



УДК 616.155.3-008.1:612.014.46

## ИНДУКЦИЯ АПОПТОЗА ЛИМФОЦИТОВ ПОД ВЛИЯНИЕМ ГОМОЦИСТЕИНА В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ ИБС

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

*ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия»  
Чита, Россия*

**Аннотация.** В краткосрочной культуре клеток периферической крови изучалось влияние гомоцистеина и глутамата на процесс апоптоза лимфоцитов у условно здоровых добровольцев и больных ишемической болезнью сердца (стабильная стенокардия 2 функционального класса). Показано, что аминокислоты индуцируют программированную гибель как в Т-, так В-лимфоцитах. Причем, клетки больных ИБС более чувствительны к воздействию изучаемых аминокислот, что вероятно можно расценить как перmissive эффект, обусловленный разным функциональным состоянием лейкоцитов периферической крови здоровых и больных ИБС. Инициация апоптоза лимфоцитов у больных ИБС осуществляется путем активации Fas-рецептора.

**Ключевые слова:** апоптоз, гомоцистеин, глутамат, лимфоциты, культура клеток.

По последним данным, в основе коронарного синдрома лежит нарушение целостности атеросклеротической бляшки в результате апоптоза эндотелия [1]. Острый инфаркт миокарда является примером заболевания, при котором апоптоз является преобладающей формой гибели кардиомиоцитов в период «реперфузии» [2]. Показано, что к ранним маркерам прогрессирования сердечной недостаточности относится увеличение концентрации растворимой формы Fas-лиганда [3]. 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. Исследования последних лет показали, что гомоцистеин может взаимодействовать с сайтом связывания глутамата или глицина NMDA рецептора [4], а значит, может быть рассмотрен как новый эндогенный активатор глутаматных рецепторов [5].

Нами при моделировании экзогенной гипергомоцистеинемии было показано, что миокардиоциты погибают как путем некроза, так и апоптоза, с преобладанием программированной клеточной гибели [6].

**Цель работы.** Изучение влияния гомоцистеина и глутамата на процесс апоптоза лимфоцитов в краткосрочной культуре клеток периферической крови условно здоровых добровольцев и больных ИБС.

**Материалы и методы исследования.** Материалом для исследования являлась венозная кровь, полученная у 7 относительно здоровых, некурящих добровольцев — мужчин, средний возраст которых составил  $33,5 \pm 4,5$  лет и 8 больных ишемической болезнью сердца (стабильная стенокардия 2 функционального класса). Кровь забирали из локтевой вены в пробирки с добавлением антикоагулянта — гепарина Li. Затем по 1 мл крови помещали в 3 стерильные пластиковые пробирки, добавляли в каждую из них по 1 мл культуральной среды, в две из них вносили растворы либо гомоцистеина в концентрации 50 мкмоль/л, NMDA в концентрации 50 мкмоль/л. В третью (контрольную) — эквивалентный объем физиологического раствора. После 4-х часов инкубации при 37 °C в 4,8% CO<sub>2</sub> определяли фенотип лейкоцитов, маркеры активации и экспрессию маркеров апоптоза. Оценку маркеров апоптоза осуществляли стандартным методом прямого трех параметрического иммуофлюоресцентного окрашивания цельной крови с использованием коммерческого лизирующего/фиксирующего раствора VERSA-LYSE/IOtest 3 (Beckman Coulter) и панели моноклональных антител IOtest (Beckman Coulter).

Для получения мононуклеарной фракции клеток исследуемые образцы крови фракционировали в 63%-ном растворе Перколла (GE Healthcare), центрифугируя при 400g в течение 30 мин. Фракцию собирали и отмывали от Перколла в растворе PBS pH 7,4. Клетки считали на проточном цитофлуориметре “Cytomics FC-500” (Beckman Coulter, USA) Чистота мононуклеаров, полученных на градиенте плотности, составляла 96—98%. Затем фракцию мононуклеаров замораживали. В лизатах определяли концентрацию Vcl-2 ELISA методом с использованием тест-набора «eBioscience» (Австрия).

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью программы Statistica 6.1 (StatSoft). Описательная статистика представлена медианой и межквартильным интервалом (25-го; 75-го перцентилей); 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 Vcl-2, ингибирующие апоптоз [7]. Ранним маркером апоптоза является экспрессия APO 2.7. В последующем на мембране клеток появляются отрицательно заряженные фосфолипиды внутреннего слоя цитоплазматической мембраны (в частности, фосфатидилсерин) [7]. Для выявления этого события используется аннексин V (Ann V) с различными флюорохромами.

При исследовании маркеров апоптоза в общей популяции лейкоцитов (CD45+) периферической крови здоровых добровольцев обнаружено, что экспрессия поверхностного рецептора Fas увеличивается под влиянием изучаемых веществ. В большей степени при внесении в культуру клеток глутамата (в 2,88 раз ( $p < 0,05$ ) и в меньшей степени — гомоцистеина (на 77,1% ( $p < 0,05$ )). При этом количество клеток с фосфатидилсеринем на внешней мембране под воздействием гомоцистеина возрастало в 165,3 раза ( $p < 0,05$ ), а NMDA — в 16,3 раза ( $p < 0,05$ ). Содержание Vcl-2 в пересчете на 1 клетку наиболее выражено увеличивалось при внесении NMDA — в 4,6 раз ( $p < 0,05$ ). Гомоцистеин же вызвал снижение этого показателя на 36,76%. При исследовании данных показателей на клетках крови больных ИБС выявлено, что уровень CD95+ позитивных лейкоцитов в 10,63 раза выше, чем у здоровых доноров, а содержание Ann V — позитивных клеток — в 108,0 раз ( $p < 0,05$ ). Гомоцистеин и глутамат так же, как у здоровых доноров, вызывали увеличение данных показателей, но значительно ниже. Концентрация Vcl под влиянием гомоцистеина в лизатах мононуклеаров осталась на том же уровне, что и в контроле инкубации. Глутамат повышал Vcl-2 примерно так же, как и в культуре клеток здоровых добровольцев. Vcl-2 является внутриклеточным мембраносвязанным белком, блокирующим запрограммированную клеточную гибель. Избыточная экспрессия Vcl-2 защищает клетки от смерти, а уменьшение его концентрации приводит клетки к апоптозу. Полученные данные свидетельствуют о том, что гомоцистеин индуцирует запрограммированную клеточную гибель и при этом, механизмы, защищающие клетку от гибели, не включаются.



В общей популяции Т-лимфоцитов как здоровых доноров, так и больных ИБС зарегистрировано увеличение экспрессии Fas-рецептора под влиянием гомоцистеина: в 4,16 ( $p < 0,05$ ) и 5,69 ( $p < 0,05$ ) раз соответственно и снижение этого показателя под воздействием глутамата на 10,1% ( $p < 0,05$ ) на клетках здоровых доноров. Число CD95 позитивных Т-лимфоцитов больных ИБС при внесении в культуру клеток глутамата возрастало в 23,83 раза ( $p < 0,05$ ). Количество Т-хелперов здоровых доноров, несущих Fas-рецептор и его лиганд под влиянием гомоцистеина увеличивалось, при воздействии глутамата — снижалось, но при этом соотношение CD95+/CD178+ в обеих изучаемых группах осталось на уровне контроля инкубации. Параллельно с этим, и под влиянием гомоцистеина, и глутамата возрастал уровень ранних и поздних маркеров апоптоза. Полученные данные свидетельствуют о том, что изучаемые вещества индуцируют апоптоз Т-хелперов, но не посредством активации Fas-рецептора. При этом на мембранах больных ИБС наблюдалась несколько иная картина: количество клеток, несущих фосфатидилсерин на наружной мембране и АРО 2.7 в большей степени увеличивалось при внесении в культуру клеток глутамата, при этом соотношение CD95+/CD178+ было снижено по сравнению с контролем инкубации в 2,82 раза ( $p < 0,05$ ). При внесении же гомоцистеина оно возрастало в 12,45 раз ( $p < 0,05$ ). Таким образом, можно предположить, что гипергомоцистеинемия активирует Fas-рецептор Т хелперов больных ИБС [9]. В популяции цитотоксических лимфоцитов гомоцистеин и глутамат вызывали односторонние сдвиги, более выраженные при воздействии гомоцистеина. Ответ В-лимфоцитов на воздействие гомоцистеина и глутамата был идентичен в культурах клеток здоровых доноров и отличался лишь степенью выраженности — более высокой под влиянием NMDA. В культуре клеток больных ИБС при внесении гомоцистеина не изменялось количества клеток, несущих Fas рецептора и FasL-лиганд, соотношение CD95+/CD178+ снижалось на 18,52% ( $p < 0,05$ ), но при этом оставалось в избытке, что привело к возрастанию числа В-лимфоцитов, несущих ранние маркеры апоптоза в 1,95 раз ( $p < 0,05$ ).

Апоптоз играет жизненно важную функцию в процессе функционирования организма, так как позволяет удалять клетки, выживание которых нежелательно для организма. Нами получено, что у больных ИБС наблюдался изначально более высокий уровень маркеров апоптоза, что свидетельствует о наличии поврежденных атеросклеротическим процессом клеток. Одним из факторов, вызывающих развитие атеросклероза, является гомоцистеин. Его токсическую роль в повреждении клеток организма связывают с его взаимодействием с глутаматными рецепторами и явлением эксайтотоксичности, которое характеризуется повышением концентрации ионов  $Ca^{2+}$  в цитоплазме, активацией  $Ca^{2+}$ -зависимых ферментативных каскадов и росту свободных радикалов в клетках, имеющих рецепторы для глутамата [8].

Нами зафиксирована активация программированной гибели всех видов лимфоцитов периферической крови в ответ на внесение в культуру клеток гомоцистеина и глутамата. Большую чувствительность клеток больных ИБС к воздействию изучаемых аминотиолов вероятно можно расценить как перmissive эффект, обусловленный разным функциональным состоянием лейкоцитов периферической крови.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Владимирская Т.Э., Швед И.А. Роль апоптоза макрофагов и эндотелиоцитов в дестабилизации атеросклеротических поврежденных коронарных артерий // Здравоохранение (Минск). 2013. № 1. С. 14—17.
2. Петрищев Н.Н., Васина Л.В., Луговая А.В. Содержание растворимых маркеров апоптоза и циркулирующих аннексин V-связанных апоптотических клеток в крови больных острым коронарным синдромом // Вестник Санкт-Петербургского университета. 2008. Сер. 11, Вып. 1. С. 14—23.
3. Тепляков А.Т., Гракова Е.В., Березикова Е.Н., Шилов С.Н., Копьева К.В., Калюжин В.В. Ранние маркеры прогрессирования сердечной недостаточности и апоптоза: роль в прогнозировании риска развития неблагоприятных сердечно-сосудистых событий у больных, перенесших инфаркт миокарда // Бюллетень сибирской медицины. 2016. Т. 15, № 1. С. 37—46.
4. Poddar R., Paul S. Homocysteine-NMDA receptor-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase leads to neuronal cell death // J. Neurochem. 2009. V. 110, № 3. P. 1095—1106.





5. Болдырев А.А. Почему токсичен гомоцистеин? // *Природа*. 2009. № 10. С. 18—23.

6. Фефелова Е.В., Цыбиков Н.Н., Терешков П.П., Сепп А.В., Дутов А.А. Морфофенотипические изменения миокарда крыс при экспериментальной гипергомоцистеинемии // *ЭНИ Забайкальский медицинский вестник*. 2015. № 4. С. 145—150.

7. Кудрявцев И.В., Головкин А.С., Зурочка А.В., Хайдуков С.В. Современные методы и подходы к изучению апоптоза в экспериментальной биологии // *Медицинская иммунология*. 2012. Т. 14, № 6. С. 461—482.

8. Lipton S.A., Kim W.K., Choi Y.B., Kumar S., D'Emilia D.M., Rayuda P.V., Arnelle D.R., Stamler J.S. Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997. V. 94, № 11. P. 5923—5928.

9. Фефелова Е.В., Терешков П.П., Максимиеня М.В., Цыбиков Н.Н. Индукция апоптоза лейкоцитов под влиянием аминоктиолов в краткосрочной культуре клеток // *ЭНИ Забайкальский медицинский вестник*. 2016. № 2. С. 98—106.

## INDUCTION OF LYMPHOCYTE APOPTOSIS INFLUENCED BY HOMOCYSTEINE CONTAINED IN IHD PATIENTS' PERIPHERAL BLOOD CELL CULTURE

*E.V. Fefelova, P.P. Tereshkov,  
M.V. Maksimenia, N.N. Tsybikov*

*State Federal-Funded Educational Institution of Higher Professional Training  
"The Chita State Academy of Medicine"  
Chita, Russia*

**Annotation.** The influence of homocysteine and glutamate on the process of lymphocyte apoptosis at conditionally healthy volunteers and IHD patients (stable angina, functional class 2) had been studied in short-term peripheral blood cell culture. It had been indicated that aminothiols induce programmed cell death both in T- and B-lymphocytes. Moreover, cells of the IHD patients are more sensitive to the studied aminothiols, which is possibly can be estimated as a permissive effect caused by by different functional status of leukocytes at healthy participants' and IHD patients' peripheral blood. The lymphocyte apoptosis at IHD patients is initiated by activation of FAS receptor.

**Key words:** apoptosis, homocysteine, glutamate, lymphocytes, cell culture.

### REFERENCES

1. Vladimirskaia T.Je., Shved I.A. The role of apoptosis in macrophages and endothelial cells destabilization of atherosclerotic lesions in the coronary arteries. *Health* (Minsk), 2013, no. 1, pp. 14—17.

2. Petrishhev N.N., Vasina L.V., Lugovaja A.V. The content of soluble markers of apoptosis and circulating annexin V-related apoptotic cells in the blood of patients with acute coronary syndrome. *Bulletin of St. Petersburg State University*, 2008, Ser. 11, vol. 1, pp. 14—23.

3. Tepljakov A.T., Grakova E.V., Berezikova E.N., Shilov S.N., Kop'eva K.V., Kaljuzhin V.V. Early markers of the progression of heart failure and apoptosis: role in predicting the risk of adverse cardiovascular events in patients with myocardial infarction. *Bulletin of the Siberian medicine*, 2016, vol. 15, no. 1, pp. 37—46.

4. Poddar R., Paul S. Homocysteine-NMDA receptor-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase leads to neuronal cell death. *J. Neurochem.*, 2009, vol. 110, no. 3, pp. 1095—1106.

5. Boldyrev A.A. Why toxic homocysteine? *Nature*, 2009, no. 10, pp. 18—23.

6. Fefelova E.V., Cybikov N.N., Tereshkov P.P., Sepp A.V., Dutov A.A. Morfofenotipicheskie changes in the myocardium of rats with experimental hyperhomocysteinemia. *ENI Zabaikal'skii Medical Gazette*. 2015, no. 4, pp. 145—150.

7. Kudrjavcev I.V., Golovkin A.S., Zurochka A.V., Hajdukov S.V. Modern methods and approaches to the study of apoptosis in experimental biology. *Medical Immunology*, 2012, vol. 14, no. 6, pp. 461—482.

8. Lipton S.A., Kim W.K., Choi Y.B., Kumar S., D'Emilia D.M., Rayuda P.V., Arnelle D.R., Stamler J.S. Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, vol. 94, no. 11, pp. 5923—5928.

9. Fefelova E.V., Tereshkov P.P., Maksimenja M.V., Cybikov N.N. Induction of apoptosis of leukocytes under the influence of amino thiols in the short cell culture. *ENI Zabaikal'skii Medical Gazette*, 2016, no. 2, pp. 98—106.

