

Биофизические основы патологии клетки

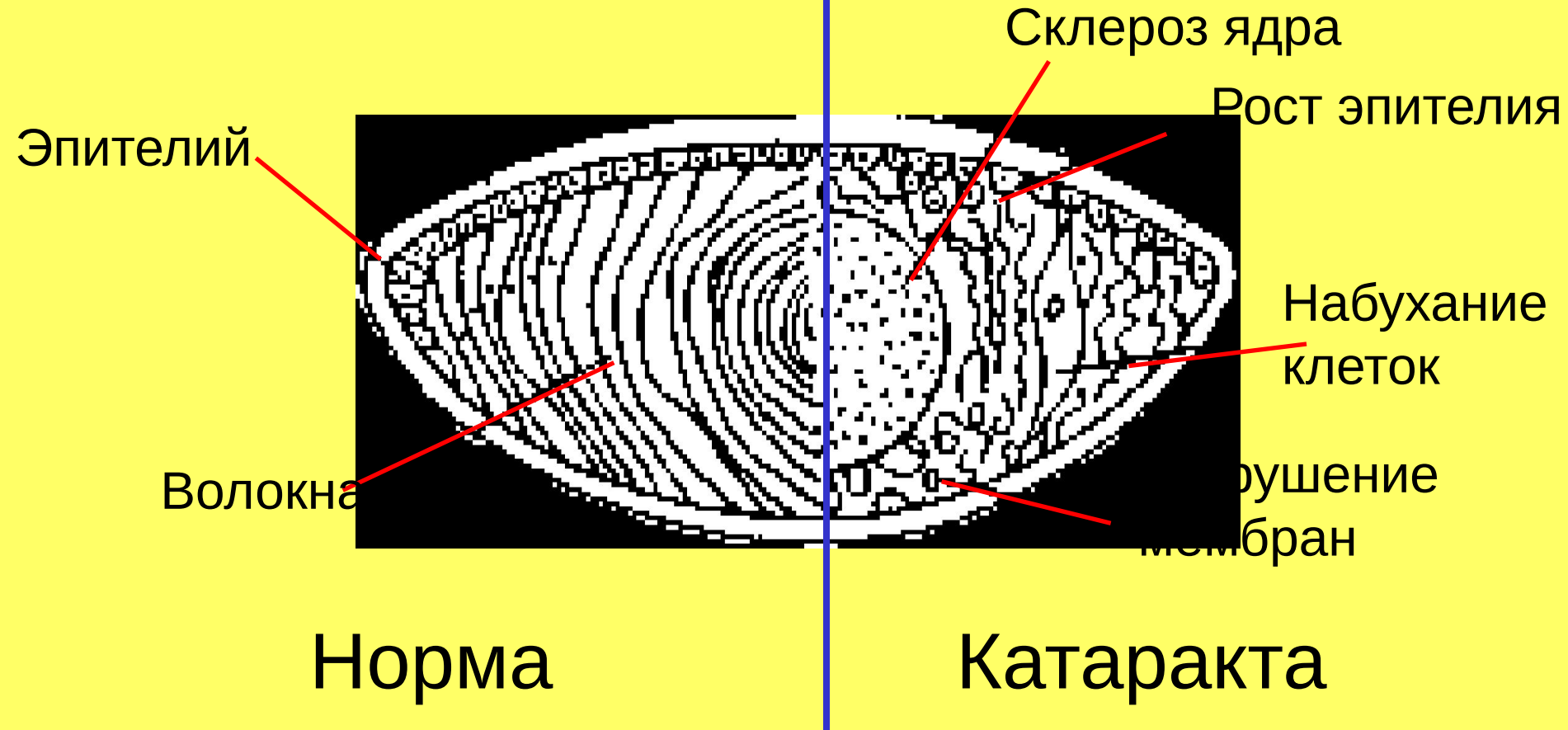
Свободные радикалы и болезни человека

Ю.А. Владимиров, А.Н. Осипов
2018

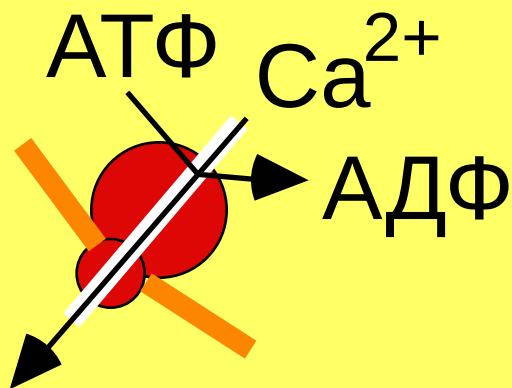
Морфологические изменения в хрусталике при катаракте

В нормальном хрусталике глаза клеточные мембраны не разрушены

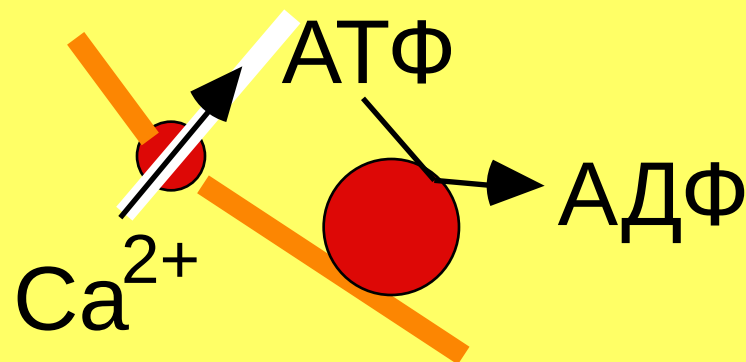
При катаракте мембраны разрушены вследствие перекисного окисления липидов



Повреждение Ca-АТФазы

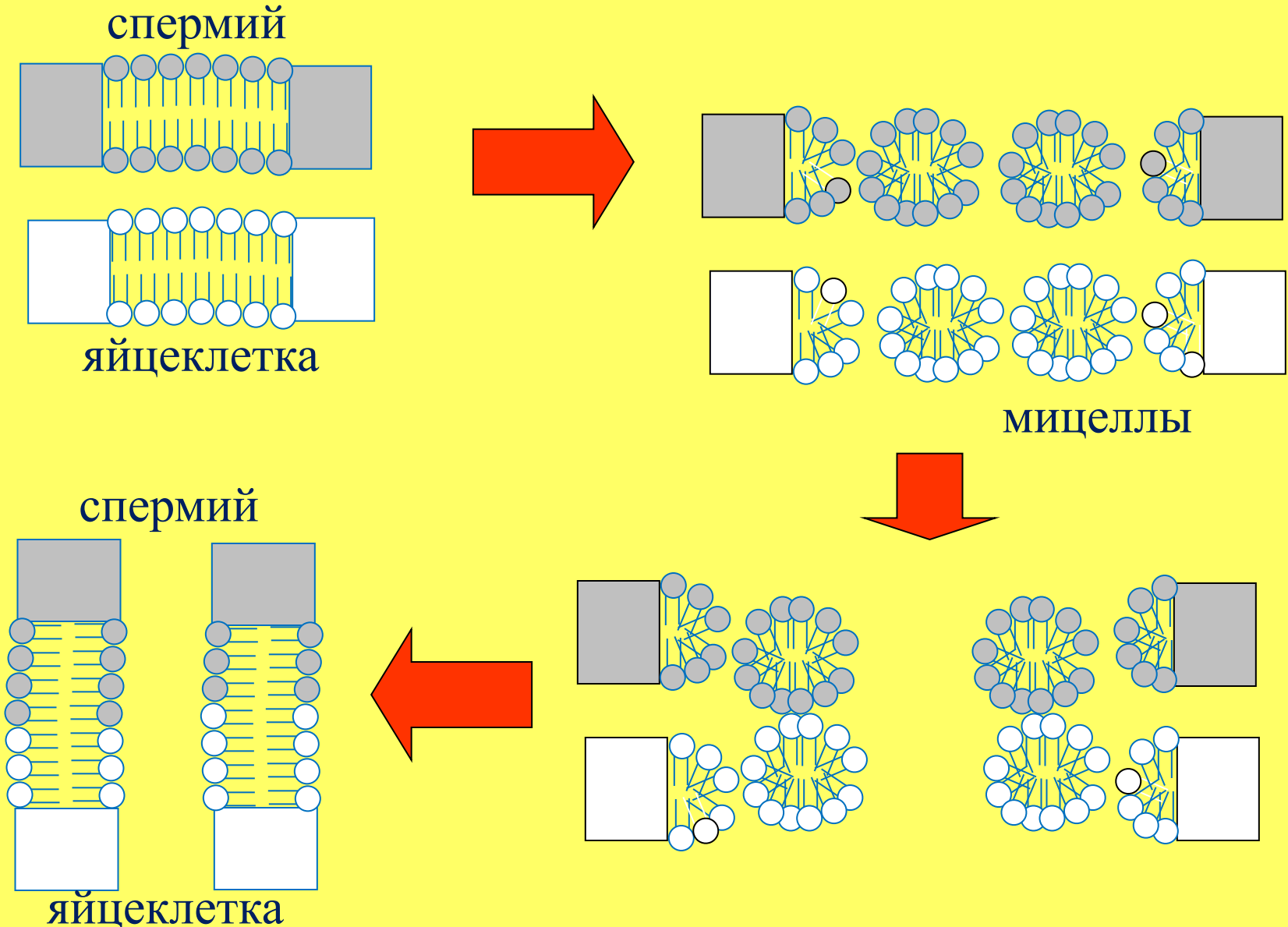


Нативная
Ca-АТФаза



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

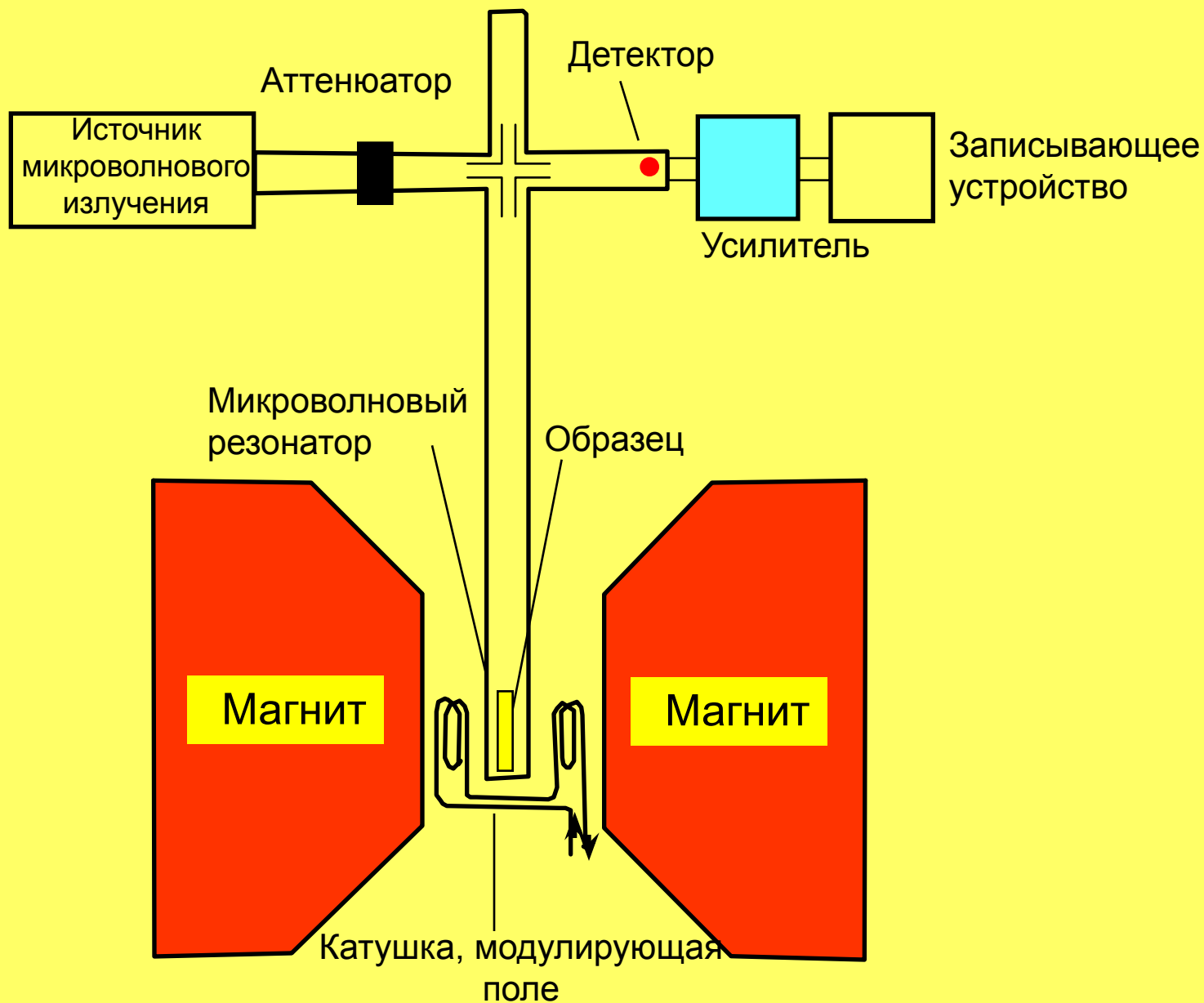
Биохимические методы

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

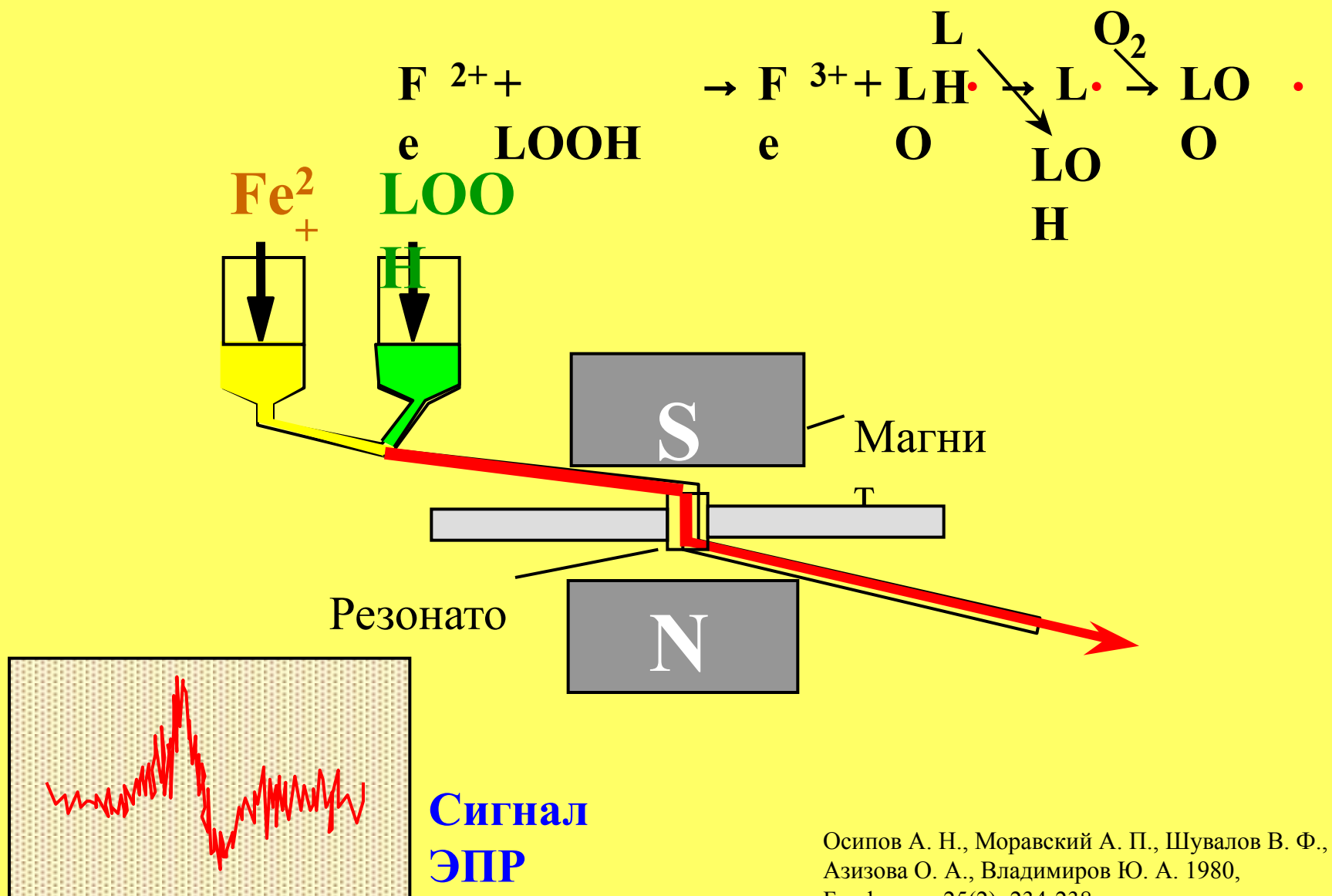
Метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР)

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

Радиоспектрометр ЭПР

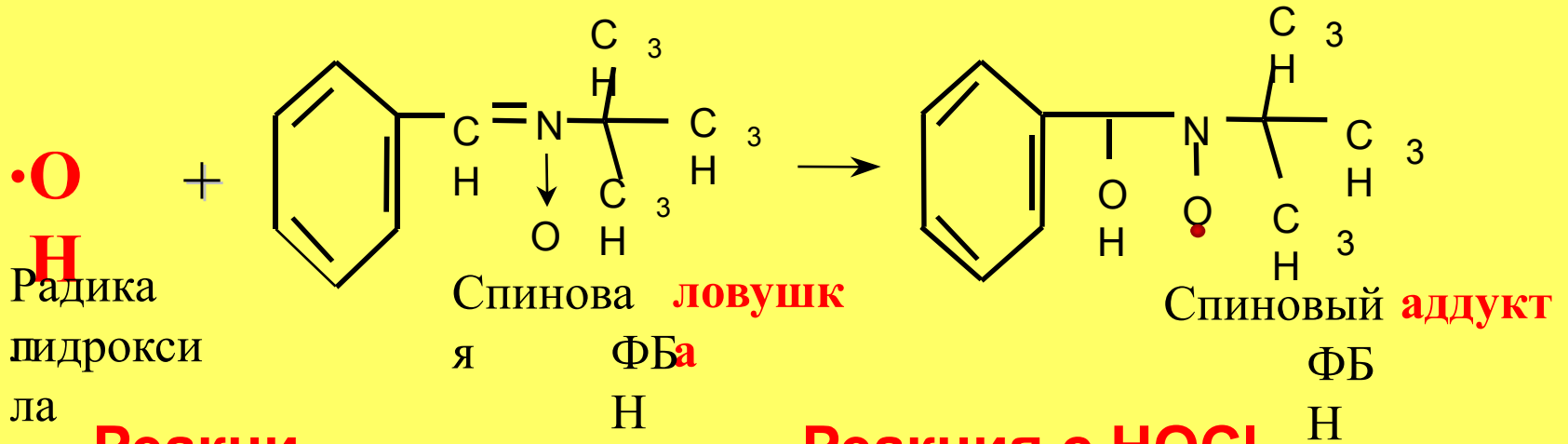


Прямое обнаружение радикалов липидов методом ЭПР в проточной кювете

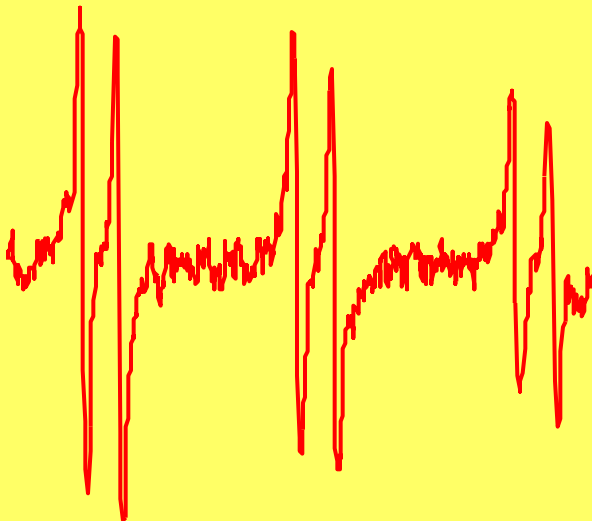
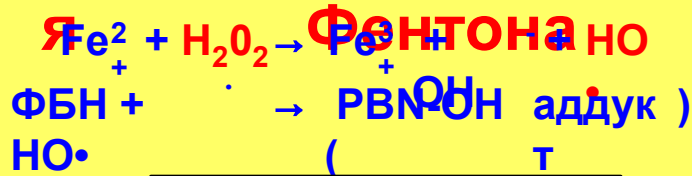


Осипов А. Н., Моравский А. П., Шувалов В. Ф.,
Азизова О. А., Владимиров Ю. А. 1980,
Биофизика 25(2): 234-238.

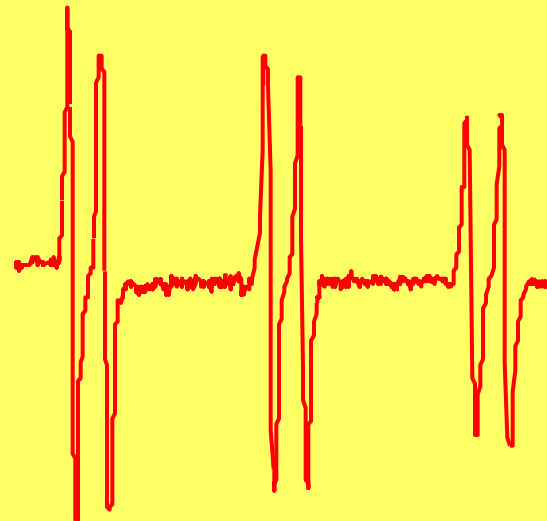
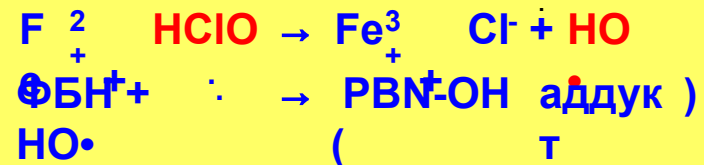
Две реакции образования радикалов гидроксила



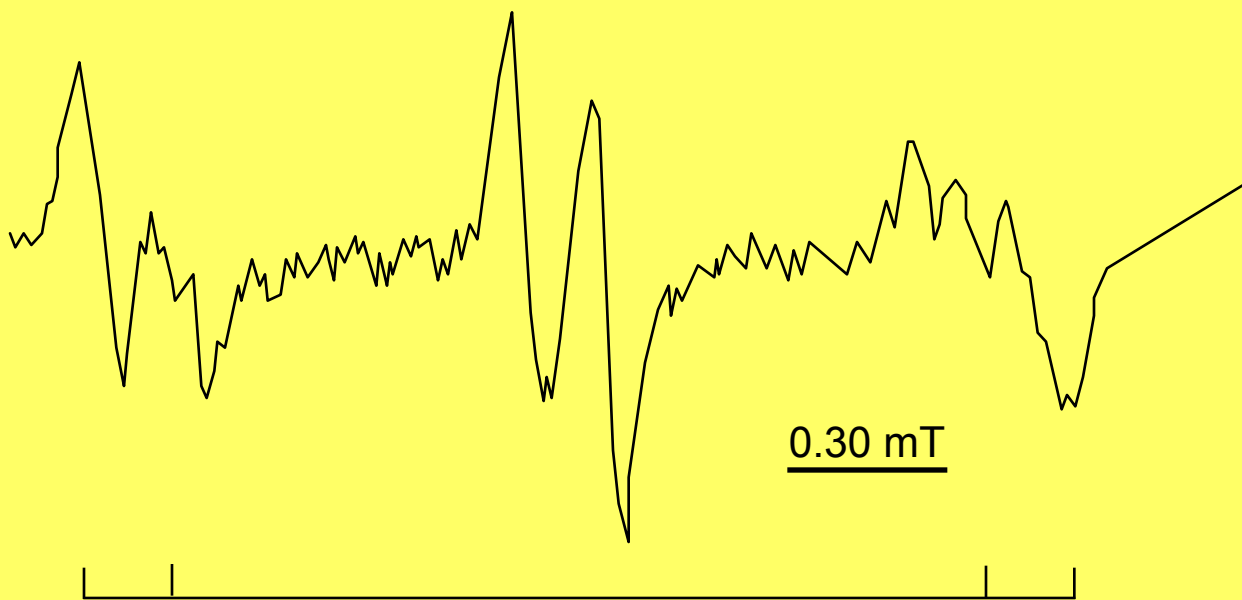
Реакции



Реакция с НОСІ

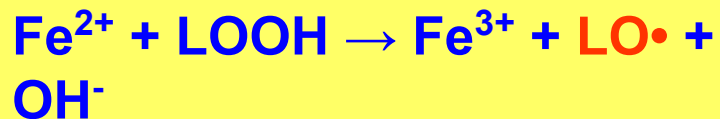


Сигнал ЭПР спиновых аддуктов радикалов олеиновой кислоты, образующихся в реакции ионов Fe^{2+} с гидроперекисью линоленовой кислоты



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

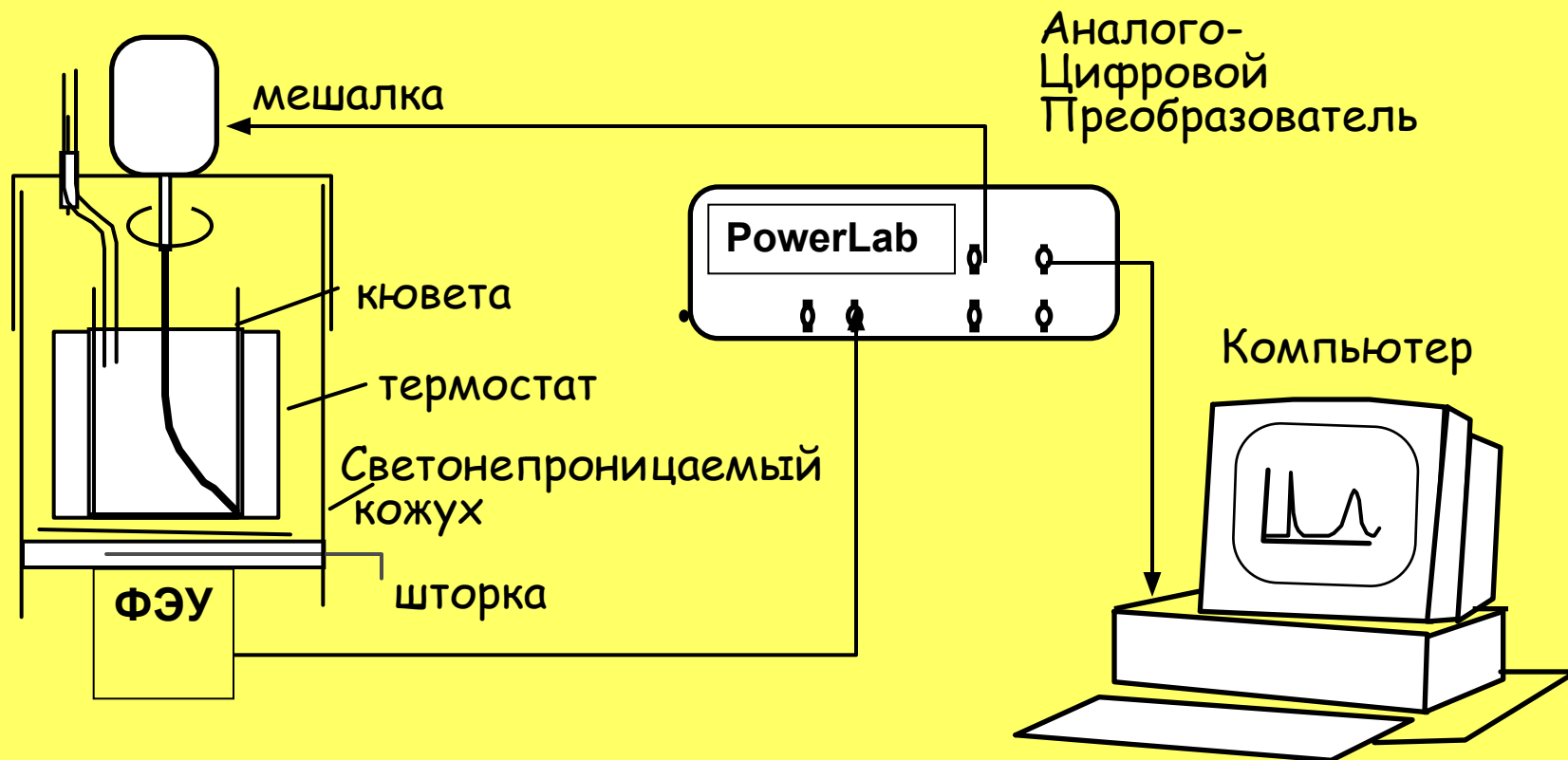
$$\alpha_{\text{N}} = 1,56 \text{ mT} \quad \alpha_{\text{H}} = 0,34 \text{ mT} \quad \Delta H = 0,06 \text{ mT}$$



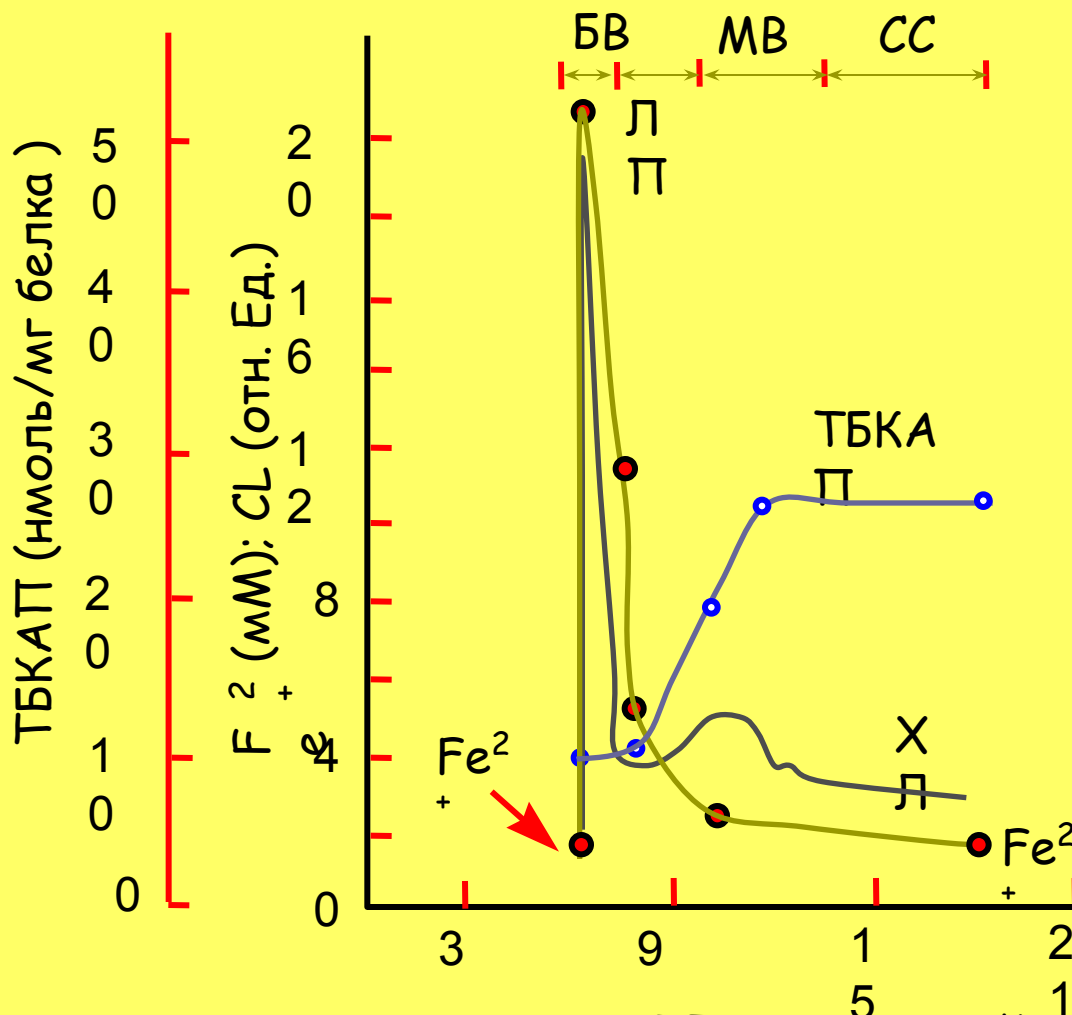
Метод хемилюминесценции

- Собственная
- Активированная

Современная установка для измерения ХЛ

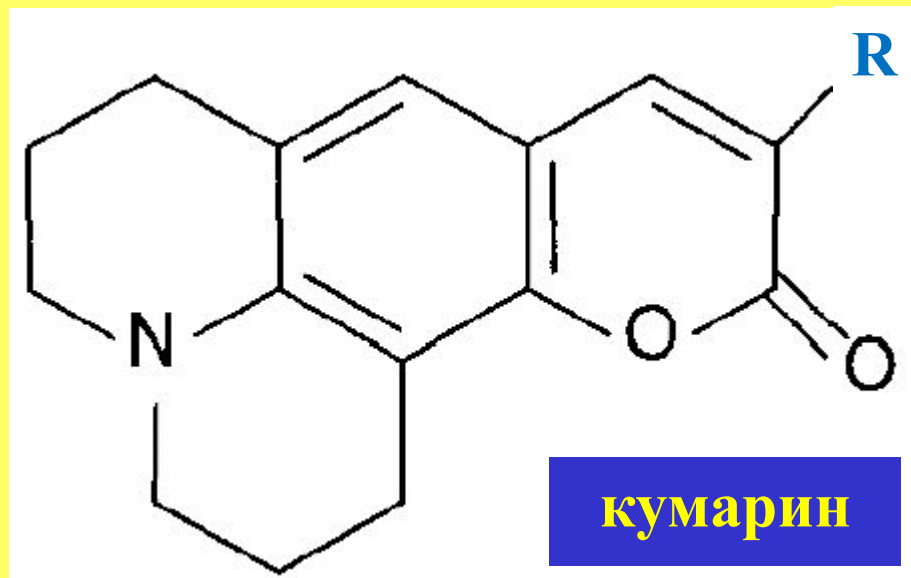


Кинетика перекисного окисления липидов

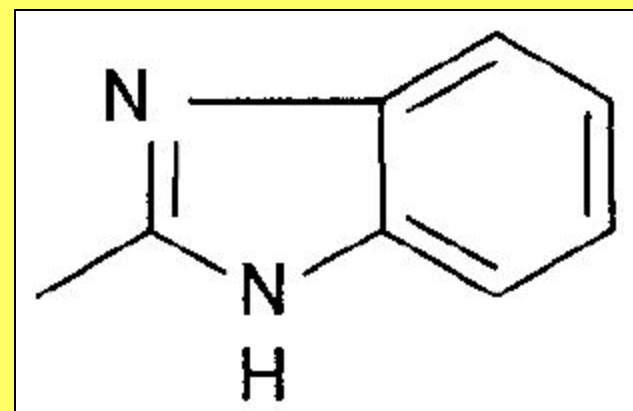


БВ - быстрая вспышка; ЛП - латентный период;
 МВ - медленная вспышка; СС - стационарное свечение

Структура производных кумаринов

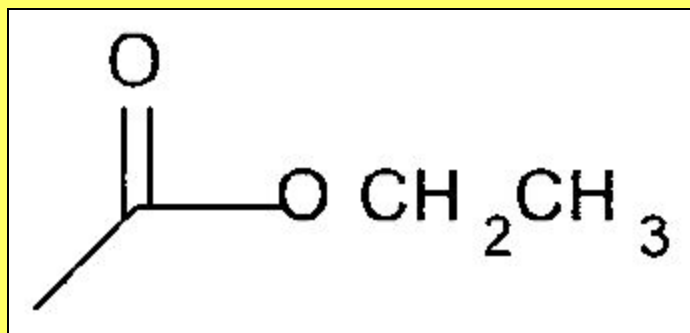


R =



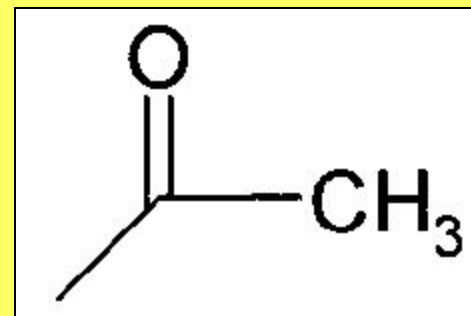
C-525

R =



C-314

R =



C-334

Биохимические методы изучения свободных радикалов

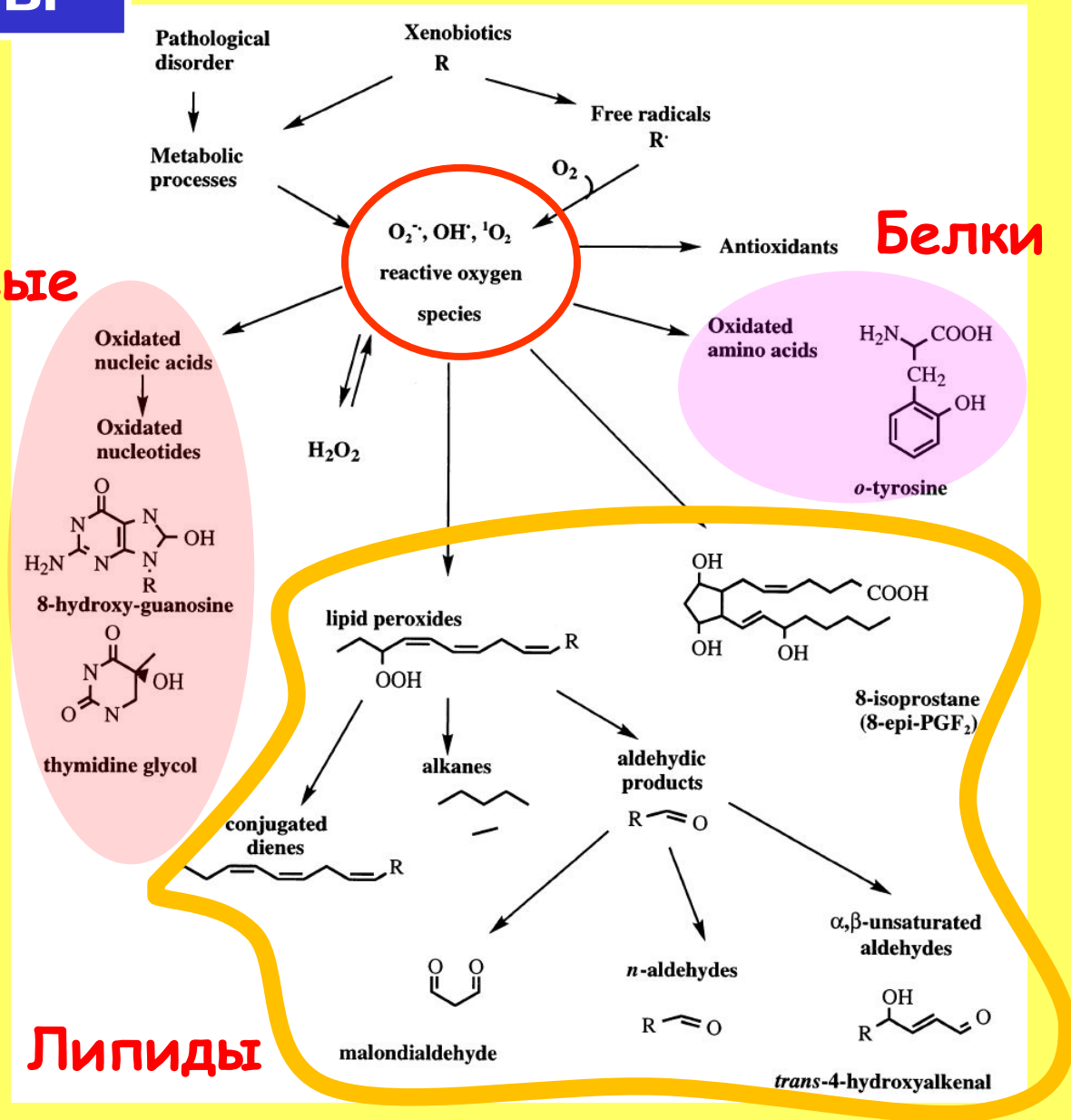
- Биомаркеры
- Диеновая конъюгация
- ТБК активные продукты
- Ингибиторный анализ

Биомаркеры

Биомаркеры

Нуклеиновые
кислоты

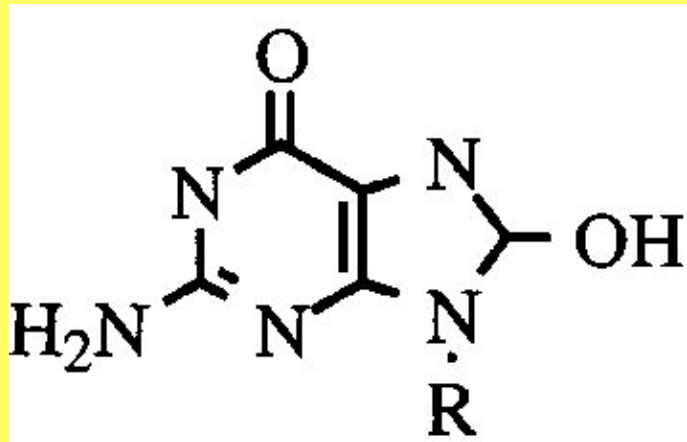
Белки



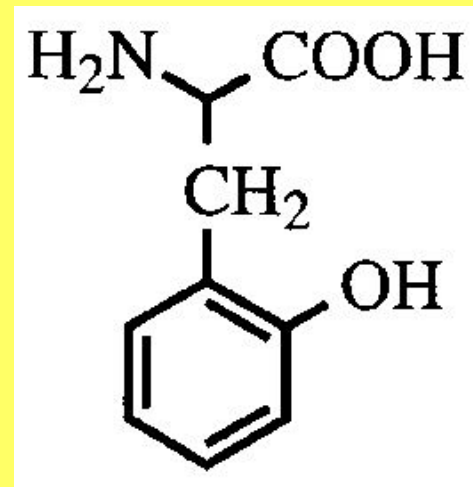
Липиды

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

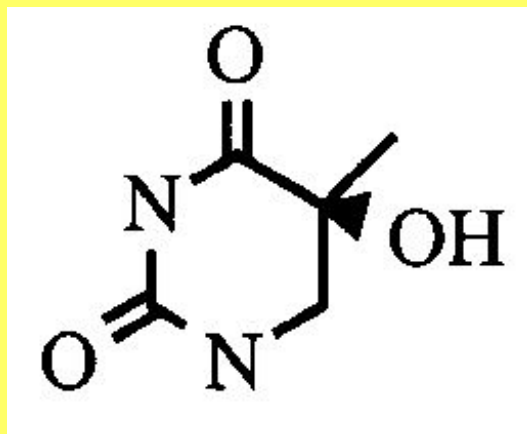
Маркеры оксидативного повреждения **нуклеиновых кислот** (слева) и **белков** (справа)



8-гидроксигуанозин



o-тирозин



ТИМИДИНГЛИКОЛЬ

Биомаркеры на окисление арахидоновой кислоты

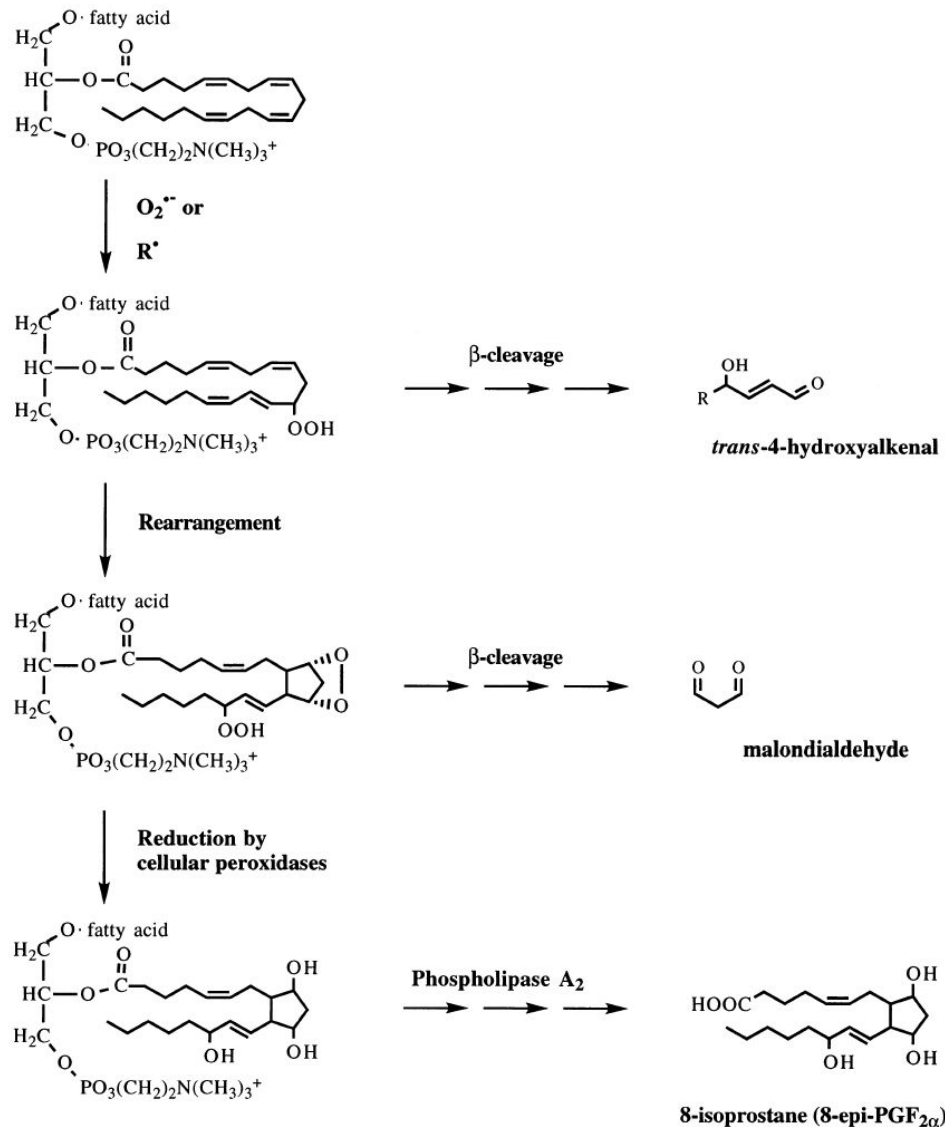


Fig. 2. The formation of 8-isoprostane. Radical-catalyzed (R^{\cdot} or $O_2^{\cdot -}$) peroxidation of esterified arachidonic acid and subsequent release of 8-isoprostane.

Структура некоторых изопростанов

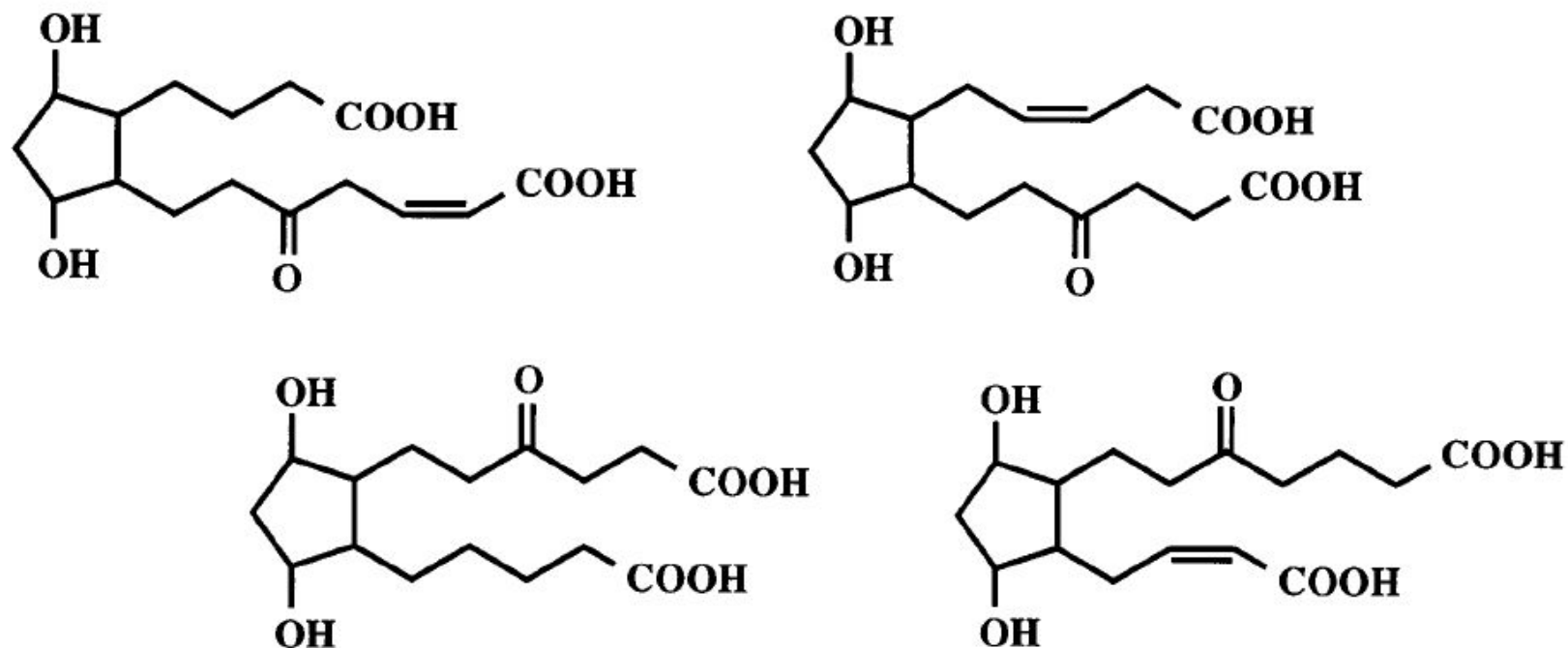
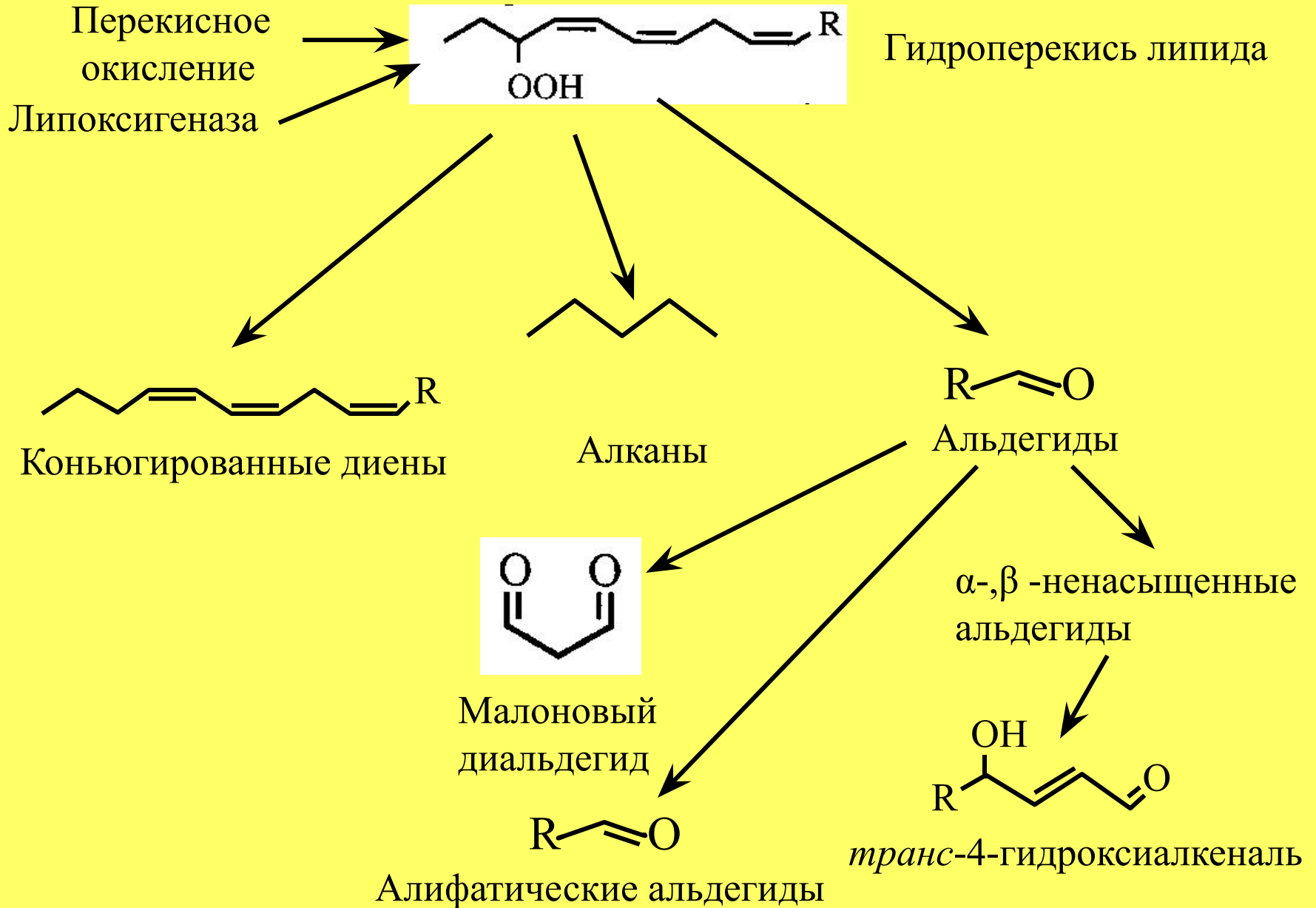
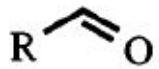


Fig. 4. Structures of metabolites of F₂-isoprostane regioisomers [79].

Маркеры липидной перекисидации



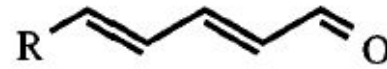
Биомаркеры - карбонилы



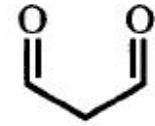
n-alkanals



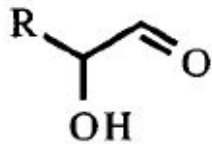
2-alkenals



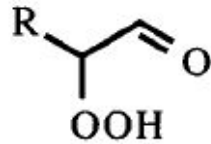
2,4-alkadienals



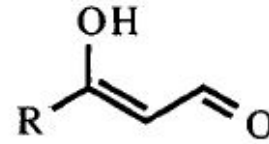
MDA



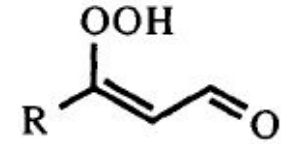
α -hydroxyalkanals



hydroperoxyalkanals



4-hydroxyalkenals



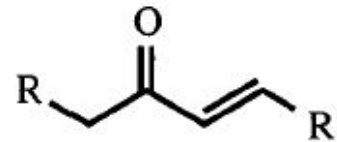
4-hydroperoxyalkenals



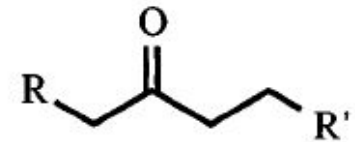
alkanes



alkenes



unsaturated ketones



saturated ketones

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

Образование изопростановых биомаркеров при отравлении четыреххлористым углеродом

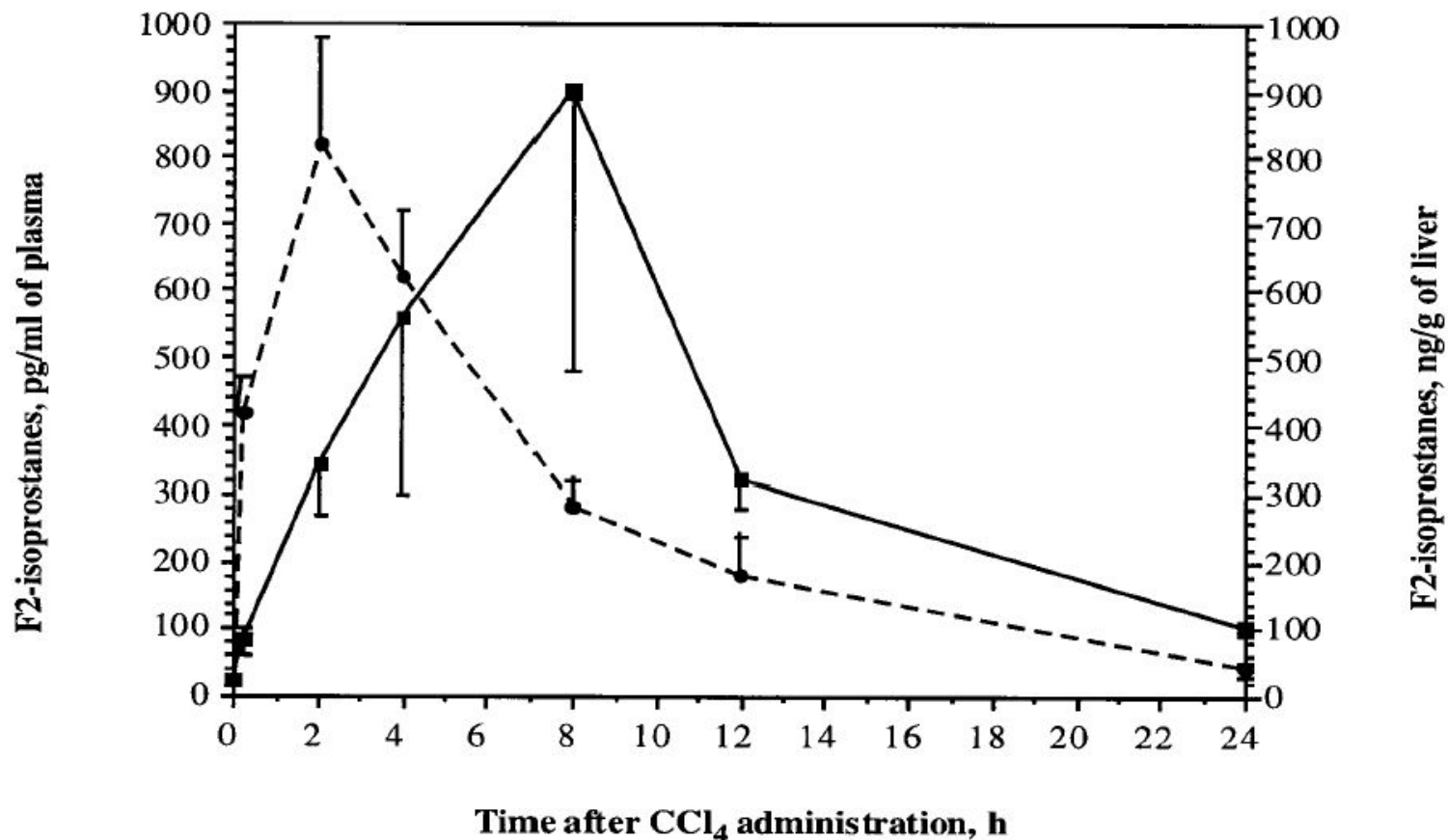


Fig. 3. Time course of appearance of lipid-associated F₂-isoprostanes in liver (●) and free F₂-isoprostanes in the circulation (■) of rats after intragastric administration of CCl₄ (1 ml/kg). Each time point represents the mean ± SD of levels of measured in at least four animals (replot of data from ref. 77).

Биомаркеры у курильщиков

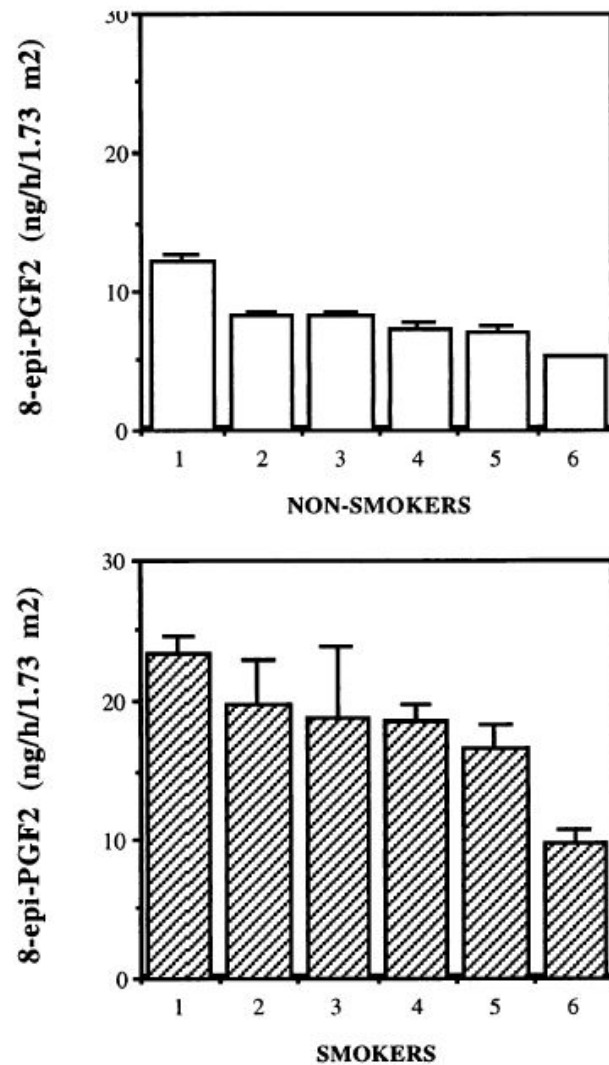


Fig. 5. Urinary excretion of 8-epi-PGF_{2α} in non-smoking and smoking healthy volunteers. Each bar represents the mean individual value (\pm SD) based on 6 h urine collections on different days ($n = 3$) (data replotted from Bachi et al. [92]).

Диеновая конъюгация

Реакции диеновой конъюгации

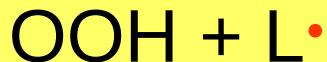
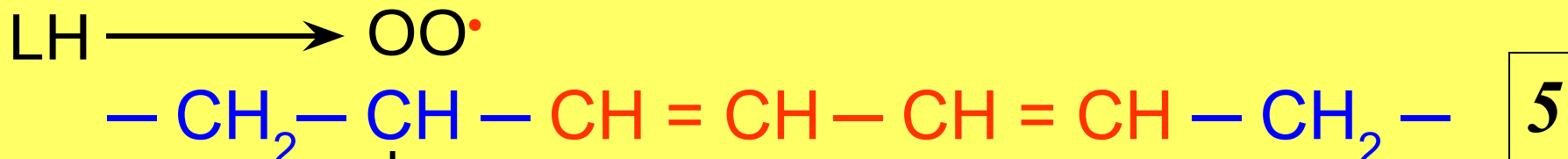
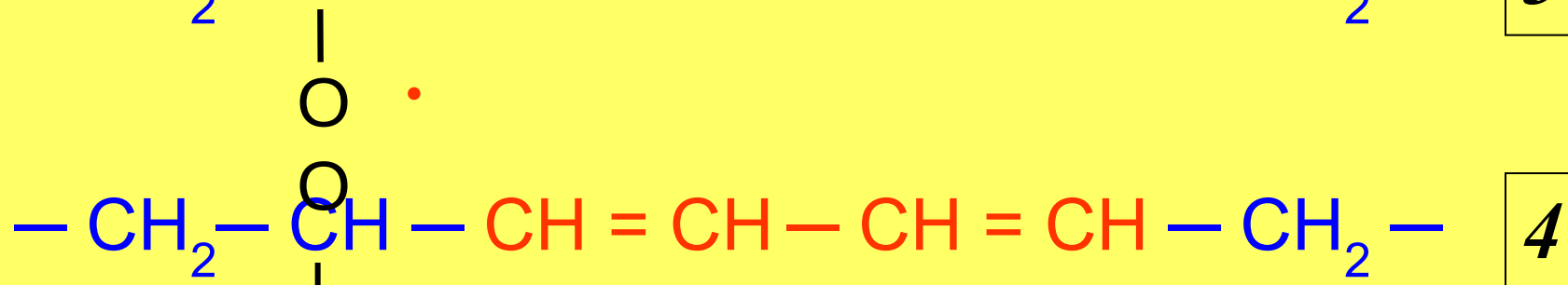
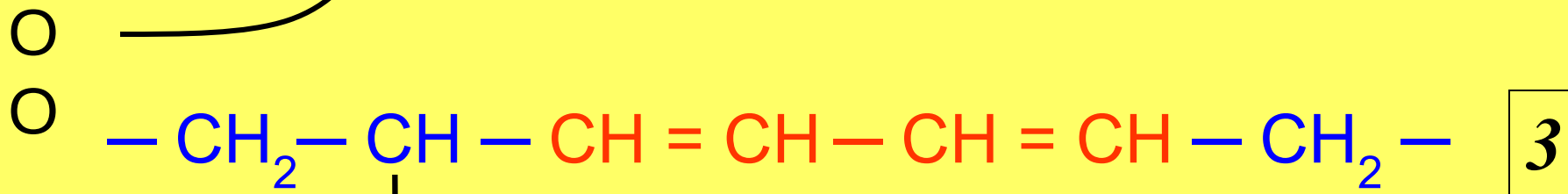
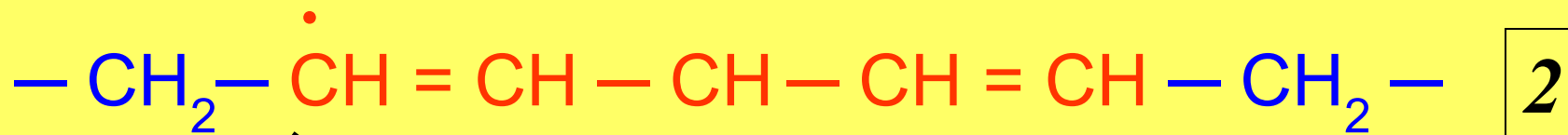
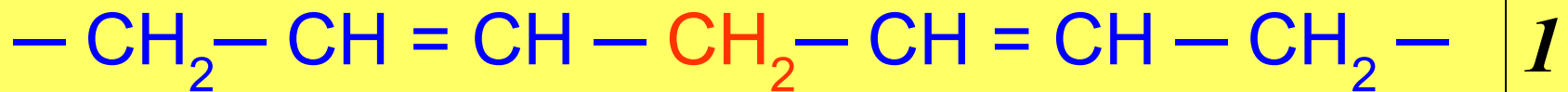
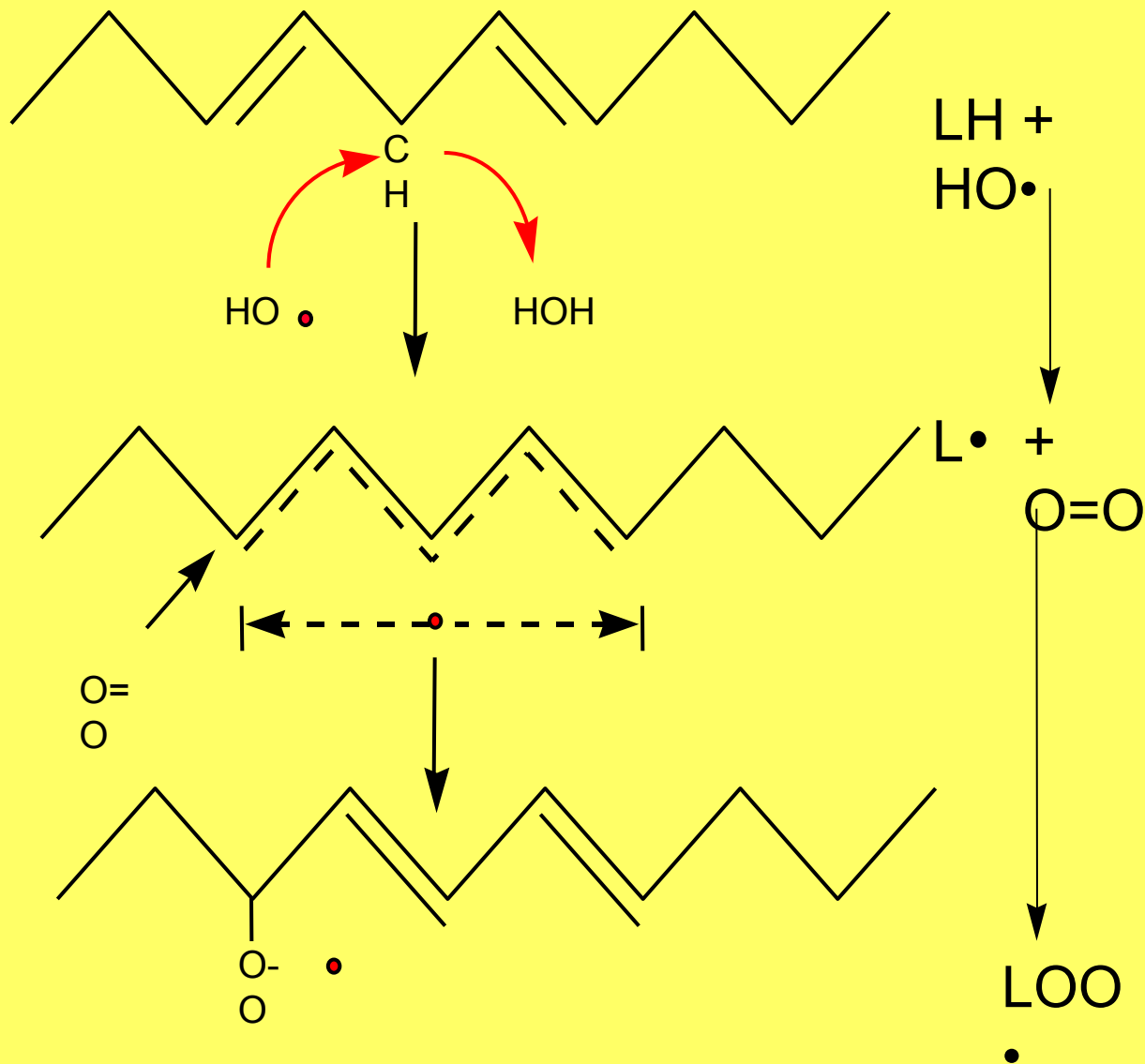
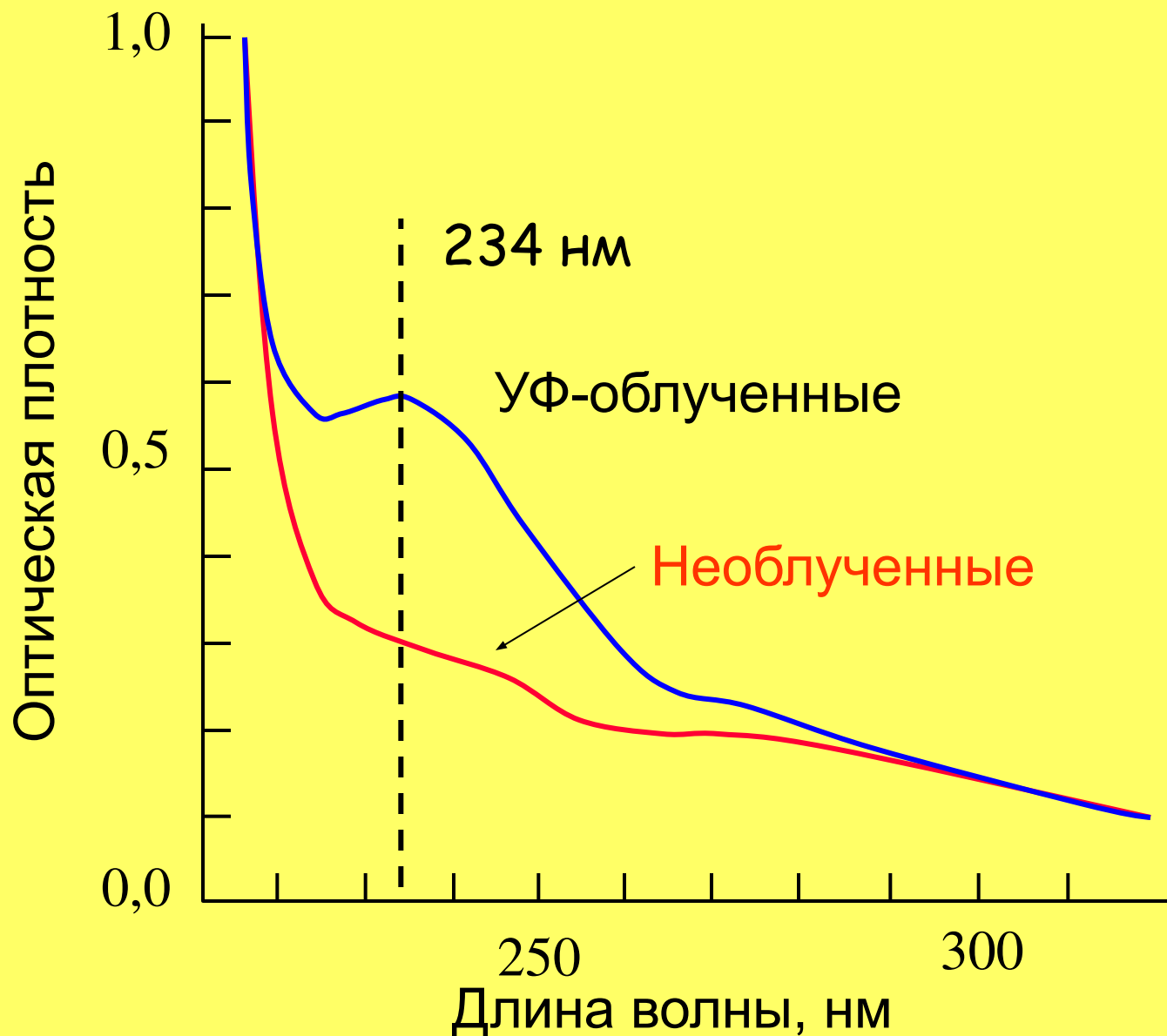


Схема образования диеновых конъюгатов



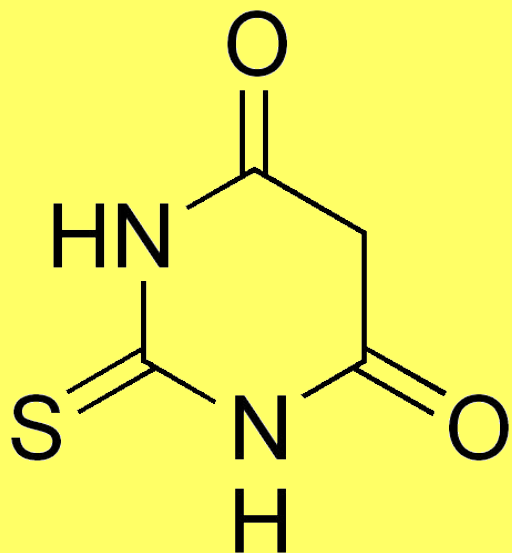
Спектр поглощения диеновых конъюгатов



Метод с тиобарбитуровой кислотой

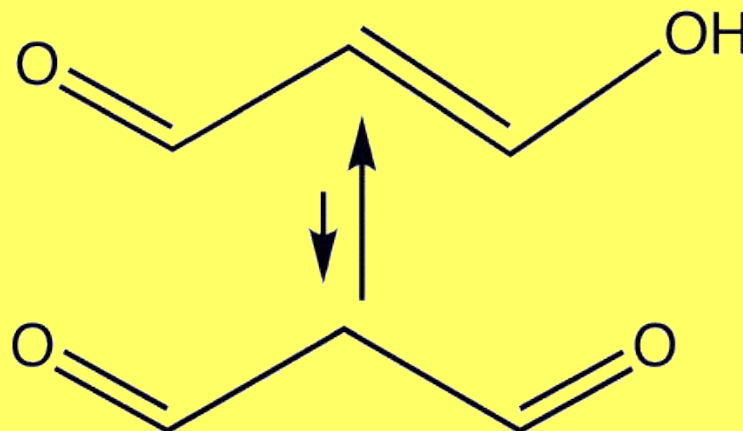
Метод ТБК активных продуктов

(TBARS, ThioBarbituric Acid Reactive Substance)



Тиобарбитуровая кислота

+



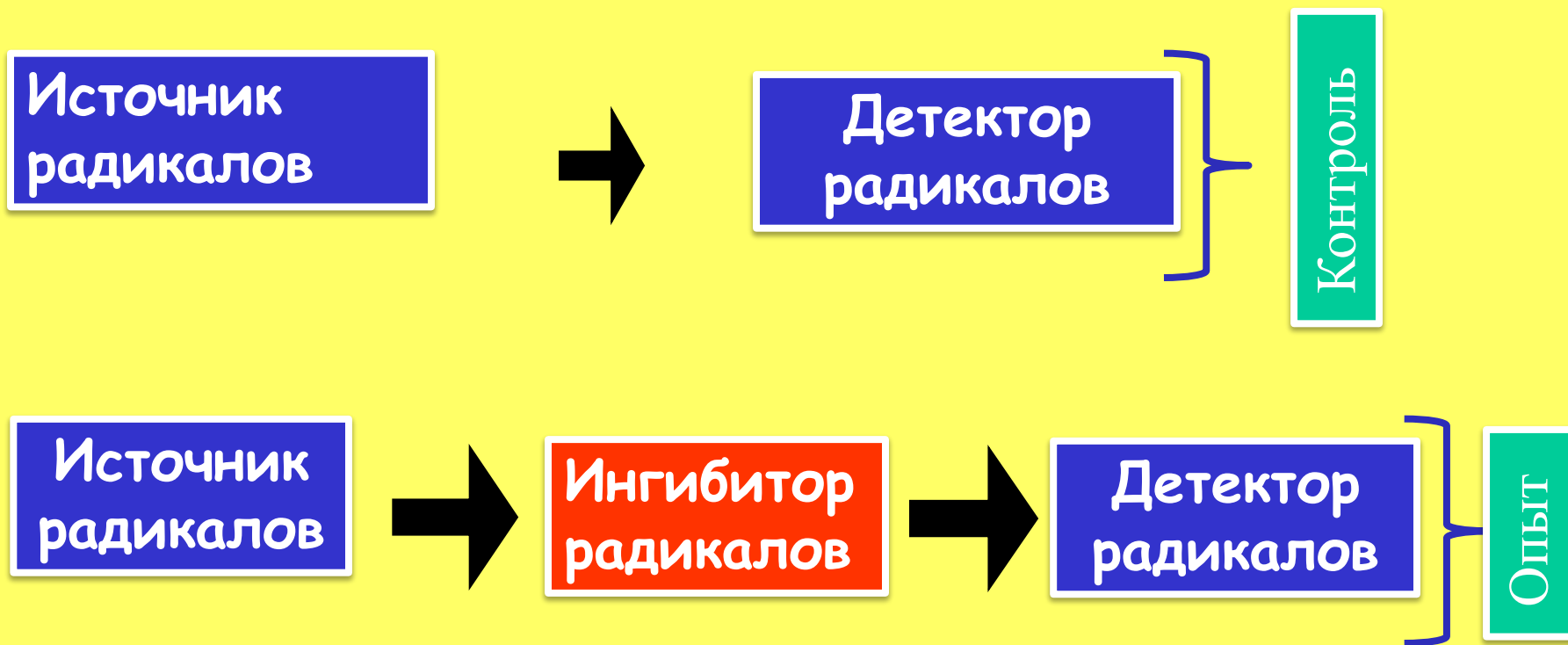
Малоновый диальдегид



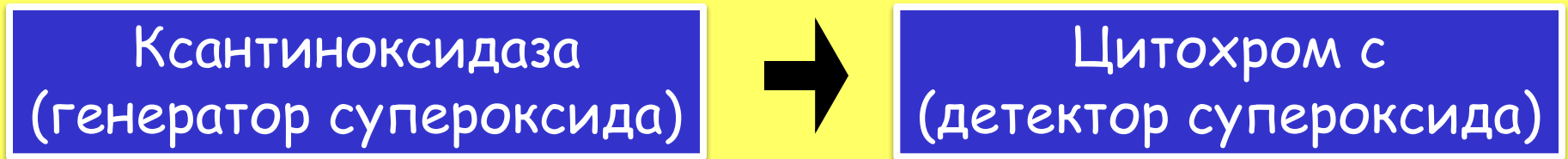
Окрашенный флуоресцирующий продукт,
имеющий поглощение при 532 нм

Ингибиторный анализ

Ингибиторный анализ



Пример 1: обнаружение супероксидных радикалов



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.