

IV. Окислительный стресс

Номенклатура различных форм кислорода

$\cdot \text{O}-\text{O} \cdot$ Триpletный кислород
(Основное квантовое состояние)

$\text{O}-\text{O} :$ Синглетный кислород

$\cdot \text{O}-\text{O} :$ Супероксид

$\cdot \text{O}-\text{O} : \text{H}$ Перидроксил радикал

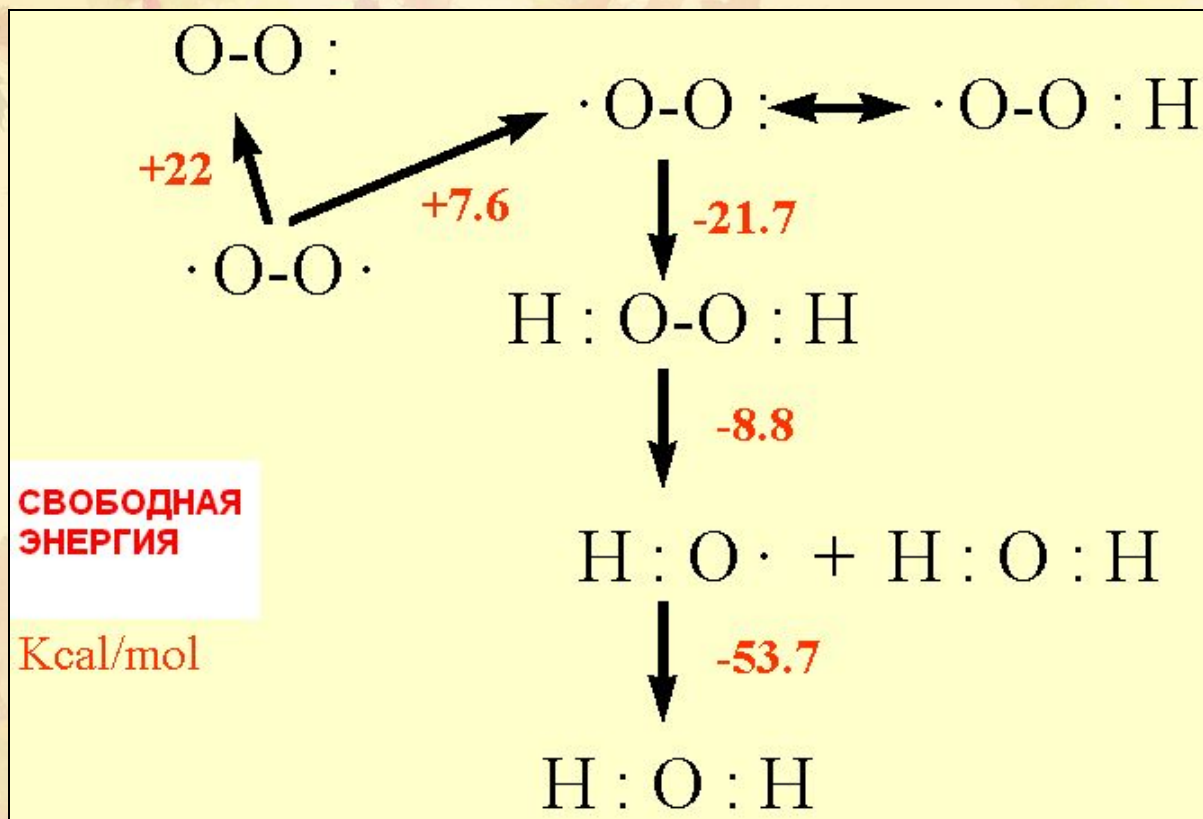
$\text{H} : \text{O}-\text{O} : \text{H}$ Перекись

$\text{H} : \text{O} \cdot$ Гидроксил радикал

$\text{H} : \text{O} :$ Гидроксил ион

$\text{H} : \text{O} : \text{H}$ Вода

Стадии активации кислорода



Неактивированный кислород – бирадикал. Из этого триплетного статуса он может быть активирован либо реверсией спина по одному из неспаренных электронов с формированием синглетного статуса или восстановлением.

1-ая реакция восстановления – образование супероксида. Последующие реакции формируют перекись, ОН-радикал и воду.

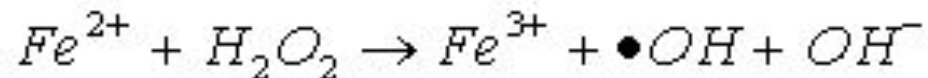
Источники радикалов кислорода

- - эндогенные
- - экзогенные

1. Эндогенные источники

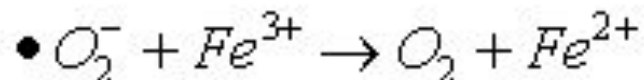
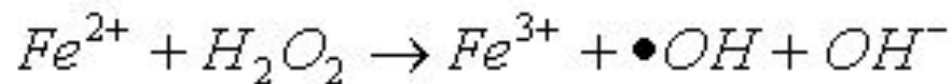
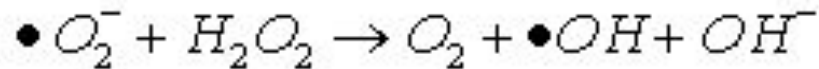
А. Реакция Фентона

- 1.** Реакция Фентона, описанная в 1894 г.

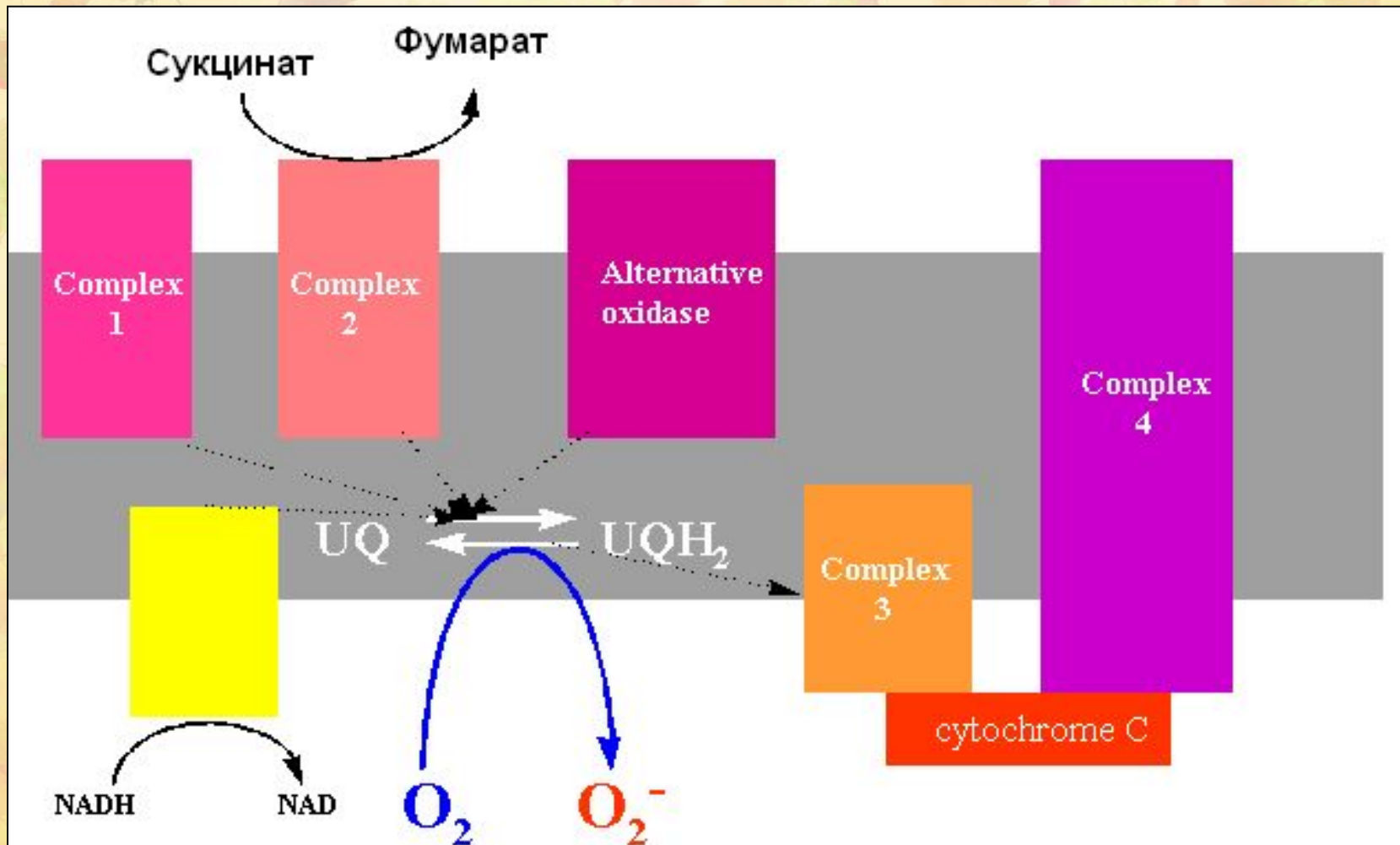


В биологических системах
нехватка восст. железа

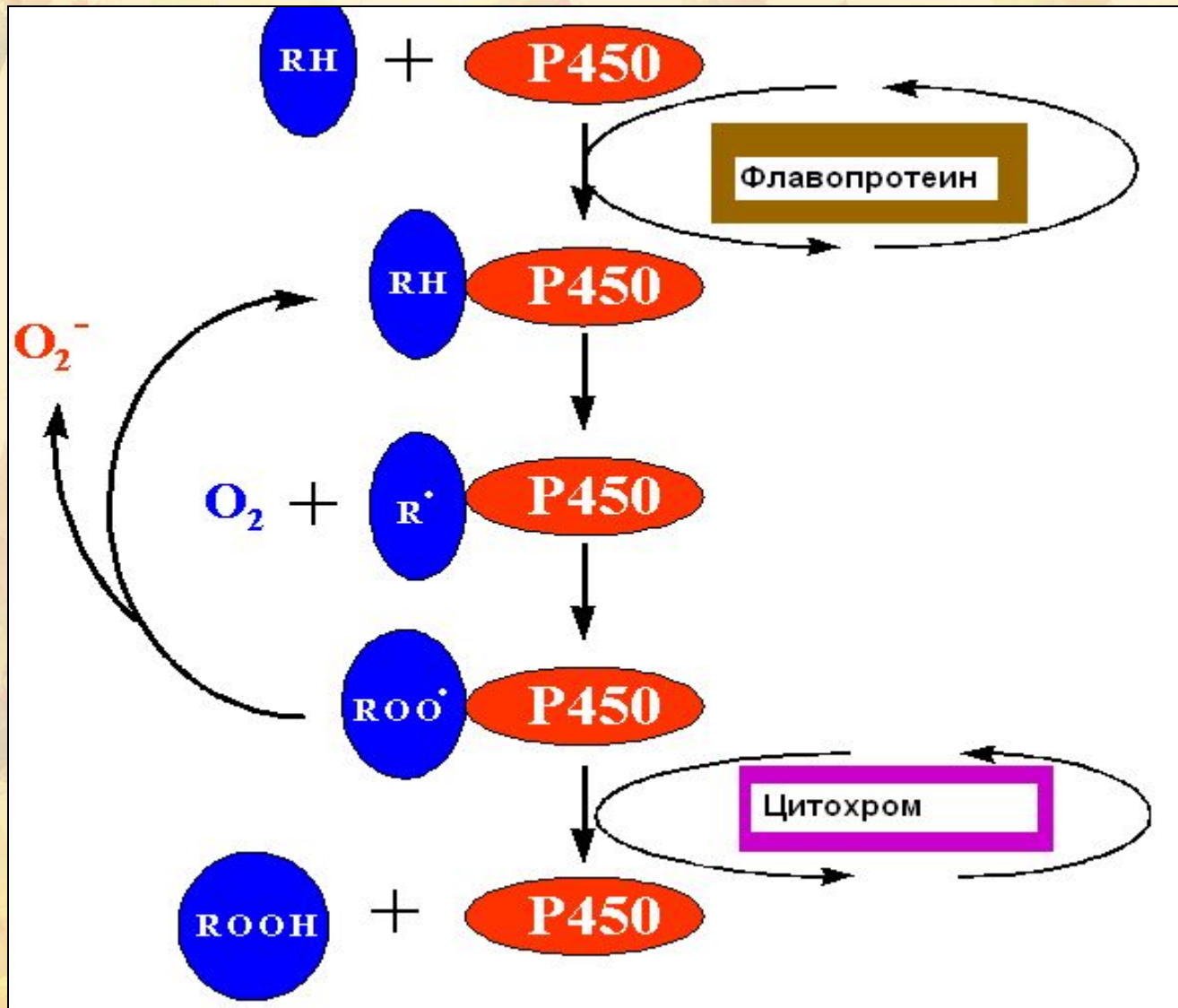
- 2.** компенсируется его образованием
из окисленного



Б. Окислительное фосфорилирование



В. Микросомная монооксигеназная система



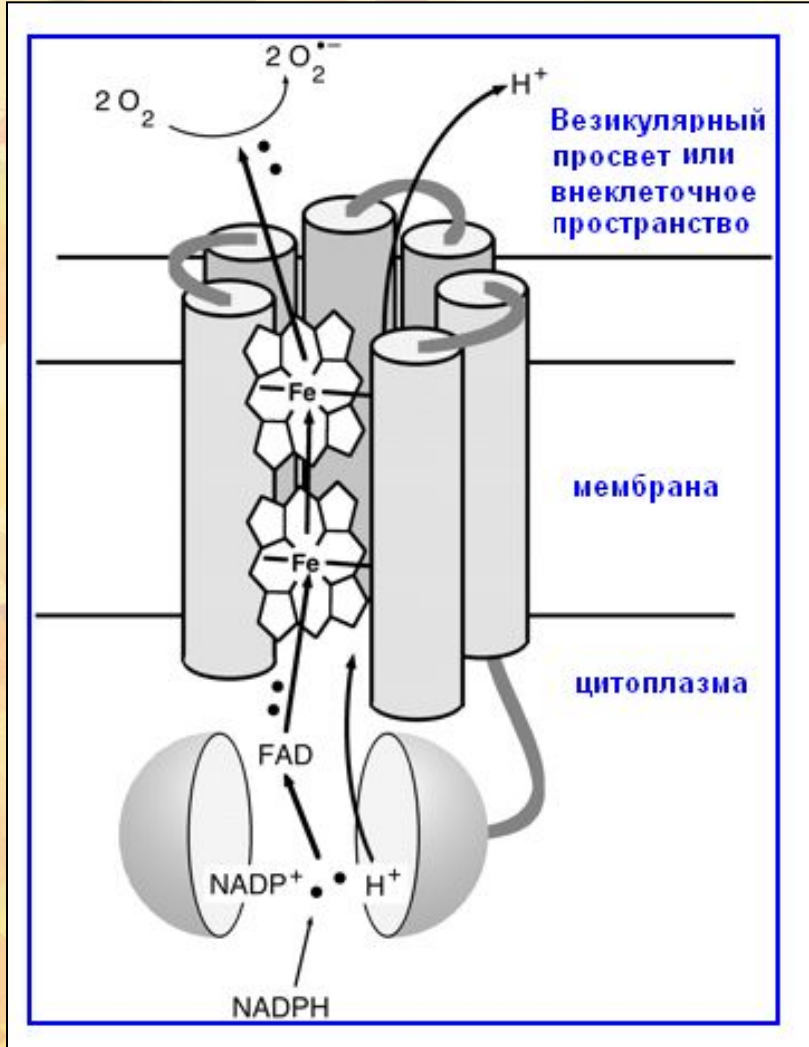
Г. Пероксисомы и глиоксисомы

- - окисление жирных кислот
- - цикл глиоксильной кислоты: гликолат оксидаза – продуцирует перекись
- - Ксантиноксидаза, уратоксидаза и НАДН оксидаза – образуют супероксид анион

Полиморфноядерные лейкоциты имеют три ферментативные системы генерации АКМ :

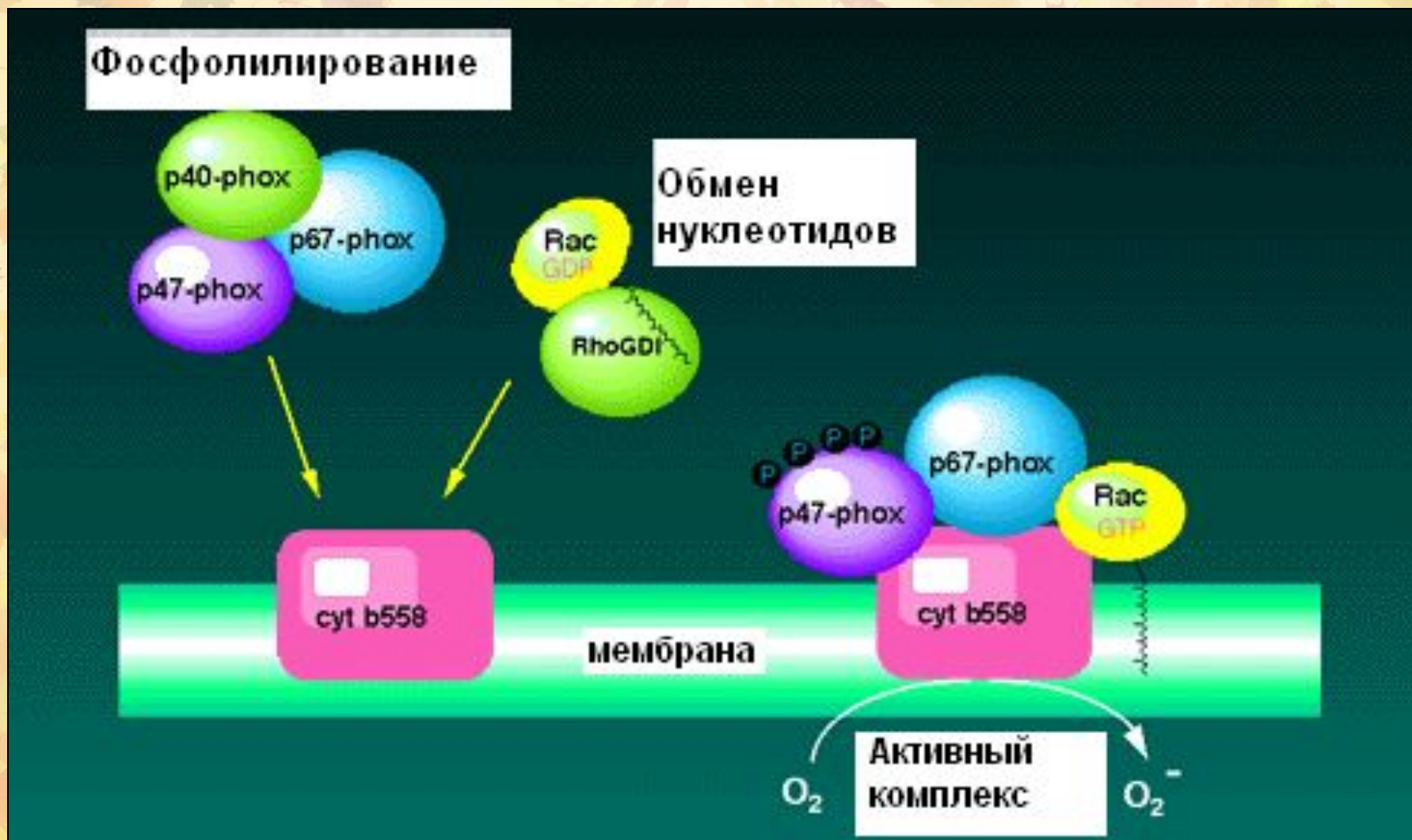
NADPH-оксидазу (мембраносвязанную),
пероксидазы - миелопероксидаза (МПО)
в нейтрофилах и
эозинофильная пероксидаза (ЭПО) в
эозинофилах
- и NO-синтазу .

Модель НАДФН-оксидазного комплекса

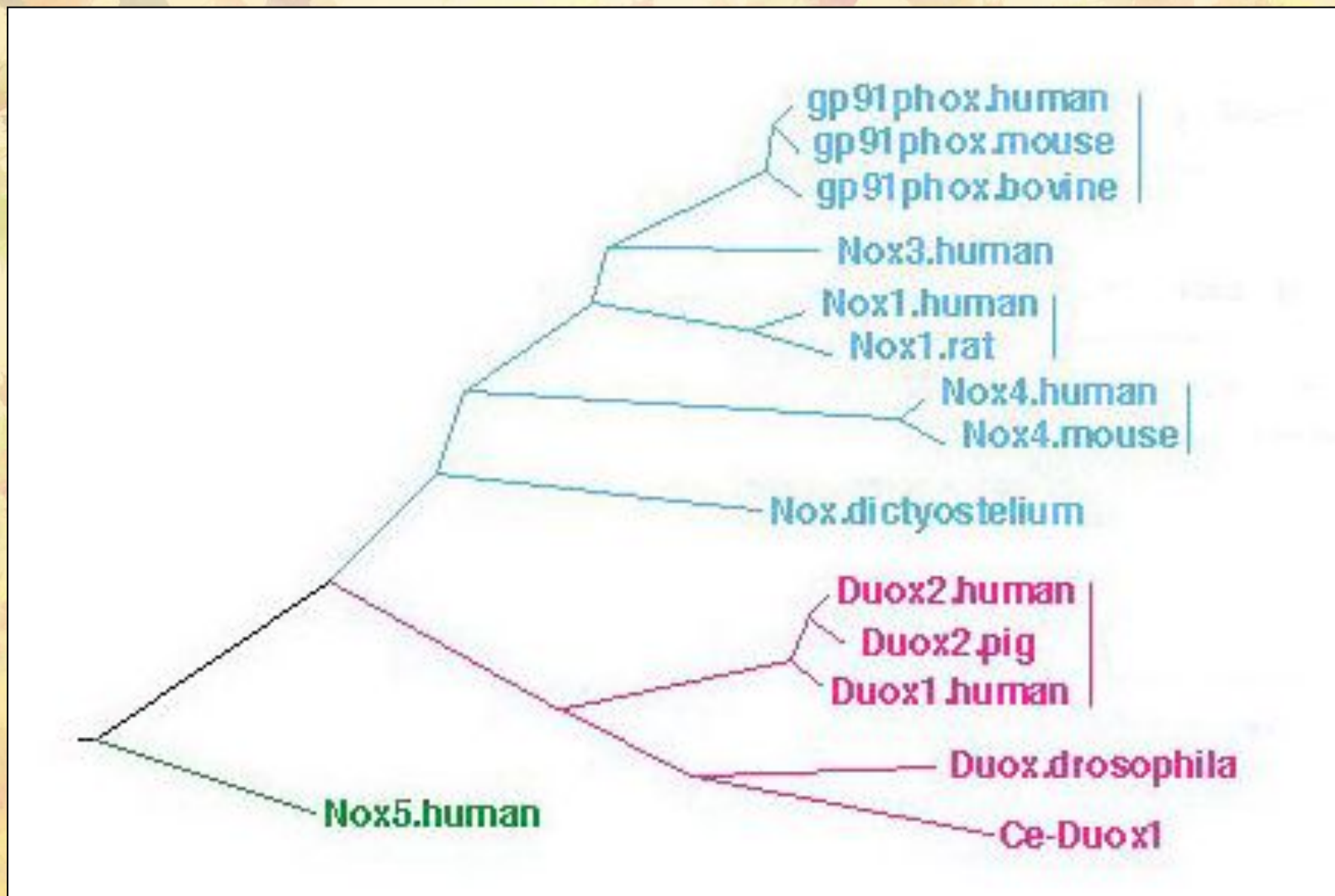


С-конец белка формирует цитоплазматическую глобулярную область рядом с FAD-простетической группой и сайтом связывания с субстратом NAD(P)H. N-конец содержит 6 гидрофобных участков, формирующих альфа-спирали, связанные с мембраной. Они же формируют протонный канал. Остатки гистидина в спиральях 3 и 5 координируют атомы железа в центре гема.

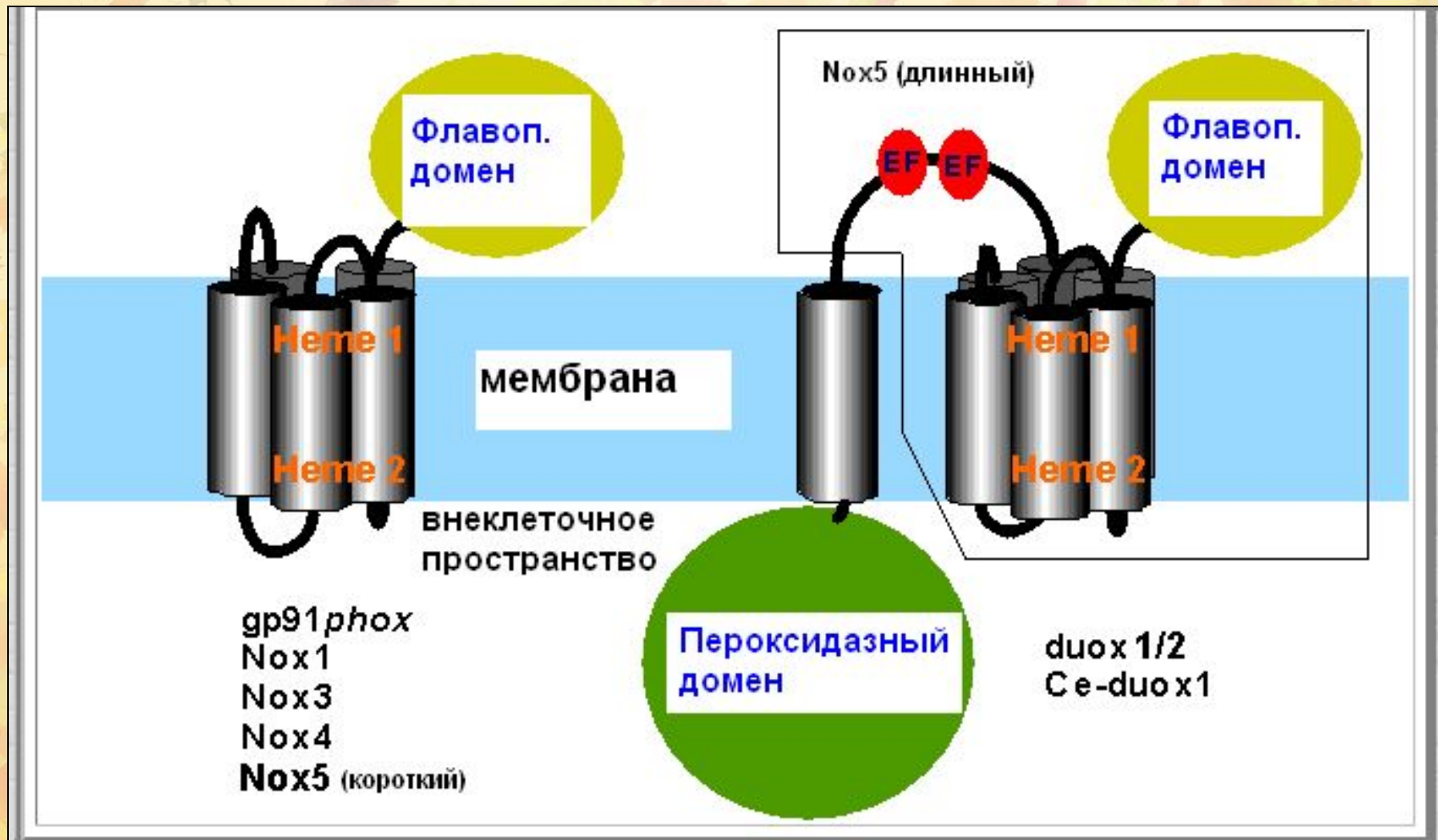
Активация NAD(P)H-оксидазы



Дендрограмма васкулярных Nox белков (7 белков у человека)

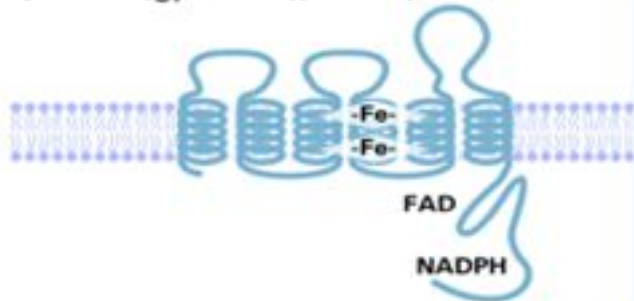


Классы Nox белков

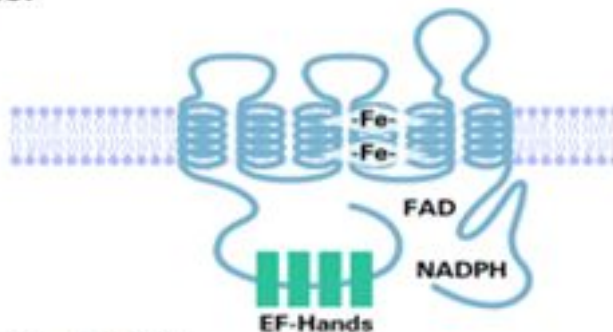


Топология Nox белков

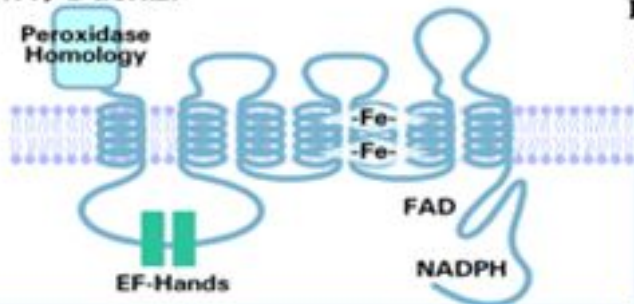
Nox1, Nox2 (gp91^{phox}), Nox3, Nox4:



Nox5:



Duox1, Duox2:

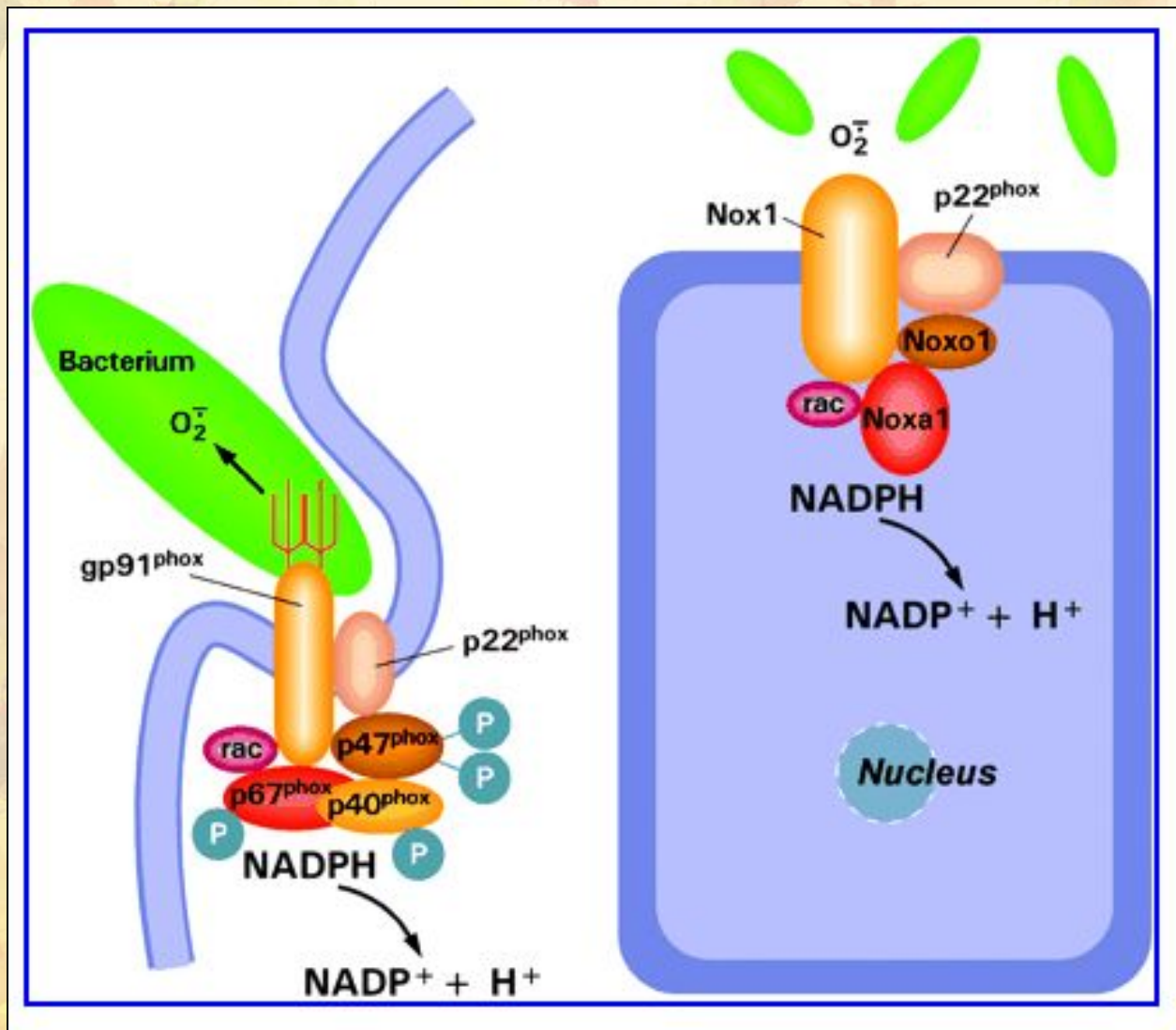


Все белки имеют коровый компонент gp91^{phox} от Nox2,

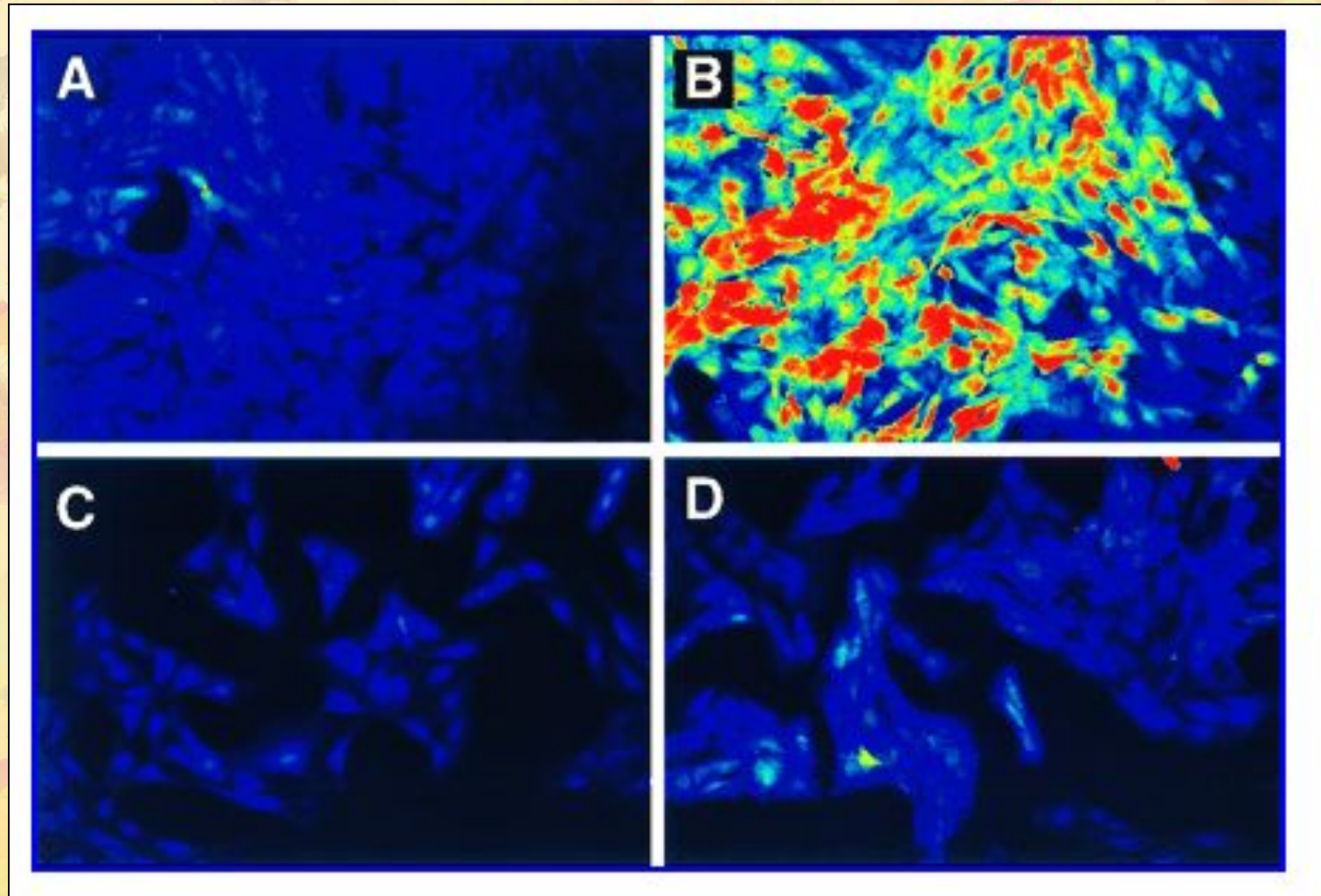
Са-связывающий участок EF, они включают 6 гидрофобных, мембрано-связанных сегментов и несколько консервативных мотивов, вовлеченных в связывание NAD(P)H, FAD, и два гема.

Nox5 содержит дополнительный Са-связывающий участок EF, тогда как Duox1 - 2 оксидазы имеют два Са-связывающих участка и EF и внеклеточный пероксидазный домен

НАДФН-оксидаза фагоцитов (слева) и кишечника (справа)



Внутриклеточное образование перекиси в VSMC-клетках (торакальная аорта) с использованием флуорофора DCF-DA



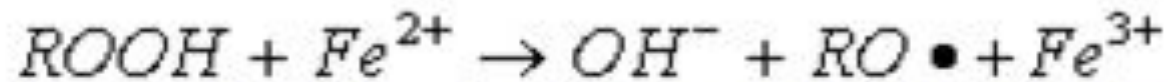
2. Экзогенные источники

- - Оксиды азота в сигаретном дыме (1000ppm)
- - Соли Fe и Cu
- - Хронические воспаления, вызванные инфекциями

Механизмы действия. Мишени для РФК и РФА

- Липиды клеточной мембраны
- ДНК
- Белки

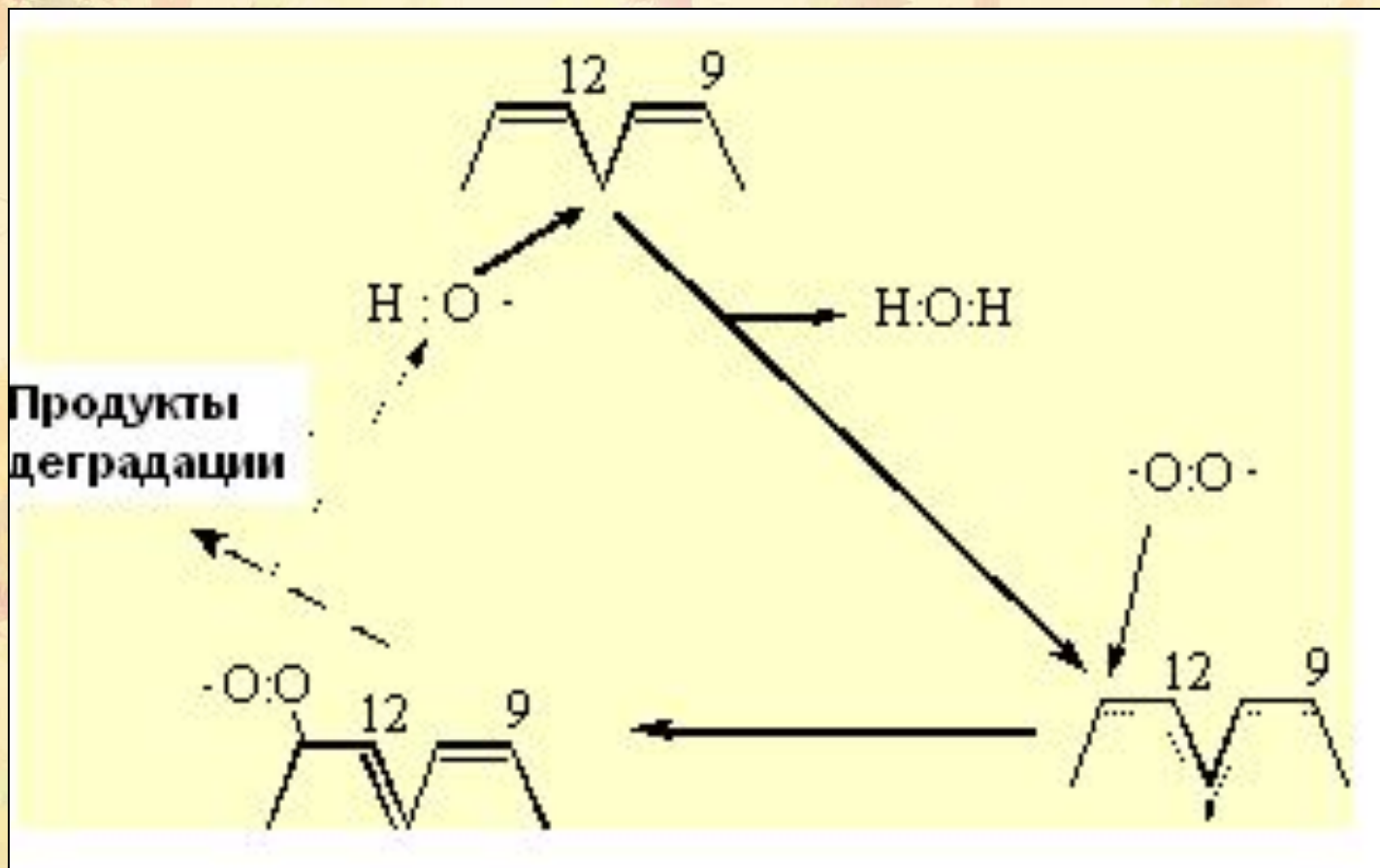
1. Окислительное повреждение ЛИПИДОВ



Гидроперекиси липидов нестабильны в присутствии железа и других металлов.

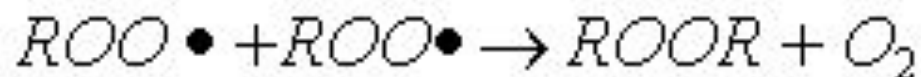
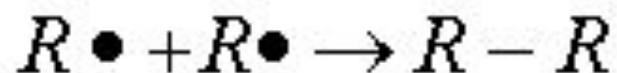
ROOH будет участвовать в реакции Фентона с образованием реактивных алкокси-радикалов

ПОЛ. Пероксидация линоленовой кислоты



Гидроксил радикал отнимает H от C-11 между двойной связью с формированием H_2O . Нехватка электронов между 9- и 13- C представляют резонансную структуру. Триpletный кислород, к. имеет 2 неспаренных электрона, может присоединяться к этой структуре у 9- или 13C- с формированием перокси-радикала

Терминация ПОЛ



Терминация происходит в том случае, когда углерод- или перокси-радикалы взаимодействуют, формируя конъюгированные продукты

2. Окислительное повреждение белков

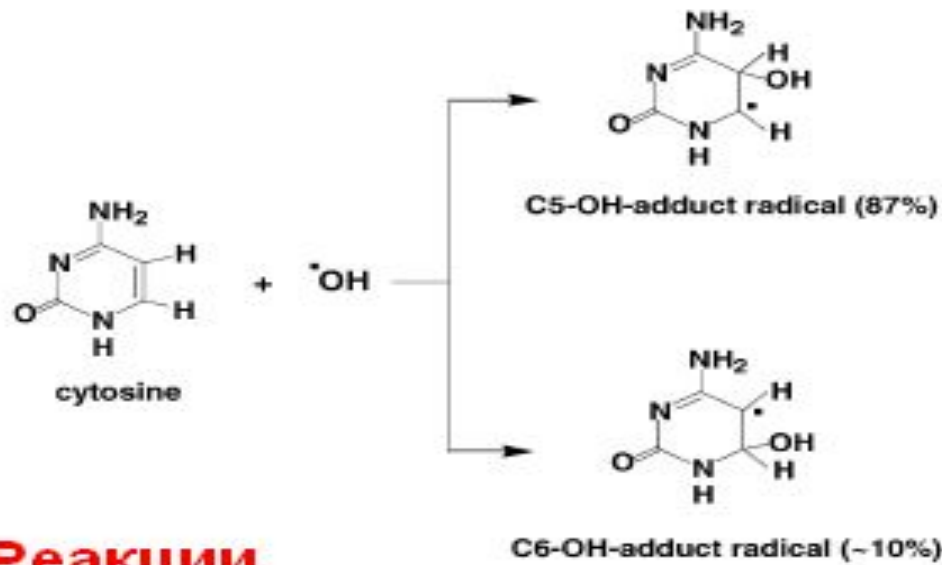
Оксидативная атака на белки вызывает:

- сайт-специфичные модификации аминокислот**
- фрагментацию пептидной цепи**
- агрегацию поперечно-сшитых продуктов**
- изменение электрического заряда**
- увеличение чувствительности к протеолизу**

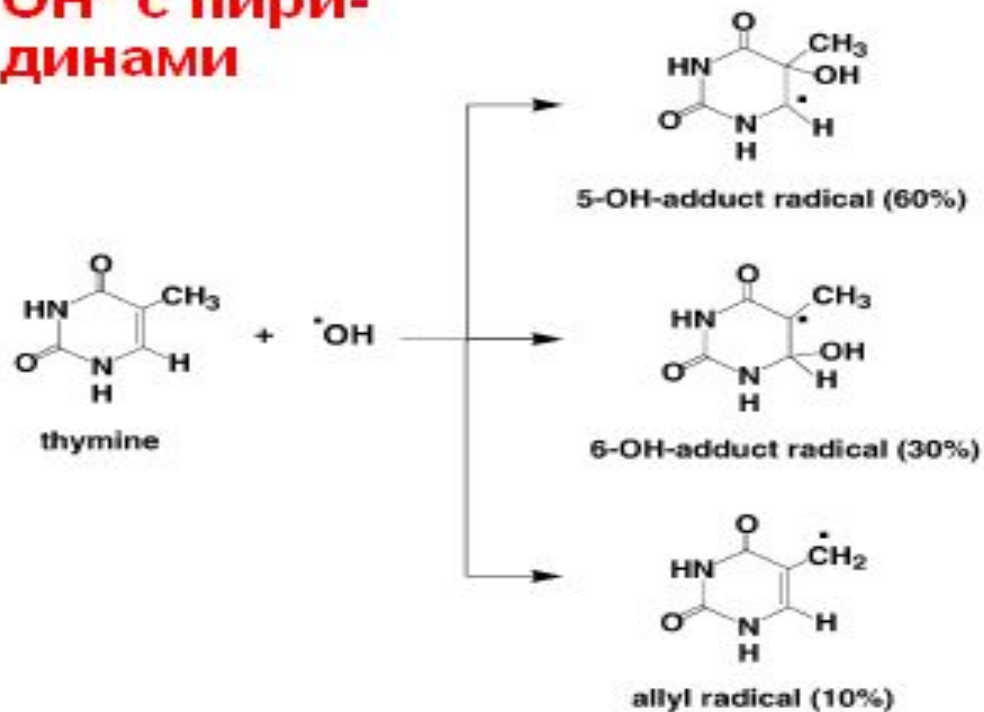
3. Окислительное повреждение ДНК

Множественные повреждения, как сахаров, так и оснований.

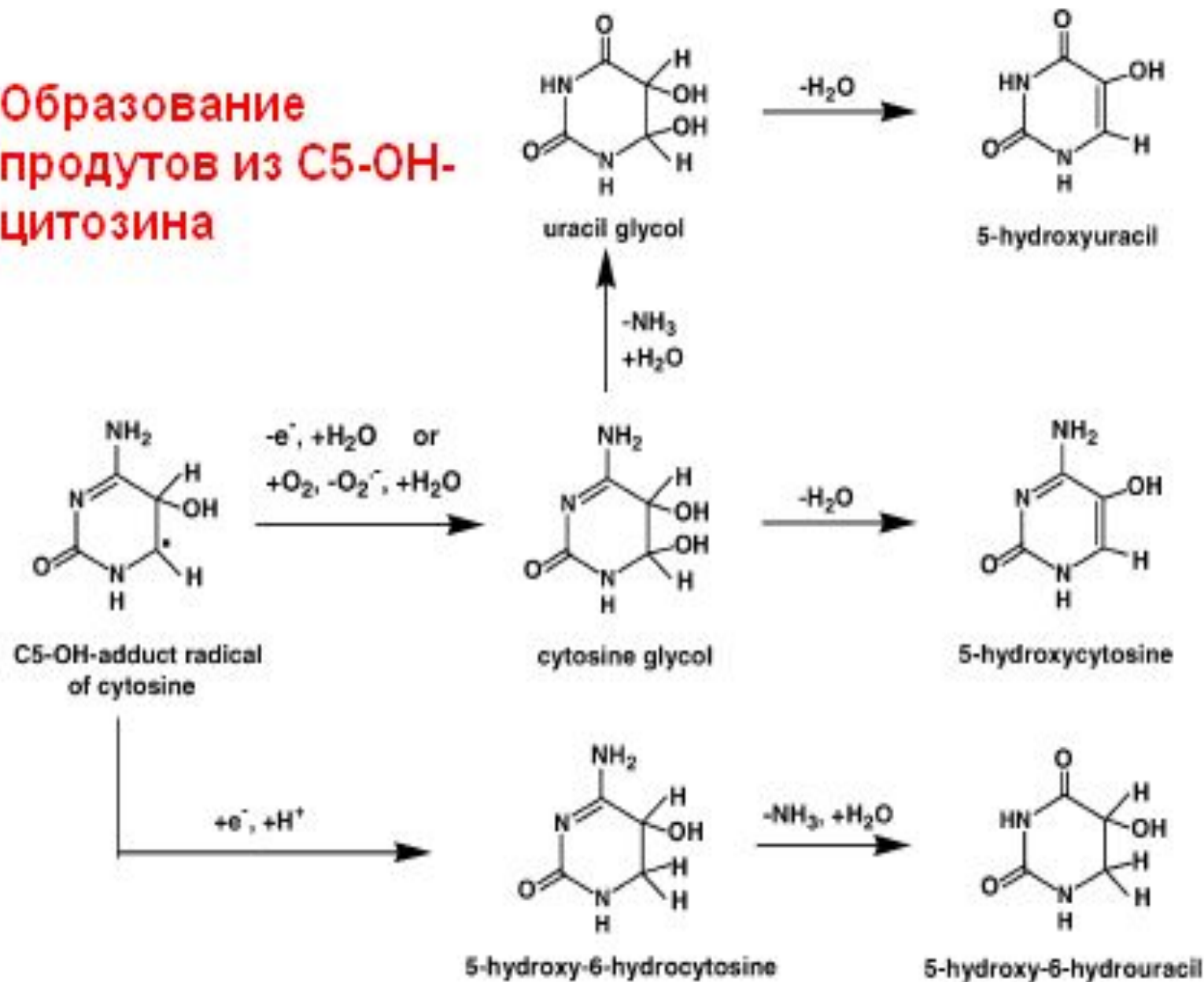
Индукцируются мутации, в том числе делеции и летальные генетические дефекты

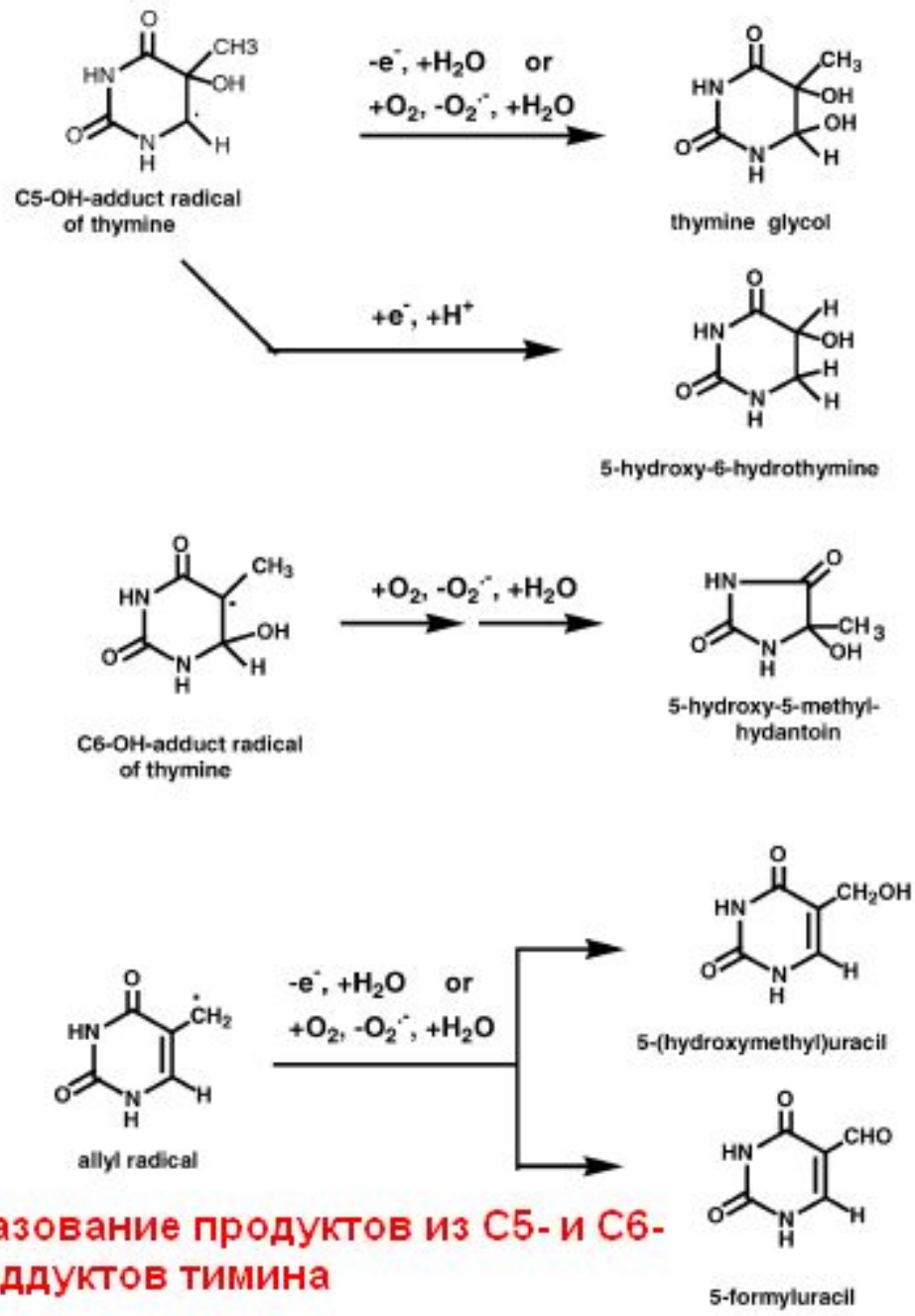


Реакции OH^* с пиридинами

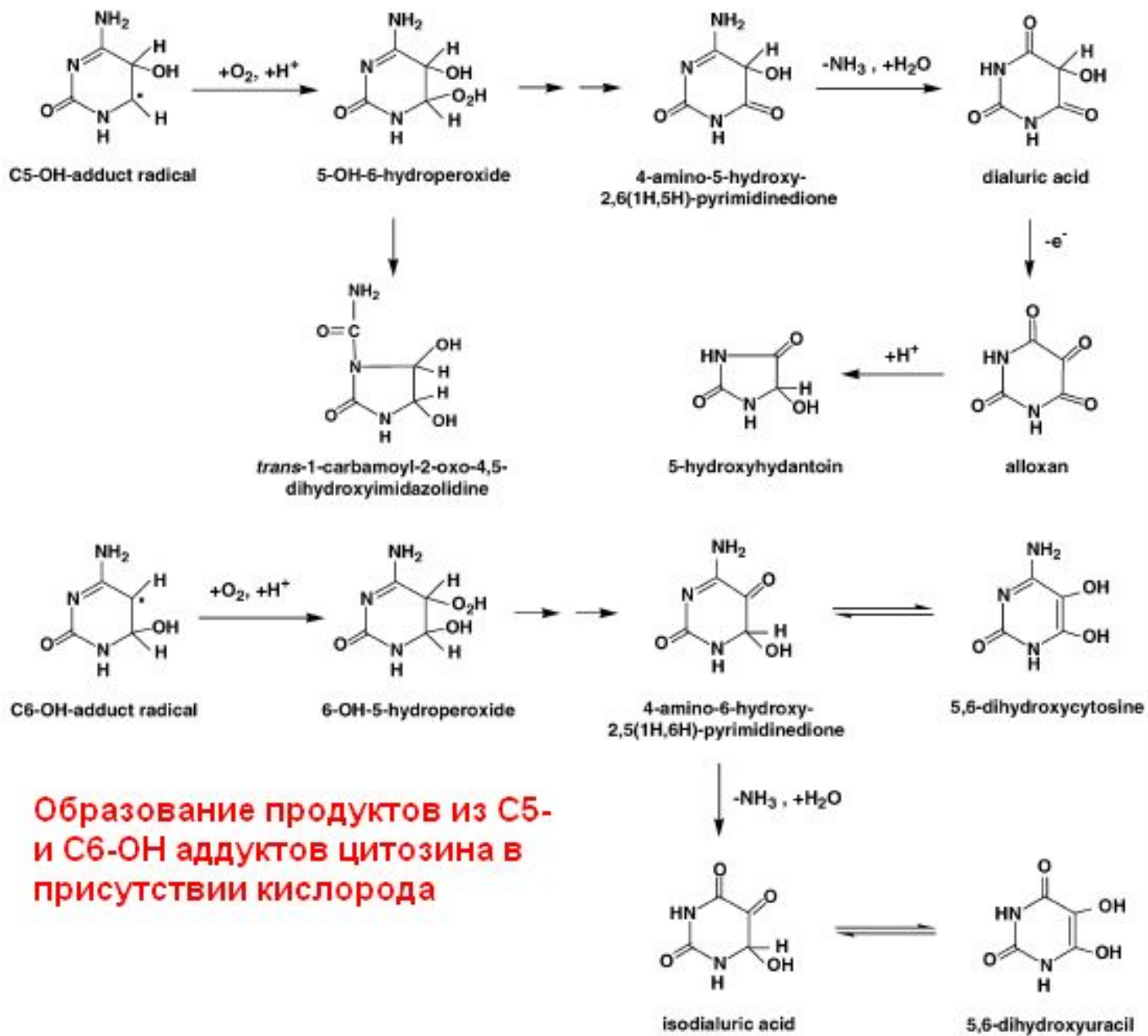


Образование продуктов из C5-OH- цитозина



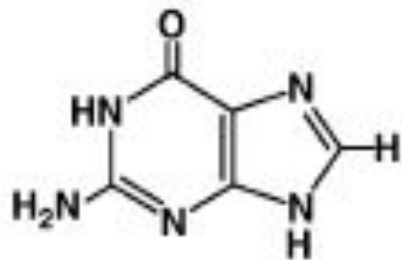


Образование продуктов из С5- и С6-ОН аддуктов тимина

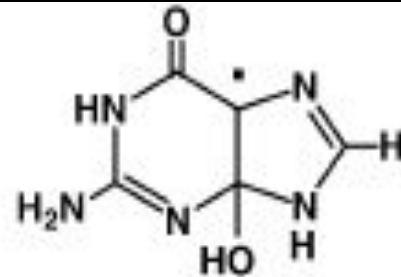
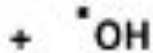


Образование продуктов из C5- и C6-OH аддуктов цитозина в присутствии кислорода

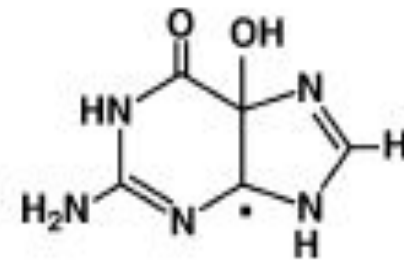
Реакции OH^{\bullet} с пуринами



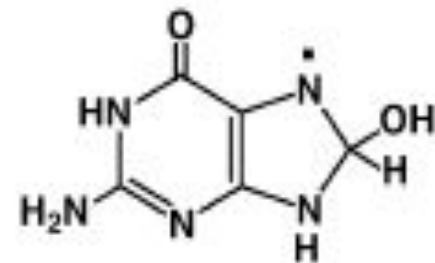
guanine



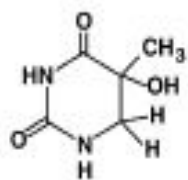
C4-OH-adduct radical



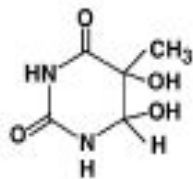
C5-OH-adduct radical



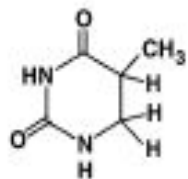
C8-OH-adduct radical



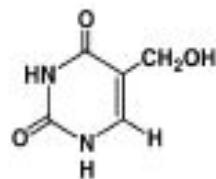
5-hydroxy-6-hydroxythymine



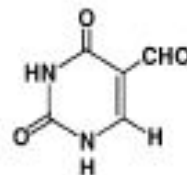
thymine glycol



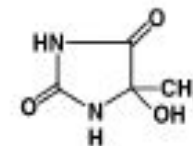
5,6-dihydroxythymine



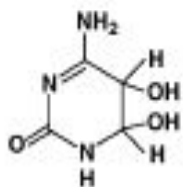
5-hydroxymethyluracil



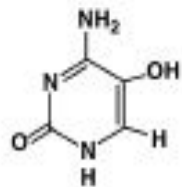
5-formyluracil



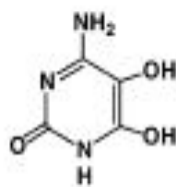
5-hydroxy-5-methylhydantoin



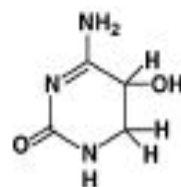
cytosine glycol



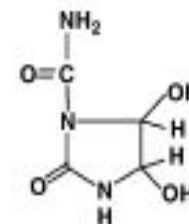
5-hydroxycytosine



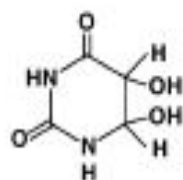
5,6-dihydroxycytosine



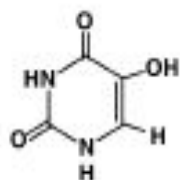
5-hydroxy-6-hydroxycytosine



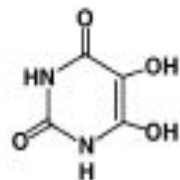
trans-1-carbamoyl-2-oxo-4,5-dihydroimidazolidine



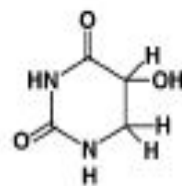
uracil glycol



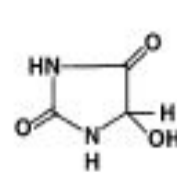
5-hydroxyuracil



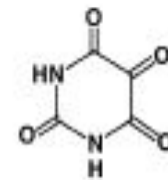
5,6-dihydroxyuracil



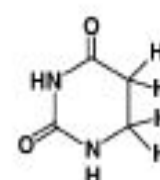
5-hydroxy-6-hydroxyuracil



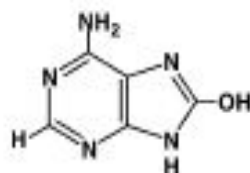
5-hydroxyhydantoin



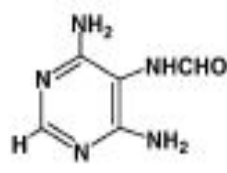
alloxan



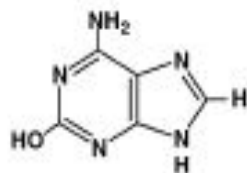
5,6-dihydouracil



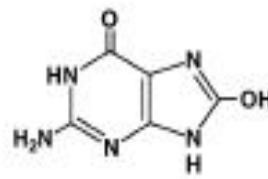
8-hydroxyadenine



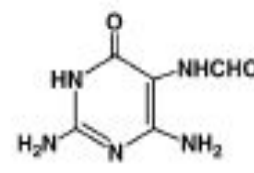
4,6-diamino-5-formamidopyrimidine



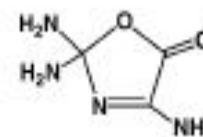
2-hydroxyadenine



8-hydroxyguanine

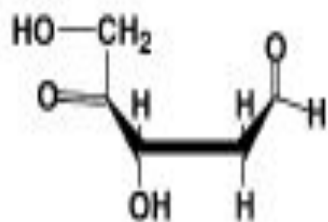


2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine

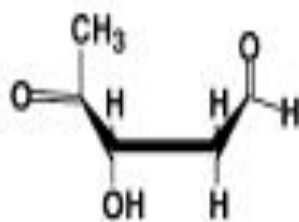


oxazolone

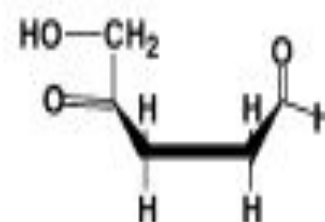
Основные продукты оксидативного повреждения ДНК



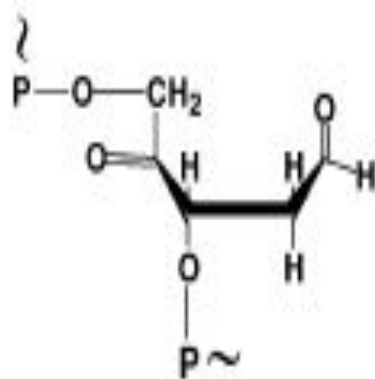
2-deoxypentose-4-ulose



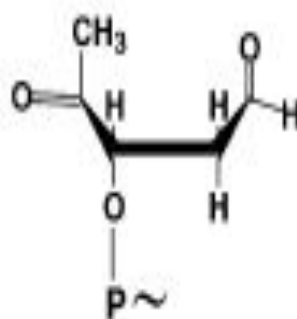
2,5-dideoxypentose-4-ulose



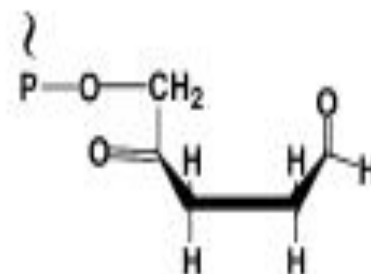
2,3-dideoxypentose-4-ulose



2-deoxypentose-4-ulose
(within DNA)



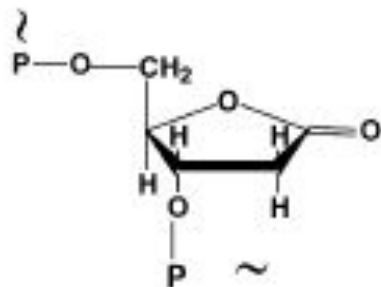
2,5-dideoxypentose-4-ulose
(as a 5'-end group)



2,3-dideoxypentose-4-ulose
(as a 3'-end group)

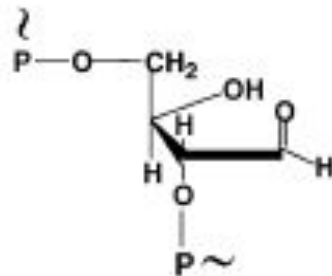
Основные продукты окислительного повреждения сахаров ДНК

2-deoxypentose-4-ulose
(within DNA)



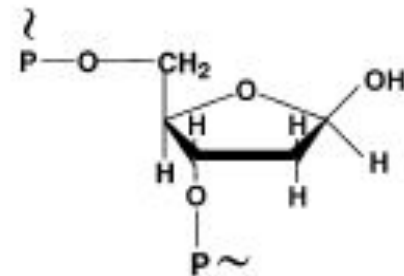
2-deoxypentonic acid lactone
(within DNA)

2,5-dideoxypentose-4-ulose
(as a 5'-end group)

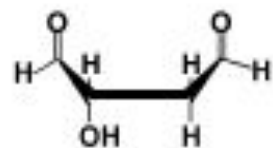


erythrose
(within DNA)

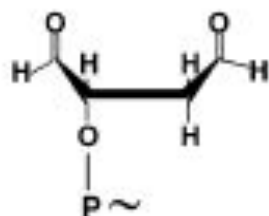
2,3-dideoxypentose-4-ulose
(as a 3'-end group)



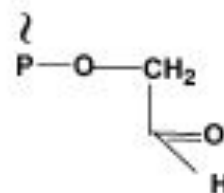
base-free site
(within DNA)



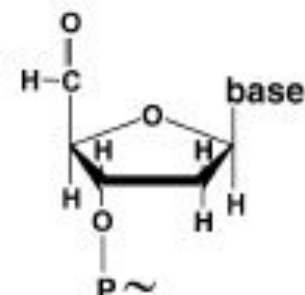
2-deoxytetrodialdose



2-deoxytetrodialdose
(as a 5'-end group)

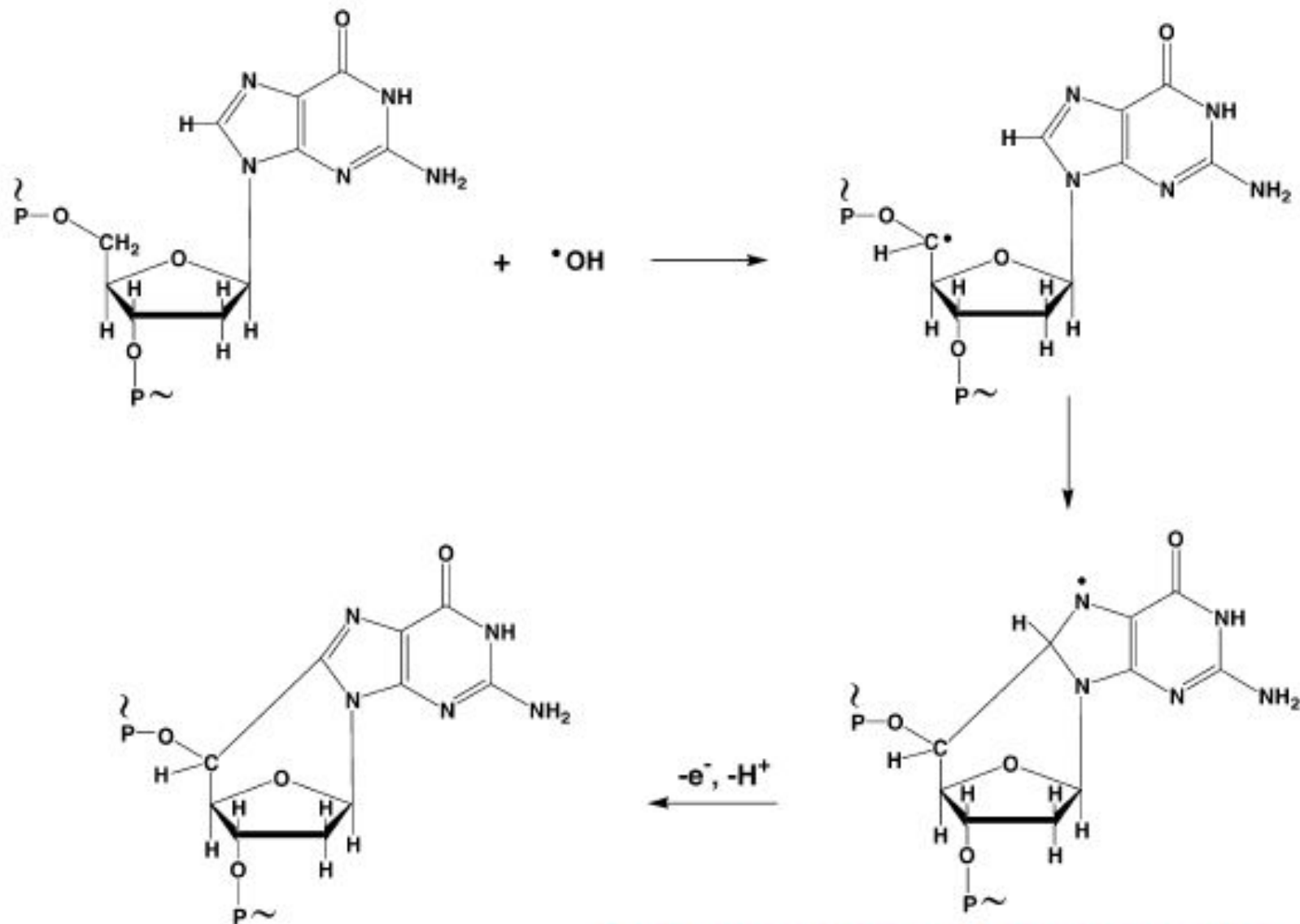


glycolic acid
(as a 3'-end group)



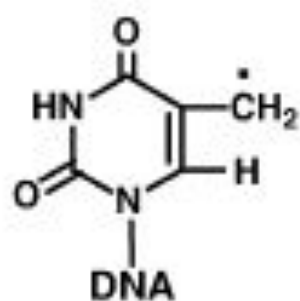
5'-aldehyde
nucleoside
(as a 5'-end group)

Основные продукты оксидативного повреждения сахаров ДНК



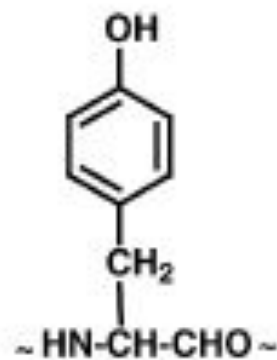
8,5'-cyclo-2'-deoxyguanosine
(5'R- and 5'S-diastereomers)
(within DNA)

**Образование циклодеоксигуанозина
в отсутствии кислорода**

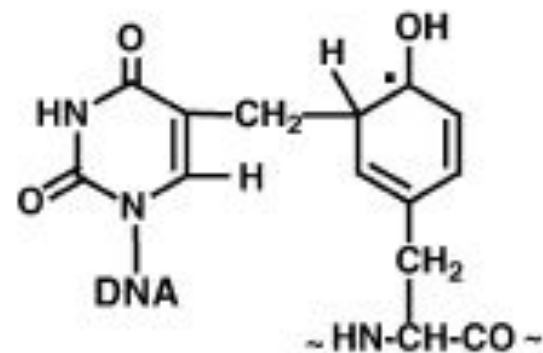


allyl radical of
thymine

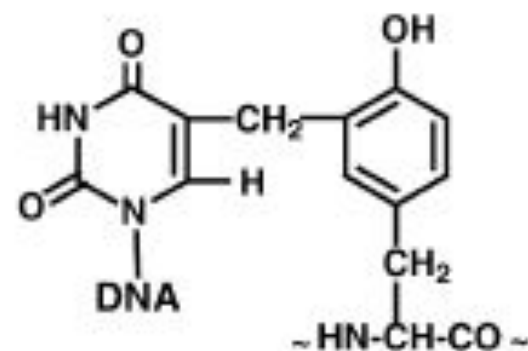
+



tyrosine



-e⁻, -H⁺



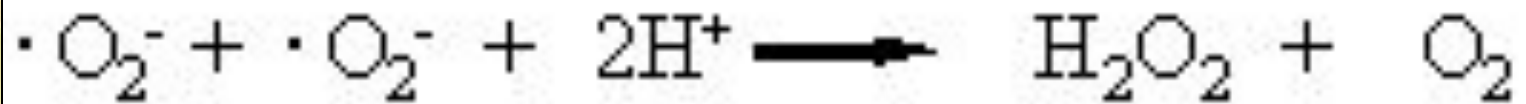
thymine-tyrosine cross-link

**Образование тимин-тирозин
кросс-линков (сшивок) в
хроматине**

Антиоксидантная защита

- - ферментативная
- - химическая

Реакция, катализируемая супероксид дисмутазой



Mn-SOD: митохондрия

Fe-SOD: хлоропласт

CuZn-SOD: хлоропласт

CuZn-SOD: цитозоль

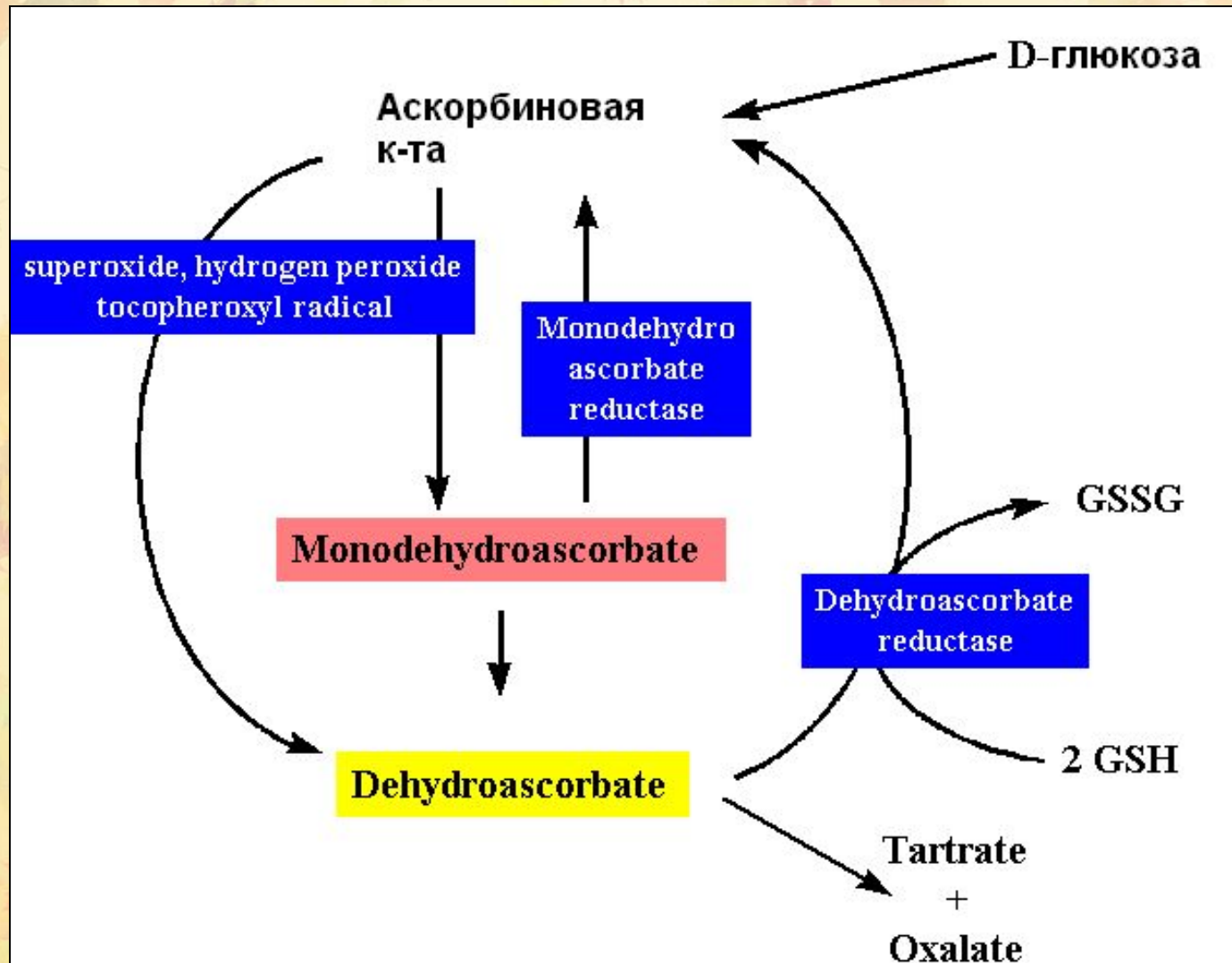
Другие ферменты



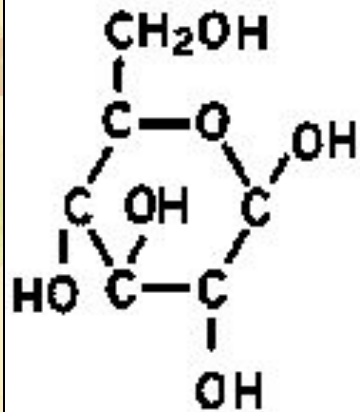
Для нейтрализации $\text{OH}\cdot$ фермента не существует.

Неферментативные способы защиты

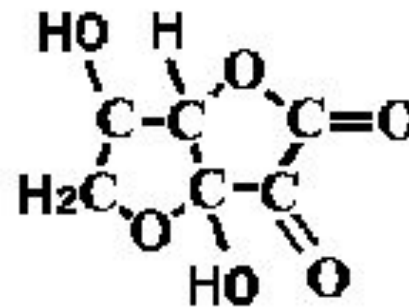
А. Аскорбат. Синтез у растений



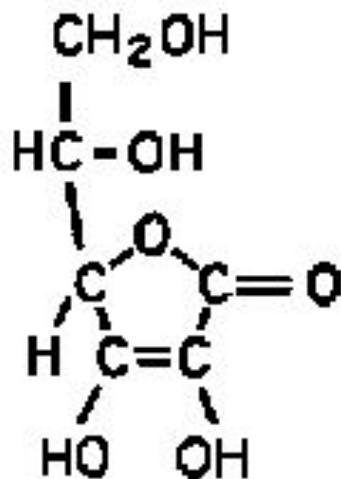
Метаболиты АК



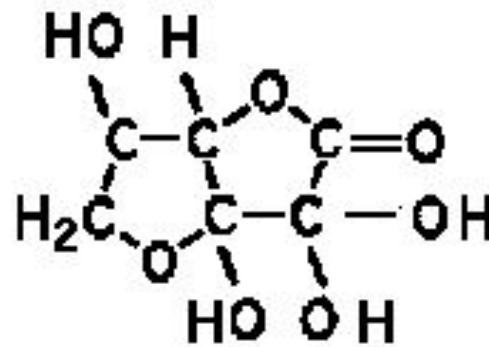
D-Glucose



Monodehydro
ascorbate

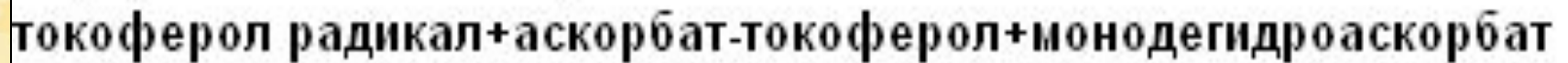
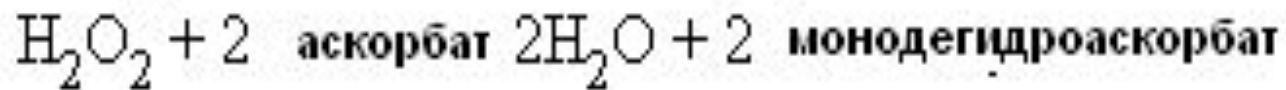
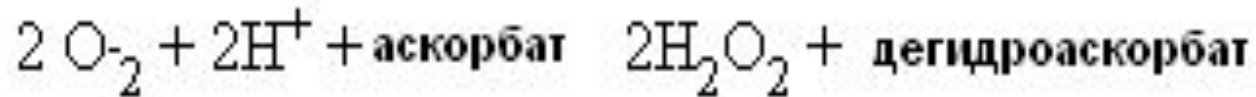


Ascorbic
acid

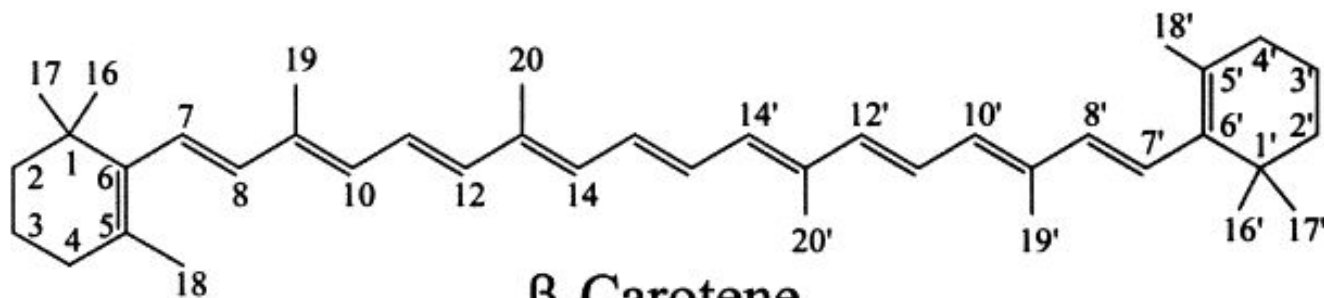


Dehydro
ascorbate

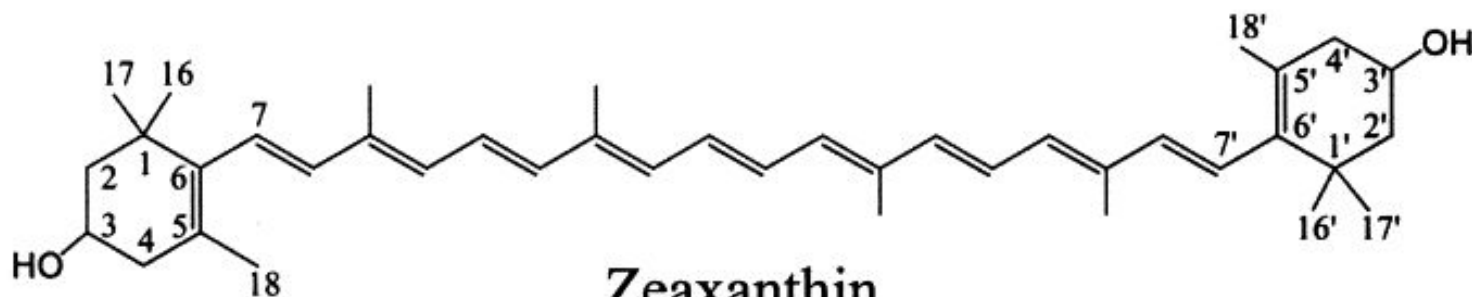
Некоторые реакции с участием аскорбата



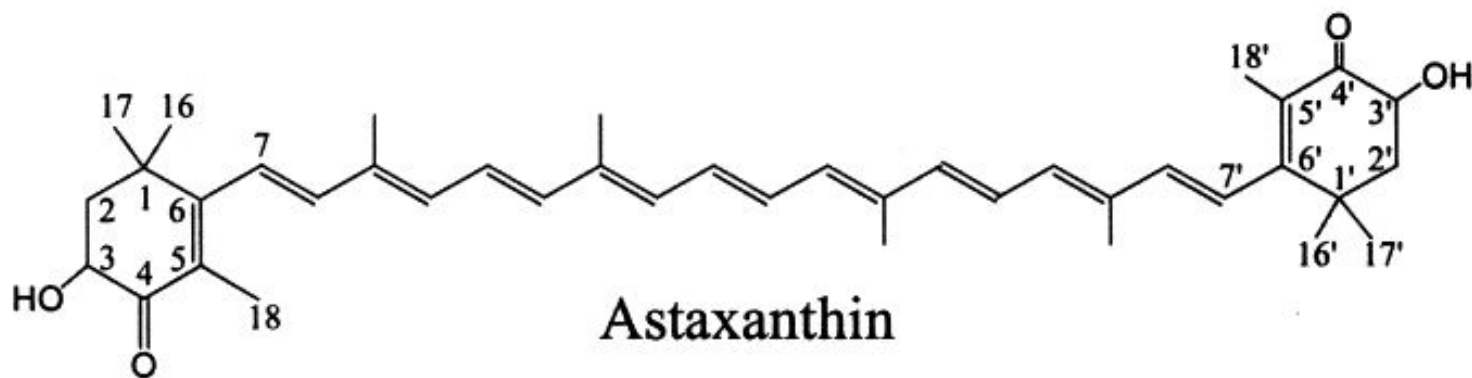
В. Каротиноиды растений (1)



β -Carotene

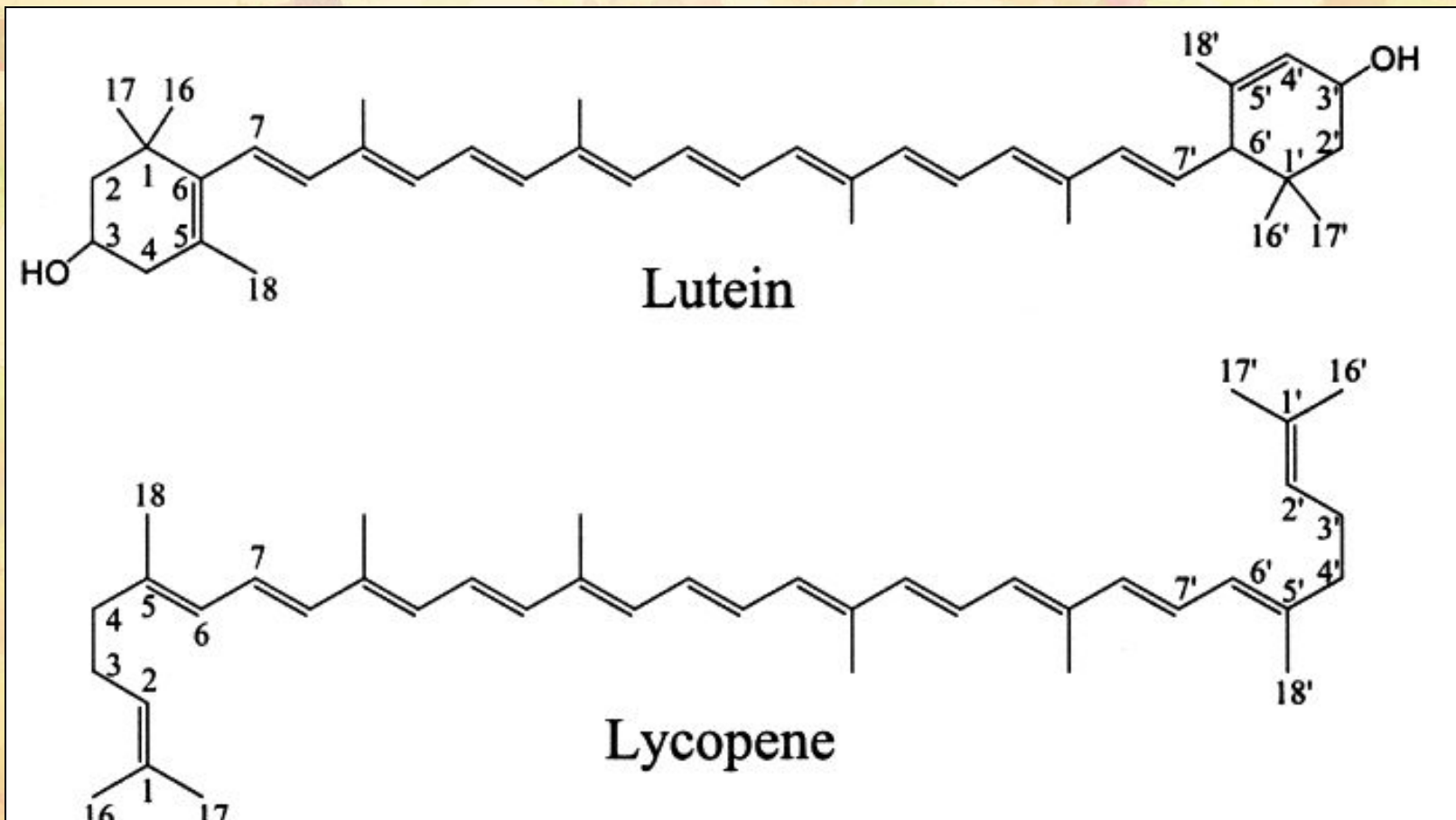



Zeaxanthin



Astaxanthin

В. Каратиноиды растений (2)

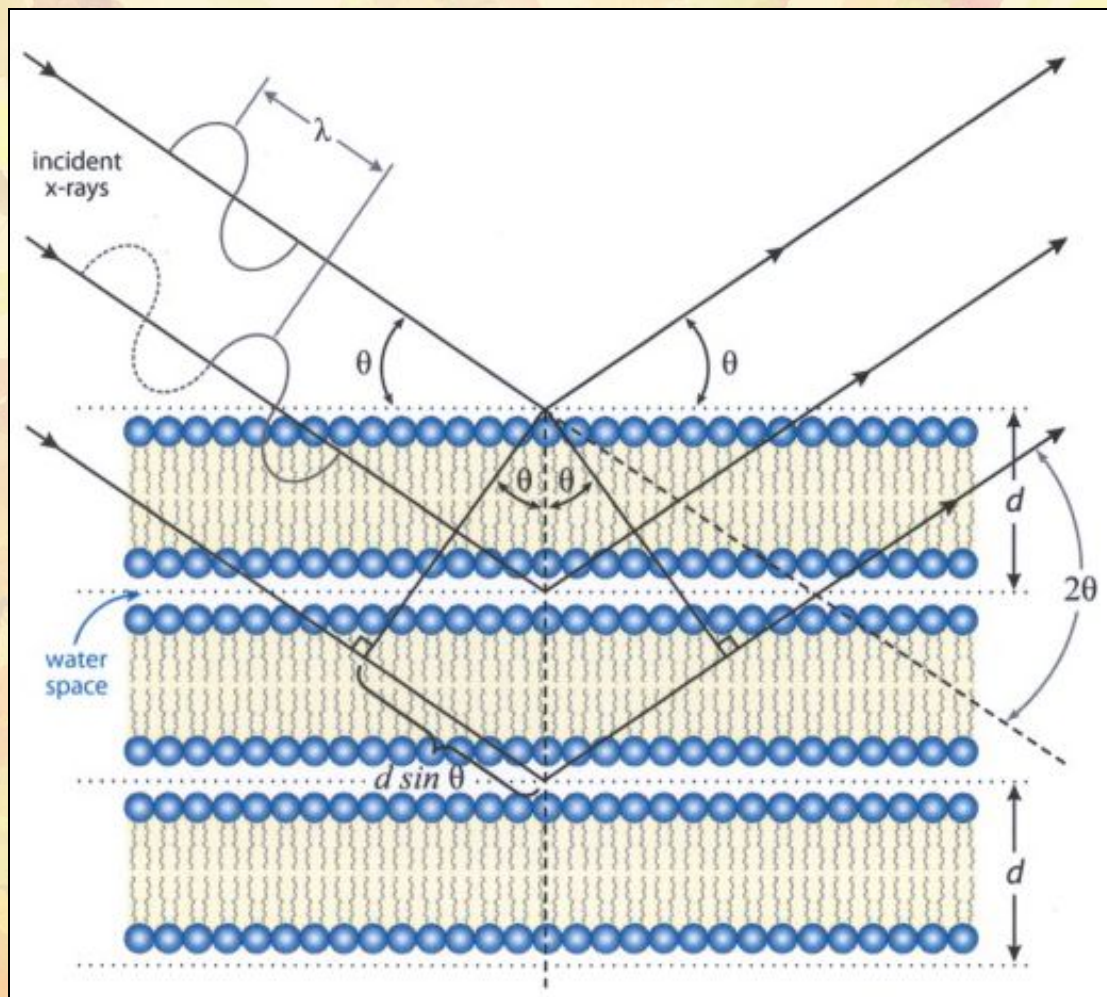




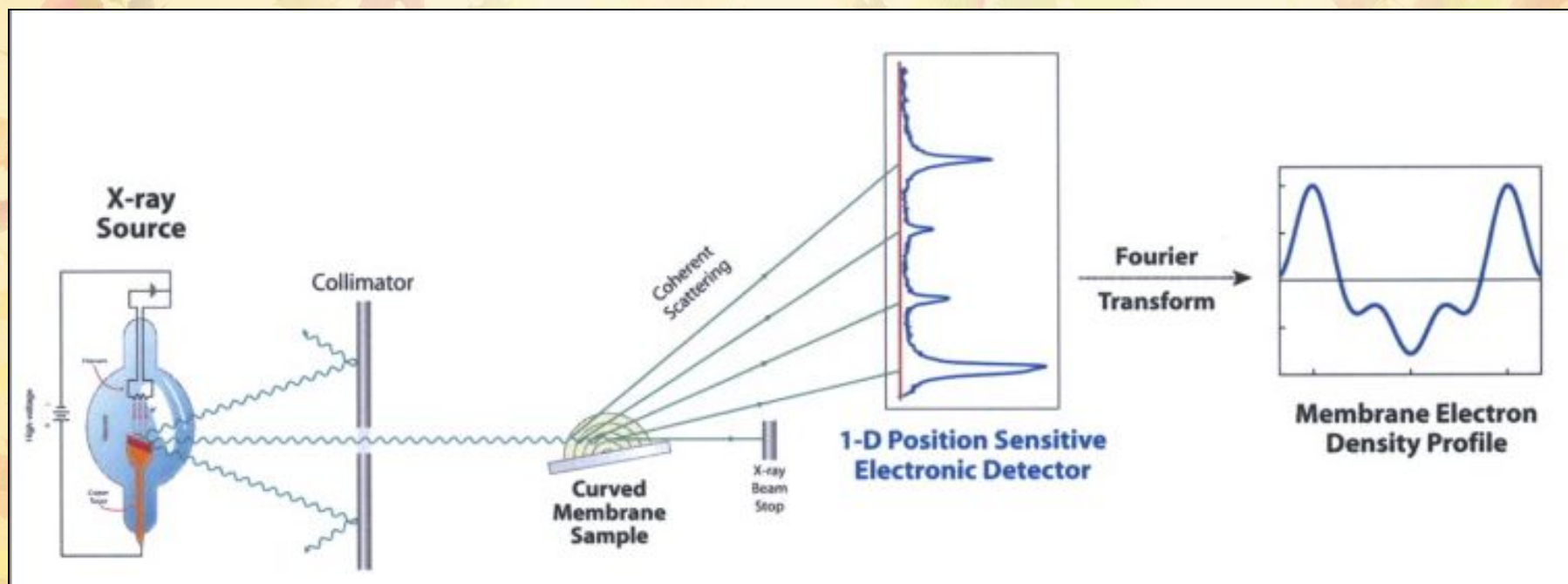
**Методы изучения
антиоксидантной
активности
каротиноидов**

Схематическое представление мембранных бислоев как x-гау дифракционная решетка.

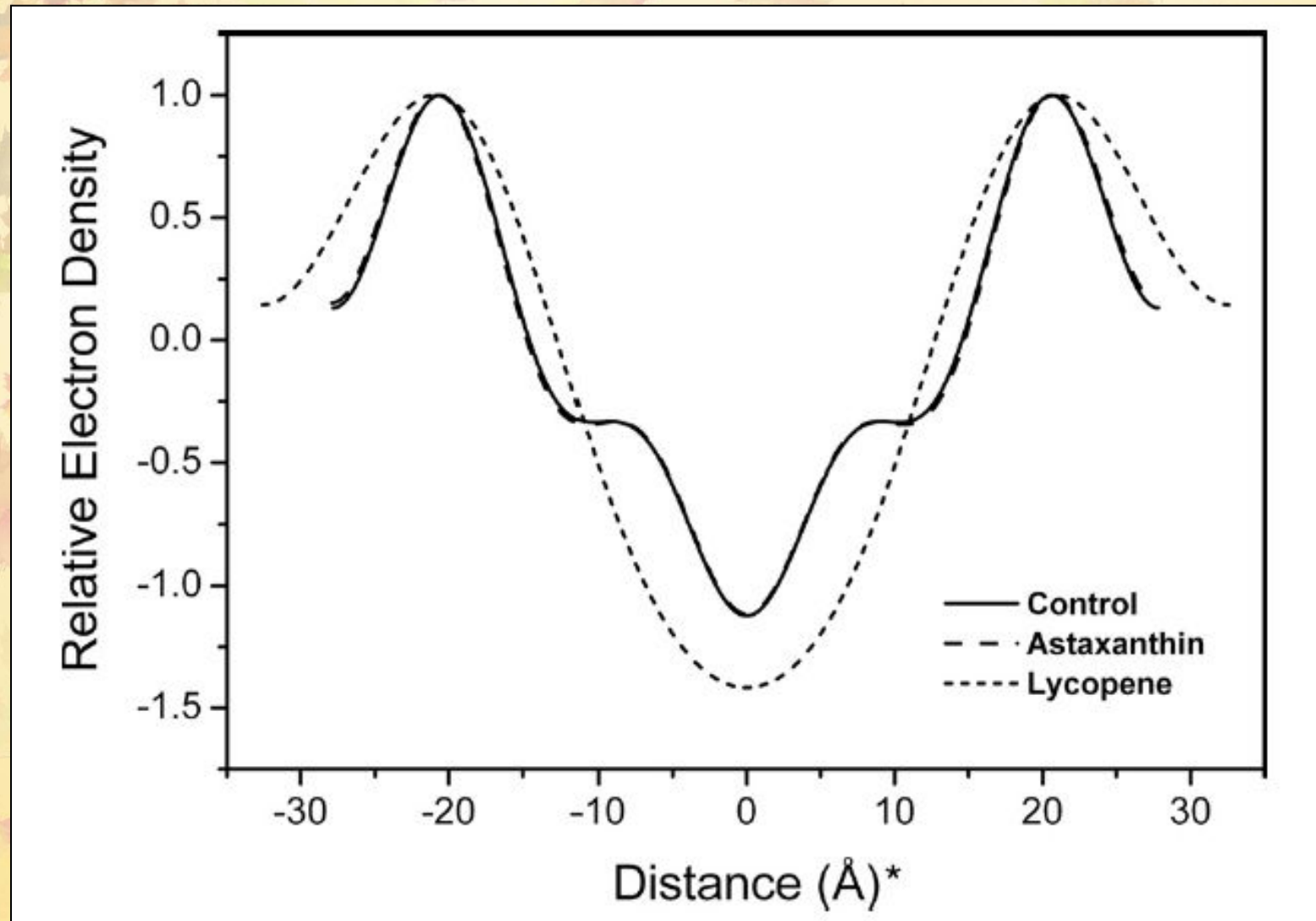
Единица клеточной периодичности, d , представляет расстояние одного бислоя плюс половину водного пространства θ - угол дифракции



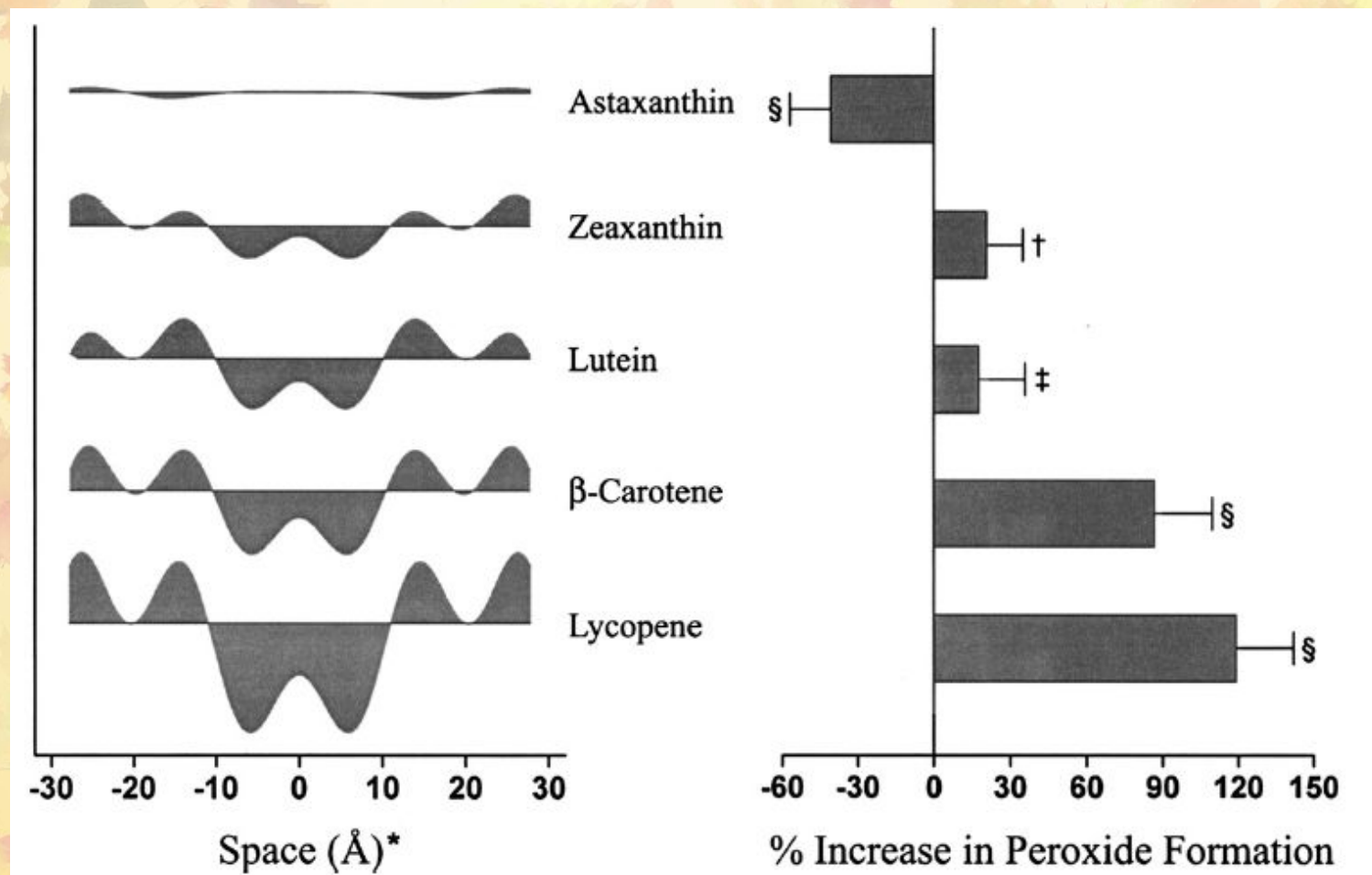
Схематическое представление Small-angle x-ray метода рассеивания



Эффект полярных против неполярных каратиноидов на мембранную структуру



Эффект каратиноидов на ПОЛ

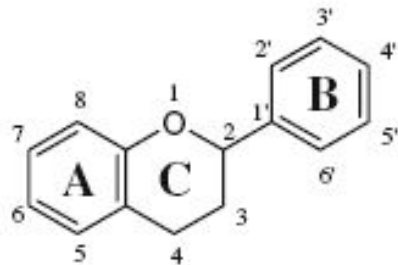


Полифенолы (ПФ) растений

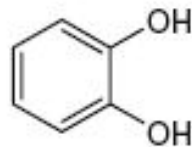
Антиоксидантная активность:

1. Взаимодействие с ROS, роль «ловушка»
2. Предотвращение образования радикалов (связывание железа)

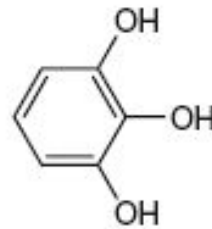
Структура некоторых полифенолов



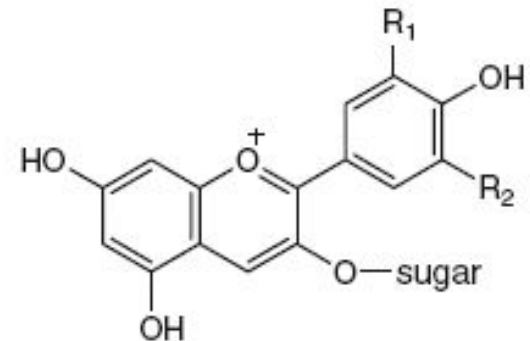
flavan



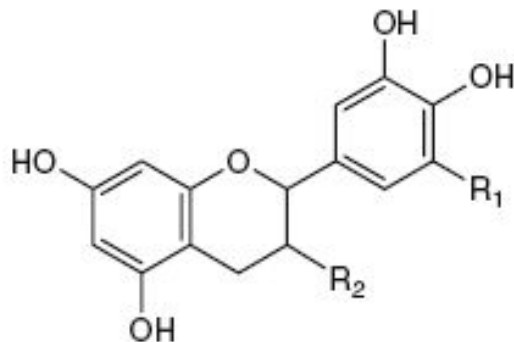
catechol



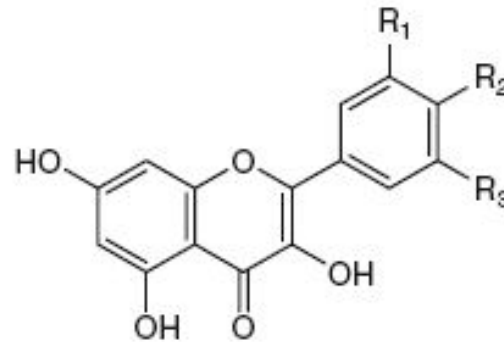
gallol



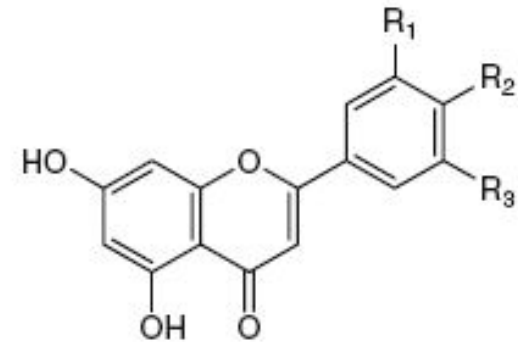
anthocyanins



catechins



flavonols



flavones

Механизм действия ПФ

1. «Тушение» радикалов

Несколько способов измерения:

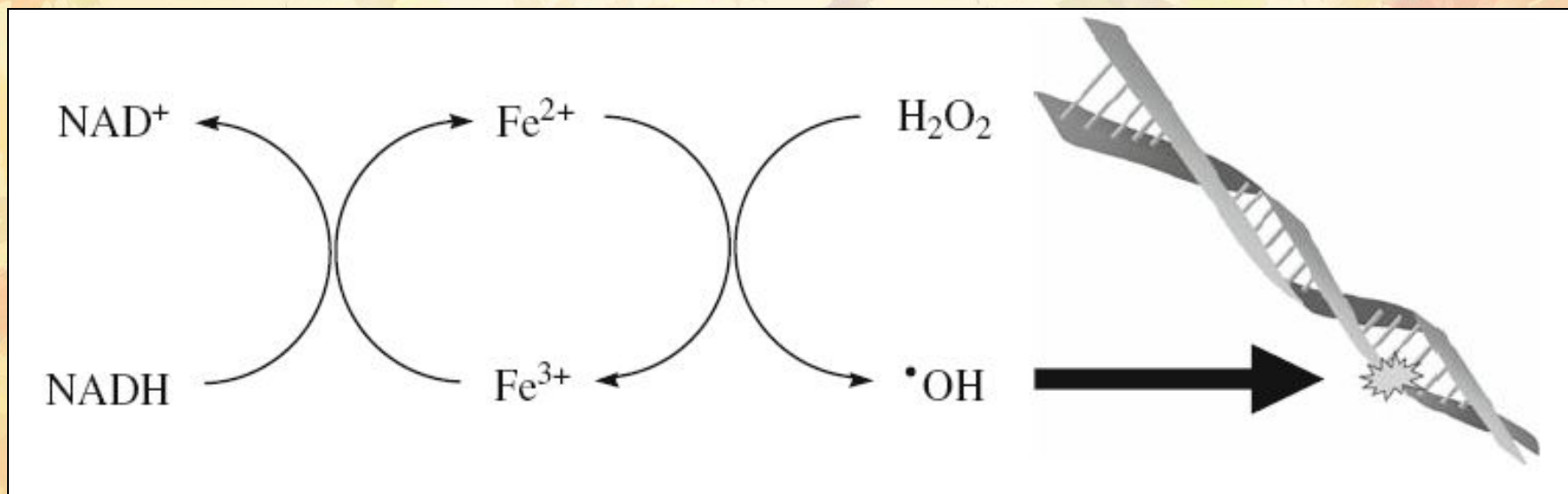
- trolox-equivalent antioxidant activity (TEAC)
- oxygen radical absorbance capacity (ORAC)
- 2,2-diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) scavenging.

Эти методы обеспечивают относительное измерение антиоксидантной активности.

Механизм действия ПФ

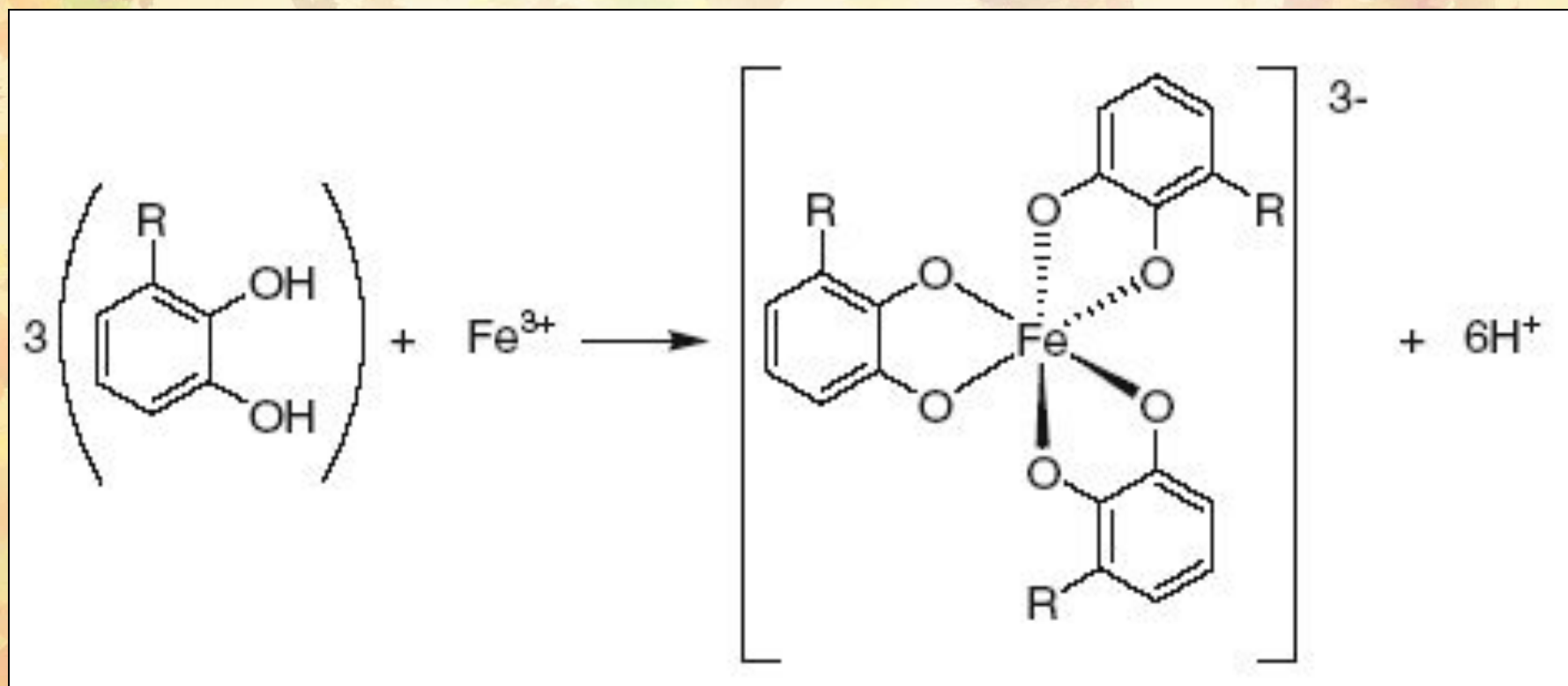
2. Взаимодействие с Fe

Восстановление железа NADH приводит к реакции Фентона:

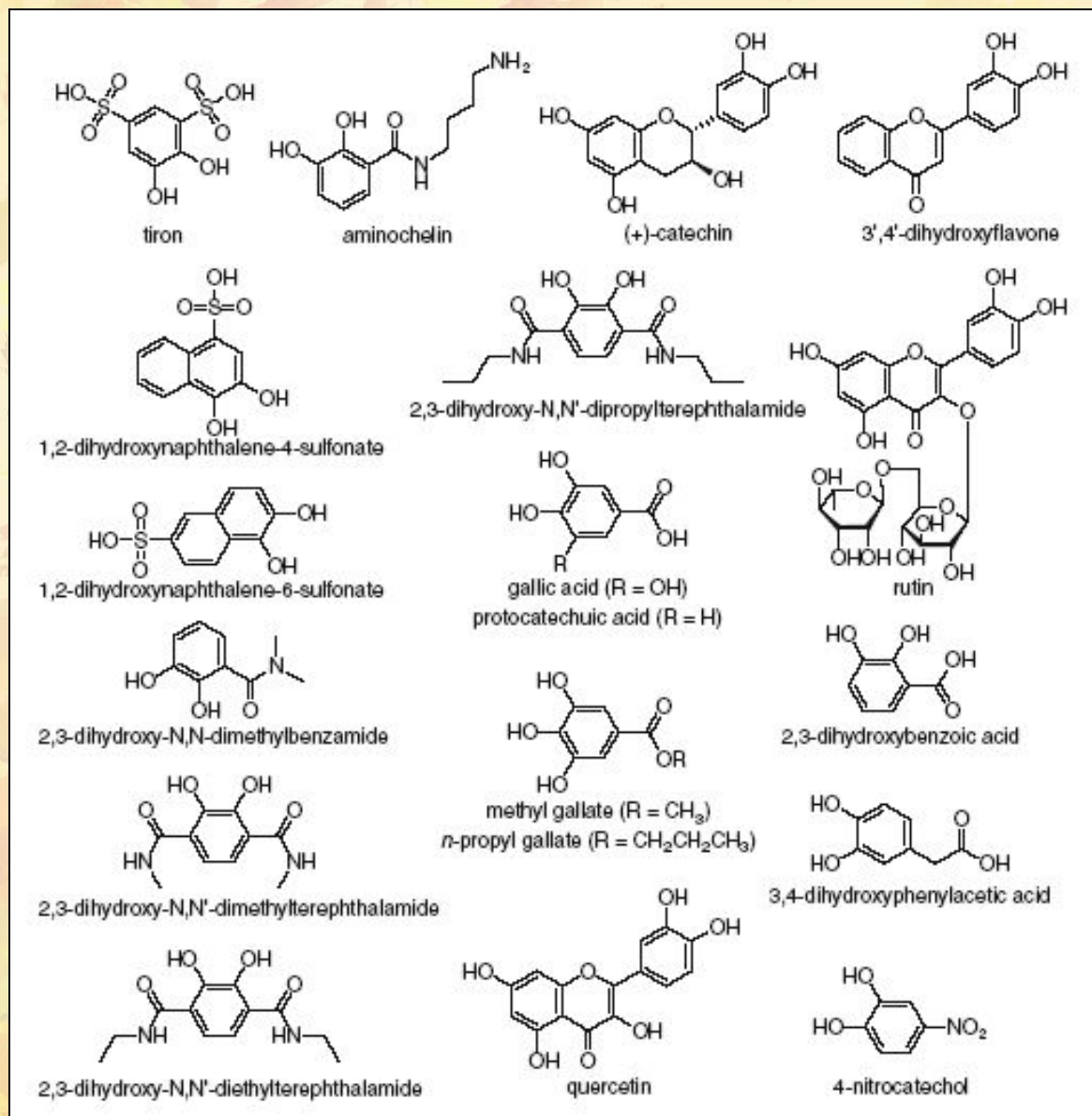


Взаимодействие с Fe

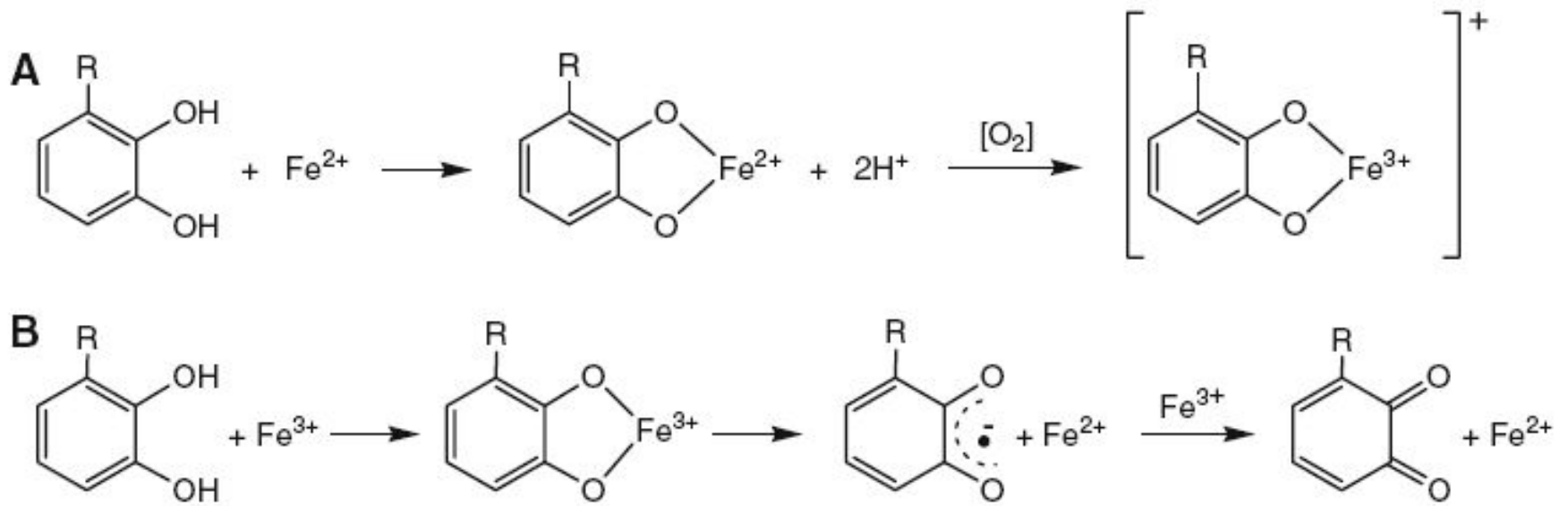
Gallols, R=OH; catechols, R=H



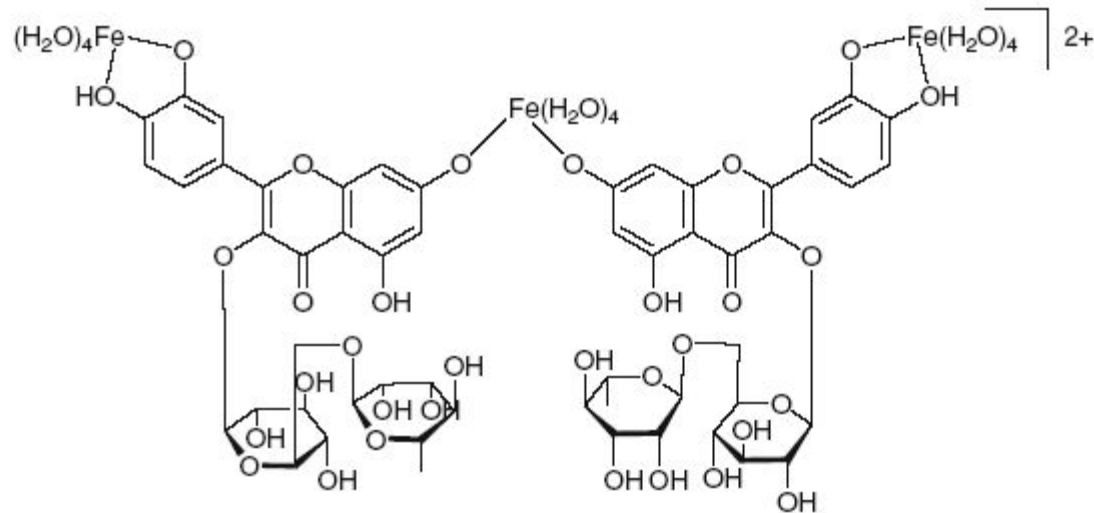
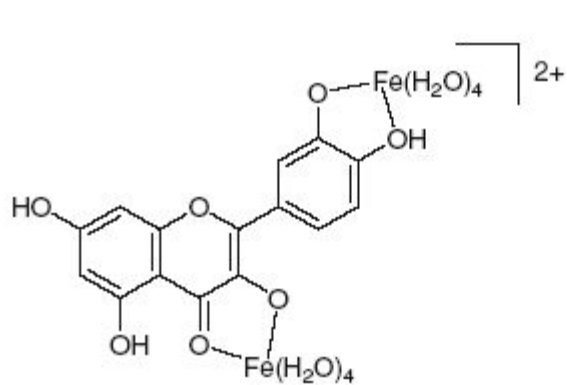
ПФ, взаимодействующие с Fe^{3+}



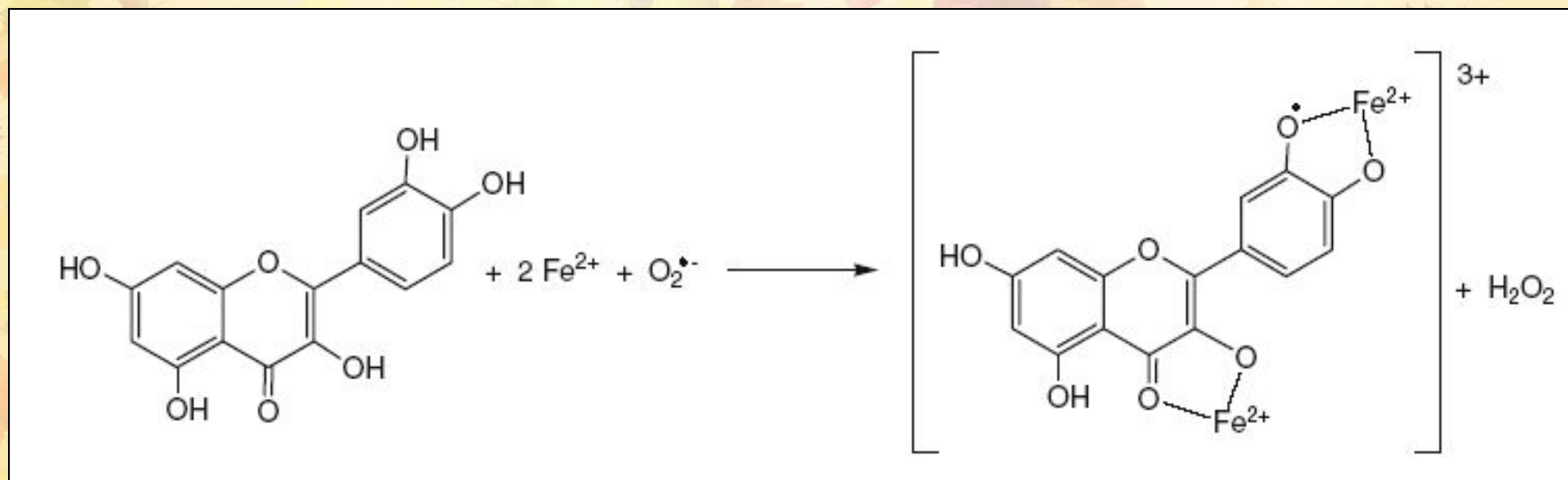
Анти и про-оксидантная активность ПФ



















Структуры железо-кверцетин (слева) и железо-рутин (справа) комплексов



















SOD-подобные реакции Fe^{2+} -кверцитинового комплекса



Содержание полифенолов в продуктах

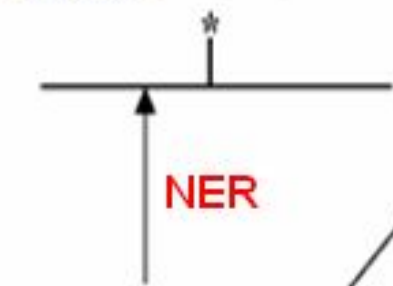
 Dark Chocolate (60 %) 951 <i>mg/serving</i> Serving size = 40 g	 Cranberries 373 <i>mg/serving</i> Serving size = 55 g
 Black Tea 943 <i>mg/serving</i> Serving size = 240 mL	 Pear 317 <i>mg/serving</i> Serving size = 166 g
 Pomegranate Juice 616 <i>mg/serving</i> Serving size = 240 mL	 Red Grapes 296 <i>mg/serving</i> Serving size = 80 g
 Red Wine 431 <i>mg/serving</i> Serving size = 240 mL	 Apple 256 <i>mg/serving</i> Serving size = 138 g
 Red Onion 431 <i>mg/serving</i> Serving size = 40 g	 Cherries 231 <i>mg/serving</i> Serving size = 73 g
 Milk Chocolate 394 <i>mg/serving</i> Serving size = 40 g	 Watermelon 183 <i>mg/serving</i> Serving size = 286 g
 Green Tea 247 <i>mg/serving</i> Serving size = 240 mL	 Blueberries 181 <i>mg/serving</i> Serving size = 70 g
 Beet 201 <i>mg/serving</i> Serving size = 85 g	 Banana 163 <i>mg/serving</i> Serving size = 118 g

Содержание полифенолов в продуктах

	Beet 201 <i>mg/serving</i> Serving size = 85 g		Banana 163 <i>mg/serving</i> Serving size = 118 g
	Corn 129 <i>mg/serving</i> Serving size = 91 g		Strawberries 162 <i>mg/serving</i> Serving size = 122 g
	Coffee 115 <i>mg/serving</i> Serving size = 240 mL		White Grapes 155 <i>mg/serving</i> Serving size = 80 g
	White Wine 92 <i>mg/serving</i> Serving size = 240 mL		Plum 149 <i>mg/serving</i> Serving size = 66 g
	Broccoli 75 <i>mg/serving</i> Serving size = 71 g		Peach 82 <i>mg/serving</i> Serving size = 117 g
	Hot Chocolate 45 <i>mg/serving</i> Serving size = 240 mL		Orange 54 <i>mg/serving</i> Serving size = 131 g
	Carrot 33 <i>mg/serving</i> Serving size = 71 g		Pineapple 52 <i>mg/serving</i> Serving size = 78 g
	Tomato 33 <i>mg/serving</i> Serving size = 91 g		Lemon 24 <i>mg/serving</i> Serving size = 58 g

Репарация окисленной ДНК

Содержащий повреждение олигомер



5'-XdNMP
NIR

TCR

Активно транскрибируемая ДНК

mРНК

C T A C Y A T G
G A T G X T A C

ДНК

MTH1

Пул нуклеотидов

DS

Вновь возникающая цепь-мишень для MTH1, OGG2

X - ок. основание; Y - норма; NIR - нуклеотид инцизионная репарация; TCR - transcription-coupled репарация; MTH1 - MutT гомолог MTH1 - гомолог MutY; OGG2 - 8-OH-гуанин гликозилаза

Окислительное повреждение ДНК в опухолях

Вид опухоли	Оценка повреждения	Виды повреждений
острая лимфобластная лейкемия (ALL)	↑	Lymphocyte DNA levels of FapyGua, 8-OH-Gua, FapyAde, 8-OH-Ade, 5-OH-Cyt, 5-OH-5-MeHyd and 5-OH-Hyd significantly ($P < 0.05$) elevated in ALL compared to control subjects
T-клеточная лимфома, острая лейкемия и миелодисплазия	↑, →	Significant difference in levels of urinary 8-OH-dG between adult T cell leukaemia/lymphoma and controls ($P < 0.05$); no significant difference in levels of urinary 8-OH-dG between lymphoma, acute leukaemia and myelodysplastic syndrome
Индукцированные мышьяком неоплазмы кожи	↑	Significantly elevated levels of 8-OH-dG ($P < 0.001$) in arsenic-related Bowen's disease, Bowen's carcinoma and actinic keratosis, compared to their corresponding non-arsenic-related conditions
Рак фибриллярная астроцитома мозга (FA); рак легкого (LC); карцинома желудка (MC); рак яичника (OC); рак кишечника (CRC)	↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑	Lesion significantly elevated ($P \leq 0.05$) in: 5-OH-5-MeHyd—LC, CRC, OC 5-OH-Hyd—FA, LC, CRC, MC, OC 5-OHMeUra—C, MC, OC 5-OH-Cyt—LC, OC 5,6-diOH-Ura—FA, LC, CRC, MC, OC FapyAde—FA, LC 8-OH-Ade—FA, LC, MC, OC Xanthine—LC, MC, OC 2-OH-Ade—FA, LC, MC, OC FapyGua—FA, LC, MC, OC 8-OH-Gua—FA, LC, CRC, MC, OC [434]. Note: only one patient per cancer apart from LC, where $n = 2$
Рак молочной железы	→	Levels of 8-OH-dG were not significantly elevated in DNA from breast cancer tissue vs. control, nor were levels associated with expression of oestrogen/progesterone receptors, clinical stage or histological grade [435]
Рак молочной железы	↑	Significantly higher ($P < 0.0001$) levels of 8-OH-dG in DNA from tumour, compared non-tumour tissue [436]