Дата публикации: 01.06.2023
DOI: 10.24412/2588-0500-2023_07_02_1
УДК 665.334.7: [58.072+612.115.12]

Publication date: 01.06.2023
DOI: 10.24412/2588-0500-2023_07_02_1
UDC 665.334.7: [58.072+612.115.12]

ВЛИЯНИЕ МАСЛА ЧЕРНОГО ТМИНА НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНУЮ ХАРАКТЕРИСТИКУ ТРОМБОЦИТОВ ПРИ ЭКЗОГЕННОЙ ТРОМБИНЕМИИ

Х.М. Алхасова[1,2], В.Г. Соловьев[2], О.В. Черничук[1]
[1]Автономное учреждение ХМАО-Югры «Центр Профессиональной Патологии», г. Ханты-Мансийск, Россия
[2]Бюджетное учреждение высшего образования ХМАО-Югры «Ханты-Мансийская государственная медицинская академия», г. Ханты-Мансийск, Россия

Аннотация. Липопероксидация клеточных мембран тромбоцитов (Тц) приводит к изменению процессов стационарного функционирования клеток, активации мембранных фосфолипаз, формированию матриц для запуска каскада ферментативных реакций гемостаза. Первым и видимым проявлением активации Тц является изменение их формы. Целью нашей работы явилось изучение БАД «Масло черного тмина “Эфиопское”» (МЧТ) на морфофункциональные характеристики и количественное распределение Тц плазмы крови у крыс при тромбинемии, индуцированной экзогенным путем. В эксперименте использовались 60 самцов неинбредных белых крыс. Животным из опытных групп дополнительно вводили перорально БАД в дозе 0,5 мл в течение 21 сут. Экзогенную тромбинемию вызывали внутривенным введением в яремную вену взвеси тромбина. Забирали кровь у животных для дальнейшего исследования морфологических особенностей, измерения среднего объема (MPV) и подсчета общего количества Тц через 0,5 ч и 1 ч. Полученные нами данные свидетельствовали о позитивном влиянии дополнительного введения МЧТ на гемостаз, что проявилось в ограничении активации Тц и степени тромбоцитопении потребления в условиях экзогенной тромбинемии.

Ключевые слова: тромбоциты, активные формы кислорода, окислительный стресс, перекисное окисление липидов, черный тмин, масло черного тмина, Nigella sativa.

EFFECT OF BLACK CUMIN OIL ON THE MORPHOFUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF PLATELETS IN EXOGENOUS THROMBINEMIA

H.M. Alkhasova[1,2], V.G. Solov’yov[2], O.V. Chernichuk[1]
[1]Occupational Pathology Center, Khanty-Mansiysk, Russia
[2]Khanty-Mansiysk State Medical Academy, Khanty-Mansiysk, Russia

Annotation. Lipid peroxidation of platelet (PLT) cell membranes leads to changes in the processes of stationary cell functioning, activation of membrane phospholipases, formation of matrices to trigger a cascade of enzymatic reactions of hemostasis. The first and visible sign of PLT activation is a change in their shape. The purpose of our work was to study the dietary supplement “Ethiopian black cumin oil” on morphofunctional characteristics and quantitative distribution of blood plasma PLT in rats with exogenously induced thrombinemia. In the experiment, 60 males of non-imbred white rats were used. Animals from the experimental groups were additionally administered dietary supplements at a dose of 0.5 ml for 21 days. Exogenous thrombinemia was caused by intravenous injection of a thrombin suspension into the jugular vein. Blood was taken from animals for further investigation of morphological features, measurement of the mean platelet volume (MPV) and calculation of the total number of PLT after 0.5 hours and 1 hour. The data obtained shows the positive effect of the additional administration of the supplement on hemostasis, which was manifested in the restriction of PLT activation and the degree of consumption thrombocytopenia in conditions of exogenous thrombinemia.

Keywords: platelets, reactive oxygen species, oxidative stress, lipid peroxidation, black cumin, black cumin oil, Nigella sativa.

Введение. Тромбоциты (Тц) являются наименьшими по размеру безъядерными форменными элементами крови, возникающими в результате цитоплазматической фрагментации мегакариоцитов в костном мозге и имеющими типичный диаметр ~2-3 мкм. Средняя продолжительность жизни – 9-12 дней. Тромбоциты выполняют такие важнейшие функции in vivo, как ангиотрофическую, репаративную, вазоконстрикторную, адгезивно-агрегационную, регулирование местной воспалительной реакции и иммунитета, катализ реакций биохимического компонента свертывания с образованием фибринового сгустка и т.д. Уникальная морфоструктура Тц, состоящая из микротрубочек, гранул, канальцевых систем и других органелл, влияет на их морфофункциональное состояние. Так, в состоянии покоя подавляющее большинство Тц представляют собой в фас дискообразную, а в профиль – эллипсоидную клетку с гладкой цитоплазматической мембраной, напоминающую форму чечевицы. Первым и видимым проявлением активации Тц является изменение их формы. При индуцировании гемостатических реакций происходит биохимическая и ультраструктурная перестройка кровяных пластинок и их переход из неактивированных форм в активированные. На этой стадии дискоциты принимают сферический или блинообразный вид, что связано с их распластыванием на субстрате и изменением общего объема. Находясь на ранней стадии активации, Тц могут обратимо менять свою форму, становясь снова дискоцитами. Следующими этапами активации являются адгезия, реакция высвобождения и появление псевдоподий (отростков), что опосредовано внутриклеточной системой сократительных микрофиламентов. Последние изменения в морфоструктуре Тц приводят к необратимым процессам и образованию первичных внутрисосудистых агрегатов [1-3].

Важная роль в активации системы гемостаза отводится окислительному стрессу, приводящему к активации перекисного окисления липидов (ПОЛ) и модификации полиненасыщенных жирных кислот клеточных мембран. Тц являются как источником, так и мишенью активных форм кислорода (АФК). Образующиеся при активации ПОЛ продукты являются мощными окислителями, более активными, чем кислород. Они представляют угрозу клеточной целостности и играют важную роль в клеточном повреждении. Липопероксидация клеточных мембран Тц приводит к изменению процессов стационарного функционирования клеток, активации мембранных фосфолипаз, формированию матриц для запуска каскада ферментативных реакций гемостаза [4]. При экзогенной активации тромбоцитов запускаются сигнальные пути, приводящие к эндогенной продукции АФК как оксидазами NAPDH (NOX), так и митохондриями [5-6]. В свою очередь, тромбоциты, активированные окислительным стрессом, также могут являться источником АФК, которые дополнительно способствуют усилению окислительного стресса. Этот процесс порождает порочный круг, способный воздействовать на другие типы клеток, способствуя в конечном итоге прогрессированию заболеваний и развитию осложнений, приводя к тромбоэмболическим состояниям [7]. Следовательно, посредством управления процессами липопероксидации, а именно обогащением нашего ежедневного рациона дополнительными источниками антиоксидантов, можно корректировать тромбоцитарную активность.

Учитывая вышеизложенные факты, целью нашей работы явилось изучение влияния биологически активной добавки «Масло черного тмина “Эфиопское”» на морфофункциональные характеристики и количественное распределение тромбоцитов плазмы крови у крыс при тромбинемии, индуцированной экзогенным путем.

Методы и организация исследования. Для эксперимента использовались 60 самцов неинбредных белых крыс массой 250-300 г. Животные содержались на смешанном сбалансированном рационе с

оптимальным соотношением белков, липидов и углеводов. Животные были разделены на 5 групп по 12 особей: интактная; 1-я контрольная – не получавшая масло черного тмина (МЧТ), исследуемая через 0,5 ч после введения тромбина; 2-я контрольная – не получавшая МЧТ, исследуемая через 1 ч после введения тромбина; 1-я опытная – получавшая МЧТ, исследуемая через 0,5 ч после введения тромбина; 2-я опытная – получавшая МЧТ, исследуемая через 1 ч после введения тромбина. Животным из опытных групп вводили перорально БАД «Масло черного тмина "Эфиопское"» (ISAR.CO, г. Каир) в дозе 0,5 мл на ежедневной основе в течение 21 сут. в соответствии с инструкцией по применению. Дозы изучаемой субстанции для животных были адекватными рекомендуемым дозам для человека, не вызывающими токсических эффектов. Содержание животных в виварии и проведение экспериментов соответствовали принципам Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 1986).

Экзогенную тромбинемию вызывали внутривенным введением в яремную вену взвеси тромбина (1,67 NIH на 100 г массы тела) в физиологическом растворе хлорида натрия, не вызывающей гибель животных. Болезненные манипуляции проводили, подвергая животных наркозу диэтиловым эфиром. Яремные вены обнажали овальным разрезом. В одну из яремных вен вводили инъекцию, забор крови осуществляли из симметричной яремной вены (через 0,5 и 1 ч после инъекции в зависимости от группы животных). Кровь для исследования морфологических особенностей тромбоцитов стабилизировали 0,1%-м забуференным раствором глутаральдегида, а для подсчета количества Тц и измерения MPV (средний объем тромбоцита) на автоматическом анализаторе кровь отдельно отбиралась в вакуумную пробирку с наполнителем К3-ЭДТА. Содержание дискоцитов и активированных форм тромбоцитов (в абсолютных и относительных значениях) выявляли с помощью прямой микроскопии в камере Горяева [8]. Автоматический подсчет общего количества тромбоцитов и средний объем тромбоцита вычисляли на анализаторе Beckman coulter DxH 500. Результаты исследования, имеющие цифровое выражение, анализировали методом вариационной статистики для малых рядов наблюдений с использованием программы Microsoft Excel. Для оценки достоверности отличий вычисляли доверительный коэффициент Стьюдента (t) и степень вероятности (p). Нормальность распределения проверялась с помощью критерия Шапиро-Уилка. Различия считали статистически значимыми при $p<0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. В ходе проведенной экспериментальной работы нами было выявлено, что тромбинемия через 0,5 ч вызвала уменьшение на 54% содержания общего количества тромбоцитов, что свидетельствовало о существенной активации клеточного звена гемостаза и тромбоцитопении потребления (1-я контрольная группа; табл. 1).

Обнаружилось, что относительное количество активированных Тц выросло на 10%, а абсолютное и относительное содержание дискоцитов было снижено. Значение MPV у самцов контрольной группы после введения тромбина выросло на 40%, что свидетельствовало об изменении объема Тц.

Через 1 ч после введения тромбина (2-я контрольная группа) сохранялась высокая степень тромбоцитопении, повышенное относительное содержание активированных форм Тц и MPV на фоне низкого количества дискоцитов (табл. 2).

Таблица 1

Морфофункциональная и количественная характеристика тромбоцитов у крыс, получавших и не получавших масло черного тмина, через 0,5 ч после введения взвеси тромбина (по 12 крыс в группе), M±m

Показатель	Интактная группа	1-я контрольная группа (без МЧТ)	1-я опытная группа (с МЧТ)
PLT, 10^9/л	1220±38	559±13*	629±37*^{0}
Дискоциты, 10^9/л	1042±23	421±11*	491±21*^{0}
Дискоциты, %	85±1,2	75±0,1	78±0,3*^{0}
АФ, 10^9/л	178±15	138±33*	138±21^{*0}
АФ, %	15±1,2	25±0,4	22±0,5*^{0}
MPV, fl	5,7±0,07	7,99±0,17*	7,19±0,07^{*0}

Примечание (к этой и последующей таблице): МЧТ – масло черного тмина; PLT – содержание тромбоцитов; АФ – активированные формы тромбоцитов; MPV – средний объем тромбоцита. Установлены статистически значимые отличия ($p<0,05$): * – от показателей интактной группы; ^{0} – от показателей 1-й контрольной группы

Таблица 2

Морфофункциональная и количественная характеристика тромбоцитов у крыс, получавших и не получавших масло черного тмина, через 1 ч после введения взвеси тромбина (по 12 крыс в группе), M±m

Показатель	Интактная группа	2-я контрольная группа (без МЧТ)	2-я опытная группа (с МЧТ)
PLT, 10^9/л	1220±38	577±9*	703±21*^{0}
Дискоциты, 10^9/л	1042±23	436±12*	568±22*^{0}
Дискоциты, %	85±1,2	76±1,1*	81±0,5*^{0}
АФ, $\times10^9$/л	178±15	141±21*	135±16
АФ, %	14±1,2	24±1,2*	19±1,6*^{0}
MPV, fl	5,7±0,07	7,45±0,04*	6,49±0,16^{*0}

Реакция на введение тромбина животным, получавшим МЧТ, выглядела иначе. Через 0,5 ч в 1-ой опытной группе также наблюдалась тромбоцитопения потребления, но степень ее была меньшей, чем в контроле (1-я контрольная группа, см. табл. 1). Содержание тромбоцитов снизилось лишь на 48%, меньше оказались прирост относительного содержания активированных форм и падение уровня дискоцитов. MPV увеличился на 26%, что очевидно меньше, чем в 1 контрольной группе.

Через 1 ч у крыс, получавших МЧТ (2-я опытная группа, табл. 2), обнаружились более интенсивные темпы возвращения показателей к исходным значениям по сравнению с контролем (2-я контрольная группа), выражающиеся как в количественных, так и в качественных показателях.

Приведенные данные свидетельствуют о позитивном влиянии дополнительного введения МЧТ на гемостаз, что проявилось в ограничении активации тромбоцитов и степени тромбоцитопении потребления в условиях экзогенной тромбинемии. Причина такого влияния может заключаться в уникальном фитохимическом составе масла черного тмина. *Nigella sativa* (черный тмин, чернушка посевная) – однолетнее травянистое растение, относящееся к семейству *Ranunculaceae* (лютиковых), имеют насыщенный вкус и запах, применяются в традиционной кулинарии восточных стран как в качестве приправы, так и в народной медицине. Показано, что семена содержат

5,02% влаги, 21,07% белка, 39,02% жира, 3,02% золы, 6,01% клетчатки и 25,86% углеводов. Черный тмин содержит нелетучие (флавоноиды, фенолокислоты, дубильные вещества) и летучие (в т.ч. терпеновые) соединения. В семенах черного тмина были выделены и идентифицированы различные алкалоиды: нигеллицин, содержащий ядро индазола, нигеллимин, имеющий молекулу изохинолина, а также N-оксид нигеллимина и, наконец, нигеллидин, представляющий собой молекулу индазольной природы. Соотношение ненасыщенных и насыщенных жирных кислот составляет 85,16% и 15,02% соответственно. В составе МЧТ обнаружены следующие минералы: кальций, калий, фосфор, магний, натрий, железо, цинк, медь и витамины: тиамин, ниацин, фолиевую кислоту, ретинолы, токоферолы и др. [9-10]. Учитывая состав Nigella sativa, можно с уверенностью говорить о том, что МЧТ обладает антиоксидантными свойствами благодаря наличию в своем составе полифенольных и терпеновых соединений, а также токоферолов и ретинолов. Многие исследования показывают сильную и положительную взаимосвязь между содержанием фенольных и терпеновых соединений и антиоксидантным потенциалом некоторых видов растений, а также фруктов и овощей. Антиоксидантная активность терпеновых и фенольных соединений объясняется способностью поглощать свободные радикалы, отдавать атомы водорода, электроны или хелатные катионы металлов [11].

Заключение. Благодаря фитохимическому составу, *Nigella sativa* является совокупным природным антиоксидантом, богатым полифенолами, терпеновыми соединениями, дубильными веществами, витаминами и минералами. Полученные в ходе эксперимента данные показали положительное влияние перорального применения МЧТ в условиях спровоцированного гиперкоагуляционного стресса. Данные научной литературы показывают, что как при активации гемостаза усиливаются процессы ПОЛ, так и активация ПОЛ может привести к ускорению тромбиногенеза. Указанные процессы являются взаимопотенцирующими по типу «тромбинемия → активация липопероксидации → активация тромбинемии → …» или «активация липопероксидации → активация тромбинемии → активация липопероксидации → …» [9]. Учитывая тесную взаимосвязь ПОЛ и гемостаза, мы считаем перспективным изучение возможностей использования МЧТ или его компонентов как средств неспецифической профилактики в условия активации тромбиногенеза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Christoph, R. Platelet morphology / R. Christoph // Journal of Laboratory Medicine. – 2020. – Vol. 44. – Issue 5. – pp. 231-239. DOI: doi.org/10.1515/labmed-2020-0007.
2. Шиффман Фред Дж. Патофизиология крови / Дж. Фред Шиффман. – М.: Бином, 2020. – 432 с.
3. Макаров, М. С. Особенности морфофункционального статуса тромбоцитов человека в норме и патологии: дисс. ... канд. биол. наук / Максим Сергеевич Макаров. – Москва, 2014. – 127 с.
4. Коррекция функционального состояния тромбоцитов при эндотоксикозе / Власов А. П., Анаскин С. Г., Шевалаев Г. А. [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 3-1. – С. 37-40.
5. Violi, F. Platelet NOX, a novel target for antithrombotic treatment / F. Violi, P. Pignatelli, // Thromb. Haemost. – 2014. – № 111. – pp. 817-823.
6. Fuentes, E. Regulation of mitochondrial function as a promising target in platelet activation-related diseases / E. Fuentes, R. Araya-Maturana; F. A. Urra // Free Radic. Biol. Med. – 2019. – № 136. – pp. 172-182.
7. ROS in Platelet Biology: Functional Aspects and Methodological Insights / Masselli E., Pozzi G., Vaccarezza M. [et al] // Int J Mol Sci. – Jul 9, 2020. – № 21(14). – P. 4866. DOI: 10.3390/ijms21144866. PMID: 32660144; PMCID: PMC7402354.
8. Шитикова, А. С. Тромбоцитарный гемостаз / А. С. Шитикова. – СПб.: Изд-во СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, 2000. – 222 с.

9. Влияние масла черного тмина на различные звенья гемостаза крыс в условиях экзогенной тромбинемии / Алхасова Х. М., Зиновьева А. В., Никулина Е. Г. [и др.] // Журн. мед.-биол. исследований. – 2022. – Т. 10. – № 3. – С. 263-273. DOI: 10.37482/2687-1491-Z113.

10.Nutritional Composition and Volatile Compounds of Black Cumin (Nigella sativa L.) Seed, Fatty Acid Composition and Tocopherols, Polyphenols, and Antioxidant Activity of Its Essential Oil / Albakry Z., Karrar E., Ahmed I. A. M. [et al] // Horticulturae. – 2022. – № 8. – P. 575. DOI: https://doi.org/10.3390/horticulturae8070575

11.Phenolic Compounds: Functional Properties, Impact of Processing and Bioavailability / Minatel I. O., Borges C. V., Ferreira M. I. [et al] // Phenolic Compounds – Biological Activity. – London, United Kingdom, 2017. URL: https://www.intechopen.com/chapters/53128 (дата обращения: 13.05.2023).

REFERENCES

1. Christoph R. Platelet morphology. *Journal of Laboratory Medicine*, 2020, vol. 44, issue 5, pp. 231-239. DOI: doi.org/10.1515/labmed-2020-0007.

2. Shiffman Fred J. Hematologic Pathophysiology. Translation from English. Moscow: Binom, 2020. 432 p. (in Russ.)

3. Makarov M.S. Features of the morphofunctional status of human platelets in normal state and pathology: an author's dissertation. Moscow, 2014. 127 p. (in Russ.)

4. Vlasov A.P., Anaskin S.G., Shevalaev G.A., Zelentsov P.V., Suvorova L.A., Satybaldin O.A. Correction of thrombocytes functional conditions at endogenic intoxication. *Fundamental research*, 2013. № 3-1. pp. 37-40. (in Russ.)

5. Violi F., Pignatelli P. Platelet NOX is a new target for antithrombotic treatment. A blood clot. *Hemostasis*, 2014, no. 111, pp. 817-823. (in Russ.)

6. Fuentes E., Araya-Maturana R., Urra F.A. Regulation of mitochondrial function as a promising target in diseases associated with platelet activation. *Free Radic. Biol. Med*, 2019, no. 136, pp. 172-182.

7. Masselli E., Pozzi G., Vaccarezza M., Mirandola P., Galli D., Vitale M., Karubbi S., Gobbi G. AFC in platelet biology: functional aspects and methodological ideas. *Int J Mol Sci*, July 9, 2020, no. 21(14), p. 4866. DOI: 10.3390/ijms21144866. PMID: 32660144, PMCID: PMC7402354.

8. Shitikova A.S. Platelet hemostasis. St. Petersburg: Publishing House of Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, 2000. 222 p. (in Russ.)

9. Alkhasova H.M., Zinov'eva A.V., Nikulina E.G., Kalashnikova S.P., Gagaro M.A., Solov'ev V.G. Effect of black cumin oil on various components of haemostasis in rats with exogenous thrombinemia. *Journal of Medical and Biological Research*, 2022, vol. 10, no. 3, pp. 263-273. DOI: 10.37482/2687-1491-Z113. (in Russ.)

10. Albakri Z., Karrar E., Ahmed I.A.M., Oz E., Proestos S., El Sheikha A.F., Oz F., Wu G., Wang, H. Nutritional composition and volatile compounds of black cumin seeds (Nigella sativa L.), composition of fatty acids and Tocopherols, polyphenols and antioxidant activity of its essential oil. *Gardening*, 2022, no. 8, p. 575. DOI: https://doi.org/10.3390/horticulturae8070575.

11. Minatel I.O., Borges S.V., Ferreira M.I., Gomez H.A.G., Lima K.O.S., Lima P.P. "Phenolic compounds: functional properties, treatment effect and bioavailability", in the section "Phenolic compounds - biological activity". London, UK, 2017. Available at: https://www.intechopen.com/chapters/53128 (accessed 13.05.2023)

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Ханна Майисовна Алхасова – биолог Центра лабораторной диагностики, АУ ХМАО-Югры «Центр Профессиональной Патологии»; аспирант, БУ ВО ХМАО-Югры «Ханты-Мансийская государственная медицинская академия» Ханты-Мансийск, e-mail: gulerkhalum@mail.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0001-6108-6846.

Владимир Георгиевич Соловьев – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой медицинской и биологической химии, БУ ВО ХМАО-Югры «Ханты-Мансийская государственная медицинская академия», Ханты-Мансийск, e-mail: vg_solovev@mail.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0003-4870-2282.

Ольга Владимировна Черничук – заведующая Центром лабораторной диагностики, АУ ХМАО-Югры «Центр Профессиональной Патологии», Ханты-Мансийск, e-mail: chernichukov@cpphmao.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0002-5660-1230.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS:
Hanna Mayisovna Alkhasova – Biologist of the Laboratory Diagnostics Center, Occupational Pathology Center; Post-Graduate Student, Khanty-Mansiysk State Medical Academy, Khanty-Mansiysk, e-mail: gulerkhalum@mail.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0001-6108-6846.
Vladimir Georgievich Solov'yov – Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Medical and Biological Chemistry, Khanty-Mansiysk State Medical Academy, Khanty-Mansiysk, e-mail: vg_solovev@mail.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0003-4870-2282.
Ol'ga Vladimirovna Chernichuk – Head of the Laboratory Diagnostics Center, Occupational Pathology Center, Khanty-Mansiysk, e-mail: chernichukov@cpphmao.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0002-5660-1230.

Для цитирования: Влияние масла черного тмина на морфофункциональную характеристику тромбоцитов при экзогенной тромбинемии / Х. М. Алхасова, В. Г. Соловьев, О. В. Черничук // Современные вопросы биомедицины. – 2023. – Т. 7. – № 2. DOI: 10.24412/2588-0500-2023_07_02_1

For citation: Alkhasova H.M., Solov'yov V.G., Chernichuk O.V. Effect of black cumin oil on the morphofunctional characteristics of platelets in exogenous thrombinemia. *Modern Issues of Biomedicine*, 2023, vol. 7, no. 2. DOI: 10.24412/2588-0500-2023_07_02_1