

Medicinski fakultet, Beograd
Institut za patološku fiziologiju

Pregledni članak
Review article
UDK 616-008.9:[616.36-056.8:613.81
DOI: 10.2298/MPNS0912547R

ULOGA OKSIDACIJSKOG STRESA U ALKOHOLNOM OŠTEĆENJU JETRE

THE ROLE OF OXIDATIVE STRESS IN ALCOHOLIC LIVER INJURY

Tatjana RADOSAVLJEVIĆ, Dušan MLADENović i Danijela VUČEVIĆ

Sažetak - Oksidacijski stres predstavlja jedan od ključnih mehanizama alkoholnog oštećenja jetre. Glavni izvor slobodnih radikala je citohrom P450 zavisna mono oksigenaza. Mitohondrije su najosetljivije na oksidacijski stres. Osim citohroma P450, dodatni izvori slobodnih radikala su Kupferove ćelije, neutrofili koji infiltriraju jetru i azot-monoksid. Endotoksin, koji se u alkoholizmu pojačano oslobađa iz creva, stimuliše Kupferove ćelije na produkciju slobodnih radikala. Iako ispoljava citoprotektivno dejstvo u malim količinama, azot-monoksid u velikim količinama pospešuje oksidacijski stres stvaranjem peroksinitrita i azot-trioksida. Oksidacijski stres u alkoholnoj bolesti jetre nije posledica samo povećanog stvaranja slobodnih radikala, već i smanjene antioksidacijske zaštite hepatocita, pre svega smanjenog sadržaja glutaciona i smanjene aktivnosti superoksid-dismutaze, katalaze i glutation-peroksidaze.

Ključne reči: Oksidativni stres; Alkoholno oštećenje jetre; Antioksidanti; Slobodni radikali

Uvod

Oksidacijski stres koji nastaje pod dejstvom alkohola predstavlja jedan od ključnih patogenetskih mehanizama alkoholnog oštećenja jetre [1-5]. Indukcija citohroma P4502E1 (CYP2E1) etanolom je centralni put nastanka oksidacijskog stresa [6-9]. Produkti CYP2E1-zavisnog oksidacijskog stresa kao što su vodonik-peroksid (H_2O_2), lipidni peroksidi (LOOH), malonildialdehid (MDA) su difuzibilni, izlaze iz hepatocita i stimulišu zvezdaste (Ito) ćelije na produkciju kolagena i razvoj fibroze. U alkoholizmu, zbog prisustva visokog sadržaja gvožđa nastaju i drugi oksidansi, kao što su hidroksilni radikal (OH), radikali gvožđa i hidroksietil radikali [5]. Ovi radikali toksično deluju na ćeliju, dovodeći do lipidne peroksidacije ćelijske membrane sa produkcijom reaktivnih lipidnih aldehida (malonildialdehid i 4-hidroksinonenal). Osim toga, oksidacija etanola pod dejstvom alkoholne dehidrogenaze uzrokuje promenu redoks stanja (smanjenje koncentracijskog odnosa oksidovanog (NAD⁺) i redukovanog nikotinamidadenin dinukleotida - NADH) [5]. Takođe, kao posledica oksidacije alkohola stvaraju se reaktivni produkti acetaldehida. U alkoholnoj bolesti jetre dolazi do oštećenja mitohondrija, što za posledicu ima smanjenje produkcije adenozin trifosfata (ATP) [10-14]. Etanol uzrokuje hipoksiju, naročito u hepatocitima pericentralne zone, korišćenjem kiseonika za detoksikaciju etanola. Kupferove (Kupffer) ćelije imaju značajnu ulogu u oštećenju jetre alkoholom [5,15-17]. Hronično konzumiranje etanola uzrokuje povećano oslobađanje endotoksina ili lipopolisaharida poreklom iz gram-negativnih bakterija creva u portnu cirkulaciju, pokrećući pri tom inflamacijski odgovor u jetri. Aktivirane Kupferove ćelije proizvode slobodne radikale koji, potom, aktivacijom nuklearnog faktora kapaB (NF-κB) uzrokuju povećanu sintezu brojnih citokina, hemokina, faktora rasta, eikosanoida, reaktivnih kiseoničnih vrsta (RKV) i azot monoksida (NO) [5,18-20].

Uloga citohroma P4502E1 u oksidacijskom stresu izazvanom etanolom

U patogenezi alkoholne bolesti jetre ključnu ulogu ima oksidacijski stres, sa stvaranjem RKV (superoksid-anjona (O_2^-) i H_2O_2). U prisustvu metala u tragovima, posebno gvožđa, O_2^- i H_2O_2 stvaraju vrlo reaktivan OH, koji je toksičan za biološke sisteme [1-5].

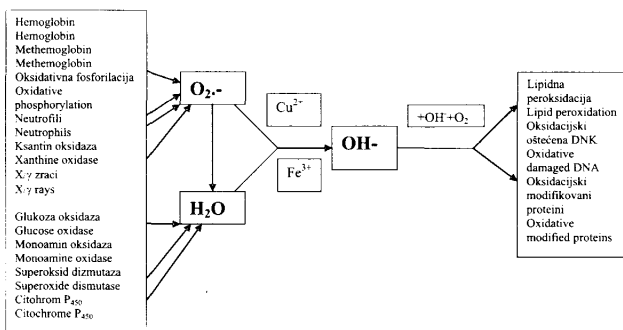
Brojne eksperimentalne studije opisuju mehanizme dejstva alkohola [1,6-8]. Enzimski sistemi, kao što su citohrom P4502E1-zavisni mikrozosmski monooksigenazni sistem, citosolni flavoenzimi (ksantin-oksidaza i aldehid-oksidaza) i enzimi mitohondrijskog respiracijskog lanca predstavljaju značajan izvor O_2^- i H_2O_2 u hepatocitima u akutnoj i hroničnoj intoksikaciji alkoholom [1,5].

Metabolizam alkohola se odvija preko tri enzimska sistema: alkoholne dehidrogenaze, mikrozosmskog etanol-oksidišućeg sistema (MEOS) i katalaze. Alkoholna dehidrogenaza je glavni enzimski put za oksidaciju etanola do acetaldehida [5]. MEOS predstavlja minorni put oksidacije etanola (manje od 10% etanola se oksidiše pomoću ovog enzimskog sistema). Međutim, značajna činjenica je da se aktivnost MEOS-a povećava posle hroničnog unosa alkohola. Razlog je povećan sadržaj citohroma P450, odnosno indukcija CYP2E1 etanolom, što povećava kapacitet za njegovu oksidaciju [8]. Zahvaljujući otkriću MEOS-a, [21] proučeni su osnovni patofiziološki mehanizmi alkoholne bolesti jetre. Indukcija CYP2E1 etanolom je centralni put nastanka oksidacijskog stresa [3,6,7,22]. Brojne eksperimentalne i kliničke studije ukazuju na pozitivnu korelaciju sadržaja CYP2E1 u mikrozomima hepatocita, aktivnosti nikotinamidadenin dinukleotid-fosfat oksidaze (NADPH oksidaze) i nivoa produkata lipidne peroksidacije u hepatocitima [23]. CYP2E1 dovodi do oksidacijskog stresa direktno preko aktivnosti NADPH oksidaze, i indirektno, preko metabolizma ksenobiotika [6,7]. CYP2E1

Skracenicice

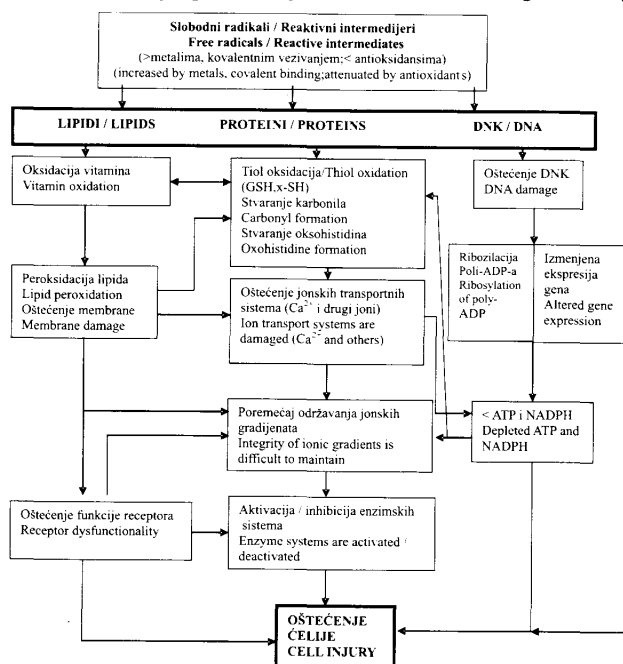
CYP2E1	- citohrom P4502E1
H ₂ O ₂	- vodonik-peroksid
LOO	- lipidni peroksidi
MDA	- malonildialdehid
OH	- hidroksilni radikal
NAD ⁺	- nikotinamidadeninukleotid (oksidovani oblik)
NADH	- nikotinamidadeninukleotid (redukovani oblik)
ATP	- adenozin-trifosfat
NfκB	- nuklearni faktor kapaB
RKV	- reaktivne kiseonične vrste
NO	- azot-monoksid
O ₂ ⁻	- superoksid-anjon
MEOS	- mikrozomski etanol-oksidujući sistem
NADPH	- nikotinamidadeninukleotidfosfat oksidaza
ONOO-	- peroksinitriti
MnSOD	- mangan-superoksid dismutaza
GSH	- glutation
DNK	- dezoksiribonukleinska kiselina
TNFα	- α faktor tumorske nekroze
SOD	- superoksid dismutaza
G6PDH	- glukoza-6-fosfat dehidrogenaza
GST	- glutation-S-transferaza
IL-1	- interleukin-1
IL-6	- interleukin-6
IL-8	- interleukin-8
MCP-1	- hemotaksijski protein-1 makrofaga
ICAM-1	- intercelularni adhezivni molekul-1
eNOS	- konstitutivna endotelna azot-monoksid sintetaza
iNOS	- inducibilna azot-monoksid sintetaza
NOS	- azot-monoksid sintetaza
LO-	- lipidni alkoksidni radikal
LOO-	- lipidni peroksidni radikal
N ₂ O ₃	- azot-trioksid
O ₂	- molekularni kiseonik
CuZnSOD	- bakar-cink superoksid dismutaza

metaboliše mnoge toksične supstancije, kao što su etanol, ugljen-tetrahlorid, paracetamol, halotan i druge [6,24-27]. U početnoj fazi hepatociti odgovaraju na CYP2E1-zavisan oksidacijski stres indukcijom transkripcije antioksidacijskih enzima, što predstavlja adaptivni odgovor, odnosno kratkotrajnu zaštitu od oksidacijskog stresa [3]. CYP2E1 u značajnoj meri ispoljava aktivnost NADPH oksidaze, i na taj način dovodi do produkcije velikih količina O₂⁻ i H₂O₂ [2]. U alkoholizmu, zbog prisustva vi-



Shema 1. Gvožđe i hepatički oksidacijski stres
Scheme 1. Iron and hepatic oxidative stress

sokog sadržaja gvožđa nastaju i drugi oksidansi, kao što je OH, radikali gvožđa i hidroksietil radikali (Shema 1). Ovi radikali toksično deluju na ćeliju, dovodeći do lipidne peroksidacije ćelijske membrane sa produkcijom reaktivnih lipidnih aldehida (MDA i 4-hidroksinonenal) [5]. Takođe, uzrokuju enzimsku inaktivaciju i oksidaciju proteina (Shema 2). RKV koje proizvodi CYP2E1 su mnogo značaj-



Shema 2. Reaktivne kiseonične vrste i oksidacijsko oštećenje ćelija jetre

Scheme 2. Reactive oxygen species and oxidative hepatic cell injury

Legenda: KAT - katalaza, GSHR - glutation-reduktaza, GSHP - glutation peroksidaza, NAD⁺ - nikotinamidadeninukleotid (oksidovani oblik), NADH - nikotinamidadeninukleotid (redukovani oblik), G6PDH - glukoza-6-fosfat dehidrogenaza, SOD - superoksid-dismutaza

Legend: CAT - catalase, GSHR - glutathione-reductase, GSHP - glutathione peroxidase, NAD⁺ - nicotinamide adenine dinucleotide (oxidative form), NADH - nicotinamide adenine dinucleotide (reductive form), 6PGDH 6-phosphate glucose dehydrogenase, SOD - superoxide-dismutase

nije u intacelularnom oksidacijskom oštećenju, u odnosu na RKV poreklom iz aktiviranih fagocita [28]. Od ćelijskih organela, mitohondrije su najviše oštećene delovanjem RKV. U ovim organelama se smanjuje membranski potencijal i remeti permeabilnost membrane, što dovodi do oslobađanja proapoptoznih faktora (kaspaza 3) i nastanka apoptoze [10-13]. Produkti CYP2E1-zavisnog oksidacijskog stresa, kao što su H₂O₂, LOOH i MDA su difuzibilni, izlaze iz hepatocita i stimulišu zvezdaste (Ito) ćelije na produkciju kolagena i razvoj fibroze [13]. Pored drugih mehanizama alkoholnog oštećenja jetre, veza koja postoji između CYP2E1-zavisnog oksidacijskog stresa, oštećenja mitohondrija i pove-

čane sinteze kolagena, kojeg stvaraju zvezdaste ćelije, može značajno doprineti rasvetljavanju toksičnog dejstva alkohola na jetru [13].

Uloga mitohondrija u oksidacijskom stresu izazvanom alkoholom

Mitohondrije su ciljne organele za hepatotoksičnost alkohola, mnogih lekova i toksina. Oštećena funkcija ovih vitalnih ćelijskih organela dovodi do poremećaja energetskog metabolizma i intracelularnog oksidacijskog stresa sa stvaranjem RKV i peroksinitrita (ONOO⁻) [13]. Poznato je da je O₂⁻ produkt aktivnosti mitohondrijskog respiracijskog lanca. S obzirom da mitohondrije sadrže aktivnu mangan-superoksid dismutazu (MnSOD), njenim katalitičkim dejstvom stvara se H₂O₂ koji se, zatim, razlaže do vode dejstvom mitohondrijske glutathion peroksidaze. Međutim, u prisustvu jona gvožđa, deo H₂O₂ koji je ostao van domašaja glutathion peroksidaze, učestvuje u nastanku vrlo reaktivnih slobodnih radikala, koji su uzrok morfološkom i funkcijskom oštećenju mitohondrija u alkoholnoj bolesti jetre [13, 14]. Naime, ove promene mitohondrija predstavljaju najranije manifestacije alkoholnog oštećenja jetre [29]. Pri hroničnom tretiranju životinja alkoholom smanjena je aktivnost mitohondrijske glutathion-transferaze, kao i sadržaj glutathiona (GSH), pa dolazi do prevage oksidanasa, koji su uzrok oksidacijskog oštećenja ćelije. Kao posledica smanjenog sadržaja mitohondrijskog GSH oštećena je sinteza ATP-a [30]. Pored ovog, stimulacijom lipidne peroksidacije, etanol remeti mitohondrijsku oksidacijsku fosforilaciju i dovodi do stvaranja megamitohondrija [31]. Produkti lipidne peroksidacije uzrokuju alkilaciju citohrom c oksidaze, pri čemu se smanjuje aktivnost respiracijskog lanca u mitohondrijama [12]. Posle akutnog i hroničnog izlaganja etanolu dolazi do oksidacije mitohondrijske dezoksiribonukleinske (DNK) kiseline i proteina [32]. Povećan je sadržaj proteinskih karbonilnih grupa u mitohondrijskim proteinima [33]. Oštećena sinteza citohroma b respiracijskog lanca kao posledica oksidacijskog oštećenja mitohondrijske DNK verovatno je odgovorna za povećanu produkciju RKV u mitohondrijama hepatocita pacova koji su hronično tretirani etanolom [12]. Takođe, odgovor hepatocita na α -faktor tumorske nekroze (TNF α) predstavlja dodatni mehanizam stvaranja mitohondrijskih oksidanasa [34]. RKV oštećuju mitohondrijsku DNK i imaju dvostruko dejstvo na apoptozu. Aktivacijom NF-kB povećana je sinteza antikaspaza i superoksid-dismutaze (SOD) i ispoljava se antiapoptozno dejstvo RKV. S druge strane, indukcija oksidacijskog stresa u mitohondrijama jetre udružena je sa kolapsom i povećanom permeabilnošću membrane mitohondrija otvaranjem megakanala u membrani i stimulacijom translokacije proapoptoznih proteina p53 i Bax [12]. Kao posledica povećane permeabilnosti membrane, dolazi do ulaska jona i vode u ćeliju, što predstavlja bitan faktor ćelijske apoptoze

i nekroze. Povećana permeabilnost membrane mitohondrija dovodi do otoka matriksa i rupture spoljne membrane sa oslobađanjem citohroma c, koji aktivira kaspazu 9, a zatim kaspazu 3 u citosolu i uzrokuje apoptozu [35]. U alkoholnoj bolesti jetre, oksidacijsko oštećenje mitohondrija je jedan od mehanizama inicijacije apoptoze hepatocita [11,36]. Takođe, zbog oštećene funkcije mitohondrija, smanjena je β oksidacija masnih kiselina, što dovodi do mikrovezikulske steatoze jetre. Naime, oštećenje mitohondrijske DNK i inhibicija respiracijskog lanca uzrokuju inhibiciju β oksidacije [10]. Za β oksidaciju neophodan je NAD⁺, koji se transformiše u svoj redukovani oblik. NADH se, potom, procesom mitohondrijske respiracije reoksiduje u NAD⁺, tako da oštećena respiracija inhibira β oksidaciju [13].

Uloga Kupferovih ćelija u oštećenju jetre alkoholom

Kupferove ćelije su specifični makrofagi jetre, koji adheriraju na površini fenestriranih endotelnih ćelija. Procesima fagocitoze i pinocitoze, Kupferove ćelije odstranjuju, kako velike partikule, kao što su bakterije, tako i male čestice i molekuli. S obzirom na ulogu koju imaju, ove ćelije su bogate enzimima, kao što su glukozo-6-fosfat dehidrogenaza (G6PDH), NADPH oksidaza, enzimi citohroma P450, posebno P4502E1 (CYP2E1) i izoenzimi glutathion-S-transferaze (GST) i glutathion peroksidaze [37-40].

Kupferove ćelije imaju značajnu ulogu u oštećenju jetre alkoholom [20]. Hronično konzumiranje etanola uzrokuje povećano oslobađanje endotoksina ili lipopolisaharida poreklom iz gram-negativnih (-) bakterija creva u portnu cirkulaciju, koji pokreću inflamacijski odgovor u jetri. Naime, oslobođeni endotoksini stimulišu Kupferove ćelije preko LPS CD14/TLR4 receptora [41]. Aktivirane Kupferove ćelije produkuju slobodne radikale, koji aktiviraju NF-kB. Ovaj nuklearni faktor, zatim, uzrokuje povećanu sintezu brojnih citokina, hemokina, faktora rasta, eikosanoida, RKV i NO [19]. Najznačajniji inflamacijski citokin poreklom iz ovih ćelija je TNF- α , koji ima značajnu ulogu u alkoholnoj bolesti jetre. Takođe, imunohistohemijskim putem su detektovani i drugi inflamacijski medijatori poreklom iz Kupferovih ćelija, kao što su interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6) i interleukin-8 (IL-8) [18].

Uloga neutrofilnih leukocita u oštećenju jetre alkoholom

U brojnim patofiziološkim stanjima, kao što su trauma, ishemija/reperfuzija, sepsa, oštećenje jetre lekovima ili dejstvo endotoksina (alkohol), zapaženo je da se pored Kupferovih ćelija, aktiviraju i neutrofili. Naime, komponente komplekta, naročito C5a komponenta, citokini (TNF α , IL-1, IL-8), eikosanoidi i hemotaksijski protein-1 makrofaga

(MCP-1) aktiviraju ekspresiju adhezivnih molekula β_2 integrina (CD11b/CD18) na neutrofilima, kao i intercelularnog adhezivnog molekula-1 (ICAM-1) na endotelnim ćelijama i hepatocitima [42]. Zahvaljujući adheziji neutrofila na endotelnim ćelijama, omogućena je njihova marginacija, migracija, kao i produkcija slobodnih radikala. Istovremeno, aktivacijom ekspresije adhezivnih molekula na hepatocitima, leukociti primaju hemotaksijske signale, koje im šalju parenhimske ćelije, što uzrokuje njihovu aktivaciju i degranulaciju, tj. oslobađanje proteaza i razvoj oksidacijskog stresa. Oksidansi oslobođeni iz neutrofila podstiču dalju inflamaciju u hepatocitima aktivacijom NF- κ B, koji kontroliše produkciju citokina, hemokina i adhezivnih molekula [43]. Kao rezultat ove aktivacije nastaje nekroza ćelija. Medijatori oslobođeni u toku hepatocelularne nekroze (produkti lipidne peroksidacije i hemokini) predstavljaju hemotaksijske signale, koji dodatno olakšavaju dalju aktivaciju i migraciju neutrofila [43-45]. Brojne studije su pokazale da je apoptoza hepatocita snažan signal za povećanje i ekstravazaciju neutrofila u oštećenju jetre izazvanom endotoksinima. Kod pacijenata sa alkoholnim hepatitisom dokazano je da se oko apoptotičnih hepatocita nagomilavaju neutrofili, uzrokujući izraženo tkivno oštećenje. U alkoholnom oštećenju jetre, bitan događaj je apoptoza hepatocita i nagomilavanje neutrofila sa njihovom ekstravazacijom [46].

Uloga azot-monoksida u oksidacijskom stresu izazvanom alkoholom

Azot-monoksid može da ima dvojako dejstvo u jetri, u zavisnosti od količine u kojoj se sintetiše, odnosa njegovog sadržaja i sadržaja RKV u jetri, prirode stimulusa koji je izazvao sintezu ovog jedinjenja, tipa ćelija koje ga proizvode, kao i od pH, prisustva prelaznih metala u jetri i drugih činilaca [3]. Najvažniji činilac koji determiniše efekat NO je njegova količina i količina RKV u jetri. U uslovima niske produkcije slobodnih radikala, NO ispoljava citoprotektivno dejstvo, dok u uslovima oksidacijskog stresa, NO ostvaruje citotoksično dejstvo na jetru [3,47,48].

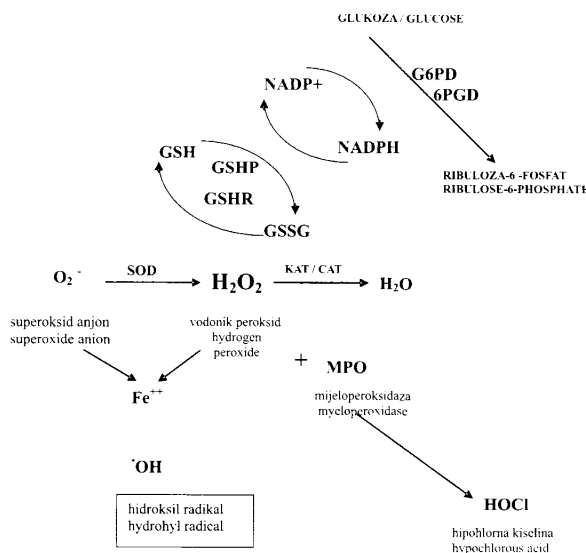
U fiziološkim uslovima najveći deo NO u jetri se sintetiše u sinusoidnim endotelnim ćelijama pod katalitičkim dejstvom konstitutivne endotelne azot-monoksid sintetaze (eNOS). Ovim putem sintetisani NO ispoljava vazodilatacijsko i antiagregacijsko dejstvo [47]. Eksperimenti na pacovima pokazali su da hronična administracija alkohola dovodi do povećanja produkcije NO u jetri [3,49]. Glavni izvor NO u ovim uslovima su Kupferove ćelije. Interesantno je napomenuti da se produkcija NO povećava i u endotelnim ćelijama i hepatocitima [2,50]. Takođe, primećeno je da i aktivirane zvezdaste ćelije postaju značajan izvor NO u alkoholnom oštećenju jetre [47,51]. Porast sinteze NO u ovim ćelijama je posledica aktivacije inducibilne azot-monoksid sintetaze (iNOS), do koje dovode endo-

toksini i različiti medijatori zapaljenjske reakcije. Pokazano je da administracija inhibitora azot-monoksid sintetaze (NOS) u uslovima niske produkcije slobodnih radikala kiseonika povećava oštećenje jetre, za razliku od administracije donora NO, koji u istim uslovima smanjuje nekrozu hepatocita [47,50,52,53]. Ovo protektivno dejstvo se može objasniti smanjenom produkcijom OH u prisustvu NO. NO uklanja O_2^- u ćeliji i time smanjuje produkciju H_2O_2 . Budući da je H_2O_2 glavni izvor OH u Fentonovoj reakciji, smanjenje produkcije H_2O_2 dovodi do smanjenja produkcije OH, a samim tim, smanjuje se oksidacijsko oštećenje jetre. Pored toga, NO u niskim koncentracijama sprečava lipidnu peroksidaciju, uklanjajući lipidne alkoksidne (LO \cdot) i peroksidne (LOO \cdot) radikale [47]. Međutim, u uslovima oksidacijskog stresa u jetri, NO pojačava alkoholom izazvano oštećenje ovog organa, što su potvrdili i eksperimenti na *knockout* miševima kojima je uklonjen gen za iNOS [3,54]. Ovi miševi su imali znatno slabije izraženo oštećenje jetre u poređenju sa divljim sojem. Slični nalazi su dobijeni i na miševima kojima je administriran 1400 W, selektivni inhibitor iNOS-a [3,54]. Citotoksično dejstvo NO u uslovima njegove visoke produkcije se objašnjava povećanim stvaranjem ONOO \cdot i azot-trioksida (N_2O_3) u ćelijama. ONOO \cdot nastaju u reakciji NO sa O_2^- , a N_2O_3 nastaje u reakciji NO sa molekularnim kiseonikom (O_2). Ova reaktivna azotna jedinjenja uzrokuju oštećenja bioloških makromolekula procesima oksidacije i nitrozilacije. Tako, N_2O_3 i ONOO \cdot uzrokuju kidanje DNK lanca, lipidnu peroksidaciju i inaktivaciju enzima i strukturnih proteina [47].

Osim ovih, i drugi mehanizmi učestvuju u ostvarivanju citotoksičnih i citoprotektivnih efekata NO u alkoholnoj bolesti jetre. S tim u vezi je pokazano da NO sprečava apoptozu hepatocita indukovanu dejstvom TNF- α i anti-Fas antitelima, kao i nedostatkom faktora rasta. Ovaj antiapoptozni efekat je moguće objasniti S-nitrozilacijom nekoliko proteina iz familije kaspaza [47,55,56]. Takođe, pokazano je da NO sprečava proliferaciju zvezdastih ćelija u jetri, čime se ostvaruje njegovo antifibrogeno dejstvo [47,57]. Ipak, uloga NO u patogenezi alkoholne bolesti jetre još uvek nije u potpunosti razjašnjena, te stoga zaslužuje da bude predmet daljih istraživanja.

Uloga antioksidacijske odbrane u oksidacijskom stresu izazvanom etanolom

U alkoholnoj bolesti jetre dolazi do smanjenja antioksidacijske zaštite. U zaštiti od oksidacijskog stresa izazvanog alkoholom važnu ulogu ima GSH. Nakon hroničnog izlaganja alkoholu smanjuje se sadržaj ovog jedinjenja u jetri [2,3], i to značajno više mitohondrijskog GSH u odnosu na GSH u citosolu [58]. Razlika u sadržaju ovog antioksidansa objašnjava se njegovim oštećenim transportom iz citosola u mitohondrije, do koga dolazi usled vezivanja alkohola sa proteinskim nosačem za GSH. U



Shema 3. Hepatički enzimski antioksidacijski mehanizmi
Scheme 3. Hepatic enzyme antioxidant mechanisms

patogenezi alkoholne bolesti jetre poremećaj u homeostazi mitohondrijskog GSH ima bitnu ulogu u nastanku ćelijskog oksidacijskog oštećenja [30].

Enzimi koji su uključeni u eliminaciju RKV su SOD, katalaza i glutation-peroksidaza (Shema 3). Postoje dva tipa SOD, i to bakar-cink superoksid dismutaza (CuZnSOD), koja se nalazi u citosolu i u prostoru između dve membrane mitohondrija, i MnSOD, koja je smeštena u matriksu mitohondrija. Ovi enzimi brzo katalizuju razlaganje RKV. Katalaza i glutation peroksidaza su enzimi koji razlažu H_2O_2 . Katalaza, koja za svoju aktivnost zahteva prisustvo gvožđa, smeštena je u peroksidomima. Sis-

tem glutation-peroksidaze se sastoji od glutation-peroksidaze i glutation-reduktaze [4]. Brojna istraživanja ukazuju na smanjenje aktivnosti enzima antioksidacijske zaštite pod uticajem alkohola. Naime, alkohol inhibira sintezu antioksidacijskih enzima, delujući na postranskripcijskom nivou ili povećavajući njihovu intraćelijsku razgradnju [59].

U normalnu antioksidacijsku zaštitu uključeni su vitamin E, vitamin C i drugi neenzimski antioksidansi. Vitamin E (α -tokoferol) glavni je lipidni antioksidans u jetri. U reakciji između vitamina E i lipidnih radikala, formira se radikal vitamina E. Uz to, vitamin E se ponovo regeneriše u prisustvu GSH i vitamina C. Brojne eksperimentalne i kliničke studije pokazale su da hronični unos alkohola smanjuje sadržaj vitamina E u jetri i njegovu koncentraciju u plazmi [2,3].

Zaključak

Oksidacija etanola u jetri dovodi do povećanja produkcije slobodnih radikala. Glavni mehanizam stvaranja slobodnih radikala je indukcija MEOS-a, koja rezultuje stvaranjem hidroksietil radikala [8]. Dodatni mehanizmi kojima etanol indukuje oksidacijski stres su aktivacija ksantin-oksidge i aldehid-oksidge, kao i aktivacija Kupferovih ćelija i neutrofila [1,5]. Etanol, takođe, dovodi do smanjenja antioksidacijske zaštite hepatocita [2,3,58,59]. Oksidacijski stres u alkoholnoj bolesti jetre je, dakle, posledica, kako povećanog stvaranja slobodnih radikala, tako i smanjenog antioksidacijskog kapaciteta jetre. Pošto oksidacijski stres ima značajnu ulogu u patogenezi alkoholne bolesti jetre, terapijski postupci usmereni na njegovo smanjenje mogli bi da preveniraju ili ublaže toksične efekte etanola.

Literatura

- Albano E. Free radicals and alcohol-induced liver injury. In: Sherman CDIN, Preedy VR, Watson RR, eds. Ethanol and the liver. London: Taylor and Francis; 2002. p.153-90.
- Albano E. Alcohol, oxidative stress and free radical damage. Proc Nutr Soc 2006;65:278-90.
- Dey A, Cederbaum AI. Alcohol and oxidative liver injury. Hepatology 2006;43(2 Suppl 1):S63-S74.
- Wu D, Cederbaum AI. Alcohol, oxidative stress and free radical damage. Alcohol Res Health 2003;27(4):277-84.
- Das SK, Vasudevan DM. Alcohol-induced oxidative stress. Life Sci 2007;81:177-87.
- Lieber CS. The discovery of the microsomal ethanol oxidizing system and its physiologic and pathologic role. Drug Metab Rev 2004;36(3-4):511-29.
- Gonzalez JF. Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1. Mutat Res 2005;569:101-10.
- Cederbaum AI. CYP2E1-biochemical and toxicological aspects and role in alcohol-induced liver injury. Mt Sinai J Med 2006;73(4):657-72.
- Cederbaum AI. Cytochrome P450 2E1-dependent oxidant stress and upregulation of anti-oxidant defense in liver cells. J Gastroenterol Hepatol 2006;21(Suppl 3):S22-5.
- Fromenty B, Pessayre D. Inhibition of mitochondrial beta-oxidation as a mechanism of hepatotoxicity. Pharmacol Ther 1995;67:101-54.
- Hock JB, Cahill A, Pastorino JG. Alcohol and mitochondria: a dysfunctional relationship. Gastroenterology 2002; 122:2049-63.
- Bailey SM, Cunningham CC. Contribution of mitochondria to oxidative stress associated with alcohol liver disease. Free Radic Biol Med 2002;32:11-6.
- Jaeschke H, Gores GJ, Cederbaum AI, Hinson JA, Pessayre D, Lemasters JJ. Mechanisms of hepatotoxicity. Toxicol Sci 2002;65:166-76.
- Koch RO, Pani G, Borrello S, Colavitti R, Gravello A, Farre S, et al. Oxidative stress and antioxidant defenses in ethanol-induced cell injury. Mol Aspects Med 2004;25:191-8.
- Wheeler MD, Kono H, Yin M, Nakagami M, Uesugi T, Arteil GE, et al. The role of Kupffer cell oxidant production in early ethanol-induced liver disease. Free Radic Biol Med 2001; 31(12):1544-9.

16. Nanji AA. Role of Kupffer cells in alcoholic hepatitis. *Alcohol* 2002;27:13-5.
17. Vrba J, Modrianský M. Oxidative burst of Kupffer cells: target for liver injury treatment. *Biomed Papers* 2002;146(2):15-20.
18. Clain CJ, Barve S, Barve S, Deaciuc I, Hill DB. Tumor necrosis factor and alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 1998;22:248S-52S.
19. Hines IN, Wheeler MD. Recent advances in alcoholic liver disease III: role of the innate immune response in alcoholic hepatitis. *Am J Physiol* 2004;287:G310-G4.
20. Cubero FJ, Nieto N. Kupffer cells and alcoholic liver disease. *Rev Esp Enferm Apar Dig* 2006;98(6):460-72.
21. Lieber CS, DeCarli LM. Ethanol oxidation by hepatic microsomes: adaptive increase after ethanol feeding. *Science* 1968;162:417-8.
22. French SW. Fish oil, alcohol, and liver pathology: role of cytochrome P450 2E1. *Proc Soc Exp Biol Med* 1994;207:197-205.
23. Ronis MJ, Lindros KO, Ingelman-Sundberg M. The CYP2E family. In: Ioannides C, ed. *Cytochromes P450: metabolic and toxicological aspects*. Boca Raton (FL): CRC Press; 1996. p. 211-39.
24. Koop DR. Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P450 2E1. *FASEB J* 1992;6:724-30.
25. Lieber CS. Cytochrome P-4502E1: its physiological and pathological role. *Physiol Rev* 1997;77:517-44.
26. Bolt HM, Roos PH, Thier R. The cytochrome P-450 isoenzyme CYP2E1 in the biological processing of industrial chemicals: consequences for occupational and environmental medicine. *Int Arch Occup Environ Health* 2003;76:174-85.
27. Tanaka E, Terada M, Misawa S. Cytochrome P450 2E1: its clinical and toxicological role. *J Clin Pharm Ther* 2000;25:165-75.
28. Bradford BU, Kona H, Isayama F, Kosyk O, Wheeler MD, Akiyama TE, et al. Cytochrome P450 CYP2E1, but not nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase is required for ethanol-induced oxidative DNA damage in rodent liver. *Hepatology* 2005;41:336-44.
29. Ishaq KG, Zimmerman HJ, Ray MB. Alcoholic liver disease: pathology, pathogenetic and clinical aspects. *Alcohol Clin Exp Res* 1991;15:45-66.
30. Fernandez-Checa JC, Kaplowitz N. Hepatic mitochondrial glutathione: transport and role in disease and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;204:263-73.
31. Matsubashi T, Karbowski M, Liu X, Usukura J, Wozniak M, Wakabayashi T. Complete suppression of ethanol-induced formation of megamitochondria by 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-piperidine-1-oxyl (4-OH-TEMPO). *Free Radic Biol Med* 1998;24:139-47.
32. Hoek JB, Pastorino JG. Ethanol, oxidative stress, and cytokine-induced liver cell injury. *Alcohol* 2002;27:63-8.
33. Bailey SM, Patel VB, Young TA, Asayama K, Cunningham CC. Chronic ethanol consumption alters the glutathione/glutathione peroxidase-I system and protein oxidation status in rat liver. *Alcohol Clin Exp Res* 2001;25:726-33.
34. Garcia-Ruiz C, Colell A, Paris R, Fernandez-Checa JC. Direct interaction of GD3 ganglioside with mitochondria generates reactive oxygen species followed by mitochondrial permeability transition, cytochrome c release and caspase activation. *FASEB J* 2000;14:847-50.
35. Bradham CA, Qian T, Streetz K, Trautwein C, Brenner DA, Lemasters JJ. The mitochondrial permeability transition is required for tumor necrosis factor α -mediated apoptosis and cytochrome c release. *Mol Cell Biol* 1998;18:6353-64.
36. Natori S, Rust C, Stadheim LM, Srinivasan A, Burgart LJ, Gores GJ. Hepatocyte apoptosis is a pathological feature of human alcoholic hepatitis. *J Hepatol* 2001;34:248-53.
37. Steinberg P, Schramm H, Schladt L, Robertson LW, Thomas H, Oesch F. The distribution, induction and isoenzyme profile of glutathione S transferase and glutathione peroxidase in isolated rat liver parenchymal, Kupffer and endothelial cells. *Biochem J* 1989;264:737-44.
38. Steinberg P, Schlemper B, Molitor E, Platt KL, Seidel A, Oesch F. Rat liver endothelial and Kupffer cell mediated mutagenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons and aflatoxin B1. *Environ Health Perspect* 1990;88:71-6.
39. Koop DR, Chernosky A, Brass EP. Identification and induction of cytochrome P450 2E1 in rat Kupffer cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1991;258:1072-6.
40. Kono H, Rusyn I, Yin M, Gabele E, Yamashina S, Dikalova A. NADPH oxidase-derived free radicals are key oxidants in alcohol induced liver disease. *J Clin Invest* 2000;106:867-72.
41. Wheeler MD, Yamashina S, Froh M, Rusyn I, Thurman RG. Adenoviral gene delivery can inactivate Kupffer cells: role of oxidants in NF-kappaB activation and cytokine production. *J Leukoc Biol* 2001;69:622-30.
42. Bautista AP. Neutrophilic infiltration in alcoholic hepatitis. *Alcohol* 2002;27:17-21.
43. Jaeschke H, Smith CW, Clemens MG, Ganey PE, Roth RA. Mechanisms of inflammatory liver injury: adhesion molecules and cytotoxicity of neutrophils. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996;139:213-26.
44. Jaeschke H. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:718-24.
45. Jaeschke H, Fisher MA, Lawson JA, Simmons CA, Farhood A, Jones DA. Activation of caspase 3 (CPP32)-like proteases is essential for TNF- α -induced hepatic parenchymal cell apoptosis and neutrophil-mediated necrosis in a murine endotoxin shock model. *J Immunol* 1998;160:3480-6.
46. Ziol M, Tepper M, Lohez M, Arcangeli G, Ganne N, Christidis C, et al. Clinical and biological relevance of hepatocyte apoptosis in alcoholic hepatitis. *J Hepatol* 2001;34:254-60.
47. Parola M, Robino G. Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis. *J Hepatol* 2001;35:297-306.
48. Zima T, Kalousova M. Oxidative stress and signal transduction pathways in alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 2005;29(11 Suppl):110S-115S.
49. Wang JF, Greenberg SS, Spitzer JJ. Chronic alcohol administration stimulates nitric oxide formation in the rat liver with or without pretreatment by lipopolysaccharide. *Alcohol Clin Exp Res* 1995;19:387-93.
50. Li J, Billiar TR. Nitric oxide. IV: determinants of nitric oxide protection and toxicity in liver. *Am J Physiol* 1999;276:G1069-G73.

51. Rokey DC, Chung JJ. Inducible nitric oxide synthase in rat hepatic lipocytes and the effect of nitric oxide on lipocyte contractility. *J Clin Invest* 1995;95:1199-206.

52. Clemens MG. Nitric oxide in liver injury. *Hepatology* 1999;30:1-5.

53. Harbrecht BG, Billiar TR, Stadler J, Demetris AJ, Ochoa J, Curran RD, et al. Inhibition of nitric oxide synthesis during endotoxemia promotes intrahepatic thrombosis and an oxygen radical-mediated hepatic injury. *J Leukoc Biol* 1992;52:390-4.

54. McKim SE, Gabele E, Isayama F, Lambert JC, Tucker LM, Wheeler MD, et al. Inducible nitric oxide synthase is required in alcohol-induced liver injury: studies with knockout mice. *Gastroenterology* 2003;125:1834-44.

55. Kim YM, Talanian RV, Billiar TR. Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. *J Biol Chem* 1997;272:31138-48.

56. Kim YM, Kim TH, Chung HT, Talanian RV, Yin XM, Billiar TR. Nitric oxide prevents tumor necrosis factor α -induced rat hepatocyte apoptosis by the interruption of mitochondrial apoptotic signaling through S-nitrosylation of caspase 8. *Hepatology* 2000;32:770-8.

57. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005;115:209-18.

58. Fernandez-Checa JC, Garcia-Ruiz C, Ookhtens M, Kaplowitz N. Impaired uptake of glutathione by hepatic mitochondria from ethanol fed rats. *J Clin Invest* 1991;87:397-405.

59. Nanji AA, Sadrzadeh SMH, Yang EK, Fogt F, Maydani M, Dannenberg AJ. Dietary saturated fatty acids: a novel treatment for alcoholic liver disease. *Gastroenterology* 1995;109:547-54.

Summary

Introduction

Oxidative stress plays an important role in pathogenesis of alcoholic liver injury. The main source of free oxygen species is cytochrome P450-dependent monoxygenase, which can be induced by ethanol.

Role of cytochrome P4502E1 in ethanol-induced oxidative stress

Reactive oxygen species produced by this enzyme are more important in intracellular oxidative damage compared to species derived from activated phagocytes. Free radicals lead to lipid peroxidation, enzymatic inactivation and protein oxidation.

Role of mitochondria in alcohol-induced oxidative stress

Production of mitochondrial reactive oxygen species is increased, and glutathione content is decreased in chronically ethanol-fed animals. Oxidative stress in mitochondria leads to mitochondrial DNA damage and has a dual effect on apoptosis.

Role of Kupffer cells in alcohol-induced liver injury

Chronic ethanol consumption is associated with increased release of endotoxin from gut lumen into portal circulation.

Key words: Oxidative Stress; Liver Diseases, Alcoholic; Antioxidants, Free Radicals

Rad je primljen 2. X 2007.

Prihvaćen za štampu 21. XI 2007.

BIBLID.0025-8105:(2009):LXII:11-12:547-553.

Endotoxin activates Kupffer cells, which then release proinflammatory cytokines and oxidants.

Role of neutrophils in alcohol-induced liver injury

Alcoholic liver injury leads to the accumulation of neutrophils, which release reactive oxygen species and lysosomal enzymes and contribute to hepatocyte damage and necrosis.

Role of nitric oxide in alcohol-induced oxidative stress

High amounts of nitric oxide contribute to the oxidative damage, mainly by generating peroxynitrites.

Role of antioxidants in ethanol-induced oxidative stress

Chronic ethanol consumption is associated with reduced liver glutathione and α -tocopherol level and with reduced superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activity.

Conclusion

Oxidative stress in alcoholic liver disease is a consequence of increased production of oxidants and decreased antioxidant defense in the liver.