

УДК 616-005.6: 547.466: 546.221

Н.В. Заїчко

БІОХІМІЧНІ МЕХАНІЗМИ ФОРМУВАННЯ ТРОМБОФІЛІЇ, ІНДУКОВАНОЇ ХРОНІЧНИМ НАВАНТАЖЕННЯМ ТІОЛАКТОНОМ ГОМОЦИСТЕЇНУ ТА ЙОГО КОМБІНАЦІЄЮ З L-NAME. КОРЕКЦІЯ ВІТАМІННО-МІКРОЕЛЕМЕНТНИМ КОМПЛЕКСОМ

Науково-дослідний інститут реабілітації інвалідів Вінницького національного медичного університету ім. М.І.Пирогова (м. Вінниця)

Робота виконана в рамках планової НДР “Обмін гомоцистеїну в умовах дії нутрієнтних чинників та при різних патологічних станах”, № держреєстрації 0106U005134.

Вступ. Гіпергомоцистеїнемія (ГГЦ) є відомим фактором ризику серцево-судинних захворювань та тромботичних ускладнень. Механізми впливу ГГЦ на систему гемостазу різноманітні і реалізуються через оксидативний стрес, порушення синтезу факторів гемокоагуляції та фібринолізу, гальмування продукції оксиду азоту (NO) тощо [12].

Нещодавно були відкриті нові, невідомі раніше аспекти обміну гомоцистеїну (ГЦ). Виявилось, що в процесі деградації ГЦ шляхом транссульфування утворюється біологічно-активна молекула гідроген сульфід (H_2S) [19]. За даними літератури і результатами наших досліджень, H_2S причетний до регуляції судинного тонуусу [19] та агрегації тромбоцитів [5, 6], і, очевидно, є синергістом NO. Ймовірно, що зниження рівня H_2S в плазмі крові буде негативного відображатись на системі гемостазу та підвищувати ризик формування тромбофілії, як це, наприклад, спостерігається в умовах інгібування синтезу NO [18]. Раніше ми показали, що двотижневе введення тіолактону ГЦ щурам викликало зниження рівня H_2S в плазмі крові, яке корелювало з посиленням агрегації тромбоцитів [6].

Метою даної роботи було на основі комплексної оцінки стану системи гемостазу та фібринолізу за умов тривалого навантаження тіолактоном ГЦ (тГЦ) та його поєднання з введенням неселективного інгібітору NO-синтази L-NAME ідентифікувати ті ланки, які в найбільшій мірі реагують на токсичний вплив високих рівнів ГЦ та дефіцит вазоактивних молекул H_2S та NO. Ми також оцінили в якій мірі препарати з гіпогомоцистеїнемічної дією (вітамінно-мікроелементний комплекс) здатні усувати порушення в різних ланках системи гемостазу за даних умов.

Об'єкт і методи дослідження. Досліди проведені на 60 білих безпородних щурах-самцях масою 250-270 г. Під час експерименту тварини отримували стандартний напівсинтетичний крохмально-казеїновий раціон [13]. Щурі були розділені на 5 груп по 12 тварин в кожній. Групу контролю (№1) склали 12 інтактних щурів, яким 1 раз на добу інтрагастрально вводили 1% розчин крохмалю в кількості 1 мл на 100 г маси тіла. Навантаження тГЦ проводили щурам груп №2 та №3, навантаження тГЦ в комбінації з неселективними інгібітором NO-синтази - L-NAME (метиловий ефір L-N ω -нітроаргініну) проводили щурам груп № 4 та №5. тГЦ та L-NAME вводили інтрагастрально в дозах 100 мг/кг та 30 мг/кг, відповідно, 1 раз на добу на 1% розчині крохмалю протягом 28 дб. Щурам груп №3 та №5 до базової дієти протягом всього терміну експерименту додавали ВМК в кількості, що забезпечувала б надходження біля 714 мкг вітаміну B_6 , 143 мкг вітаміну B_9 , 14,3 мкг вітаміну B_{12} , 1 мг іонів цинку (Zn^{2+}), 7,5 мкг іонів хрому (Cr^{3+}) та 0,93 мкг іонів ванадію (V^{5+}) на 1 кг маси тіла тварин. Обрані дози вітамінів виявляють максимальний гіпогомоцистеїнемічний ефект [1]. Досліди виконували згідно правил гуманного відношення до експериментальних тварин, затверджених комітетом з біоетики ВНМУ ім. М.І.Пирогова.

Забір крові для досліджень проводили з серця тварин в пластикові пробірки Vacuette (Greiner Bio-One, Австрія): з 3,8% розчином цитрату натрію (у співвідношенні 9:1) чи K_2 ЕДТА. Перед забором крові щурів анестезували кетаміном (100 мг/кг маси тіла інтраперітонеально). З експерименту тварин виводили шляхом дислокації шийних хребців.

Багату та бідну тромбоцитами плазму крові отримували звичайними методами. Визначали активований частковий тромбопластиновий час (АЧТЧ), протромбіновий час (ПЧ) та протромбіновий індекс (ПТІ), тромбіно-

вий час (ТЧ). Вміст фібриногену визначали спектрофотометричним методом [2]. Вміст розчинних фібрин-мономерних комплексів (РФМК) визначали у паракоагуляційному тесті з використанням фосфатних буферів. Функціонально неактивні форми протромбіну визначали в тесті екамуліновий час (ЕЧ). Екамулін (ензим з отрути середньоазійської ефи багатолускової *Echis multisquamatus*), на відміну від тромбoplastину, перетворює в тромбін не лише функціонально активний протромбін, а і його неактивні форми - протромбін та декарбоксілований протромбін [9]. В пробірку вносили 0,1 мл 0,025М розчину $CaCl_2$, 0,1 мл розчину препарату екамуліну, 0,1 мл бідної тромбоцитами плазми крові, інкубували при 37°C, постійно струшуючи, реєстрували час утворення фібринового згортку, розраховували екамуліновий індекс: $EI = (EЧ_{\text{контроль}}/EЧ_{\text{дослід}}) * 100\%$ та співставляли його з ПТІ. За присутності в плазмі крові функціонально неактивних форм протромбіну EI перевищує ПТІ.

Систему протизсідання крові оцінювали за амідолітичною активністю антитромбіну III (АТ III) та протеїну С (PrC). Систему фібринолізу оцінювали за часом лізису еуглобулінів та вмістом ПАІ-1 (інгібітору активатору плазміногену 1), який визначали імуноферментним методом за набором Zymutest Rat - PAI-1 (Antigen), Франція.

Агрегацію тромбоцитів досліджували у зразках багатой тромбоцитами плазми крові на фотооптичному агрегометрі AP2110 ("Солар", Білорусь), в якості індуктору агрегації використовували АДФ. Морфофізіологічні параметри тромбоцитів визначали на гематологічному аналізаторі ErmaPCE-210(Японія). Реєстрували кількість тромбоцитів, середній об'єм тромбоцитів (MPV, фл), ширину розподілу тромбоцитів по об'єму (PDW, %) та тромбокрит (PCT, %). Активність простагландин-ендопероксид синтази (РГН-синтази, КФ 1.14.99.1) в тромбоцитах визначали спектрофотометричним методом за накопиченням окисненої форми

донору електронів адреналіну [10]. Вміст протеїну визначали за Лоурі [20].

Загальний рівень ГЦ визначали імуноферментним методом за набором "Homocysteine EIA" фірми "Axis-Shield", Англія. Вміст H_2S в плазмі крові визначали як описано [3]. Вміст SH-груп протеїнів визначали за реакцією з реактивом Елмана. Вміст цистеїну визначали за реакцією з нінгідрином у кислому середовищі [16]. Суму нітритів та нітратів в плазмі крові визначали за реакцією Грісса [8]. Вміст малонового діальдегіду (МДА) визначали за реакцією з тіобарбітуровою кислотою [4], а карбонільних груп протеїнів - за реакцією з 2,4-динітрофенілгідразином [9]. Фосфоліпідні фракції плазми крові - фосфатидилхолін(ФХ), лізофосфатидилхолін (ЛФХ), фосфатидилетаноламін (ФЕА) визначали методом тонкошарової хроматографії на силікагелі Л5/40, кількісну оцінку проводили після хроматографії за реакцією з фосфорнованіліновим реактивом. Загальний вміст фосфоліпідів оцінювали екстракційно-фотометричним методом [11].

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою стандартних статистичних програм "MS Excel XP". Вірогідність відмінностей оцінювали за t-критерієм Стьюдента.

В роботі використані L-цистеїн, L-NAME, реактив Елмана фірми Sigma (США), тіолактон D,L-гомоцистеїну фірми Fluka (Німеччина), набори "Техпластин-тест", "АПТВ-ЕІ-тест", "Тромботест", "Хромотех-Антитромбін", "АДФ" фірми Технологія-Стандарт (Росія) та "Реахром-Протеїн С" фірми НПО РЕНАМ (Росія). Препарат екамуліну люб'язно наданий співробітниками відділу структури та функції білка Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна НАНУ.

Результати досліджень та їх обговорення. Встановлено, що навантаження тГЦ викликало активацію системи зсідання крові: ПЧ, АЧТЧ та ТЧ скоротились на 11,2, 16,6 та 18,6%, рівень фібриногену підвищився на 17,0%, з'явилися РФМК (табл.1).

Таблиця 1

Вплив хронічного навантаження тіолактоном ГЦ, його поєднання з L-NAME та корекції ВМК на показники систем зсідання, протизсідання крові та фібринолізу у щурів ($M \pm m$, $n=8-12$)

Показник	Групи щурів				
	1	2	3	4	5
	Контроль	ГЦ	ГЦ+ВМК	ГЦ+L-NAME	ГЦ+L-NAME+ ВМК
ПЧ, с	17,8±0,37	15,8±0,35*	17,7±0,58#	14,7±0,31*§	16,1±0,58*#
АЧТЧ, с	34,9±0,99	29,1±1,59*	33,3±1,14*#	24,6±1,29*§	30,2±1,15*#
ТЧ, с	10,2±0,29	8,3±0,27*	9,6±0,29*#	7,6±0,17*§	8,7±0,32*#
ПТІ, %	101±1,89	114±2,26*	102±3,59#	123±2,46*§	113±4,47*#

ЕІ, %	101±0,46	125±4,59*	109±2,92*#	130±3,33*	117±4,28*#
Фібриноген, г/л	2,88±0,15	3,36±0,15*	3,03±0,05#	3,81±0,12*	3,40±0,07*#
РФМК, мг/л	0	41,5±3,95*	23,0±4,48*#	52,5±5,23*	30,0±3,33*#
АТ III, %	104,0±1,93	90,1±2,11*	99,6±2,02#	88,9±2,16*	99,4±2,05#
ПрС, %	100,3±1,45	85,4±2,78*	97,5±2,37#	76,2±2,86*§	94,8±2,34#
Час лізису еуглобулінів, хв	108±2,71	130±4,11*	118±3,12*#	141±3,58*	123±4,22*#
ПАІ-1, нг/мл	1,49±0,17	2,54±0,20*	2,06±0,12*#	3,56±0,12*§	2,16±0,11*#

Примітка: * – $p < 0,05$ – відносно групи контролю; # – $p < 0,05$ – відносно попередньої групи; § – $p < 0,05$ – між групами №2 та №4.

Гіперфібриногенемія є визнаним фактором ризику тромбофілії, а накопичення РФМК в плазмі крові вказує на глибокі порушення в регуляції системи гемостазу та розвиток тромбінемії [15]. Навантаження тГЦ викликало появу в плазмі крові функціонально неактивних форм протромбіну, на що вказує більш значне зростання ЕІ, ніж ПТІ – на 23,8% проти 13,9%. Як відомо, до функціонально неактивних форм протромбіну відноситься декарбоксильований протромбін та претромбін 1 [15]. Декарбоксильований протромбін утворюється в печінці при порушенні γ -карбоксилування на тлі дефіциту вітаміну К чи прийому його антагоністів. Претромбін 1 утворюється в кровеносному руслі в результаті гідролізу протромбіну (в положенні Arg155-Ser156) тромбіном. Ймовірно причиною зростання ЕІ при навантаженні тГЦ є накопичення в плазмі крові претромбіну 1, що вказує на порушення балансу між про- та антикоагулянтною системами і є однією з ознак тромбінемії. Введення L-NAME

посилювало вплив тГЦ на систему зсідання крові, що підтвержується більш значним скороченням ПЧ, АЧТЧ та ТЧ, вищим рівнем фібриногену та РФМК.

Навантаження тГЦ викликало зниження активності фізіологічних інгібіторів зсідання крові – АТІІІ (на 13,5%) і ПрС (на 14,6%), а також зменшувало фібринолітичну активність, на що вказує зростання часу лізису еуглобулінів (на 20,8%) та вмісту антигену ПАІ-1 (на 70,5%). Введення L-NAME посилювало негативний вплив тіолактону ГЦ на інгібітори зсідання крові та систему фібринолізу, причому більш чутливими до цієї комбінації виявились ПрС та ПАІ-1.

Навантаження тГЦ викликало розвиток гіперреактивності тромбоцитів: підвищились MPV, ступінь та швидкість ADP-індукованої агрегації, а також активність тромбоцитарної РGH-синтази (табл.2). Введення L-NAME потенціювало негативний вплив тГЦ на морфофункціональний стан тромбоцитів.

Таблиця 2

Вплив хронічного навантаження тіолактоном ГЦ, його поєднання з L-NAME та корекції ВМК на показники тромбоцитарної ланки системи гемостазу у щурів ($M \pm m$, $n=8-12$)

Показник	Групи щурів				
	1	2	3	4	5
	Контроль	ГГЦ	ГГЦ+ ВМК	ГГЦ+ L-NAME	ГГЦ+ L-NAME+ ВМК
Тромбоцити, $\times 10^9$ /л	464±21,1	466±13,7	454±20,4	464±22,2	453±20,2
MPV, фл	6,54±0,14	7,57±0,13*	6,93±0,27#	8,09±0,23*	7,23±0,27*#
PCT, %	0,302±0,11	0,353±0,11*	0,313±0,16	0,371±0,13*	0,328±0,17#
PDW, %	9,66±0,17	9,77±0,31	9,56±0,25	10,2±0,27	9,56±0,25
Ступінь агрегації, %	21,8±1,37	42,4±3,12*	30,6±1,57*#	57,7±3,76*§	33,5±1,57*#
Швидкість агрегації, % за 1 хв.	23,2±1,49	37,5±2,76*	28,2±1,45*#	41,6±2,71*	29,7±1,39*#
Час агрегації, с	359±23	386±28	335±17	450±29*	352±15
РGH-синтаза, мкмоль/хв на 1 мг білка	9,53±0,66	14,7±0,76*	12,4±0,50*#	15,1±1,05*	13,4±0,57*#

Примітка: * – $p < 0,05$ – відносно групи контролю; # – $p < 0,05$ – відносно попередньої групи; § – $p < 0,05$ – між групами №2 та №4.

Застосування ВМК ефективно стримувало формування ГГЦ-індукованої тромбофілії: зменшувало дисбаланс між про- та антикоагулянтною ланками, відновлювало активність фібринолітичної системи, запобігало формуванню гіперреактивності тромбоцитів. ВМК також позитивно впливало на стан сис-

теми гемостазу при поєднанні навантаження тГЦ з введенням L-NAME.

На наступному етапі роботи ми оцінили, які метаболічні зміни виникають за умов навантаження тГЦ та його поєднання з L-NAME (табл.3).

Таблиця 3

Вплив хронічного навантаження тіолактоном ГЦ, його поєднання з L-NAME та корекції ВМК на біохімічні показники в плазмі крові щурів ($M \pm m$, $n=8-12$)

Показник	Групи щурів				
	1	2	3	4	5
	Контроль	ГГЦ	ГГЦ+ВМК	ГГЦ+L-NAME	ГГЦ+L-NAME+ВМК
Загальний ГЦ, мкмоль/л	6,54±0,23	15,3±0,84*	9,71±0,67*#	18,0±0,93*§	10,1±0,67*#
H ₂ S, мкмоль/л	78,3±6,45	51,7±4,80*	69,2±3,20*#	45,5±4,92*	61,4±3,13*#
ГЦ/H ₂ S	0,09±0,01	0,34±0,06*	0,14±0,01*#	0,45±0,08*#	0,17±0,02*#
Загальний цистеїн, мкмоль/л	124,4±6,83	97,4±4,21*	110,5±3,40#	89,2±3,67*	101,7±3,33*#
Непротеїновий цистеїн, мкмоль/л	41,8±2,08	34,2±1,90*	38,6±2,19#	33,0±1,43*	37,3±2,23
Протеїнзв'язаний цистеїн, мкмоль/л	82,7±5,26	63,3±4,95*	71,9±2,57	56,2±3,36*	64,4±4,67*
SH-групи протеїнів, ммоль/л	8,38±0,36	6,74±0,41*	7,93±0,37#	5,66±0,25*	7,15±0,40*#
Нітрати та нітрити, мкмоль/л	53,7±3,02	37,0±2,97*	51,6±4,51#	22,0±1,95*§	38,3±2,25*#
Карбонільні групи, нмоль/мг протеїну	0,76±0,03	1,04±0,08*	0,85±0,05#	1,14±0,06*	0,94±0,08*#
МДА, мкмоль/л	10,3±0,81	13,4±0,71*	11,9±0,55#	13,9±0,86*	12,3±0,51*#
ФХ, мг/л	1648±83,5	1337±82,7*	1511±48,7	1207±63,5*	1415±46,4*#
ЛФХ, мг/л	58,8±3,10	75,7±7,43*	54,6±3,07#	87,7±5,26*	71,6±4,40*
ФЕА, мг/л	725±22,9	1095±52,0*	797±38,1#	1159±56,8*	960±42,2*#
ФХ / ЛФХ	28,9±2,35	18,6±2,17*	28,2±1,34#	14,6±1,69*	20,2±0,85*#
ФХ / ФЕА	2,32±0,18	1,24±0,09*	1,94±0,13#	1,06±0,08*	1,50±0,08*#

Примітка: *— $p < 0,05$ – відносно групи контролю; #— $p < 0,05$ – відносно попередньої групи; §— $p < 0,05$ – між групами №2 та №4.

Введення тГЦ викликало підвищення рівня ГЦ в плазмі крові на 134%, при цьому реєструвалось зниження вмісту молекул з вазодилаторними та антиагрегантними властивостями: загальний вміст нітратів та нітритів (метаболітів NO) зменшився на 31,1%, а вміст H₂S – на 34,0%. Введення L-NAME не лише значно зменшувало (на 59,%) рівень метаболітів NO в плазмі крові у щурів з ГГЦ, як і очікувалось, а й посилювало негативний вплив тГЦ на обмін сірковмісних амінокислот. Так, рівень ГЦ підвищився на 175%, зниження вмісту H₂S становило 42%. Негативний вплив ГГЦ і, особливо, її комбінації з L-NAME на рівень H₂S більш чітко відобразив коефіцієнт ГЦ/H₂S: якщо в контролі цей показник становив 0,08 - 0,1, то у щурів з ГГЦ він збільшувався до 0,3 - 0,4 (майже в 4 рази),

а у щурів з комбінованим навантаженням тГЦ та L-NAME - до 0,4 - 0,5 (в 5 разів).

За умов ГГЦ виникало зниження (на 21,7%) загального вмісту цистеїну в плазмі крові, при цьому непротеїнова фракція зменшилась на 18,2%, а протеїнзв'язана – на 23,6%. Як відомо, ГЦ та, особливо, його тіолактон легко приєднуються до протеїнів за тіоловими залишками (S-гомоцистеїнування), а також утворюють дисульфідиди з цистеїном та іншими тіолами [12]. ГЦ витісняє цистеїн зі змішаних дисульфідидів типу «протеїн-S-S-цистеїн» та інкорпорується на його місце, утворюючи дисульфідиди типу «протеїн-S-S-ГЦ» [21]. Витіснений з протеїнів цистеїн, очевидно, швидко утилізується, що і обумовлює зниження його вмісту в крові. До деякої міри

цей механізм підтверджується зниженням (на 19,6%) рівня протеїнових SH-груп.

Здатність високих рівнів ГЦ ініціювати оксидативний стрес є відомою. Так і в нашому дослідженні ми спостерігали підвищення в плазмі крові тварин з ГЦ вмісту маркерів окиснювального пошкодження протеїнів та ліпідів: рівень карбонільних груп протеїнів, МДА та ЛФХ збільшився на 36,8, 30,0 та 29,0%, а коефіцієнт ФХ / ЛФХ знизився на 35,6%. При поєднанні навантаження тГЦ з введенням L-NAME, який за деякими даними має антиоксидантні властивості [14], виявлені порушення зберігались.

Одним із найбільш загрозливих метаболічних порушень за умов ГЦ є розвиток гіпометилування, що негативно відображається на експресії генів, синтезі протеїнів, фосфоліпідів, адреналіну та інших процесах. Тривале навантаження тГЦ порушувало процеси метилування, на що вказують зміни у фосфоліпідному спектрі плазми крові: зниження (на 18,9%) вмісту ФХ, підвищення (на 51,0%) вмісту ФЕА та зменшення (на 46,6%) коефіцієнту ФХ / ФЕА. При введенні L-NAME ознаки гіпометилування посилювались.

Збагачення раціону тварин ВМК протягом всього терміну експерименту ефективно запобігало розвитку метаболічних порушень, індукованих навантаженням тГЦ: зменшувало ступінь ГЦ, дефіцит H_2S та ознаки оксидативного стресу, нормалізувало вміст фракцій фосфоліпідів, метаболітів NO та цистеїну. Застосування ВМК також достовірно зменшувало негативні зміни цих показників при комбінованому навантаженні тГЦ та L-NAME.

Отже, за умов тіолактонової ГЦ та її поєднання з L-NAME з одного боку формується дисбаланс в системі гемостазу, а з іншого боку – значні метаболічні порушення (дефіцит вазоактивних молекул, оксидативний стрес, гіпометилування). Кореляційний аналіз показав, що між показниками системи гемостазу та порушеннями обміну сірковмісних амінокислот існують тісні взаємозв'язки. За фізіологічних умов з рівнем ГЦ достовірно корелювали лише показники морфофункціонального стану тромбоцитів – ступінь агрегації та MPV ($r=0,56$ та $0,55$), тоді як за ГЦ зв'язки встановлювались з більшістю показників. Найбільш тісно високі рівні ГЦ корелювали з EI ($r=0,54$), активністю фізіологічних антикоагулянтів АТІІІ та ПрС ($r=-0,63$ та $-0,77$), вмістом антигену ПАІ-1 ($r=0,67$), ступенем агрегації тромбоцитів та MPV ($r=0,64$ та $0,67$). Тобто, мішенями для токсичної дії високих рівнів ГЦ переважно були ключові регулятори тромбоутворення – тромбін, ПрС, АТІІІ, ПАІ-1 та тромбоцити.

Кореляційний аналіз засвідчив, що найбільш чутливими до дефіциту вазоактивних молекул H_2S та NO виявились ПрС, фібринолітична система та тромбоцити. На це вказує і той факт, що при збільшенні дефіциту NO та H_2S на тлі комбінування ГЦ з L-NAME виявлені зв'язки посилювались.

Індуковане навантаженням тГЦ зниження активності інгібіторів зсідання крові може пояснюватись посиленням їхнього споживання в умовах тромбінемії. Однак, не виключений прямий токсичний вплив ГЦ на АТІІІ та ПрС, в тому числі і інкорпорація ГЦ чи його тіолактону в їхні молекули (S- чи N-гомоцистеїнування). На користь цієї гіпотези свідчить виявлена нами здатність навантаження тГЦ зменшувати кількість протеїнів зв'язного цистеїну та SH-груп протеїнів в плазмі крові, а також вірогідний кореляційний зв'язок між цими показниками та рівнем ГЦ ($r=-0,79$ та $-0,49$, відповідно). Як відомо, ковалентна модифікація кардинально змінює властивості протеїнів, в тому числі і системи гемостазу. Зокрема, АТІІІ втрачав свою антикоагулянтну активність після інкубації з тГЦ [17]. Негативний вплив ГЦ на фібринолітичну систему скоріше реалізується на рівні експресії генів, на що вказує зниження рівня антигену ПАІ-1 в плазмі крові.

Виявилось, що показник MPV достовірно корелює з коефіцієнтом ФХ / ФЕА ($r=-0,59$) та вмістом ЛФХ ($r=-0,71$) в плазмі крові. Порушення фосфоліпідного спектру плазми крові до деякої міри відображають пертурбації фосфоліпідного складу мембран клітин крові. Тому, ймовірно, що підвищення MPV асоціюється з порушенням фосфоліпідного складу тромбоцитарних мембран. Підвищення кількості неметильованих та негативнозаряджених фосфоліпідів в мембранах тромбоцитів призведе до зміни поверхневого заряду, збільшення адсорбції Ca^{2+} та факторів зсідання крові на поверхні цих клітин та посилення агрегаційної активності.

Ще одним фактором, який може посилювати дестабілізацію тромбоцитарних мембран за умов ГЦ є дефіцит H_2S . Як відомо, H_2S має потужні антиоксидантні властивості і здатний перешкоджати окислювальній деструкції протеїнів та ліпідів, в тому числі і в тромбоцитах, а значить інгібувати утворення проагрегантів (тромбоксану A_2 та арахідонової кислоти). Виявилось, що активність РГН-синтази тромбоцитів корелювала з рівнем ГЦ ($r=0,47$) та коефіцієнтом ГЦ / H_2S ($r=0,40$), при чому при навантаженні тГЦ ця залежність посилювалась ($r=0,86$ та $0,66$). Також за ГЦ виявлявся тісний зв'язок активності

PGH-синтази з маркерами окиснювальної де-струкції ліпідів МДА та ЛФХ ($r=0,86$ та $0,70$).

Таким чином, комплексна оцінка стану системи гемостазу дозволила виявити нові патерни формування тромбофілії, асоційованої з порушеннями обміну ГЦ, і зокрема, висвітлити роль дефіциту вазоактивних молекул H_2S та NO у розвитку порушень не лише в тромбоцитарній ланці, а й на рівні коагулянтної, антикоагулянтної та фібринолітичної систем. Здатність ВМК зменшувати негативний вплив ГЦ на систему гемостазу пояснюється не лише його відомою гіпогомоцистеїнемічною дією [1], а й відновленням рівня вазоактивних молекул H_2S та NO в плазмі крові і нормалізацією процесів метилування.

Висновки

1. Навантаження тГЦ викликає розвиток дисбалансу в системі гемостазу, який проявляється гіперреактивністю тромбоцитів, розвитком тромбінемії, накопиченням функціонально неактивних форм протромбіну, гіперфібриногенемією, зменшенням активності АТФІІ та ПрС, зниженням рівня антигену ПАІ-1 в плазмі крові. Введення L-NAME посилює негативний вплив ГЦ на систему гемостазу.
2. За умов ГЦ формується дефіцит вазоактивних молекул H_2S та NO , який значно посилюється при введенні L-NAME. Зниження рівня H_2S та NO відображається не лише на функціональному стані тромбоцитів, а й поглиблює порушення в коагулянтній, антикоагулянтній та фібринолітичній системах.
3. Насичення організму щурів ВМК пом'якшує метаболічні порушення, індуковані навантаженням тГЦ: підвищує вміст H_2S та метаболітів NO в плазмі крові, зменшує ознаки оксидативного стресу, нормалізує фосfolіпідний спектр плазми крові, і, таким чином, стримує формування ГЦ-індукованих порушень в системі гемостазу.

Перспективи подальших досліджень полягають в розкритті молекулярних механізмів впливу H_2S на рецепторні протеїни та ензимні системи тромбоцитів, коагулянтну, антикоагулянтну та фібринолітичну системи, що дозволить поглибити розуміння шляхів формування метаболічних тромбофілій та оптимізувати підходи до їх корекції модуляторами обміну сірковмісних амінокислот.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Артемчук М.А. Профілактично-лікувальна дія вітамінних та вітамінно-мікроелементних препаратів за гострої та хронічної метіонінової гіпергомоцистеїнемії / М.А. Ар-

- темчук // Biomedical and Biosocial Anthopology. - 2006. - №7. - С.17-20.
2. Беліцер В. О. Кількісне визначення фібриногену в плазмі крові людини / В. О. Беліцер, Т. В. Варецька, К. М. Веремеєнко // Лаб. діагностика. - 1997. - №2. - С.53-57.
3. Визначення вмісту гідроген сульфід у плазмі крові / Н. В. Заїчко, Н. О. Пентюк, Л. О. Пентюк [та ін.] // Вісник наукових досліджень. - 2009. - №1. - С.29-32.
4. Владимиров Ю. А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю. А. Владимиров, А. И. Арчаков. - М.: Наука, 1972. - 252 с.
5. Заїчко Н. В. Асоціація середнього об'єму тромбоцитів з рівнем гомоцистеїну та гідроген сульфід у крові щурів з гіпергомоцистеїнемією / Н. В. Заїчко // Медична хімія. - 2008. - Т. 10, № 2. - С. 54-58.
6. Заїчко Н. В. Вплив аніонів гідросульфід, дитіоніту, сульфіді, тіосульфату та сульфату на агрегацію тромбоцитів людини / Н. В. Заїчко, О. О. Пентюк // Укр. біохім. журн. - 2009. - т.81, №1. - С.105-113.
7. Заїчко Н. В. Окислювальна модифікація білків сироватки крові як маркер активності ревматоїдного артриту та її зміни під впливом фармакотерапії амізоном, індометацином, німесулідом / Н. В. Заїчко // Вісник Вінницького державного медичного університету. - 2003. - №7 (2/2) - С.664 - 666.
8. Коренман И. М. Методы определения органических соединений / И. М. Коренман. - М.: Химия, 1975. - 360 с.
9. Корольова Д. С. Використання екамуліну – активатору протромбіну із отрути ефі багатолускової – в клінічній лабораторній діагностиці / Д. С. Корольова, Р. П. Виноградова, Т. М. Чернишенко, Т. М. Платонова // Лаб. діагностика. - 2006. - т. 37, №3 - С. 18-22
10. Мевх А.Т. Изучение эндопероксидпростагландин-синтетезы микросомной фракции тромбоцитов человека / А. Т. Мевх, В. В. Басевич, С. Д. Варфоломеев // Биохимия. - 1982. - т.47, №10. - С.1635-1639.
11. Определение фосфолипидов в биологическом материале по образованию гидрофобного комплекса с ферротриацианатом аммония / А.А. Пентюк, В.И. Гуцол, О.А. Яковлева [и др.] // Лаб. дело. - 1987. - №6. - С.21.
12. Пентюк О.О. Метаболізм гомоцистеїну та його роль у патології / О.О. Пентюк, М.Б. Луцюк, І.І. Андрушко, К.П. Поставітенко // Укр. біохім. журн. - 2003. - 75, №1. - С.5-17.
13. Пентюк О.О. Гіпергомоцистеїнемія: моделювання та вплив на стан судинної системи в експерименті / О.О. Пентюк, М. Б. Луцюк, К. П. Поставітенко // Досягнення біології та медицини. - 2004. - №1 (3). - С.35-38.
14. Сибірна Н.О. Вплив L-аргініну та інгібіторів NO-синтази на стан антиоксидантної системи за умов цукрового діабету 1 типу / Н.О. Сибірна, О.І. Вовк, В.І. Бурда, М.Я. Люта //Лабораторна діагностика. - 2004. - №4. - С.45-51.
15. Современные представления о системе гемостаза / Волков Г.Л., Платонова Т.Н., Савчук А.Н. [та ін.] // Киев : Наукова думка, 2005. - 292 с.
16. Gaitonde M.K. A spectrophotometric method for direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acid / M. K. Gaitonde // Biochem. J.- 1967. - Vol.104, №2. - P.627-633.
17. Gugliucci A. Antithrombin activity is inhibited by acrolein and homocysteine thiolactone: Protection by cysteine / A. Gugliucci // Life Sci.- 2008.- Vol. 82, №7-8. - P.413-418.
18. Hemostasis imbalance in experimental hypertension / D.Corseaux, V. Ollivier, V. Fontaine [et al.] // Mol. Med. - 2002. - Vol.8, №4. P.169-178.
19. Lowicka E. Hydrogen sulfide (H_2S) - the third gas of interest for pharmacologists / E. Lowicka, J. Beltowski // Pharmacol. Rep. - 2007. - Vol.59, №1. - P.4-24.
20. Lowry O. H. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough, A. L. Farr, R. J. Randall // J. Biol. Chem. - 1951. - V. 193.- P. 265 - 276.
21. Stamler J. S. Biological chemistry of thiols in the vasculature and in vascular-related disease / J. S. Stamler, A. Slivka // Nutr. Rev. - 1996. - Vol.54, №1 (Pt. 1). - P. 1-30.

УДК 616-005.6: 547.466: 546.221

БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ ТРОМБОФИЛИИ, ИНДУЦИРОВАННОЙ ХРОНИЧЕСКОЙ НАГРУЗКОЙ ТИОЛАКТОНОМ ГОМОЦИСТЕИНА И ЕГО КОМБИНАЦИЕЙ С L-NAME. КОРРЕКЦИЯ ВИТАМИННО-МИКРОЭЛЕМЕНТНЫМ КОМПЛЕКСОМ

Заичко Н.В.

Резюме. Исследовано влияние хронической нагрузки тиолактоном гомоцистеина (100 мг/кг) и его комбинации с L-NAME (30 мг/кг) на систему гемостаза крыс. Нагрузка тиолактоном гомоцистеина вызывает комплексные нарушения в системе гемостаза: гиперреактивность тромбоцитов, тромбинемия, гиперфибриногемия, снижение антикоагулянтной и фибринолитической активности. Установлено, что новым паттерном формирования тромбофилии, индуцированной гипергомоцистеинемией, является дефицит вазодиллятора, антиагреганта и антиоксиданта гидроген сульфида. Введение L-NAME усиливает дефицит гидроген сульфида и потенцирует негативное влияние тиолактона гомоцистеина на систему гемостаза крыс. Обогащение рациона крыс витаминно-микроэлементным комплексом уменьшает дефицит гидроген сульфида и препятствует развитию тромбофилии.

Ключевые слова: тиолактон гомоцистеина, гидроген сульфид, L-NAME, система гемостаза, витаминно-микроэлементный комплекс.

UDC 616-005.6: 547.466: 546.221

BIOCHEMICAL MECHANISM of THROMBOPHILIA FORMATION INDUCED by CHRONIC HOMOCYSTEINE THIOLACTONE LOADING and its COMBINATION with L-NAME. CORRECTION by VITAMINS-MICROELEMENT COMPLEX

Zaichko N.V.

Summary. It was investigated influence of homocysteine thiolactone loading (100 mg/kg) and its combination with L-NAME (30 mg/kg) within 4 weeks on rat hemostasis system. Homocysteine thiolactone loading caused complex disturbance in hemostasis system such as platelet hyperreactivity, thrombinemia, hyperfibrinogenemia, decreasing of anticoagulant and fibrinolytic activity. It was established that deficit of vasodilator, antiaggregant and antioxidant hydrogen sulfide became the new pattern of thrombophilia formation induced by hyperhomocysteinemia. L-NAME administration increased hydrogen sulfide deficit and potentiated negative influence on rat hemostasis system. Vitamins-microelement enrichment of rat diet decreased hydrogen sulfide deficit and prevented from thrombophilia formation.

Key words: homocysteine thiolactone, hydrogen sulfide, L-NAME, hemostasis system, vitamins-microelement complex.

Стаття надійшла 2.03.2010 р.