

**ВПЛИВ НАВАНТАЖЕННЯ ТІОЛАКТОНОМ
ГОМОЦИСТЕЇНУ НА ОБМІН АДЕНОЗИНУ У ЩУРІВ:
ЗВ'ЯЗОК З ГІПЕРРЕАКТИВНІСТЮ ТРОМБОЦИТІВ,
КОРЕКЦІЯ ПОРУШЕНЬ ЙОГО ОБМІНУ
ВІТАМІННО-МІКРОЕЛЕМЕНТНИМ КОМПЛЕКСОМ**

Н. В. ЗАІЧКО

*Науково-дослідний інститут реабілітації інвалідів Вінницького національного
медичного університету ім. М. І. Пирогова, Україна;
e-mail: nzaichko@mail.ru*

Досліджено вплив навантаження тіолактоном D,L-гомоцистеїну (в дозі 100 мг/кг маси тіла інтрагастрально протягом 28 діб) на активність ензимів обміну аденолових нуклеотидів та аденозину в сироватці крові, фракції тромбоцитів та печінки щурів, оцінено зв'язок виявлених порушень з гіперреактивністю тромбоцитів. Встановлено, що у щурів з гіпергомоцистеїнемією (ГГЦ) в тромбоцитах знижується активність апірази і 5'-нуклеотидази, а аденозиндезамінази – підвищується; також порушується утворення аденозину в сироватці крові та печінці. За цих умов істотно посилюється чутливість тромбоцитів щурів до ADP-стимуляції. Вітамінно-мікроелементний комплекс зменшує ГГЦ-індуковані порушення обміну аденозину та запобігає формуванню гіперреактивності тромбоцитів. In vitro гомоцистеїн інгібує гідроліз ADP та AMP фракцією тромбоцитів щурів і цей ефект зменшується у присутності донора гідроген сульфід- NaHS .

Ключові слова: гіпергомоцистеїнемія, тромбоцити, аденозин, апіраза, 5'-нуклеотидаза, вітамінно-мікроелементний комплекс.

Гіпергомоцистеїнемія (ГГЦ) – відомий фактор ризику артеріальних і венозних тромбозів. Тригерним механізмом тромбогенної дії ГГЦ вважають здатність високого рівня гомоцистеїну (ГЦ) активувати судинно-тромбоцитарну ланку системи гемостазу внаслідок оксидативного пошкодження ендотеліальних та тромбоцитарних клітин, порушення синтезу вазодилаторів та антиагрегантів – нітроген монооксиду, простагліцину, гідроген сульфід (H_2S) та зменшення чутливості клітин-мішеней до цих молекул [1, 2]. Не виключаються і інші механізми впливу ГЦ на судинно-тромбоцитарний гемостаз, наприклад, через пуринергічну сигнальну систему. Остання, крім пуринових рецепторів тромбоцитів та ендотеліоцитів, включає також ензими: апіразу (КФ 3.6.1.5), що гідролізує ADP до AMP, 5'-нуклеотидазу (КФ 3.1.3.5), що перетворює AMP до аденозину, аденозиндезаміназу (КФ 3.5.4.4), яка забезпечує деградацію аденозину з вивільненням аміаку, та ін. [3–5]. Відомо, що ADP та аденозин по-різному впливають на функціональну активність тромбоцитів: перший – потужний індуктор агрегації, тоді як другий, навпаки, має антиагрегантну дію. Тому очевидно, що швидкість деградації

аденолових нуклеотидів та аденозину залежить від ектоензимів та циркулюючих нуклеотидаз плазми крові і значною мірою визначає функціональний стан тромбоцитів. Важливим джерелом аденозину в організмі вважають реакцію розщеплення S-аденозилгомоцистеїну, яку каталізує S-аденозилгомоцистеїнгідролаза (КФ 3.3.1.1). Ймовірно, що за ГГЦ зменшення загального пулу екстрацелюлярного аденозину також може створювати умови для формування гіперреактивності тромбоцитів. Раніше було показано, що введення щурам тіолактону ГЦ спричинює зниження активності апірази в сироватці крові тварин [2].

Мета цієї роботи – вивчення зв'язку порушень обміну аденолових нуклеотидів та аденозину з гіперреактивністю тромбоцитів за тривалого навантаження тіолактоном ГЦ та оцінка здатності вітамінно-мікроелементного комплексу (ВМК) запобігати формуванню пов'язаних з цим розладів.

Матеріали і методи

Досліди проводили на 30 білих безпородних щурах-самцях масою 250–270 г. Під час експерименту тварини отримували стандартну напівсинтетичну крохмально-казеїнову

дієту, яка забезпечувала надходження в організм щурів оптимальної кількості всіх макро- і мікронутрієнтів [6]. Тварин перевели на напівсинтетичний раціон за 10 діб до початку експерименту для адаптації. Щурів розділили на 3 групи по 10 тварин у кожній. Модель ГГЦ створювали на тваринах 2- та 3-ої груп шляхом введення тіолактону D,L-ГЦ в дозі 100 мг/кг 1 раз на добу, інтрагастрально у 1%-му розчині крохмалю протягом 28 діб [7]. Крім того, щурам групи 3 до базової дієти протягом всього експерименту додавали вітамінно-мікроелементний комплекс (ВМК) у кількості, що забезпечувала надходження біля 714 мкг вітаміну B₆, 143 мкг вітаміну B₉, 14,3 мкг вітаміну B₁₂, 1 мг іонів цинку (Zn²⁺), 7,5 мкг іонів хрому (Cr³⁺) та 0,93 мкг іонів ванадію (V⁵⁺) на 1 кг маси тіла тварин. Зазначені дози вітамінів перевищують мінімальну добову потребу щурів у 7–15 разів, при цьому вважаються нетоксичними та виявляють максимальний гіпогомоцистеїнемічний ефект, а мікроелементи є незалежними чинниками нормального функціонування серцево-судинної системи [8]. Тваринам контрольної групи (1) 1 раз на добу інтрагастрально вводили відповідну кількість 1%-го розчину крохмалю. Досліди виконували згідно з правилами гуманного поводження з експериментальними тваринами, затвердженими комітетом з біоетики ВНМУ ім. М. І. Пирогова.

Зразки крові брали із серця щурів після анестезування кетаміном (100 мг/кг, інтраперитоніально). Для виділення тромбоцитів та дослідження їх агрегації зразки крові набирали у пластикові пробірки Vacuette (Greiner Bio-One, Австрія), які містили 3,8%-й розчин цитрату натрію у співвідношенні 9 : 1. Плазму, багату на тромбоцити (ПБТ), одержували центрифугуванням стабілізованої крові при 300 g упродовж 5 хв при 18 °С. Потім ПБТ центрифугували при 1500 g упродовж 20 хв при 18 °С, супернатант видаляли, осад тромбоцитів тричі промивали 0,05 М трис-НСІ-буфером (рН 7,4) з 0,13 М NaCl [9], потім ресуспендували в 1,0 мл цього ж буферу і одержану фракцію тромбоцитів використовували для досліджень.

Агрегацію тромбоцитів досліджували у зразках ПБТ на фотооптичному агрегометрі AP2110 (Солар, Білорусь). ADP як індуктор агрегації використовували в кінцевих концентраціях 2,5, 5, 10, 25 мкМ (Технологія-Стандарт, Росія).

Активність ензимів визначали у зразках сироватки крові, фракції тромбоцитів, пост'ядерній фракції гомогенату печінки. Печінку гомогенізували в середовищі 1,15%-му

калію хлориду у співвідношенні 1 : 4, пост'ядерну фракцію одержували центрифугуванням гомогенатів при 600 g упродовж 30 хв. Вміст протеїну у препаратах визначали за Лоурі [10].

Активність апірази (КФ 3.6.1.5) та 5'-нуклеотидази (КФ 3.1.3.5) визначали за кількістю неорганічного фосфату, який утворювався в процесі гідролізу ADP чи AMP відповідно [4, 11]. Активність S-аденозилгомоцистеїнгідролази (КФ 3.3.1.1) визначали за швидкістю гідролізу S-аденозилгомоцистеїну за збільшенням вмісту гомоцистеїну [12]. Активність аденозиндезамінази (КФ 3.5.4.4) оцінювали за кількістю аміаку, що утворився за гідролітичного дезамінування аденозину [13]. Вміст аденозину в сечі визначали методом тонкошарової хроматографії [14].

Загальний рівень ГЦ в сироватці крові визначали імуноферментним методом (набір Axis-Shield, Англія), а вміст H₂S в сироватці крові – за утворенням тіонінового барвника за взаємодії сульфід-аніону з парафенілендіаміном [15]. Вміст цистеїну визначали за реакцією з нінгідрином у кислому середовищі [16]. Зв'язаний з протеїнами цистеїн вивільняли дитіотреїтолом. Рівень SH-груп протеїнів у плазмі крові визначали за реакцією з реактивом Елмана.

Для визначення впливу ГЦ на швидкість гідролізу ADP *in vitro* в інкубаційне середовище об'ємом 1,0 мл, що містить 120 мМ NaCl, 5,0 мМ KCl, 6,0 мМ глюкози, 5,0 мМ CaCl₂, 50 мМ трис-НСІ-буфер (рН 7,5), 1,0 мг протеїну фракції тромбоцитів додавали D,L-ГЦ в діапазоні концентрацій від 0,2 до 10 мМ і після 5-хвилинної інкубації розпочинали реакцію, додаючи ADP в кінцевій концентрації 0,5 мМ. Для визначення впливу ГЦ на швидкість гідролізу AMP в інкубаційне середовище об'ємом 1,0 мл, що містило 1 мМ MgCl₂, 50 мМ трис-НСІ-буфера (рН 7,4), 1,0 мг протеїну фракції тромбоцитів додавали D,L-ГЦ в діапазоні концентрацій 0,2 до 10 мМ і після 5-хвилинної інкубації розпочинали реакцію додаванням AMP в кінцевій концентрації 4,0 мМ. Швидкість гідролізу нуклеотидів оцінювали за утворенням неорганічного фосфату (P_i).

У роботі використовували тіолактон DL-гомоцистеїну (Fluka, Німеччина), DL-гомоцистеїн, L-цистеїн, аденозин, ADP, AMP, S-аденозилгомоцистеїн, Na₂S · 9H₂O, дитіотреїтол (Sigma, США), набір Homocysteine EIA (Axis-Shield, Англія). Інші реактиви були вітчизняного виробництва категорії хч.

Статистичне оброблення результатів проводили за допомогою стандартних програм

MS Excel XP. Вірогідність відмінностей оцінювали за *t*-критерієм Стьюдента, а також проводили парний кореляційний аналіз за Пірсоном.

Результати та обговорення

Введення шурам тіолактону ГЦ у дозі 100 мг/кг маси тіла протягом 28 діб спричинювало розвиток помірної ГГЦ. Так, рівень ГЦ в сироватці крові у тварин групи 2 збільшився в 2,3 раза порівняно з контролем (табл. 1). Накопичення у плазмі крові ГЦ супроводжується зниженням (на 21,7 та 34,0%) вмісту його метаболітів – цистеїну та H_2S , що може бути наслідком порушення процесів транс- та десульфування сірковмісних амінокислот у разі перевантаження тіолактоном ГЦ. Відомо, що високий рівень ГЦ індукує розвиток оксидативного та нітрозативного стресу [1], тоді як H_2S , навпаки, знижує рівень активних форм кисню та азоту, а також забезпечує регенерацію сульфгідрильних груп протеїнів [17]. Отже, дефіцит H_2S за ГГЦ може промотувати окислення у клітинах-мішенях, порушувати мембранне оточення їхніх ектоензимів, змінювати редокс-статус протеїнів, у тому числі і у тромбоцитах. Дійсно, у тварин з ГГЦ кількість протеїнових SH-груп у плазмі крові на 19,5% менша, ніж в контрольній групі. Найбільш чітко дефіцит H_2S при ГГЦ відображає коефіцієнт ГЦ/ H_2S : в інтактних тварин цей показник становить 0,09, а у тварин із ГГЦ зростає до 0,34 (тобто в 3,5 раза). Виявляється, що коефіцієнт ГЦ/ H_2S достовірно корелює з рівнем протеїнових SH-груп у плазмі крові, і ця залежність посилюється при ГГЦ ($r = -0,45$ та $-0,64$ відповідно). Збагачення дієти ВМК стримує формування індукованих навантаженням тіолактоном ГЦ порушень в обміні сірковмісних сполук: ступінь ГГЦ, ознаки дефіциту

H_2S та падіння кількості протеїнових SH-груп у шурів групи 3 (ГГЦ + ВМК) були достовірно менші, ніж у тварин групи 2, що не отримували ВМК. Здатність ВМК запобігати зниженню рівня H_2S у плазмі крові при ГГЦ пов'язана з тим, що до його складу входять вітамін B_6 та іони Zn^{2+} – есенціальні чинники реакцій десульфування цистеїну та ГЦ [1, 17].

Аналіз активності ензимів обміну аденолінових нуклеотидів та аденозину показує (табл. 2), що за тривалого навантаження тіолактоном ГЦ створюються умови для підвищення екстрацелюлярної концентрації індуктора агрегації тромбоцитів ADP, при цьому сповільнюється утворення та посилюється деградація антиагреганта аденозину. Зокрема, у шурів з ГГЦ активність апірази в сироватці крові достовірно знижується на 22,5%, на рівні тенденції зменшується активність 5'-нуклеотидази та підвищується активність аденозіндезамінази. Однак виразніше змінюється активність ензимів тромбоцитів: у шурів з ГГЦ активність апірази та 5'-нуклеотидази вірогідно знижується на 28,3 та 25,6%, тоді як активність аденозіндезамінази зростає на 32,1%. Аналогічні зміни активності досліджуваних ензимів виявлено в печінці. Тривале навантаження тіолактоном ГЦ спричинювало достовірне зниження (на 33,8%) активності S-аденозилгомоцистеїнгідролази в печінці. Зниження активності S-аденозилгомоцистеїнгідролази, з одного боку, веде до накопичення S-аденозилгомоцистеїну – потужного інгібітора реакцій метилювання [1], а, з іншого боку, – пригнічує утворення аденозину. Отже, за ГГЦ формуються такі зміни активності ензимів нуклеотидного обміну, які в цілому спрямовані на зменшення пулу вільного аденозину в організмі. Цей факт до деякої міри підтверджується достовірним зниженням

Таблиця 1. Показники обміну сірковмісних амінокислот у сироватці крові шурів за довгострокового введення тіолактону, гомоцистеїну (ГЦ) та вітамінно-мікроелементного комплексу (ВМК) ($M \pm m$; $n = 10$)

Показник	Групи шурів		
	1	2	3
	Контроль	Тіолактон ГЦ	Тіолактон ГЦ та ВМК
ГЦ, мкМ	6,54 ± 0,23	15,30 ± 0,84*	9,71 ± 0,67*#
Цистеїн, мкМ	124,40 ± 6,83	97,40 ± 4,21*	110,5 ± 3,4#
H_2S , мкМ	78,30 ± 6,45	51,7 ± 4,8*	69,2 ± 3,2*#
Коефіцієнт ГЦ/ H_2S	0,09 ± 0,01	0,34 ± 0,06*	0,14 ± 0,01*#
SH-групи протеїнів, мМ	8,38 ± 0,36	6,74 ± 0,41*	7,93 ± 0,37#

* $P < 0,05$ – відносно групи 1; # $P < 0,05$ – відносно групи 2

Таблиця 2. Показники обміну аденозину у щурів у разі довгострокового введення тіолактону, гомоцистеїну (ГЦ) та вітамінно-мікроелементного комплексу (ВМК) ($M \pm m$; $n = 10$)

Показник	Групи щурів		
	1	2	3
	Контроль	Тіолактон ГЦ	Тіолактон ГЦ та ВМК
Аденозин в сечі, мкмоль/моль креатиніну	6,24 ± 0,19	4,61 ± 0,33*	5,64 ± 0,30 [#]
<i>Активність ензимів у сироватці крові, нмоль/хв·мл</i>			
Апіраза	7,67 ± 0,52	5,94 ± 0,38*	7,10 ± 0,26 [#]
5'-Нуклеотидаза	8,85 ± 0,51	7,61 ± 0,44	8,29 ± 0,31
Аденозиндезаміназа	46,5 ± 3,78	59,7 ± 6,19	55,0 ± 5,77
<i>Активність ектоензимів у фракції тромбоцитів, нмоль/хв на 1 мг протеїну</i>			
Апіраза	5,08 ± 0,22	3,64 ± 0,21*	4,83 ± 0,15 [#]
5'-Нуклеотидаза	2,07 ± 0,09	1,54 ± 0,10*	1,87 ± 0,08 [#]
Аденозиндезаміназа	13,2 ± 1,06	17,5 ± 1,02*	15,6 ± 0,99
<i>Активність ензимів у гомогенаті печінки, нмоль/хв на 1 мг протеїну</i>			
Апіраза	6,35 ± 0,27	4,92 ± 0,31*	6,19 ± 0,37 [#]
5'-Нуклеотидаза	7,40 ± 0,41	6,05 ± 0,39*	7,08 ± 0,33
Аденозиндезаміназа	198,6 ± 9,41	218,5 ± 6,91	206,2 ± 10,0
S-Аденозилгомоцистеїнгідролаза	3,88 ± 0,41	2,57 ± 0,35*	3,61 ± 0,35 [#]

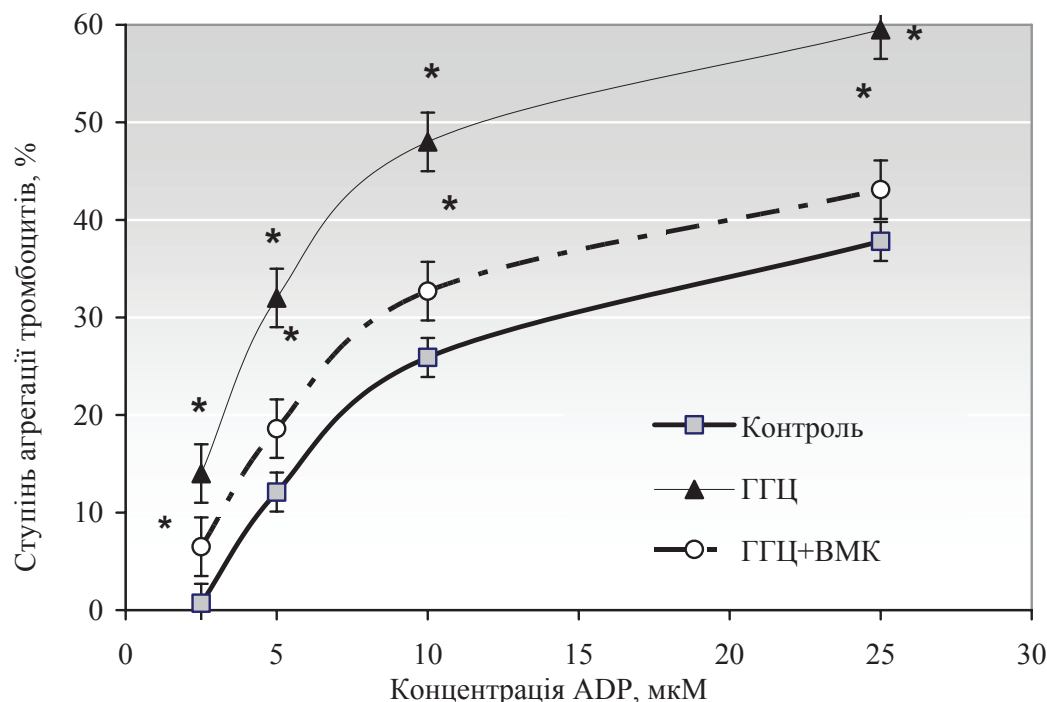
* $P < 0,05$ – відносно групи 1; [#] $P < 0,05$ – відносно групи 2

(на 25,6%) екскреції аденозину із сечею у групі тварин з ГГЦ. Застосування ВМК ефективно протидіє розвитку порушень в обміні аденилових нуклеотидів та аденозину, що підтверджується нормалізацією активності апірази, 5'-нуклеотидази, аденозиндезамінази в сироватці крові, тромбоцитах та печінці, підвищенням активності S-аденозилгомоцистеїнгідролази в печінці, а також збільшенням екскреції аденозину із сечею у щурів групи 3.

Наступним етапом роботи було дослідження впливу порушень обміну аденозину на функціональну активність тромбоцитів у щурів з ГГЦ. Оскільки одним із проявів гіперреактивності тромбоцитів вважають збільшення їхньої чутливості до дії індукторів агрегації, оцінювали зміну порогу активації тромбоцитів до ADP-стимуляції, адже при ГГЦ створюються умови для накопичення в крові саме цього тромбоцитарного агоністу (рисунки). З'ясувалось, що кінцева концентрація ADP, яка спричинює незворотну агрегацію тромбоцитів у 100% тварин, у контрольній групі становить 10 мкМ, а у групі щурів з ГГЦ – лише 5 мкМ. У щурів з ГГЦ ступінь агрегації тромбоцитів, індукованої ADP в концентрації 2,5, 5, 10 та 25 мкМ, перевищує такий у групі контролю в

5,6, 2,0, 1,5 та 1,3 раза відповідно. Отже, найбільші відмінності в реакції тромбоцитів на ADP-стимуляцію спостерігаються між групами 1 та 2 у разі низьких концентрацій цього індуктора. Виявляється, що в контролі ADP (2,5 мкМ) не зумовлює агрегації тромбоцитів у 60% тварин, в той же час у 40% тварин – індукує зворотну агрегацію з дезагрегацією. У 70% тварин 2-ї групи виникає незворотна агрегація тромбоцитів у відповідь на таку саму концентрацію ADP. Застосування ВМК достовірно зменшує ознаки ГГЦ-індукованої гіперреактивності тромбоцитів у щурів.

Показано, що ступінь ADP-індукованої агрегації тромбоцитів як у нормі, так і при ГГЦ, тісно корелює з рівнем ГЦ та коефіцієнтом ГЦ/Н₂S (табл. 3). Кореляційний аналіз підтвердив, що функціональний стан тромбоцитів значною мірою визначається активністю їхніх ензимів: ADP-індукована агрегація обернено корелює з активністю апірази і 5'-нуклеотидази тромбоцитів, і прямо – з активністю аденозиндезамінази. Між рівнем ГЦ та активністю апірази тромбоцитів виявлено достовірний кореляційний зв'язок, який посилюється за ГГЦ. Активність 5'-нуклеотидази та аденозиндезамінази тромбоцитів меншою мірою залежить



Залежність ступеня агрегації тромбоцитів від концентрації індуктора агрегації ADP в інтактних щурів, щурів з ГГЦ та у щурів з ГГЦ, що отримували ВМК. * P < 0,05 відносно контролю

від рівня ГЦ і достовірні кореляційні зв'язки між цими показниками встановлюються лише при ГГЦ. Аналогічну кореляцію виявлено між рівнем ГЦ і активністю ензимів обміну аденозину в сироватці крові та печінці щурів. Одержані дані свідчать про те, що у фізіологічних концентраціях ГЦ, ймовірно, один із чинни-

ків, який регулює чутливість тромбоцитів до ADP-стимуляції. В той же час, порушення балансу в системі «деградація ADP/утворення аденозину» при ГГЦ стає патерном для формування гіперреактивності тромбоцитів.

Які ж механізми лежать в основі розвитку асоційованих з ГГЦ порушень нуклеотидного

Таблиця 3. Кореляції між рівнем ГЦ в сироватці крові, коефіцієнтом ГЦ/H₂S, ступенем агрегації тромбоцитів, активністю ектоензимів тромбоцитів і екскрецією аденозину у щурів

Показники	Групи щурів					
	1			2		
	Контроль			Тіолактон ГЦ		
	ГЦ	ГЦ/H ₂ S	Ступінь агрегації тромбоцитів	ГЦ	ГЦ/H ₂ S	Ступінь агрегації тромбоцитів
Ступінь агрегації тромбоцитів	0,56*	0,39	—	0,64*	0,70*	—
Апіраза тромбоцитів	-0,48	-0,36	-0,43	-0,73*	-0,56*	-0,68*
5'-Нуклеотидаза тромбоцитів	-0,21	-0,12	-0,42	0,54*	-0,38	-0,53*
Аденозіндезаміназа тромбоцитів	0,28	0,26	0,35	0,48	0,34	0,53*
Аденозін сечі	-0,33	-0,37	-0,22	-0,47	-0,43	-0,47

*Вірогідні коефіцієнти кореляції

обміну? Як відомо, негативна дія ГЦ на організм реалізується як на геномному рівні, так і на рівні протеому. Хронічне навантаження тіолактоном ГЦ може індукувати зміни активності тромбоцитарних, циркулюючих та печінкових ензимів обміну аденілових нуклеотидів внаслідок порушення експресії відповідних генів при ГЦ [1]. Ще одним механізмом впливу високого рівня ГЦ на активність нуклеотидаз може бути післятрансляційна модифікація їхніх молекул. Адже відомо, що ГЦ та тіолактон легко утворюють аддукти із протеїнами (S- та N-гомоцистеїнування), змінюючи функціональні властивості їх. Крім того, надлишок ГЦ індукує генерацію активних форм кисню [1], а ензими нуклеотидного обміну, як відомо, інактивуються під їхньою дією [18]. Цей механізм підтверджує виявлений кореляційний зв'язок між коефіцієнтом ГЦ/ H_2S та активністю ектоапірази тромбоцитів, який посилюється при ГЦ.

В дослідях *in vivo* встановлено здатність ГЦ знижувати активність апірази та 5'-нуклеотидази, у зв'язку з цим було перевірено, чи виявляє ГЦ пряму інгібуючу дію на ці ензими *in vitro*. Для досліджень використовували фракцію тромбоцитів, яку отримали від 5 інтактних щурів-самців. За деякими даними ГЦ здатен гальмувати гідроліз ADP та AMP сироваткою крові щурів *in vitro* [19]. Було застосовано загальноприйнятий метод визначення IC_{50} – параметра, який вказує на концентрацію інгібітора, що забезпечує зменшення швидкості реакції вдвічі.

Встановлено, що присутність ГЦ в інкубаційному середовищі спричинює зниження швидкості гідролізу ADP і, меншою мірою, гідролізу AMP фракцією тромбоцитів (табл. 4).

При цьому IC_{50} ГЦ для гідролізу ADP знаходиться в межах 5–6 мМ, а IC_{50} ГЦ для гідролізу AMP – в межах 8–9 мМ. Оскільки *in vivo* активність нуклеотидаз корелює не лише з рівнем ГЦ, а і з коефіцієнтом ГЦ/ H_2S було досліджено залежність інгібуючої дії ГЦ від донора H_2S – NaHS, який додавали до наведених вище модельних систем у вигляді водного розчину $Na_2S \cdot 9H_2O$ в кінцевій концентрації 1 мМ. Показано, що у присутності NaHS вплив ГЦ на гідроліз аденілових нуклеотидів зменшується, про що свідчить підвищення значення IC_{50} ГЦ для гідролізу ADP до 9 мМ, а для гідролізу AMP – вище 10 мМ. Різна чутливість апірази та 5'-нуклеотидази тромбоцитів до інгібуючої дії ГЦ, а також зменшення цього ефекту у присутності H_2S вказує на те, що каталітична активність цих ектоензимів змінюється скоріше через ковалентну модифікацію їхніх есенціальних тіолових залишків, ніж через окислювальне пошкодження мембранного оточення тромбоцитарних протеїнів. Це узгоджується з даними, що й інші тіоли (наприклад, глутатіон) також виявляють здатність знижувати активність нуклеотидаз [20]. В той же час, H_2S має не лише потужні антиоксидантні властивості, а і забезпечує регенерацію сульфгідрильних груп протеїнів [17].

Таким чином, індуковані тіолактоном ГЦ порушення обміну аденілових нуклеотидів та аденозину створюють умови для формування гіперреактивності тромбоцитів. Введення шурам вітамінів B_6 , B_9 , B_{12} та мікроелементів (Zn^{2+} , Cr^{3+} , V^{5+}) не лише зменшує ступінь ГЦ, а й стабілізує функціональний стан тромбоцитів, у тому числі і за рахунок нормалізації активності їхніх ензимів. Наслідки порушень нуклеотидного обміну при ГЦ, очевидно, не

Таблиця 4. Вплив ГЦ на швидкість гідролізу ADP та AMP фракцією тромбоцитів інтактних щурів ($M \pm m$; $n = 3$)

ГЦ, мМ	Швидкість утворення P_i , нмоль/хв на 1 мг протеїну			
	Гідроліз ADP	Гідроліз ADP + 1 мМ NaHS	Гідроліз AMP	Гідроліз AMP + 1 мМ NaHS
0	5,45 ± 0,13	–	2,43 ± 0,08	–
0,2	4,72 ± 0,11	5,13 ± 0,10	1,99 ± 0,05	2,10 ± 0,02
0,5	4,20 ± 0,06	4,73 ± 0,18	1,82 ± 0,02	1,95 ± 0,01
1,0	3,79 ± 0,09	4,42 ± 0,08	1,71 ± 0,08	1,83 ± 0,01
2,0	3,24 ± 0,08	3,94 ± 0,06	1,49 ± 0,03	1,61 ± 0,02
5,0	2,84 ± 0,11	3,50 ± 0,13	1,27 ± 0,03	1,48 ± 0,03
10,0	2,09 ± 0,08	2,98 ± 0,06	1,08 ± 0,03	1,21 ± 0,04

обмежуються розвитком тромбофілії, оскільки ці молекули беруть участь у багатьох фізіологічних процесах — пуриновому сигналінгу, нейромодуляції, апоптозі тощо. Подальше вивчення впливу порушень обміну сірковмісних амінокислот на нуклеотидний обмін покращить розуміння механізмів формування різних патологічних станів і дозволить оптимізувати підходи до їхньої фармакотерапії.

Узагальнюючи, треба відзначити, що навантаження щурів тиолактоном ГЦ (в дозі 100 мг/кг маси тіла, протягом 28 днів) спричинює порушення обміну аденилових нуклеотидів: зниження (на 22–27%) активності апирази та 5'-нуклеотидази і підвищення активності аденозіндезамінази у сироватці крові, фракції тромбоцитів та печінці; зниження (на 33,8%) активності S-аденозилгомоцистеїнгідролази в печінці, зменшення (на 25,6%) екскреції аденозину із сечею. Порушення активності тромбоцитарних ектоензимів при ГЦ корелюють зі ступенем агрегації тромбоцитів, підвищенням рівня ГЦ та дефіцитом H_2S . Ознакою формування гіперреактивності тромбоцитів, асоційованої з ГЦ, є зниження (в 2 рази) порога активації цих клітин ADP. Застосування ВМК запобігає порушенням обміну аденозину при ГЦ і практично нормалізує функціональний стан тромбоцитів. В модельних системах *in vitro* ГЦ дозозалежно інгібує гідроліз ADP та AMP (з $IC_{50} \approx 6$ та 9 мМ відповідно) фракцією тромбоцитів і цей ефект зменшується у присутності донора H_2S — NaHS.

ВЛИЯНИЕ ХРОНИЧЕСКОЙ НАГРУЗКИ ТИОЛАКТОНОМ ГОМОЦИСТЕИНА НА ОБМЕН АДЕНОЗИНА У КРЫС: СВЯЗЬ С ГИПЕРРЕАКТИВНОСТЬЮ ТРОМБОЦИТОВ, КОРРЕКЦИЯ НАРУШЕНИЙ ЕГО ОБМЕНА ВИТАМИННО-МИКРОЭЛЕМЕНТНЫМ КОМПЛЕКСОМ

Н. В. Заичко

Научно-исследовательский институт реабилитации инвалидов Винницкого национального медицинского университета им. Н. И. Пирогова;
e-mail: nzaichko@mail.ru

Исследовано влияние нагрузки тиолактоном D,L-гомоцистеина (в дозе 100 мг/кг массы тела, интрагастрально в течение 28 суток) на активность энзимов обмена адениловых нуклеотидов и аденозина в сыворотке крови,

фракции тромбоцитов и печени крыс, изучена связь выявленных нарушений с функциональным состоянием тромбоцитов. Установлено, что у крыс с гипергомоцистеинемией (ГГЦ) снижается активность апиразы и 5'-нуклеотидазы и повышается активность аденозіндезамінази в тромбоцитах, а также нарушается образование аденозина в сыворотке крови и печени. При этих условиях существенно усиливается чувствительность тромбоцитов крыс к ADP-стимуляции. Витаминно-микроэлементный комплекс уменьшает индуцированные ГГЦ нарушения обмена аденозина и предотвращает формирование гиперреактивности тромбоцитов. *In vitro* гомоцистеин дозозависимо ингибирует гидролиз ADP и AMP фракцией тромбоцитов крыс и этот эффект уменьшается в присутствии донора гидрогенсульфида — NaHS.

Ключевые слова: гипергомоцистеинемия, тромбоциты, аденозин, апираза, 5'-нуклеотидаза, витаминно-микроэлементный комплекс.

INFLUENCE OF CHRONIC HOMOCYSTEINE THIOLACTONE LOADING ON ADENOSINE METABOLISM IN RATS: RELATIONSHIP WITH PLATELET HYPER-REACTIVITY, CORRECTION OF THIS METABOLISM DISTURBANCES BY VITAMIN-MICROELEMENT COMPLEX

N. V. Zaichko

Scientific-Research Institute of Invalid Rehabilitation, Pirogov Vinnytsia National Medical University, Vinnytsia;
e-mail: nzaichko@mail.ru

Summary

Influence of DL-homocysteine thiolactone loading (100 mg/kg by intragastric administration for 28 days) on enzymes activity of adenylic nucleotide and adenosine metabolism in the blood serum, platelets and liver of rats was investigated. The relation between revealed disturbance and platelet hyper-reactivity was estimated. It was established, that apyrase and 5'-nucleotidase activities decreased and adenosine deaminase activity increased in platelets of the rats with hyperhomocysteinemia (HHC). HHC also interrupted adenosine production in the blood serum and liver in rats. Under this condition the platelet sensitivity to ADP-stimulation was significantly increased. Vi-

tamin-microelement complex decreased HHC-induced disorder of adenosine metabolism and prevented platelet hyper-reactivity formation. *In vitro* homocysteine inhibited platelet hydrolysis of ADP and AMP in a dose-dependent manner and this effect reduced in the presence of hydrogen sulfide donor NaHS.

Key words: hyperhomocysteinemia, platelet, adenosine, apyrase, 5'-nucleotidase, vitamin-microelement complex.

1. Пентюк О. О., Луцюк М. Б., Заїчко Н. В. та ін. // *Biomed. Biosoc. Anthropol.* – 2008. – № 10. – С. 297–303.
2. Заїчко Н. В. // *Мед. хімія.* – 2008. – 10, № 2. – С. 54–58.
3. Birk A. V., Broekman M. J., Gladek E. M. // *J. Lab. Clin. Med.* – 2002. – 140, N 3. – P. 166–175.
4. Frassetto S. S., Schetinger M. R., Schierholt R. et al. // *Braz. J. Med. Biol. Res.* – 2000. – 33, N 11. – P. 1369–1377.
5. Franco R., Aran J. M., Colomer D. et al. // *J. Histochem. Cytochem.* – 1990. – 38, N 5. – P. 653–658.
6. Пентюк О. О., Луцюк М. Б., Постовітенко К. П. та ін. // *Досягнення біології та медицини.* – 2004. – № 1 (3). – С. 35–38.
7. Stangl G. I., Weisse K., Dinger C. et al. // *Exp. Biol. Med (Maywood).* – 2007. – 232, N 1. – P. 81–87.
8. Артемчук М. А. // *Biomed. Biosoc. Anthropol.* – 2006. – № 7. – С. 17–20.
9. Карбовський В. Л., Савчук О. М., Волков Г. Л. та ін. // *Укр. біохім. журн.* – 2007. – 79, № 4. – С. 82–89.
10. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // *J. Biol. Chem.* – 1951. – 193. – P. 265–276.
11. Рыбальченко В. К., Коганов М. М. Структура и функции мембран: Практикум. – К.: Вища школа, 1988. – 312. – P. 239–241.
12. Isa Y., Tsuge H., Hayakawa T. // *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* – 2006. – 52, N 5. – P. 302–306.
13. *Современные методы в биохимии* / Под ред. Ореховича В. Н. – М.: Медицина, 1968. – 372. – С. 121–123.
14. Pull I., McIlwain H. // *Biochem. J.* – 1972. – 126, N 4. – P. 965–973.
15. Заїчко Н. В., Пентюк Н. О., Пентюк Л. О. та ін. // *Вісн. наук. досліджень.* – 2009. – № 1. – С. 29–32.
16. Gaitonde M. // *Biochem. J.* – 1967. – 104, N 2. – P. 627–633.
17. Lowicka E., Beltowski J. // *Pharmacol. Rep.* – 2007. – 59, N 1. – P. 4–24.
18. Liu X. W., Sok D. E. // *Neurochem. Res.* – 2000. – 25, N 11. – P. 1475–1484.
19. Böhmer A., Pochmann D., Sarkis J. // *Chem. Biol. Interact.* – 2006. – 160, N 2. – P. 159–164.
20. Frassetto S. S., Dias R. D., Sarkis J. J. // *Biochem. Mol. Biol. Int.* – 1997. – 41, N 1. – P. 161–168.

Отримано 11.02.2010