

СТАН ТРОМБОЦИТІВ У ЩУРІВ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМИ ПОРУШЕННЯМИ ОБМІНУ ГОМОЦИСТЕЇНУ, ЦИСТЕЇНУ ТА ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ

Вивчено стан тромбоцитів при порушеннях метаболізму гомоцистеїну, цистеїну та гідроген сульфїду (H_2S) у 110 щурів. Гіпергомоцистеїнемія та гіперцистеїнемія викликають збільшення спонтанної та ADP-індукованої агрегації тромбоцитів, MPV, активності PGH-синтази і зменшення активності екто-NTPDази (апірази) тромбоцитів. Введення пропаргілгліцину (інгібітора синтезу H_2S) спричиняє активацію тромбоцитів з підвищенням активності PGH-синтази та зниженням активності апірази, а введення Na_2S (донора H_2S) має слабкий антиагрегантний ефект.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: гомоцистеїн, цистеїн, гідроген сульфід, пропаргілгліцин, тромбоцити.

ВСТУП. Серцево-судинна патологія асоціюється зі змінами морфологічних параметрів тромбоцитів, зокрема зі збільшенням їх середнього об'єму (MPV) [7]. У тромбоцитів великих розмірів зростає гранулярність, збільшується експресія адгезивних глікопротеїнів GP IIIa та посилюються агрегаційні властивості [8]. Підвищення MPV пов'язують з гіперхолестеролемією, інсулінорезистентністю, атеросклерозом [7]. Можливо, й інші метаболічні чинники можуть індукувати зміни MPV, адже майже у 40 % пацієнтів з ішемічною хворобою серця виявляють порушення обміну сірковмісних амінокислот – гомоцистеїну (ГЦ) та цистеїну [4]. В процесі метаболізму сірковмісних амінокислот утворюється біологічно активний метаболіт гідроген сульфід (H_2S) – вазодилататор, цитопротектор, антиоксидант, але питання щодо його впливу на стан тромбоцитів залишається відкритим. Раніше було показано, що двотижневе введення високих доз тіолатону ГЦ (200 мг/кг маси) викликало підвищення MPV, посилення агрегації тромбоцитів та зниження рівня H_2S у плазмі крові щурів [2]. Метою цієї роботи було вивчити особливості агрегації та морфологічні показники і стан тромбоцитів у щурів з комбінованими й ізольованими порушеннями обміну ГЦ, цистеїну та H_2S .

© Н. В. Заїчко, 2014.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди проведені на 110 білих нелінійних щурах-самцях масою 200–270 г відповідно до загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених на Першому національному конгресі України з біоетики (Київ, 2001), Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), інших міжнародних угод та національного законодавства в цій галузі. Тварини перебували в стандартних умовах віварію з 12-годинним режимом день/ніч, воду та їжу отримували *ad libitum*. Під час дослідів щурів годували напівсинтетичною крохмально-казеїновою дієтою з контрольованим вмістом усіх нутрієнтів, яку модифікували залежно від мети експерименту [1]. Відтворено моделі ГГЦ, гіперцистеїнемії, дефіциту та надлишку H_2S .

Модель гострої метіонінової ГГЦ дозволяє швидко збільшити вміст ГЦ у плазмі крові тварин в 4–5 разів до 6 год. Щурам вводили L-метіонін ("Sigma", США) у дозі 500 мг/кг маси тіла в шлунок (в/шл), і через 2 год, на пікові рівні ГЦ у крові, тварин піддавали евтаназії шляхом дислокації шийних хребців. Модель гіповітамінотно-метіонінової ГГЦ викликає підвищення вмісту ГЦ у плазмі крові в 10–13 разів за 14 діб і супроводжується гіперцистеїнемією та гіперхолестеролемією. Цю модель відтворювали шляхом годування тварин дієтою, що містила

L-метіонін (1 % до сухої маси) і була позбавлена вітамінів B_6 , B_9 , B_{12} . Модель тіолактон ГЦ-індукованої ГГЦ, що забезпечує підвищення вмісту ГЦ у плазмі крові щурів у 2–3 рази, відтворювали шляхом введення тіолактону D,L-ГЦ (“Sigma”, США) в/шл у дозі 100 мг/кг маси 28 діб. Цю модель ГГЦ також комбінували з введенням інгібітора NO-синтази L-NAME (“Sigma”, США) в дозі 30 мг/кг маси в/шл. Модель гіперцистеїнемії в щурів створювали шляхом введення L-цистеїну (“Sigma”, США) в дозі 250 мг/кг маси в/шл 28 діб. Дефіцит та надлишок H_2S у плазмі крові щурів викликали введенням інгібітора цистатіонін- γ -ліази D,L-пропаргілгліцину (“Sigma”, США) в дозі 50 мг/кг та донора H_2S – $Na_2S \cdot 9H_2O$ (“Sigma”, США) в дозі 3,36 мг/кг маси внутрішньочеревно 1 раз на добу протягом 7 діб. Контрольні групи отримували збалансований раціон і, залежно від умов досліду, “плацебо” – 1 % крохмальний гель при в/шл введенні речовин та 0,9 % розчин NaCl при внутрішньочеревному введенні речовин.

Кров у щурів отримували із серця у пробірці Vacuette (“Greiner Bio-One”, Австрія) з 3,8 % розчином цитрату натрію (9:1). Плазму, збагачену тромбоцитами, одержували шляхом центрифугування крові при 300 г 5 хв при 18–22 °C. Тромбоцити виділяли, центрифугуючи плазму при 1500 г 20 хв при 18–22 °C, осад тричі відмивали 0,05 М Трис-буфером (pH 7,4) з 0,13 М NaCl, ресуспендували в 1,0 мл цього ж буфера. Агрегацію тромбоцитів досліджували на агрегометрі AP2110 (“Солар”, Білорусь), як індуктор застосовували ADP (“Технологія-Стандарт”, Росія). Середній об’єм тромбоцитів (MPV, фл) та інші параметри визначали на гемоаналізаторі Erma PCE-210 (Японія).

Загальний рівень ГЦ визначали імуноферментним методом за набором “Homocysteine EIA” (“Axis-Shield”, Англія); активність апірази – екто-NTPDази (КФ 3.6.1.5) – за кількістю неорганічного фосфату, який утворився при гідролізі ADP; активність PGH-синтази (КФ 1.14.99.1) – в мікросомній фракції тромбоцитів за накопиченням окисненої форми адреналіну; вміст H_2S у плазмі крові – за реакцією з парафенілендіаміном, цистеїну – за реакцією з нінгідринном у кислому середовищі, як описано раніше [3]. Статистичну обробку результатів проводили за допомогою стандартних програм “MS Excel”. Вірогідність відмінностей оцінювали за t-критерієм Стьюдента, проводили парний кореляційний аналіз за Пірсоном.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. За умов гострої метіонінової ГГЦ посилювалась спон-

танна агрегація тромбоцитів (на 56,0 %), зростали ступінь та початкова швидкість ADP-індукованої агрегації (на 62,8 та 31,8 %), але через 24 год всі показники агрегації тромбоцитів нормалізувались (табл. 1). За умов тяжкої гіповітамінозно-метіонінової ГГЦ та при поєднанні помірної тіолактон ГЦ-індукованої ГГЦ з інгібуванням синтезу NO відзначали найбільш значне зростання здатності тромбоцитів до спонтанної агрегації (в 3,2–3,5 рази), посилювались усі параметри ADP-індукованої агрегації, достовірно знижувався поріг чутливості тромбоцитів до ADP. Так, концентрація ADP, яка викликала повну агрегацію тромбоцитів (з первинною та вторинною хвилями), в контролі становила $(9,40 \pm 0,92)$ мкМ, у щурів з тіолактон ГЦ-індукованою ГГЦ – $(5,45 \pm 0,59)$ мкМ, а за її поєднання з введенням L-NAME – $(2,65 \pm 0,43)$ мкМ ($p < 0,001$). Помірна тіолактон ГЦ-індукована ГГЦ та гіперцистеїнемія спричиняли зіставне посилення спонтанної та індукованої агрегації тромбоцитів. Максимальні відмінності в параметрах агрегації тромбоцитів у нормі та при ГГЦ чи гіперцистеїнемії виявляли за низьких концентрацій ADP (0,625–2,5 мкМ). Введення Na_2S (донора H_2S) упродовж 7 діб викликало достовірне зниження здатності тромбоцитів до спонтанної агрегації, але суттєво не порушувало ADP-індукованої агрегації. Під впливом пропаргілгліцину спостерігали підвищення ступеня спонтанної та індукованої агрегації, зростала початкова швидкість ADP-індукованої агрегації тромбоцитів.

Морфологічні параметри тромбоцитів за умов гострої ГГЦ не змінювались. Тяжка гіповітамінозно-метіонінова ГГЦ та помірна тіолактон ГЦ-індукована ГГЦ, комбінована з інгібуванням синтезу NO, викликали значні зміни морфологічних параметрів тромбоцитів: збільшувався MPV (з 6,7 до 8,1 фл), з’являлись ознаки анізоцитозу (підвищувався PDW) (табл. 2). Помірна ізольована тіолактон ГЦ-індукована ГГЦ спричиняла менш виражене зростання MPV та PDW, ніж моделі комбінованої ГГЦ. Тривала ізольована гіперцистеїнемія також індукувала помірне підвищення MPV та PDW, подібно до ізольованої ГГЦ. Введення Na_2S не спричиняло суттєвих змін морфологічних параметрів тромбоцитів, тоді як введення пропаргілгліцину викликало стійку тенденцію до збільшення MPV.

Далі ми оцінили активність PGH-синтази та апірази – ензимів, які регулюють процеси активації та агрегації тромбоцитів (табл. 3). Гостра та тривала ГГЦ спричиняла зростання активності PGH-синтази (проагрегант) та

зменшення активності апірази (антиагрегант), при цьому найбільш вираженими зміни були за умов комбінованих моделей. Аналогічні, хоча і менш виражені, зміни активності тромбоцитарних ензимів відзначали і при гіперцистеїнемії. Вплив модуляторів обміну H_2S на активність

ензимів виявився протилежним: введення Na_2S спричиняло зниження активності PGH-синтази та підвищення активності апірази, а введення пропаргілгліцину, навпаки, – зростання активності PGH-синтази та зменшення активності апірази.

Таблиця 1 – Показники агрегації тромбоцитів у щурів з порушеннями обміну сірковмісних амінокислот та H_2S (n=10–15, M±m)

Назва моделі	Група тварин	Спонтанна агрегація, %	Агрегація, індукована ADP (5 мкМ)		
			ступінь, %	швидкість, % за 1 хв	час, с
Метіонінова ГГЦ (гостра)	Контроль	3,87±0,35	32,5±1,55	28,6±1,00	381±10,7
	Модель	6,04±0,58	52,9±1,79 [*]	37,7±1,32 [*]	383±10,6
Гіповітамінозно-метіонінова ГГЦ	Контроль	3,16±0,41	27,1±1,14	25,6±1,41	365±18,6
	Гіповітаміноз	4,38±0,44 [*]	30,2±1,24	24,4±1,30	386±28,4
	Модель	10,5±0,58 [#]	62,6±2,91 [#]	44,7±2,67 [#]	411±21,0
Тіолактон ГЦ-індукована ГГЦ	Контроль	2,32±0,17	21,8±1,37	23,2±1,49	359±22,9
	Модель	3,83±0,31 [*]	42,4±3,12 [*]	37,5±2,76 [*]	386±28,4
	+ L-NAME	7,35±0,57 [#]	57,7±3,76 [#]	41,6±2,71 [*]	450±29,3 [*]
Гіперцистеїнемія	Контроль	2,56±0,29	23,7±1,50	24,4±1,55	342±20,2
	Модель	5,12±0,42 [*]	31,8±1,34 [*]	30,3±1,20 [*]	391±17,0
Модуляція обміну H_2S	Контроль	2,79±0,17	31,3±2,31	26,5±1,36	203±18,8
	Na_2S	2,10±0,26 [*]	26,0±1,14	22,5±1,70	207±10,7
	DL-ПГ	4,58±0,24 [*]	40,7±1,15 [*]	32,4±1,82 [*]	248±4,24 [*]

Примітки. Тут і в наступних таблицях:

- * – p<0,05 відносно контролю.
- # – p<0,05 відносно попередньої групи.
- DL-ПГ – пропаргілгліцин.

Таблиця 2 – Морфологічні параметри тромбоцитів у щурів з порушеннями обміну сірковмісних амінокислот та H_2S (n=10–15, M±m)

Назва моделі	Група тварин	Тромбоцити, тис./мм ³	MPV, фл	PCT, %	PDW, %
Гіповітамінозно-метіонінова ГГЦ	Контроль	486±18,3	6,73±0,17	0,33±0,01	10,1±0,16
	Гіповітаміноз	465±10,1	6,94±0,12	0,32±0,07	10,4±0,19
	Модель	438±15,6	8,01±0,21 [#]	0,35±0,02	12,6±0,30 [#]
Тіолактон ГЦ-індукована ГГЦ	Контроль	464±21,1	6,54±0,14	0,30±0,01	9,66±0,17
	Модель	466±13,7	7,57±0,13 [*]	0,35±0,01	9,77±0,31
	+ L-NAME	463±22,2	8,09±0,23 [#]	0,37±0,01	10,2±0,27
Гіперцистеїнемія	Контроль	455±7,04	6,79±0,07	0,31±0,01	9,28±0,05
	Модель	448±5,37	7,25±0,07 [*]	0,33±0,01	10,2±0,17 [*]
Модуляція обміну H_2S	Контроль	455±22,4	6,81±0,18	0,34±0,02	10,9±0,28
	Na_2S	462±17,9	6,72±0,21	0,36±0,07	10,8±0,14
	DL-ПГ	431±25,2	7,24±0,12	0,35±0,17	11,1±0,36

Таблиця 3 – Активність ензимів тромбоцитів та відношення ГЦ/ H_2S у щурів з порушеннями обміну сірковмісних амінокислот та H_2S (n=10–15, M±m)

Назва моделі	Група тварин	Апіраза, нмоль/хв·мг протеїну	PGH-синтаза, нмоль/хв·мг протеїну	ГЦ/ H_2S
Метіонінова ГГЦ (гостра)	Контроль	5,43±0,23	10,5±0,96	0,08±0,005
	Модель	3,23±0,40 [*]	14,8±0,62 [*]	0,71±0,08 [*]
Гіповітамінозно-метіонінова ГГЦ	Контроль	5,14±0,37	10,1±0,54	0,09±0,02
	Гіповітаміноз	4,88±0,29	9,68±0,56	0,12±0,01
	Модель	2,92±0,23 [#]	16,6±1,04 [#]	3,55±0,87 [#]
Тіолактон ГЦ-індукована ГГЦ	Контроль	5,08±0,22	9,53±0,66	0,09±0,01
	Модель	3,64±0,21 [*]	14,7±0,76 [*]	0,34±0,06 [*]
	+ L-NAME	3,14±0,19 [*]	15,1±1,05 [*]	0,45±0,08 [*]
Гіперцистеїнемія	Контроль	5,25±0,24	9,89±0,36	0,09±0,005
	Модель	4,10±0,29 [*]	12,7±0,83 [*]	0,08±0,005
Модуляція обміну H_2S	Контроль	5,12±0,18	9,76±0,45	0,09±0,005
	Na_2S	6,05±0,21 [*]	8,25±0,36 [*]	0,07±0,006 [*]
	DL-ПГ	4,48±0,27	11,7±0,31 [#]	0,19±0,01 [#]

Тромбоцитарні ензими, рецептори до ADP та фібриногену (GPIIb/IIIa) належать до редокс-чутливих протейнів [5]. Очевидно, ГЦ, цистеїн та H_2S можуть змінювати їх функціональний стан, як і багатьох інших протейнів, шляхом S-гомоцистеїнування, цистеїнування та S-сульфгідрування [6, 9].

Для всіх моделей ГЦ характерним було підвищення відношення ГЦ/ H_2S із найбільш суттєвими змінами за умов комбінованих моделей – гіповітамінозно-метіонінової (в 40 разів) та тіолактон ГЦ-індукованої у поєднанні з інгібуванням синтезу NO (в 5 разів). При гіперцистеїнемії відношення ГЦ/ H_2S майже не змінювалось, але у 2 рази зростало відношення цистеїн/ H_2S . Введення пропаргілгліцину викликало слабке підвищення (у 2 рази), а введення Na_2S , навпаки, зниження (в 1,3 раза) відношення ГЦ/ H_2S . Кореляційний аналіз засвідчив достовірний обернений зв'язок між активністю апірази тромбоцитів та відношенням ГЦ/ H_2S ($r=-0,77$, $p<0,05$).

Отже, порушення обміну ГЦ та цистеїну спричиняють формування гіперреактивності тромбоцитів, і найбільш виражені зміни вини-

кають за умов комбінування ГЦ з іншими метаболічними чинниками. Інгібування ендогенної продукції H_2S індукує активацію тромбоцитів, а підвищення вмісту H_2S у плазмі крові супроводжується слабким антиагрегантним ефектом. Вивчення молекулярних механізмів впливу H_2S на стан тромбоцитів є перспективним напрямком подальших досліджень і дозволить окреслити нові підходи до корекції патологічних станів, асоційованих з порушеннями обміну сірковмісних амінокислот.

ВИСНОВКИ. 1. При порушеннях обміну ГЦ і цистеїну посилюється здатність до спонтанної та ADP-індукованої агрегації, збільшується MPV, знижується активність апірази та підвищується активність PGH-синтази тромбоцитів. Найбільш виражені ознаки гіперреактивності тромбоцитів виникають за умов ГЦ, комбінованої з іншими метаболічними чинниками.

2. Введення пропаргілгліцину (інгібітора синтезу H_2S) викликає активацію тромбоцитів зі збільшенням активності PGH-синтази та зниженням активності апірази, а введення Na_2S (донора H_2S) має слабкий антиагрегантний ефект.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гіпергомоцистеїнемія: моделювання та вплив на стан судинної системи в експерименті / О. О. Пентюк, М. Б. Луцюк, К. П. Постовітенко [та ін.] // *Досягнення біології та медицини.* – 2004. – № 1 (3). – С. 35–38.
2. Заїчко Н. В. Асоціація середнього об'єму тромбоцитів з рівнем гомоцистеїну та гідроген сульфід у крові щурів з гіпергомоцистеїнемією / Н. В. Заїчко // *Мед. хімія.* – 2008. – **10**, № 2. – С. 54–58.
3. Заїчко Н. В. Порушення в системі гемостазу щурів, індуковані навантаженням метіоніном, та профілактична дія вітамінів B_6 , B_9 , B_{12} / Н. В. Заїчко // *Одес. мед. журн.* – 2010. – № 1. – С. 24–28.
4. Коваленко В. М. Асоціація гіпергомоцистеїнемії з метаболічними факторами ризику у хворих на ішемічну хворобу серця / В. М. Коваленко, І. І. Андрушко, Т. В. Талаєва // *Укр. кардіол. журн.* – 2011. – № 6. – С. 66–70.
5. Essex D. W. Redox modification of platelet glycoproteins / D. W. Essex, M. Li // *Curr. Drug. Targets.* – 2006. – **7**, № 10. – P. 1233–1241.
6. Jakubowski H. The pathophysiological hypothesis of homocysteine thiolactone-mediated vascular disease / H. Jakubowski // *J. Phys. Pharm.* – 2008. – **59**, Suppl. 9. – P. 155–167.
7. Mean platelet volume in patients with metabolic syndrome and its relationship with coronary artery disease / Y. Tavil, N. Sena, H. U. Yazicia [et al.] // *Thrombosis Research.* – 2007. – **120**, № 2. – P. 245–250.
8. Pathansali R. Prothrombotic megakaryocyte and platelet changes in hypertension are reversed following treatment: a pilot study / R. Pathansali, N. Smith, P. Bath // *Platelets.* – 2001. – **12**, № 3. – P. 144–149.
9. Stein A. Redox biology of hydrogen sulfide: Implications for physiology, pathophysiology, and pharmacology / A. Stein, Sh. M. Bailey // *Redox. Biology* – 2013. – **1**. – P. 32–39.

СОСТОЯНИЕ ТРОМБОЦИТОВ У КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМИ НАРУШЕНИЯМИ ОБМЕНА ГОМОЦИСТЕИНА, ЦИСТЕИНА И ГИДРОГЕН СУЛЬФИДА

Резюме

Изучено состояние тромбоцитов при нарушениях метаболизма гомоцистеина, цистеина и гидроген сульфида (H_2S) у 110 крыс. Гипергомоцистеинемия и гиперцистеинемия вызывают увеличение спонтанной и ADP-индуцированной агрегации тромбоцитов, MPV, активности PGH-синтазы и уменьшение активности экто-NTPДазы (апиразы) тромбоцитов. Введение пропаргилглицина (ингибитора синтеза H_2S) вызывает активацию тромбоцитов с повышением активности PGH-синтазы и снижением активности апиразы, а введение Na_2S (донора H_2S) имеет слабый антиагрегантный эффект.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гомоцистеин, цистеин, гидроген сульфид, пропаргилглицин, тромбоциты.

N. V. Zaichko
M. I. PYROHOV VINNYTSIA NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY

PLATELETS PARAMETERS IN RATS WITH HOMOCYSTEINE, CYSTEINE AND HYDROGEN SULFIDE EXPERIMENTAL METABOLIC DISORDERS

Summary

It was studied the platelets parameters in 110 rats with homocysteine, cysteine and hydrogen sulfide (H_2S) metabolic disorder. Hyperhomocysteinemia or hypercysteinemia induced an increase of spontaneous or ADP-induced platelet aggregation, MPV, PGH-synthase activity and decrease of ecto-NTPDase activity of platelets. Administration of propargylglycine (inhibitor H_2S synthesis) induced platelet activation with increase of PGH-synthase activity and decrease of ecto-NTPDase activity. But administration of Na_2S (H_2S donor) had mild antiplatelet effect.

KEY WORDS: homocysteine, cysteine, hydrogen sulfide, propargyl glycine platelets.

Отримано 01.07.14

Адреса для листування: Н. В. Заічко, Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова, вул. Пирогова, 56, Вінниця, 21018, Україна.