

# Тема 9

**Антиоксидантная  
защита мозга**

# Особенности окислительного метаболизма мозга

- **Высокий уровень потребления кислорода**
- **Большое количество липидов с ненасыщенными жирнокислотными радикалами**
- **Насыщенность железом белков-переносчиков**
- **Низкий уровень антиоксидантной защиты**

# БАЛАНС АФК В ЖИВЫХ КЛЕТКАХ

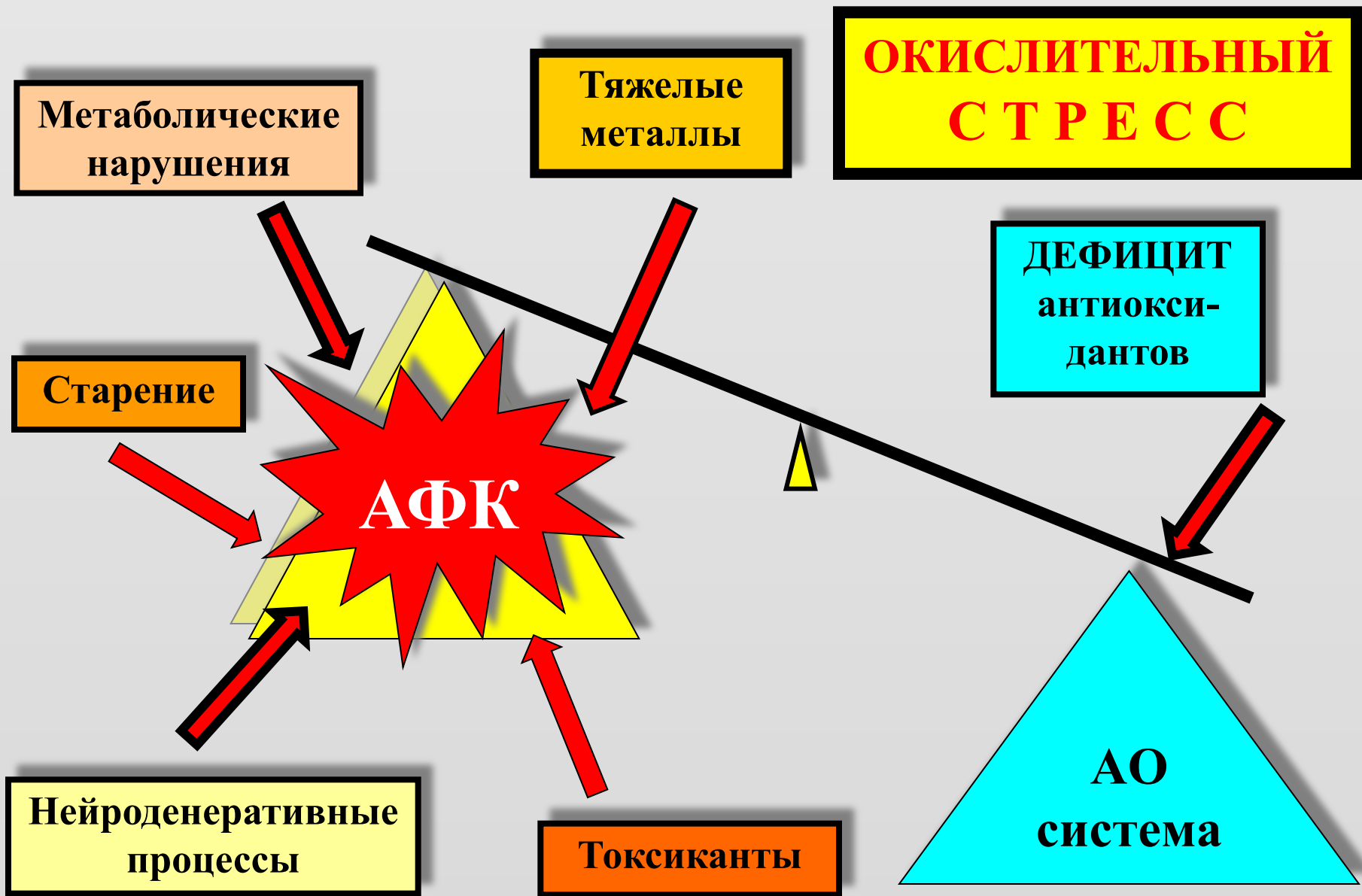


**ГЕНЕРАЦИЯ  
АФК**

**ТУШЕНИЕ  
АФК**

**Дыхательная цепь митохондрий,  
NADPH-оксидаза нейтрофилов,  
микросомальное окисление,  
неферментативное окисление  
биогенных аминов**

**СОД, Каталаза, Пероксидазы,  
Низкомолек. антиоксиданты  
(мочевая кислота, таурин,  
витамины А, С, Е, карнозин, N-  
ацетилцистеин, глутатион),  
хелаторы ионов железа**



**ТАБЛИЦА III-3. Тушители активного кислорода и свободных радикалов и антиоксиданты**

<b>Антиоксиданты</b>	<b>Локализация</b>	<b>Функция</b>
<i><b>Ферменты и белки</b></i>		
<i>СОД</i> <i>Cu/Zn-СОД</i>	Эритроциты, цитоплазма	Тушение $O_2^{\cdot -}$
<i>Mn-СОД</i>	Митохондрии	Тушение $O_2^{\cdot -}$
<i>Внеклет. СОД</i>	Плазма крови, стенки сосудов	Тушение $O_2^{\cdot -}$
<i>Каталаза</i>	Пероксисомы	Тушение $H_2O_2$
<i>Глутатионпероксидаза</i>	Цитоплазма, митохондрии	Деградация $H_2O_2$ и перекисей липидов
<i>трансфераза</i>	Наружная мембрана, митохондрии, эндоплазматический ретикулум	Деградация $H_2O_2$ и перекисей липидов
<i>Феритин</i>	Цитоплазма	Хелатор $Fe^{2+}$
<i>Трансферин</i>	Внеклеточная среда	Хелатор $Fe^{2+}$
<i>Лактоферин</i>	Внеклеточная среда	Хелатор $Fe^{2+}$
<i>Церулоплазмин</i>	Внеклеточная среда	Хелатор $Cu^{2+}$ , окисление $Fe^{2+}$ , тушение $O_2^{\cdot -}$
<i>Альбумин</i>	Внеклеточная среда	Хелатор $Cu^{2+}$ , тушитель $OH^{\cdot}$ , $LOO^{\cdot}$ , $HOCl$
<i><b>Низкомолекулярные соединения</b></i>		
<i>Витамин Е</i>	Биомембраны	Тушение $OH^{\cdot}$ , $LOO^{\cdot}$ , $HOCl$ и т. п.
<i>Убихинон</i>	Биомембраны	Тушение $OH^{\cdot}$ , $LOO^{\cdot}$ , $HOCl$ и т.п.
<i>Каротиноиды</i>	Биомембраны	Тушение $OH^{\cdot}$ , $LOO^{\cdot}$ , $HOCl$ , $^1O_2$
<i>Витамин С</i>	Цитоплазма	Тушение $OH^{\cdot}$ , $O_2^{\cdot -}$
<i>Карнозин</i>	Цитоплазма	Тушение $OH^{\cdot}$ , $O_2^{\cdot -}$ , нейтрализация гипохлорита
<i>Таурин</i>	Цитоплазма	Нейтрализация гипохлорита
<i>Глутатион</i>	Цитоплазма, митохондрии	Тушение $OH^{\cdot}$ , $O_2^{\cdot -}$
<i>Мочевая кислота</i>	Кровь	Предотвращение перекисного окисления липидов
<i>Билирубин</i>	Кровь	Предотвращение перекисного окисления липидов

# Антиоксидантные ферменты и низкомолекулярные антиоксиданты

Супероксиддисмутаза (разные формы содержат Cu/Zn и Mn):



Каталаза (гемосодержащий фермент):



Глутатионпероксидаза (содержит остаток селеноцистеина):



Глутатионредуктаза (содержит FAD):



Токоферол (вит. E)

Ретинол (вит. A)

Аскорбиновая кислота (вит. C)

Глутатион восстановленный

N-ацетилцистеин

Мочевина, мочевая кислота

Карнозин и другие гистидинсодержащие дипептиды

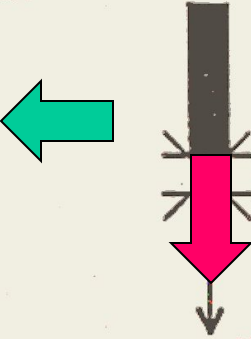
**РЕГУЛЯ  
ЦІЯ**

**Active Oxygen sources**

- cell organelle
- leukocytes & macrophages
- xanthine oxidase
- chemicals
- NO synthase

**Antioxidants**

Enzymes	Compounds
• SOD	• transferrin
• catalase	• ferritin
• GSH peroxidase	• ceruloplasmin
• G-6PD	• vitamin E
	• vitamin C
	• uric acid



**Cell Component**

- lipid
- protein
- DNA • RNA
- others

**Cell Damage** → **Cell Death**

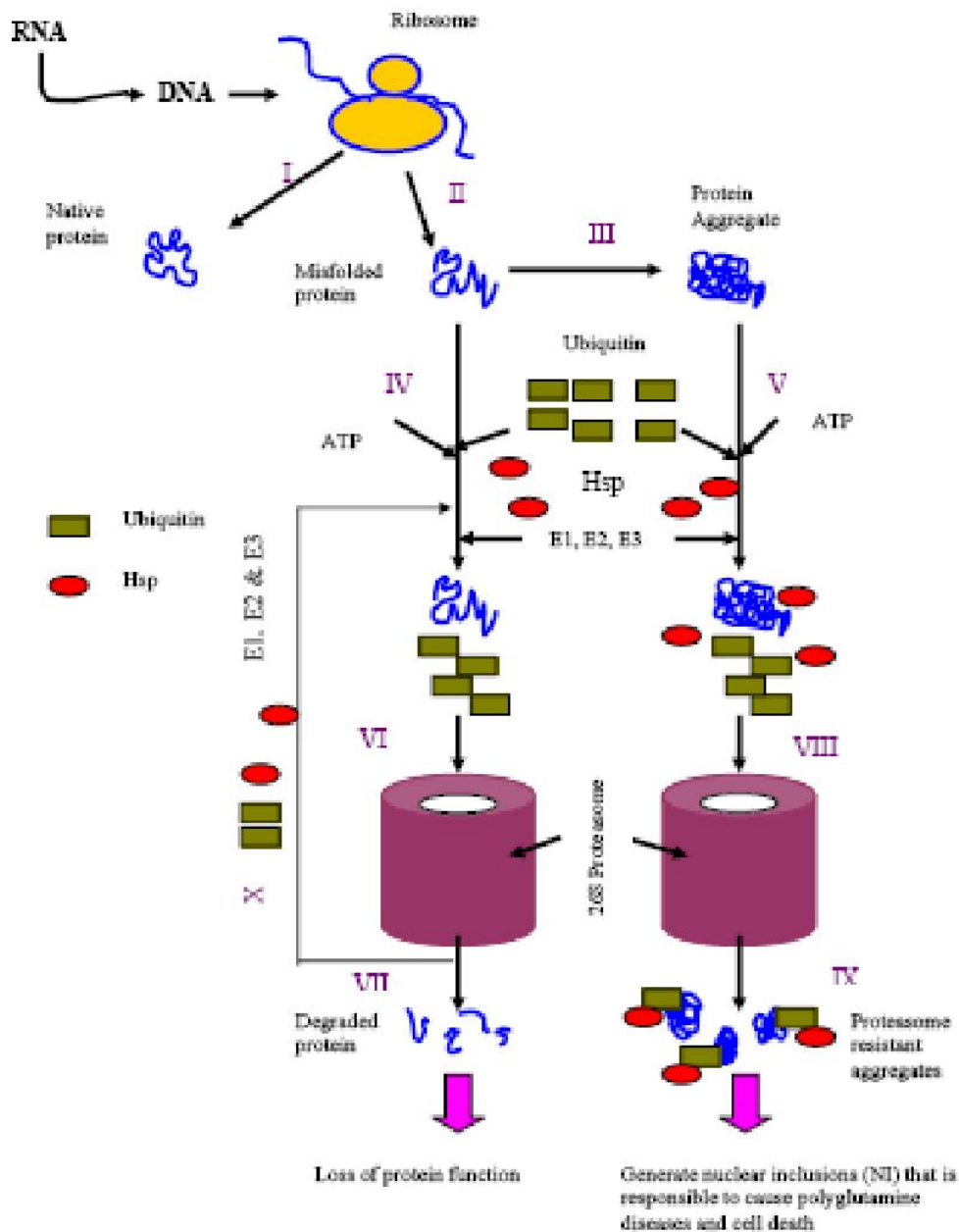
**Synthesis or Reconstitution**

- protein synthesis
- lipid acylation
- DNA polymerase, ligase

**Degradation of Damaged Molecules and Removal**

- phospholipase
- macroproteinase
- DNA glycosylase

**Cell Repair**



# УБИКВИТИ- НИЛИРОВАНИЕ И ДЕГРАДАЦИЯ ПОВРЕЖДЕННЫХ МОЛЕКУЛ БЕЛКА



# **Контроль уровня АФК клетками глии**

- Соотношение глия/нейроны  
растет в онтогенезе от 0,2 до  
1,6 (человек)**
- Соотношение глия/нейрон в  
мозге Эйнштейна  
составляло 1,95**

# Роль каталазы

Контрольная культура

глиальных клеток

Knock-out

Glu-peroxidase -/-

$H_2O_2$

$H_2O_2$

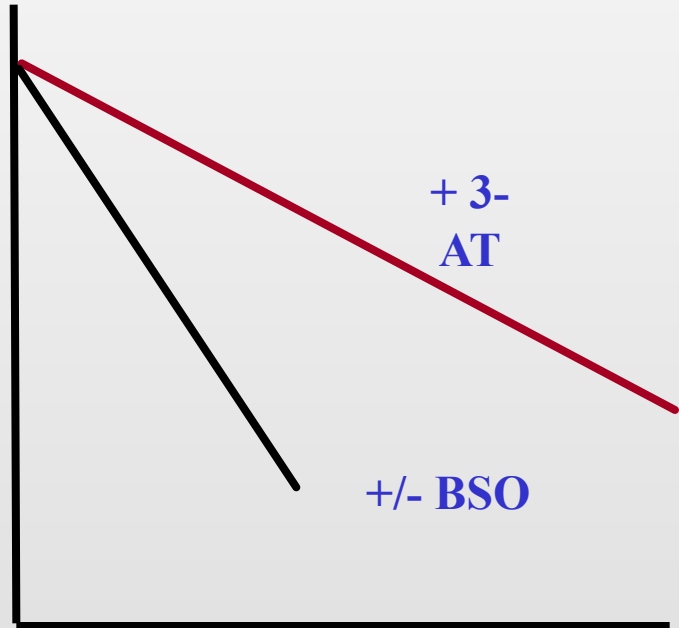
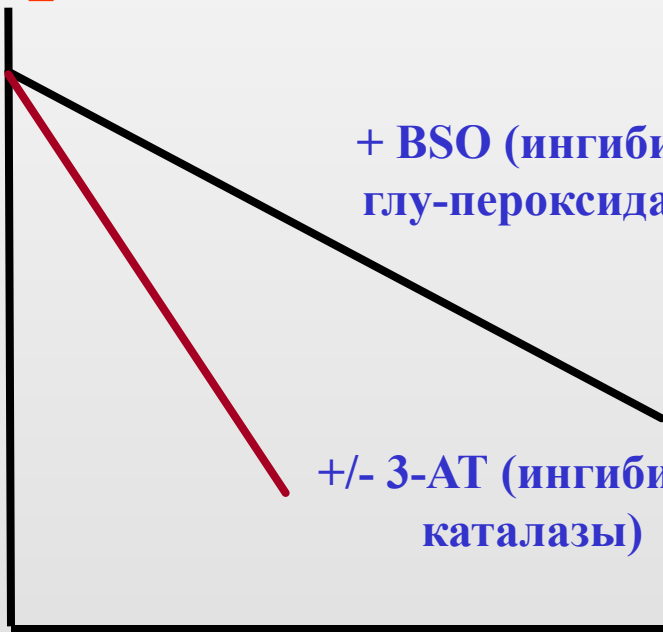
+ BSO (ингибитор  
глу-пероксидазы)

+ 3-  
AT

+/- 3-AT (ингибитор  
каталазы)

+/- BSO

Время



# GSH

## $\gamma$ -L-glutamyl-L-cysteinylglycine

- В клетках млекопитающих концентрация от 1 - 10 мМ
- В мозге ~ 1 - 5 мМ, в межклеточном пространстве присутствует в микромолярной концентрации
- Не проникает через гематоэнцефалический барьер (вопрос о специфическом переносчике открыт)
- Синтезируется из проникающих в клетку предшественников – глутамата, цистеина и глицина
- Метаболизм GSH имеет тонкие различия в клетках мозга разного типа (астроглия поддерживает необходимый уровень предшественников для синтеза GSH в нейронах)
- В синтезе принимают участие ферменты –  $\gamma$ GluCys синтетаза и глутатион синтетаза
- Конечный продукт окисления – глутатион дисульфид (GSSG), восстанавливается глутатионредуктазой (NADPH), GSH/GSSG порядка 1000/1
- Уровень внутриклеточного глутатиона изменяется при патологиях (показано снижение уровня на 40-50% при болезни Паркинсона и, наоборот, возрастание при гомоцистеинемии)

# Функции GSH в клетках

- Антиоксидантная - прямое взаимодействие с радикалами в неэнзиматических реакциях (Saer et al.,1990; Winterbourn, 1994); донор электронов в реакциях восстановления перекисей, катализируемых глутатион пероксидазами (Chance et al., 1979)
- Обеспечивает поддержание тиолового статуса клетки путем сохранения сульфгидрильных групп в восстановленном состоянии (Cotdrave and Gudes, 1997)
- Участник процесса детоксикации ксенобиотиков, кофактор в реакциях изомеризации, форма хранения и транспортировки цистеина (Meister and Anderson, 1983; Cooper, 1997)
- Участник процессов пролиферации (Pool et al., 1995)
- Участие в регуляции апоптоза (Chibelli et al., 1998; Hall, 1999)
- **NEW!** Является нейротрансмиттером и нейромодулятором (в микромолярных концентрациях является агонистом глутаматных рецепторов; в миллимолярных концентрациях модулирует SH – группы NMDA рецепторов) (Janaky et al., 1999)
- **NEW!** При определенных условиях может выступать в качестве прооксиданта (Paolicchi et al., 2002)

# Способы изменения содержания глутатиона в клетках *in vitro*

## - GSH

- CDNB (chloro-2,4-dinitrobenzene)  
цитозоль+ митохондрии
  - DEM (diethyl maleimide)  
цитозоль
- образуют конъюгаты с GSH в результате реакции, катализируемой глутатион-S-трансферазой

Уровень GSH оценивали *цитометрически* (непосредственно в живых клетках) – с помощью флуоресцентной краски на глутатион – CMFDA (chloromethyl fluorescein )

## +GSH

- использовали et-GSH (легко проникает в клетку благодаря этерифицированной группе глицинового остатка и деэтерифицируется внутриклеточно)

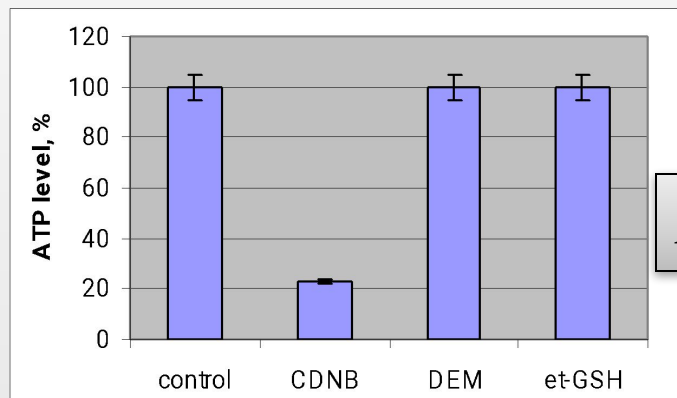
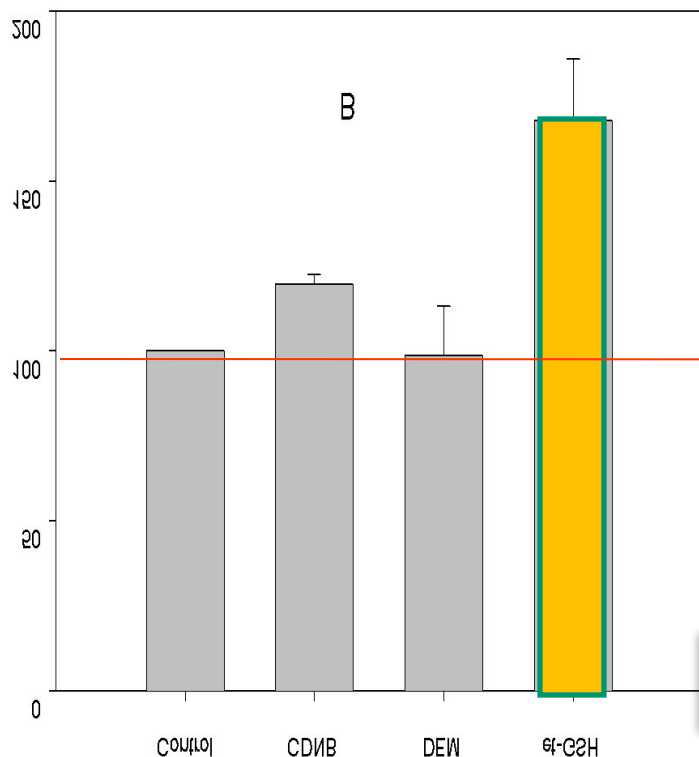
DEM – 1 mM, 1h

CDNB - 1 mM, 30 min

Et-GSH – 5 mM, 30 min

N=5

**Истощение цитозольного и митохондриального пулов GSH при помощи CDNB приводит к увеличению генерации митохондриальных АФК, снижает уровень АТФ в клетке, снижает транспортную активность Na,K-АТФазы, и, в конечном итоге, резко понижает жизнеспособность клеток**

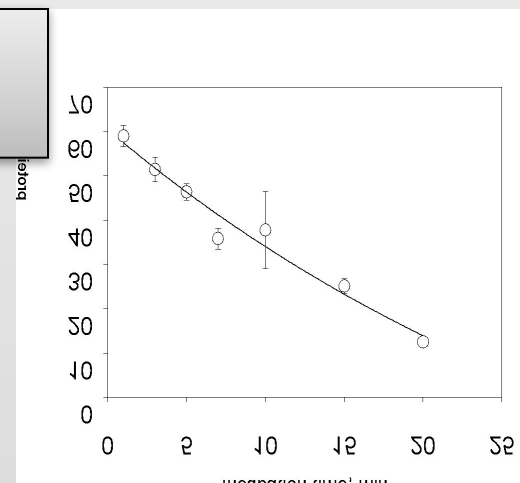


АТФ



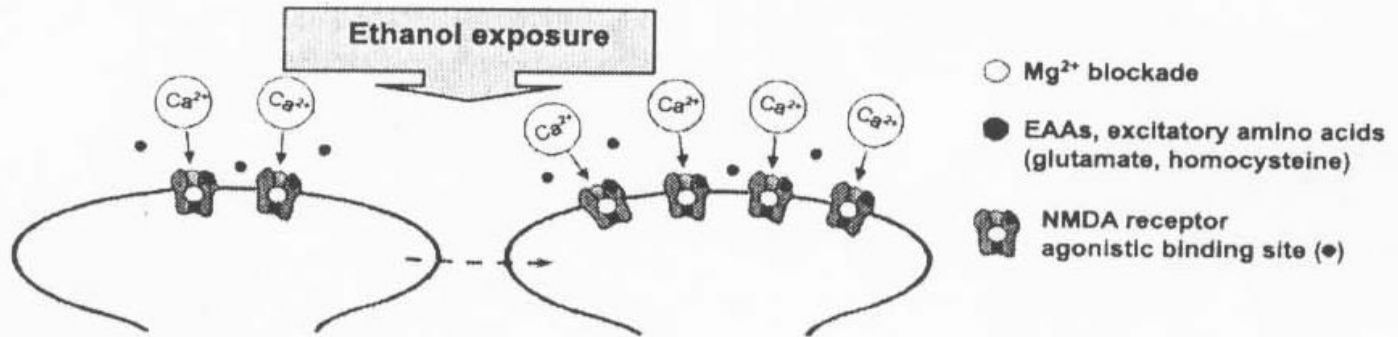
+ CDNB

АФК

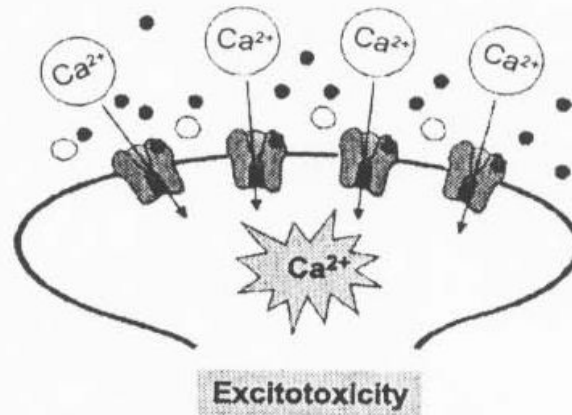


**123(DHR) – dihydrorhodamine, окисляется до катиона rhodamine 123, накапливается в митохондриях**

# Этанол



A. Chronic ethanol exposure with NMDA receptor inhibition and NMDA receptor up-regulation (right)



B. Ethanol withdrawal with increased NMDA receptor activation by glutamate and homocysteine

# Гомоцистеин (ГЦ) представляет собой серосодержащую аминокислоту

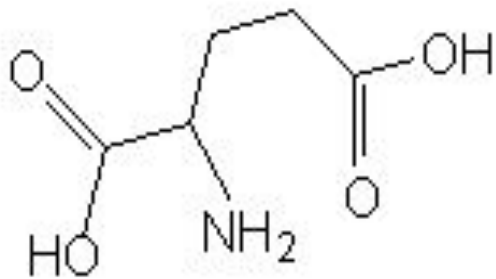
- история исследований, связанных с определением гомоцистеина, начинается с 1932 г., когда De Vigneaud обнаружил эту аминокислоту как продукт деметилирования метионина
- в организме активно участвует в окислительно-восстановительных реакциях, он способен к аутоокислению, в результате которого образуется гомоцистеиновая кислота [Welch G., 1998].
- вне клетки находится либо в окисленной форме (1%), либо в связанном с белками состоянии (70%).
- в понятие «общий гомоцистеин» входят все формы гомоцистеина, циркулирующие в плазме крови [Шевченко О.П., Олефриенко Г.А., 2002].
- диагноз гипергомоцистеинемии ставят в том случае, если уровень гомоцистеина в крови превышает 15 мкмоль/л.

Концентрация гомоцистеина в плазме крови в пределах

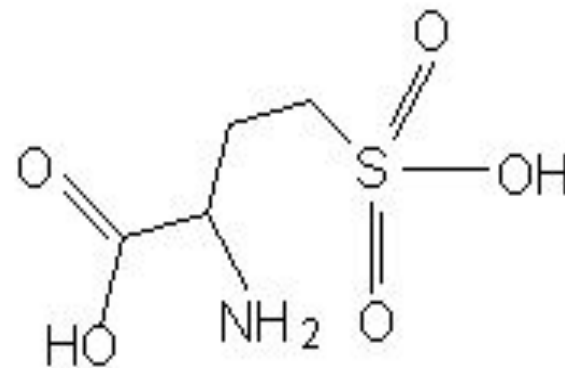
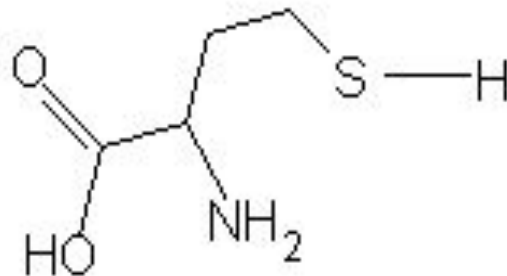
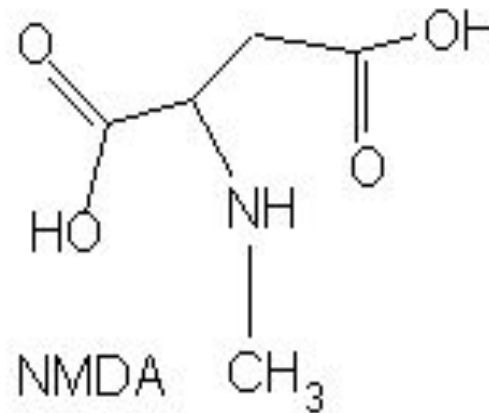
15–30 мкмоль/л свидетельствует об умеренной гипергомоцистеинемии,  
от 30 до 100 мкмоль/л – о промежуточной,  
100 – 500 мкмоль/л – тяжелой [Welch G., Loscalo J., 1998; Warren C., 2002].



# ГОМОЦИСТЕИН КАК ФАКТОР РИСКА ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА МОЗГА И СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ



Glu 70 mM (blood)  
several mM (synapse)



ГОМОЦИСТЕИН

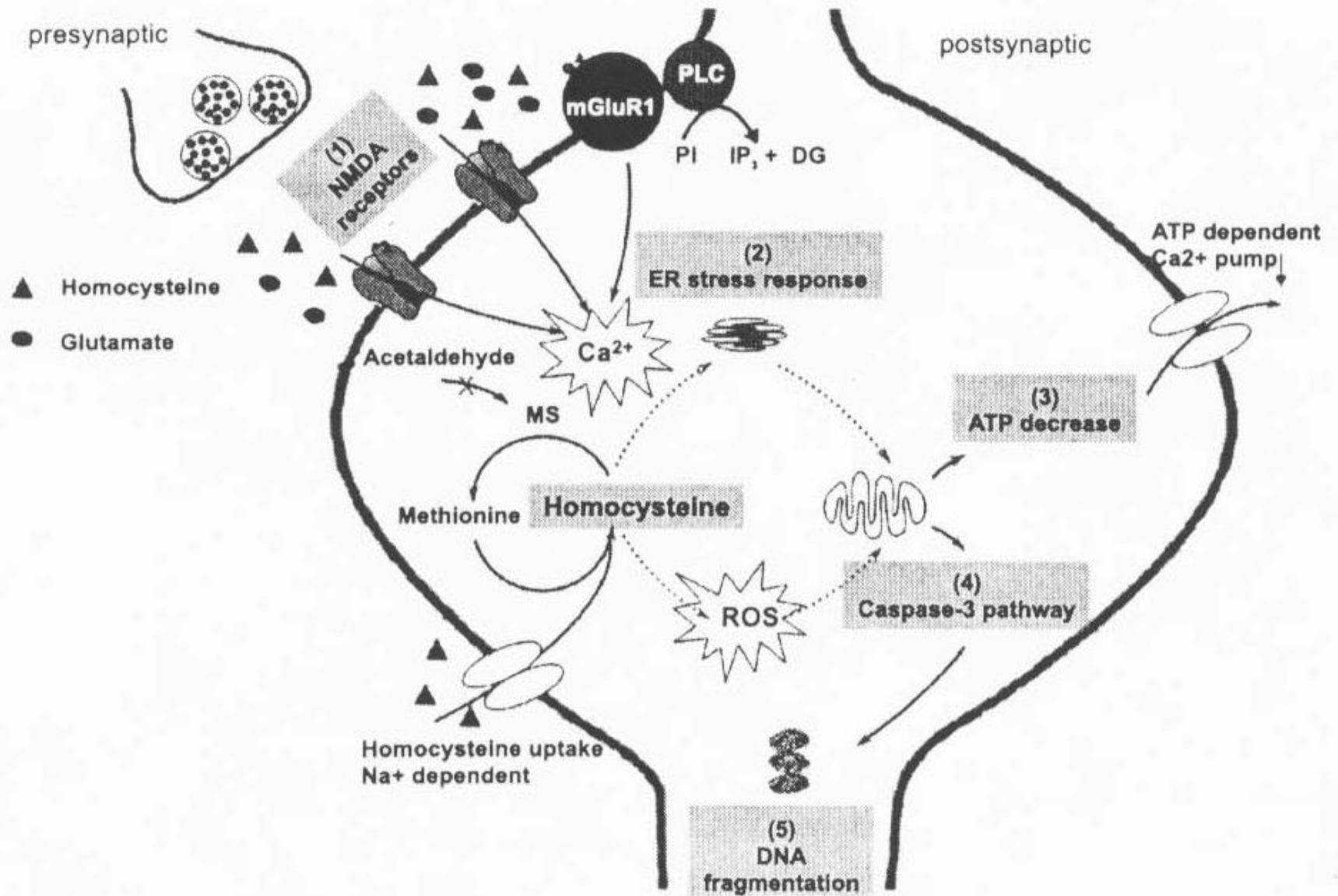
ГОМОЦИСТЕИНОВАЯ КИСЛОТА

# Причины и следствия повышения уровня гомоцистеина в плазме крови

- Нарушение какого - либо из этапов превращения ГЦ (вследствие недостатка витаминов или генетического дефекта ферментов)
- Сопутствующие заболевания (почечная недостаточность)
- Действие приема некоторых лекарственных препаратов



- Развитие сердечно-сосудистых патологий
- Тромбообразование (риск тромбоэмболии увеличивается в несколько раз)
- Атеросклероз  
в 1975 г. McCully предложил гомоцистеиновую теорию атеросклероза
- Нейро-дегенеративные заболевания (болезнь Альцгеймера)
- Нарушение течения беременности и формирования плода (главное - патологии развития нервной системы)



# Молекулярные последствия гипергомоцистеинемии

- Интенсификация метилирования нуклеиновых кислот, белков и фосфолипидов
  - Повышенный внутриклеточный уровень свободных радикалов
- 
- Модификация глутаматных рецепторов

**In vitro**

# Исследовали действие ГЦ и ГЦК на глутаматные рецепторы нейронов и лимфоцитов *in vitro* методом проточной цитометрии

В работе использовались следующие

флуоресцентные зонды:

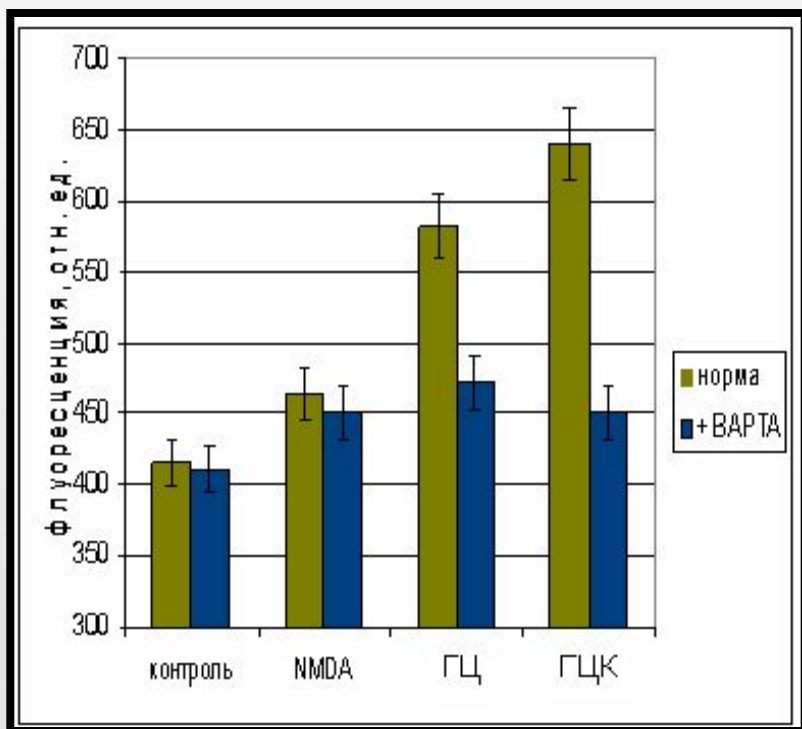
- **PI** (пропидий иодид)  $\lambda_{\text{ex}}=485$  нм,  $\lambda_{\text{em}}=610$ нм (оценка смертности)

**DCFH-DA** (2,7 – дихлордигидрофлуоресцеин)  $\lambda_{\text{exc}}=485$  нм,  $\lambda_{\text{em}}=530$ нм (оценка АФК)

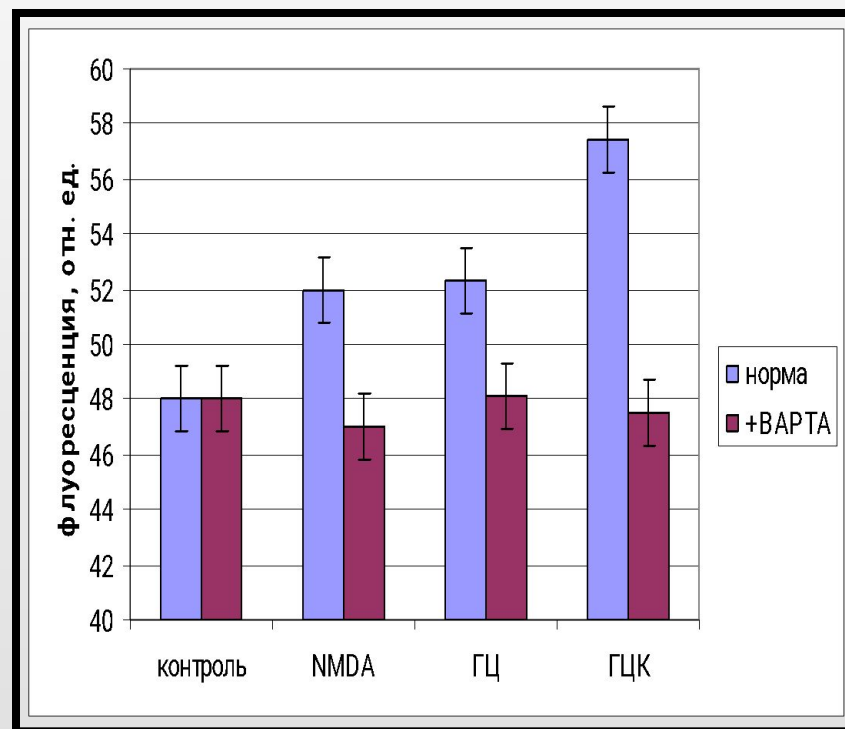
**Fluo-3 AM**  $\lambda_{\text{exc}}=488$  нм,  $\lambda_{\text{em}}=530$ нм (оценка цитоплазматического кальция)

**Аннексин V – FITC**  $\lambda_{\text{exc}}=488$  нм,  $\lambda_{\text{em}}=530$ нм (оценка степени экспонирования фосфатидилсерина на начальных стадиях апоптоза)

# Действие ГЦ и ГЦК на глутаматные рецепторы нейронов *in vitro*

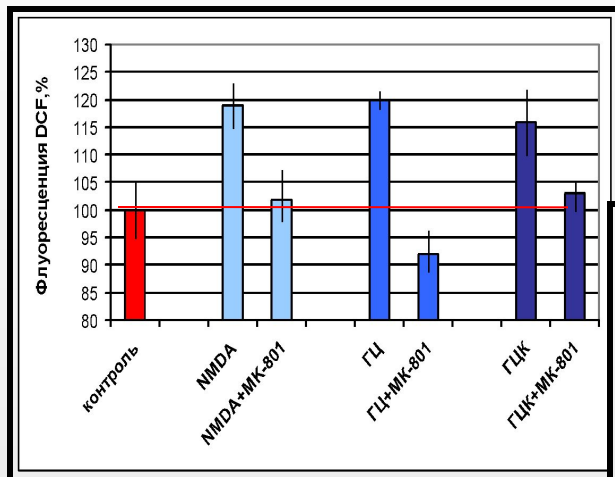


Кальций

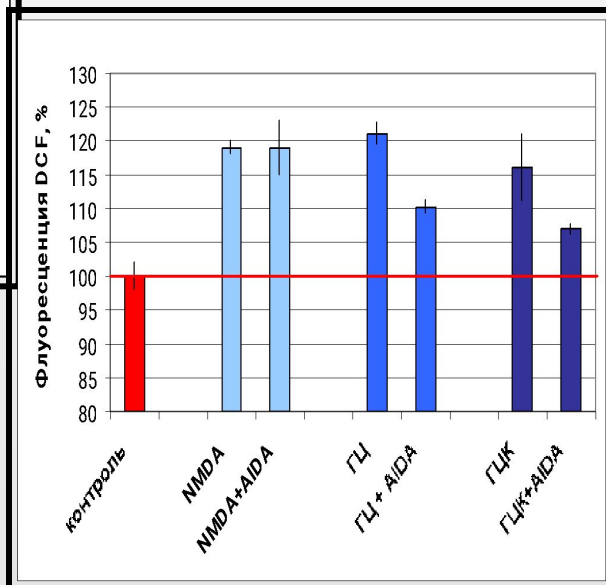


АФК

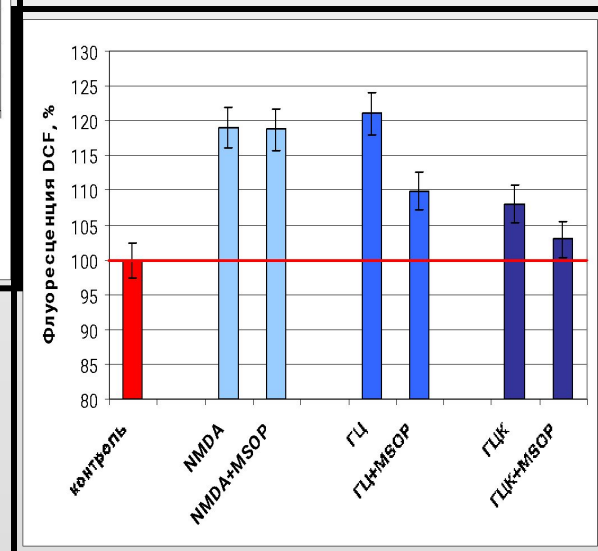
# ГЦ и ГЦК способны взаимодействовать как с ионотропными, так и с метаботропными глутаматными рецепторами



МК-801 – антагонист ионотропных рецепторов



AIDA – антагонист метаботропных рецепторов I класса

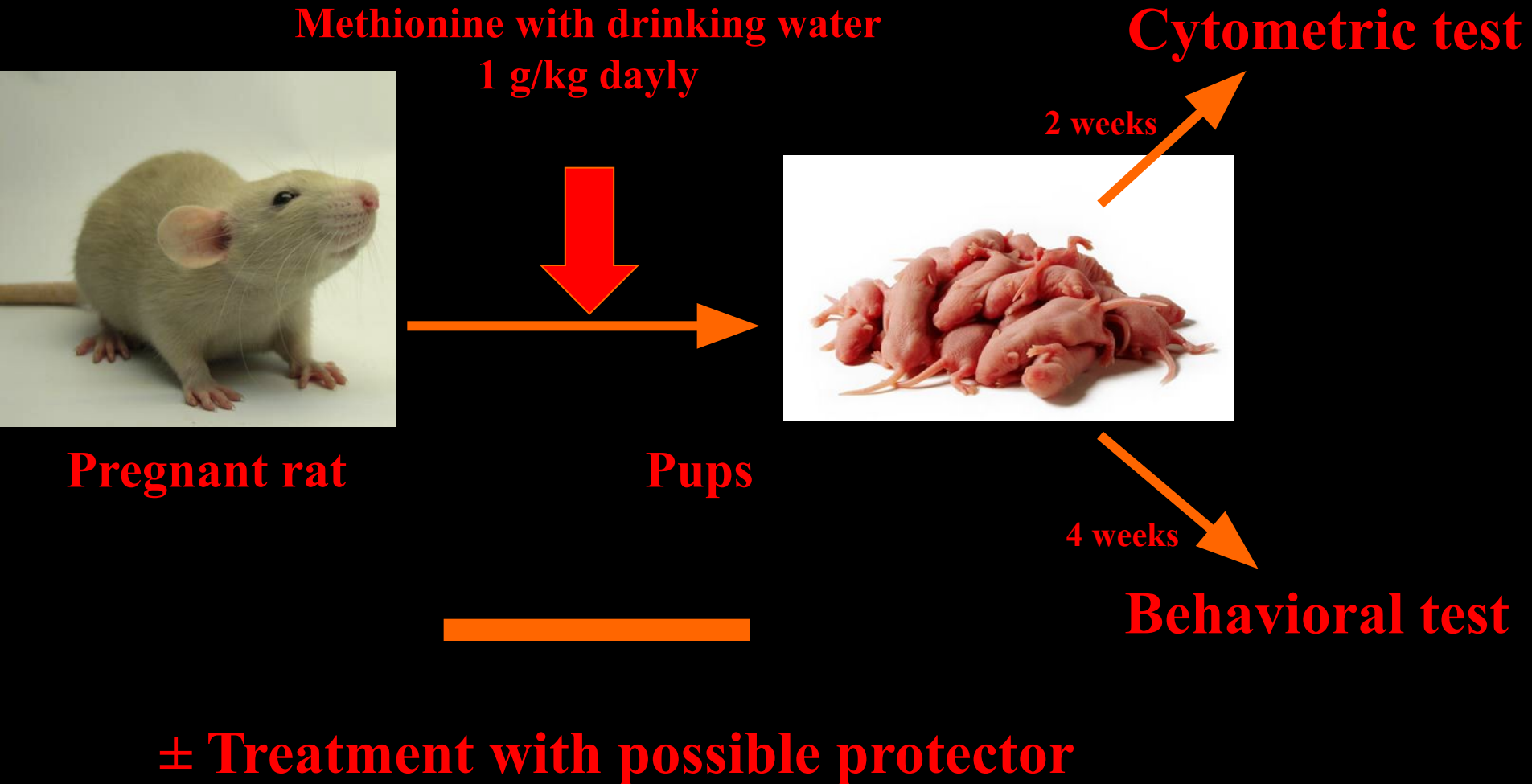


MSOP – антагонист метаботропных рецепторов III класса



**In vivo**

# Experimental protocol



# Модель пренатальной гипергомоцистеинемии

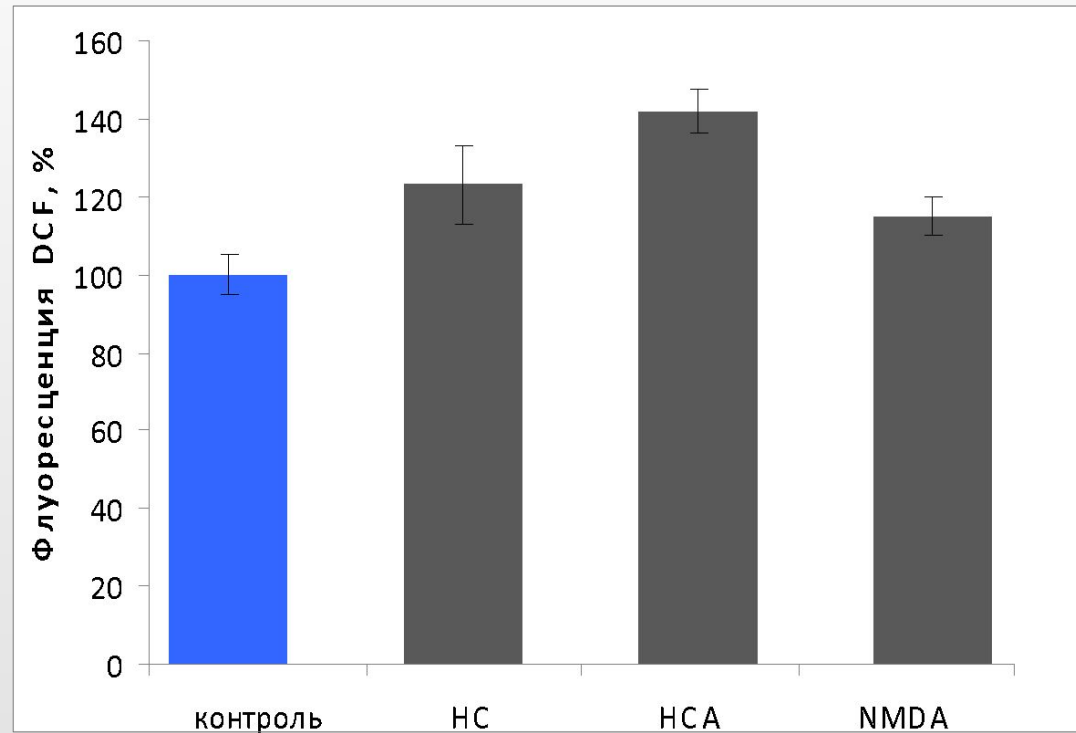
Группа	Диета	Количество семей	Среднее количество особей в помете	Вес (г) (для потомства в возрасте 10 дней)
<i>Группа 1 (контрольные)</i>	обычная диета	6	14 ± 2	23,3 ± 0,4
<i>Группа 2 (метиониновые)</i>	введение в питье беременных животных метионина (из расчета 1±0,01 г/кг веса с учетом объема потребляемой жидкости) и ограничение в рационе витаминов группы В и фолиевой кислоты	4 (6 – 2)	7 ± 1	18,9 ± 0,5
<i>Группа 3 (метионин + карнозин)</i>	то же + карнозин из расчета 0,1±0,01 г/кг веса	6	11 ± 2	22,9 ± 0,9

**Content of HC in the blood of rats  
under methionine  
over-loading**

- **Control      8-13 mkM**
- **Methionine  
overload 48-52 mkM**

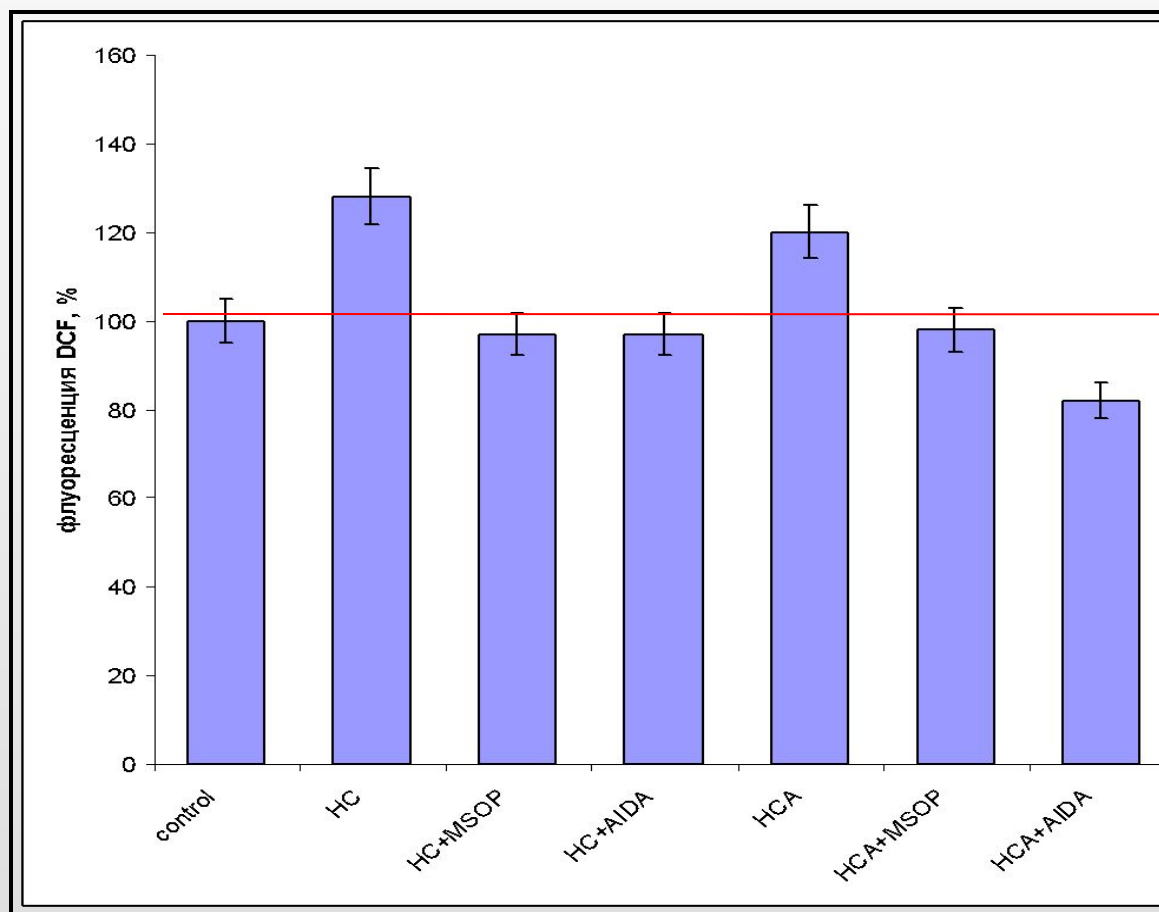
# Определение чувствительности глутаматных рецепторов к лигандам

Нейроны  
преинкубировали  
с NMDA,  
HCA и HC  
в концентрации  
500 мкМ 30 мин



1. У животных, получавших метионин, наблюдается тенденция к снижению чувствительности глутаматных рецепторов.
2. Рецепторы «метиониновых» животных утратили чувствительность к NMDA, однако чувствительность к HC и HCA сохранилась.

**В случае активации нейронов при инкубации с НС или НСА  
ответ нейронов реализуется через не-NMDA  
глутаматные рецепторы**

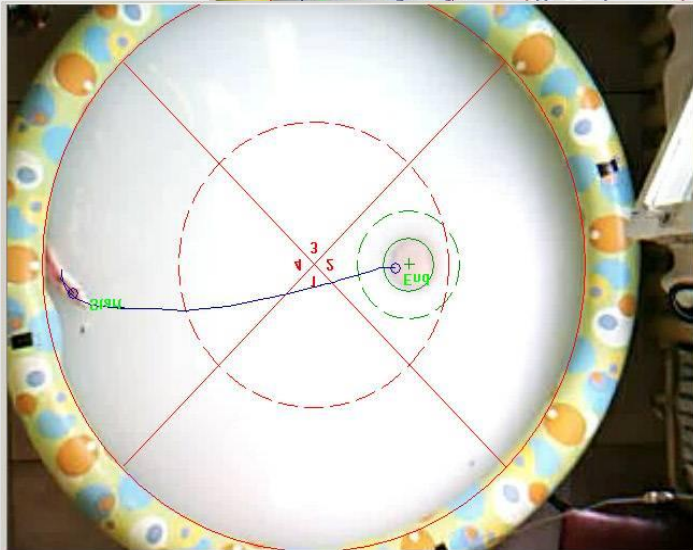
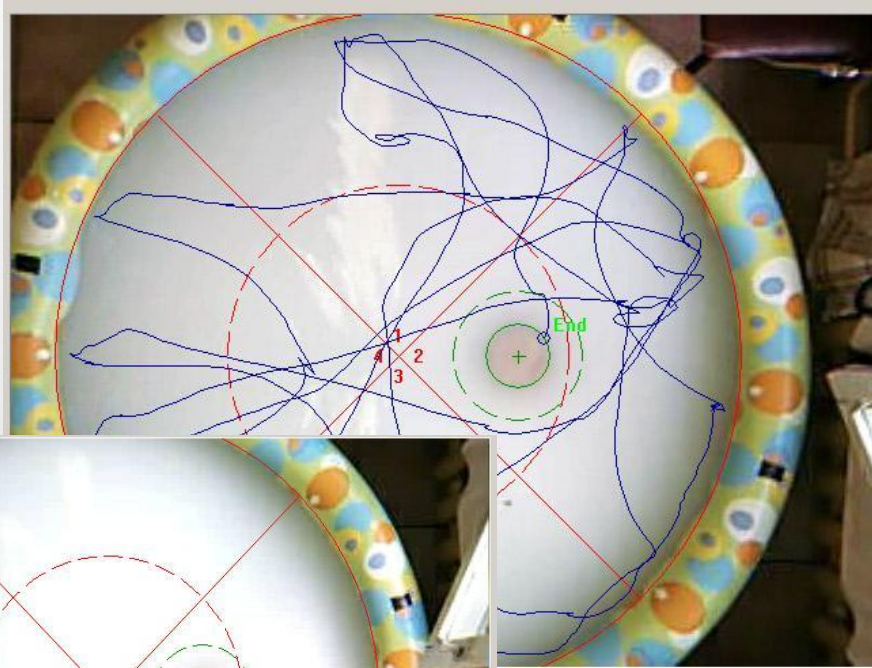


AIDA -  
антагонист  
mGlu 1

MSOP -  
антагонист  
mGlu3

# Тест Морриса

R .G. M. Morris et al. 1982. Nature, 297, 681-683.



При обработке данных использовали специальную программу, которая позволяет оценить следующие параметры:

- 1) время от начала движения крысы в бассейне до достижения ею платформы (в сек);
- 2) длину пути (в метрах);
- 3) среднюю скорость (в м/с);
- 4) сколько времени крыса плавала с быстрой, средней и медленной скоростью (в % от всего времени прохождения теста);
- 5) время нахождения крысы в центре бассейна (внутренний круг) или около бортика (внешний круг), что также позволяет оценить характер поисков

Проводили для 2 - 4 животных из каждой семьи в возрасте 2 - 4 месяцев. Животные содержались на диете, соответствующей каждой группе.

# Анализ результата теста Морриса

Оценивали пространственную ориентацию животных:

□ в первый день эксперимента осуществляется претренинг животных

□ во второй день животным предоставляется 4 -5 попыток найти платформу

<b>Регистрируемый параметр (данные представлены для четвертой попытки)</b>	<b>Группа 1 (контрольные)</b>	<b>Группа 2 (метиониновые)</b>	<b>Группа 3 (карнозиновые)</b>
<b>Время нахождения платформы, с</b>	<b><math>20 \pm 7</math></b>	<b><math>140 \pm 18</math></b>	<b><math>45 \pm 6</math></b>
<b>Длина траектории, м</b>	<b><math>5 \pm 2</math></b>	<b><math>20 \pm 5</math></b>	<b><math>8 \pm 2</math></b>
<b>Средняя скорость, м/с</b>	<b><math>0,24 \pm 0,02</math></b>	<b><math>0,18 \pm 0,02</math></b>	<b><math>0,25 \pm 0,04</math></b>
<b>Время нахождения в центральной области бассейна, в % от всего времени</b>	<b><math>20 \pm 7</math></b>	<b><math>7 \pm 5</math></b>	<b><math>35 \pm 5</math></b>

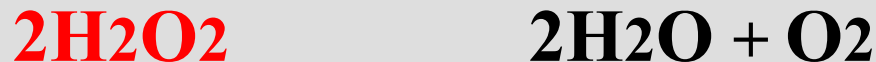


# Антиоксидантные ферменты и низкомолекулярные антиоксиданты

Супероксиддисмутаза (разные формы содержат Cu/Zn и Mn):



Каталаза (гемосодержащий фермент): →



Глутатионпероксидаза (содержит остаток селеноцистеина):



Глутатионредуктаза (содержит FAD):



Токоферол (вит. E)

Ретинол (вит. A)

Аскорбиновая кислота (вит. C)

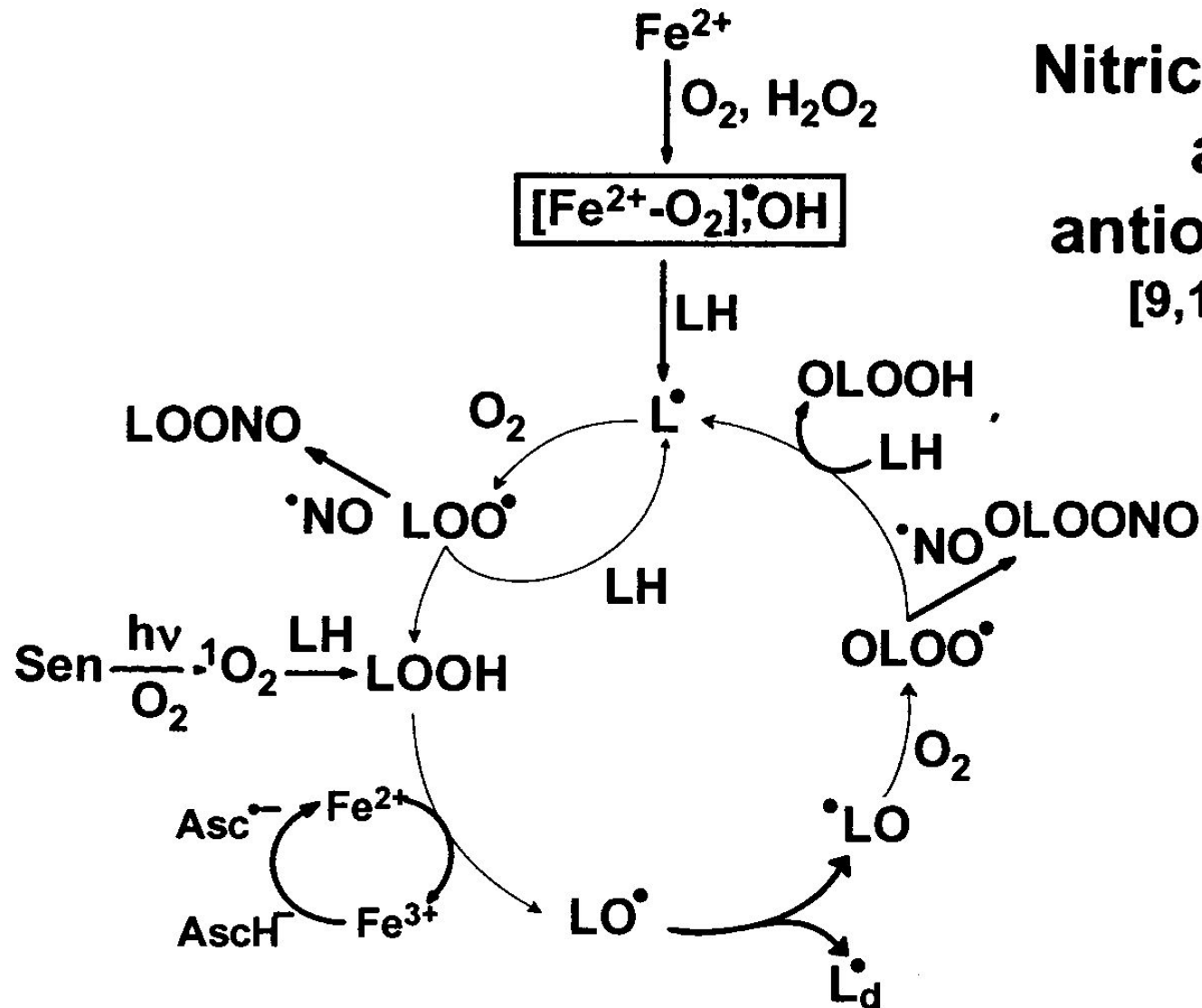
Глутатион восстановленный

N-ацетилцистеин

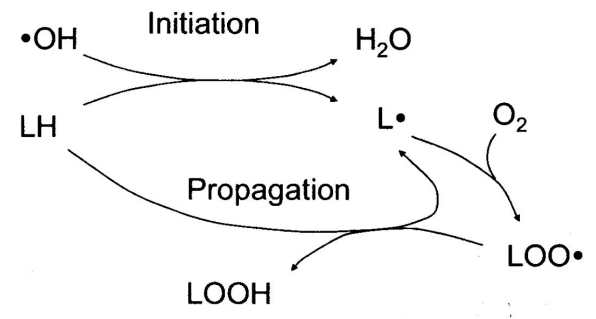
Мочевина, мочевая кислота

Карнозин и другие гистидинсодержащие дипептиды

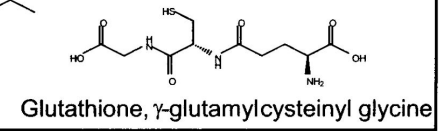
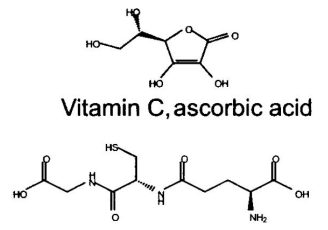
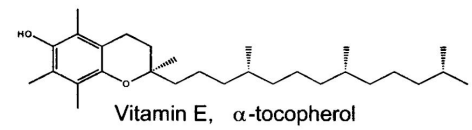
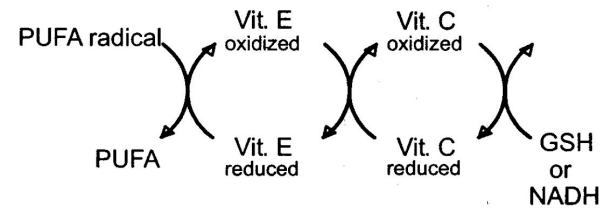
# Nitric Oxide, an antioxidant [9,10,11]



## Lipid peroxidation a major target for antioxidants

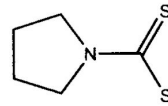


## 3- Potential interactions with co-antioxidants Antioxidants in defense against lipid peroxidation

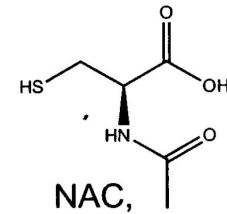


## 5- Can antioxidants function as pro-oxidants?

Thiols



PDTC,  
Pyrrolidinedithiocarbamate

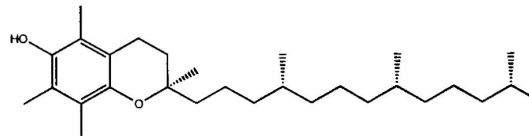


NAC,  
N-acetylcysteine

PDTC inhibits NF- $\kappa$ B DNA binding (6)

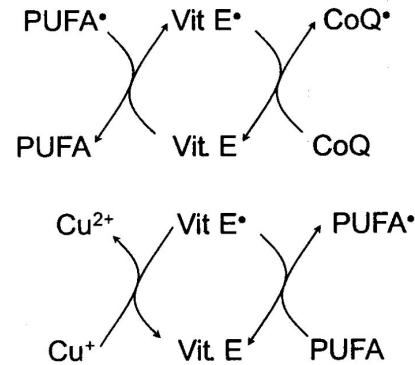
PDTC is a pro-oxidant copper chelator (7)

NF- $\kappa$ B activation by thiol oxidation (8□)

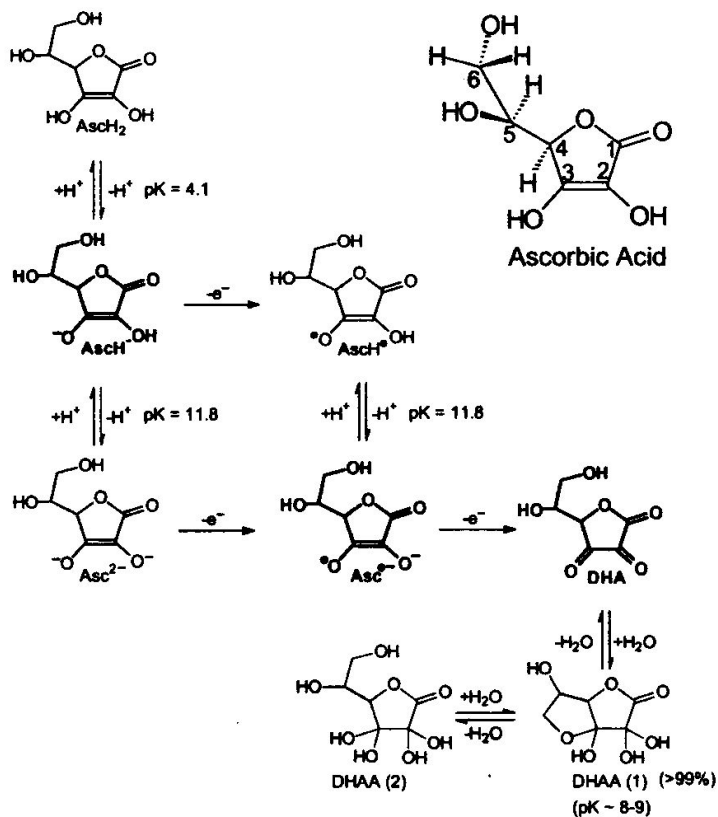


$\alpha$ -tocopherol, vitamin E

In the absence of a co-antioxidant,  $\alpha$ -tocopherol can be a pro-oxidant (9)



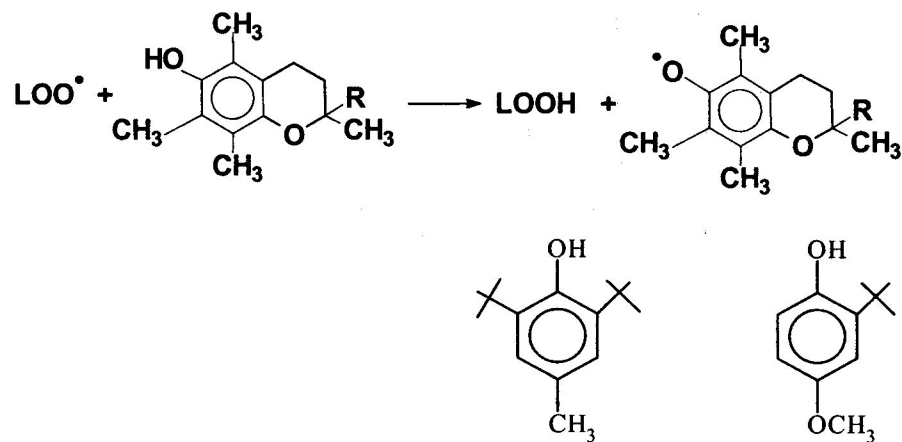
# Ascorbate a Donor Antioxidant



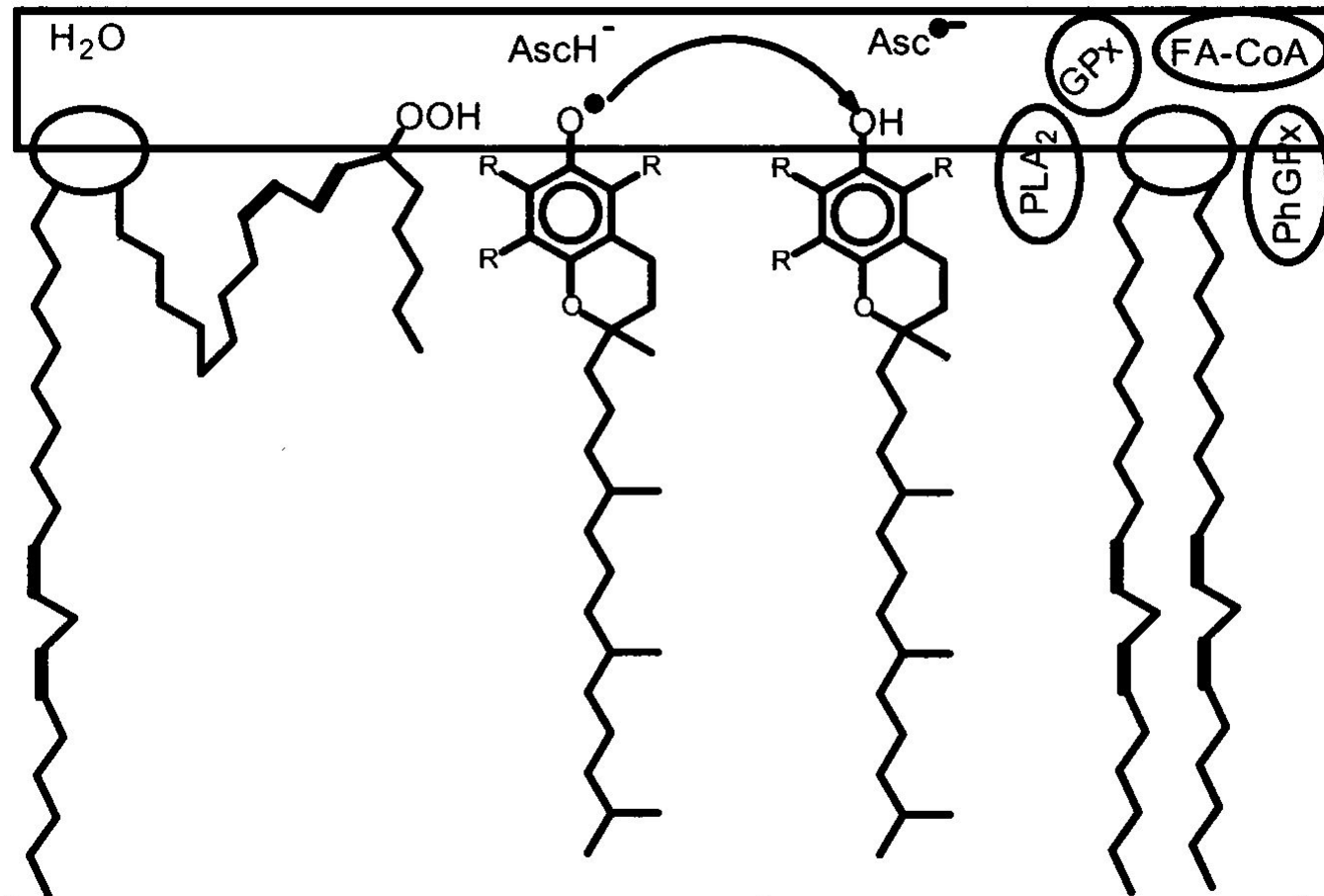
Buettner GR

SFRBM 2007 Sunrise Free Radical School

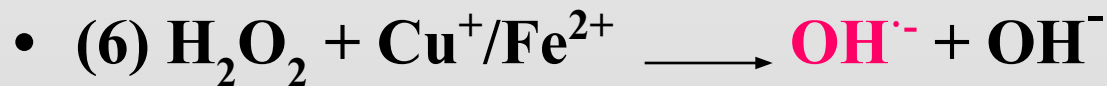
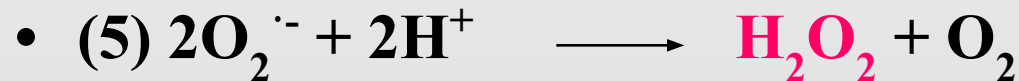
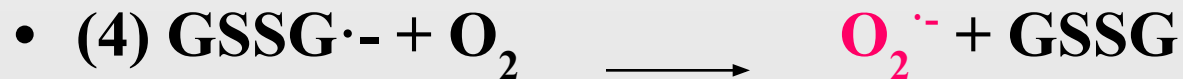
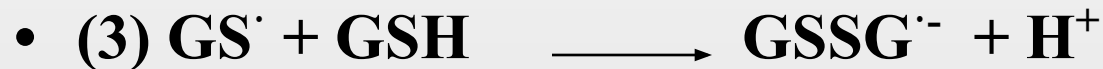
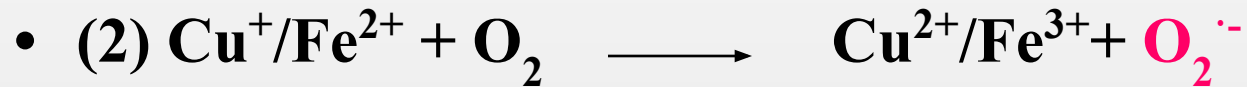
## Tocopherol in Action



# C and E as Co-Antioxidants



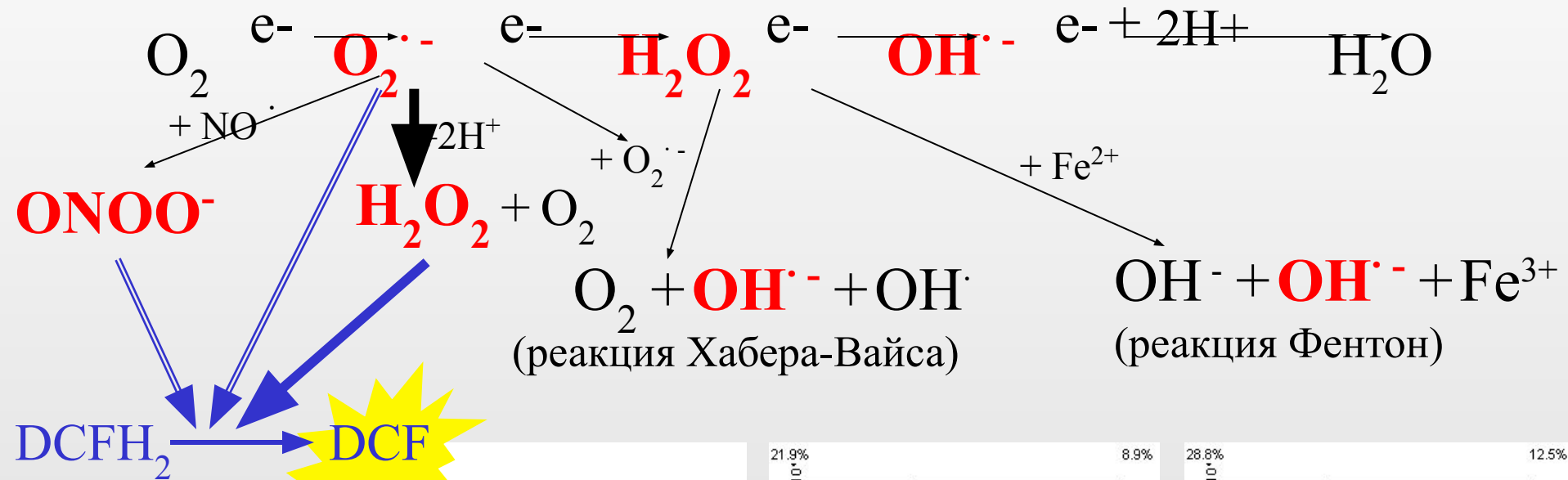
**Парадоксальное увеличение генерации АФК в нейронах в ответ на увеличение содержания GSH может быть связано с прооксидантным действием**



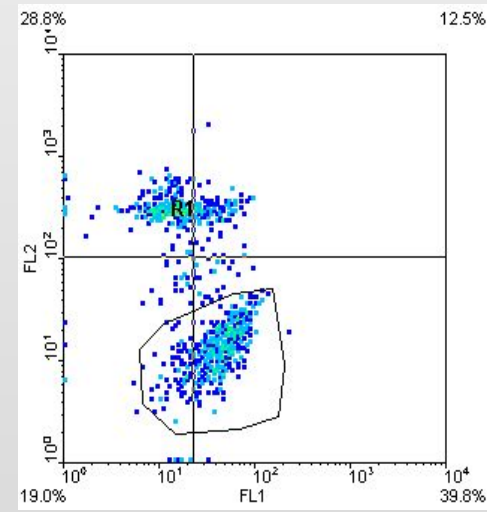
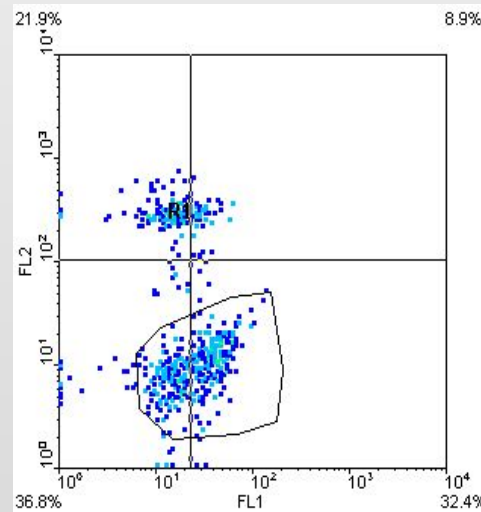
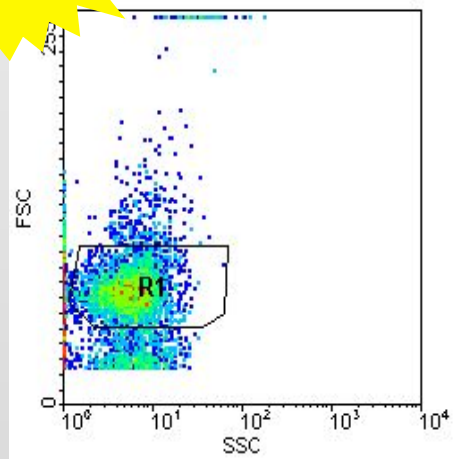


# Развитие окислительного стресса в нейроне.

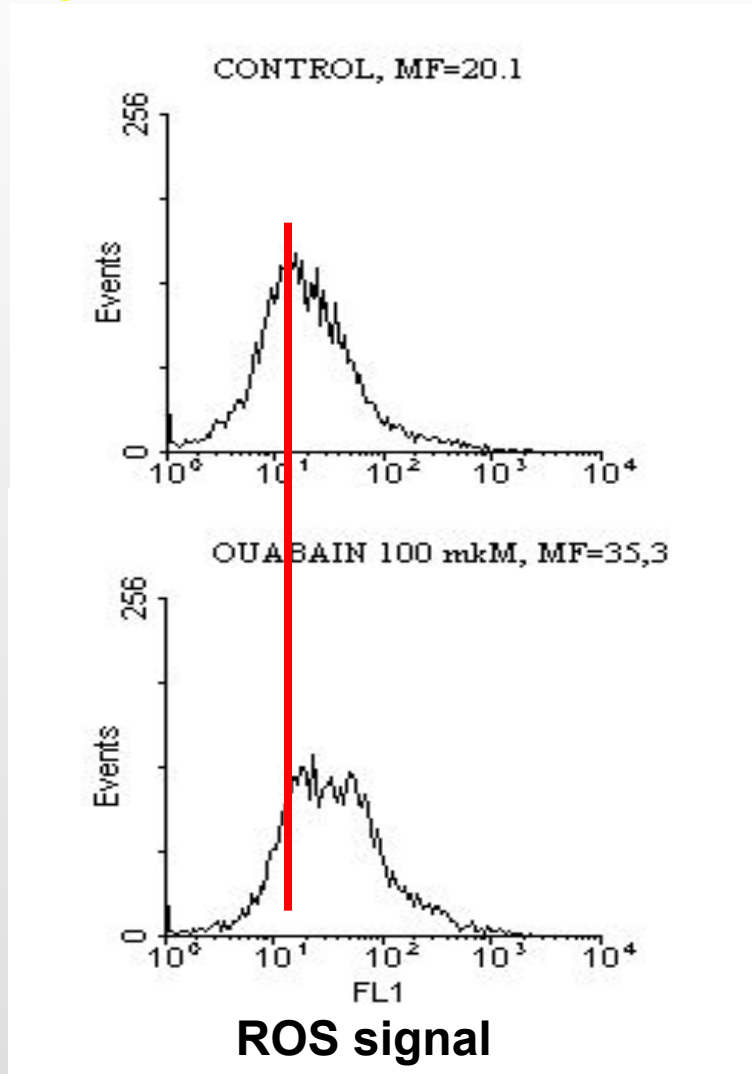
## Регистрация АФК методом проточной цитометрии



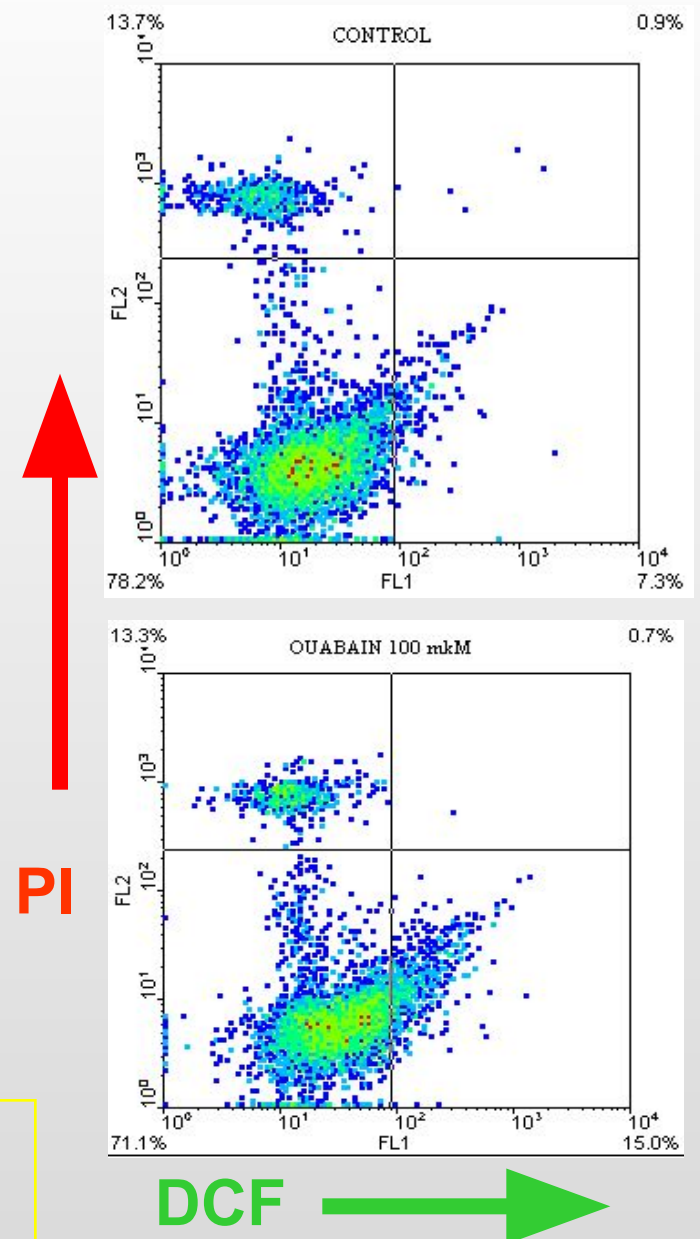
Не флуоресцирующая молекула DCF проникает в клетку, а ее окисленная форма флуоресцирует



# Влияние 100 $\mu\text{M}$ убаина на внутриклеточный уровень АФК в гранулярных клетках мозжечка

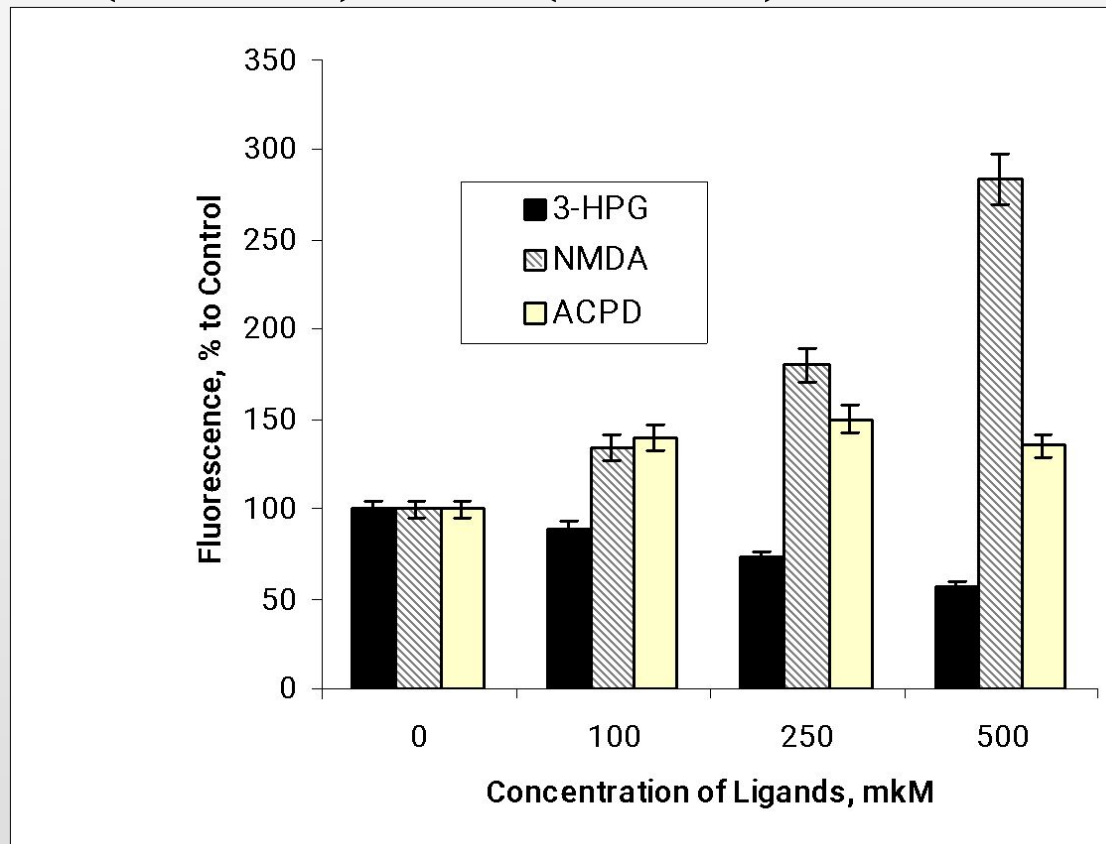


## PI versus DCF coordinates

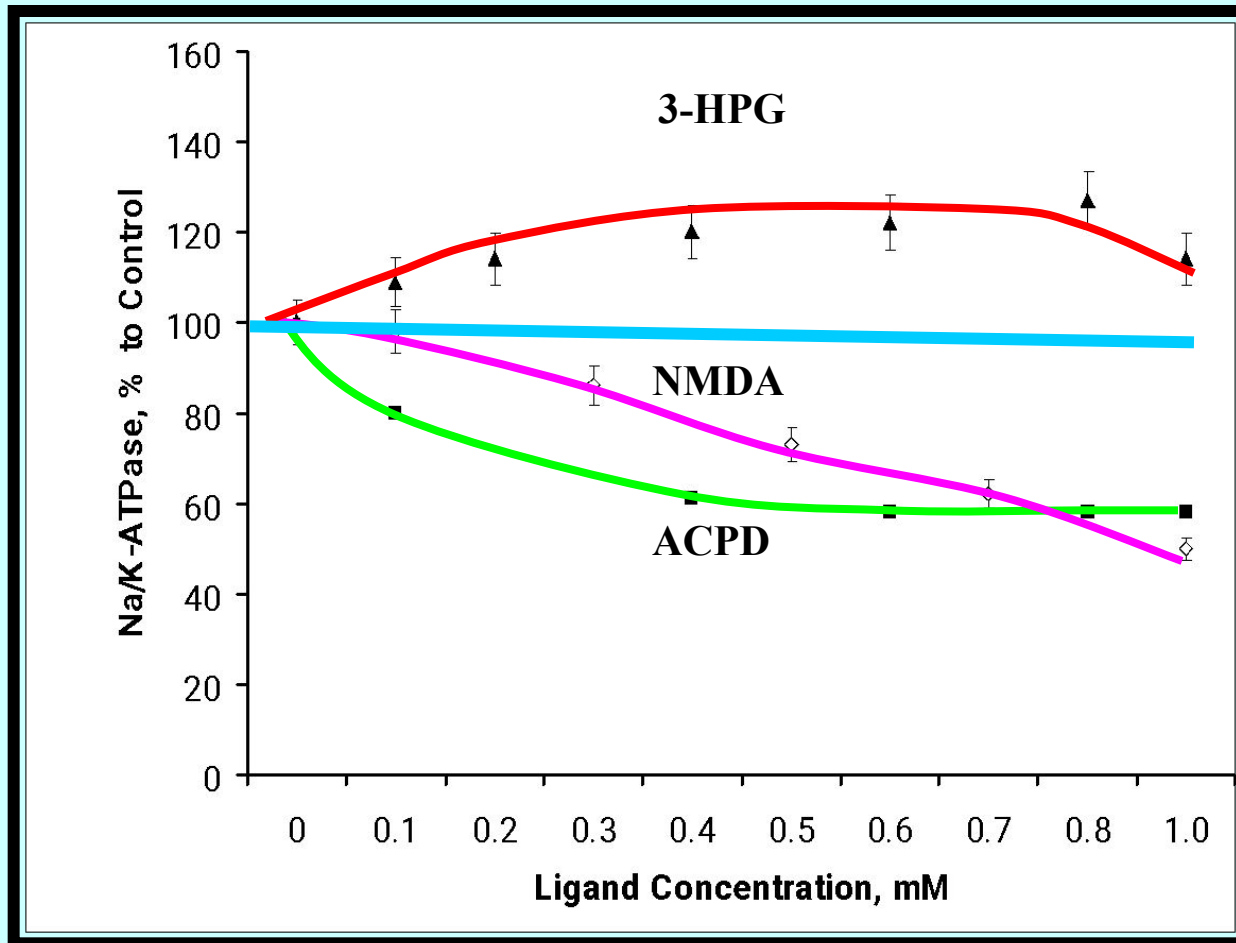


Boldyrev et al, Ann NY Acad. Sci,  
2003, 814, 613-618.

# Изменение содержания АФК в нейронах в условиях активации ионотропных NMDA-рецепторов и метаботропных рецепторов I(3-HPG) и II(ACPD) классов

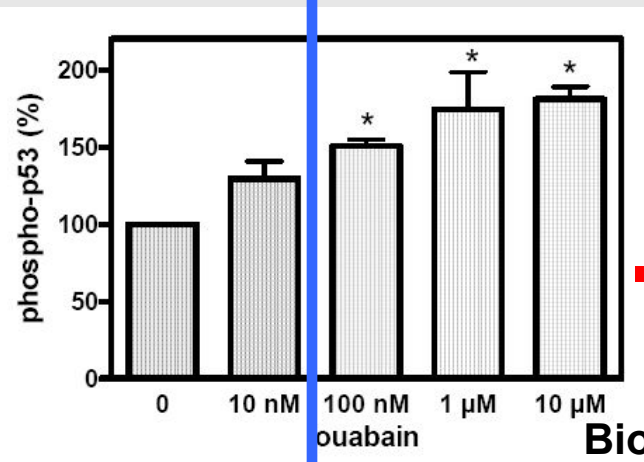
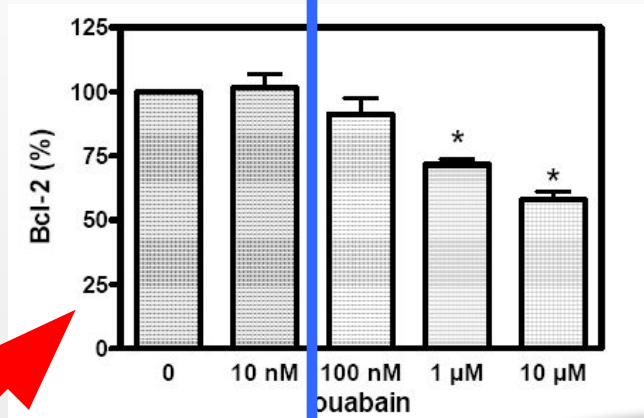
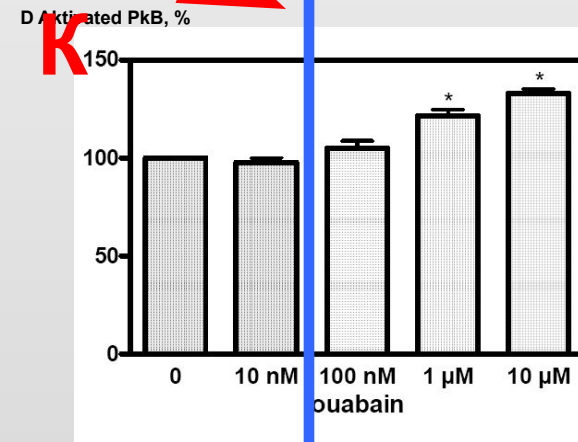
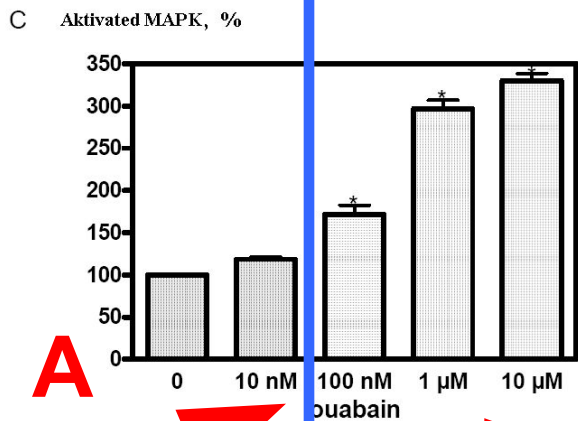
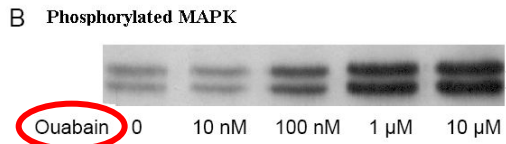
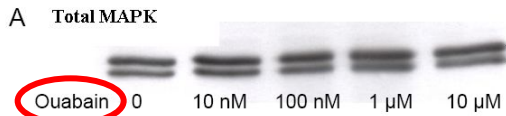


# Effect of Glutamate Ligands on Na/K-ATPase



# Нейробластома SH-SY5Y

Выход цит С из митохондрий в цитоплазму



A  
Φ  
K

α1

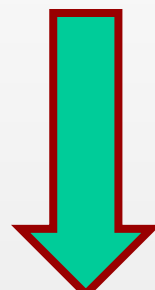
α(2+3)

АПОПТОЗ

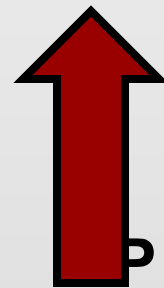
14-3-3

Kulikov et al,

Biochemistry, submitted

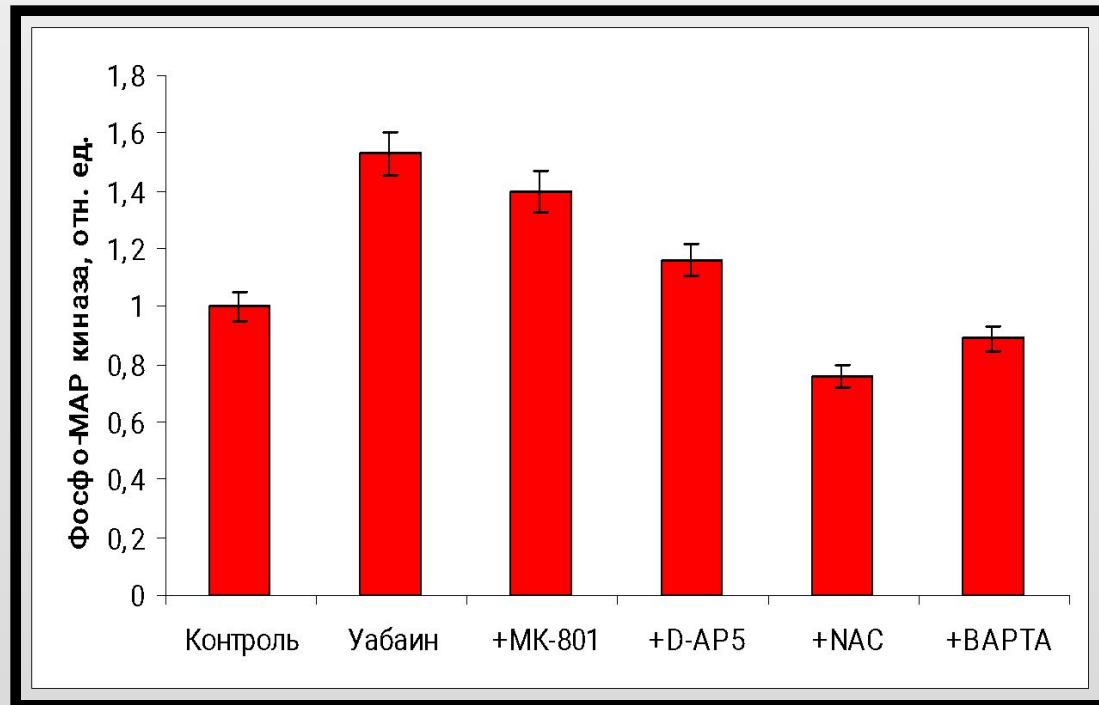
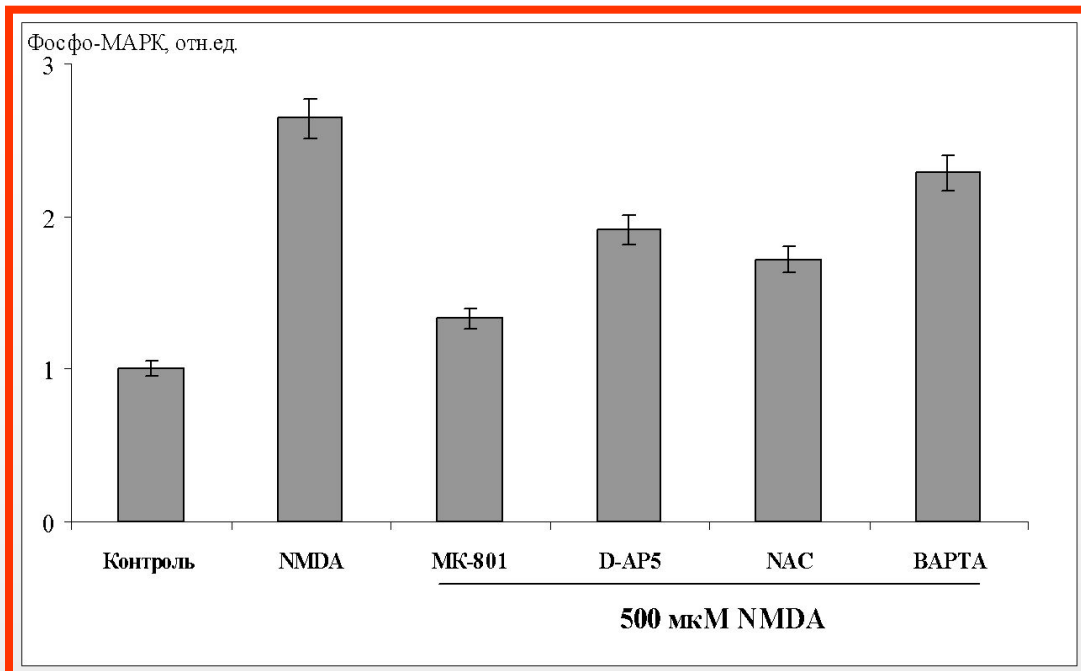


+

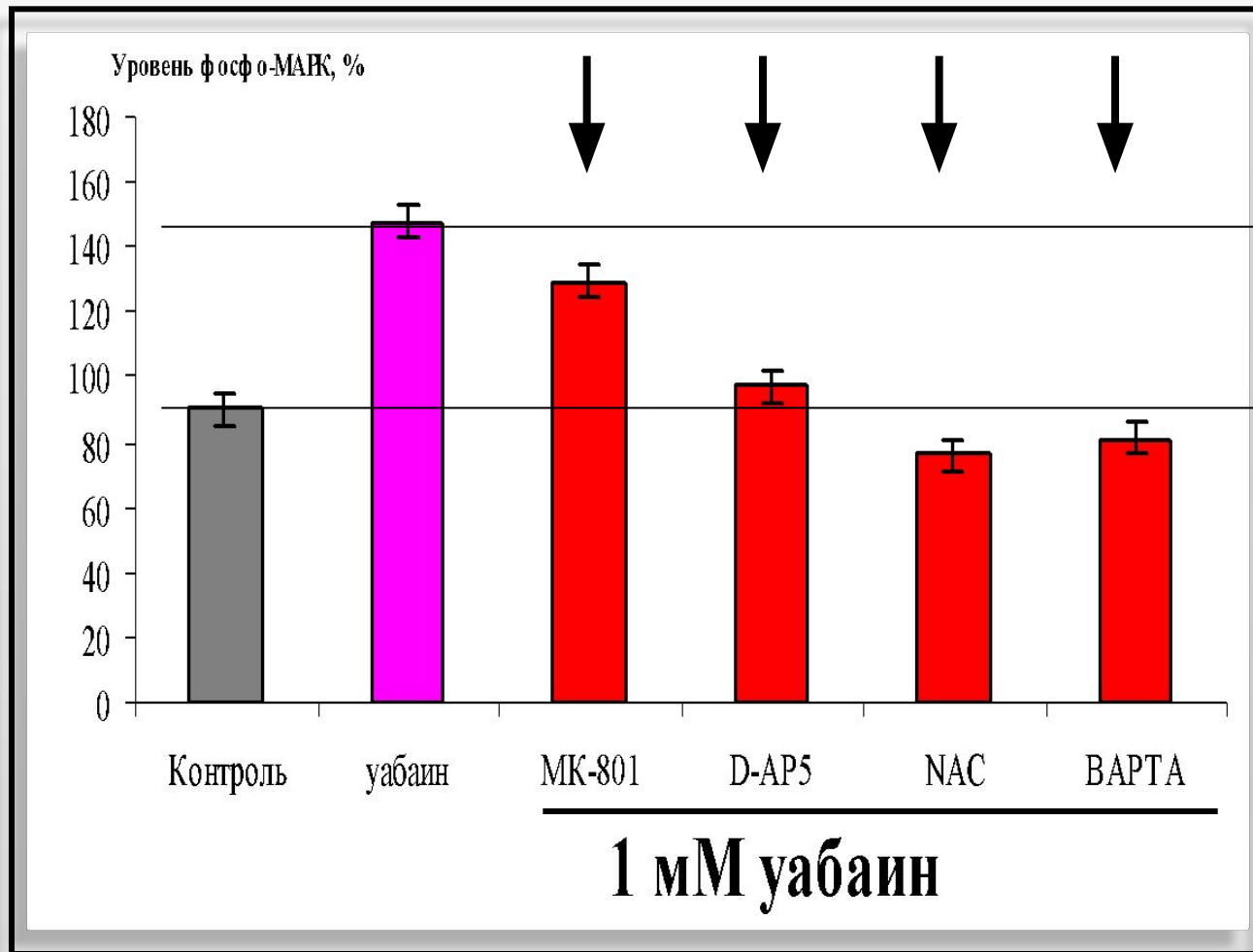


-

*Na-насос в нейронах  
регулирует  
активность  
MAP киназы*



# При инкубации нейронов с убаином рост MAP киназы зависит от активности NMDA-рецепторов и ионов кальция

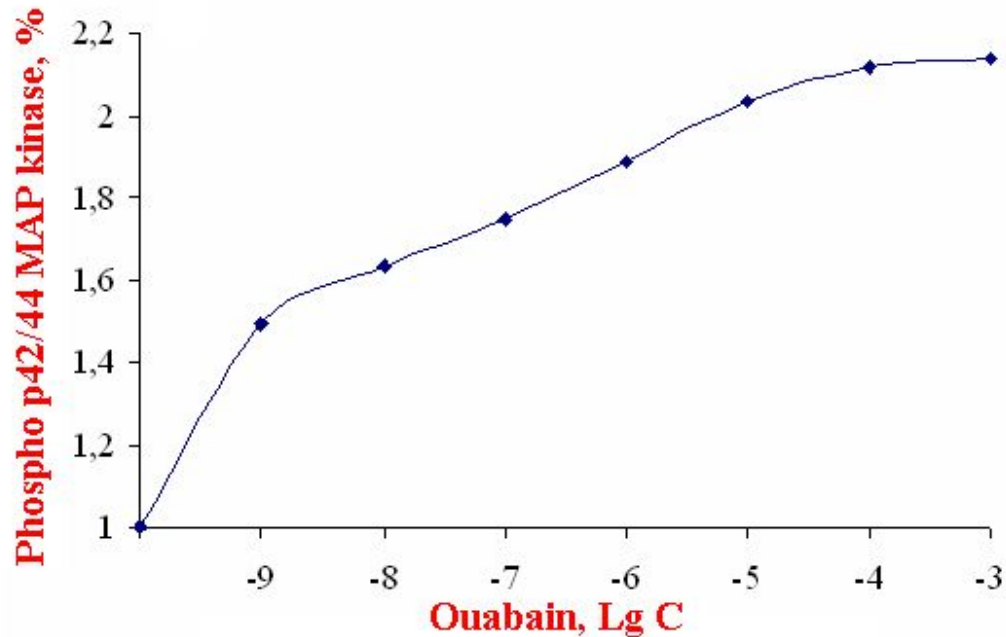


# Активация нейрональной МАРК уабайном требует активного состояния NMDA- рецепторов и реализуется при участии ионов Ca и АФК

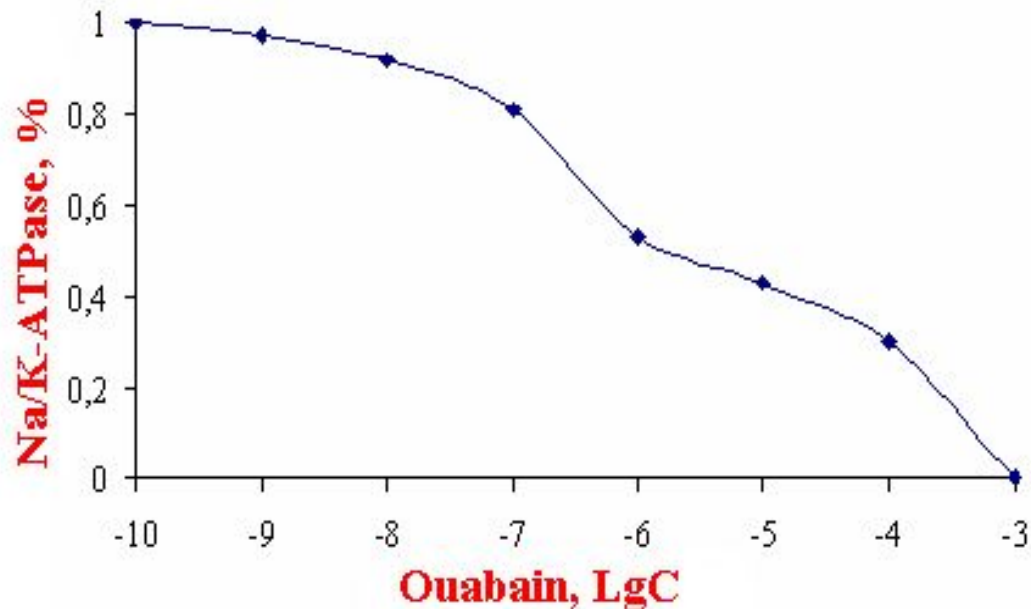
(\* соответствует  $p < 0.05$  относительно контроля)

Conditions	No additions	МК-801, 10 $\mu\text{M}$	D-AP5, 10 $\mu\text{M}$	НАС, 1 mM	ВАРТА, 50 $\mu\text{M}$
Ouabain 0.1 $\mu\text{M}$ 180 min	1.24	1.12	0.99	1.05	0.87
Ouabain 1 mM 180 min	<b>1.53</b> $\pm$ <b>0.03</b>	<b>1.40</b> $\pm$ <b>0.02 (*)</b>	<b>1.16</b> $\pm$ <b>(0.04)*</b>	<b>0.76</b> $\pm$ <b>(0,10)*</b>	<b>0.89</b> $\pm$ <b>0.08 (8)</b>

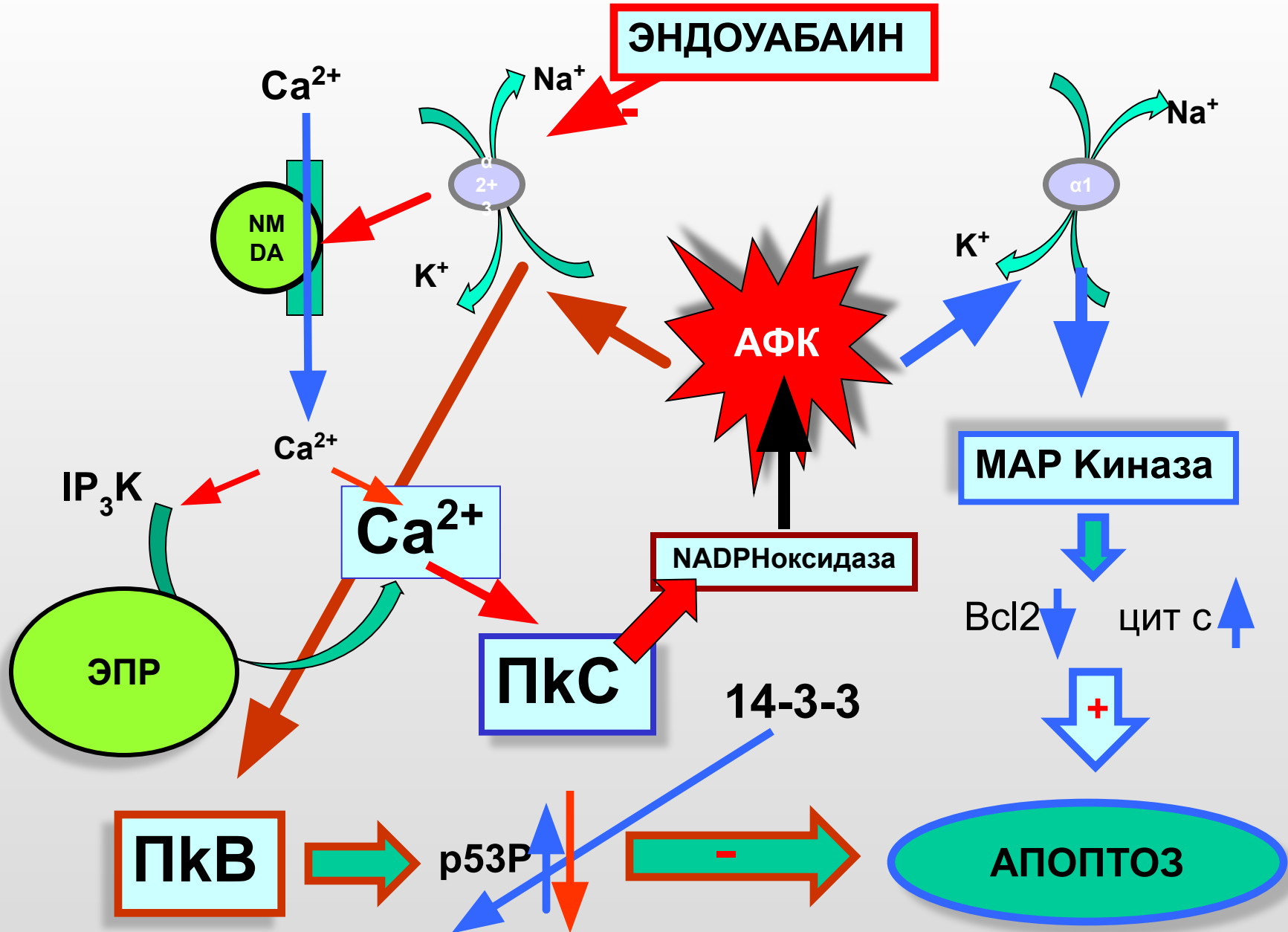




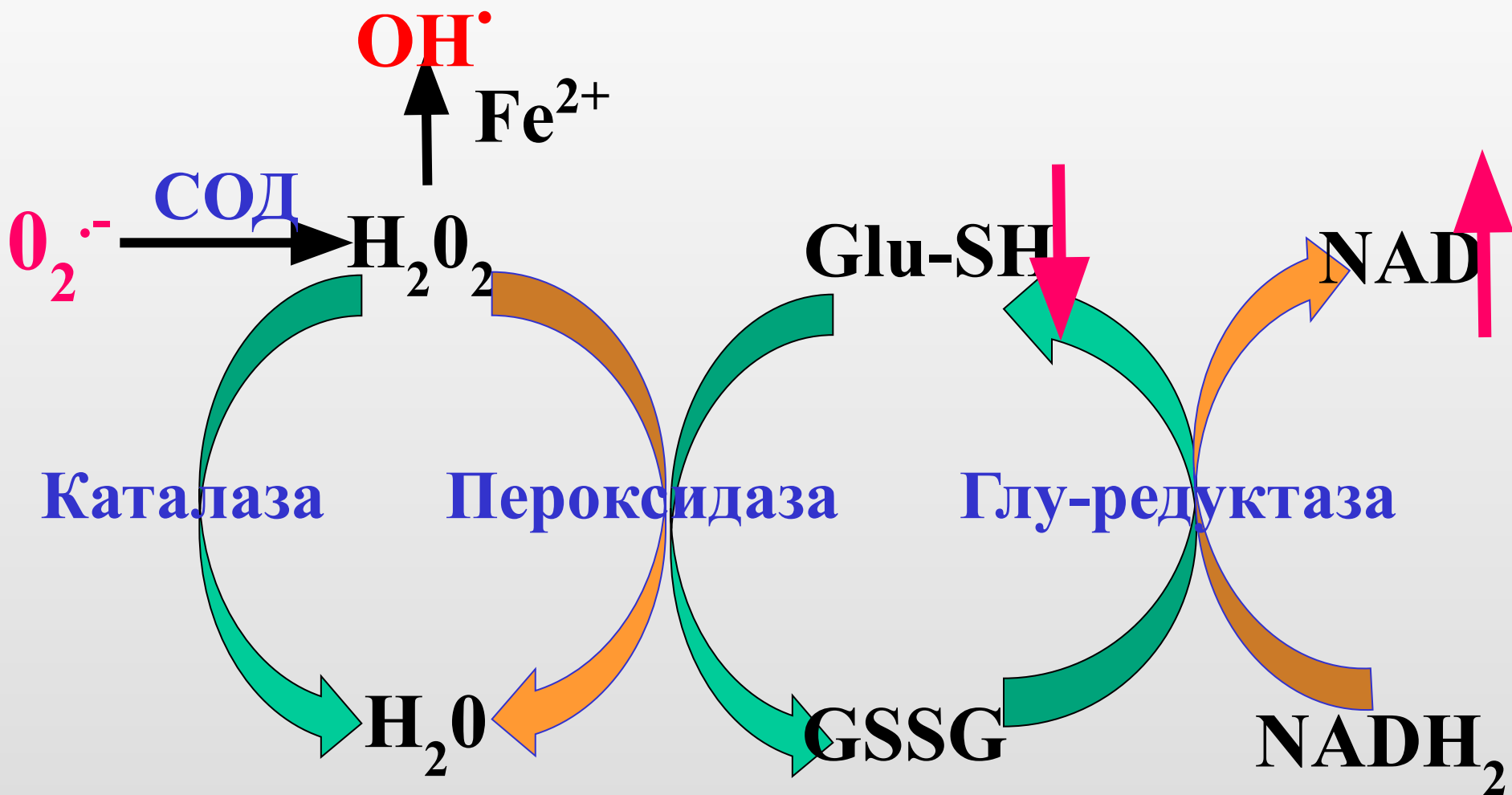
Корреляция между  
ингибированием  
Na/K-АТФазы и  
активацией МАРК  
уобаином



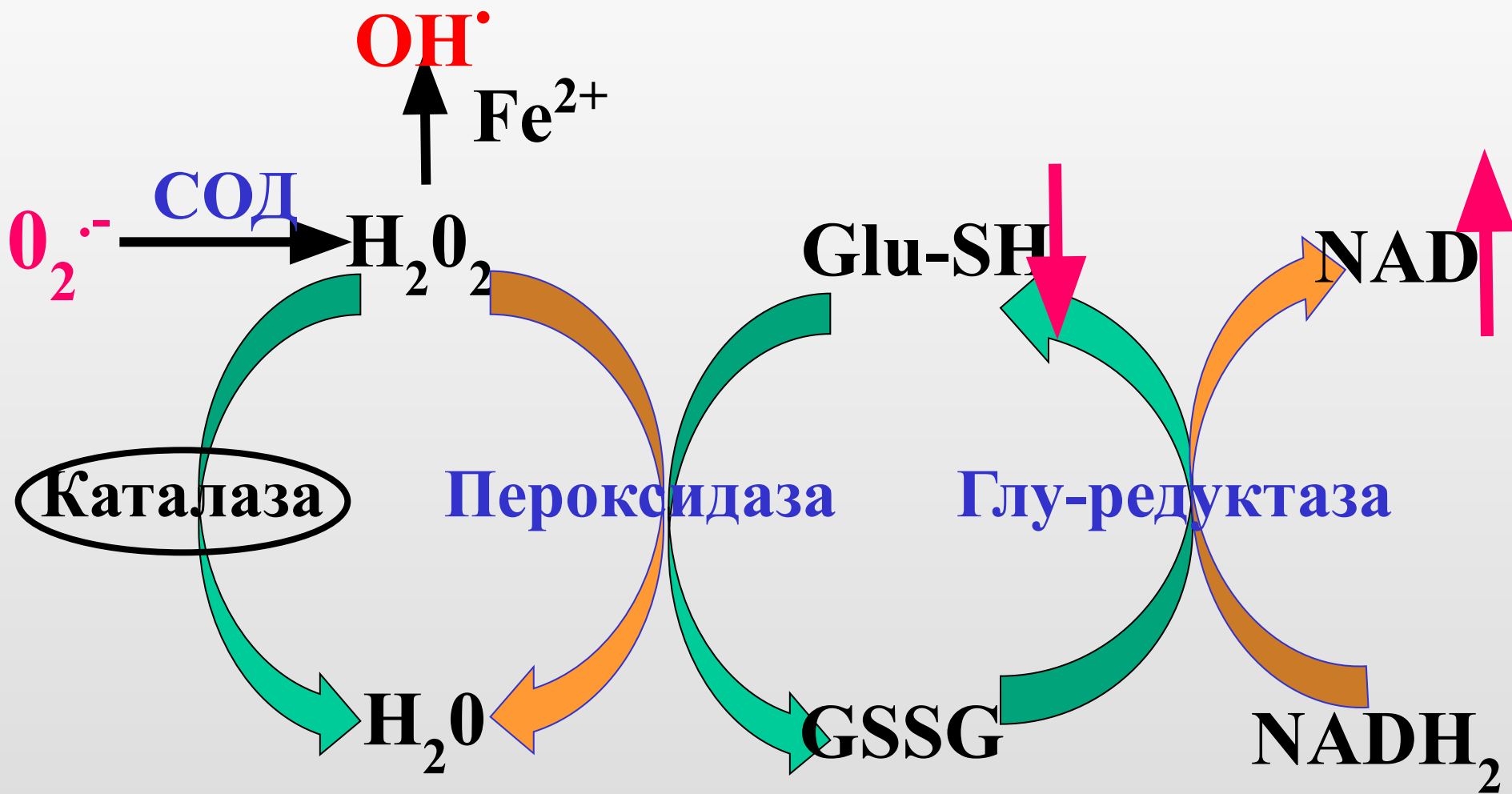
# Участие Na/K-АТФазы в регуляции апоптоза



# Проблемы антиоксидантной защиты ишемического мозга



# Проблемы антиоксидантной защиты ишемического мозга



# Избыток антиоксидантов вызывает прооксидантный эффект

