

Modificări ale unor parametri de stres oxidativ și ale ecografiei abdominale hepatice în cazul alcoolismului

CHANGES IN REDOX STRESS PARAMETERS AND ABDOMINAL LIVER ULTRASOUND IN ALCOHOLIC PATIENTS

Asist. Univ. Dr. Carolina Negrei^{1,2}, Conf. Univ. Dr. Florica Nicolescu¹

¹Disciplina de Toxicologie, Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila”, București

²Agenția Națională a Medicamentului și a Dispozitivelor Medicale, București, România

Rezumat

Studiul prezintă rezultatele preliminare ale evaluării anumitor parametri biochimici de stres oxidativ (activitatea glucozo-6-fosfat-dehidrogenazei eritrocitare – G6PDH, susceptibilitatea eritrocitelor la peroxidare lipidică – ESP) și ale ecografiei hepatice la pacienții diagnosticați cu alcoolism comparativ cu cele ale unor subiecți sănătoși.

Studiul clinic a inclus 36 de subiecți (18 pacienți dependenți de alcool și 18 subiecți sănătoși). Au fost evaluate G6PDH și ESP pe hematii separate din probe de sânge recoltate à jeun.

Rezultatele au evidențiat faptul că alcoolismul este asociat cu scăderea activității G6PDH, a producției de NADPH (a sistemului antioxidant). Creșterea ESP este corelată cu reducerea liposolubilității conținutului antioxidant al membranei eritrocitare.

Alcoolismul se caracterizează prin modificări patologice la nivelul structurii hepatice monitorizate prin ecografie hepatică.

Cuvinte cheie: alcoolism, stres oxidativ, ecografie hepatică

Abstract

The present study presents preliminary results aimed to evaluate certain biochemical redox stress parameters (erythrocyte activity of glucose-6-dehydrogenase – G6PDH, erythrocytes susceptibility to lipid peroxidation – ESP) and liver ultrasound in patients diagnosed with alcoholism compared to healthy controls.

A clinical study was designed that included 36 subjects, (18 addicted patients compared to a control group of 18 healthy subjects). On red blood cells separated from a jeun blood samples, G6PDH and ESP were assayed.

Adresa de corespondență:

Asist. Univ. Dr. Carolina Negrei, Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila”, str. Dionisie Lupu, nr. 37, București
e-mail: carol_n2002@hotmail.com

The results showed that the alcoholism is associated with a reduction of the G6PDH activity, and a subsequent decrease of the NADPH production (thus of the antioxidant defense system). The increase of the ESP is connected to the reduction of the liposoluble erythrocytes' membrane antioxidant content.

The alcoholism is also characterized by pathological changes of the liver structure monitorized by liver ultrasound.

Key words: alcoholism, redox stress, liver ultrasound

Abrevieri: BHA = boală hepatică alcoolică, ROS = specii reactive de oxigen, NADP = nicotinamida adenin dinucleotid fosfat, PBS = tampon fosfat salin, G6PDH = glucozo-6-fosfat dehidrogenaza, ESP = susceptibilitatea eritocitară la peroxidare lipidică, MDA = malondialdehida.

INTRODUCERE

Alcoolismul este o tulburare adictivă, care se caracterizează printr-un consum compulsiv și necontrolat de alcool în ciuda efectelor negative asupra sănătății, relațiilor și statusului social al consumatorilor. Similar adicției altor droguri, alcoolismul este definit din punct de vedere medical ca o boală curabilă. Termenul de „alcoolism” este larg răspândit și a fost folosit pentru prima dată de către Magnus Huss, însă în medicină acest termen a fost înlocuit cu conceptul de „abuz de alcool” și „dependență de alcool” DSM III în 1980 (1,2).

Alcoolul acționează prin intermediul a numeroase căi, prin care apar afecțiuni la nivel hepatic, al altor organe și determină dezvoltarea bolii hepatice alcoolice (BHA). Nu există un singur proces sau un mecanism preexistent care să determine toate efectele alcoolului asupra organismului sau asupra unui organ specific; în schimb, multe mecanisme acționează concertat, reflectând răspunsul organismului la acțiunile directe sau indirecte ale alcoolului. Factorul care a fost suspiciat ca jucând un rol central în multe căi de distrugere a alcoolului și care a fost în centrul multor cercetări este generarea excesivă de molecule numite radicali liberi, care duc la un status numit stres oxidativ (3,4).

Sunt în mod special importante acțiunile unei clase de oxigen care conține radicali liberi cunoscuți sub denumirea de specii reactive de oxigen (ROS). ROS pot afecta sau determina degradare totală (peroxidare) a complexelor moleculare esențiale din celule, inclusiv moleculele lipidice, proteinele și ADN-ul. Atât expunerea acută, cât și cea cronică la alcool pot crește producția de ROS și a peroxidării lipidelor, proteinelor și ADN-ului (5).

Un radical liber este un atom, moleculă sau compus care este foarte instabil din cauza structurii sale

atomice sau moleculare (distribuția electronilor în interiorul moleculei). Ca rezultat, radicalii liberi sunt foarte reactivi și încearcă să se lege de alte molecule, atomi sau chiar electroni pentru a crea un compus stabil. Pentru a atinge o stare mai stabilă, radicalii liberi pot „fura” un atom de hidrogen de la altă moleculă, se pot lega de altă moleculă sau pot interacționa în diverse moduri cu alți radicali liberi (6).

Un element chimic frecvent implicat în formarea de radicali liberi este oxigenul. Oxigenul molecular este esențial pentru funcția celulară pentru că joacă un rol pivot într-o serie de reacții biochimice din lanțul respirator, care este responsabil pentru cea mai mare producție de adenozin trifosfat (ATP), care furnizează energia necesară unei multitudini de reacții și funcții celulare (6,7).

MATERIALE ȘI METODE

Designul studiului

Studiul clinic a inclus 36 pacienți divizați în două grupuri:

- grupul de studiu a cuprins 18 pacienți, cu vârste cuprinse între 20 și 70 ani, 16 bărbați și 2 femei, dependenți de alcool;
- grupul de control a cuprins 18 subiecți sănătoși (15 bărbați și 3 femei).

Pacienții cu boli renale, hepatice sau hematologice severe, boli cardiovasculare sau maligne au fost excluși din studiu.

A fost obținut consimțământul informat de la toți subiecții incluși în studiu, iar protocolul de lucru a fost aprobat de către Comisia de Etică.

Reactivi: citrat de sodiu, clorură de sodiu, trietanolamină, nicotinamidă adenin dinucleotid fosfat (NADP⁺), glucozo-6-fosfat disodic, tampon fosfat (PBS), acid tiobarbituric, azidă de sodiu, acid tricloracetic.

Prepararea probei

Probe de sânge venos *à jeun*, au fost recoltate de la subiecți, folosind EDTANa₂ ca anticoagulant.

Hematiile au fost separate, spălate de două ori cu soluție de NaCl 0,9% și standardizată la 1g hemoglobină/100 ml suspensie eritrocitară. Activitatea glucozo-6-fosfat dehidrogenazei eritrocitare (G6PDH) a fost evaluată pe hemolizat proaspăt preparat (1:3, v/v).

Evaluare biochimică

Activitatea G6PDH (EC 1.1.1.49) a fost evaluată prin metoda Lohr și Waller (9). Rata formării NADPH, care este o măsură a activității enzimice, a fost evaluată spectrofotometric la 340 nm (10).

Susceptibilitatea hematiilor la peroxidare lipidică (ESP) a fost evaluată prin metoda malondialdehidei (MDA) conținută în suspensia de eritrocite standardizate (11, 12). În acest sens, suspensia eritrocitară a fost tratată timp de o oră cu H₂O₂ 10 mM (1:1, v/v). MDA rezultată din peroxidarea lipidică a membranei hematiilor a fost evaluată spectrofotometric la 535 nm utilizând acid tiobarbituric (1%, 3:0.75 v/v).

Evaluare clinică

Aceeași 18 pacienți dependenți de alcool au fost evaluați ecografic.

Am obținut următoarele rezultate:

Ecografie abdominală	Număr	Procent %
Hepatomegalie	14	87,5
Inflamație periportală/periseptală	8	5
Inflamație + patologie difuză	4	2,5
Structură neomogenă	0	
Ascită	2	1,25
Splenomegalie	2	1,25

Rezultatul: inflamație, apoptoză și fibroză:

– Un cerc vicios de înrăutățire a inflamației apare:

- Necroza celulară și apoptoza determină la pierderea de hepatocite și încercare subiacentă de regenerare, cu apariția fibrozei
- Celulele stelate, care se întind de-a lungul sinusoidelor de la nivel hepatic, proliferază și se transformă în miofibroblaste, cu producerea în exces a tipului I de collagen și matrice extracelulară
- Ca rezultat, îngustarea sinusoidelor determină limitarea fluxului sanguin
- Fibroza determină îngustarea venulelor hepatice terminale, ducând la compromiterea perfuziei hepatice și la hipertensiune portală
- Fibroza extensivă este asociată cu o încercare de regenerare, rezultând în noduli hepatici. Acest proces culminează cu ciroză.

REZULTATE

Rezultatele parametrilor investigați sunt prezentate în Tabelul 1.

Tabelul 1. Valorile parametrilor biochimici de stres oxidativ evaluați

Parametri evaluați	Alcoolism		Subiecți sănătoși	
	Media	Deviația standard	Media	Deviația standard
G6PDH (UI/g)	18,75	7,87	187,45	24,89
MDA (mM MDA/g Hb)	408,25	110,20	156,86	32,56

Conform literaturii de specialitate, alcoolismul este în general asociat cu un stres oxidativ crescut. Rezultatele obținute confirmă acest lucru, din moment ce G6PDH a fost semnificativ scăzută $18,75 \pm 7,87$ UI/g Hb vs. $187,45 \pm 24,89$ UI/g Hb ($p < 0,0001$) la pacienții cu alcoolism comparativ cu subiecții sănătoși (Tabelul I). ESP a fost semnificativ crescută ($408,25 \pm 110,20$ mM MDA/g Hb vs. $156,86 \pm 32,56$ mM MDA/g Hb), $p = 0,0002$ la pacienții cu alcoolism comparativ cu subiecții sănătoși, acest lucru indicând o supraproducție de ROS.

DISCUȚII

Rezultatele arată că alcoolismul este asociat cu scăderea activității G6PDH, scăderea producției de NADPH și a apărării antioxidante.

Rezultatele sunt în acord cu datele din literatura de specialitate, iar alcoolismul în special este asociat cu stres oxidativ din cauza supraproducției de ROS și efectului TNF α , care scade activitatea SOD și a altor enzime antioxidante.

CONCLUZII

1. Stresul oxidativ este crescut de:

- Metabolizare excesivă hepatică datorată consumului de alcool
- Radicalii liberi induc alterare prin peroxidare lipidică
- Scăderea apărării antioxidante (de exemplu, glutationul, vitaminele A și E), determinate de consumul de alcool duc la malnutriție
- Legarea produșilor de oxidare ai alcoolului, cum sunt acetaldehida, de hepatocite, duc la formarea de neoantigene și inflamație
- Acumularea neutrofilelor și a altor leucocite, care sunt atrase de alterarea lipidelor prin peroxidare și neoantigene
- Citokinele inflamatorii secretate de leucocite

2. Statusul redox al dependenților de alcool a fost comparat cu subiecți sănătoși cu ajutorul activității G6PDH și ESP – rezultatele au indicat o creștere a ESP la

dependenți prin creșterea acțiunii ROS la nivelul eritrocitelor și scăderea activității G6PDH, a producției de NADPH și a apărării antioxidante.

3. Studiile experimentale și clinice nu doar că au demonstrat asocierea dintre stresul oxidativ mediat de

către radicalii liberi și hepatotoxicitatea dată de alcool, dar descoperă treptat mecanismele celulare implicate.

4. Stresul oxidativ mitocondrial determină direct apoptoza hepatocitelor și favorizează sensibilizarea indusă de alcool a activității pro-apoptotice a TNF α .

BIBLIOGRAFIE

- Bondy S.C.** Ethanol toxicity and oxidative stress. *Toxicology Letter* 63:231-242, 1992.
- Cederbaum A.I.** Introduction – Serial review: Alcohol, oxidative stress, and cell injury. *Free Radical Biology & Medicine* 31:1524-1526, 2001.
- De Groot H.** Reactive oxygen species in tissue injury. *Hepato-Gastroenterology* 41:328-332, 1994.
- Fernandez-Checa J.C., Kaplowitz N., Colell, A., and Garcia-Ruiz, C.** Oxidative stress and alcoholic liver disease. *Alcohol Health & Research World* 21:321-324, 1997.
- Halliwell B.** Antioxidant defense mechanisms: From the beginning to the end. *Free Radical Research* 31:261-272, 1999.
- Kono H., Arteel G.E., Rusyn L., ET AL.** Ebselen prevents early alcohol-induced liver injury in rats. *Free Radical Biology & Medicine* 30:403-411, 2001.
- Zima T., Fialová L., Mestek O., Janebová M., Crkovská J., Malbohan I., ŠTÍPEK S., Mikulíková L., Popov P.** Oxidative Stress, Metabolism of Ethanol and Alcohol-Related Diseases, *Journal of Biomedical Science* 2001; 8:59-70
- Yu, B.P.** Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews* 74:139-162, 1994.
- W.Lohr G., Waller H. D.,** Methods of Enzymatic Analysis, edited by H. U. Bergmeyer, New York Academic Press, 1974, vol. 2, pp. 636-643
- Shibib B.A., Khan L.A., Rahman R.,** *Biochem. J.*, 292, 267-270 (1993)
- Yagi K.,** Free Radical and Antioxidant Protocols, 108, 101-106 (1998)
- Margină D., Grădinaru D., Mitrea N.,** Timisoara Medical Journal, 55, supplement 5, 197-199 (2005)