

# Динамика показателей оксидантного стресса, системы антиоксидантной защиты, эндогенной интоксикации и биохимических маркеров поражения печени у больных алкоголизмом при лечении иммуномодулятором полиоксидонием

БИШЕВА И.В.  
ГАМАЛЕЯ Н.Б.  
ДМИТРИЕВА И.Г.  
НАДЕЖДИН А.В.  
ТЕТЕНОВА Е.Ю.

аспирант лаборатории иммунохимии ННЦ наркологии Росздрава, Москва  
д.м.н., профессор, рук. лаборатории иммунохимии ННЦ наркологии Росздрава, Москва  
к.б.н., с.н.с. лаборатории иммунохимии ННЦ наркологии Росздрава, Москва  
к.м.н., рук. отделения детской наркологии ННЦ наркологии Росздрава, Москва  
к.м.н., в.н.с. отделения детской наркологии ННЦ наркологии Росздрава, Москва

*У больных алкоголизмом (14 чел.), поступивших в клиническое отделение в абстинентном синдроме, изучена динамика показателей перекисного окисления липидов (ПОЛ), метаболитов оксида азота, факторов антиоксидантной защиты (АОЗ), активности трансаминаз и индексов эндогенной интоксикации в зависимости от вида проводимого лечения: с добавлением иммуномодулятора полиоксидония и без него. Полиоксидоний (по 6 мг) вводили в двух капельницах с физиологическим раствором (по 400,0 мл), затем 6 мг внутримышечно однократно. Контрольную группу составили 10 здоровых человек. Включение полиоксидония в схему лечения больных алкоголизмом способствовало более эффективной коррекции некоторых нарушений: достоверному снижению уровня креатинина, молекул средней массы, лейкоцитарного и интегрального индексов эндогенной интоксикации, а также активности -ГГТ. Полиоксидоний способствовал также более полной нормализации баланса продуктов ПОЛ и факторов АОЗ.*

## Введение

Известно, что алкоголизм сопровождается активацией ПОЛ и формированием синдрома эндогенной интоксикации, который провоцирует развитие множественных вторичных изменений на клеточном, органном и системном уровнях [8]. Увеличение количества продуктов ПОЛ приводит к развитию необратимых изменений, являющихся основой фрагментации и разрушения мембран, и гибели клеток [3]. Обнаружение выраженных биохимических нарушений при алкоголизме делает особенно актуальным поиск средств, эффективно корригирующих изменения тканевого метаболизма, в первую очередь связанные с активацией свободнорадикального окисления и прогрессированием эндогенной интоксикации.

В связи с этим представило интерес исследование у больных алкоголизмом эффективности иммуномодулятора полиоксидония, обладающего также детоксицирующими, антиоксидантными и мембраностабилизирующими свойствами [6]. Полиоксидоний относится к классу водорастворимых производных гетероцепных алифатических полиаминов. Физико-химические и фармакологические свойства полиоксидония во многом определяются N-оксидными группами, введенными в основную цепь макромолекулы, и величиной молекулярной массы (100 kD). С химической точки зрения, N-оксидные соединения отличаются от других соединений самой высокой полярностью. Этим обусловлена их уникальная способность сорбировать как растворимые токсические соединения, так и микрочастицы, циркулирующие в крови, а затем выводить их из организма. Детоксицирующие свойства полиоксидония проявляются в его способности снижать в крови концентрацию токсических веществ, например у больных с ожоговой болезнью — уровень липополисахарида энтеробактерий. У больных с острым панкреонекрозом поли-

оксидоний существенно снижает уровень малонового диальдегида и диеновых кетонов.

Антиоксидантные свойства полиоксидония проявляются в перехвате в водной среде активных форм кислорода (супероксидного аниона, перекиси водорода, гидроксильного радикала), уменьшении концентрации каталитически активного двухвалентного железа, что ведет к угнетению ПОЛ, а также в подавлении спонтанной и индуцированной люминол- и люцигенинзависимой хемилюминесценции [9].

Таким образом, иммуномодулятор полиоксидоний обладает механизмами лечебного действия, которые делают его перспективным препаратом для использования в комплексной терапии больных алкоголизмом. Проверка антиоксидантных и детоксицирующих свойств полиоксидония при лечении больных алкоголизмом стала целью нашей работы.

## Материалы и методы

Обследовано 14 больных алкоголизмом 2-й стадии, поступивших с алкогольным абстинентным синдромом (ААС) средней тяжести на стационарное лечение в клиническое отделение ННЦ наркологии Росздрава. Из исследования исключались больные с наличием психотических расстройств различного генеза в структуре ААС, а также интеркуррентных соматических и неврологических заболеваний в стадии декомпенсации, больные с проявлениями алиментарной дистрофии и с инфекционными заболеваниями. Возраст больных от 26 до 52 лет (средний возраст  $39,5 \pm 7,1$  года), 9 мужчин и 5 женщин. Больные алкоголизмом были разделены случайным образом на 2 группы — опытную и группу сравнения. Больные из группы сравнения (7 чел., 5 мужчин и 2 женщины, средний возраст  $41,1 \pm 8,5$  года) получали лечение стандартными методами (дезинтоксикация с включением двух капельниц с физиологическим раствором по 400,0 мл, транк-

визиторы, нейролептики, антидепрессанты, витамины, симптоматическое лечение).

Больные из опытной группы (7 чел., 4 мужчины и 3 женщины, средний возраст  $38,1 \pm 8,5$  года) в дополнение к лечению стандартными методами получали полиоксидоний по схеме: 6 мг в 400,0 мл физиологического раствора внутривенно капельно первые 2 дня, затем 6 мг внутримышечно однократно с целью иммунокоррекции и детоксикации. Контрольная группа включила в себя 10 здоровых человек (медицинские работники, 6 мужчин и 4 женщины, средний возраст  $35,5 \pm 7,5$  года).

Пациенты были обследованы с помощью биохимических методов. Исследовали венозную кровь, взятую натощак при поступлении больного (в острой фазе абстинентного синдрома), а также через 7 и 14 дней после начала лечения (фаза постабстиненции). Больным проводилось минимизированное биохимическое тестирование путем определения активности триады ферментов: аспаратаминотрансферазы (АсАТ), аланинаминотрансферазы (АлАТ) и -глутамилтрансферазы (ГГТ) [4]. Определяли следующие показатели ПОЛ: диеновые конъюгаты и кетоны (модифицированным методом З. Плацера с соавторами по поглощению липидным экстрактом плазмы монохроматического светового потока в ультрафиолетовой области спектра (233 и 278 нм) [3]; ТБК — активные продукты (малоновый диальдегид) в сыворотке крови (с помощью диагностического набора фирмы «Агат» по образованию окрашенных продуктов с 2-тиобарбитуровой кислотой). Метаболиты оксида азота — нитриты/нитраты ( $\text{NO}_x$ ) определяли в сыворотке крови. Сыворотки депротеинизировали с последующей 15-часовой совместной инкубацией с гранулированным кадмием, после чего добавляли реактив Грисса (смесь 1%-ного раствора сульфаниламида, 0,1%-ного раствора нафтилендиамина и 2,5%-ного раствора фосфорной кислоты) и фотометрировали при 546 нм [2]. Из показателей АОЗ определяли уровень -токоферола в плазме крови (спектрофотометрически путем экстракции смесью этанол—гексан с последующим выпариванием гексановой фазы и добавлением к полученному остатку хлорного железа, которое способно восстановиться в двухвалентное состояние под действием -токоферола [3]); количество свободных SH-групп в белках плазмы крови (спектрофотометрически с применением 2-нитробензойной кислоты — реагента Элмана); активность каталазы эритроцитов (по скорости утилизации перекиси водорода в реакционной смеси, в которую вносили биологический материал, содержащей фермент [3]). Для больных алкоголизмом и здоровых рассчитывали коэффициент  $K$ , выявляющий степень дисбаланса в системе ПОЛ/АОЗ, по модифицированной формуле [1]:

$$K = \frac{\left( \frac{DK_{on_i}}{DK_{on_n}} \cdot \frac{DK_{et_i}}{DK_{et_n}} \cdot \frac{MDA_i}{MDA_n} \cdot \frac{NO_{xi}}{NO_{xn}} \right)}{\left( \frac{SH_i}{SH_n} \cdot \frac{Vit.E_i}{Vit.E_n} \cdot \frac{Kat_i}{Kat_n} \right)},$$

где  $DK_{on}$  — диеновые конъюгаты;  $DK_{et}$  — диеновые кетоны;  $MDA$  — малоновый диальдегид;  $NO_x$  — метаболиты оксида азота;  $SH$  — SH-группы белков плазмы крови;  $Vit.E$  — -токоферол;  $Kat$  — активность каталазы эритроцитов (показатели с индексом  $i$  соответствуют значениям у больных, а показатели с индексом  $n$  — нормальным значениям). При сохранении баланса в системе

ПОЛ/АОЗ коэффициент  $K$  равен 1, при усилении процессов ПОЛ значение  $K$  возрастает.

Для изучения показателей эндогенной интоксикации определяли концентрацию креатинина, молекул средней массы в сыворотке крови, рассчитывали лейкоцитарный индекс интоксикации (ЛИИ) и интегральный индекс интоксикации (по М.Н. Тарелкиной). Концентрацию креатинина определяли с помощью коммерческих тест-систем фирмы «Витал Диагностикс СПб» методом, основанным на реакции Яффе с депротеинизацией. Молекулы средней массы в сыворотке крови изучали по методу Н.И. Габриэляна, заключающемуся в осаждении крупномолекулярных белков раствором трихлоруксусной кислоты с дальнейшим спектрофотометрическим исследованием надосадочной жидкости, содержащей молекулы средней массы при длине волны 254 нм [5]. Рассчитывали ЛИИ по формуле Кальф—Калифа [5], по современным представлениям он отражает тяжесть состояния больных и выраженность воспалительных процессов:

$$ЛИИ = \frac{(4 \times \text{миел.} + 3 \times \text{юн.} + 2 \times \text{пал.} + 1 \times \text{сегм.})}{(\text{мон. лимф.}) \times (\text{эоз.} + 1)},$$

где миел. — миелоциты; юн. — юные; пал. — палочкоядерные; сегм. — сегментоядерные; пл. — плазматические клетки; лимф. — лимфоциты; мон. — моноциты; эоз. — эозинофилы. Нормальные значения ЛИИ — от 0,3 до 1,5. Интегральный индекс интоксикации (ИИИ) определяли по формуле [5]:

$$ИИИ = \sqrt{\left[ \frac{0,240 - MCM}{0,044} \right]^2 + \left[ \frac{110,5 - Kp}{9,3} \right]^2 + \left[ \frac{1,2 - ЛИИ}{0,177} \right]^2},$$

где  $MCM$ ,  $Kp$  и  $ЛИИ$  — реальные значения уровня  $MCM$ , креатинина и лейкоцитарного индекса интоксикации у конкретного больного с интоксикацией; 0,24 — средний показатель  $MCM$  (у.е.); 110,5 — среднее значение креатинина (мкМ/л); 1,2 — среднее значение  $ЛИИ$  у лиц контрольной группы. Дисперсии величин равны: 0,044 для  $MCM$ ; 9,3 для креатинина; 0,177 для  $ЛИИ$ . Из представленной формулы следует, что если содержание  $MCM$ , креатинина и  $ЛИИ$  близки к норме, то величина  $ИИИ$  приближается к 0 и, наоборот, возрастание значения показателей приводит к увеличению  $ИИИ$ .

Оценку результатов проводили с использованием стандартных методов статистического анализа (пакет прикладных программ Excel 2000 и «Статистика 6.0») с учетом характера распределения признаков [7].

#### Результаты исследования и их обсуждение

Показатели, характеризующие процессы ПОЛ, представлены на рис. 1. Как видно из представленных данных, у всех обследованных больных алкоголизмом в состоянии ААС имеется тенденция к повышению уровня первичных и вторичных продуктов ПОЛ (диеновых конъюгатов и  $MDA$  соответственно) и достоверно ( $p=0,035$ ) повышена концентрация метаболитов оксида азота в опытной группе. Эти данные свидетельствуют об активации процессов ПОЛ. На 7-й день лечения в обеих группах повысился уровень  $MDA$ , а в группе сравнения также и уровень диеновых конъюгатов. На 14-й день лечения эти показатели нормализовались в обеих группах.

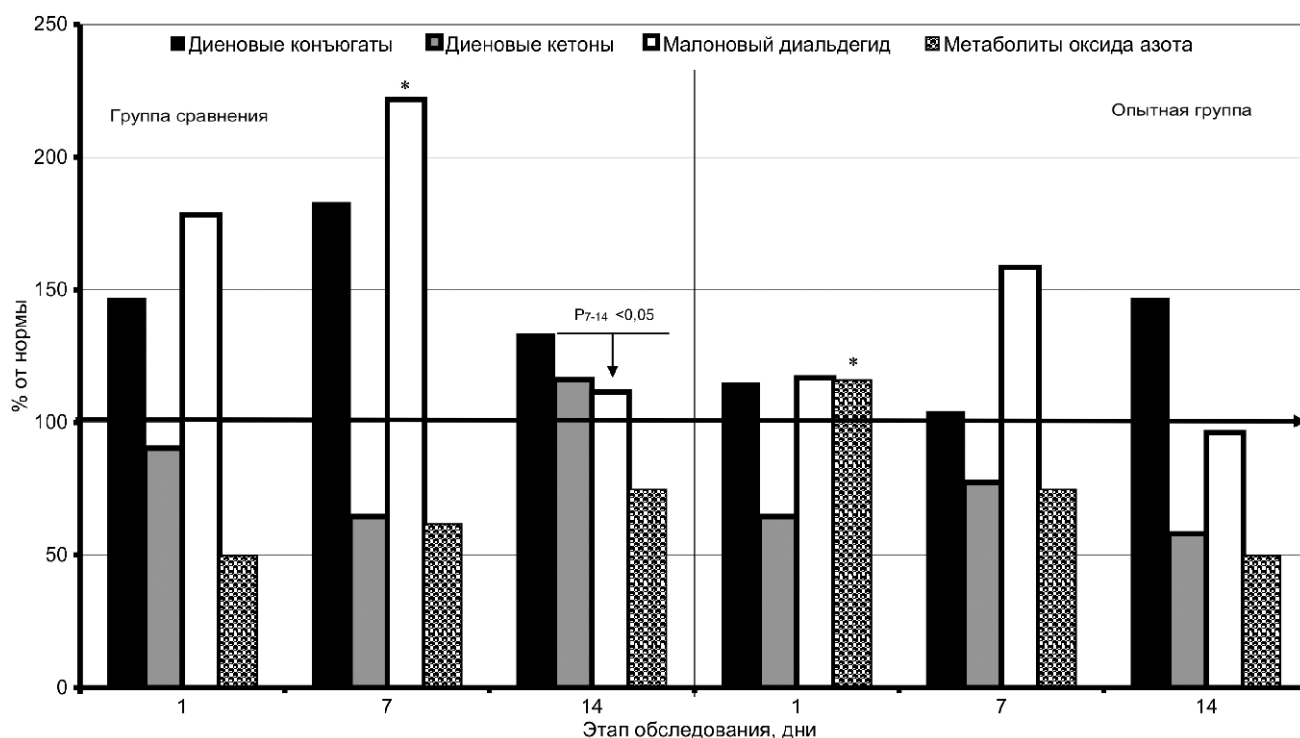


Рис. 1. Динамика показателей ПОЛ у больных алкоголизмом: \* – достоверность отличий от группы здоровых,  $p < 0,05$

Одним из важных факторов эндогенной интоксикации является оксид азота (NO). Высокие концентрации NO, соединяясь с супероксидом, образуют пероксинитрит, который индуцирует повреждение ДНК и мутации, ингибирует функцию ферментов. Основными продуктами метаболизма NO в крови являются нитриты и нитраты [1]. У больных алкоголизмом из группы сравнения уровень нитритов/нитратов не был повышен (рис. 1), тогда как у больных из опытной груп-

пы при поступлении в стационар выявлено достоверное повышение концентрации метаболитов оксида азота, которое после лечения с применением полиоксидония снижалось.

Показатели системы АОЗ представлены на рис. 2, из которого видно, что у больных алкоголизмом имеется ее недостаточность: снижены концентрация свободных SH-групп в белках плазмы крови, по количеству которых можно судить о сохранности ферментных систем, и уровень -токоферола

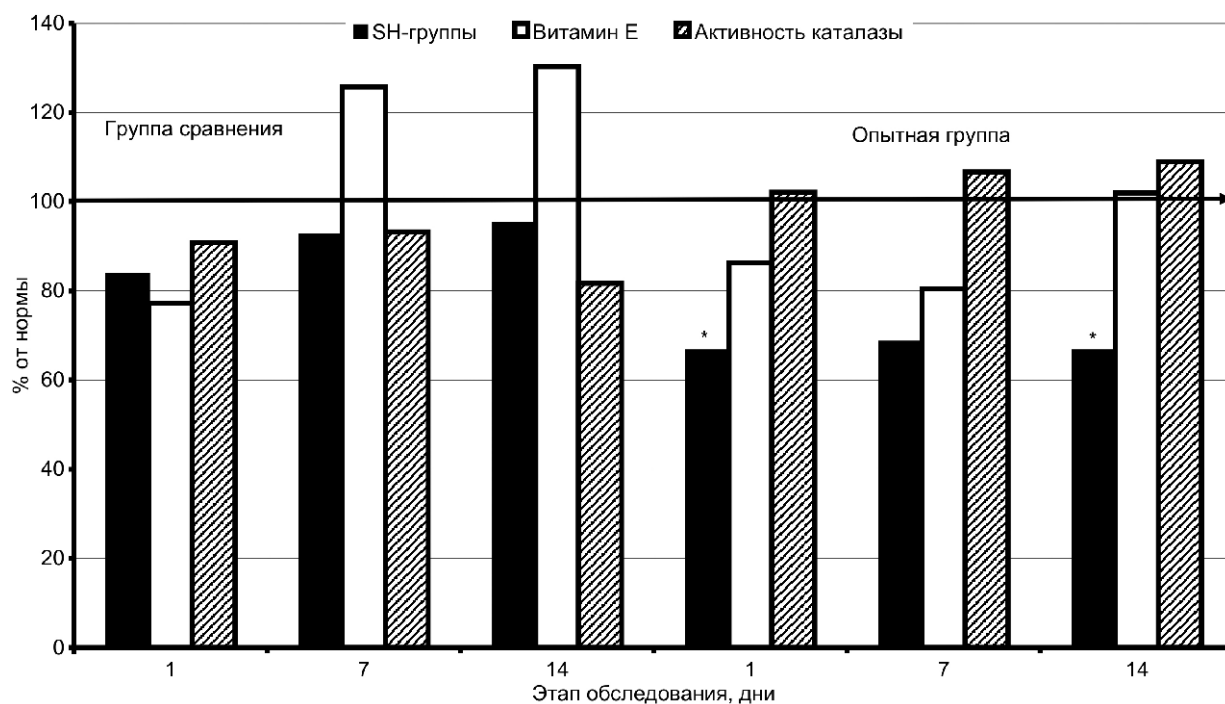


Рис. 2. Динамика показателей антиоксидантной защиты у больных алкоголизмом: \* – достоверность отличий от группы здоровых,  $p < 0,05$

Соотношение показателей перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты у больных алкоголизмом в динамике лечения

Параметр		Здоровые	Больные алкоголизмом					
			Группа сравнения (n=7)			Опытная группа (n=7)		
			До лечения	7-й день лечения	14-й день лечения	До лечения	7-й день лечения	14-й день лечения
Коэффициент ПОЛ/АОЗ	Медиана	0,57	2,65 (p<0,05)*	1,25	1,64	3,01 (p<0,05)*	1,88	0,96
	25–75 процентиля	0,29–0,78	1,06–10,7	0,79–16,6	0,309–2,19	1,48–4,17	0,38–3,18	0,144–2,57

Примечание. \* — достоверность отличий от группы здоровых

(витамина Е). После проведенного лечения содержание SH-групп в белках плазмы крови больных опытной группы так и осталось сниженным, тогда как содержание витамина Е нормализовалось.

Важным фактором АОЗ является каталаза, участвующая в инаktivации активных форм кислорода —  $O_2^*$  и  $H_2O_2$ , образующихся как в процессе нормальной жизнедеятельности, так и в условиях значительной активации ПОЛ. У больных алкоголизмом с абстинентным синдромом активность каталазы в эритроцитах была близка к нормальным значениям. На 14-й день терапии в группе сравнения активность каталазы несколько снизилась, тогда как после комплексного лечения с полиоксидонием активность фермента даже превысила норму.

Коэффициент ПОЛ/АОЗ, позволяющий оценить баланс между оксидантным стрессом и АОЗ, у больных в обеих группах был достоверно повышен по сравнению со здоровыми лицами, что свидетельствует об усилении процессов перекисного окисления липидов (табл. 1). После проведен-

ного лечения произошло уменьшение этого коэффициента, более интенсивное в опытной группе ( % 68,1), чем в группе сравнения ( % 38,1).

Для изучения эндогенной интоксикации у больных алкоголизмом были определены также концентрации креатинина, молекул средней массы, рассчитаны ЛИИ и ИИИ. Результаты представлены на рис. 3–4. Уровень креатинина в сыворотке крови был повышен у больных из обеих групп (в опытной группе достоверно). К 14-му дню лечения концентрация креатинина в опытной группе достоверно снизилась (нормализовалась), а в группе сравнения — незначительно повысилась, не отличаясь достоверно от нормы.

Важным универсальным фактором эндогенной интоксикации являются молекулы средней массы, основная часть которых представлена полипептидами с молекулярной массой 300–5000 Д. Значительную часть таких молекул составляют продукты распада фибрина, витамины, поступающие в кровь из желудочно-кишечного тракта, а также метаболические продукты, образующиеся в процессе распада эндогенных белков

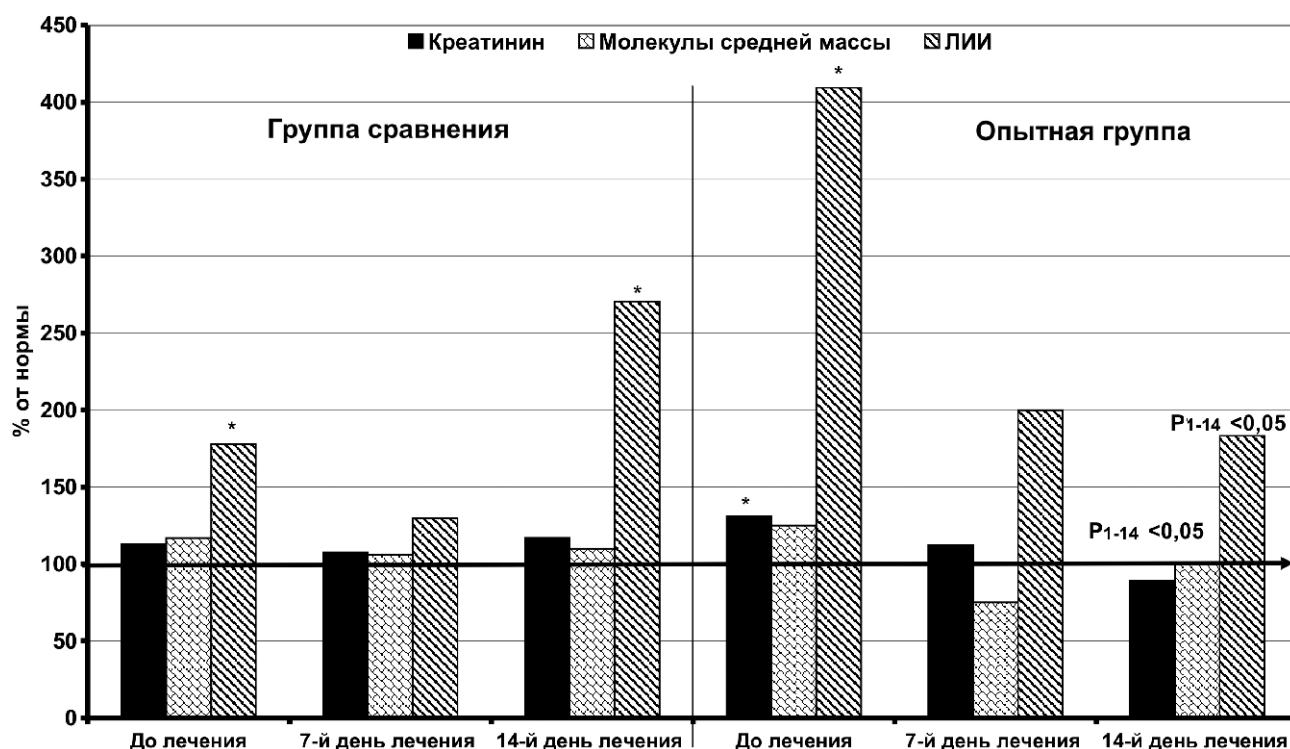


Рис. 3. Динамика показателей эндогенной интоксикации у больных алкоголизмом: \* — достоверность отличий от группы здоровых, p<0,05

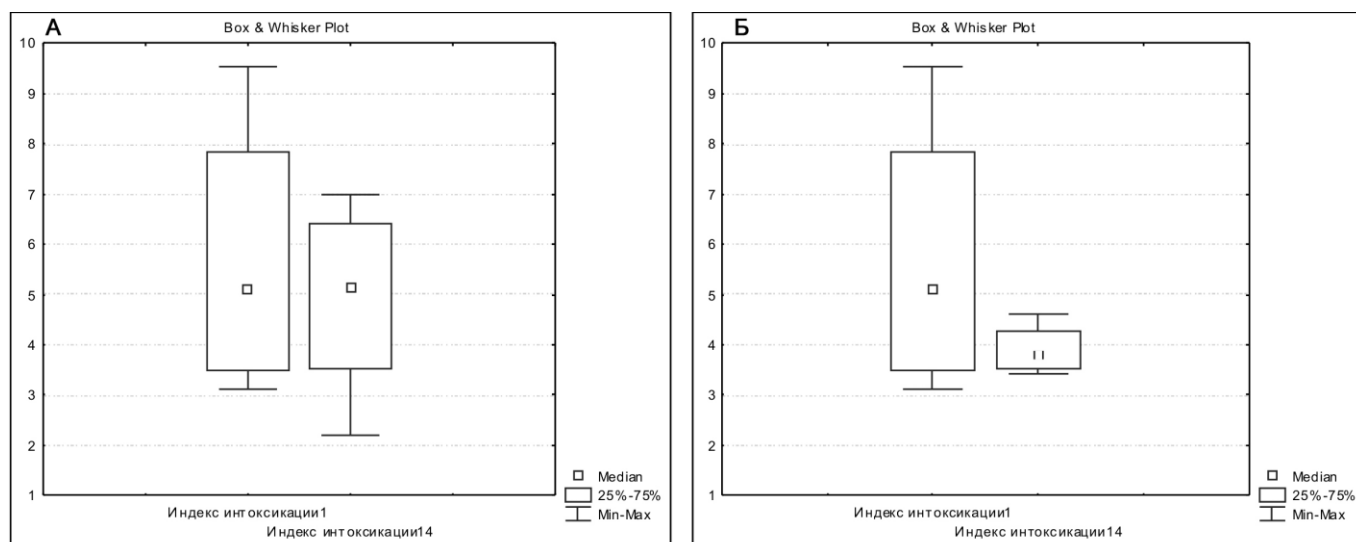


Рис. 4. Динамика интегрального индекса интоксикации у больных алкоголизмом: А – в группе сравнения; Б – в опытной группе

[3]. Эти соединения обладают способностью ингибировать функциональную активность Т- и В-лимфоцитов, фагоцитарную активность лейкоцитов. У больных из обеих групп до лечения наблюдалась тенденция к повышению уровня молекул средней массы. На 14-й день лечения в группе сравнения концентрация этих молекул была незначительно повышена по сравнению с исходной величиной, тогда как в опытной группе их уровень достоверно снизился, достигнув нормальных значений, что отражает детоксикационные свойства полиоксидония.

ЛИИ был достоверно повышен у больных из обеих групп, особенно значительно в опытной группе (рис. 3). В результате проводившегося лечения у больных в группе сравнения произошло еще большее увеличение ЛИИ. После комплексного лечения с полиоксидонием ЛИИ сни-

зился и приблизился к уровню здоровых. Интегральный индекс интоксикации (ИИИ) при поступлении больных в состоянии ААС имел тенденцию к повышению, а в процессе лечения снижался в обеих группах (в опытной группе – достоверно,  $p < 0,05$ ) (рис. 4).

Изучение ферментов сыворотки крови больных алкоголизмом показало, что до лечения у них наблюдалось выраженное повышение активности АсАТ, АлАТ и -ГГТ. У больных в обеих группах к 7-му дню лечения произошло достоверное снижение (по отношению к исходной величине) активности АсАТ и АлАТ (табл. 2). Активность же -ГГТ достоверно снизилась на 7-й день лечения только у больных, получавших полиоксидоний, к 14-му дню отмечалось дальнейшее снижение активности фермента с приближением к нормальным значениям. В группе срав-

Таблица 2

Показатели активности ферментов в динамике лечения

Параметр		Здоровые (n=10)	Больные алкоголизмом					
			Группа сравнения (n=7)			Опытная группа (n=7)		
			До лечения	На 7-й день лечения	На 14-й день лечения	До лечения	На 7-й день лечения	На 14-й день лечения
АсАТ, ед.	Медиана	16,0–48,0	81,7	51,0 <sup>#</sup> $P_{1-7} < 0,05$	39,2 <sup>#</sup> $P_{1-14} < 0,05$	55,1	41,7 <sup>#</sup> $P_{1-7} < 0,05$	44,3 <sup>#</sup> $P_{1-14} < 0,05$
	25–75 процентиля		42,4–146,4	44,2–56,2	29,7–57,4 $p < 0,05$	46,6–65,6	40,3–47,7	37,3–46,4 $p < 0,05$
АлАТ, ед.	Медиана	10,1–52,0	74,6	49,6 <sup>#</sup> $P_{1-7} < 0,05$	40,8 <sup>#</sup> $P_{1-14} < 0,05$	53,3	40,2 <sup>#</sup> $P_{1-7} < 0,05$	42,5 <sup>#</sup> $P_{1-14} < 0,05$
	25–75 процентиля		65,6–95,7	39,6–62,1	34,2–62,8 $p < 0,01$	32,5–82,9	30,4–52,4	32,1–52,0 $p < 0,05$
ГГТ, ед.	Медиана	5,0–50,0	196,2	139,1	114,2 $p < 0,06$	184,7	130,4 <sup>#</sup> $P_{1-7} < 0,05$	82,9 <sup>#</sup> $P_{1-14} < 0,05$
	25–75 процентиля		142,3–250,4	84,6–208,3	52,3–216,3	116,3–209,5	94,0–135,8	55,1–105,1 <sup>#</sup> $P_{1-14} < 0,05$

**Примечание.** <sup>#</sup> – достоверность отличий в группе (до и в процессе лечения); – повышение относительно нормы менее чем в 2 раза; – повышение относительно нормы в 2 раза и более

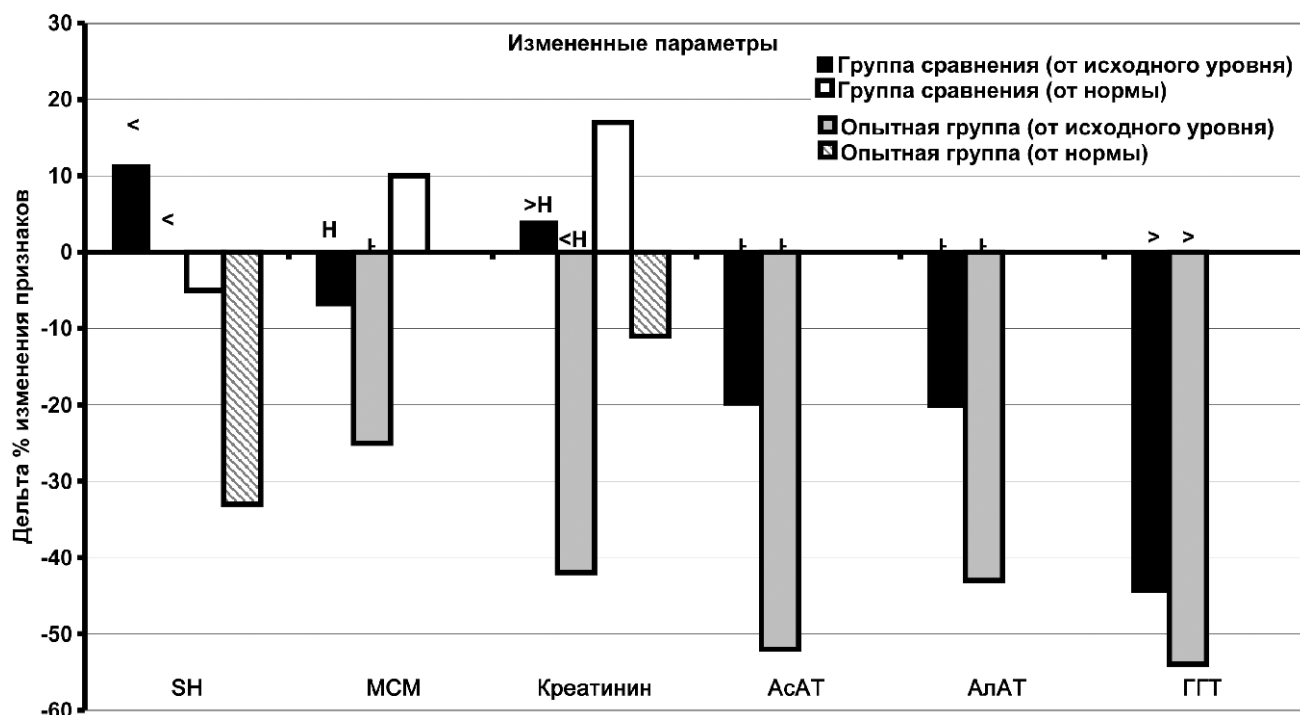


Рис. 5. Итоговые результаты исследования биохимических показателей в динамике лечения больных алкоголизмом

нения снижение активности -ГГТ, близкое к достоверному, наблюдалось только на 14-й день лечения (табл. 2), причем средняя активность фермента в 1,7 раза превышала верхнюю границу нормы.

Итоговые результаты исследования биохимических показателей в динамике лечения больных алкоголизмом представлены на рис. 5. Для большей наглядности приведена динамика лишь тех параметров, которые были изначально изменены.

#### Заключение и выводы

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что включение полиоксидония в терапию больных алкоголизмом приводит к более эффективной коррекции некоторых биохимических нарушений.

1. Детоксицирующее действие полиоксидония проявилось в достоверном снижении ЛИИ, концентраций креатинина и молекул средней массы, а также интегрального индекса интоксикации и активности -ГГТ.

2. Полиоксидоний способствовал более полной, чем в группе сравнения, нормализации баланса продуктов ПОЛ и факторов АОЗ.

#### Список литературы

1. Голиков П.П., Николаева Н.Ю., Гавриленко И.А., Матвеев С.Б., Давыдов Б.В., Марченко В.В., Смирнов С.В., Лебе-

дев В.В., Голиков А.П. Оксид азота и перекисное окисление липидов как факторы эндогенной интоксикации при неотложных состояниях // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. — 2000. — №2. — С. 6—9.

2. Голиков П.П. Взаимосвязь оксида азота с малоновым диальдегидом и ангиотензинпревращающим ферментом в норме и при ранениях груди // Физиология человека. — 2004. — №5. — С. 97—103.

3. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. Т. 2. — Минск: Беларусь, 2002. — С. 195—205.

4. Лабораторная диагностика как инструмент в решении задач профилактической и клинической наркологии (энзимодиагностика наркологических заболеваний) / Под ред. Т.В. Чернобровкиной. — М.: РГМУ, 1999. — 32 с.

5. Медицинские лабораторные технологии и диагностика: Справочник / Под ред. А.И. Карпищенко. Т. 2. — СПб.: Интермедика, 2002. — 600 с.

6. Пинегин Б.В. Механизм действия и клиническое применение отечественного иммуномодулятора полиоксидония. — М.: ГНЦ — Институт иммунологии МЗ РФ, 2003. — 107 с.

7. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. — М.: Медиасфера, 2003. — 312 с.

8. Руководство по наркологии / Под ред. Н.Н. Иванца. Т. 1. — М.: Медпрактика, 2002. — 443 с.

9. Современные представления о механизме действия иммуномодулятора полиоксидония / Под ред. Б.В. Пинегина, И.Н. Царева. — М.: ГНЦ — Институт иммунологии МЗ РФ. — 2004. — 69 с.