

Особенности развития окислительного стресса при опийной наркомании

ВНУКОВ В.В.

МИЛЮТИНА Н.П.

ОВСЯННИКОВ М.В.

ПАНЧЕНКО Л.Ф.

д.б.н., профессор, зав.кафедрой биохимии и микробиологии Ростовского госуниверситета (РГУ), Ростов-на-Дону

к.б.н., доцент кафедры биохимии и микробиологии РГУ, Ростов-на-Дону

к.м.н., зав.отд. №2 ГОУЗ «Психоневрологический диспансер», Ростов-на-Дону

д.м.н., профессор, академик РАМН, рук. лаборатории биохимии

Национального научного центра наркологии Росздрава, Москва

Проведено клинико-биохимическое обследование больных опийной наркоманией на стадиях абстиненции и ремиссии. Установлено нарушение прооксидантно-антиоксидантного баланса в крови, которое сопровождается повышением интенсивности индуцированной хемилюминесценции и перекисного окисления липидов (ПОЛ) в плазме и эритроцитах на фоне дисбаланса и ингибирования компонентов антиоксидантной системы крови.

Введение

Хроническое поступление опийных препаратов в организм является пусковым звеном последующего каскада патологических реакций, которые затрагивают ключевые стороны метаболизма, что приводит к развитию психической и физической зависимости. Глубокие сдвиги в медиаторном обмене, вовлечение микросомального окисления в биотрансформацию опиатов, периодическая гипоксия при опийной наркомании [1, 23, 24, 30] позволяют предположить важную роль свободнорадикальных процессов (СРП) в патогенезе данного заболевания. В клинических исследованиях показано усиление свободнорадикального окисления (СРО) при различных видах наркомании [2, 18, 22]. В настоящее время установлено, что развитие многих патологических состояний сопровождается проявлением окислительного стресса [9, 14]. Окислительный стресс определяют как состояние сдвига динамического равновесия в системе прооксиданты—антиоксиданты в сторону усиления СРО на фоне напряженности и дисбаланса компонентов антиоксидантной системы [9, 14, 31].

В соответствии с этим целью настоящего исследования стало выяснение участия СРП в молекулярных механизмах опийной наркомании на стадиях абстиненции и ремиссии.

Материалы и методы

Проведено клинико-лабораторное обследование 70 больных опийной наркоманией, проходивших лечение в отделении №2 ГОУЗ «Психоневрологический диспансер» г. Ростова-на-Дону. Все больные были мужского пола в возрасте 17—35 лет (средний возраст 24,5 года); стаж регулярного употребления наркотических средств опийной группы (преимущественно самодельных препаратов из опийного мака и т.п.) от 1 года до 6 лет. Были обследованы две группы больных:

- 1) пациенты с абстинентным синдромом;
- 2) пациенты на стадии ремиссии (4—6 мес. после прекращения приема наркотиков).

Контрольную группу составили 20 практически здоровых доноров соответствующего пола и возраста.

Образцы крови отбирали в течение 24 ч после поступления в стационар, до начала лечения. Из цельной крови получали плазму путем центрифугирования при 1500 g 15 мин. Эритроцитарную массу трижды отмывали 0,15 М NaCl в трис-HCl буфере pH 7,4 и готовили 1%-ный гемолизат.

Интенсивность СРП оценивали по параметрам H_2O_2 -люминол-индуцированной хемилюминесценции (ХЛ) — высоте быстрой вспышки (Н) и светосумме (S_m) [25], а также содержанию молекулярных продуктов ПОЛ. Экстракцию липидов из плазмы и гемолизата осуществляли методом Блая и Дайера [27]. Хлороформный экстракт использовали для определения уровня первичных и конечных продуктов ПОЛ. Первичные продукты ПОЛ — диеновые конъюгаты (ДК) — определяли с помощью УФ-спектрофотометрии [19]. Содержание вторичного продукта ПОЛ — малонового диальдегида (МДА) — определяли методом [20]. Уровень конечных продуктов — шиффовых оснований (ШО) определяли спектрофлуориметрическим методом [26]. Супероксидгенерирующую активность (СГА) плазмы определяли по [29], скорость утилизации H_2O_2 в плазме — методом [12].

Для оценки состояния антиоксидантной системы в плазме крови определяли оксидантную активность церулоплазмينا (ЦП) модифицированным методом Ревина [11], а также содержание α -токоферола (α -ТФ) [3]. В эритроцитах определяли активность супероксиддисмутазы (СОД) методом Фрида [29], каталазы — методом М.А. Королюка и др. [12], глутатионпероксидазы (ГПО) — методом В.М. Моина [15]. Содержание гемоглобина определяли с помощью набора фирмы «Реагент» (Россия).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента [13].

Результаты исследования и их обсуждение

Проведенное исследование показывает, что в состоянии абстиненции наблюдается повышение интенсивности H_2O_2 -люминол-индуцированной ХЛ в плазме крови больных опийной наркоманией (табл. 1). Н ХЛ увеличивается на 65%, S_m возрастает на 117%, что может свидетельствовать о повышенном образовании активных форм кислорода (АФК) и преобладании прооксидантного потенциала плазмы крови. Известно, что амплитуда быстрой вспышки H_2O_2 -индуцированной ХЛ прямо пропорциональна окисляемости тканевых липидов и концентрации металлов переменной валентности и обратно пропорциональна содержанию эндогенных антиоксидантов [6].

В обследованной группе пациентов в состоянии абстиненции наблюдается увеличение на 124% СГА плазмы крови, тогда как скорость расщепления гидропероксида

Таблица 1

Интенсивность H_2O_2 -люминол-индуцированной хемилюминесценции (ХЛ) и перекисного окисления липидов (ПОЛ) в плазме крови больных опийной наркоманией

Группы обследованных, стадии заболевания	Показатели ХЛ		Продукты ПОЛ		
	Н, мм	$S_m \times 10^4$ отн.ед.	ДК, нМ/мл	МДА, нМ/мл	ШО, ед фл./мл
Доноры, n=20	44,2±4,2	84,1±2,1	12,38±1,71	20,87±1,58	1,062±0,090
Абстиненция, n=20–40	72,8±7,9***	182,5±17,0***	20,18±2,20*	34,30±3,58**	1,936±0,079**
Ремиссия, n=10–25	66,4±6,9**	158,0±13,9***	20,38±1,40**	24,19±1,58###	1,596±0,113****

Примечание. Здесь и в табл. 2 — *: **, *** — достоверность различий по сравнению с донорами ($P<0,05$ —0,001); #, ##, ### — относительно абстиненции ($P<0,05$ —0,001)

Таблица 2

Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) и активность антиоксидантных ферментов в эритроцитах больных опийной наркоманией

Группы обследованных, стадии заболевания	Продукты ПОЛ			Антиоксидантные ферменты		
	ДК, нМ / мг Hb	МДА, нМ / мг Hb	ШО, Ед.фл. / мг Hb	СОД, ед.акт. / мг Hb	Каталаза, нМ H_2O_2 / мг Hb	ГПО, усл.ед. / мг Hb
Доноры, n=20	4,34±0,13	3,36±0,34	0,553±0,040	3,55±0,29	27,61±2,78	256,93±12,83
Абстиненция, n=30–40	8,33±0,86***	6,64±0,31**	0,881±0,077***	1,85±0,23***	22,71±2,18	183,90±7,79***
Ремиссия, n=20–30	7,08±0,26***	5,61±0,35****	0,672±0,071	2,43±0,26*	21,39±3,89**	202,28±9,75**

(IN_2O_2) в плазме уменьшается на 57% относительно контроля. Это может привести к значительному превышению стационарной концентрации H_2O_2 и дополнительной продукции АФК. Взаимодействие гидропероксида с вне-эритроцитарным гемоглобином, уровень которого резко возрастает в плазме крови при опийной наркомании [16], приводит к образованию более сильных прооксидантов — метгемоглобина, феррилгемоглобина, а также ОН-радикала, которые, как известно, характеризуются высокой окисляющей способностью и индуцируют ПОЛ [17, 21].

Среди различных причин повышения уровня АФК при опийной наркомании следует отметить периодическую дыхательную и тканевую гипоксию [23, 24], которая, как установлено, сопровождается усилением СРО [5, 9], а также гиперкатехолемию [1]. Резкое повышение в крови наркоманов при абстиненции уровня дофамина приводит к его аутоокислению, в ходе которого через стадию семихинона образуется супероксидный анион-радикал [4]. Кроме того, показано, что хроническая наркотическая интоксикация приводит к развитию различных соматических расстройств [22, 24], в патогенезе которых важная роль может принадлежать интенсификации ПОЛ и нарушению структурной организации биомембран.

Повышенное образование АФК при абстиненции инициирует процесс ПОЛ в плазме крови и мембранах эритроцитов (табл. 1, 2). Уровень ДК в плазме и эритроцитах пациентов с синдромом отмены возрастает на 63 и 92%, содержание МДА — на 64 и 83%, ШО — на 82 и 59% соответственно по сравнению с донорами. Как следует из полученных данных, у больных наблюдается интенсификация как начальных, так и конечных стадий ПОЛ в плазме и эритроцитах с образованием широкого спектра продуктов, вызывающих окислительное повреждение всех биомолекул и клеточных структур организма [5, 10, 28].

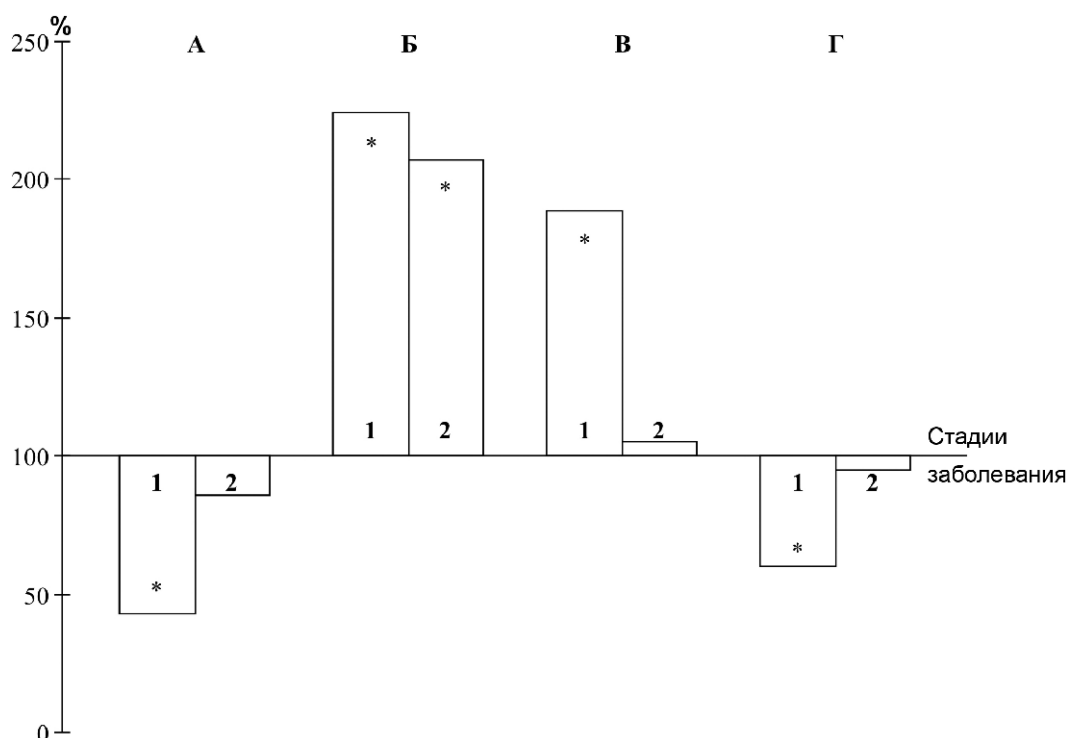
Повышение уровня ПОЛ в мембранах эритроцитов при наркомании может быть причиной нарушения их стабильности и повышения проницаемости, а это снижает эффективность функционирования эритрона и ухудшает реологические свойства крови. В исследовании [8] показано, что липопероксидация в мембранах эритроцитов сопровождается выраженными морфологическими трансформациями клеток: везикуляцией, агрегацией, формированием эхино- и стоматоцитов, сложными изменениями структуры плазматической мембраны и гиперполяризацией.

Важнейшая роль в поддержании стационарного уровня ПОЛ в крови принадлежит антиоксидантным ферментам эритроцитов — СОД, каталазе, ГПО — которые функционируют сопряженно и ингибируют СРО на различных стадиях цепного процесса.

В эритроцитах больных с синдромом отмены наблюдается ингибирование активности СОД и ГПО на 48 и 28% соответственно по сравнению с нормой (табл. 2). В результате ингибирования СОД нарушается регуляция ПОЛ на стадии активации кислорода и зарождения цепного процесса, что подтверждается резким приростом СГА в плазме и накоплением ДК — первичных продуктов ПОЛ — в плазме и эритроцитах больных.

Ингибирование в эритроцитах ГПО, которая характеризуется липопероксид- и пероксинитритредуктазной активностью [33], может создавать условия для образования высокотоксичных липоксильных (LO) и гидроксильных (ОН) радикалов, наиболее мощных индукторов ПОЛ [5, 10].

К важнейшим компонентам антиоксидантной системы плазмы крови относятся медьсодержащий полифункциональный белок ЦП и α -ТФ. При абстиненции оксидантная активность ЦП в плазме повышается на 89% по сравнению с нормой (рисунок). Учитывая, что ЦП обладает феррооксидазной и СОД-подобной активностью, его



Изменение в плазме крови больных опиоидной наркоманией:

А — скорости утилизации перекиси водорода; Б — супероксидгенирующей активности; В — содержания церулоплазмينا; Г — α -ТФ; 1 — абстиненция; 2 — ремиссия; * — $P < 0,05–0,001$ (% относительно уровня доноров)

активация в плазме пациентов с абстиненцией может рассматриваться как компенсаторная реакция, направленная на торможение СРП.

При опиоидной наркомании в абстиненции наблюдается снижение содержания α -ТФ в плазме крови на 40% (рис. 1). Витамин Е является эффективным "тушителем" синглетного кислорода, восстанавливает липопероксильные радикалы (LO_2), обладает мембранопротекторным эффектом, защищает хроматин от окислительного повреждения [14]. В исследовании [34] показано снижение уровня витамина Е в плазме крови при героиновой наркомании, особенно существенное у ВИЧ-инфицированных наркоманов [32]. Включение витамина Е в детоксикационную терапию опиоидной наркомании обеспечивает быстрое восстановление его содержания, стойкое снижение уровня ПОЛ в плазме крови, редукцию соматовегетативных и поведенческих симптомов в структуре абстинентного синдрома [2].

Полученные результаты показывают, что нарушение прооксидантно-антиоксидантного баланса при наркомании носит долговременный характер и в значительной степени сохраняется после прекращения приема наркотиков. В плазме крови в период ремиссии параметры индуцированной ХЛ остаются повышенными на 50–88% по сравнению с нормой, сохраняется высокий уровень СГА, тогда как скорость расщепления гидропероксида (INH_2O_2) в плазме нормализуется (табл. 1, рисунок).

На стадии ремиссии наблюдается лишь частичная нормализация уровня ПОЛ в крови. В плазме крови к норме приближается уровень МДА, а в эритроцитах — содержание ШО, остальные показатели ПОЛ превышают норму на 50–65% (табл. 1, 2). Это согласуется с сохранением дисбаланса в антиоксидантной системе крови.

На стадии ремиссии в плазме крови отмечена нормализация оксидантной активности ЦП и содержания α -ТФ, тогда как активность антиоксидантных ферментов в эритроцитах остается ниже контроля (табл. 2, рисунок).

В состоянии ремиссии активность СОД на 32% ниже, чем в норме, а каталазы и ГПО — на 21–23%.

Заключение

Проведенное исследование показывает, что при опиоидной наркомании развивается выраженный окислительный стресс, который сопровождается интенсификацией СРО в крови на фоне дисбаланса и ингибирования компонентов антиоксидантной системы плазмы (ЦП, α -ТФ) и эритроцитов (СОД, каталаза, ГПО).

На стадии ремиссии в крови больных опиоидной наркоманией сохраняются признаки окислительного стресса.

Синдром липопероксидации является важным механизмом патогенеза опиоидной наркомании и одной из причин развития сопутствующих соматических нарушений на стадии ремиссии. Наличие отсроченных нарушений прооксидантно-антиоксидантного баланса после прекращения приема наркотиков указывает на необходимость расширения стратегии пролонгированной терапии путем применения эффективных способов коррекции окислительно-восстановительного гомеостаза.

Список литературы

1. Анохина И.П. Биологические механизмы зависимости от психоактивных веществ (патогенез) // Лекции по наркологии / Под ред. Иванца Н.Н. — М.: Медпрактика, 2001. — С. 13–33.
2. Анохина И.П., Иванец Н.Н., Дробышева В.Я. Основные достижения в области наркологии, токсикомании, алкоголизма // Вестник Российск. АМН. — 1998. — №7. — С. 29–37.

3. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма: Методические рекомендации. — СПб.: ИКФ «Фолиант», 2000. — С. 93—94.
4. Болдырев А.А. Двойственная роль свободнорадикальных форм кислорода в ишемическом мозге (обзор) // Нейрохимия. — 1995. — Т. 12, №3. — С. 3—13.
5. Владимиров Ю.А., Азизова О.А., Деев А.И. и др. Свободные радикалы в живых системах. Итоги науки и техники: серия Биофизика. ВИНТИ. — М., 1991. — Т. 29. — 252 с.
6. Владимиров Ю.А., Шерстнев М.П. Хемилюминесценция клеток животных. Итоги науки и техники: серия Биофизика. ВИНТИ. — М., 1989. — Т. 24. — 220 с.
7. Добротина Н.А., Рутницкий А.Ю., Гладышева М.В. и др. Полифункциональность церулоплазмينا, обоснование применения // Успехи соврем. биол. — 1999. — Т. 119, №4. — С. 375—379.
8. Доманский А.В., Лапшина Е.А., Заводник И.Б. Окислительные процессы, индуцируемые органической гидроперекисью в эритроцитах человека: хемилюминесцентные исследования // Биохимия. — 2005. — Т. 70, №7. — С. 922—932.
9. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс: Биохимический и патофизиологический аспекты. — М.: МАИК «Наука/Интерпериодика», 2001. — 343 с.
10. Каган В.Е., Орлов О.Н., Прилипко Л.Л. Проблема анализа эндогенных продуктов перекисного окисления липидов. Итоги науки и техники: серия Биофизика. ВИНТИ. — М., 1986. — Т. 18. — 133 с.
11. Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии. — Мн.: Беларусь, 1982. — С. 289—292.
12. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. и др. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. — 1988. — №1. — С. 16—19.
13. Лакин Г.Ф. Биометрия. — М.: Высшая школа, 1980. — 293 с.
14. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К. и др. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. — М.: Слово, 2006. — 556 с.
15. Моин В.М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах // Лаб. дело. — 1986. — №12. — С. 724—727.
16. Овсянников М.В., Масловский С.Л., Милутина Н.П. Структурное состояние мембран эритроцитов в патогенезе опийной наркомании // Биол. мембраны. — 2005. — Т. 22, №4. — С. 322—326.
17. Осипов А.Н., Брюханова Э.В., Вахрушева Т.В. и др. Влияние гипохлорита и перекиси водорода на способность гемоглобина стимулировать перекисное окисление липидов липопротеинов низкой плотности // Биофизика. — 1997. — Т. 42, №2. — С. 400—407.
18. Панченко Л.Ф., Пирожков С.В., Немоловский А.В. и др. Перекисное окисление липидов и состояние системы антиперекисной защиты плазмы крови у подростков, злоупотребляющих психоактивными веществами // Вопр. наркологии. — 1998. — №1. — С. 50—53.
19. Стальная И.Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот // Современные методы в биохимии. — М.: Медицина, 1977. — С. 63—64.
20. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии. — М.: Медицина, 1977. — С. 66—68.
21. Теселкин Ю.О., Бабенкова И.В., Любичкий О.Б. и др. Ингибирование сывороточными антиоксидантами окисления люминола в присутствии гемоглобина и пероксида водорода // Вопр. мед. химии. — 1996. — №5. — С. 87—93.
22. Усманова Н.Н. Соматические осложнения опийной наркомании в подростковом возрасте и роль свободнорадикальных процессов в их патогенезе: Автореф. дисс. на соискание ученой степени к.м.н. — М., 2000. — 20 с.
23. Фридман Л.С., Флеминг Н.Ф., Робертс Д.Х. и др. Наркология / Под ред. С.Е. Хайман. — М.—СПб: «Изд-во БИНОМ» — «Невский Диалект», 1998. — 318 с.
24. Шабанов П.Д. Руководство по наркологии. — СПб.: Лань, 1999. — 352 с.
25. Шестаков В.А., Бойчевская Н.О., Шерстнев М.П. Хемилюминесценция плазмы крови в присутствии перекиси водорода // Вопр. мед. химии. — 1979. — №2. — С. 132—137.
26. Bidlack W.R., Tappel A.I. Fluorescent products of phospholipids during lipid peroxidation // Lipids. — 1973. — Vol. 8, №4. — P. 203—209.
27. Bligh E., Dyer W.G. Rapid methods of total lipid extraction and purification // Can. J. Biochem. Physiol. — 1959. — Vol. 37, №8. — P. 911—917.
28. Esterbauer H., Schaur R.J., Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes // Free Radical Biol. And Med. — 1991. — Vol. 11. — P. 81—128.
29. Fried R. Enzymatic and non-enzymatic assay of superoxide dismutase // Biochem. — 1975. — Vol. 57, №5. — P. 657—660.
30. Nestler E.I., Hyman S.E., Malenka R.C. Molecular neuropharmacology: A Foundation for Clinical Neuroscience. — New York — London: The McGraw-Hill Comp., Inc., 2001. — 539 p.
31. Sies H. Oxidative stress — From basic research to clinical application // Amer. J. Med. — 1991. — Vol. 91, Suppl. 3C. — P. S31—S38.
32. Tang A.M., Smit E., Semba R.D. et al. Improved antioxidants status among HIV-infected injecting drug users on potent antiretroviral therapy // J. Acquir. Immune. Defic. Syndr. — 2000. — Vol. 23. — P. 321—326.
33. Ursini F., Maiorino M., Sevanian A. Membrane hydroperoxides // Oxidative stress: oxidants and antioxidants / Sies H., ed. L.: Acad. Press, 1991. — P. 319—336.
34. Zhou J., Si P., Ruan Z. et. Al. Primary studies on heroin abuse and injury induced by oxidation and lipoperoxidation // Clin. Med. J. — 2001. — Vol. 114. — P. 297—302.

THE OXIDATIVE STRESS SPECIFICITY AT OPIATE ADDICTION

VNUKOV V.V.
MILUTINA N.P.
OVSYANNIKOV M.V.
PANCHENKO L.F.

dr.biol.sci., professor, Head of chair of Biochemistry and Microbiology of Rostov State University (RSU), Rostov-on-Don
 cand.biol.sci., docent of chair of Biochemistry and Microbiology of RSU, Rostov-on-Don
 cand.med.sci., Head of department №2 of SRDH «Psychoneurological hospital», Rostov-on-Don
 dr.med.sci., professor, Academician of RAMS, Head of the laboratory of Biochemistry,
 National Scientific Center of Addiction, Ministry of Public Health of Russian Federation

This article deal with the investigation of some oxidative stress mechanisms at opiate addiction. Opiate-dependent patients were observed during abstinence and remittency. The intensification of free radical generation and lipid peroxidation in plasma and erythrocytes of opiate addicts were demonstrated. It was found the balance disturbance and the inhibition of antioxidant system components of plasma (ceruloplasmine and vitamin E) and erythrocytes (superoxidedismutase, catalase, glutathioneperoxidase).