Методы изучения реакций с участием свободных радикалов:

1. Электронный парамагнитный резонанс
2. Хемилюминесценция
3. Биохимические

Методы изучения реакций с участием свободных радикалов

Биохимические

Маркеры,
Диеновая коньюгация,
Ингибиторный анализ

Электронный парамагнитный резонанс

Прямое обнаружение радикалов

Метод спиновых ловушек

Хемилюминесценция

Собственная
Активированная

Липидные системы

Клеточная ХЛ

Липопротеины крови

Действие лазеров

АОА веществ

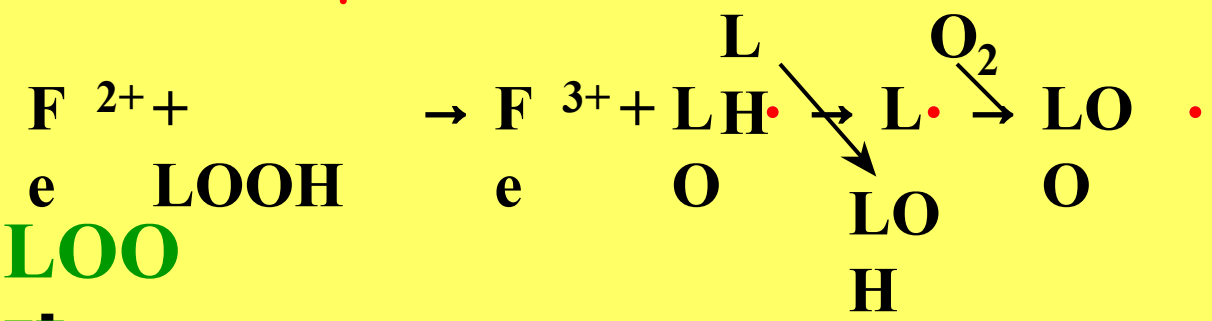
Диагностика

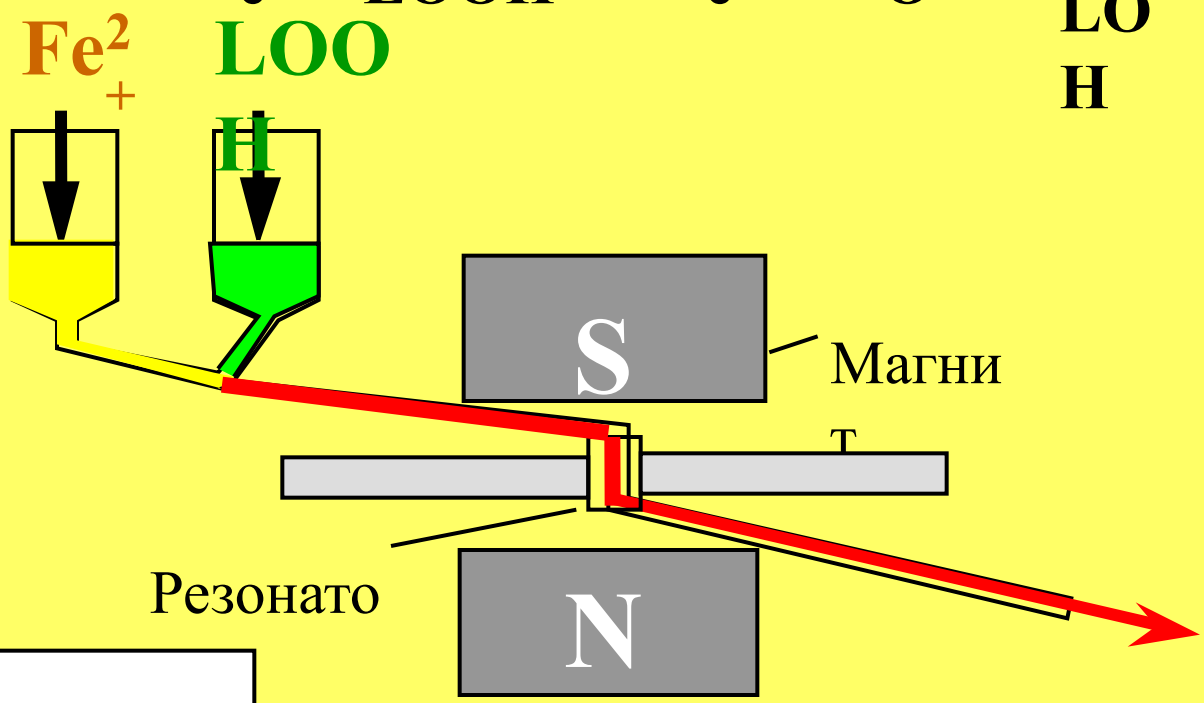
Методы изучения свободных радикалов:

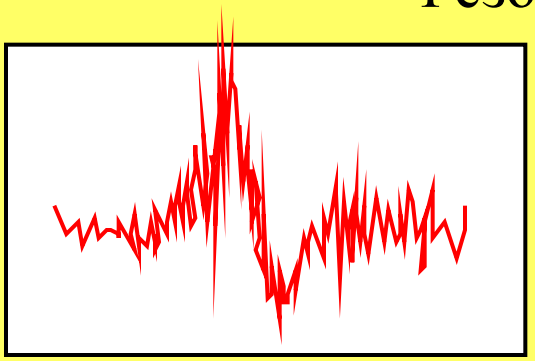
Метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР)

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

Прямое обнаружение радикалов липидов методом ЭПР в проточной кювете



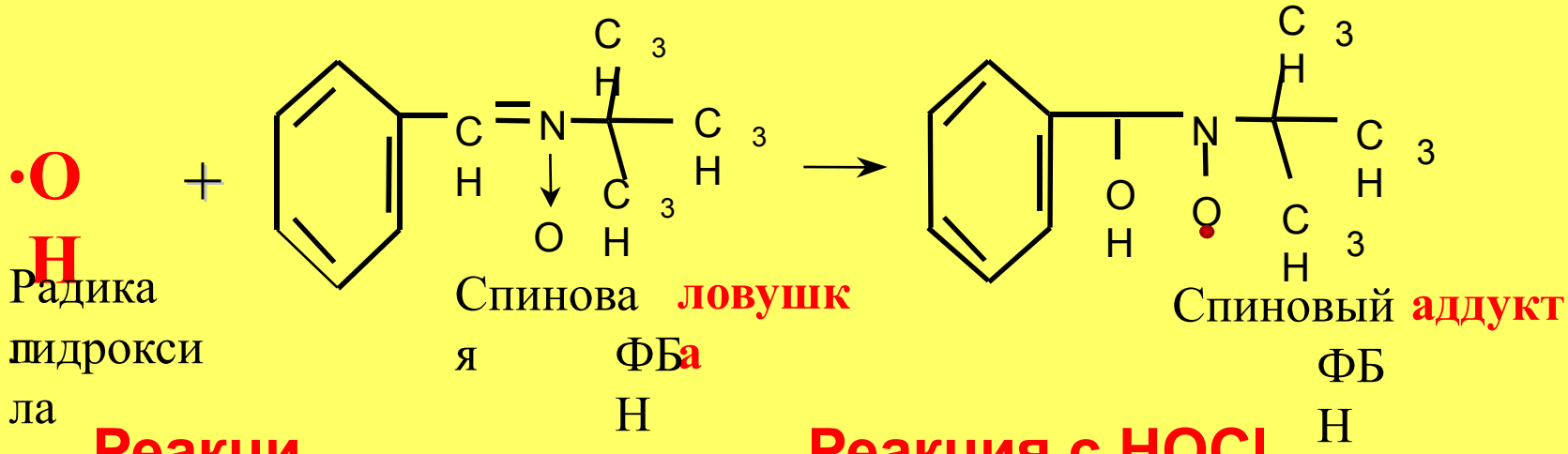




Сигнал ЭПР

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

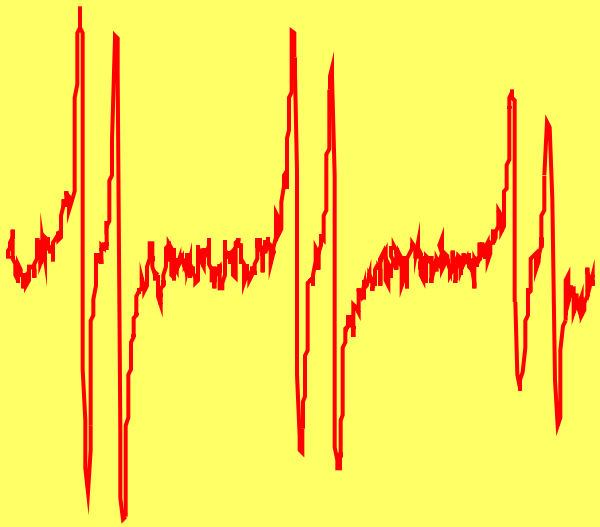
Две реакции образования радикалов гидроксила



Реакция Фентона

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

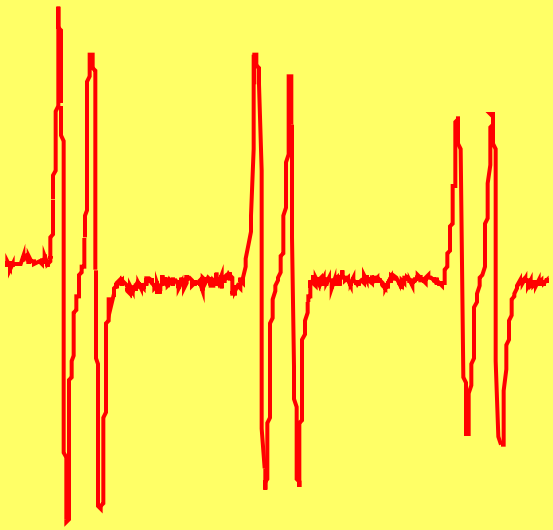
ФБН + $HO^{\bullet}$ → PBN-OH (аддукт)



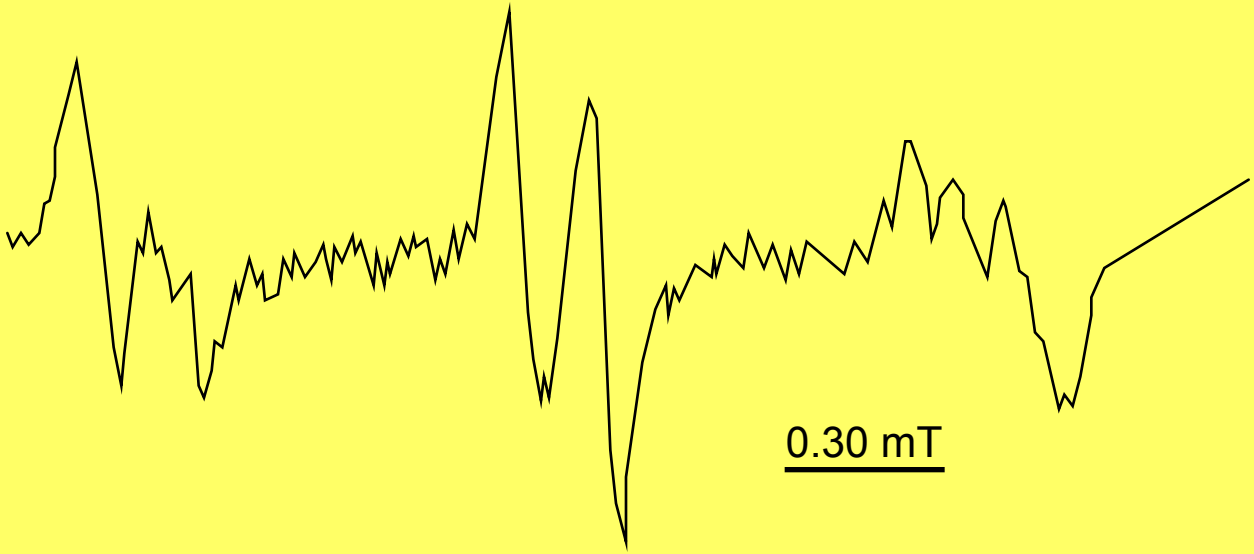
Реакция с HOCl

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

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



Сигнал ЭПР спиновых аддуктов ФБН и 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)

Биохимические методы изучения свободных радикалов

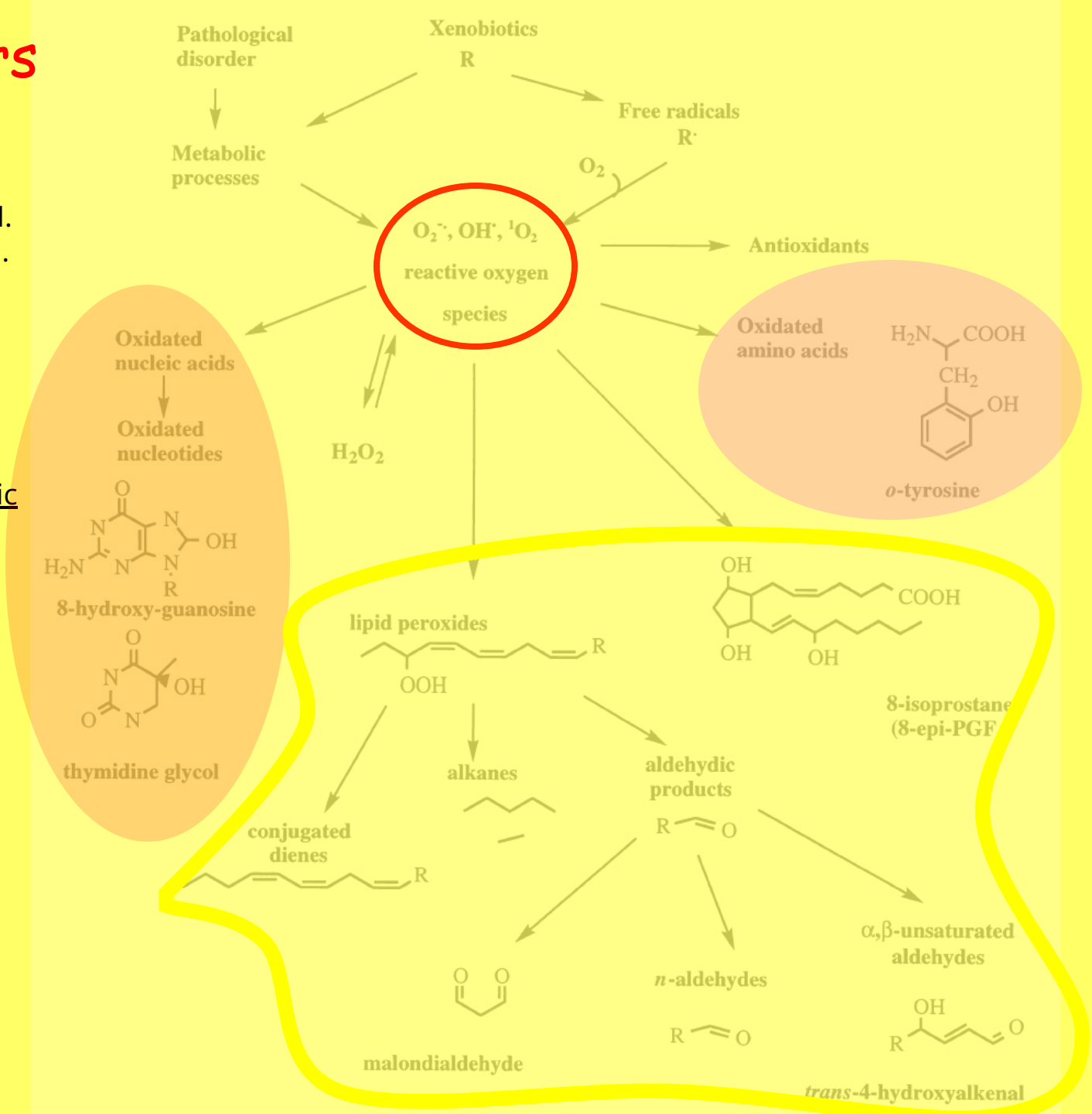
- Биомаркеры
- Диеновая коньюгация
- Ингибиторный анализ

Биохимические методы изучения свободных радикалов

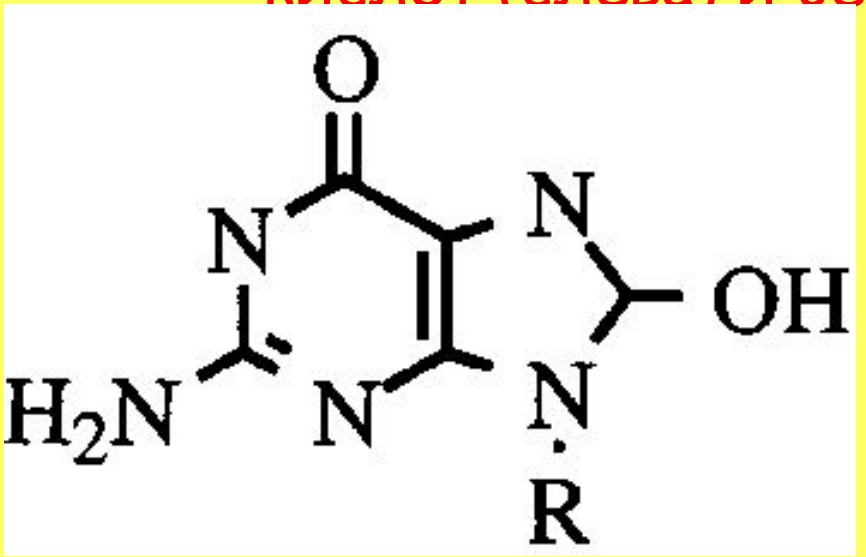
Биомаркеры

Biomarkers

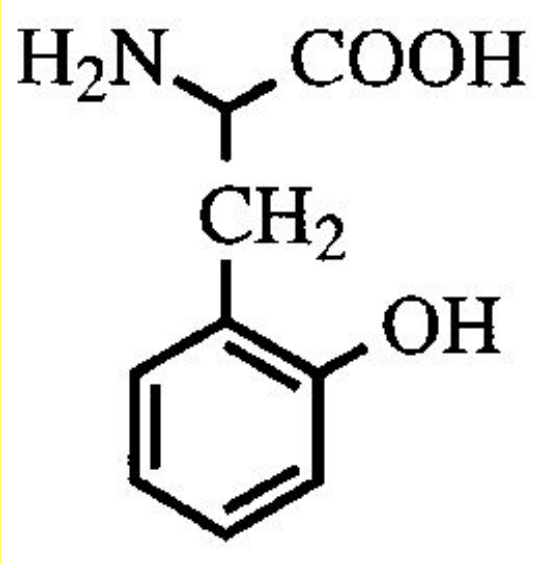
de Zwart, L. L., Meerman, J. H., Commandeur, J. N. and Vermeulen, N. P. (1999). *Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans*. Free Radic Biol Med **26**(1-2): 202-26.



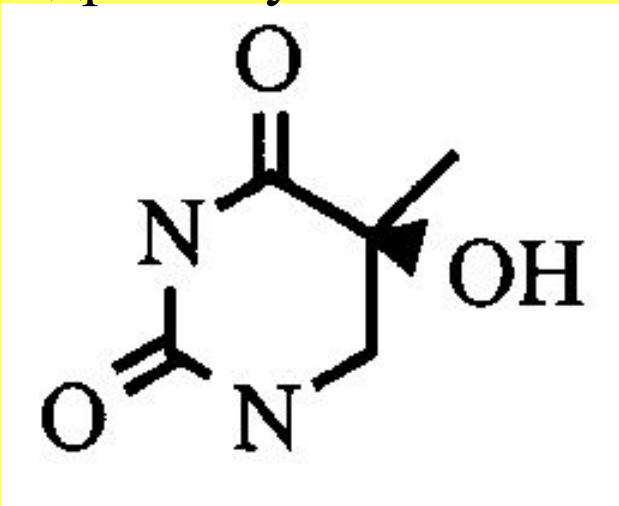
Маркеры оксидативного повреждения нуклеиновых кислот (слева) и белков (справа)



8-гидроксигуанозин



о-тирозин



тимидингликоль

Образование маркеров при окислении ДНК

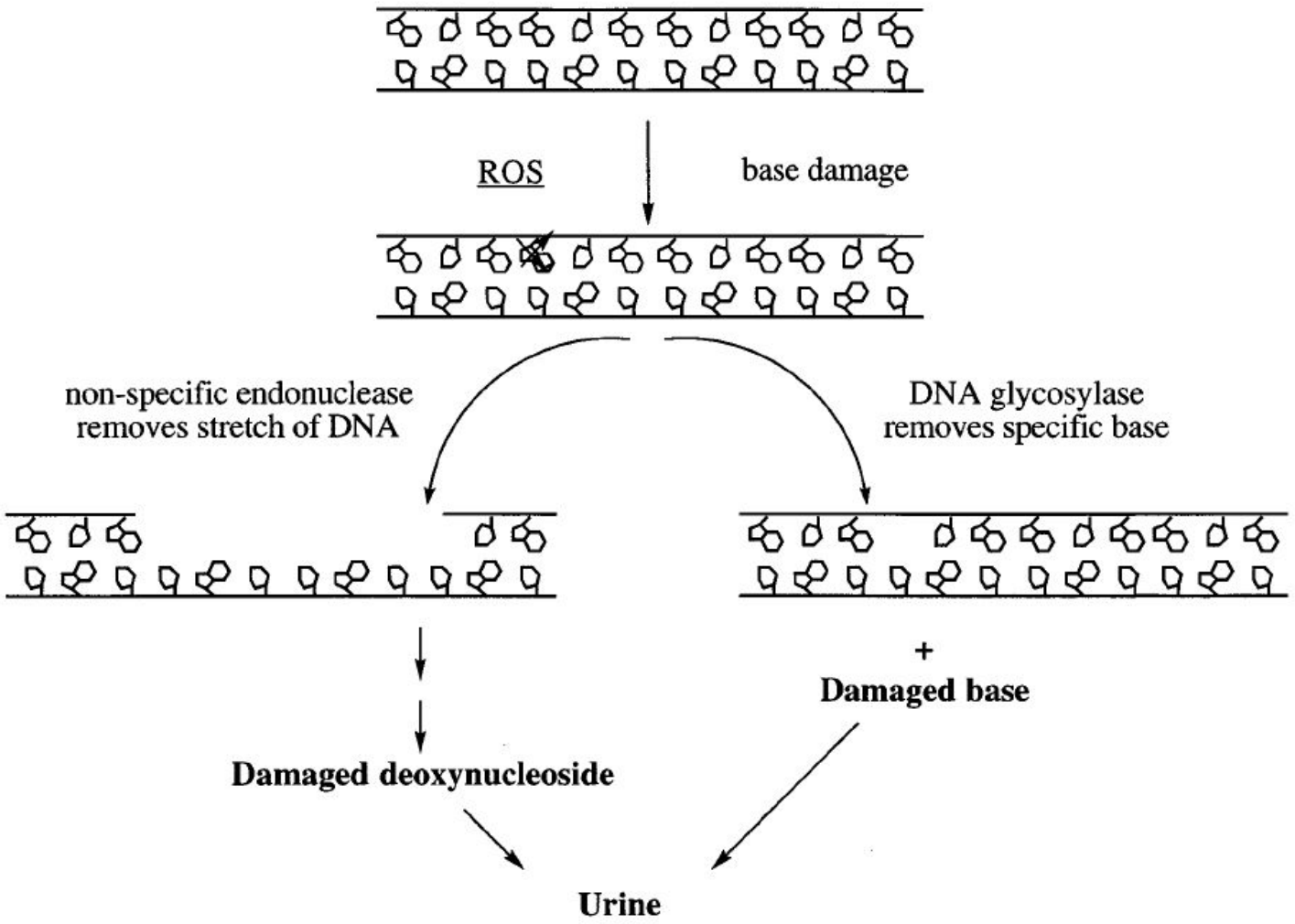


Fig. 7. Repair of a damage DNA base by non-specific endonucleases or specific glycolyses (adapted from Shigenaga et al. [171]).

Биомаркеры на окисление арахидоновой кислоты

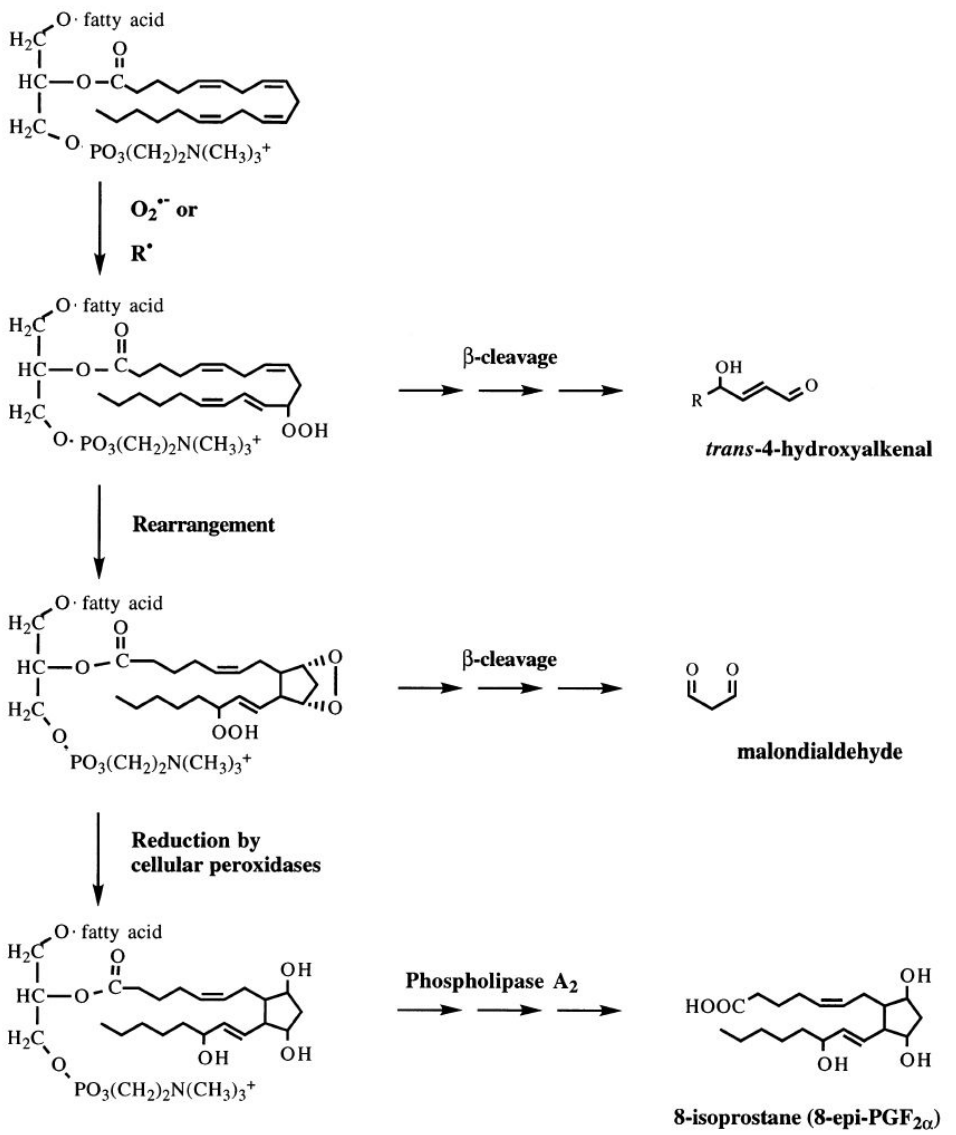


Fig. 2. The formation of 8-isoprostane. Radical-catalyzed (R• or $O_2^{\bullet-}$) peroxidation of esterified arachidonic acid and subsequent release of 8-isoprostane.

Структура некоторых изопростанов

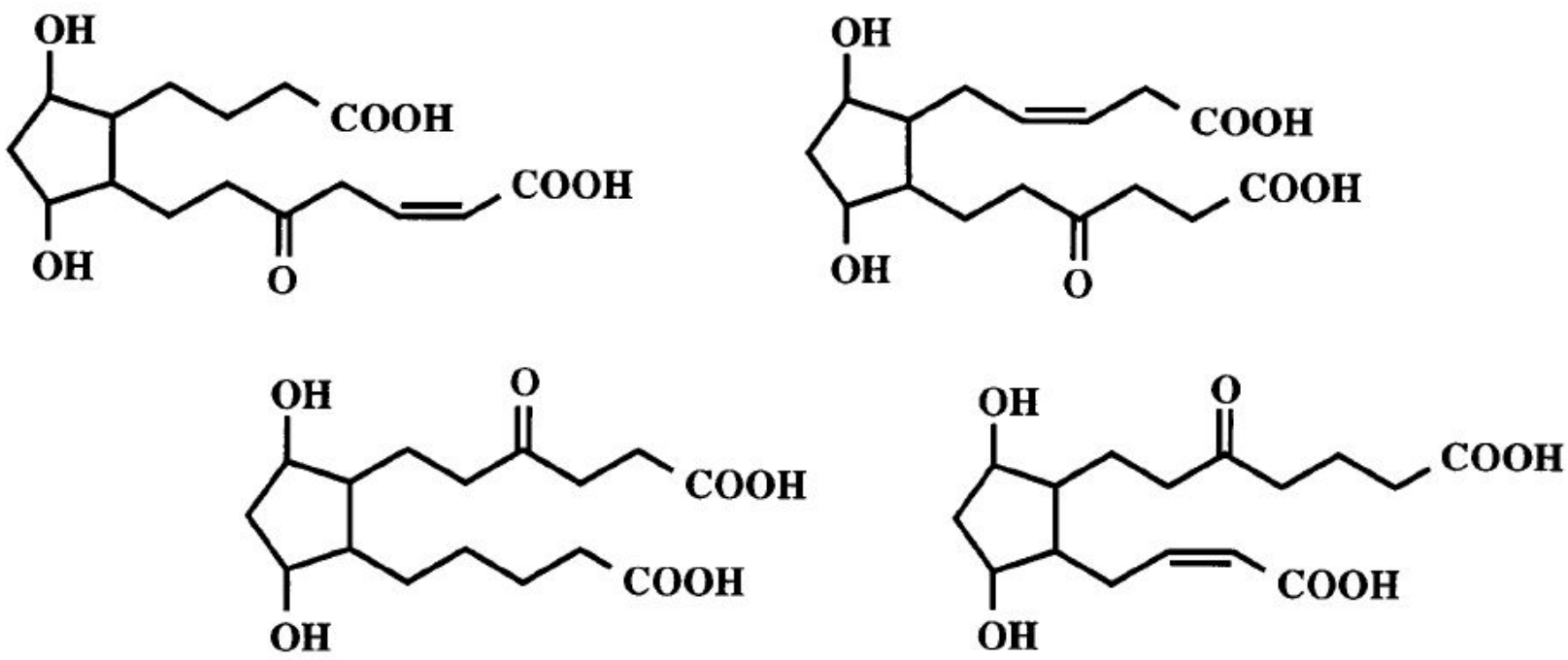
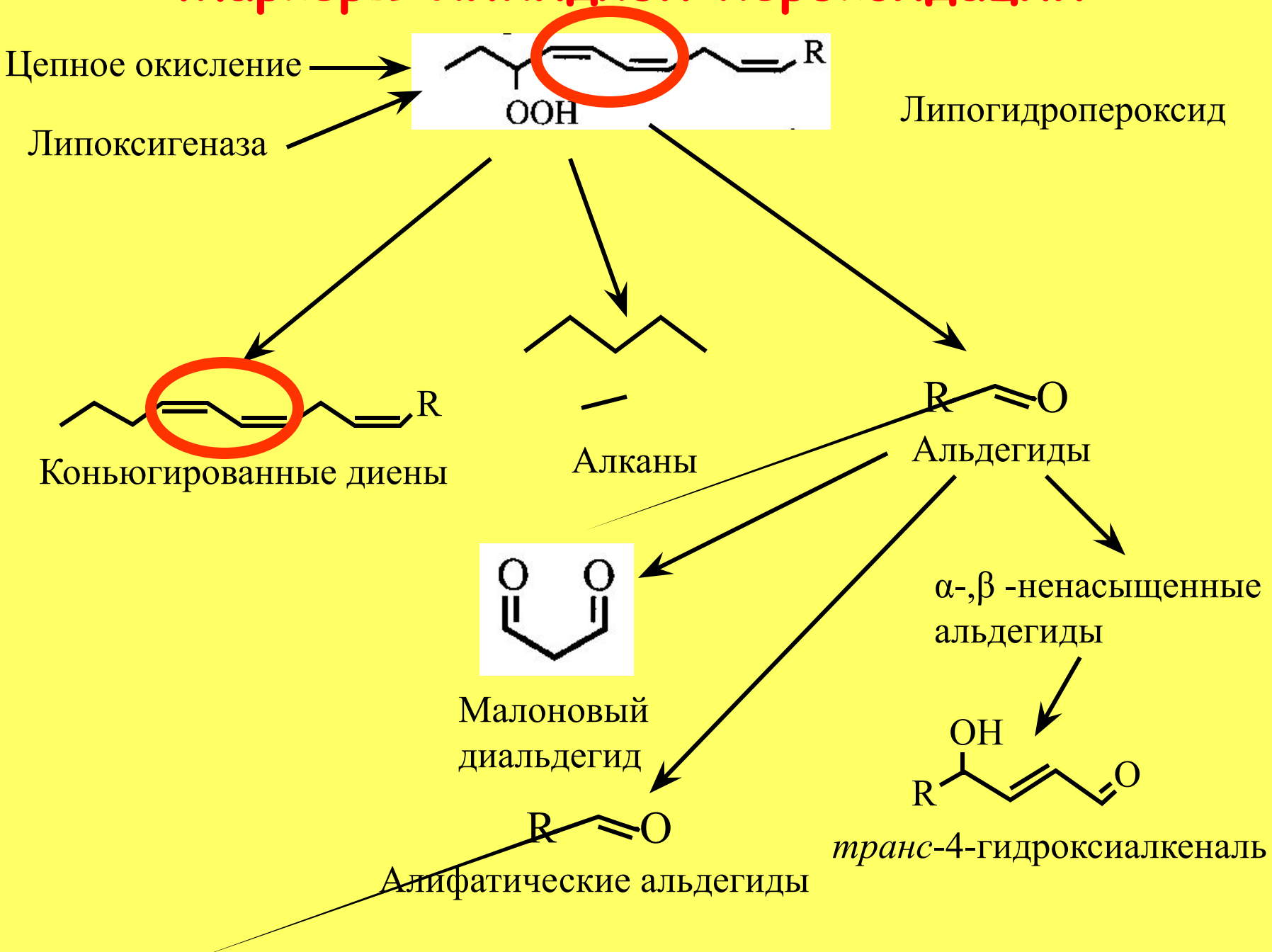


Fig. 4. Structures of metabolites of F_2-isoprostane regioisomers [79].

Маркеры липидной пероксидации



Биомаркеры -карбонилы

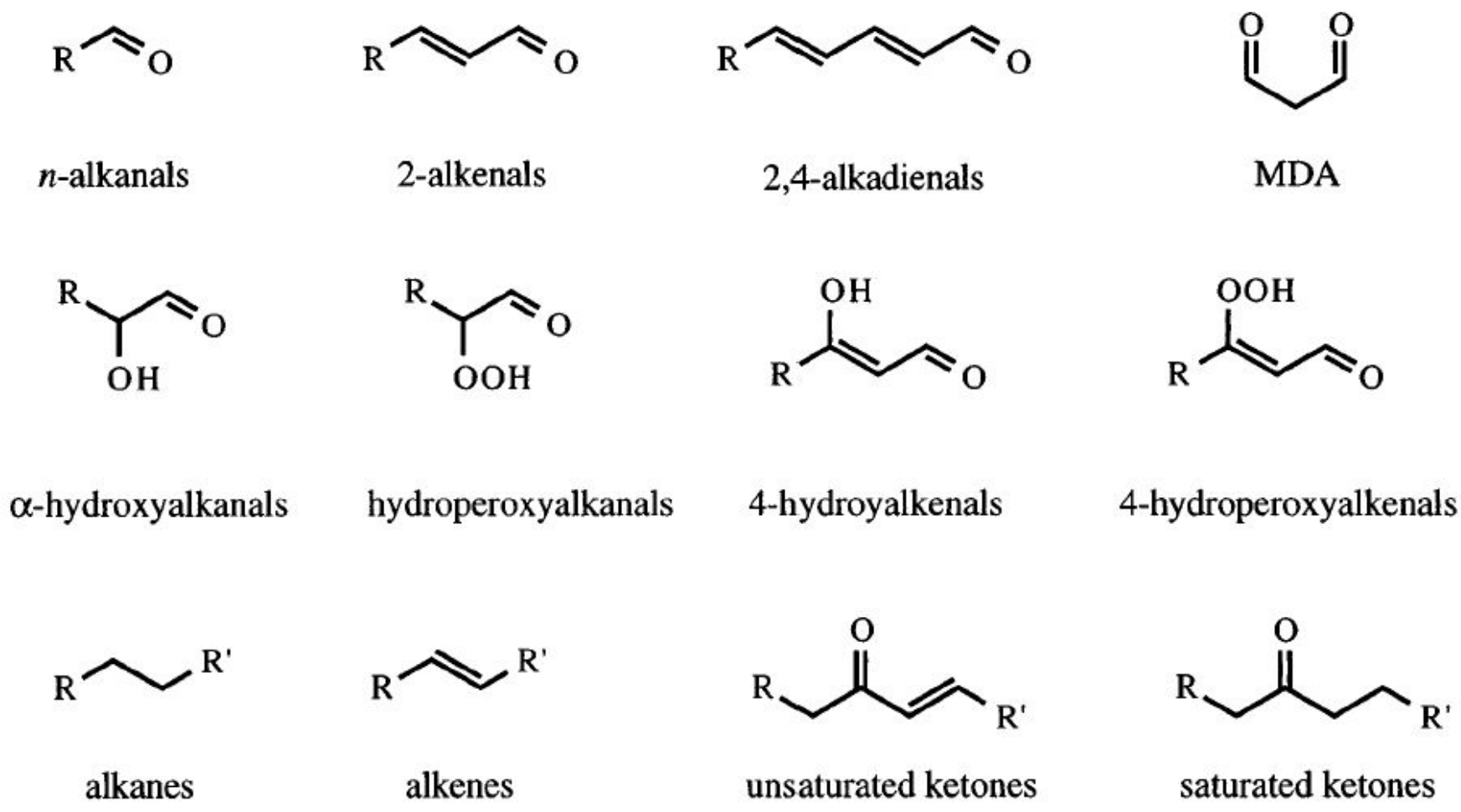


Fig. 6. Stable carbonyls formed following peroxidation of ω-3 and ω-6 fatty acids.

Кинетика образования изопростановых биомаркеров у крыс при отравлении четыреххлористым углеродом

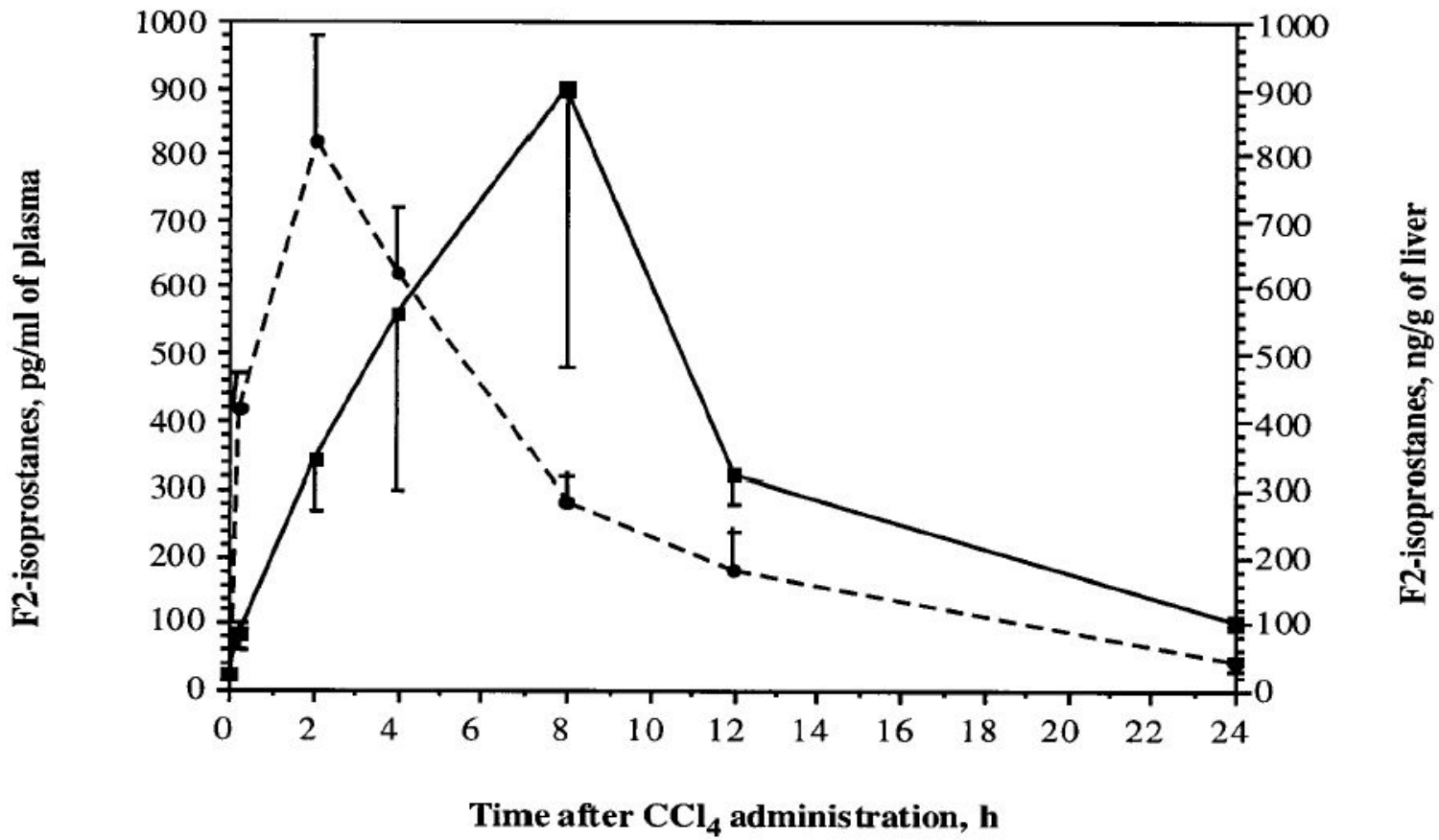


Fig. 3. Time course of appearance of lipid-associated F_2-isoprostanes in liver (●) and free F_2-isoprostanes in the circulation (■) of rats after intragastric administration of CCl_4 (1 ml/kg). Each time point represents the mean ± SD of levels of measured in at least four animals (replot of data from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

Биомаркеры у курильщиков

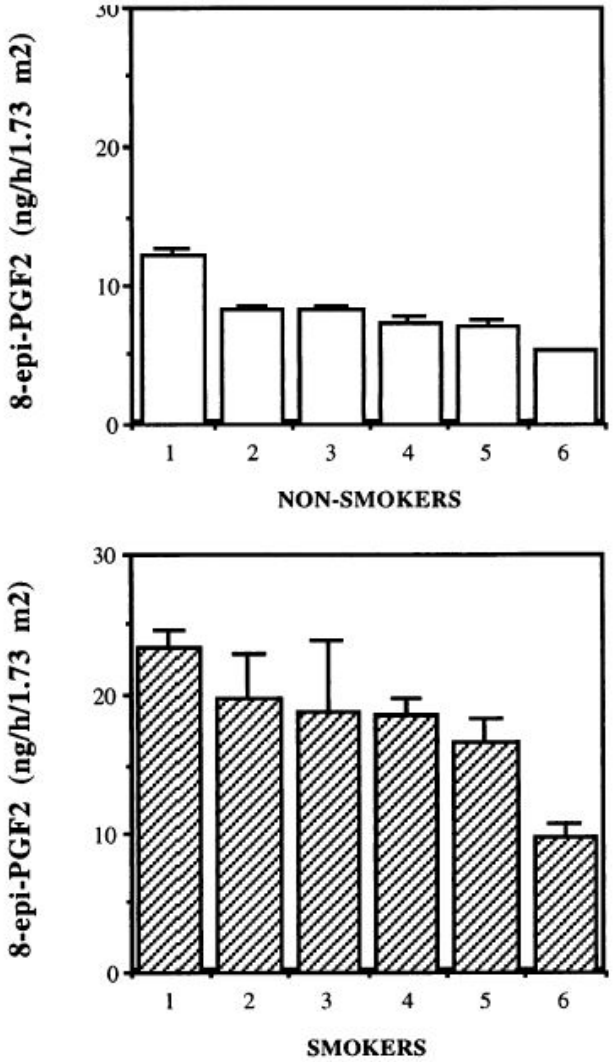


Fig. 5. Urinary excretion of 8-epi-$PGF_{2\alpha}$ in non-smoking and smoking healthy volunteers. Each bar represents the mean individual value (±SD) based on 6 h urine collections on different days ($n = 3$) (data replotted from Bachi et al. [92]).

Биохимические методы изучения свободных радикалов

Диеновая коньюгация

Другая форма изображения диеновой коньюгации

$$-CH_2-CH=CH-CH_2-CH=CH-CH_2- \quad \boxed{1}$$

$$-CH_2-\dot{C}H-\dot{C}H-\dot{C}H-\dot{C}H-\dot{C}H-CH_2- \quad \boxed{2}$$

$$O_2$$

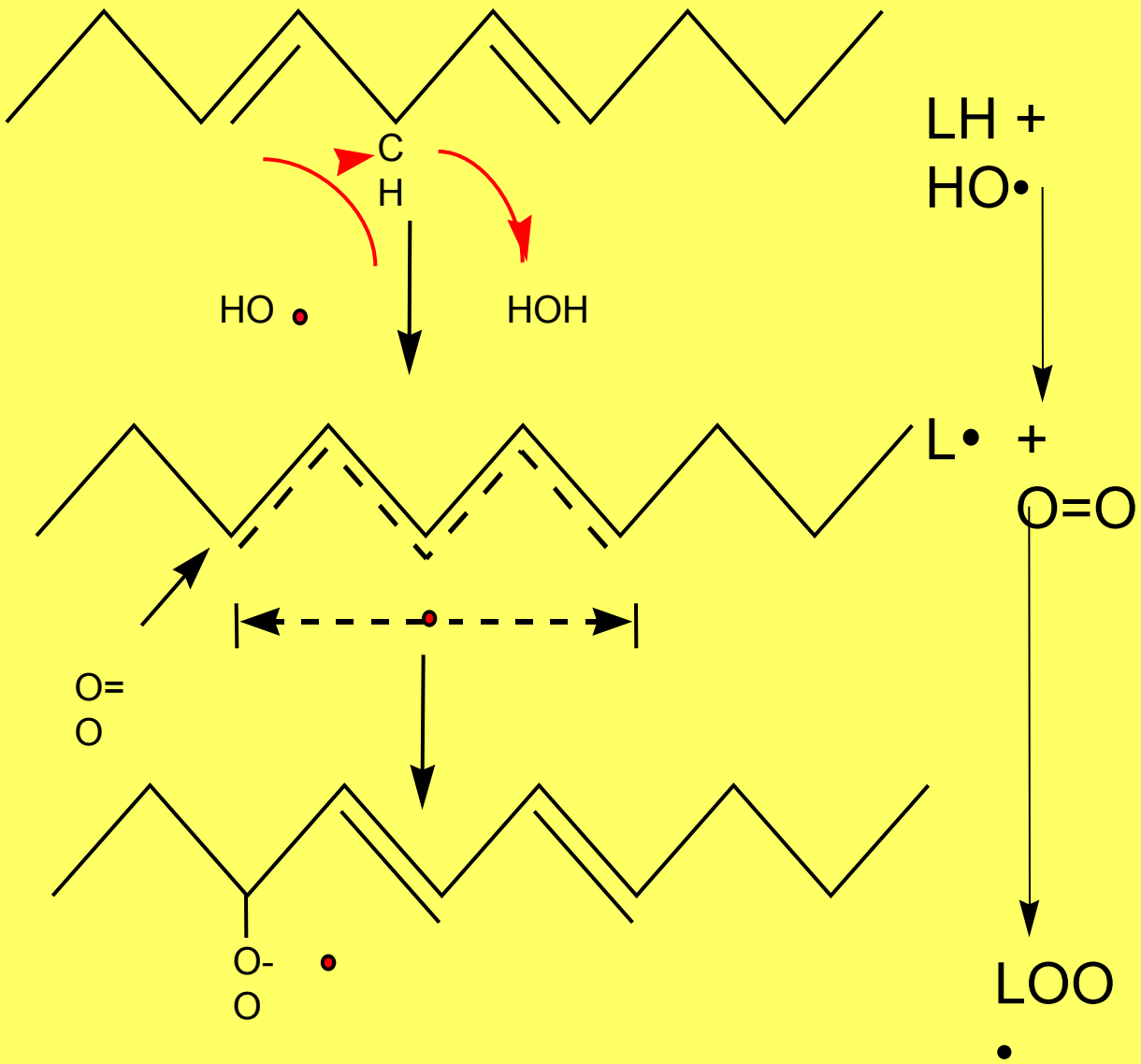
$$-CH_2-\underset{\underset{O_2\cdot}{|}}{CH}-\dot{C}H-\dot{C}H-\dot{C}H-\dot{C}H-CH_2- \quad \boxed{3}$$

$$-CH_2-\underset{\underset{OO\cdot}{|}}{CH}-CH=CH-CH=CH-CH_2- \quad \boxed{4}$$

$$LH \longrightarrow$$

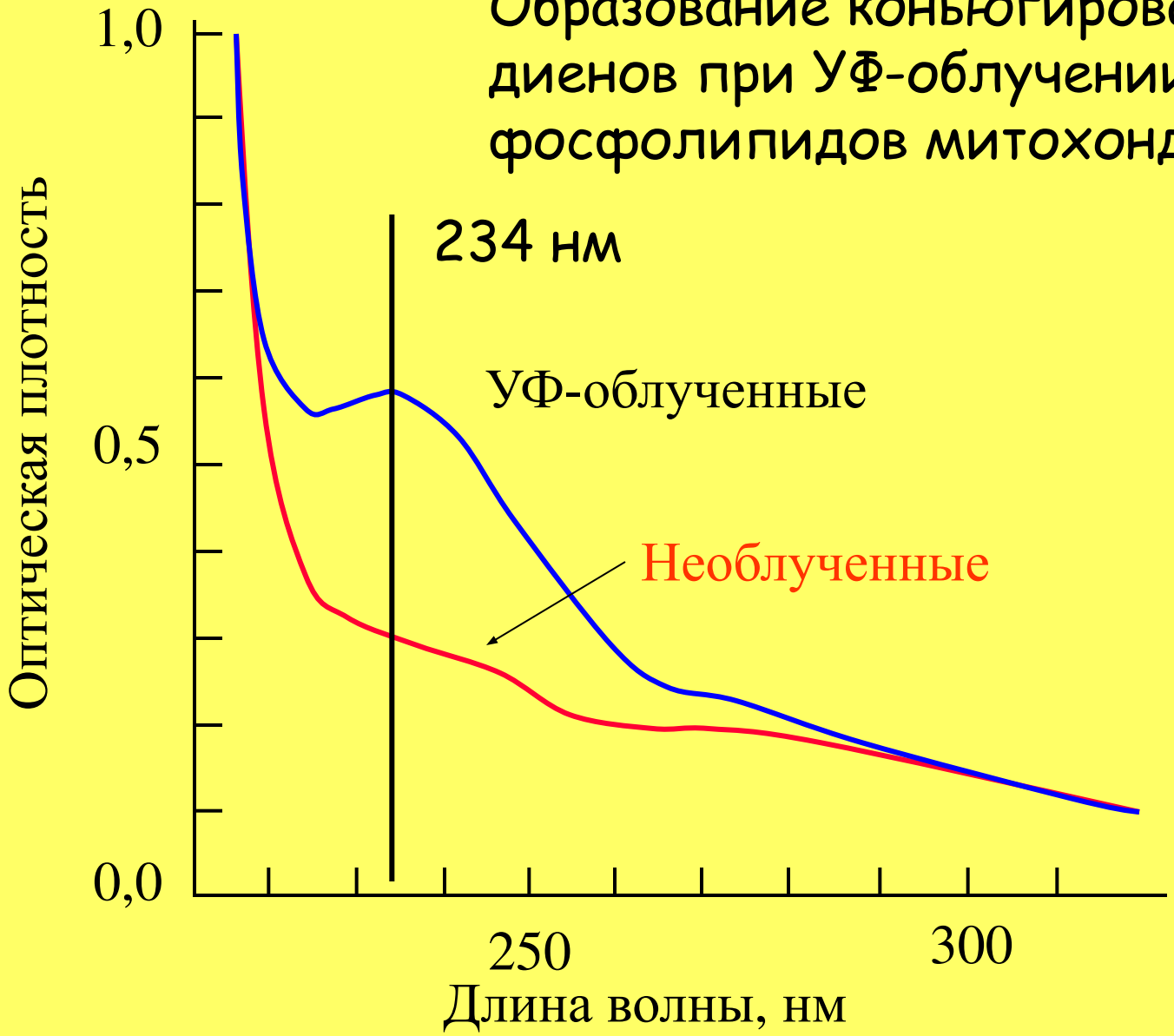
$$-CH_2-\underset{\underset{OOH+L\cdot}{|}}{CH}-CH=CH-CH=CH-CH_2- \quad \boxed{5}$$

Третий способ изображения процесса диеновой коньюгации



Спектры диеновых коньюгатов

Образование коньюгированных диенов при УФ-облучении фосфолипидов митохондрий



Биохимические методы изучения свободных радикалов

Ингибиторный анализ

Биохимические методы изучения свободных радикалов

Ингибиторный анализ

Источник → Радикал → Результат

Источник → Ингибитор → НЕТ результата

Примеры

- Супероксид-дисмутаза (**СОД**) → Ингибирование реакций с участием **супероксидного радикала**
- Перехватчики липидных радикалов (**токоферол**, каротиноиды, флавоноиды и другие «липидные антиоксиданты») → Ингибирование реакций с участием **липидных радикалов**

Вопросы к зачету (Без ЭПР)

1. Перечислите основные методы изучения реакций с участием свободных радикалов (можно в виде схемы).
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.