

H. Wehr, B. Habrat, B. Czartoryska, D. Górską, M. Poźniak

# **ZASTOSOWANIE OZNACZANIA BETA-HEKSOZOAMINIDAZY W MOCZU DO DIAGNOSTYKI NADUŻYWANIA ALKOHOLU**

## **Wstęp**

W poprzedniej pracy [7] stwierdzono, że oznaczanie aktywności beta-heksozoaminidazy w surowicy krwi jest przydatne w monitorowaniu trzeźwości. Niekorzystną stroną metody jest konieczność pobierania krwi, co związane jest z trudnościami, zwiększa koszty oraz stwarza ryzyko zakażenia (WZW, AIDS). Celem obecnej pracy było wypróbowanie metody oznaczania aktywności beta-heksozoaminidazy w moczu i porównanie uzyskanych wyników z wynikami równoległego oznaczania enzymu w surowicy krwi oraz użyteczności obu metod jako markerów nadużywania alkoholu u pacjentów uzależnionych.

W innej pracy autorów [1] spróbowano wstępnie ocenić przydatność wykonywanych oznaczeń w monitorowaniu abstynencji w programie farmakologicznego zapobiegania nawrotom picia.

## **Osoby badane i metoda**

Badaniami objęto 49 osób uzależnionych od alkoholu: 41 mężczyzn i 8 kobiet w wieku od 18 do 71 lat (średnio 41,1) oraz 25 osób zdrowych: 13 mężczyzn i 12 kobiet w wieku od 20 do 70 lat (średnio 36,0) nieuzależnionych od alkoholu, które stanowiły grupę kontrolną. Okres uzależnienia pacjentów wynosił od 2 do 40 lat (średnio 18), a czas trwania ostatniego ciągu picia od 2 do 90 dni. Wszyscy pacjenci badani byli co najmniej jeden raz, 18 osób dwa, a dwie osoby trzy i więcej razy.

W surowicy krwi i w moczu oznaczano aktywność całkowitą i aktywność termostabilną beta-heksozoaminidazy metodą spektrofлуorymetryczną (spektrofлуorymetr Aminco-Bowman) z użyciem substratu syntetycznego – pochodnej 4-metyloumbelliferonu, a aktywność termolabilną uzyskiwano z różnicy między wynikami tych oznaczeń [7]. Do oznaczeń surowicę rozcieńczano 20-krotnie. We wstępnych badaniach sprawdzono, przy jakim rozcień-

czeniu moczu wyeliminowane jest hamujące działanie mocznika na aktywność enzymu. Najkorzystniejsze okazało się rozcieńczenie 50-krotne. Aktywność enzymu w surowicy wyrażano w nmolach 4-metylumbelliferonu uwolnionego w ciągu 1 godziny przez 1 ml surowicy. Aktywność w moczu wyrażano jako nmole uwolnionego w tych samych warunkach 4-metylumbelliferonu na mg kreatyniny (oznaczanej przy pomocy reakcji Jaffego [4]).

U wszystkich pacjentów wykonywano podstawowe badania laboratoryjne, oznaczano aktywność aminotransferaz i gamma-glutamylotransferazy oraz poziom kreatyniny i bilirubiny w surowicy.

Istotność statystyczną różnic między grupami oceniano nieparametrycznym testem Manna Whitneya, a korelację przy użyciu rankingowej analizy Spearmana.

## Wyniki

Średnie aktywności beta-heksozoaminidazy całkowitej i termostabilnej w surowicy u osób grupy kontrolnej były bardzo zbliżone do wyników uzyskanych w poprzednio opublikowanej pracy [7].

Tabela 1

Aktywność beta-heksozoaminidazy w surowicy i w moczu u osób uzależnionych od alkoholu w różnych okresach abstynencji

| Dni abstynencji                  |    | 0 - 3   | 4 - 10 | 11 - 20 | > 20  | Gr. kontr. |
|----------------------------------|----|---------|--------|---------|-------|------------|
| Surowica<br>(nmole/ml/godz.)     | n  | 33      | 17     | 10      | 8     | 17         |
|                                  | Ś  | 1218*** | 839*** | 766*    | 614   | 506        |
| Akt. całkowita                   | SD | 592,3   | 373,1  | 352,9   | 150,0 | 126,9      |
|                                  | Ś  | 877***  | 537*** | 451*    | 319   | 256        |
| Akt. termostabilna               | SD | 529,4   | 345,5  | 262,0   | 148,3 | 92,7       |
|                                  | Ś  | 332     | 302    | 316     | 295   | 249        |
| Akt. termolabilna                | SD | 147,0   | 84,7   | 118,7   | 75,1  | 68,0       |
|                                  | n  | 32      | 18     | 10      | 8     | 20         |
| Mocz (nmole/mg<br>kreatyn/godz.) | Ś  | 443***  | 245*   | 143     | 97    | 116        |
|                                  | SD | 363,0   | 237,1  | 64,1    | 48,1  | 62,2       |
| Akt. całkowita                   | Ś  | 225***  | 107*   | 65      | 43    | 50         |
|                                  | SD | 221,2   | 122,4  | 42,7    | 18,2  | 30,4       |
| Akt. termostabilna               | Ś  | 219***  | 138*   | 78      | 56    | 70         |
|                                  | SD | 155,3   | 121,2  | 31,1    | 33,6  | 35,6       |

Istotność statystyczna w odniesieniu do grupy kontrolnej:

\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

n = liczba badanych

$\bar{X}$  = średnia

SD = odchylenie standardowe

W tabeli 1 zamieszczono wyniki oznaczania aktywności beta-heksozoaminidazy w surowicy krwi i moczu w różnym czasie po przerwaniu picia oraz osób z grupy kontrolnej.

Tabela 2

Aktywność beta-heksozoaminidazy jako wskaźnik nadużywania alkoholu (w procentach wyników przewyższających średnią grupy kontrolnej + 2 odchylenia standardowe)

| Dni abstynencji    |      | 0 - 3 | 4 - 10 | 11 - 20 | < 20 | Gr. kontr. |
|--------------------|------|-------|--------|---------|------|------------|
| Surowica           |      |       |        |         |      |            |
| Akt. całkowita     | n/n1 | 23/33 | 7/17   | 5/11    | 0/8  | 9/17       |
|                    | %    | 70    | 41     | 45      | 0    | 0          |
| Akt. termostabilna | n/n1 | 25/33 | 9/17   | 6/11    | 2/8  | 0/17       |
|                    | %    | 76    | 53     | 55      | 25   | 0          |
| Akt. termolabilna  | n/n1 | 9/33  | 2/17   | 4/11    | 1/8  | 1/17       |
|                    | %    | 27    | 12     | 36      | 13   | 6          |
| Mocz               |      |       |        |         |      |            |
| Akt. całkowita     | n/n1 | 24/32 | 4/18   | 1/11    | 0/8  | 2/20       |
|                    | %    | 75    | 22     | 9       | 0    | 2          |
| Akt. termostabilna | n/n1 | 18/32 | 4/18   | 1/11    | 0/8  | 2/20       |
|                    | %    | 56    | 22     | 9       | 0    | 10         |
| Akt. termolabilna  | n/n1 | 19/32 | 5/18   | 0/11    | 0/8  | 1/20       |
|                    | %    | 59    | 28     | 0       | 0    | 5          |

n/n1 = liczba pacjentów z podwyższonymi wynikami : liczby wszystkich pacjentów

% = procent

W tabeli 2 przedstawiono porównanie częstości występowania w poszczególnych badaniach wysokich aktywności enzymu (przewyższających wartość średnią + 2 odchylenia standardowe grupy kontrolnej).

Z tabel wynika, że zarówno w surowicy jak i w moczu w okresie do 3 dni po przerwaniu picia obserwowano wysokie aktywności enzymu, które obniżały się w miarę upływu czasu. Aktywność w moczu obniżała się średnio nieco

szybciej niż w przypadku surowicy. Wzrost aktywności w moczu bardziej niż w surowicy zależał od aktywności termolabilnej. Aktywności w moczu i w surowicy wykazywały korelację dodatnią w przypadku aktywności całkowitej oraz termostabilnej – współczynniki korelacji wynosiły odpowiednio 0,47 ( $p = 0,0089$ ) i 0,51 ( $p = 0,0047$ ) – nie stwierdzono korelacji między moczem a surowicą w zakresie aktywności termolabilnej.

### **Dyskusja i wnioski**

Wpływ alkoholu na aktywność beta-heksozoaminidazy w moczu był badany poprzednio przez Martinezę i wsp. [5] i Karkkainen [2, 3]. Autorzy ci oznaczali wyłącznie aktywność całkowitą tego enzymu. W tej pracy wykonano oznaczanie aktywności obu izoenzymów beta-heksozoaminidazy.

Stwierdzona przez nas różnica w proporcji tych izoenzymów w surowicy krwi i w moczu sugeruje różne ich pochodzenie. Większość autorów zajmujących się aktywnością enzymów w moczu uważa, że beta-heksozoaminidaza nie przechodzi przez nerkę, aktywność stwierdzana w moczu reprezentuje więc enzym pochodzący z tkanki nerkowej, który może uwolnić się z niej pod wpływem różnych czynników patogennych [6, 5]. Uzyskane przez nas wyniki potwierdzają taki pogląd.

Obserwowany przez nas spadek aktywności beta-heksozoaminidazy w moczu następował po odstawieniu alkoholu szybciej niż w relacji innych autorów [2, 3, 5].

Aktywność beta-heksozoaminidazy w moczu okazała się równie, a może nawet bardziej, czułym wskaźnikiem nadużywania alkoholu w porównaniu z aktywnością w surowicy. Bardzo korzystne jest uniknięcie pobierania krwi, użycia igieł i strzykawek, co czyni metodę znacznie tańszą i umożliwia pobieranie materiału w każdych warunkach ambulatoryjnych. W surowicy bardzo dobrym wskaźnikiem okazała się aktywność termostabilna beta-heksozoaminidazy. Ze względu na większy udział beta-heksozoaminidazy termolabilnej we wzroście aktywności w moczu sądzimy, że w tym materiale nie jest celowe oznaczanie obu izoenzymów.

W konkluzji należy stwierdzić, że oznaczanie beta-heksozoaminidazy w moczu może być stosowane jako wskaźnik nadużywania alkoholu. Ocena jego użyteczności w praktyce leczenia odwykowego wymaga obserwacji na większym materiale. W szczególności bardzo istotna jest odpowiedź, czy możliwe jest wykrycie przy jego użyciu nieprzestrzegania abstynencji w trakcie leczenia. Ważne jest również, czy można tą metodą rozpoznawać w ogólnej populacji osoby aktualnie pijące alkohol (po wykluczeniu schorzenia nerek).

## Streszczenie

Celem pracy było porównanie użyteczności oznaczania aktywności beta-heksozaminidazy w surowicy krwi i w moczu jako markerów nadużywania alkoholu.

Aktywność enzymu oznaczano u 49 uzależnionych od alkoholu w różnym czasie po przerwaniu picia i u 25 osób kontrolnej.

Zarówno w surowicy jak i w moczu obserwowano po okresie picia wysokie aktywności enzymu, które stopniowo obniżały się w okresie abstynencji. Aktywność wykrywana w moczu spadała nieco szybciej niż w surowicy. Wzrost aktywności w moczu bardziej niż w surowicy zależał od aktywności termolabilnej enzymu.

Oznaczanie aktywności beta-heksozaminidazy w moczu jest czułym wskaźnikiem nadużywania alkoholu. Dużą zaletą metody jest jej nieinwazyjność.

## Summary

The aim of this study was to compare the practical value of beta-hexosaminidase activity determination in serum and in urine as markers of alcohol abuse.

Enzyme activity was determined in various intervals in 49 alcohol dependent patients entering detoxification treatment and in a group of 25 controls.

Both serum and urine activities were high after heavy drinking and decreased gradually during abstinence. The decrease progressed faster in urine. The high activity in urine depended more than in serum on thermolabile component of enzyme.

Determination of beta-hexosaminidase in urine is a sensitive marker of alcohol abuse. An important advantage of this method is its noninvasiveness.

## Piśmiennictwo

1. Habrat B., Czartoryska B., Górska D., Poźniak M., Wehr H.: Próba wykorzystania beta-heksozaminidazy jako markera nadużywania alkoholu w leczeniu uzależnienia (doniesienie wstępne). Postępy Psychiatrii i Neurologii (w druku).

2. Karkkainen P.: Serum and urinary beta-hexosaminidase as markers of heavy drinking, *Alcohol and Alcoholism* 1990, 25, 365-369.

3. Karkkainen P., Salaspuro M.: Hexosaminidase in the detection of alcoholism and heavy drinking, *Alcohol, Alcoholism* 1991, Suppl. 1, 459-464.

4. Kokot F.: Metody badań laboratoryjnych stosowanych w klinice, PZWL Warszawa 1969, 243.

5. Martines D., Morris A.I., Gilmore I.T., Ansari M.A., Patel A., Quayle J.A., Billington D.: Urinary enzyme output during detoxification of chronic alcoholic patients, *Alcohol, Alcoholism* 1989, 24, 113-120.

6. Paraire M., Bourbouze R., Baumann F.Ch., Percheron F.: Differential assay of A and B isoenzymes in urinary N-acetyl beta-D-glucosaminidase, *Clin. Chim. Acta* 983, 129, 233-238.

7. Wehr H., Czartoryska B., Górską D., Matsumoto H.: Serum beta-hexosaminidase and alfa-mannosidase activities as markers of alcohol abuse, *Alcoholism: Clin. Exp. Res.* 1991, 15, 13-15.