

УДК 616.89-008.441.13:616.15

ОЦЕНКА ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА У БОЛЬНЫХ АЛКОГОЛИЗМОМ**Прокопьева В.Д., Ветлугина Т.П., Ярыгина Е.Г., Мандель А.И.***Научно-исследовательский институт психического здоровья, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, e-mail: mental@tnimc.ru*

Исследован уровень окислительной модификации белков (карбонилированных белков, КБ) и липидов (ТБК-реактивных продуктов, ТБК-РП) плазмы крови, а также активность супероксиддисмутазы (СОД) в плазме и гемолизате эритроцитов крови больных алкогольной зависимостью в динамике стандартной антиалкогольной терапии: на 3–4 день после поступления пациента в стационар (1-я точка) и на 12–14 день терапии (2-я точка). Обнаружено статистически значимое повышение уровня КБ и ТБК-РП у больных в 1-ой точке обследования относительно соответствующих показателей здоровых лиц (контроля). Активность СОД как в плазме крови, так и в гемолизате у больных алкоголизмом в этот период (в 1-й точке) практически не отличалась от контроля. Дальнейшее лечение приводило к снижению карбонилированных белков и ТБК-реактивных продуктов плазмы крови до величин, статистически не отличающихся от контрольных. Активность СОД в плазме крови в группе пациентов через 12–14 дней лечения оставалась практически такой, как и в 1-й точке обследования, а в гемолизате эритроцитов достоверно увеличилась. Полученные данные позволяют рассматривать карбонилированные белки и ТБК-реактивные продукты, как и СОД, в качестве кандидатов для включения в состав комплексного биомаркера оценки эффективности терапии и устойчивости терапевтической ремиссии у больных алкогольной зависимостью.

Ключевые слова: окислительный стресс, белки, липиды, супероксиддисмутазы, кровь, алкоголизм**EVALUATION OF PERIPHERAL OXIDATIVE STRESS MARKERS IN ALCOHOLIC PATIENTS****Prokopeva V.D., Vetlugina T.P., Yarygina E.G., Mandel A.I.***Mental Health Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, e-mail: mental@tnimc.ru*

The level of oxidative modification of proteins (carbonylated proteins, CP) and lipids (TBA-reactive products, TBA-RP) in blood plasma as well as activity of superoxide dismutase (SOD) in blood plasma and red blood cell hemolysate of patients with alcohol addiction in the time course of standard anti-alcohol therapy was investigated: by day 3 – 4 after admission of the patient in the hospital (point 1) and by day 12 – 14 of the therapy (point 2). The statistically significant increase in the level of CP and TBA-RP in patients at point 1 of the examination was found in relation to corresponding parameters of healthy persons (controls). In this period (point 1), SOD activity both in blood plasma and hemolysate in the group of alcoholic patients did not practically differ from control. Further therapy led to decrease in carbonylated proteins and TBA-reactive products of blood plasma up to values that did not differ statistically from control ones. SOD activity in blood plasma by days 12 – 14 after the therapy remained practically the same as at point 1 of the examination and it increased reliably in red blood cell hemolysate. The obtained data allowed considering carbonylated proteins and TBA-reactive products as well as SOD as candidates for integration into the complex biomarker of evaluation of the efficiency of the therapy and stability of therapeutic remission in patients with alcohol addiction.

Keywords: oxidative stress, proteins, lipids, superoxide dismutase, blood, alcoholism

Окислительный стресс (ОС) является важнейшим фактором патогенеза алкогольной зависимости и существенно влияет на характер клинического течения болезни, что доказано многочисленными исследованиями [1–3]. Измерение периферических маркеров ОС в динамике терапии больных алкогольной зависимостью может оказаться полезным для оценки эффективности проводимого лечения и прогноза устойчивости ремиссии, а выявление взаимосвязей маркеров окислительного стресса с клиническими проявлениями алкоголизма может явиться основой для разработки новых подходов к дифференциальной диагностике, созданию новых технологий и алгоритмов лечения и реабилитации больных алкогольной

зависимостью. В литературе описаны подходы, которые позволили по показателям окислительного стресса (карбонильным продуктам окисления белков, уровню SH-групп в плазме, уровню окисления липидов) выявлять группы пациентов с разными клиническими вариантами течения хронической ишемии мозга. Изучение взаимосвязей этих показателей с клиническими проявлениями заболевания позволило авторам разработать диагностические критерии, указывающие на неблагоприятный тип течения заболевания и риск развития инсульта [4]. В другой работе установлены достоверные различия по показателям интенсивности окислительного стресса в группах пациентов с различными клиническими формами

и стадиями рассеянного склероза, с использованием маркеров ОС разработаны новые критерии прогноза течения заболевания и рекомендации по лечению [5]. Ранее нами была показана целесообразность оценки выраженности окислительного стресса путем измерения окисленных белков и липидов плазмы крови у больных алкогольной зависимостью для назначения персонализированной антиоксидантной терапии [6].

Целью данной работы было исследование периферических маркеров ОС (окисленных белков и липидов плазмы крови, а также активности одного из важнейших антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазы плазмы и гемолизата эритроцитов крови) у больных алкоголизмом в динамике стандартной антиалкогольной терапии для поиска наиболее информативных показателей, перспективных для разработки в дальнейшем критериев прогноза длительности ремиссии.

Материалы и методы исследования

В основную группу обследования вошли 38 мужчин, больных алкогольной зависимостью, находящихся на лечении в отделении аддиктивных состояний клиники НИИ психического здоровья Томского национального исследовательского медицинского центра РАН. Диагноз больных по МКБ-10 квалифицировался как «Психические и поведенческие расстройства в результате употребления алкоголя (синдром зависимости – F10.21 и синдром отмены – F10.30)». Средний возраст участников основной группы составил 44,5 (39,0–52,0) лет. В контрольную группу вошли 38 практически здоровых мужчин, которые не состояли на учете у психиатра или нарколога, не имели хронических соматических заболеваний в стадии обострения и не употребляли алкоголь, по крайней мере, последние 10 суток перед исследованием. Средний возраст участников контрольной группы составил 42,0 (34,0–53,0) лет (различия с основной группой по данному показателю статистически не значимы, $p > 0,05$).

В основной группе исследование проводили в динамике терапии синдрома отмены и постабстинентного состояния: 1-я точка обследования – на 3–4 день после поступления пациента в стационар и проведения ему курса дезинтоксикационной терапии; 2-я точка – на 12–14 день стандартной терапии.

У всех участников исследования кровь брали из локтевой вены утром натощак с использованием стерильной системы однократного применения Vacutainer («Becton Dickinson», USA) с антикоагулянтом литий-гепарин. Плазму крови получали центрифугированием (10 минут, 3000 об/мин). Эритроцитарную массу трижды отмывали изотоническим раствором натрия хлорида и гемолизировали деионизованной водой в соотношении 1:10. Далее плазму крови и гемолизат эритроцитов разливали по 0,3 мл в пробирки для микропроб типа эппендорф, замораживали и хранили при -80°C до исследования.

Окислительную модификацию белков плазмы крови оценивали по уровню карбонилированных белков (КБ) с использованием 2,4-динитрофенилгидразина (Panreac, Espana) [7]. Окислительную модификацию липидов – по содержанию ТБК-реактивных продуктов (ТБК-РП) с применением набора реактивов ТБК АГАТ (ООО «Агат-Мед», РФ). Активность СОД в плазме и гемолизате эритроцитов крови определяли, используя набор реактивов Superoxide Dismutase Assay Kit (Cayman Chemical Company, USA). Методики были адаптированы для измерения оптической плотности в планшетах (Orange scientific, Бельгия) на спектрофотометре ЕРОСН (BioTek Instruments, USA).

Исследование проводили с соблюдением принципов информированного согласия Хельсинкской декларации Всемирной Медицинской Ассоциации.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета компьютерных программ «Statistica 10». Данные представляли в виде медианы (Me) и межквартильного интервала (QL–QU). Оценку достоверности межгрупповых различий проводили с использованием непараметрического критерия Манна – Уитни, для зависимой выборки использовали тест Вилкоксона. Значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Основные экспериментальные результаты исследования представлены в таблицах.

Как следует из данных, представленных в табл. 1, в плазме крови больных алкогольной зависимостью в 1-й точке обследования, проведенной после интенсивной дезинтоксикационной терапии и снятия выраженных проявлений абстинентного синдрома, обнаружено статистически значимое повышение уровня карбонилированных белков и ТБК-реактивных продуктов ($p < 0,05$ для обоих показателей).

Таблица 1

Карбонилированные белки (КБ) и ТБК-реактивные продукты (ТБК-РП) в плазме крови больных алкоголизмом в динамике терапии синдрома отмены и постабстинентного состояния, Me (QL–QU)

Показатели	Больные алкоголизмом, n = 38		Контроль, n = 38
	1 точка (3–4 день терапии)	2 точка (12–14 день терапии)	
КБ, нмоль/мг	0,43 (0,37–0,51)*	0,41 (0,30–0,47)	0,35 (0,28–0,43)
ТБК-РП, нмоль/мл	3,5 (2,8–4,2)*	2,6 (2,3–3,1)	2,45 (2,10–2,80)

Примечание. * $p < 0,05$ по сравнению с контролем и с соответствующей 2-й точкой.

Таблица 2

Активность супероксиддисмутазы (СОД) в плазме и гемолизате эритроцитов крови больных алкоголизмом в динамике терапии синдрома отмены и постабстинентного состояния, Me (QL–QU)

Показатели	Больные алкоголизмом, n = 38		Контроль, n = 38
	1 точка (3–4 день терапии)	2 точка (12–14 день терапии)	
СОД плазмы, ед. акт/мл	0,17 (0,13–0,19)	0,17 (0,15–0,21)	0,17 (0,13–0,19)
СОД гемолизата эритроцитов, ед. акт/мл	4,1 (3,9–4,3)	4,3 (4,2–4,5)*	4,0 (3,9–4,25)

Примечание. * $p < 0,05$ по сравнению с контролем и с соответствующей 1-й точкой.

При этом активности супероксиддисмутазы как в плазме, так и в гемолизате эритроцитов крови пациентов в этот период (в 1-й точке обследования) практически не отличались от контроля (табл. 2).

Дальнейшее лечение привело к статистически значимому снижению в плазме крови пациентов как карбонилированных белков, так и ТБК-реактивных продуктов до величин, статистически не отличающихся от контрольных показателей (табл. 1, 2-я точка). Активность СОД плазмы крови в группе пациентов и через 12–14 дней лечения (во 2-й точке) не изменилась по сравнению с 1-й точкой обследования и была сопоставима с контролем. В гемолизате эритроцитов активность СОД во второй точке обследования достоверно повысилась как относительно первой точки, так и относительно контроля (табл. 2).

Полученные в настоящем исследовании результаты согласуются с данными литературы, свидетельствующими о снижении выраженности окислительного стресса у больных алкоголизмом в процессе терапии. Ранее в наших исследованиях для более эффективного купирования окислительного стресса были использованы антиоксидантные препараты [8, 9]. Рекомендации по использованию антиоксидантных соединений для купирования ОС у больных алкоголизмом даются в ряде обзорных статей [9–11]. Получены также положительные результаты коррекции окислительного стресса у больных алкогольной зависимостью при использовании технологии КВЧ-терапии – воздействию на организм электромагнитного излучения крайне высокой частоты низкой интенсивности в миллиметровом диапазоне [9, 12]. Оценка оксидативного статуса больных алкоголизмом по уровню окисленных белков и липидов плазмы крови позволила выявить разную степень выраженности ОС у разных пациентов. Было обнаружено, что в процессе антиоксидантной терапии в разных груп-

пах пациентов, отличающихся исходным оксидативным статусом, изменение уровня карбониллов белков и продуктов ПОЛ в плазме крови происходит разнонаправленно: при отсутствии у больного при поступлении состояния ОС за время лечения может произойти его индукция, в то время как при выраженном ОС при поступлении на лечение после антиоксидантной терапии происходит его купирование [9]. Эти данные позволяют предполагать перспективность оценки исходного уровня окисленных белков и липидов плазмы крови и их динамики в процессе терапии и для прогноза длительности ремиссии.

Об изменении активности СОД плазмы (или сыворотки) крови, как и СОД гемолизата эритроцитов, больных алкоголизмом в процессе антиалкогольной терапии данные литературных источников весьма противоречивы. В работе М.С. Huang и соавторов (2009) показано, что на ранней стадии синдрома отмены алкоголя активность сывороточной СОД у пациентов снижена [3]. Однако R. Parthasarathy с соавторами (2015) сообщают о более высокой, по сравнению с контрольной группой, активности СОД у пациентов в состоянии алкогольной абстиненции [2]. В наших более ранних исследованиях было выявлено статистически значимое повышение СОД в плазме крови больных алкоголизмом в период абстиненции до начала терапии [12]. После 7 дней лечения у пациентов происходило снижение активности СОД в плазме крови, при этом в группе, в которой на фоне традиционного лечения применяли КВЧ-терапию, это снижение происходило быстрее [12]. В работе Высокогорского с соавторами (2006) было обнаружено, что у больных алкогольной зависимостью активность эритроцитарной СОД очень лабильна: в 1-е сутки пребывания пациента в стационаре она на 13% ниже нормы, на 3-и сутки лечения достоверно превышает значения здоровых лиц, а на 5-й и 10-й день не отличается от таковых [13]. Другие ис-

следователи показали, что у больных с тяжелой степенью алкогольного абстинентного синдрома после детоксикационной терапии активность СОД в гемолизате эритроцитов статистически достоверно ниже контрольных показателей [14]. Есть также данные о том, что у пациентов в состоянии абстиненции активность СОД в эритроцитах на 60% выше, чем у здоровых лиц [15]. При этом после проведенной терапии была выявлена корреляционная связь между изменением активности СОД и каталазы в эритроцитах и длительностью последующей ремиссии у пациентов. Если в процессе терапии одновременно повышалась активность СОД и каталазы, длительность ремиссии была максимальной и составляла в среднем семь недель. При повышении активности одного из ферментов с одновременным снижением активности другого длительность ремиссии составляла не более пяти недель. Если в результате лечения снижалась активность обоих ферментов, длительность ремиссии не превышала трех недель [15].

В настоящем исследовании мы не выявили заметных изменений активности СОД плазмы крови у пациентов как относительно контроля, так и после двухнедельного стандартного лечения. При этом в гемолизате эритроцитов обнаружено статистически достоверное повышение активности СОД после терапии, что в целом можно оценить как положительный фактор для купирования окислительного стресса. Представленные в данном исследовании результаты динамики активности СОД в крови больных алкоголизмом в процессе стандартной терапии, наряду с данными литературы, еще раз подтверждают высказанное ранее предположение о том, что активность данного антиоксидантного фермента очень лабильна и зависит от многих факторов – таких, например, как стадия заболевания, длительность и способ терапевтического воздействия, особенности метаболизма пациента, сопутствующая соматическая отягощенность и др. Вполне вероятно, что исходный уровень активности этого фермента, как и направленность ее изменения в процессе терапии, может рассматриваться в качестве одного из факторов, позволяющих прогнозировать эффективность терапевтического воздействия и длительности ремиссии у пациентов.

Результаты данного исследования подтверждают предположение о том, что периферические маркеры окислительного стресса (окисленные биомолекулы крови – карбонилированные белки и продукты

перекисного окисления липидов, а также активность СОД могут рассматриваться, наряду с другими циркулирующими в крови факторами (про/противовоспалительными цитокинами, стресс-реализующими стероидными и тиреоидными гормонами и др.), в качестве возможных компонентов комплексного биомаркера оценки эффективности проводимой терапии и устойчивости терапевтической ремиссии у больных алкогольной зависимостью.

Заключение

Таким образом, исследование периферических маркеров окислительного стресса у больных алкоголизмом в динамике терапии синдрома отмены и постабстинентного состояния показало, что как СОД, так и карбонилированные белки и ТБК-реактивные продукты крови являются перспективными кандидатами для включения в разрабатываемый нами тест оценки эффективности проводимой терапии и устойчивости терапевтической ремиссии у больных алкогольной зависимостью.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и администрации Томской области в рамках научного проекта № 18-44-70002.

Список литературы

1. 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.
2. Parthasarathy R., Kattimani S., Sridhar M.G. Oxidative stress during alcohol withdrawal and its relationship with withdrawal severity. *Indian J. Psychol. Med.*, 2015, vol. 37, no 2, pp. 175–180. DOI: 10.4103/0253-7176.155617.
3. Huang M.C., Chen C.H., Peng F.C., Tang S.H., Chen C.C. Alterations in oxidative stress status during early alcohol withdrawal in alcoholic patients. *J. Formos Med. Assoc.*, 2009, vol. 108, no. 7, pp. 560–569. DOI: 10.1016/S0929-6646(09)60374-0.
4. Азизова О.А., Соловьева Э.Ю., Асейчев А.В., Баранова О.А., Бекман Э.М., Карнеев А.Н., Миронова О.М., Маневский А.П., Иваноков А.Н., Федин А.И., Сергиенко В.И. Взаимосвязь маркеров окислительного стресса с клиническим течением хронической ишемии мозга // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2013. № 9, Вып. 2. С. 21–27.
5. Луцкий М.А., Земсков А.М., Разинкин К.А. Биохимические маркеры окислительного стресса при различных клинических формах и стадиях течения рассеянного склероза // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2014. № 11. С. 74–77.
6. Прокопьева В.Д., Мандель А.И., Ярыгина Е.Г. Персонализированная антиоксидантная терапия при алкогольной зависимости // Наркология. 2017. № 6. С. 31–35. URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=29672418> (дата обращения: 17.08.2018).
7. Levine R.L. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic. Biol. Med.*. 2002. vol 32. P. 790–796.
8. Prokopieva V.D., Yarygina E.G., Bokhan N.A., Ivanova S.A. Use of Carnosine for Oxidative Stress Reduction in Different Pathologies. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016. vol. 2016. Article ID 2939087. 8 p.

9. Бохан Н.А., Прокопьева В.Д., Иванова С.А., Ветлугина Т.П., Епимахова Е.В., Плотников Е.В., Ярыгина Е.Г., Бойко А.С. Окислительный стресс и его коррекция у больных алкогольной зависимостью (итоги исследований в НИИ психического здоровья Томского НИМЦ) // Вопросы наркологии. 2018. № 3. С. 27–59.
10. Nordmann R. Alcohol and antioxidant systems. *Alcohol&Alcohol*. 1994. vol. 29. no. 5. P. 513–522.
11. Zima T., Fialova L., Mestek O., Janebova M., Crkowska J., Malbohan I., Stipek S., Mikulikova L., Popov P. Oxidative Stress, Metabolism of Ethanol and Alcohol-Related Diseases. *J. Biomed. Sci.*. 2001. vol. 8. no. 1. P. 59–70.
12. Прокопьева В.Д., Ярыгина Е.Г., Кротенко Н.М., Бойко А.С., Бохан Н.А., Иванова С.А. Показатели антиоксидантной системы и дофамина плазмы крови в динамике микроволновой резонансной терапии у больных алкоголизмом // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2017. № 9. С. 67–70.
13. Высокогорский В.Е., Ефременко Е.С., Грицаев И.Е. Характеристика обмена глутатиона при алкогольном абстинентном синдроме // Наркология. 2006. № 8. С. 59–61.
14. Куреков И.В., Долгих В.Т. Использование гипоксена в лечении пациентов, страдающих алкоголизмом и находящихся в состоянии отмены алкоголя // Наркология. 2009. № 3. С. 67–72.
15. Красиков С.И., Тухватуллина Р.Ф., Тимошинова С.В. Изменение активности антиоксидантных ферментов при лечении алкоголизма // Вестник Оренбургской государственной медицинской академии. 2005. № 5. С. 130–131.