

# Биофизические основы патологии клетки

Свободные радикалы и болезни человека

Ю.А. Владимиров, А.Н. Осипов  
2018

# Хемилюминесценция при перекисном окислении липидов

# Триггерная функция $Fe^{2+}$

$$① \frac{[LOOH]}{[LOOH]_0} = \frac{[L \cdot]}{[L \cdot]_0} = \frac{v_{\text{пол}}}{v_{\text{пол-0}}} = e^{\gamma t}$$

$$② \gamma = k_p \left( [O_2] \frac{k_2}{k_9} - [Fe^{2+}] \right)$$

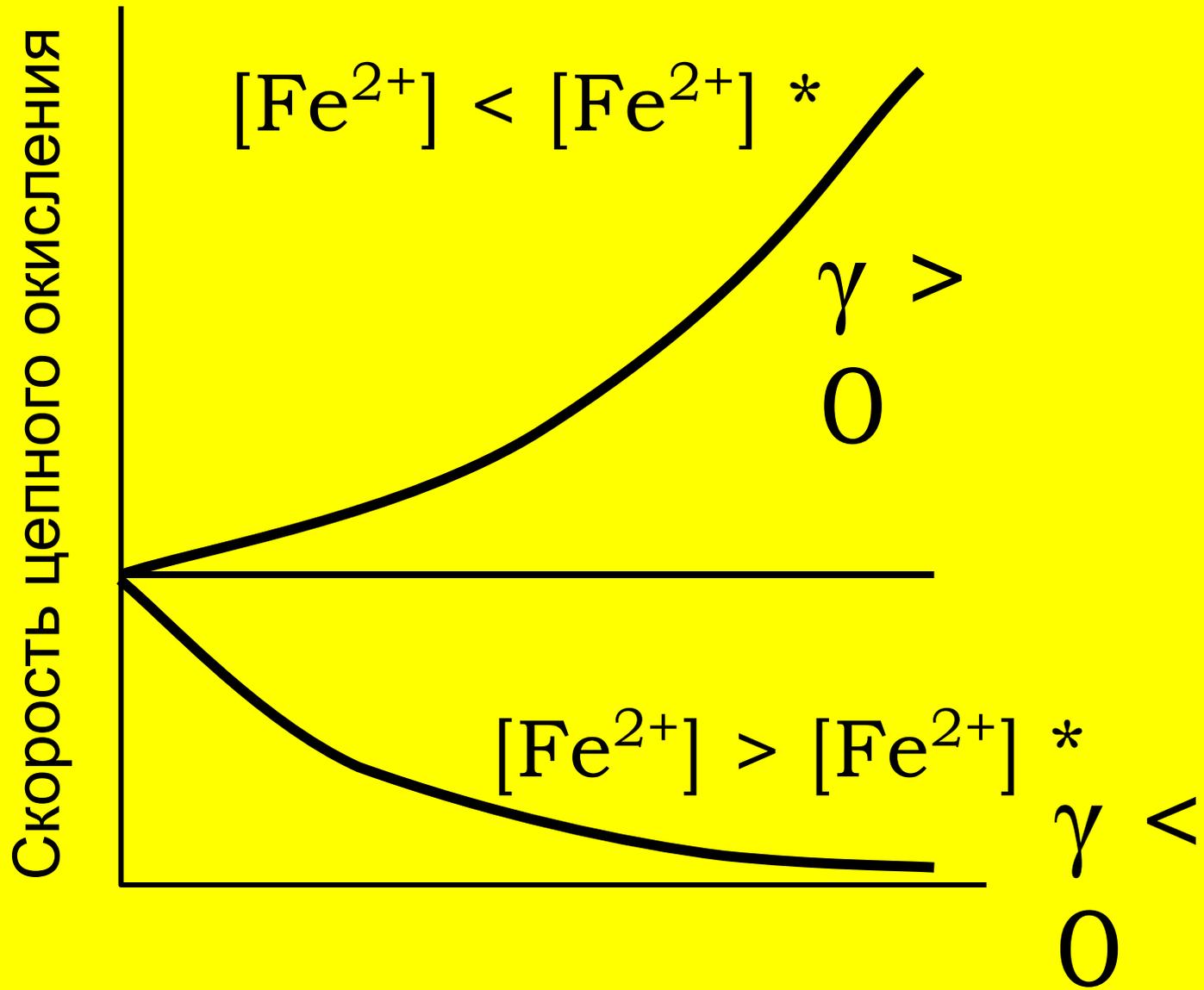
$$③ \text{ При } \gamma = 0 \quad [Fe^{2+}] = [O_2] \frac{k_2}{k_9} = [Fe^{2+}]_{\text{крит}}$$

$$④ \gamma = k_p ([Fe^{2+}]^* - [Fe^{2+}])$$

$$⑤ \text{ При } [Fe^{2+}] > [Fe^{2+}]^*, \gamma < 0$$

$$⑥ \text{ При } [Fe^{2+}] < [Fe^{2+}]^*, \gamma > 0$$

# Железо как *про*- и *анти*оксидант



# Уравнения реакций цепного окисления липидов



## Скорости реакций

$$v_0 =$$

$$v_1 = k_1 [\text{LH}][\text{HO}\cdot]$$

$$v_2 = k_2 [\text{O}_2][\text{L}\cdot]$$

$$v_3 = k_3 [\text{LH}][\text{LOO}\cdot]$$

$$v_p = k_p [\text{Fe}^{2+}][\text{LOOH}]$$

$$v_5 = k_5 [\text{LH}][\text{LO}\cdot]$$

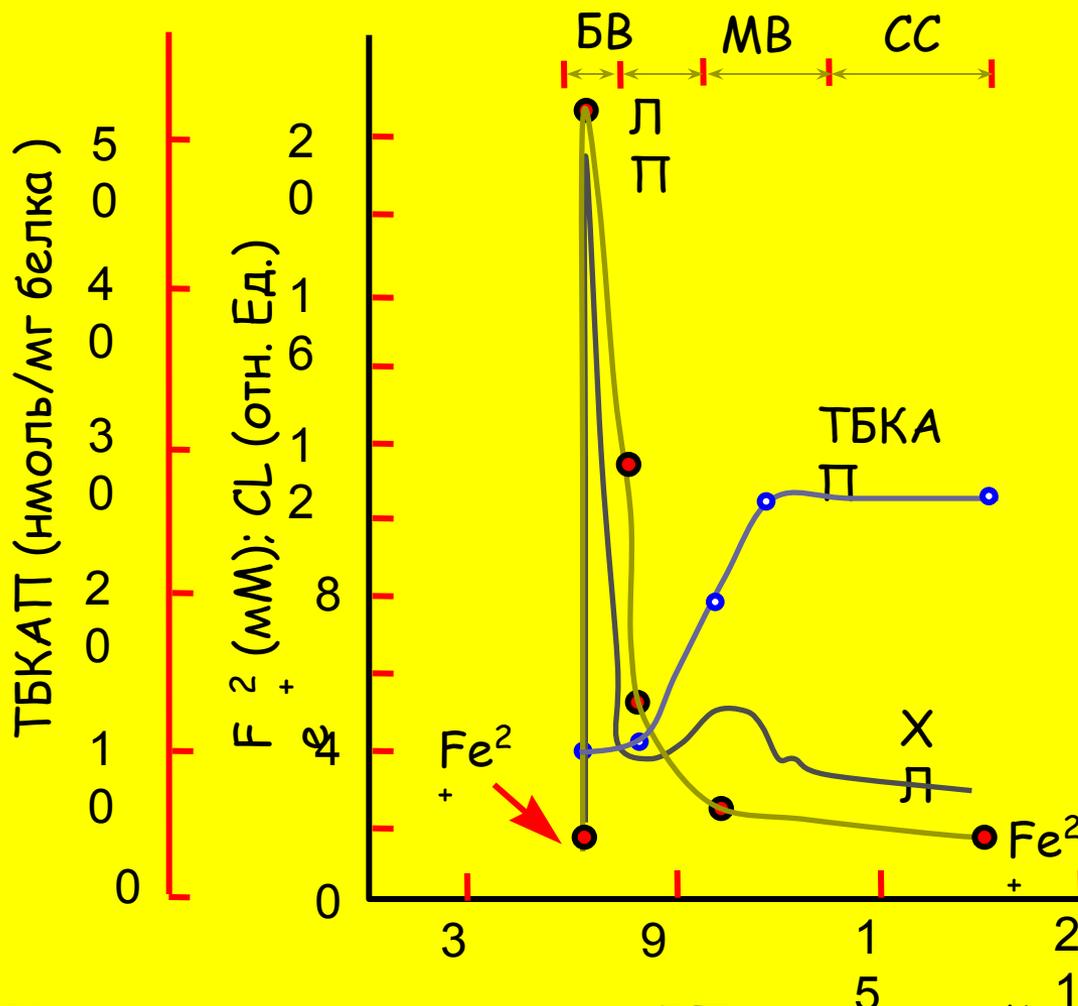
$$v_6 = k_6 [\text{LOO}\cdot]_2$$

$$v_7 = k_7 [\text{InH}][\text{L}\cdot]$$

$$v_8 = k_8 [\text{In}\cdot][\text{L}\cdot]$$

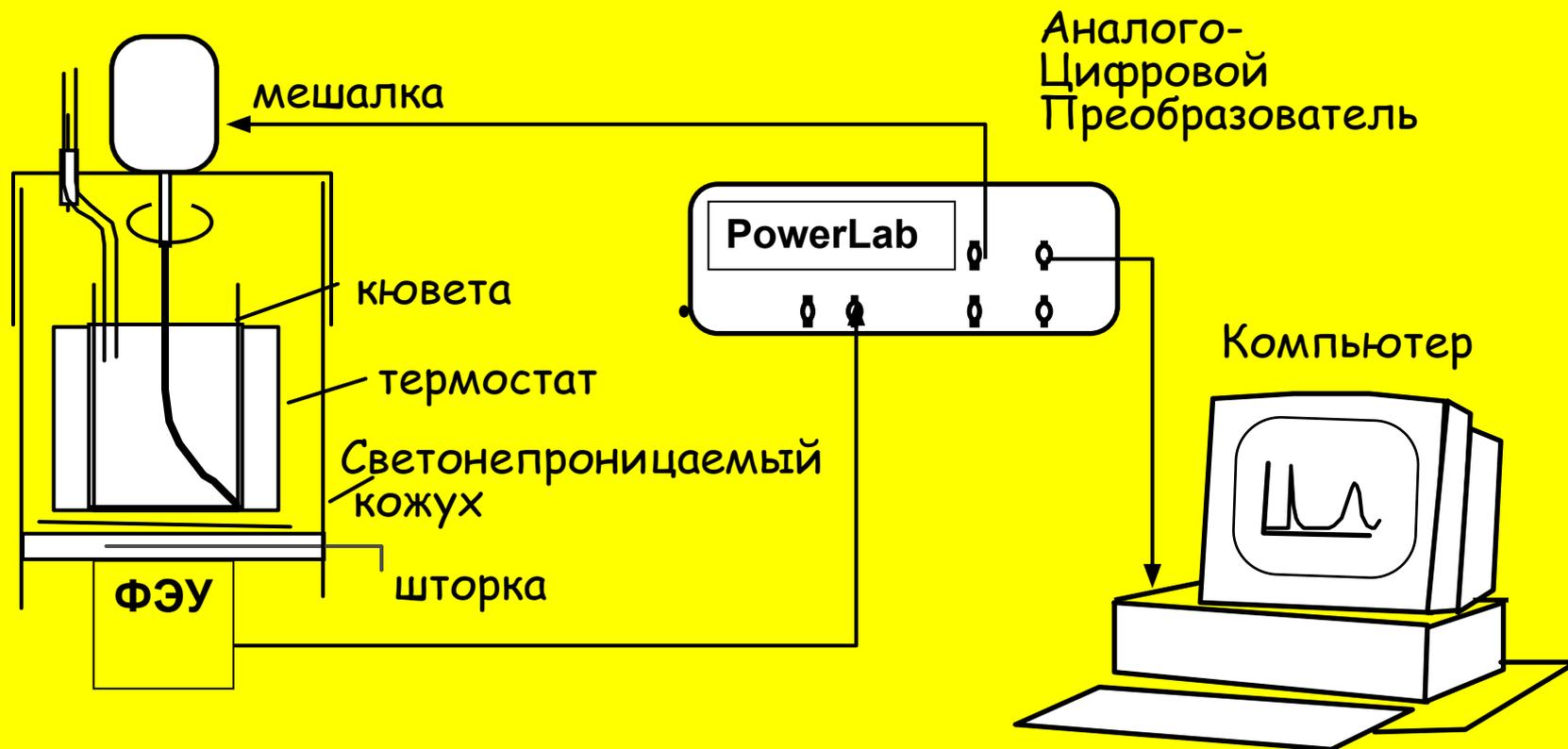
$$v_9 = k_9 [\text{Fe}^{2+}][\text{L}\cdot]$$

# Кинетика перекисного окисления липидов

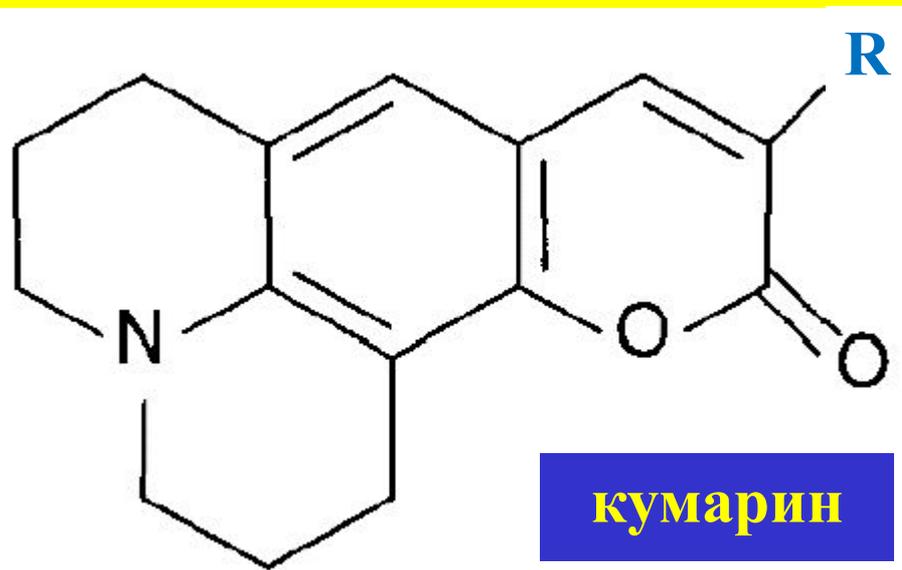


BV - быстрая вспышка;      ЛП - латентный период;  
 MB - медленная вспышка;    СС - стационарное свечение

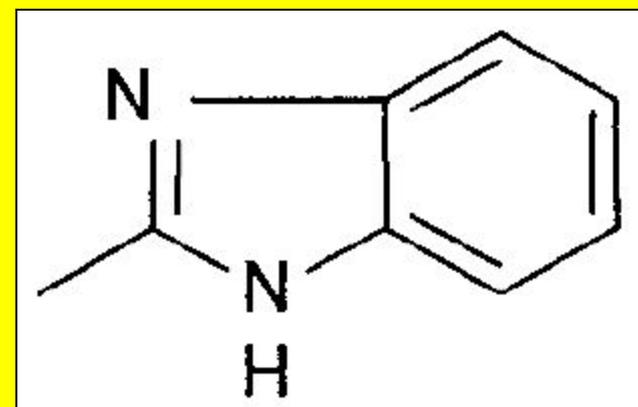
# Современная установка для измерения ХЛ



# Структура производных кумаринов

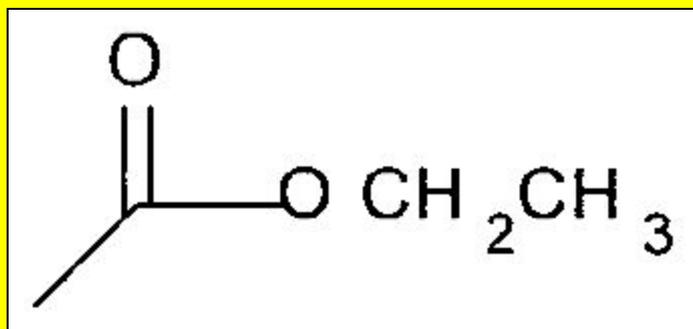


R =



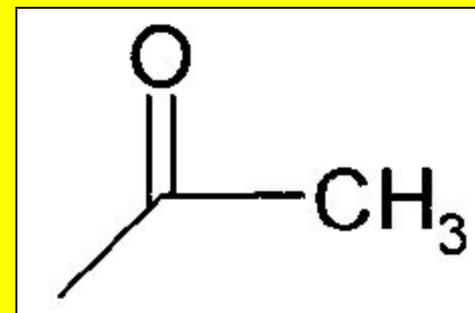
**C-525**

R =



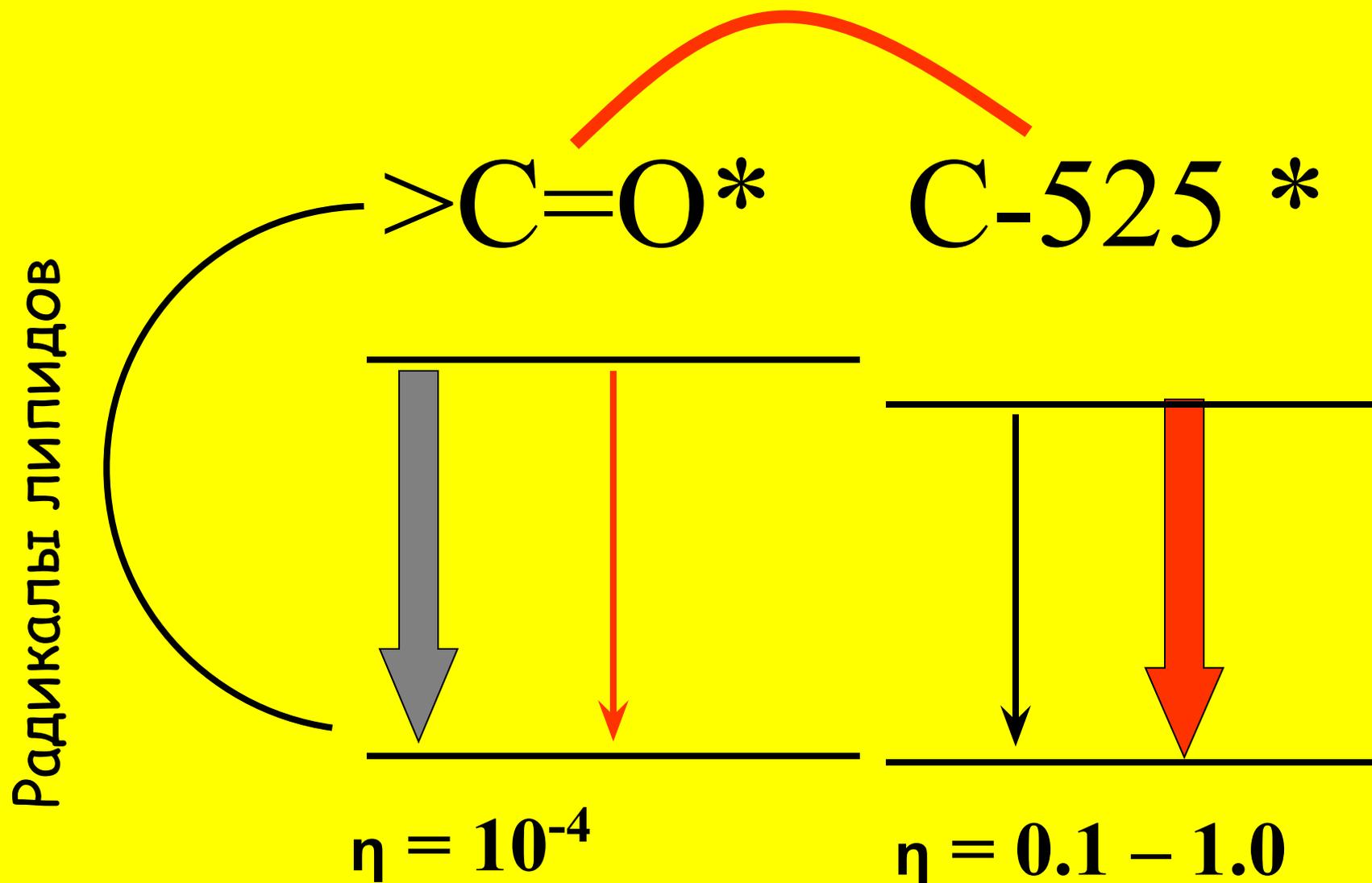
**C-314**

R =

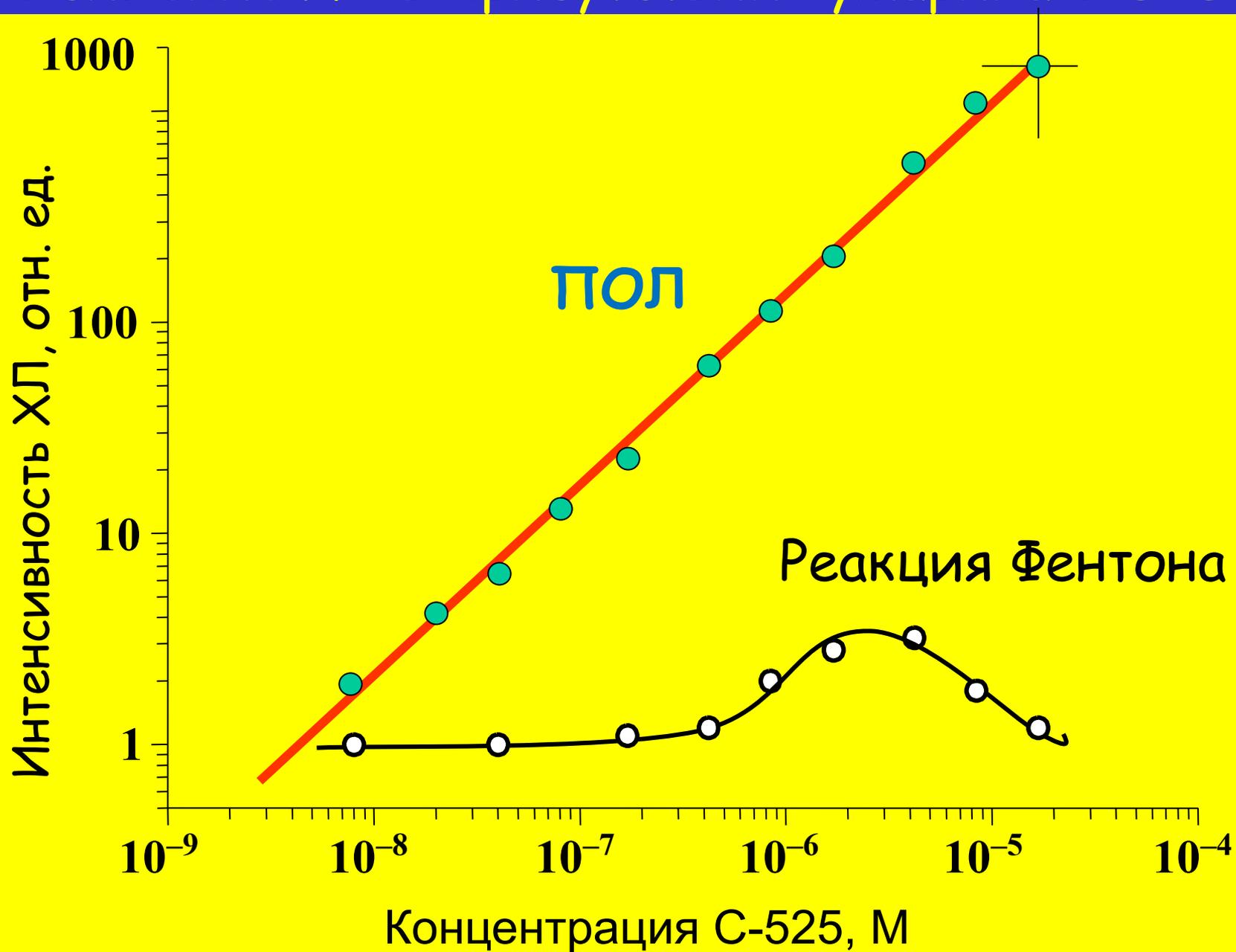


**C-334**

# Кумарин как физический активатор ХЛ

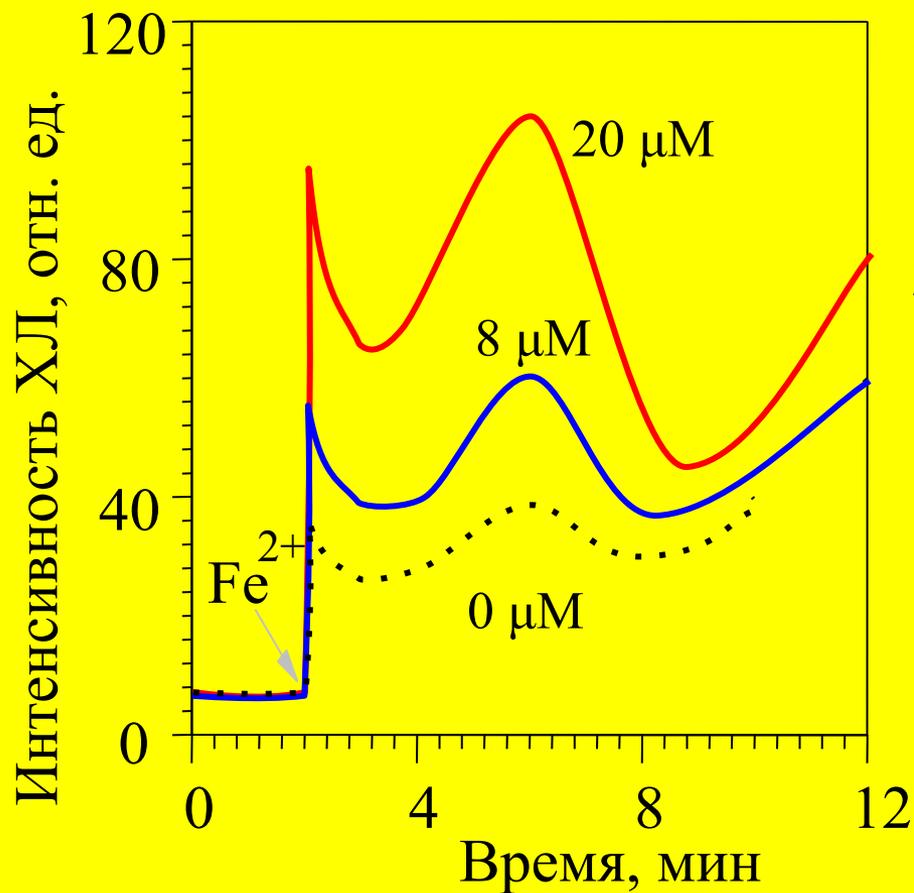


# Усиление ХЛ в присутствии кумарина С-525

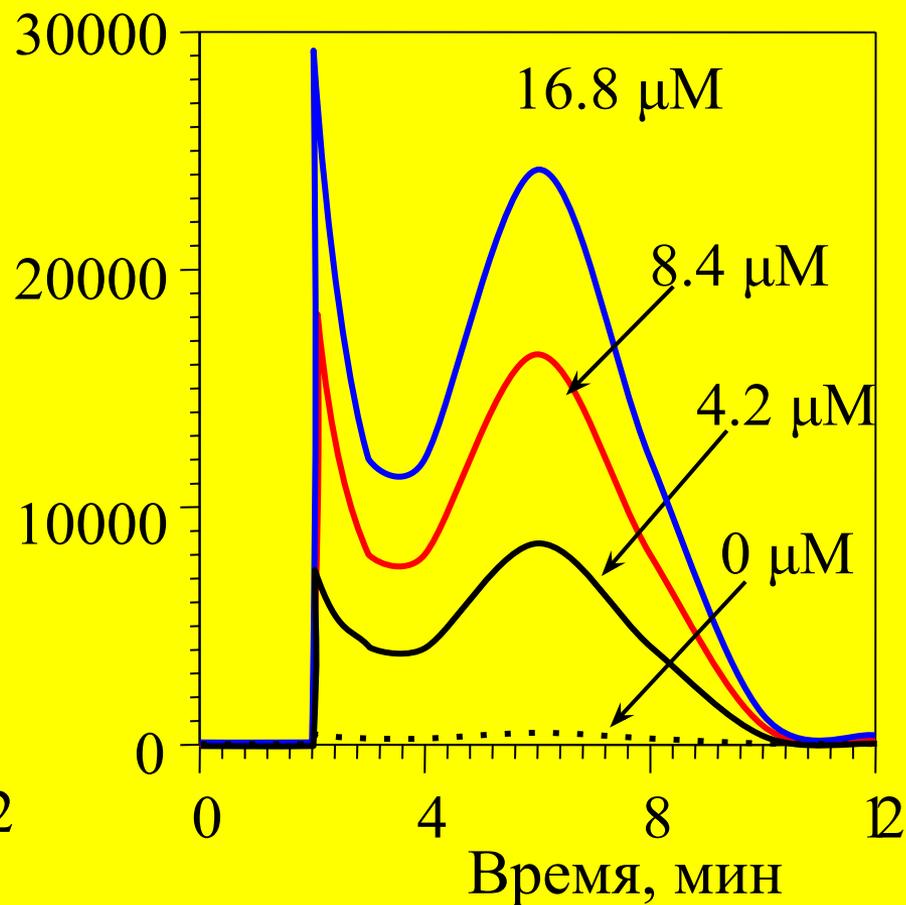


# Усиление ХЛ при ПОЛ в присутствии С-525.

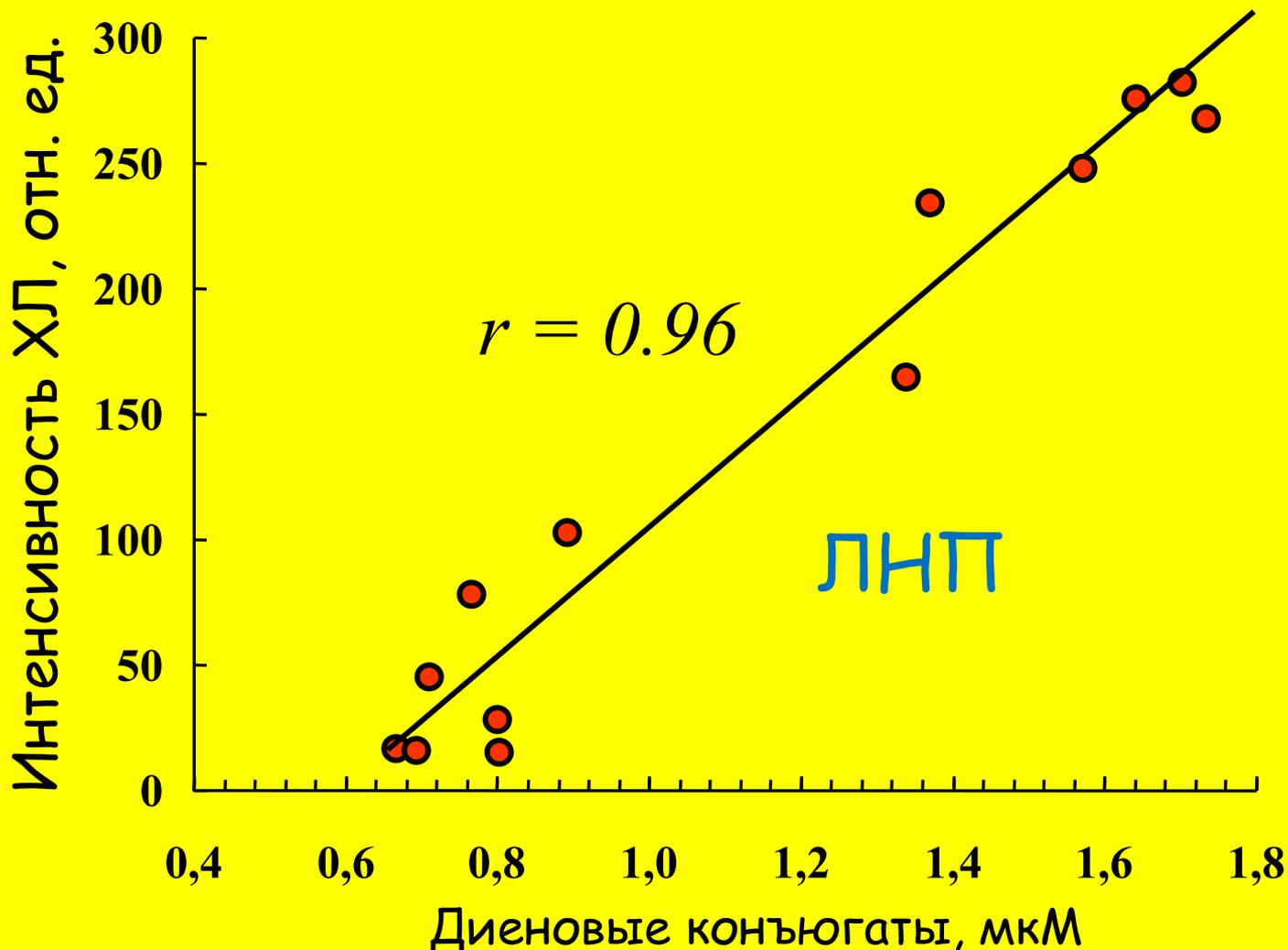
-С-525



+С-525

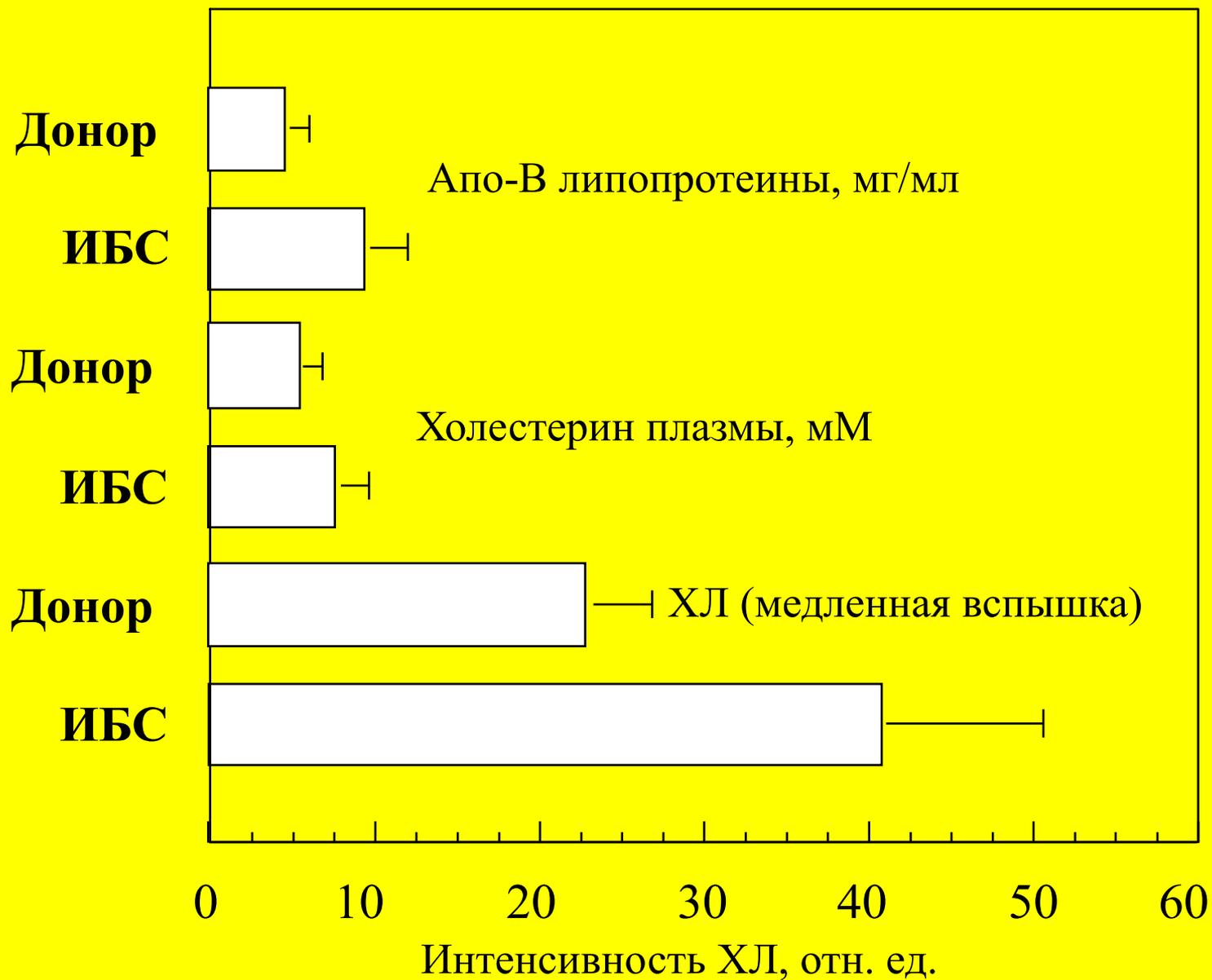


# Корреляция между интенсивностью ХЛ и количеством диеновых конъюгатов в ЛНП

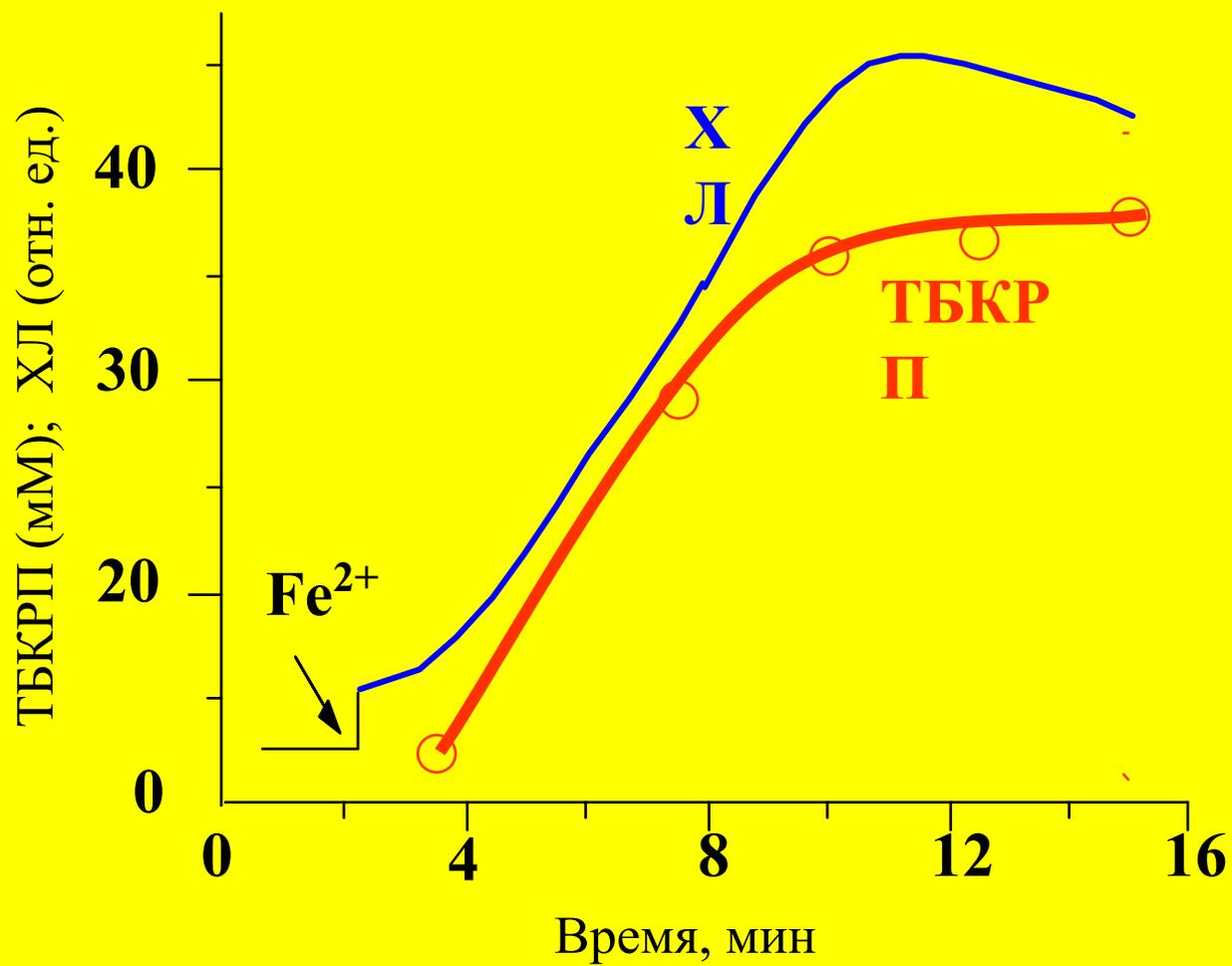




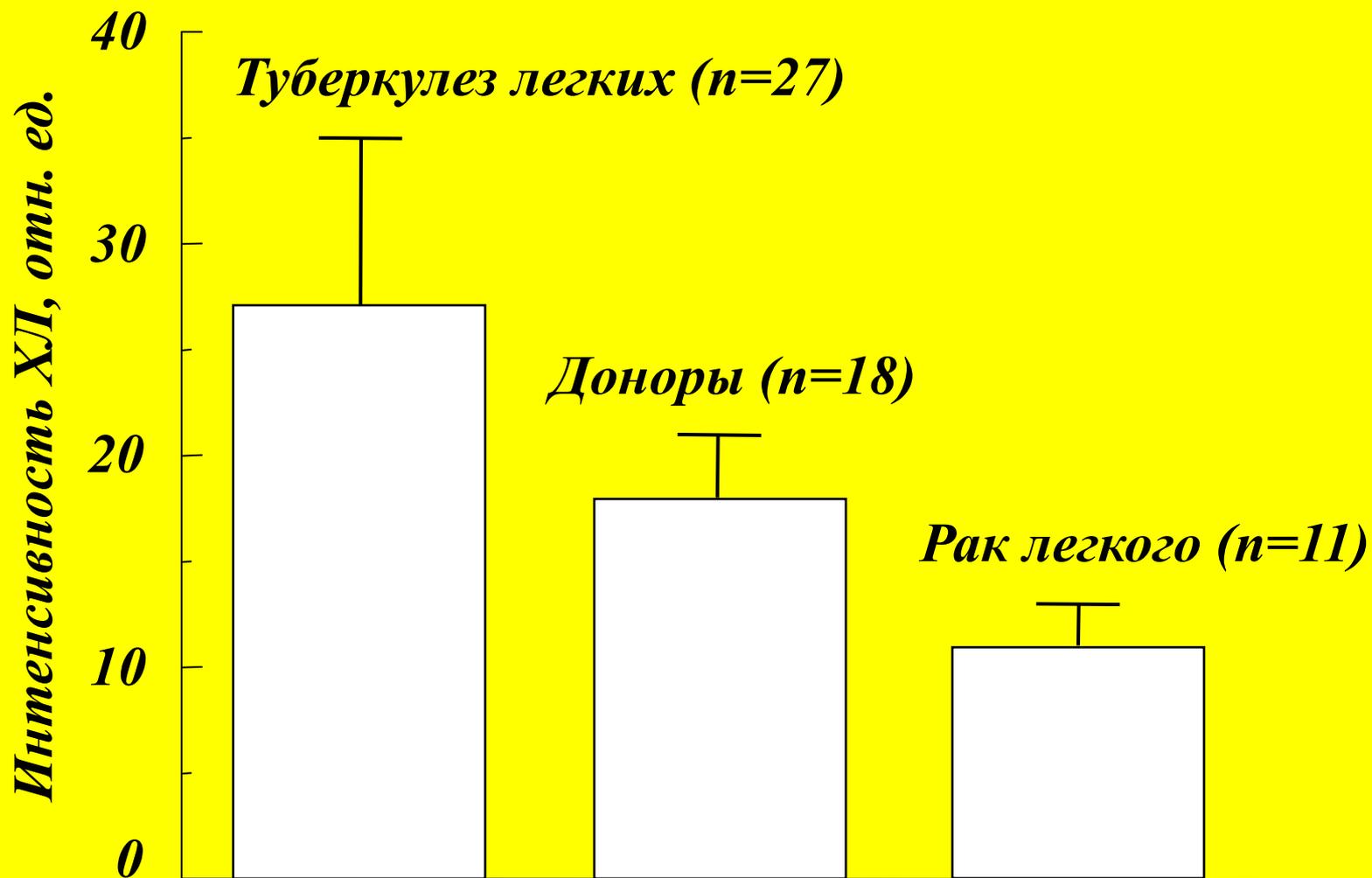
# ХЛ при ишемической болезни сердца



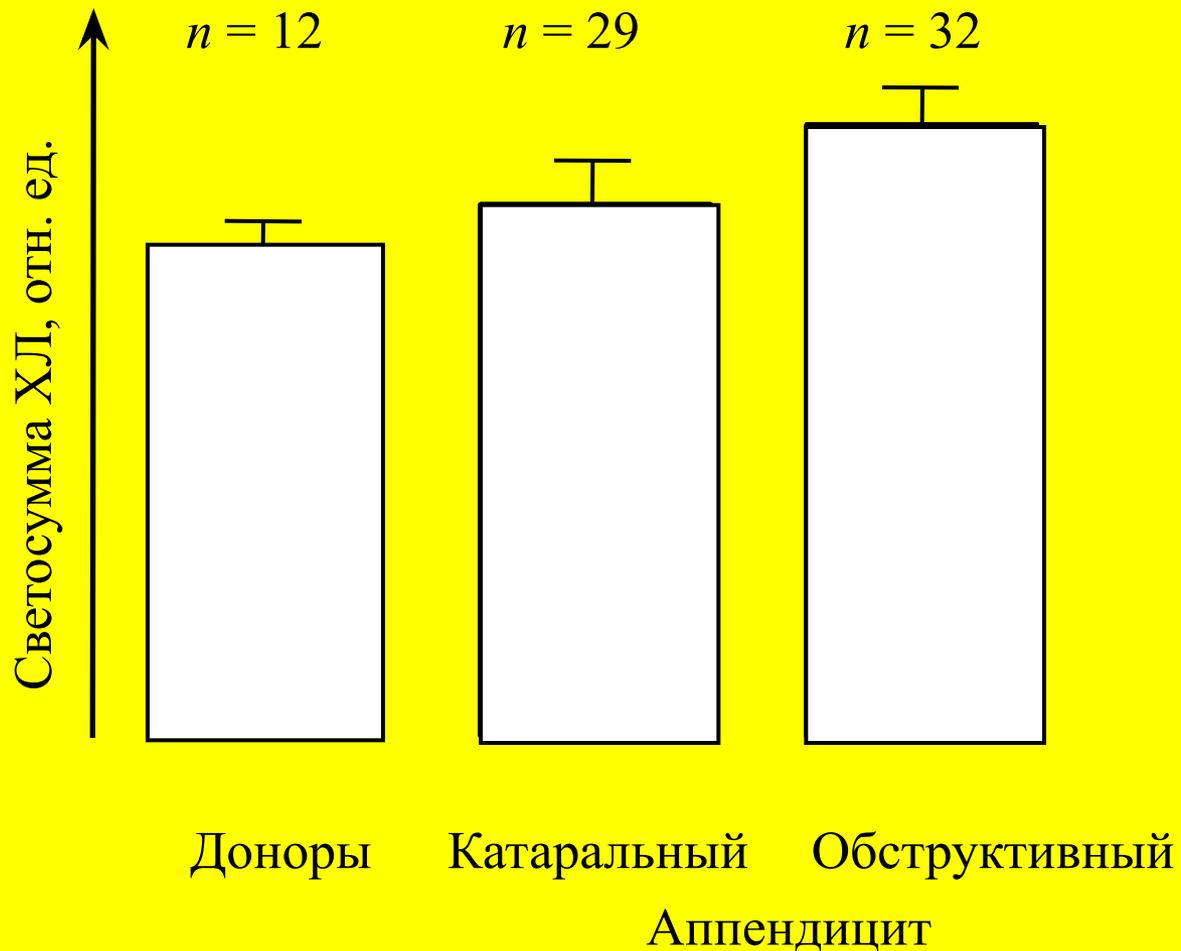
# Интенсивность ХЛ плазмы крови, индуцированной $Fe^{2+}$



# ХЛ плазмы крови при некоторых заболеваниях



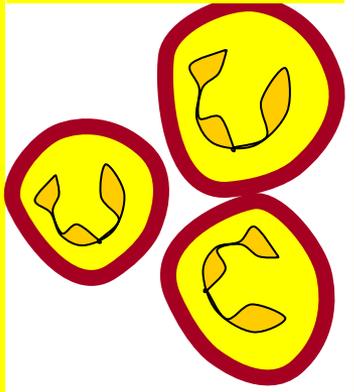
# ХЛ плазмы крови при аппендиците



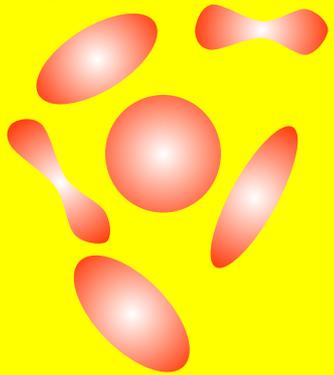
# Действие радикалов на клеточные структуры

# Действие ПОЛ изучали на многих мембранных объектах

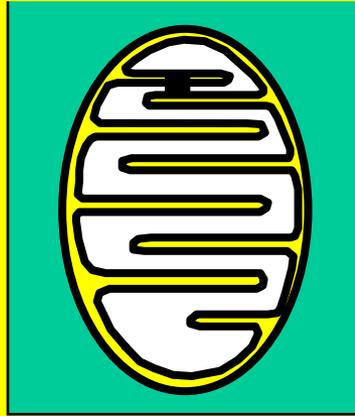
Лейкоциты



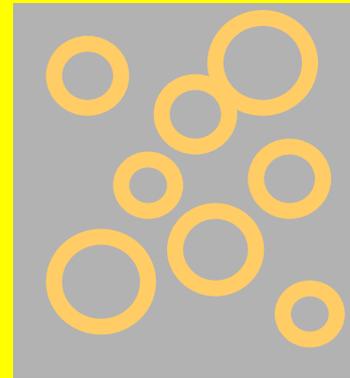
Эритроциты



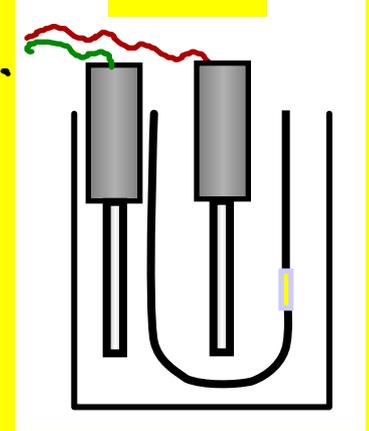
Митохондрии



Липосомы

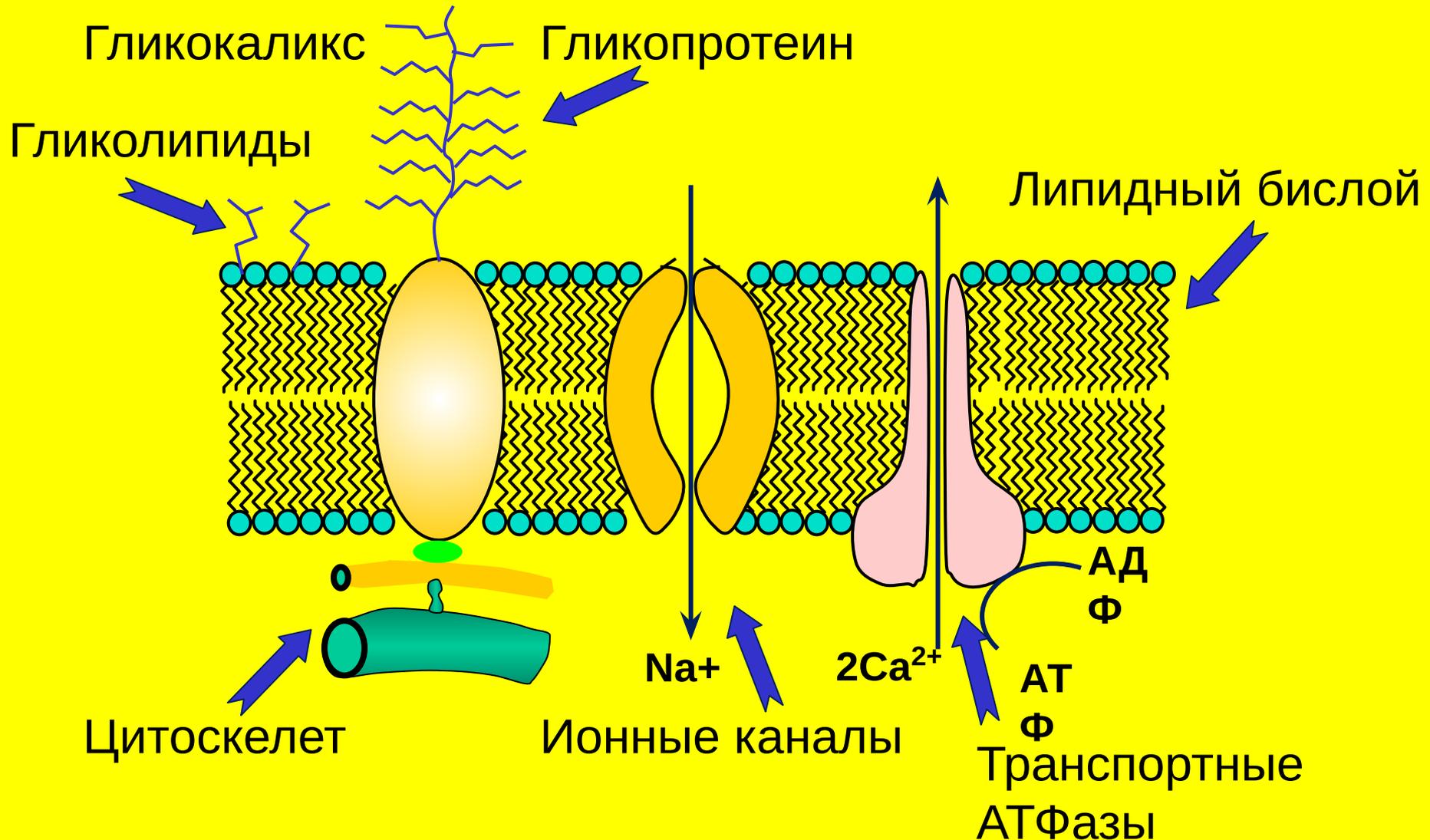


БЛМ



Во всех случаях наблюдали потерю барьерной функции мембран, как результат действия свободных радикалов.

# Элементы мембранных структур, чувствительные к действию повреждающих агентов



Действие перекисного  
ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ на —  
белки

# Действие перекисного окисления липидов на мембранные белки

## Окисление тиоловых групп



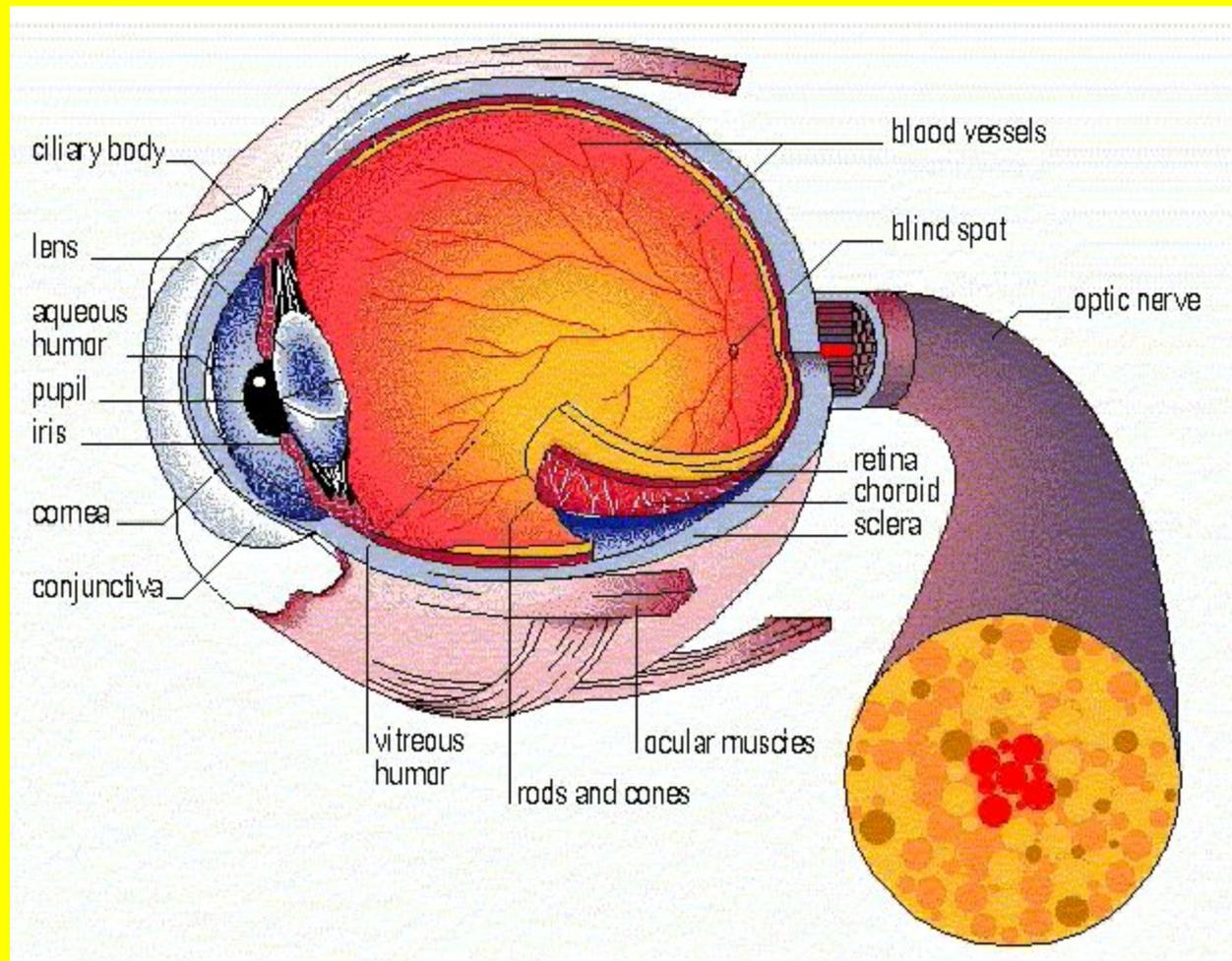
## Инактивация мембранных ферментов

Инактивация  $Ca^{2+}$ -АТФазы

## Агрегация белковых молекул

Помутнение хрусталика при катаракте

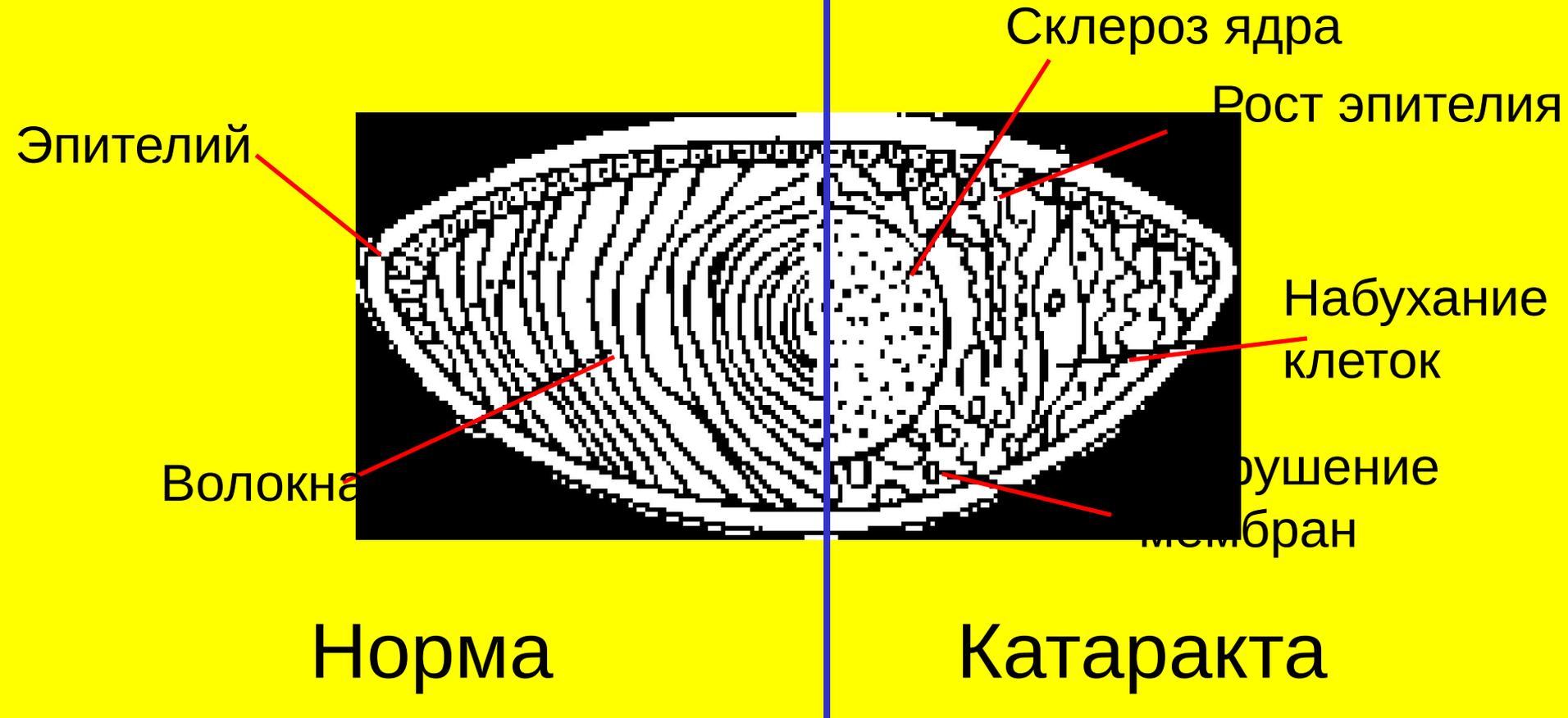
# Строение глаза человека



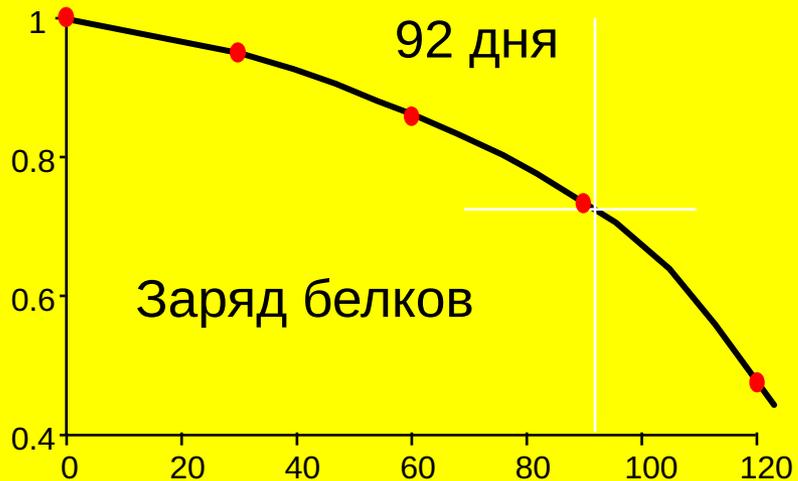
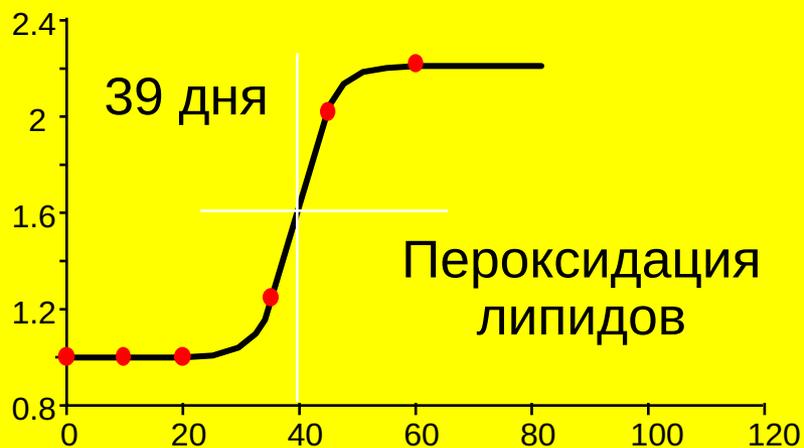
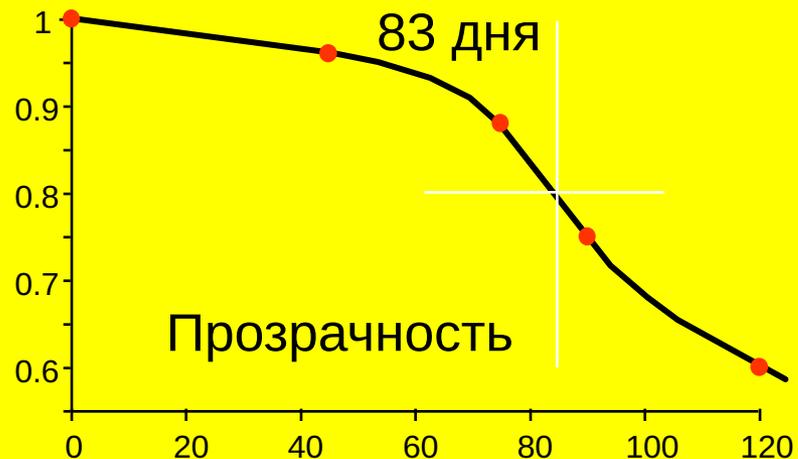
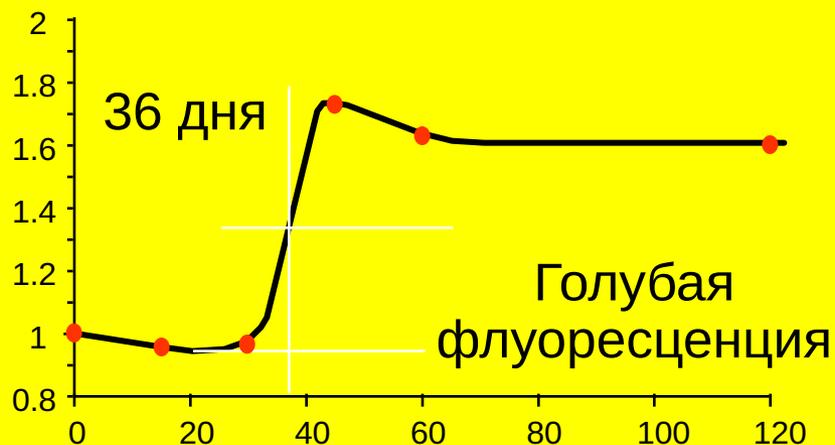
# Морфологические изменения в хрусталике при катаракте

В нормальном хрусталике глаза клеточные мембраны не разрушены

При катаракте мембраны разрушены вследствие перекисного окисления липидов



# Развитие радиационной катаракты



Дни после облучения

Дни после облучения

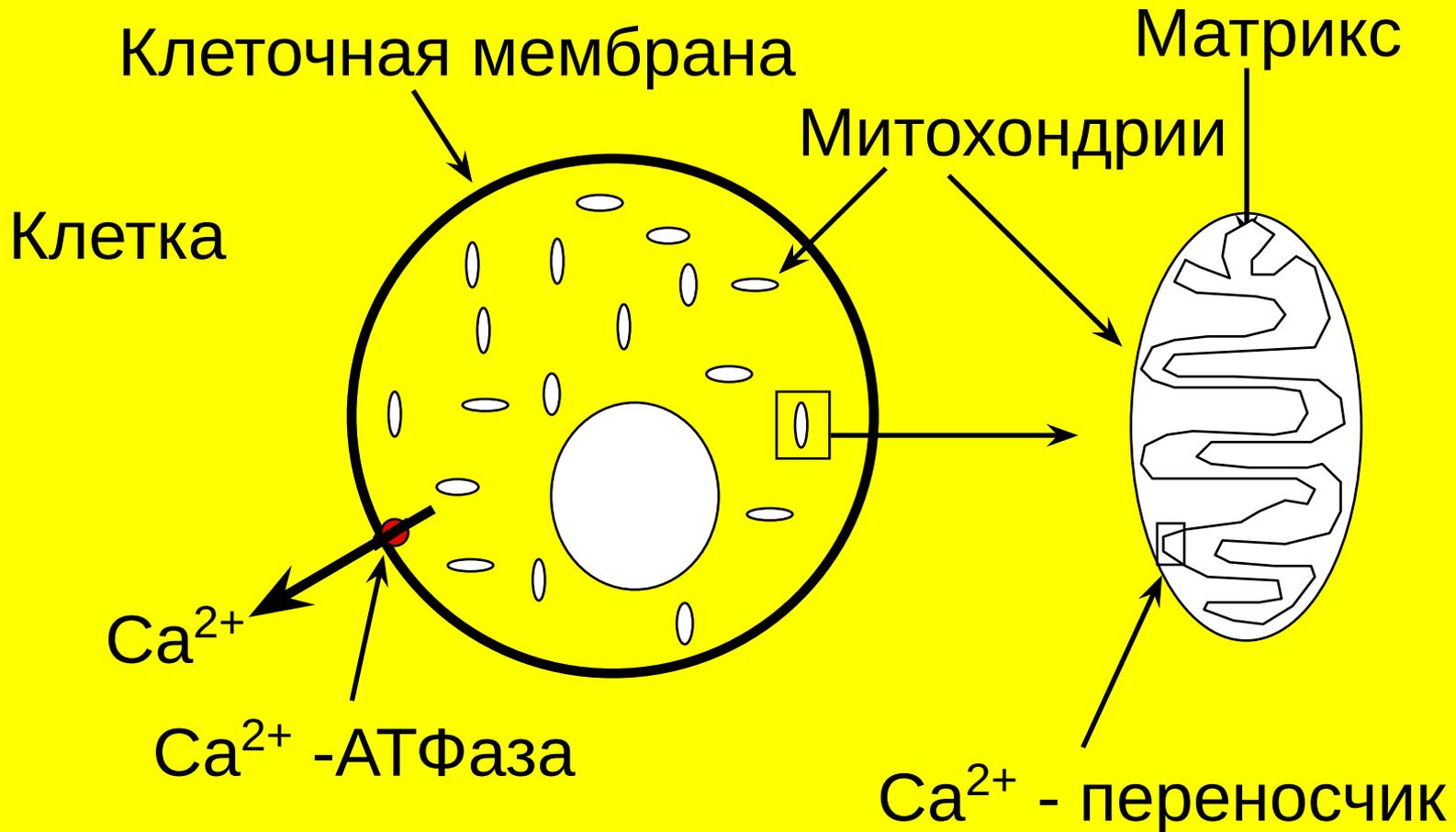
# Развитие радиационной катаракты



Действие липопероксидации на  
–Ca<sup>2+</sup>-транспортную АТФазу

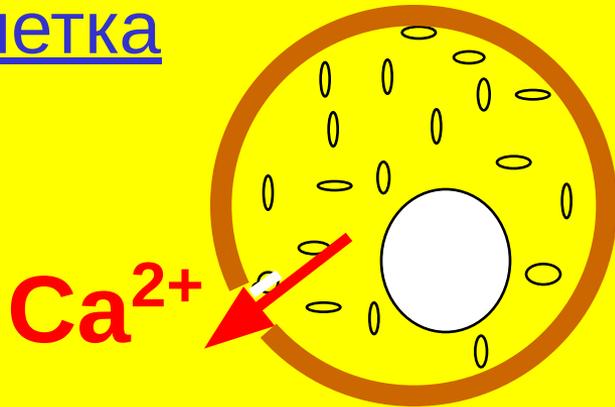
# Регуляция уровня $\text{Ca}^{2+}$ в клетке

Низкий уровень ионов кальция ( $10^{-8}$  М) в живых клетках обеспечивается работой  $\text{Ca}^{2+}$  - насосов клеточной мембраны и митохондриями.

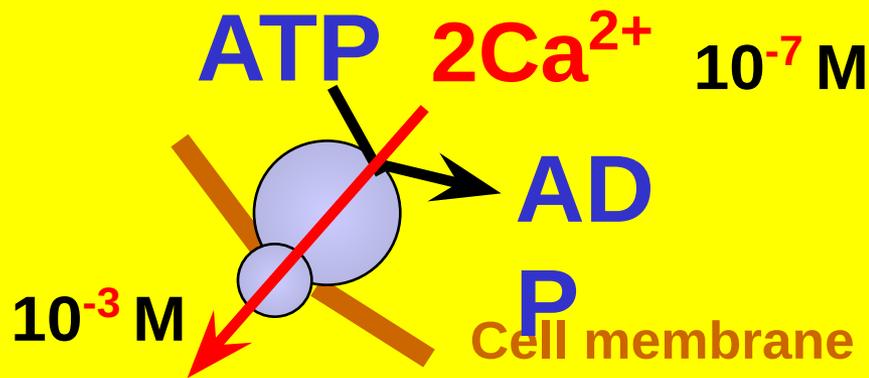


# Кальциевые насосы в живой клетке

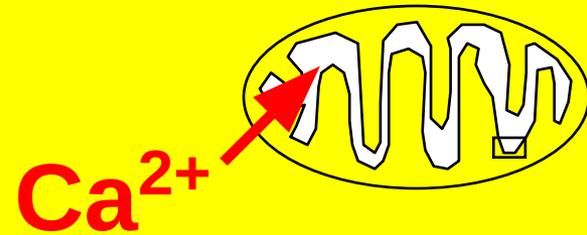
## Клетка



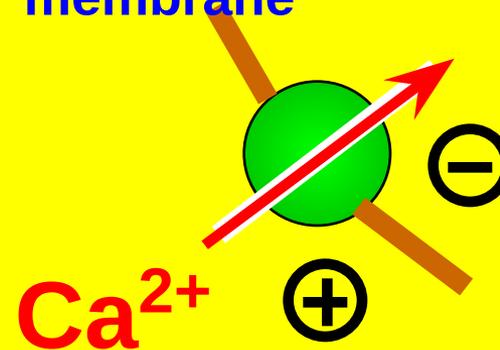
$\text{Ca}^{2+}$  - ATPase in plasma membrane and intracellular depots



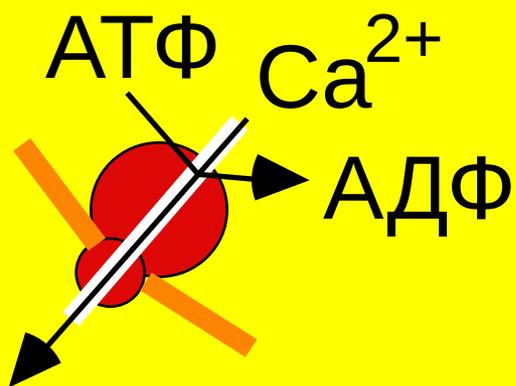
## Митохондрия



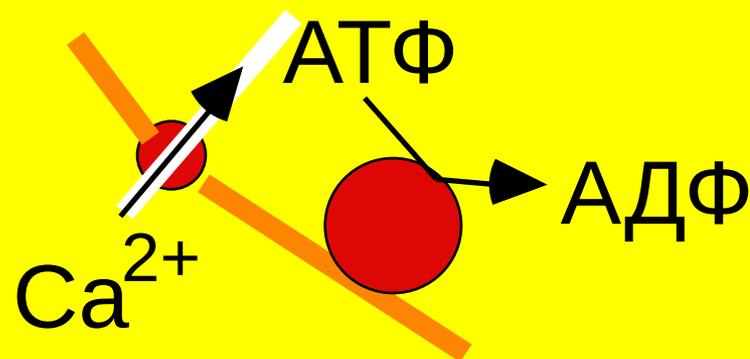
Electrophoretic  $\text{Ca}^{2+}$  transport across mitochondrial inner membrane



# Повреждение Ca-АТФазы



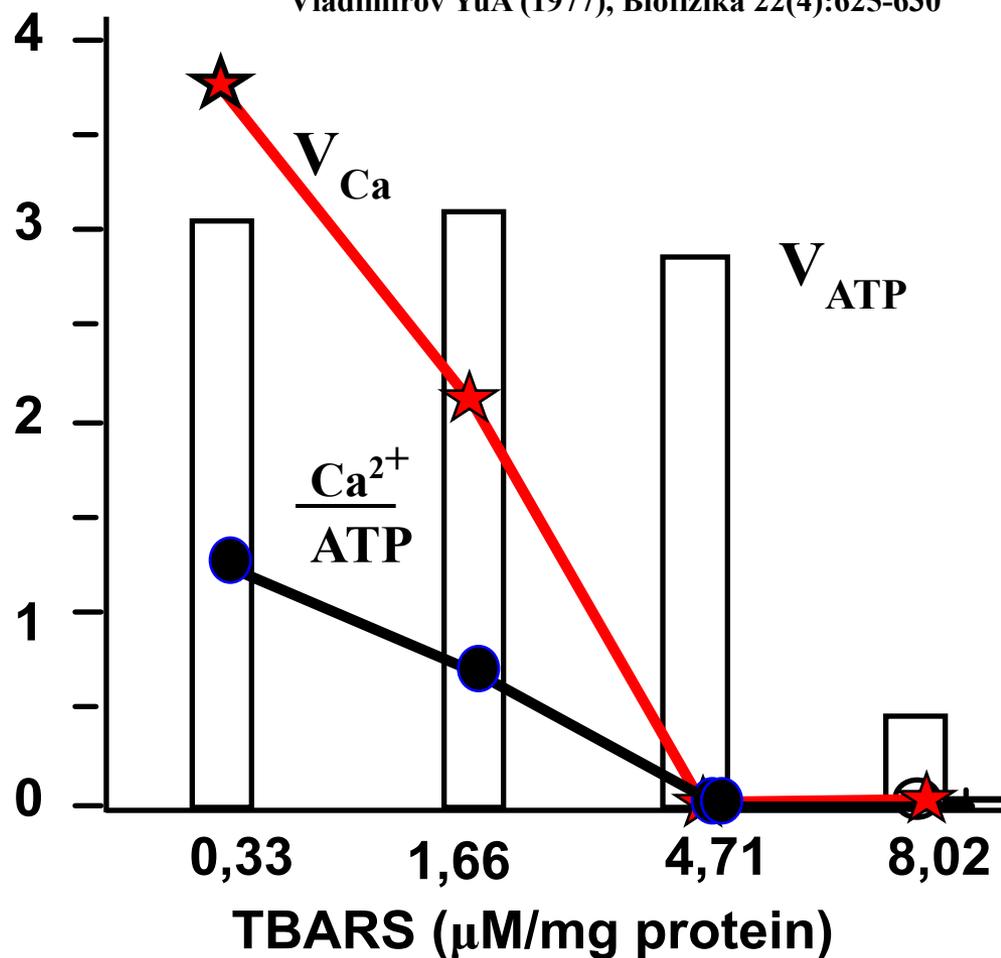
Нативная  
Ca-АТФаза



Поврежденная  
Ca-АТФаза

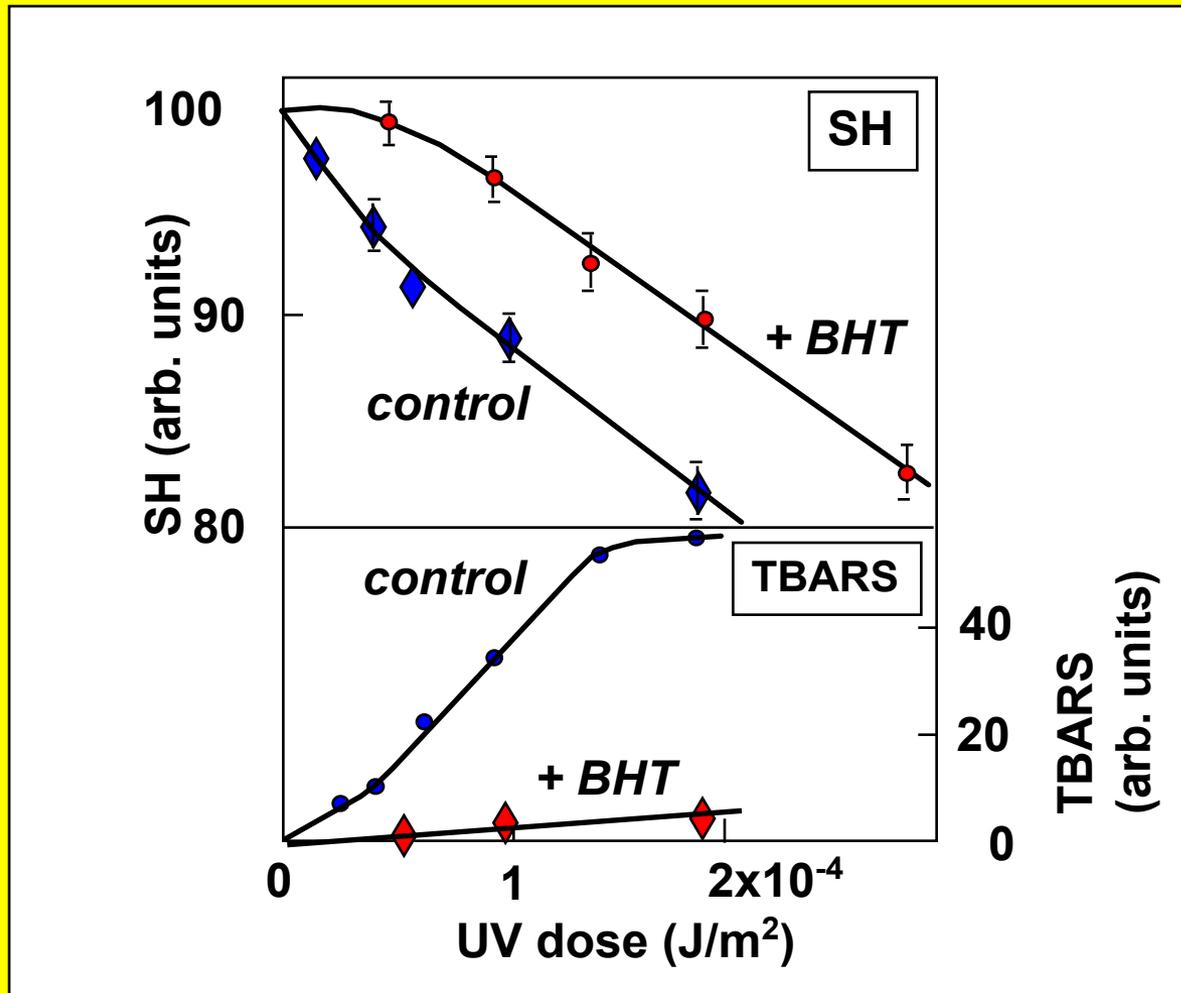
# Влияние ПОЛ на $\text{Ca}^{2+}$ -АТРазу

Kagan VE, Azizova OA, Arkhipenko YV, Klaan NA, Kozlov YP.  
Vladimirov YuA (1977), Biofizika 22(4):625-630

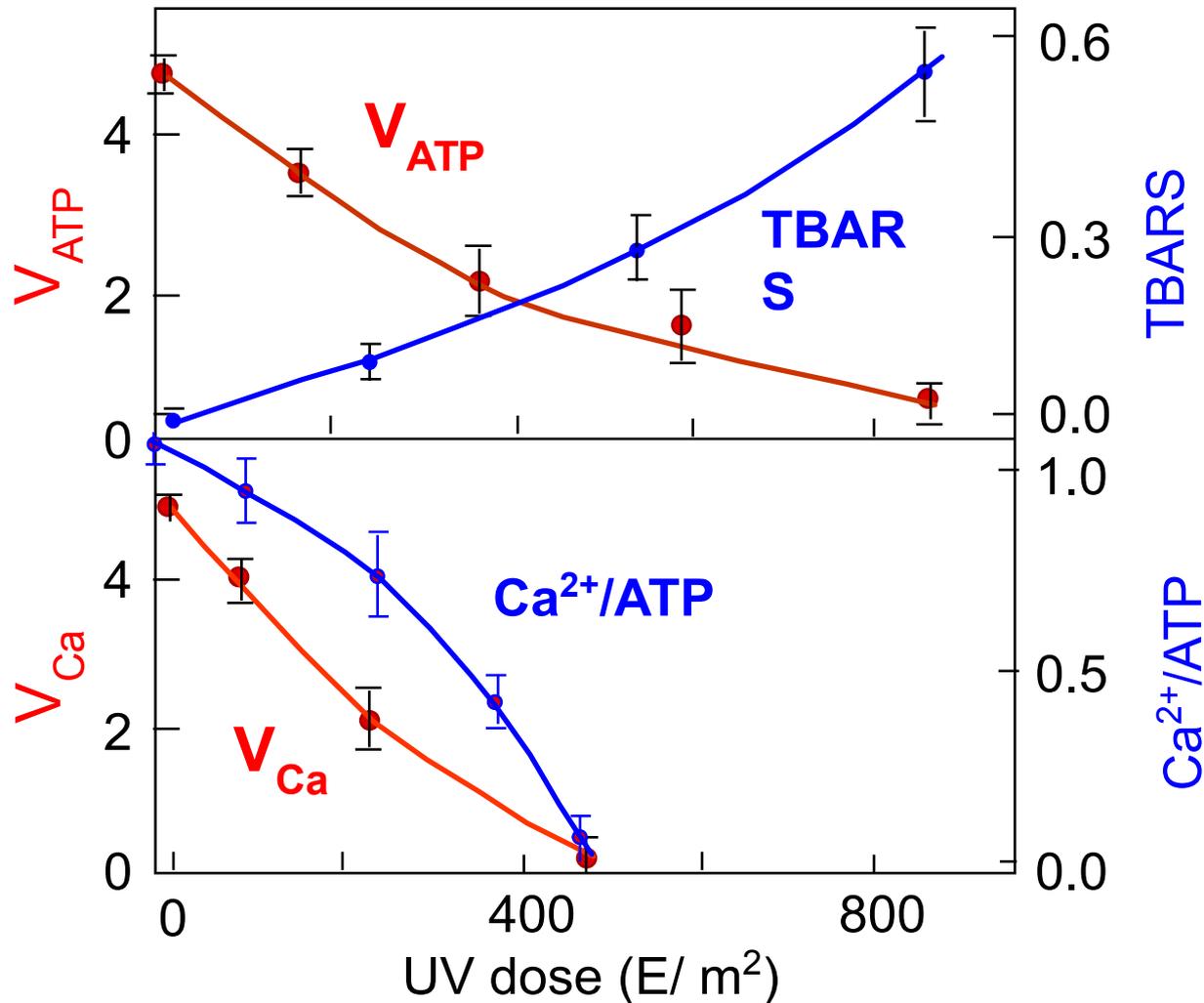


# Effect of UV on Liposomes + Globin

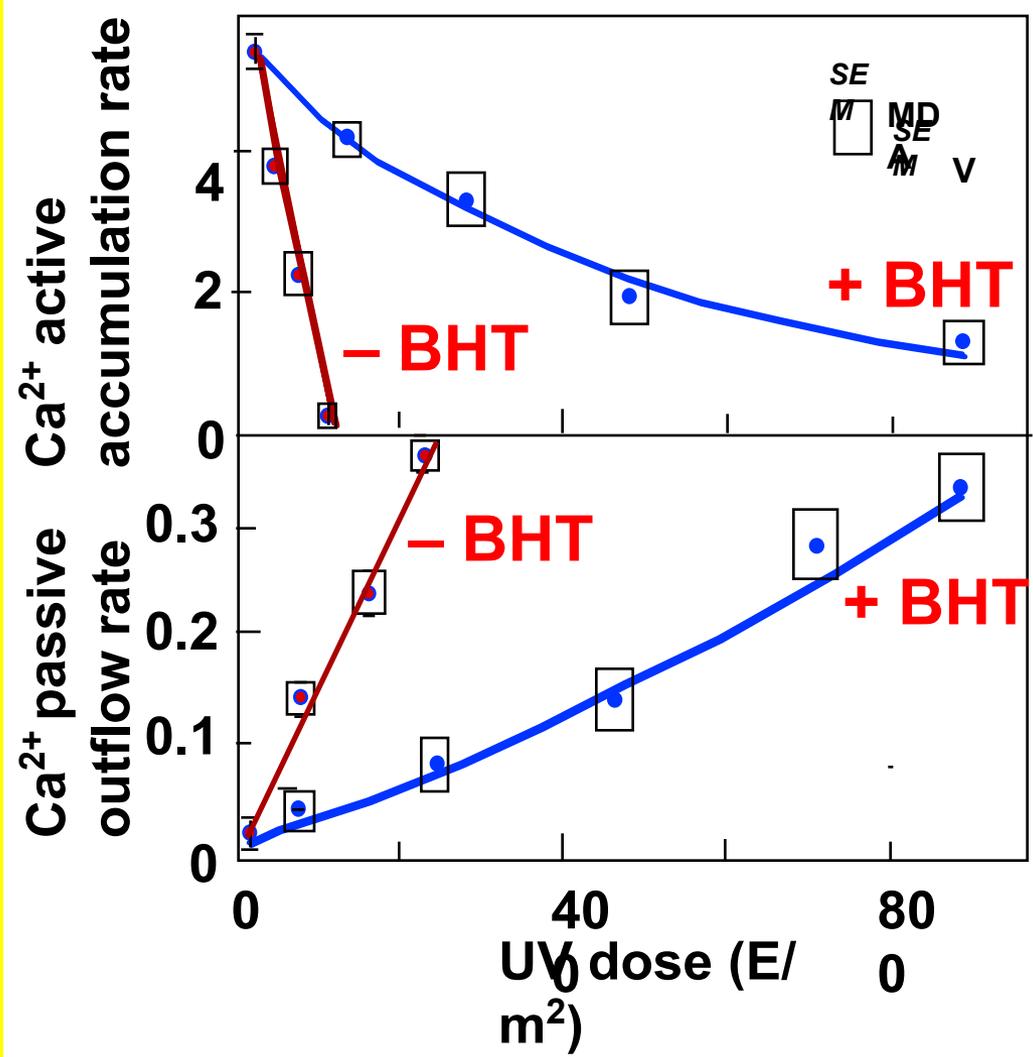
*D.I. Roshchupkin , M.A. Murina. Biophysics 38: 1083-1097 (1993)*



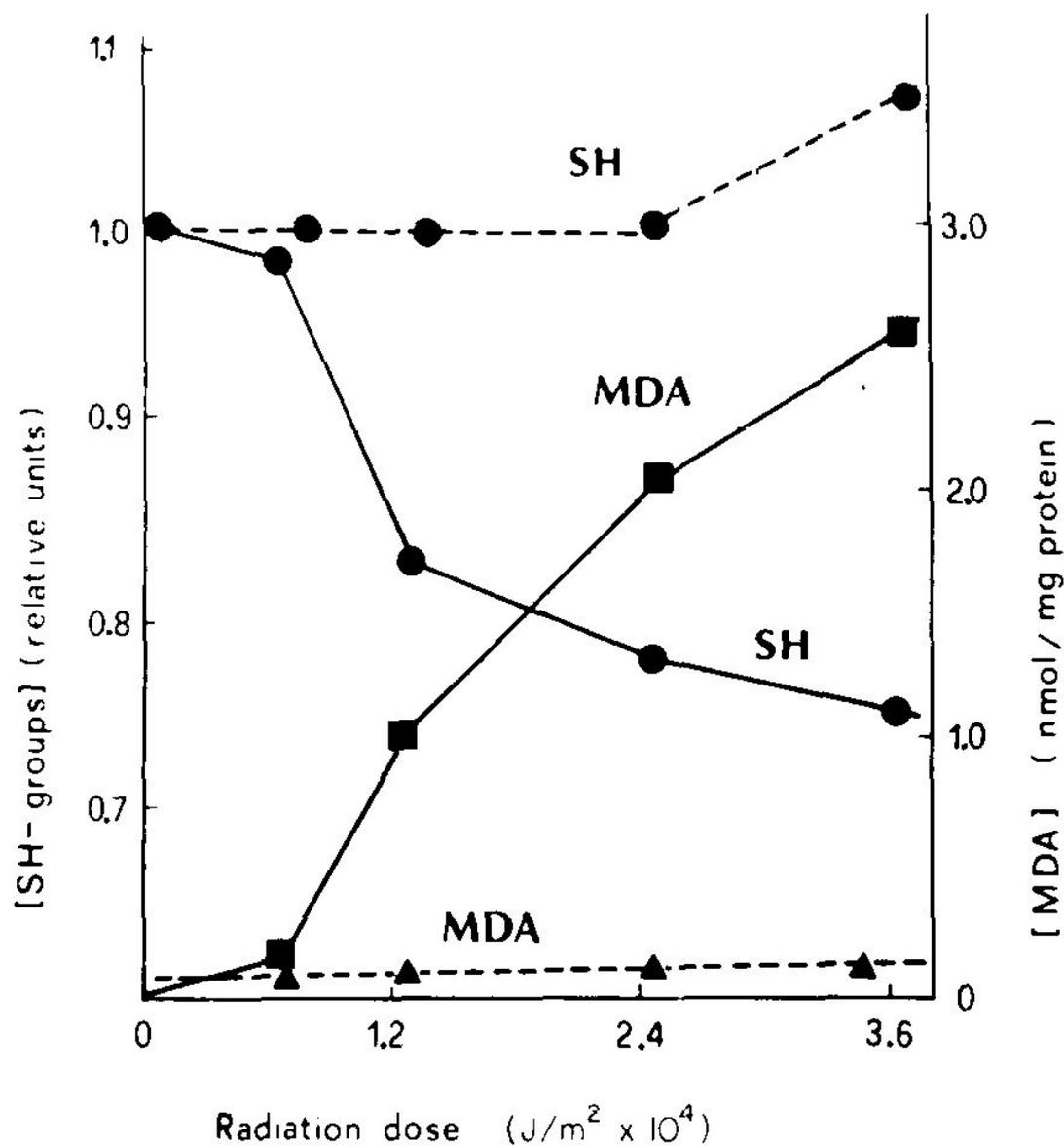
# Effect of UV on $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase



# Effect of UV on $\text{Ca}^{2+}$ Transport



# Тиолы и ПОЛ в эритроцитах при УФ облучении



1. На какие элементы биологических мембран действуют свободные радикалы?
2. На каких объектах изучали действие липидной пероксидации на мембранные структуры? Достоинства и недостатки каждого из этих объектов.
3. Последовательность событий при развитии катаракты: изменения, связанные с белками, тиолами и липидами.
4. Связь липидной пероксидации с уровнем тиолов. Факты и механизм.
5. Действие липидной пероксидации на способность митохондрий удерживать ионы кальция. Механизм этого действия.
6. Действие липидной пероксидации на работу Са-АТФазы. Экспериментальные данные и интерпретация. Биологические последствия.

# Электрический пробой мембран при перекисном окислении липидов

# Изучение электрического пробоя на БЛМ

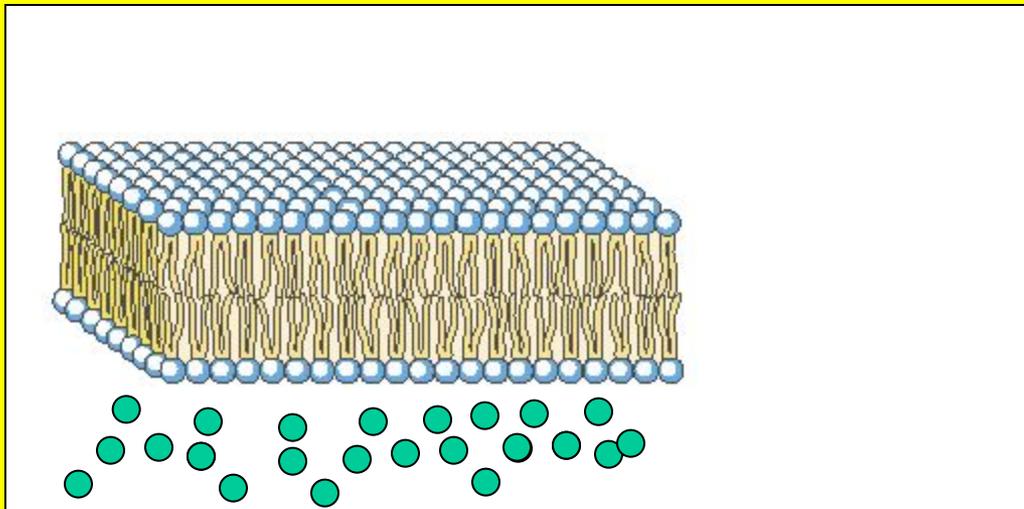
# Электрические свойства Бислоистой Липидной Мембраны (БЛМ)

$R$  (сопротивление) БЛМ =  $10^7 - 10^8 \text{ Ом} \cdot \text{см}^2$

Слой раствора электролита (KCl 0.01 M) имеет  $R = 10^{-4} \text{ Ом} \cdot \text{см}^2$

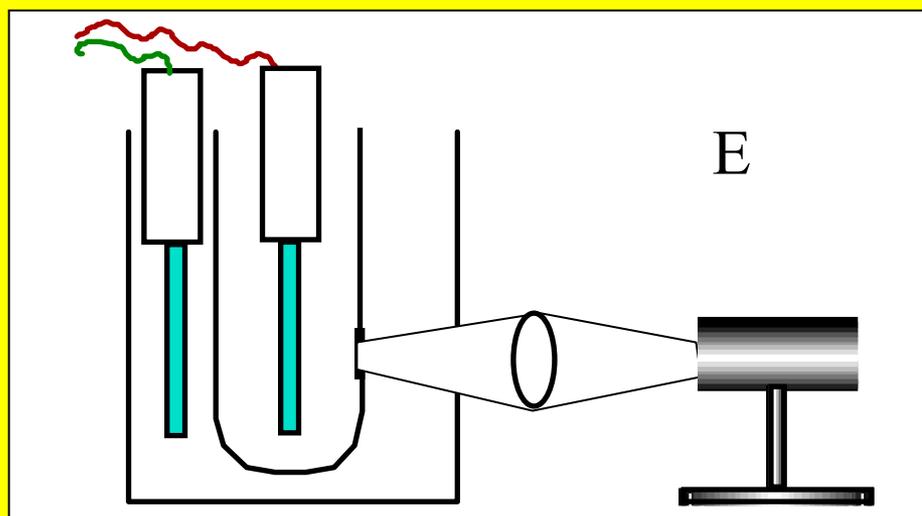
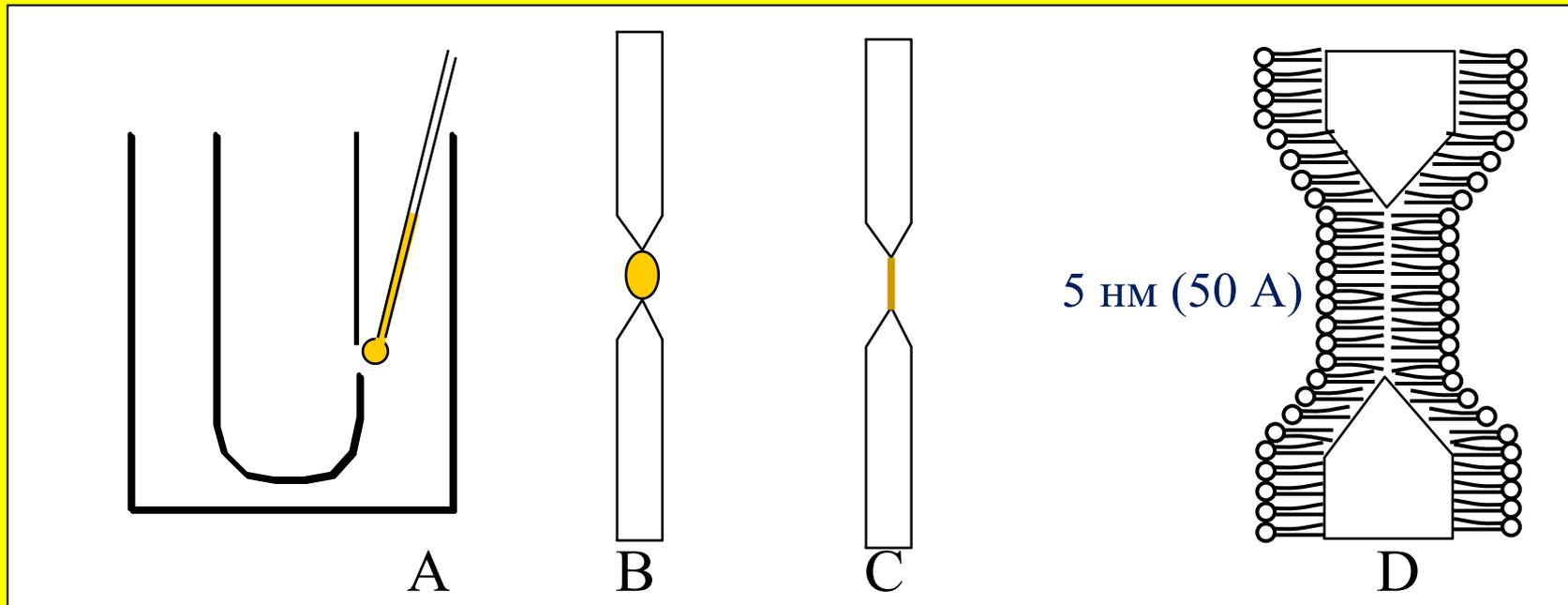
$\epsilon$  (диэлектрическая проницаемость) липидов мембраны = 2

$\epsilon$  (диэлектрическая проницаемость) воды = 80



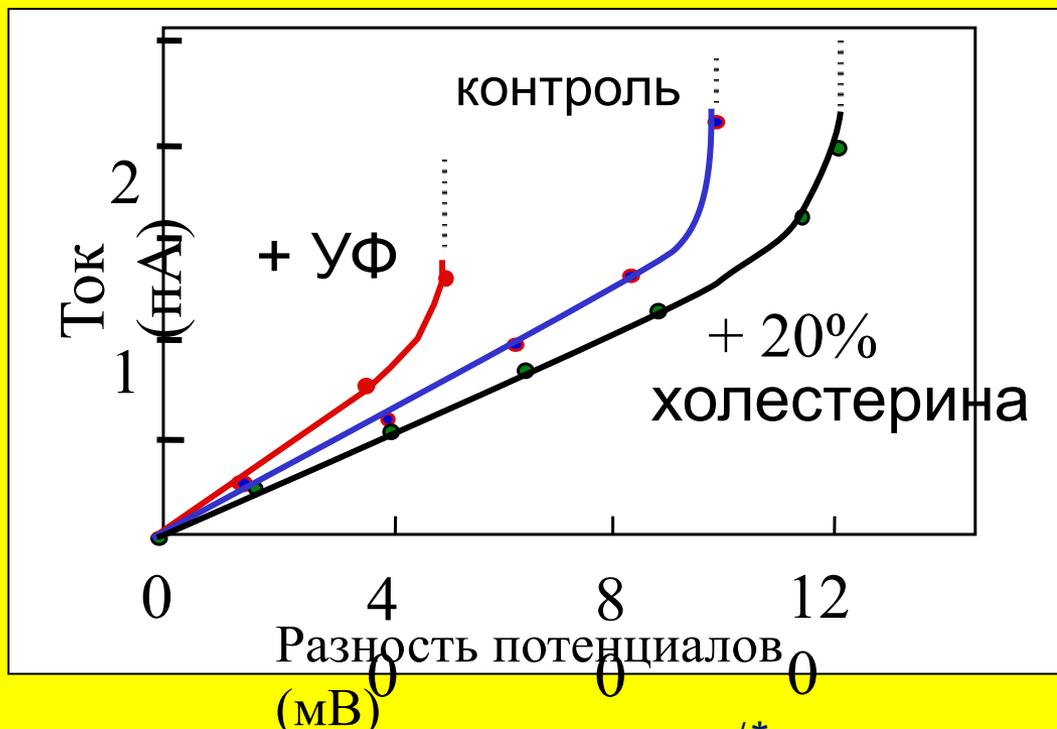
Если концентрация ионов в растворе равна 0.1 M, то в липидной фазе она должна упасть до  $10^{-13} \text{ M}$ .

# Формирование бислоевой липидной мембраны



- A – C – стадии формирования БЛМ.
- D – микроскопическое строение БЛМ.
- E – Общий вид установки с БЛМ .

# Вольт-амперные характеристики БЛМ



При потенциалах, ниже порогового значения  $\phi^*$ , зависимость между током и разностью потенциалов на мембране – линейная. При потенциалах выше  $\phi^*$  ток начинает расти. Процесс прогрессирует во времени и, если не сбросить потенциал, заканчивается механическим разрушением мембраны.

Такое явление называется **электрическим пробоем мембраны**. Потенциал  $\phi^*$  называется **потенциалом пробоя** и может служить количественной характеристикой электрической прочности мембран.

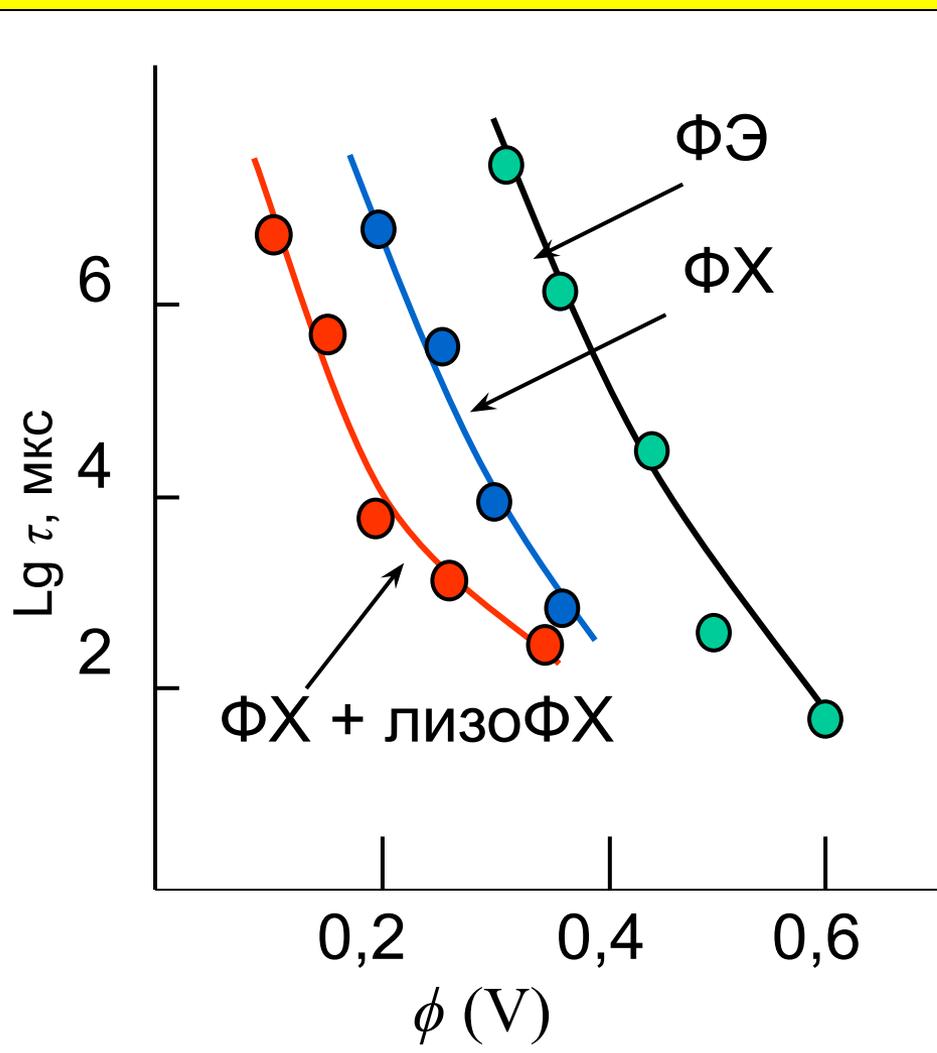
# Гипотезы о механизмах электрического пробоя

| Теория                             | Автор              | Год  | Описание   | Недостатки  |
|------------------------------------|--------------------|------|--|---|
| Теория лавинного пробоя            | Thompson           | 1970 | Лавинное нарастание числа носителей в бислое   | Возможен в толстых пленках<br>Необходима большая напряженность поля         |
| Эффект Вина                        | Neumcke            | 1970 | Увеличение константы диссоциации электролитов в неводных растворах   | Не согласуются температурные зависимости<br>Различаются константы процессов |
| Теория электромеханического сжатия | Crowley            | 1973 | Мембрана- конденсатор с упругим диэлектриком между обкладками<br>При $F_{эл} > F_{упр}$ происходит электромеханический коллапс | Занижен модуль упругости  |
| Тепловая природа пробоя            | Смолин<br>Поливода | 1974 | Под действием электрического поля теплообразование превышает теплоотдачу   | Возможно, реализуется при разрушении толстых пленок                         |
| Эволюция локальных дефектов пор    | Чизмаджев          | 1981 | Радиус поры зависит от приложенного напряжения   | Теория применима к действию импульсов конечной длительности                 |

## Факты подтверждающие теорию порообразования

1. Неспецифическая проницаемость для разных низкомолекулярных веществ;
2. Локальность изменения свойств мембраны;
3. Резкое увеличение скорости флип-флопа липидов;
4. Существование легко измеряемого эффективного диаметра проницаемых структур, который зависит от параметров электрообработки.

# Зависимость времени жизни липидных пор от напряжения



Точками обозначены данные эксперимента, сплошные кривые – теоретические.

Мембраны были сформированы из разных фосфолипидов:

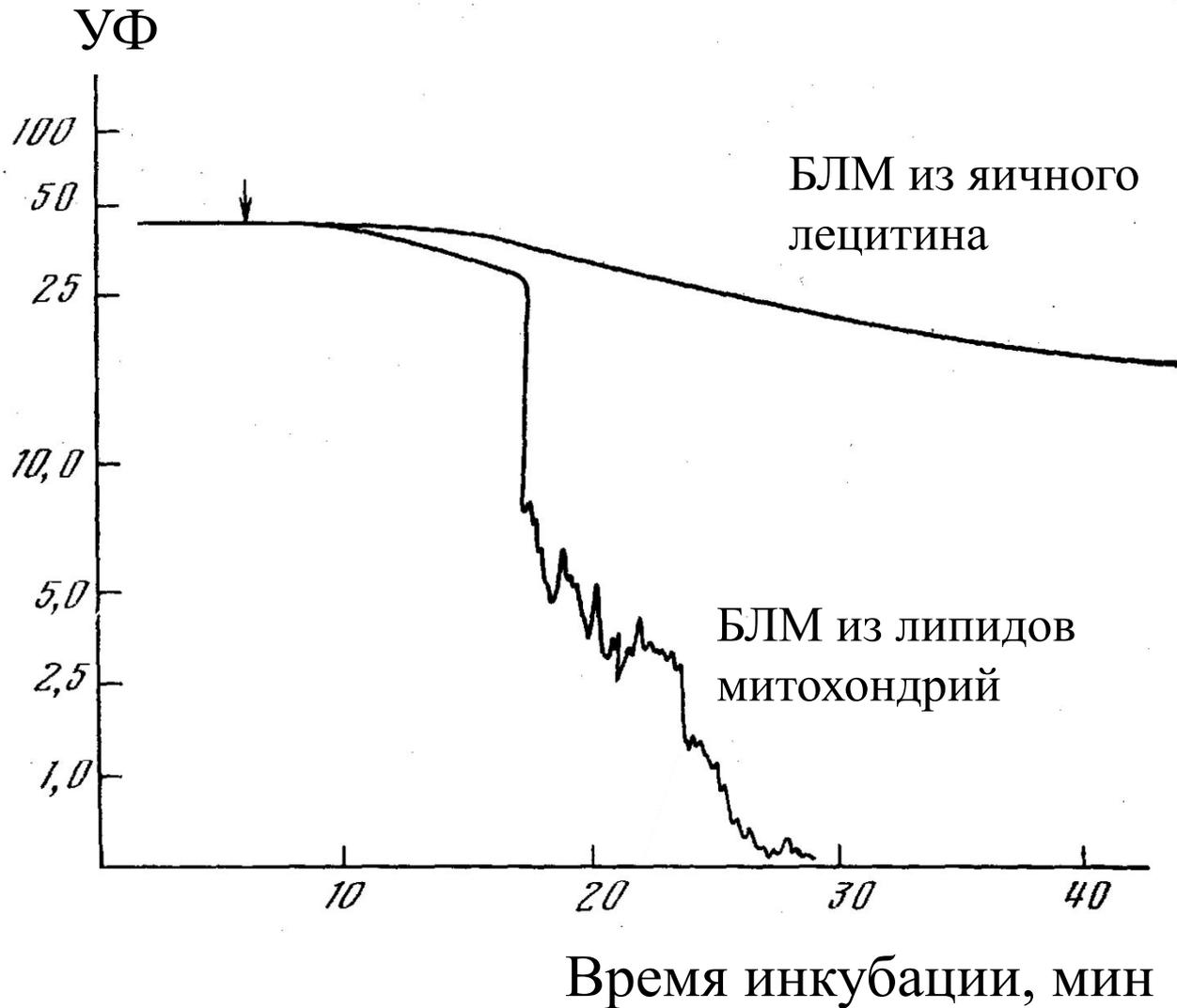
ФЭ - фосфатидилэтаноламин;  
ФХ - фосфатидилхолин

$\tau$  - Время жизни пор

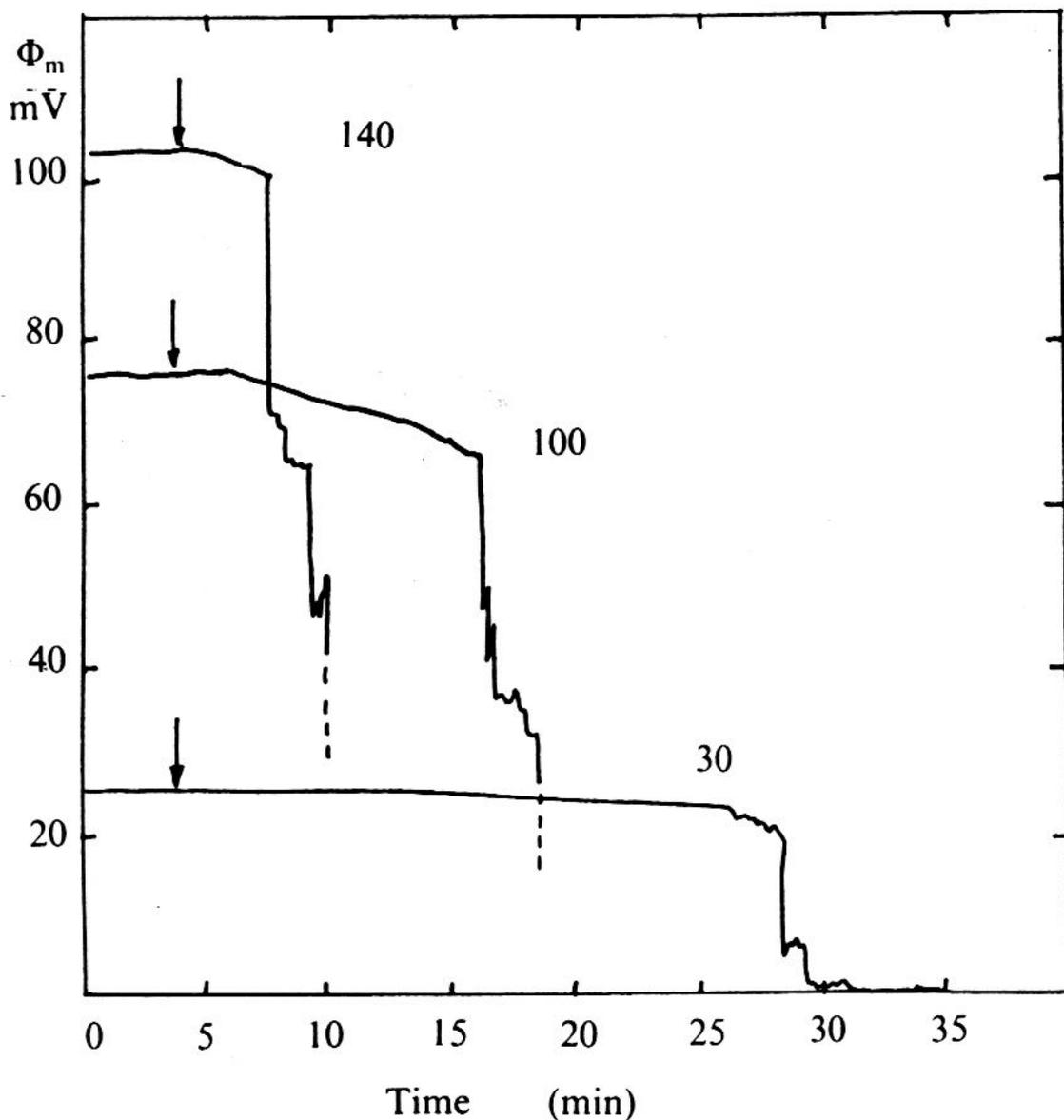
$\phi$  - потенциал на мембране

# Пробой БЛМ при УФ облучении

Сопротивление БЛМ, ГОм

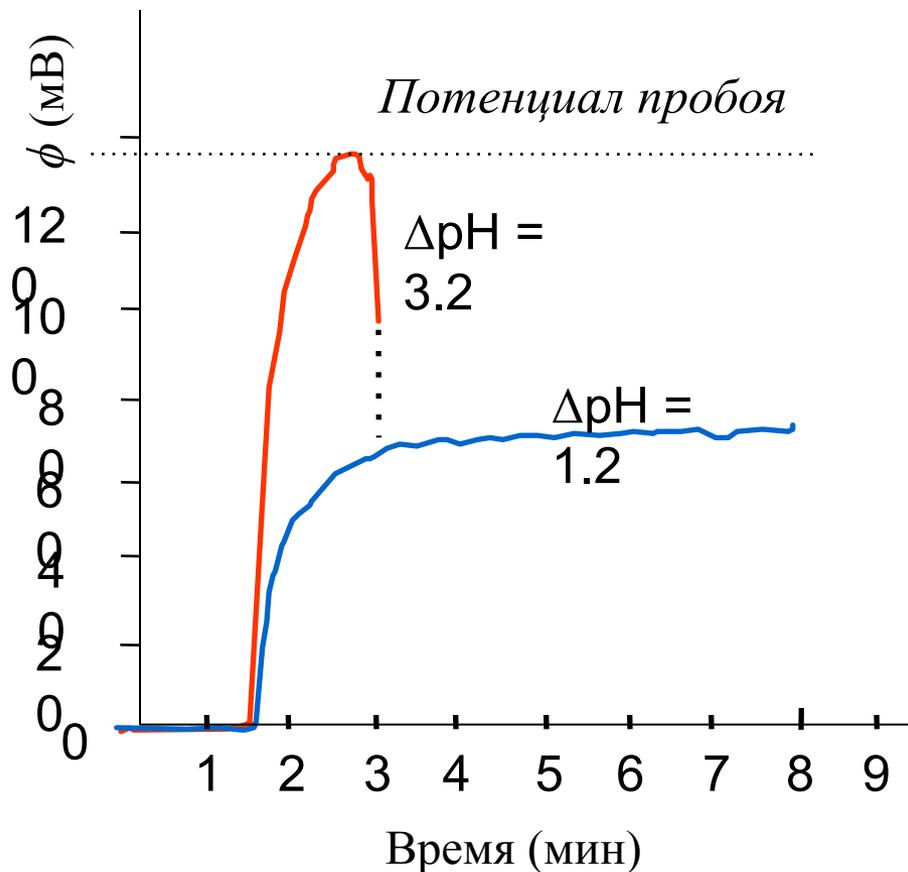


## Электрический пробой БЛМ под действием ПОЛ, индуцированным УФ

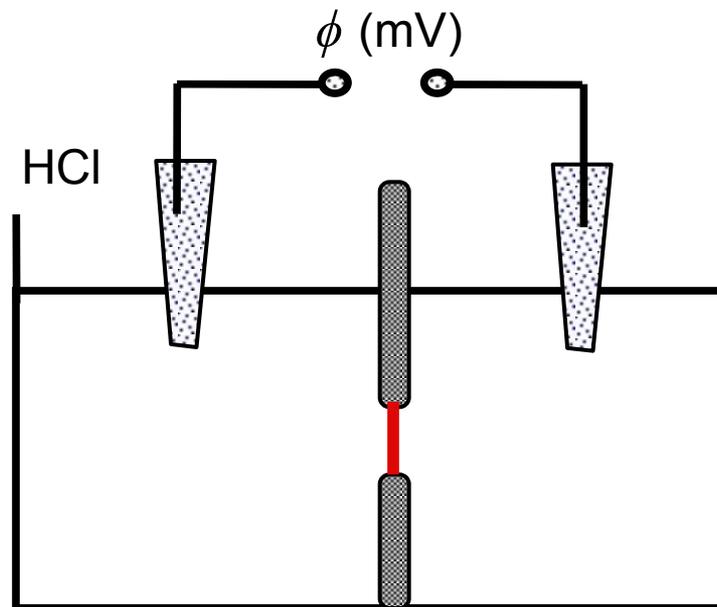


Стрелкой показано начало УФ-облучения.  $\Phi_m$ , - потенциал, измеренный на мембране. Значение  $\Phi_m$  при котором кривые резко идут вниз соответствуют потенциалу пробоя. Потенциал пробоя уменьшается с увеличением продолжительности действия (дозы) УФ-излучения. При высоких дозах пробой наблюдается даже при очень низких потенциалах.

# Самопробой БЛМ протонным диффузионным потенциалом

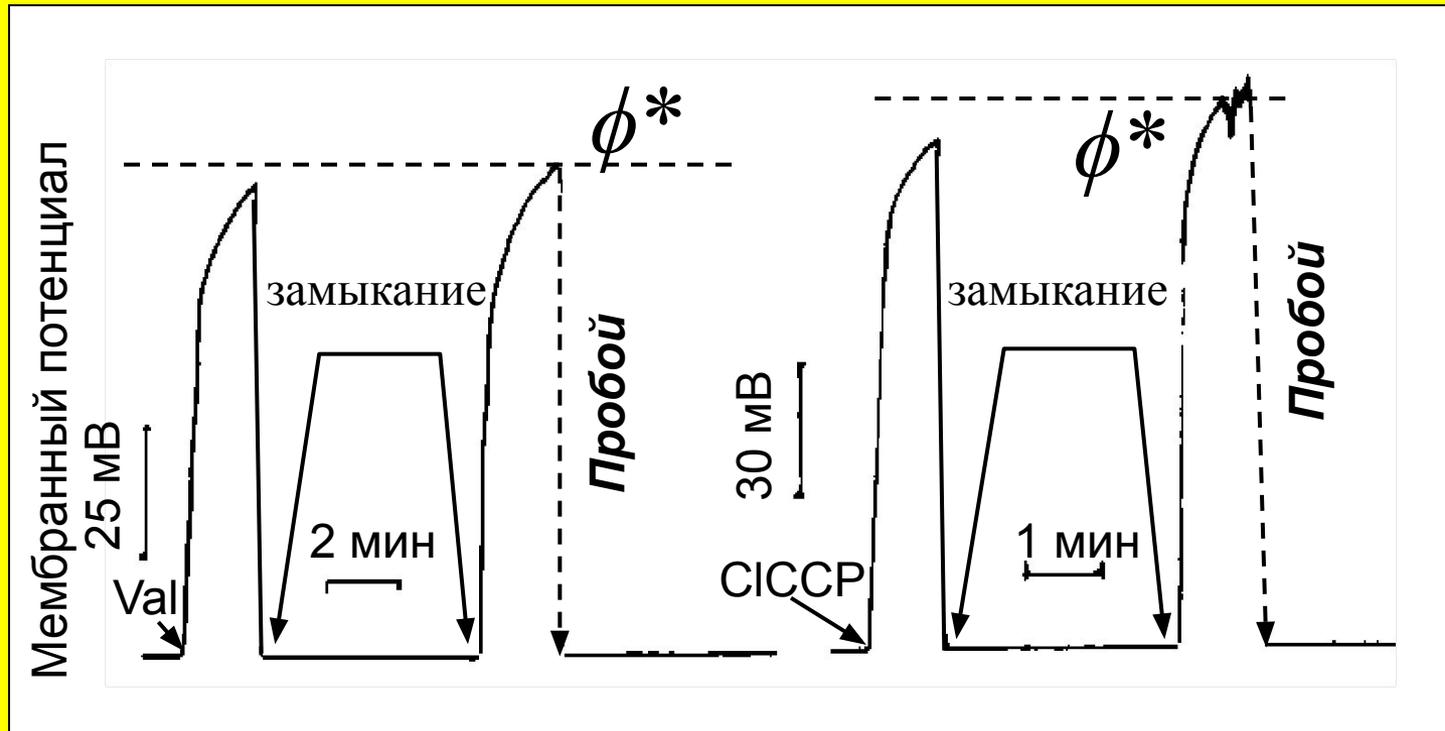


$$U(\text{mV}) = \frac{zF}{RT} \ln \frac{[H]_2}{[H]_1} \approx 60 \times \Delta \text{pH}$$



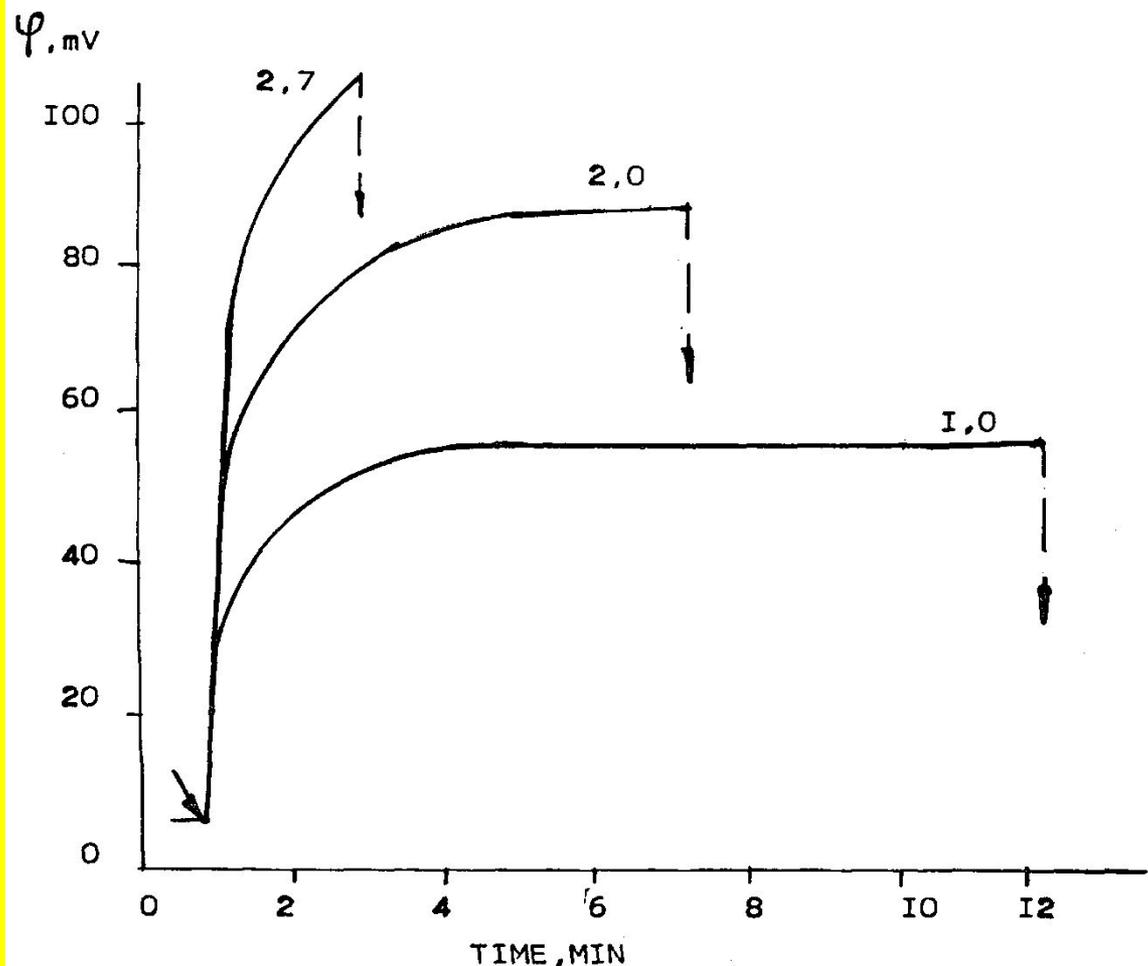
Измерение потенциала, генерируемого мембраной в результате диффузии ионов в присутствии переносчика протонов СИССР. Запись изменения потенциала. После добавления СИССР с одной стороны мембраны добавляли кислоту для создания разности рН ( $\Delta \text{pH}$ ).

# Электрический пробой мембран собственным мембранным потенциалом



Источником электродвижущей силы в данном случае служит сама мембрана, по сторонам которой созданы разные концентрации ионов:  $K^+$  (слева) или  $H^+$  (справа). Мембранный потенциал появлялся в ответ на введение ионофора: валиномицина (переносчик ионов калия) – слева или СССР (переносчик протонов) – справа. Как только потенциал достигал критического значения, наступал электрический пробой и измеряемый потенциал начинал падать. В этот момент производилось "короткое замыкание" растворов по сторонам мембраны. После потенциал вновь развивался и вторично наступал электрический пробой мембраны (при потенциале пробоя  $\phi^*$ ).

# Пробой БЛМ при разном диффузионном потенциале

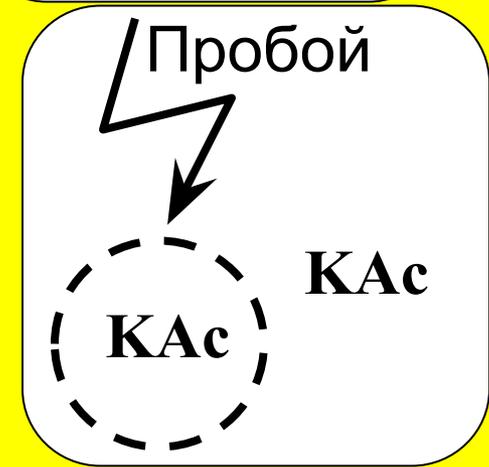
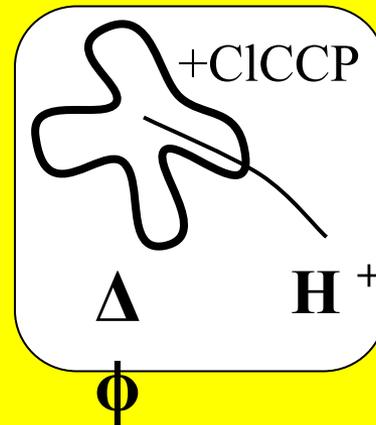
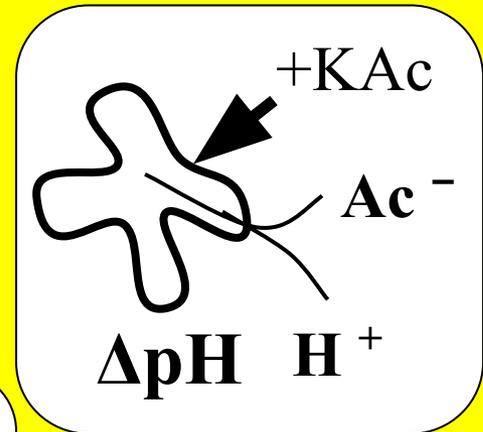
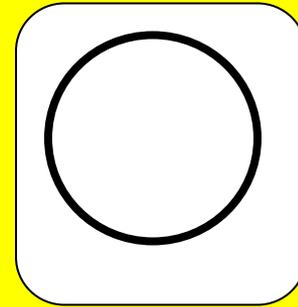
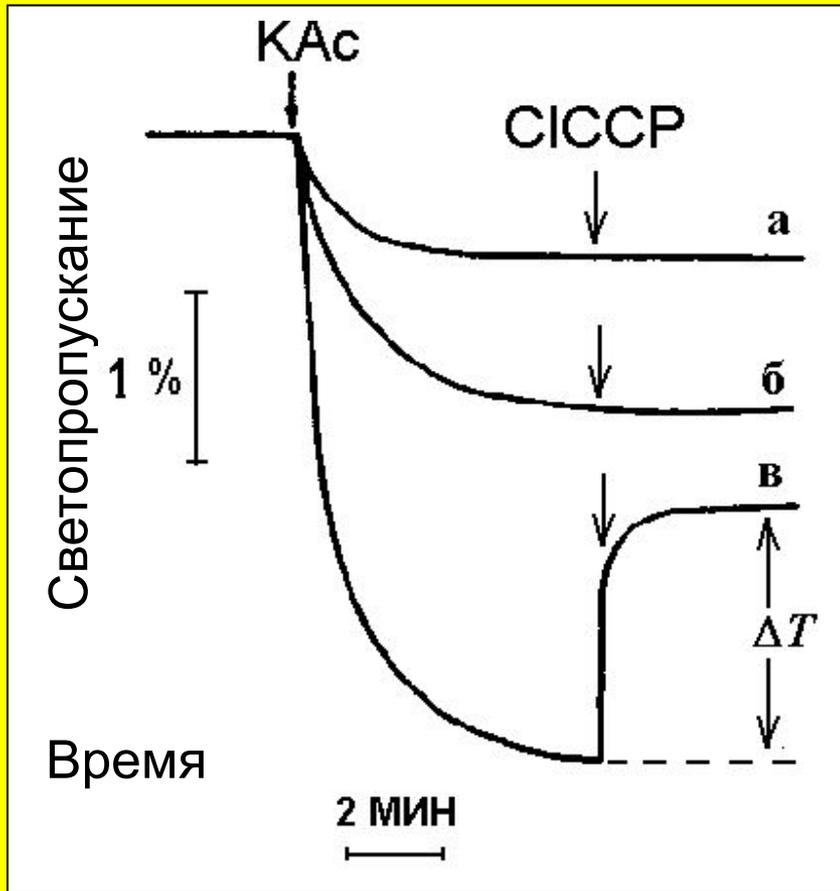


Две величины - величина потенциала пробоя и время жизни мембраны тесно связаны.

Если величина потенциала пробоя достаточно высока, то мембрана быстро разрушается. Если создаваемый диффузионный потенциал низок, то мембрана может жить дольше, но все равно разрушается, если этот потенциал не снять.

# Изучение электрического пробоя в **липосомах**

# Электрический пробой мембран липосом



Изменения светопропускания суспензии липосом при добавлении ацетата калия (КАс) и протонифора (СІССР).

Липосомы (0.2 мг/мл) были получены из яичного лецитина в растворе сахарозы (10 mmol/l).

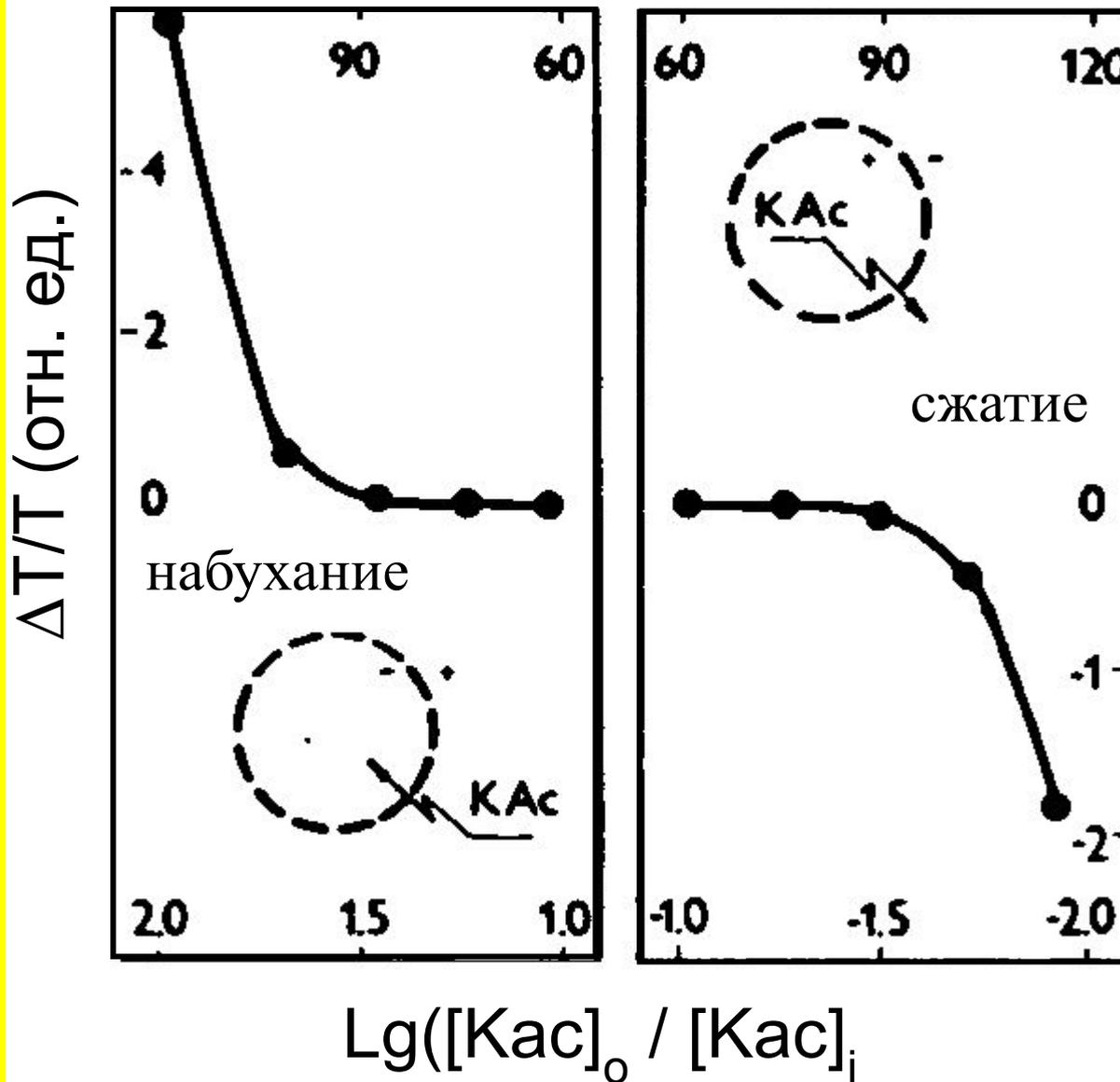
Добавки ацетата: а - 5 мМ, б - 15 мМ, в - 40 мМ.

Ко всем пробам добавляли валиномицин до концентрации 100 нМ.

В результате вхождения уксусной кислоты и ионов калия внутрь липосомы, на мембране создается равновесный калиевый потенциал. При определенном потенциале мембрану пробивает, концентрации ацетата выравниваются и светопропускание суспензии резко подскакивает.

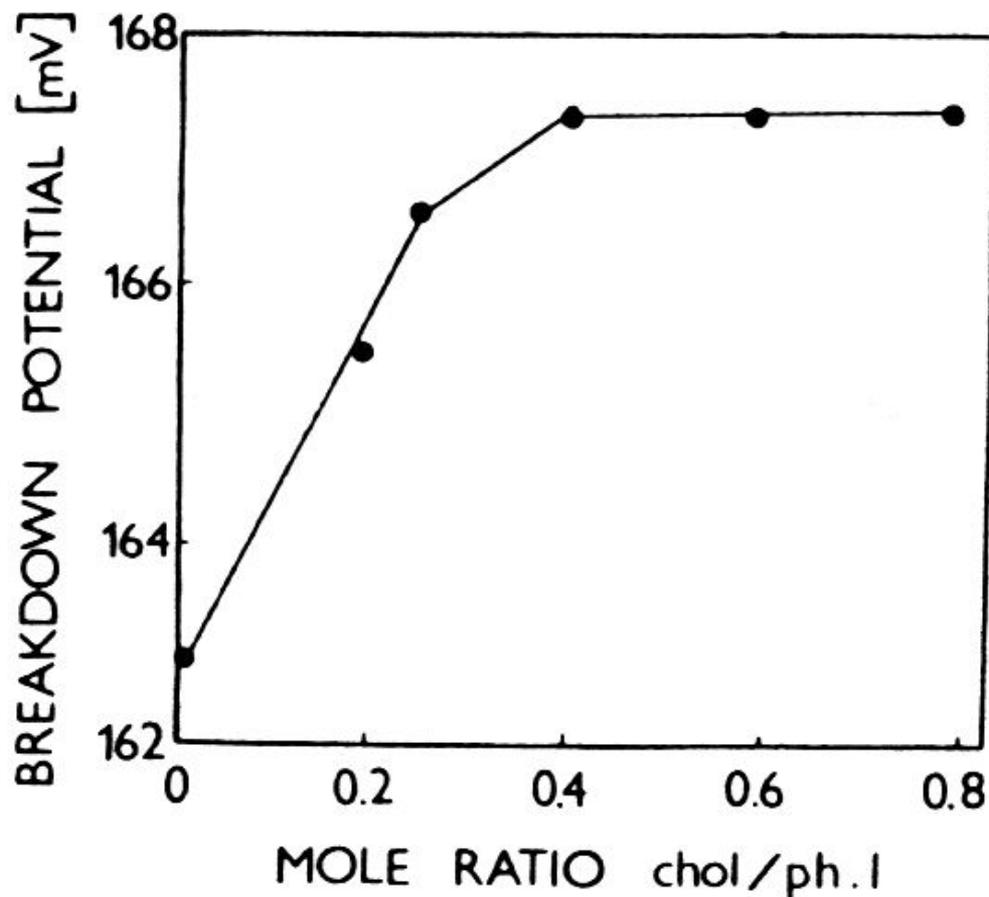
# Электрический пробой мембран липосом

## Мембранный потенциал



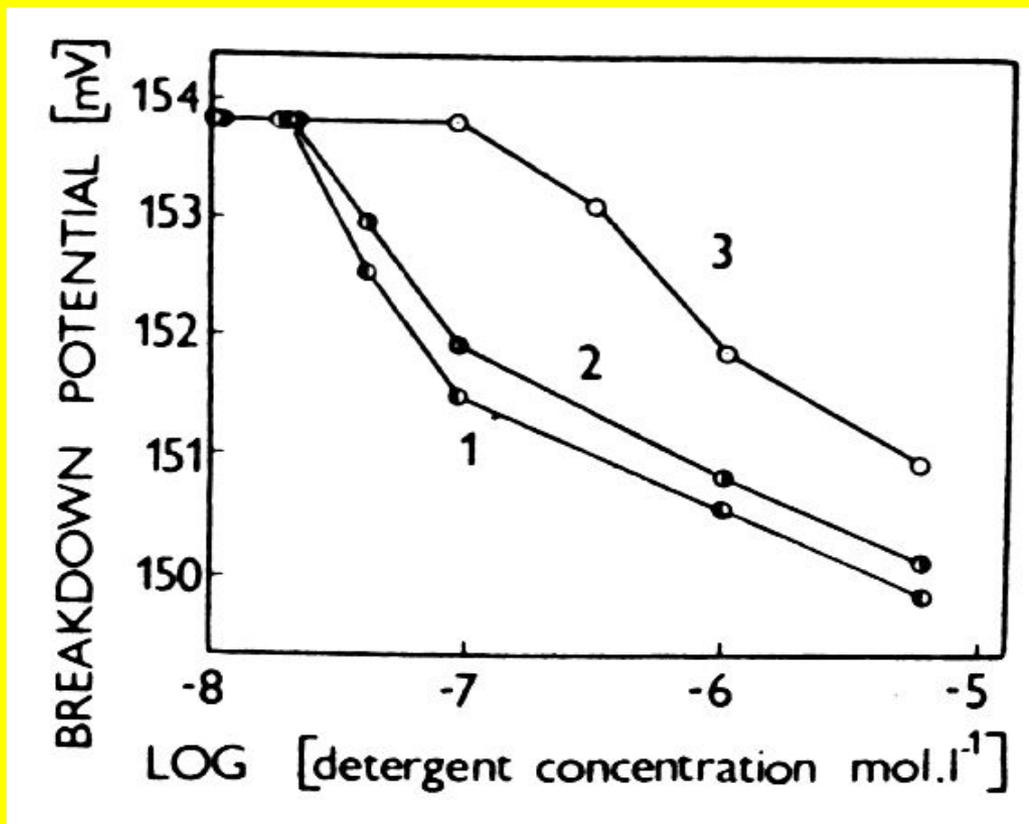
- Изменение светопропускания суспензии липосом при добавлении протонофора к липосомам, нагруженным **КАс** (справа) или помещенным в раствор **КАс** (слева).  $[\text{КАс}]_i$  и  $[\text{КАс}]_o$  - концентрация ацетата внутри и снаружи липосом, соответственно. Вверху — рассчитанный мембранный потенциал. Ордината — изменение светопропускания суспензии ( $\Delta T/T$ ) в ответ на добавление ионофора.

# Влияние холестерина на электрическую стабильность мембран липосом



Липосомы (0.2 мг липидов/мл) были изготовлены из смеси фосфолипидов митохондрий печени крысы с холестерином.

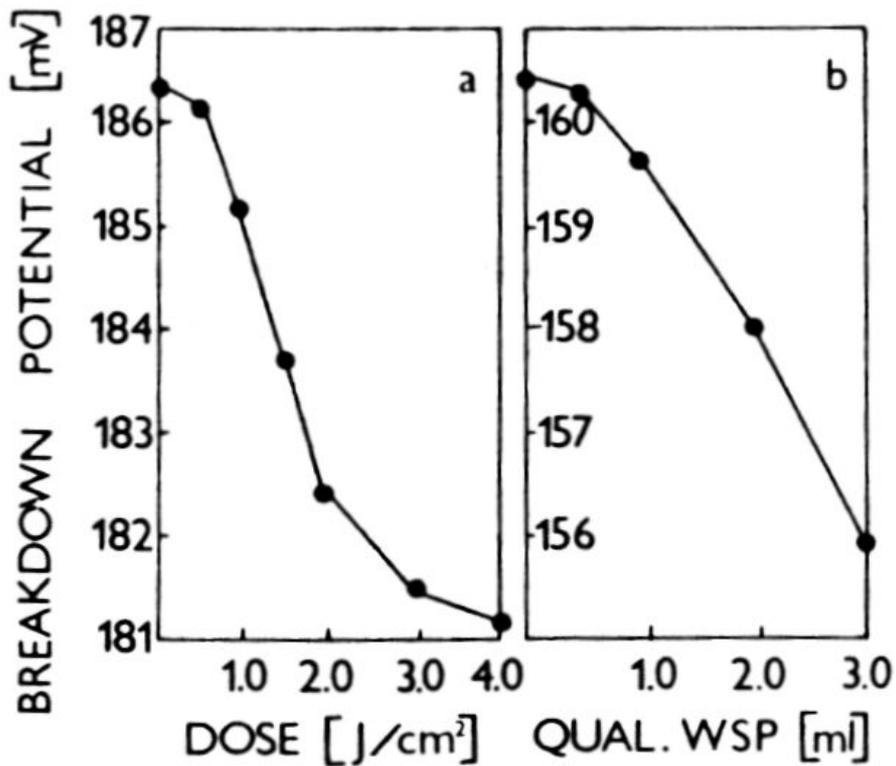
# Влияние детергентов на потенциал пробоя мембран ЛИПОСОМ



Липосомы приготовлены из лецитина яичного желтка, сформированы в растворе сахарозы, содержащем различные концентрации детергента.

1 – додецилсульфат натрия (SDS), 2 – цетилтриметиламмоний бромид (CTAB), 3 - Triton X-100.

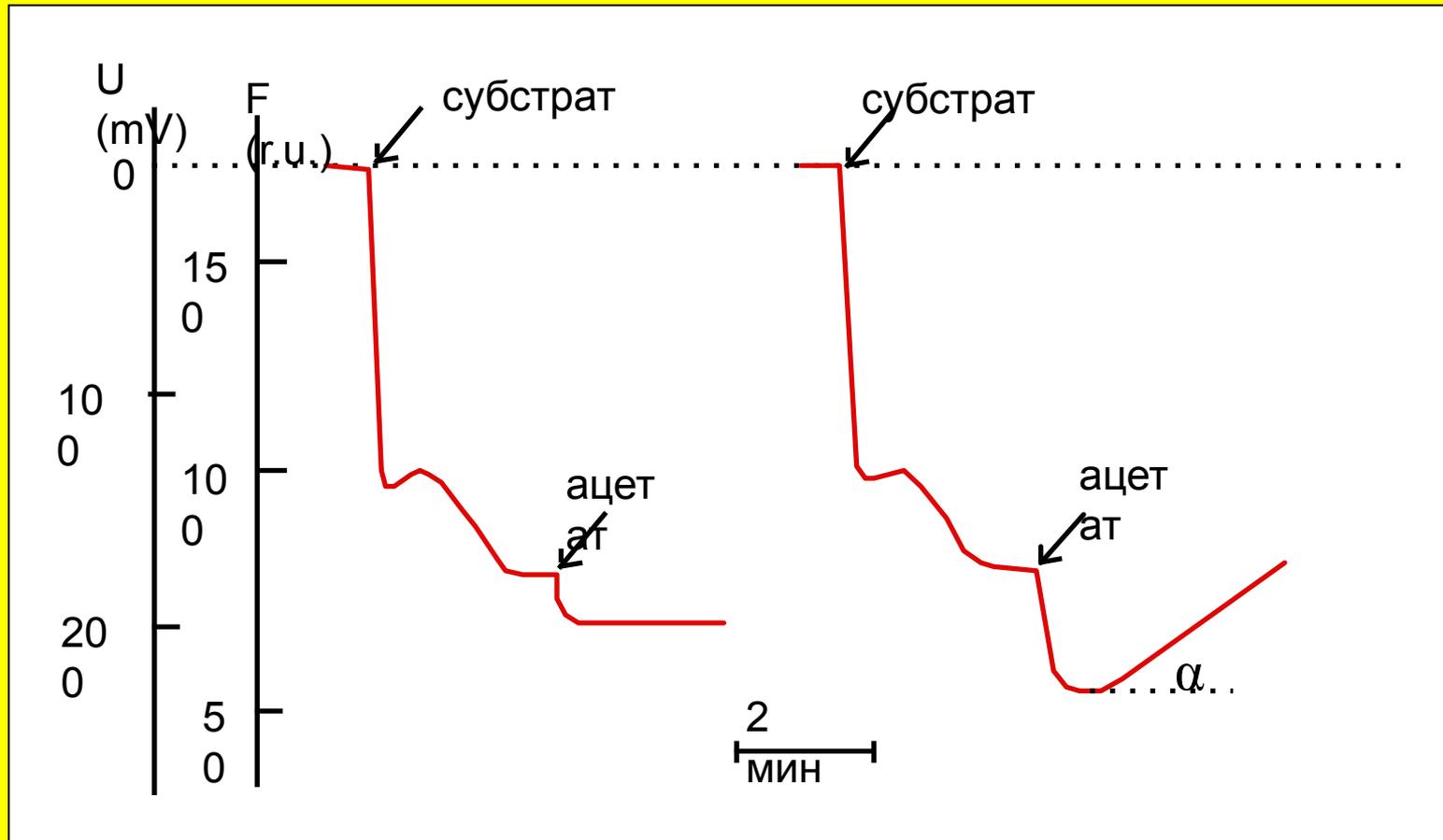
# Влияние УФ и продуктов перекисного окисления на потенциал пробы



Уменьшение электрической стабильности мембран липосом (из яичного лецитина) при действии УФ-облучения (a) и при добавлении водорастворимых продуктов перекисного окисления (WSP) (b). WSP были выделены из супернатанта при центрифугировании (100,000 x g) липосом, предварительно облученных УФ (250-350 нм).

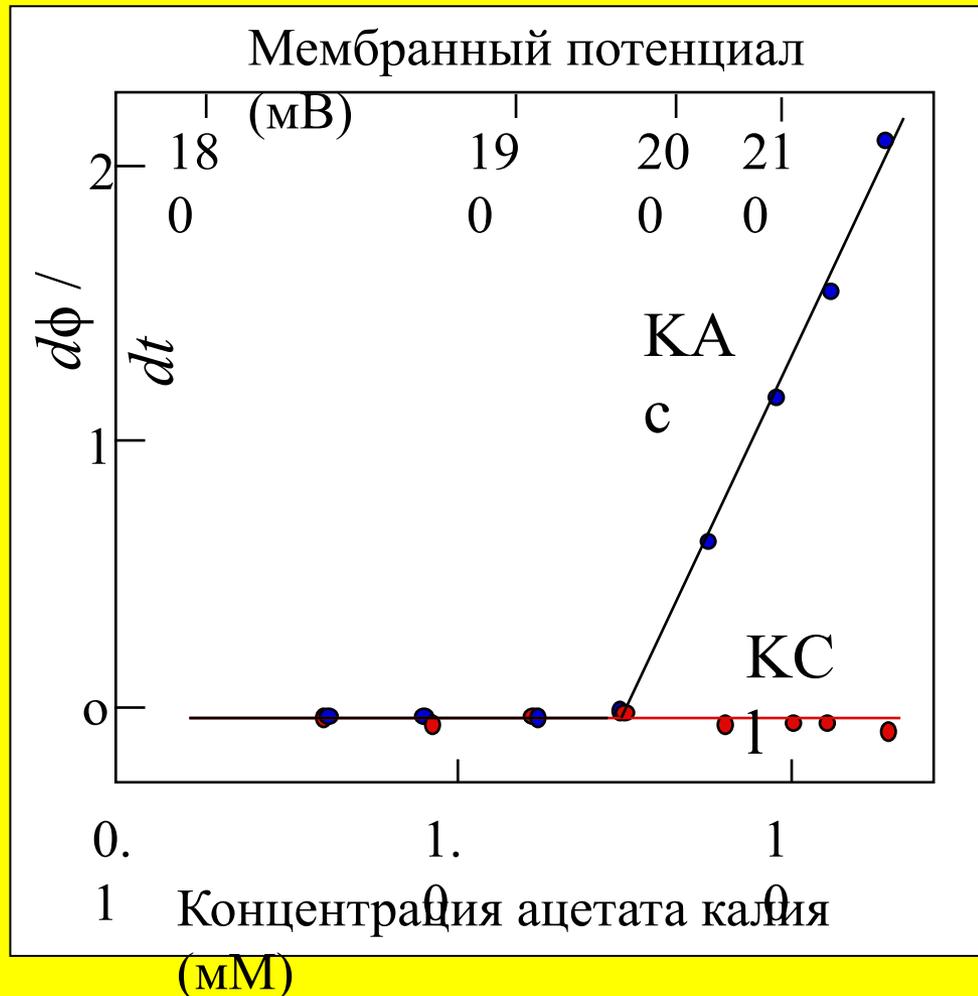
Изучение электрического  
пробоя мембран **МИТОХОНДРИЙ**

# Электрический пробой мембран митохондрий



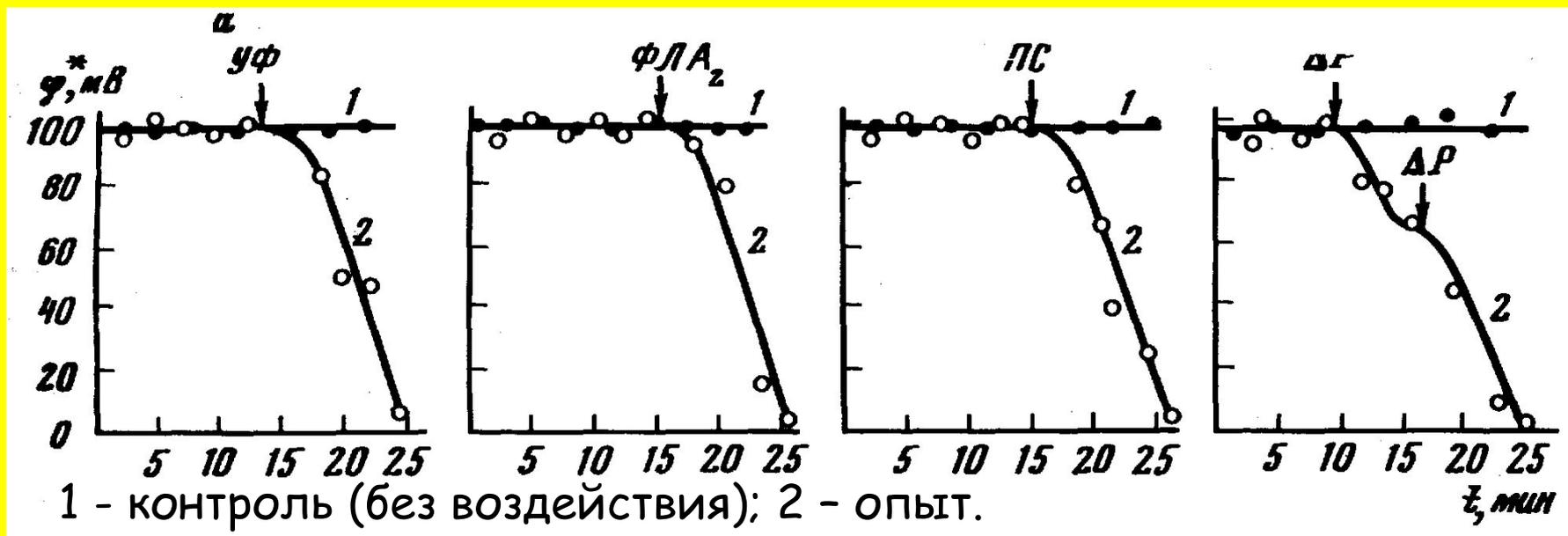
При добавлении к митохондриям субстратов появляется мембранный потенциал ( $\Delta\phi$ ). При добавлении ацетата уксусная кислота проникает в матрикс, уменьшая  $\Delta pH$  на мембране и тем самым увеличивая  $\Delta\phi$  (левая кривая). Этот потенциал стабилен. Если добавить больше ацетата,  $\Delta\phi$  вырастет сильнее, но он не держится (правая кривая). Величина  $\tan \alpha$  на правой кривой характеризует утечку ионов через мембрану, пробитую слишком высоким потенциалом

# Зависимость скорости падения мембранного потенциала от концентрации добавленного ацетата



Точка перелома на кривой с КАс соответствует началу пробоя мембраны и может рассматриваться как потенциал пробоя  $\phi^*$ . На рисунке также видно, что добавление КСl вместо КАс не приводит к пробоя мембраны.

# Факторы, влияющие на электрическую стабильность мембран



перекисное окисление липидов

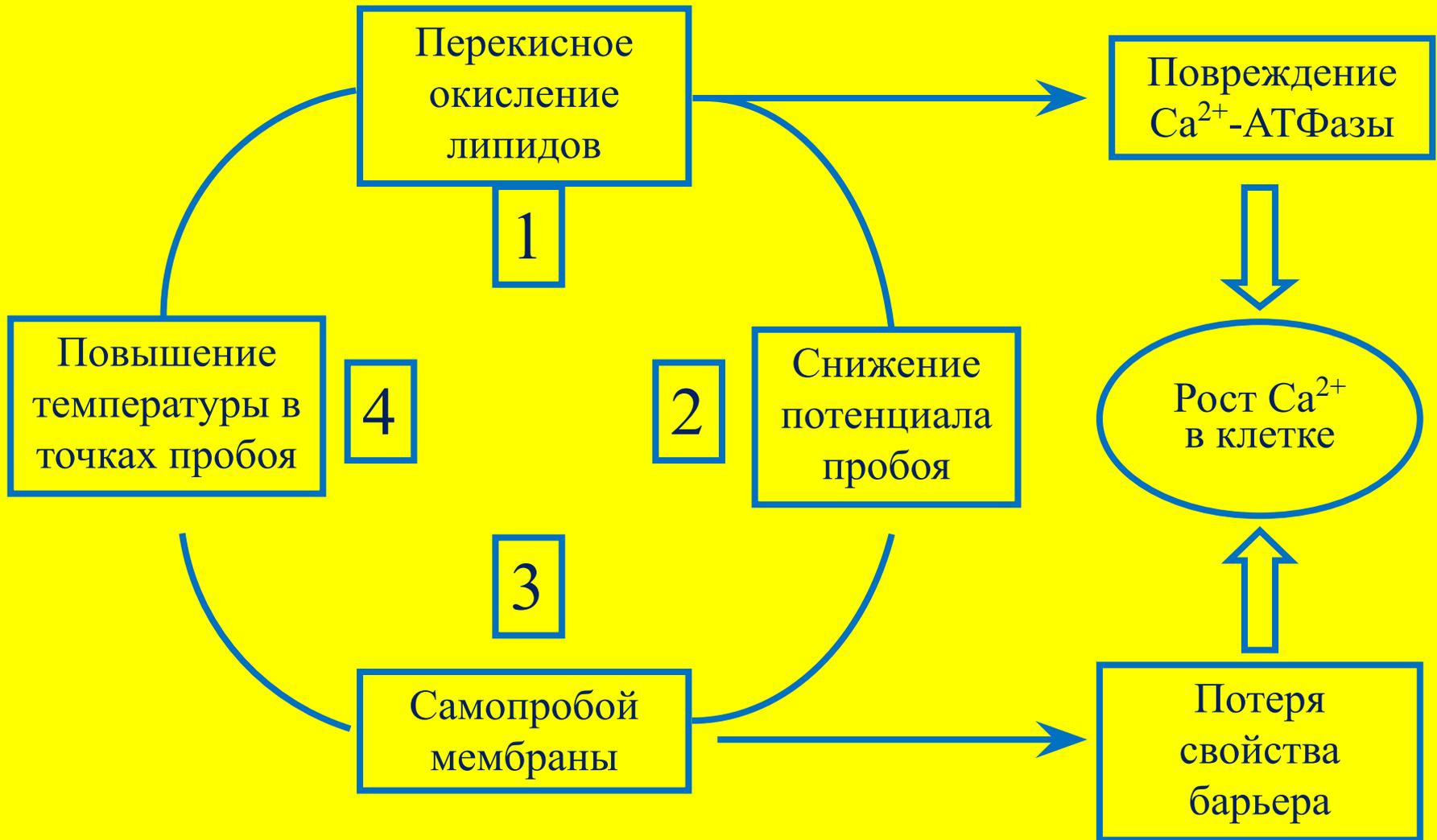
действие эндогенных фосфолипаз

адсорбция на поверхности мембраны

заряженных полиэлектролитов

осмотическое растяжение мембраны

# Порочный круг в липидном бислое при перекисидации



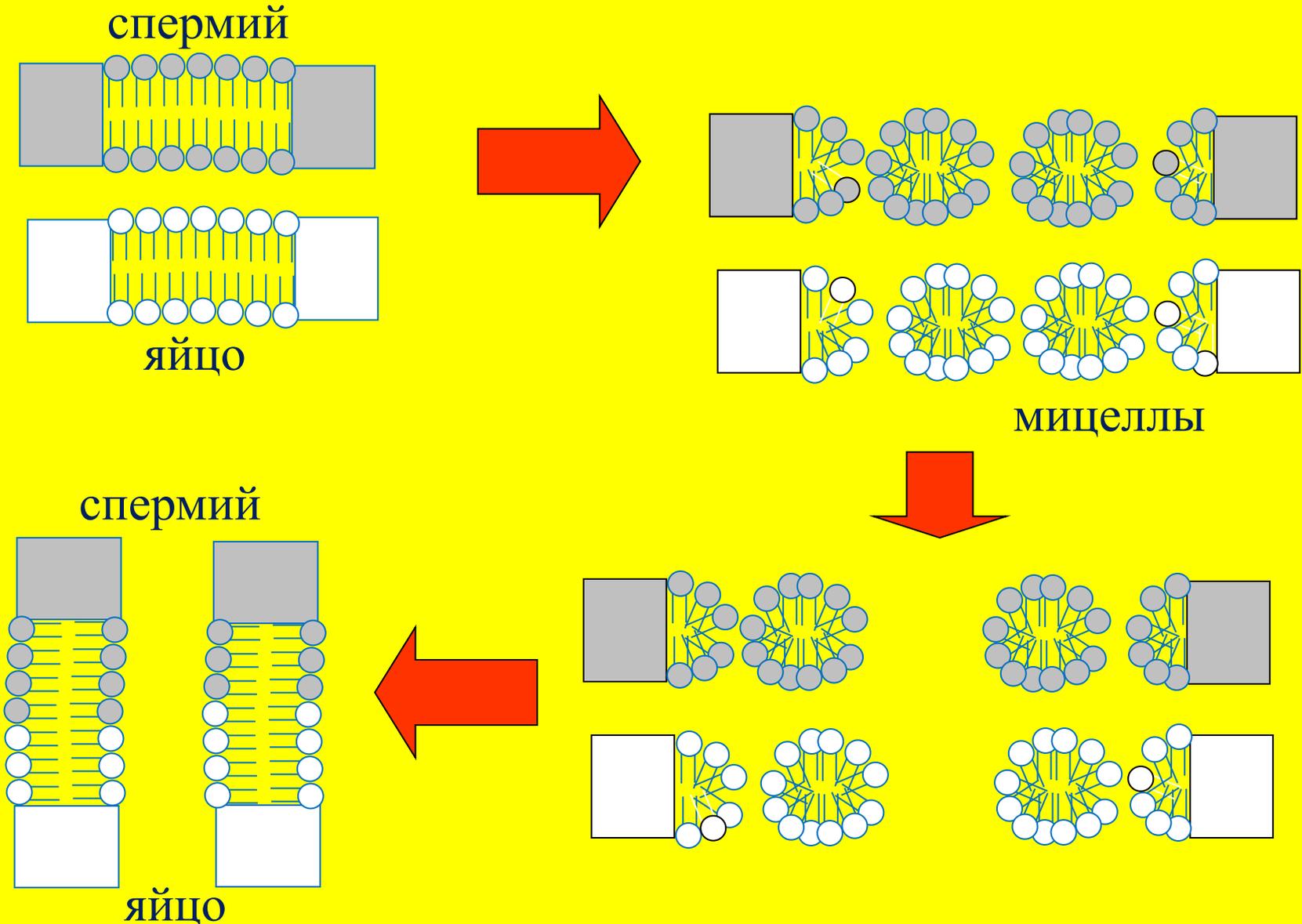
Электрические потенциалы (мВ) на мембранах клеток и потенциалы пробоя модельных и биологических мембран

| Объект                          | Разность потенциалов на мембране в клетках                    | Потенциал пробоя      |
|---------------------------------|---|-----------------------|
| Липидный бислой                 | -   | 130 - 170 (БЛМ)       |
| Клеточная мембрана              | 70 (нервные и мышечные клетки)                                | 90 - 100 (эритроциты) |
| Внутренняя мембрана митохондрий | 175 (митохондрии печени в присутствии субстратов и кислорода) | 200                   |

# Применение явления электрического пробоя

- ✓ Загрузка клеток лекарственными препаратами
- ✓ Электрослияние клеток
- ✓ Генная трансформация клеток
- ✓ Стерилизация
- ✓ Электростимуляция

# Модель слияния плазматических мембран в месте контакта спермия с яйцеклеткой



# Влияние различных веществ и факторов на состояние мембраны

## 1. Физические факторы

Величина приложенного потенциала

Температура

Высокочастотное электромагнитное поле

Гидростатическое давление

УФ облучение и перекисное окисление липидов

## 2. Качественный состав мембраны

Фосфатидная кислота

Лецитин

Ганглиозиды

Длина жирнокислотного остатка жирной кислоты

## 3. Химические соединения

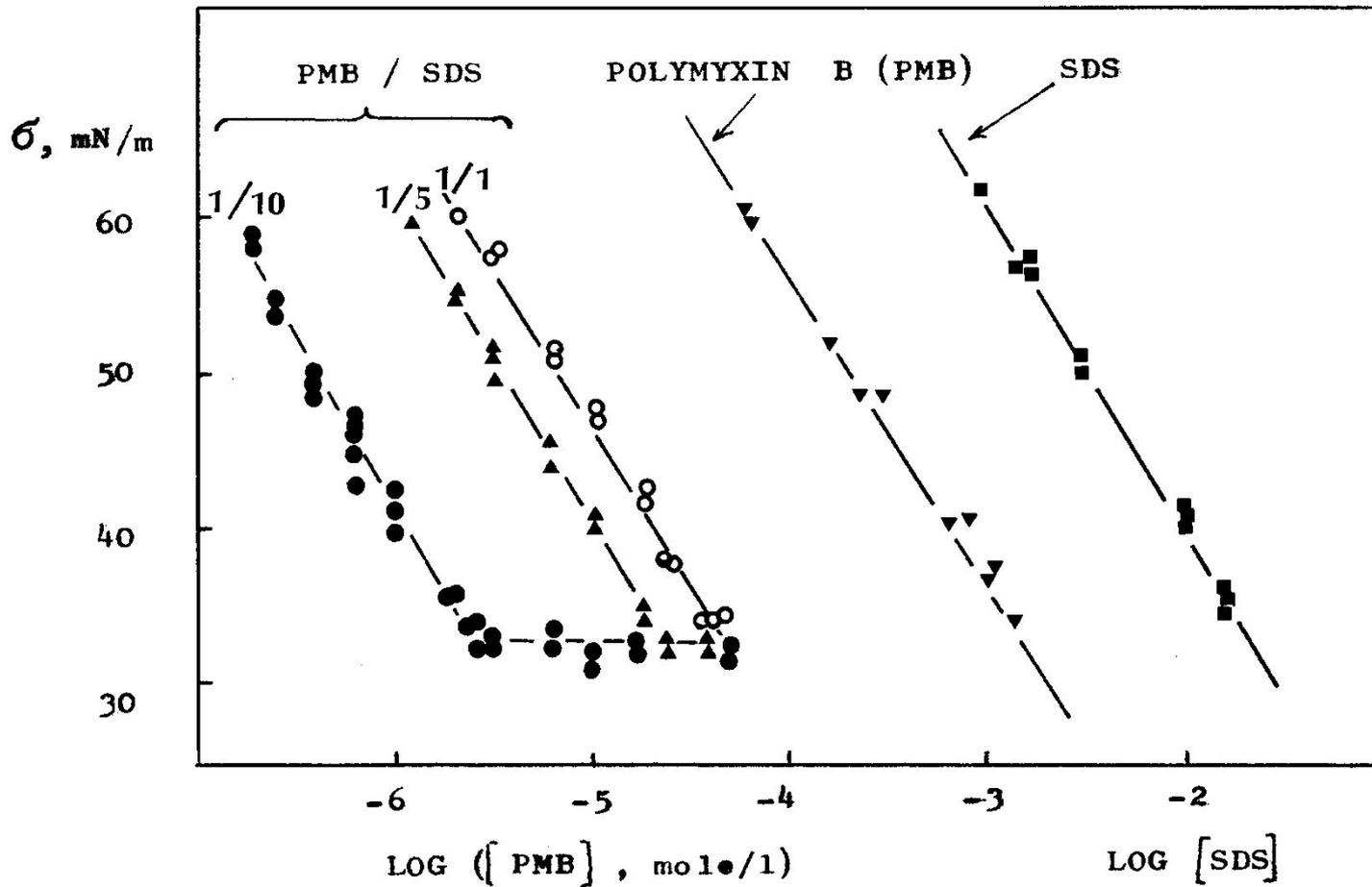
Глицерин

Голотурин

Полимиксин

# Влияние полимиксина на поверхностное натяжение

EFFECT OF POLYMYXIN + SDS ON PHOSPHOLIPID MONOLAYER SURFACE TENSION



# Вопросы к зачету

1. Электрический пробой плоской бислойной мембраны (БЛМ): формирование и свойства БЛМ.
2. Понятие электрического пробоя. Изучение пробоя клеточных мембран. Гипотезы о механизме электрического пробоя.
3. Принципы теории локальных пор Ю.А. Чизмаджева. Основные факты, подтверждающие теорию локальных пор.
4. Вольт-амперные характеристики БЛМ и условия электрического пробоя.
5. Влияние растяжения, липопероксидации и фосфолипазы на потенциал пробоя БЛМ. Факты и объяснение.
6. Влияние электрического пробоя на электрическую стабильность мембран.
7. Самопробой БЛМ ионным диффузионным потенциалом.
8. Самопробой мембран при пероксидации липидов, индуцированной УФ излучением.
9. Принцип метода изучения электрического пробоя везикулярных липидных структур (липосом).
10. Электрический пробой мембран эритроцитов. Принцип метода, влияние растяжения мембраны, выход гемоглобина.
11. Электрический пробой митохондрий. Метод создания и измерения потенциала. Проявление пробоя.
12. Электрический пробой мембран при снижении поверхностного натяжения на границе раздела фаз.