

СТАТЬЯ

УДК 616.89-008.441.13:577.112.4

**УРОВЕНЬ АЛИФАТИЧЕСКИХ АЛЬДЕГИД-ДИНИТРОФЕНИЛГИДРАЗОНОВ
В КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С АЛКОГОЛЬНЫМ АБСТИНЕНТНЫМ СИНДРОМОМ****Ефременко Е.С.***ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения РФ, Омск, e-mail: bx-osma@mail.ru*

Окислительный стресс является одной из основных причин структурных изменений, происходящих с белковыми молекулами в крови. Значительное количество публикаций по данному вопросу позволяет говорить о том, что при алкоголизме происходит развитие психической и физической зависимости от этилового алкоголя, возникают необратимые изменения молекулярного состава биологических жидкостей и клеток организма. Белки плазмы крови при действии избыточного количества свободнорадикальных соединений первыми вовлекаются в процессы окислительных изменений, имеют значительный период полураспада, их устойчивость к воздействию других биомолекул относительно высока, для них отсутствуют специфические рецепторы, позволяющие им активно переходить из крови в клетки, и поэтому рассматриваются как значимый и надежный маркер оксидативного статуса организма при возникновении различных заболеваний. Проведена оценка параметров окислительной модификации белковых молекул плазмы крови больных алкоголизмом, имеющих признаки алкогольного абстинентного синдрома. В число обследуемых вошли пациенты 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 определенными критериями включения и исключения. Уровень спонтанной окислительной модификации белков в крови оценивали по образованию алифатических альдегид-динитрофенилгидразонов. В статье описываются возможные причины полученных данных, приводится анализ метаболических последствий нарушения функционирования белков при алкогольном абстинентном синдроме.

Ключевые слова: алкоголь, алкоголизм, этанол, алкогольный абстинентный синдром, алкогольная абстиненция, окислительная модификация белков, свободнорадикальное окисление, антиоксиданты

**THE LEVEL OF ALIPHATIC ALDEHYDE-DINITROPHENYLHYDRAZONES
IN THE BLOOD OF PATIENTS WITH ALCOHOL WITHDRAWAL SYNDROME****Efremenko E.S.***Federal State Funded Educational Institution for Higher Education Omsk State Medical University
Ministry of Public Health Russian Federation, Omsk, e-mail: bx-osma@mail.ru*

Oxidative stress is one of the main causes of structural changes in protein molecules in the blood. In a significant number of publications talk about the development of mental and physical dependence on ethyl alcohol in alcoholism, there are irreversible changes in the molecular composition of biological fluids and cells of the body. Proteins of blood plasma under the action of excess amounts of free radical compounds of the first involved in the processes of oxidative modifications, have a significant half-life, their resistance to the effects of other biomolecules is relatively high, there is no specific receptors that allow them to actively move from the blood into the cells and is therefore regarded as a significant and reliable marker of oxidative status of an organism at the onset of various diseases. The estimation of parameters of oxidative modification of protein molecules in the blood plasma of alcoholic patients with signs of alcohol withdrawal syndrome. Among the surveyed group consisted of patients of a narcological clinic with the diagnosis «Mental and behavioural disorders due to use of alcohol, the average stage. Syndrome active addiction. The withdrawal state, uncomplicated, the average severity» (F.10.242, F.10.302). The sample of patients was carried out in accordance with defined criteria of inclusion and exclusion. The article describes the possible causes of these changes, the analysis of the metabolic consequences of the disorders of the functioning of proteins in alcohol withdrawal syndrome.

Keywords: alcohol, alcoholism, ethanol, alcohol withdrawal syndrome, alcohol withdrawal, oxidative modification of proteins, free radical oxidation, antioxidants

Окислительный стресс является одной из основных причин структурных изменений, происходящих с белковыми молекулами в крови. Плазменные белки при действии избыточного количества свободнорадикальных соединений первыми вовлекаются в процессы окислительных изменений, имеют значительный период полураспада, их устойчивость к воздействию других биомолекул относительно высока, для них отсутствуют специфические

рецепторы, позволяющие им активно переходить из крови в клетки, и поэтому рассматриваются как значимый и надежный маркер оксидативного статуса организма при возникновении различных заболеваний [1]. Способом реализации окислительной модификации белков являются реакции карбонилирования белков преимущественно по остаткам треонина, пролина, гистидина, лизина. В результате возникают необратимые ковалентные

изменения белковых молекул. До определенного уровня выраженности и интенсивности процесс окислительных изменений белковых молекул носит физиологический характер. Он необходим для удаления и деградации протеинов с наличием структурных нарушений при участии лизосом, а также в ходе функционирования протеасомного механизма. При достижении определенного уровня выраженности окислительная модификация белков приобретает патологическую направленность.

Реализация токсических эффектов этанола и ацетальдегида при злоупотреблении алкоголем может быть осуществлена посредством окисления белковых молекул. Алкоголь-индуцируемая генерация кислородных радикалов и повышение интенсивности липопероксидации при алкоголизме могут быть причиной изменения структуры белков, приводящей к нарушению механизмов действия сигнальных молекул, функционирования транспортных, ферментных систем, работы рецепторов [2].

Вполне вероятно, что данные нарушения могут проявляться в виде различных метаболических сдвигов и находить отражение в клинической симптоматике при формировании алкогольной абстиненции. Детальная оценка параметров окислительной модификации белков плазмы крови в различные сроки развития алкогольного абстинентного синдрома может способствовать уточнению и более глубокому пониманию нарушений молекулярных и биохимических событий при алкоголизме.

В связи с этим с целью оценки окислительной модификации белков в первые сутки развития алкогольного абстинентного синдрома было проведено исследование содержания в плазме крови больных алкоголизмом алифатических альдегид-динитрофенилгидразонов.

Материалы и методы исследования

В число обследуемых вошли пациенты 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: возраст 35–50 лет; состояние алкогольной абстиненции при поступлении в стационар; информированное согласие пациента (или его родственников) на проведение исследования. Критерии исключения: наличие аллергических, эндокринных или других заболеваний, способ-

ных оказать влияние на течение основного заболевания и результат исследования; прием других наркотических и психотропных средств; отказ от участия в исследовании (по результатам беседы с пациентом или его родственниками).

С использованием этих критериев была сформирована группа больных, у которых взяты крови для исследования проводилось в первые сутки (группа ААС1, n = 9) после поступления в стационар. Группу сравнения (группа К, n = 10) составили условно здоровые лица аналогичной возрастной категории. Купирование абстинентных расстройств проводилось обычными медикаментозными средствами (дезинтоксикация, седативная терапия, витаминотерапия).

Уровень спонтанной окислительной модификации белков в крови оценивали по образованию алифатических альдегид-динитрофенилгидразонов [3].

Статистическая обработка полученных данных проводилась с помощью компьютерных программ AnalystSoft Inc., Statplus (версия 5) и Microsoft Excel. В качестве основных характеристик описательной статистики применяли медиану (Me), нижний 25-й (L) и верхний 75-й (H) квантили. Оценку статистической значимости различий проводили с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни (U) для двух независимых выборок.

Результаты исследования и их обсуждение

При оценке уровня алифатических альдегид-динитрофенилгидразонов в крови пациентов с алкогольным абстинентным синдромом статистически значимых изменений не обнаружено. Содержание алифатических альдегид-динитрофенилгидразонов в группе ААС1 составило 276,7 (226,1; 319,3) ЕДоп/г белка. ЕДоп – единицы оптической плотности. В группе сравнения уровень данного параметра был равен 289,8 (268,4; 444,3) ЕДоп/г белка.

Индикация структурных изменений протеинов, связанных с развитием заболеваний, в патогенезе которых отводится значительное место свободнорадикальным веществам, может быть осуществлена при оценке параметров окислительной модификации белковых молекул в различных тканях и биологических жидкостях. Оценка данных показателей в условиях патологии позволяет говорить о том, что их устойчивость к воздействиям других молекул высока, а вовлеченность в химические процессы в тканях и крови – низкая. Это обстоятельство определяет надежность показателей окислительной модификации

белков в аспекте диагностики окислительного стресса.

Динитрофенилгидразоны представляют собой соединения, которые образуются в результате взаимодействия окислительно-модифицированных белков с 2,4-динитрофенилгидразином. Считается, что при окислительной модификации белков происходят различные конформационные изменения структуры протеинов, связанные с влиянием веществ свободнорадикальной природы. Предположительно роль инициаторов окислительной модификации белков выполняют: а) продукты липопероксидации; б) активные кислородные метаболиты; в) ионы двухвалентного железа.

Соединение продуктов перекисного окисления липидов с радикалами аминокислот (цистеин, лизин, гистидин) в белковых молекулах составляет один из возможных способов реализации окислительных изменений в протеинах. Также вероятным вариантом может быть воздействие химически агрессивных радикалов кислорода с формированием карбонильных производных белков. Немаловажным моментом является существование процесса металл-катализируемого окисления белков. Так, влияние солей железа и меди – это причина образования гидроксильного радикала, вызывающего формирование карбонильных производных белков.

В то же время представляется, что главными иницирующими факторами изменения структуры белков окислительного характера являются активированные кислородные метаболиты [4]. В плане химического воздействия с развитием молекулярных последствий в виде образования белковых агрегатов наиболее мощным считается гидроксильный радикал. Фундаментальные исследования Davies K. et al. (1987) по оценке стабильности протеиновых структур крови электрофоретическим методом, а также изучение уровня формирования агрегационных продуктов, проведенное с измерением молекулярной массы, показали значительное повреждение многих белков под влиянием гидроксильного радикала.

Окислительным изменениям структуры белковых молекул подвержены практически все аминокислотные радикалы. По данным Дубининой Е.Е. и соавт. (1993), указанные изменения приводят к трансформации физико-химических свойств протеинов: а) в сторону повышения склонности к образованию агрегатов, или наоборот; б) тенденции к формированию коротких белково-пептидных веществ (фрагментация); в) уменьшение количества гидрофильных аминокислотных последовательностей;

г) увеличение подверженности протеолитической ферментативной деградации.

Кроме того, видится весьма вероятным снижение каталитической активности ферментов в результате окислительных модификаций их молекул с многочисленными негативными метаболическими последствиями. Это связано с реакциями окисления, в которые вступают функциональные группы аминокислот активных центров ферментов. Их структурная модификация определяет изменение ферментативной активности. Определенные ферменты класса оксидоредуктаз полностью теряют свою активность в результате воздействия на активный центр гидроксильного радикала.

Нарушение структуры митохондриальных белков из-за активации окислительных реакций с участием аминокислот, входящих в состав протеинов митохондриальных мембран, выражается в развитии гипонергетического состояния.

Избыточное образование и сохранение в клетках окислительно-модифицированного протеина обуславливает возможность формирования дополнительных поперечных «сшивок» как внутри молекулы белка, так и между отдельными белковыми субъединицами, что определяет утрату свойств белковых молекул.

Максимально подвержены действию свободных радикалов аминокислоты, содержащие в своем составе серу (цис, мет) и бензольное кольцо (фен, тир, три). Соответственно, свободнорадикальное изменение структуры белков сопровождается появлением тиольных радикалов, радикалов ароматических аминокислот, углеродных радикалов, радикальных форм, содержащих азот.

Алкоголь-индуцированные структурные изменения затрагивают белки различных тканей [5]. В результате этого белковые молекулы могут претерпевать следующие изменения: взаимодействие липидных перекисей с аминокислотными остатками гистидина, лизина, цистеина в составе белков; окисление с образованием карбонильных производных белков; окисление с образованием дисульфидов и серосодержащих кислот, гликозилирование протеинов, глиоксидация с участием остатков аспарагиновой кислоты и лизина.

В экспериментальных исследованиях Bailey S. et al. (2001) при моделировании хронической алкогольной интоксикации показано увеличение карбонильных производных белков в цитозольной и митохондриальной фракциях ткани печени. В работе [6] отмечено увеличение интенсивности ацетилирования. Shringarpure R. et al. (2002)

выявили активацию пропионилирования митохондриальных белков при воздействии этанола. Kim H. et al. (2006) показали, что уровень окислительно-модифицированных белков при воздействии этанола повышен в нервных структурах, ткани легких, плазме крови.

Установлено повышение карбонильных производных белков при развитии алкогольного абстинентного состояния, осложнённого делирием. Авторами подчёркивается значимость влияния длительности и тяжести заболевания на исследуемые показатели [7; 8]. При хронической алкогольной интоксикации в плазме крови и эритроцитах Grattagliano I. et al. (1995) выявлено существенное изменение редокс-статуса белковых молекул в сторону увеличения окисленных форм. Данные положительно коррелируют с низким уровнем восстановленного глутатиона, повышением активности прооксидантных ферментов.

Алкоголь-ассоциированное поражение печени с развитием цирротических изменений также может являться одной из причин модификации уровня карбонилированных производных белков согласно данным иммуногистохимического, масс-спектрометрического и блоттингового анализа. Более 400 уникальных, специфичных для алкогольной патологии видов измененных белков выделено в условиях триггеризации окислительного стресса. При детальном изучении механизмов данного процесса определили взаимосвязь длительного, хронического потребления этанола с увеличением уровня карбонилирования белков в посттрансляционный период. Стоит отметить мнение авторов об обусловленности нарушений в аспекте изменения глутатионового гомеостаза и гликолитических процессов при алкоголизме [9].

По данным других исследователей, изменений показателей, отражающих окислительную модификацию белкового статуса в крови при алкогольном абстинентном синдроме, по сравнению с группой условно здоровых лиц не наблюдается [10].

Принято считать, что алифатические альдегид-динитрофенилгидразоны – это продукты окисления триптофана, аргинина, лизина, пролина, являющиеся ранними маркерами окислительной деструкции белка и отражающие степень деструкции белков по типу фрагментации. Модификация белков по типу фрагментирования может быть связана с действием радикальных форм липидов, выявляемым при различных формах алкогольной интоксикации.

Недостаточность и дефекты ферментативной антиоксидантной активности

в отношении продуктов липидной перексидации являются причиной усиления окислительных изменений белковых молекул. Так, в исследовании хронического действия этанола на мышах, «нокаутированных» по гену фермента глутатион-S-трансферазы A4-4, проявляющего высокую каталитическую эффективность относительно продуктов липоперексидации и реактивных альдегидов, выявлено повышение уровня карбонилированных белков [9].

Возможный механизм, объясняющий полученные данные об уровне продуктов окислительной модификации белков в плазме крови при алкогольной абстиненции, может быть связан с повышением активности протеасомального пути деградации белков. Превалирующая 20S-форма протеасом более избирательна к процессу лизиса ковалентно модифицированных и белков с ошибками фолдинга [11].

Другой вероятной причиной результатов исследования видится значительная активация окислительной модификации белков вследствие предшествующей развитию абстинентного состояния алкогольной интоксикации. Результатом этого может явиться формирование количественного недостатка субстратов для процесса карбонилирования.

Кроме того, необходимость устранения метаболических сдвигов, отмеченная Zhenqi L. et al. (2002), при отмене алкоголя сопровождается первоочередным использованием аминокислот и белков крови, мышечной и других тканей и подтверждается результатами наших предыдущих исследований, свидетельствующих об увеличении активности гаммаглутамилтрансферазы в ткани печени при моделировании алкогольной абстиненции.

Результаты оценки окислительной модификации белков крови по уровню алифатических альдегид-динитрофенилгидразонов могут быть связаны с преимущественным действием активных форм кислорода на полиненасыщенные высшие жирные кислоты, входящие в состав фосфолипидов клеточных мембранных образований, что обеспечивает сохранность белков.

Также механизмом, определяющим отсутствие статистически значимых изменений оцениваемых параметров, представляется действие компонентов антиоксидантной системы клеток. Так, оценка эффективности функционирования каталазы при исследовании влияния этанола в дрожжевых клетках, проведенная Lushcha K. et al. (2003), показала защитные свойства данного фермента в отношении образования окислительно-модифицированных форм белковых молекул.

Выводы

Обобщая указанные факты, можно сделать выводы о том, что отсутствие значимых изменений уровня алифатических альдегид-динитрофенилгидразонов в крови больных алкоголизмом при развитии абстинентного состояния может быть связано с:

1) недостатком субстратов для окислительной модификации, который сопряжен с активным использованием белков в процессе метаболической адаптации, а также усилением их вовлеченности в свободнорадикальные процессы в ходе предшествующей алкогольной интоксикации;

2) усилением процессов внутриклеточной деградации белковых молекул, которая интенсифицируется из-за окислительных изменений в структуре белков;

3) возможным преимущественным влиянием свободнорадикальных субстанций на полиеновые высшие жирные кислоты фосфолипидов мембран клеток;

4) эффективным функционированием ферментативной составляющей антиоксидантной системы.

Список литературы

1. Болдырев А.А., Кяйвярайнен Е.И., Илюха В.А. Биомембранология. Петрозаводск, 2006. 226 с.
2. Rouach H., Fataccioli V., Gentil M., French S., Morimoto M., Nordmann R. Effect of chronic ethanol feeding on lipid peroxidation and protein oxidation in relation to liver pathology. *Hepatology*. 1997. Vol. 25. P. 351–355.
3. Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод её определения // *Вопросы медицинской химии*. 1995. № 41. С. 24–26.
4. Муравлева Л.Е., Молотов-Лучанский В.Б., Ключев Д.А., Бакенова Р.А., Култанов Б.Ж., Танкибаева Н.А., Койков В.В., Омарова Г.А. Окислительная модификация белков: проблемы и перспективы исследования // *Фундаментальные исследования*. 2010. № 1. С. 74–78.
5. Панченко Л.Ф., Давыдов Б.В., Теребилина Н.Н., Баронец В.Ю., Наумова Т.А. Окислительный стресс в патогенезе алкогольной болезни печени // *Вопросы наркологии*. 2013. № 2. С. 82–91.
6. Ramirez T., Longato L., Dostalek M., Tong M., Wands J., S. de la Monte. Insulin resistance, ceramide accumulation and endoplasmic reticulum stress in experimental chronic alcohol-induced steatohepatitis. *Alcohol Alcohol*. 2013. Vol. 48. P. 39–52.
7. Малев А.Л., Захарова А.Н. Окислительная модификация белков плазмы крови как биологический маркер вероятности развития синдрома отмены с делирием при алкогольной зависимости // *Украинский вестник психоневрологии*. 2010. Т. 18. № 1 (62). С. 57.
8. 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. С. 115–117.
9. Shearn C., Fritz K., Shearn A., Saba L., Mercer K., Engi B., Galligan J., Zimniak P., Orlicky D., Ronis M., Petersen D. Deletion of GSTA4-4 results in increased mitochondrial post-translational modification of proteins by reactive aldehydes following chronic ethanol consumption in mice. *Redox Biol*. 2016. Vol. 7. P. 68–77.
10. Parthasarathy P., Kattimani S., Sridhar M. Oxidative stress during alcohol withdrawal and its relationship with withdrawal severity. *Indian J. Psychol. Med*. 2015. Vol. 37 (2). P. 175–180.
11. Donohue T. Jr., Thomes P. Ethanol-induced oxidant stress modulates hepatic autophagy and proteasome activity. *Redox Biol*. 2014. Vol. 3. P. 29–39.