Биофизические основы патологии клетки

Свободные радикалы и болезни человека

Ю.А. Владимиров, А.Н. Осипов

2018

Морфологические изменения в хрусталике при катаракте

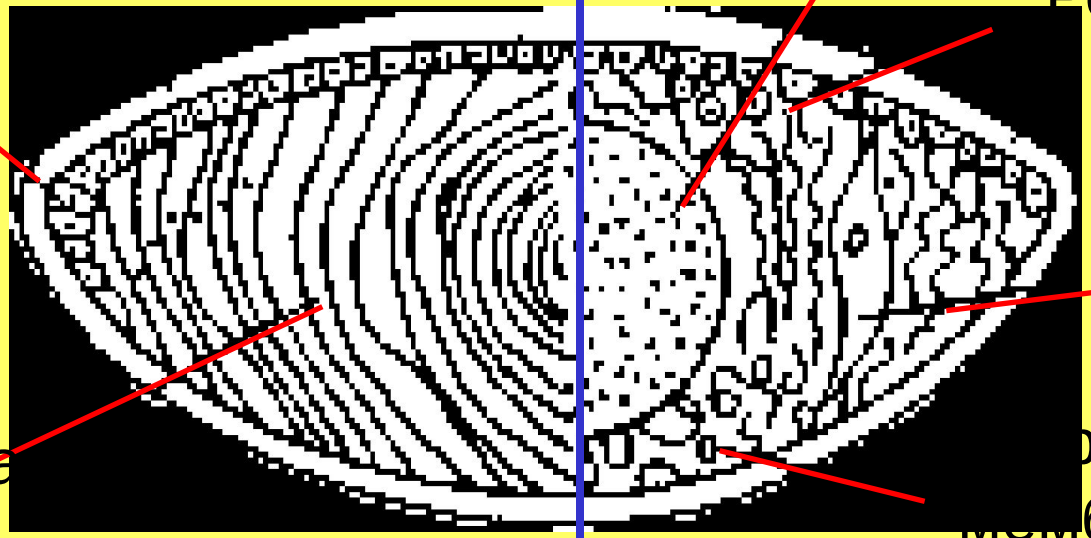
В нормальном хрусталике глаза клеточные мембраны не разрушены

При катаракте мембраны разрушены вследствие перекисного окисления липидов

Склероз ядра

Рост эпителия

Эпителий



Набухание клеток

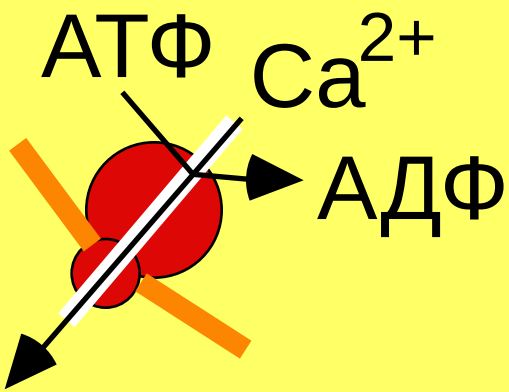
Волокна

рушение мембран

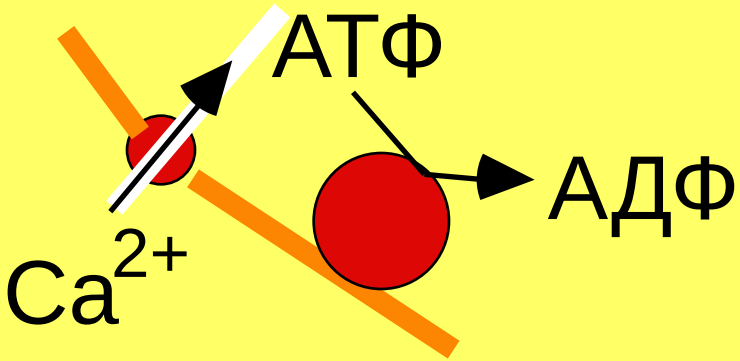
Норма

Катаракта

Повреждение Са-АТФазы

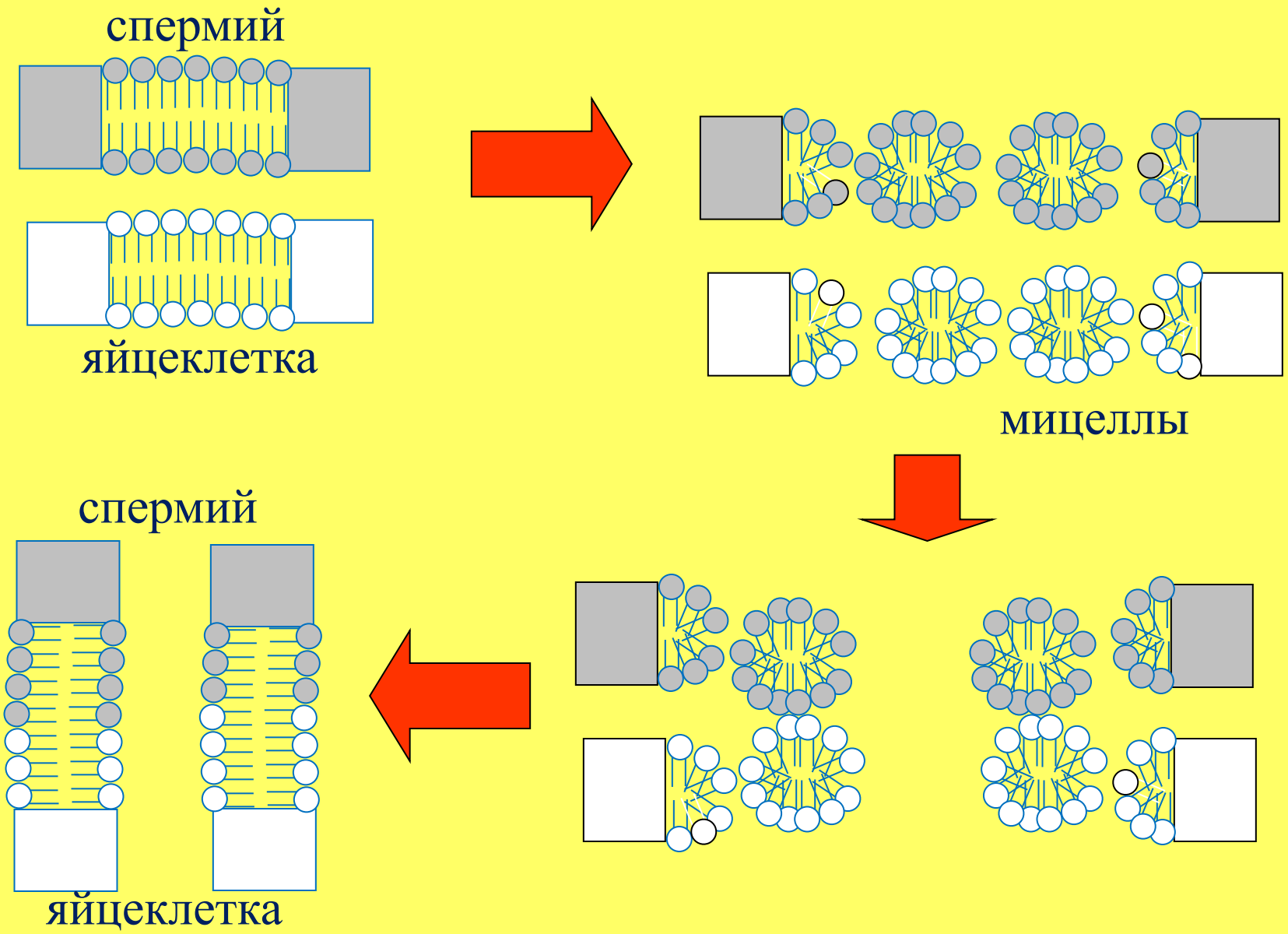


Нативная Са-АТФаза



Поврежденная Са-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

Биохимические методы

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

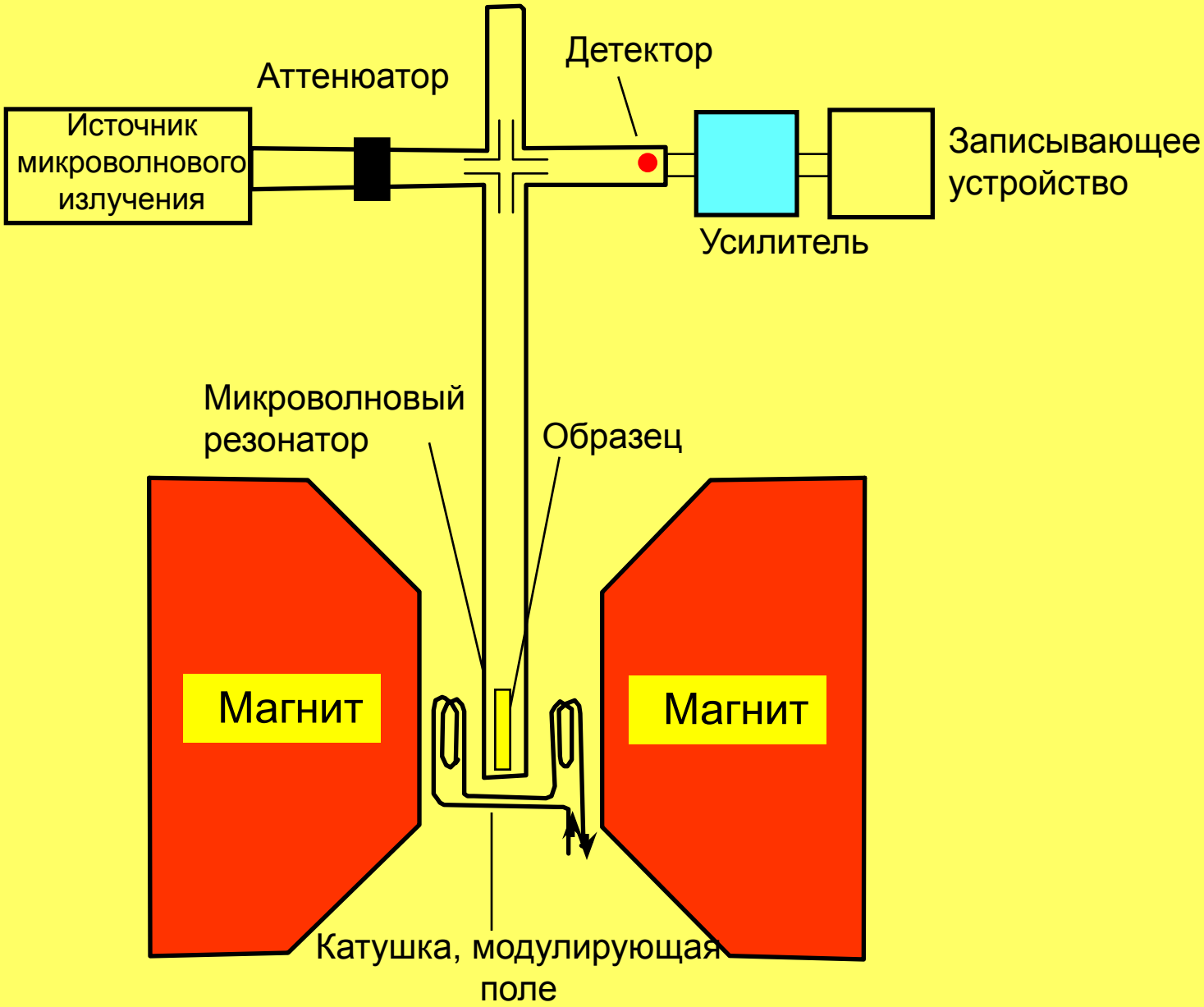
Хемилюминесценция

1. Собственная
2. Активированная

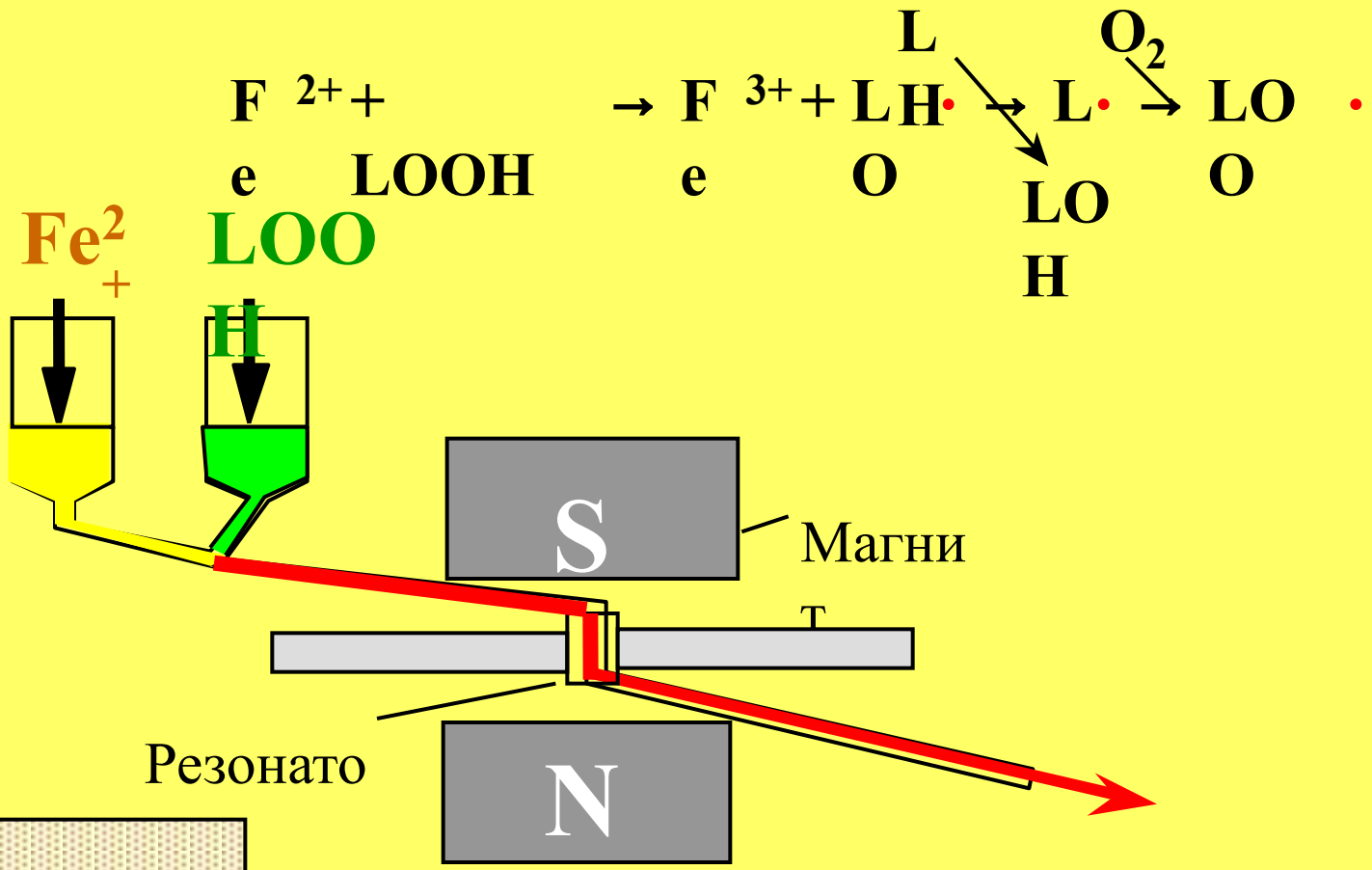
Метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР)

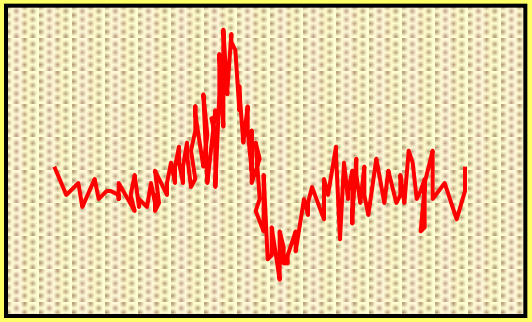
- Прямое измерение сигнала радикалов
  - Сигналы стабильных радикалов
  - Метод быстрого смешивания
  - Стабилизация радикалов при низких температурах
- Метод спиновых ловушек

Радиоспектрометр ЭПР



Прямое обнаружение радикалов липидов методом ЭПР в проточной кювете

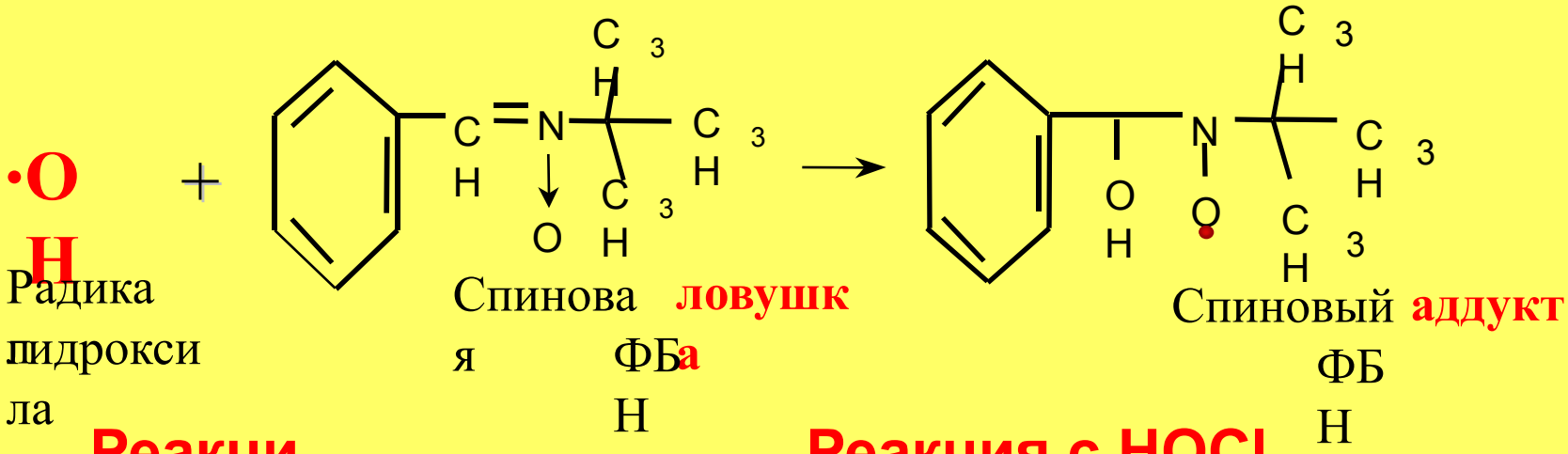




Сигнал ЭПР

Осипов А. Н., Моравский А. П., Шувалов В. Ф., Азизова О. А., Владимиров Ю. А. 1980, Биофизика 25(2): 234-238.

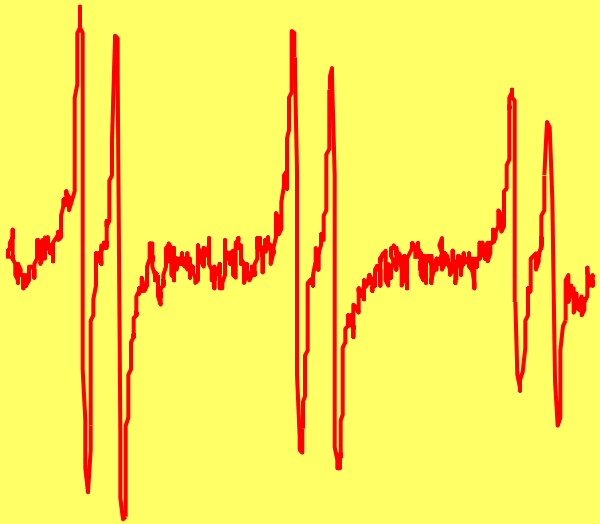
Две реакции образования радикалов гидроксила



Реакция Фентона

$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + HO^{\bullet}$

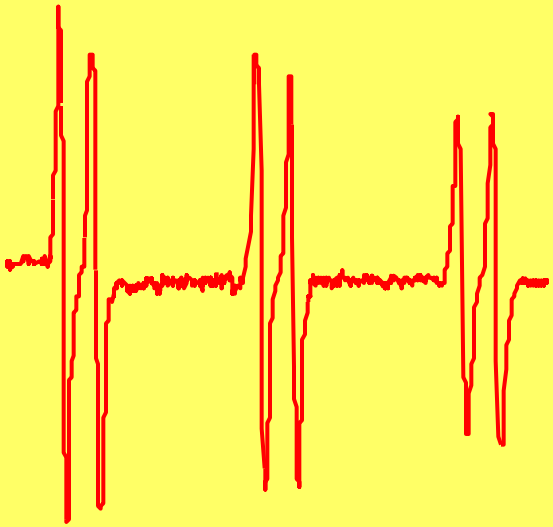
ФБН + $HO^{\bullet}$ → PBN-OH (аддукт)



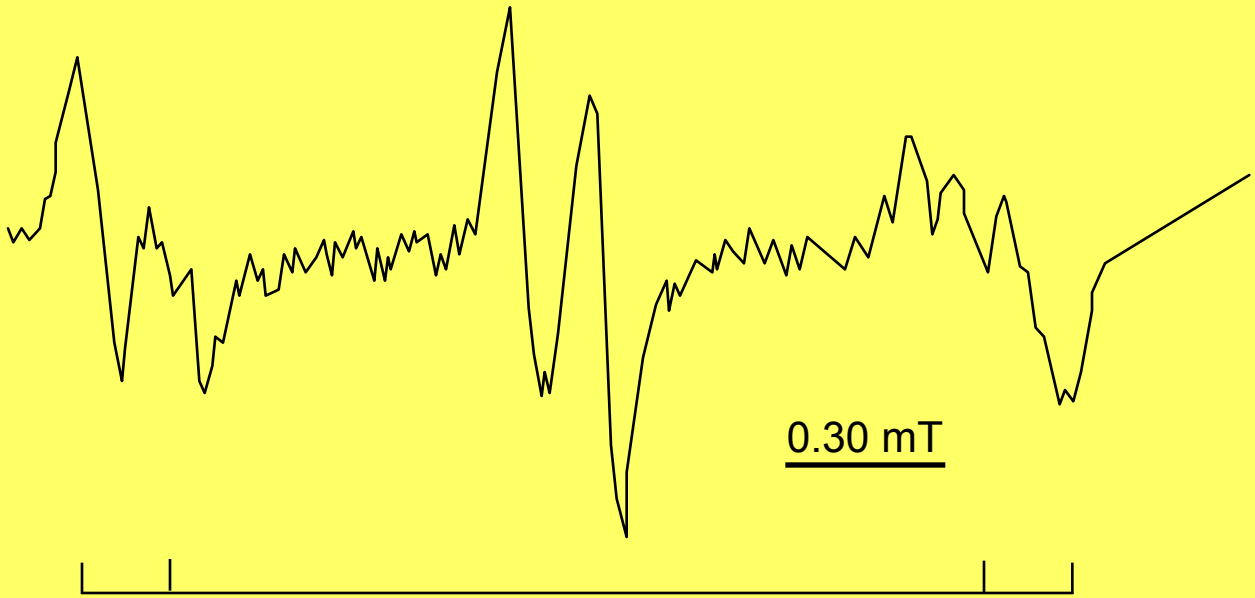
Реакция с HOCl

$Fe^{2+} + HClO \rightarrow Fe^{3+} + Cl^- + HO^{\bullet}$

ФБН + $HO^{\bullet}$ → PBN-OH (аддукт)



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



α_N =1,62mT α_H= 0,30mT Δ H=0,1mT

α_N =1,56mT α_H= 0,34mT Δ H=0,06mT

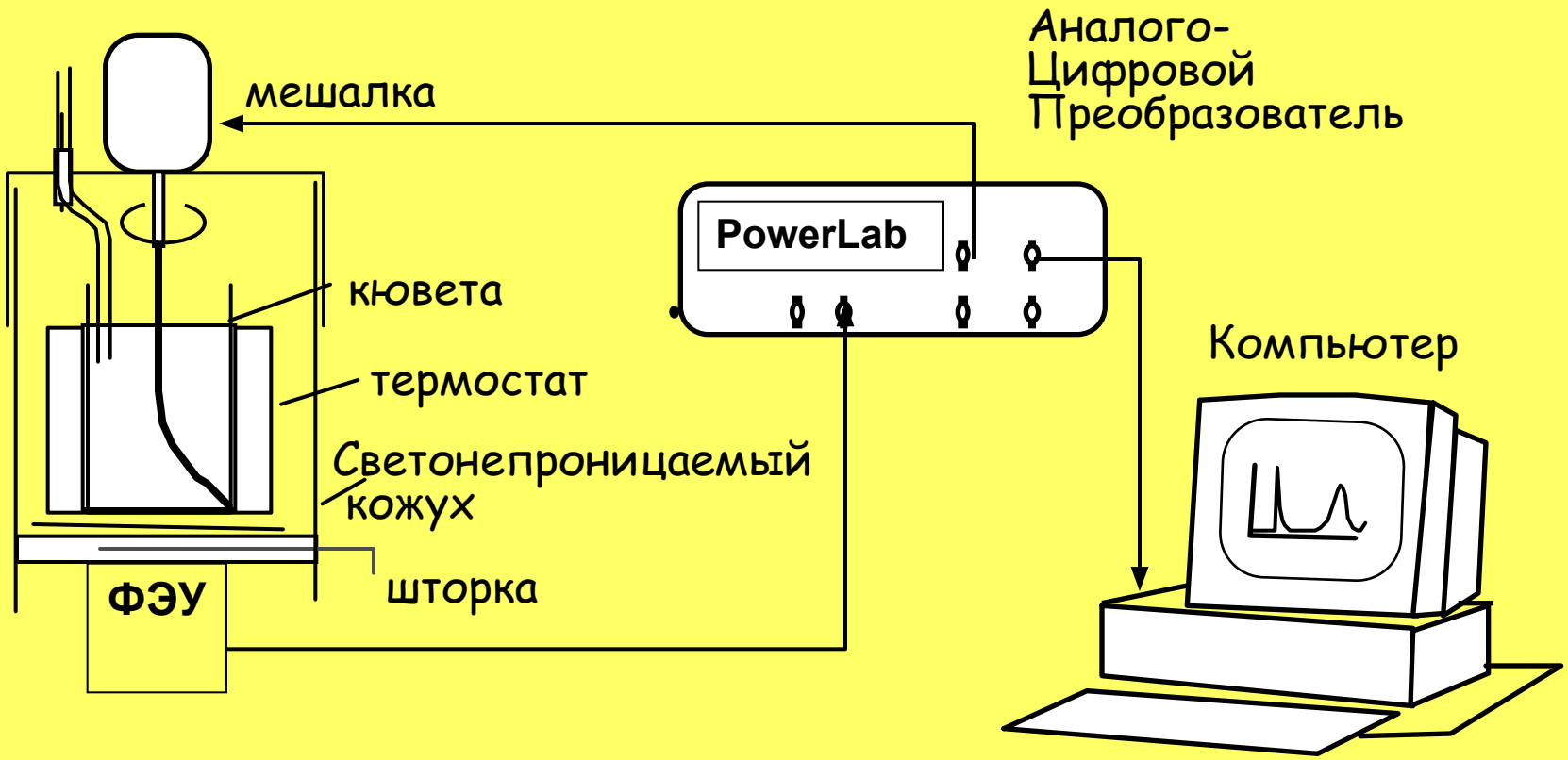
Fe^{2+} + LOOH → Fe^{3+} + LO• + OH^-

PBN + LO• → PBN-LO (аддукт)

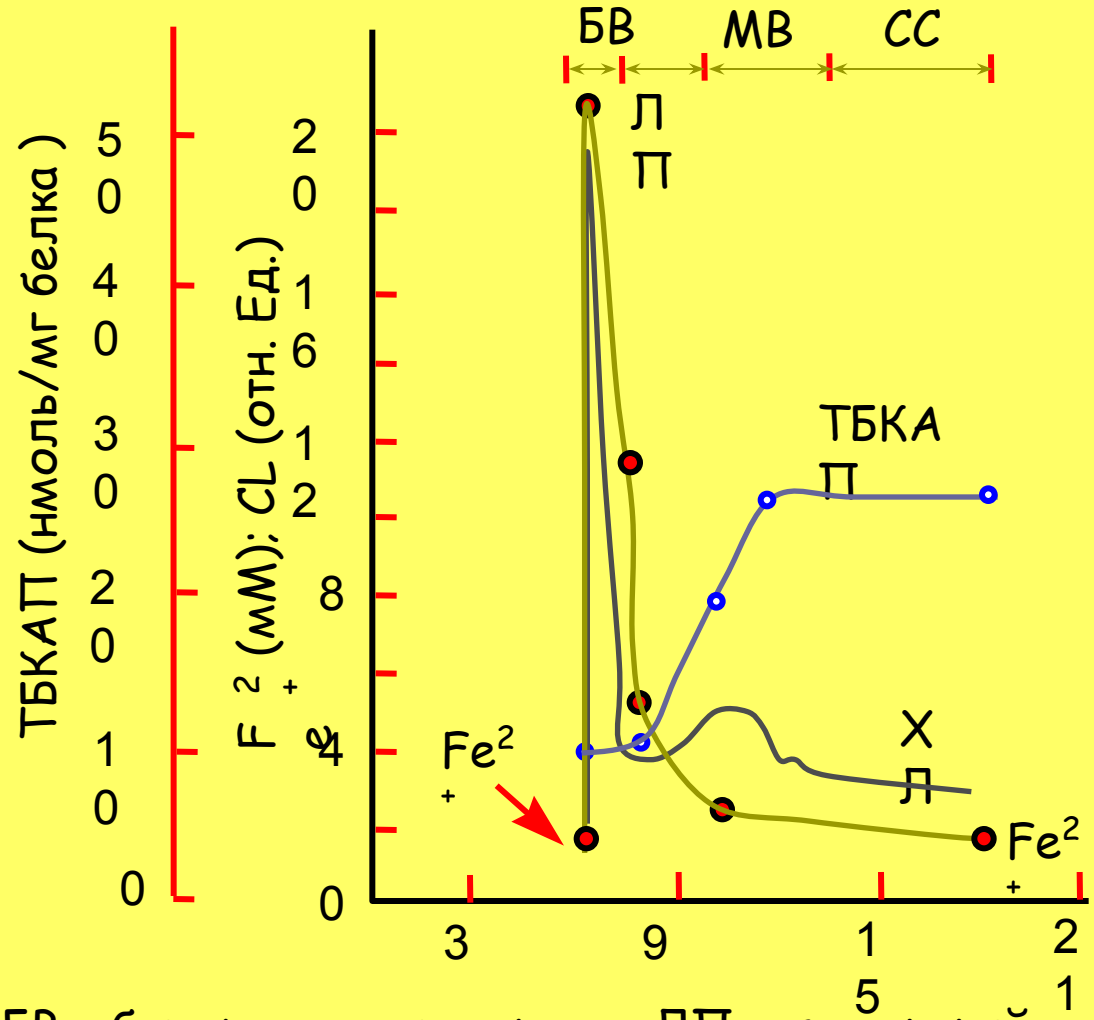
Метод хемилюминесценции

- Собственная
- Активированная

Современная установка для измерения ХЛ



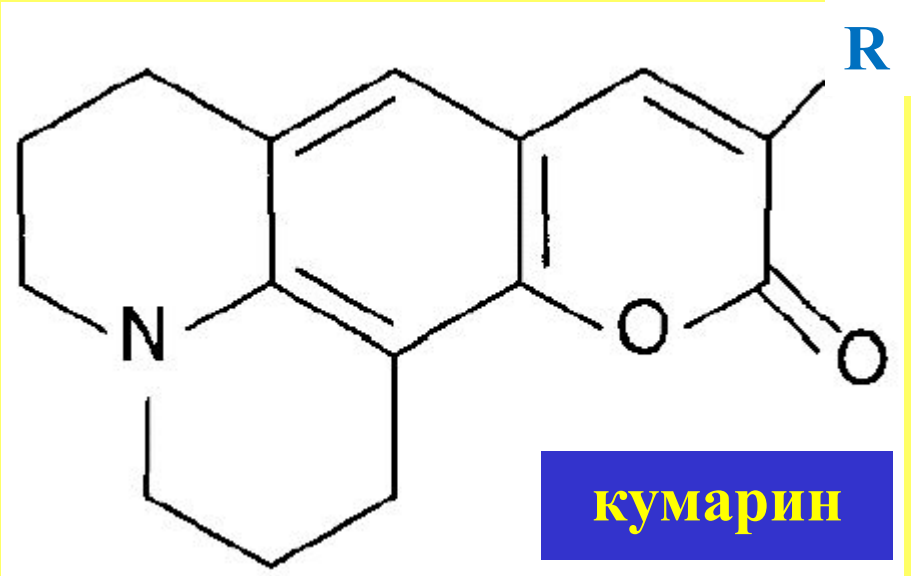
Кинетика перекисного окисления липидов



БВ – быстрая вспышка; ЛП – латентный период;
МВ – медленная вспышка; СС – стационарное свечение

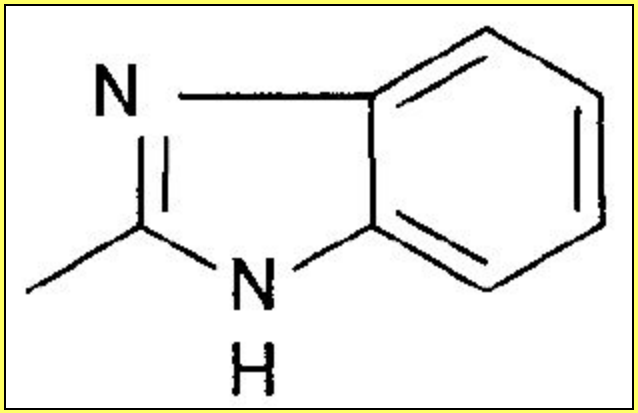
Владимиров, А., Т.Б. Суслова, В.И. Оленев, *Хемилюминесценция, сопряженная с образованием липидных перекисей в биологических мембранах. II. Роль Fe(2+) в разитии цепного окисления липидов и сверхслабого свечения.* Биофизика, 1969. **14**: p. 836.

Структура производных кумаринов



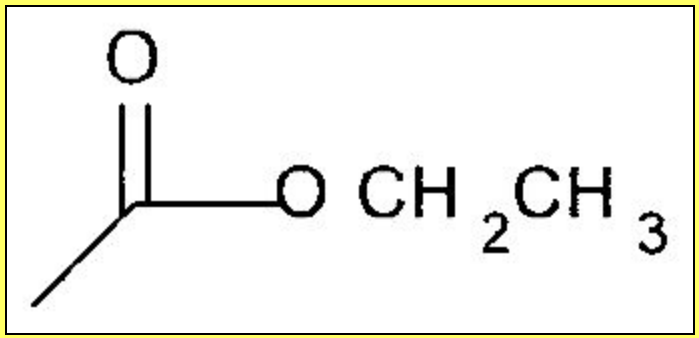
кумарин

R =



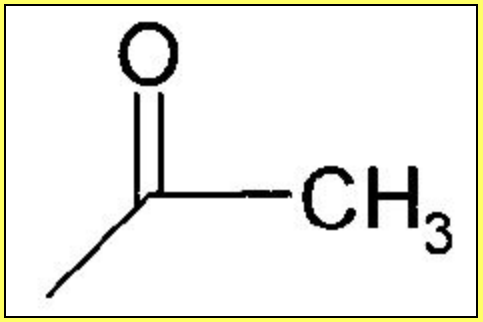
С-525

R =



С-314

R =



С-334

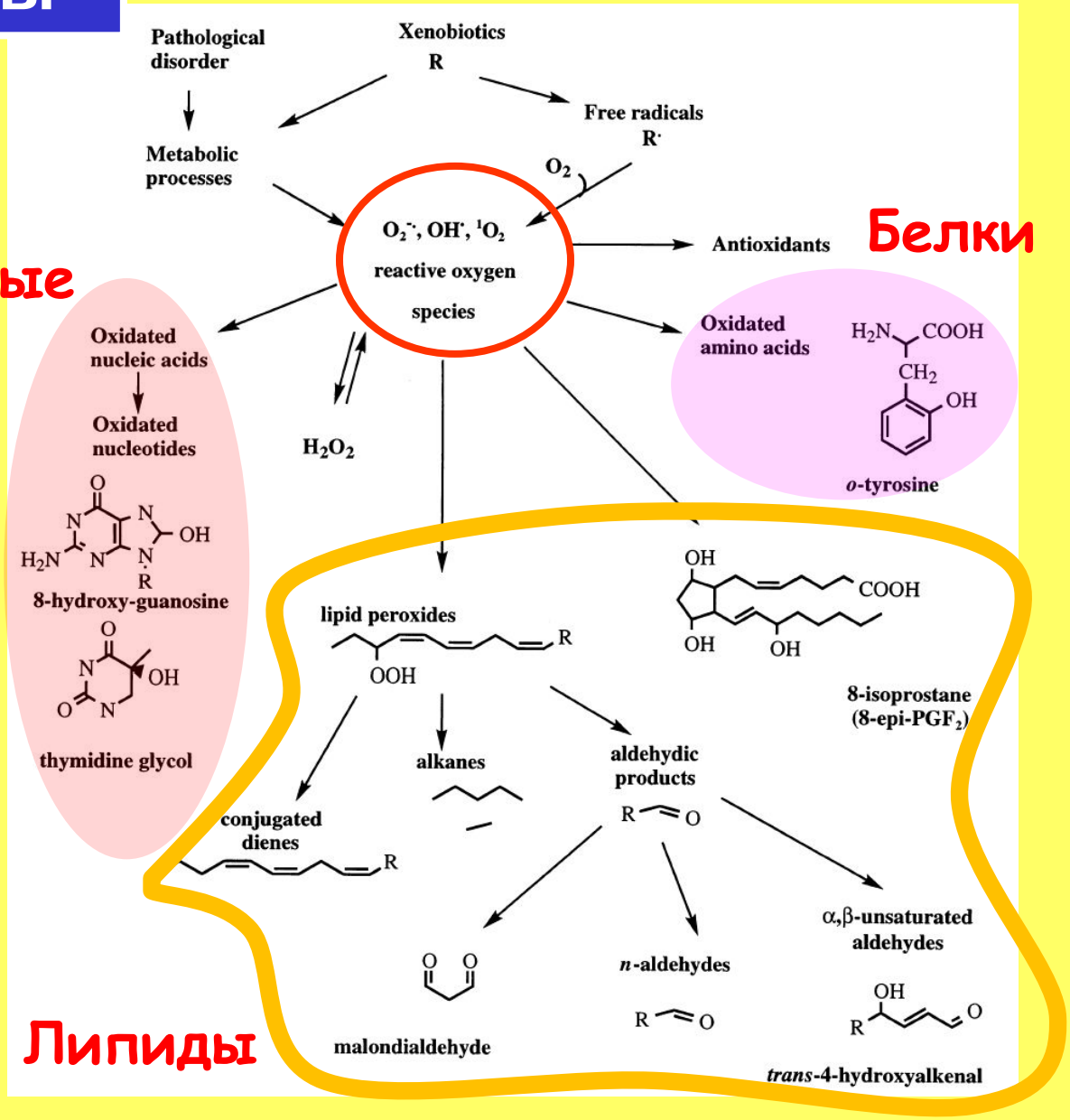
Биохимические методы изучения свободных радикалов

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

Биомаркеры

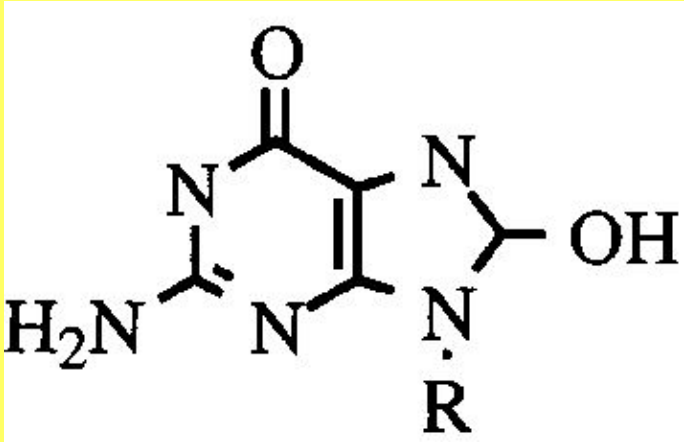
Биомаркеры

Нуклеиновые кислоты

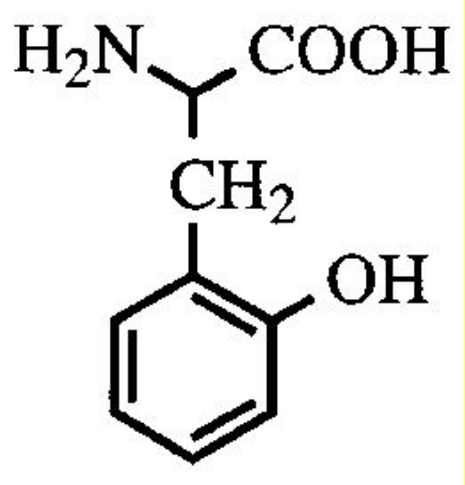


de Zwart, L. L., Meerman, J. H., Commandeur, J. N. and Vermeulen, N. P. (1999). Free Radic Biol Med **26**(1-2): 202-26.

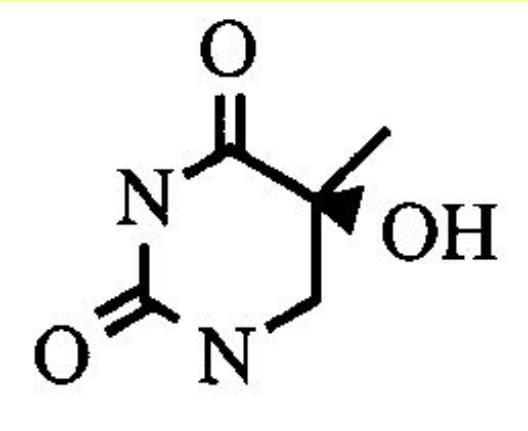
Маркеры оксидативного повреждения нуклеиновых кислот (слева) и белков (справа)



8-гидроксигуанозин



о-тирозин



тимидингликоль

Биомаркеры на окисление арахидоновой кислоты

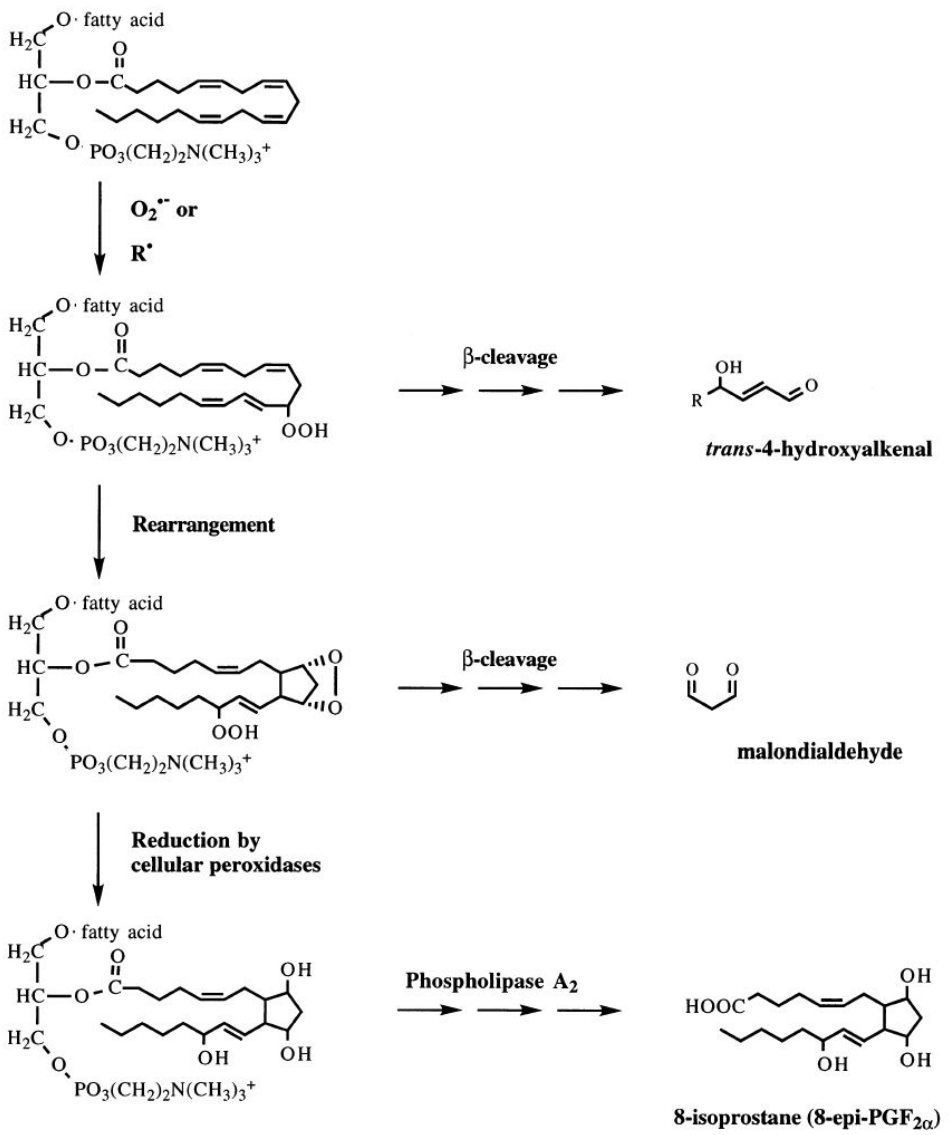


Fig. 2. The formation of 8-isoprostane. Radical-catalyzed ($R^\bullet$ or $O_2^{\bullet-}$) peroxidation of esterified arachidonic acid and subsequent release of 8-isoprostane.

Структура некоторых изопростанов

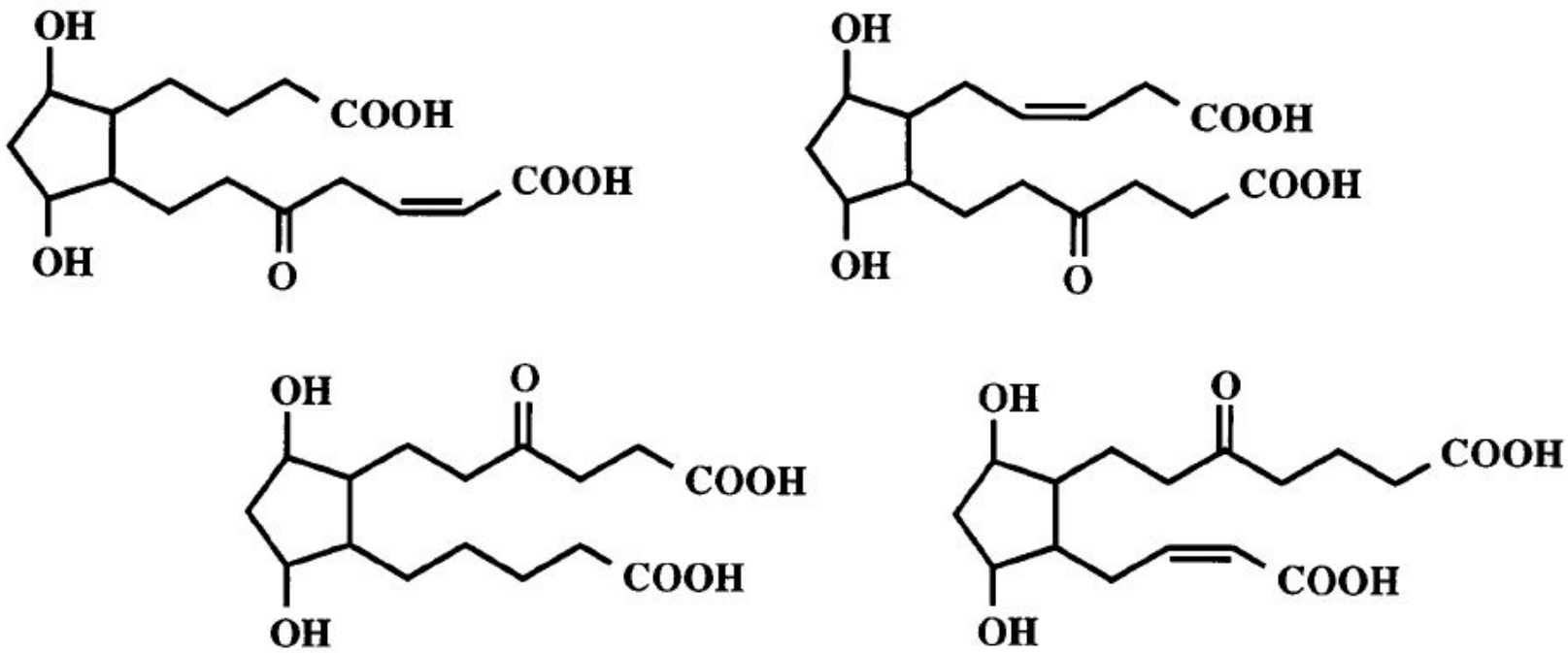
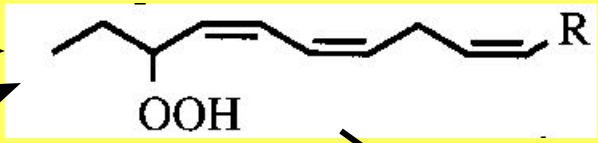


Fig. 4. Structures of metabolites of F_2-isoprostane regioisomers [79].

Маркеры липидной пероксидации

Перекисное окисление

Липоксигеназа

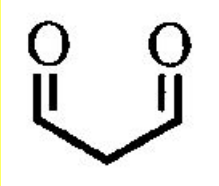


Гидроперекись липида

Коньюгированные диены

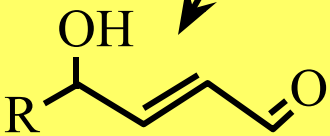
Алканы

Альдегиды



Малоновый диальдегид

α-,β -ненасыщенные альдегиды



транс-4-гидроксиалкеналь

Алифатические альдегиды

Биомаркеры - карбонилы

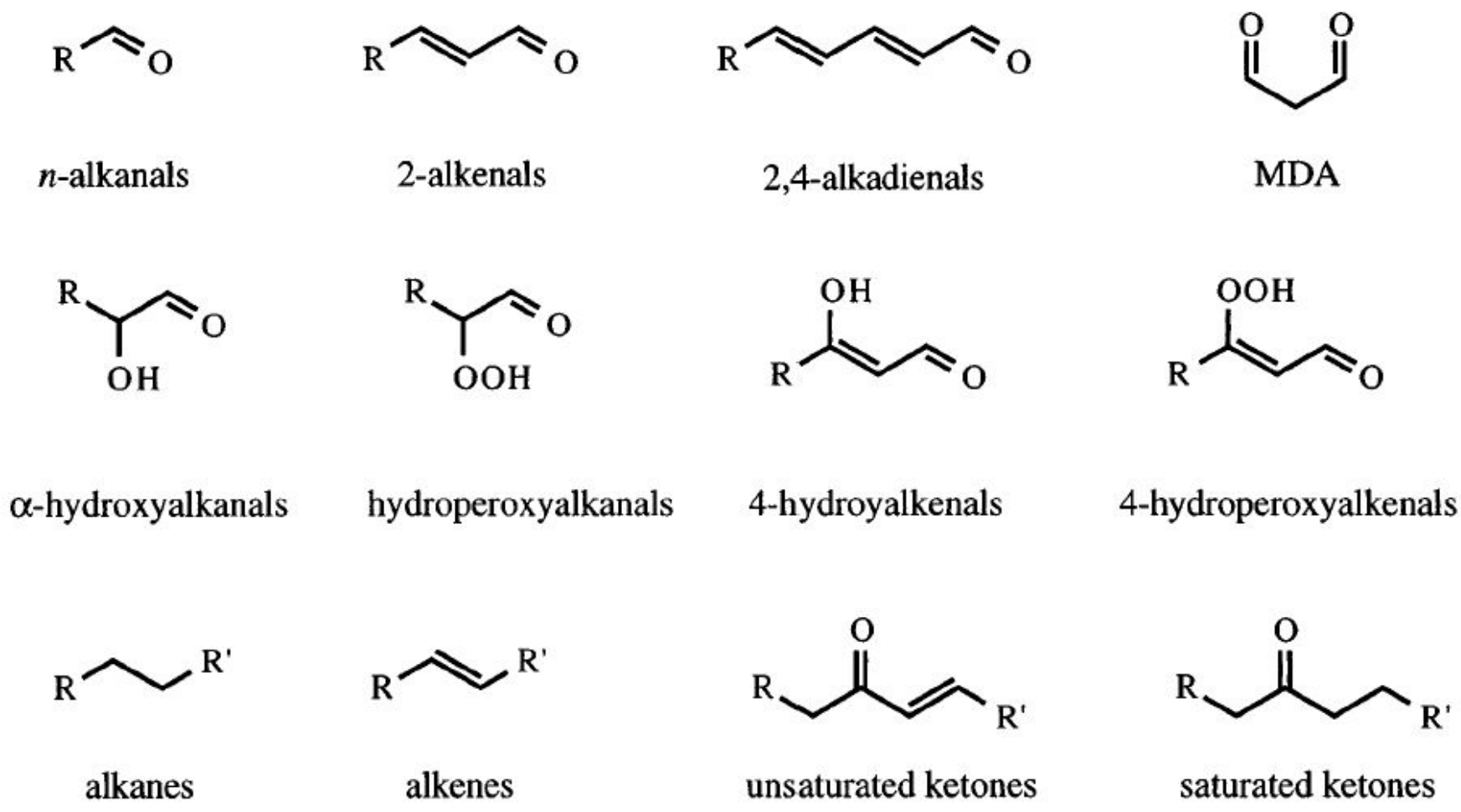


Fig. 6. Stable carbonyls formed following peroxidation of ω-3 and ω-6 fatty acids.

Образование изопростановых биомаркеров при отравлении четыреххлористым углеродом

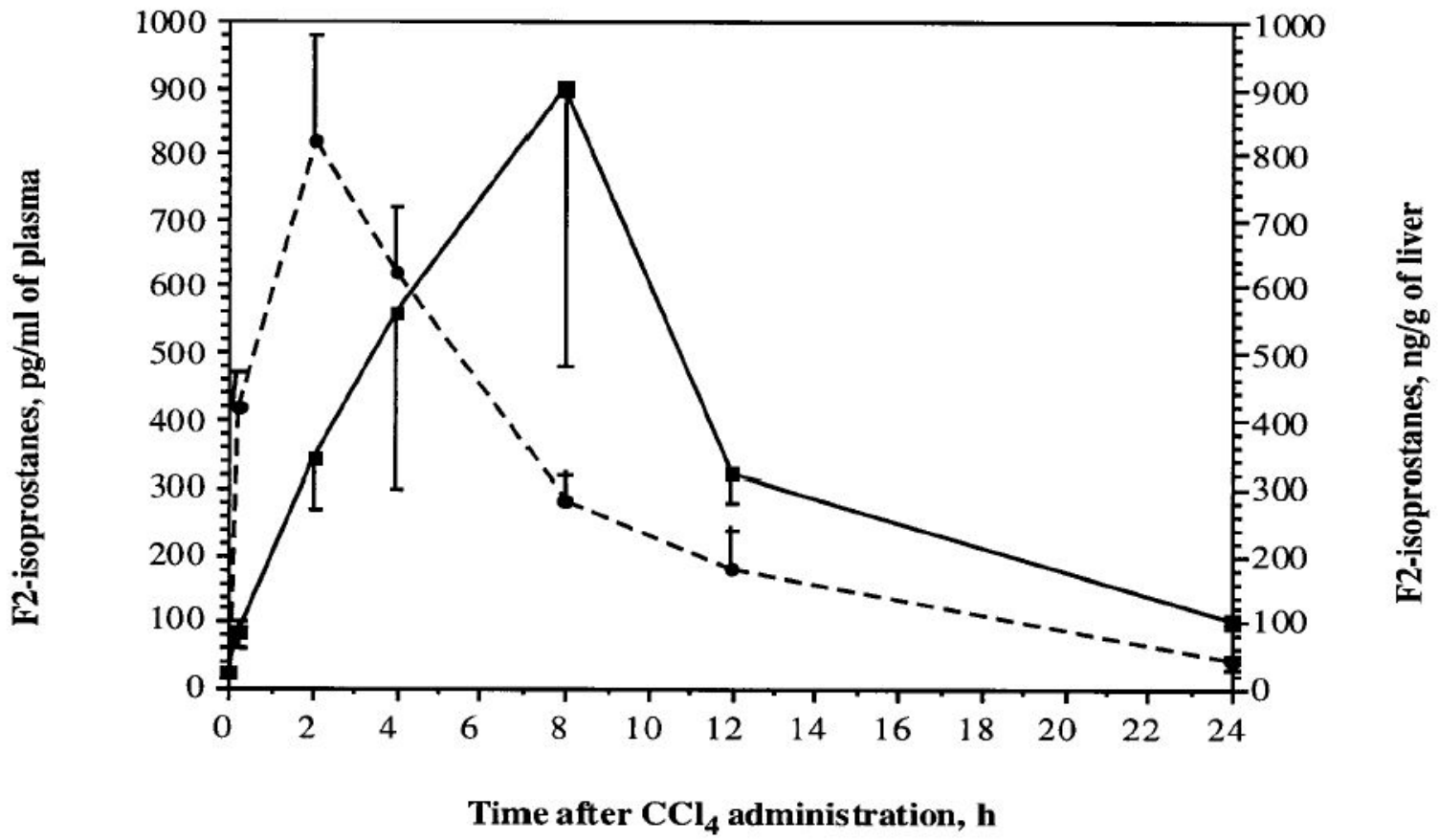


Fig. 3. Time course of appearance of lipid-associated F_2-isoprostanes in liver (●) and free F_2-isoprostanes in the circulation (■) of rats after intragastric administration of CCl_4 (1 ml/kg). Each time point represents the mean ± SD of levels of measured in at least four animals (replot of data from ref. 77).

Биомаркеры у курильщиков

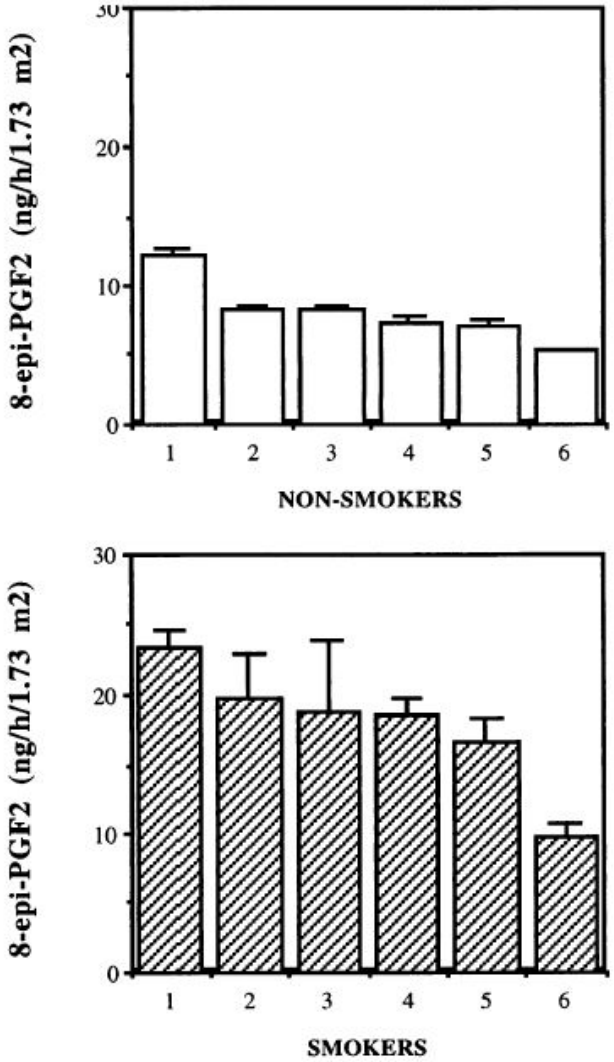


Fig. 5. Urinary excretion of 8-epi-$PGF_{2\alpha}$ in non-smoking and smoking healthy volunteers. Each bar represents the mean individual value (±SD) based on 6 h urine collections on different days ($n = 3$) (data replotted from Bachi et al. [92]).

Диеновая коньюгация

Реакции диеновой коньюгации

$-CH_2-CH=CH-CH_2-CH=CH-CH_2-$ **1**

$-CH_2-\dot{C}H=CH-CH-CH=CH-CH_2-$ **2**

O_2

$-CH_2-CH(OO\cdot)-CH=CH-CH=CH-CH_2-$ **3**

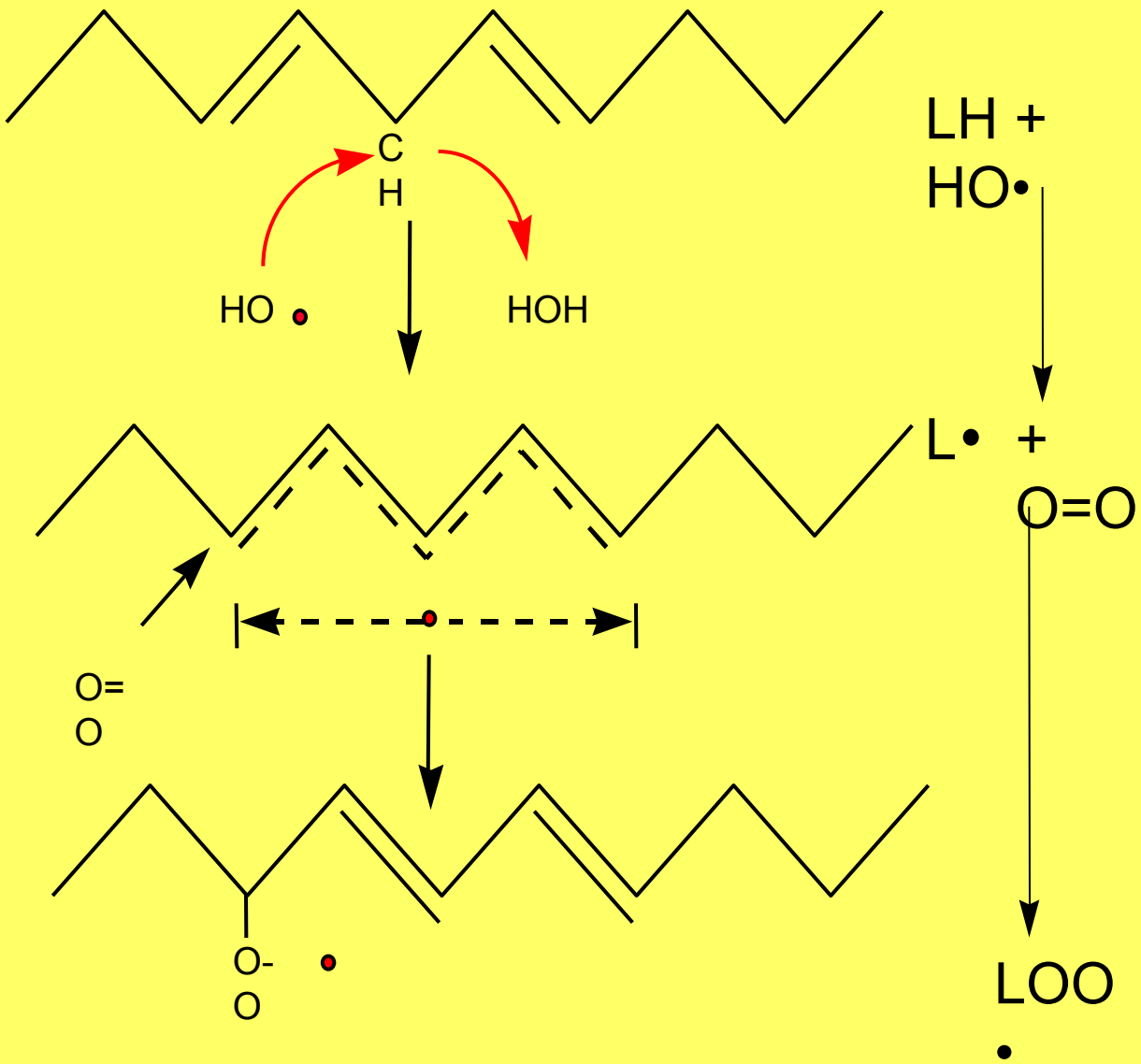
$-CH_2-CH(OO\cdot)-CH=CH-CH=CH-CH_2-$ **4**

$LH \longrightarrow$

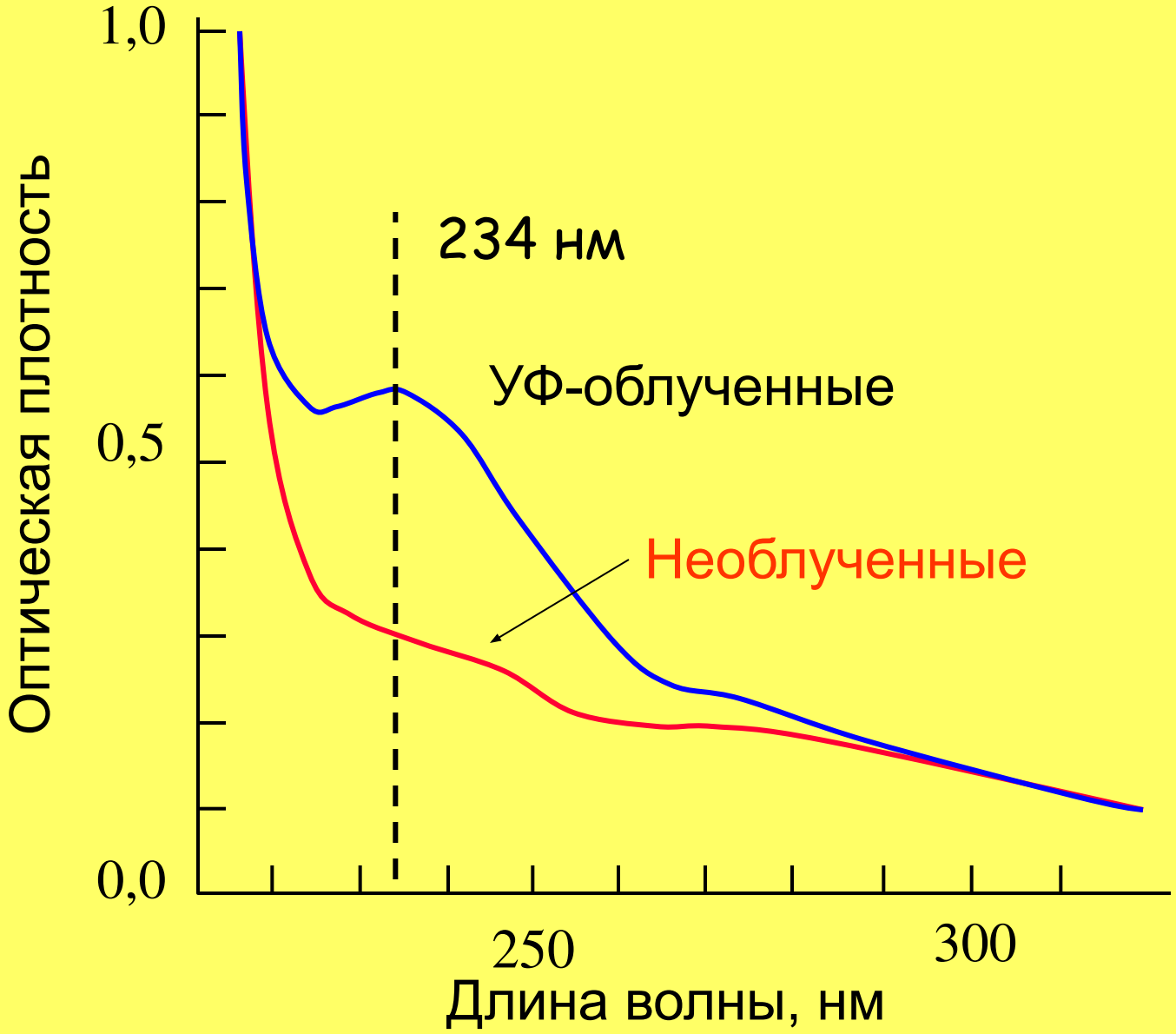
$-CH_2-CH(OOH)-CH=CH-CH=CH-CH_2-$ **5**

$+ L\cdot$

Схема образования диеновых коньюгатов



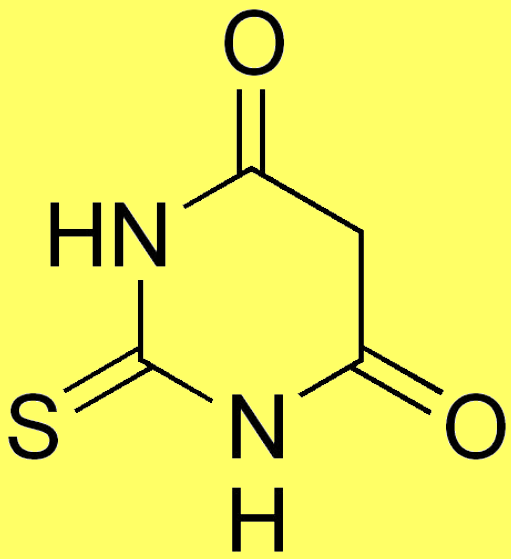
Спектр поглощения диеновых коньюгатов



Метод с тиобарбитуровой кислотой

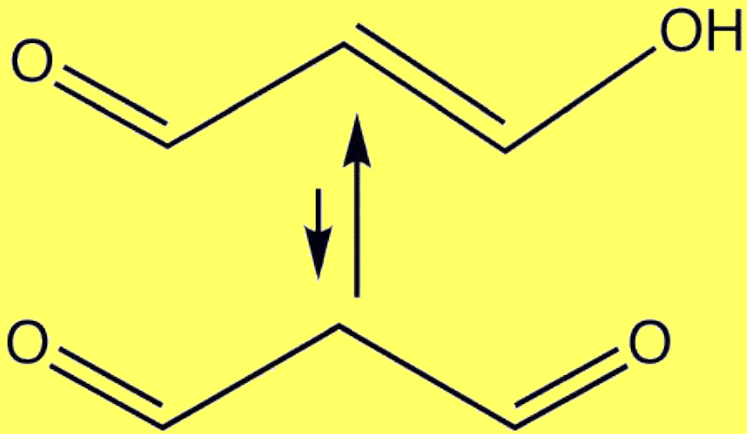
Метод ТБК активных продуктов

(TBARS, ThioBarbituric Acid Reactive Substance)



Тиобарбитуровая кислота

+



Малоновый диальдегид

Окрашенный флуоресцирующий продукт, имеющий поглощение при 532 нм

Ингибиторный анализ

Ингибиторный анализ

Источник радикалов → Детектор радикалов } Контроль

Источник радикалов → Ингибитор радикалов → Детектор радикалов } Опыт

Пример 1: обнаружение супероксидных радикалов

Ксантиноксидаза (генератор супероксида) → Цитохром с (детектор супероксида)

Ксантиноксидаза (генератор супероксида) → Супероксиддисмутаза (перехватчик супероксида) → Цитохром с (детектор 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 коньюгации. Теоретические основы и способы определения коньюгированных диенов.
6. Применение ингибиторов при изучении роли радикалов в различных процессах.