

АПОПТОЗ И ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ПРИ АЛКОГОЛИЗМЕ

С.А. Иванова
заместитель директора по научной работе
ФГБНУ «НИИ психического здоровья»,
руководитель лаборатории
молекулярной генетики и биохимии,
доктор медицинских наук, профессор

**«Для каждой клетки
есть время жить
и есть время умирать»**

Джон Кэмпбелл

Нобелевская премия

В 2002 году

присуждена

Нобелевская премия

по физиологии и медицине

за исследования генетической регуляции апоптоза

трем молекулярным биологам –

Сидней Бреннер,

Джон Салстон и

Роберт Хорвиц.



*Роберт
Хорвиц*



*Сидней
Бреннер*



Джон Салстон

Апоптоз – форма запрограммированной клеточной гибели

- Термин «апоптоз» взят из греческого языка (απορροήσμενα), этим словом называли «то, что должно быть отвергнуто в споре», или «листья, опадающие с деревьев осенью» (Хаитов Р. М., 2000).
- Годом признания апоптоза как физиологического явления, считается 1972 год, когда английские исследователи Kerr, Wyllie, Currie представили убедительные морфологические доказательства существования этого явления.

Апоптоз – физиологическая гибель клеток

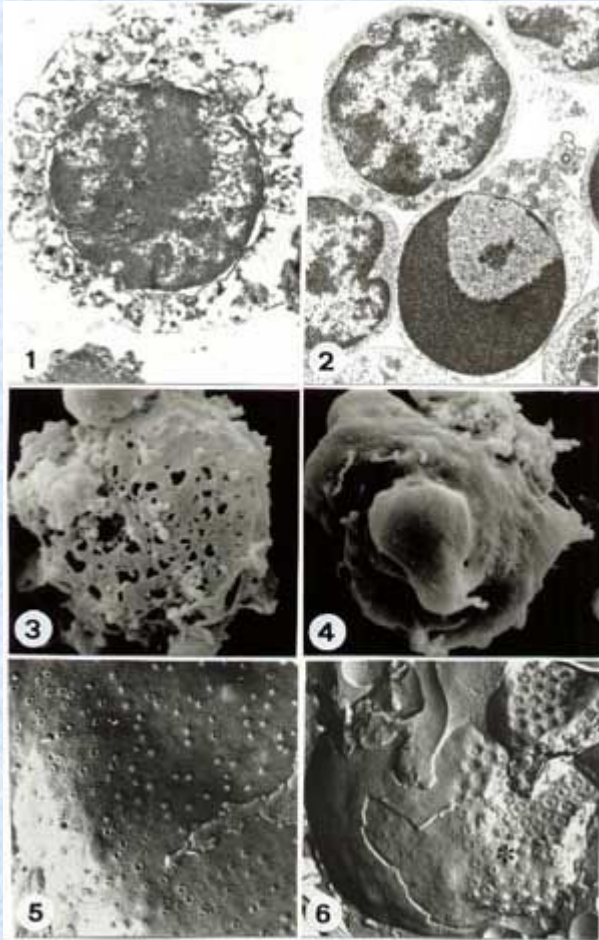
**В переводе с греческого означает «опадание»
(листьев с деревьев, лепестков с цветов).**

**Синонимами термина апоптоз являются
«активная гибель клетки»,
«программированная гибель клетки»**

- ☐ **Сморщивание клетки**
- ☐ **Уменьшение объема**
- ☐ **Межнуклеосомная деградация ДНК**
- ☐ **Апоптотические тельца**

Признаки апоптоза по сравнению с некрозом

Апоптоз	Некроз
Делеция отдельных клеток	Гибель групп клеток
Уменьшение размера клетки	Набухание клетки
Пикноз, конденсация и фрагментация хроматина	Кариолизис
Длительное сохранение целостности клеточной мембраны	Раннее нарушение целостности мембраны клеток
Лизосомы остаются интактными	Происходит утечка содержимого лизосом
Митохондрии, ЭПР, аппарат Гольджи остаются морфологически интактными	Набухание митохондрий, поступление в них Ca^{2+} , нарушение регуляции ионного гомеостаза, ЭПР и аппарат Гольджи набухают и диспергируются
Изменение экспрессии генов p53, c-fos, c-myc, c-jun, Fas, bcl-2, bcl-x и др.	Экспрессия генов не изменяется
Ингибиторы синтеза белка и РНК блокируют апоптоз	Ингибиторы синтеза белка и РНК не оказывают влияние на процесс некроза
Повышение активности эндонуклеаз, межнуклеосомное расщепление ДНК	Неупорядоченное, диффузное расщепление ДНК
Образование апоптотических тел	Фрагментация клеток с выходом их содержимого в окружающую среду
Фагоцитоз апоптотических тел близлежащими нормальными клетками	Фагоцитоз разрушенных клеток в основном профессиональными макрофагами
Отсутствие воспалительной реакции	Воспалительная реакция в окружающих тканях



АПОПТОЗ

- Ежедневно около 5 % клеток организма подвергается апоптозу, а их место занимают новые клетки
- В процессе апоптоза клетка исчезает бесследно в течение 15—20 мин.

Биологический смысл апоптоза:

- **Необходимый компонент жизнедеятельности организма, вносит вклад в реакцию клеток на неблагоприятные внешние воздействия.**

Это активный, генетически регулируемый процесс, участвующий в:

- **дифференцировке,**
- **морфогенезе,**
- **поддержании клеточного гомеостаза,**
- **защите от развития патологических процессов.**

Роль процесса апоптоза в норме и при патологии

Апоптоз в морфогенезе

Нематода *Caenorhabditis elegans* состоит из 1090 соматических клеток, из которых 131 отмирают путем апоптоза. Идентифицировано 14 генов, регулирующих отдельные этапы апоптоза.

Роль апоптоза во взрослом организме

Апоптоз необходим для физиологического функционирования тканей и органов во взрослом организме, в частности для возвращения органа в исходное состояние после его гиперплазии.

Роль апоптоза в функционировании иммунной системы

Апоптоз в селекции Т-клеток

Созревание Т-клеток происходит в тимусе, где тимоциты подвергаются селекции. В тимусе млекопитающих до 95% незрелых тимоцитов гибнут не покидая органа.

Позитивная селекция состоит в отборе клеток, имеющих фенотип TCR+CD4+CD8+.

Апоптоз в селекции В-клеток

Первичные этапы созревания и дифференцировки В-клеток происходит в месте их образования, костном мозге, где большая часть развивающихся В-лимфоцитов погибает апоптотически в результате селекции.

Иммунологическая привилегированность передней камеры глаза, яичка, мозга и других мест в организме, а также солидных опухолей, образуется благодаря способности клеток продуцировать FasL, который вызывает апоптотическую гибель лимфоцитов.

Роль апоптоза при патологии

При вирусной и бактериальной инфекциях в пораженных клетках включается механизм апоптоза.

В частности, при **СПИДе** гибель Т-клеток обусловлена белками вируса gp120 и Tat, активирующими систему Fas/FasL, что вызывает их апоптоз.

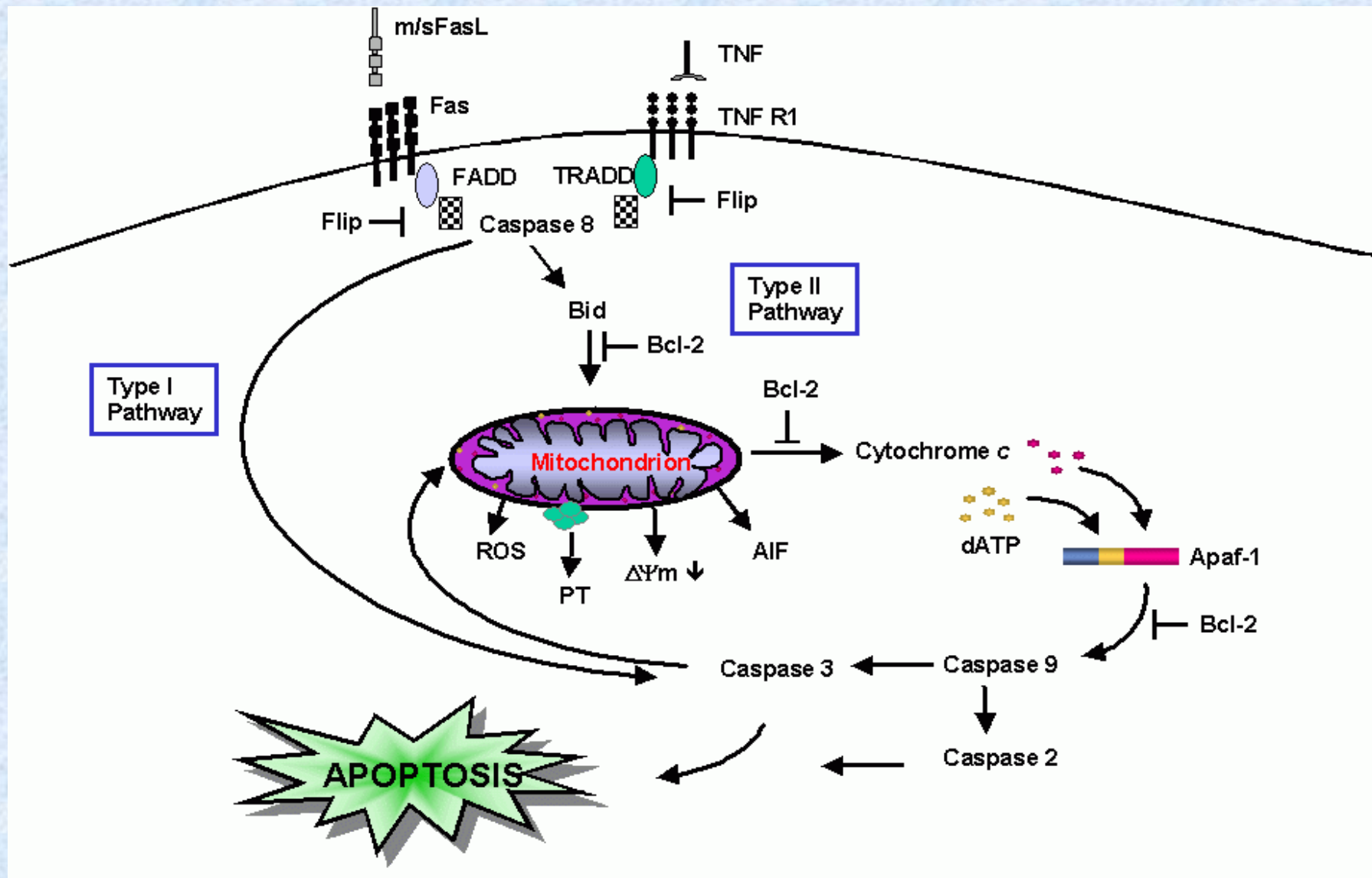
Апоптоз рассматривается ключевым патогенетическим феноменом при алкоголь-индуированном **гепатите, панкреатите и диабете**.

Нейродегенеративные болезни (болезнь **Альцгеймера и Паркинсона**), развиваются на основе избыточного прогрессирующего апоптоза клеток.

Сигналы апоптоза

Внутриклеточные сигналы	Повреждения хромосом Нарушения структуры ДНК Повреждения структуры мембран Окислительный стресс Активация Bcl-2 Факторы роста Прекращение цитокиновой регуляции Ионизирующие излучения УФ-излучение
Внеклеточные сигналы	Fas-лиганды TNF (ФНО) Глюкокортикоиды

Рецептор – опосредуемый апоптоз

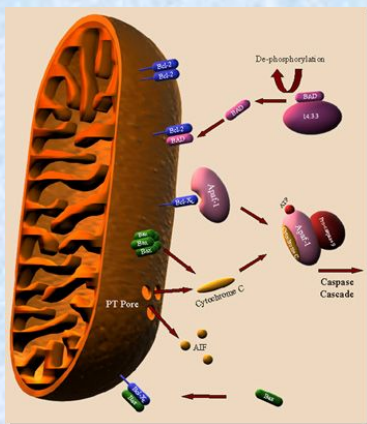


Теория апоптоза и старения Скулачева

Академиком Скулачевым В.П. выдвинуто предположение, о существовании некой генетической программы самоуничтожения, которая постепенно и разрушает организм.

Оригинальность идеи Скулачева в том, что в противовес мнению многих геронтологов о старении как о многофакторном процессе накапливающихся повреждений, он предлагает проверить гипотезу существования единой причины.

Согласно теории Скулачева, клетка, совершив свой жизненный цикл, подвергшись действию неблагоприятных факторов (ионизирующее излучение, заражение вирусами и т.д.), трансформации в раковую клетку и др. должна сама себя уничтожить, совершить "самоубийство" - вступить на путь апоптоза.



Самоубийство
происходит не только
на **клеточном уровне – апоптоз**,
но самое главное,
на **организменном – феноптоз**.

Индукция апоптоза при психических расстройствах

- **Высокий риск и распространенность вирусных, онкологических заболеваний и заболеваний связанных с нарушениями в иммунной системе при психических расстройствах.**
- **Гипотеза биологической аутоагрессии при депрессии (S.Mendlovic et al., 1999, E.Eilat, 2003).**
- **Neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia.**

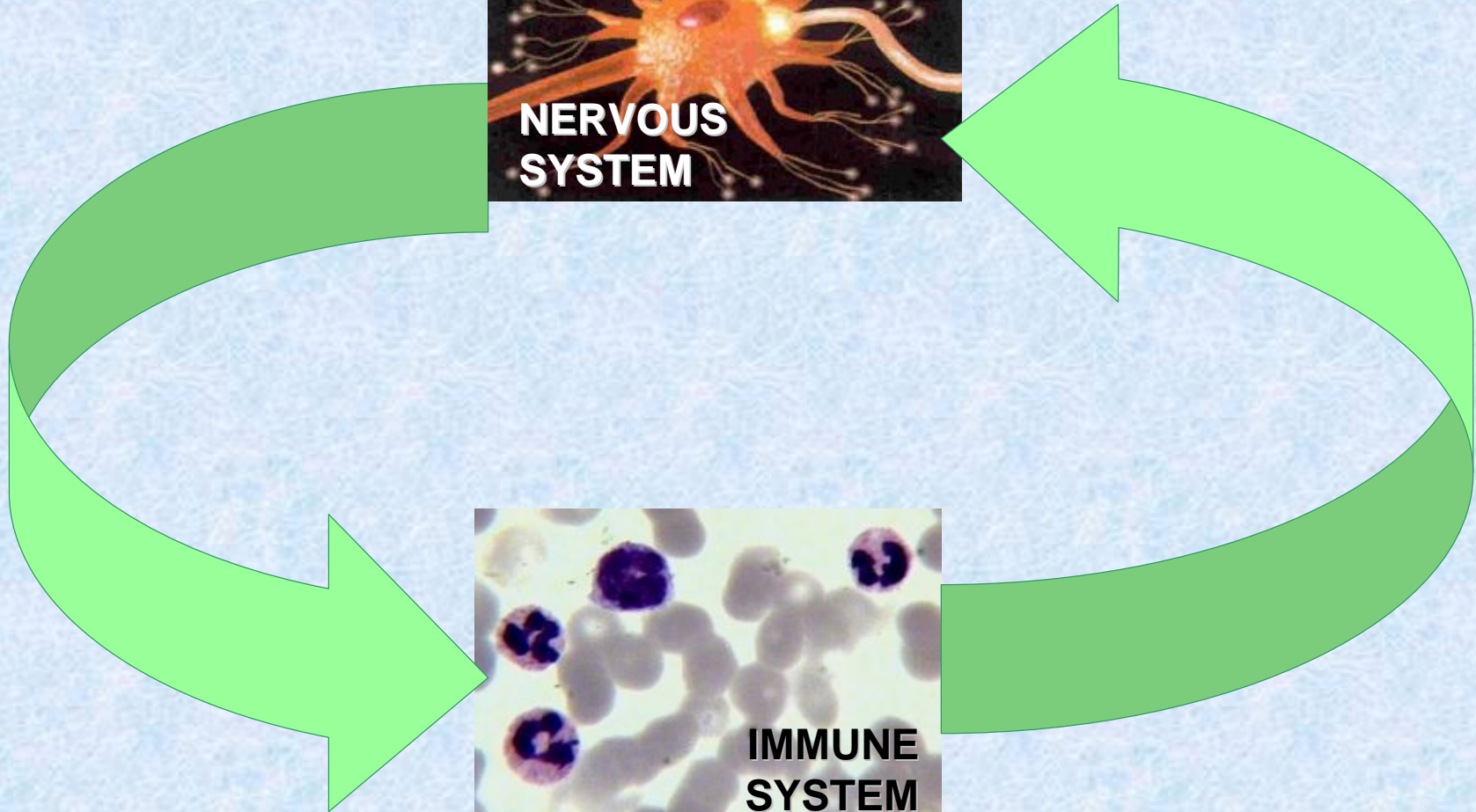
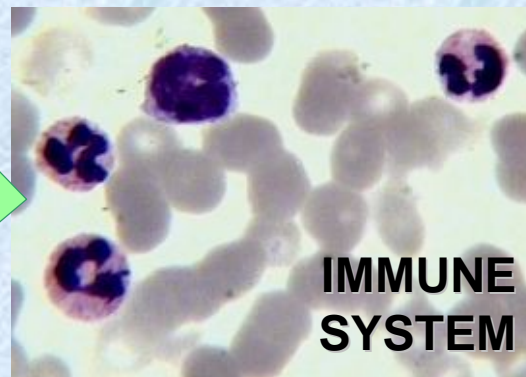
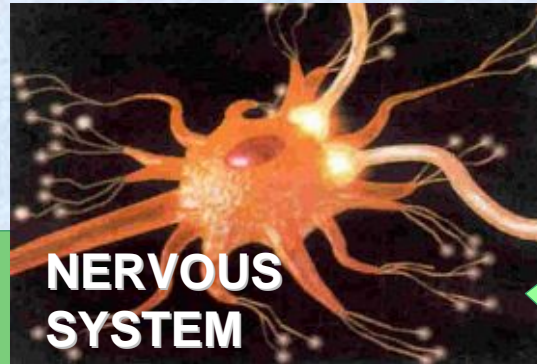
Актуальность исследования апоптоза при алкоголизме

В патологический процесс формирования алкогольной зависимости вовлечены различные механизмы, связанные с нарушением функционирования в основных гомеостатических системах организма [Панченко Л.Ф. с соавт., 2008; Fernandez-Sola J., 2007].

На сегодняшний день представлено множество работ, доказывающих роль апоптоза, запрограммированной клеточной гибели, в патогенезе алкоголь-индуцированного поражения органов [Brooks P.J., 2000; Spirodopolous I. et al., 2001; Reed D.J., 2004; Rodriguez D.A., 2004; Haorah J. et.al., 2008; Szuster-Ciesielska A. et.al., 2008; Sheth D. S. et.al., 2009; Yan D. et.al., 2010].

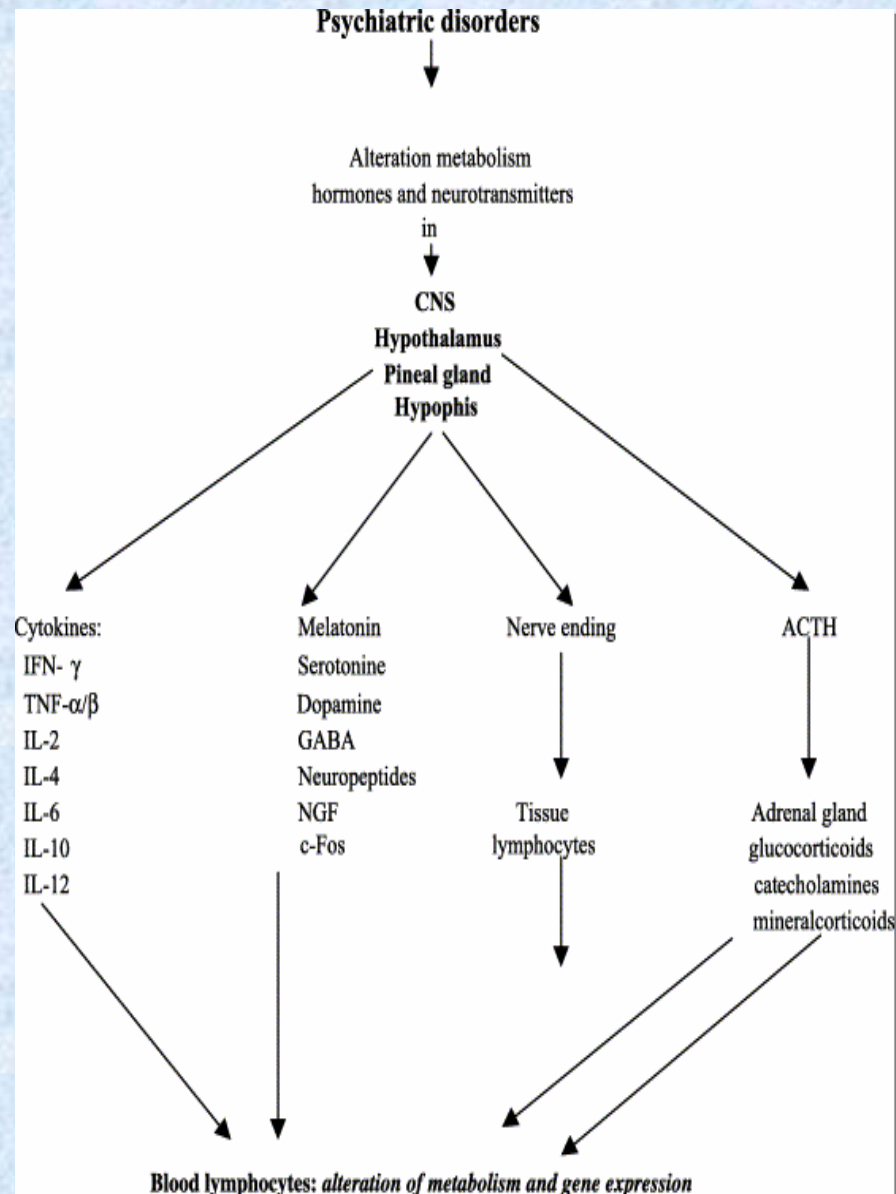
В тоже время нерешенными остаются многие вопросы, касающиеся биологических основ влияния этанола на лимфоциты периферической крови.

Другой актуальной проблемой остается несовершенство лекарственной терапии аддиктивных расстройств, что делает необходимым изыскание и разработку новых, более эффективных фармакологических средств профилактики и лечения аддикций. В последние годы показана перспективность использования препаратов, обладающих разносторонними спектрами действия, в том числе и возможность влияния на апоптоз.



«Lymphocytes as a neural probe: potential for studying psychiatric disorders»

Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry 28 (2004) 559– 579



Neurotransmitters and corresponding receptors expressed on neuronal cells and lymphocytes		
Neuronal process	CNS, neurons (n), microglia (m)	Lymphocyte (type)
BDNF	n	T-cells, B-cells
NGF	n, m	T-cells, B-cells
NGF-receptors		
P75	n, m	T-cells, B-cells
TrkA	n, m	T-cells
Dopamine receptors		
D1 subclass		
D1	n	—
D5	n	T-cells, B-cells, NK-cells
D2 subclass		
D2	n	T-cells, B-cells, NK-cells
D3	n	T-cells, B-cells, NK-cells
D4	n	T-cells, B-cells, NK-cells
Dopamine transporter	n	T-cells, B-cells, NK-cells
Cannabinoid receptors		
CB1	n	T-cells, B-cells, NK-cells
CB2	n	T-cells, B-cells, NK-cells
β-2AR	n	T-cells, B-cells, NK-cells
MR	n	T-cells, B-cells, NK-cells
GR	n	T-cells, B-cells, NK-cells
Muscarinic ACh	n	T-cells, B-cells
Nicotinic ACh	n	T-cells, B-cells
GABA A receptor	n	T-cells
SP receptor	n	T-cells
5-HT1A receptor	n	T-cells
5-HT5A receptor	n	T-cells
5-HT2 receptor	n	T-cells
Serotonin transporter	n	T-cells

Основные направления изучения апоптоза в НИИ психического здоровья:

- **Изучение влияния этанола *in vitro* на иммунокомпетентные клетки периферической крови человека и клетки нейробластомы C-1300 и *in vivo* на клетки периферической крови пациентов.**
- **Исследования на клетках нейробластомы проводятся в кооперации с НИИ молекулярной биологии и биофизики.**

Методические подходы к исследованию апоптоза

Рецепторный уровень

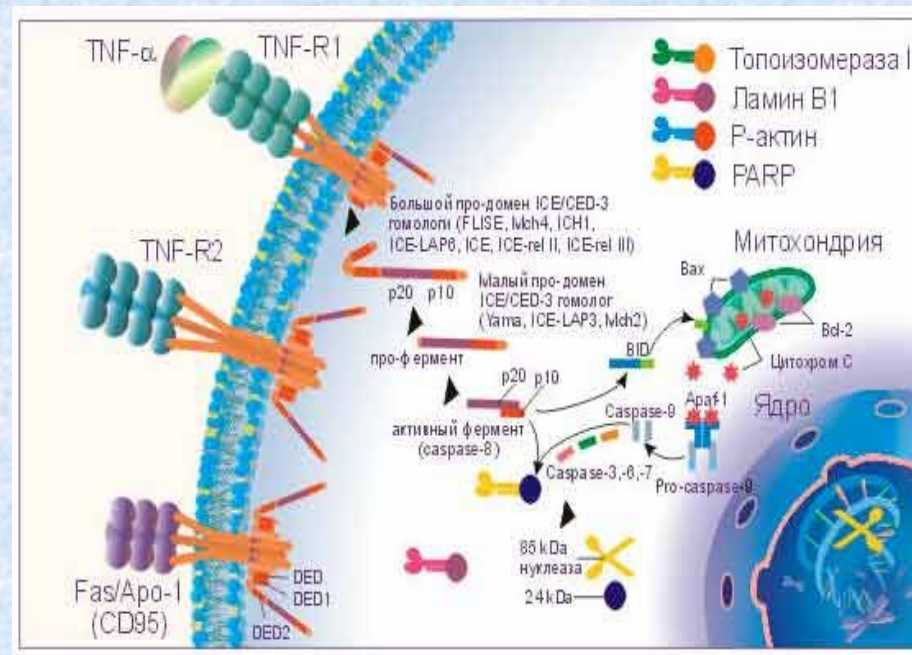
(содержание клеток, экспрессирующих FAS-рецептор).

Клеточный уровень

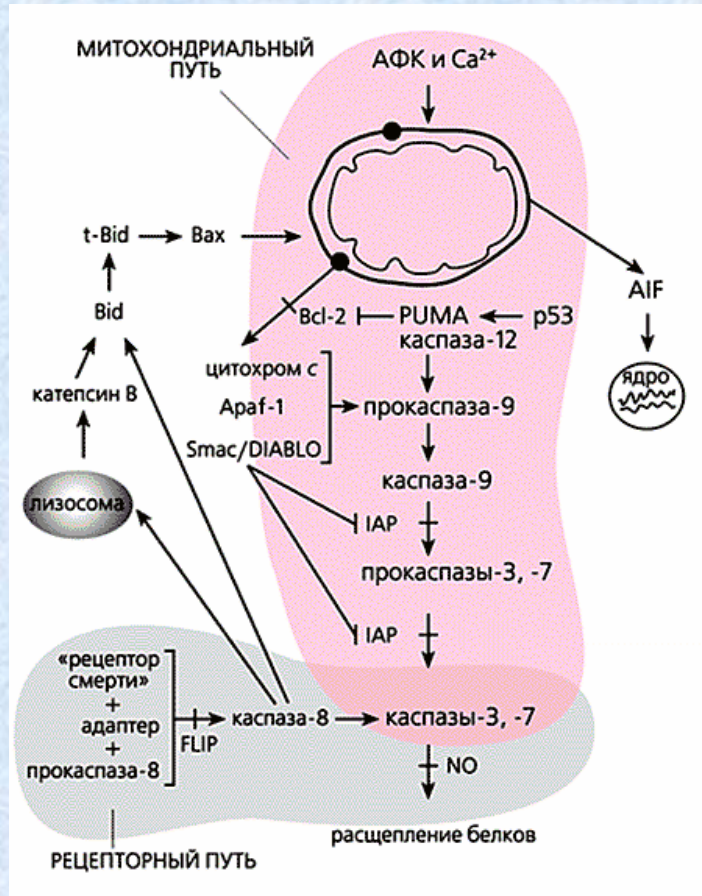
(цитологический анализ морфологических признаков апоптоза нейтрофилов и лимфоцитов периферической крови).

Молекулярно-биологический уровень

(оценка апоптоза с использованием ядерного красителя Nehst 33342; молекулярно-генетическая регуляция апоптоза, определение уровня каспазы-3 и Bcl-2 в суспензии лимфоцитов, клеток нейробластомы, оценка экспрессии белков-регуляторов, роль киназ).



Изучение регуляции апоптоза *in vivo* и *in vitro*



- Изучение индуцированного апоптоза и резистентности клеток к гибели; оценка влияния физиологических факторов, этанола и фармакологических препаратов на апоптоз *in vitro*
- Изучение окислительного стресса, как индуктора апоптоза.
- Гормональная регуляция апоптоза.

Материалы исследования

Обследовано 149 пациентов с алкогольной зависимостью (F10.232), проходивших курс лечения в отделении аддиктивных расстройств НИИ психического здоровья, средний возраст $41,63 \pm 1,55$ года.

Длительность заболевания у наблюдаемых пациентов составила от 5 до 25 лет. У обследуемых полностью сформировалось первичное патологическое влечение к алкоголю, утрата количественного контроля, максимальная толерантность к алкоголю, развернутый абстинентный синдром с соматовегетативными, неврологическими, психопатологическими нарушениями. Степень тяжести была квалифицирована как средняя.

Психологическое обследование проводилось исследование когнитивных функций и личностных характеристик больных с помощью экспериментально-психологических тестов:

- миннесотский многофазный личностный тест (MMPI);
- тесты на непосредственное и опосредованное воспроизведение с заучиванием серии слов по методике А.Р.Лурия (1962);
- методы статистической обработки материала.

Лабораторные методы:

В качестве экспериментального материала использованы лимфоциты и сыворотка периферической крови больных алкоголизмом и психически и соматически здоровых лиц, а также клетки нейробластомы, клеточной линии С–1300.

Выделение лимфоцитов на градиенте плотности Ficoll-Paque 1,077 («Pharmacia», Швеция);

Определение лимфоцитов с маркером апоптоза CD95 осуществлялось непрямым иммунофлуоресцентным методом с использованием моноклональных антител;

Оценка морфологических признаков апоптоза лимфоцитов осуществлялась методом световой микроскопии в мазках крови;

Для определения процентной доли клеток, подвергшихся апоптозу, использован метод проточной цитофлуориметрии с применением набора Annexin V – FITC Kit (Beckman Coulter, France);

Уровень белков апоптоза Bcl-2 и caspase-3 определяли в лизате лимфоцитов методом иммуноферментного анализа;

Определение концентрации гормонов (ДГЭАС и кортизола) в сыворотке крови проводили методом иммуноферментного анализа.

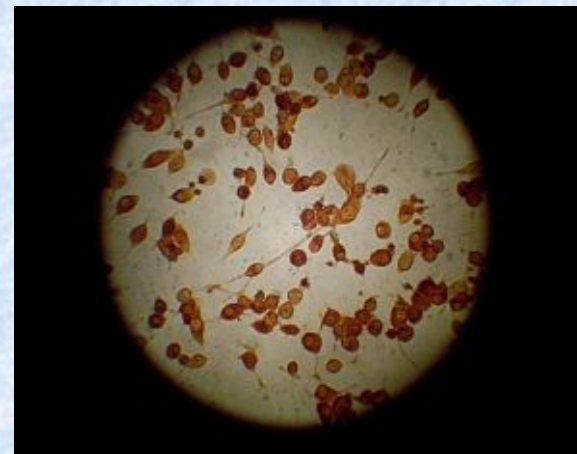


Культивирование лимфоцитов периферической крови in vitro

Культивирование лимфоцитов проводили в CO₂-инкубаторе при температуре 37°C, абсолютной влажности и 5 % содержании CO₂ в полной культуральной среде, состоящей из RPMI-1640 с L-глутамином, 25 мМ HEPES («Invitrogen», США), 10 % инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки («Биолот», Санкт-Петербург). Для выяснения эффекта тестируемых препаратов лимфоциты периферической крови здоровых доноров инкубировали с препаратом в концентрации 0,1 мкг/мл, 1 мкг/мл, 10 мкг/мл в течение 18 часов, а затем действовали индукторами окислительного стресса (140 мкМ ГПТБ в течение 4 часов) и 0,5% этанолом.

Культивирование клеток нейробластомы in vitro

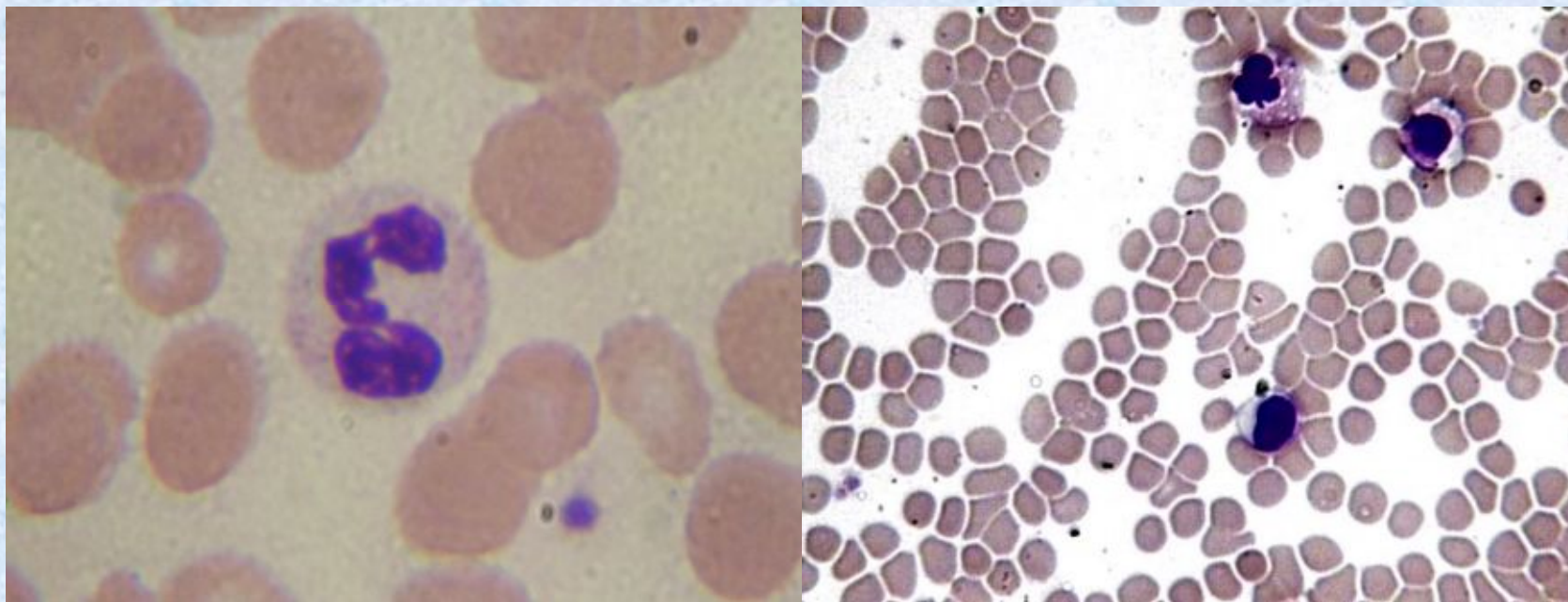
Клетки нейробластомы C-1300 культивировали при 37°C в CO₂-инкубаторе при 5% CO₂ и 95% воздуха, 80% влажности в среде DMEM с добавлением 5% ЭТС, 50 ед/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина. Для выявления эффекта препаратов на клетки нейробластомы инкубировали с препаратом в концентрации 0,1 мкг/мл в течение 16 часов, а затем действовали индукторами окислительного стресса (140 мкМ ГПТБ в течение 4 часов) и 0,5% этанолом.



Культура клеток
нейробластомы

Статистическую обработку результатов производили с помощью программ STATISTICA, версия 8.0 для Windows и SPSS, версия 11.0.

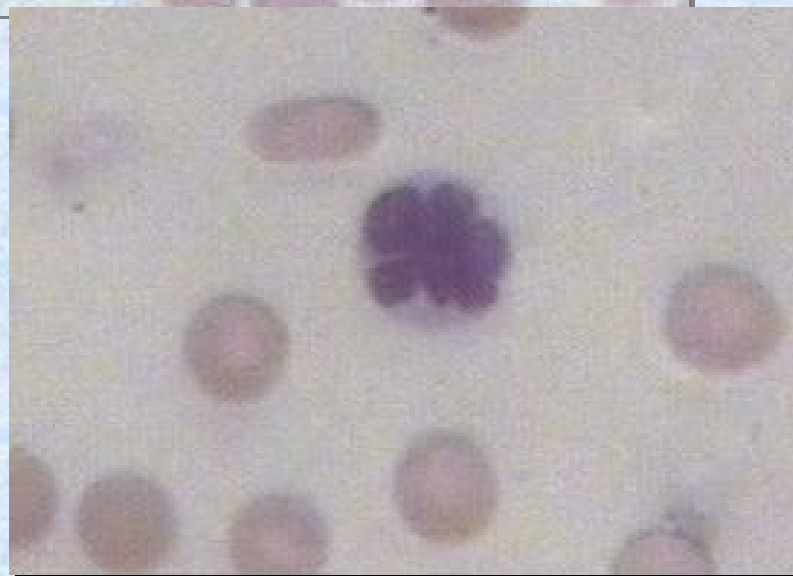
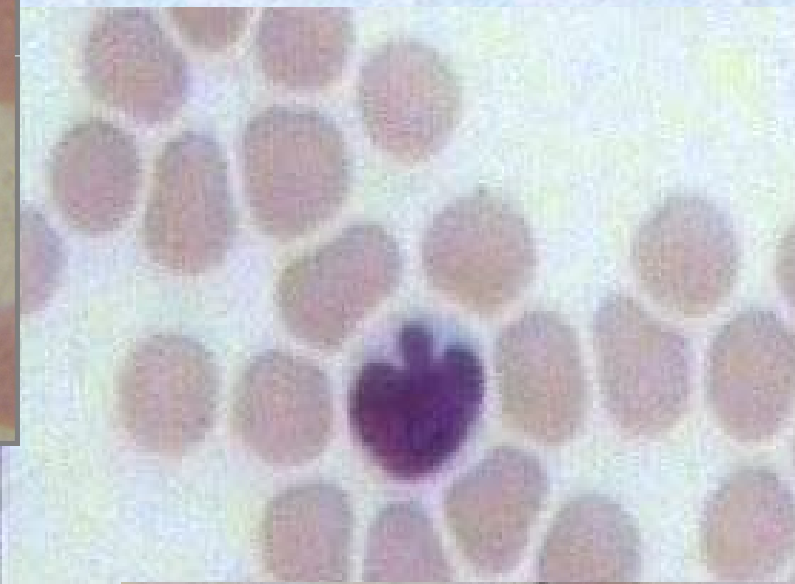
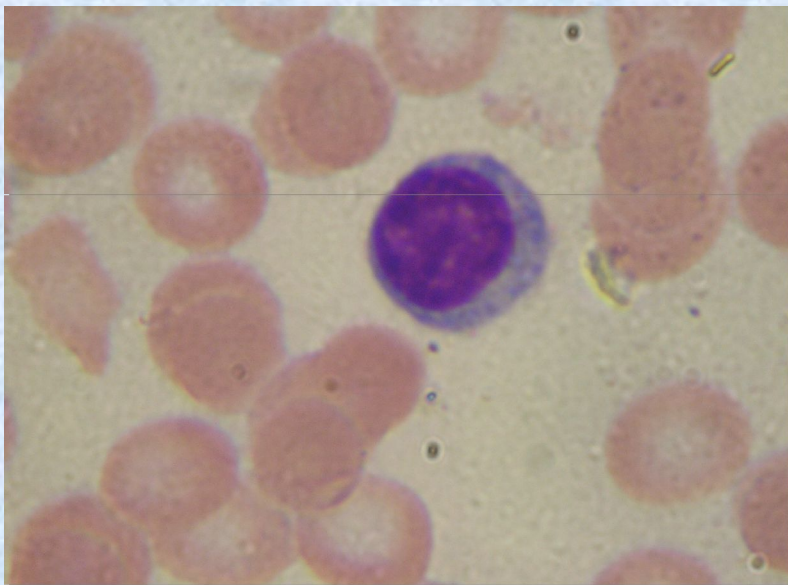
Нейтрофилы с морфологическими признаками апоптоза



а
нормальный
сегментоядерный
нейтрофил

б
апоптотный
нейтрофил

Уровень спонтанного апоптоза нейтрофилов в мазках, приготовленных сразу после взятия крови, у больных алкоголизмом достоверно отличался от значений, наблюдаемых у здоровых лиц $0,92 \pm 0,12\%$ и $0,38 \pm 0,11\%$ соответственно, $p < 0,05$.

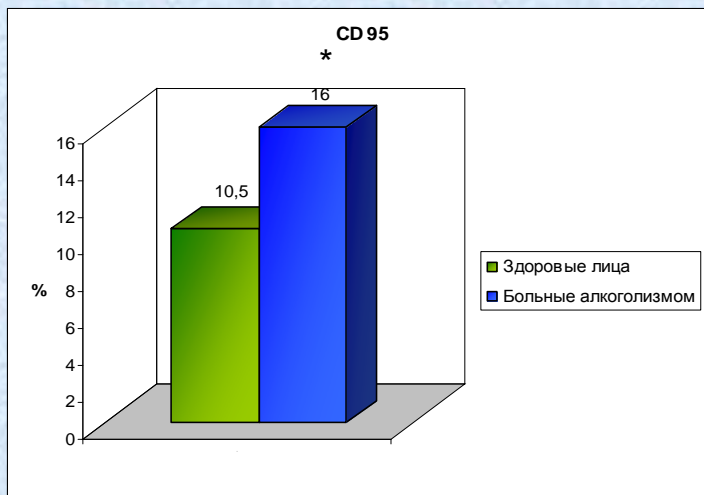


Цитологический анализ мазков крови показал, что у больных алкоголизмом уровень спонтанного апоптоза лимфоцитов составляет $5,1 \pm 0,6\%$, (у здоровых лиц $0,9 \pm 0,2\%$, $p < 0,001$).

Индекс реализации апоптоза лимфоцитов, т.е. доля клеток с морфологическими признаками апоптоза в процентах от общего числа клеток, экспрессирующих рецепторы готовности к апоптозу у больных алкоголизмом достоверно выше нормы ($14,4 \pm 2,4\%$, в контроле - $7,7 \pm 1,6\%$, $p > 0,05$).

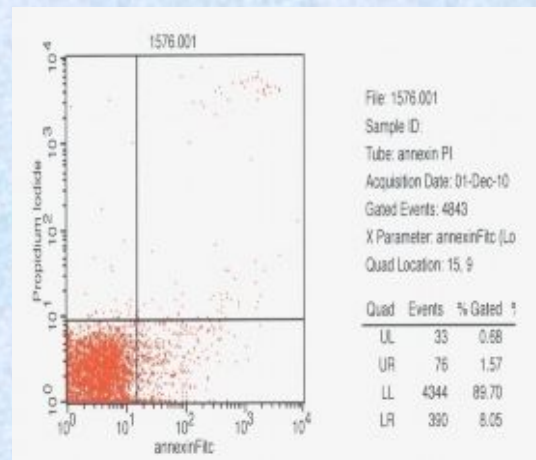
Экспрессия рецептора CD95

Анализ апоптотической гибели лимфоцитов периферической крови больных алкоголизмом

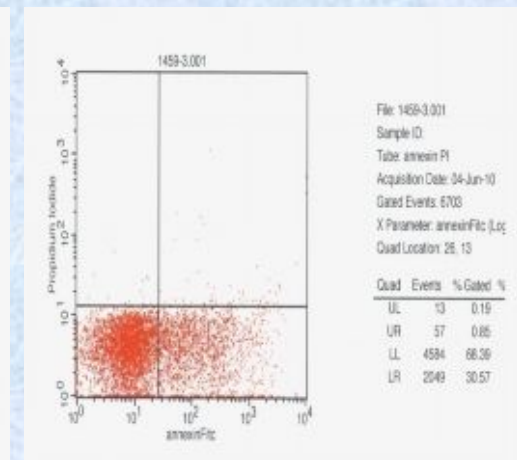


* - $p < 0,05$ уровень значимости достоверных различий по сравнению с контрольной группой.

Доля Annexin V⁺- клеток



Здоровый мужчина



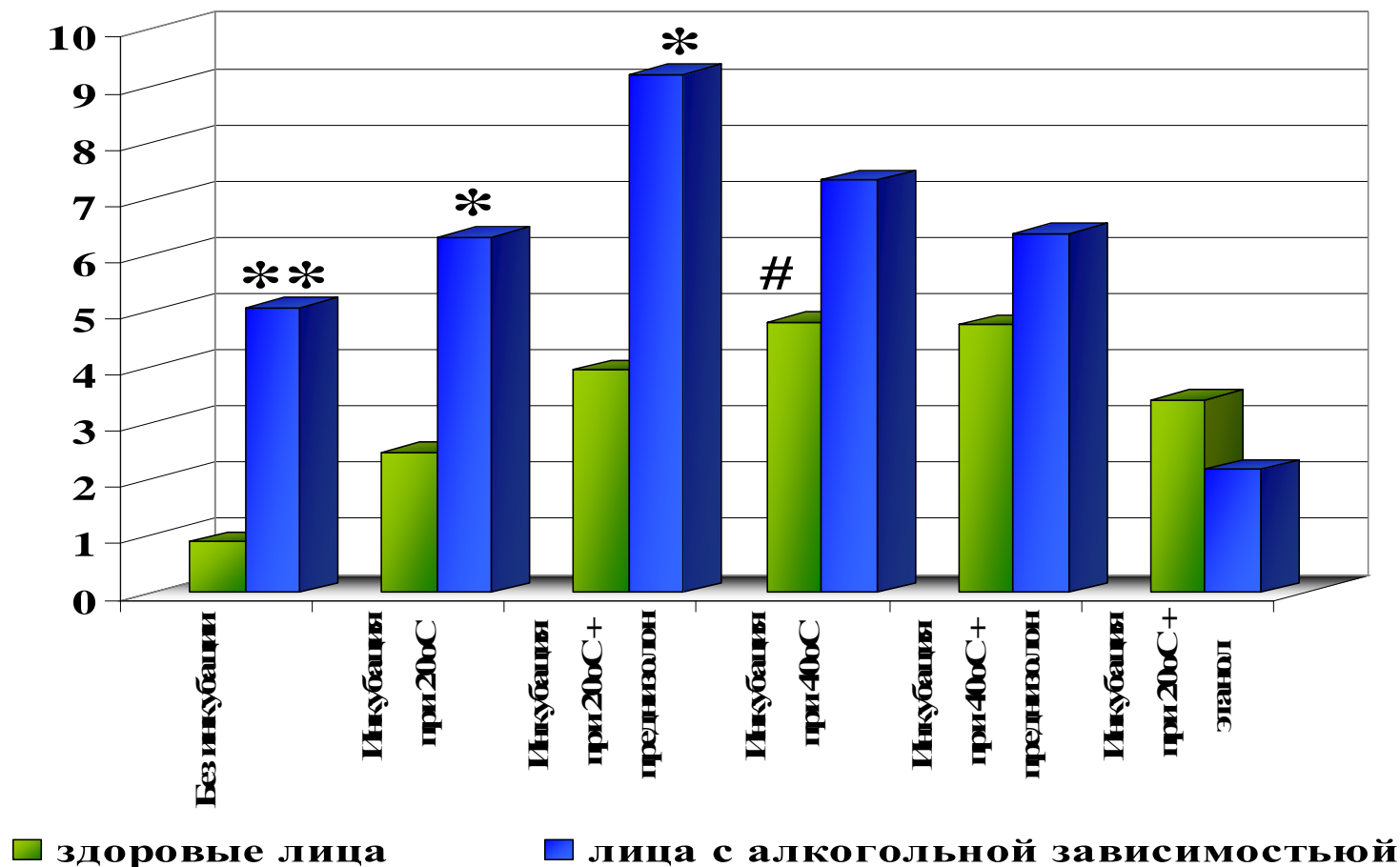
Больной алкоголизмом

В контрольной группе процент аннексин V⁺-моноклеаров составил 15,93 (15,10-17,49) %.

У больных алкоголизмом выявлено достоверное увеличение доли Annexin V⁺- клеток по сравнению со здоровыми донорами (21,56 (18,02-26,21)%, $p < 0,05$).

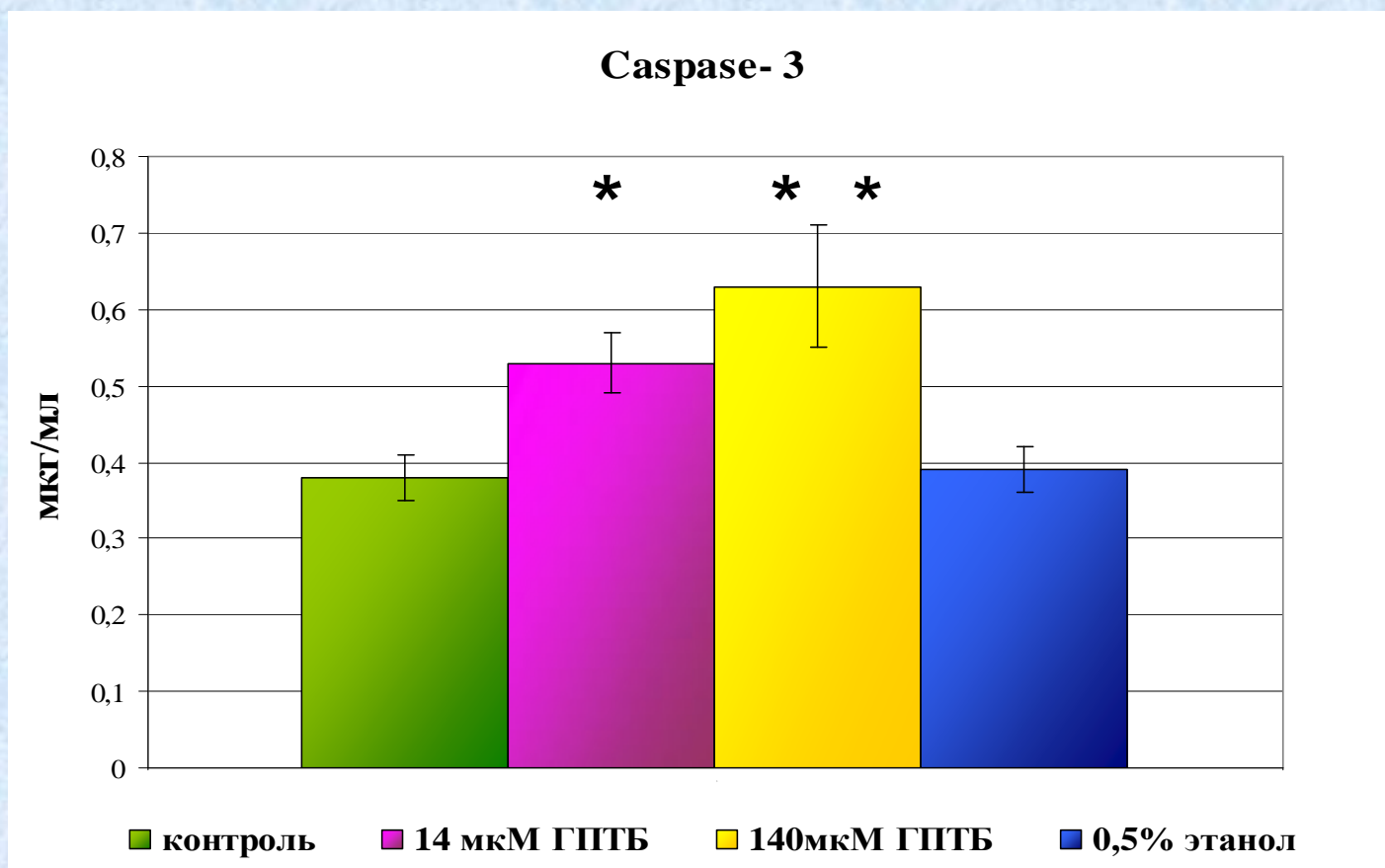
Действие гипертермии, преднизолона и этанола на апоптоз лимфоцитов больных алкоголизмом и здоровых лиц *in vitro*

Доля лимфоцитов с фрагментированным ядром, %

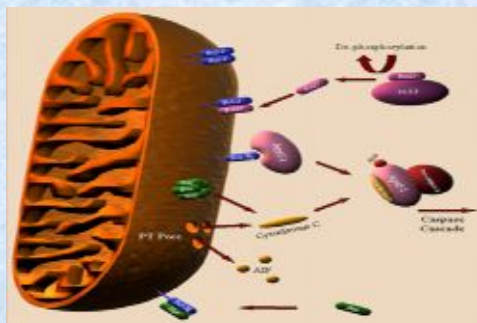


Примечание: * - $p < 0,05$ по сравнению со здоровыми донорами,
** - $p < 0,001$ по сравнению со здоровыми лицами;
- $p < 0,05$ по сравнению с инкубацией в тех же условиях при 20°C.

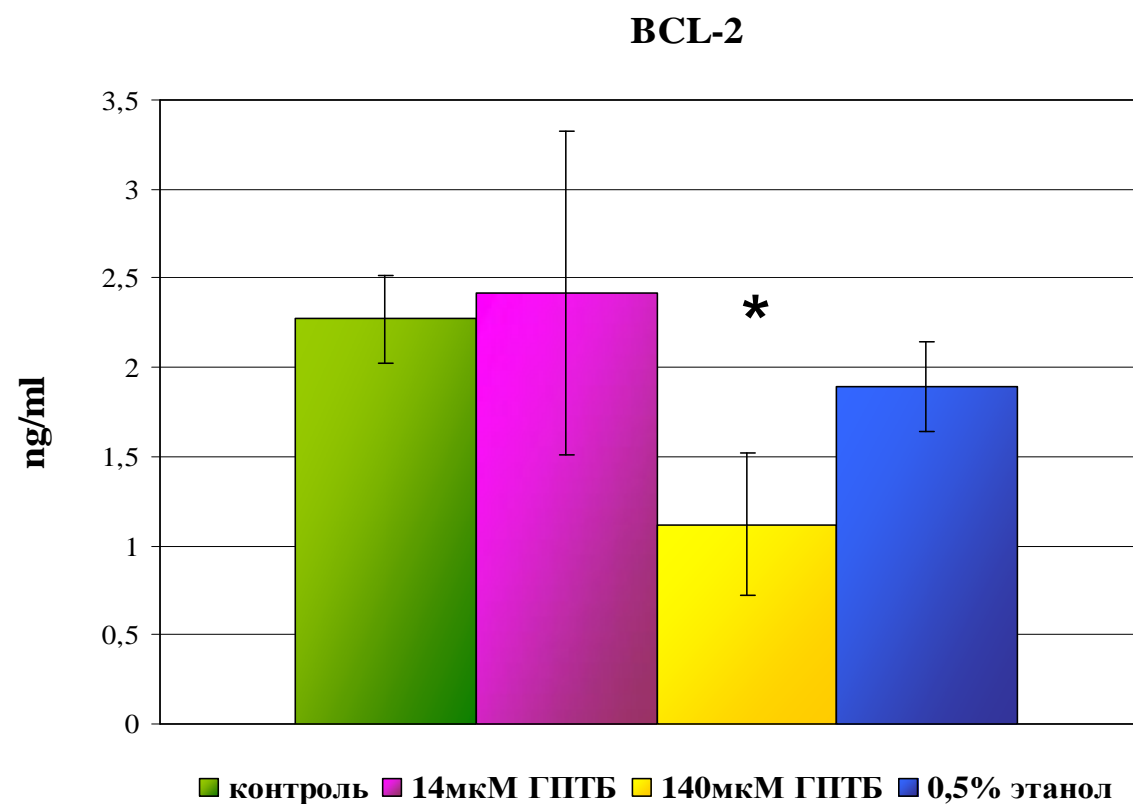
Концентрация проапоптотического белка caspase-3 в лимфоцитах при инкубации с ГПТБ и 0,5% этанолом



Примечание: * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем;
**- $p < 0,001$ по сравнению с контролем.



Уровень антиапоптотического белка Bcl-2 в лимфоцитах при инкубации с ГПТБ и 0,5% этанолом



Примечание: *- $p < 0,05$ по сравнению с контролем

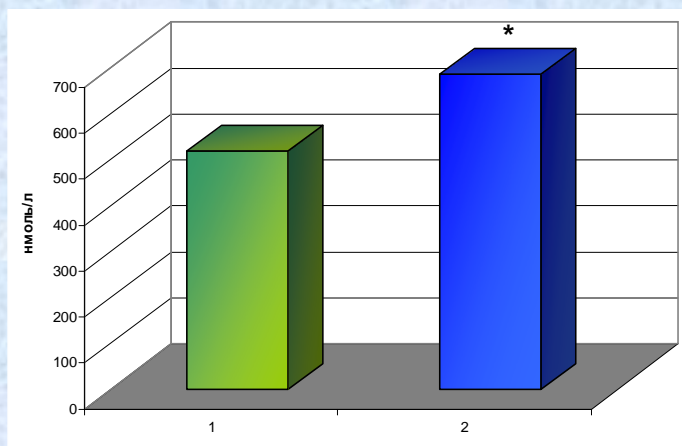
Кортизол – известный индуктор апоптоза.

Дегидроэпиандростерон (ДГЭА) является ключевым звеном в биосинтезе всех стероидных гормонов и обладает собственными эффектами.

Этот нейростероид оказывает нейропротективное, стресспротективное, антиапоптическое действие, защищая организм от пагубного воздействия высоких доз кортизола. Нейростероиды обладают многими эффектами в ЦНС и могут быть вовлечены в патофизиологические процессы как психических расстройств так и болезней зависимостей.

Характеристика гормональных показателей у больных алкоголизмом

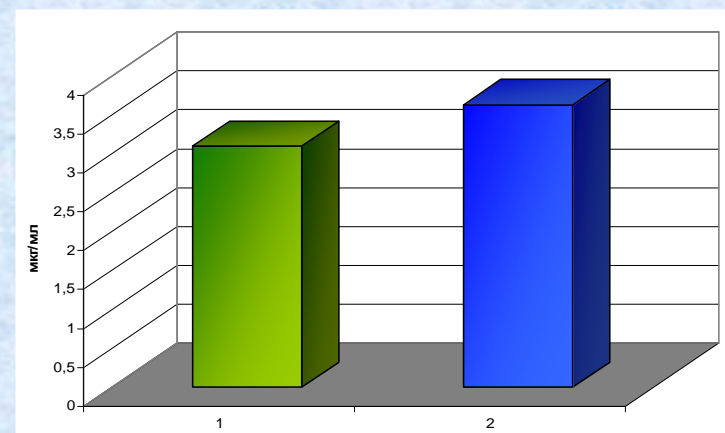
Концентрация кортизола у здоровых доноров и больных алкоголизмом



1 –
здоровые
доноры,

2 –
больные
алкоголизмом.

Концентрация дегидроэпиандростерона сульфата у здоровых доноров и больных алкоголизмом



Примечание. * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Корреляционная матрица биологических показателей лиц больных алкоголизмом

	Кортизол	ДГЭАС	CD95
Кортизол	1,00	0,10	0,74*
ДГЭАС	0,10	1,00	0,48
CD95	0,74*	0,48	1,00

Примечание. * - достоверность уровня различия $p < 0,05$ при значениях коэффициента корреляции $r = 0,5-1,0$

Математическая модель прогноза развития ремиссии у больных алкоголизмом после проведенной терапии

Биологические показатели больных с аддитивными расстройствами в группе с положительной ремиссией и повторным рецидивом

Показатели	Медиана (Q _L -Q _U)		Р
	Больные алкоголизмом		
	Пациенты с положительной ремиссией n = 11	Пациенты с повторным рецидивом n = 40	
CD 95 (%)	15,00 (12,00-20,00)	15,00 (11,00-21,00)	0,95
Апоптотические лимфоциты	4,17 (3,12-5,22)	5,7 (3,85-7,41)	0,59
Индекс реализации апоптоза (%)	29,82 (18,63-34,03)	34,96 (27,83-45,76)	0,75
<i>Кортизол (нмоль/мл)</i>	<i>684,02 (524,29-827,64)</i>	<i>754,10 (513,22-914,11)</i>	<i>0,04</i>
<i>ДГЭАС (мкг/мл)</i>	<i>4,03 (2,07-5,65)</i>	<i>3,02 (2,13-4,07)</i>	<i>0,05</i>
ДГЭАС/кортизол	1,32 (0,85-2,20)	1,17 (0,91-1,62)	0,24

Р - достоверность различий между группой пациентов с положительной ремиссией и группой пациентов с повторным рецидивом.

Обучающую выборку составили 51 чел., из них 40 пациентов – с положительной ремиссией, 11 пациентов – с повторным рецидивом.

Пациенты были распределены на 2 группы в соответствии с катamnестическими данными.

Уравнение модели:

$$P_k = \frac{e^{f_k}}{1 + e^{f_k}}$$

Исследуемые показатели сыворотки крови	
Кортизол (нмоль/л) после лечения	0.117
ДГЭАС (мкг/мл) после лечения	-0.230

Весовые коэффициенты умножаются на значения показателей уровня кортизола и ДГЭАС в сыворотке крови. Если в результате расчета вероятность $p \geq 0,05$ - пациент относится к классу стойкой ремиссии после проведенного лечения. Если же $p < 0,05$, то пациент относится к классу возможного рецидива.

Основные направления изучения апоптоза:

II. Оценка показателей апоптоза у больных алкоголизмом в динамике различных схем терапии абстинентного и постабстинентного синдромов с включением нейрометаболической коррекции:

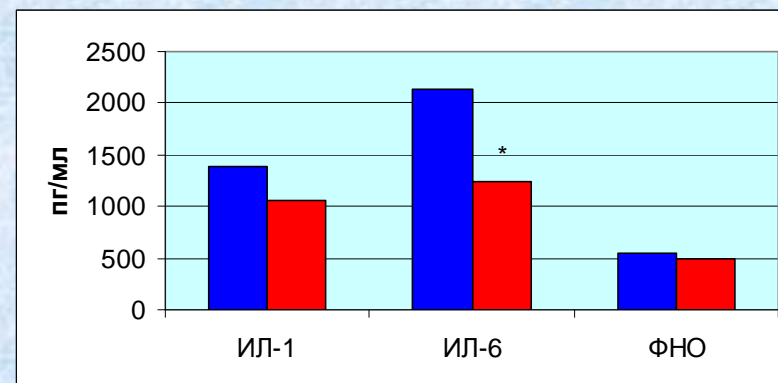
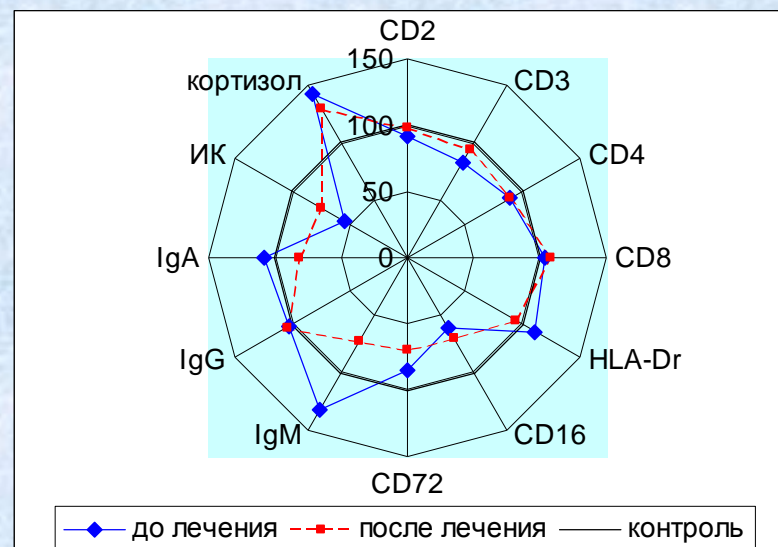
- Микроволновая резонансная терапия (МРТ) в сочетании с фармакотерапией,**
- Включение препаратов с антиоксидантными (цитофлавин, ремаксол, реамберин) свойствами**
- Включение препаратов с нейропротекторными свойствами (кортексин).**

МИКРОВОЛНОВАЯ РЕЗОНАНСНАЯ ТЕРАПИЯ (МРТ)

Бохан Н. А.,
Семке В. Я.,
Кожемякин А. М.

«Способ купирования
осложненного алкогольного
абстинентного синдрома»

Патент № 2067442 от 10.10.96 г.



**МРТ-терапия оказывает
иммуномодулирующее и стресспротективное
действие (снижение концентрации кортизола
в сыворотке крови больных), сопровождается
снижением индекса реализации апоптоза и
положительной динамикой интегральной
антиоксидантной активности.**

Метаболический цитопротектор кортексин в комплексной терапии больных алкоголизмом



Кортексин

содержит комплекс полипептидов и относится к новому классу препаратов - природных биорегуляторов, способных восстанавливать функциональные нарушения и препятствовать развитию патологических процессов в тканях и органах.

Механизм действия КОРТЕКСИНА®
связан с его метаболической активностью:
препарат регулирует соотношение тормозных
и возбуждающих аминокислот, уровень серотонина и дофамина,
оказывает ГАМКергическое влияние,
обладает антиоксидантной активностью и
способностью восстанавливать
биоэлектрическую активность головного мозга,
имеет выраженное иммуномодулирующее действие.

Эмоциональное состояние и когнитивные функции больных алкоголизмом в динамике терапии

Личностный профиль ММРІ больных алкоголизмом до и после завершения курса терапии кортексином

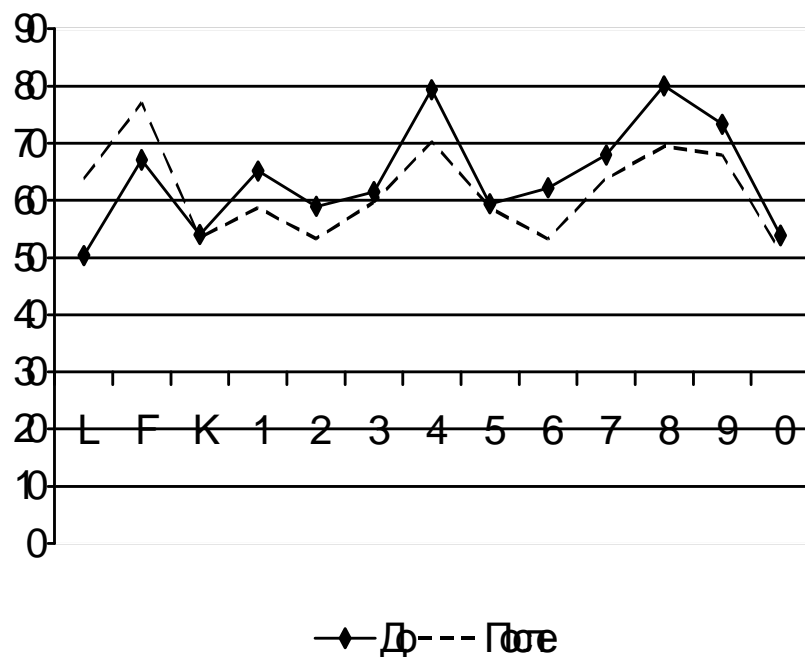
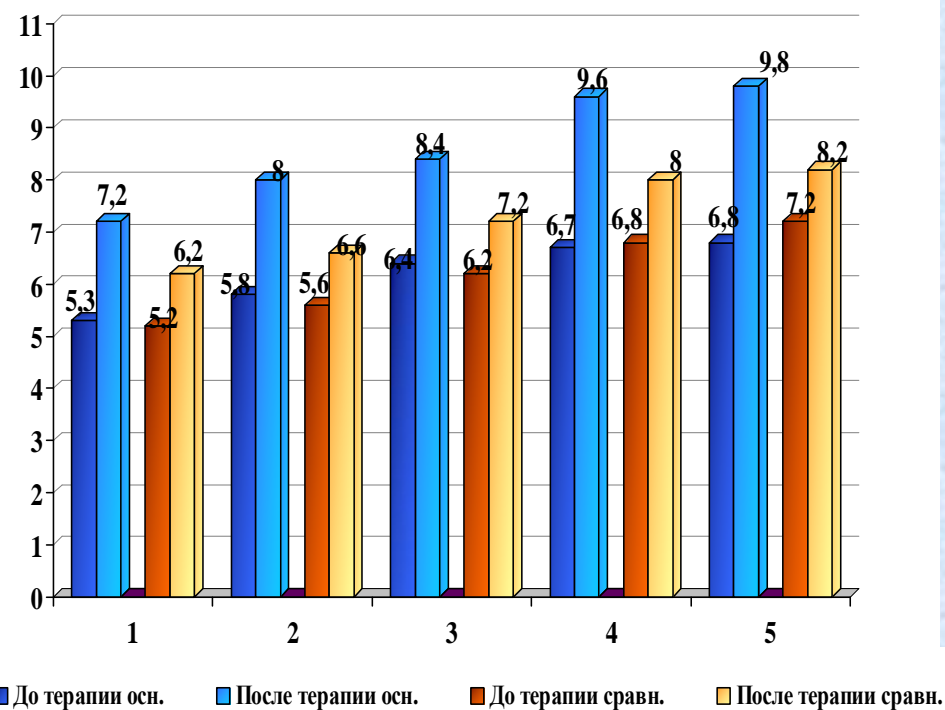


Диаграмма запоминания у больных основной группы и группы сравнения до и после завершения курса терапии



Эффект кортексина на клетки нейробластомы C-1300

**Влияние кортексина на уровень Bcl-2
в нервных клетках нейробластомы (нг/мл), Me (Q_L - Q_U)**

Условия инкубации	Интактные клетки	Интактные клетки + 140 мкМ ГПТБ	Интактные клетки + 0,5 % этанол
Инкубация без кортексина	20,20 (17,77—23,50)	14,58 (13,10—16,20)*	15,55 (11,73—17,61)*
Инкубация с кортексином (0,1 мкг/мл)	17,56 (14,40—21,64)	18,24 (15,49—22,17)#	19,56 (18,44—21,05)#

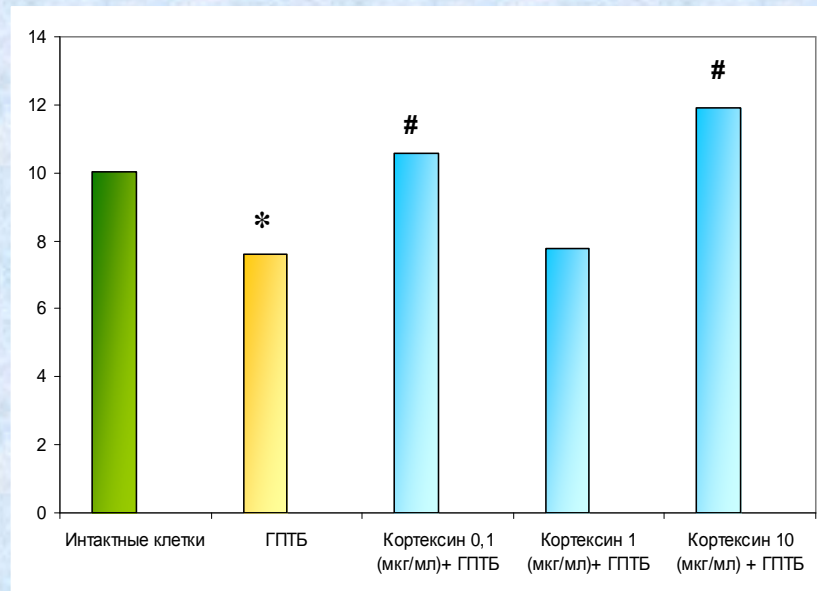
**Влияние кортексина на уровень caspase-3
в клетках нейробластомы, (мкг/мл), Me (Q_L - Q_U)**

Условия инкубации	Интактные клетки	Интактные клетки + 140 мкМ ГПТБ	Интактные клетки + 0,5 % этанол
Инкубация без кортексина	2,61 (2,43—3,47)	3,95 (3,53—4,02) *	2,40 (1,82—3,92)
Инкубация с кортексином (0,1 мкг/мл)	1,1 (0,75—1,92)*	2,21 (1,85—2,65)	2,24 (1,56—3,02)

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с интактными клетками (контроль); # – $p < 0,05$ по сравнению с инкубацией в тех же условиях без протектора.

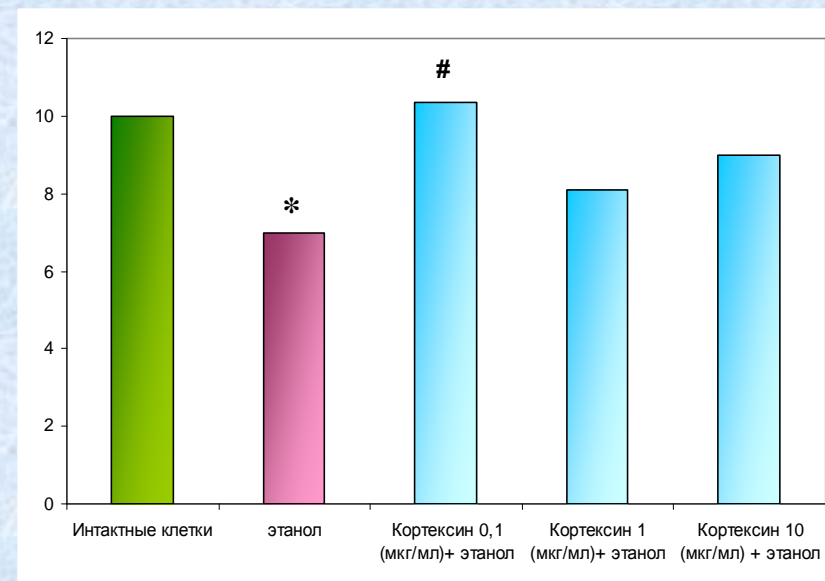
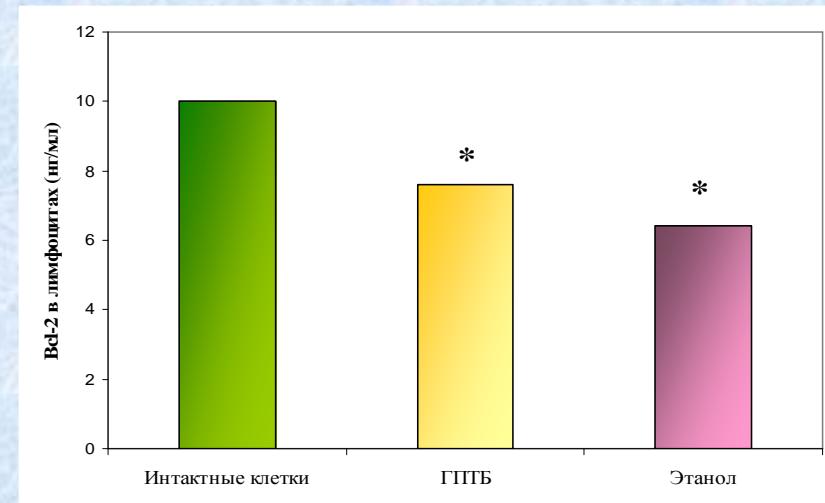
Эффект кортексина на лимфоциты периферической крови здоровых людей

Эффекты кортексина на уровень Vcl-2 в лимфоцитах при культивировании in vitro



Примечание.

* - $p < 0,05$ по сравнению с интактными клетками (контроль);
- $p < 0,05$ по сравнению с инкубацией в тех же условиях без протектора.



Эффекты кортексина на уровень caspase-3 в лимфоцитах при культивировании in vitro

Условия инкубации	Интактные клетки	Интактные клетки + 140 мкМ ГПТБ	Интактные клетки + 0,5 % этанол
Инкубация без кортексина	3,76 (3,59—4,11)	5,02 (4,33—5,74)*	4,54 (3,81— 4,79)
Инкубация с кортексином (0,1 мкг/мл)	3,43 (2,17—4,60)	3,93 (3,25—4,51) #	4,35 (1,8—4,54)
Инкубация с кортексином (1 мкг/мл)	3,97 (2,24—4,17)	4,49 (1,3—4,78)	4,27 (1,3—4,55)
Инкубация с кортексином (10 мкг/мл)	3,69 (2,14—4,66)	4,3 (1,79—4,54)	3,73 (2,8—4,48)

Примечание. *- $p < 0,05$ по сравнению с интактными клетками (контроль); # - $p < 0,05$ по сравнению с инкубацией в тех же условиях без кортексина.

Эффекты кортексина на уровень Annexin V+- лимфоцитов здоровых лиц, (%), Me (Q_L-Q_U)

Условия инкубации	Интактные клетки	Интактные клетки + 140 мкМ ГПТБ	Интактные клетки + 0,5 % этанол
Инкубация без кортексина	12,8 (10,5—13,5)	17,71 (16,80—17,80)*	18,15 (15,55—18,00)*
Инкубация с кортексином (0,1 мкг/мл)	12,6 (10,65—14,76)	16,8 (15,41—18. 90)	14,61 (12,6—16,35) #
Инкубация с кортексином (1 мкг/мл)	13,3 (12,70—14,52)	17,36 (15,51—19,60)	13,5 (11,05—16,15) #
Инкубация с кортексином (10 мкг/мл)	11. 9 (10,65—12,50)	14,5 (14,3—16,80)	16,9 (15,65—17,75)

Примечание: *- $p < 0,05$ по сравнению с интактными клетками (контроль); # - $p < 0,05$ по сравнению с инкубацией в тех же условиях без кортексина.

Влияние кортексина на содержание лимфоцитов с фрагментированным ядром при культивировании in vitro (%), Me (Q_L - Q_U)

Условия инкубации	Интактные клетки	Интактные клетки + 140 мкМ ГПТБ	Интактные клетки + 0,5 % этанол
Без кортексина	6,66 (5,00—8,19)	8,2* (7,41—9,43)	7,12 (4,05—8,45)
Инкубация с кортексином (0,1 мкг/мл)	1,51 (1,21—1,85)*	2,61 (1,1—4,76) #*	3,51 (1,2—5,05) #*
Инкубация с кортексином (1 мкг/мл)	5,94 (2,02—9,93)	3,62 (1,61—3,84) #*	5,41 (1,6—6,55)
Инкубация с кортексином (10 мкг/мл)	1,86 (1,43—4,16)*	3,53 (2,78—5,88)	2,7 (1,2—3,82) #*

Примечание: *- $p < 0,05$ по сравнению с интактными клетками (контроль); # - $p < 0,05$ по сравнению с инкубацией в тех же условиях без кортексина.

Эффект воздействия дегидроэпиандростерона сульфата на уровень caspase-3 в лимфоцитах периферической крови человека

	Интактные клетки	Интактные клетки + 14мкМ ГПТБ	Интактные клетки + 140мкМ ГПТБ	Интактные клетки + 0,5% этанол
Уровень caspase-3 (мкг/мл)	0,38±0,03	0,53±0,04	0,63±0,08	0,36±0,04
Уровень caspase-3 при инкубации с ДГЭАС (мкг/мл)	0,21±0,09	0,25±0,02*#	0,24±0,03*#	0,41±0,01

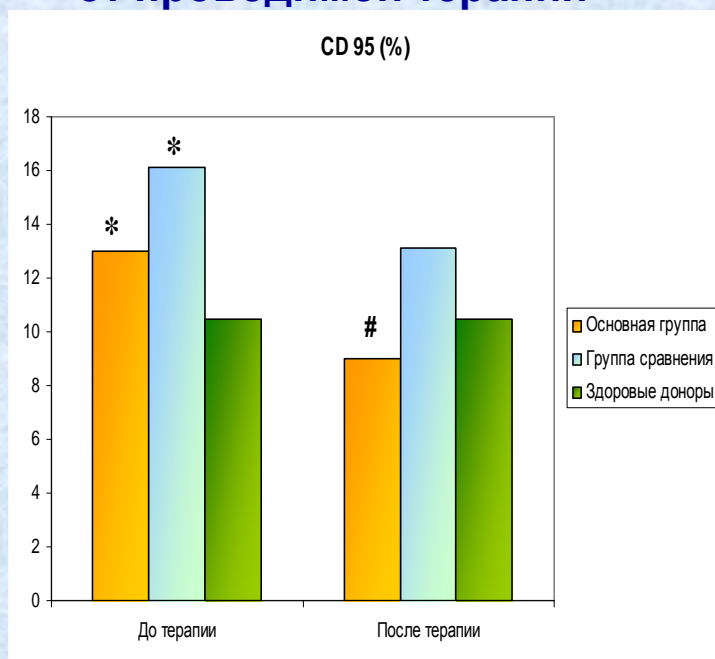
Эффект воздействия дегидроэпиандростерона сульфата на уровень Vcl-2 в лимфоцитах периферической крови человека

	Интактные клетки	Интактные клетки + 14мкМ ГПТБ	Интактные клетки + 140мкМ ГПТБ	Интактные клетки + 0,5% этанол
Уровень Vcl-2 (нг/мл)	2,3±0,3	2,4±0,9	1,1±0,2	1,9±0,3
Уровень Vcl-2 при инкубации с ДГЭАС (нг/мл)	1,8±0,2	1,1±0,2	1,7±0,3*#	1,6±0,4

Примечание: *- p<0,05 по сравнению с контролем;
- p<0,05 по сравнению с инкубацией в тех же условиях без ДГЭАС

Влияние фармакотерапии кортексином на реализацию запрограммированной клеточной гибели в лимфоцитах периферической крови больных алкоголизмом

Динамика экспрессии рецептора CD95 у больных алкоголизмом в зависимости от проводимой терапии



Примечание.

*- $p < 0,05$ по сравнению с контролем;

- $p < 0,05$ достоверность уровня различий результатов в группе пациентов до и после терапии.

Динамика апоптоза лимфоцитов у пациентов, получающих кортексин, и в группе лиц получающих стандартную медикаментозную терапию, (%), Me (Q_L - Q_U)

	Основная группа	Группа сравнения
До терапии	4,96 (4,27-8,12)*	4,08 (3,36-5,54)*
После терапии	4,23 (3,67-5,08)	5,47 (2,77-7,62)
Контроль	1,87 (1,48-2,10)	1,87 (1,48-2,10)

Доля Annexin V+- лимфоцитов у пациентов, получающих кортексин и стандартную медикаментозную терапию (%), Me (Q_L - Q_U)

	Основная группа	Группа сравнения
До терапии	22,80 (14,70-24,96)*	21,66 (18,29-25,17)*
После терапии	18,97 (17,46-24,03)#	21,58 (17,60-24,75)
Контроль	15,93 (15,10-17,49)	15,93 (15,10-17,49)

Заключение

1. У больных алкоголизмом выявлены достоверное по сравнению со здоровыми лицами усиление экспрессии рецептора CD95, увеличение доли Annexin V⁺-клеток и статистически значимое повышение количества лимфоцитов с морфологическими признаками фрагментации ядра. Усиление показателей клеточной гибели лимфоцитов у больных алкоголизмом наблюдается на фоне повышения концентрации кортизола в сыворотке крови.
2. В экспериментальных пробах *in vitro* показано усиление клеточной гибели лимфоцитов здоровых лиц при действии этанола и различных температурных режимов культивирования. Инкубация лимфоцитов периферической крови больных алкоголизмом с модуляторами апоптоза и этанолом не приводила к значимым изменениям исследуемых параметров.
3. В условиях окислительного стресса в культуре лимфоцитов здоровых доноров выявлены увеличение уровня проапоптотического белка caspase-3, повышение доли клеток с морфологическими признаками апоптоза, усиление выхода фосфотидилсерина на поверхность клеточных мембран и снижение уровня антиапоптотического белка Bcl-2. При инкубации клеток с этанолом выявлены увеличение доли Annexin V⁺-клеток и снижение концентрации Bcl-2 по сравнению с интактными клетками. Клетки нейробластомы C-1300 в присутствии этанола и индуктора окислительного стресса реагировали снижением уровня Bcl-2.
4. Включение в комплексные программы терапии аддиктивных расстройств нейрометаболических протекторов и препаратов с антиоксидантными свойствами позволяет повысить клиническую эффективность купирования абстинентных и постабстинентных расстройств, приводит к положительной динамике эмоционального состояния и когнитивных функций больных алкоголизмом и нормализации показателей апоптоза (экспрессии рецептора CD95 и количества Annexin V⁺-клеток).

**БЛАГОДАРЮ
ЗА ВНИМАНИЕ!**