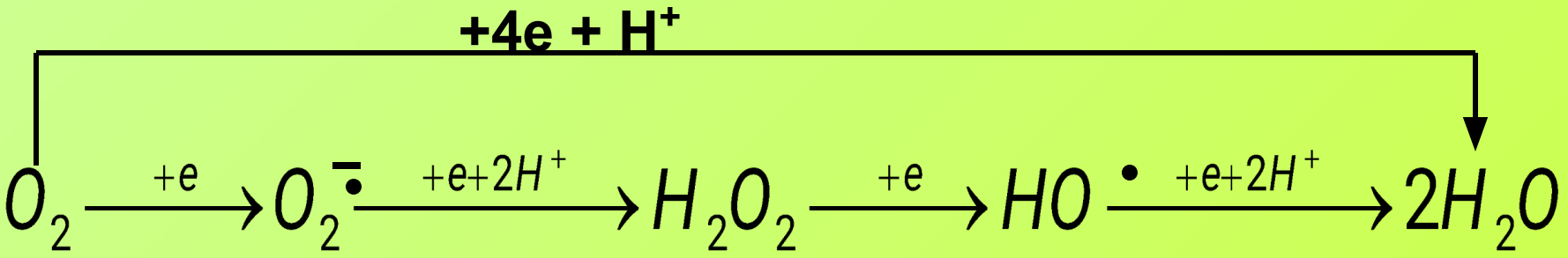
Физиологические эффекты активных форм кислорода.

Основные механизмы образования АФК.



$$НАДФН + 2O_2 \rightarrow НАД^+ + 2O_2^{\bullet -}$$

$$2O_2^{\bullet -} + 2H^+ \xrightarrow{СОД} H_2O_2$$

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

Реакция Фентона

$$H_2O_2 + Cl^- \xrightarrow{\text{МИЕЛОПЕРОК СИДАЗА}} H_2O + ClO^-$$

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

$$^{\bullet}N = O + O_2^{\bullet -} + H^+ \rightarrow O = N - O - OH$$

$$O = N - O - OH \rightarrow O = N - O^{\bullet} + {}^{\bullet}OH$$

NAD(P)H-оксидазы - главные физиологические продуценты АФК в клетках сосудов.

NAD(P)H-оксидаза - 4 субъединицы:

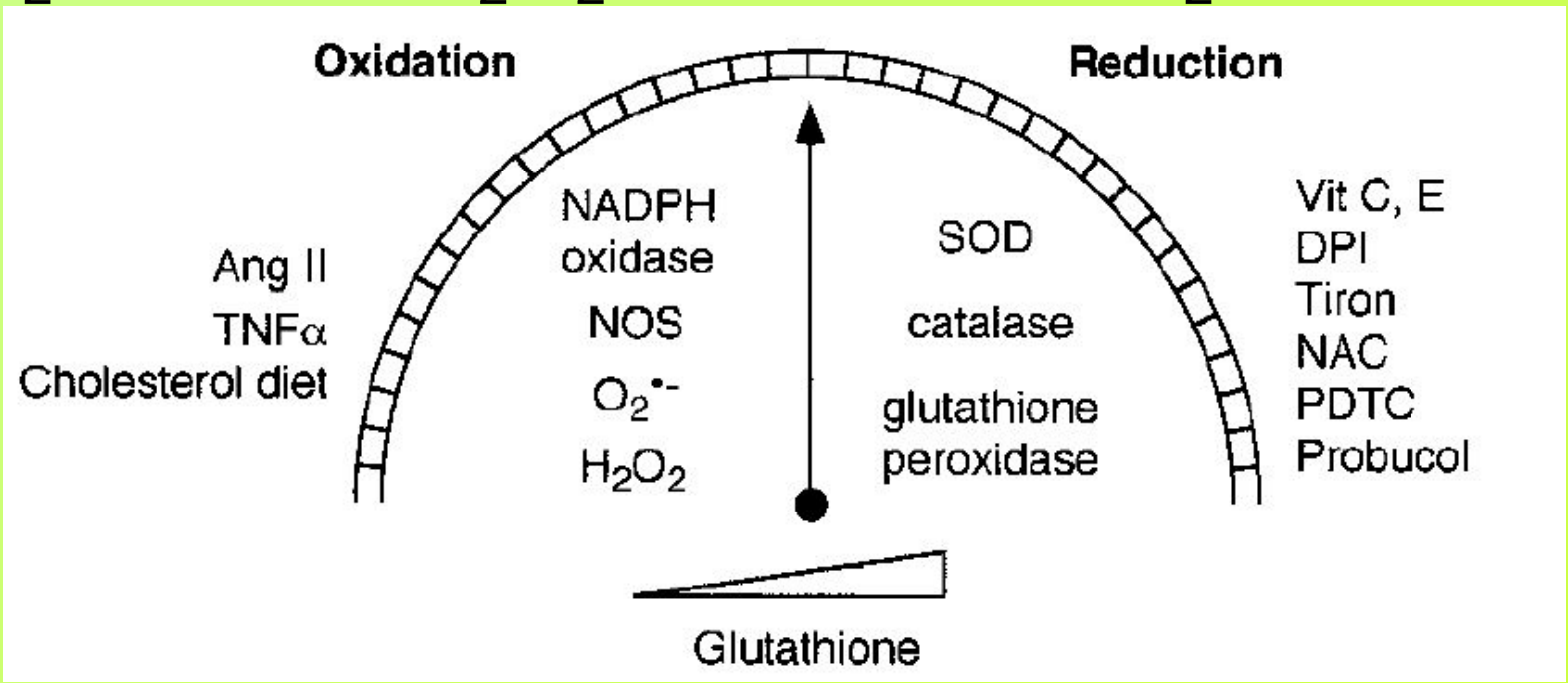
- цитохром b558: gp91phox и p22phox
- 2 цитозольных компонента:
  p47phox и p67phox.

G-белок rac-семейства участвует в сборке активного комплекса.

Точно неизвестно, какие субъединицы функционально активны для производства АФК в разных типах клеток.

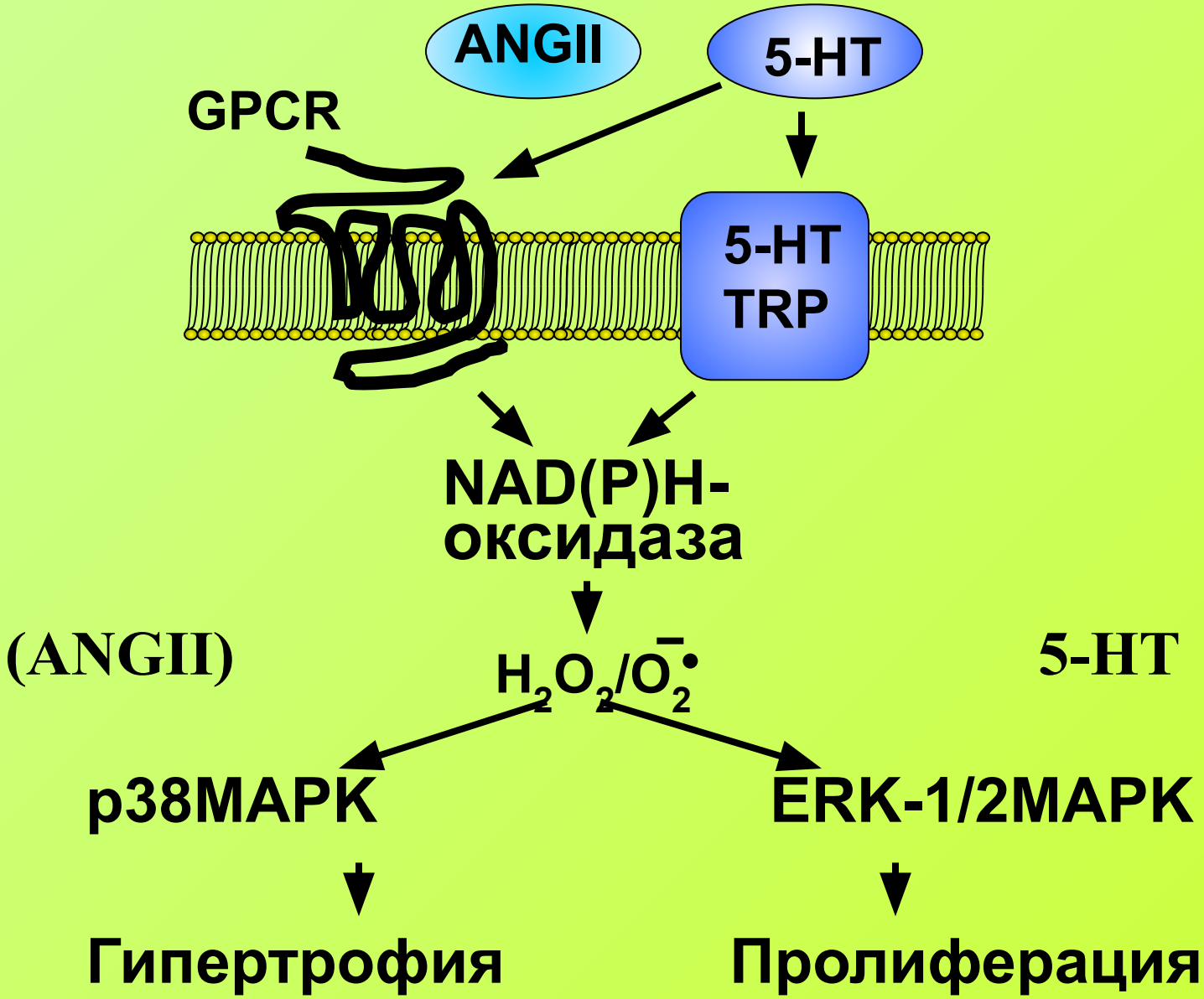
Уровень АФК строго контролируется:

$$O_2^{\bullet-} \xrightarrow{\text{СОД}} H_2O_2 \xrightarrow{\text{КАТАЛАЗА}} H_2O$$

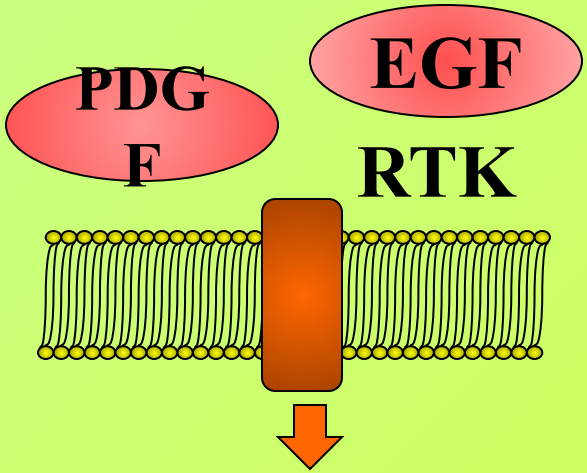


АФК - внутриклет. «реостат», модулирующий активность биохимических реакций.

АФК как сигнальные молекулы в ГМК



NIH3T3-клетки (immortalized fibroblasts)



$p21^{Ras}$

Rac

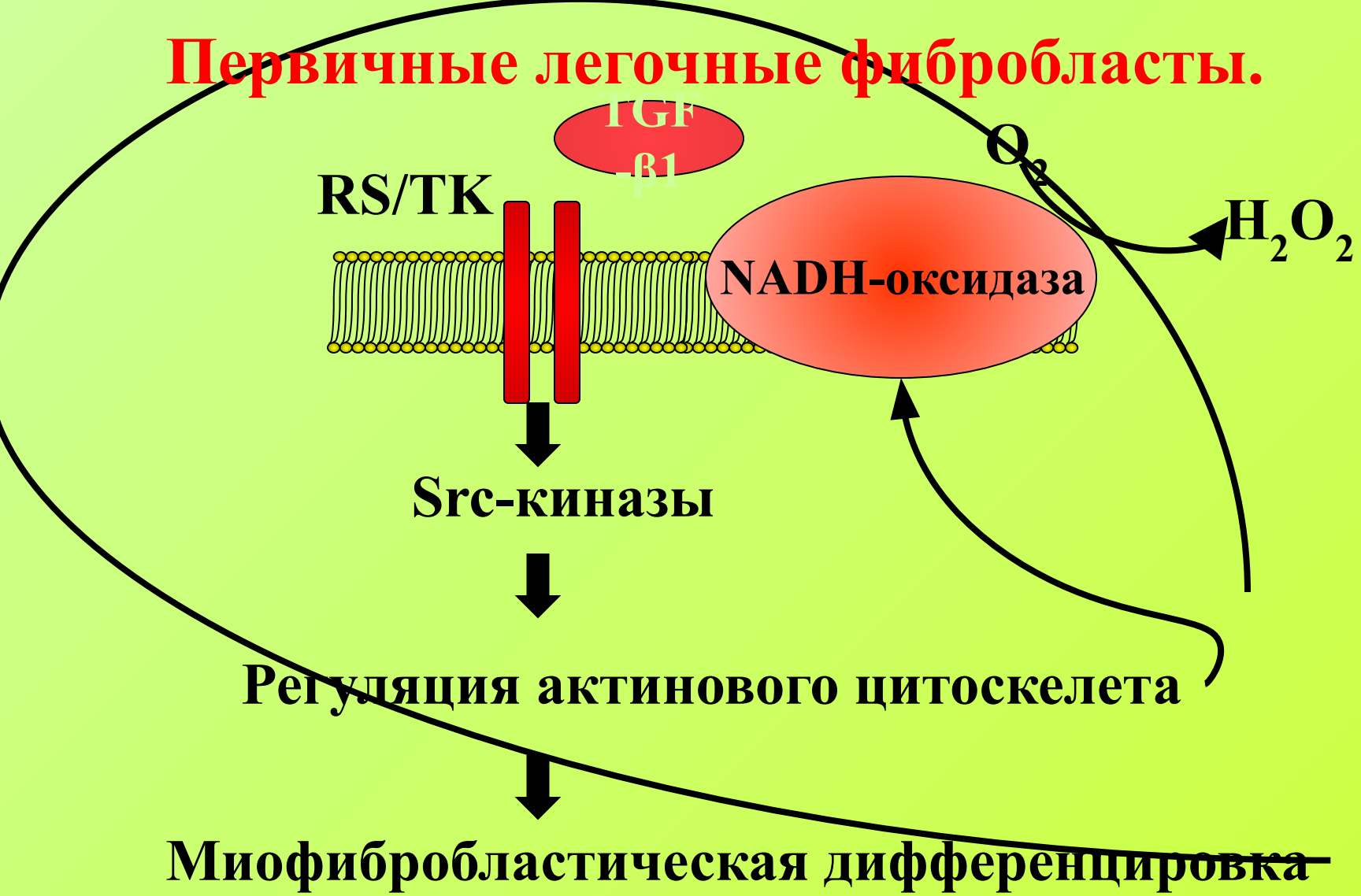
активация мембран-связанного оксидазного комплекса (?гомолога gp91phox)

$H_2O_2/O_2^{\bullet-}$

Ингибирование белковой тирозин-фосфатазы

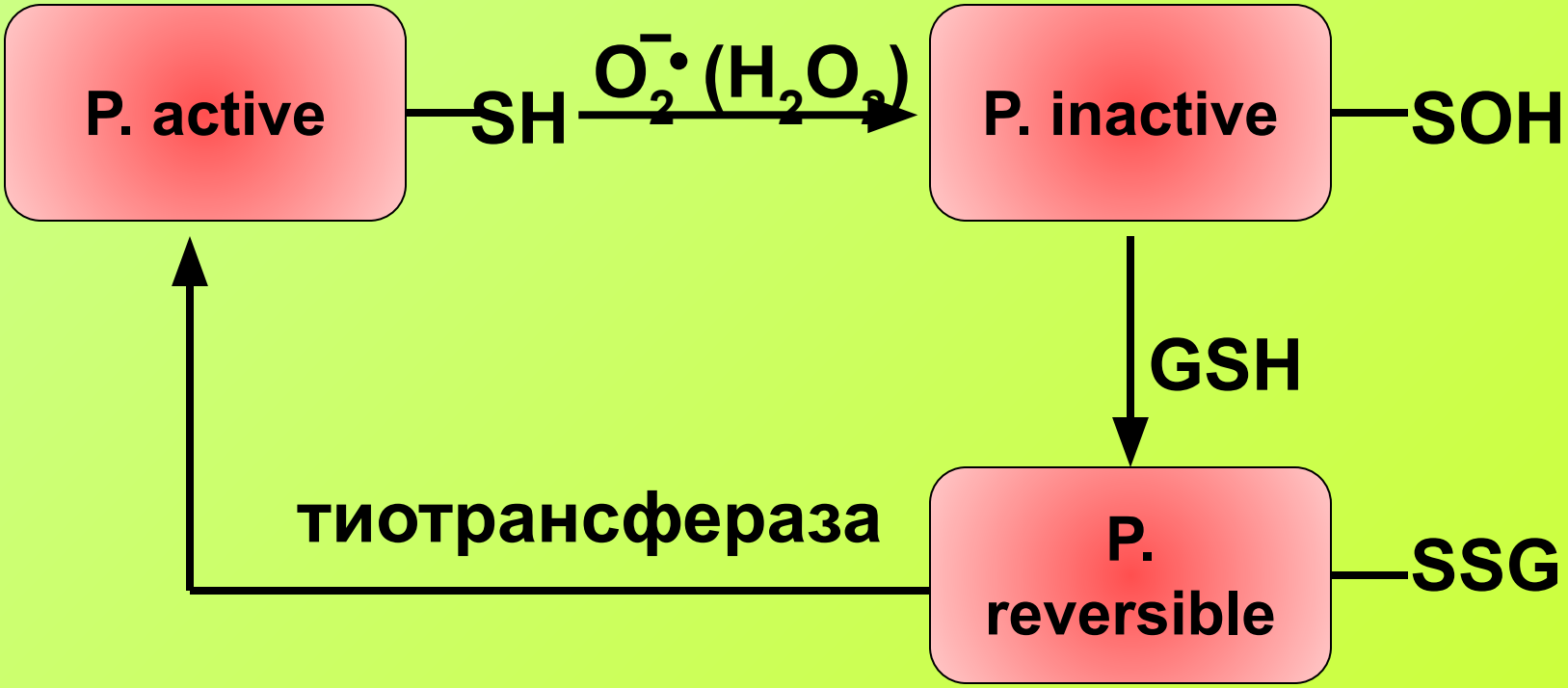
Пролиферация

Первичные легочные фибробласты.

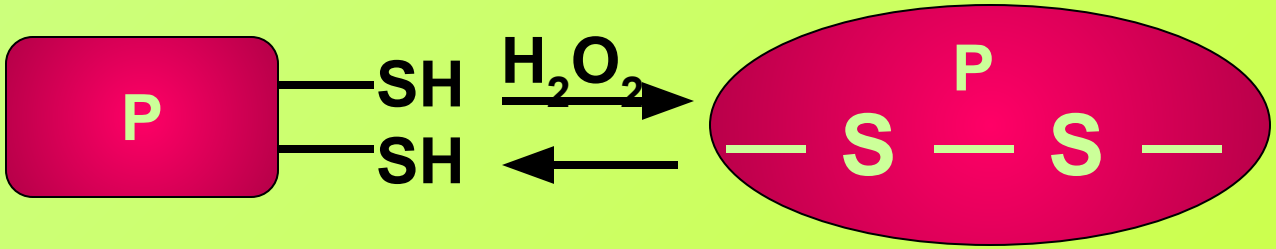


Оксидативная модификация белков как возможный механизм АФК-опосредованной передачи сигналов в клетке.

ОМ белков путем окисления Cys-остатков



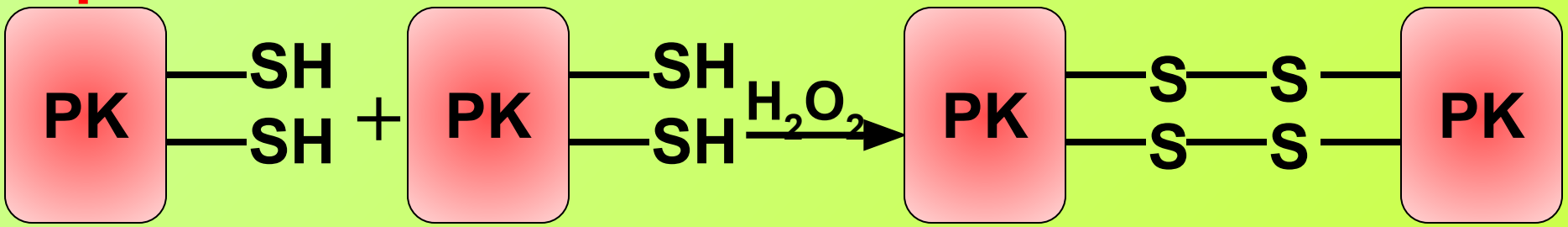
Образование внутримолекулярных дисульфидных мостиков



Изменение активности путем конформационных изменений в структуре белка

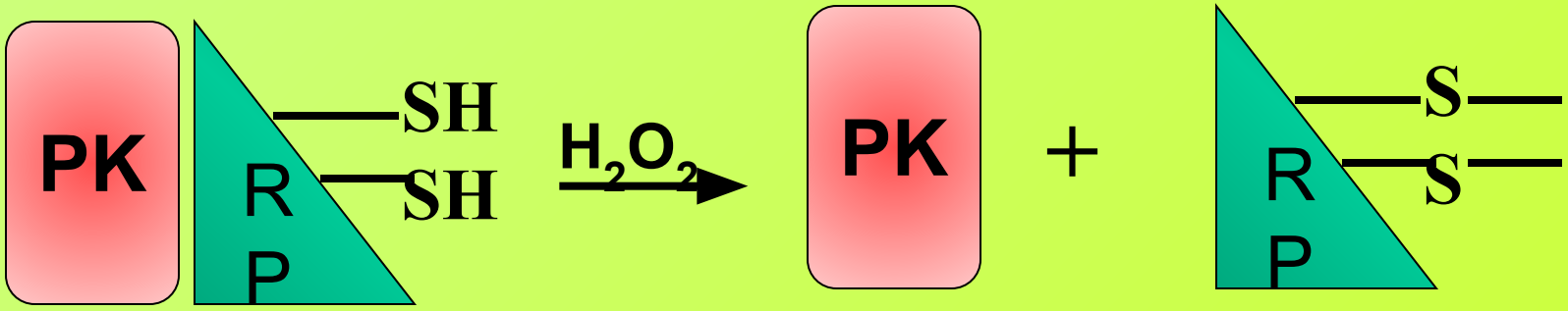
Димеризация белков межмолекулярными дисульфидными мостиками:

прямая:



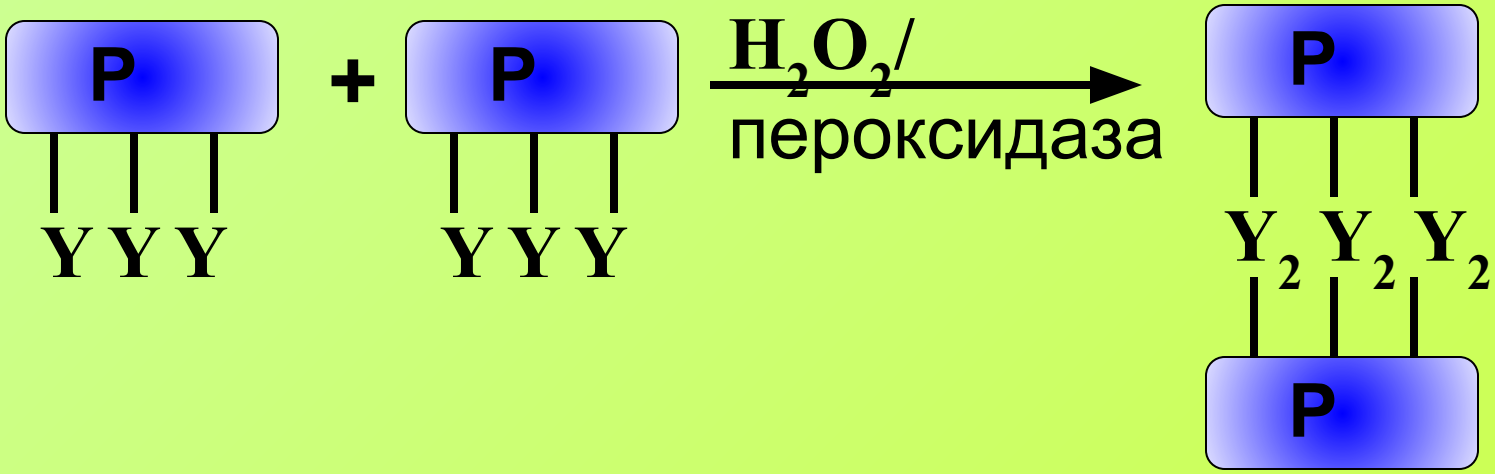
неактивные мономеры — активный димер

обратная:

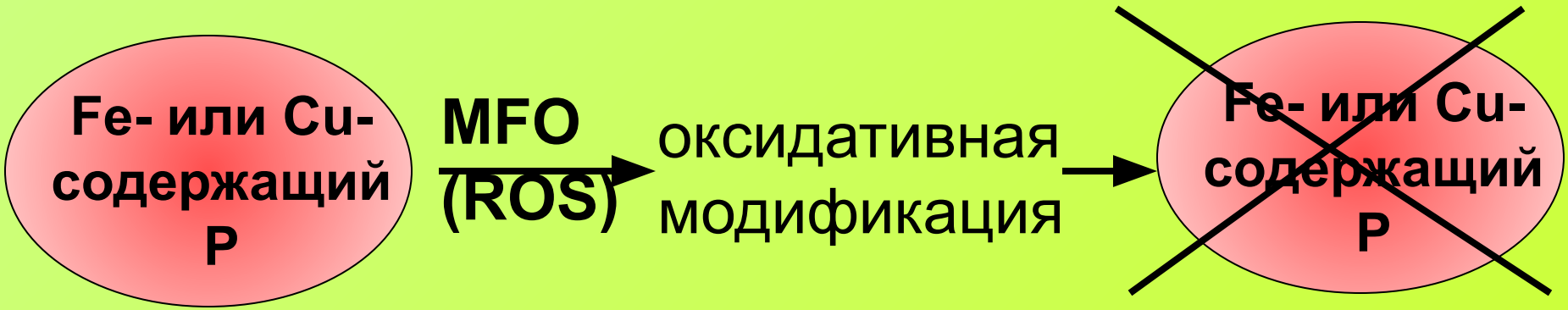


неактивный комплекс — активная РК

Образование дитирозиновых связей:

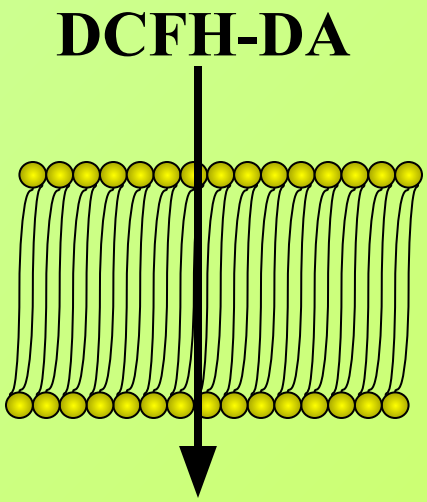


Металл-катализируемое окисление



Методы изучения АФК

Люцигенин - хемилюминесцентный субстрат для определения $O_2^{-\bullet}$ в клетке.



DCFH - 2’,7’-дихлорфлуоресцин - нефлуоресцирующий

DCF - 2’,7’-дихлорфлуоресцеин - флуоресцирующий

$$DCFH - DA \xrightarrow{\text{ЭСТЕРАЗЫ}} DCFH \xrightarrow{\text{ОКИСЛ.}} DCF$$

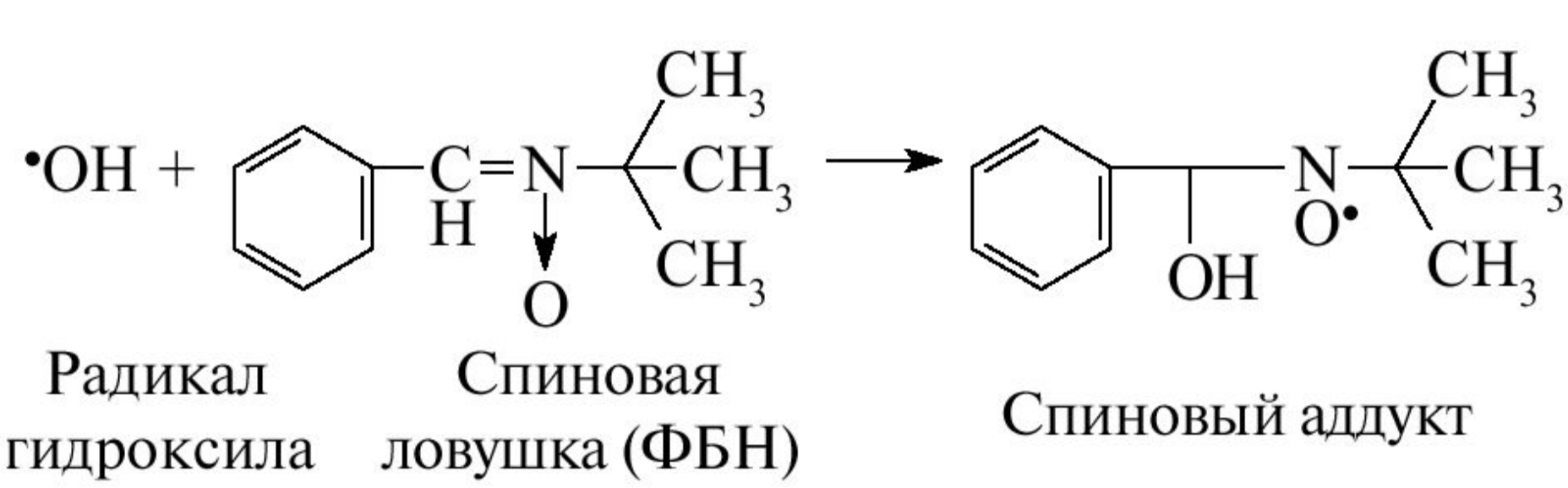
Флуориметрический метод, основанный на способности гем-пероксидаз катализировать H_2O_2-зависимую димеризацию замещенных фенольных элементов.

Высокая специфичность и чувствительность к H_2O_2.

Наиболее часто используется пероксидаза хрена.

Электрон-спиновая резонансная спектроскопия - единственный аналитический метод.

Метод спиновых ловушек - нитроны или нитрозосоединения.



РЕЗЮМЕ:

- АФК не только вредные побочные продукты клеточного метаболизма, но и важные регуляторы жизнедеятельности клетки.
- Уровень АФК строго контролируется

- Передача сигналов в клетке с помощью

АФК осуществляется путем оксидативной модификаций с клеточными компонентами, такими как киназы, белки или ДНК.