

Próba wykorzystania β -heksozoaminidazy jako markera nadużywania alkoholu w leczeniu uzależnienia.

Doniesienie wstępne

The use of β -hexosaminidase as a marker for sobriety monitoring. Preliminary findings.

BOGUSŁAW HABRAT, BARBARA CZARTORYSKA, DANUTA GÓRSKA, MONIKA POŹNIAK, HANNA WEHR

Z Zespołu Profilaktyki i Leczenia Uzależnień IPiN i Zakładu Genetyki IPiN w Warszawie

STRESZCZENIE. *Celem pracy było określenie użyteczności oznaczania β -heksozoaminidazy do monitorowania abstynencji u osób uzależnionych od alkoholu. W grupie 18 pacjentów leczonych przy pomocy fluwoksaminy oznaczano aktywność β -heksozoaminidazy w surowicy i w moczu. Stwierdzono, że: (1) aktywność β -heksozoaminidazy zarówno w surowicy, jak i w moczu była podwyższona w okresie tygodnia, a czasami do 2 tygodni po picciu alkoholu, (2) dynamika normalizacji aktywności enzymatycznej była wyraźniejsza w badaniu moczu, (3) oznaczanie aktywności β -heksozoaminidazy w moczu może być bardziej użyteczne niż jej oznaczanie w surowicy, ponieważ jest metodą nieinwazyjną i daje mniej wyników fałszywie pozytywnych.*

SUMMARY. *The aim of this study was to evaluate the usefulness of β -hexosaminidase for sobriety monitoring among alcoholics. In a group of 18 patients participating in fluvoxamine programme β -hexosaminidase activity in serum and urine was measured. It was found that: (1) β -hexosaminidase activity was elevated both in serum and in urine for one week and sometimes for two weeks after heavy drinking. It rapidly decreased as the patient continued abstinence. (2) The dynamics of decrease was bigger in urine. (3) Measurement of β -hexosaminidase activity in urine can be more useful than in serum because it is noninvasive and possibly gives less false positive results.*

Słowa kluczowe: β -heksozoaminidaza / monitorowanie abstynencji

Key words: β -hexosaminidase / sobriety monitoring

W ostatnich latach obserwuje się wzrost zainteresowania badaniami nad tzw. markerami alkoholizmu (10). Prace te koncentrują się na dwu głównych kierunkach: badania nad markerami ułatwiającymi diagnozowanie picia szkodliwego i uzależnienia od alkoholu oraz badania nad wskaźnikami pozwalającymi monitorować zachowanie abstynencji. Woronowicz i wsp. (16) stwierdzili, że znaczna część pacjentów (63%) i terapeutów odwykowych (41%) uważa, że monitorowanie abstynencji może mieć korzystny wpływ na przebieg uzależnienia. Największe zainteresowanie badawcze budzi obecnie oznaczanie

5-OH-tryptofolu, jednak badanie jest drogie i skomplikowane, co znacznie ogranicza jego powszechne stosowanie.

Niniejsza praca jest kolejną z cyklu prac nad wprowadzeniem do praktyki prostych i tanih metod biochemicznych służących monitorowaniu abstynencji (11, 12, 13, 14, 15, 16).

W poprzedniej pracy (12) wykazano przydatność oznaczania aktywności β -heksozoaminidazy w surowicy dla tego celu. Metoda ta ma jednak ograniczenia związane z koniecznością pobierania krwi, co szczególnie w dobie zakażeń HIV i w.z.w. jest istotnym mankamentem. W związku z po-

wyższym zdecydowaliśmy się na oznaczanie aktywności β -heksozoaminidazy w moczu, tym bardziej, że pojawiły się zachęcające prace na ten temat (5, 8, 9). W innej z naszych prac (13) wykazaliśmy, że aktywność β -heksozoaminidazy w moczu jest co najmniej równie, a prawdopodobnie bardziej użytecznym wskaźnikiem nadużycia alkoholu niż aktywność w surowicy.

GRUPY BADANE

Badaniami objęto 18 pacjentów biorących udział w programie farmakologicznego zapobiegania nawrotom picia alkoholu przy pomocy fluwoksaminy. Wszyscy pacjenci spełniali kryteria DSM III-R uzależnienia od alkoholu. Średni wiek badanych wynosił $41 \pm 11,1$ lat i mieścił się w przedziale 21-71 lat, a okres nadużywania alkoholu wskazującego na uzależnienie trwał średnio $16,3 \pm 8,7$ lat. Z badań wykluczono pacjentów z niealkoholowymi uszkodzeniami wątroby (w.z.w., cholestaza itp. w wywiadzie), choć rozróżnienie między alkoholowym a niealkoholowym uszkodzeniem wątroby jest trudne bez specjalistycznych badań (np. biopsji) (7). Z badań wyłączono 2 pacjentów z aktywnym ostrym alkoholowym zapaleniem wątroby, u których aktywność GGTP osiągała wartości czterocyfrowe. Kryterium wykluczającym były także inne ciężkie choroby somatyczne, głównie nerek. Pacjenci mieli pobieraną krew i oddawali mocz do analizy przy każdej wizycie ambulatoryjnej.

Osiemnastoosobową grupę kontrolną (10 mężczyzn i 8 kobiet, średni wiek 38,6 lat) stanowiły osoby nieuzależnione od alkoholu, negujące przebycie poważniejszych chorób, które nie spożywały alkoholu przez co najmniej 2 tygodnie poprzedzające badania. Za normę aktywności β -heksozoaminidazy przyjęto wyniki średnie uzyskane w tej grupie ± 2 odchylenia standardowe.

METODY

Aktywność całkowitą i termostabilną β -heksozoaminidazy w moczu oraz w surowicy oznaczano metodą spektrofotometryczną z użyciem substratu syntetycznego: pochodnej 4-metylobelliferonu, a aktywność termolabilną obliczano przy pomocy różnicy między wynikami tych oznaczeń. Bliższy opis procedury oznaczania aktywności β -heksozoaminidazy można znaleźć w innych pracach (12, 13).

Oprócz tego u wszystkich pacjentów wykonywano badania rutynowe, w tym: aktywność aminotransferaz, GGTP, poziom bilirubiny i kreatyniny w surowicy.

Wyniki opracowywano statystycznie przy pomocy testów: t-Studenta lub Cochrańa-Coxa.

WYNIKI

Dane dotyczące średnich wartości i odchyłeń standardowych aktywności β -heksozoaminidazy w surowicy i w moczu zestawiono w tabelicy 1 i przedstawiono graficznie na rysunkach 1 i 2.

W pierwszym tygodniu abstynencji średnia aktywność β -heksozoaminidazy całkowitej, zarówno w surowicy jak i w moczu, a także w poszczególnych jej frakcjach, przekraczała średnie wartości przyjętej normy. Średnie wyniki aktywności β -heksozoaminidazy całkowitej, zarówno w surowicy jak i w moczu, przekraczały górną granicę przyjętej normy. Dotyczyło to także frakcji termostabilnej w surowicy.

W drugim i trzecim tygodniu abstynencji obserwowano obniżanie się średniej aktywności wszystkich frakcji β -heksozoaminidazy (poza termostabilną w surowicy w drugim tygodniu), zarówno w surowicy, jak i w moczu. Interesujące, że nierzadko wyniki przyjmowały wartości zbliżone do dolnej granicy normy. Dynamika tych zmian była wyraźniejsza w badaniach moczu.

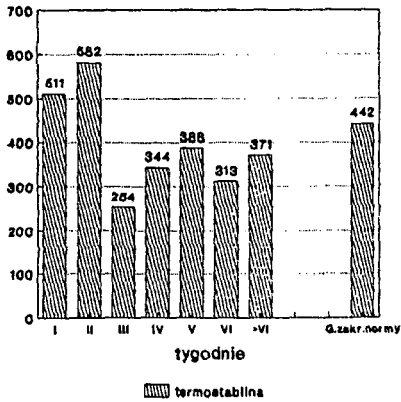
Po kilku tygodniach zaobserwowano lekki wzrost aktywności enzymatycznej, nie osiága-

Tablica 1. Aktywność β -heksozaminidazy w surowicy i w moczu w kolejnych tygodniach abstinencji

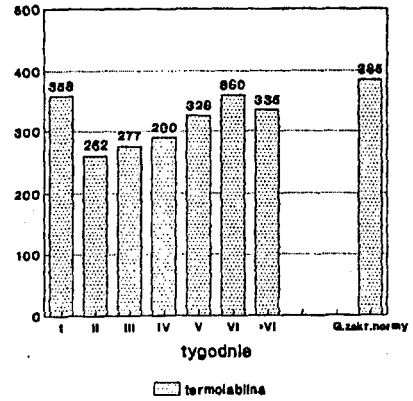
β -heksozaminidaza	Tydzień leczenia	I	II	III	IV	V	VI	VII	Wyniki grupy kontrolnej
całkowita w surowicy	znamiennosc statystyczna	AaBC	bc	Ab	ad	e		BD	cCdDe
	średnia	869,72	844,33	531,60	634,00	714,28	673,00	706,00	506,00
	odchyl.stand.	364,13	376,88	199,04	102,00	119,66	0	65,60	126,90
termostabilna w surowicy	znamiennosc statystyczna	EF		F					E
	średnia	510,82	582,00	254,20	344,00	388,00	313,00	371,00	256,00
	odchyl.stand.	363,48	279,30	174,72	164,00	105,68	0	87,87	92,70
termolabilna w surowicy	znamiennosc statystyczna	fgE	f	g				h	h
	średnia	358,90	262,33	277,40	290,00	326,14	360,00	335,33	249,00
	odchyl.stand.	121,93	100,55	47,14	62,00	76,95	0	22,29	68,00
całkowita w moczu	znamiennosc statystyczna	FGHi	F		G			H	i
	średnia	209,00	113,33	122,40	90,00	130,86	140,00	93,25	116,00
	odchyl.stand.	115,15	16,21	86,53	11,00	39,38	0	13,32	62,20
termostabilna w moczu	znamiennosc statystyczna	IJKjLK	I	J	K	j		L	k
	średnia	86,00	48,00	42,60	37,00	53,14	82,00	39,00	50,00
	odchyl.stand.	42,77	8,04	26,19	2,00	16,76	0	9,13	30,40
termolabilna w moczu	znamiennosc statystyczna	lmn	l		ł			m	n
	średnia	123,00	65,33	78,00	53,00	73,00	82,00	54,25	70,00
	odchyl.stand.	84,12	8,25	61,58	9,00	8,84	0	7,72	35,60
HDL	średnia	47,10	46,00	36,50		37,40	29,00	26,00	
	odchyl.stand.	18,90	0	9,23		8,84	0	2,94	

a...a = p 0.05, A...A = p 0.01 w teście t-Studenta lub Cochran-Coxa

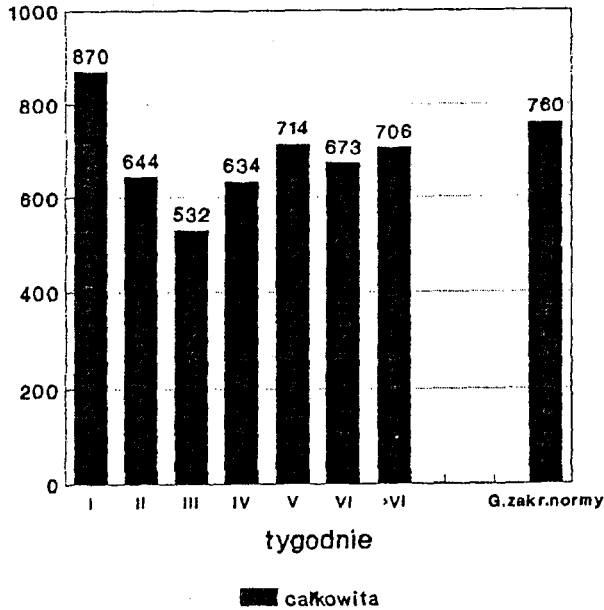
Beta-heksozoaminidaza termostabilna w surowicy



Beta-heksozoaminidaza termolabilna w surowicy

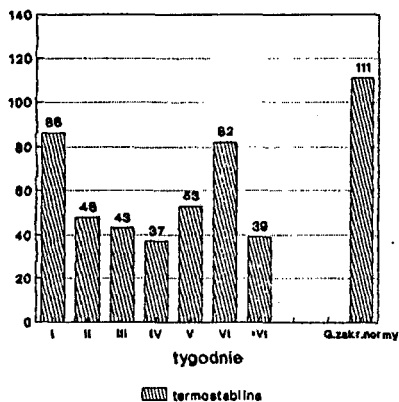


Beta-heksozoaminidaza całkowita w surowicy

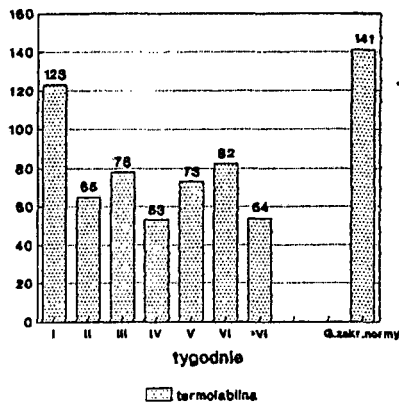


Rysunek 1. Aktywność β -heksozoaminidazy w surowicy.

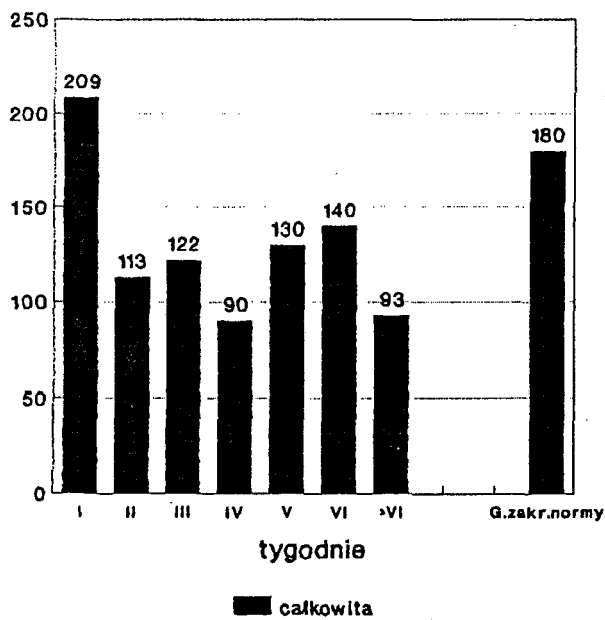
Beta-heksozoaminidaza
termostabilna w moczu



Beta-heksozoaminidaza
termolabilna w moczu



Beta-heksozoaminidaza
całkowita w moczu



Rysunek 2. Aktywność β -heksozoaminidazy w moczu.

jący jednak wartości powyżej normy. Bardziej wnikliwa analiza wykazała, że zjawisko to było po części spowodowane faktem, że część pacjentów z niższymi wartościami enzymu przestała uczestniczyć w programie.

Ogólnie rzecz biorąc, w czasie całej obserwacji wartości aktywności β -heksozoaminidazy w surowicy (zarówno całkowitej jak i jej frakcji) były wyższe w stosunku do średniej normy i najczęściej oscylowały koło górnego jej zakresu. W zakresie frakcji β -heksozoaminidazy, wyraźnie niższe średnie wartości (w stosunku do normy) występowały we frakcji termostabilnej, szczególnie w moczu.

Zestawienie liczb osób z "pozytywnymi", tzn. przekraczającymi normę (za normę przyjęto średnie wyniki aktywności u osób zdrowych ± 2 odchylenia standardowe) przedstawiono w tabelicy 2.

W pierwszym tygodniu abstynencji wartości całkowitej β -heksozoaminidazy w surowicy powyżej normy miało 4 spośród 13 pacjentów (30.8%), a jej obu podfrakcji po 5 osób (38.5%). Natomiast normę aktywności enzymu w moczu przekroczyły jedynie 2 osoby (15.4%).

W kolejnych tygodniach obserwowano zmniejszanie się liczby osób przekraczających normy aktywności β -heksozoaminidazy. Za wyjątkiem 5 tygodnia (dwie z siedmiu badanych osób) przypadki "pozytywnych" prób nie występowały lub dotyczyły to pojedynczych osób.

DYSKUSJA

Podwyższenie aktywności β -heksozoaminidazy w surowicy po spożyciu alkoholu zaobserwowano po raz pierwszy na początku lat 80-tych (3, 4, 6), jednak zjawisko to nie jest specyficznie związane z piciem alkoholu. Podwyższone wartości spotykano także w niealkoholowych chorobach wątroby (2) i w czasie ciąży (1). Mimo braku specyficzności wykazano użyteczność oznaczania tego markera we krwi dla monitorowania abstynencji, ze względu na wystarczającą czułość i właściwość rychłego pojawiania się wzrostu aktywności tego enzymu po krótkich okresach picia oraz jej szybkiej, bo występującej po kilku dniach, normalizacji (5, 12). Po pojawieniu się prac Martinezes i wsp. (8) oraz Karkainen i wsp. (6), którzy opisali możliwość wykorzystania oznaczeń tego markera w moczu,

Tablica 2. Liczba pacjentów z poziomami β -heksozoaminidazy przewyższającymi normę (średnia ± 2 odchylenia standardowe) w stosunku do ogólnej liczby pacjentów badanych w kolejnych tygodniach leczenia

β -heksozoaminidaza	Tydzień leczenia						
	I	II	III	IV	V	VI	>VI
całkowita w surowicy	4/13	1/3	1/6	0/1	2/7	0/3	0/4
termostabilna w surowicy	5/13	1/3	1/6	1/1	2/7	0/3	1/4
termolabilna w surowicy	5/15	1/3	0/6	0/1	2/7	0/8	0/4
całkowita w moczu	2/13	0/3	1/6	0/1	0/7	0/3	0/4
termostabilna w moczu	2/13	0/3	1/6	0/1	0/7	0/3	0/4
termolabilna w moczu	3/13	0/3	1/6	0/1	0/7	0/3	0/4
HDL w surowicy	3/13	0/3	1/6	0/1	3/7	1/3	2/4

HDL = lipoproteiny wysokiej gęstości

wzrosło zainteresowanie tą metodą jako prostą, a przede wszystkim, nieinwazyjną.

Uzyskane wyniki potwierdziły wstępnie użyteczność oznaczania β -heksozaminidazy (szczególnie w moczu) dla monitorowania zachowania abstynencji w czasie leczenia uzależnienia od alkoholu.

Poza pierwszym tygodniem abstynencji, wartości β -heksozaminidazy wykazywały spadek do wartości niższych niż górny zakres normy. Szczególnie wyraźnie było to widać w wynikach badań moczu.

Oznaczanie aktywności β -heksozaminidazy w moczu wydaje się metodą dającą mniej wyników fałszywie pozytywnych. Zaletą jest łatwość pobierania materiału do badań zarówno dla pacjenta jak i dla personelu.

Interpretacja wyników "pozytywnych" (tzn. sugerujących spożycie alkoholu) jest trudna. W czasie obecnych badań leczący nie otrzymywał na bieżąco wyników z laboratorium i dlatego nie mógł przy ich pomocy weryfikować informacji uzyskiwanych od pacjenta. Stwierdzono jednak, że pacjenci z "pozytywnymi" wynikami testu mieli znacząco wyższe wyniki innych prób wątrobowych (GGTP i AspAT $p < 0,01$, AIAT $p < 0,05$) oraz wyższe (choć nie znamienne) poziomy kreatyniny w surowicy. Dokładna analiza wartości β -heksozaminidazy wykazała, że większość pacjentów, u których pojawiły się "pozytywne" próby, to osoby, które miały poprzednie wartości enzymu zbliżone do górnej granicy normy, a nieznaczne podwyższenie (w granicach błędu metody) jego aktywności powodowało przesunięcie pacjenta do kategorii "powyżej normy".

W niniejszej pracy brak jest wyników badań pacjentów, którzy przerwali abstynencję i zaraz po tym fakcie zgłosili się do poradni. Większość pacjentów przestała uczestniczyć w programie prawdopodobnie przerywając abstynencję, inni zgłaszali się powtórnie, ale dopiero po 2-3 tygodniach i choć bywali ponownie włączani do programu, nie było

możliwości pobrania u nich materiału do badań krótko po ostatnim picu alkoholu.

WNIOSKI

1. Aktywność β -heksozaminidazy jest podwyższona w pierwszym, a czasami i w drugim tygodniu abstynencji, później normalizuje się, a nawet spada w dolne granice normy lub poniżej normy.
2. Dynamika zmian aktywności enzymatycznej jest wyraźniejsza w badaniach moczu niż surowicy.
3. β -heksozaminidaza wydaje się dobrym markerem do monitorowania trzeźwości u pacjentów leczonych odwykowo. Wymaga to jednak potwierdzenia w badaniach na większej populacji.

PIŚMIENNICTWO

1. Hultberg B., Isacson A.: A possible explanation of for the occurrence of increased β -hexosaminidase activity in pregnancy serum. *Clin. Chim. Acta* 1981, 113, 135-140.
2. Hultberg B., Isacson A., Jansson L.: β -hexosaminidase in serum from patients with cirrhosis and cholestasis. *Enzyme* 1981, 26, 296-300.
3. Hultberg B., Isacson A., Tiderstrom G.: β -hexosaminidase, leucine aminopeptidase, cystidyl aminopeptidase, hepatic enzymes and bilirubin in serum of chronic alcoholics with acute ethanol intoxication. *Clin. Chim. Acta* 1980, 105, 317-323.
4. Isacson A., Blanche C., Hultberg B., Joelsson B.: Influence of ethanol on the human serum level of hexosaminidase. *Enzyme* 1985, 33, 162-166.
5. Karkkainen P.: Serum and urinary β -hexosaminidase as markers of heavy drinking. *Alcohol & Alcoholism* 1990, 25, 365b-369.
6. Karkkainen P., Poikolainen K., Salaspuro M.: Serum β -hexosaminidase as a marker of heavy drinking. *Alc. Clin. Exp. Res.* 1990, 14, 187-190.
7. Laskus T., Lupa E., Poplewska M., Babiuch L.: Wartość rutynowych badań biochemicznych w wykrywaniu uszkodzeń wątroby u alkoholików w okresie abstynencji. *Wiad. Lek.* 1990, 43, 1027-1032.
8. 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.
9. Paraire M., Bourboze R., Baumann F.Ch., Percheron F.: Differential assay of A and B isoenzymes in urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase. *Clin. Chim. Acta* 1983, 129, 233-238.
10. Salaspuro M.: Conventional and coming laboratory markers of alcoholism and heavy drinking. *Alc. Clin. Exp. Res.* 1986, 10 suppl. 6, 5S-12S.