

## ГІПЕРГОМОЦИСТЕЇНЕМІЯ: МОДЕЛЮВАННЯ ТА ВПЛИВ НА СТАН СУДИННОЇ СИСТЕМИ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

*Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова*

### Вступ

Гіпергомоцистеїнемія (ГГЦ) є важливим фактором розвитку атеросклерозу й атеротромбозу, а рівень гомоцистеїну (ГЦ) у плазмі крові прямо корелює з тяжкістю перебігу ішемічної та гіпертонічної хвороб і суттєво погіршує прогноз захворювань [1]. Причиною ГГЦ є спадкові фактори, дефіцит вітамінів, що беруть участь в обміні ГЦ, ниркова недостатність та інші фактори [2]. Головним біохімічним механізмом несприятливої дії ГГЦ є порушення процесів метилування, гомоцистеїнування білків, оксидативний стрес [3]. Клінічно ГГЦ проявляється ендотеліальною дисфункцією, посиленням процесів атеросклеротичного ураження судин та тромбоутворення. Ці та інші дані стимулювали дослідження в напрямку створення засобів зниження рівня ГЦ. Здатність знижувати рівень ГЦ притаманна вітамінам В9, В6 і В12 [4], статевим гормонам, аргініну та іншим речовинам.

Експериментальні моделі ГГЦ використовуються для дослідження патогенетичних механізмів її дії, впливу різноманітних харчових та інших факторів, для розробки методів та засобів лікування ускладнень, спричинених цим синдромом. Відповідні моделі передбачають гостре або хронічне навантаження метіоніном [5] або гомоцистеїном [6]. Метіонін є єдиним джерелом ГЦ в організмі і тому при додатковому його введенні дозалежно підвищується рівень

ГЦ у плазмі крові. Однак метіонінова модель ГГЦ, хоча і використовується найчастіше, є далекою від реальних механізмів розвитку ГГЦ у людей, що переважно спричинюється спадковими дефектами ферментів обміну вітамінів В9, В6 та В12, їх аліментарною недостатністю та іншими факторами.

Метою нашої роботи була апробація відомих моделей ГГЦ та їх удосконалення за рахунок поєднання навантаження метіоніном з аліментарною недостатністю вітамінів, що контролюють обмін ГЦ.

Адекватність досліджуваних варіантів моделей ГГЦ перевірена за їх здатністю спричинювати підвищення рівня ГЦ у плазмі крові, порушувати структуру та функції деяких органів і за можливістю зворотного розвитку ГГЦ при специфічному лікуванні.

### Матеріали та методи дослідження

Дослідження проводилося на 135 щурах-самцях лінії Вістар, яких утримували під час експерименту на стандартній крохмально-казеїновій дієті. Для приготування корму та очистки казеїну і крохмалю від вітамінів використані рекомендації [7; 8] з деякими змінами, обумовленими особливостями експерименту. Так, до складу дієти тварин деяких груп 3, 5а, 5б, 7, 9, 11 введено 1 % L-метіонін (Rexim, фірма "Degussa"), усіх груп — 1 % фармакопейного антимікробного препарату фталазолу, що сповільнює синтез вітамінів

кишковою мікрофлорою, але не всмоктується, не виявляє системної дії, та, як показали наші дослідження, не впливає на рівень ГЦ у плазмі крові. Склад дієти: крохмаль, відмитий від вітамінів, — 65,4 %, казеїн, відмитий від вітамінів, — 17 %, суміш однакових кількостей соняшникової олії та свинячого смальцю — 10 %, суміш мінеральних солей — 3,5 %, целюлоза — 2 %, L-метіонін — 1 %, фталазол — 1 %, суміш вітамінів — 0,1 %. Тварини контрольних груп L-метіоніну не отримували.

До базової дієти вітаміни включали у фізіологічних кількостях [7]: піридоксину — 1,0; фолату — 0,2; кобаламіну — 0,03; тіаміну — 4,0; рибофлавіну — 5,0; пантотенату — 15,0; нікотинату — 15,0; біотину — 0,1; холіну — 50,0; токоферолу — 150,0; вітаміну К (філохінон) — 2,0; ретинолу — 1,0; кальциферолу — 0,03 мг/кг. Жиророзчинні вітаміни попередньо вносили до складу жирової суміші. Водорозчинні вітаміни змішували з глюкозою з таким розрахунком, щоб в 1 г суміші (0,1 % від маси дієти) містилася їх необхідна доза. Групи тварин з недостатністю вітамінів В6, В9, В12 одержували дієту без зазначених вітамінів. У кінці досліду в тварин брали для дослідження кров, у плазмі визначали рівень загального ГЦ за відомим методом [9].

### Результати дослідження та їх обговорення

*1. Модель короткочасної (гострої) ГГЦ*

Досліджували дві групи тварин масою близько 200 г, яких протягом 10 діб утримували на стандартній повноцінній дієті, включаючи вітаміни В6, В9 і В12. На 11-й день дослідження натще тваринам 2-ї групи за допомогою зонда одноразово в шлунок вводили 1 мл на 100 г маси тіла 5%-го розчину L-метіоніну на дистильованій воді. Тваринам контрольної групи (група 1) вводили таку саму кількість води. Через 2 год у тварин визначали у плазмі крові рівень ГЦ (згідно з попередньо отриманими даними, піковий рівень ГЦ у плазмі крові тварин за цих умов спостерігався через 2 год). Результати дослідження подано в табл. 1.

У плазмі контрольних щурів (1-ша група) середній рівень ГЦ становив 1,98 мкг/мл, або 14,65 мкмоль/л. Виявилося, що одноразове введення тваринам L-метіоніну (група 2а) через 2 год збільшувало рівень ГЦ до 7,98 мкг/мл, тобто в чотири рази ( $P < 0,01$ ). Дані літератури свідчать про те, що навіть короткочасна (гостра) ГГЦ має негативні наслідки, зокрема активуються агрегація тромбоцитів та біосинтез тромбоксанів у тварин [5], виникає дисфункція ендотелію у волонтерів [2].

У частини тварин 2-ї групи (група 2б) ми оцінили вплив навантаження вітамінами В6, В9 і В12 (дозами 5,0; 1,0; 0,15 мг на 1 кг корму відповідно, що в 5 разів перевищує фізіологічну кількість цих вітамінів) на індуковану метіоніном ГГЦ. У цій групі тварин після введення метіоніну середній рівень ГЦ виявився вірогідно меншим, ніж у тварин групи 2а, і становив 3,25 мкг/мл. Отже, вжиті вітаміни здатні частково запобігати розвитку експериментальної ГГЦ. Описана модель ГГЦ, очевидно, відображає стан системи метаболізму ГЦ і тому може бути використана для вивчення впливу різноманітних факторів і речовин на зазначену систему.

## 2. Моделі довготривалої (хронічної) ГГЦ

2.1. Перша модель. Молоді (маса близько 100 г) та дорослі (маса близько 250 г) щури-самці утримувалися протягом двох тижнів на стандартній повноцінній (в тому числі з вітамінами В6, В9 і В12 дієті, що містила 1 % L-метіоніну (групи 3, 5а, 5б). Контрольні тварини L-метіоніну не отримували (4-та і 6-та групи). Результати визначення рівня ГЦ у плазмі крові щурів в кінці досліду подано в табл. 2.

Як видно з табл. 2, введення молодим тваринам з дієтою L-метіоніну (3-тя група) супроводжується лише невірогідним підвищенням рівня ГЦ. Можливо, це пояснюється підвищеним станом обміну білків, характерним для молодого організму. Навпаки, у дорослих тварин (група 5а) дієта, збагачена L-метіоніном, сприяла вірогідному підвищенню (в 1,6 разу) його рівня у плазмі крові ( $P < 0,05$ ), тобто в умовах надходження з дієтою фізіологічних кількостей вітамінів лише тварини старшого віку реагували на навантаження метіоніном вірогідним, але в цілому незначним збільшенням вмісту ГЦ, а молодші щури виявилися резистентними до введення метіоніну.

На нашу думку, описана модель ГГЦ може бути використана для вивчення профілактичної та лікувальної дії гіпогомостеїнемічних препаратів лише у тварин старшого віку. На цій моделі нами було встановлено, що п'ятиразове збагачення раціону вітамінами В6, В9 і В12 запобігає розвитку ГГЦ (група 5 б).

2.2. Друга модель ГГЦ ґрунтується на використанні двох факторів:

— харчової недостатності одночасно трьох вітамінів — В6, В9 і В12 (виключення з дієти вітамінів, які беруть участь в обміні ГЦ, на нашу думку, має забезпечити більш високу ГГЦ);

— введення тваринам з дієтою L-метіоніну.

Досліди проведені протягом 2 тиж на 4 групах молодих щурів-самців (7, 8, 9, 10-та групи), з яких тварини 7-ї та 8-ї груп одержували дієту, що не містила вітамінів В6, В9 і В12, а тварини 9-ї і 10-ї груп — дієту, що містила фізіологічні дози усіх вітамінів, включаючи В6, В9 і В12. Тварини 7-ї та 9-ї груп харчувалися дієтою, що містила 1 % метіоніну, 8-ма і 10-та групи отримували раціон без метіоніну. У дослідженнях на самцях старшого віку було використано 3 групи. В 11-й групі щури отримували дієту з метіоніном на фоні дефіциту вітамінів В6, В9 і В12. Тварини 12-ї групи отримували дієту без метіоніну та вітамінів В6, В9 і В12. Щури 13-ї групи (контроль) отримували повноцінну дієту без метіоніну. Результати досліду подано в табл. 3.

Як видно з табл. 3, молоді тварини, що отримували протягом двох тижнів позбавлену вітамінів В6, В9 і В12 дієту, відстали в рості від тварин, що одержували дієту з фізіологічним вмістом цих вітамінів.

У попередніх дослідженнях нами показано, що вже через 2 тиж у тварин, які знаходилися на дієті, позбавленій вітамінів В6, В9 і В12, реєструва-

Таблиця 1

Рівень гомоцистеїну в плазмі крові тварин, яким одноразово вводили 5%-й розчин L-метіоніну по 1,0 мл на 100 г маси тіла,  $M \pm m$

Групи тварин	Рівень гомоцистеїну, мкг/мл	Коливання рівня гомоцистеїну	P
1. Контроль, n=8	1,98±0,29	1,13–3,45	
2а. Метіонін, n=8	7,98±1,36	3,77–14,7	<0,01
2б. Метіонін + вітаміни В6, В9, В12, n=7	3,25±0,22	2,25–3,82	<0,05

Примітка. Вірогідність відмінностей середніх величин подано між групами 2а та 1 і між групами 2б і 2а.

лися ознаки дефіциту цих вітамінів, а саме зниження активності піридоксинзалежних ферментів аланінамінотрансферази та аспартатамінотрансферази в гомогенаті печінки з 72,4 до 54,0 та з 34,6 до 22,7 ммоль пірувату/год відповідно, з'являлися ознаки дефіциту фолієвої кислоти (лейкопенія, гіперсегментація ядер лейкоцитів) та вітаміну В12 (підвищення екскреції з сечею метилмалонової кислоти на 45 %).

Комбінація двох факторів — вітамінної недостатності та введення L-метіоніну — призвела у тварин 7-ї групи до значної ГГЦ — 19,3 мкг/мл, що більш ніж у 10 разів перевищила рівень ГЦ у щурів контрольних (9-ї, 10-ї) груп. Характерно, що у тварин 8-ї групи, які отримували дієту, звільнену від вітамінів В6, В9 і В12, але без навантаження L-метіоніном, рівень ГЦ у плазмі крові, хоча і був дещо вищим, але статистично не відрізнявся від нормальних показників.

Було продубльовано попередній експеримент, але на щурах старшого віку з масою близько 200 г. У кінці дослідження у тварин 11-ї та 12-ї груп, на відміну від молодих тварин, явних ознак недостатності вітамінів В6, В9 і В12 не було виявлено. У тварин 11-ї групи, яких утримували на дієті, позбавленій вітамінів В6, В9 і В12 з включенням 1 % L-метіоніну, рівень ГЦ був збільшений майже в 10 разів порівняно з контрольними щурами (12-ї та 13-ї груп) і становив 19,6 мкг/мл. Таким чином, відносна вітамінна недостатність як у молодих щурів (до 100 г), так і в тварин старшого віку (масою близько 200 г) значно потенціює ефект L-метіоніну щодо підвищення рівня ГЦ.

Модель описаної довготривалої ГГЦ спричинює патологічні зміни в судинах внутрішніх органів та оці, що доведено при морфологічному дослідженні. Наведемо вибіркового опис виявлених порушень. Так, в оці відмічено зміни в усіх структурах су-

динного тракту — як в хоріоїдеї та райдужній оболонці, так і в циліарному тілі. Головні зміни спостерігалися з боку строми і кровоносних су-

дин, переважно середнього та дрібного калібру. В паренхіматозно-стромальних елементах судинного тракту виявлено дистрофічні та проліферативні

Таблиця 2

**Рівень гомоцистеїну в плазмі крові тварин, які отримували протягом двох тижнів дієту з вмістом 1%-го розчину L-метіоніну,  $M \pm m$**

Групи тварин	Маса тварин під час дослідження, г		Рівень гомоцистеїну, мкг/мл	P
	На початку	Наприкінці		
Молоді тварини				
3. Метіонін в дієті, n=8	98	146	2,23±0,26	>0,05
4. Контроль (дієта без метіоніну), n=8	96	145	1,99±0,27	
Тварини старшого віку				
5а. Метіонін в дієті, n=11	258	278	3,59±0,31	<0,05
5б. Метіонін + вітаміни В6, В9, В12 в дієті, n=8	261	285	2,60±0,20	>0,05
6. Контроль (дієта без метіоніну), n=14	252	280	2,20±0,26	

*Примітка.* Вірогідність відмінностей середніх величин між 3-ю та 4-ю групами та між групами 5а, 5б і 6.

Таблиця 3

**Маса тіла та рівень гомоцистеїну у молодих тварин і тварин старшого віку з експериментальною гіпергомоцистеїнемією, спричиненою недостатністю вітамінів В6, В9, В12 та введенням L-метіоніну,  $M \pm m$**

Групи тварин	Маса тварин під час дослідження, г		Рівень гомоцистеїну, мкг/мл	P
	На початку	Наприкінці		
Молоді тварини				
7. Метіонін на фоні дефіциту вітамінів В6, В9, В12 в дієті, n=8	99	130	19,3±3,20	<0,05
8. Контроль (дефіцит вітамінів В6, В9, В12), n=9	98	130	2,23±0,22	
9. Контроль (метіонін на фоні повноцінної дієти), n=6	92	147	1,71±0,33	
10. Контроль (повноцінна дієта), n=6	93	149	1,67±0,35	
Тварини старшого віку				
11. Метіонін на фоні дефіциту вітамінів В6, В9, В12 в дієті, n=14	195	212	19,6±2,78	<0,05
12. Контроль (дефіцит вітамінів В6, В9, В12), n=10	202	215	1,98±0,25	
13. Контроль (повноцінна дієта), n=10	197	212	1,69±0,20	

*Примітка.* Вірогідність відмінностей середніх величин між 7-ю та 8, 9, 10-ю групами; а також між 11-ю та 12-ю і 13-ю групами.

зміни. У капілярному руслі сітківки спостерігалась агрегація формених елементів крові. Інколи виявлялися звуження просвіту судин, їх обтурація та інші порушення. Ці зміни в сітківці ока морфологічно тотожні з ретинопатією, що дозволило нам запропонувати експериментальну модель ураження сітківки ока [10]. Виявлені також мікроскопічні зміни в нирках, а саме ознаки ураження судин: потовщення стінок артерій та їх інфільтрація макрофагами з вакуолізованою цитоплазмою, тромби в окремих судинах.

На нашу думку, всі описані вище моделі є достатньо зручними у виконанні з огляду на те, що їх тривалість не перевищує 10–14 днів. Важливою особливістю гострої метіонінової та гіповітамінозно-метіонінової моделей ГГЦ є можливість отримання високого рівня ГЦ, який відповідно більш ніж у 4 та 10 разів перевищує нормальні показники. Запропоновані моделі можуть бути використані як для вивчення дії гіпогомоцистеїнемічних препаратів, так і для пошуку методів та засобів корекції змін, спричинених ГГЦ. Нами показано, що комбінування навантажень L-метіоніном з вітамінною недостатністю (вітамінів В6, В9 і В12) здатне забезпечити розвиток значної ГГЦ з порушенням су-

динного русла органів. У цих умовах ГГЦ моделюється як у молодих щурів, так і у тварин старшого віку. Адекватність моделей підтверджена також зниженням рівня ГЦ при навантаженні тварин вітамінами В6, В9 і В12.

### Висновки

1. Створено три моделі експериментальної ГГЦ: дві метіонінові (гостра та хронічна) та одна комбінована (хронічна), спричинена введенням метіоніну на фоні відносної недостатності вітамінів В6, В9 і В12.
2. При комбінованій хронічній ГГЦ виявлено патологічні зміни в судинах ока та нирок.
3. На моделях гострої та хронічної ГГЦ виявлено здатність навантаження вітамінами В6, В9 і В12 суттєво зменшувати або нормалізувати рівень ГЦ у плазмі крові.
4. Описані моделі можуть бути використані для розробки та випробовування методів та засобів профілактики ГГЦ та лікування її наслідків.

### ЛІТЕРАТУРА

1. *Plasma homocysteine levels and Mortality in patients with coronary artery disease* / O. Nygard, J. E. Nordrehaug, H. Refsum et al. // *New Engl. J. Med.* — 1997. — Vol. 337, N 4. — P. 230-236.
2. *Homocysteine determinants and the evidence to what extent homocysteine determines the risk of coronary heart disease* / A. De Bree, W. M. M. Verschuren,

D. Kromhout et al. // *Pharmacological Reviews.* — 2002. — Vol. 54. — P. 599-618.

3. *Метаболізм гомоцистеїну та його роль у патології* / О. О. Пентюк, М. Б. Луцук, І. І. Андрушко, К. П. Постовітенко // *Укр. біохім. журнал.* — 2003. — Т. 75, № 1. — С. 5-17.

4. *Clarke R. Lowering blood homocysteine with folic acid based supplements: meta-analysis of randomised trials* // *British Medical Journal.* — 1998. — Vol. 316. — P. 894-898.

5. *Durand P., Lussier-Cacan S., Blache D. Acute methionine load-induced hyperhomocysteinemia enhances platelet aggregation, thromboxane biosynthesis, and macrophage derived tissue factor activity in rats* // *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal.* — 1997. — Vol. 11, N 13. — P. 1157-1168.

6. *Increasing levels of dietary homocysteine with carotid endarterectomy produced proportionate increases in plasma homocysteine and intimal hyperplasia* / F. Southern, J. Eidt, J. Drouilhet et al. // *Atherosclerosis.* — 2001. — Vol. 158, N 1. — P. 129-138.

7. *Островский Ю. М. Экспериментальная витаминология: Справ. рук.* — Минск: Наука и техника, 1979. — 551 с.

8. *Extremely low activity of methionine synthase in vitamin B<sub>12</sub> — deficient rats may be related of effects on coenzyme stabilization rather than to changes in coenzyme induction* / K. Yamada, T. Kawada, M. Wada et al. // *J. Nutrition.* — 2000. — Vol. 130. — P. 1894-1900.

9. *Визначення концентрації гомоцистеїну в біологічних рідинах методом високоефективної рідинної хроматографії* / О. О. Пентюк, О. В. Ільченко, С. В. Шевчук та ін. // *Мед. хімія.* — 2001. — Т. 3, № 3. — С. 61-67.

10. *Спосіб моделювання ретинопатії* / Й. Р. Салдан, О. О. Пентюк, М. Б. Луцук та ін. — Деклараційний патент на винахід. Україна, 53403А; 7 AGIF9/00, Y09B23/28 від 15.01.2003 р.

УДК 577.16:547.466.001.5

О. О. Пентюк, М. Б. Луцук, К. П. Постовітенко, М. А. Артемчук, О. С. Асачова, Т. В. Призимирська  
ГІПЕРГОМОЦИСТЕІНЕМІЯ: МОДЕЛЮВАННЯ ТА ВПЛИВ НА СТАН СУДИННОЇ СИСТЕМИ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

Гіпергомоцистеїнемія (ГГЦ) є незалежним фактором ризику виникнення атеросклерозу, ішемічної хвороби серця, тромбозу та оклюзії судин. Пошук препаратів гіпогомоцистеїнемічної дії гальмується відсутністю адекватних експериментальних моделей, які б враховували основні патогенетичні механізми виникнення ГГЦ. У роботі наведено три створених авторами моделі ГГЦ — дві метіонінові (гостра та хронічне навантаження метіоніном) та одна комбінована, спричинена введенням метіоніну на фоні відносної недостатності вітамінів В6, В9 і В12. Показано, що вітаміни В6, В9 і В12 дозами, що перевищують фізіологічну потребу в 5 разів, здатні зменшувати або повністю нормалізувати рівень гомоцистеїну у плазмі крові тварин із ГГЦ.

**Ключові слова:** гіпергомоцистеїнемія, експериментальне моделювання ураження судин.

UDC 577.16:547.466.001.5

О. О. Pentjuk, M. B. Lutsyuk, K. P. Postovitenko, M. A. Artemchuk, O. S. Asachova, T. V. Prysmyrska  
HYPERHOMOCYSTEINEMIA: EXPERIMENTAL MODELING AND INFLUENCE ON VASCULAR SYSTEM STATE

Hyperhomocysteinemia (HHC) is an independent risk factor of atherosclerosis origin, ischemic heart disease thrombosis and vascular occlusion. The search of hyperhomocysteinemic action preparations is restrained by the absence of corresponding experimental models, which would take into account the main pathogenetic mechanism of HHC origin. In this article there are given three models of HHC created by authors: two — methionite (acute and chronic loading by methionine) and one — combined, caused by methionine introducing on the background of relative deficiency of vitamins B6, B9, B12. It is shown that, vitamins B6, B9, B12 in doses that exceed physiologic need in five times, are able to decrease or completely normalize the level of homocysteine in blood plasma of animals with HHC.

**Key words:** hyperhomocysteinemia, experimental modeling vascular damage.