

СТАТЬЯ

УДК 612.12:577.15:616.89-008.441.13

**НЕОБРАТИМАЯ ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ ТИРОЗИНОВЫХ
ОСТАТКОВ БЕЛКОВ КРОВИ БОЛЬНЫХ АЛКОГОЛИЗМОМ,
НАХОДЯЩИХСЯ В СОСТОЯНИИ АЛКОГОЛЬНОЙ АБСТИНЕНЦИИ****¹Ефременко Е.С., ²Титов Д.С., ²Никонов Д.А.**¹*ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет»**Министерства здравоохранения Российской Федерации, Омск, e-mail: bx-osma@mail.ru;*²*БУЗ Омской области «Наркологический диспансер», Омск*

Особые физико-химические свойства этилового спирта, который является эндогенным метаболитом многих химических реакций в клетках, но не относится к факторам питания, при избыточном поступлении в организм определяют развитие его токсических эффектов. Интенсификация свободнорадикальных процессов происходит при острой, хронической алкогольной интоксикации, на всех стадиях развития алкоголизма. Напряженное, тяжелое клиническое течение периода абстиненции делает важным поиск и оценку показателей обмена веществ именно в эту фазу развития алкогольной зависимости. Цель исследования: установить значение окислительной модификации белковых молекул крови больных алкоголизмом в патогенезе заболевания и развитии нарушений метаболизма. Задача исследования: определить содержание битирозина в сыворотке крови больных, находящихся в состоянии алкогольной абстиненции. В соответствии с целью и задачей исследования проведена оценка динамики уровня битирозина в сыворотке крови больных алкоголизмом, находящихся в состоянии алкогольной абстиненции. Установлено снижение содержания битирозина в крови. Описаны возможные причины и механизмы данных изменений. Сделано предположение о том, что по уровню битирозина в сыворотке крови можно косвенно судить о возможных химических модификациях белков при алкогольном абстинентном синдроме. Выявленные сдвиги не могут расцениваться в положительном аспекте из-за сохранения действия активных радикальных форм в этот период развития алкоголизма.

Ключевые слова: алкоголь, алкоголизм, окислительный стресс, свободные радикалы, антиоксиданты, белки, битирозин, метаболизм

**IRREVERSIBLE OXIDATIVE MODIFICATION OF TYROSINE RESIDUES
OF BLOOD PROTEINS IN ALCOHOLIC PATIENTS****¹Efremenko E.S., ²Titov D.S., ²Nikonov D.A.**¹*Federal State Funded Educational Institution for Higher Education Omsk State Medical University**Ministry of Public Health, Omsk, e-mail: bx-osma@mail.ru;*²*Budgetary healthcare institution Omsk region «Narcological dispensary», Omsk*

Special physical and chemical properties of ethyl alcohol, which is an endogenous metabolite of many chemical reactions in cells, but does not relate to nutrition factors, determine the development of its toxic effects when it is over-supplied to the body. Intensification of free radical processes occurs in acute, chronic alcohol intoxication, at all stages of alcoholism development. Stressful, severe clinical course of the abstinence period makes it important to search for and evaluate metabolic indicators during this phase of alcohol dependence development. The purpose of the study: to determine the significance of oxidative modification of protein molecules in the blood of alcoholics in the pathogenesis of the disease and the development of metabolic disorders. Aim of the study: to determine the content of bityrosine in the blood serum of patients who are in a state of alcoholic abstinence. In accordance with the purpose and objective of the study, the dynamics of the level of tyrosine in the blood serum of patients with alcoholism who are in a state of alcohol abstinence was evaluated. A decrease in the bilirubin content in the blood was found. Possible causes and mechanisms of these changes are described. It is assumed that the level of bityrosine in the blood serum can indirectly judge the possible chemical modifications of proteins in alcohol withdrawal syndrome. The identified changes cannot be regarded in a positive aspect due to the persistence of active radical forms during this period of alcoholism development.

Keywords: alcohol, alcoholism, oxidative stress, free radicals, antioxidants, proteins, bityrosine, metabolism

Считается, что естественное, физиологическое, постоянное течение процесса свободнорадикального окисления различных субстратов (фосфолипидов, белков, аминокислот, нуклеиновых кислот) является основой одной из выполняемых защитных функций клеток – функции эндоэкологии (поддержания «чистоты» межклеточной среды) [1]. Данный процесс обеспечивает

возможностью генерации радикальных форм веществ нейтрофильными лейкоцитами и практически каждой клеткой организма человека. В связи с этим постоянный, низкий уровень образования свободных радикалов рассматривается как нормальный процесс, необходимый для выполнения клеток специализированных функций, а избыточная активация свободнорадикального

окисления – как универсальный механизм повреждения клеточных органелл, мембран при различных заболеваниях и патологических состояниях. Обязательным условием, определяющим негативный вариант развития окислительного метаболизма в целом, является недостаточная функциональная активность, истощение и нарушение функционирования ферментативных и неферментативных компонентов антиоксидантной защиты [2].

Сформированный проф. В.Х. Хавинсоном (2003) список «болезней свободных радикалов» указывает на существование большой группы нозологических форм, ведущим фактором развития которых определена гиперпродукция свободных радикалов. Для ряда заболеваний в этом списке определяющим причинным фактором может быть либо поступление в организм чужеродных, токсичных веществ, либо избыточное поступление питательных веществ, относящихся к естественным, эндогенным метаболитам.

Вероятно, что согласно современной теории биологических функций в любом из перечисленных случаев можно отметить нарушение биологической функции экзотрофии (функции внешнего питания). Вполне возможно, что именно поэтому начинают функционировать одинаковые звенья патогенеза и формируются однотипные адаптивные реакции.

Согласно статистическим данным, показатель общей заболеваемости алкогольными расстройствами, динамика смертности от острых отравлений алкоголем в Российской Федерации имеют тенденцию к снижению. Однако совокупная смертность от злоупотребления алкоголем возрастает за счет возникающей соматической патологии [3].

Особые физико-химические свойства этилового спирта, который является эндогенным метаболитом многих химических реакций в клетках, но не относится к факторам питания, при избыточном поступлении в организм определяют развитие его токсических эффектов. Интенсификация свободнорадикальных процессов происходит при острой, хронической алкогольной интоксикации, на всех стадиях развития алкоголизма. Напряженное, тяжелое клиническое течение периода абстиненции делает важным поиск и оценку показателей обмена веществ именно в эту фазу развития алкогольной зависимости.

При имеющихся данных о нарушении всех видов обмена веществ при алкоголизме особая значимость отводится нарушению обмена белков в связи с алкоголь-ассоциированными изменениями в работе белковых

катализаторов, белковых транспортеров и регуляторов белковой природы. Определенный вклад в развитие этих нарушений у больных алкоголизмом вносят различные виды химической модификации белковых молекул. Показана значимость развития карбонильного стресса при осложненном течении алкогольного абстинентного синдрома [4]. Отмечено увеличение интенсивности ацетилирования [5], пропионилирования митохондриальных белков при воздействии этанола [6]. Также одной из возможных модификаций белков является формирование белковых агрегатов, связанное с образованием битирозина.

Цель исследования: установить значение окислительной модификации белковых молекул крови больных алкоголизмом в патогенезе заболевания и развитии нарушений метаболизма.

Задача исследования: определить содержание битирозина в сыворотке крови больных, находящихся в состоянии алкогольной абстиненции.

Материалы и методы исследования

В связи с дефицитом информации об интенсивности и роли данной модификации белков в развитии метаболических нарушений при алкогольной абстиненции нами было проведено исследование уровня битирозина в сыворотке крови пациентов Омского областного наркологического диспансера с диагнозом «Психические и поведенческие расстройства в результате употребления алкоголя, средняя стадия. Синдром активной зависимости. Состояние отмены, неосложненное, средней степени тяжести» (F.10.242, F.10.302), выборка которых была сформирована в соответствии с критериями включения и исключения.

Критерии включения:

- 1) возраст 35–50 лет;
- 2) состояние алкогольной абстиненции при поступлении в стационар;
- 3) информированное согласие пациента (или его родственников) на проведение исследования.

Критерии исключения:

- 1) наличие аллергических, эндокринных или других заболеваний, способных оказать влияние на течение основного заболевания и результат исследования;
- 2) прием наркотических и психотропных средств до поступления в стационар;
- 3) отказ от участия в исследовании (по результатам беседы с пациентом или его родственниками).

С использованием этих критериев была сформирована группа больных, у которых забор крови для исследования проводил-

ся в 1-е сутки после поступления в стационар (группа А1, n = 10). Купирование абстинентных расстройств проводилось обычными медикаментозными средствами (дезинтоксикация, седативная терапия, витаминотерапия). Группу сравнения (группа К) составили 8 условно здоровых лиц.

Сыворотку крови использовали для определения уровня битирозина по методу К.Т. Дэвиса (1987) в модификации Э.М. Бекмана и соавт. (2006) и содержания общего белка биуретовым методом.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с помощью компьютерных программ Biostat и Microsoft Excel. В качестве основных характеристик описательной статистики применяли медиану (Me), нижний 25-й (L) и верхний 75-й (H) квантили. Оценка статистической значимости различий проводили с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни (U) для двух независимых выборок.

Результаты исследования и их обсуждение

Полученные нами данные свидетельствуют о снижении содержания битирозина в сыворотке крови в группе А1 на 29,3% (pU = 0,012).

Битирозин был впервые выделен при исследовании нерастворимого белка катакта хрусталика [7]. Битирозин относится к семейству производных тирозильных радикалов, в которое входят: изодитирозин, тритирозин. Принято считать, что тирозиновые аминокислотные остатки проявляют максимальную склонность к изменениям окислительного характера. Далее сформированные радикалы тирозина могут взаимодействовать между собой, образуя тирозиновые димеры. Продуктом реакции окисления является 1,3-дитирозин (битирозин).

К особенностям физико-химических свойств данного соединения можно отнести:

- 1) способность к флуоресценции;
- 2) устойчивость к гидролизу кислотного типа;
- 3) резистентность к действию протеолитических ферментов.

Образование битирозина (дитирозиновых «сшивок» белковых молекул) может рассматриваться как следствие естественного, нормального, физиологического процесса окислительной модификации белковых молекул различного строения и локализации. Но следует учитывать и влияние факторов окружающей среды, влияние которых также вызывает формирование битирозина. Так, указывается, что дитирозиновые «сшивки» могут образовываться в результате действия:

- 1) ультрафиолетового облучения;
- 2) гидроперекисных соединений липидной природы;
- 3) оксида азота (I), N₂O;
- 4) свободных радикалов кислорода [8].

Наряду с карбонилированием, формированием нитротирозина, присоединением серной кислоты по аминокислотным остаткам, образование битирозиновых «сшивок» относят к необратимым изменениям структуры белков. Методом виртуального скрининга с последующей оценкой связывания битирозина с клеточными «мишенями» была установлена его способность к взаимодействию с белком тубулином (в форме цис-дитирозина) и β1-рецептором тиреоидных гормонов (в форме транс-дитирозина). Главными типами взаимодействия между указанными молекулами обнаружилось: водородные связи, электростатические и гидрофобные взаимодействия.

Анализ литературных данных по вопросу определения уровня битирозина свидетельствует об определенном интересе к проблеме окислительной модификации белковых молекул при острой и хронической алкогольной интоксикации. Так, проводилась оценка показателей окислительного метаболизма в крови больных при развитии интоксикации различной степени тяжести вследствие приема суррогатов алкоголесодержащих напитков. В результате исследования крови 30 пациентов в возрасте от 26 до 40 лет было обнаружено увеличение уровня битирозинсодержащих (дитирозинсодержащих) продуктов свободнорадикального окисления белков в группе пациентов с диагностированной интоксикацией средней степени тяжести на 28,4%. Но уже в группе больных с тяжелой интоксикацией превышение показателя выявлено на 95,2% по сравнению с контрольной группой лиц, не имеющих признаков алкогольной зависимости.

Следует подчеркнуть, что изменение уровня битирозиновых «сшивок» произошло раньше, чем проявление характерных клинических симптомов формирования зависимости. Авторы обращают особое внимание на вовлеченность в патогенез зависимости структурно-функциональных нарушений белковых молекул, обусловленных действием избыточного количества свободнорадикальных субстанций [9].

Выраженность окислительного стресса, возникающего в результате действия на клеточные структуры избыточного количества этилового алкоголя, оценена при экспериментальном исследовании на животных. В предложенных условиях хронической, принудительной алкоголизации крыс про-

исходило снижение интенсивности антиоксидантной защиты, которое коррелировало с высоким уровнем в плазме крови карбонильных производных белков и битирозина. В этом же исследовании отмечено положительное влияние компонентов черного чая на указанные изменения параметров окислительной модификации белковых молекул в плазме крови алкоголизированных крыс [10].

Рассматриваемый A. Augustyniak et al. (2009) L-карнитин (гидрокситриметиламинобутират) в качестве соединения, обладающего некоторой антиоксидантной активностью, был применен для формирования представлений о его способности предупреждать возникновение окислительных изменений структуры протеинов при хронической алкогольной интоксикации. Лабораторные крысы, получавшие раствор L-карнитина (1,5 г/л) в течение пяти недель при одновременном интрагастральном назначении этанола проявили снижение уровня битирозина в крови на 10%, а в ткани печени на 20% по сравнению с группой животных, получавших только этанол. В группе крыс, подвергнутых алкоголизации, уровень битирозина был статистически значимо увеличен по сравнению с группой контрольных (интактных) животных на 40% при исследовании крови и ткани печени. Полагают, что антиоксидантная способность L-карнитина связана с его скавенджерной ролью в отношении свободно-радикальных веществ и возможной функцией по хелатированию ионов металлов с переменной валентностью.

При исследовании продукции свободных радикалов в ранние сроки формирования реакции отмены этанола A. Bautista et al. (2002) установлено увеличение образования в тканях супероксидного анион-радикала. Дальнейшее превращение супероксидного радикала может происходить по механизму, известному как реакция Хабер-Вайса, с образованием гидроксильного радикала.

Фундаментальные работы K.J. Davies et al. (1987) показывают, что белки, подверженные действию гидроксильного радикала в комбинации с супероксидным радикалом, проявляют большую восприимчивость к деградации. Особая чувствительность к модификациям выявлена для цистеина, гистидина, триптофана и тирозина. Отмечено, что гидроксильные радикалы определяют формирование белковых агрегатов.

Также известно, что липидные перекиси опосредуют процесс димеризации тирозина [11] и ингибируют активность супероксиддисмутазы. Учитывая данные факты

и многочисленные данные об активации перекисного окисления липидов при алкоголизме, можно предположить направленность превращения супероксидного радикала по пути образования гидроксильного радикала и увеличение, обусловленное им, битирозиновых сшивок при формировании алкогольной абстиненции.

Однако данные проведенного нами исследования свидетельствуют об обратном. Возможные механизмы такого изменения содержания битирозина при алкогольной абстиненции предположительно могут быть связаны с ограничением опосредованного влияния липоперекисей на процесс образования тирозиновых димеров, предупреждением снижения активности супероксиддисмутазы и связыванием гидроксильного радикала, т.е. с процессами, которые либо уменьшают вероятность образования гидроксильного радикала, либо приводят к его устранению. Соответственно этому снижается возможность его действия на белковые молекулы в отношении формирования белковых продуктов агрегации.

Выявленная нами ранее на аналогичной группе пациентов повышенная активность глутатионпероксидазы, вероятно, может ограничивать промежуточное действие липоперекисей в плане синтеза битирозина и ингибирования ими супероксиддисмутазы. Предположительно, активация супероксиддисмутазы при алкогольной абстиненции уменьшает вероятность образования продуктов реакции Хабер-Вайса.

Кроме того, активные формы кислорода с мощным окислительным эффектом, такие как гидроксильный радикал, могут вызывать отщепление атома водорода от этанола, образуя 1-гидроксиэтильный радикал. Гидроксиэтильный радикал может взаимодействовать с кислородом, формируя пероксильный радикал, дальнейшая перестройка которого приводит к освобождению ацетальдегида и супероксида. Таким образом, при формировании алкогольной абстиненции возможность образования гидроксильного радикала может быть затруднена.

Утилизация гидроксильного радикала в реакции синтеза гидроксиэтильного радикала дала основания предположению, что в определенных экспериментальных условиях этанол обладает свойствами скавенджера свободных радикалов. Однако этот феномен не имеет существенного биологического значения из-за генерации реакционноспособного гидроксиэтильного радикала. Ускорение дисмутации супероксида сопровождается интенсивным образованием пероксида водорода, токсичность которого значительно меньше супероксида, но под

его влиянием также может происходить нарушение проницаемости мембран метгемоглобинообразование, инактивация ферментов и ряд других нежелательных событий. Данные, полученные Бабенко Г.А. (2001) при анализе показателей спонтанной и индуцированной хемилюминесценции сыворотки крови при хроническом алкоголизме, указывают на превалирование агентов, разлагающих пероксид водорода по свободно-радикальному пути, над веществами, которые обуславливают нерадикальный распад пероксида водорода.

Таким образом, по уменьшению содержания битирозина в сыворотке можно косвенно судить о возможных химических модификациях белков при алкогольном абстинентном синдроме. В то же время данные сдвиги не могут расцениваться как положительные из-за сохранения действия активных радикальных форм в этот период развития алкоголизма, а также вследствие того, что образование битирозина является биологически значимой посттрансляционной модификацией при биосинтезе некоторых белков.

Список литературы

1. Титов В.Н. О биологической функции эндоэкологии (чистота межклеточной среды), которую реализуют две биологические реакции: реакция экскреции и реакция воспаления – утилизация *in vivo, in situ* катаболитов большой молекулярной массы // Клиническая лабораторная диагностика. 2018. Т. 63. № 11. С. 668–676.
2. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З., Бондарь И.А., Труфакин В.А. Окислительный стресс: патологические состояния и заболевания. Новосибирск: АРТА, 2008. 284 с.
3. Кошкина Е.А., Киржанова В.В. Проблемы распространенности болезней зависимости и основные направления совершенствования наркологической помощи в России // Вопросы наркологии. 2013. Т. 6. С. 10–26.
4. Перфильев П.Р., Виноградов Д.Б., Паначев И.В., Синицкий А.И. Особенности окислительного стресса и содержание кортизола в крови пациентов с абстинентным состоянием, осложненным развитием алкогольного делирия // Медицинская наука и образование Урала. 2014. Т. 15. № 4 (80). С. 115–117.
5. Shepard B.D., Tuma D.J., Tuma P.L. Chronic ethanol consumption induces global hepatic protein hyperacetylation. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 2010. № 34 (2). P. 280–291.
6. Fritz K.S., Green M.F., Petersen D.R., Hirschey M.D. Ethanol metabolism modifies hepatic protein acylation in mice. *PLoS One.* 2013. № 8 (9). P. 75868.
7. Garcia-Castineiras S., Dillon J., Spector A. Detection of bityrosine in cataractous human lens protein. *Science.* 1978. № 199 (4331). P. 897–899.
8. Wang F, Yang W, Hu X. Discovery of high affinity receptors for dityrosine through inverse virtual screening and docking and molecular dynamics. *Int. J. Mol. Sci.* 2018. № 20 (1). P. E115.
9. Beynikova I.V., Terekhin S.P., Muravlyova L.E., Molotov-Luchanskiy V.B., Bakirova R.E., Klyuev D.A., Snyatina V.A. Characteristics of oxidative metabolism parameters at acute intoxication induced by surrogate alcohol. *Vopr. Pitan.* 2016. № 85 (3). P. 36–41.
10. Augustyniak A., Bylińska A., Skrzydlewska E. Age-dependent changes in the proteolytic-antiproteolytic balance after alcohol and black tea consumption. *Toxicol. Mech. Methods.* 2011. № 21 (3). P. 209–215.
11. Bartesaghi S., Wenzel J., Trujillo M., López M., Joseph J., Kalyanaraman B., Radi R. Lipid peroxyl radicals mediate tyrosine dimerization and nitration in membranes. *Chem. Res. Toxicol.* 2010. № 23 (4). P. 21–835.