

УДК 576. 32

ГОМОЦИСТЕИН И ФУНКЦИИ НЕЙТРОФИЛОВ IN VITRO

Гайдукова Тамара Владимировна

ассистент

Галак Иван Русланович

Богданов Иван Алексеевич

Решетников Игорь Андреевич

Балданов Арсалан Альбертович

студенты

Научные руководители: **Цыбиков Намжил Нанзатович**

д.м.н., профессор

Фефелова Елена Викторовна

д.м.н., профессор

ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия»

Аннотация: в данной статье описывается влияние гомоцистеина на фагоцитарную и миелопероксидазную активность нейтрофильных гранулоцитов в различных концентрациях. Гомоцистеин в разных концентрациях оказывает несхожие эффекты на фагоцитоз. Введение гомоцистеина в дозе 10, 15 и 20 мкмоль/л усиливает фагоцитоз, однако гомоцистеин в концентрации 30 мкмоль/л угнетает его. Также отмечены изменения миелопероксидазной активности, средний цитохимический коэффициент возрастал при добавлении гомоцистеина в дозе от 5 до 20 мкмоль/л, однако концентрации 25 и 30 мкмоль/л не приводили к изменениям среднего цитохимического коэффициента.

Ключевые слова: нейтрофилы, гомоцистеин, гипергомоцистеинемия, фагоцитоз, миелопероксидаза.

HOMOCYSTEINE AND NEUTROPHIL FUNCTIONS IN VITRO

Gaydukova Tamara Vladimirovna

Galak Ivan Ruslanovich

Bogdanov Ivan Alekseevich

Reshetnikov Igor Andreevich

Baldanov Arsalan Albertovich

Scientific advisers: **Namzhil Nanzatovich Tsybikov**

Fefelova Elena Viktorovna

Abstract: this article describes the effect of homocysteine on the phagocytic and myeloperoxidase activity of neutrophil granulocytes in various concentrations. Homocysteine in different concentrations has dissimilar effects on phagocytosis. The introduction of homocysteine at a dose of 10, 15 and 20 mmol / l increases phagocytosis, but homocysteine at a concentration of 30 mmol / l inhibits it. Changes in myeloperoxidase activity were also noted, the average cytochemical coefficient increased with the addition of homocysteine at a dose of 5 to 20 mmol/l, but concentrations of 25 and 30 mmol/l did not lead to changes in the average cytochemical coefficient.

Key words: neutrophils, homocysteine, hyperhomocysteinemia, phagocytosis, myeloperoxidase.

Введение. Функция нейтрофильных гранулоцитов является особо важным компонентом конститутивного иммунитета. На сегодняшний день известно три процесса, с помощью которых нейтрофилы защищают организм: фагоцитоз, дегрануляция и нейтрофильные внеклеточные ловушки (NETs) (рис.1) [1, с. 5]. Активаторами нейтрофилов является огромное количество различных факторов, среди них молекулы PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) и DAMPs (damage-associated molecular patterns) [2, с. 88], провоспалительные цитокины такие как ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО-альфа и другие, хемоаттрактанты, которые обеспечивают процессы хемотаксиса и хемокинеза также являются активаторами нейтрофилов [3, с. 62]. Некоторые химические вещества, например, форбол-12-миристан-13-ацетат (ФМА) способствует активации нейтрофильных гранулоцитов, данное соединение интересно тем, что оно является индуктором NETs [4, с. 211].

Такое разнообразие активаторов объясняется ролью нейтрофилов, ведь они самые первые реагируют на внедрение патогена и их функционирование должно осуществляться максимально быстро и эффективно.

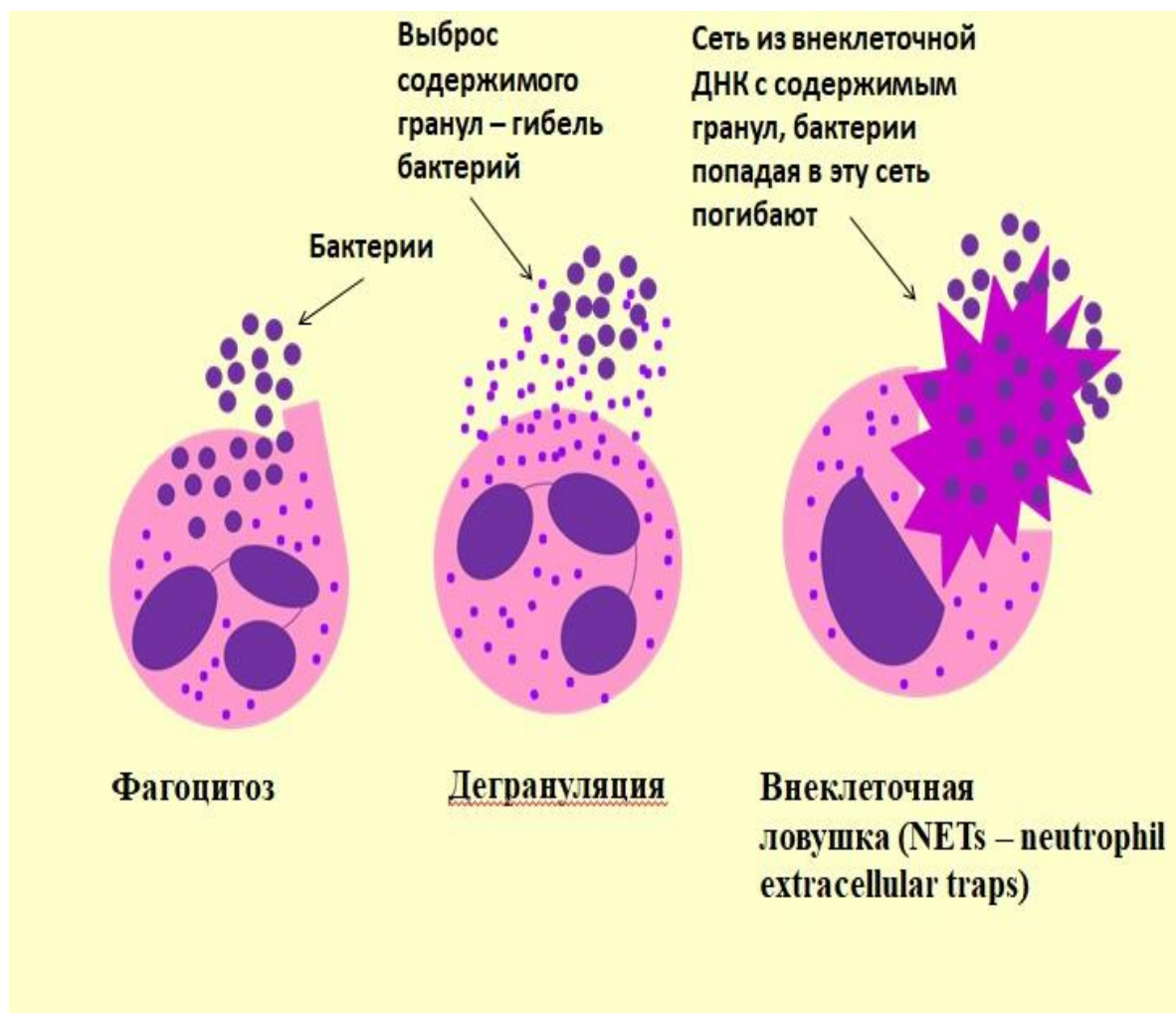


Рис.1. Способы киллинга бактерий нейтрофилами Рисунок автора

Особый интерес вызывает аминокислота гомоцистеин, в том числе его эффекты на нейтрофилы. Эта аминокислота является промежуточным продуктом обмена метионина и является его деметилированным производным. В норме гомоцистеин должен повторно метилироваться с образованием метионина, в этом процессе участвуют фермент метионинсинтаза, витамин В₁₂ и фолиевая кислота. При нарушении преобразования гомоцистеина в метионин, гомоцистеин начинает накапливаться (рис.2). В норме его концентрация в крови не должна превышать 15 мкмоль/л.

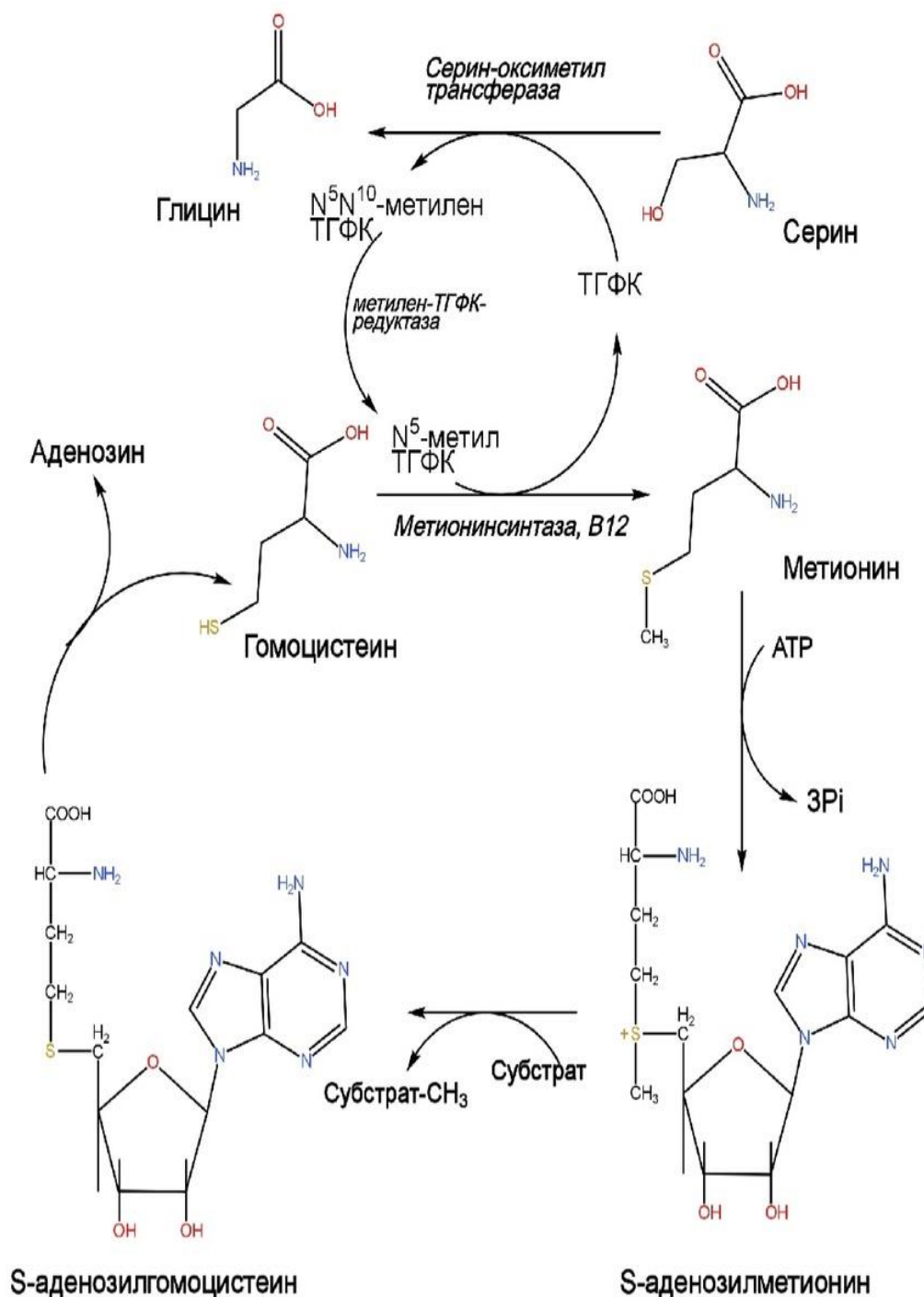


Рис.2. Обмен метионина и гомоцистеина. Схема автора

Гипергомоцистеинемия относится к неблагоприятным факторам, так как гомоцистеин является повреждающим агентом. Механизмы повреждающего действия гомоцистеина весьма разнообразны: имея свободную $-SH$ группу,

гомоцистеин способствует образованию большого количества свободных радикалов [5, с. 120]. Гомоцистеин-тиолактон обеспечивает N-гомоцистеинилирование различных белков, что приводит к изменению их структуры и функции [6, с. 379]. Гипергомоцистеинемия вызывает развитие дисфункции эндотелия, уменьшая синтез оксида азота (NO) и простациклина (Pgl), увеличивает образование тромбосана A_2 эндотелина-1 [7, с. 6], а они в свою очередь, вызывают развитие вазоконстрикции и агрегации тромбоцитов. Высокие концентрации гомоцистеина способствуют активации системы гемостаза, как стимулируя экспрессию тканевого фактора эндотелиоцитами и макрофагами, так и за счет стимуляции образования внеклеточных ловушек [9, с. 3]. При активации NETs, наблюдается выброс ДНК, что способствует активации FXII. Гистоны H3 и H4 высвобождаемые во время выброса ДНК обладают выраженным прокоагулянтным эффектом [8, с. 78].

Гомоцистеин конкурирует с глутаматом за NMDA-рецепторы клеток [10, с. 573]. На сегодняшний день известно, что NMDA-рецепторы имеются на цитоплазматической мембране многих клеток, в том числе и на мембране нейтрофилов. Их активация вызывает приток Ca^{++} внутрь клетки, что способствует изменению функциональной активности нейтрофилов, вплоть до запуска каскада активации каспаз и активации процессов апоптоза.

Цель работы: изучить функциональную активность нейтрофилов *in vitro* в присутствии различных концентраций гомоцистеина по изменению уровня миелопероксидазы и процента фагоцитирующих клеток.

Методы исследования.

В исследовании использовали периферическую кровь 10 относительно здоровых, некурящих добровольцев – мужчин, средний возраст которых составил $20,3 \pm 1,1$ лет. Кровь забирали из локтевой вены в пробирки с добавлением гепарина Li. Затем, по 0,5 мл крови помещали в 8 стерильных пластиковых пробирок, добавляли в каждую из них по 0,3 мл культуральной среды RPMI 1640 MACSCR MCDIA (Германия). Затем, в каждую из них вносили растворы гомоцистеина в концентрациях 5,0, 10,0, 15,0, 20,0, 25,0, 30 мкмоль/л, В шестую (контрольную) – эквивалентный объем физиологического раствора, в седьмую (контроль активации) – 0,005% раствор продигозана. Далее проводили оценку фагоцитарного индекса и активности миелопероксидазы.

Для оценки фагоцитарного индекса использовали взвесь суточной культуры *S.aureus* с концентрацией 1 млрд/мл, взвесь готовили по стандарту

мутности в физиологическом растворе, в растворе продигиозана и в растворах гомоцистеина. Смешивали кровь и взвесь бактерий в соотношении 1:1, инкубировали 30 минут при температуре 37°C. После инкубации образцы центрифугировали 10 минут при 1500 об/мин, из осадка готовили мазки и окрашивали по Романовскому-Гимзе. Окрашенные мазки микроскопировали при увеличении 1000х, подсчитывали 100 нейтрофилов, среди них дифференцировали интактные и фагоцитирующие (рис. 3).



Рис.3. Фагоцитоз кокков нейтрофилами. Фиксированный мазок, окраска по Романовскому-Гимзе. Увеличение 1000х. Фото автора

Для оценки активности миелопероксидазы полиморфноядерных лейкоцитов использовали метод Грэхема-Кнолля. Кровь инкубировали с изучаемыми анолитами в течении часа при 37°C. После инкубации образцы центрифугировали 10 мин при 1500 об/мин, из осадка готовили мазки. Для фиксации использовали смесь этанол-формалин в соотношении 9:1, фиксацию проводили в течении 30 секунд, промывали дистиллированной водой и сушили на воздухе. После высыхания мазков их окрашивали бензидиновым реактивом в течении 5 минут. Бензидиновый реактив готовили в расчете на 10 мл готового реактива из следующих компонентов: спирт этиловый 6 мл, бензидин на кончике ножа, дистиллированная вода 4 мл и 3% раствор пероксида водорода в объеме 0.02 мл. После окраски бензидиновым реактивом мазки промывали дистиллированной водой и докрашивали красителем Романовского-Гимзе. Время докрашивания красителем Романовского-Гимзе подбирают эмпирически, в нашем случае оно составило 30 минут. После промывки и высыхания, мазки микроскопировали с иммерсией, подсчитывали 100 нейтрофилов, среди них дифференцировали различную активность МПО, от отрицательной до высокой (рис. 4). Данные по активности МПО приведены в виде среднего цитохимического коэффициента (СЦК).

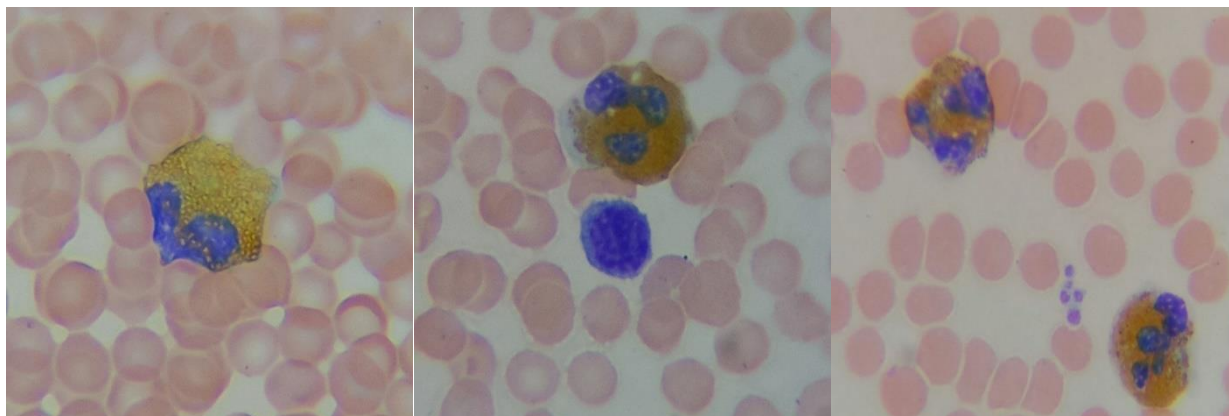


Рис.4. Положительная цитохимическая реакция Грэхема-Кнолля на МПО нейтрофилов. Высокая активность МПО. Увеличение 1000х. Фото автора

Полученные данные были статистически обработаны в программе Jamovi 2.3. Результаты в таблицах представлены как медиана (Me) и (25; 75) проценты. Достоверность различий между группами (p) оценивали при помощи попарных сравнений Двасса-Стила-Кричлоу-Флигнера. Статистически достоверными считались данные при количественной характеристике случайностей (p -значение) не более 0,05.

Полученные результаты. В ходе эксперимента было показано, что при концентрациях гомоцистеина 10, 15 и 20 мкмоль/л происходит увеличение фагоцитарного индекса на 7% по сравнению с продигиозаном ($p=0,04$; 0,049; 0,049 соответственно), а при его концентрации 30 мкмоль/л активность фагоцитоза снизилась на 18,4% по сравнению с физиологическим раствором ($p=0,041$), что вероятно связано с токсическим действием гомоцистеина на нейтрофилы.

Средний цитохимический коэффициент активности миелопероксидазы возрастал при внесении гомоцистеина в концентрациях 5 и 10 мкмоль/л на 63% в сравнении с физиологическим раствором ($p=0,049$; 0,041 соответственно), однако в сравнении с продигиозаном гомоцистеин в концентрации 5 мкмоль/л не изменял активность МПО, при внесении аминотиола в дозе 10 мкмоль/л она увеличилась на 16,9% ($p=0,04$). Введение тиолов в концентрации 20 мкмоль/л увеличивало СЦК на 54,6% больше чем физиологический раствор ($p=0,049$) и было равным действию продигиозана ($p=0,075$). Дозы гомоцистеина 25 и 30 мкмоль/л, введенные в краткосрочную культуру клеток не вызывали изменение активности миелопероксидазы (табл. 1).

Таблица 1

Фагоцититарный индекс и активность миелопероксидазы при внесении в краткосрочную культуру клеток различных концентраций гомоцистеина

Стимулятор	% фагоцитоза	МПО, СЦК
0.9% NaCl	62,5 (61.3; 63.8)	1.81 (1.78; 1.82)
Продигиозан 0.005%	71.5 (70.3; 72.8) p1=0.035	2.24 (2.22; 2.25) p1=0.045
Нсу 5мкмоль/л	63.0 (62.3; 63.8) p1=1.000 p2=0.073	2.95 (2.44; 3.08) p1=0.049 p2=0.534
Нсу 10мкмоль/л	76.5 (75.0; 78.5) p1=0.04 p2=0.048 p3=0.04	2.62 (2.59; 2.66) p1=0.041 p2=0.04 p3=0.970
Нсу 15мкмоль/л	80 (79.0; 80.5) p1=0.049 p2=0.049 p3= 0.052 p4=0.451	2.65 (2.61; 2.71) p1=0.049 p2=0.054 p3=0.975 p4=0.943
Нсу 20мкмоль/л	78.5 (77.3; 79.8) p1=0.049 p2=0.049 p3=0.073 p4=0.956 p5= 0.789	2.80 (2.75; 2.83) p1=0.049 p2=0.075 p3=0.980 p4=0.041 p5=0.140
Нсу 25мкмоль/л	61.5 (60.3; 62.8) p1=0.987 p2=0.045 p3= 0.898 p4=0.04 p5=0.053 p6=0.075	1.94 (1.89; 2.00) p1=0.046 p2=0.075 p3=0.076 p4=0.041 p5=0.055 p6=0.076
Нсу 30мкмоль/л	51.0 (48.0; 53.3) p1=0.041 p2=0.04 p3=0.04 p4=0.018 p5=0.026 p6=0.04 p7=0.041	2.25 (1.80; 2.37) p1=0.781 p2=1.000 p3=0.526 p4=0.018 p5=0.026 p6= 0.041 p7=0.781

Гомоцистеин, активируя NMDA-рецепторы нейтрофилов, вызывает дозозависимое изменение их функциональной активности, проявляющееся в первую очередь устойчивой повышенной фагоцитарной активности и увеличенной выработки миелопероксидазы. Параллельный рост изучаемых показателей наблюдается при введении в краткосрочную культуру клеток гомоцистеина в концентрациях от 5 до 20 мкмоль/л. Более высокие дозы аминтиола вызывают уменьшение иммунологической активности клеток. Это можно объяснить тем, что высокие дозы гомоцистеина индуцируя активацию

перекисного окисления липидов и образование свободных радикалов, снижают окислительно-восстановительные реакции в митохондриях, разобщают процессы окисления и фосфорилирования, уменьшают биологическое окисление и как следствие этого – ослабление функциональной активности.

Выводы. Введение в краткосрочную культуру клеток периферической крови гомоцистеина в концентрации от 5 до 20 мкмоль/л вызывает дополнительную активацию нейтрофилов, введение более высоких уровней аминотиолов сопровождается снижением функциональной активности полиморфноядерных лейкоцитов.

Список литературы

1. Андрюков Б.Г. Защитные стратегии нейтрофильных гранулоцитов от патогенных бактерий / Б.Г. Андрюков, Л.М. Сомова, Е.И. Дробот, Е.В. Матосова // Здоровье. Медицинская экология. Наука. – 2017. – № 1 (68). – С. 4-18.
2. Потапнев М.П., Гущина Л.М., Мороз Л.А. Фенотипическая и функциональная гетерогенность субпопуляций нейтрофилов в норме и при патологии // Иммунология. – 2019. – Т. 40., № 5. – С. 84-96.
3. Ключева А.А. Нераскрытые свойства фагоцитов // Современные проблемы здравоохранения и медицинской статистики. 2017. – № 2. – С. 57-67.
4. Воробьева Н.В. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: новые аспекты // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. – 2020. – Т. 75. № 4. – С. 210-225.
5. Милютина Ю.П. Сравнение показателей окислительного стресса в сыворотке крови крыс при различных моделях гипергомоцистеинемии / Милютина Ю.П., Пустыгина А.В., Щербицкая А.Д., Залозная И.В., Арутюнян А.В // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук.– 2016. – Т. 1. № 3-2 (109). – С. 120-123.
6. Jakubowski H. Homocysteine thiolactone: metabolic origin and protein homocysteinylation in humans. J Nutr. 2000 Feb;130(2S Suppl):377S-381S. doi: 10.1093/jn/130.2.377S.
7. Esse R, Barroso M, Tavares de Almeida I, Castro R. The Contribution of Homocysteine Metabolism Disruption to Endothelial Dysfunction: State-of-the-Art. Int J Mol Sci. 2019 Feb 17;20(4):867. doi: 10.3390 / ijms20040867.
8. Бицадзе В.О. Внеклеточные ловушки нейтрофилов (nets) в патогенезе тромбоза и тромбовоспалительных заболеваний / Бицадзе В.О., Слуханчук

Е.В., Хизроева Д.Х., Третьякова М.В., Шкода А.С., Радецкая Л.С., Макацария А.Д., Элалами И., Грис Ж.К., Грандоне Э. // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2021. – Т. 76. № 1. – С. 75-85.

9. Joshi MB, Baipadithaya G, Balakrishnan A, Hegde M, Vohra M, Ahamed R, Nagri SK, Ramachandra L, Satyamoorthy K. Elevated homocysteine levels in type 2 diabetes induce constitutive neutrophil extracellular traps. Sci Rep. 2016 Nov 4;6:36362. doi: 10.1038 / srep36362.

10. Брюшкова Е.А. Влияние гомоцистеина на свойства нейтрофилов, активированных *in vivo* / Брюшкова Е.А., Владыченская Е.А., Степанова М.С., Болдырев А.А. // Биохимия. – 2011. – Т. 76. № 4. – С. 573-580.

© Т.В. Гайдукова, И.Р. Галак, И.А. Богданов, И.А. Решетников,
А.А. Балданов, 2023