

Д-р биол. наук В. Д. Прокопьева
(НИИ психического здоровья, Томск)

Окислительный стресс при алкоголизме

Доклад на
международных
образовательных семинарах
«Современные проблемы нейробиологии
и психофармакологии аддикций»
Томск
18—19 мая 2015 г.

Окислительный стресс -
это такое состояние организма, при
котором в результате дисбаланса
между образованием и
нейтрализацией свободных
радикалов происходит увеличение
их стационарного уровня,
приводящее к окислительному
повреждению биологических
молекул

Активные формы кислорода (АФК)

При окислительном метаболизме в организме образуются различные соединения реактивного кислорода

Радикальные соединения:

- супероксидный анион-радикал ($O_2^{\cdot-}$)
- алкоксильный радикал ($RO\cdot$)
- пероксильный радикал ($ROO\cdot$)
- гидроксид-радикал ($OH\cdot$)
- гидропероксильный радикал ($HO_2\cdot$)

Не радикальные соединения:

- пероксид водорода (H_2O_2)
- синглетный кислород (1O_2)

Содержание различных АФК в нервной ткани (норма)

Виды АФК

КОНЦЕНТРАЦИЯ

Супероксид анион

10 μM

Гидроксид радикал

< 15 nM

Пероксил радикал

отсутствует

Перекись водорода

10-15 μM

NO-радикал

5-10 μM

NB

Free Radicals, Nitric Oxide,
and Inflammation:
Molecular, Biochemical, and
Clinical Aspects
(A. Tomasi, T. Ozben, and
V. Skulachev, Eds.)
IOS Press, NATO Sci Ser, 2003

**Активные формы кислорода
образуются в ходе клеточного
метаболизма и выполняют в
клетках функцию вторичных
мессенджеров**

Антиоксиданты - ферменты и белки

Антиоксиданты	Локализация	Функция
Cu/Zn – СОД	Эритроциты, цитоплазма	Тушение $\bullet\text{O}_2^-$
Mn - СОД	Митохондрии	Тушение $\bullet\text{O}_2^-$
Внеклеточная СОД	Плазма крови, стенки сосудов	Тушение $\bullet\text{O}_2^-$
Каталаза	Пероксисомы	Тушение H_2O_2
Глутатионпероксидаза	Цитоплазма, митохондрии	Деградация H_2O_2 и перекисей липидов
Глутатионтрансфераза	Клеточные мембраны, митохондрии, цитоплазма, эндоплазматический ретикулум	Деградация перекисей липидов
Ферритин	Цитоплазма	Хелатор Fe^{2+}
Трансферрин, лактоферрин	Внеклеточная среда	Хелатор Fe^{2+}
Церулоплазмин	Внеклеточная среда	Хелатор Cu^{2+} , окисление Fe^{2+} , тушение O_2^-
Альбумин	Внеклеточная среда	Хелатор Cu^{2+} , тушитель $\text{OH}\bullet$, $\text{LOO}\bullet$, HOCl

Низкомолекулярные антиоксиданты

Антиоксиданты	Локализация	Функция
Витамин Е (токоферол)	Биомембраны	Тушение OH^\bullet , LOO^\bullet , HOCl
Убихинол	Биомембраны	Тушение OH^\bullet , LOO^\bullet , HOCl
Каротиноиды	Биомембраны	Тушение OH^\bullet , LOO^\bullet , HOCl , $^1\text{O}_2$
Витамин С (аскорбат)	Цитоплазма	Тушение OH^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$
Карнозин	Цитоплазма	Тушение OH^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$, нейтрализация ClO^-
N- ацетилцистеин	Цитоплазма	Тушение АФК
Таурин	Цитоплазма	Нейтрализация гипохлорита
Глутатион	Цитоплазма, митохондрии	Тушение OH^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$
Мочевая кислота	Кровь	Предотвращение ПОЛ
Билирубин	Кровь	Предотвращение ПОЛ

ГЛУТАТИОН

- Глутатион представляет собой трипептид, состоит из трех аминокислот — глутамина, глицина, цистеина. Цистеин содержит серу, которая работает «дворником», собирая весь мусор нашего организма — тяжелые металлы, токсины, свободные радикалы.
- Глутатион является ключевым элементом антиоксидантной защиты, поскольку он способен восстанавливать другие антиоксиданты.
- Со свободными радикалами борются и витамин С, и витамин Е, и бета-каротин (витамин А), и др., но при этом они сами окисляются и становятся опасными для организма. Глутатион, «жертвуя собой», «реанимирует» другие антиоксиданты. Но, поскольку он обладает способностью «возрождаться», антиоксидантная система продолжает успешно функционировать.

Система глутатиона

- В антиоксидантную систему глутатиона входят три глутатионзависимых фермента: глутатионпероксидаза (ГПО), глутатионредуктаза (ГР) и глутатионтрансфераза (ГТ).
- **Глутатионпероксидаза** восстанавливает окисленные водородные молекулы, а также липидные и другие органические молекулы, окисленные радикалами кислорода; **глутатионредуктаза** восстанавливает сам глутатион, **глутатионтрансфераза** катализирует реакции обезвреживания свободных радикалов, которые проходят с участием глутатиона; .
- Главная антиоксидантная роль глутатиона заключается в защите иммунных клеток, в первую очередь лимфоцитов. В борьбе с вредными микроорганизмами и токсинами главным оружием иммунных клеток являются те же свободные радикалы, поэтому они нуждаются в собственной защите. А если глутатиона недостаточно, лимфоциты могут сами погибнуть, вызвав "огонь на себя", и функционирование иммунной системы будет серьезно нарушено.

Алкоголизм – самостоятельное психическое расстройство с типичными симптомами

Приоритет в формировании концепции алкоголизма как самостоятельной болезни принадлежит России.

Впервые алкоголизм выделен как **отдельная нозология** в нозологических классификациях, созданных С.С.Корсаковым (1854-1900) и Э.Крепелиным (1856-1926).

В 1906 г. в Санкт-Петербурге по инициативе российского психиатра В.М.Бехтерева был создан Противоалкогольный институт.

В 30 – 40-е годы XX века Н.В.Канторович (1901-1969) описал симптом утраты количественного контроля при алкоголизме.

И.В.Стрельчук (1901-1991) исследовал диагностическое значение алкогольных амнезий.

С.Г.Жислин (1898-1968) подробно описал алкогольный абстинентный синдром, показал связь между этим синдромом и алкогольным делирием.

Алкоголь: $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$

Этиловый спирт легко преодолевает мембраны клеток, растворяется в липидах и воде.

Эндогенный алкоголь: 0.005-0.01% в крови.



«Типичная» картина развития эффектов экзогенного (внешнего) алкоголя:

- малая доза: усиление выброса дофамина, возможно снятие усталости, «растормаживание», эмоциональная лабильность (на психическом уровне проявляется очень индивидуально);
- средняя доза: депрессантное действие (активация ГАМК- и торможение глутаматных синапсов), уменьшение кол-ва объектов в фокусе внимания, снижение интеллекта и адекватности самооценки;
- большая доза: ухудшение работы всех медиаторных систем; двигательные, сенсорные и вегетативные нарушения; отравление продуктами распада алкоголя; постепенное засыпание.



Алкоголь: $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$

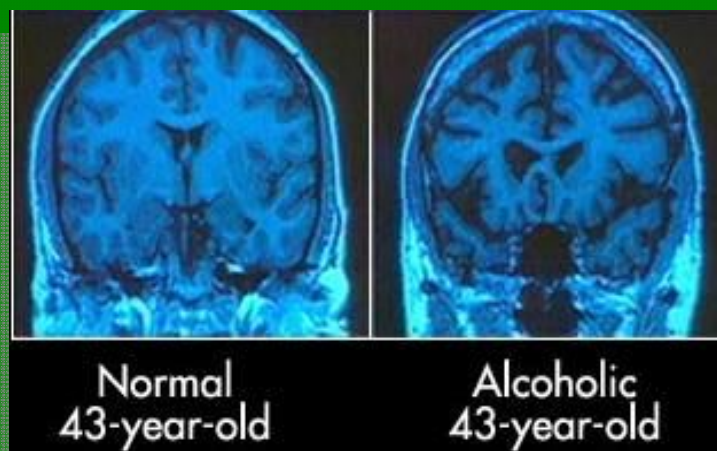
В ходе развития алкоголизма: прежде всего, истощение системы дофамина (DA), формирование привыкания и зависимости на уровне DA-синапсов = «DA-алкоголизм», абстинентный синдром в форме депрессии.



Позже: гибель DA-нейронов, ухудшение состояния ГАМК-системы, нарастающая дегенерация корковых структур (синдром «грецкого ореха») = «ГАМК-алкоголизм»; абстинентный синдром в форме «белой горячки».



Признаки алкоголизма: ежедневный прием алкоголя, увеличение доз и потеря самоконтроля при потреблении, деградация личности, измененные состояния психики во время опьянения и при абстинентном синдроме, нарушения памяти, запои, необходимость «опохмеляться», неоднократные и неудачные попытки бросить пить и т.д.



Алкоголь: $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$

Метаболизм этанола:

$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$ (влияние на DA-синапсы)



(фермент алкоголь-дегидрогеназа – АДГ)

$\text{CH}_3\text{-COH}$ (ацетальдегид; токсич. эффекты: похмелье)

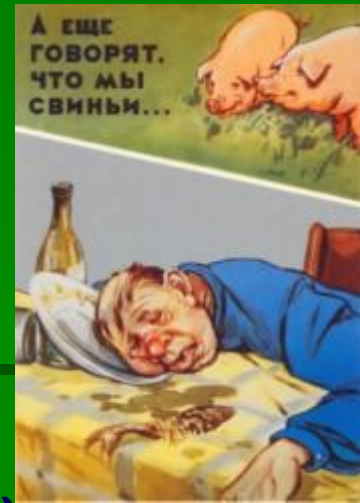


(фермент ацетальдегид-дегидрогеназа – АцДГ)

$\text{CH}_3\text{-COOH}$ (ацетат, уксусная кислота)



дальнейшее расщепление с участием кислорода



При плохой работе АцДГ моментально развивается похмелье (головная боль, тошнота); такие люди не пьют... Плохая работа АДГ – предпосылка к активному взаимодействию алкоголя с DA-системой, «база» для развития алкоголизма (5% населения). Блокада АцДГ тетурамом усиливает похмельный синдром до опасного уровня.



ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ ЭТАНОЛА



- Алкогольдегидрогеназа
- Этанол-индуцируемый цитохром P₄₅₀
- Каталаза

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ АЦЕТАЛЬДЕГИДА

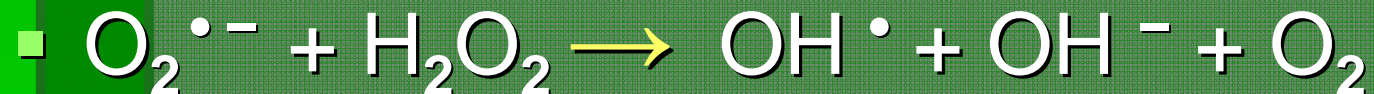


- Альдегиддегидрогеназа
- Альдегидоксидаза

Реакция Фентона



Реакция Хабер-Вейса



Антиоксидантные системы у больных алкоголизмом

- У больных алкоголизмом функционирование антиоксидантных систем существенно нарушается. Меняется активность антиоксидантных ферментов, страдает и система глутатиона.
- Данные литературы и собственный опыт работы не позволяют делать однозначные выводы о **направленности** влияния алкоголизации на антиоксидантные системы организма.
- В разных типах клеток это влияние варьирует, что может быть связано с разной способностью клеток продуцировать свободные радикалы в ответ на действие этанола и его метаболитов.

Нарушение окислительно - восстановительных реакций при алкоголизме

1. Массированное поступление **ЭКЗОГЕННОГО ЭТАНОЛА** приводит к росту **АЦЕТАЛЬДЕГИДА** в митохондриях и цитозоле клеток.
2. Окисление этанола до ацетальдегида осуществляется **НАД-зависимым** ферментом алкогольдегидрогеназой. В процессе этой реакции от молекулы этанола отщепляется водород, который восстанавливает молекулу **НАД+** до **НАДН** (НАДН увеличивается!).
3. Ацетальдегид является ингибитором **НАДН-дегидрогеназы** – фермента, который окисляет НАДН до НАД+ (НАДН остается высоким и продолжает расти!). Этап возвращения НАД+ в окисленную форму крайне важен для нормального течения биоэнергетических процессов. При недостатке НАД+ тормозится окисление многих НАД+ - зависимых субстратов в митохондриях, а также этанола и ацетальдегида.
4. В условиях хронической алкоголизации в клетках возникает состояние **ГИПЕРВОССТАНОВЛЕННОСТИ**, когда равновесие НАД+/НАДН сдвигается в сторону НАДН. Из-за недостатка окисленной формы НАД+ снижается использование кислорода для окисления целого ряда субстратов, что, в свою очередь, приводит к появлению «избыточного» кислорода, который вносит свой вклад в генерацию свободных радикалов, активных форм кислорода и поддержание окислительного стресса на высоком уровне.

Показатели теста восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-теста), характеризующего продукцию АФК в процессе дыхательного взрыва лейкоцитов

НСТ-тест, %клеток	Здоровые доноры (n=10)	Больные в стадии абстиненции (n=22)
Спонтанный	$9,8 \pm 1,8$	$15,6 \pm 2,5^*$
Стимулированный	$24,2 \pm 2,6$	$24,2 \pm 4,2$

Примечание. *- различия достоверны по сравнению с показателями здоровых доноров, $p < 0,05$;
n – количество обследованных доноров

Схема развития окислительного стресса при алкоголизме

Увеличение поступления экзогенного этанола

Ингибирование алкогольдегидрогеназы
и альдегиддегидрогеназы

Индукция микросомальной этанолокисляющей
системы и альдегидоксидативных систем



Неконтролируемая продукция
активных форм кислорода



Окислительный стресс

Содержание различных АФК в нервной ткани

Виды АФК	Норма	Окислительный стресс
Супероксид анион	10 μM	10 μM
Гидроксид радикал	< 15 nM	до 75 μM
Пероксил радикал	отсутствует	100-120 μM
Перекись водорода	10-15 μM	>150 μM
NO-радикал	5-10 μM	<5 μM

Маркеры окислительного стресса

**НУКЛЕОТИДНЫЕ
УГЛЕВОДНЫЕ**

ЛИПИДНЫЕ

БЕЛКОВЫЕ

**СИГНАЛЬНЫЕ
МОЛЕКУЛЫ**

Дигидрогуанозин
AGE products
(липофусцины)
ТБК-реактивные
продукты,
Гидроксикетонали,
Гомоцистеин
Карбонилы,
Ферменты, вовлечен-
ные в обмен АФК,
Кросс-линкинг
Цитокины (Хемокины)

Содержание карбониллов белков и продуктов ПОЛ в сыворотке крови у больных алкоголизмом и здоровых доноров

Исследуемые группы	Карбонилы белков, нмоль/мг	Продукты ПОЛ, мкмоль/л
Здоровые доноры	0,089±0,018 (n=5)	4,10±0,2 (n=10)
Больные в стадии абстиненции	0,296±0,080* (n=9)	4,79±0,3*# (n=22)
Больные в стадии формирования ремиссии	0,212±0,050* (n=5)	3,96±0,2 (n=22)

- Примечание: в скобках указано количество обследованных доноров;
- * - различия достоверны по сравнению с параметрами в группе здоровых доноров $p < 0,05$;
- # - различия достоверны по сравнению с параметрами в группе больных в стадии формирования ремиссии, $p < 0,05$.

ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИПИДНОГО МАТРИКСА ЭРИТРОЦИТОВ В РАЗНЫХ ГРУППАХ ДОНОРОВ

(Изменение чувствительности липидного бислоя к этанолу и ацетальдегиду)
Степень эксимеризации пирена (F470/F392)

Группы доноров	Контроль	Этанол		Ацетальдегид	
		0,25%	0,50%	0,10%	0,25%
Здоровые	1,10±0,11 (8)	1,28±0,04* (5)	1,30±0,03* (8)	1,35±0,04* (3)	1,31±0,03* (8)
Больные (абстиненция)	0,69±0,10# (5)	0,78±0,11 (3)	0,81±0,07 (3)	0,69±0,16 (3)	0,74±0,15 (3)
Больные (формирование ремиссии)	0,74±0,08# (9)	0,84±0,09 (8)	0,97±0,01* (7)	0,85±0,12 (4)	0,71±0,14 (4)

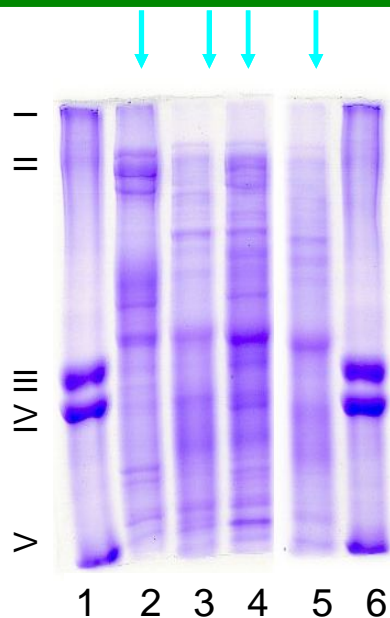
- $p < 0,025$ в контроле по сравнению со здоровыми;

* - $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим контролем.

В скобках указано количество обследованных доноров

Окислительная модификация мембранных белков у больных алкоголизмом

Электрофореграммы теней эритроцитов



→ 1, 6 - стандарты белков (I - тироглобулин 330 KD, II - ферритин 220 KD, III - альбумин 67 KD, IV - каталаза, 60 KD, V - лактатдегидрогеназа 36 KD);

→ 3, 5 - тени эритроцитов здоровых доноров;

→ 2 - тени морфологически измененных эритроцитов больного алкоголизмом

→ 4 - тени морфологически нормальных эритроцитов больного алкоголизмом

Содержание карбониллов белков в тенях эритроцитов (M±m)

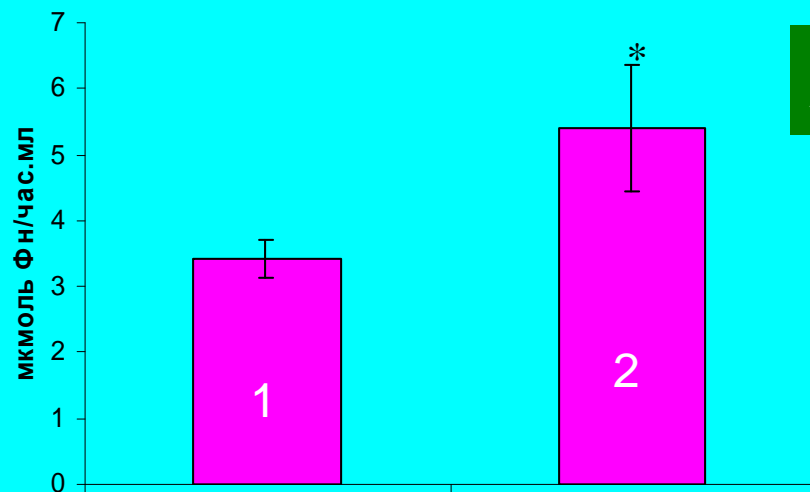
Группы	Карбонилы, нмоль/мг белка
Здоровые доноры	0,034 ± 0,002 (7)
Больные алкоголизмом, общая группа	0,589 ± 0,060* (12)
Больные алкоголизмом с эритроцитами патологической формы	0,760 ± 0,090*# (3)
Больные алкоголизмом с морфологически нормальными эритроцитами	0,524 ± 0,060* (9)

Примечание. * $p < 0,001$ – различия достоверны по сравнению со здоровыми донорами; # $p < 0,01$ по сравнению с группой больных с морфологически нормальными эритроцитами; в скобках указано количество обследованных доноров.

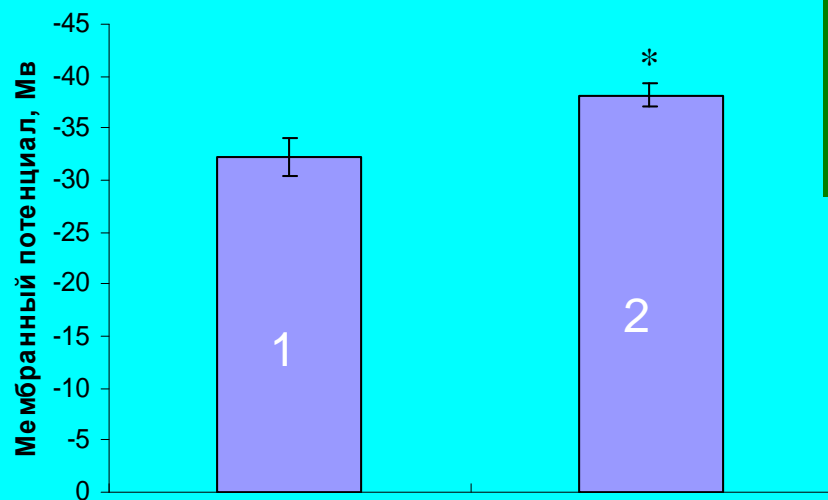
Функциональные нарушения мембран эритроцитов при алкоголизме

- В период абстиненции активность Na,K-АТФазы эритроцитов повышается. Увеличивается Ca^{2+} -зависимая калиевая проницаемость мембран эритроцитов.
- Мембранные системы, обеспечивающие транспорт катионов, благодаря наличию в организме разнообразных регуляторных механизмов, переходят в новое функциональное состояние, пытаясь приспособить клетку к работе в новых условиях, создавшихся в результате хронического действия этанола и его метаболитов
- Однако резервы адаптации биологических мембран ограничены, поэтому длительное воздействие алкогольной интоксикации на организм приводит в конце концов к необратимым изменениям эритроцитов, их гемолизу и развитию анемии.

Ион-транспортирующие системы эритроцитов (1 –здоровые доноры, 2 – больные алкоголизмом)



Активность Na/K-АТФазы



Проводимость Ca^{2+} -
зависимых K^{+} -каналов

* - $p < 0,05$ по сравнению со здоровыми.

Свойства «идеального» антиоксиданта

Антиоксидант

- должен проявлять выраженное антиоксидантное действие;
- быть природным;
- быть гидрофильным;
- обладать хорошей биодоступностью;
- быть не токсичным и не образовывать токсичных продуктов при взаимодействии с активными формами кислорода;
- не оказывать негативных эффектов в случае передозировки;
- иметь хорошую совместимость с другими препаратами.

Б л а г о д а р ю
за в н и м а н и е