УДК 616.155.3 – 008.1:612.014.46.

Фефелова Е.В., Терешков П.П., Максименя М.В., Цыбиков Н.Н.

ИНДУКЦИЯ АПОПТОЗА ЛЕЙКОЦИТОВ ПОД ВЛИЯНИЕМ АМИНОТИОЛОВ В КРАТКОСРОЧНОЙ КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК

ГБОУ ВПО Читинская государственная медицинская академия, г. Чита

Резюме. *Изучалось влияние гомоцистеина и гомоцистеина-тиолактона на процесс апоптоза лейкоцитов периферической крови условно здоровых добровольцев в краткосрочной культуре клеток периферической крови. Показано, что аминотиолы не активируют процесс апоптоза в моноцитах периферической крови, но индуцируют его в Т-, В-лимфоцитах и нейтрофилах. При этом пути активации программированной гибели клеток у гомоцистеина и гомоцистеина-тиолактона разные.*
Ключевые слова: *апоптоз, гомоцистеин, гомоцистеин-тиолактон, лейкоциты.*

E.V. Fefelova, P.P. Tereshkov, M.V. Maksimenya, N.N. Tsybikov

AMINO THIOL-INDUCED LEUKOCYTE APOPTOSIS IN SHORT TERM CELL CULTURE

Abstract. *We studied the role of homocysteine and homocysteine thiolactone in the process of leukocyte apoptosis in the short term cell culture of peripheral blood in conditionally healthy volunteers. Amino thiols were shown to induce the process of apoptosis in T- and B-lymphocytes and neutrophils rather than in peripheral blood monocytes. The mechanisms activating programmed cell death in homocysteines and homocysteine thiolactones are different.*
Key words: *apoptosis, homocysteine, homocysteine thiolactone, leukocyte*

Апоптоз – это физиологический процесс, направленный на элиминацию из организма, прежде всего генетически неаутентичных и дефектных клеток [4]. Реализация программы апоптоза клеткой может начинаться даже при слабом повреждении ее структур, так как это чревато возможным накоплением мутаций и онкотрасформацией клетки [1, 4]. Выделяют рецепторный и митохондриальный пути запуска программированной клеточной гибели, которые, как правило, протекают не изолированно, а дополняют и усиливают друг друга [8, 10]. Особое внимание в последнее время уделяется процессам регуляции апоптоза в клетке. В настоящее время описывают ряд веществ, осуществляющих регуляцию апоптоза и способных как стимулировать, так и ингибировать данный процесс. Одним из них является глутамат, реализующий свое действие через NMDA рецепторы. При концентрации этой аминокислоты свыше 3 мкмоль/л избирательно активируются AMPA-рецепторы, индуцирующие некротические процессы [7]. При этом, нарушается выработка межклеточных медиаторов, а это, в свою очередь, приводит к развитию вторичной альтерации [9, 11, 12, 13, 14].

Исследования последних лет показали, что гомоцистеин может взаимодействовать с сайтом связывания глутамата или глицина NMDA рецептора [2, 16], а значит, может быть рассмотрен как новый эндогенный активатор глутаматных рецепторов [3, 15, 17].

Нами, при моделировании экзогенной гипергомоцистеинемии было показано, что кардиомиоциты погибают как путем некроза, так и апоптоза, с преобладанием программированной клеточной гибели [7].

Цель работы. Изучение влияния гомоцистеина и гомоцистеина-тиолактона на процесс апоптоза лейкоцитов периферической крови условно здоровых добровольцев.

Материалы и методы исследования. Материалом для исследования являлась венозная кровь, полученная у 7 относительно здоровых, некурящих добровольцев – мужчин, средний возраст которых составил 34±5 лет. Кровь забирали из локтевой вены в пробирки с добавлением антикоагулянта – гепарина Li. Затем, по 1 мл крови помещали в 4 стерильные пластиковые пробирки, добавляли в каждую из них по 1 мл культуральной среды. Затем, в две из них вносили растворы либо гомоцистеина в концентрации 50 мкмоль/л, либо гомоцистеин-тиолактона в концентрации 50 нмоль/л. В третью добавляли NMDA в концентрации 50 мкмоль/л. В четвертую (контрольную) – эквивалентный объем физиологического раствора.

После 4х часов инкубации при 37^0С в 4,8% CO_2 определяли фенотип лейкоцитов, маркеры активации и экспрессию маркеров апоптоза.

Проточная цитофлюориметрия. Клетки периферической крови окрашивали пятицветной комбинацией моноклональных антител, панель комбинации антител приведена в таблице 1. Моноклональные антитела фирмы Beckman Coulter (США) были мечены FITC (изотиоцианат флуоресцеина), PE (фикоэритрин), ECD (комплекс PE с техасским красным), PC5 (комплекс PE с цианином-5) и PC7 (комплекс PE с цианином-7). Для удаления эритроцитов пробоподготовку проводили по безотмывочной технологии с использованием лизирующего раствора OptiLyse C (Beckman Coulter, США). Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлюориметре Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США).

Для корректного исключения из зоны анализа всех частиц, которые не соответствовали по размерам и гранулярности живым лимфоцитам и моноцитам вводили необходимые логические ограничения в гистограммы распределения частиц по малоугловому, боковому светорассеянию, CD45, CD3 и CD14. В каждой пробе анализировали не менее 10^4 клеток.

Математическую обработку цитометрических данных проводили при помощи программ CXP v. 2.2 и Kaluza™ v.1.2 (Beckman Coulter, США).

Таблица 1

Панель моноклональных антител, использованная для анализа экспрессии маркёров апоптоза на основных популяциях лимфоцитов, моноцитов и нейтрофилов периферической крови обследуемых лиц

Пробирка	Флуорохромы и меченые ими моноклональные антитела				
	FITC	PE	ECD	PC5	PC7
1	Annexin V	CD95	CD45	CD14	CD19
2	Annexin V	CD95	CD8	CD4	CD3
3	Annexin V	CD56	CD45	CD16	CD3
4	Annexin V	CD95	CD45	CD16	CD11b
5	CD4/CD19	CD178	CD8/CD14	Apo2.7	CD3

Получение мононуклеарных лейкоцитов проводили с помощью осаждения клеток на градиенте плотности фиколла-1,077 (Histopaque®-1077, Sigma, США). 1 мл разведенной крови наслаивали на 1 мл раствора фиколла-1,077 и центрифугировали в горизонтальном роторе при 400g в течение 30 минут. Мононуклеарные лейкоциты отбирали из интерфазного кольца, образовавшегося на границе смеси фиколла и разведенной крови, и отмывали 3 раза в культуральной среде. Количество клеток определяли на проточном цитофлюориметре "Cytomics FC-500" (Beckman Coulter, USA) используя панель моноклональных антител к CD14/CD45 конъюгированных с флуоресцентными красителями PC5/PC7, к панели добавляли ионный краситель 7-AAD (7-аминоактиномицин-D) для выявления живых клеток. В 1 мкл фракции содержалось 10000 клеток. Чистота мононуклеаров, полученных на градиенте плотности, составляла 96-98%. Затем фракцию мононуклеаров замораживали. В лизатах определяли концентрацию Bcl ELISA методом с использованием тест-набора «eBioscience» (Австрия).

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью программы Statistica 6.1 (StatSoft). Описательная статистика представлена в виде «среднее значение ± среднеквадратическое отклонение»; сравнение зависимых выборок проводили с помощью критерия Вилкоксона; сравнение независимых выборок – U-критерия Манна-Уитни. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали $p < 0,05$.

Результаты. К наиболее важным регуляторам апоптоза относятся индукторы гибели клетки, в частности, поверхностный рецептор Fas (CD95, APO-1), его лиганд (CD 178) и белки семейства Bcl-2, ингибирующие апоптоз [10].

Ранним маркером апоптоза является экспрессия APO 2.7 [5]. В последующем, на мембране клеток, появляются отрицательно заряженные фосфолипиды внутреннего слоя цитоплазматической мембраны (в частности, фосфатидилсерин) [18]. Для выявления этого события используется аннексин V (Ann V) с различными флюорохромами [10].

При исследовании маркеров апоптоза в популяции лейкоцитов периферической крови обнаружено, что экспрессия поверхностного рецептора Fas увеличивается под влиянием всех изучаемых веществ. В большей степени при внесении в культуру клеток гомоцистеина-тиолактона (в 3,16 раз (p=0,00017) и в меньшей степени – гомоцистеина (на 77,1% (p=0,00001)). При этом количество фосфатедилсерина на внешней мембране клеток под воздействием гомоцистеина возрастала в 165,3 раза (p=0,000001), гомоцистеина-тиолактона – в 21,67 раз (p=0,00003), а NMDA – в 16,3 раза (p=0,00001). Содержание Bcl-2 в пересчете на 1 клетку наиболее выражено увеличивалось при внесении NMDA – в 4,6 раз (p=0,000001). Гомоцистеин вызвал рост этого показателя на 36,76%, а гомоцистеин-тиолактон – в 2,25 раз (p=0,00001) (табл. 2).

Таблица 2

Маркеры апоптоза в популяции лейкоцитов в образцах периферической крови здоровых добровольцев, %, (M±SD)

Показатели	CD 45 Ann V	CD 45+ CD95+	Bcl/WBC, pg/cells
Контроль инкубации	0,015±0,015	0,22±0,19	0,62±0,09
С добавлением гомоцистеина	0,43±0,33 p=0,00001	1,78±1,49 p=0,00001	4,28±3,58 p=0,0018
С добавлением гомоцистеин-тиолактона	0,33±0,21 p=0,00003 p1=0,0004	0,69±0,19 p=0,00017 p1=0,001	1,53±0,15 p=0,00001 p1=0,014
С добавлением NMDA	0,25±0,07 p=0,00001 p1=0,0005 p2=0,1	0,64±0,33 p=0,0014 p1=0,001 p2=0,1	3,13±1,06 p=0,00001 p1=0,3 p2=0,00003

Примечание: p – <0.05 по сравнению с контролем инкубации, p_1 – <0.05 по сравнению с образцами с добавлением гомоцистеина, p_2 – <0.05 по сравнению с образцами с добавлением гомоцистеина-тиолактона.

Полученные данные свидетельствуют о том, что механизмы запуска апоптоза под влиянием гомоцистеина и гомоцистеина-тиолактона, по-видимому, разные: гомоцистеин-тиолактон и NMDA – посредством активации NMDA-рецепторов, а гомоцистеин – либо путем активации других рецепторов, либо – митохондриальным.

Для уточнения механизмов активации программированной гибели клеток под влиянием аминотиолов в дальнейшем мы изучали количество клеток, с наличием Fas-рецептора, его лиганда (CD178), экспрессию фосфатидилсерина и APO 2.7 на поверхности различных лейкоцитов периферической крови.

В популяции нейтрофилов количество клеток, несущих CD95 увеличилось под влиянием всех изучаемых веществ: NMDA – в 6,48 раз (p=0,000001), гомоцистеина – в 4,1 раз (p=0,000001), гомоцистеина-тиолактона – в 2,69 раз (p=0,000001), при этом количество аннексин V позитивных клеток возросло в исследуемых образцах одинаково в 3,7 раз (p= 0,000002 и 0,000001 соответственно) (рис. 1).

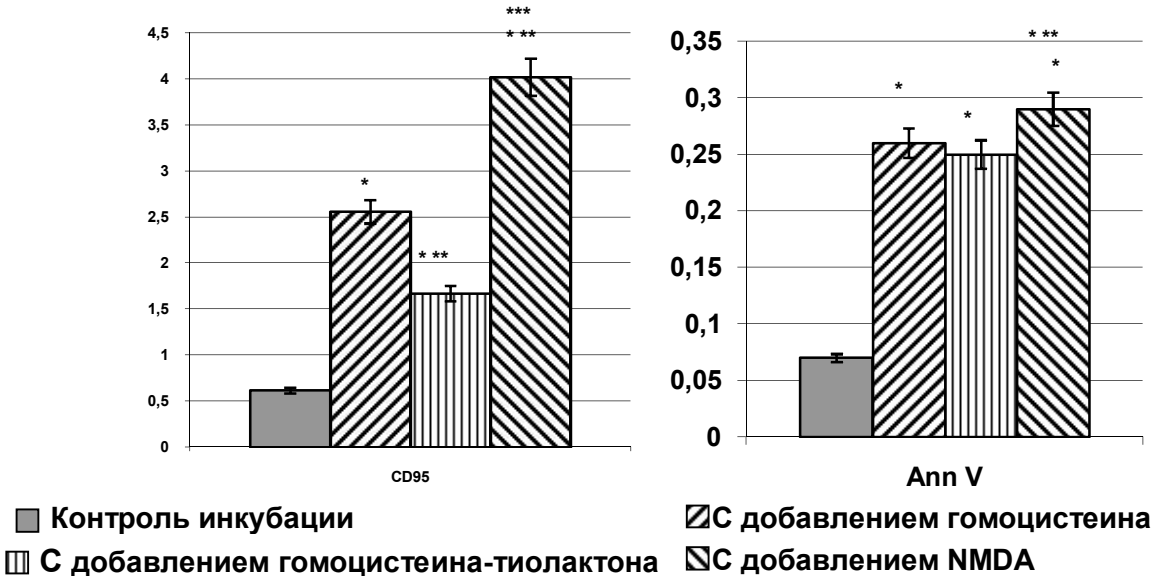

Рисунок 1. Экспрессия CD95 и Ann V на мембране нейтрофилов
под воздействием аминотиолов и глутамата, %

Примечание: * – p<0.05 по сравнению с контролем инкубации, ** – p<0.05 по сравнению с образцами с добавлением гомоцистеина, *** – p<0.05 по сравнению с образцами с добавлением гомоцистеина-тиолактона.

Активации апоптотического процесса под влиянием изучаемых веществ в моноцитах периферической крови не выявлено: Зафиксировано лишь увеличение клеток, с наличием Fas-рецептора на 66,05% (p=0,027) при внесении в культуру клеток гомоцистеина-тиолактона, при этом, в этих же образцах обнаружено снижение Fas-лиганда на 16,43% (p=0,015) по сравнению с контролем инкубации. Маркеры же и раннего и позднего этапа апоптоза не изменялись. Следовательно, данные изменения можно проинтерпретировать лишь как готовность моноцитов к рецепции апоптогенного сигнала (рис. 2).

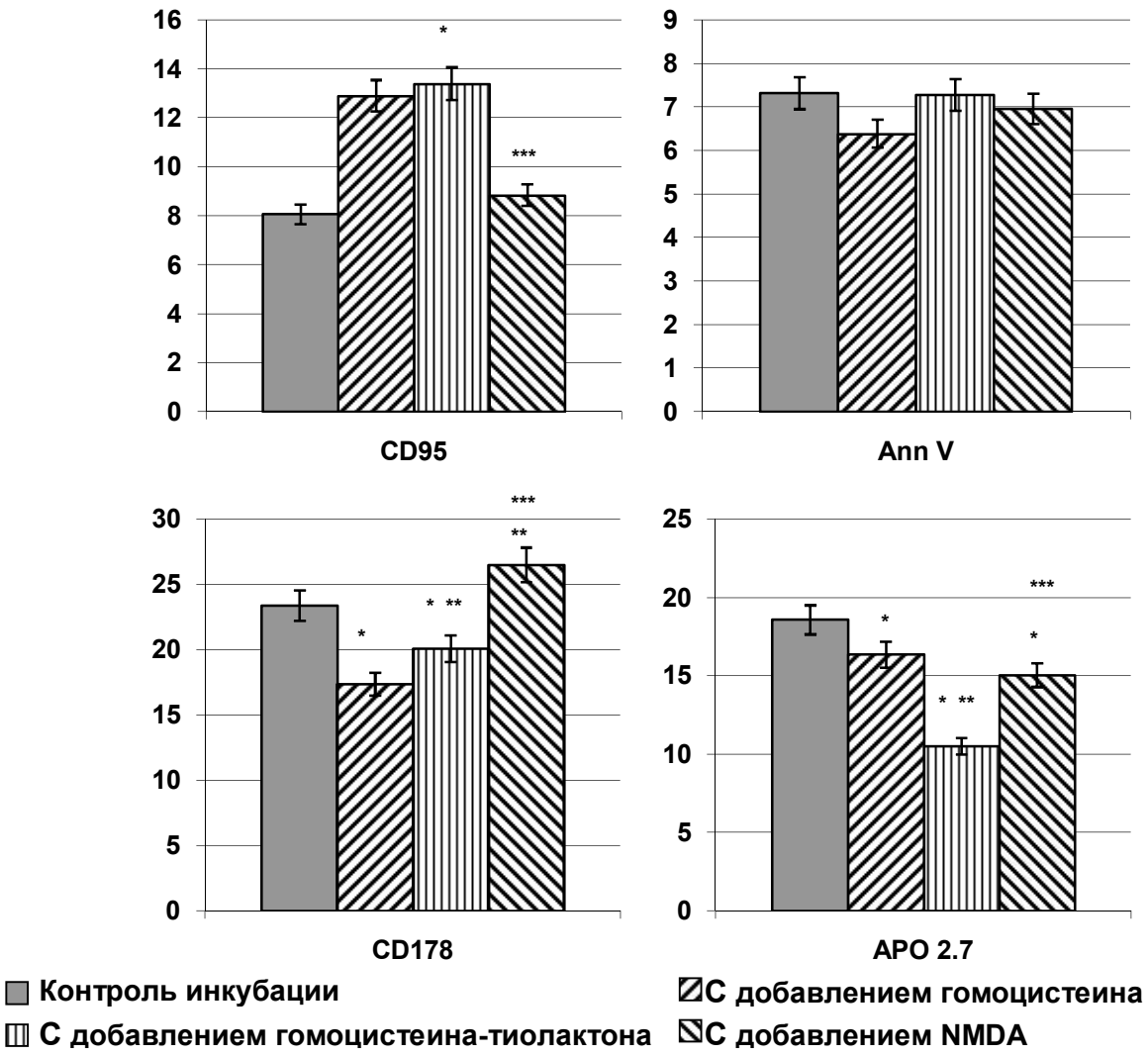

Рисунок 2. Экспрессия маркеров апоптоза моноцитами периферической крови под влиянием аминотиолов и NMDA, %

Примечание: * – p<0.05 по сравнению с контролем инкубации, ** – p<0.05 по сравнению с образцами с добавлением гомоцистеина, *** – p<0.05 по сравнению с образцами с добавлением гомоцистеина-тиолактона.

Ответ В-лимфоцитов на влияние гомоцистеина и гомоцистеина-тиолактона был разным. Так, количество Fas-рецептора не изменялось под воздействием гомоцистеина, а экспрессия фосфатидилсерина и APO 2.7 увеличивалась в большей степени, чем при внесении в культуру клеток гомоцистеин-тиолактона – в 13,69 (p=0,0013) и 4,97 раз (p=0,00001) против в 5,92 (p=0,000004) и 4,03 раз (p=0,00024) (рис. 3).

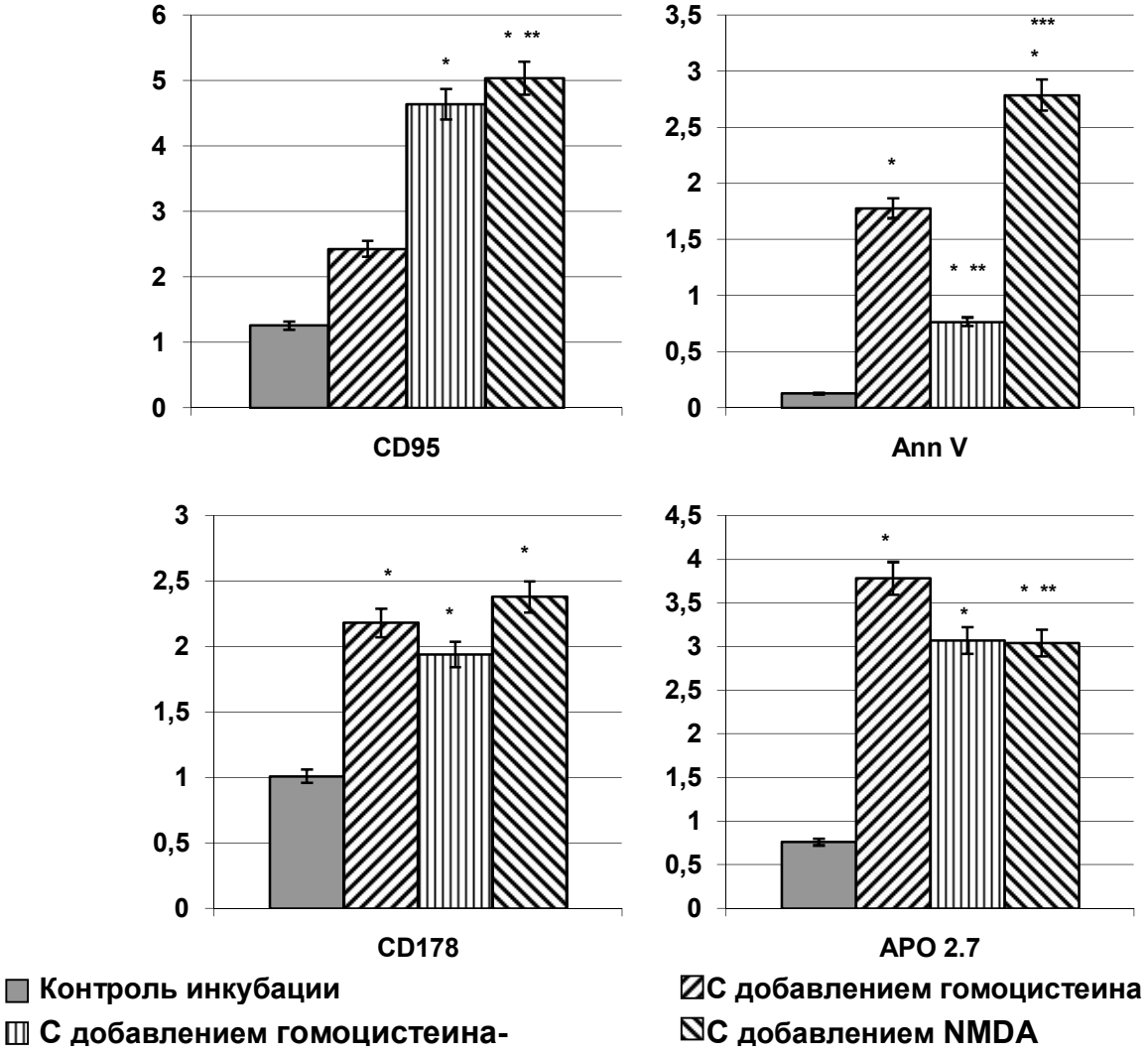

Рисунок 3. Экспрессия маркеров апоптоза В-лимфоцитами периферической крови под влиянием аминотиолов и NMDA, %

Примечание: * – p<0.05 по сравнению с контролем инкубации, ** – p<0.05 по сравнению с образцами с добавлением гомоцистеина, *** – p<0.05 по сравнению с образцами с добавлением гомоцистеина-тиолактона.

В общей популяции Т-лимфоцитов зарегистрировано увеличение экспрессии Fas-рецептора под влиянием аминотиолов, причем в большей степени при внесении гомоцистеина-тиолактона (в 1,71 раз (p=0,00017) и снижение этого показателя под воздействием глутамата на 10,1 % (p=0,0014).

Рост экспрессии отрицательно заряженных фосфолипидов внутреннего слоя цитоплазматической мембраны был зарегистрирован под влиянием всех изучаемых веществ, примерно в одинаковой степени (табл. 3).

Таблица 3

Маркеры апоптоза в популяции Т-лимфоцитов в образцах периферической крови здоровых добровольцев, %, (M± SD)

	CD3+ Ann V	CD3+CD95+
Контроль инкубации	0,06±0,0049	1,79±0,54
С добавлением гомоцистеина	0,41±0,32 p=0,00001	2,36±1,04 p=0,00001
С добавлением гомоцистеин-тиолактона	0,35±0,09 p=0,00003	3,06±1,89 p=0,00017

	p1=0,0004	p1=0,001
С добавлением NMDA	0,33±0,13 p=0,00001 p1=0,0005 p2=0,1	1,61±0,60 p=0,0014 p1=0,001 p2=0,1

Примечание: p – уровень статистической значимости различий по сравнению с контролем инкубации, p_1 – уровень статистической значимости различий образцов с добавлением гомоцистеина, p_2 – уровень статистической значимости различий образцов с образцами с добавлением гомоцистеина-тиолактона.

Динамика изменений маркеров программированной гибели клеток в популяции Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов носила одинаковый характер, но отличалась степенью выраженности. Так, в популяции Т-хелперов количество клеток несущих на своей мембране как Fas-рецептора, так и его лиганд увеличивалось под влиянием гомоцистеина в 7,57 раз (p=0,00001) и 7,86 раз (p=0,000001). В то время, как у цитотоксических лимфоцитов в 3,38 (p=0,00001) и 1,68 (p=0,011) раз соответственно. Нарастание маркеров раннего и позднего апоптоза так же более выражено в популяции Т-хелперов. Под влиянием гомоцистеина-тиолактона, напротив, уровень CD95+ и CD178+ резко возрастал в популяции цитотоксических лимфоцитов (рис. 4 и 5).

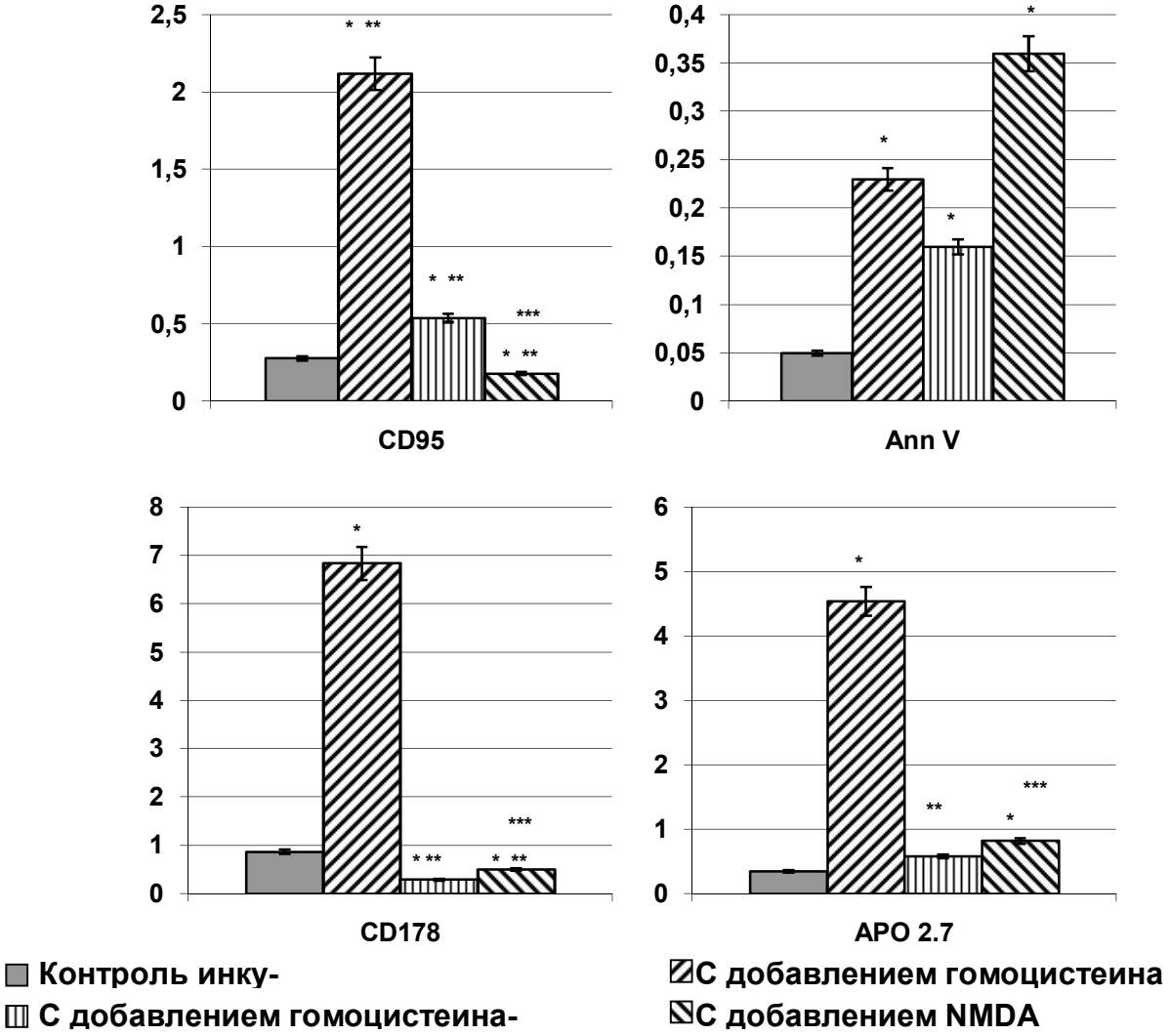

Рисунок 4. Экспрессия маркеров апоптоза Т-хелперов периферической крови под влиянием аминотиолов и NMDA, %

Примечание: * – p<0.05 по сравнению с контролем инкубации, ** – p<0.05 по сравнению с образцами с добавлением гомоцистеина, *** – p<0.05 по сравнению с образцами с добавлением гомоцистеина-тиолактона.

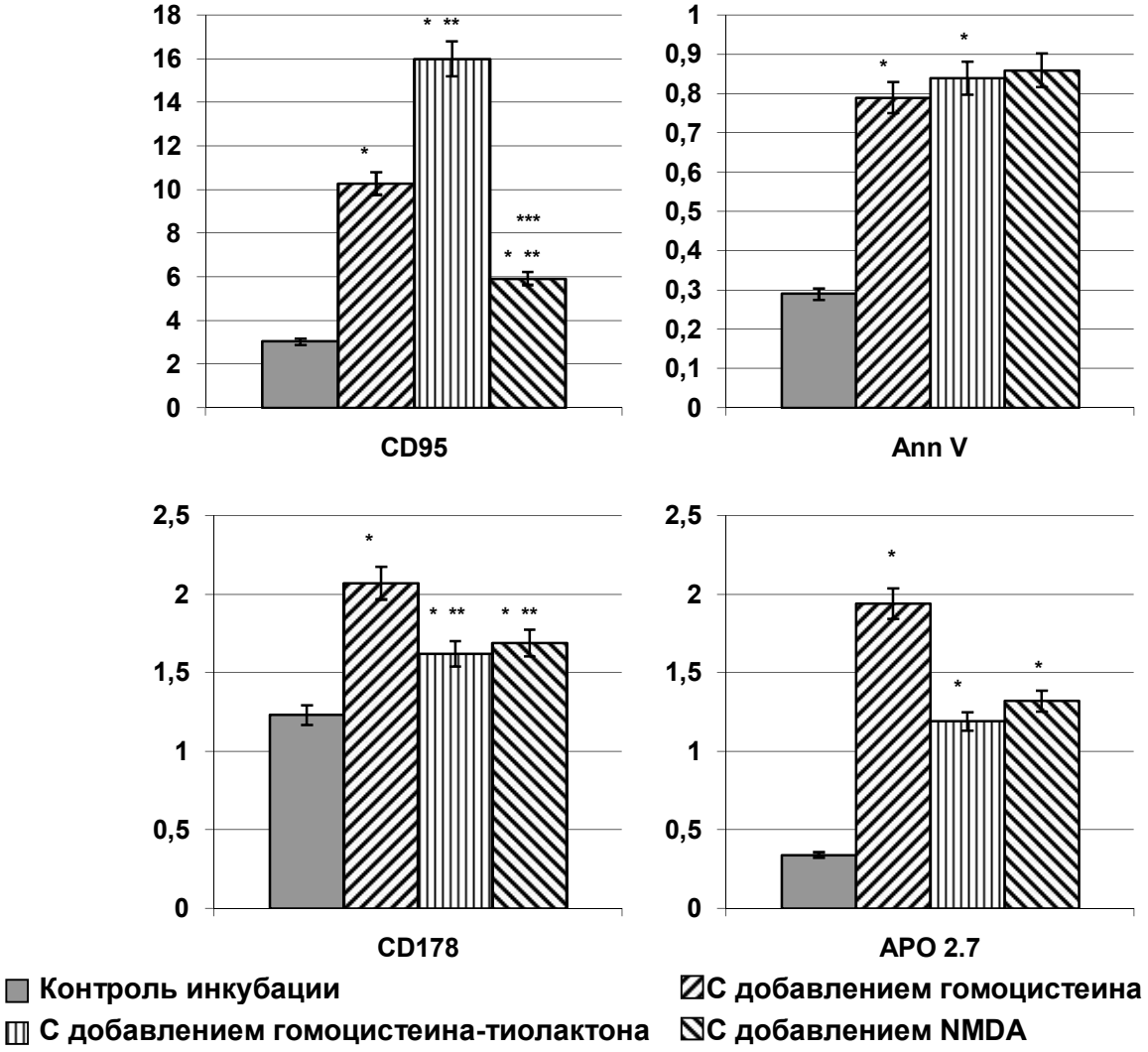

Рисунок 5. Экспрессия маркеров апоптоза цитотоксических Т-лимфоцитов периферической крови под влиянием аминотиолов и NMDA, %

Примечание: * – p<0.05 по сравнению с контролем инкубации, ** – p<0.05 по сравнению с образцами с добавлением гомоцистеина, *** – p<0.05 по сравнению с образцами с добавлением гомоцистеина-тиолактона.

Таким образом, можно сделать вывод, что и гомоцистеин и гомоцистеин-тиолактон индуцируют программированную гибель клеток. При этом пути ее активации у гомоцистеина и гомоцистеина-тиолактона разные.

Литература:

1. Белушкина Н.Н. Заболевания, связанные с нарушением регуляции программируемой клеточной гибели / Н.Н. Белушкина, Т.Н. Хомякова, Ю.Н. Хомяков // Молекулярная медицина. – 2012. – № 2. – С. 3-10.
2. Болдырев А.А. NMDA-рецепторы в клетках иммунной системы / А.А. Болдырев, Е.А. Брюшкова, Е.А. Владыченская // Биохимия. – 2012. – Т. 77, №2. – С. 160-168.
3. Болдырев А.А. Почему токсичен гомоцистеин? / А.А. Болдырев // Природа. – 2009. – №10. – 18-23.
4. Едранов С.С. Апоптоз как фактор организации посттравматического воспаления // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2012. – №2. – С. 100-104.
5. Кайгородова Е.В. Белки теплового шоке и митогенактивированные протеинкиназы JNK, P38: роль в адаптации и дизрегуляции клетки при стрессиндуцированном апоптозе / Е.В.

Кайгородова, Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий // Молекулярная медицина. – 2012. – № 1. – С. 3-9.
6. Миронова Е.В. Механизмы токсического действия глутамата в нейронах коры головного мозга : автореф. дис… канд. биол. наук : 03.00.13 / Е.В. Миронова. – Санкт-Петербург, 2007. – 26 с.
7. Морфофенотипические изменения миокарда крыс при экспериментальной гипергомоцистеинемии / Е.В. Фефелова [и др.] // Забайкальский медицинский вестник. – 2015. – №4. – С.145-150.
8. Пальцев М.А. Межклеточные взаимодействия / М.А. Пальцев, А.А. Иванов, С. Е. Северин. – 2-е изд., перераб. и доп. – М., 2003. – 288 с.
9. Результаты исследования эффективности синтетического иммуностимулятора нового поколения / А.В. Степанов [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2012. – №12 (1). – С.142-145.
10. Современные методы и подходы к изучению апоптоза в экспериментальной биологии / И.В. Кудрявцев [и др.] // Медицинская иммунология. – 2012. – Т.14, № 6. – С.461-482.
11. Степанов А.В. Влияние синтетических пептидов сумки Фабрициуса на функциональную активность макрофагов / А.В. Степанов, В.Л. Цепелев. // Забайкальский медицинский вестник. – 2014. – № 2. – С. 44-47.
12. Степанов А.В. Иммуностимулятор из центрального органа гуморального иммунитета – сумки Фабрициуса / А.В. Степанов, В.Л. Цепелев, С.Л. Мельникова // Сибирский медицинский журнал. – 2013. – № 2. – С. 32-34.
13. Степанов А.В. Механизмы коррегирующего действия полипептидов из лимфоидной ткани при иммунодефицитных состояниях и воспалении : автореф. дис. докт. мед. наук : 14.03.00 / А.В. Степанов. – Иркутск, 1995. – 40 с.
14. Цепелев В.Л. Влияние регуляторных пептидов на продукцию провоспалительных цитокинов / В.Л. Цепелев, А.В. Степанов // Забайкальский медицинский вестник. – 2015. – № 2. – С. 147-150.
15. Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor / S. A. Lipton [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1997. – V. 94, № 11. – P. 5923-5928.
16. Poddar R. Homocysteine-NMDA receptor-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase leads to neuronal cell death / R. Poddar, S. Paul // J. Neurochem. 2009. – V. 110, № 3. – P. 1095- 1106.
17. Streck E.L. Reduction of Na+, K+-ATPase activity in hippocampus of rats subjected to chemically-induced hyperhomocysteinemia / E.L. Streck [et al.] // Neurochem. – 2002: – Vol. 27. – P.1585-1590.
18. The role of phosphatidiylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes / V.A. Fadok [et al.] // Cell Death Differ. – 1998. – № 5. – P. 551–62.