

Биофизические основы патологии клетки

Свободные радикалы и болезни человека

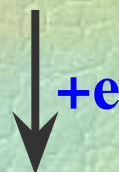
Ю.А. Владимиров, А.Н. Осипов
2018

Антиоксиданты, и способы их изучения

Антиоксиданты – соединения,
тормозящие процессы
оксидативного стресса

Оксидативный стресс – процесс,
повреждения биологических структур,
протекающий с участием свободных
радикалов и/или активных форм
кислорода

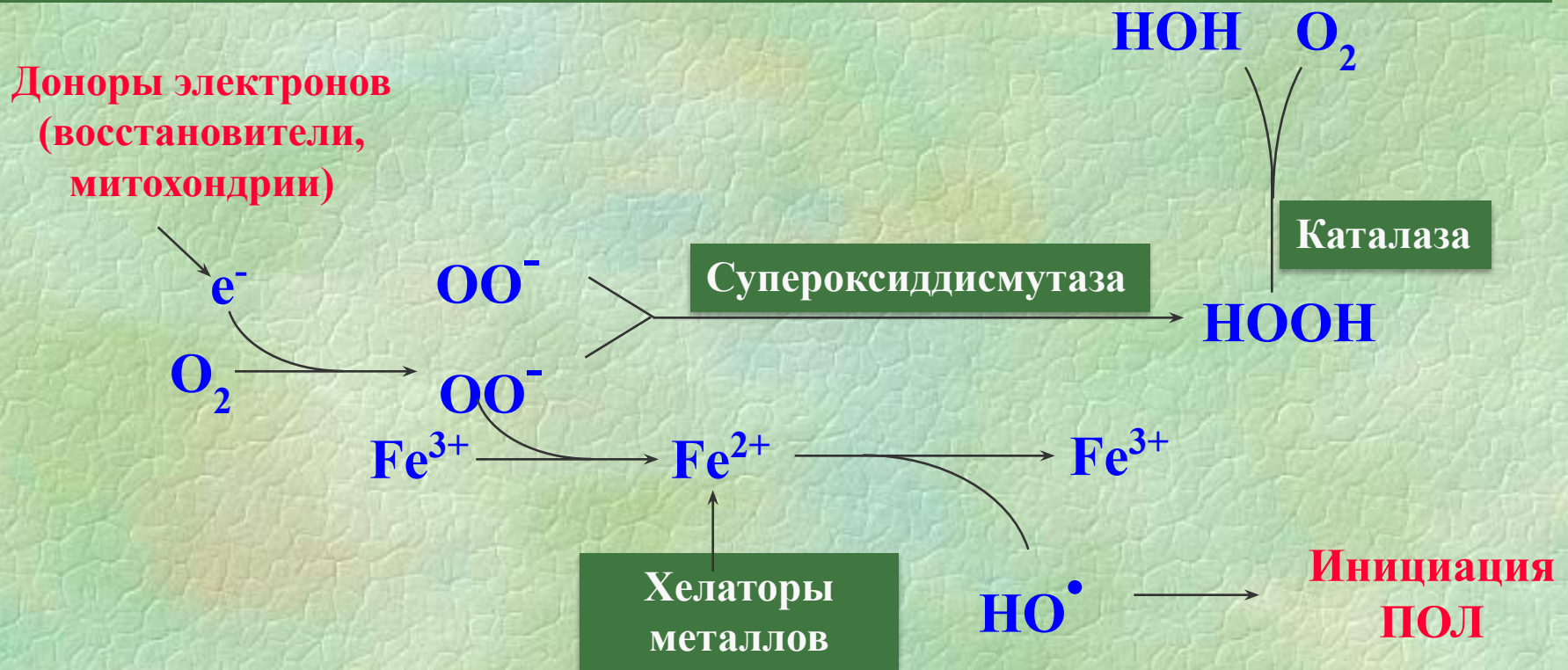
Процесс последовательного одноэлектронного восстановления молекулы кислорода:



Перехватчики
радикалов

Хелаторы металлов

Антиоксидантная система водной фазы

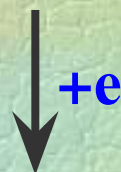


Антиоксиданты могут предотвращать окисление, реагируя с водорастворимыми радикалами или их предшественниками. Такие антиоксиданты называются - **антиоксидантами водной фазы (АВФ)**. Супероксиддисмутаза, каталаза и хелаторы ионов железа, а также карнозин относятся к классу АВФ.

Антиоксидантные ферменты

Супероксид дисмутаза

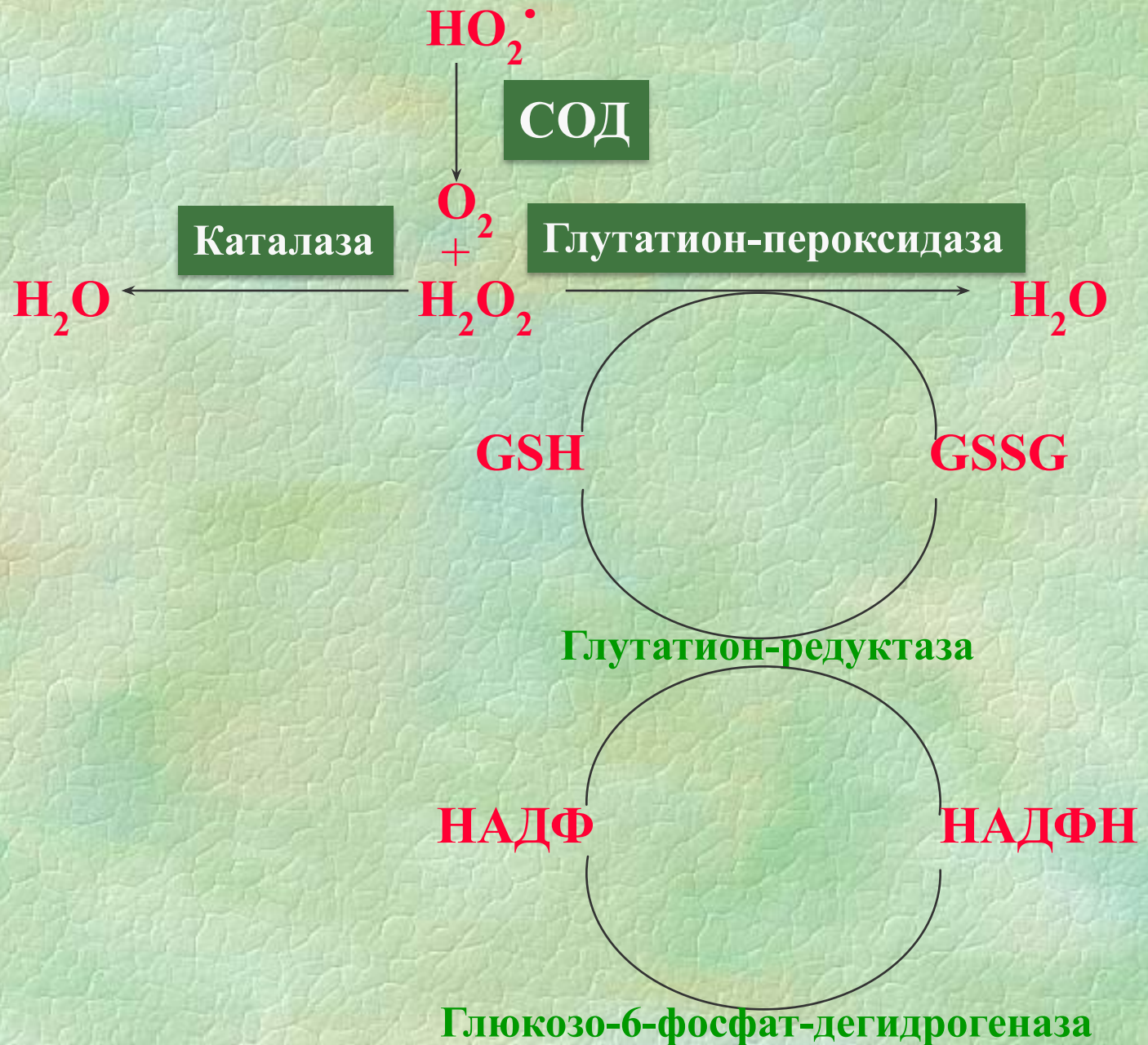
Процесс последовательного одноэлектронного восстановления молекулы кислорода:



СОД



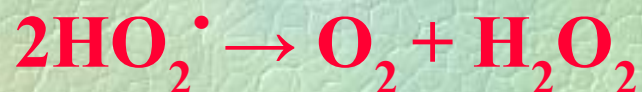
Метаболизм супероксида в биологических системах



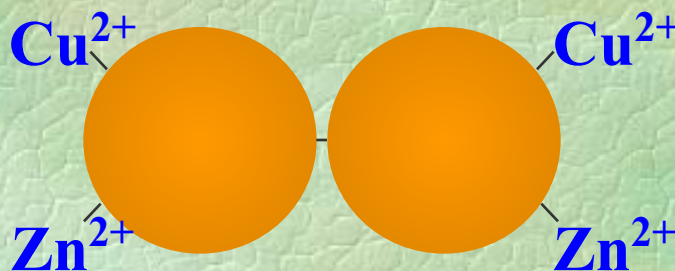
Супероксиддисмутаза

Супероксиддисмутаза (**СОД**) - единственный известный в настоящее время **фермент**, субстратом которого являются **свободные радикалы**.

Супероксиддисмутаза **катализирует** следующую реакцию:



Фермент, обнаруженный **МакКордом** и **Фридовичем**, имеет молекулярную массу 32 кД и состоит из **двух субъединиц**, каждая из которых содержит по одному атому **Cu** и одному атому **Zn**:



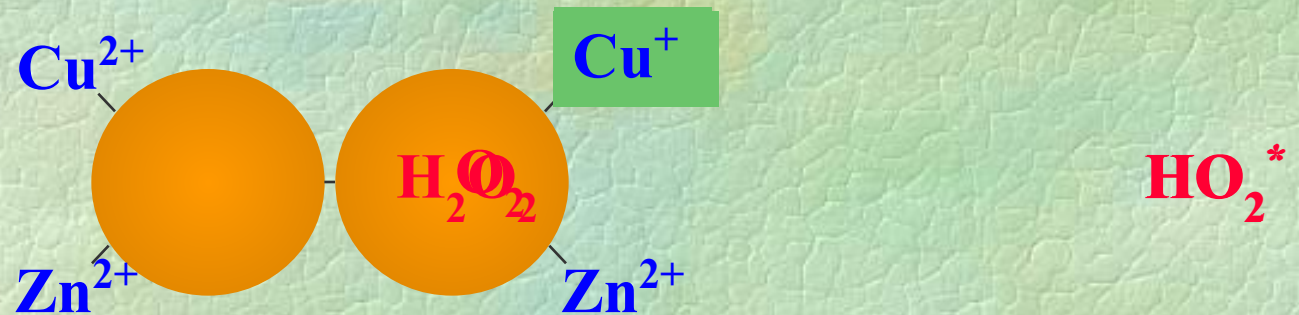
Дисмутация $\text{HO}_2\cdot$ супероксиддисмутазой

Реакция, катализируемая СОД, состоит из двух стадий и заключается в переносе электрона с одного супероксидного радикала на другой. Промежуточным акцептором этого электрона служит атом меди, входящий в активный центр СОД:



Zn^{2+} не участвует в каталитическом цикле, хотя и входит в активный центр. Ионы металлов защищают молекулу СОД от воздействий различных протеаз.

Дисмутация $\text{HO}_2\cdot$ супероксиддисмутазой



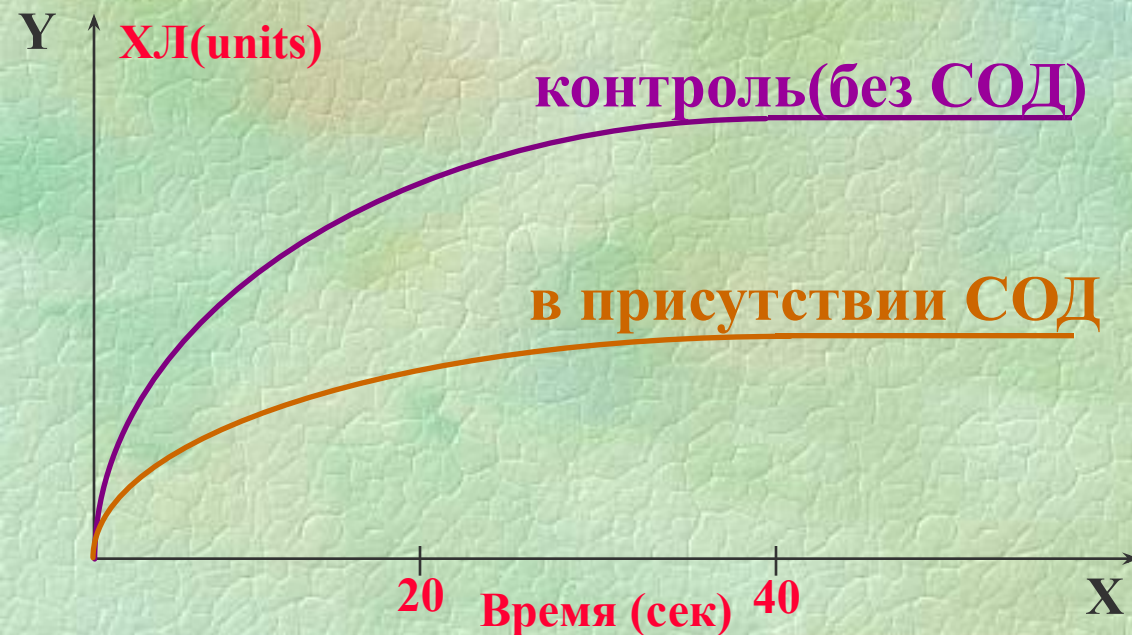
Реакция, катализируемая СОД, состоит из **двух стадий** и заключается в переносе электрона с одного супероксидного радикала на другой. Промежуточным акцептором этого электрона служит **атом меди**, входящий в активный центр СОД.

Измерение активности СОД

Генерацию радикалов осуществляют:

- физически** (например, радиолиз, электролиз);
- химически** (например, распад пероксида и автоокисление);
- биохимически** (например, энзиматически с помощью КсО).

Индикацию O_2^{*-} можно проводить **непосредственно**, измеряя его поглощение, либо **опосредованно**, с помощью измерения изменения свойств вспомогательного вещества или образования нового продукта.

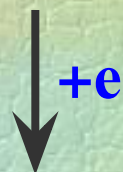


Здесь представлен метод **фотохемилюминесценции**: интенсивность люминесценции рибофлавина падает при добавлении СОД. Количество фермента приводящее к **50%** падению сигнала принимается за **единицу его активности**

Антиоксидантные ферменты

Каталаза и Пероксидазы

Процесс последовательного одноэлектронного восстановления молекулы кислорода:



СОД



Каталаза
Пероксидазы



Дезактивация перекиси водорода

Перекись водорода (H_2O_2) - основной источник самых токсичных радикалов в живых системах - **$\text{HO}\cdot$ радикалов**.

Следовательно, снижение уровня H_2O_2 приведет к снижению концентрации **$\text{HO}\cdot$ радикалов**.

Удаление H_2O_2 осуществляют два класса ферментов:



Как работают каталаза и пероксидаза?

Стадии ферментативного цикла **каталазы**:

1. $\text{Cat-Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{Cat-Fe}^{5+}(\text{соединение 1}) + 2\text{H}_2\text{O}$
2. $\text{Cat-Fe}^{5+}(\text{соединение 1}) + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{Cat-Fe}^{3+} + \text{O}_2$



Стадии ферментативного цикла **пероксидазы**:

1. $\text{Per-Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{Per-Fe}^{5+}(\text{соединение 1}) + 2\text{H}_2\text{O}$
2. $\text{Per-Fe}^{5+}(\text{соединение 1}) + \text{AH}_2 \longrightarrow \text{Per-Fe}^{3+} + \text{A}$



Каталаза

Каталаза представляет собой гемовый фермент, состоящий из **четырех субъединиц** с общей молекулярной массой около 240 кД.

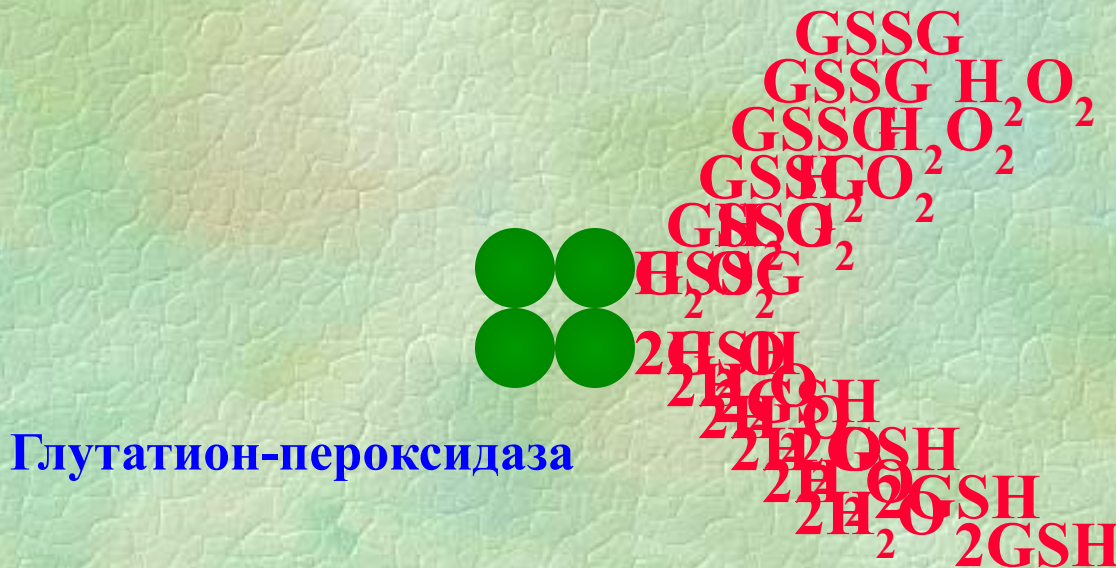
В основе действия **каталазы** лежит вышеприведенная реакция, протекающая в **две стадии**:



Пероксидазы

Пероксидазы также являются ферментами, разрушающими H_2O_2 нерадикальным путем и образующими H_2O ; при этом окислению подвергается не вторая молекула H_2O_2 , как в случае каталазы, а другие субстраты (AH_2).

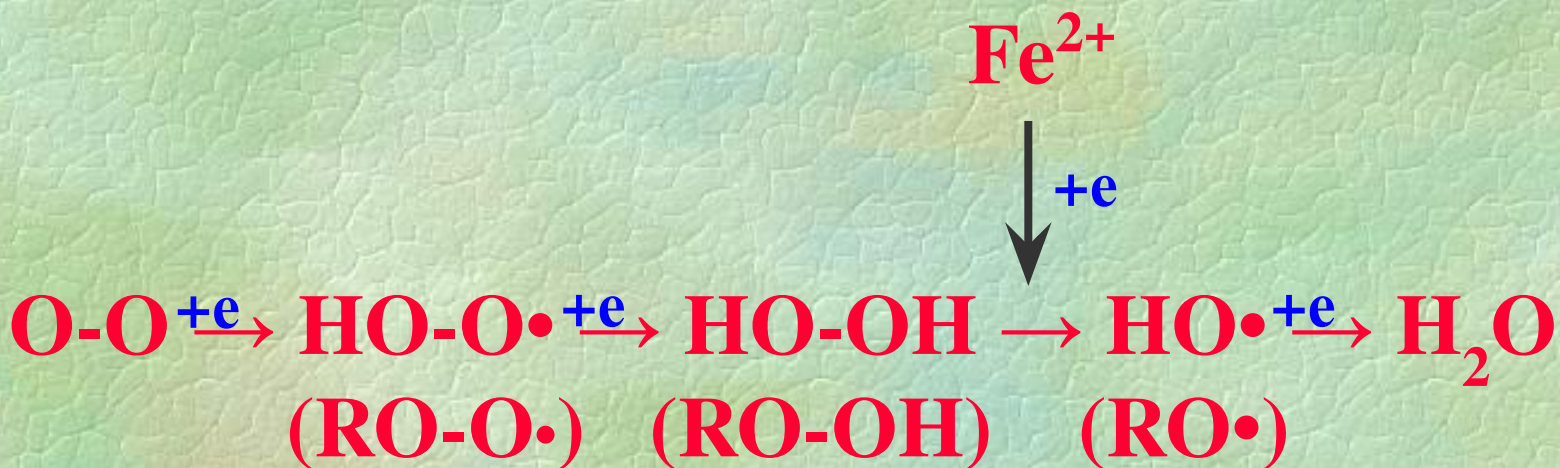
Рассмотрим реакцию с участием **глутатион-пероксидазы**:



Антиоксиданты, и способы их изучения

Перехватчики радикалов

Процесс последовательного одноэлектронного восстановления молекулы кислорода:



СОД



Каталаза
Пероксидаза



Перехватчики
радикалов

Перехватчики радикалов

В качестве системы защиты организма от повреждающего действия радикалов кислорода могут выступать **низкомолекулярные вещества**, имеющие высокую константу скорости взаимодействия с этими радикалами:

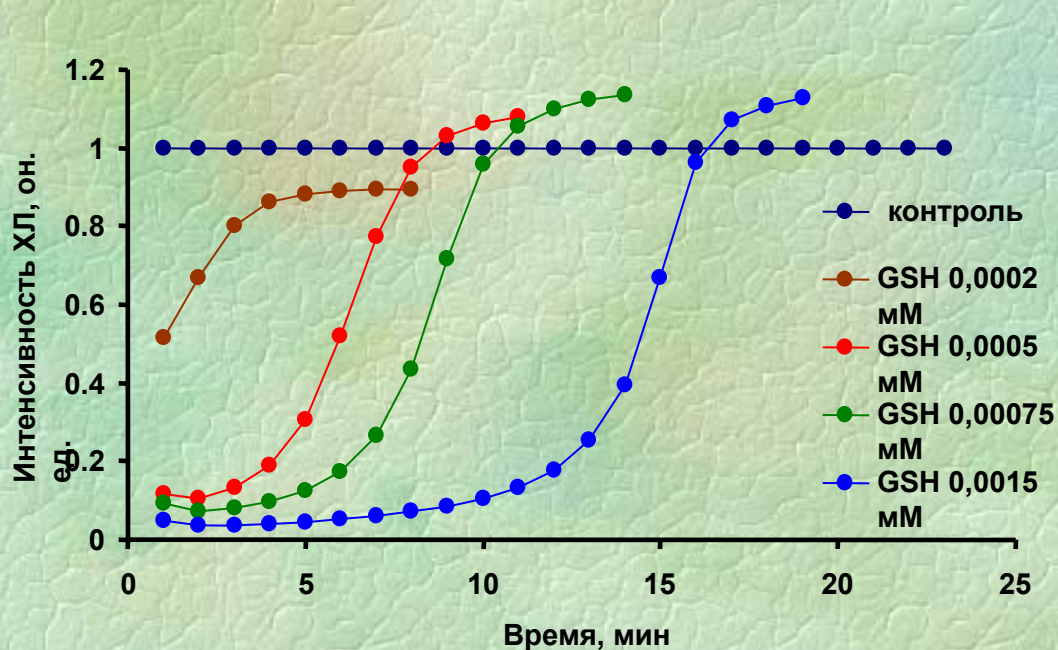
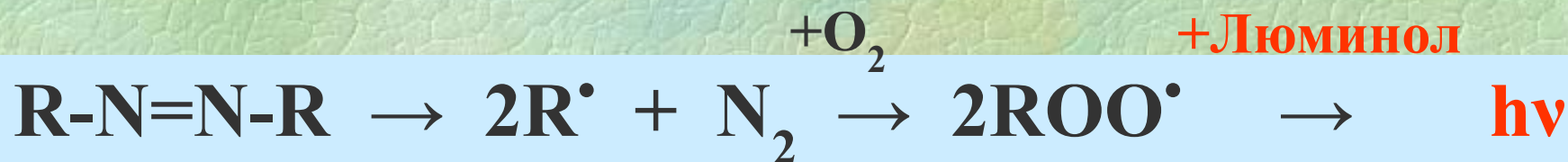
- Аскорбиновая кислота (витамин С)
- *α* –токоферол (витамин Е)
- Сульфгидрильные соединения (глутатион, цистеин)
- Мочевая кислота
- Одно- и многоатомные спирты (этанол, рибоза, глюкоза)

Принцип действия перехватчиков радикалов

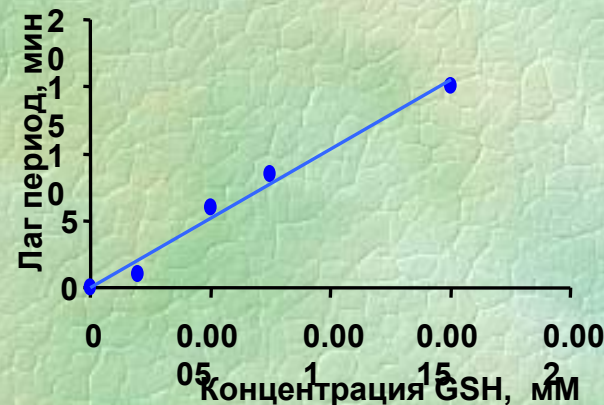
Антиоксидантные свойства обычно определяются как способность каких-либо соединений защищать от разрушающего действия свободных радикалов



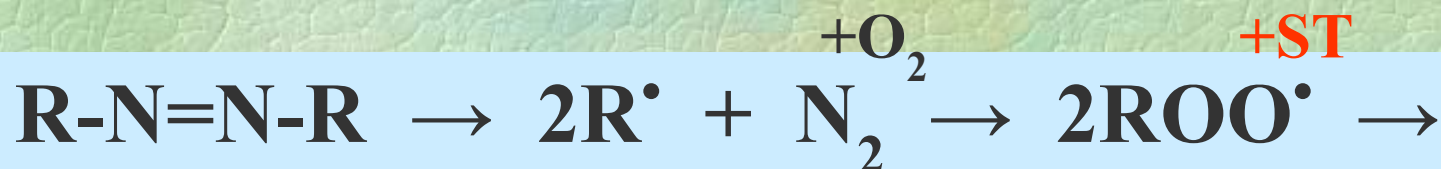
Определение общей антиоксидантной активности (метод хемилюминесценции)



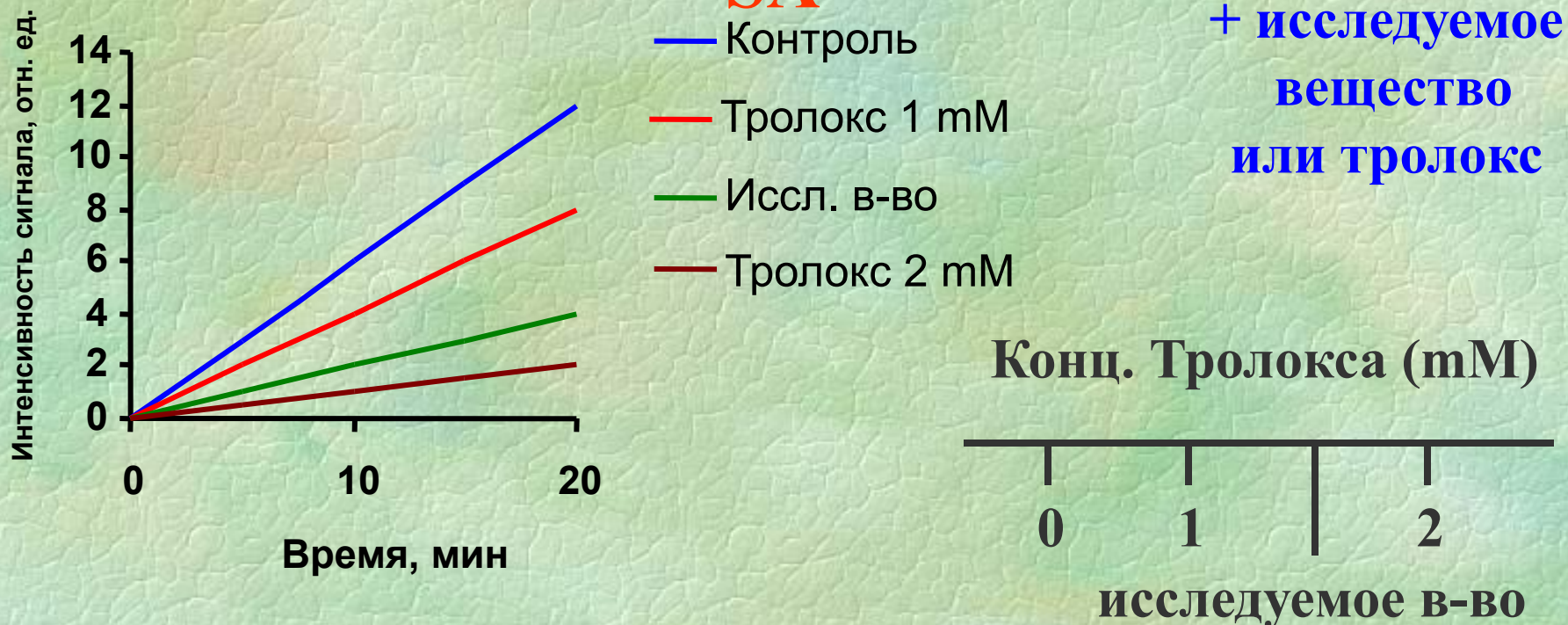
+ исследуемое
вещество
или тролокс



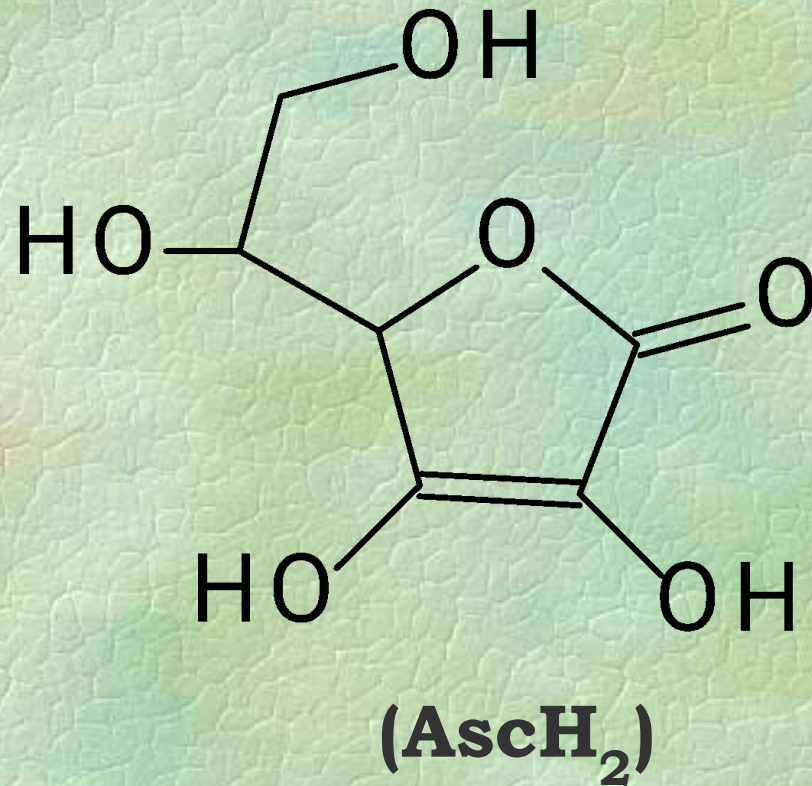
Определение общей антиоксидантной активности



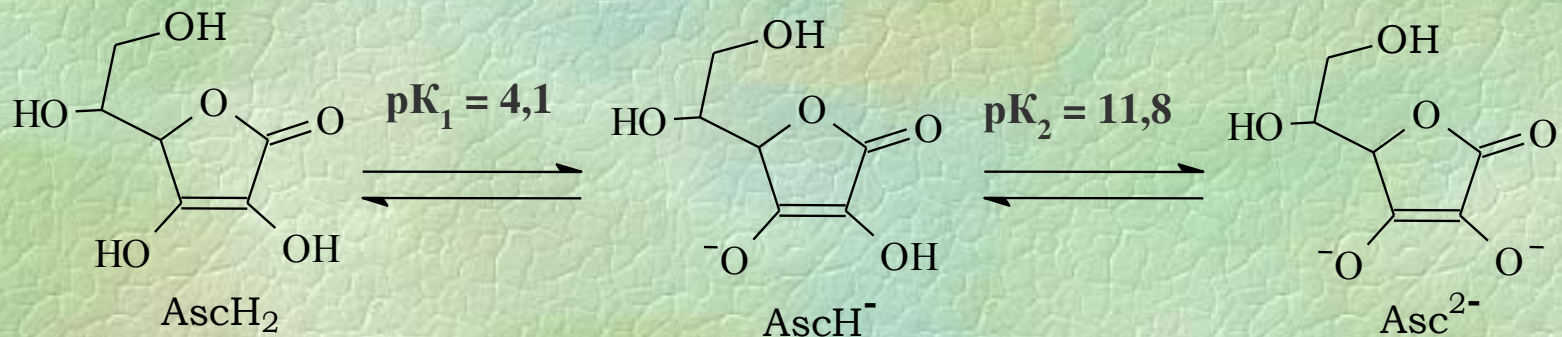
SA



Строение молекулы аскорбиновой кислоты



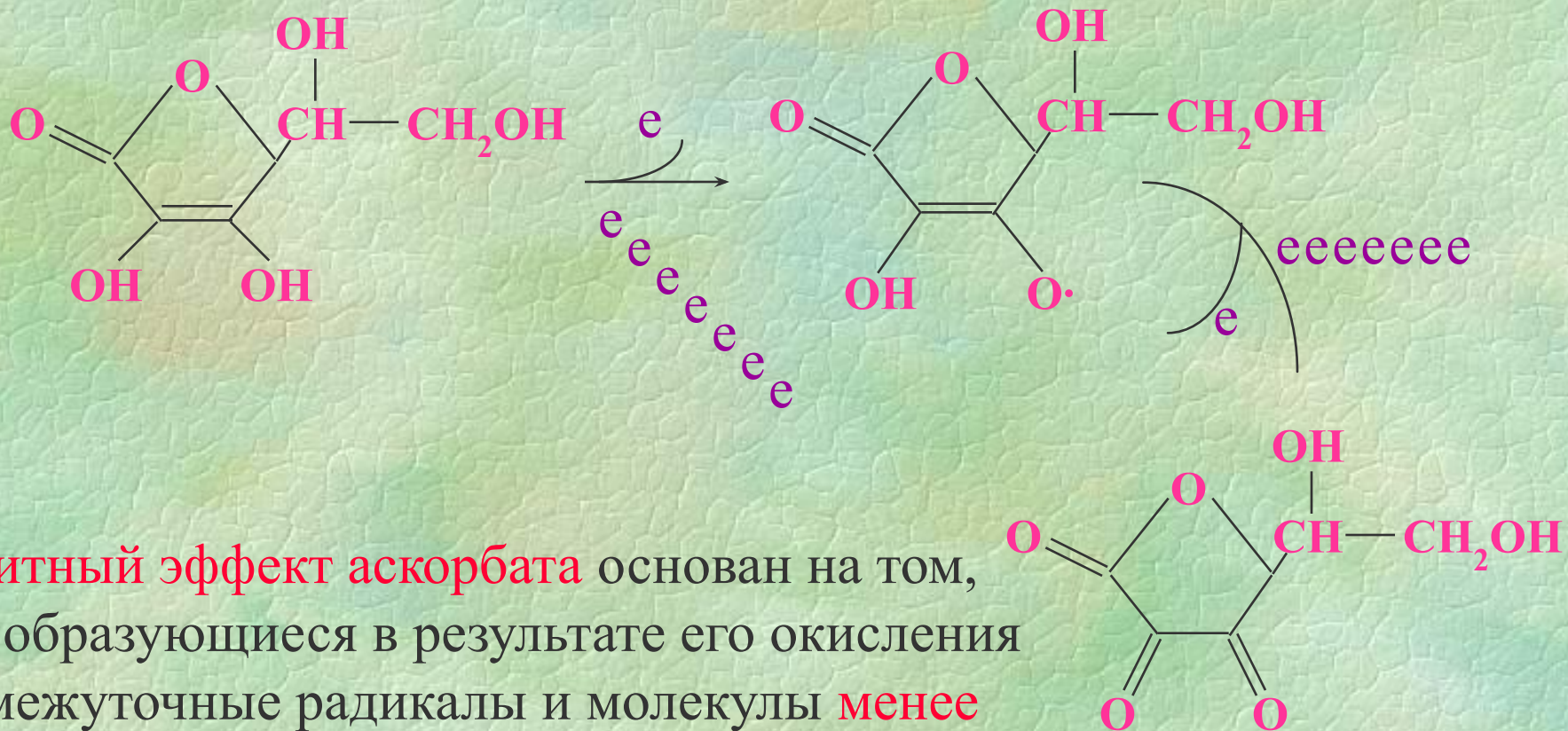
AscH₂ – двухосновная кислота



При pH 7.4, 99.95% витамина С присутствует в виде AscH⁻; 0.05% как AscH₂ и 0.004% как Asc²⁻. Т.о., в реакциях витамина С в организме принимает участие преимущественно AscH⁻.

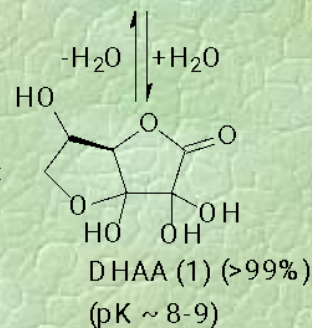
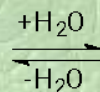
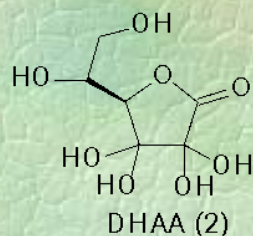
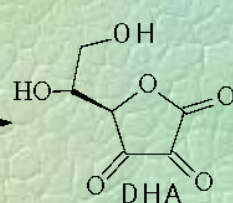
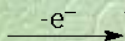
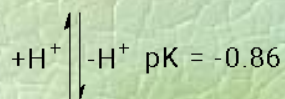
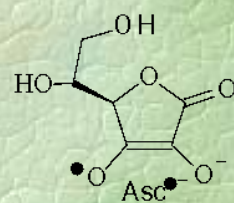
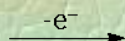
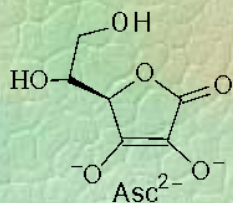
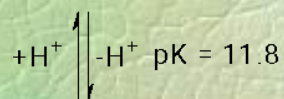
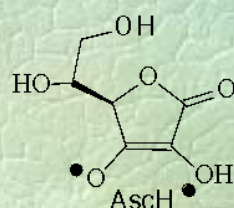
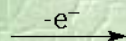
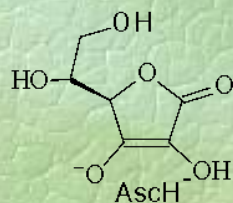
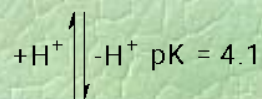
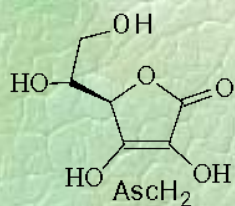
Аскорбиновая кислота

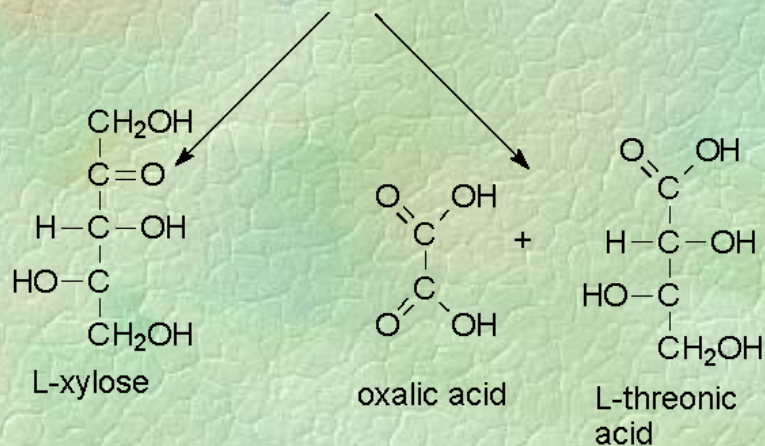
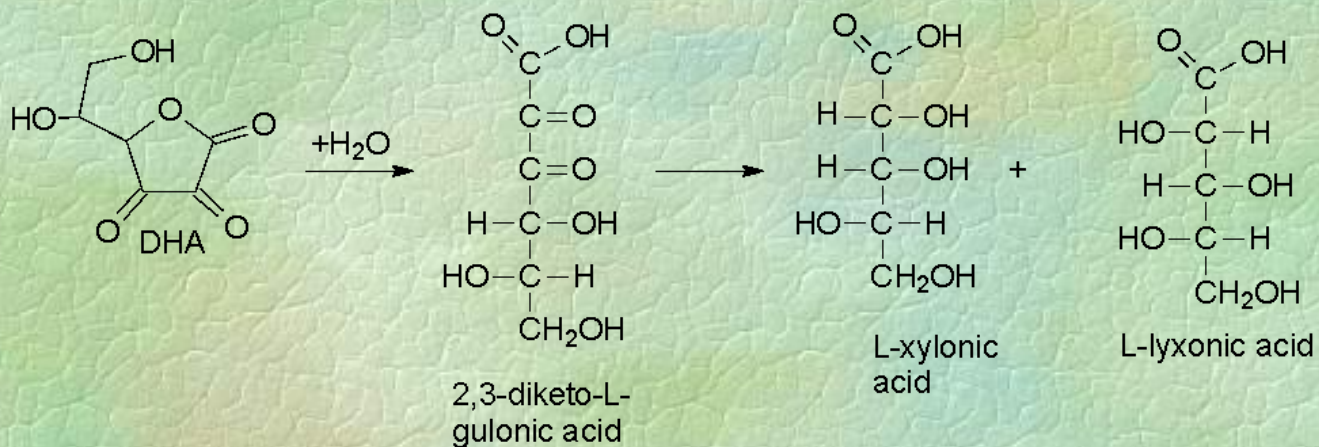
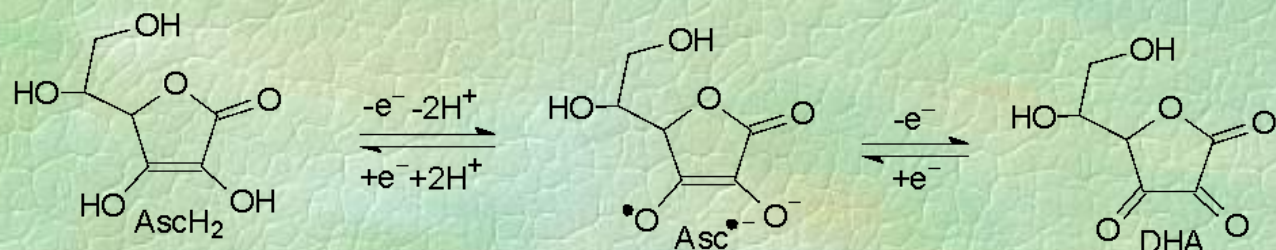
Отрыв одного **электрона** от **аскорбиновой кислоты** приводит к образованию **семидегидроаскорбила**, в результате дальнейшего окисления переходит в **дегидроаскорбат**.



Защитный эффект аскорбата основан на том, что образующиеся в результате его окисления промежуточные радикалы и молекулы **менее активны**, чем $\text{HO}\cdot$ радикалы.

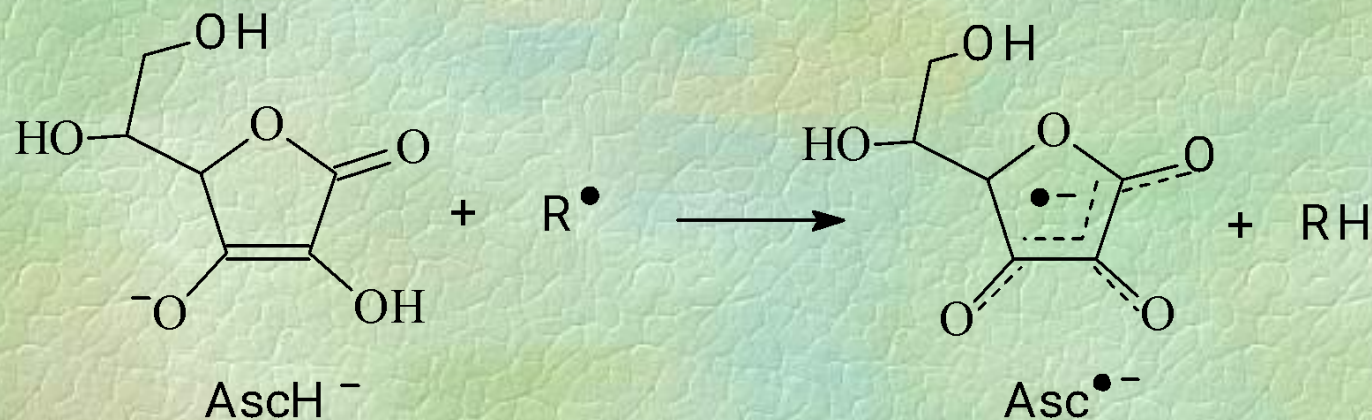
Различные формы аскорбата





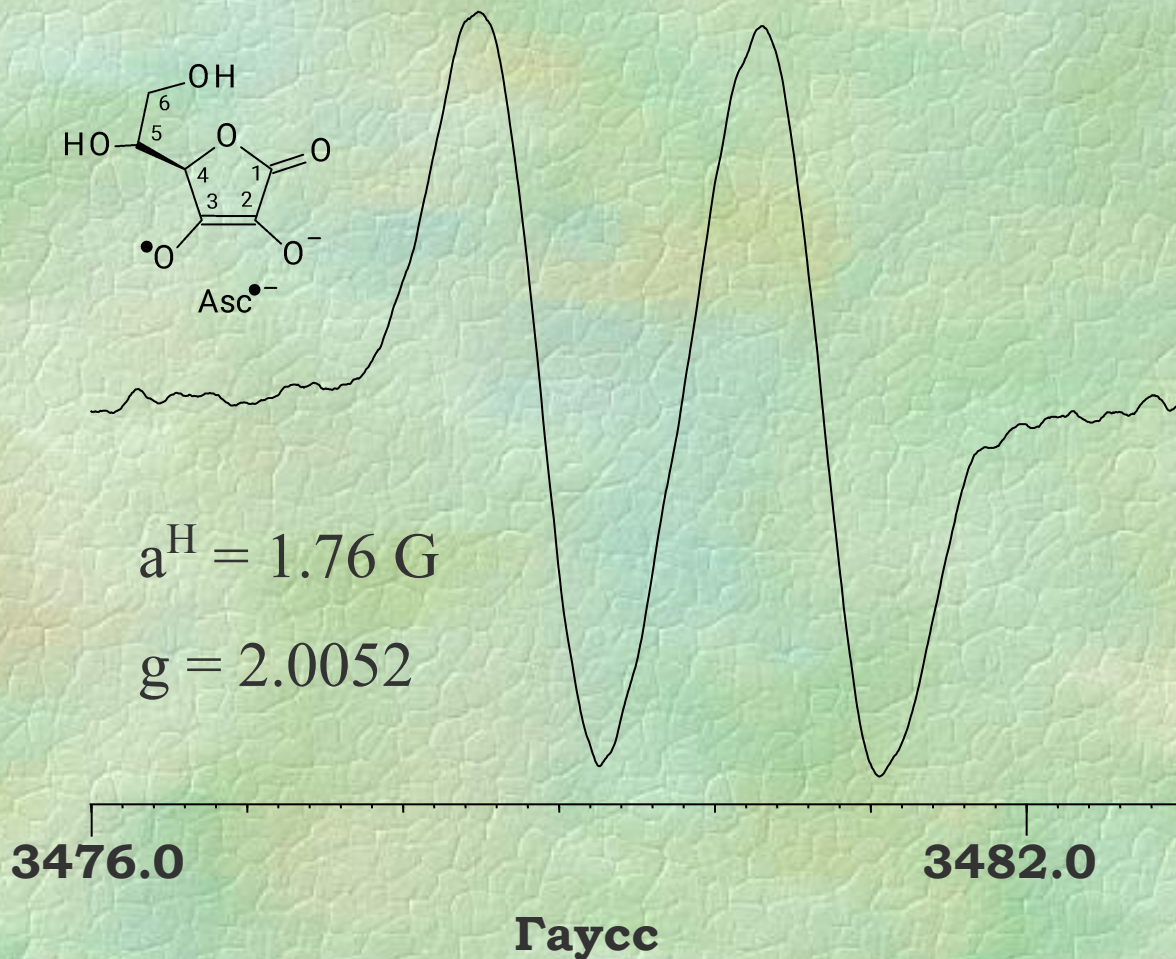
Продукты
 превращения
 аскорбата

AscH⁻ - это антиоксидант-восстановитель



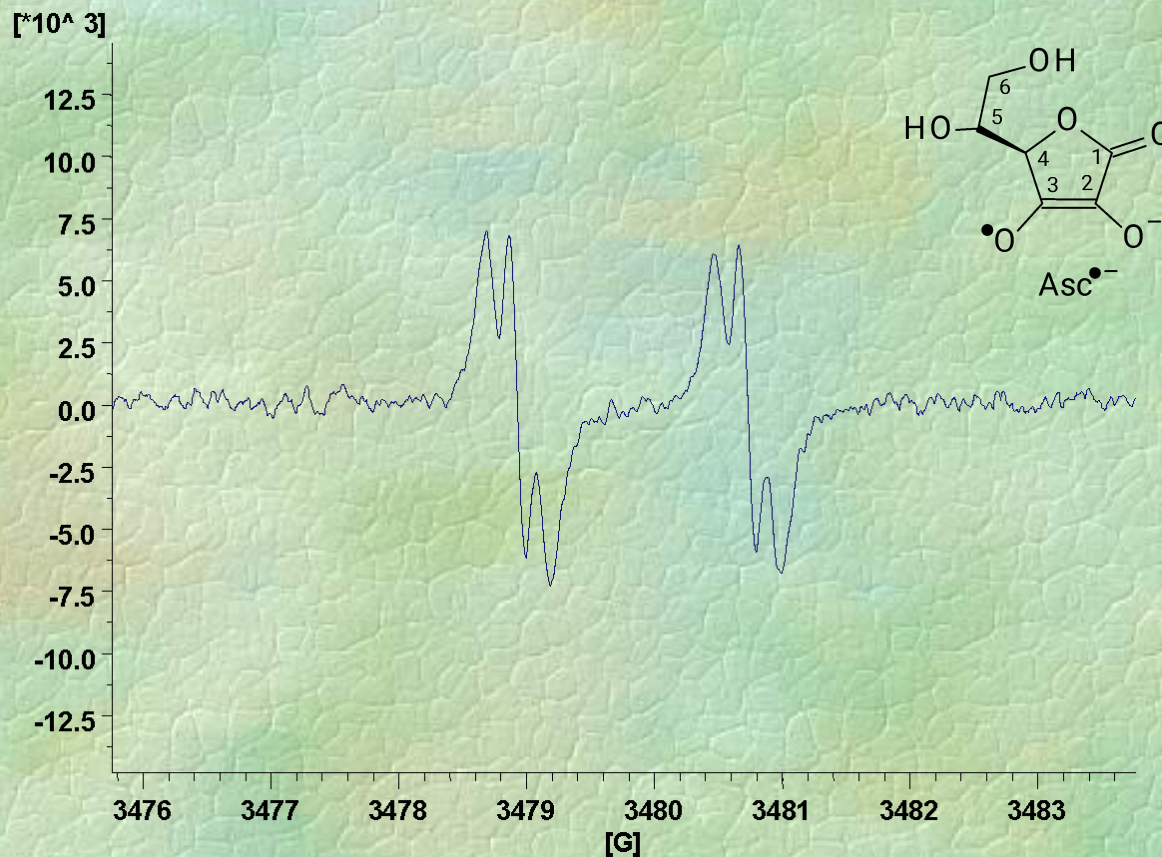
AscH⁻ при взаимодействии с радикалом отдает атом водорода (H[•] или H⁺ + e⁻) и дает трикарбонил аскорбатный радикал. AscH⁻ имеет pK_a -0.86; т.е. В клетке радикал присутствует в виде Asc^{•-}.

Сигнал ЭТР Asc



Радикал аскорбата представляет собой дублетную линию. Интенсивность сигнала ЭПР Asc^{•-} может быть использована для оценки величины окислительного стресса *in vitro* и *in vivo*.

Сигнал ЭПР Asc• – высокого разрешения

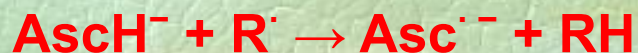


$$a^H_4(1) = 1.76 \text{ Гс}; a^H_5(1) = 0.07 \text{ Гс}; a^H_6(2) = 0.19 \text{ Гс}$$

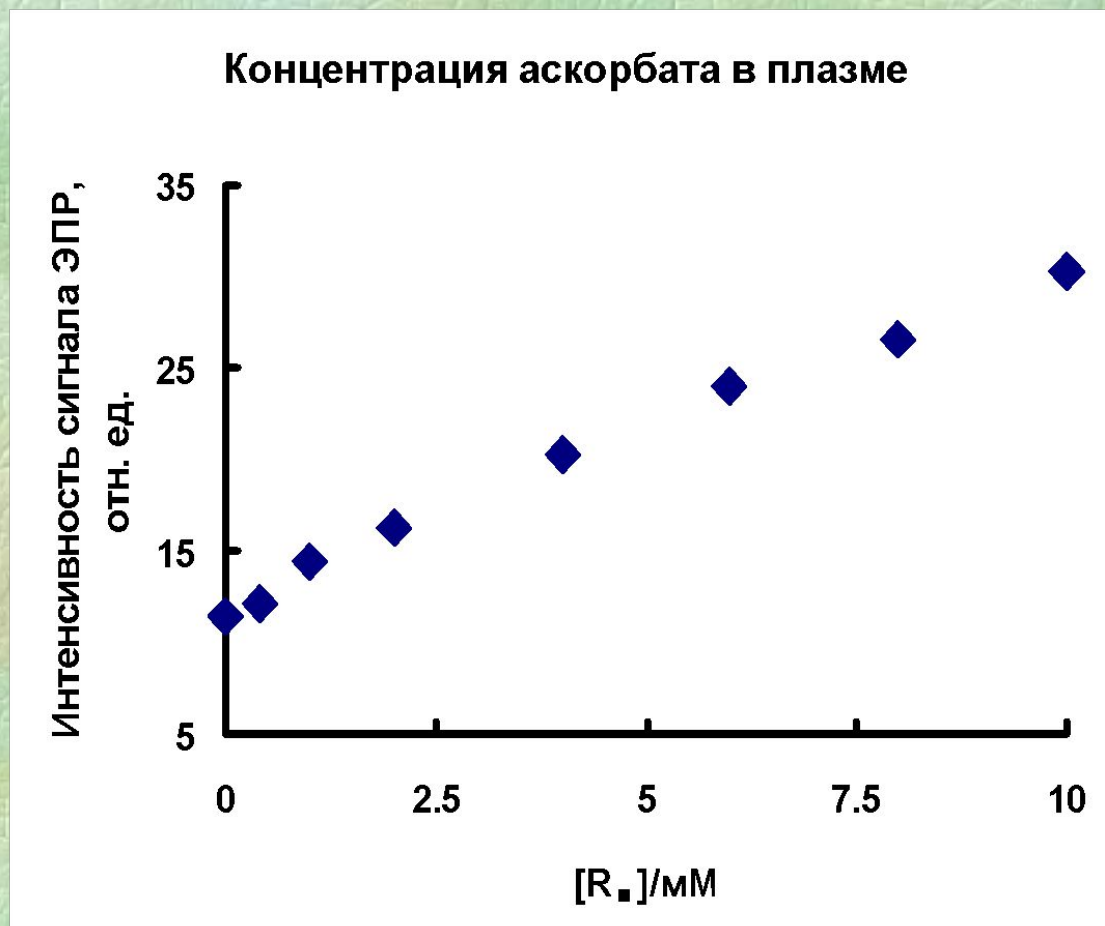
Константы скорости взаимодействия аскорбата с некоторыми радикалами

Радикал (R•)	$k_{\text{эфф}}/\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (pH=7,4)
HO• (гидроксильный радикал)	1.1×10^{10}
RO• (трет-бутил алкоксильный радикал)	1.6×10^9
ROO• (алкил перекисный радикал)	2×10^6
GS• (глутатиильный радикал)	6×10^8
UH• (радикал мочевой кислоты)	1×10^6
TO• (токофероксильный радикал)	2×10^5
Asc• (дисмутация)	2×10^5
Fe(III)EDTA/ Fe(II)EDTA	10^2
$\text{O}_2^{\cdot -}/\text{HO}_2^{\cdot}$	2.7×10^5
Fe(III)десферал/ Fe(II) десферал	Очень медленно

Приведенные константы скорости соответствуют реакции:

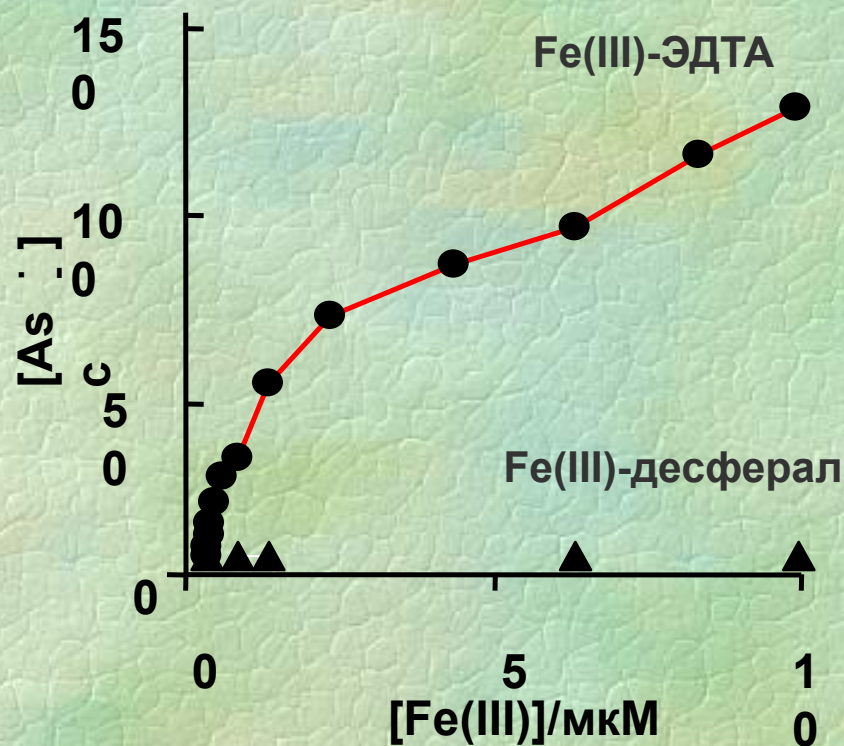


$Asc^{\cdot-}$ – маркер окислительного стресса



$[Asc^{\cdot-}]$ – пропорциональна степени окисления аскорбата

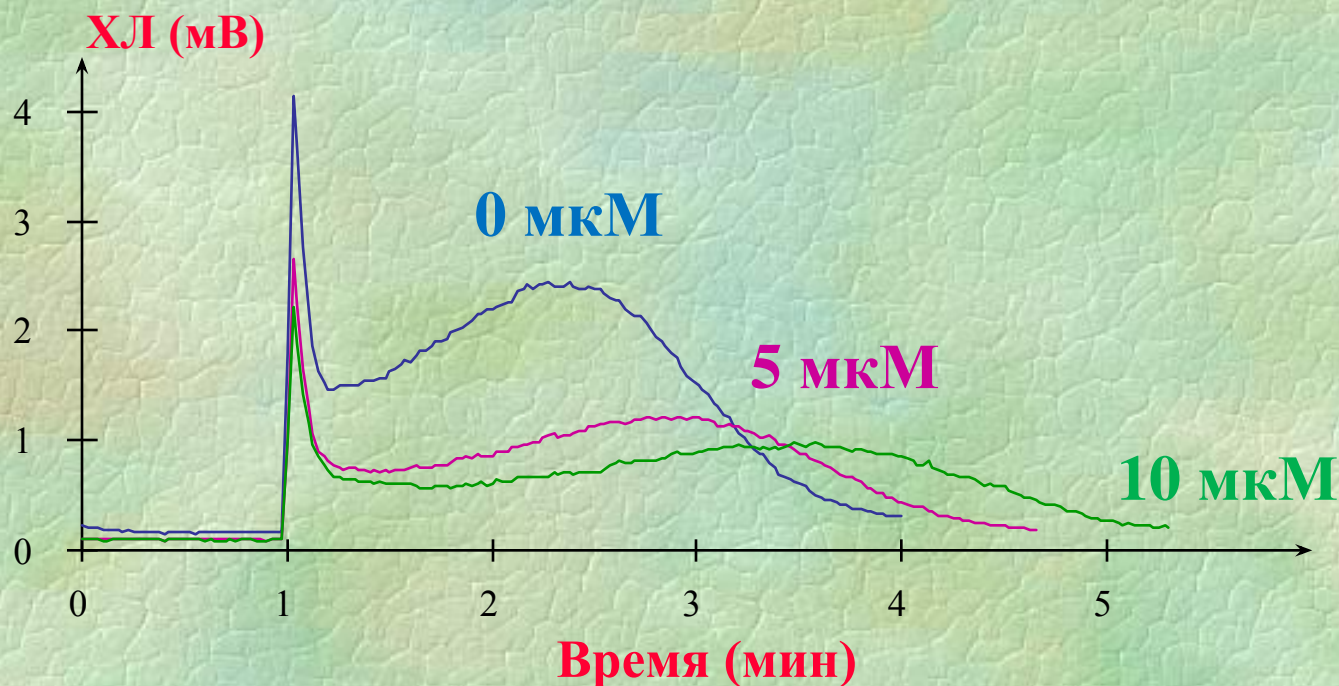
$Asc^{\cdot -}$ - индикатор присутствия ионов переходных металлов



В отсутствие ионов Fe^{3+} окисление аскорбата происходит очень медленно. Приведенный график показывает зависимость $[Asc^{\cdot -}]$ от различных концентраций $[Fe^{3+}]$ в присутствии двух хелаторов – ЭДТА и Десферала. Поскольку железо в комплексе с ЭДТА доступно для восстановителей, этот комплекс может легко окислять $AsCH^{\cdot -}$. Напротив, в комплексе с Десфералом железо не может взаимодействовать с восстановителями, поэтому комплекс Fe-Десферал не окисляет $AsCH^{\cdot -}$.

Аскорбиновая кислота

Здесь представлено **изменение кинетики хемилюминесценции**, сопровождающей **перекисное окисление** липосом в присутствии **аскорбиновой кислоты**.



Аскорбат увеличивает латентный период хемилюминесценции в результате **регенерации двухвалентного железа**, окисляющегося в ходе процесса липидной пероксидации.