

**Maria Rodo¹, Hanna Wehr¹, Piotr Woźniak²,
Cezary Markuszewski², Bogusław Habrat², Ewa Taracha³**

¹Zakład Genetyki,

²Zespół Profilaktyki i Leczenia Uzależnień,

³Zakład Biochemii

Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie

MODYFIKACJA LIPOPROTEIN OSOCZA OSÓB UZALEŻNIONYCH OD ALKOHOLU

WSTĘP

Lipoproteiny, które są białkami transportującymi lipidy w płynach ustrojowych, łatwo ulegają modyfikacjom chemicznym. Dotyczy to przede wszystkim lżejszych frakcji lipoproteinowych – tych, które zawierają dużo lipidów np. lipoprotein małej gęstości (LDL) i lipoprotein bardzo małej gęstości (VLDL). Zmodyfikowane lipoproteiny mogą wywierać szkodliwy wpływ na tkanki.

Pierwszym produktem metabolizmu alkoholu etylowego w ustroju jest aldehyd octowy. Jest to związek bardzo aktywny chemicznie, który łatwo wchodzi w połączenia z innymi związkami m. in. z białkami. Wykazano, że u intensywnie pijących osób uzależnionych od alkoholu aktywność dehydrogenazy aldehydowej – enzymu katalizującego utlenianie aldehydu octowego, jest zmniejszona (1). Można zatem oczekiwać, że u tych osób większa ilość aldehydu octowego będzie powodowała powstanie większej ilości jego połączeń z białkami.

U osób uzależnionych od alkoholu w trakcie intoksykacji stwierdzono występowanie produktów reakcji z aldehydem octowym (4), między innymi również lipoprotein (7, 3), a wykrywanie produktów kondensacji aldehydu octowego było proponowane jako marker nadużywania alkoholu (5, 2). Jest prawdopodobne, że większa ilość zmodyfikowanych lipoprotein powstaje u osób z większym uszkodzeniem wątroby.

Praca wykonana w ramach grantu PARPA: Alc. 2/98

Modyfikacja lipoprotein powoduje, że ładunek elektryczny tych białek przybiera większą wartość ujemną, co przyspiesza ich wędrówkę w polu elektrycznym i może być rozpoznane przy pomocy elektroforezy.

Oprócz powstawania produktów reakcji z aldehydem octowym, metabolizm alkoholu prowadzić może też do powstawania w inny sposób zmodyfikowanych lipoprotein, a mianowicie do ich utlenienia. Obecność utlenionych LDL w osoczu wykazali Lin i wsp. (3). Utlenione LDL mają również zwiększoną ruchliwość elektroforetyczną. Elektroforeza lipoprotein jest łatwa do wykonania przy użyciu gotowych zestawów do elektroforezy, a ich ruchliwość elektroforetyczna może być zmierzona z zastosowaniem densytometrii.

Celem tej pracy była próba oceny, czy taki pomiar może służyć jako prosty wskaźnik nadużywania alkoholu.

OSOBY BADANE I METODY

Badaniami objęto 70 uzależnionych od alkoholu przyjmowanych do Zespołu Profilaktyki i Leczenia Uzależnień Instytutu Psychiatrii i Neurologii celem detoksykacji i dalszego leczenia odwykowego. Badanych podzielono na dwie podgrupy w zależności od czasu, jaki upłynął od ostatniego ciągu picia. U 34 osób wynosił on od 0 do 5 dni (u przeważającej liczby osób od 1 do 3 dni). Osoby te stanowiły grupę intoksykowanych. U pozostałych 36 osób od ostatniego ciągu picia upłynął dłuższy okres (grupa nieintoksykowanych).

U pacjentów na podstawie wywiadu, badania klinicznego oraz badań laboratoryjnych oceniano ogólny stan zdrowia ze szczególnym zwróceniem uwagi na stan wątroby. U przeważającej liczby osób uzależnionych od alkoholu (praktycznie prawie u wszystkich) dochodzi do różnego stopnia uszkodzenia wątroby. Grupę intoksykowanych pacjentów podzielono arbitralnie na podgrupę z większym stopniem uszkodzenia wątroby (10 osób) i z mniejszym stopniem lub bez jej uszkodzenia (24 osoby).

Grupę kontrolną stanowiło 31 klinicznie zdrowych osób pijących alkohol sporadycznie i tylko w umiarkowanych ilościach.

Elektroforezę lipoprotein wykonywano w próbce surowicy świeżej lub przechowywanej do 3 dni w temperaturze +4°C. Stosowano aparat i zestawy firmy Boehringer. Zabarwioną i wysuszoną płytkę poddawano densytometrii przy użyciu aparatu tej samej firmy. Na wykresie mierzono odległość od startu (początek elektroforezy) najwyższego punktu (pik) frakcji LDL oraz początku (czoło) frakcji VLDL (najczęściej występującej w połączeniu z LDL). Mierzono również odległość od startu piku albuminy.

Istotność statystyczną różnic między średnimi oceniano testem t-Studenta. Do oceny przydatności różnicującej badanych parametrów jako markerów nadużywania alkoholu stosowano analizę ROC (Receiver Operating Characteristic). Krzywa ROC jest wykresem wszystkich par czułość-specyficzność, otrzymanych dla zmienianej w sposób ciągły wartości przyjmowanej za granicę normy. Test, którego wykres wskazuje na większą czułość (wyższe położenie wykresu) i większą specyficzność (położenie

bardziej na lewo) charakteryzuje się lepszymi wartościami dyskryminującymi. Miarą jakości testu jest powierzchnia pod krzywą.

WYNIKI I OMÓWIENIE

Tabela 1 przedstawia średnie wartości (w milimetrach) odległości od startu (początek elektroforezy) piku LDL, czoła VLDL i piku albuminy dla poszczególnych grup badanych.

TABELA 1
Szybkość wędrówki elektroforetycznej lipoprotein i albuminy (w mm).

Grupa badana	Pik LDL	Czoło VLDL	Pik albuminy
Osoby intoksykowane (n = 34)	14,6 ± 3,34	34,0 ± 6,23*	73,5 ± 5,29*
Osoby intoksykowane z uszkodzeniem wątroby znacznego stopnia (n = 10)	16,1 ± 4,74	34,5 ± 5,55	72,6 ± 4,84
Osoby intoksykowane bez uszkodzenia wątroby lub z uszkodzeniem wątroby nieznacznego stopnia (n = 24)	14,0 ± 2,38	33,9 ± 6,60	73,9 ± 5,43
Osoby bez intoksykacji (n = 36)	13,2 ± 2,10	33,6 ± 6,15	72,3 ± 5,59
Grupa kontrolna (n = 31)	13,3 ± 2,42	30,1 ± 78,3	70,1 ± 5,15

*Istotność statystyczna w odniesieniu do grupy kontrolnej

Jak wynika z danych Tabeli 1 wpływ intoksykacji na ruchliwość elektroforetyczną lipoprotein okazał się zgodny z przewidywaniami. Ruchliwość LDL u osób intoksykowanych była najwyższa u tych z większym stopniem uszkodzenia wątroby, zaś w przypadku VLDL istotnie wyższa w całej grupie intoksykowanych w porównaniu z grupą kontrolną. Stwierdzone różnice były jednak niewielkie, a wyniki w poszczególnych grupach dość często „zachodziły” na siebie.

TABELA 2
Przydatność modyfikowanych lipoprotein jako markerów nadużywania alkoholu – powierzchnia pod krzywą ROC.

Rodzaj modyfikowanych lipoprotein	Osoby uzależnione intoksykowane ze znacznym uszkodzeniem wątroby	Osoby uzależnione intoksykowane bez lub z nieznacznym uszkodzeniem wątroby	Osoby uzależnione z co najmniej 6-dniową abstinencją
Lipoproteiny małej gęstości (LDL)	0,63	0,57	0,53
Lipoproteiny bardzo małej gęstości (VLDL)	0,67	0,63	0,64

Analiza ROC wykazała niską wartość dyskryminacyjną zastosowanych wskaźników pomiaru ruchliwości elektroforetycznej LDL, VLDL i albumin. Dla analizowa-

nych parametrów wartości pola pod krzywą nie przekraczały 0,69, podczas gdy marker uważa się za wartościowy, gdy wartości pola pod krzywą zbliżają się do 1,0, a przynajmniej przekraczają 0,8.

Należy zatem uznać, że badany parametr nie może być zalecany jako prosty wskaźnik nadużywania alkoholu ani jako wskaźnik uszkodzenia wątroby u nadmiernie pijących.

Wykonane badania wniosły natomiast interesujące elementy poznawcze. Największa średnia różnica w ruchliwości białek dotyczyła VLDL, potem LDL, a najmniejsza albumin. Stwierdzenie modyfikacji VLDL wskazuje na fakt, że proces modyfikacji zachodzi w wątrobie, tam bowiem syntetyzowane są powyższe lipoproteiny. W toku stopniowej przemiany VLDL w LDL, która ma miejsce w osoczu, część zmodyfikowanego białka pozostaje w LDL.

W poprzedniej pracy, w której obecność modyfikacji aldehydem octowym identyfikowano przy zastosowaniu przeciwciał specyficznych dla tego rodzaju pochodnych, podobnie jak w tej pracy, wykazywano dużą ilość produktów modyfikacji we frakcji VLDL (7).

Utlenianie LDL w ścianie naczyniowej jest uważane obecnie za podstawową przyczynę gromadzenia się w niej makrofagów i w konsekwencji rozwoju zmian miażdżycowych (6). Wykazanie, że modyfikacja pod wpływem alkoholu zachodzi w wątrobie, pozwala sądzić, że skutki modyfikacji dotyczą przede wszystkim tkanki wątrobowej, a dla innych tkanek (np. naczynia wieńcowe lub inne) są znacznie mniej szkodliwe.

Wydaje się prawdopodobne, że modyfikacje lipoprotein odgrywają istotną rolę w mechanizmie poalkoholowego uszkodzenia wątroby.

WNIOSKI

1. Ruchliwość elektroforetyczna lipoprotein bardzo małej gęstości (VLDL) jest zwiększona, a w przypadku lipoprotein małej gęstości (LDL) wykazuje tendencję do wzrostu u osób uzależnionych od alkoholu w stanie intoksykacji.

2. Zmieniona ruchliwość elektroforetyczna nie może być zalecana do zastosowania ani jako prosty wskaźnik nadużywania alkoholu, ani jako wskaźnik uszkodzenia wątroby u nadmiernie pijących.

3. Modyfikacje lipoprotein prawdopodobnie odgrywają istotną rolę w mechanizmie poalkoholowego uszkodzenia wątroby.

STRESZCZENIE

Lipoproteiny łatwo ulegają modyfikacjom chemicznym. W stanie intoksykacji alkoholem etylowym mogą powstawać połączenia lipoprotein z aldehydem octowym lub mogą one podlegać utlenieniu. Modyfikacje zmieniają ruchliwość elektroforetyczną tych białek. Celem tej pracy była próba oceny, czy elektroforeza lipoprotein może służyć jako prosty wskaźnik nadużywania alkoholu.

Badania wykonano u 70 osób uzależnionych od alkoholu przyjmowanych, w stanie intoksykacji do Zespołu Profilaktyki i Leczenia Uzależnień Instytutu Psychiatrii i Neurologii i u 31 osób grupy kontrolnej.

Stwierdzono, że ruchliwość lipoprotein była u osób intoksykowanych przyspieszona, najbardziej u tych z większym stopniem uszkodzenia wątroby, jednak stwierdzone różnice były niewielkie. Badana cecha nie może być w związku z tym zalecana do zastosowania jako prosty wskaźnik nadużywania alkoholu.

Ze stwierdzenia większego stopnia modyfikacji w lipoproteinach bardzo niskiej gęstości (VLDL) niż w lipoproteinach małej gęstości (LDL) wynika, że miejscem modyfikacji jest wątroba. Może to być istotne w mechanizmie uszkodzenia tego narządu.

Słowa kluczowe: uzależnieni od alkoholu, lipoproteiny, elektroforeza

Maria Rodo, Hanna Wehr, Piotr Woźniak, Cezary Markuszewski,
Bogusław Habrat, Ewa Taracha

Evaluation of plasma lipoprotein modifications in alcohol dependent patients

SUMMARY

Lipoproteins are easily susceptible to chemical modifications. In the situation of ethanol intoxication adducts with acetaldehyde and products of oxidation can be formed. The lipoprotein modification results in their electrophoretic mobility change. The aim of this work was to evaluate whether electrophoresis could be used as a simple marker of alcohol abuse.

The examination was performed in 71 alcohol dependent patients entering the detoxification in the Department of Prevention and Treatment of Substance Abuse of Institute of Psychiatry and Neurology and in 37 controls.

It was observed that the electrophoretic mobility was enhanced in intoxicated patients especially in those with post alcoholic liver impairment. The differences were however not very remarkable, and therefore the analyzed feature should be not recommended as a useful marker of alcohol intoxication.

The observation that the modification was more significant in the very low-density lipoproteins (VLDL) than in the low-density lipoproteins (LDL) suggests that the modification took place in the liver. This can contribute to the mechanism leading to liver damages

Key words: alcoholics, lipoproteins, electrophoresis

PIŚMIENNICTWO

1. Jenkins W.J., Peters T.J.: *Selectively reduced hepatic acetaldehyde dehydrogenase in alcoholics*. Lancet, 1980, 8169, 628-629.
2. Lesch O.M., Walter H.: *New „state” markers for the detection of alcoholism*. Alcohol & Alcoholism, 1996, 31, suppl. 1, 59-62.

3. Lin R.C., Dai J., Lumeng L., Zhang M.: *Serum low density lipoprotein of alcoholic patients is chemically modified in vivo and induces apolipoprotein E synthesis by macrophages*. J. Clin. Invest., 1995, 95, 1979-1986.
4. Niemela O., Klajner F., Orrego H., Vidins E., Blendis L., Israel Y.: *Antibodies against acetaldehyde-modified protein epitopes in human alcoholics*. Hepatology 1987, 7, 1210-1214.
5. Salaspuro M.: *Conventional and coming laboratory markers of alcoholism and heavy drinking*. Alcoholism Clin. Exp. Res. 1986, 5S-12S.
6. Steinberg D., Parthasarathy S., Carew T.E., Khoo J.C., Witztum J.L.: *Beyond cholesterol. Modification of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity*. N. Engl. J. Med. 1989, 320, 915-924.
7. Wehr H., Rodo M., Lieber C.S., Baraona E.: *Acetaldehyde adducts and autoantibodies against VLDL and LDL in alcoholics*. J. Lip. Res., 1993, 34, 1237-1244.