каждый с одним неспаренным электроном. Эти свободные радикалы могут диффундировать и затем рекомбинировать со спариванием двух спинов.



По такому механизму протекает реакция молекулярного кислорода с восстановленными флавинами.⁵

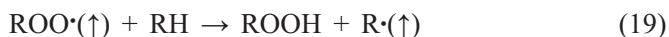


Однако такие реакции встречаются редко, так как они требуют, чтобы субстрат был очень сильным восстановителем (например, восстановленный флаavin), способным одноэлектронно восстанавливать кислород до супероксида. Типичные органические субстраты в ферментативных и неферментативных реакциях оксигенирования обычно являются недостаточно сильными одноэлектронными восстановителями, чтобы восстановить O_2 до O_2^- , и этот механизм обычно не наблюдается.

Кинетические барьеры реакций кислорода с большинством органических молекул приводят к тому, что некатализируемые реакции этого типа обычно очень медленные. Исключением из этого правила является механизм окисления, известный как свободнорадикальное автоокисление.

XI.1.2.3. Свободнорадикальное автоокисление

Термин «свободнорадикальное автоокисление» описывает реакционный путь, по которому O_2 реагирует с органическим субстратом с образованием окисленного продукта в свободнорадикальном цепном процессе, который требует инициатора для начала цепной реакции. (Свободнорадикальный инициатор – это соединение, которое легко образует свободные радикалы при термическом или фотохимическом разложении.) Механизм свободнорадикального автоокисления описывается следующим образом.⁶



Этот реакционный путь приводит к окислению разнообразных органических субстратов и не зависит от ограничений по спине, так как реакция O_2 в основном триплетном состоянии со свободным радикалом $R\cdot$ с образованием свободнорадикального продукта $ROO\cdot$ разрешена по спине.

Поскольку радикал $R\cdot$ регенерируется на стадии роста цепи, цепная реакция проходит большое число циклов перед обрывом цепи, и является очень эффективным способом окисгенирования некоторых органических субстратов. Ингибирование свободнорадикального автоокисления происходит при добавлении ловушек радикалов, которые быстро реагируют с $ROO\cdot$, обрывая таким образом цепь.

Если свободнорадикальное автоокисление используется для синтеза, специально добавляют инициаторы. Распространенными инициаторами являются пероксиды и другие соединения, способные к легкому распаду на свободные радикалы. Свободнорадикальные реакции автоокисления часто наблюдаются и в тех случаях, когда намеренно не добавляют никакого инициатора, поскольку органические субстраты часто содержат примеси пероксидов, которые и служат инициаторами. Первые предположения о том, что реакции O_2 с органическими субстратами, катализируемые комплексами металлов, происходят по нерадикальному механизму, оказались ошибочными. Эти реакции являются свободнорадикальными, а роль комплекса металла заключается в генерировании инициаторов — свободных радикалов.

Свободнорадикальные реакции часто используют для синтеза окисгенированных производных относительно простых углеводов, но они неселективны, и в случае более сложных субстратов образуется набор продуктов. С точки зрения возможных механизмов реакций биологического окисления *in vivo* для биосинтеза или производства энергии свободнорадикальное автоокисление является не лучшей возможностью, потому что такой механизм требует диффузии высокореакционноспособных свободных радикалов. Такие радикалы, образованные в клетке, как следует ожидать, неселективно реагируют с чувствительными сайтами ферментов, субстратов и других клеточных компонентов, вызывая серьезные повреждения. Действительно, считается, что свободнорадикальное автоокисление является источником многих токсичных реакций O_2 , которые происходят в биологических системах, например при пероксидном окислении липидов в мембранах. Этот же процесс вызывает прогоркание жиров и масел.

Реакции свободнорадикального окисления, по-видимому, не используются для активации O_2 оксигеназами, но часто наблюдается сходство в природе образующихся интермедиатов. Большое различие между ферментативными и неферментативными реакциями заключается в том, что реакционноспособные кислородсодержащие частицы или другие реакционноспособные радикальные интермедиаты, которые образуются в ферментативных реакциях, не диффундируют из сайта генерирования и не участвуют в неселективном окислении. Напротив, в силу стерических причин они участвуют в прямой реакции с близко расположенными связанными с ферментом субстратами (см. раздел XI.5).

XI.1.2.4. Каким образом ферменты преодолевают кинетические барьеры?

Некатализируемые реакции O_2 часто медленные или неселективные. Функция металлоферментов, для которых O_2 является субстратом, заключается в том, чтобы преодолеть кинетические барьеры, накладываемые ограничениями по спину или неблагоприятными путями одноэлектронного восстановления, и, в случае ферментов оксигеназ, задать направление реакции и обеспечить их высокую специфичность (раздел XI.5). Важно понять, каким образом функционируют такие металлоферменты, чтобы 1) снизить кинетические барьеры реакций с кислородом и 2) в случае оксигеназ менять маршруты реакции для образования различных продуктов.

Рассмотрим, например, монооксигеназу цитохром P450 (см. раздел XI.5). Этот фермент катализирует реакцию O_2 с органическими субстратами. Он связывает O_2 с парамагнитным ионом металла в активном центре, таким образом преодолевая ограничение по спину. Далее осуществляется формально многоэлектронное восстановление O_2 с образованием высокореакционноспособных оксокомплексов металла в высокой степени окисления, по активности аналогичных гидроксильному радикалу. Однако, в отличие от свободного гидроксильного радикала, который был бы очень реакционноспособным, но неселективным, реакция, которая протекает в активном центре цитохрома P450, может быть весьма селективной и стереоспецифичной. Высокореакционноспособные оксочастицы металла генерируются вблизи субстрата, который связан с ферментом таким образом, чтобы направлять реакционноспособный атом кислорода в нужное положение. Таким образом, металлоферменты предназначены для связывания O_2 и усиления его реакционной способности, но в строго контролируемом направлении. Такие реакции подробно описаны в разделе XI.5.

XI.1.3. Токсичность диоксида

XI.1.3.1. Введение

Большинство химических реакций O_2 *in vivo* очень полезны для организмов, в которых они протекают, но некоторые приносят вред из-за окислительных повреждений.^{1, 2} Организмы, которые могут жить в аэробных условиях, разработали разные стратегии, чтобы справляться с окислительным стрессом с использованием и низкомолекулярных антиоксидантов, и антиоксидантных ферментов (см. рис. XI.1.1). В настоящем разделе рассмотрена химия окислительного повреждения, вызываемого токсичными метаболитами O_2 , и защита от него с участием низкомолекулярных антиоксидантных систем. Большинство антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазы, супероксидредуктазы, каталазы и пероксидазы – обсуждаются в разделах XI.2 и XI.3.

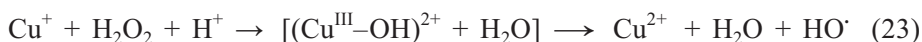
Диоксигород сам по себе не является *первичным* агентом окислительного стресса, поскольку его прямые реакции с другими молекулами в отсутствие катализаторов или радикальных инициаторов в основном медленные. Напротив, O_2^- , H_2O_2 , гидроксильный радикал ($HO\cdot$), пероксинитрит

(ONOO⁻) и другие активные частицы и молекулы относятся к ROS, которые являются агентами окислительного повреждения.^{1, 2}

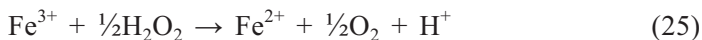
XI.1.3.2. Образование реакционноспособных активных метаболитов кислорода *in vivo*

Большая часть H₂O₂ и других ROS, генерированных в нормальном метаболизме типичной клетки эукариот, образуется из супероксида, который генерируется при восстановлении O₂ компонентами митохондриальной электронтранспортной цепи. На первой стадии побочных реакций транспорта электрона восстановителем является убисемихинон ([•]QH) в комплексе III, а затем NADH-дегидрогеназа (комплекс I) (раздел XI.3). Однако существуют также специальные системы, главная цель которых – генерировать супероксид и ROS для использования в системах защиты, предохраняющих от патогенов. Примером является NADPH-оксидаза в лейкоцитах, которая катализирует одноэлектронное восстановление O₂ действием NADPH с образованием супероксида.⁷

Гидроксильный радикал является одним из самых реакционноспособных из известных ROS. Он может образовываться в реакции H₂O₂ с восстановленными ионами металлов, такими как Fe²⁺ или Cu⁺ (в реакции Фентона).⁸ Образование гидроксильного радикала включает в качестве интермедиатов оксо- или гидроксокомплексы металла в высокой степени окисления, например (Fe^{IV}=O)²⁺ и (Cu^{III}-OH)²⁺, которые наряду с самим свободным гидроксильным радикалом служат агентами, вызывающими окислительное повреждение в условиях окислительного стресса. Гидроксильные радикалы и оксо- и гидроксочастицы металла в высокой степени окисления действуют как инициаторы свободнорадикального окисления липидов и повреждают белки, нуклеиновые кислоты, углеводы и другие органические молекулы, когда генерируются вблизи таких молекул.



Пероксид водорода сам по себе является сильным (термодинамически) окислителем, но его реакции в отсутствие катализатора протекают очень медленно. Следовые количества редокс-активных ионов металлов могут катализировать такие реакции, поскольку пероксид водорода действует и как восстановитель, и как окислитель, а гидроксильный радикал образуется как интермедиат.

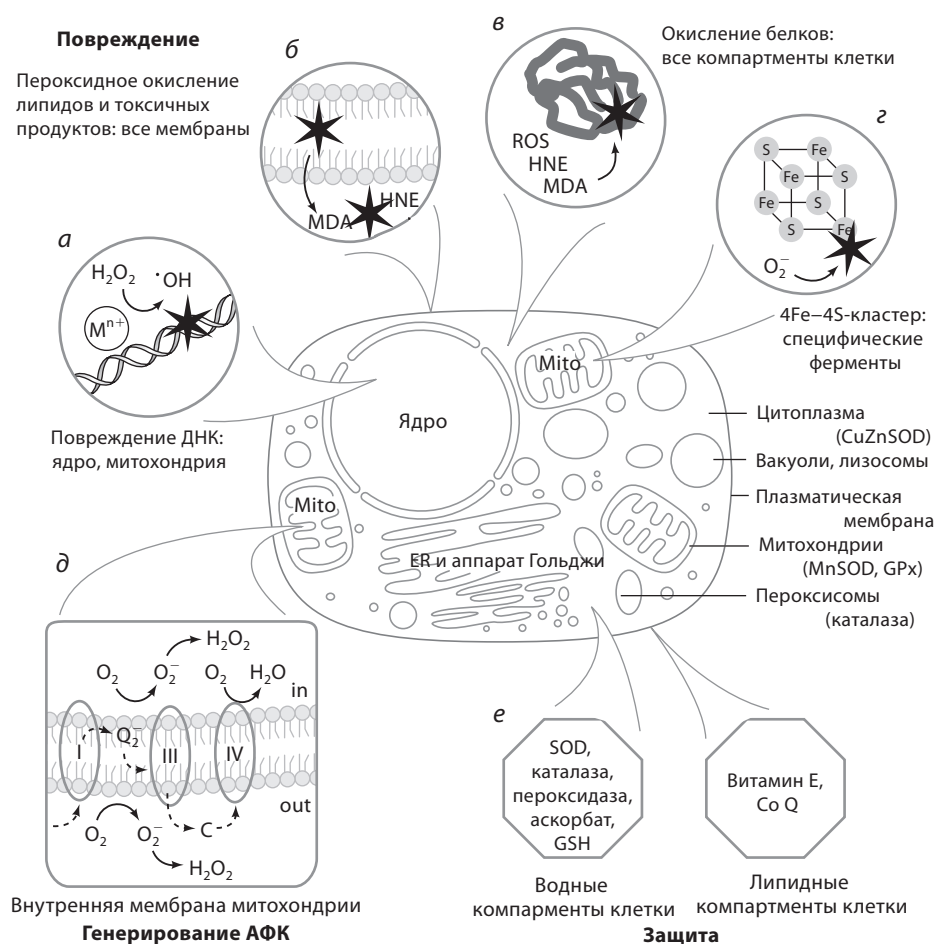


Супероксид – более инертный окислитель, чем гидроксильный радикал, и, следовательно, более селективен по отношению к мишеням, которые он окисляет. Из этих мишеней лучше всего охарактеризованы железосерные белки, содержащие одинарные лабильные атомы железа в кластере. Такие реакции обсуждаются более подробно ниже.

Пероксинитрит (ONOO^-) – активная частица, образующаяся в реакции супероксида с оксидом азота ($\text{O}_2^- + \text{NO} \rightarrow \text{ONOO}^-$). Давно известно, что он является важным агентом в биологическом окислительном повреждении.⁹ Недавно доказано, что реакция пероксинитрита с CO_2 с образованием нитрозопероксикарбоната (ONOOCO_2) может играть основную физиологическую роль в химии пероксинитрита *in vivo*.¹⁰

XI.1.3.3. Низкомолекулярные антиоксиданты

Низкомолекулярные антиоксиданты встречаются и в неводных, и в водных отделах аэробных и аэротолерантных клеток, а также для большинства



многоклеточных организмов во внеклеточных жидкостях. Они играют важную роль, позволяя организмам жить в аэробной среде.¹

Один из классов молекул, которые особенно подвержены окислительному повреждению, – полиненасыщенные липиды, присутствующие в мембранах высших организмов. Будучи незащищенными, эти молекулы очень чувствительны к свободнорадикальному окислению (рис. XI.1.2), нарушающему целостность и функции мембраны. Прекрасной защитой от такого повреждения является присутствие большого количества мембранорастворимых антиоксидантов – α -токоферола (витамина E) и восстановленного убихинона (коэнзима Q), которые обрывают свободнорадикальную цепную реакцию и действуют совместно с NADPH-зависимыми ферментами. Повреждения наблюдаются, только если эта защита исчерпана или подавлена.¹

В водных компартментах, таких как цитозоль и внеклеточные жидкости, присутствуют водорастворимые низкомолекулярные антиоксиданты, такие как глутатион, аскорбиновая кислота (витамин C) и урат. Эти молекулы распространены и весьма реакционноспособны по отношению к некоторым ROS и другим сильным окислителям и, таким образом, могут защитить другие потенциально уязвимые мишени от окислительного повреждения. Подробное описание их антиоксидантных химических свойств можно найти в книгах^{1, 3}.

Рис. XI.1.1. Схематический обзор некоторых механизмов, приводящих к окислительному стрессу, и антиоксидантов, предупреждающих его в клетках типичных эукариот (центр; Mito – митохондрия; ER – эндоплазматический ретикулум). Существуют четыре класса окислительного повреждения. а) Сайт-специфичное окислительное повреждение, включающее катализируемое металлом генерирование гидроксильного радикала из пероксида водорода, которая приводит к разрыву цепи и повреждению оснований ДНК. (Похожие события могут происходить в любом месте, где дополнительно связываются ионы металла.) б) Окисление липидов, которое повреждает мембраны и генерирует токсичные продукты, такие как MDA (малоновый диальдегид) и HNE (4-гидрокси-2-ноненаль), реагирующие с другими компонентами клетки. в) Повреждение белков, которое происходит в результате прямого окисления активными формами кислорода (АФК) или в реакциях с продуктами метаболизма липидов (например, HNE, MDA). г) Прямые реакции самого супероксида с некоторыми простетическими группами (железосерными кластерами) в незащищенных положениях, которые приводят к полному или частичному разрушению кластера, инактивации фермента и высвобождению железа. (Железо, высвобождающееся таким образом, может катализировать дальнейшее генерирование гидроксильного радикала в специфических положениях.) д) Схематическое изображение основного источника супероксида и пероксида водорода при «утечке» электронов из электронтранспортной цепи. Комплексы I (NADH-дегидрогеназа), III (коэнзим Q: цитохром-с-оксидоредуктаза) и IV (цитохромоксидаза) представляют электронтранспортную цепь. (Q – коэнзим Q; C – цитохром с.) е) Защищающие молекулы перечислены согласно тому, присутствуют ли они в водном или липидном слоях. SOD – супероксиддисмутаза, GSH – глутатион. (С разрешения из²)

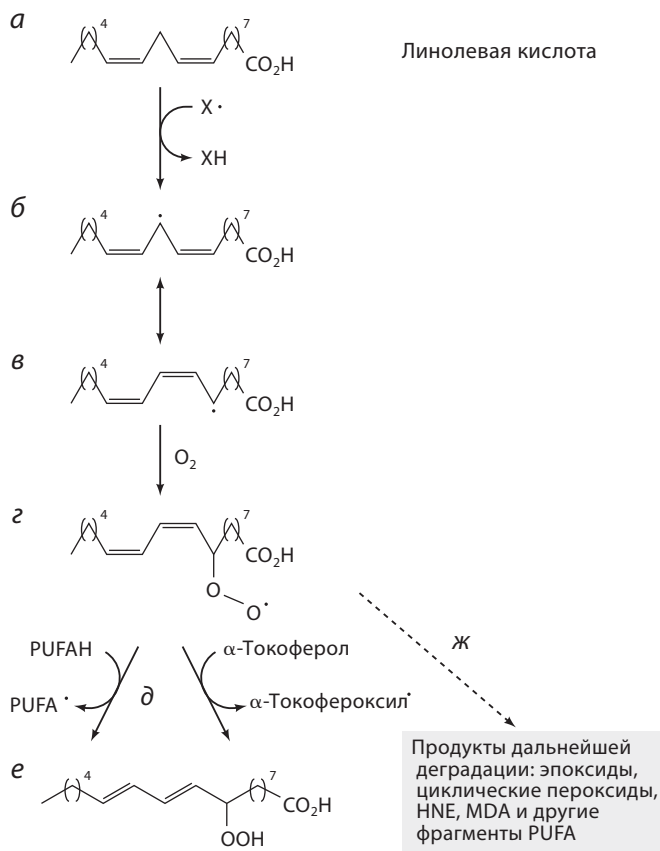


Рис. XI.1.2. Свободнорадикальные реакции автоокисления полиненасыщенных липидов, приводящие к пероксидному окислению липидов. **а)** Различные АФК, обозначенные как X, способны отрывать атомы водорода от полиненасыщенных липидов, таких как линолевая кислота. **б)** Перегруппировка диаллильного радикала до **в)**, сопряженной моноаллильной системы, которая легко реагирует с молекулярным кислородом с образованием **г)**, пероксильного радикала ROO•. **д)** Реакция с другими полиненасыщенными жирными кислотами (PUFАН) или с витамином Е (α-токоферолом) превращает пероксильный радикал в **е)**, гидропероксид липида ROOH. В некоторых случаях **ж)** пероксильный радикал реагирует со своей собственной сопряженной диеновой системой с образованием эпоксидов и циклических пероксидов. Внутримолекулярная реакционная способность диен-пероксильного радикала часто приводит к фрагментации полиненасыщенных жиров с образованием HNE, MDA и других карбонильных соединений. [С разрешения из Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., *Free radicals in biology*, 2nd ed., Clarendon Press, Oxford, 1989.]

XI.1.3.4. Окислительное повреждение биологических молекул

Известно, что окислительный стресс вызывает окислительное повреждение белков, липидов и липопротеинов, нуклеиновых кислот, углеводов и других клеточных компонентов в живых организмах, но до сих пор не до конца ясны химическая природа и механизм действия повреждающего

агента в каждом конкретном случае.² Более того, природу агента, вызывающего первоначальное повреждение, и сайта окислительной атаки определить трудно, так как некоторые продукты окислительного повреждения липидов и сахаров быстро реагируют с белками и нуклеиновыми кислотами и таким образом распространяют повреждение от места первоначальной атаки.

Белки. Химические исследования радикальных реакций окисления белков продемонстрировали окислительное модифицирование боковых цепей белков, расщепление скелета и образование димеров белок–белок. Серосодержащие боковые цепи особенно чувствительны к окислению по атому серы, но большинство других маршрутов приводит к карбонильным соединениям – альдегидам и кетонам; содержание последних легко определить с использованием 2,4-динитрофенилгидразина (см. ниже подраздел «Липиды и углеводы»).

В последние годы одним из наиболее важных открытий, связанных с пониманием механизмов окислительного повреждения в биологических системах, является легко осуществляемая реакция супероксида с незащищенными от растворителя железосерными кластерами в ферментах, например аконитазе и других гидролазах, содержащих 4Fe–4S-кластеры (рис. XI.1.3).¹¹ Установлено, что реакция супероксида с этими центрами инактивирует ферменты как *in vitro*, так и *in vivo* и увеличивает уровень свободного внутриклеточного железа, которое само может способствовать дополнительному окислительному повреждению белков и других субстратов. Этот механизм – первый хорошо изученный пример прямой реакции супероксида, а не получающихся из него ROS, приводящей к повреждению компонентов клетки *in vivo*.

Липиды и углеводы. Пероксидное окисление липидов не только представляет угрозу для целостности и функционирования мембраны и мембранных белков, но также ведет к образованию различных токсичных альдегидов и кетонов, причем наиболее токсичный из них – 4-гидрокси-2-ноненаль (HNE) – продуцируется с высоким выходом.¹ Известно, что HNE, малоновый диальдегид (MDA) и другие токсичные продукты, образующиеся при пероксидном окислении липидов, вступают в реакцию Михаэля с нуклеофильными боковыми цепями белков, что приводит к перекрестной сшивке белков (рис. XI.1.4). Продукты окисления углеводов также могут реагировать с белками и приводить к дальнейшему повреждению.¹

Идентификация первичных мишеней окислительного повреждения в живых организмах является основной проблемой, так как антиоксидантная защита значительно различается в зависимости от природы ROS и сайта атаки. Как уже отмечалось, продукты окисления липидов и/или углеводов реагируют с белками, и эти модифицированные белки содержат карбонильные группы, которые реагируют с 2,4-динитрофенилгидразином в карбонильной пробе на белки. Таким образом, регистрация высокого уровня содержания карбонильных групп в белках не обязательно указывает на то, что сами белки окисляются напрямую ROS; карбонильные

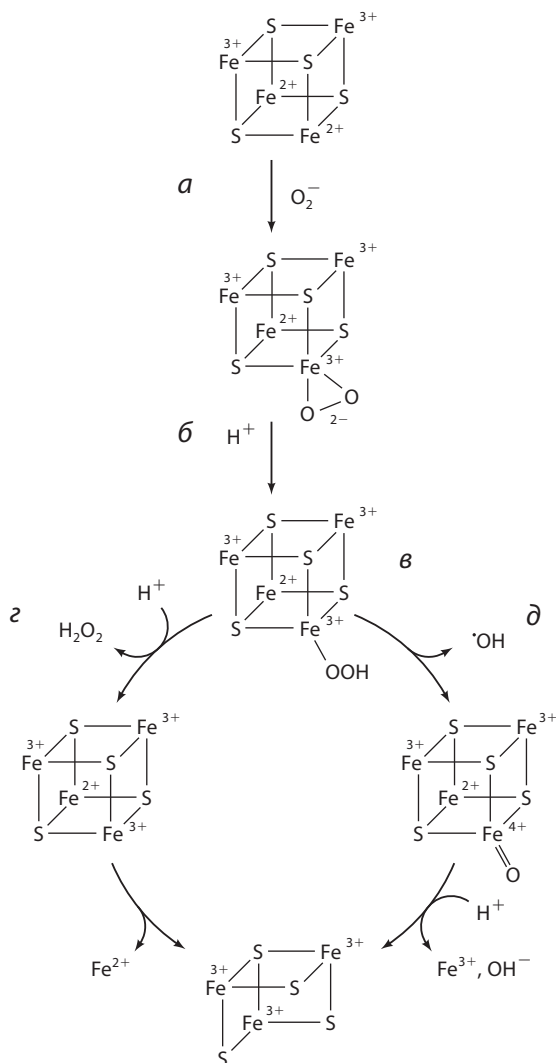


Рис. XI.1.3. Гипотетический механизм реакции кластеров $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ с супероксидом. Индивидуальные заряды на рисунке приписываются атомам железа для удобства отслеживания окислительно-восстановительных изменений; тем не менее следует подчеркнуть, что электронная плотность в Fe–S-кластерах, как известно, сильно делокализована (см. главу IV). а) Реакция O_2^- с доступным для растворителя Fe-центром в одной из вершин куба приводит к образованию Fe(III)-пероксо-интермедиата $[\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{O}_2)]^{3+}$; б) протонирование Fe(III)-пероксо-комплекса приводит к гидропероксиду Fe(III) $[\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{OOH})]^{3+}$ (в). Разложение кластера может происходить по одному из двух указанных путей: з) протонирование и отрыв пероксида водорода с образованием кластера $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{3+}$, который высвобождает Fe^{2+} с образованием кластера $[\text{Fe}_3\text{S}_4]^{3+}$, или д) гомолитический разрыв связи в гидропероксолиганде с образованием гидроксильного радикала и феррилсодержащего кластера $[\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{O})]^{2+}$, который также может дать кластер $[\text{Fe}_3\text{S}_4]^{3+}$ при протонировании и высвобождении Fe^{3+} и гидроксид-иона. [D.H. Flint, R.M. Allen, *Chem. Rev.*, **96**, 2315–2334 (1996); с разрешения из²¹]



Рис. XI.1.4. Реакции нуклеофильных боковых цепей белка с HNE. *а*) Деструкция PUFA часто приводит к образованию токсичных альдегидов и кетонов, таких как HNE. *б*) Это соединение губительно для белков ввиду его способности выступать в качестве акцептора Михаэля по отношению к различным нуклеофильным боковым белковым цепям. Образующийся аддукт HNE–белок (*в*) может обладать повышенной гидрофобностью, а также большим содержанием карбонильных групп, что делает его активным в реакции с 2,4-динитрофенилгидразином в пробе на карбонильные группы в белках. *г*) Аддукт HNE–белок способен реагировать в дальнейшем с аминогруппами других белков с образованием «сшитых» аддуктов белок–белок. [Stadtman E. R., Berlett B. S., *Chem. Res. Toxicol.*, **10**, 485–494 (1997); с разрешения из²]

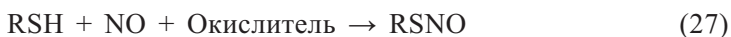
группы могут образовываться и в реакциях еще неповрежденных белков с токсичными продуктами окисления липидов или углеводов.¹

Нуклеиновые кислоты. Давно известно, что сильный окислительный стресс приводит к окислительному повреждению ДНК.¹ Гуаниновые основания особенно чувствительны и превращаются в 8-оксо-7,8-дигидрогуанин и продукты последующего окисления.¹² Существуют доказательства участия

«свободного» внутриклеточного железа в этом процессе окисления. Считается, что его источником является железо, высвобождаемое из железосерных кластеров вследствие высокого содержания супероксида в условиях окислительного стресса. Общеизвестная теория основана на том, что это «свободное» железо может лабильно связываться с разными сайтами в ДНК, где оно является катализатором для генерирования из пероксида водорода очень реакционноспособных частиц, таких как гидроксильный радикал либо оксо- или гидроксочастицы, содержащих железо в высокой степени окисления, которые затем реагируют с ДНК (см. обсуждение реакции Фентона в разделе X.1.3.2). Клеточные восстановители супероксид, аскорбиновая кислота и NADH восстанавливают связанное Fe^{3+} до Fe^{2+} , а далее протекает реакция Фентона, которая повреждает основания и сахара в ДНК. Этот тип химических реакций также характерен для ионов Cu, случайно связанных с ДНК; в результате появляются модифицированные основания и/или одиночные разрывы цепи ДНК.¹¹

XI.1.3.5. Связь между биохимией оксида азота и молекулярного кислорода

Химия оксида азота (NO) и O_2 в физиологических процессах, по-видимому, тесно связана. Например, пероксинитрит, образующийся в реакции оксида азота и супероксида, является активной частицей, которая, как полагают, образуется *in vivo* в определенных условиях и реагирует с тирозиновыми остатками белков с образованием нитротирозина. Другим примером является S-нитрозилирование тиолов *in vivo*, механизм которого в настоящее время неизвестен, но в котором O_2 или ROS, вероятно, служат в качестве окислителя (окислителей) в генерировании нитрозирующих частиц.¹³



Сообщалось также, что оксид азота реагирует с белками, содержащими железосерные кластеры.¹⁴

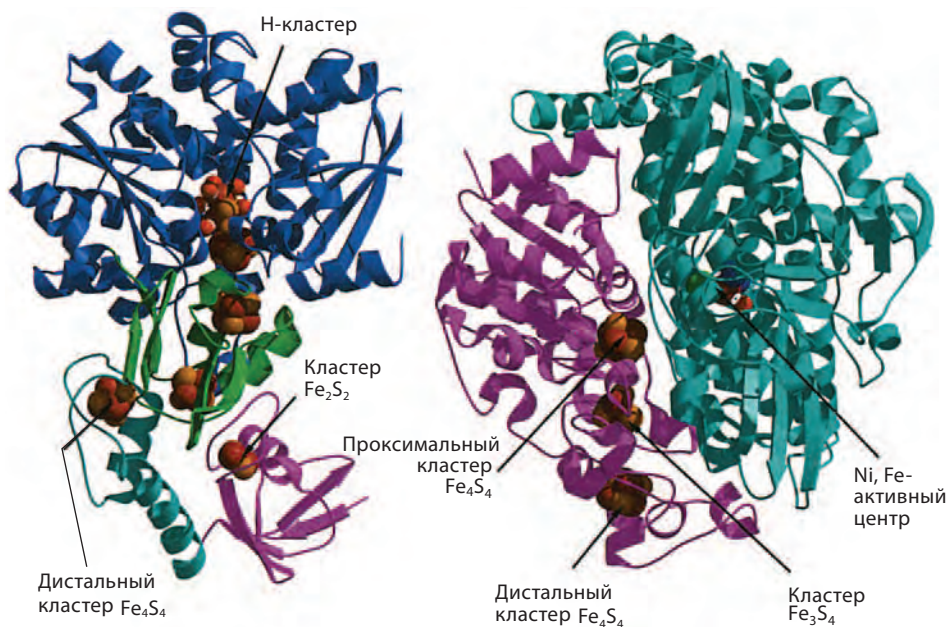
Литература

Работы общего характера

1. Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C., «Free radicals in biology and medicine», Oxford University Press, New York, 1989.
2. Ho, R. Y. N., Liebman, J. F., and Valentine, J. S., «Overview of Energetics and Reactivity of Oxygen», in Foote, C. S., Valentine, J. S., Greenberg, A., and Liebman, J., Eds., *Active Oxygen in Chemistry*, Blackie Academic & Professional, Glasgow, 1995.
3. Ho, R. Y. N., Liebman, J. F., and Valentine, J. S., «Biological reactions of dioxygen: an introduction», in Valentine, J. S., Foote, C. S., Greenberg, A., and Liebman, J., Eds., *Active Oxygen in Biochemistry*, Blackie Academic & Professional, Glasgow, 1995.
4. Valentine, J. S., Wertz, D. L., Lyons, T. J., Liou, L. L., Goto, J. J., and Gralla, E. B., «The dark side of dioxygen biochemistry», *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2**, 253–262 (1998).

[...]

a



б

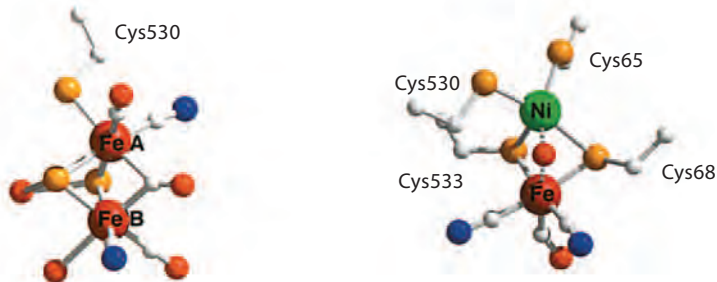


Рис. XII.1.1. Структуры Fe–Fe-гидрогеназы *C. pasteurianum* (код PDB: 1FEN) и Ni–Fe-гидрогеназы *D. gigas* (код PDB: 2FRV). а) Ленточные изображения, обобщающие структуры белков и показывающие относительное расположение неорганических кофакторов. б) Структуры биядерных H_2 -окисляющих и продуцирующих сайтов



Рис. XII.2.4. Структура COD/ACS. Субъединица CODH состоит из двух центральных субъединиц, тогда как субъединицы ACS присоединены к каждой центральной субъединице CODH