

СЕРОТОНИН И АДРЕНАЛИН КАК ИНГИБИТОРЫ ОБРАЗОВАНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК НЕЙТРОФИЛОВ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ



С.В. Скупневский, Р.В. Савельев

Институт биомедицинских исследований — филиал ФГБУН Федерального научного центра «Владикавказский научный центр Российской академии наук», РСО-Алания, г. Владикавказ, Россия

Резюме. Регуляция процесса нетоза нейтрофилов как провоцирующего фактора развития воспалительных и аутоиммунных заболеваний может составить основу высокоэффективной таргетной терапии. Цель — изучить модифицирующее действие серотонина и адреналина в отношении нетоза при фагоцитозе у крыс. **Материалы и методы.** Крысы линии Wistar, разделенные на контрольную (растворитель, 0,9% раствор NaCl) и опытные (серотонин и адреналин 1,43 и 0,143 мг/кг массы тела соответственно) группы. Внутривентральное введение затравок — за 90 мин до забора крови, в которой определяли фагоцитарную активность (фагоцитарный индекс и фагоцитарное число) и степень суицидального нетоза нейтрофилов: с полной и частичной деконденсацией хроматина. Сравнение групп проводили с использованием парного критерия Стьюдента (для численных значений) и Мак-Немара (для дихотомических переменных). Степень линейной зависимости между выборками оценивали по критерию Пирсона (r_{xy}). **Результаты.** Введение адреналина способствовало ингибированию нетоза на 41,5% относительно контроля ($p < 0,001$), серотонина — на 27,6% ($p < 0,001$). Соотношение нейтрофилов с полной деконденсацией хроматина и частичной для контрольной группы составило 1,0:0,9; для серотонина оно изменилось до 1,0:1,7, а для адреналина равнялась 1,0:1,4. Фагоцитарный индекс после введения серотонина возрос относительно контрольной группы на 4,9%, в то время как на фоне адреналина он снизился на 12,4% ($p < 0,01$). Выявлена высокая положительная корреляционная связь между нетозом и фагоцитарным индексом для контрольной и опытной с адреналином: $r_{xy} = 0,823-0,997$. Для фагоцитарного числа и нетоза в тех же группах высокая отрицательная корреляция ($r_{xy} = -0,714-(-0,871)$) и заметная положительная — для серотонина ($r_{xy} = 0,638$). **Заключение.** Серотонин и адреналин в терапевтических дозировках способны оказывать выраженное ингибирующее действие в отношении нетоза, что может открывать перспективы к повышению эффективности терапии иммуновоспалительных и онкологических заболеваний. Использование серотонина является более предпочтительным, поскольку он обладает дополнительным иммуномодулирующим действием и не вызывает прямой стимуляции α - и β -адренорецепторов.

Ключевые слова: адреналин, внеклеточные ловушки нейтрофилов, модификация воспаления, нетоз, серотонин, фагоцитарная активность нейтрофилов.

Адрес для переписки:

Скупневский Сергей Валерьевич
363110, Россия, РСО-Алания, г. Владикавказ, ул. Вильямса, 1,
Институт биомедицинских исследований — филиал ФГБУН ФНЦ
Владикавказский научный центр РАН.
Тел.: 8 988 871-55-28.
E-mail: dreammas@yandex.ru

Contacts:

Sergey V. Skupnevskiy
363110, Russian Federation, RNO-Alania, Vladikavkaz,
Vil'yamsa str., 1, Institute of Biomedical Research,
Affiliate of Vladikavkaz Scientific Center of RAS.
Phone: +7 988 871-55-28.
E-mail: dreammas@yandex.ru

Для цитирования:

Скупневский С.В., Савельев Р.В. Серотонин и адреналин как ингибиторы образования внеклеточных ловушек нейтрофилов в эксперименте // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 4. С. 823–826. doi: 10.15789/2220-7619-SAA-17558

Citation:

Skupnevskii S.V., Saveljjev R.V. Serotonin and adrenaline as inhibitors of neutrophil extracellular traps formation (experimental study) // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 4, pp. 823–826. doi: 10.15789/2220-7619-SAA-17558

SEROTONIN AND ADRENALINE AS INHIBITORS OF NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS FORMATION (EXPERIMENTAL STUDY)

Skupnevskii S.V., Saveljev R.V.

Institute of Biomedical Investigations — the Affiliate of Vladikavkaz Scientific Centre of RAS, RNO-Alania, Vladikavkaz, Russian Federation

Abstract. Regulation of the NETosis can provoke cancer, inflammatory and autoimmune diseases and become a basis for effective targeted therapy. The aim: to study the modifying effects of serotonin and adrenaline on NETosis during phagocytosis in rats. *Materials and methods.* Wistar rats were divided into control (solvent, 0.9% NaCl solution) and experimental (serotonin and adrenaline 1.43 and 0.143 mg/kg body weight, respectively) groups. Intraperitoneal injection of test substances was carried out 90 minutes before blood sampling, in which phagocytic activity (PhA), phagocytic index (PhI) and degree of suicidal neutrophil NETosis were determined: with total and partial chromatin decondensation (TCD, PCD, accordingly). A paired Student's t test was used to compare groups with numerical values and McNemar's test (for dichotomous variables). Pearson's linear correlation coefficient (r_{xy}) was assessed to measure a linear relationship between time points. *Results.* The administration of adrenaline contributed to NETosis inhibition by 41.5% compared to control group ($p < 0.001$), serotonin — by 27.6% ($p < 0.001$). The ratio of neutrophils with total and partial chromatin decondensation for control group was 1.0:0.9; for serotonin and adrenaline it changed to 1.0:1.7 and 1.0:1.4, respectively. Relative to control group, phagocytic index after serotonin administration increased by 4.9%, in case of adrenaline, on the contrary, it decreased by 12.4% ($p < 0.01$). A high positive correlation was revealed between NETosis and phagocytic index for control group and experimental group with adrenaline: $r_{xy} = 0.823-0.997$. For phagocytic index and NETosis in these groups there was a high negative ($r_{xy} = -0.714-(-0.871)$) and a noticeable positive correlation for serotonin ($r_{xy} = 0.638$). *Conclusion.* Serotonin and adrenaline in therapeutic dosages have a pronounced inhibitory effect on NETosis, which may pave the avenue for increasing the effectiveness of therapy for immunoinflammatory and oncological diseases. The use of serotonin is preferable because it has additional immunomodulatory effects and cause no direct stimulation of α - and β -adrenergic receptors.

Key words: *adrenaline, extracellular traps of neutrophils, modification of inflammation, NETosis, phagocytic activity of neutrophils, serotonin.*

Введение

Важная роль формирования внеклеточных ловушек нейтрофилов (neutrophil extracellular traps, NET) при фагоцитозе микроорганизмов, а также в патогенезе аутоиммунных заболеваний (ревматоидный артрит, системная красная волчанка, псориаз и др. [1]) определяет высокий интерес исследователей к изучению механизмов данного феномена. В работе Волкова Д.В. и соавт. [2] отмечается, что внеклеточные ловушки нейтрофилов оказывают стимулирующее влияние на рост и метастазирование солидных опухолей и в то же время за счет пространственной преграды значительно снижают эффективность CAR-T-лимфоцитарной терапии (Chimeric Antigen Receptor T-Cell). И.И. Долгушин и Е.А. Мезенцева приводят результаты исследований нетоза, способствующего переходу *P. aeruginosa* от высокорепликативного планктонного существования к пленочному, что предотвращает проникновение возбудителя в головной мозг мышей при инокуляции бактерий на роговицу животных и выявляет один из эволюционно закрепленных защитных механизмов [4]. Изначальное представление о том, что нетоз — одна из новых форм клеточной гибели, в последнее время значительно расширилось, поскольку обосновано его непосредственное участие в воспалении и аутоиммунитете за счет индукции образования антител, иммунных комплексов, активных форм

кислорода (АФК), азота, а также выброса аларминов в виде ядерной, митохондриальной ДНК и другого внутриклеточного содержимого [3].

Определяется роль нетоза в таргетной терапии атерогенного воспаления, которая способна значительным образом снизить риски атеротромботических осложнений [10]. Все это определяет актуальность поиска эффективных и безопасных средств для управления процессами выброса хроматина и формирования NET.

Цель — изучить модифицирующее действие серотонина и адреналина в отношении нетоза при фагоцитозе у крыс.

Материалы и методы

Исследование провели на 9 крысах линии Wistar массой 270–290 г, разделенных на три равные группы. Первая группа — контроль (внутрибрюшинное (в/б) введение растворителя — физиологического раствора эквивалентно с опытными группами). Вторая группа (опытная) — в/б введение серотонина (серотонина адипинат, раствор для введения (ООО «ЛОПП+К», Россия) из расчета 1,43 мг/кг массы тела (м.т.). Третья группа (опытная) — в/б введение адреналина (эпинефрина гидрохлорид) (ФГУП «Московский эндокринный завод», Россия) из расчета 0,143 мг/кг м.т.

Через 90 мин после введения препаратов под общим рауш-наркозом у животных из сердца отбирали кровь, которую стабилизировали ге-

парином с конечной концентрацией антикоагулянта 50 МЕ/мл. Образцы крови, подогретые до 37°C, смешивали в соотношении 10:1 с суспензией туши, разведенной 1:1000 физиологическим раствором и инкубировали в термостате в течение 30 мин при 37°C для оценки индуцированного нетоза и при 38°C для оценки фагоцитарной активности [7]. После инкубации кровь тщательно перемешивали и делали мазки на аппарате «Vision» (Австрия). Микропрепараты высушивали при комнатной температуре и фиксировали 25 мин при 37°C в парах формалина. Окрашивали 0,5% раствором метиленового синего в течение 2–3 мин. Оценивали процент суицидального нетоза с частичной и полной деконденсацией хроматина (ЧДХ и ПДХ), анализируя по 150 нейтрофилов на крысу. Определяли фагоцитарную активность (100 клеток на крысу), рассчитывая фагоцитарный индекс (ФИ, количество клеток, вступивших в фагоцитоз) и фагоцитарное число (ФЧ, среднее количество частиц, поглощенных клетками) с помощью микроскопа «Минимед-2». Сравнение гипотез проводили для двух связанных групп (контроль/опыт) по парному критерию Стьюдента — для количественного признака с нормальным распределением — фагоцитарного числа; критерию Мак-Немара — для качественного дихотомического признака — нетоза (и его разновидностей: ПДХ/ЧДХ) и фагоцитарного индекса. Нормальность распределения выборки значений ФЧ проверяли по критерию Шапиро–Уилка (при уровне значимости $\alpha = 0,05$). Коэффициент корреляции рассчитывали по критерию Пирсона (r_{xy}). Данные обрабатывали в Excel, вычисляя среднее значение и стандартное отклонение $M \pm \sigma$ (для численного значения); достоверность различий проверяли с помощью онлайн калькулятора (<https://medstatistic.ru/calculators.html>).

В работе с лабораторными животными придерживались правил и этических норм содержания и ухода, описанных в руководстве National Research Council, 2011 г. и ГОСТ Р53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики» с разрешения этического комитета при Институте биомедицинских исследований РАН.

Результаты и обсуждение

В ходе исследования был установлен выраженный нетоз-ингибирующий и фагоцитоз-модулирующий эффекты адреналина и серотонина в условиях *in vivo* (табл.).

Из таблицы видно, что введение биогенных аминов приводит к общему снижению образования NET и изменению морфологии самих ловушек. Из двух сравниваемых препаратов адреналин оказал более выраженное ингибирование нетоза — на 41,5% (относительно контроля), серотонин — на 27,6%. Соотношение нейтрофилов с полной деконденсацией хроматина и частичной для контрольной группы составило 1,0:0,9, в то время как для серотонина оно изменилось до 1,0:1,7, а для адреналина равнялось 1,0:1,4.

Выгодным свойством, отличающим серотонин от адреналина, явилось стимулирование фагоцитоза, который превысил показатели контрольной группы на 4,9%, что сопровождалось дополнительно увеличением фагоцитарного числа. Для адреналина падение фагоцитарной активности составило 12,4% (относительно животных контрольной группы).

По шкале Чеддока для контрольной группы и опытной с адреналином, выявляется высокая положительная корреляционная связь между нетозом и фагоцитарным индексом. Для серотонина теснота связи — умеренная, а характер корреляции — обратный. Для фагоцитарного числа и нетоза выявлена аналогичная тенденция: отрицательная высокая корреляция для контрольной группы и эпинефрина и заметная положительная корреляция для серотонина.

Обнаруженные эффекты могут быть объяснены рядом общих биологических и химических свойств серотонина и адреналина. В первую очередь, обе молекулы являются активаторами тромбоцитов, которые, как известно, выступают одним из факторов врожденного иммунитета, образуя тромбоцитарно-лейкоцитарные комплексы [6]. В частности, благодаря наличию рецепторов к патогенам (например, TLR4 (Toll-like receptor) к бактериальным липополисахаридам) кровяные пластинки могут непосредственным

Таблица. Результаты исследования фагоцитарной активности и индуцированного нетоза у крыс

Table. Results of rat phagocytic activity and induced NETosis

Группа Group	NET, %	ПДХ, % TCD, %	ЧДХ, % PCD, %	ФИ, % PhA, %	ФЧ, $M \pm \sigma$ Phl	r_{xy} (ФИ/NET) (PhA/NET)	r_{xy} (ФЧ/NET) (Phl/NET)
Контроль/Control	21,7	11,3	10,4	47,7	1,8±0,4	0,997	-0,714
Серотонин/Serotonin	15,7***	5,9***	9,8***	52,6	2,0±0,3	-0,418	0,638
Адреналин/Adrenaline	12,7***	5,3***	7,4***	35,3**	1,5±0,2	0,823	-0,871

Примечание. *** — $p < 0,001$; ** — $p < 0,01$ относительно контрольной группы по критерию Мак-Немара; статистические различия ФЧ «контроль/опыт» незначимые по парному критерию Стьюдента.

Note. *** — $p < 0.001$; ** — $p < 0.01$ compared with control group assessed by McNemar criterion; statistical differences for Phl in control/experience parameter are insignificant according to Student's paired criterion.

образом изменять активность нейтрофилов, влияя на реактивность клеточного звена иммунитета [9]. Во-вторых, исследуемые биогенные амины проявляют выраженные антиоксидантные свойства и могут купировать образование АФК — пускового звена в механизме дегрануляции и выброса хроматина нейтрофилами.

Изменение фагоцитарной активности, изученное в ходе эксперимента, находится в полном соответствии с данными из научной литературы, где показано, что серотонин повышает общую фагоцитарную активность [8], а катехоламины, наоборот, ее снижают [5]. Результаты корреляционного анализа проявляют механизм образования ловушек нейтрофилов с серотонином, отличный от контрольной группы и опыт-

ной, подвергнутой воздействию адреналина. Отличительным признаком животных, получавших серотонин, является повышение фагоцитарной активности на фоне снижения NET.

Таким образом, серотонин и адреналин в терапевтических дозировках способны оказывать выраженное ингибирующее действие в отношении нетоза, что может открывать перспективы к повышению эффективности терапии иммуновоспалительных и онкологических заболеваний. Использование серотонина является более предпочтительным, поскольку он обладает дополнительным иммуномодулирующим действием, повышая фагоцитарную активность нейтрофилов, и не вызывает прямой стимуляции α - и β -адренорецепторов.

Список литературы/References

- Бедина С.А., Мозговая Е.Э., Трофименко А.С., Мамус М.А., Спицина С.С., Зборовская И.А. Внеклеточные ловушки нейтрофилов: динамика образования, ассоциированная с переходом от ремиссии к активному ревматоидному артриту // Сибирское медицинское обозрение. 2022. № 6. С. 86–92. [Bedina S.A., Mozgovaya E.E., Trofimenko A.S., Mamus M.A., Spitsyna S.S., Zborovskaya I.A. Neutrophil extracellular traps: formation dynamics associated with the transition from remission to active rheumatoid arthritis. *Sibirskoe meditsinskoe obozrenie = Siberian Medical Review*, 2022, no. 6, pp. 86–92. (In Russ.)] doi: 10.20333/25000136-2022-6-86-92
- Волков Д.В., Тец Г.В., Рубцов Ю.П., Степанов А.В., Габибов А.Г. Внеклеточные ловушки нейтрофилов (NET): перспективы таргетной терапии // Acta Naturae. 2021. № 3. С. 15–23. [Volkov D.V., Tets G.V., Rubtsov Yu.P., Stepanov A.V., Gabibov A.G. Extracellular neutrophil traps (NET): prospects for targeted therapy. *Acta Naturae*, 2021, no. 3, pp. 15–23. (In Russ.)]
- Воробьева Н.В. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: новые аспекты // Вестник Московского университета. Серия 16. Биология. 2020. Т. 75, № 4. С. 210–225. [Vorob'eva N.V. Neutrophil extracellular traps: new aspects. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 16. Biologiya = Herald of Moscow University. Series 16. Biology*, 2020, vol. 75, no. 4, pp. 210–225. (In Russ.)]
- Долгушин И.И., Мезенцева Е.А. Нейтрофильные внеклеточные ловушки в борьбе с биофильнообразующими микроорганизмами: охотники или добыча? // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2020. Т. 97, № 5. С. 468–481. [Dolgushin I.I., Mezentseva E.A. Neutrophil extracellular traps in the fight against biofilm-forming microorganisms: hunters or prey? *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2020, vol. 97, no. 5, pp. 468–481. (In Russ.)] doi: 10.36233/0372-9311-2020-97-5-9
- Кривохижина Л.В., Осиков М.В. Современные представления о регуляции неспецифической защиты в организме // Человек. Спорт. Медицина. 2005. Т. 1, № 4 (44). С. 88–94. [Krivokhizhina L.V., Osikov M.V. Modern ideas about the regulation of nonspecific protection in the body. *Chelovek. Sport. Meditsina = Human. Sport. Medicine*, 2005, vol. 1, no. 4 (44), pp. 88–94. (In Russ.)]
- Павлов О.В., Чепанов С.В., Селютин А.В., Сельков С.А. Тромбоцитарно-лейкоцитарные взаимодействия: иммунорегуляторная роль и патофизиологическое значение // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 5. С. 871–888. [Pavlov O.V., Chepanov S.V., Selutin A.V., Selkov S.A. Platelet-leukocyte interactions: immunoregulatory role and pathophysiological relevance. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2022, vol. 24, no. 5, pp. 871–888. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-PLI-2511
- Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2012. 944 с. [Guidelines for Conducting Preclinical Trials of Medicines. Part one / Ed. by A.N. Mironov. *Moscow: Grif and K*, 2012. 944 p. (In Russ.)]
- Herr N., Bode C., Duerschmied D. The effects of serotonin in immune cells. *Front. Cardiovasc. Med.*, 2017, no. 4: 48. doi: 10.3389/fcvm.2017.00048
- Rai G. NETosis: Immunity, pathogenesis and therapeutics drug development. *Academic Press*, 2019. 200 p.
- Van A.K., Maegdefessel L., Soehnlein O. Therapeutic targeting of neutrophil extracellular traps in atherogenic inflammation. *Thromb. Haemost.*, 2019, vol. 119, no. 4, pp. 542–552. doi: 10.1055/s-0039-1678664

Авторы:

Скупневский С.В., д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории субклеточных структур отдела молекулярных и клеточных механизмов аутоиммунных заболеваний Института биомедицинских исследований — филиала ФГБУН ФНЦ Владикавказский научный центр РАН, г. Владикавказ, Россия;
Савельев Р.В., старший лаборант лаборатории субклеточных структур отдела молекулярных и клеточных механизмов аутоиммунных заболеваний Института биомедицинских исследований — филиала ФГБУН ФНЦ Владикавказский научный центр РАН, г. Владикавказ, Россия.

Authors:

Skupnevskiy S.V., DSc (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Subcellular Structures, Department of Molecular and Cellular Mechanisms of Autoimmune Diseases, Institute of Biomedical Research, Affiliate of Vladikavkaz Scientific Center of the RAS, Vladikavkaz, Russian Federation;
Saveljev R.V., Senior Laboratory Assistant, Laboratory of Subcellular Structures, Department of Molecular and Cellular Mechanisms of Autoimmune Diseases, Institute of Biomedical Research, Affiliate of Vladikavkaz Scientific Center of the RAS, Vladikavkaz, Russian Federation.

Поступила в редакцию 20.12.2023
 Принята к печати 08.08.2024

Received 20.12.2023
 Accepted 08.08.2024