УДК 616.153 – 092.19 – 6 – 9

Фефелова Е.В., Изместьев С.В., Цыбиков Н.Н., Терешков П.П.

ОТВЕТ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ НА МОДИФИКАЦИЮ АМИНОТИОЛАМИ БЕЛКОВЫХ СТРУКТУР ОРГАНИЗМА

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Читинская государственная медицинская академия Министерства здравоохранения Российской Федерации

Резюме.
Целью *исследования явилось изучение ответа организма на модификацию альбумина аминотиолами в эксперименте и клинике.*
Материалы и методы. *Конъюгат гомоцистеина с сывороточным альбумином получали путем его инкубации в течение 24 часов при температуре 4°С и 60 минут – 37°С с сывороточным альбумином. Моделировали гипергомоцистеинемию у интактных крыс и животных с иммунодефицитом, вызванном введением циклофосфана, путем введения аминотиолов в дозе 100 мкмоль на 1 мл ОЦК. Кровь забирали из подключичной вены животных, до, через 6 часов и 9 суток внутрибрюшинного введения гомоцистеина и гомоцистеина-тиолактона. РПГА проводили с определением всех классов Ig и цистеин-устойчивых антител (класса IgG). В исследовании приняли участие кардиологические больные, мужского пола в возрасте от 40 до 60 лет, находившихся на стационарном лечении. В группу контроля вошли практически здоровые лица, сопоставимые по полу и возрасту (12 человек).*
Результаты. *Показано, что 40% гомоцистеина комплексировалось с альбумином с образованием модифицированного белка в условиях in vitro. У интактных крыс до нагрузки аминотиолами были обнаружены аутоантитела к альбумину, модифицированному гомоцистеином. Нагрузка тиолами вызвала рост уровня Ig. Содержание гомоцистеина у крыс с иммунодефицитом в 2 раза выше, чем у интактных животных. Спустя 6 часов после инъекции аминотиолов его уровень в сыворотке крови у крыс с ИДС в 3 раза превышал значения в группе контроля, через 9 дней – не отличался от содержания до нагрузки аминотиолами. При оценке уровня аутоантител к модифицированному альбумину в сыворотке крови здоровых и больных различными формами ИБС, выявлено, что максимальный титр IgG против модифицированного гомоцистеином альбумина наблюдается у больных стабильной и прогрессирующей стенокардией.*
Заключение. *Иммунная система активно включается в механизмы элиминации излишков гомоцистеина, изменяющих антигенную структуру белков организма.*
Ключевые слова: *гипергомоцистеинемия, модификация белка, иммунный ответ.*

Fefelova E.V., Izmestyev S.V., Tsybikov N.N., Tereshkov P.P.

SYSTEMIC RESPONSE ON MODIFICATIONS BY AMINOTHIOLS PROTEINIC STRUCTURES OF ORGANISM

Chita state medical academy

Summary.
The aim of investigation is study of systemic response on modifications of albumins by aminothiols in experiments and clinics.
Materials and methods. *Serum albumin is conjugated with homocysteine by incubations during 24 hours in temperature 4°C and 60 minutes in temperature 37°C. Hyperhomocysteinemia is designed in intact rats and immunodeficiensy animals by introduction of aminothiols in dose 100 micromole on 1 ml of blood volume. Immunodeficiensy in animals is designed by introduction of cyclophosphan. Blood is take from subclavicular vein of animals before, after 6 hours and after 9 days of intraperitoneal introduction of homocysteine and homocysteine-thiolactone. Reaction of passive hemagglutination is carry out with identification of all class of Ig and cysteine-resisted IgG. In clinical research is take part cardiac patients of male sex, from 40 – to 60 years old. Patients are received stationary treatment. In control group are included practically healthy, comparable in sex and age peoples (12 persons).*
Results. *In investigation are demonstrated, that 40% of homocysteine is conjugated with serum albumin with generation of modify proteins in vitro.*
In intact rats before introduction of aminothiols whose detected autoantibodies to homocysteinylated albumin. Introduction of thiols is result in elevation of autoantibodies level.

Content of homocysteine in rats with immunodeficiensy is twice as large than in intact animals. Homocysteine level in blood serum of rats with immunodeficiensy three times as more then control group after 6 hours of aminothiols injection. After 9 days homocysteine level whose not differ from content before introductions of aminothiols.
In assessment of level of autoantibodies to modify albumin in blood serum of health peoples and patients with different forms of CAD is identified that maximal titre of IgG against homocysteinylated albumin are observed in patient with stable and progressive stenocardia.
Conclusion. *Immune system is actively included in eliminations mechanisms of homocysteine surpluses, which changed of antigen structure of organisms proteins.*
Key words: *hyperhomocysteinemia, modification of proteins, immune response.*

Проблема гипергомоцистеинемии в последнее время привлекает все большее внимание исследователей, так как увеличение уровня гомоцистеина в сыворотке крови является одним из ведущих факторов риска развития и смертности от сердечно-сосудистых заболеваний [7]. Предположительных механизмов повреждающего действия гипергомоцистеинемии довольно много. Так, показано, что данное состояние сопровождается активацией окислительного стресса [5]. Образование свободных радикалов вызывает повреждение эндотелиоцитов [8], инактивацию оксида азота, модификации различных структур организма [1], в том числе и ЛПНП [1], что приводит к развитию атеросклеротического процесса и гипертонической болезни [7, 9]. Наряду с этим было показано, что в нейронах и астроцитах гомоцистеин оказывал антиоксидантный эффект [15].

Цель исследования. Изучить ответ организма на модификацию альбумина аминотиолами в эксперименте и клинике.

Материалы и методы исследования. *Конъюгирование гомоцистеина с сывороточным альбумином человека in vitro.* Гомоцистеин в концентрации 150 мкмоль/л инкубировали с 5% сывороточным альбумином человека в течение 24 часов при температуре 4°С и 60 минут – 37°С. Затем полученный образец подвергли центрифугированию с ультрафильтрацией с порогом разделения по молекулярной массе 50 КДа с целью отделить свободный ГЦ от образовавшего конъюгаты с альбумином. Ультрафильтрацию проводили с помощью набора для центрифужной микрофильтрации Amicon Ultra, 0.5 мл, 50 КДа (Millipore, USA). Объем супернатанта 500 мкл. Ультрацентрифуга Sigma 3-30K, ротор 12100, 15 мин при 14.000 g. Концентрацию ГЦ в образцах до фильтрации, после фильтрации и в фильтрате определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовой детекцией при 330 нм, и разделением на колонке Chromolith 100 × 4,6 мм, с использованием в качестве элюента ацетонитрил – 0,05 М, лимонную кислоту (10:90, v/v) [6].

Изучение влияния экзогенной гипергомоцистеинемии на организм животного. Животные всех исследуемых групп содержались в стандартных идентичных условиях. Экспериментальное исследование проводилось в соответствии с требованиями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются в исследовательских и других научных целях» (Strasburg, 18.03.1986 г.).

Моделирование гипергомоцистеинемии у интактных крыс и животных с иммунодефицитом. В эксперимент включены сорок белых беспородных крыс-самцов, средней массой 150 г, из которых у двадцати крыс вызывали иммунодефицит, другие двадцать составили контрольную группу.

На первом этапе получали модель иммунодефицита путем внутрибрюшинного введения раствора циклофосфана быстрорастворимого (ООО «ЛЭНС-фарм». Регистрационный номер: Р N 000459/01) в дозе 100 мг/м^2 2 раза в неделю. Расчет площади поверхности тела животных производили по формуле Миха: S (см^2) = К$^3\sqrt{m^2}$ (г), где К – коэффициент, равный для крысы – 9,13–11,05.

Наличие иммунодефицита подтверждали определением иммунограммы методом проточной цитофлюориметрии. Для иммунофенотипирования кровь забирали в пробирку Vacutainer (BD), содержащую динатриевую соль ЭДТА, объемом 2,5 мл. Оценку субпопуляционной структуры лимфоцитов осуществляли стандартным методом прямого трехпараметриче-

ского иммунофлюоресцентного окрашивания цельной крови с использованием коммерческого лизирующего/фиксирующего раствора VERSALYZE/IOTest3 (Beckman Coulter) и панели моноклональных антител IOTest (Beckman Coulter): первая панель – CD3-FITC/CD4-PC7/CD8-APC; вторая панель – CD3-FITC/CD45RA-PC7/CD161a-APC. Контрольные пробы инкубировали с иммуноглобулинами, мечеными флуорохромами (FITC, PC7, APC) соответствующего изотипа – мышиные IgG1, IgG2a IOTest (Beckman Coulter). Цитофлюориметрию осуществляли на проточном цитофлюориметре «Cytomics FC-500» (Beckman Coulter, USA), при этом регистрировали суммарно не менее 10000 событий. Данные анализировали с помощью программы CXP Cytometer (Beckman Coulter).

На втором этапе у крыс забирали кровь из подключичной вены, затем десяти интактным и десяти крысам с иммунодефицитом ввели гомоцистеин в концентрации 100 мкмоль на 1 мл ОЦК. Другим десяти интактным и десяти иммунодефектным крысам ввели гомоцистеин-тиолактон в дозе 100 мкмоль на 1 мл ОЦК. Расчет ОЦК крысы проводили в соответствии с соотношением 5-7 мл/100 г веса. Через 6 часов после инъекции гомоцистеина и гомоцистеин-тиолактона кровь забирали вновь. Далее ежедневно вводили гомоцистеин и гомоцистеин-тиолактон в течение девяти дней интактным крысам и животным с иммунодефицитом, после чего вновь проводили забор крови. Животных выводили из эксперимента путем летальной кровопотери под наркозом.

Изучение ответа животного на модифицированый альбумин крысы. Получение крысиного альбумина осуществляли центрифугированием сыворотки крови с ультрафильтацией с порогом разделения 100 кДа для отделения крупнодисперсных белков, а затем ультрафильтрацией с порогом 60 кДа с целью отделить белки меньшей молекулярной массы.

Далее получали модифицированный крысиный альбумин и конъюгировали его глутаровым альдегидом на эритроцитах.

Гомоцистеин-тиолактон ("Fluco", Германия) в концентрации 150 мкмоль/л инкубировали с 5% сывороточном альбумином крысы в течение 24 часов при температуре 4°С и 60 минут – при 37°С. Гомоцистеином крысиный альбумин модифицировали также как сывороточный альбумин человека.

Трижды отмытый физиологическим раствором осадок эритроцитов охлаждали до 0°С на водяной бане. 25% глутаровый альдегид разводили до 1% раствором следующего состава: 1 часть 0,15 М Na_2HPO_4 с pH 8,2 + 9 частей 0,15 М NaCl + 5 частей дистиллированной воды, охлаждали смесь на ледяной бане. Отмытые эритроциты разводили 1% глутаровым альдегидом до 5% суспензии, инкубировали 30 мин при 0°С при периодическом перемешивании (фиксация). Фиксированные эритроциты отмывали 5 раз 0,15 М NaCl и 5 раз дистиллированной водой.

Отмытый осадок фиксированных эритроцитов в объеме 0,5 мл добавляли к 2,5 мл раствора модифицированного альбумина в 0,15 М фосфатном буфере с pH 7,4. Смесь инкубировали 1 час при комнатной температуре. После трехкратной отмывки эритроциты, конъюгированные модифицированным альбумином, использовали для проведения РПГА.

РПГА проводили в двух вариантах: с определением всех классов Ig и с определением цистеин-устойчивых антител (класса IgG) согласно методическим рекомендациям по постановке реакции пассивной гемагглютинации с цистеиновой пробой с целью диагностики сальмонеллезов (Центральный НИИ эпидемиологии Министерства здравоохранения СССР). Основанием для подобного дифференцированного определения иммуноглобулинов является то, что при обработке сыворотки некоторыми редуцирующими веществами, в частности цистеином, IgG-антитела относительно устойчивы, тогда как IgM и IgA-антитела не специфически инактивируются, выпадая в осадок, что связано с большей молекулярной массой их по сравнению с IgG. Это позволяет определить удельное содержание IgG в сыворотке.

Цистеин в соотношении 15 мг на 1 мл растворяли 0,1 М раствором NaOH и при значении pH 7,0-7,2 доводили до нужного объема 0,85% раствором NaCl. Одну часть сыворотки экспериментальных крыс, разведенную 1:5 физиологическим раствором, смешивали с равным объемом раствора цистеина, помещали в пробирку и заливали слоем стерильного вазе-

линового масла, вторую часть сыворотки (без цистеина) также заливали слоем вазелинового масла. Пробирки с сыворотками, обработанными и необработанными цистеином, выдерживали в термостате при 37°С в течение 18 часов.

Далее обе части сыворотки титровали в нескольких парных рядах соответственно числу эритроцитарных диагностикумов, начиная с разведения 1:30, в планшетах для иммунологических реакций однократного применения. Для разведения использовали забуференный 0,85% раствор NaCl (фосфатный буфер с pH 7,0-7,2). Эритроциты, конъюгированные глутаровым альдегидом с альбумином, модифицированным гомоцистеином и гомоцистеинтиолактоном, в 2,5% разведении вносили в каждую лунку разведения сыворотки в равном объеме (0,1 мл). Каждый эритроцитарный диагностикум вносили в два ряда разведений сыворотки (обработанной и необработанной цистеином). В одну из лунок, содержащую растворитель без испытуемой сыворотки, вносили равный объем диагностикума для контроля спонтанной агглютинации. Контролем служили разведения исследуемых сывороток с несенсибилизированными эритроцитами, а также с эритроцитами, сенсибилизированными не модифицированным альбумином. Через 2 часа учитывали результаты по обычной для РПГА методике. Положительной считали реакцию в случае образования ровного слоя агглютинированных эритроцитов по всей поверхности лунки («зонтик»), отрицательной – компактный осадок эритроцитов в центре лунки («пуговка»). Количественную оценку проводили через отрицательный десятичный логарифм от титра разведения сыворотки, при котором регистрировалась положительная реакция.

Характеристика исследуемых групп. У исследуемых лиц осуществляли забор венозной крови системой Vacutainer натощак. В работе с обследуемыми людьми соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинкской Декларацией Всемирной медицинской ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki 1964, 2000 ред.). Проведена экспертиза исследования в локальном этическом комитете ГБОУ ВПО ЧГМА.

В исследование приняли участие кардиологические больные, мужского пола в возрасте от 40 до 60 лет, находившихся на стационарном лечении. Критериями исключения из исследования служили: острый пиелонефрит, гломерулонефрит, острая патология желудочно-кишечного тракта, органов дыхания, патология щитовидной железы, сахарный диабет, онкозаболевания, псориаз, прием лекарственных препаратов, повышающих уровень гомоцистеина, курение, вегетарианство.

В группу контроля вошли практически здоровые лица, сопоставимые по полу и возрасту (12 человек).

Первую группу составили больные с диагнозом ИБС: стабильная стенокардия III ФК, осложнения: НК II А, III ФК (32 человека). Диагноз выставлен на основании синдрома ангинозных болей (сжимающего, давящего характера, локализованных за грудиной, связанных с небольшой физической нагрузкой, купирующихся приемом нитратов), синдрома хронической сердечной недостаточности (одышка смешанного характера при небольшой физической нагрузке – ходьба до 100 м, подъем на 1 этаж), данных ЭКГ и коронароангиографии.

Вторая группа – ИБС: острый коронарный синдром без подъема сегмента ST, осложнения: НК II А, III ФК (12 человек). Диагноз выставлен на основании отрицательной динамики ангинозного синдрома (учащение и усиление ангинозных болей, увеличение дозы потребляемых нитратов, снижение толерантности к физической нагрузке, данных ЭКГ), с исключением острого инфаркта миокарда.

Третья группа – больные с Q-инфарктом миокарда в острую стадию (10 человек). Диагноз выставлен на основании синдрома ангинозных болей, синдрома ЭКГ-изменений, резорбционно-некротического синдрома, синдрома острой левожелудочковой недостаточности, аритмического синдрома. У данной группы материал забирали в первые и седьмые сутки госпитализации.

Статистическая обработка результатов проводилась в программе STATISTICA 6.0 с расчетом критерия Манна-Уитна. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Полученные результаты. В последнее время большое внимание уделяется изучению образования химических связей ГЦ с белками организма, что приводит к их модификации и превращению в неоантигены, способных индуцировать иммунный ответ. Имеются данные, что гипергомоцистеинемия индуцирует появление аутоантител [1, 11, 12].

Для изучения этого процесса мы получали комплекс сывороточного альбумина с гомоцистеином. Модификация альбумина с гомоцистеином осуществлялась способом, описанным в главе «Материалы и методы исследования».

Оказалось, что содержание гомоцистеина в образце до фильтрации составило 189,3 нг/мкл, после фильтрации и десорбции с фильтра – 74,3 нг/мкл, в фильтрате – 120 нг/мкл. Данные отображены на хроматограммах (рис. 1). Следовательно, 40% гомоцистеина комплексировалось с альбумином с образованием модифицированного белка в условиях in vitro. В условиях in vivo, как известно из литературных источников, около 70% гомоцистеина в плазме крови образует связь с альбумином [3, 4].

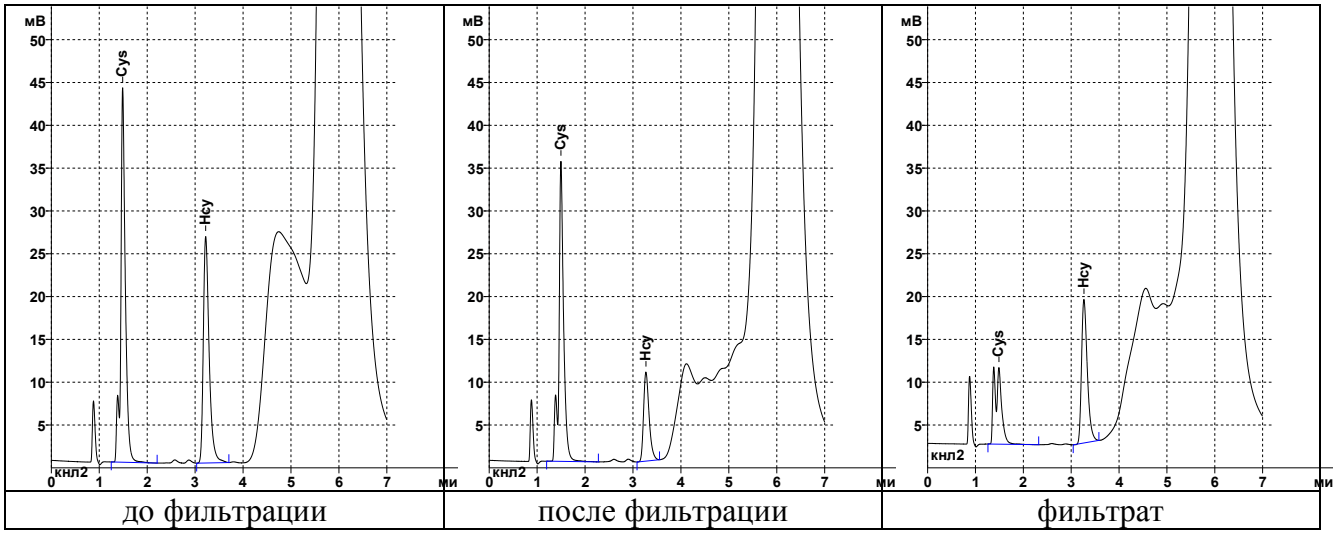

Рис. 1. Хроматограммы исследованных образцов
(Hcy – пик, отражающий концентрацию гомоцистеина)

Таким образом, мы подтвердили возможность образования коньюгатов гомоцистеина с сывороточным альбумином человека in vitro.

На следующем этапе мы изучали уровень аутоантител к альбумину, модифицированному гомоцистеином и гомоцистеином-тиолактоном как в эксперименте (у 20 интактных и 20 крыс, с гуморальным иммунодефицитом), так и в сыворотке крови человека (здоровые и больные ИБС).

В реакции пассивной гемагглютинации с сенсибилизированными нативным сывороточным альбумином крысы и несенсибилизированными эритроцитами, получен отрицательный результат.

При этом, у интактных крыс до нагрузки гомоцистеином и гомоцистен-тиолактоном были обнаружены аутоантитела к альбумину, модифицированному гомоцистеином. Через 6 часов после введения гомоцистеина и гомоцистеин-тиолактона титр аутоантител класса IgG увеличился в 8 раз, а титр всех классов Ig возрос в еще большей степени: в 24 раза после введения гомоцистеина и в 32 раза после нагрузки животных гомоцистеин-тиолактоном (табл. 1).

После девятидневного введения гомоцистеина титр аутоантител всех классов оставался столь же высоким. На фоне введения гомоцистеина-тиолактона наблюдалось резкое падение концентрации аутоантител до уровня контроля.

Титр аутоантител к комплексу альбумина с гомоцистеин-тиолактоном у интактных животных был таким же, как и к комплексу альбумина и гомоцистеина, но при этом, динамика его на фоне введения тиолов отсутствовала (табл. 2).

Данный факт, вероятно, можно объяснить быстрой трансформацией гомоцистеина-тиолактона в организме животного в гомоцистеин, вызывающего модификацию белков [10]. У иммунодефицитных животных прослеживалась эта же тенденция, но с гораздо меньшей степенью выраженности.

Таблица 1

Титр аутоантител к комплексу альбумина с гомоцистеином у интактных крыс (Me (25-й; 75-й))

До нагрузки		**Через 6 ч после введения**				**После 9 дней введения**			
		гомоцистеина		гомоцистеин-тиолактона		гомоцистеина		гомоцистеин-тиолактона	
IgG	Все классы Ig	IgG	Все классы Ig	IgG	Все классы Ig	IgG	Все классы Ig	IgG	Все классы Ig
1:30 (0; 1:30)	1:60 (1:15; 1:60)	1:480 (1:480; 1:480) p_1=0,01	1:720 (1:480; 1:960) p_1=0,001	1:480 (1:480; 1:480) p_1=0,01	1:960 (1:960; 1:960) p_1=0,001	1:480 (1:480; 1:960) p_1=0,01	1:960 (1:480; 1:960) p_1=0,005	0 (0; 0)	1:480 (1:60; 1:960)

Примечание: p_1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с титром до нагрузки.

Таблица 2

Титр аутоантител к комплексу альбумина с гомоцистеин-тиолактоном у интактных крыс (Me (25-й; 75-й))

До нагрузки		**Через 6 ч после введения**				**После 9 дней введения**			
		Гомоцис-теина		Гомоцистеин-тиолактона		гомоцистеина		гомоцистеин-тиолактона	
IgG	Все клас-сы Ig	IgG	Все классы Ig	IgG	Все классы Ig	IgG	Все классы Ig	IgG	Все классы Ig
1:45 (0; 1:300)	1:60 (1:45; 1:480)	1:30 (0; 1:30)	1:60 (0; 1:60)	0 (0; 0)	1:30 (0; 1:60)	1:30 (1:30; 1:30)	1:60 (1:60; 1:60)	1:30 (1:30; 1:30)	1:60 (1:60; 1:960)

Примечание: p_1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с титром до нагрузки.

Иммунодефицитное состояние вызывали путем введения экспериментальным животным циклофосфана, и подтверждали показателями иммунограммы (табл. 3). У иммунодефектных животных отмечались изменения как в гуморальном звене иммунной системы – снижалось абсолютное количество В-лимфоцитов на 30%; так и в клеточном – уменьшалось соотношение Т-хелперы/Т-цитотоксические лимфоциты в 2 раза ниже контроля, на фоне снижения Т-хелперов (CD3 CD4) на 43,1 % и увеличение процентного количества Т-лимфоцитов на 23,4 % по сравнению с соответствующими показателями у интактных крыс.

Таблица 3

Иммунограмма крыс до введения тиолов (Me (25-й; 75-й))

Показатели	**Интактные крысы (n=10)**	**Крысы, получавшие цитостатик (n=10)**
Лимфоциты, абс. в 1 мкл крови	8210,0 [4760; 8704]	4875,8 [3269,12; 5307,03] p=0,002

Т лимфоциты (CD3+), абс. в 1 мкл крови	5404,0 [3208,0; 5884,0]	3831,23 [2704,04; 4566,89] p=0,01
Т хелперы (CD3+, CD4+), абс. в 1 мкл крови	1801,5 [1095,0; 2223,0]	776,45,26 [472,45; 958,12] p=0,005
Т цитотоксические (CD3+, CD8+),, абс. в 1 мкл крови	3497,0 [1751,0; 3724,0]	3054,78 [2232,96; 3608,52] p=0,045
Т хелперы/Т цитотоксические	0,6 [0,5; 0,65]	0,27 [0,18; 0,36] p=0,02
В лимфоциты, (CD3-, CD45RA+), абс. в 1 мкл крови	1090,0 [905,0; 1617,0]	797,52 [589,59; 887,06]
NK, (CD3-, CD161ax+), абс. в 1 мкл крови	537,5 [230,0; 675,0]	238,5 [241,05; 357,02] p=0,04

Примечание: p – уровень статистической значимости различий по сравнению с группой контроля.

Содержание гомоцистеина у иммунодефектных крыс было практически в 2 раза выше (p=0,0001), чем у интактных животных (табл. 4), что подтверждает регуляторную роль иммунной системы.

Спустя 6 часов после инъекции экзогенного гомоцистеина его уровень в сыворотке крови у крыс с ИДС в 3 раза превышал значения в группе контроля; после введения гомоцистеин-тиолактона уровень эндогенного гомоцистеина также, по нашим данным, повышался почти в 2 раза, что можно объяснить образованием гомоцистеина из тиолактона под действием гомоцистеин-тиолактоназы [13].

Спустя девятидневное введение тиолов уровень эндогенного гомоцистеина по-прежнему оставался почти в 2 раза выше у крыс с индуцированным иммунодефицитом по сравнению с концентрацией у интактных и не отличался от содержания до нагрузки аминотиолами. Возврат концентрации гомоцистеина к исходному (до нагрузочному) уровню у иммунодефектных крыс через 9 суток, вероятно, связан с включением других, более отсроченных, механизмов его элиминации (реметилирование в метионин ферментом метилентетрагидрофолатредуктазой и превращение в цистеин под действием цистатионин-β-синтазы) [14].

Таблица 4

Уровень общего гомоцистеина в сыворотке крови у крыс с ИДС (мкмоль/л) (Me (25-й; 75-й))

До нагрузки (n=10)	**Через 6 ч после введения**		**После 9 дней введения**	
	гомоцистеина (n=10)	гомоцистеин-тиолактона (n=10)	гомоцистеина (n=10)	гомоцистеин-тиолактона (n=10)
9,18 (8,61; 10,59) p1=0,002	27,38 (17,65; 32,1) p1=0,001 p2=0,0003	17,20 (14,92; 20,2) p1=0,003	9,54 (6,05; 12,29) p1=0,002	9,67 (6,73; 12,50) p1=0,002

Примечание: p_1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с контрольной группой, p_2 – уровень статистической значимости различий в сравнении с уровнем до нагрузки.

Показатели иммунограммы иммунодефектных крыс не имели отличия в зависимости от введения гомоцистеина и гомоцистеина-тиолактона. Наблюдалось резкое снижение общего числа лимфоцитов (в 2,26 раз (p=0,002)) через 6 часов после введения тиолов и увеличение их количества на 9 день (в 1,55 раз (p=0,03)). Однако изменения в субпопуляциях носили однонаправленный характер и отличались только степенью выраженности. Так, процентное

содержание Т-лимфоцитов у крыс с ИДС было больше на 43,4% по сравнению с интактными животными (p=0,003) и не менялось на фоне введения аминотиолов. Рост числа Т-лимфоцитов был обусловлен возрастанием уровня цитотоксических лимфоцитов (в 2,2 раза по сравнению с интактными животными (p=0,001)) и уменьшением совокупности Т-хелперов. Со стороны В-лимфоцитов наблюдалось падение относительного количества в 4 раза (p=0,005), а абсолютного – в 10 раз (p=0,0001).

До введения экзогенных тиолов содержание аутоантител было сопоставимо с данными интактных животных. Нагрузка тиолами вызвала увеличение титра аутоантител против альбумина, модифицированного гомоцистеином, примерно в 2 раза и не изменилась при введении гомоцистеина-тиолактона (табл. 5 и 6).

Таким образом, данный эксперимент убедительно демонстрирует наличие иммунологических механизмов поддержания нормального уровня гомоцистеина. Высокие концентрации гомоцистеина модифицируют белковые структуры организма – активируя процесс перекисного окисления липидов и блокируя работу антиокислительной системы, либо образуя *N*-гомоцистеинилированные белки [5]. Иммунная система реагирует на появление нео-антигена повышенным синтезом иммуноглобулинов класса G и образованием иммунных комплексов.

Следующим этапом нашего исследования явилось определение наличия аутоантител против модифицированного гомоцистеином альбумина у здоровых и больных различными формами ИБС добровольцев.

Таблица 5

Титр аутоантител к комплексу альбумина с гомоцистеином у крыс с ИДС (Me (25-й; 75-й))

До нагрузки		**Через 6 ч после введения**				**После 9 дней введения**			
		гомоцистеина		гомоцистеин-тиолактона		гомоцистеина		гомоцистеин-тиолактона	
IgG	Все классы Ig	IgG	Все классы Ig	IgG	Все классы Ig	IgG	Все классы Ig	IgG	Все классы Ig
0 (0; 0)	1:30 (1:30;1:60)	1:30 (1:30; 1:30) p_1=0,04	1:60 (1:60; 1:60) p_1=0,04	1:30 (1:30; 1:30) p_1=0,04	1:60 (1:60; 1:60) p_1=0,04	1:15 (0; 1:30) p_1=0,001	1:30 (0; 1:60) p_1=0,001	0 (0; 1:30)	1:60 (0; 1:60) p_1=0,03

Примечание: p_1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с титром у интактных крыс.

Таблица 6

Титр аутоантител к комплексу альбумина с гомоцистеин-тиолактоном у крыс с ИДС (Me (25-й; 75-й))

До нагрузки		**Через 6 ч после введения**				**После 9 дней введения**			
		гомоцистеина		гомоцистеин-тиолактона		гомоцистеина		гомоцистеин-тиолактона	
IgG	Все классы Ig	IgG	Все классы Ig	IgG	Все классы Ig	IgG	Все классы Ig	IgG	Все классы Ig
0 (0; 1:15) p_1=0,04	1:30 (1:30;1:60)	0 (0; 0)	1:60 (1:30;1:60)	0 (0; 0)	1:30 (1:30;1:60)	1:15 (0; 1:30)	1:60 (0; 1:60)	1:30 (0; 1:30)	1:60 (0; 1:60)

Примечание: p_1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с титром до нагрузки.

Оказалось, что максимальный титр IgG против модифицированного гомоцистеином альбумина наблюдается у больных стабильной и прогрессирующей стенокардией (табл. 7).

Таблица 7

Содержание аутоантител к комплексу гомоцистеин-альбумин (ед. оп. пл.) (Me (25-й; 75-й))

Группа	Аутоантитела класса IgG к модифицированному альбумину в сыворотке
Контрольная группа (n=12)	0,026 (0,010; 0,038)
Стабильная стенокардия (n=12)	0,075 (0,000; 0,076) p_1=0,003
Острый коронарный синдром (n=12)	0,066 (0,039; 0,111) p_1=0,004
Острый инфаркт миокарда (n=10)	0,043 (0,026; 0,049)

Примечание: p_1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с показателями в группе контроля

При этом, в контрольной группе исследуемые аутоантитела также присутствовали, что подтверждает мысль о роли в поддержании уровня аминотиолов на постоянном уровне иммунной системой. Повышение же их концентрации является маркером нарушения функционирования адаптивного звена иммунной системы и активации аутоиммунного процесса в организме, который, в свою очередь, приведет к более раннему и быстрому развитию атеросклеротического процесса. Значимое снижение уровня аутоантител к комплексу гомоцистеин-альбумин при остром инфаркте миокарда, вероятно, можно объяснить реакцией потребления. Последнее 10-летие получено достаточно данных в пользу того, что аутоиммунный механизм является первичным патогенетическим процессом, вовлеченным в развитие атеросклероза. Преимущественной мишенью аутоиммунных реакций рассматриваются окисленные липопротеины низкой плотности (оЛПНП) [2].

Полученные нами данные свидетельствуют, во-первых, об активном включении иммунной системы в механизмы элиминации излишков гомоцистеина, изменяющих антигенную структуру белков организма, как в эксперименте, так и клинике. Во-вторых, об инициации аутоиммунного процесса на модифицированные гомоцистеином белковые структуры организма и включении механизма развития атеросклероза.

Литература:

1. Мельниченко А.А., Орехов А.Н., Собенин И.А. Атерогенная модификация липопротеидов. Роль в атерогенезе. LAP LAMBERT Academic Publishing. 2013. 253 с.
2. Жданова О.Ю. Аутоантитела к модифицированным липопротеинам человека и их роль в атерогенезе : автореф. дис… к.б.н. : 03.00.04. Санкт-Петербург. 2005. 17 с.
3. Блашко Э.Л. Исследование транспортных форм гомоцистеина при различных состояниях организма : автореф. дис. : канд. биол. наук. Санкт-Петербург. 2007. 22 с.
4. Блашко Э.Л., Жлоба А.А., Шляхто Е.В. Связывание гомоцистеина высокомолекулярными белками и альфа-2-макроглобулином в плазме крови у пациентов с гипергомоцистеинемией. Неделя здорового сердца и мозга. Бюллетень научно исследовательского института кардиологии имени Алмазова В.А. 2005. Т. 3, №1. С. 67.
5. Болдырев А.А. Почему токсичен гомоцистеин. Природа. 2009. №10. С.18-23.
6. Дутов А.А., Никитин Д.А., Федотова А.А. Определение гомоцистеина и цистеина в плазме/сыворотке крови ВЭЖХ методом с УФ детекцией и твердофазной экстракцией на полимерном сорбенте. Биомедицинская химия. 2010. Т. 56, вып. 5. С. 609-615.
7. Мирошниченко И.И., Птицына С.Н., Кузнецова Н.Н., Калмыков Ю.М. Гомоцистеин – предиктор патологических изменений в организме человека. Российский медицинский журнал. 2009. Том 17, №4. С. 224-227.
8. Цыбиков Н.Н., Фефелова Е.В., Терешков П.П., Изместьев С.В. Дисфункция эндотелия при экспериментальной гипергомоцистеинемии. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2016. Т.60, №3. С. 42-46.

9. Цыбиков Н.Н., Цыбикова Н.М. Роль гомоцистеина в патологии человека / Н.Н. Цыбиков, // Успехи современной биологии. 2007. Т. 127, №5. С. 471-482.
10. Kolarz M., Wyroślak J., Zbróg Z., Kraśniak A., Rogulska J., Padjas A. Antibodies against N-homocysteinylated proteins and their determinants in patients on long-term hemodialysis. Pol. Arch. Med. Wewn. 2010. Vol. 120(6). P. 223-230.
11. Undas A., ßrozek J., Szczeklik A. Homocysteine and thrombosis: from basic science to clinical evidence. Thromb Haemost. 2005. Vol. 94. P. 907-915.
12. Undas A., Stepien E., Glowacki R. Folic acid administration and antibodies against homocysteinylated proteins in subjects with hyperhomocysteinemia. Thromb Haemost. 2006. Vol. 96. P. 342-347.
13. Mashkina A.P., Tyulina O.V., . Solovyova T.I., . Kovalenko E.I., Kanevski L. ., Johnson P., Boldyrev A.A. The excitotoxic effect of NMDA on human lymphocyte immune function. Neurochem. Int. 2007. Vol.51. P. 356-360.
14. Jakubowski H. Metabolism of homocysteine thiolactone in human cell cultures. Possible mechanism for pathological consequences of elevated homocysteine levels. J. Biol. Chem. 1997. Vol. 272(3). P. 1935-1942.
15. Loureiro S.O., Romão L., Alves T., Fonseca A., Heimfarth L., Moura Neto V., Wyse A.T., Pessoa–Pureur R. Homocysteine induces cytoskeletal remodeling and production of reactive oxygen species in cultured cortical astrocytes. Brain Res. 2010. № 1355. P. 151-164.

References

1. Mel'nichenko A.A., Orehov A.N., Sobenin I.A. Atherogenic modification of lipoproteins. Role in atherogenesis. LAP LAMBERT Academic Publishing. 2013. 53 p.
2. Zhdanova O.Ju. Autoantibodies to modified human lipoproteins and their role in atherogenesis: author's abstract. Dis ... Ph.D. : St. Petersburg., 2005. 17 p.
3. Blashko Je.L. Study of the transport forms of homocysteine in different states of the body: the author's abstract. Dis. : Cand. Biol. Sciences. St. Petersburg., 2007. – 22 p.
4. Blashko Je.L. Zhloba A.A., Shljahto E.V. Binding homocysteine with high-molecular proteins and alpha-2-macroglobulin in blood plasma in patients with hyperhomocysteinemia. Week of a healthy heart and brain. Bulletin of the Scientific Research Institute of Cardiology named after Almazov VA - St. Petersburg, 2005. T. 3, №1. P. 67.
5. Boldyrev A.A. Why homocysteine is toxic. Priroda. 2009. №10. P.18-23.
6. Dutov A.A., Nikitin D.A., Fedotova A.A. Determination of homocysteine and cysteine in plasma / serum by HPLC method with UV detection and solid phase extraction on a polymeric sorbent. Biomeditsinskaya khimiya. 2010. T. 56 (5). P. 609-615.
7. Miroshnichenko I.I., Pticyna S.N., Kuznecova N.N., Kalmykov Ju.M. Homocysteine - a predictor of pathological changes in the human body. Rossiyskiy meditsinskiy zhurnal. 2009. Vol. 17, №4. P. 224-227.
8. Tsybikov N.N., Fefelova E.V., Tereshkov P.P., Izmest'ev S.V. Endothelial dysfunction in experimental hyperhomocysteinemia. Pathological physiology and experimental therapy. 2016. - T.60, №3. P. 42-46.
9. Tsybikov N.N., Tsybikova N.M. The role of homocysteine in human pathology. Advances in modern biology. 2007. T. 127, №5. P. 471-482.
10. Kolarz M., Wyroślak J., Zbróg Z., Kraśniak A., Rogulska J., Padjas A. Antibodies against N-homocysteinylated proteins and their determinants in patients on long-term hemodialysis. Pol. Arch. Med. Wewn. 2010. Vol. 120(6). P. 223-230.
11. Undas A., ßrozek J., Szczeklik A. Homocysteine and thrombosis: from basic science to clinical evidence. Thromb Haemost. 2005. Vol. 94. P. 907-915.
12. Undas A., Stepien E., Glowacki R. Folic acid administration and antibodies against homocysteinylated proteins in subjects with hyperhomocysteinemia. 2006. Vol. 96. P. 342-347.

13. Mashkina A.P., Tyulina O.V., . Solovyova T.I., . Kovalenko E.I., Kanevski L. ., Johnson P., Boldyrev A.A. The excitotoxic effect of NMDA on human lymphocyte immune function. Neurochem. Int. 2007. Vol.51. P. 356-360.
14. Jakubowski H. Metabolism of homocysteine thiolactone in human cell cultures. Possible mechanism for pathological consequences of elevated homocysteine levels. J. Biol. Chem. 1997. Vol. 272(3). P. 1935-1942.
15. Loureiro S.O., Romão L., Alves T., Fonseca A., Heimfarth L., Moura Neto V., Wyse A.T., Pessoa–Pureur R. Homocysteine induces cytoskeletal remodeling and production of reactive oxygen species in cultured cortical astrocytes. Brain Res. 2010. № 1355. P. 151-164.