

В.К. Казимирко
Л.Н. Иваницкая
В.В. Кутовой
А.Г. Дубкова
Т.С. Силантьева

ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ: ПРОТИВОРЕЧИЯ ПРОБЛЕМЫ

Национальная медицинская академия последипломного образования им. П.Л. Шупика

Ключевые слова:

перекисное окисление липидов, свободные радикалы, ДНК, диеновые конъюгаты, малоновый диальдегид, эйкозаноиды.

Представления о перекисном окислении липидов (ПОЛ), в основном базирующиеся на исследованиях *in vitro*, не соответствуют требованиям, предъявляемым для признания существования изучаемого метаболического процесса или метаболического пути. Отсутствуют критерии, методологические подходы, позволяющие судить о параметрах выраженности ПОЛ *in vivo*. Наличие в крови физиологического (фонового) уровня малонового диальдегида, диеновых конъюгатов, других продуктов ПОЛ свидетельствует о существовании строгого контроля за окислением липидов со стороны иерархической системы регуляции и в конечном итоге — ДНК. Поэтому утверждение о существовании в клетках неконтролируемых свободнорадикальных реакций в больших масштабах является необоснованным. При некоторых заболеваниях самоокисление может иметь место, вызывая образование в ряде тканей аномальных липидных включений.

За несколько десятков лет, прошедших с момента появления концепции перекисного окисления липидов (ПОЛ), она так и не подтверждена практикой, являющейся критерием истинности науки. Возникает ряд вопросов, требующих ответа. Если этот феномен так важен, например для развития атеросклероза (как утверждают авторы), то почему антиоксиданты не предупреждают, не останавливают патологический процесс, а в то же время меры по снижению уровня холестерина в крови являются эффективными? В каких исследованиях *in vivo* подтверждены «лавинообразные», «цепные» разрушения клеточных мембран в процессе ПОЛ? Как могут существовать нормальные показатели продуктов ПОЛ в крови при хаотическом процессе? Возможны ли такие разрушительные не подконтрольные ДНК процессы в клетке, организме вообще? Почему распространенные представления о ПОЛ не соответствуют современным биохимическим требованиям для заключения о подлинности существования изучаемого метаболического процесса в организме? Нужно ли витамины Е, С, А (бета-каротин) именовать антиоксидантами? Ведь они имеют большое количество других не менее важных биологических функций, а их дефицит приводит к нарушениям различных видов обмена в организме. Эти факты, а также, что самое важное, — отсутствие эффекта от применения антиоксидантов при различных заболеваниях (например при атеросклерозе) и не редко возникновение антиэффекта, требуют переосмысления теории ПОЛ [1, 2]. Многие положения теории ПОЛ вступают в противоречие с фундаментальными законами биохимии. Возникает, в частности, вопрос, как выражена степень реакций ПОЛ в детском возрасте, когда преобладают анаболические процессы, или в среднем возрас-

те, в условиях практического равновесия анаболической и катаболической фаз метаболизма. Ответ на эти вопросы в литературе отсутствует. Для суждения о степени изменений ПОЛ клиницисты часто определяют в крови диеновые конъюгаты и малоновый диальдегид. При этом дают нормативы этих показателей, что противоречит самой концепции, поскольку существование нормальных параметров процесса свидетельствует о его генетической обусловленности, а не стихийности.

Реакции окисления происходят в клетке в соответствующих структурах: митохондриях, эндоплазматическом ретикулуме (микросомальное окисление). В митохондриях в цепи переноса электронов возможно неполное восстановление кислорода и образование перекиси водорода, супероксидного радикала [3]. Образование активных форм кислорода (АФК) в митохондриях, по мнению А. Ленинджера, является нормальным физиологическим явлением, что, однако, требует объяснения предназначения и биологической целесообразности этого процесса. (В фагоцитах «дыхательный взрыв» играет важную роль в обезвреживании бактерий и разрушении неинфекционного материала). Уменьшение движения потока электронов по окислительно-восстановительной цепи митохондрий приводит к уменьшению образования АФК. АФК постоянно производятся при взаимодействии кислорода с коферментами флавиновых ферментов. Они образуются в эндоплазматическом ретикулуме в коротких цепях переноса электронов. В цикле реакций микросомального окисления с участием цитохрома P450 в качестве промежуточных продуктов возникают супероксидные радикалы и перекись водорода. Супероксид образуется и в других электронно-транспортных клеточных системах. Образование

АФК происходит под действием ионизирующего и ультрафиолетового излучения, гипербарической оксигенации, токсических веществ [4]. В перокси-сомах продуцируется перекись водорода, которая эффективно обезвреживается. Перекись водорода может восстановиться супероксидом с образованием гидроксильного радикала. Гидроксильный радикал, взаимодействуя с супероксидом, может образовать синглетный кислород, хотя течение этой реакции *in vivo* не доказано [5]. Считают [6], что синглетный кислород в обычных биологических условиях организма не играет существенной роли. Благодаря тому, что ферменты, образующие перекись водорода, и каталаза локализованы внутри пероксисом, остальное содержимое клетки защищено от разрушающего воздействия перекиси. Все АФК нестабильны и короткоживущие.

В соответствии с концепцией, образующиеся свободные радикалы инициируют так называемое ПОЛ — свободнорадикальное окисление ненасыщенных жирных кислот (НЖК) в биомембранах, приводящее к образованию гидроперекисей липидов. Следствием предполагаемых цепных реакций является возрастание продуктов ПОЛ, способных вызывать нарушение структуры различных биосубстратов и тем самым повреждать белки и липиды биомембран, инактивировать ферменты, изменять строение макромолекул, целостность клетки и внутриклеточных органелл. Таким образом, постулируется некая глобальная система окисления, возможная во всех клеточных образованиях, содержащих в своем составе НЖК, хаотический процесс, в основе которого лежат «цепные, лавинообразные» реакции. И в то же время приводятся нормы промежуточных продуктов ПОЛ — например малонового диальдегида, диеновых конъюгатов, других продуктов. Возникает первое противоречие: внутриклеточный хаос, разрушительный процесс генетически запрограммирован, что противоречит биологическим законам. В качестве второго противоречия можно отметить, что ПОЛ как системное явление не соответствует требованиям, предъявляемым к изучению метаболических процессов [7] (таблица).

Третье противоречие заключается в том, что в организме существует ферментная система, подконтрольная геному, осуществляющая синтез эйкозаноидов (простагландинов, лейкотриенов, тромбоксанов), играющих важнейшую роль в функционировании организма. В этом процессе промежуточными продуктами являются малоновый диальдегид, гидроперекиси липидов [7] (схема). И здесь действительно речь может идти о нормативах этих и других показателей. Образование эйкозаноидов является элементом проявления общего неспецифического адаптационного синдрома. Поэтому увеличение количества различных продуктов ПОЛ (в том числе малонового диальдегида и диеновых конъюгатов) выявляют при большинстве заболеваний [8]. Их уровень зависит от нейроэндокринных сдвигов как следствия развития неспецифического адаптационно-

го синдрома. В стрессовой катаболической (адренергически-кортикоидной) фазе одновременно с распадом органических молекул протекают синтетические процессы — образуются эйкозаноиды, позволяющие преодолевать стресс. Перекиси липидов, образующиеся в процессе синтеза эйкозаноидов, полностью метаболизируются, нейтрализуются (а не накапливаются, как считают сторонники теории ПОЛ).

Таблица

Стратегия изучения метаболического процесса или метаболического пути [7]

Вывод о существовании биохимического процесса или метаболического пути, сделанный на основании наблюдений над целым организмом
↓ Анализ механизмов, контролирующих процесс <i>in vivo</i>
↓ Анализ нарушений процесса, вызванных специфическими болезнями (врожденные ошибки метаболизма, рак и т.д.)
↓ Локализация процесса в одном или нескольких органах
↓ Локализация процесса в одной или нескольких клеточных органеллах или субклеточных фракциях
↓ Рассмотрение процесса в виде отдельных реакций
↓ Очистка его индивидуальных субстратов, продуктов, ферментов, кофакторов и других компонентов
↓ Анализ механизмов, контролирующих процесс <i>in vitro</i>
↓ Изучение механизмов отдельных реакций
↓ Реконструкция процесса
↓ Изучение процесса на генетическом уровне методом рекомбинантных ДНК

Применение такого подхода позволяет обычно выяснить детали биохимических процессов или метаболических путей. В общем виде эта схема использовалась для изучения главных метаболических путей в организме. Организация метаболических процессов в организме контролируется генетической программой на всем протяжении жизни. Поэтому утверждение «хаоса» ПОЛ противоречит вышеназванному постулату.

Из третьего противоречия вытекает четвертое: если интенсивный самопроизвольный процесс окисления НЖК (ПОЛ) происходит, то как определить, какая часть перекисных продуктов образуется в процессе ПОЛ, инициируемом АФК, а какая — в процессе синтеза эйкозаноидов? В настоящее время определяемые перекисные продукты сторонниками концепции приписываются ПОЛ при отсутствии каких-либо доказательных исследований.

В свете сказанного становится понятным отсутствие даже упоминания о ПОЛ в известном учебнике Д.М. Фаллера и Д. Шилдса «Молекулярная биология клетки» [9], монографии известных биохимиков Я. Кольмана и К.Г. Рема [10]. В то же время детально представлены сведения об эйкозаноидах, их роли в функции клетки. Сама теория ПОЛ изначально базируется на результатах исследований *in vitro*. Возможность существования подобных разрушительных процессов *in vivo* вызывает большие сомнения, исходя из того, что период полужизни белков, интенсивность клеточного деления, апоптоз запрограммированы ДНК. Как показал с помощью изотопов Шёнхаймер, обмен липидов в организме протекает поразительно быстро. Очень быстрым процессом является обновление жирных кислот. Период биологической полужизни жирных кислот в различных органах животных составляет от 1,5 до 8 сут. На наш взгляд,

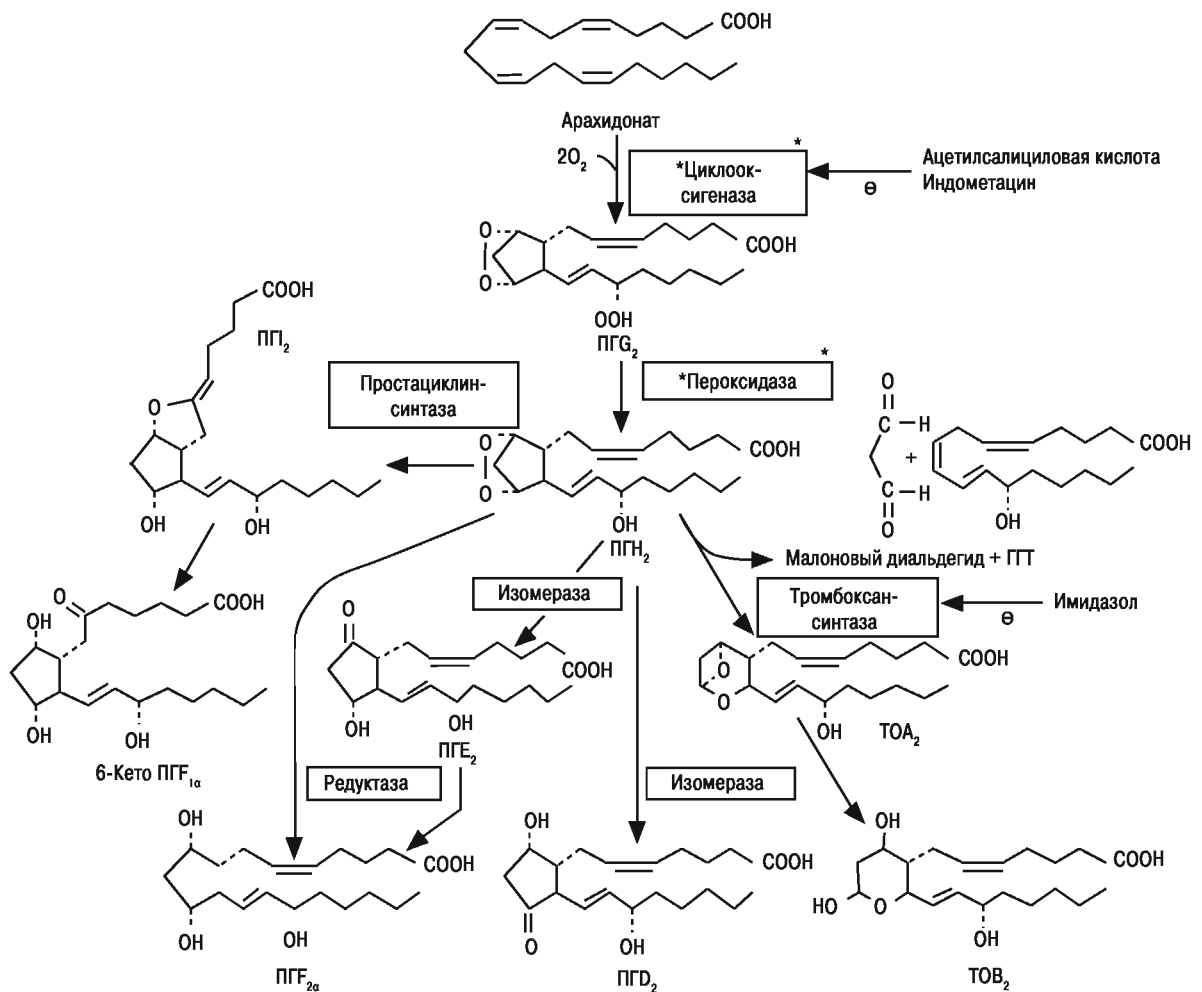


Схема. Образование эйкозаноидов (по: Марри Р. и соавт., 2004) [8]

ошибочным является утверждение, что перекиси липидов накапливаются в организме и оказывают токсическое действие. Известно, что образующиеся в процессе окисления НЖК гидроперекиси и циклические перекиси не могут накапливаться в организме: они разлагаются до жирных альдегидов, например: капронового, малонового, полуальдегида капроновой кислоты [11]. Линолевая кислота образует 1 молекулу малонового диальдегида, линоленовая — 2, арахидоновая — 3, клупанононовая — 4. Продукты расщепления линолевой кислоты подвергаются дальнейшему окислению с образованием капроновой, азелаиновой и малоновой кислот, которые в конечном итоге подвергаются окислению до CO₂ и H₂O₂ в цикле Кребса. Подобному превращению подвергаются промежуточные продукты линоленовой, арахидоновой и клупанононовой кислот.

По заключению известного биохимика А. Ленинджера [3], в клетках человека в обычных условиях самоокисление НЖК полностью заторможено благодаря наличию витамина Е, различных ферментов и аскорбиновой кислоты. Исследования доказательного характера, которые бы опровергли эту точку зрения, до сих пор отсутствуют. А. Ленинджер допускает, что при некоторых забо-

леваниях самоокисление может иметь место, вызывая образование в ряде тканей аномальных липидных включений. Тот факт, что ПОЛ, инициируемое в гидрофобном пространстве клеточных мембран, способно прерываться витамином Е, подтверждают другие биохимики. Высокая концентрация витамина Е в биологических мембранах препятствует их повреждению свободными радикалами [12]. Дефицит же витамина Е у человека отмечается чрезвычайно редко [13]. Следует думать, что многочисленные публикации клинического характера, авторы которых определяли диеновые конъюгаты, малоновый диальдегид, гидроперекиси и другие метаболиты при самых различных заболеваниях и состояниях, отражают не ПОЛ, а другой конкретный ферментативный, генетически обусловленный процесс — синтез эйкозаноидов. В процессах синтеза эйкозаноидов участвует целый ряд ферментов (фосфолипаза А₂, циклооксигеназы, липооксигеназы и др.). Из свободных полиненасыщенных жирных кислот и, прежде всего, арахидоновой (линолевой, линоленовой после их превращения в арахидоновую кислоту) образуются простагландины [14]. Перечисленные полиненасыщенные жирные кислоты входят в состав фосфолипидов, в молекуле которых эфирной связью связа-

ны с С-2-концом глицерола. Из фосфолипидов они высвобождаются под действием фосфолипазы А₂ и становятся субстратом биосинтеза простагландинов. Продукты окисления выводятся с мочой. В мембранах клеток различных тканей имеются рецепторы, на которые действуют простагландины. Иными словами, образование перекисей липидов в различных тканях является нормальным процессом и осуществляется под контролем ферментов. Все полиеновые кислоты (линолевая, линоленовая, арахидоновая) при участии липооксигеназы окисляются до гидроперекисей, гидроксипроизводных жирных кислот, из которых в результате последовательных реакций образуются лейкотриены [15]. При участии простагландин-синтазы (циклооксигеназа + пероксидаза) арахидоновая кислота превращается в ее метаболиты — простагландины, простациклины, тромбоксаны, лейкотриены, то есть локальные гормоны, обладающие различной физиологической активностью [16]. Поскольку образование эйкозаноидов является элементом общего неспецифического адаптационного синдрома, рост количества различных продуктов ПОЛ определяется при самых различных заболеваниях [8]. Уровень продуктов ПОЛ зависит от нейроэндокринных сдвигов как следствия развития стресса.

ВЫВОДЫ

Имеющиеся на сегодняшний день представления о ПОЛ, в основном базирующиеся на исследованиях *in vitro*, не соответствуют требованиям, предъявляемым для признания существования изучаемого метаболического процесса или метаболического пути. Нет критериев, методологических подходов, позволяющих судить о параметрах выраженности ПОЛ *in vivo*. Оценивать выраженность ПОЛ (инициируемом АФК) в организме по содержанию в крови продуктов ПОЛ не представляется адекватным, поскольку эти метаболиты образуются в процессе биосинтеза эйкозаноидов — ферментативного, генетически детерминированного процесса. Тот факт, что в крови определяется физиологический (фоновый) уровень малонового диальдегида, диеновых конъюгатов, других продуктов ПОЛ, свидетельствует о существовании строгого контроля за окислением липидов со стороны иерархической системы регуляции, и в конечном итоге ДНК. (ДНК осуществляет контроль метаболизма посредством синтеза ферментов и клеточных белков.) Поэтому утверждение о существовании в клетках неконтролируемых свободнорадикальных реакций в больших масштабах является необоснованным. По мнению А. Ленинджера, «...в клетках в обычных условиях самоокисление ненасыщенных жиров полностью заторможено благодаря наличию витамина Е, различных ферментов, а также, по-видимому, аскорбиновой кислоты. Однако при некоторых заболеваниях оно может иметь место, вызывая в ряде тканей образование аномальных липидных включений [3] (Т. 1, с. 331)». Существенные повреждения свободными ради-

калами липидов клеточных мембран, нуклеиновых кислот происходят при лучевой болезни, влиянии канцерогенных, токсических факторов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Грацианский Н.А. (2002) Очередное (окончательное) подтверждение неэффективности антиоксидантных витаминов в профилактике коронарной болезни сердца и ее осложнений. Кардиология, 42(2): 85–86.
2. Грацианский Н.А. (2001) Статины как противовоспалительные средства. Кардиология, 12: 14–26.
3. Ленинджер А. (1985) Основы биохимии: В 3 т. Мир, Москва, Т. 1.
4. Хорст А. (1982) Молекулярные основы патогенеза болезней. Пер. с польск. Медицина, Москва, 456 с.
5. Stadman E. R., Oliver C. N. (1991) Metal-catalyzed oxidation of proteins: physiological consequences. J. Biol. Chem., 266: 2005–2008.
6. Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э. и др. (1981) Основы биохимии: В 3 т. Мир, Москва. Т. 2, 617 с.
7. Марри Р., Греннер Д., Мейес П. и др. (2004) Биохимия человека. Пер. с англ.: В 2 т. Мир, Москва. Т. 2, 414 с.
8. Казимирко В.К., Мальцев В.И., Бутилини В.Ю. и др. (2004) Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная терапия. МОРИОН, Киев, 160 с.
9. Фаллер Д.М., Шилдс Д. (2006) Молекулярная биология клетки. Руководство для врачей. Пер. с англ. Издательство БИНОМ, Москва, 256 с.
10. Кольман Я., Рем К.Г. (2000) Наглядная биохимия: Пер. с нем. Мир, Москва, 469 с.
11. Савицкий И.В. (1981) Биологическая химия. Вища школа, Київ, 488 с.
12. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. (1990) Биологическая химия: Учеб. под ред. С.С. Дебова, Медицина, Москва, 528 с.
13. Ерин А.Н., Скрыпин В.И., Прилишко Л.Л. (1988) Витамин Е. Молекулярные механизмы действия в биологических мембранах. Кислородные радикалы в химии, биологии и медицине. Рига. С. 180–208.
14. Владимиров Ю.А. (1989) Роль нарушений липидного слоя мембран в развитии патологических процессов. Патол. физиол. и эксперим. терапия. 4: 7–17.
15. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (1989) Free radicals in biology and medicine. 2nd ed. Clarendon Press, Oxford.
16. Halliwell B., Gross C.E. Gutteridge J.M.C. (1992) Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? Lab. Clin. Med., 119: 598–620.

ПЕРЕКИСНЕ ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ: ПРОТИРІЧЧЯ ПРОБЛЕМИ

В.К. Казимирко, Л.М. Іваніцька, В.В. Кутовий, А.Г. Дубкова, Т.С. Сілантьєва

Резюме. Уявлення про перекисне окиснення ліпідів (ПОЛ), що в основному базуються на дослідженнях *in vitro*, не відповідають вимогам, які ставляться для визнання існування метаболічного процесу чи метаболічного шляху. Відсутні критерії, методологічні підходи, які дозволяють визначити параметри вираженості ПОЛ *in vivo*. Наявність у крові фізіологічного (фонового) рівня малонового діальдегіду, діенових кон'югатів, інших продуктів ПОЛ свідчить про існування чіткого контролю за окисненням ліпідів з боку ієрархічної системи регуляції та на завершення — ДНК. Тому твердження про існування у клітинах неконтрольованих вільнорадикальних реакцій у великих масштабах є необґрунтованим.

ним. При деяких захворюваннях самоокиснення може мати місце, викликаючи утворення в ряді тканин аномальних ліпідних включень.

Ключові слова: перекисне окиснення ліпідів, вільні радикали, ДНК, дієнові кон'югати, малоновий діальдегід, ейкозаноїди.

LIPID PEROXIDATION: CONTROVERSERY PROBLEM

**V.K. Kazimirko, L.N. Ivanitska, V.V. Kutovyi,
A.G. Dubkova, T.S. Silantieva**

Summary. *The concept of lipid peroxidation, mainly based on studies in vitro, does not meet the requirements for recognition of the studied process existence or metabolic pathway. There are no criteria, methodological approaches to judge the severity of lipid peroxidation parameters in vivo. Determined in blood physiological (background) lev-*

el of malondialdehyde, conjugated diens and other lipid peroxidation products, indicates the existence of lipid oxidation strict control by the hierarchical system of regulation and eventually — DNA. Therefore, the assertion of the existence of cells uncontrolled free radical reactions on a large scale is unreasonable. In some diseases, auto-oxidation may occur, causing the formation of abnormal lipid inclusions in a number of tissues.

Key words: lipid peroxidation, free radicals, DNA, conjugated diens, malondialdehyde, eicosanoids.

Адрес для переписки:

Казимирко Віталій Казимирович
04112, Київ, ул. Дорогожицька, 9
Национальная медицинская академия
последипломного образования
имени П.Л. Шупика

РЕФЕРАТИВНА ІНФОРМАЦІЯ

НПВП способствуют изменению структуры клеточной мембраны

Подготовила Ю.С. Котикович

НПВП ефективні при ліченні широкого спектра захворювань — від простуди до артрита. Однак в ході нового дослідження учені з Медичинської школи при Університеті Джонса Хопкінса (Johns Hopkins University School of Medicine), Балтимор, США, виявили, що тривалий і неконтрольований прийом цих безрецептурних препаратів може привести до серйозних проблемам внаслідок зміни активності мембранних ферментів. Результати роботи представлені в журналі «Cell Reports».

Изуча побочные эффекты нового препарата, ученые стремятся определить нормальные белки организма, имеющие максимальное сходство с белком — точкой приложения лекарственного вещества. Однако в данном случае белки клеточной мембраны не имеют ничего общего с белком — мишенью НПВП. Так, изучали влияние препаратов на состояние ферментов в клеточной мембране и действующих в качестве «клеточных ножниц». Эти ферменты, известные как ромбовидные протеазы, разделяют полипептидную цепь, отделенные белки высвобождаются из клеточной мембраны и становятся сигнальными молекулами для других клеток. Ранее установлено, что вероятность высвобождения каждой отдельной молекулы зависит от ее стабильности — чем стабильнее белок, тем позже он будет вырезан из полипептидной цепи. Ученые под руководством доктора Синиса Урбан (Sinisa Urban) обрабатывали клетки человека химическими составами, повышающими гибкость клеточной мембраны, или изменяли ее форму. Цель исследователей — определение выборочной активности ромбовидных протеаз при изменении структуры белка. Как и предполагалось, изучаемые ферменты выбирали своей целью белки, по отношению к которым обычно не проявляют активности, в частности предшественник β-амилоида и сигнальный протеин δ.

Поскольку многие препараты способны проникать сквозь клеточные мембраны, исследователи изучали, воздействует ли данный процесс на активность ромбовидных протеаз и их способность распознавать менее стабильные молекулы. Применение такого НПВП, как флурбипрофен, способствует изменению активности фермента γ-секретаза, что приводит к высвобождению предшественника β-амилоида с образованием большого количества коротких пептидных цепей, которые при попадании в мозг могут провоцировать развитие болезни Альцгеймера.

Культуры клеток обрабатывали различными НПВП — флурбипрофеном, индометацином и сулиндаком — в концентрациях, эквивалентных содержанию веществ, которые можно выявить в крови у пациентов при применении препаратов в высоких дозах. Активность ромбовидных протеаз при этом изменялась так же, как и при обработке культуры клеток химическими реагентами — они высвобождали предшественник β-амилоида и на сигнальный протеин δ. При воздействии на клетки безрецептурных НПВП (ацетилсалициловая кислота, ибупрофен и напроксен) активность протеаз изменялась незначительно.

Анализ показателей клеточных мембран свидетельствовал, что наиболее агрессивные химические вещества способствуют снижению температуры плавления мембран с дальнейшим изменением активности ромбовидных протеаз. По мнению авторов, ряд побочных эффектов НПВП может быть обусловлен их воздействием на клеточные мембраны и ферменты. Основным результатом можно считать подтверждение возможного использования ромбовидной протеазы в ходе дальнейших исследований в качестве предиктора потенциального негативно-го воздействия химического вещества на состояние клеточной мембраны.

Iyer S. (2014) Anti-Inflammatory drugs affect unwanted cellular processes; drug developers should be more aware of NSAIDs' side effects. Medical Daily, August 21 (www.medicaldaily.com/anti-inflammatory-drugs-affect-unwanted-cellular-processes-drug-developers-should-be-more-299048).