

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 616.89—008.441.13:547.262

© Коллектив авторов

УГНЕТЕНИЕ ЭТЕРИФИЦИРУЮЩЕЙ И ЛИПОПРОТЕИНЛИПАЗНОЙ АКТИВНОСТЕЙ СЫВОРОТКИ КРОВИ ПРИ ОСТРОМ И ДЛИТЕЛЬНОМ ДЕЙСТВИИ ЭТАНОЛА

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

Институт неврологии, психиатрии и наркологии АМН Украины, Украина, 61068,
Харьков, ул. Академика Павлова, 46, тел.: (0572) 738-40-83;
эл. почта: doctor@alc-help.com

Исследовали этерифицирующую и липопротеинлипазную активности, а также спектр липопротеинов сыворотки крови при острой и длительной этанольной интоксикации. Установили ингибирующее влияние этанола на лецитин-холестерин-ацилтрансферазную и липопротеинлипазную активности и повышение апоА-содержащих липопротеинов в сыворотке крови. Выявленные изменения рассматриваются как предпосылка угнетения прямого и обратного транспорта холестерина в кровяном русле при действии этанола.

Ключевые слова: этанол, лецитин-холестерин ацилтрансфераза, липопротеинлипаза, липопротеины.

ВВЕДЕНИЕ. Одной из актуальных задач в решении проблемы алкоголизма является выяснение механизмов острого и хронического влияния этанола на отдельные звенья метаболизма и, в частности, на обмен липопротеинов (ЛП). Значение нарушений липидного обмена при данной патологии очень велико [1,2]. Поэтому цель данного исследования состояла в изучении эффектов этанола на протекание в сыворотке крови двух ферментативных процессов: этерификации свободного холестерина, катализируемого лецитин-холестерин-ацилтрансферазой (ЛХАТ), и взаимопревращение апоВ-содержащих ЛП под действием липопротеинлипаз (ЛПЛ).

МЕТОДИКА. Группу контроля составили из 14 человек (средний возраст составил 42 ± 4 года) - сотрудники частной наркологической клиники, которые по нравственным и профессиональным соображениям в течение многих лет находились в состоянии полной алкогольной депривации [3]. После регистрации исходных значений исследуемых параметров испытуемым перорально вводили 40% раствор этанола в дозе 1 г/кг веса. Эффекты длительного воздействия этанола изучали в группе больных хроническим алкоголизмом (18 человек), средний возраст которых составлял 41 ± 3 года. Стаж алкоголизма пациентов составлял 5-8 лет, а длительность последнего запоя $6,8 \pm 3,8$ суток. Использовать в качестве контрольных величин в модели длительной этанольной интоксикации показатели хронических алкоголиков "до запоя" мы посчитали нецелесообразным, поскольку периодичное употребление этанола приводит к необратимым метаболическим нарушениям, не восстанавливающимся в светлые промежутки времени между запоями [4]. Таким образом, контролем в этой модели, как и в модели острой интоксикации этанолом, служили исходные показатели вышеупомянутых абстинентов.

Активность ЛХАТ и ЛПЛ активности определяли через 2 ч и 3 суток после однократного приема этанола (у пациентов контрольной группы); а у хронических алкоголиков — через 2 ч, 3 суток и 10 суток после последнего приема этанола. В той же динамике в сыворотке крови определяли содержание общего (ОХ), свободного (СХ) и этерифицированного (ЭХ) холестерина непрямым методом Златкиса-Зака с дигитонином [5] и содержание неэтерифицированных жирных кислот (НЭЖК) — унифицированным методом. Этерифицирующую способность сыворотки крови определяли методом Stokke и Norum [6] и выражали в нмоль холестерина, подвергшегося этерификации в 1 л сыворотки за 1 сек инкубации (нмоль/л·сек). Общую липопротеинлипазную активность сыворотки крови определяли как описано [7]. Поскольку ЛПЛ только частично присутствует в кровяном русле, то с целью высвобождения основной массы фермента из связи с эндотелием кровеносных сосудов внутривенно вводили раствор гепарина (50 ЕД/кг веса). Забор крови осуществляли до и через 15 мин после введения гепарина. Липопротеинлипазную активность сыворотки крови рассчитывали по разности между величинами общей (+ гепарин проба) и базальной (- гепарин проба) ЛПЛ активности и выражали в нмоль НЭЖК в 1 л сыворотки за 1 сек инкубации (нмоль/л·сек).

Методом гель-электрофореза [8] было проанализировано перераспределение 7 фракций липопротеинов сыворотки крови: хиломикроны (ХМ), липопротеины очень низкой плотности (ЛОНП), липопротеины промежуточной плотности (ЛПП), липопротеины низкой плотности (ЛНП), три фракции липопротеинов высокой плотности (ЛВП_{2А}, ЛВП_{2В}, ЛВП₃). Для идентификации ЛП, параллельно с образцами сыворотки крови разделяли отдельные фракции ЛП, выделенные ультрацентрифугированием [8]. Электрофореграммы сканировали на денситометре ERI-65m ("Karl Zeiss", Германия). Полученные денситограммы использовали для качественного анализа фракций ЛП. Цифровой материал вводили в персональный компьютер. В основу программного обеспечения входил алгоритм обработки цифрового ряда, который включал подпрограммы поиска максимальных величин оптической плотности отдельных фракций по второй производной огибающей кривой денситограммы и вычисления площади пиков в мм², а также оптимизация и сравнение расчетных величин с реальной интегральной кривой. Содержание отдельных фракций липопротеинов в каждой пробе выражали в процентах от общей суммы фракций (100%). В отдельных случаях рассчитывали соотношение фракций между собой.

Статистическую обработку результатов проводили в системе Sg Win. Для анализа достоверности различий использовали критерий U Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Исследование этерифицирующей способности сыворотки крови показало, что при остром и длительном действии этанола ЛХАТ активность снижена в 3,5 раза в первые 2 ч и восстанавливается до исходных значений в группе контроля к 3 суткам после отмены токсического агента (рис. 1). Считается, что скорость окисления этанола в организме человека после однократного приема постоянна во времени (фармакокинетика нулевого порядка) и составляет 85-100 мг/кг в час. При длительном введении этанола скорость окисления даже несколько возрастает вследствие повышения активности алкогольдегидрогеназы [9]. Поэтому можно предположить, что угнетение ЛХАТ активности через 2 ч после приема этанола есть результат его прямого токсического действия, а нормализация этерифицирующей способности сыворотки крови к 3 суткам сопряжена с полным окислением экзогенного этанола. Далее, было установлено, что длительное действие этанола не влияло на содержание метаболитов ЛХАТ реакции *in vivo*, т.е. в сыворотке крови больных алкоголизмом во все исследованные промежутки времени после последнего приема этанола (табл. 1) содержание ОХ, СХ и ЭХ не отличалось от исходных величин в контрольной группе абстинентов. Кажущееся противоречие между тем, что на фоне ингибирования этанолом ЛХАТ в сыворотке крови больных

алкоголизмом не изменяется общее количество и соотношение фракций холестерина можно разрешить лишь допустив, что этанол угнетает еще одно звено в цепи обратного транспорта холестерина – активность эфир холестерин переносящих белков (ЭХПБ). Основная функция ЭХПБ – это реципрокный обмен ЭХ и триглицеридов между апоА- и апоВ-содержащими ЛП: 80% ЭХ, образующихся в ЛХАТ реакции переносится этими белками с ЛВП на апоВ-содержащие ЛП [10]. Вышеизложенные факты убеждают в том, что этанол тормозит обратный транспорт холестерина в кровотоке путем угнетения активностей ЛХАТ и ЭХПБ (рис. 2). Если бы этанол ингибировал только ЛХАТ, мы бы обнаружили повышение в сыворотке крови содержания незатерифицированного холестерина и снижение доли ЛВП в липопротеиновом спектре, как в случае генетической недостаточности этого фермента [11]. В литературе есть указания на то, что именно дефицит ЭХПБ является ведущей причиной повышения фракции ЛВП в сыворотке крови [10]. В данном исследовании на модели длительной интоксикации этанолом (табл. 1 и 2) было выявлено повышение апоА-содержащих ЛП и отсутствие изменений в содержании свободного холестерина через 2 ч после последнего приема этанола по сравнению с контрольными величинами. Только в группе больных хроническим алкоголизмом через 2 ч после отмены токсического агента было установлено значимое ($p < 0,01$) изменение в соотношении отдельных фракций ЛВП между собой. Если в группе контроля коэффициенты $k_1 = (ЛВП_{2A}/ЛВП_3)$, $k_2 = ((ЛВП_{2A} + ЛВП_{2B})/ЛВП_3)$ и $k_3 = (ЛВП_{2B}/ЛВП_{2A})$ составляли 1,34; 2,29 и 0,70 соответственно, то в рассмотренной опытной группе – 2,03; 3,08 и 0,52. Принимая во внимание то обстоятельство, что процесс обратного переноса холестерина в кровотоке осуществляется в результате последовательного взаимопревращения липопротеиновых частиц в направлении $ЛВП_3 \rightarrow ЛВП_{2A} \rightarrow ЛВП_{2B}$, становится очевидным угнетение данного процесса и накопление фракции $ЛВП_{2A}$ (табл. 2). Восстановление активности ЛХАТ (рис. 1) и, видимо, ЭХПБ через 3 и 10 суток после последнего приема этанола приводит к усилению процесса обратного транспорта холестерина и снижению уровня апоА-содержащих ЛП в сыворотке больных хроническим алкоголизмом (табл. 2). В целом надо отметить, что торможение обратного транспорта холестерина под действием этанола может носить адаптивный характер, поскольку приводит к обогащению клеточных мембран периферических тканей свободным холестерином, способным защитить их от флюидизирующего действия экзогенного этанола [12].

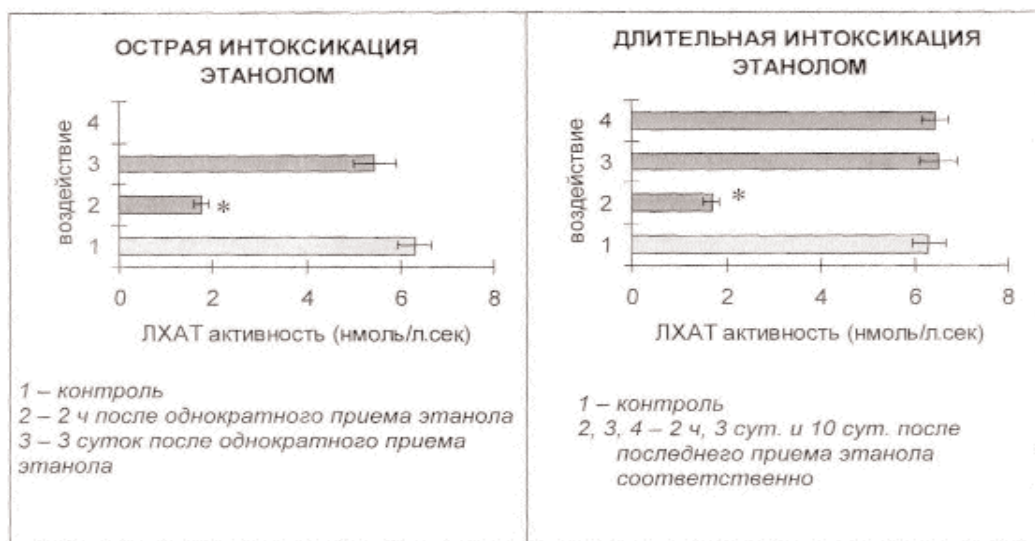


Рисунок 1.

Динамика этерифицирующей способности сыворотки крови в условиях острой и длительной интоксикации этанолом

(* — различия между контрольной и опытной группами достоверно при $p < 0,05$).

ЭТЕРИФИЦИРУЮЩАЯ И ЛИПОПРОТЕИНЛИПАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ СЫВОРОТКИ

Таблица 1. Влияние этанола на липопротеинлипазную активность сыворотки крови и содержание незатерифицированных жирных кислот, общего холестерина и его фракционный состав.

группы параметры	КОНТРОЛЬ			ДЛИТЕЛЬНАЯ ИНТОКСИКАЦИЯ		
	до приёма этанолa	через 2 ч после приёма этанолa	через 3 сут. после приёма этанолa	алкоголики через 2 ч после приёма этанолa	алкоголики через 3 сут. после приёма этанолa	алкоголики через 10 сут. после приёма этанолa
ЛПН акт. ммоль/л • сек	13,5±1,8	7,3±1,4 *	20,5±2,7	16,7±1,9	8,8±1,8	6,6±2,7 *
НЭЖК ммоль/л	0,69±0,02	0,81±0,10	0,71±0,04	0,56±0,09	0,57±0,06	0,53±0,10
ОХ ммоль/л	4,3±0,2	4,4±0,2	5,5±0,3 *	4,5±0,3	4,0±0,3	4,5±0,4
СХ ммоль/л	1,2±0,1	0,9±0,2	1,1±0,1	0,9±0,1	1,0±0,1	0,9±0,1
ЭХ ммоль/л	3,1±0,2	3,4±0,3	4,3±0,2 *	3,6±0,2	3,0±0,4	3,5±0,4

Примечание. *— изменение достоверно по отношению к контролю ($p < 0,05$).

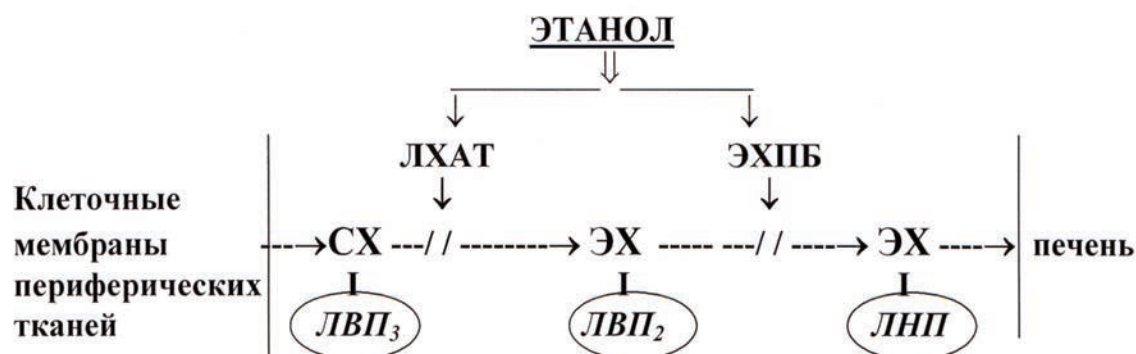


Рисунок 2.

Угнетение обмена холестерина под действием этанола:
предполагаемые участки ингибирующего действия (ЛХАТ и ЭХПБ).

Таблица 2. Распределение липопротеинов в сыворотке крови в условиях интоксикации этанолом.

группы параметры	КОНТРОЛЬ			ДЛИТЕЛЬНАЯ ИНТОКСИКАЦИЯ		
	до приёма этанола	через 2 ч после приёма этанола	через 3 сут. после приёма этанола	алкоголики через 2 ч после приёма этанола	алкоголики через 3 сут. после приёма этанола	алкоголики через 10 сут. после приёма этанола
ХМ	10,3±1,2	9,2±0,9	14,5±1,4 *	7,2±0,7 *	8,0±1,4	7,7±0,8
ЛОНП	16,6±1,6	18,8±1,3	15,3±1,6	13,0±1,2	25,8±2,5*	15,4±1,6
ЛПП	8,6±1,0	8,3±0,7	5,8±0,6 *	5,9±1,1	7,4±0,9	7,1±0,8
ЛНП	29,0±2,4	24,8±3,0	28,7±2,9	27,0±2,4	34,8±2,7	44,2±2,8 *
Σ апоВ	64,5±3,2	61,1±5,5	64,3±5,6	53,1±5,0	76,0±5,0	74,4±6,4
ЛВП _{2В}	10,2±1,1	10,3±1,4	10,2±1,0	12,1±1,2	7,1±1,3 *	7,5±0,7
ЛВП _{2А}	14,5±1,8	17,0±1,3	16,1±2,1	23,3±2,4 *	9,2±1,3 *	10,9±1,9
ЛВП ₃	10,8±0,7	11,6±1,7	9,4±0,9	11,5±1,9	7,7±0,6 *	7,2±1,0 *
Σ апоА	35,5±3,2	38,9±3,5	35,7±2,6	46,9±5,0 *	24,0±2,9*	25,6±2,4 *

Примечание. Содержание отдельных фракций липопротеинов сыворотки крови выражено в % от суммы фракций. *— изменение достоверно по отношению к контролю ($p<0.05$).

В отличие от модели длительного влияния этанола, после однократного приема в контрольной группе был отмечен повышенный уровень ЭХ через 3 суток после действия токсического агента (табл. 1), который нельзя объяснить лишь повышением этерифицирующей способности сыворотки крови, поскольку ЛХАТ активность восстанавливается только до контрольных величин. Скорее это эффект более длительной, по сравнению с контролем, циркуляции в кровотоке ЛП, обогащенных ЭХ. У этих обследованных лиц не была выявлена динамика изменения содержания апоА-содержащих фракций ЛП (табл. 2).

В группе больных алкоголизмом (модель длительной интоксикации) активность ЛПЛ сыворотки крови снижалась и составляла 50% контрольных значений к 10 суткам после отмены этанола (табл. 1). При остром воздействии этанола активность ЛПЛ была достоверно снижена к 2 ч, и восстанавливалась до значений контроля к 3 суткам. Динамика ЛПЛ активности после отмены этанола, возможно, связана с прямым положительным контролем инсулина, который индуцирует синтез молекул фермента *de novo* [13]. Прекращение приема этанола, видимо, вызывает сопряженное снижение концентрации инсулина и ЛПЛ активности, что в конечном итоге приводит к угнетению прямого транспорта холестерина.

Таким образом, угнетающее влияние этанола на активность ферментов метаболизма липопротеинов приводит к торможению прямого и обратного транспорта холестерина и, видимо, связано с угнетением процессов переноса эфиров холестерина между апоА- и апоВ-содержащими липопротеинами.

Авторы статьи благодарны сотрудникам ООО “Центр здоровья доктора Артемчука” за участие и помощь в осуществлении экспериментальной части исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Божко Г.Х., Артемчук А.П., Чурсіна В.С., Артемчук А.О. (2002) Медична хімія, **4**(2), 19-22.
2. Зезеров Е.Г. (1998) Вопр. биол., мед. и фармацевт. химии, **2**, 47-55.
3. Шабанов П.Д. (2002) Основы наркологии. С.-Петербург: “Лань”, 560.
4. Дереча Л.Н. (1998) Укр. вісник психоневрології, **6**(3), 77-79.
5. Меньшиков В.В. (1987) Лабораторные методы исследования в клинике М.: Медицина.
6. Stokke K.T., Norum K.R. (1971) Scand. J. Clin. Lab. Invest., **27**, 21-27.
7. Deckelbaum R.L., Ramakrishnan R., Eisenberg S. et al. (1992) Biochemistry, **31**, 8544-8551.
8. Божко Г.Х., Кулабухов В.М. (1993) Биохимия, **58**, 1594-1603.
9. Итоги науки и техники (1984) – Теоретические основы поиска средств для лечения алкоголизма. Сер. Токсикология, **13**.
10. Климов А.Н., Никульчева Н.Г. (1999) Обмен липидов и липопротеидов и его нарушения, СПб: Питер Ком.
11. Klein H.G., Duverger N., Albers J. (1995) J. Biol. Chem., **270**, 9443-9447.
12. Сторожок С.А., Панченко Л.Ф., Филиппович Ю.Д., Глушков В.С. (2001) Вопр. мед. химии, **47**, 198-201.
13. Коваленко И.Г., Бернштейн Л.М. (1996) Вопр. мед. химии, **42**, 3-9.

Поступила: 12. 05. 2003.

**A DEPRESSION OF ESTERASE AND LIPOPROTEIN LIPASE ACTIVITIES
OF BLOOD SERUM IN ACUTE AND LONGITUDINAL ACTIONS OF ETHANOL**

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

Institute of Neurology, Psychiatry and Narcology, Ukrainian AMS, Akademika Pavlova ul., 46,
Kharkov, 61068 Ukraine, tel.: (0572) 738-40-83.

Esterase (LCAT) and lipoprotein lipase (LPL) activities of blood serum, and a range of blood serum lipoproteins (LP) in acute and chronic ethanol intoxication were examined in healthy persons and patients with alcohol abuse. Ethanol inhibited LCAT and LPL activities, and increased apoA-containing LP in blood serum. These changes are considered as a basis for depression of a direct and reverse transportation of cholesterol in blood circulation under the action of ethanol.

Key words: ethanol, lecithin-cholesterol acyltransferase, lipoprotein lipase, lipoproteins.