

# Ï ÀÒ Î ÔÈÇÈ Î Ë Î ÆÈ Æ

УДК 616. 155. 32 : 616. 89 – 008. 441.13

Е. В. Жернова, Н. М. Вялова, А. Н. Бохан, С. А. Иванова

## ПОКАЗАТЕЛИ ЗАПРОГРАММИРОВАННОЙ ГИБЕЛИ ЛИМФОЦИТОВ И НЕЙТРОФИЛОВ У ЛИЦ С АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИЕЙ В ДИНАМИКЕ ТЕРАПИИ ПРЕПАРАТОМ С АНТИОКСИДАНТНЫМИ СВОЙСТВАМИ

Целью настоящего исследования явилось изучение апоптоза нейтрофилов и лимфоцитов у лиц с алкогольной интоксикацией в динамике терапии препаратом цитофлавин. У лиц, злоупотребляющих алкоголем, выявлено статистически значимое повышение уровня апоптоза лимфоцитов и нейтрофилов на рецепторном и клеточном уровнях по сравнению со здоровыми донорами. Терапия цитофлавином приводила к положительной динамике экспрессии рецептора CD95 на лимфоцитах лиц с алкогольной интоксикацией. Отмечена тенденция к нормализации содержания нейтрофилов и лимфоцитов с морфологическими признаками апоптоза. На фоне применения цитофлавина у пациентов с алкоголизмом наблюдалось снижение концентрации кортизола в сыворотке крови.

Ëë þ-ââ ûâ ñë îââ: *апоптоз, алкоголизм, цитофлавин, нейтрофил, лимфоцит.*

В условиях длительной алкоголизации этанол может повреждать любые органы и ткани из-за его мембранотропности и способности изменять ключевые звенья клеточного метаболизма, что приводит к повышенной гибели различных клеток [1, 2]. Этанол выступает в качестве индуктора апоптоза, и при развитии алкогольной зависимости наблюдается усиление гибели иммунокомпетентных клеток [3, 4]. При хроническом злоупотреблении алкоголем характерны сдвиг гормонального баланса и длительное повышение уровня глюкокортикоидов, что может быть приравнено к состоянию сильного длительного стресса [5]. Ряд авторов указывают на увеличение в человеческом организме такого важного глюкокортикоида, как кортизол [6]. Отрицательное влияние длительной гипресекции кортизола на нервную систему существенно блокируется другим стероидным гормоном – дегидроэпиандростероном сульфатом (ДГЭАС) [7]. Как кортизол, так и ДГЭАС участвуют в осуществлении регуляции процессов апоптоза в организме.

Несовершенство лекарственной терапии аддиктивных расстройств делает необходимым изыскание и разработку новых, более эффективных фармакологических средств профилактики и лечения аддикций. Представляется перспективным использование препаратов, обладающих особыми нейропротекторными свойствами, оказывающих влияние на основные биологические процессы в организме и имеющих способность купировать зависимость от психоактивного вещества. Одним из возможных таких препаратов является «Цитофлавин» производства НТФФ «Полисан», который обладает антигипоксическим и антиоксидантным действием, оказывая положительный эффект на процессы энергообразования в клетке, уменьшая продукцию свободных радикалов и восстанавливая активность ферментов антиоксидантной защиты [8, 9].

### Ï àòâðèèè è ìàòîâû

Материалом исследования явились нейтрофилы и лимфоциты, сыворотка периферической крови здоровых лиц и лиц с алкогольной интоксикацией. Для этого была обследована группа из 23 мужчин с алкогольной интоксикацией (F10 по МКБ-10) в возрасте 25–60 лет, проходящих курс лечения в отделении аддиктивных состояний клиник ГУ НИИ психического здоровья ТНЦ СО РАМН. 13 лиц, злоупотребляющих алкоголем, получали цитофлавин, который вводился 2 раза в сутки внутривенно капельно (медленно) по 10.0 мл на 400 мл 0.9 %-ного натрия хлорида в течение 5 дней (основная группа). Данная группа пациентов получала цитофлавин в качестве основной терапии, дополнительно назначались только психотропные препараты для коррекции расстройств сна. 10 пациентов составили группу сравнения и получали традиционную медикаментозную терапию. Стандартная медикаментозная терапия абстинентного синдрома включала дифференцированное назначение следующих основных групп препаратов: психотропные препараты, ноотропы, вегетостабилизаторы и витамины.

Комплексная оценка биологических показателей лиц, злоупотребляющих алкоголем, проводилась в динамике: до назначения лечения на фоне выраженного абстинентного синдрома и через 10 дней после начала терапии.

Контрольную группу для биологического обследования составили 30 психически и соматически здоровых лиц, соответствующих по полу и возрасту обследуемым группам пациентов с алкогольной интоксикацией.

У здоровых лиц и в группе лиц, злоупотребляющих алкоголем, кровь для биологических исследований брали из локтевой вены утром, натощак. Лимфоциты выделяли из гепаринизированной крови обще-

принятым методом на градиенте плотности Ficoll-Paque («Pharmacia», Швеция). Оценку содержания клеток с маркером апоптоза проводили непрямым иммунофлюоресцентным методом с использованием моноклональных антител к антигену CD95 (Fas-рецептор) (ОО «Сорбент», Москва). Морфологические изменения нейтрофилов и лимфоцитов, характерные для апоптоза, оценивали методом световой микроскопии в мазках крови. Для исследования влияния цитофлавина на клетки периферической крови *in vitro* проводили инкубацию клеток с препаратом в течение 4 ч. Концентрацию кортизола и ДГЭАС в сыворотке крови определяли методом иммуоферментного анализа с использованием наборов «Алкор-Био».

Статистический анализ и обработку данных проводили с использованием пакета STATISTICA, версия 6.0 для Windows с использованием непараметрического критерия Краскела–Уоллиса.

### Цитологический анализ

Содержание в кровотоке лимфоцитов, экспрессирующих рецепторы готовности к Fas-зависимому апоптозу, при алкоголизме существенно превышает аналогичный показатель в группе контроля, что отражает процессы активации лимфоцитов (у лиц с алкогольной интоксикацией составляет 17.4±1.9 %, в группе здоровых лиц – 11.7±0.4 %, p<0.05). Сравнительный анализ двух групп пациентов, принимающих цитофлавин или стандартную медикаментозную терапию, показал, что в первой группе пациентов происходит снижение уровня экспрессии рецептора CD95, а во второй группе проводимая терапия не оказывает влияния на этот показатель (рисунок).

Цитологический анализ показал, что у лиц с алкогольной зависимостью до лечения уровень спонтанного апоптоза достоверно отличался от значений, наблюдаемых у здоровых лиц (2.3±1.2 и 0.3±0.2 %

соответственно, p<0.05). Число лимфоцитов с фрагментированным ядром также превышало значения, наблюдаемые у здоровых лиц (1.6±0.6 и 0.9±0.2 %), однако полученные результаты не были статистически достоверны.

Инкубация клеток *in vitro* с цитофлавином вызывала снижение содержания апоптотических нейтрофилов, но повышала число лимфоцитов с фрагментированным ядром (табл. 1).

У лиц, злоупотребляющих алкоголем, после терапии цитофлавином наблюдали тенденцию к снижению содержания в крови лимфоцитов и нейтрофилов с морфологическими признаками апоптоза (табл. 2).

Таблица 1  
Спонтанный и стимулированный апоптоз нейтрофилов и лимфоцитов лиц, злоупотребляющих алкоголем

Условия опыта	Доля нейтрофилов с признаками апоптоза, %		Доля лимфоцитов с фрагментированным ядром, %	
	Лица с АИ	Здоровые лица	Лица с АИ	Здоровые лица
Без инкубации	2.3±1.2*	0.4±0.2	1.6±0.8*	0.9±0.2
Инкубация с цитофлавином	1.6±1.1	0.0±0.0 <sup>#</sup>	7.2±4.3 <sup>#</sup>	1.7±0.6

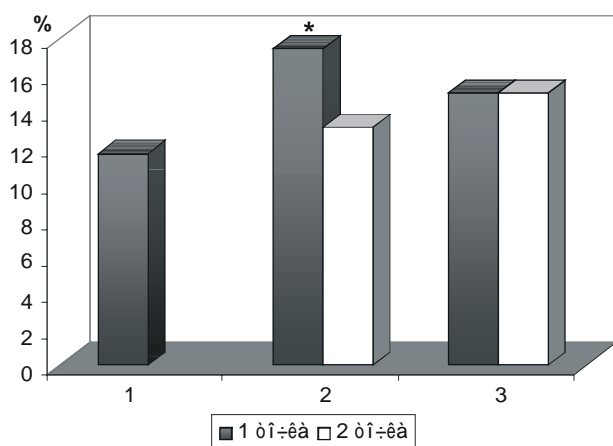
Примечание: АИ – алкоголизм; \* – p<0.05 по отношению к здоровым лицам; # – p<0.05 по отношению к лицам с АИ.

Таблица 2  
Динамика апоптоза нейтрофилов и лимфоцитов у пациентов, получающих цитофлавин, и в группе лиц, получающих стандартную медикаментозную терапию, %

Этап	Основная группа		Группа сравнения	
	Апоптотические нейтрофилы	Лимфоциты с фрагментированным ядром	Апоптотические нейтрофилы	Лимфоциты с фрагментированным ядром
До терапии	232±022*	1.63±0.80*	1.64±0.80	3.39±0.54*
После терапии	091±0.61	1.40±0.66	0.29±0.20	1.87±0.57
Контроль	038±0.16	0.92±0.20	0.38±0.16	0.92±0.20

Примечание: \* – p<0.05 по отношению к группе сравнения.

### CD95



Примечание: \* – p<0.05 по отношению к группе контроля; 1 – лица с алкоголизмом; 2 – лица с алкогольной интоксикацией; 3 – лица с алкогольной интоксикацией, получающие терапию.

В группе лиц с алкогольной интоксикацией, получающих стандартную медикаментозную терапию, не обнаружено достоверных различий в содержании клеток крови с признаками апоптоза до и после терапии.

При определении концентрации гормонов в основной группе обследованных пациентов на фоне выраженного абстинентного синдрома выявлена тенденция к увеличению уровня кортизола в сыворотке крови до  $528.00 \pm 65.19$  нмоль/л (табл. 3). При анализе распределения обследованных лиц в зависимости от концентрации кортизола индивидуальные значения колебались от 225 до 871 нмоль/л. Большая часть больных имели значения от 400 до 700 нмоль/л, в то время как в группе психически и соматически здоровых лиц средние значения составили  $445.13 \pm 21.45$  нмоль/л. Уровень ДГЭА-сульфата у больных алкоголизмом статистически не отличался от показателей в группе психически и соматически здоровых лиц.

В динамике терапии концентрация кортизола в группе больных, получающих цитофлавин, имела тенденцию к снижению, а в группе сравнения наблюдалось статистическое повышение данного показателя.

Таким образом, проведенные исследования показывают, что терапия цитофлавином приводит к положительной динамике экспрессии рецептора CD95 на лимфоцитах лиц с алкогольной интоксикацией, отмечается тенденция к нормализации содержания нейтрофилов и лимфоцитов с морфологическими признаками апоптоза. В экспериментальных пробах с иммунокомпетентными клетками показано, что на лимфоциты цитофлавин оказывает неоднозначное воздействие: с одной стороны, снижается экспрессия FAS-рецептора, что свидетельствует о снижении готовно-

сти клеток к апоптозу, но, с другой стороны, повышается количество лимфоцитов с фрагментированными ядрами. Апоптоз нейтрофилов при инкубации с цитофлавином *in vitro* снижается.

Существенным компонентом комплексного клинического действия цитофлавина является его стресс-протективное воздействие, направленное на снижение концентрации кортизола в сыворотке крови.

#### АУААУ

1. У лиц с алкогольной интоксикацией выявлено статистически значимое увеличение экспрессии рецептора CD95 в состоянии абстинентного синдрома по сравнению с контрольной группой. Терапия цитофлавином приводит к положительной динамике экспрессии рецептора CD95 на лимфоцитах лиц с алкогольной интоксикацией.

2. У лиц, злоупотребляющих алкоголем, уровень лимфоцитов и нейтрофилов с морфологическими признаками апоптоза статистически значимо выше, чем у здоровых лиц. Терапия цитофлавином приводит к нормализации содержания нейтрофилов и лимфоцитов с морфологическими признаками апоптоза. В экспериментальных пробах *in vitro* при инкубации с цитофлавином у здоровых доноров обнаружено статистически значимое снижение уровня апоптотических нейтрофилов.

3. В сыворотке крови лиц, злоупотребляющих алкоголем, на фоне выраженного абстинентного синдрома установлено повышение концентрации кортизола. Уровень ДГЭАС у пациентов до терапии сравним со значениями, выявленными у здоровых лиц, и значимо не изменяется в ходе проводимой терапии.

Таблица 3

Динамика некоторых показателей гормональной системы больных алкоголизмом

Гормоны	Контроль	Основная группа		Группа сравнения	
		до лечения	после лечения	до лечения	после лечения
Кортизол (нмоль/л)	$445.13 \pm 21.4$	$528.00 \pm 65.19$	$471.20 \pm 51.85$	$417.66 \pm 27.8$	$680.50 \pm 99.5^*P$
ДГЭАС (мкг/мл)	$2.33 \pm 0.14$	$2.62 \pm 0.59$	$1.65 \pm 0.32$	$1.74 \pm 0.68$	$1.59 \pm 0.81$

Таблица 3 – Динамика некоторых показателей гормональной системы больных алкоголизмом

### Список литературы

1. Астахов И. А., Исаев И. А. Иммунитет и алкоголь // Журнал неврологии и психиатрии. 2004. 166 н.
2. Halliwell D. B., Gutteridge J. M. Free Radicals in Biology and medicine // Oxford University Press. 1999. P. 936.
3. Freund G. Apoptosis and gene expression: perspectives on alcohol-induced brain damage // Alcohol. 1994. V. 11. P. 385–387.
4. Olney J. W. et al. Glutamate signaling and the fetal alcohol syndrome // Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev. 2001. 1 7. P. 267–275.
5. Adinoff B., Iranmanesh A., Veldhuis J., Fisher L. Disturbances of the stress response: the role of the HPA axis during alcohol withdrawal and abstinence // Alcohol Health Res World. 1998. V. 22. 1 1. P. 67–72.
6. Adinoff R., Ruether K., Krebaum S., Williams M. Increased salivary cortisol concentrations during chronic alcohol concentrations in a naturalistic clinical sample of men // Alcohol. Clin. Exp. Res. 2003. V. 27. P. 1420–1427.
7. Ермаков В. А. Алкоголизм и абстинентный синдром // Журнал неврологии и психиатрии. 2004. 0 5. N. 161–174.

8. Áíðèíèñèääíóííá è íáéðíððí ðè-áñèíá äáéñoáèä òèòí ò èááèíá ïðè ððííè-áñèèð òáðááðíááñèóèÿðí ùò çááíèáááíèÿð / Ç. Á. Nóñèèíá, Í. Í. Õáíáøÿí, È. Í. Ñíèðóííáà è äð. // Ááñòí. Ñíá. áíñ. íáä. àèää. 2002. ¹ 3. Ñ. 110–114.
9. Ïðèíáíáíèèä òèòí ò èááèíá ïðè ðíèñè-áñèíé è ïíðàèííèñè-áñèíéé ÿíòáäèííàðèè: Ïíñíáéá äèÿ äðà-áé / Á. Á. Èèááííá, Á. Á. Áàðíòóðáííá, Ñ. È. Áèóðèíá è äð. Ñíá., 2004. 44 ñ.

Жернова Е. В., младший научный сотрудник.

**Í È È ï ñ è ð è - á ñ è í á í ç ä í ð í á ù ÿ Ñ Í Ð À Ì Í .**

пос. Сосновый бор, г. Томск, Россия, 634014.

E-mail: redo@mail.tomsknet.ru

Вялова Н. М., кандидат биологических наук.

**Í È È ï ñ è ð è - á ñ è í á í ç ä í ð í á ù ÿ Ñ Í Ð À Ì Í .**

пос. Сосновый бор, г. Томск, Россия, 634014.

E-mail: Nartarakitina@yandex.ru

Бохан А. Н., доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора.

**Í È È ï ñ è ð è - á ñ è í á í ç ä í ð í á ù ÿ Ñ Í Ð À Ì Í .**

пос. Сосновый бор, г. Томск, Россия, 634014.

E-mail: redo@mail.tomsknet.ru

Иванова С. А., доктор медицинских наук, профессор, зав. лабораторией.

**Í È È ï ñ è ð è - á ñ è í á í ç ä í ð í á ù ÿ Ñ Í Ð À Ì Í .**

пос. Сосновый бор, г. Томск, Россия, 634014.

E-mail: Svetlana@mail.tomsknet.ru

Материал поступил в редакцию 22.01.2009

*E. V. Zhernova, N. M. Vyalova, N. A. Bokhan, S. A. Ivanova*

#### PARAMETERS OF PROGRAMMED DEATH OF LYMPHOCYTES AND NEUTROPHILS IN PERSONS WITH ALCOHOL INTOXICATION IN DYNAMIC OF THERAPY PREPARATION WITH ANTIOXIDANT PROPERTIES

Objective of this study was researching the apoptosis of lymphocytes and neutrophils in alcoholic patients in dynamic of the therapy with preparation cytophavin. Level of apoptosis in lymphocytes and neutrophils on receptor and cellular levels statistically significant increase in group of persons with alcohol intoxication, compared with healthy donors. Therapy with cytophavin resulted in positive dynamic expressing receptors CD5 on lymphocytes of persons with alcohol intoxication. Trend toward normalization of number of neutrophils and lymphocytes with morphological signs of apoptosis has been noticed. During application of cytophavin in patients with alcoholism decrease of concentration of cortisol in serum of blood was observed.

**Key words:** *apoptosis, alcoholism, cytophavin, neutrophils, lymphocytes.*

Zhernova E. V.

**RI of Mental Health SB RAMS.**

pos. Sosnovy Bor, Tomsk, Russia, 634014.

E-mail: redo@mail.tomsknet.ru

Vyalova N. M.

**RI of Mental Health SB RAMS.**

pos. Sosnovy Bor, Tomsk, Russia, 634014.

E-mail: Nartarakitina@yandex.ru

Bokhan N. A.

**RI of Mental Health SB RAMS.**

pos. Sosnovy Bor, Tomsk, Russia, 634014.

E-mail: redo@mail.tomsknet.ru

Ivanova S. A.

**RI of Mental Health SB RAMS.**

pos. Sosnovy Bor, Tomsk, Russia, 634014.

E-mail: redo@mail.tomsknet.ru