

Особливості реалізації програмованої загибелі нейтрофілів крові за умов гіпергомоцистеїнемії при гіпертиреозі

Нечипорук В.М.^{1*}, Корда М.М.²

¹Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова, Україна

²Тернопільський національний медичний університет імені І.Я.Горбачевського МОЗ України, Україна

*E-mail: nechporuk@vnmu.edu.ua

Ключові слова:

- гомоцистеїн
- тиреоїдні гормони
- гіпергомоцистеїнемія
- апоптоз

Анотація

Гіпергомоцистеїнемія (ГГЦ) є метаболічним фактором ризику ураження судин. Одним із механізмів кардіотоксичного ефекту високих рівнів гоцистеїну (ГЦ) є окисдатовний стрес. Окислення ГЦ супроводжується утворенням активних форм кисню (АФК), які індують перекисне окислення ліпідів у клітинних мембранах, виникає пошкодження мітохондріальної мембрани, звільнення цитохрому С і активація каспази-3, що завершується апоптозом. Вплив на функцію серцево-судинної системи та метаболізм ГЦ мають гормони щитоподібної залози.

Метою нашої роботи було дослідити особливості реалізації програмованої клітинної смерті в циркулюючих нейтрофілах щурів з гіпергомоцистеїнемією при гіпертиреозі.

Тривалий гіпертиреоз моделювали у піддослідних щурів шляхом дозування тваринам L-тироксину протягом 21 дня. ГГЦ моделювали шляхом введення екзогенного ГЦ протягом 21 дня.

Виявлено, що кількість циркулюючих нейтрофілів зі збільшеною продукцією АФК та зниженим трансмембранним мітохондріальним потенціалом значно збільшується у щурів з ГГЦ порівняно з контрольними тваринами, що свідчить про прооксидантні властивості ГЦ та його здатність викликати мітохондріальну дисфункцію. Інтенсивність продукції АФК циркулюючими нейтрофілами у гіпертиреоїдних тварин з ГГЦ істотно не відрізнялася від такої у гіпертиреоїдних щурів без ГГЦ. Виявлено збільшення кількості циркулюючих нейтрофілів з ознаками апоптозу у щурів з ГГЦ порівняно з контрольною групою тварин.

Експериментальна ГГЦ, що супроводжується гіперпродукцією АФК та порушенням цілісності зовнішньої мітохондріальної мембрани, призводить до ініціації апоптотичної загибелі клітини. Надлишок гормонів щитоподібної залози також посилює ініціацію запрограмованої смерті клітин.

Вступ

Відомо, що патологія серцево-судинної системи є основною причиною захворюваності і смертності серед населення у світі. Тому первинна профілактика та пошук нових предикторів кардіоваскулярної патології є важливим завданням. Встановлено, що у осіб із рівнем гоцистеїну (ГЦ) в сироватці

крові $> 15,3$ мкмоль/л ризик смерті від серцево-судинної патології є вищим у 1,7 рази, а від інфаркту міокарда – у 3,4 рази [1]. Гіпергомоцистеїнемія (ГГЦ) – рівень ГЦ в сироватці крові > 15 мкмоль/л – є одним із нових метаболічних факторів ризику судинних уражень [2].

Одним із механізмів кардіотоксичної дії високих концентрацій ГЦ є окислативний стрес та розвиток ендотеліальної дисфункції. Процес окиснення ГЦ супроводжується утворенням активних форм кисню (АФК), які індукують процеси пероксидного окиснення ліпідів у мембранах клітин і в ліпопротеїнах низької щільності. Надлишок АФК зумовлює деполяризацію мітохондріальної мембрани, виділення цитохрому-с, активацію каспази-3 та призводить до апоптозу клітин [3].

Відомо, що гіпертиреоз зумовлює збільшення частоти серцевих скорочень, скоротливості міокарда та фракції викиду, систолічної гіпертонії, систолічних шумів, збільшеної маси лівого шлуночка та розвитку стенокардії, фібриляції передсердь з ризиком інсульту [4]. Встановлено, що тиреоїдні гормони впливають на метаболізм ГЦ [5].

Метою нашої роботи було дослідити особливості реалізації програмованої загибелі нейтрофілів крові у щурів з ГГЦ та на тлі гіпертиреозу.

Матеріали та методи

Для досліджень використано 24 безпородних щурів-самців масою 150–180 г. Усіх тварин поділили на 3 групи: 1-а – контрольна група тварин ($n=8$); 2-га – щури з ГГЦ (ентерально вводили 100 мг/кг тіолактону-ГЦ протягом 28 днів) ($n=8$); 3-тя – тварини з гіпертиреозом, які щоденно протягом 21-ї доби отримували ентерально L-тироксин (200 мкг/добу на 1 кг маси) ($n=8$); четверта – щури з ГГЦ, яким щоденно протягом 21-ї доби вводили ентерально L-тироксин (200 мкг/добу на 1 кг маси) ($n=8$).

Для дослідів використовували популяцію нейтрофілів крові. Аналіз зразків клітин для визначення усіх досліджуваних параметрів проводився на проточному цитометрі Epics XL («Beckman Coulter», США). Генерацію АФК визначали за допомогою барвника із заблокованою флуоресценцією [6]. Рівень трансмембранного потенціалу мітохондрій ($\Delta\Psi_m$) визначали з допомогою набору реактивів «MitoScreen» («BD Pharmingen», США) [7]. Оцінку апоптозу/некрозу у популяції нейтрофілів крові проводили з використанням FITC-міченого анексину V з набору реагентів «ANNEXIN V FITC» («Beckman Coulter», США) [8].

Статистичну обробку цифрових даних здійснювали за допомогою програмного забезпечення «Excel» («Microsoft», США).

Результати та обговорення

Нами встановлено, що генерація АФК нейтрофілами крові щурів із ГГЦ збільшилася на 116% відносно контрольної групи. У щурів із ГГЦ на тлі гіпертиреозу даний показник зріс на 74,8% відносно контрольної групи, але відносно групи тварин з ГГЦ без супутньої патології був нижчим на 19,1%. Варто вказати, що інтенсивність генерації АФК нейтрофілами крові у гіпертиреїдних тварин з ГГЦ вірогідно не відрізнялася від показника тварин з гіпертиреозом. Подібні результати були отримані в роботі [9]. Раніше було встановлено, що ГЦ сприяє окислювальному пошкодженню шляхом автоокислення та утворенню змішаних дисульфідів, взаємодії тіолактон-ГЦ та гомоцистеїнуванню білка, а пряма інкубація в присутності ГЦ підвищує середні рівні АФК в ендотеліальних [10] або гладком'язових артеріальних клітинах [11].

Подібна тенденція спостерігалась відносно змін кількості нейтрофілів крові із зниженим $\Delta\Psi_m$. Нами встановлено, що у щурів із ГГЦ кількість нейтрофілів крові із зниженим $\Delta\Psi_m$ збільшилася на 98% відносно контрольної групи. У щурів із ГГЦ на тлі гіпертиреозу даний показник зріс на 81,2% відносно контролю, при цьому вірогідно не відрізняючись відносно показника тварин з ГГЦ. Наші результати подібні до результатів інших дослідників, що встановили індукцію програмованої загибелі різних типів клітин за умов ГГЦ. Так, Вао Х.М. *та ін.* показали, що ГЦ-індукований апоптоз в ендотеліальних клітинах-попередниках може бути пов'язаний з прооксидативним ефектом ГЦ, а також з підвищенням експресії білка р38МАРК та зростанням активності каспази-3 [3].

Узагальнюючи отримані дані, можна вважати, що гіперпродукція АФК викликає порушення цілісності зовнішньої мітохондріальної мембрани, внаслідок чого відбувається вихід цитохрому с та інших проапоптичних протеїнів із міжмембранного простору у цитозоль і запускається апоптоз клітин. У

щурів із ГГЦ кількість нейтрофілів крові з ознаками апоптозу збільшилася на 49,5 % відносно контрольної групи. У щурів із ГГЦ на тлі гіпертиреозу даний показник зріс на 44,2 % відносно контрольної групи, при цьому вірогідно не відрізняючись відносно показника тварин з ГГЦ.

При вивченні кількості PI+-нейтрофілів крові, які характеризують інтенсивність некротичних процесів у щурів з ГГЦ встановлено їх вірогідне (на 26,2 %) переважання відносно контрольної групи. У щурів із ГГЦ на тлі гіпертиреозу даний показник зріс на 31,0 % відносно контрольної групи, при цьому вірогідно не відрізняючись відносно показника тварин з ГГЦ.

Висновки

Експериментально індукована ГГЦ супроводжується гіперпродукцією активних форм кисню та порушенням цілісності зовнішньої мітохондріальної мембрани, що призводить до ініціації апоптотичної загибелі клітин. Надлишок гормонів щитовидної залози також посилює ініціацію запрограмованої смерті клітин.

Література

- [1] Peng H, Man C, Xu J, Fan Y. Elevated homocysteine levels and risk of cardiovascular and all-cause mortality: a meta-analysis of prospective studies. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B* [Internet]. 2015 Jan;16(1):78–86. Available from: <https://doi.org/10.1631/jzus.B1400183>
- [2] Schaffer A, Verdoia M, Casseti E, Marino P, Suryapranata H, De Luca G. Relationship between homocysteine and coronary artery disease. Results from a large prospective cohort study. *Thrombosis Research* [Internet]. 2014 Aug;134(2):288–293. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2014.05.025>
- [3] Bao X, Wu C, Lu G. Atorvastatin inhibits homocysteine-induced dysfunction and apoptosis in endothelial progenitor cells. *Acta Pharmacologica Sinica* [Internet]. 2010 Mar 22;31(4):476–484. Available from: <https://doi.org/10.1038/aps.2010.22>
- [4] An JH, Song K-H, Kim D-L, Kim SK. Effects of thyroid hormone withdrawal on metabolic and cardiovascular parameters during radioactive iodine therapy in differentiated thyroid cancer. *Journal of International Medical Research* [Internet]. 2016 Nov 18;45(1):38–50. Available from: <https://doi.org/10.1177/0300060516664242>
- [5] Zhang Y, Wang Q, Li Q, Lu P. Association between Hyperhomocysteinemia and Thyroid Hormones in Euthyroid Diabetic Subjects. *BioMed Research International* [Internet]. 2015;2015:1–5. Available from: <https://doi.org/10.1155/2015/196379>
- [6] Bass DA, Parce JW, Dechatelet LR, Szejda P, Seeds MC, Thomas M. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J Immunol*. 1983 Apr;130(4):1910–1917.
- [7] Chechina OY, Ryazantseva NV, Sazonova YV, Zhukova NG, Udintseva IN, Novitsky VV. Mechanisms of lymphocyte apoptosis at tick-borne encephalitis. *Bulletin of Siberian Medicine* [Internet]. 2011 Dec 28;10(6):61–65. Available from: <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2011-6-61-65>
- [8] Maianski NA, Maianski AN, Kuijpers TW, Roos D. Apoptosis of Neutrophils. *Acta Haematologica* [Internet]. 2003 Dec 17;111(1-2):56–66. Available from: <https://doi.org/10.1159/000074486>
- [9] Signorello MG, Viviani GL, Armani U, Cerone R, Minniti G, Piana A, et al. Homocysteine, reactive oxygen species and nitric oxide in type 2 diabetes mellitus. *Thrombosis Research* [Internet]. 2007 Jan;120(4):607–613. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2006.11.008>
- [10] Zhu W, Li S, Lin L, Yan H, Fu T, Zhu J. Vascular oxidative stress increases dendritic cell adhesion and transmigration induced by homocysteine. *Cellular Immunology* [Internet]. 2009;254(2):110–116. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2008.08.001>

- [11] Ke XD, Foucault-Bertaud A, Genovesio C, Dignat-George F, Lamy E, Charpiot P. Homocysteine modulates the proteolytic potential of human arterial smooth muscle cells through a reactive oxygen species dependant mechanism. *Molecular and Cellular Biochemistry* [Internet]. 2009 Sep 29;335(1-2):203–210. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11010-009-0270-7>