

УДК 616.89-008.441.13-036.66:577.11

©Коллектив авторов

ИЗМЕНЕНИЯ ОБМЕНА ЛИПОПРОТЕИНОВ ПРИ АЛКОГОЛИЗМЕ НЕ ВОССТАНАВЛИВАЮТСЯ В УСЛОВИЯХ ДЛИТЕЛЬНОЙ РЕМИССИИ

Г.Х. Божко, В.В. Соколик, В.С. Чурсина, А.Ф. Артемчук

Институт неврологии, психиатрии и наркологии АМН Украины, 61068, Харьков, ул. Академика Павлова, 46; тел/факс: (0572)26-33-87, 38057738, 33874083; эл. почта: doctor@alc-help.com

Исследовали содержание липопротеинов (ЛП), липопротеинлипазную и холестеролэтерифицирующую активность сыворотки крови у больных алкоголизмом в периоды интоксикации, отмены алкоголя и в условиях длительной ремиссии. Обнаружили, что в ремиссии общая картина перераспределения апоВ-содержащих ЛП в интактной сыворотке крови подобна той, которая характеризует состояние интоксикации. Процессы превращения ЛП этого класса значительно замедляются в изолированной сыворотке крови *in vitro*. Величина этих изменений практически аналогична периоду интоксикации. Происходит это на фоне различной активности свободной и связанной форм липопротеинлипаз. Характерной особенностью состояний интоксикации и отмены алкоголя является высокий уровень ЛВП_{2а}. В ремиссии количество всех апоА-содержащих фракций ЛП значительно меньше, чем в контроле. Наряду с этим замедлены процессы их превращения *in vitro*. Интенсивность этих изменений близка периоду интоксикации.

Таким образом, нарушения обмена ЛП, которые наблюдаются в периоды интоксикации и отмены алкоголя, не восстанавливаются в состоянии длительной ремиссии.

Ключевые слова: липопротеины (ЛП), этанол, сыворотка крови, липопротеинлипазы (ЛПЛ), лецитин-холестеролацилтрансфераза (ЛХАТ).

ВВЕДЕНИЕ. Липопротеины (ЛП) крови - хиломикроны (ХМ), ЛП очень низкой (ЛОНП), промежуточной (ЛПП) и низкой плотности (ЛНП), - осуществляют транспорт липидов из печени в другие ткани. В обратном направлении липиды переносятся апоА-содержащими ЛП высокой плотности (ЛВП). В процессе прямого и обратного транспорта холестерина (ХС) и триацилглицеридов (ТГ) происходят ферментативные превращения ЛП, обмен липидными компонентами в пределах каждого из двух классов и между ними [1]. Исследование ЛП интактной сыворотки крови характеризует перераспределение фракций, которое происходит в кровяном русле и в результате взаимодействия с тканевыми структурами *in vivo*. Анализ перераспределения фракций после инкубации сыворотки крови *in vitro* позволяет исключить роль тканевых механизмов и выяснить процессы превращения частиц ЛП, свойственные только изолированной сыворотке [2].

При действии алкоголя наблюдаются характерные изменения содержания и обмена ЛП. По этой причине определение количества ЛП или ХС в их составе входит в перечень факторов, используемых для лабораторной диагностики алкоголизма [3]. Среди исследований ЛП при алкоголизме преобладают работы, посвященные изучению механизмов острой и хронической интоксикации. Особенности обмена ЛП при длительной ремиссии практически не рассматривались.

Цель настоящей работы заключалась в исследовании у больных алкоголизмом перераспределения основных фракций ЛП сыворотки крови и активности ферментов их превращения в разные периоды заболевания и условиях длительной ремиссии.

МЕТОДИКА. Исследовали сыворотку крови мужчин в возрасте от 25 до 52 лет ($43 \pm 4,2$ года). Больные одной из групп находились в состоянии алкогольной интоксикации, продолжающейся около 9 суток. Других пациентов обследовали на 3, 14 и 30 сутки после отмены алкоголя (абстиненция). Каждая группа больных включала 9-10 пациентов.

Клиническая характеристика обследованных лиц соответствовала всем основным симптомам второй стадии алкогольной зависимости.

Отдельную группу составили 10 пациентов, которые находились в состоянии длительной ремиссии после сеанса стрессопсихотерапии по методу А.Р. Довженко. У двух человек из этой группы полная алкогольная депривация продолжалась 8 лет; у остальных – в среднем 1,5 года.

В качестве контроля использовали сыворотку крови 12 здоровых доноров соответствующего возраста и пола.

Холестеролэтерифицирующую способность сыворотки крови определяли методом Stokke и Norum [4] и выражали в нмоль холестерина, подвергшегося этерификации за 1 сек инкубации в 1 л сыворотки крови.

Общую липопротеинлипазную активность крови определяли ранее описанным методом [5] после освобождения фермента, связанного с эндотелием капилляров при помощи гепарина. Раствор гепарина в дозе 50 ЕД/кг веса тела вводили внутривенно с экспозицией 15 мин. Об активности липопротеинлипазы (ЛПЛ-зы), которую выражали в нмоль/(л·сек) судили по приросту за 2 часа инкубации неэтерифицированных жирных кислот. Помимо общей липопротеинлипазной активности регистрировали ее фоновую величину, присутствующую в данный период времени в циркулирующей крови.

Липопротеины определяли по методу, описанному в предыдущей работе [2]. Сыворотку крови получали центрифугированием 10 мин, 3000 об/мин при 4°C. Далее, образцы сыворотки разделяли на две части. Одну из них сразу охлаждали до -18°C и хранили при этой же температуре 24 ч. Другую инкубировали 24 ч как описано ранее при температуре 37°C [2].

Гель-электрофорез проводили в течение 1,5 ч при постоянной силе тока 60 мА в вертикальных пластинах (160×140×2 мм) с линейным градиентом концентрации акриламида 2,5-10% (pH 8,9). Для стабилизации градиента концентрации акриламида добавляли 10%-ю сахарозу. Использовали реактивы фирмы "Reanal" (Венгрия).

Электрофореграммы сканировали на денситометре ERI-65m ("Karl Zeiss", Германия). Полученные денситограммы использовали для качественного анализа фракций липопротеинов. Результаты обрабатывали при помощи программного обеспечения, основанного на алгоритме обработки цифрового материала с подпрограммами поиска максимальных величин оптической плотности отдельных фракций по второй производной огибающей кривой денситограммы и вычисления площади пиков в мм², а также оптимизации и сравнения расчетных величин с реальной интегральной кривой.

Полученные данные обрабатывали по методу Фишера-Стьюдента. В отдельных экспериментах достоверность различий определяли с помощью непараметрического критерия Вилкоксона.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Результаты, представленные на рисунке 1, свидетельствуют, что общее количество апоВ-содержащих ЛП не изменялось у больных в период интоксикации этанолом по сравнению с контролем. В этих условиях наблюдалось отчетливое количественное перераспределение индивидуальных фракций ЛП указанного класса. Как видно из данных, представленных на рисунке 2А, это выражалось в резком уменьшении концентрации ЛПП (28%). Уровень ЛОНП и ЛНП, напротив, повышался (124% и 145% по сравнению с контролем, соответственно).

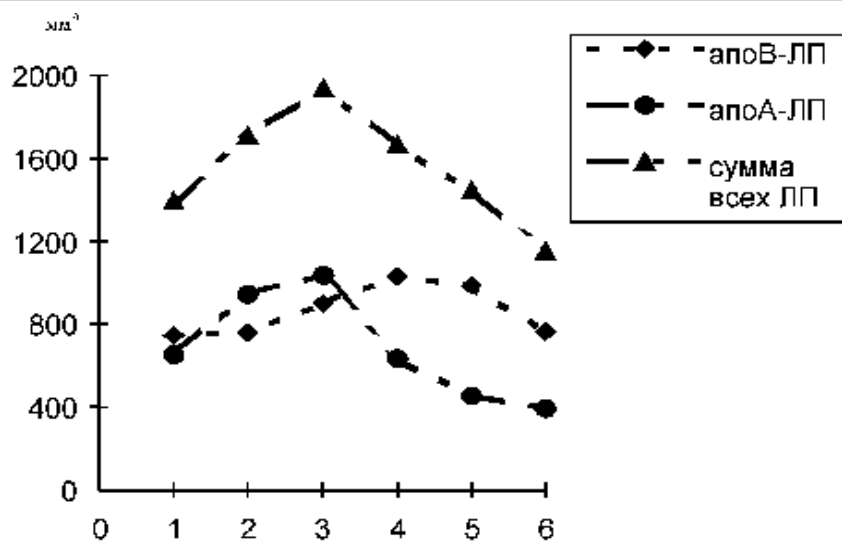


Рисунок 1.

Количество апоВ- и апоА-содержащих фракций липопротеинов сыворотки крови в разные периоды заболевания алкоголизмом и в ремиссии. Ось ординат: площадь пиков фракций, мм^2 ; ось абсцисс: 1 - контроль, 2 - интоксикация, 3, 4, 5 - различные периоды после отмены этанола, 3, 14, 30 суток, соответственно; 6 - ремиссия.

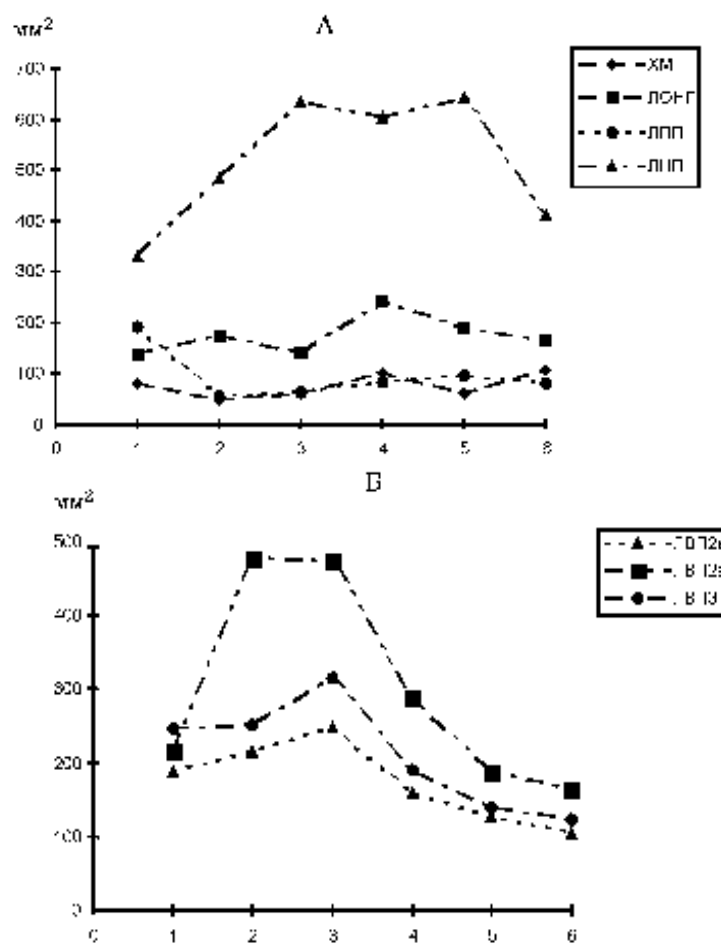


Рисунок 2.

Изменения количества индивидуальных фракций липопротеинов в разные периоды заболевания и в ремиссии. А - апоВ-содержащие фракции липопротеинов, Б - апоА-содержащие фракции липопротеинов. Обозначения на осях координат такие же, как на рис. 1.

Конечным продуктом превращения апоВ-содержащих ЛП в сыворотке крови являются ЛНП. Их функция состоит в снабжении периферических тканей этерифицированным ХС [1]. Усиление этого процесса вполне может быть связано с повышением липолитической активности сыворотки крови. Как видно из данных, представленных на рисунке 3, при интоксикации этанолом наблюдается значительное повышение липолитической активности. При этом уровень свободного пула ЛПЛ-зы возрастает в 2 раза, в то время как величина общей (постгепариновой) фракции – лишь на 15%. Это, по-видимому, связано с тем, что при интоксикации этанолом почти наполовину уменьшается доля активности фермента, адсорбированного на поверхности сосудов. Усиление солюбилизирующего ЛПЛ-зу эффекта гепарина в контроле достигало 135%, в то время как в условиях интоксикации этанолом составляло не более 35%.

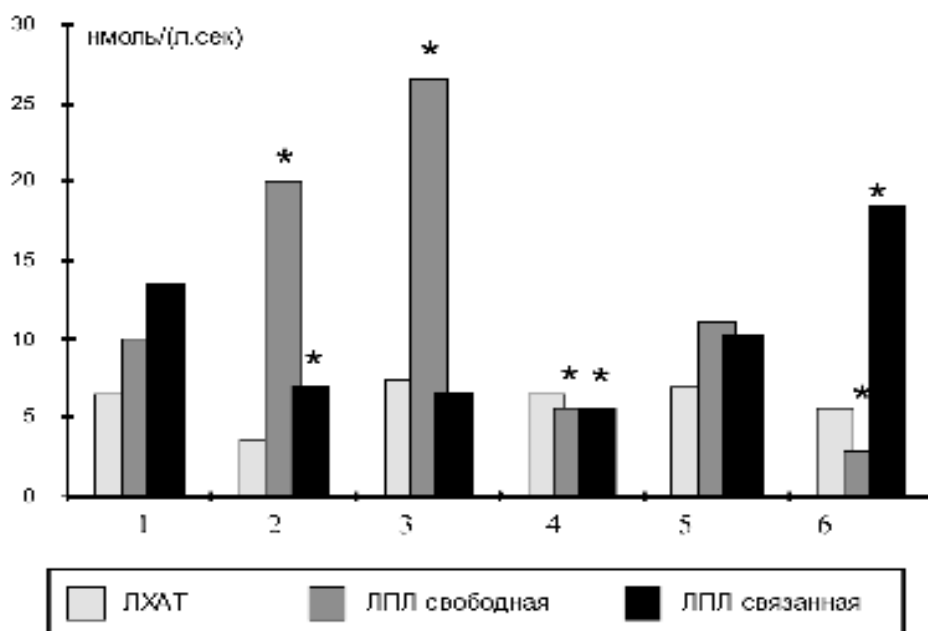


Рисунок 3.

Изменение липопротеинлипазной и холестеролэтерифицирующей активности сыворотки крови в различные периоды заболевания и в ремиссии. Ось ординат: активность ферментов в нмоль/(л·сек); ось абсцисс: обозначения те же, как на рис. 1;

* - изменения статистически достоверны по сравнению с контролем.

Приведенные результаты свидетельствуют, что интоксикация этанолом вызывает освобождение значительной доли молекул ЛПЛ-зы, связанных с мембранами клеток. Иными словами, этанол подобно гепарину способен нарушать взаимодействие липолитических ферментов с гликозилированными компонентами эндотелия сосудов [6].

Среди данных, представленных на рисунке 2А, обращает на себя внимание самая низкая при интоксикации этанолом среди всех исследованных групп больных концентрация ХМ (60% по сравнению с контролем). Принимая во внимание то обстоятельство, что ХМ переносят в кровотоке экзогенные, поступившие с пищей липиды [1], можно предположить, что наблюдаемые изменения связаны с нарушением режима питания больных. Повышенный уровень ЛОНП в рассматриваемой и других группах больных в таком контексте может трактоваться как свидетельство обеспечения тканей липидами за счет эндогенных ресурсов, усиления синтеза ЛОНП в печени [1]. Между тем это может также объясняться дефицитом функции одной из фракций ЛПЛ-зы,

катализирующей липолиз ТГ в составе ЛОНП, в отличие от действия печеночной ТГ-липазы, способствующей расщеплению ТГ в составе ЛПП [7], и активность которой стимулируется в условиях интоксикации этанолом. Такое предположение хорошо согласуется с результатами определения фоновой липолитической способности крови и резким уменьшением количества ЛПП.

Полученные результаты свидетельствуют, что при интоксикации этанолом, в отличие от апоВ-содержащих ЛП, сумма апоА-содержащих фракций возрастала на 45 %, продолжала увеличиваться к третьим суткам после отмены этанола, после чего снижалась (рис. 1). Как известно, в организме человека и некоторых животных величина отношения апоВ- к апоА-содержащим ЛП близка к единице. То есть два основных класса ЛП в сыворотке крови находятся в количественном равновесии [1]. На рисунке 1 видно, что у лиц с зависимостью от алкоголя при всех исследованных стадиях заболевания наблюдается значительное нарушение этого равновесия. Причем, происходит инверсия количественных изменений апоВ- и апоА-содержащих фракций. Кривые, которые описывают динамику количественных изменений, перекрещиваются в период отмены этанола.

Повышение уровня ЛВП при действии этанола обычно рассматривается как свидетельство стимуляции их функции с последующей экстраполяцией на представления об антиатерогенных свойствах алкоголя [8]. Между тем, многие факты указывают на снижение в условиях интоксикации этанолом у больных алкоголизмом обмена апоА-содержащих ЛП. Данные рисунка 3 показывают, что стадия интоксикации этанолом характеризуется значительным (54%) уменьшением активности ЛХАТ, которая в дальнейшем не отличается от контроля. В этих условиях (на фоне интоксикации) (рис. 2Б) среди исследованных субпопуляций апоА-содержащих ЛП увеличивалось количество лишь фракции ЛВП_{2а}. Частицы этих белково-липидных комплексов служат субстратом для переноса эфиров ХС к апоВ-содержащим ЛП. Поэтому высокий уровень ЛВП_{2а}, вероятно, указывает на снижение функции холестеролпереносящих белков [9]. В инкубированной *in vitro* сыворотке крови больных алкоголизмом, так же, как у больных атеросклерозом, наблюдается сильное торможение превращения всех фракций апоА-содержащих ЛП [10].

Изменения содержания ЛП после прекращения употребления алкоголя исследовали в широком интервале времени (рис. 2А, Б). Весь этот период заболевания характеризовался высоким уровнем фракции ЛНП (181-193% по сравнению с контролем). Подобные изменения отмечены и для других апоВ-содержащих ЛП (ХМ и ЛОНП). Они выражались в наличии максимума концентрации, приходящегося на вторую неделю развития синдрома отмены алкоголя. Уровень ЛПП после значительного уменьшения в период интоксикации оставался сниженным.

В первые дни после отмены этанола содержание ЛВП_{2а} оставалось таким же высоким, как в состоянии интоксикации. Наряду с этим, наблюдалось повышение по сравнению с контролем и предыдущим периодом исследования других субпопуляций апоА-содержащих ЛП (рис. 2Б). После этого уровень всех апоА-содержащих фракций понижался по сравнению с начальными стадиями абстиненции. Количество ЛВП₃ уже через 14 суток после отмены этанола было ниже даже по сравнению с контролем (77%). Наибольшая инерция повышающего ЛВП эффекта этанола была свойственна фракции ЛВП_{2а}, уровень которой даже через 14 суток после отмены алкоголя оставался выше на 33%, чем у здоровых лиц.

На основании полученных данных можно судить о том, что в каждый последующий период заболевания (по сравнению с предыдущим) наблюдалась противоположная направленность изменений концентрации ХМ и ЛОНП, с одной стороны, и активности той или иной формы ЛПЛ-зы, с другой. Вместе с тем изменения фракции ЛНП были однонаправлены с активностью свободного пула липолитических ферментов. Результаты этого сопоставления хорошо согласуются с представлением о том, что транспорт липидов из печени в другие ткани включает

последовательные превращения апоВ-содержащих ЛП, обусловленных расщеплением ТГ в составе ЛОНП и ХМ [1].

В отличие от этого количественные превращения апоА-содержащих фракций ЛП в разные периоды заболевания не соответствуют изменениям ЛХАТ активности (рис. 2Б и 3).

Анализ полученных данных показывает, что изменения количества некоторых фракций ЛП, которые возникли в условиях интоксикации этанолом, не только не восстанавливаются, но даже усиливаются в период развития синдрома отмены алкоголя. Обнаруженные нарушения весьма стабильны. В сыворотке крови лиц, зависимых от алкоголя, к 30 суткам после его отмены сохраняется высокий уровень ЛНП и значительно снижена концентрация фракций ЛВП₃ и ЛВП₂₆ (рис. 2).

Как видно из данных, представленных на рисунке 2А, у лиц в состоянии ремиссии наблюдалось повышение по сравнению с контролем содержания ХМ (131%). Можно предположить, что данный эффект связан с восстановлением нормального питания больных, и это выражается в компенсаторном повышении функции ХМ.

Суммарное количество апоВ-содержащих ЛП в ремиссии, как и при интоксикации, не отличалось от показателей здоровых лиц. Вместе с тем общая картина перераспределения индивидуальных апоВ-содержащих фракций, за исключением ХМ, вполне сходна той, которая характеризует группу больных, исследованных в состоянии интоксикации. Доля ЛНП и ЛОНП составляла по сравнению с контролем 124% и 119%, соответственно, а фракции ЛПП – 42%.

Отмеченное подобие направленности изменений апоВ-содержащих частиц ЛП в ремиссии и при интоксикации происходит на фоне абсолютно различной активности ЛПЛ-3. Как следует из данных, представленных на рисунке 3, в условиях ремиссии активность свободной формы липолитических ферментов составляла лишь 28% по сравнению с контролем и 14% по сравнению с величиной, наблюдавшейся при интоксикации. Доля связанной формы, наоборот, достигала 137% по сравнению с контролем и была в 2,6 раза выше, чем при интоксикации. Несмотря на существенное отличие от контроля, изменение соотношения свободной и связанной форм липолитических ферментов в ремиссии, скорее свидетельствует о нормализации функции ЛПЛ-3, чем о ее нарушении [11].

Количество всех исследованных апоА-содержащих фракций ЛП в состоянии ремиссии значительно меньше, чем в контроле (рис. 1, 2). Это определяет высокое значение величины отношения апоВ- к апоА-содержащим ЛП – 170% по сравнению с контролем. При этом активность ЛХАТ больных статистически значимо не отличалась от величин у здоровых лиц (рис. 3). В результате сравнения соотношения отдельных субпопуляций ЛВП можно видеть, что в ремиссии остаются последствия значительного возрастания при интоксикации и абстиненции количества ЛВП_{2а}. Это выражается в том, что уровень данной фракции, в отличие от контроля, превышает содержание ЛВП₃.

Приведенные результаты свидетельствуют, что в интактной сыворотке крови больных алкоголизмом в состоянии длительной ремиссии наблюдаются отклонения концентрации всех исследованных апоВ- и апоА-содержащих фракций ЛП по сравнению с величинами, характеризующими здоровых лиц. Эффект нормализации отсутствует.

В таблице приведены данные о перераспределении фракций ЛП после инкубации изолированной сыворотки крови *in vitro*. В предыдущих работах показано, что у здоровых лиц (в норме) основными показателями, характеризующими процесс превращения ЛП *in vitro* является увеличение доли ЛНП и уменьшение ЛВП₃ [2, 10]. Изменения количества этих и других фракций отражают нормальный процесс формирования ЛНП и переход ЛВП₃→ЛВП₂ в изолированной сыворотке крови в результате действия факторов, которые способствуют превращению ЛП непосредственно в кровотоке без участия тканевых механизмов. Результаты настоящей работы вполне согласуются с этим выводом.

Таблица. Перераспределение фракций липопротеинов сыворотки крови после её инкубации в течение суток при температуре 37°C.

Фракции ЛП	ХМ	ЛОНП	ЛПП	ЛНП	ЛВП _{2а}	ЛВП _{2в}	ЛВП ₃
Контроль	100±5	81±3*	30±1*	184±8*	60±3*	138±6*	44±2*
Ремиссия	86±3	98±4	79±3*	126±5*	92±3	84±3	72±3*
Интоксикация	88±3	90±4	75±3*	127±5*	104±5	89±4	80±3*

Примечания: результаты представлены в процентах к значениям в интактной сыворотке крови, до инкубации (средняя арифметическая ± ошибка средней); статистическая значимость $p < 0,05$;

* - изменение статистически достоверно по сравнению со значением “до инкубации”.

Данные таблицы свидетельствуют, что у больных алкоголизмом в состоянии ремиссии процессы превращения апоВ-содержащих ЛП *in vitro* значительно замедляются по сравнению с контролем. Количество ХМ и ЛОНП не изменяется по сравнению с начальной (до инкубации) величиной. Доля ЛПП уменьшается на 21%, а ЛНП - увеличивается на 26%. Обращает на себя внимание тот факт, что также как в интактной сыворотке крови, величина этих изменений *in vitro* практически аналогична отклонениям, которые наблюдались у больных в период интоксикации. Различие между рассматриваемыми группами больных составляло не более 1-2% (см. табл.).

В ремиссии *in vitro* также происходит замедление по сравнению с контролем превращения апоА-содержащих фракций (табл.). Об этом свидетельствует отсутствие значимых изменений после инкубации сыворотки крови субфракций ЛВП_{2а} и ЛВП_{2в}. Вместе с тем наблюдалось незначительное по сравнению с контролем уменьшение доли ЛВП₃. Сравнение изменений ЛВП, которые наблюдались в ремиссии и при интоксикации, показывает, что они подобны, также как превращение апоВ-содержащих фракций.

Означают ли обнаруженные закономерности нарушения обмена ЛП, что они генетически обусловлены, присущи части человеческой популяции, предрасположенной к заболеванию алкоголизмом, служат ли они фактором риска в развитии зависимости от алкоголя или являются результатом перенесенного заболевания, предстоит решить в последующих исследованиях.

Авторы благодарят сотрудников ООО “Центр здоровья доктора Артемчука” за участие в работе и обсуждении ее результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Климов А.Н., Никульчева Н.Г. (1999) Обмен липидов и липопротеидов и его нарушения. Из-во Питер, Санкт-Петербург.
2. Божко Г.Х., Кулабухов В.М. (1993) Биохимия, **58**, 1594-1603.
3. Шабанов П.Д. (2002) Основы наркологии. Лань, Санкт-Петербург.
4. Stokke K.T., Norum K.R. (1971) J. Clin. Lab. Invest., **27**, 21-27.
5. Deekelbaum R.L., Ramakrishnan R., Eisenberg S. (1992) Biochemistry, **31**, 8544-8551.
6. Sendak R.A., Berryman D.E., Gellman G. et al. (2000) J. Lipid Res., **41**, 260-268.
7. Griffin B.A., Freeman D.J., Tait G.W. (1994) Atherosclerosis, **106**, 241-253.
8. Зезеров Е.Г. (1998) Вопросы биол., мед. и фарм. химии, **2**, 47-55.

9. Barter P.I., Liang H.Q., Clay M.A., Rye K.A. (1995) Atherosclerosis (Woodford F.P, ed.), Elsevier Science, Amsterdam. pp. 731-735.
10. Божко Г.Х., Артемчук А.П., Чурсіна В.С., Артемчук О.А. (2002) Медична хімія, **4**(2), 19-22.
11. Seo T., Al-Haideri Y., Treskova E et al. (2000) J. Biol. Chem., **275**, 30355-30362.

Поступила: 11. 11. 2003.

CHANGES OF THE LIPOPROTEIN METABOLISM IN ALCOHOL DEPENDENCE
DO NOT RECOVER UNDER CONDITIONS OF
PROLONGED REMISSION

G. Kh. Bozhko, V.V. Sokolyk, V.S. Chursina, A.F. Artemchuk

Institute of Neurology, Psychiatry and Narcology of the AMS of Ukraine,
Akademika Pavlova ul., 46, Kharkiv, 61068 Ukraine; tel.: (0572)26-40-83;
fax: 26-33-87; e-mail: doctor@alc-help.com

Contents of lipoproteins (LP), activity of lipoprotein lipase (LP-lipase) and cholesterol esterification activity of blood serum were examined in patients with alcoholism at the periods of intoxication, alcohol abstinence and under conditions of prolonged remission. During remission a general pattern of apoB-containing LP was similar to the period of intoxication. Processes of transformation of this class LP significantly delayed in isolated blood serum *in vitro*. The magnitude of these changes almost corresponded to the period of intoxication. However activity of free and membrane-bound forms of LP-lipase. A high level of LPHD_{2a} was characteristic for the conditions of intoxication and alcohol abstinence. In the remission the level of all the apoA-containing LP fractions was significantly lower than in the control. Besides, processes of their transformations *in vitro* were slowed down. Intensity of these changes resembled the period of intoxication.

Thus, disorders of LP metabolism pointed out during the period of intoxication and alcohol abstinence do not recovered under conditions of a prolonged remission.

Key words: lipoproteins, ethanol, blood serum, lipoprotein-lipases, lecithincholesterolacyltransferase.