

УДК 616.89-02-092.19-092.6-092.4

ПОКАЗАТЕЛИ КРАСНОЙ КРОВИ И Т-ЛИМФОЦИТЫ У БОЛЬНЫХ АЛКОГОЛИЗМОМ; ЗАЩИТНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ АСКОРБАТА ЛИТИЯ**Ветлугина Т.П., Савочкина Д.Н., Рощина О.В., Никитина В.Б.,
Мартыненко Л.И., Плотников Е.В.***Научно-исследовательский институт психического здоровья ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», Томск, e-mail: mental@tnimc.ru*

Проведено исследование состояния красной крови 35 больных алкоголизмом мужчин в динамике терапии синдрома отмены и постабстинентного состояния – через 3–4 дня поступления в стационар и на 12–14 день лечения. Выявлено снижение по отношению к контролю (19 практически здоровых мужчин) количества эритроцитов, гематокрита, уровня гемоглобина и его концентрации в эритроците в обеих точках. Макроцитоз ($MCV \geq 100 \mu m^3$) выявлен у 29,4% лиц с алкогольной зависимостью и у 1 человека контрольной группы. Установлена прямая корреляционная зависимость между числом эритроцитов и уровнем суточной толерантности. Ранее в опытах *in vitro* показано, что аскорбат лития значительно повышает устойчивость эритроцитов к гемолизу, индуцированному этанолом. Предварительные результаты данного исследования свидетельствуют об отсутствии негативного влияния аскорбата лития на экспрессию поверхностных рецепторов Т-лимфоцитов в пробах крови больных алкоголизмом. Полученные обнадеживающие результаты являются основанием для дальнейших исследований спектра химически синтезированных органических солей лития с целью выявления наиболее перспективных соединений для разработки препаратов, обладающих комбинированным нормотимическим, цитопротекторным, антиоксидантным действием.

Ключевые слова: эритроциты, гемоглобин, гематокрит, макроцитоз, Т-лимфоциты, аскорбат лития, алкоголизм**INDICATORS OF RED BLOOD AND T-LYMPHOCYTES IN PATIENTS WITH ALCOHOLISM; PROTECTIVE POTENTIAL OF LITHIUM ASCORBATE****Vetlugina T.P., Savoshkina D.N., Roshchina O.V., Nikitina V.B.,
Martynenko L.I., Plotnikov E.V.***Mental Health Research Institute, Tomsk National Research Medical Center,
Russian Academy of Sciences, Tomsk, e-mail: mental@tnimc.ru*

Here we present the results of a study of red blood parameters in 35 patients with alcoholism in men. Blood samples were studied in the dynamics of therapy for withdrawal and post-abstinence conditions – after 3-4 days of admission to hospital and on 12-14 days of treatment. Data at both points showed a decrease in the number of erythrocytes, hematocrit, hemoglobin level and its concentration in the erythrocyte in comparison with the control (control group 19 of practically healthy men). Macrocytosis ($MCV \geq 100 \mu m^3$) was detected in 29,4% of persons with alcohol dependence and only 1 person from the control group. A direct correlation was established between the number of erythrocytes and the level of alcohol daily tolerance. Previously, it was showed that lithium ascorbate significantly increases the resistance of erythrocytes to ethanol-induced hemolysis *in vitro*. Preliminary results of this study indicate the absence of a negative impact of lithium ascorbate on the expression of surface receptors of T-lymphocytes in blood samples of patients with alcoholism. The received encouraging results are the basis for the further researches of a spectrum of chemically synthesized organic salts of lithium with the purpose of revealing the most perspective compounds for development of the medicines possessing combined normotimic, cytoprotective and antioxidant action.

Keywords: erythrocytes, hemoglobin, hematocrit, macrocytosis, T-lymphocytes, lithium ascorbate, alcoholism

Важным фактором патогенеза алкогольной зависимости является структурно-функциональная дезорганизация эритроцитов при хроническом действии этанола и его метаболитов, в частности ацетальдегида и продуктов ПОЛ. Эритроциты подвергаются как прямому токсическому действию этанола и продуктов его метаболизма, так и окислительной модификации липидной компоненты эритроцитарных мембран [1–4]. Модификация липидного бислоя сопровождается изменением морфологии эритроцитов, снижением гемолитической устойчивости, возможным развитием анемии, нарушением роли в поддержании

адекватного иммунного ответа [5–7]. Показано, что у больных алкоголизмом снижены значения большинства гематологических параметров [8], вместе с тем в литературе практически не освещен вопрос зависимости этих показателей от клинических характеристик и динамики течения алкоголизма.

Цель исследования

Изучить параметры красной крови больных алкоголизмом при терапии синдрома отмены и постабстинентного состояния; оценить влияние аскорбата лития на экспрессию поверхностных рецепторов лимфоцитов.

Таблица 1

Характеристика красной крови больных алкоголизмом в динамике лечения постабстинентного состояния

Показатели	Медиана (LQ–UQ)		Контроль N = 19	p
	Пациенты, точки обследования			
	1 точка N = 35	2 точка N = 28		
Число эритроцитов (RBC), $10 \times 10^{12}/л$	4,46 (4,17–4,84)	4,63 (4,34–4,84)	5,03 (4,73–5,19)	$P_1 = 0,000$ $P_2 = 0,001$
Уровень гемоглобина (HGB), g/dl	14,65 (13,50–15,20)	14,90 (14,40–15,25)	16,50 (15,80–17,20)	$P_1 = 0,000$ $P_2 = 0,000$
Гематокрит (HCT), %	41,45 (38,20–43,80)	42,30 (39,95–44,35)	45,80 (43,80–47,30)	$P_1 = 0,000$ $P_2 = 0,000$
Объем эритроцитов (MCV), μm^3	92,00 (90,00–96,00)	92,00 (89,50–94,00)	90,00 (89,00–93,00)	$P_1 = 0,525$ $P_2 = 0,891$
Концентрация гемоглобина в эритроците (MCHC), g/dl	35,30 (24,40–35,90)	35,20 (34,05–35,75)	36,20 (36,00–36,60)	$P_1 = 0,000$ $P_2 = 0,000$

Примечание. p_1 – достоверность различий показателей в 1 точке к контролю; p_2 – достоверность различий показателей во 2 точке к контролю.

Материалы и методы исследования

Обследовано 35 мужчин (средний возраст $46,6 \pm 10,0$ лет), страдающих алкогольной зависимостью. Диагноз больных по МКБ-10 квалифицировался как «Психические и поведенческие расстройства в результате употребления алкоголя (синдром зависимости – F10.21 и синдром отмены – F10.30); длительность заболевания составила $10,6 \pm 9,2$ лет. Контрольная группа – 19 практически здоровых мужчин, соответствующих по возрасту группе пациентов. Гематологические исследования пациентов были проведены на этапе синдрома отмены алкоголя в динамике терапии постабстинентного состояния: 1 точка на 3–4 день поступления пациента в стационар после проведения курса дезинтоксикационной терапии, 2 точка – на 12–14 день стандартной терапии постабстинентного состояния с назначением основных групп препаратов для коррекции аффективных нарушений, диссомнических, нейровегетативных расстройств и редукции симптомов проявления зависимости от алкоголя в острый период синдрома отмены.

Забор крови для исследований осуществляли из локтевой вены утром натощак с использованием стерильной системы однократного применения Vacutainer («Becton Dickinson», USA) с антикоагулянтом EDTA. Гематологический анализ крови проводили на автоматическом гематологическом анализаторе Micros 60 (HORIBA ABX SAS). Фенотипы лимфоцитов с поверхностными рецепторами (поверхностными антигенами, кластерами дифференцировки CD) определяли на автоматическом проточном цитометре системы BD FACSCalibur.

Исследование с участием людей проведено с соблюдением принципов информированного согласия Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации и одобрено Локальным этическим комитетом при НИИ психического здоровья Томского НИМЦ (протоколы № 53/4 от 01.10.2012; № 361 от 23.10.2017 г.).

Статистическую обработку данных осуществляли с использованием пакета программ STATISTICA для Windows, версия 12.0. Описательная статистика представлена средним арифметическим значением M, стандартной ошибкой среднего m, стандартным отклонением σ , медианой Me и межквартильным интервалом (LQ – UQ). Корреляционный анализ проводили с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r_s). Использовали уровень достоверности $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

В ходе исследования установлено, что число эритроцитов (RBC), занимаемый ими объем крови (гематокрит), уровень гемоглобина и концентрация его в эритроците (MCHC) в группе пациентов при синдроме отмены этанола в 1 точке исследования были с высокой степенью достоверности снижены по сравнению с контрольной группой мужчин (табл. 1).

К концу периода наблюдения на 12–14 день терапии постабстинентного состояния у пациентов отмечается уменьшение степени тяжести симптомов абстиненции, исчезновение вегето-соматической, алгической симптоматики, субъективно удовлетворительное самочувствие, при этом исследуемые гематологические параметры остаются практически без изменения.

Показатель среднего объема эритроцитов (MCV) в группе пациентов и здоровых мужчин был сопоставим. В то же время значительное число публикаций посвящено обсуждению макроцитоза, макроцитарной анемии – состоянию, при котором объем

эритроцита равен или более 100 фемтолитров (фл.), или $\mu\text{м}^3$. Stouten K et al. [9] показали, что макроцитарная анемия является относительно частой в общей медицинской практике, и среди этиологических факторов патологии эритроцитов – злоупотребление алкоголем. Исследователями отмечается разная частота встречаемости макроцитоза ($\text{MCV} \geq 100 \text{ fL}$) у больных алкоголизмом – от 24,1% до 36,5% случаев. Аномалия эритроцитов при алкоголизме может быть связана с непосредственным токсическим действием алкоголя на мембраны эритроцитов, высоким уровнем ацетальдегида, продуктами ПОЛ, а также недостаточностью питания [6; 10]. В нашем исследовании в группе больных значение $\text{MCV} \geq 100 \mu\text{м}^3$ (при сниженном по сравнению с контролем уровне гемоглобина) установлено у 29,4% лиц. Тогда как в группе контроля макроцитоз ($\text{MCV} = 105 \mu\text{м}^3$) отмечен только у одного человека при уровне гемоглобина у него 17,5 g/dl.

Далее нами был проведен корреляционный анализ зависимости всех гематологических параметров от клинических характеристик алкоголизма, таких как длительность заболевания и суточная толерантность пациентов к этанолу в пересчете на водку. Толерантность к психоактивному веществу определяется его минимальной дозой, способной вызвать желаемый психофизический эффект. Установлена прямая статистически значимая корреляционная зависимость между числом эритроцитов (RBC) и уровнем толерантности как в 1-й точке обследования, так и во 2-й ($r = 0,33$; $r = 0,35$; $p < 0,001$). Возможно, прямая зависимость объясняется тем, что высокая толерантность свидетельствует о большей адаптивности и сохранности гомеостатических систем организма; при дальнейшем развитии заболевания происходит снижение адаптивных возможностей организма

к действию алкоголя и, соответственно, снижение толерантности [11]. В данном фрагменте исследования обнаружены слабые отрицательные корреляции между числом эритроцитов, гематокритом, уровнем гемоглобина с длительностью заболевания ($r = -0,22$; $-0,23$; $-0,23$ соответственно).

В связи с аномалиями эритроцитов у больных алкоголизмом важное значение приобретает расширение арсенала защитных средств биологических мембран эритроцитов от воздействия этанола. В лечении пациентов с расстройствами аффективного спектра (депрессивным эпизодом, биполярным аффективным расстройством, алкогольной зависимостью с аффективными нарушениями) применяются соли лития, чаще в виде карбоната. Ранее нами в опытах *in vitro* был выявлен гемопротекторный эффект аскорбата лития, заключающийся в повышении в 1,5–2 раза устойчивости эритроцитов к гемолизу, индуцированному этанолом [12]. Представляются актуальными исследования действия аскорбата лития на мембраны лимфоцитов пациентов с алкогольной зависимостью.

В литературе имеются сведения об иммуносупрессивном действии этанола. Вместе с тем отмечается сложность и неясность молекулярных механизмов влияния этанола на систему иммунитета и имеются факты активации адаптивного иммунитета при алкогольной зависимости. В нашем исследовании не обнаружено снижения популяций Т-лимфоцитов у больных алкоголизмом при синдроме отмены (табл. 2).

Напротив, относительное количество зрелых Т-лимфоцитов в 1 точке обследования было повышено по отношению к контролю, что может быть обусловлено включением компенсаторных механизмов при стрессе, поскольку длительное потребление алкоголя и его отмена является мощным стрессором [13, 14].

Таблица 2

Популяции Т-лимфоцитов у больных алкоголизмом

Показатели	Медиана (LQ–UQ)		
	Пациенты, точки обследования		Контроль, n = 19
	1 точка, n = 35	2 точка, n = 28	
Т-клетки CD3 ⁺ (CD3 ⁺ CD19 ⁺), %	78,00 (71,00–81,00) p1 = 0,016	76,00 (68,00–80,00)	73,00 (68,00–77,00)
Т-хелперы CD4 ⁺ (CD3 ⁺ CD4 ⁺), %	47,00 (44,00–53,00)	45,00 (39,00–49,00)	47,00 (43,00–54,00)
Т-цитотоксические CD8 ⁺ (CD3 ⁺ CD8 ⁺), %	27,00 (21,00–32,00)	26,00 (22,00–34,00)	22,00 (16,00–31,00)

Примечание. p1 – достоверность к контролю.

Таблица 3

Влияние аскорбата лития на экспрессию рецепторов лимфоцитов (M ± m)

Параметры	Количество лимфоцитов в пробах крови больных алкоголизмом (n = 6)	
	контроль	пробы с аскорбатом лития
Т-клетки (CD3 ⁺ CD19 ⁺), %	75,83 ± 4,26	75,01 ± 4,21
Т-хелперы (CD3 ⁺ CD4 ⁺), %	41,00 ± 2,13	41,02 ± 2,15
Т-цитотоксические (CD3 ⁺ CD8 ⁺), %	34,17 ± 3,84	34,00 ± 4,01

Проведены предварительные эксперименты по влиянию аскорбата лития на экспрессию поверхностных рецепторов лимфоцитов больных алкоголизмом. К пробам крови 6 пациентов (1 точка обследования) добавляли равный объем раствора лития аскорбата, содержащего 500 мкл/мл лития аскорбата, содержащего 500 мкл/мл лития (опыт), или физиологического раствора (контроль) и инкубировали с реагентами для проточной цитометрии. Результаты цитометрии показали, что аскорбат лития в исследуемой дозе не оказывал негативного влияния на мембраны лимфоцитов и количество Т-лимфоцитов, Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов в контрольных пробах крови и в нагрузочных пробах с аскорбатом лития было сопоставимо (табл. 3).

Возможно, устойчивость мембран лимфоцитов к аскорбату лития связана с его антиоксидантным действием. Вольтамперометрическим методом был установлен антиоксидантный эффект аскорбата лития в отношении активных форм кислорода. Процесс четырехэлектронного катодного восстановления кислорода в известной степени моделирует процессы дыхательной цепи на внутренней мембране митохондрий. Влияние аскорбата лития проявляется в нейтрализации кислородных радикалов и уменьшении тока [15].

В целом проведенные исследования выявили статистически значимое по отношению к контролю снижение большинства показателей красной крови в группе мужчин, страдающих алкоголизмом, в динамике терапии синдрома отмены и постабстинентного состояния. Макроцитоз (MCV ≥ 100 μm³) установлен у 29,4% лиц с алкогольной зависимостью и у 1 человека из 19 группы контроля. Установлена прямая корреляционная зависимость между числом эритроцитов и уровнем суточной толерантности. Ранее в опытах in vitro нами был обнаружен позитивный гемопротекторный эффект аскорбата лития. Данные в рамках настоящего исследования свидетельствуют об отсутствии негативного влияния аскорбата лития на экспрессию поверхностных

рецепторов лимфоцитов больных алкоголизмом. Полученные обнадеживающие результаты по гемопротекторной, мембранопротекторной и антиоксидантной активности аскорбата лития являются основанием для дальнейших исследований других химически синтезированных органических солей лития с целью выявления наиболее перспективных соединений для разработки в будущем фармакологических препаратов, обладающих комбинированным нормотимическим, цитопротекторным, антиоксидантным действием и расширяющих спектр лекарственных средств при лечении психической патологии аффективного спектра.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 17-75-20045).

Список литературы

1. Бохан Н.А. Молекулярные механизмы влияния этанола и его метаболитов на эритроциты in vitro и in vivo / Н.А. Бохан, В.Д. Прокопьева. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 2004. – 166 с.
2. Gurtovenko A., Anwar J. Interaction of ethanol with biological membranes: the formation of non-bilayer structures within the membrane interior and their significance // J. Phys Chem B. – 2009. – Vol. 113. – P. 1983–1992.
3. Maturu P., Vaddi D.R., Pannuru P., Nallanchakravarthula V. Modification of erythrocyte membrane proteins, enzymes and transport mechanisms in chronic alcoholics: an in vivo and in vitro study // Alcohol. – 2013. – Vol. 48(6). – P. 679–686.
4. Sonmez M., Ince H.Y., Yalcin O. et al. The effect of alcohols on red blood cell mechanical properties and membrane fluidity depends on their molecular size // PLoS One. – 2013. – Vol.23. – P.76–79.
5. Shimizu Y., Nakazato M., Sekita T., Kadota K., Arima K., Yamasaki H., Goto H., Takamura N., Aoyagi K., Maeda T. Free thyroxine (FT4) and anemia in relation to drinking status of Japanese men: the Nagasaki islands study // Endocr J. – 2013. – vol. 60(9). – P. 1029–1034.
6. Yokoyama A., Yokoyama T., Brooks P.J., Mizukami T., Matsui T., Kimura M., Matsushita S., Higuchi S., Maruyama K. Macrocytosis, macrocytic anemia, and genetic polymorphisms of alcohol dehydrogenase-1B and aldehyde dehydrogenase-2 in Japanese alcoholic men // Alcohol Clin Exp Res. – 2014. – vol. 38(5). – P. 1237–1246.
7. Fuster D., Sanvisens A., Bolao F., Zuluaga P., Rivas I., Tor J., Muga R. Markers of inflammation and mortality in a cohort of patients with alcohol dependence // Medicine (Baltimore). – 2015. – vol. 94(10). – P. 607.
8. Cylwik B., Naklicki M., Gruszewska E., Szmikowski M., Chrostek L. The distribution of serum folate concentration and red blood cell indices in alcoholics // J. Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). – 2013. – vol. 59(1). – P. 1–8.

9. Stouten K., Riedl J.A., Droogendijk J., Castel R., van Rosmalen J., van Houten R.J., Berendes P., Sonneveld P., Levin M.D. Prevalence of potential underlying aetiology of macrocytic anaemia in Dutch general practice // *BMC Fam Pract.* – 2016. – vol. 17(1). – P. 113.
10. Veda P. Evaluation of macrocytosis in routine hemograms // *Indian J. Hematol Blood Transfus.* – 2013. – vol. 29(1). – P. 26–30.
11. Шабанов П.Д., Калишевич С.Ю. Биологические последствия злоупотребления этанолом / П.Д. Шабанов, С.Ю. Калишевич. – СПб.: Лань, 1998. – 292 с.
12. Ветлугина Т.П., Плотников Е.В., Никитина В.Б., Лобачева О.А., Савочкина Д.Н., Радионова Т.С., Плотников В.М., Бохан Н.А. Исследование гемопротекторной активности аскорбата лития / Т.П. Ветлугина, Е.В. Плотников, В.Б. Никитина, О.А. Лобачева, Д.Н. Савочкина, Т.С. Радионова, В.М. Плотников, Н.А. Бохан // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований.* – 2016. – № 4–2. – С. 368–370.
13. Becker H.C. Influence of stress associated with chronic alcohol exposure on drinking // *Neuropharmacology.* 2017; 122:115–126.
14. Blaine S.K., Sinha R. Alcohol, stress, and glucocorticoids: From risk to dependence and relapse in alcohol use disorders // *Neuropharmacology.* 2017; 122: 136–147.
15. Plotnikov E., Korotkova E., Voronova O., Dorozhko E., Bohan N., Plotnikov S. Lithium-based antioxidants: electrochemical properties and influence on immune cells // *Physiology and pharmacology.* – 2015. – vol. 19. – P. 107–113.