

# Биофизические основы патологии клетки

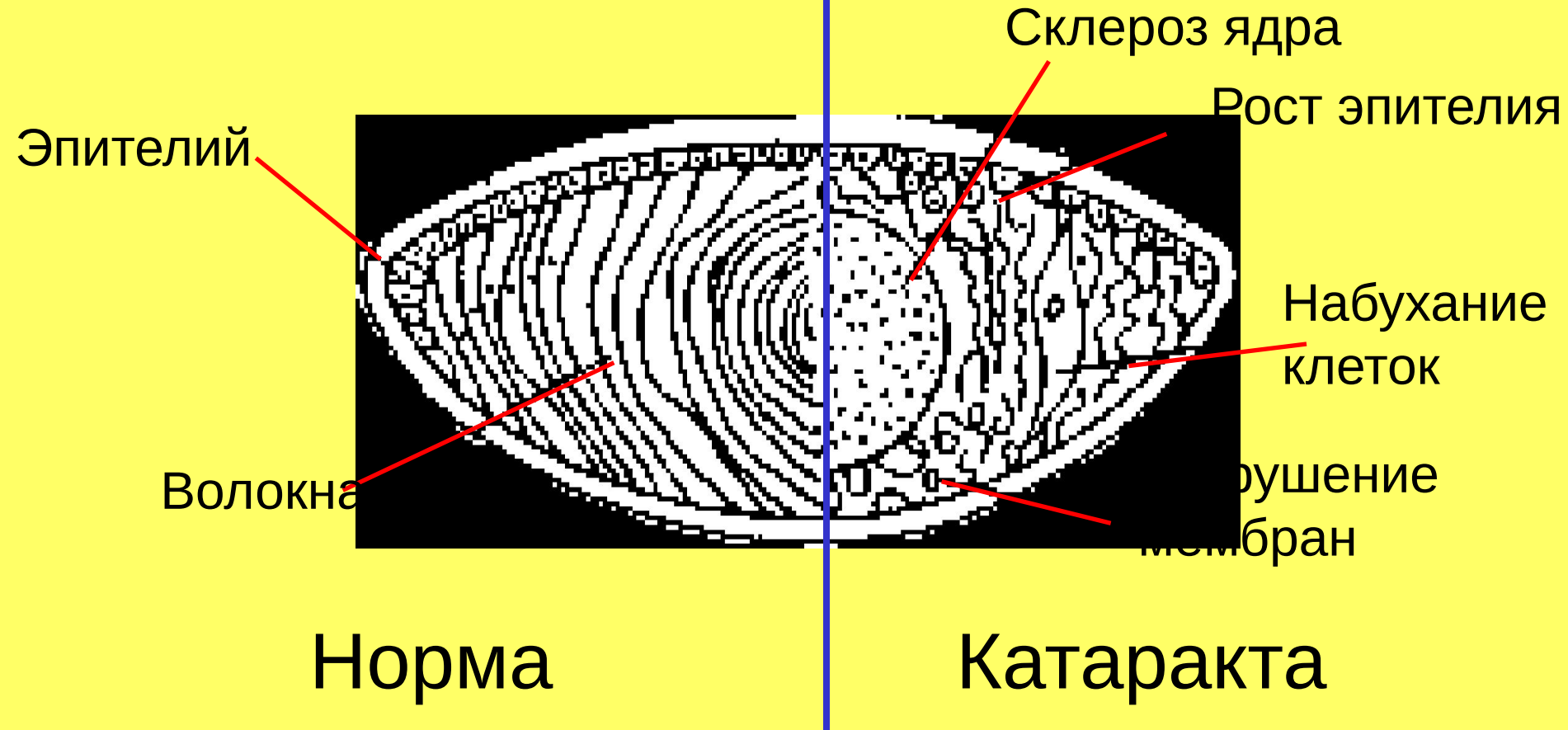
Свободные радикалы и болезни человека

Ю.А. Владимиров, А.Н. Осипов  
2018

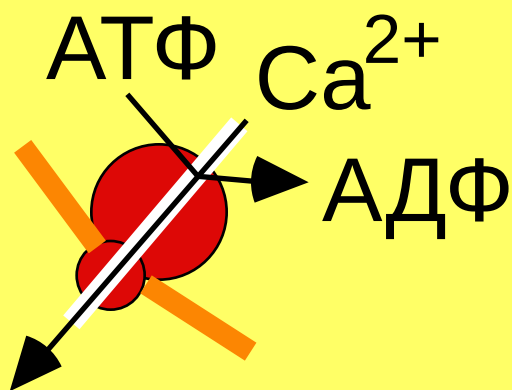
# Морфологические изменения в хрусталике при катаракте

В нормальном хрусталике глаза клеточные мембраны не разрушены

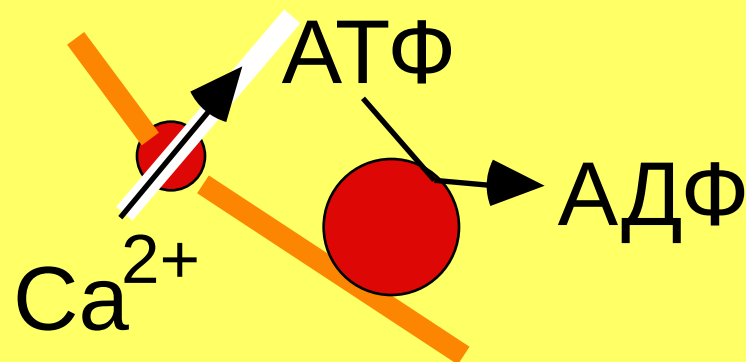
При катаракте мембраны разрушены вследствие перекисного окисления липидов



# Повреждение Ca-АТФазы

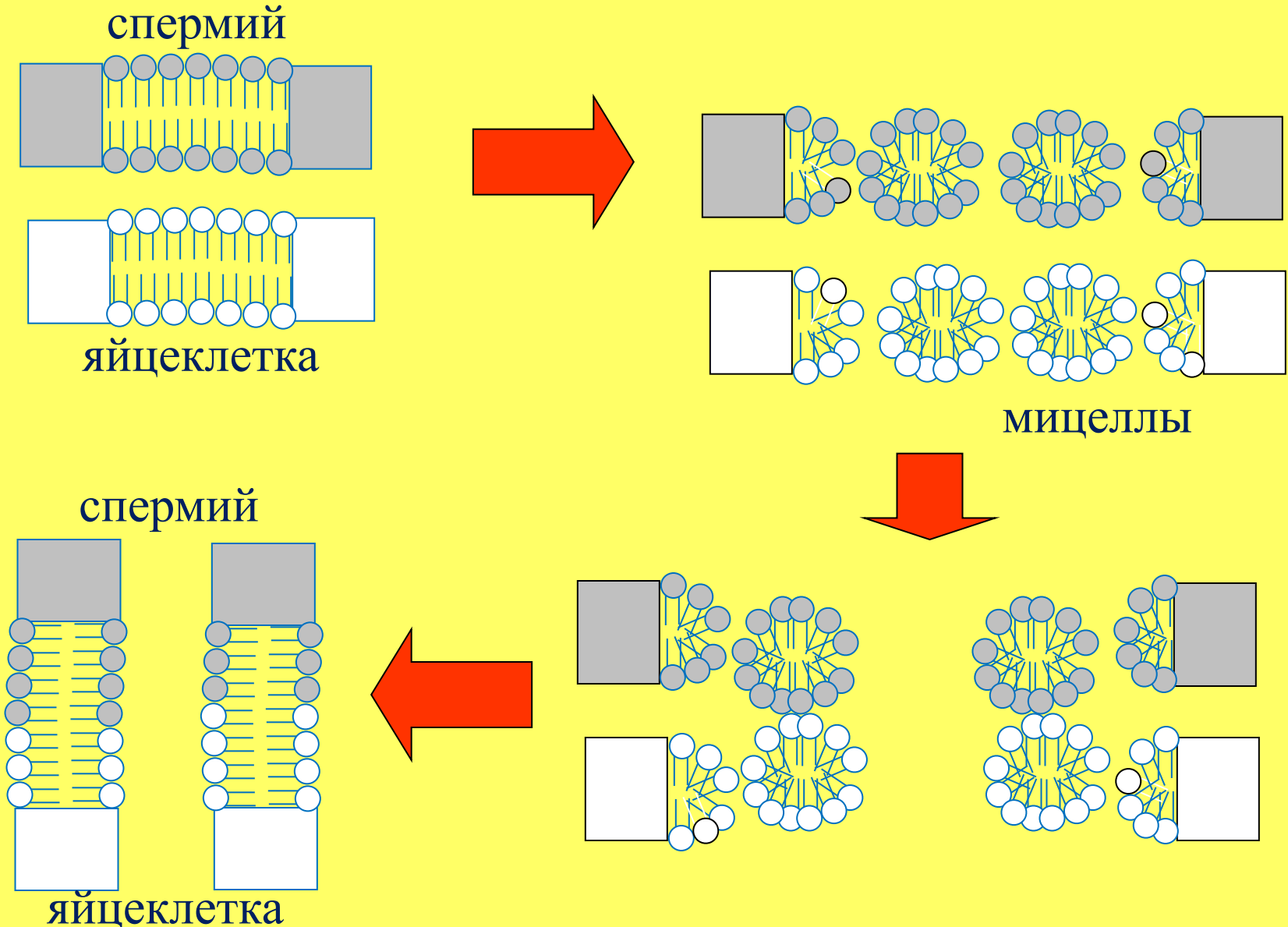


Нативная  
Ca-АТФаза



Поврежденная  
Ca-АТФаза

# Модель слияния плазматических мембран в месте контакта спермия с яйцеклеткой



# Методы изучения реакций с участием свободных радикалов

# Методы изучения свободных радикалов



## Электронный парамагнитный резонанс

1. Прямое обнаружение радикалов
2. Метод спиновых ловушек

## Хемилюминесценция

1. Собственная
2. Активированная

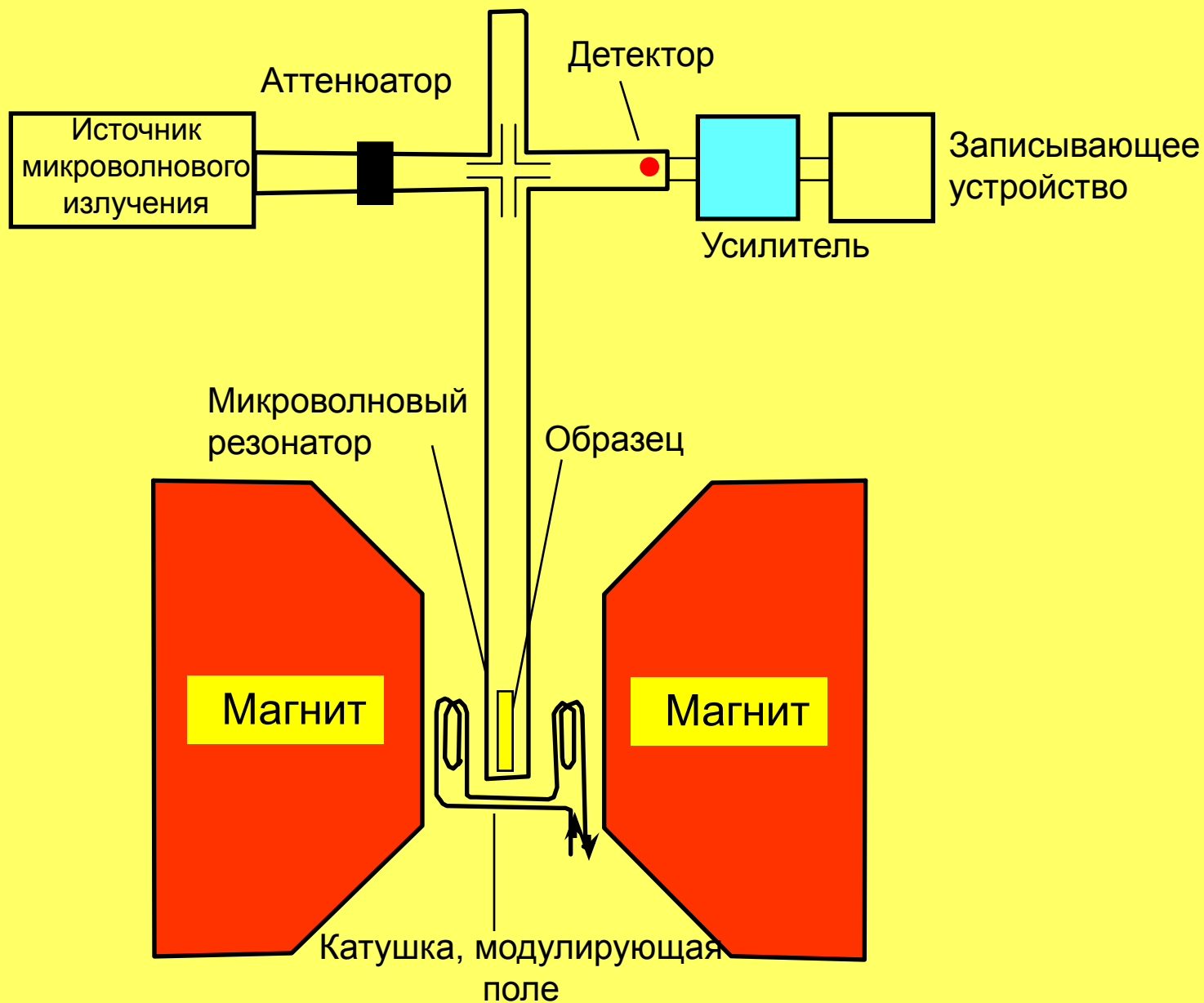
## Биохимические методы

1. Маркеры
2. Диеновая конъюгация
3. ТБК активные продукты
4. Ингибиторный анализ

# Метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР)

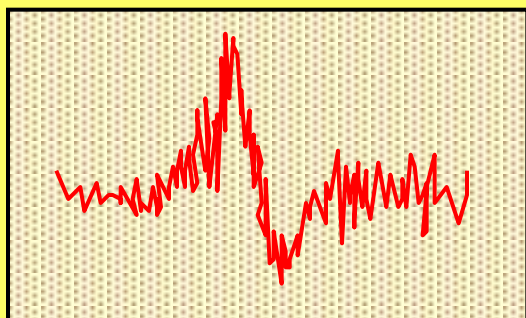
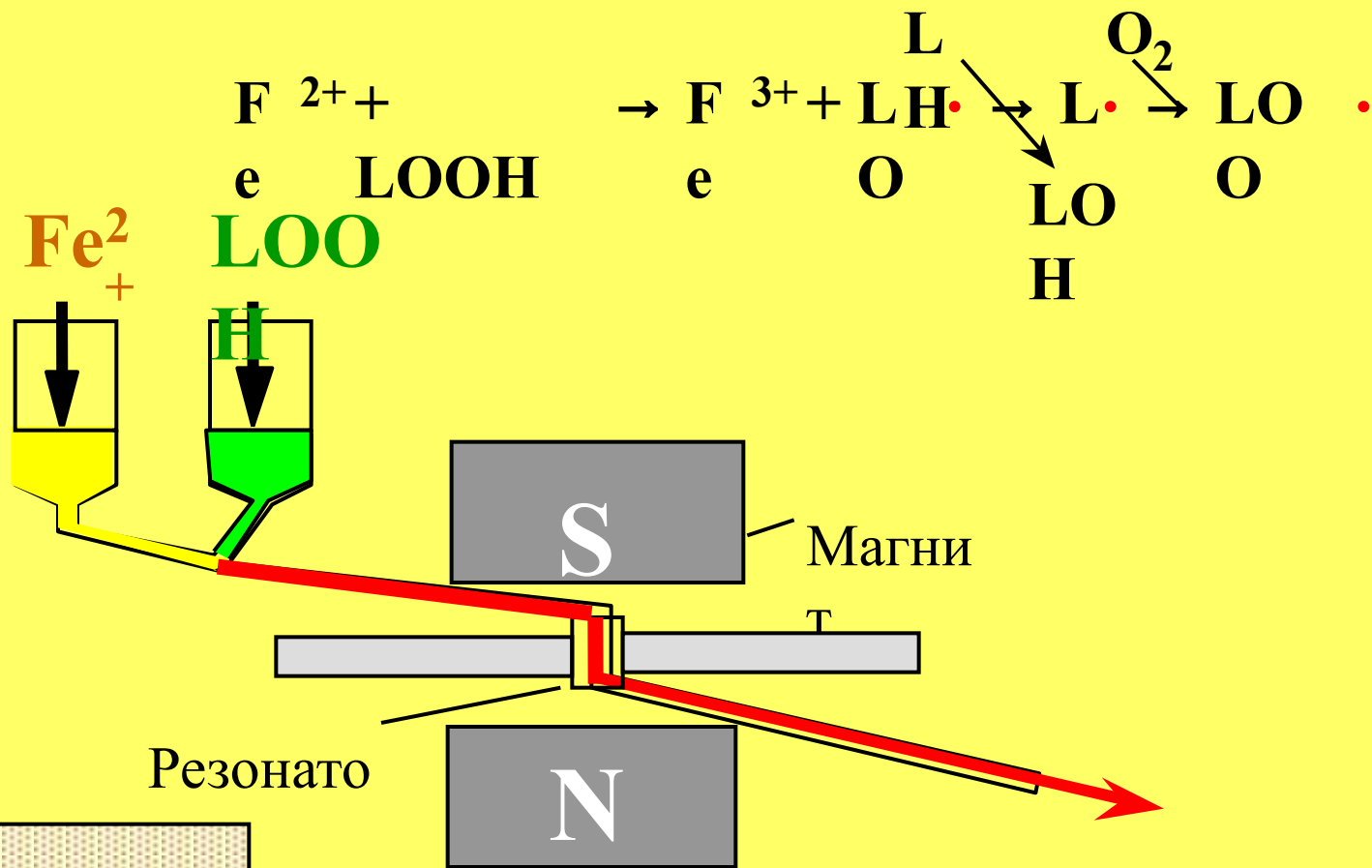
- **Прямое измерение сигнала радикалов**
  - Сигналы стабильных радикалов
  - Метод быстрого смешивания
  - Стабилизация радикалов при низких температурах
- **Метод спиновых ловушек**

# Радиоспектрометр ЭПР



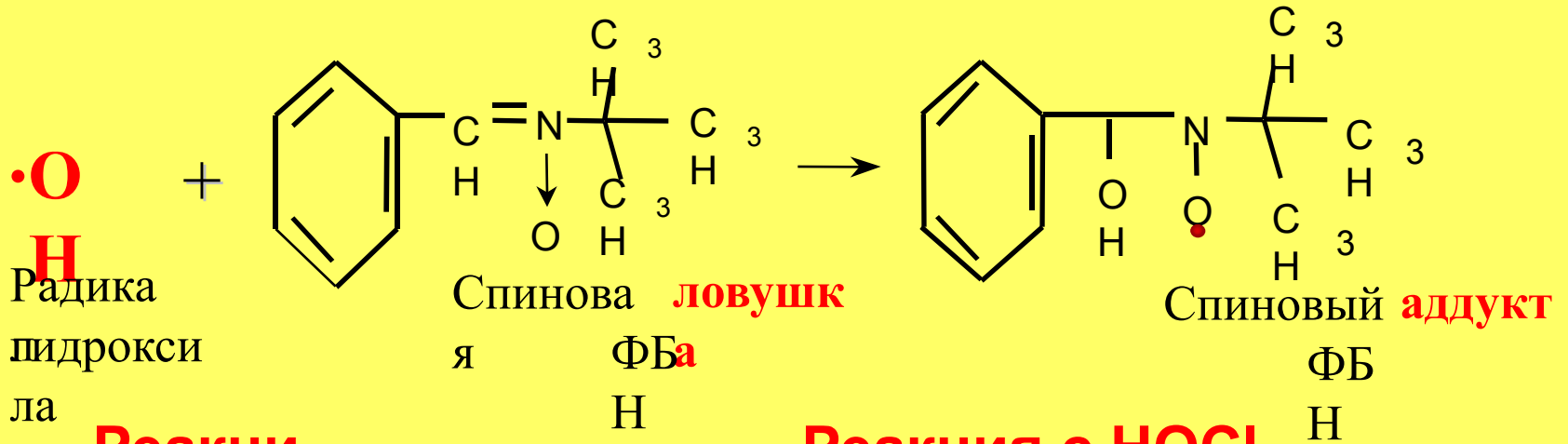


# Прямое обнаружение радикалов липидов методом ЭПР в проточной кювете

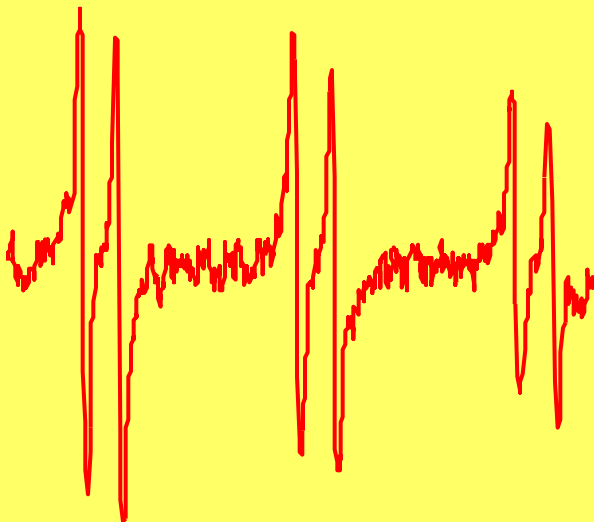
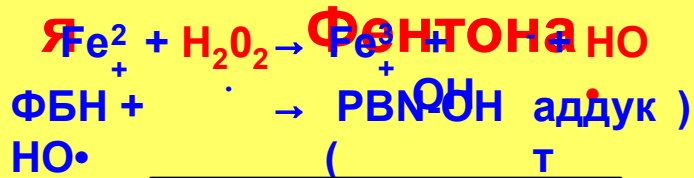


Сигнал  
ЭПР

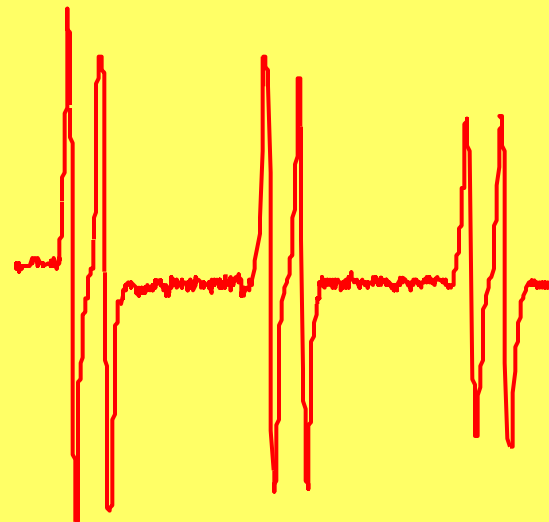
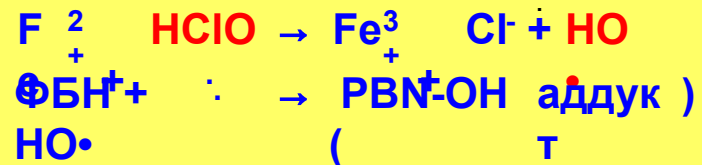
# Две реакции образования радикалов гидроксила



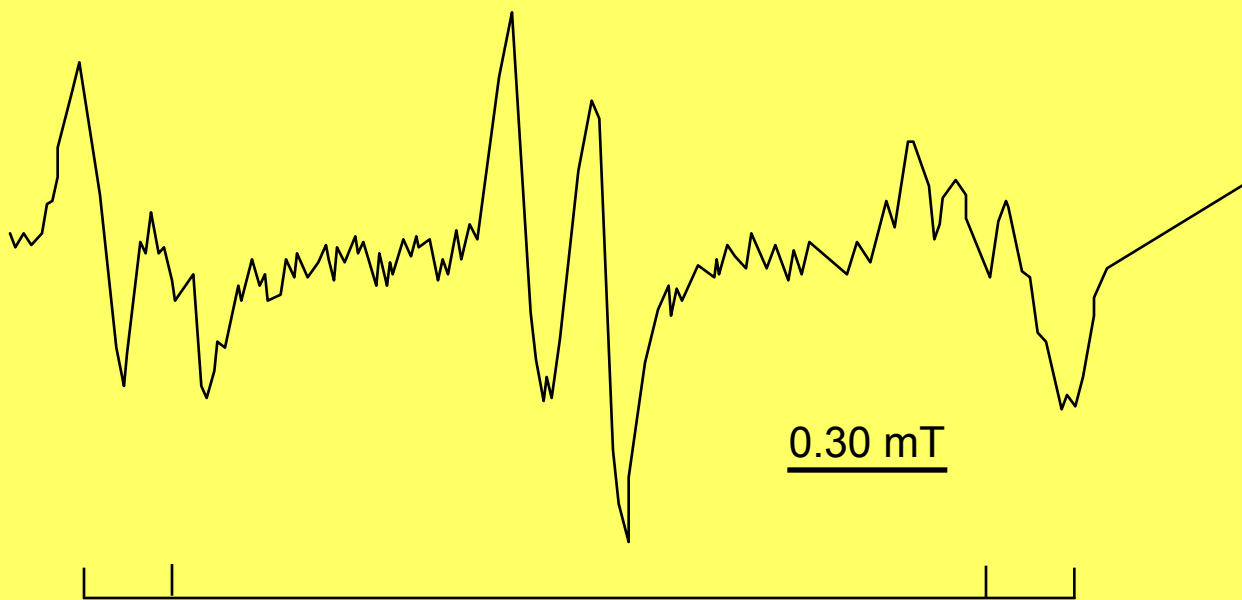
## Реакци



## Реакция с НОСІ

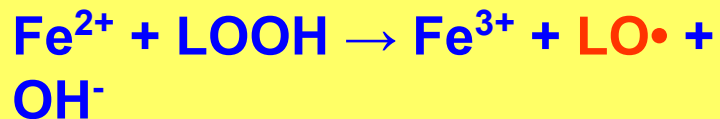


Сигнал ЭПР спиновых аддуктов радикалов олеиновой кислоты,  
образующихся в реакции ионов  $\text{Fe}^{2+}$  с гидроперекисью  
линоленовой кислоты



$$\alpha_{\text{N}} = 1,62 \text{ mT} \quad \alpha_{\text{H}} = 0,30 \text{ mT} \quad \Delta H = 0,1 \text{ mT}$$

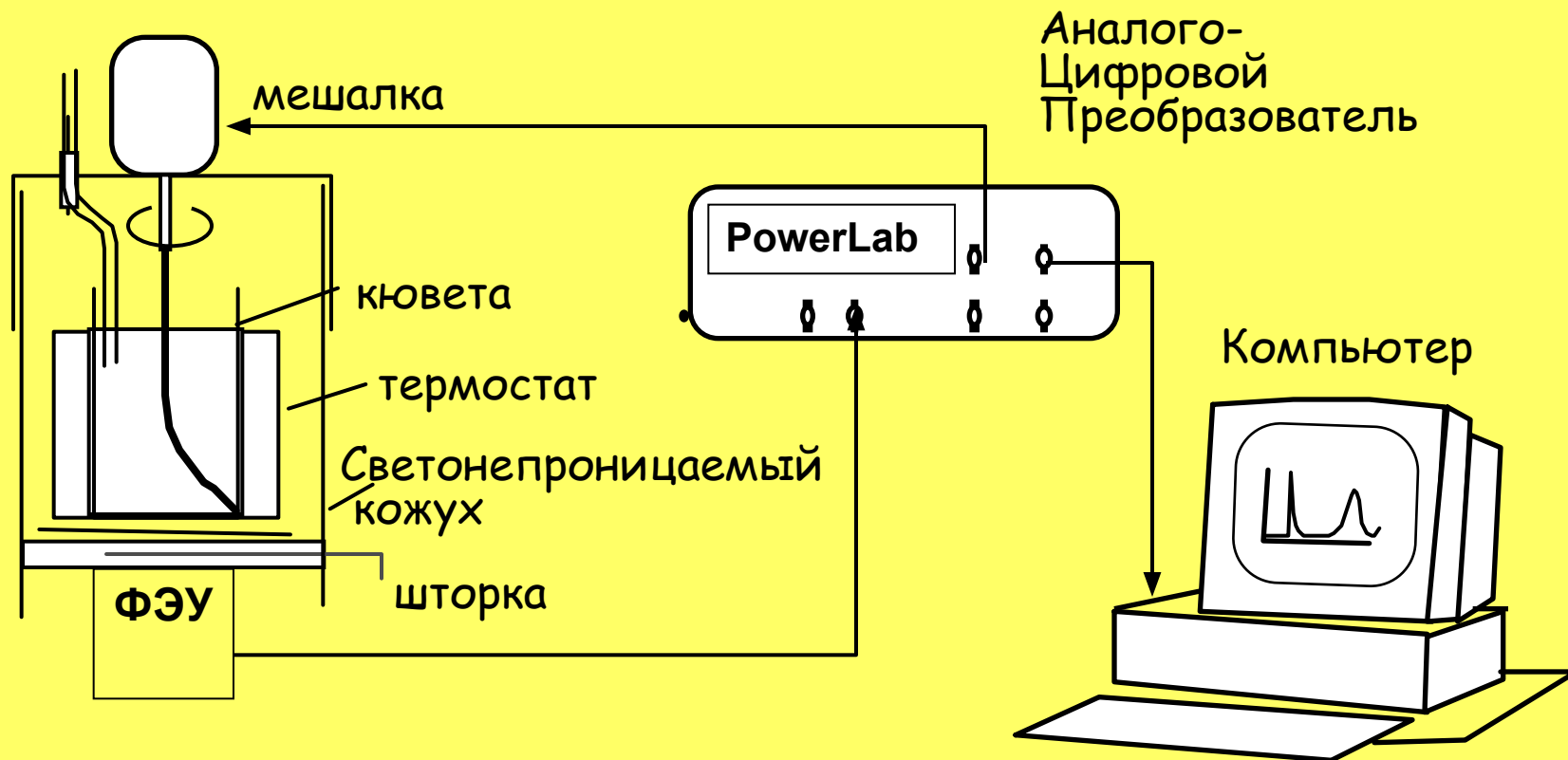
$$\alpha_{\text{N}} = 1,56 \text{ mT} \quad \alpha_{\text{H}} = 0,34 \text{ mT} \quad \Delta H = 0,06 \text{ mT}$$



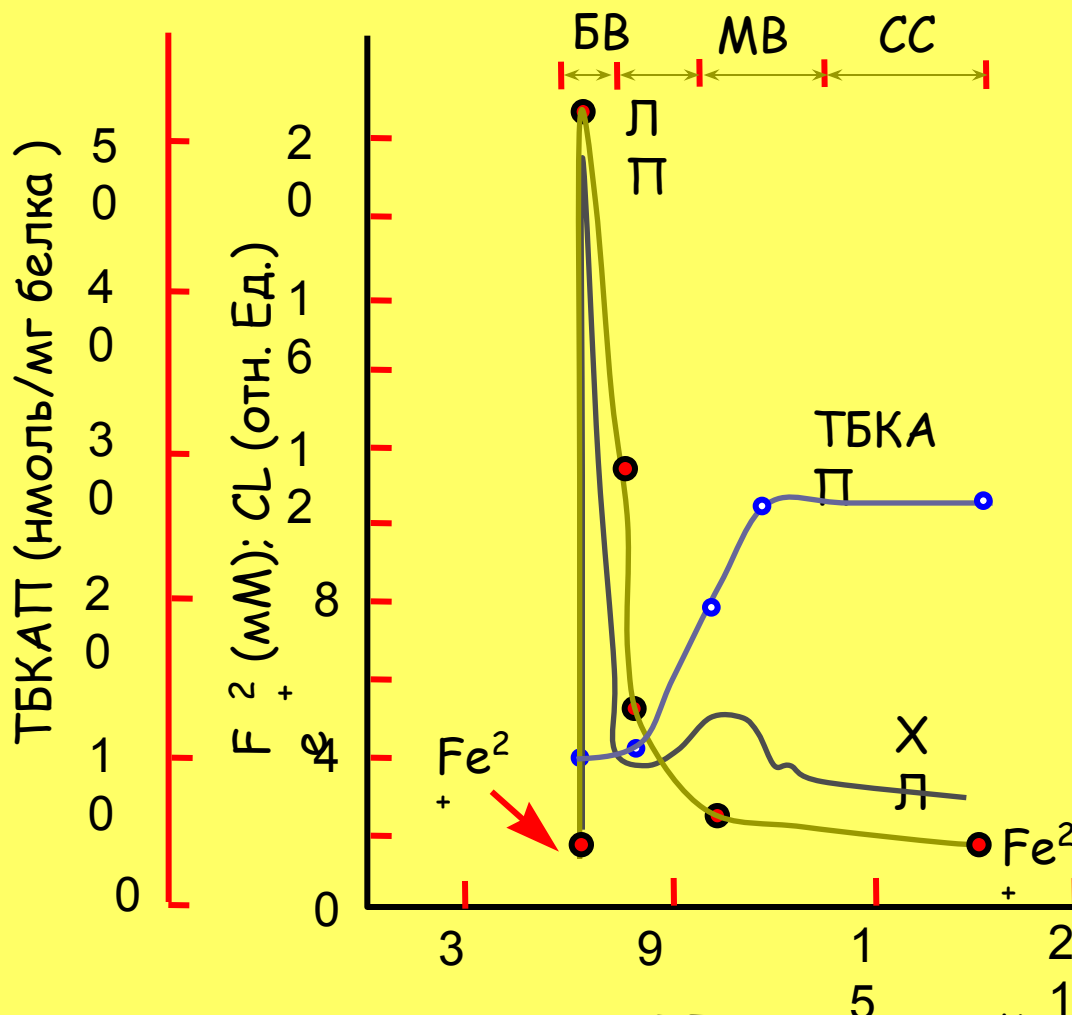
# Метод хемилюминесценции

- Собственная
- Активированная

# Современная установка для измерения ХЛ

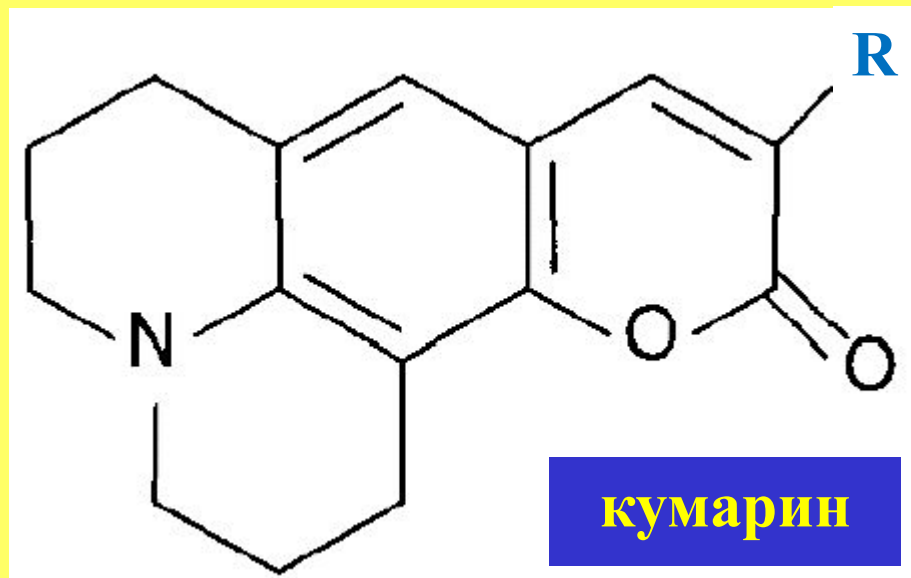


# Кинетика перекисного окисления липидов

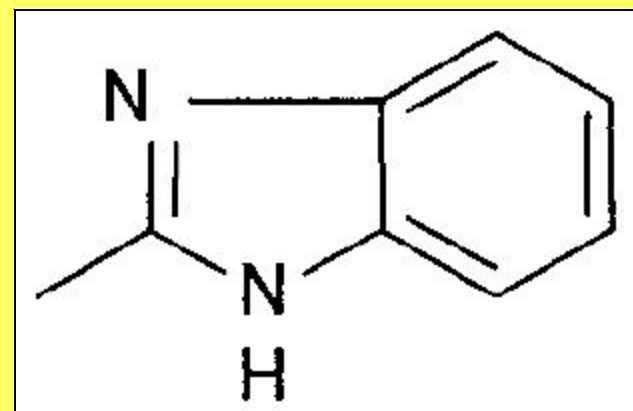


BV - быстрая вспышка;      ЛП - латентный период;  
 MB - медленная вспышка;    СС - стационарное свечение

# Структура производных кумаринов

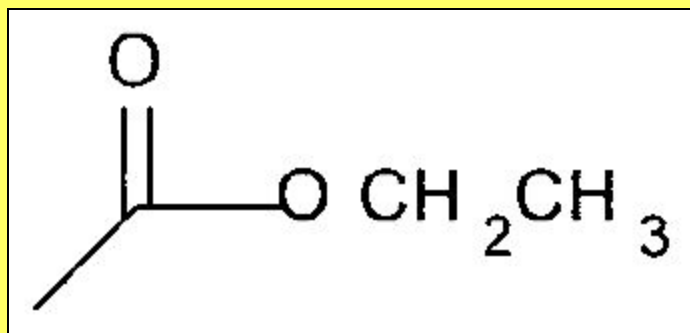


R =



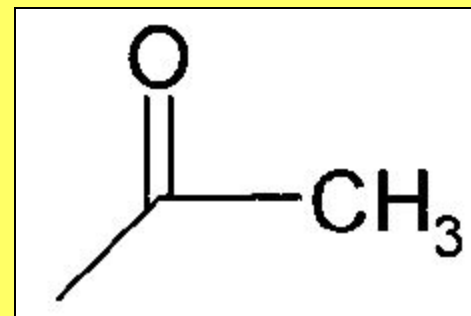
C-525

R =



C-314

R =



C-334

# Биохимические методы изучения свободных радикалов

- Биомаркеры
- Диеновая конъюгация
- ТБК активные продукты
- Ингибиторный анализ

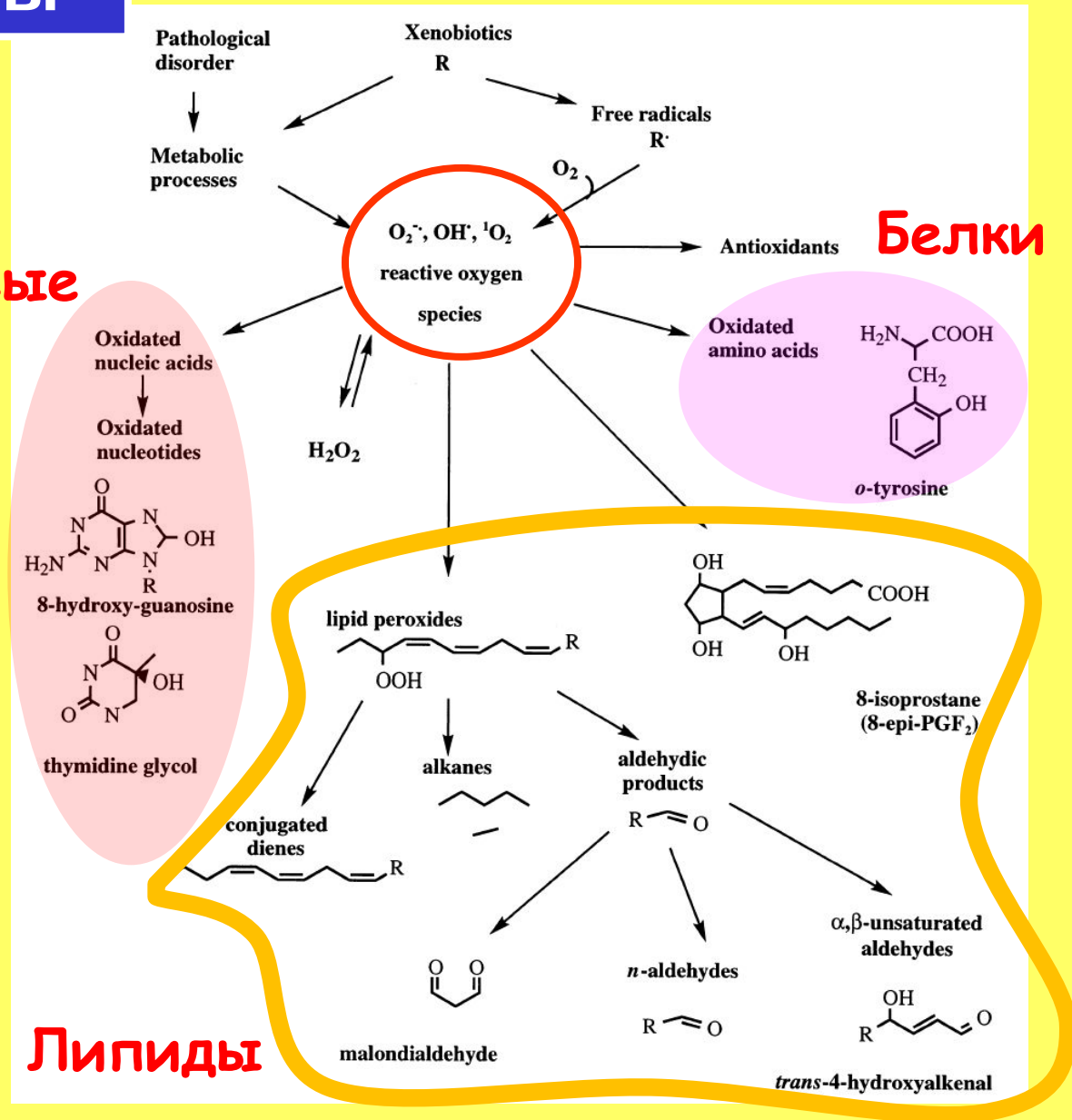


# Биомаркеры

# Биомаркеры

Нуклеиновые  
кислоты

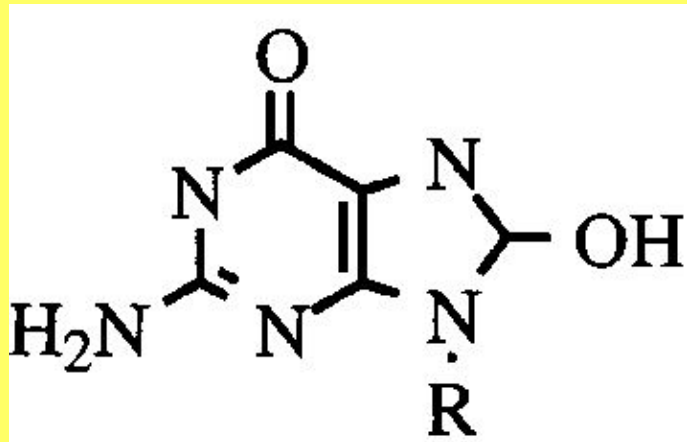
Белки



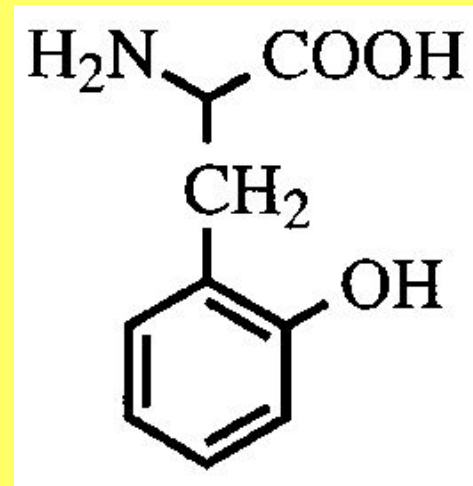
Липиды

de Zwart, L. L.,  
Meerman, J. H.,  
Commandeur, J. N.  
and Vermeulen, N. P.  
(1999). Free Radic Biol  
Med **26**(1-2): 202-26.

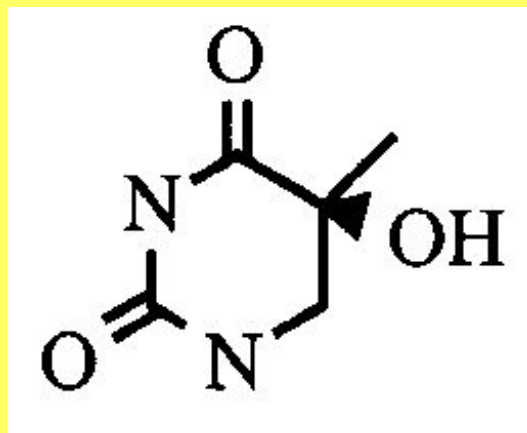
Маркеры оксидативного повреждения **нуклеиновых кислот** (слева) и **белков** (справа)



8-гидроксигуанозин



o-тирозин



ТИМИДИНГЛИКОЛЬ

# Биомаркеры на окисление арахидоновой кислоты

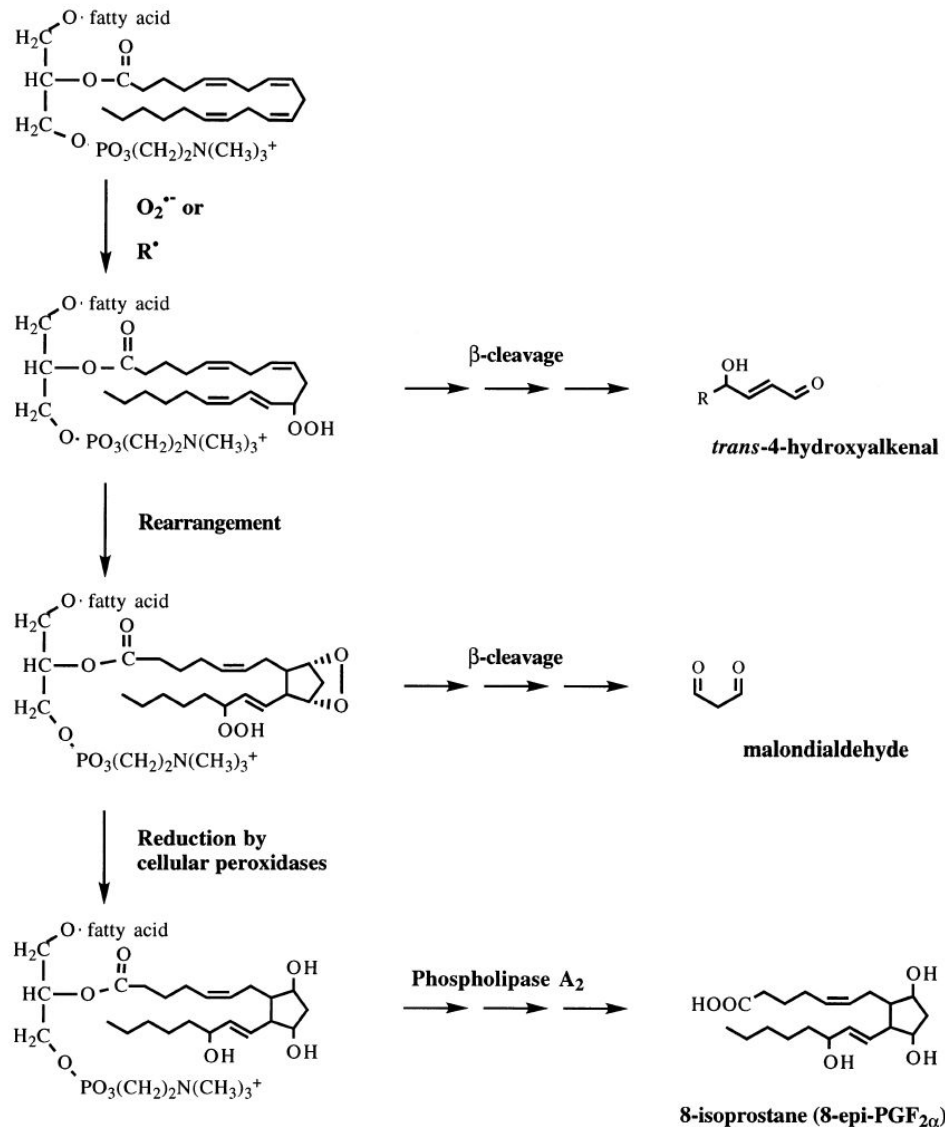


Fig. 2. The formation of 8-isoprostane. Radical-catalyzed ( $R^{\cdot}$  or  $O_2^{\cdot-}$ ) peroxidation of esterified arachidonic acid and subsequent release of 8-isoprostane.

# Структура некоторых изопростанов

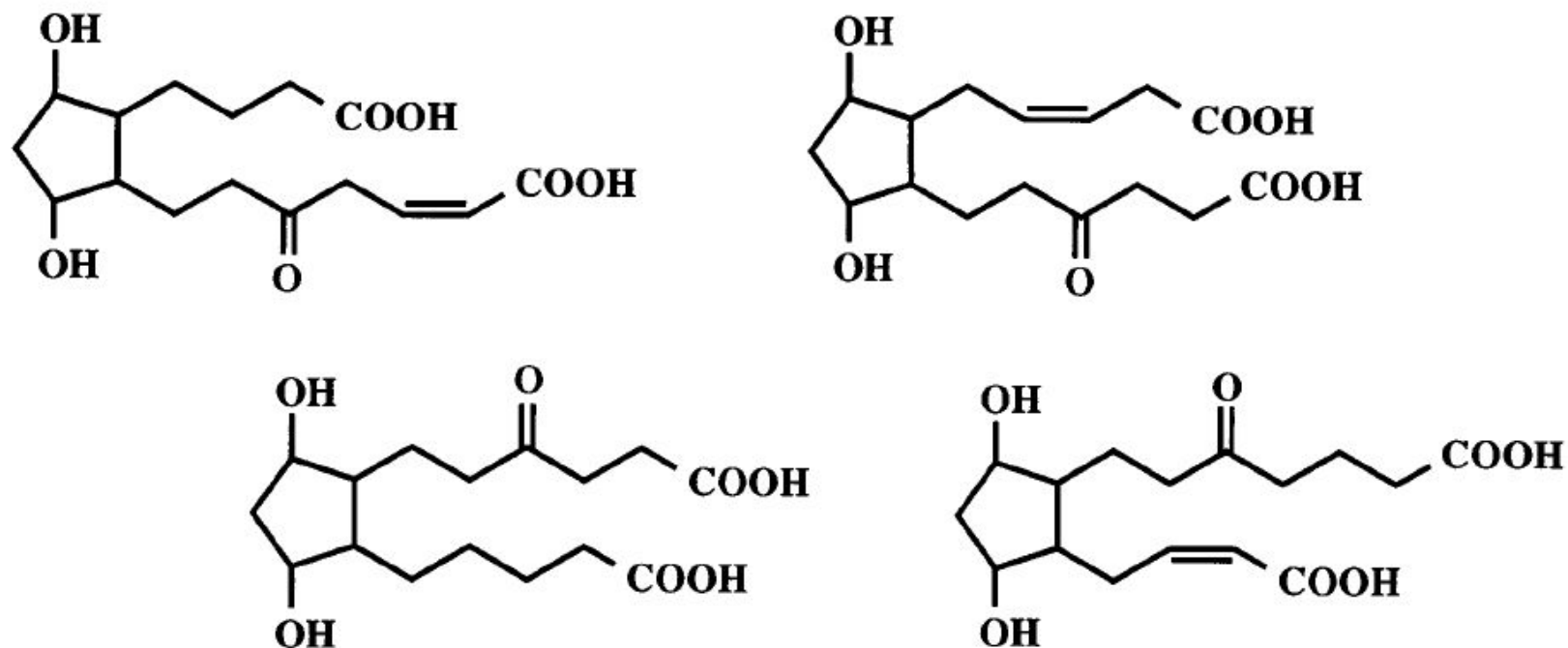
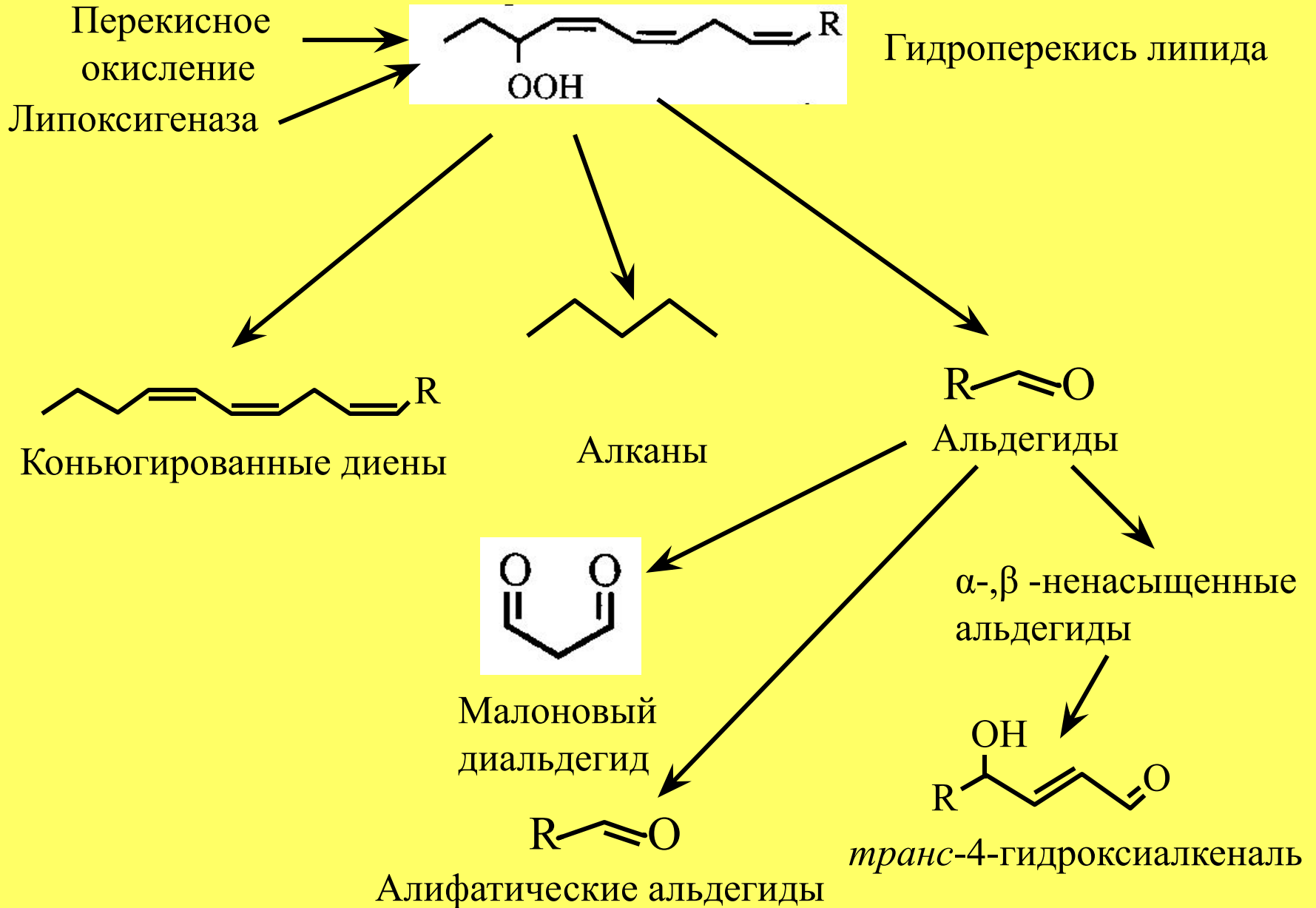
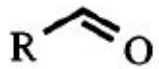


Fig. 4. Structures of metabolites of F<sub>2</sub>-isoprostane regioisomers [79].

# Маркеры липидной перекисидации



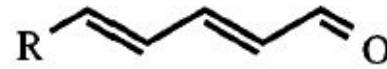
# Биомаркеры - карбонилы



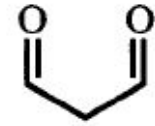
*n*-alkanals



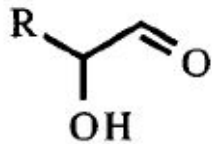
2-alkenals



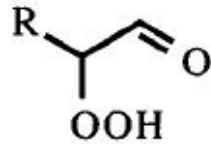
2,4-alkadienals



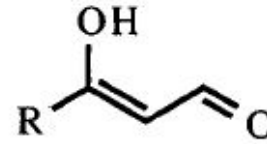
MDA



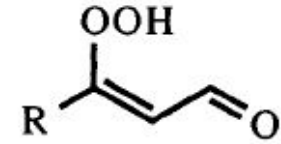
$\alpha$ -hydroxyalkanals



hydroperoxyalkanals



4-hydroxyalkenals



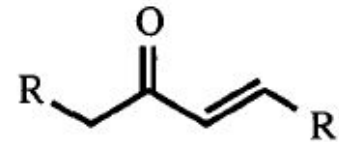
4-hydroperoxyalkenals



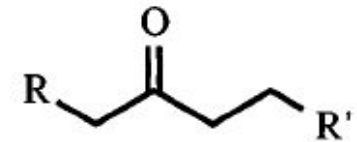
alkanes



alkenes



unsaturated ketones



saturated ketones

Fig. 6. Stable carbonyls formed following peroxidation of  $\omega$ -3 and  $\omega$ -6 fatty acids.

# Образование изопростановых биомаркеров при отравлении четыреххлористым углеродом

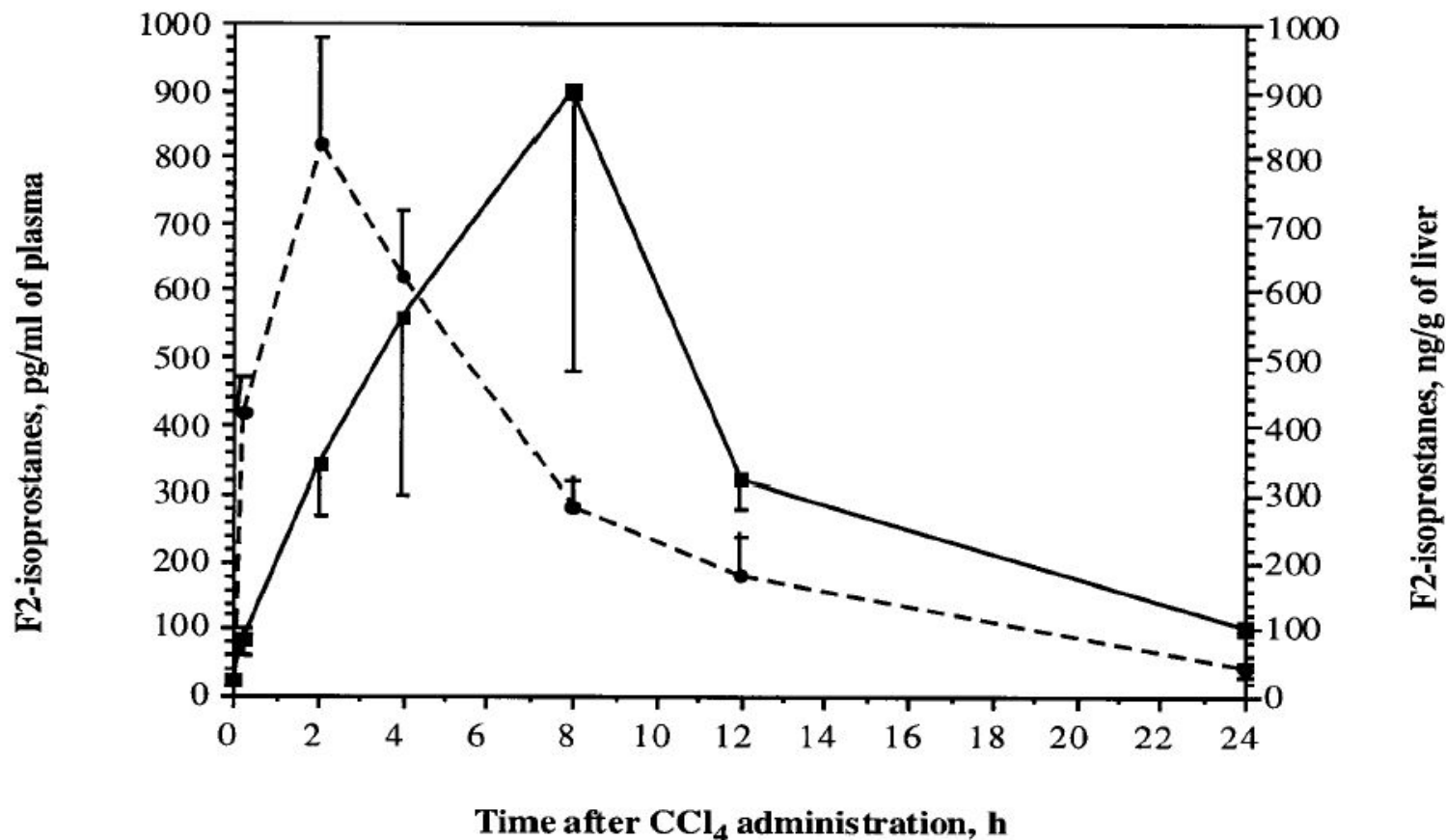


Fig. 3. Time course of appearance of lipid-associated F<sub>2</sub>-isoprostanes in liver (●) and free F<sub>2</sub>-isoprostanes in the circulation (■) of rats after intragastric administration of CCl<sub>4</sub> (1 ml/kg). Each time point represents the mean ± SD of levels of measured in at least four animals (replot of data from ref. 77).



# Биомаркеры у курильщиков

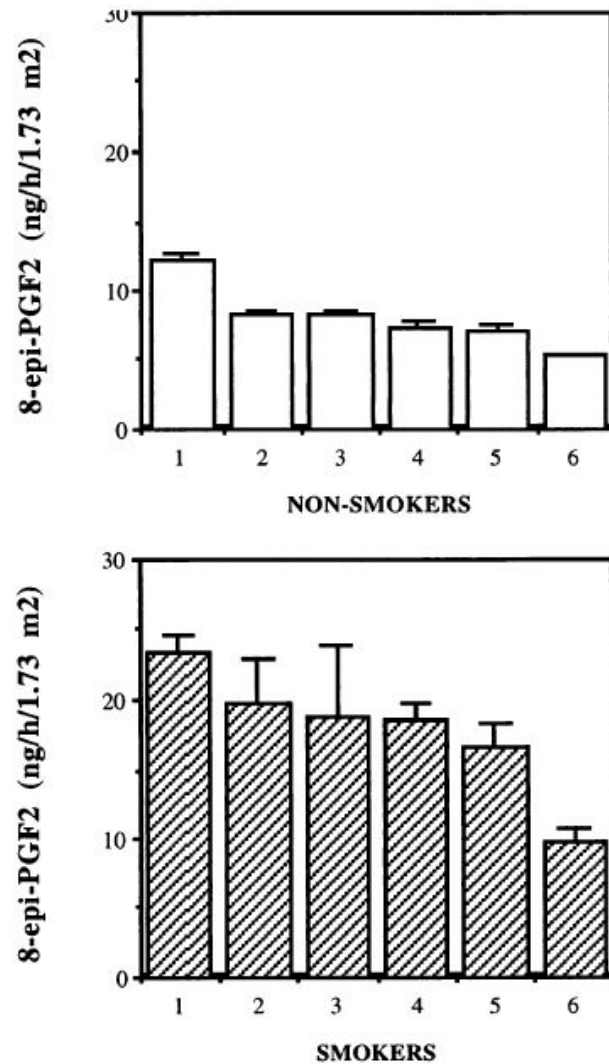
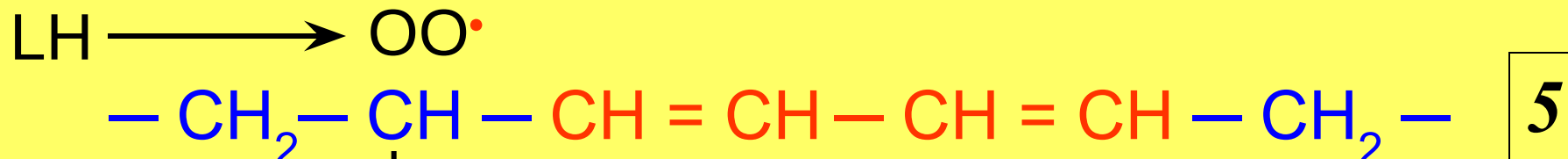
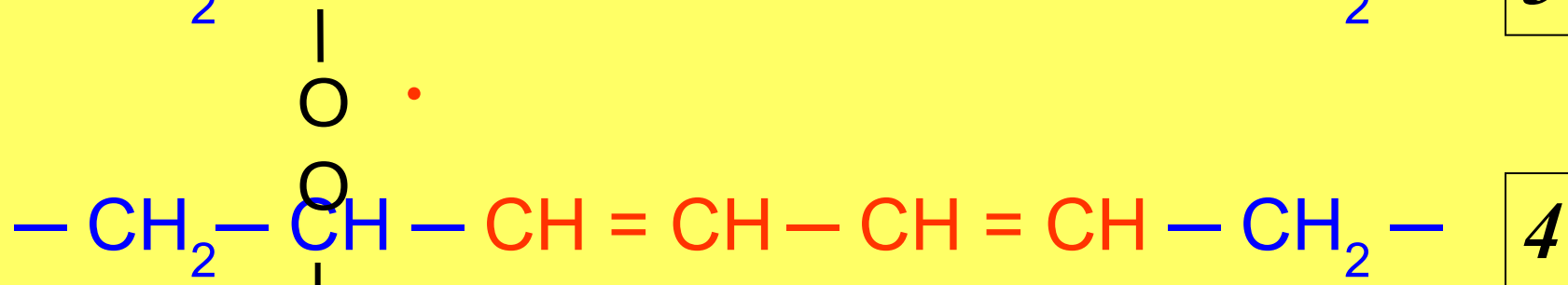
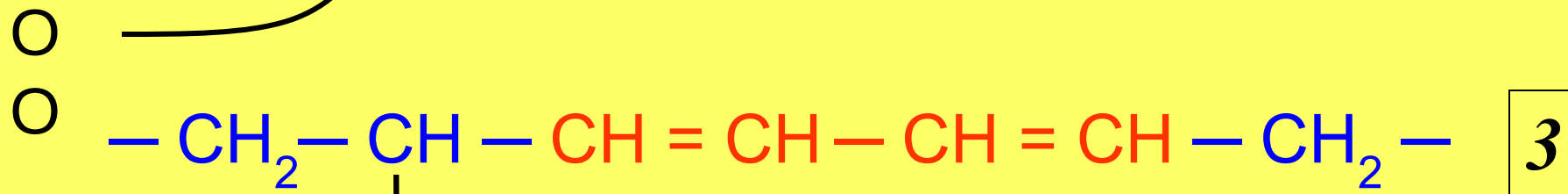
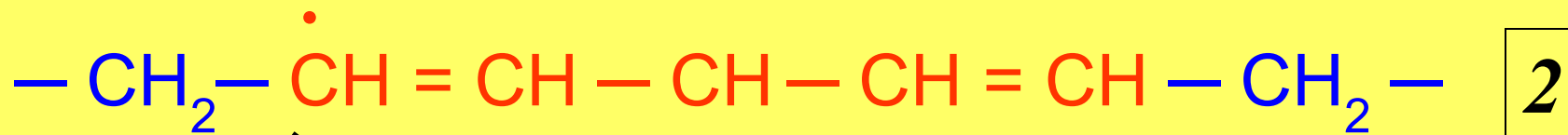
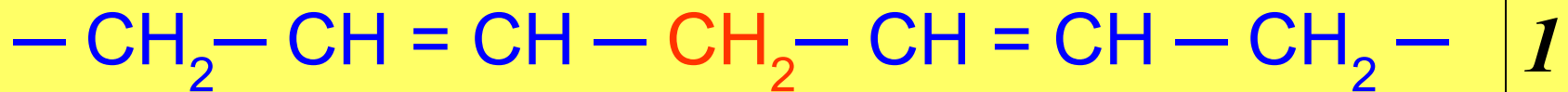


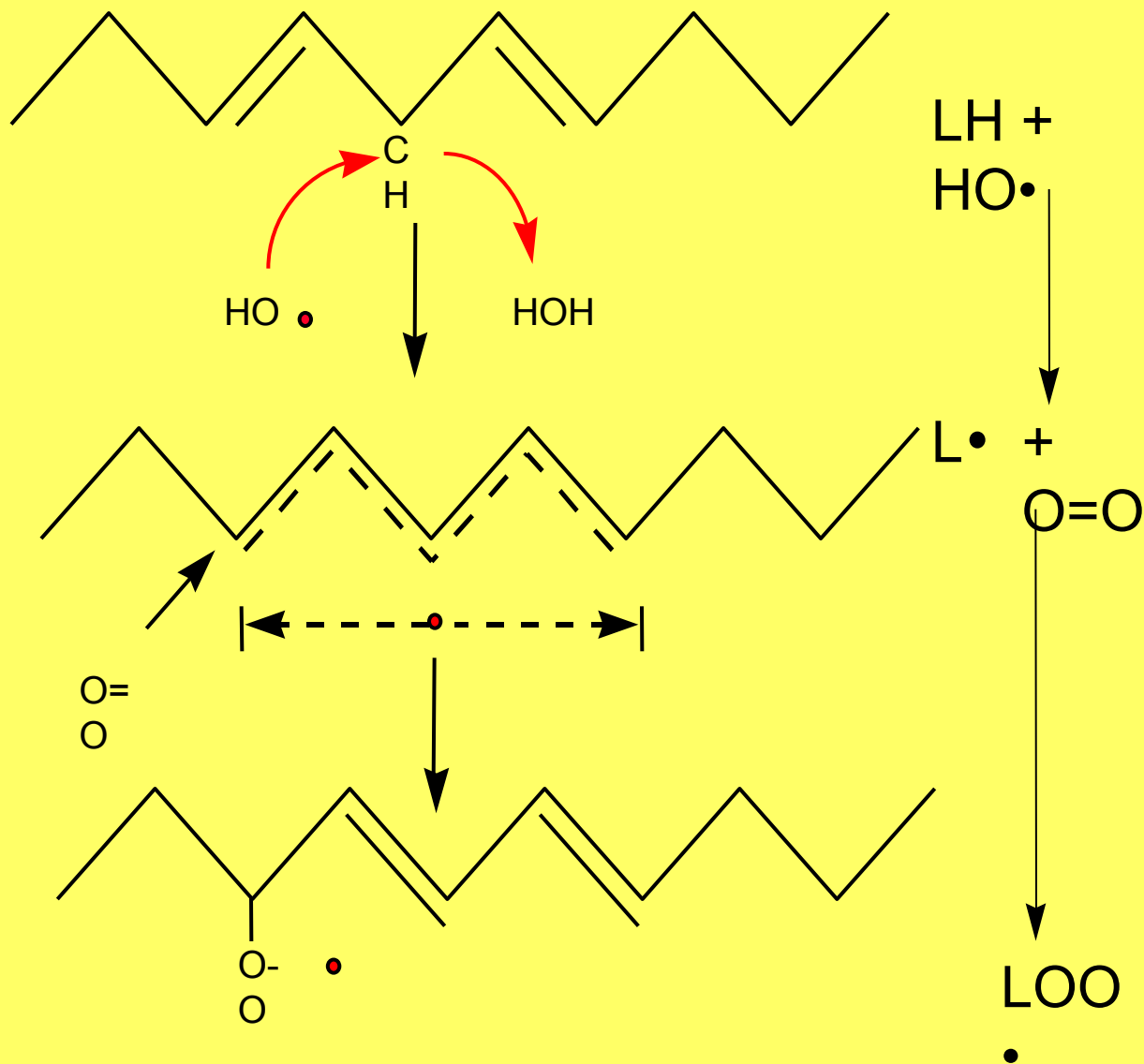
Fig. 5. Urinary excretion of 8-epi-PGF<sub>2α</sub> in non-smoking and smoking healthy volunteers. Each bar represents the mean individual value ( $\pm$ SD) based on 6 h urine collections on different days ( $n = 3$ ) (data replotted from Bachi et al. [92]).

# Диеновая конъюгация

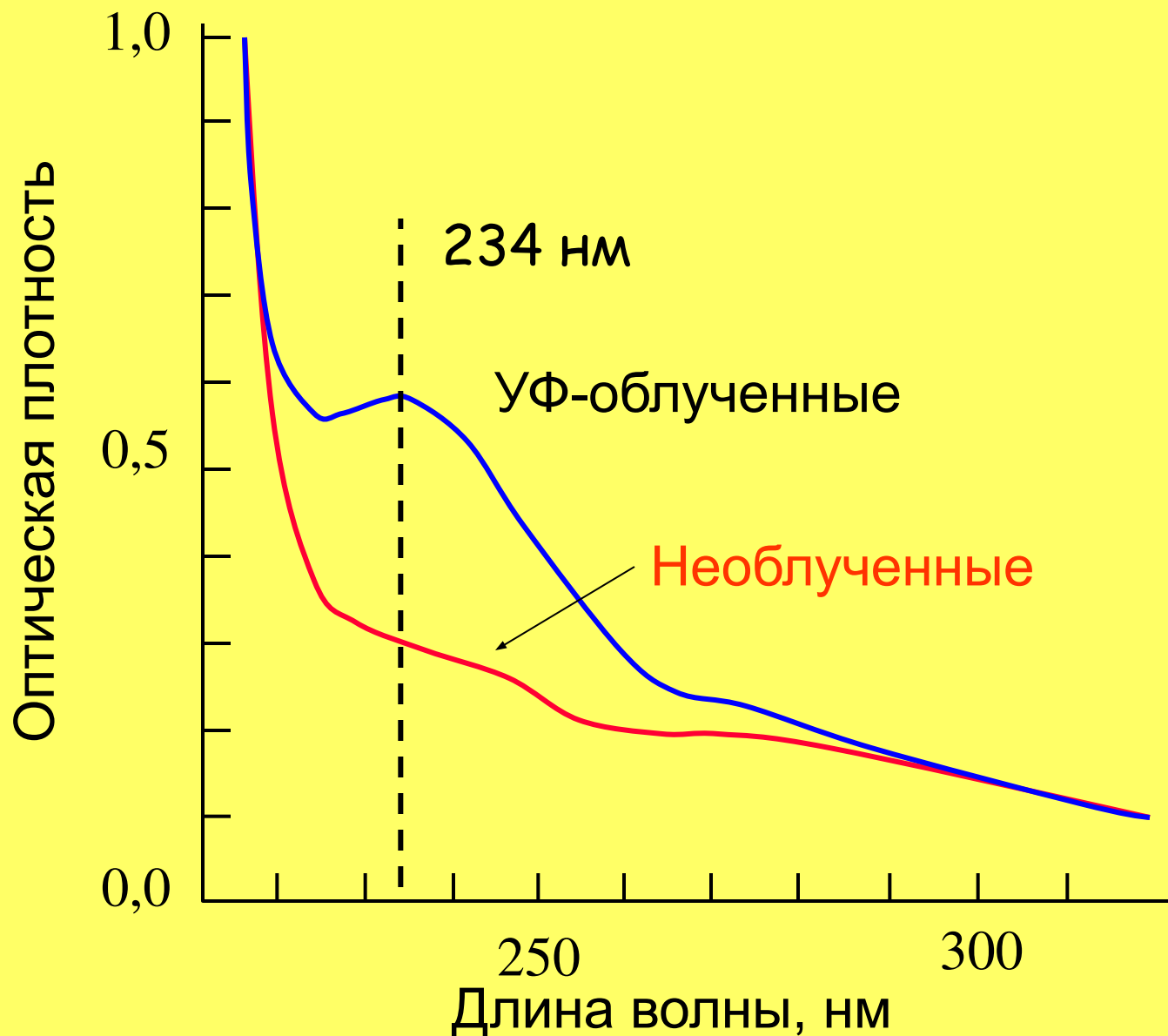
# Реакции диеновой конъюгации



# Схема образования диеновых конъюгатов



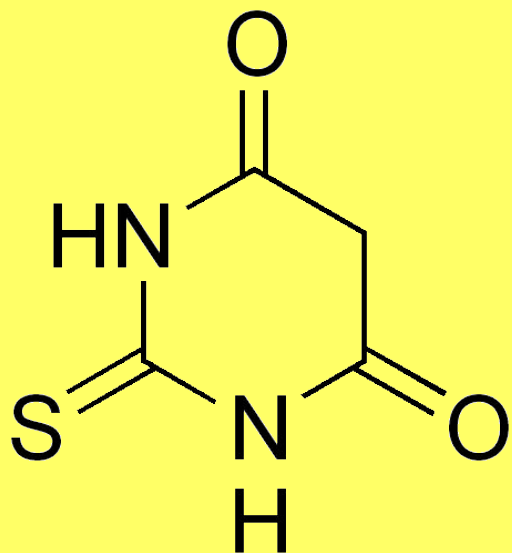
# Спектр поглощения диеновых конъюгатов



# Метод с тиобарбитуровой кислотой

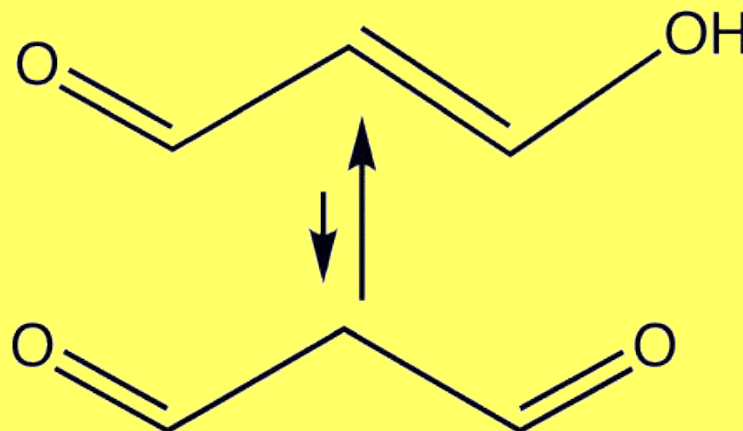
# Метод ТБК активных продуктов

(TBARS, ThioBarbituric Acid Reactive Substance)



Тиобарбитуровая кислота

+



Малоновый диальдегид

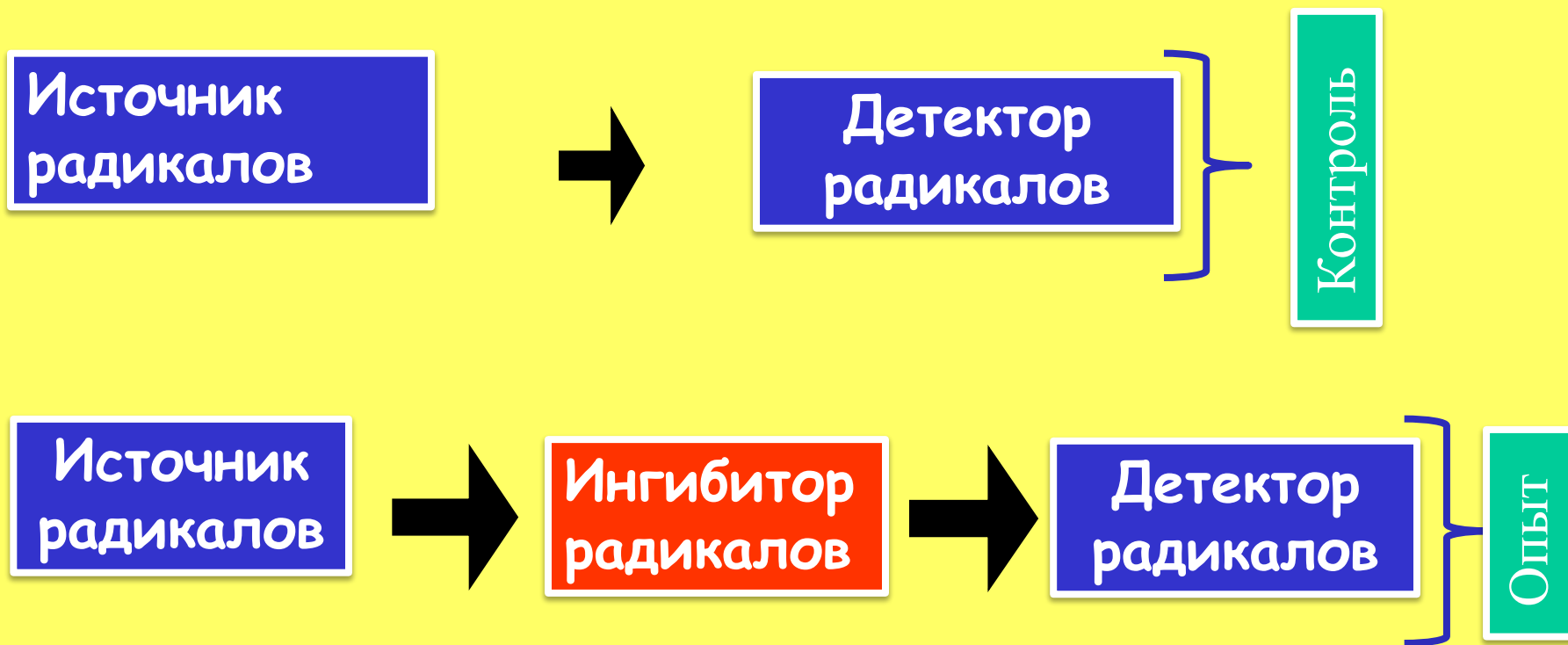


Окрашенный флуоресцирующий продукт,  
имеющий поглощение при 532 нм

# Ингибиторный анализ



# Ингибиторный анализ



# Пример 1: обнаружение супероксидных радикалов

Ксантинооксидаза  
(генератор супероксида)



Цитохром с  
(детектор супероксида)

Ксантинооксидаза  
(генератор супероксида)



Цитохром с  
(детектор супероксида)



Супероксиддисмутаза  
(перехватчик супероксида)

## Пример 2: обнаружение перекисного окисления ЛИПИДОВ

Индукторы  
ПОЛ



Измерение  
диеновых  
конъюгатов

Индукторы  
ПОЛ



Антиоксиданты



Измерение  
диеновых  
конъюгатов

# Вопросы к зачету:

1. Перечислите основные методы изучения реакций с участием свободных радикалов.
2. Биомаркеры для изучения оксидативного повреждения белков и нуклеиновых кислот.
3. Биомаркеры для обнаружения липидной пероксидации в организме пациентов.
4. Что Вы знаете об анализе алканов в выдыхаемом воздухе.
5. Метод диеновой конъюгации. Теоретические основы и способы определения конъюгированных диенов.
6. Применение ингибиторов при изучении роли радикалов в различных процессах.