

# Trombotsüütide agregatsiooni inhibeerimine B<sub>6</sub>-vitamiini vitameeridega *in vitro* koronaarhaigetel

Vilja Mardla<sup>1</sup>, Indrek Rätsep<sup>2</sup>,  
Gennadi Kobzar<sup>1</sup>, Merli Špitsmeister<sup>1</sup>,  
Nigulas Samel<sup>1</sup> – <sup>1</sup>TTÜ keemiainstituut,  
<sup>2</sup>Põhja-Eesti Regionaalhaigla

**Võtmesõnad:** trombotsüütide agregatsioon, püridoksiin, püridoksamiin, püridoksaal, püridoksaalfosfaat

**B<sub>6</sub>-vitamiin inhibeerib trombotsüütide agregatsiooni ja samal ajal kaitseb ka veresoone endoteelirakke kahjustuste eest. Töös uuriti B<sub>6</sub>-vitamiini vitameeride püridoksiini (PN), püridoksamiini (PM), püridoksaali (PL) ja püridoksaalfosfaadi (PLP) toimeid trombotsüütide agregatsioonile koronaarhaigetel võrdlevalt nii optilise kui ka impedantsmeetodiga *in vitro*. Mõlema meetodi puhul ei erinenud B<sub>6</sub>-vitamiini vitameeride IC<sub>50</sub> väärtused märkimisväärselt. Kuna erinevad B<sub>6</sub>-vitamiini vitameerid esinevad vereplasmas korruga, uuriti ka nende koostoimet. Eraldi võetuna inhibeerivad nad trombotsüütide agregatsiooni millimolaarsetes kontsentratsioonides, kombinatsioonides on nad tõhusad juba mikromolaarsetes kontsentratsioonides. Selline tulemus viitab B<sub>6</sub>-vitamiini vitameeride võimalikule rollile aterotromboosi kujunemisel.**

B<sub>6</sub>-vitamiiniks nimetatakse kuut lähedast ühendit: püridoksaali, püridoksiini, püridoksamiini ja vastavaid 5'-fosfaate. B<sub>6</sub>-vitamiin pole normaalse tarbimise juures toksiline.

On leitud, et B<sub>6</sub>-vitamiin PLP-vormis inhibeerib trombotsüütide agregatsiooni (1, 2). Varasemates uuringutes leidsime, et ka PN inhibeerib trombotsüütide agregatsiooni tervete vabatahtlike vereliistakuterikkas plasmas (PRP) ja pestud vereliistakute suspensioonis (WP) (3). PN IC<sub>50</sub> väärtused ei erinenud oluliselt PRPs ja WPs ning see näitas, et vereplasma valgud ei seo püridoksiini. PLP seostub erinevalt PNist vereplasma valkudega, peamiselt albumiiniga (2).

B<sub>6</sub>-vitamiin ei mõjuta mitte ainult trombotsüüte, vaid kaitseb ka veresoone endoteelirakke kahjustuste eest (4). Nimelt suurendab B<sub>6</sub>-vitamiini vitameer PLP prostaglandiin I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) vabastamist endoteelirakkude poolt ja parandab nende rakkude eluvõimelisust. B<sub>6</sub>-vitamiini defitsiit (vereplasma PLP kontsentratsioon < 30 nmol/l) on tugevalt seotud koronaarhaiguse riskiga (5). Lisaks sellele on koronaarhaigetel, kellel on PLP tase < 30 nmol/l, tunduvalt kõrgem väikse tihedusega lipoproteiinide (LDL) ja homotsüsteiini tase veres. Kõrgenenud homotsüsteiini tase on koronaarhaiguse üheks riskiteguriks. Homotsüsteiin kahjustab veresoone endoteelirakke (6). B<sub>6</sub>-vitamiini, B<sub>12</sub>-vitamiini ja folaadi tarbimine alandavad homotsüsteiini taset veres, kuna need vitamiinid osalevad homotsüsteiini metabolismis tsüsteiiniks ja metioniiniks (7, 8).

B<sub>6</sub>-vitamiini vitameeride toimet koronaarhaigete trombotsüütidele on senini vähe uuritud. Koronaarhaigete trombotsüütidel esineb funktsioneerimise häireid, sest tugev ateroskleroos koronaararterites mõjutab vereliistakute tundlikkust antiagregatiiv-

sete ainete suhtes. Varasemates uuringutes leidsime, et koronaarhaigete vereliistakud on ligikaudu kaks korda vähem tundlikud antiagregatiivsete prostaglandiinide PGE<sub>1</sub>, 13,14-dihüdro-PGE<sub>1</sub> ja 5,6-dihüdro-PGE<sub>3</sub> suhtes (9). Need prostaglandiinid toimivad PGI<sub>2</sub> retseptori kaudu ja tundlikkuse vähenemine võis olla tingitud trombotsüütide PGI<sub>2</sub> retseptorite desensitatsioonist. Peale endogeensete prostaglandiinide esinevad veres ka teised antiagregatiivsed ained, sealhulgas ka B<sub>6</sub>-vitamiini vitameerid. Oluline on uurida korraka kõiki B<sub>6</sub>-vitamiini vitameere, kuna nad võivad metabolismi käigus esineda ühel ajal erinevates vormides ja anda omavahelisi koostoimeid. Töös kasutasime võrdlevalt kahte erinevat meetodit – optilist ja impedantsmeetodit –, et hinnata trombotsüütide tundlikkust B<sub>6</sub>-vitamiini vitameeride suhtes koronaarhaigetel.

## MATERJALID JA MEETODID

### 1. PATSIENDID

Patsientide kliinilised andmed on antud tabelis 1. Veri koguti patsientide kägiveenist vahetult enne aortokoronaarse šunteerimise operatsiooni. Uuringu oli olemas kohaliku eetikakomitee luba ja patsientide nõusolek. Koronaarhaigetel oli vähemalt üks peamine koronaararter rohkem kui 75% ulatuses ahenenud, nagu näitas koronaarangiograafia (vt tabel 1). Uuritavad patsiendid polnud enne operatsiooni tarbinud aspiriini.

### 2. TROMBOTSÜÜTIDE ERALDAMINE

Veeniveri koguti 3,8% -lisse naatriumtsitraati. Trombotsüüdirikas plasma (PRP) saadi tsentrifuugides tsitraatverd 160 x g 10 min toatemperatuuril. Trombotsüüte loendati Swelab'i rakuloenduriga kuni 250 x 10<sup>9</sup>/l rakuni.

### 3. OPTILINE AGREGATSIOONIMEETOD

Agregatsiooni mõõdeti Chrono-log'i agregomeetriga. Trombotsüütide agregatsiooni ulatust hinnati, mõõtes valguse läbitavust PRPs. Maksimaalse agregatsiooni puhul moodustasid trombotsüüdid suuri agregate

ja vereplasma muutus läbipaistvaks. Agregomeetri küvett sisaldas 0,25 ml PRPd, mida hoiti 37 °C juures ja segati teflonkattega segajaga. Agregatsiooni indutseeriti ADPga, mida lisati trombotsüütidele kontsentratsioonis, et indutseerida submaksimaalset agregatsiooni. ADP kontsentratsioon varieerus 2 kuni 10 μM erinevates PRP-proovides. Submaksimaalne agregatsiooni amplituud võeti 100 protsendiks. B<sub>6</sub>-vitamiini vitameerid lisati 1 minut enne ADPd ja leiti vastavad IC<sub>50</sub> väärtused. Andmed esitati aritmeetilise keskmise ja standardveaga (SEM). Statistilised erinevused arvatuti t-testiga.

### 4. IMPEDANTSMEETOD

Swelab'i rakuloenduriga määrati trombotsüütide arv PRPs. Trombotsüütide agregeerumist hinnati pingepulsside mõõtmise teel. Impulsi amplituud on seotud trombotsüütide suurusega, impulsside arv on samaväärne trombotsüütide arvuga, mis läbivad anduri pilu lugemisperoodi jooksul. Trombotsüütide agregaadid ei läbi anduri pilu. Seega saab mitteagregeerunud trombotsüütide arvu järgi hinnata agregatsiooni ulatust. Kõigepealt mõõdeti trombotsüütide arv PRPs, kuhu polnud lisatud ADPd ja B<sub>6</sub>-vitamiini vitameere. Seejärel lisati PRP-le submaksimaalses kontsentratsioonis ADPd ja mõõdeti trombotsüütide arv. B<sub>6</sub>-vitamiini vitameere lisati erinevates kontsentratsioonides enne ADPd ja mõõdeti trombotsüütide arv. Statistiline analüüs tehti sarnaselt eespool mainitud meetodiga.

### 5. KASUTATUD REAGENDID

Reagendid ADP, PN, PLP, PM ja PL on pärit firmalt Sigma Chemical CO (St. Lois, MO, USA). ADP, PN, PL ja PM olid lahustatud 0,9% NaCl-s. PLP oli lahustatud 1M NaHCO<sub>3</sub> lahuses. Lahuste kontrollid tehti iga eksperimendi korral ning need lahused ei mõjutanud trombotsüütide agregatsiooni.

### TULEMUSED

Uuriti B<sub>6</sub>-vitamiini vitameeride mõju trombotsüütide agregatsioonile. Trombotsüütide

Tabel 1. Koronaarhaigete kliinilised andmed

Vanus	Sugu M/N	Veregrupp	Infarktide arv	Angiograafia (%) 1 veresoone 2 veresoont 3 veresoont	INR	PLT x 10 <sup>9</sup> /l
72	M	A	-	100 90 50	0,95	185
75	M	A	-	90 75 100	1,1	276
66	M	AB	1	75 50 50	0,98	234
52	M	O	-	90 50 90	1,28	196
68	N	AB	-	95 75 75	1,04	230
80	N	B	1	90 75 95	1,26	257
59	M	A	-	75 90 100	1,07	215
66	M	O	-	100 90 100	0,92	195
75	N	B	1	75 90 100	0,96	224
69	M	A	-	100 75 91	1,23	159
74	N	B	-	90 100 100	0,95	230
63	M	B	-	100 75 90	1,0	229
68 ± 2,2	8M 4N	4 A 2 AB 2 O 4 B	3	90 ± 2,9 78 ± 4,5 87 ± 5,4	1,06 ± 0,04	219 ± 9,2

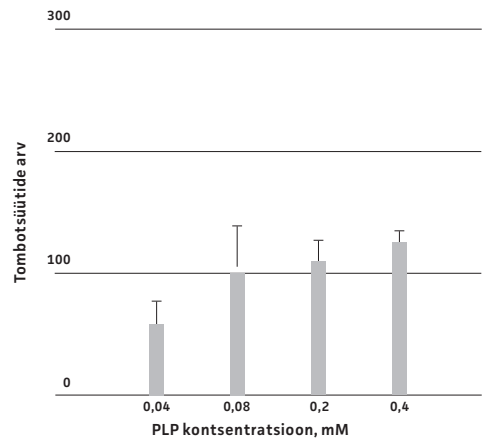
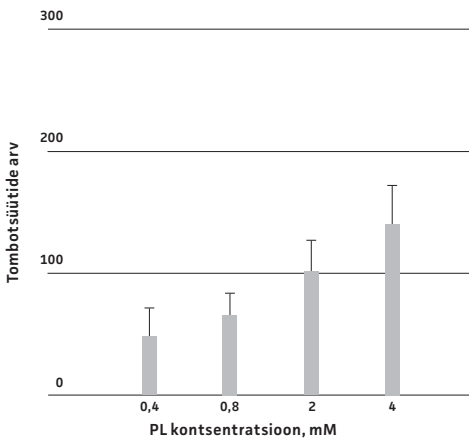
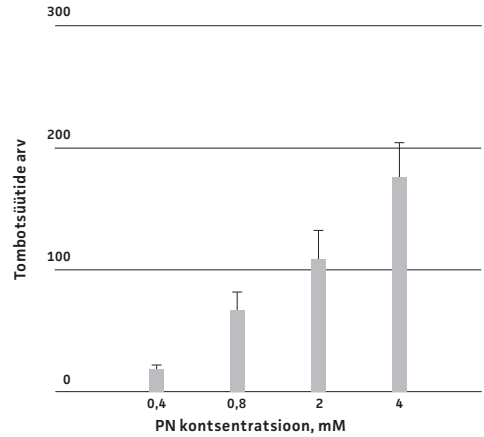
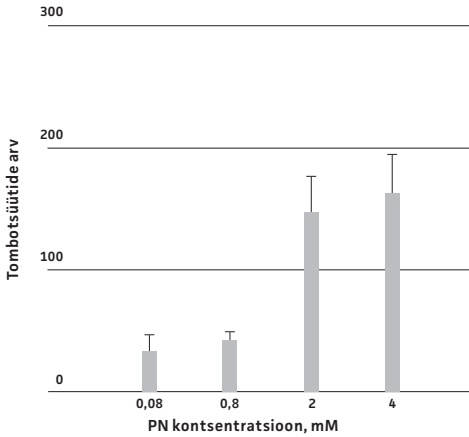
Andmed on antud aritmeetilise keskmise ± standardveaga (SEM) või absoluutarvuna. PLT – trombotsüütide arv. INR – rahvusvaheline indeks, mis iseloomustab verekoagulatsiooniteste tulemusi.

agregatsioon kutsuti esile ADPga. Töö üheks eesmärgiks oli kahe erineva agregatsiooni hindamiseks kasutatava meetodi, impedantsi ja optilise, võrdlemine. Selleks korraldati paralleelkatsed esimese kuue patsiendi PRPga (vt tabel 2; patsiendid 1–6) kahe aparaadiga. Impedantsmeetodi puhul leiti trombotsüütide arv pärast ADPst indutseeritud agregatsiooni inhibeerimist PN, PL, PM ja PLPga (vt jn 1, 2). Optilise meetodi puhul mõõdeti PN, PL, PM ja PLP inhibeerivat toimet ADPst indutseeritud trombotsüütide agregatsioonile (vt jn 3, 4).

Trombotsüütide arvu ja B<sub>6</sub>-vitamiini vitameeride kontsentratsioonide vahel esines lineaarne sõltuvus (vt jn 1, 2). Trombot-

süütide ADPst indutseeritud agregatsiooni inhibitsioon PN, PL, PM ja PLP puhul sõltus samuti kontsentratsioonist (vt jn 3, 4). PN inhibeeris trombotsüütide agregatsiooni märgatavalt ≥ 0,8 mM kontsentratsiooni korral, PL teatud määral juba 0,4 mM kontsentratsiooni korral (vt jn 3). Kõige tõhusamaks trombotsüütide agregatsiooni inhibiitoriks osutus PLP, mis vähendas agregatsiooni üle 20% juba 0,04 mM kontsentratsiooni korral (vt jn 4). PM oli nõrgema toimega kui PLP ja ilmutas inhibeerivat efekti > 0,4 mM kontsentratsiooni korral.

Arvutati B<sub>6</sub>-vitamiini vitameeride vastavad IC<sub>50</sub> väärtused (vt tabel 2) optilise ja impedantsmeetodiga. Kõige tugevam trom-



**Joonis 1.** Trombotsüütide arv (x 10<sup>9</sup>/l) pärast ADPst indutseeritud agregatsiooni inhibeerimist PNi ja PLiga 6 patsiendi PRPs.

**Joonis 2.** Trombotsüütide arv (x 10<sup>9</sup>/l) pärast ADPst indutseeritud agregatsiooni inhibeerimist PMi ja PLPga 6 patsiendi PRPs.

botsüütide agregatsiooni inhibiitor koronaarhaigete PRPs oli PLP ja kõige nõrgem PM. Vitameeride IC<sub>50</sub> väärtused ei erinevad märkimisväärselt optilise ja impedants-

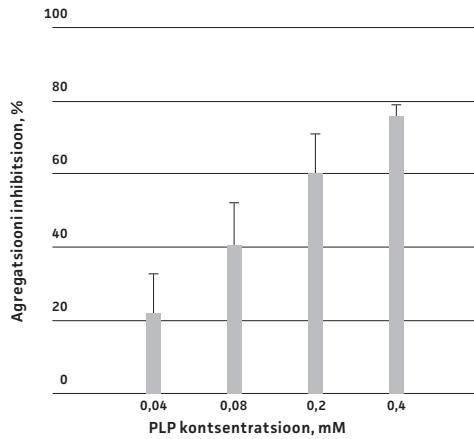
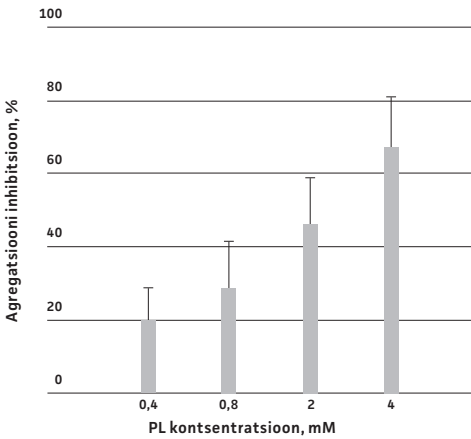
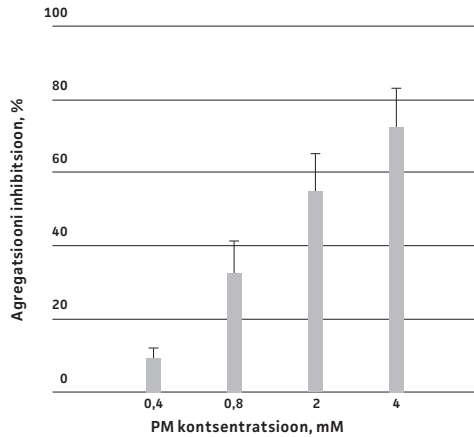
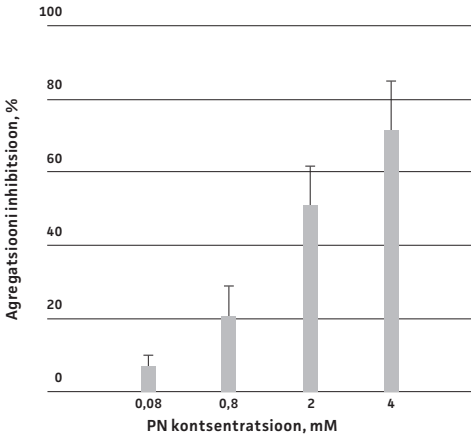
meetodi korral. Tulemustest selgus, et nende meetodite tundlikkus on väga sarnane, mistõttu on saadud tulemused omavahel võrreldavad (vt tabel 2).

**Tabel 2.** Optilise ja impedantsmeetodi tundlikkuse võrdlus

Be-vitamiini vitameer	IC <sub>50</sub> , mM	
	Optiline meetod	Impedantsmeetod
PN	1,5 ± 0,2	1,7 ± 0,3
PL	1,3 ± 0,3	1,3 ± 0,3
PM	1,6 ± 0,4	1,9 ± 0,3
PLP	0,14 ± 0,04	0,22 ± 0,07

PN, PL, PM ja PLP olid koronaarhaigetel *in vitro* eraldi võetuna suhteliselt nõrgad antiagregandid (vt tabel 2). Seetõttu uurisime neid vitameere ka koostoimes kuue patsiendi PRPs (vt tabel 1; patsiendid 7–12), et leida võimalikult efektiivseid kombinatsioone. Kõige silmapaistvama efekti andsid koostoimes PL ja PLP, mis koos lisatuna inhibeerisid trombotsüütide agregatsiooni mikromolaarsete kontsentratsioonide korral, samas kui eraldi võetuna nad nii väikes- te kontsentratsioonide korral toimet ei aval-

IC<sub>50</sub> on Be-vitamiini vitameeri kontsentratsioon, mis inhibeerib 50%-liselt ADPst indutseeritud trombotsüütide agregatsiooni. Andmed on antud aritmeetilise keskmise ja standardveaga kuue patsiendi PRPs. Statistilised erinevused on arvatud t-testiga paariseksperimentide jaoks. p > 0,05.



**Joonis 3.** Trombotsüütide ADPst indutseeritud agregatsiooni inhibeerimine PNi ja PLiga 6 patsiendi PRPs.

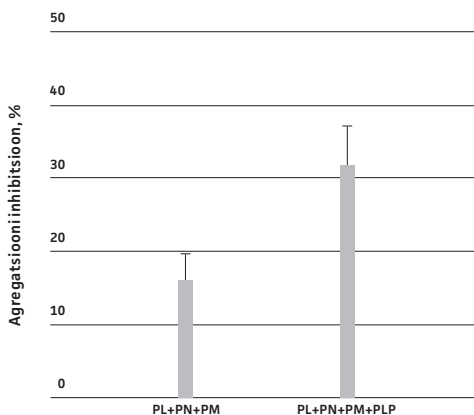
**Joonis 4.** Trombotsüütide ADPst indutseeritud agregatsiooni inhibeerimine PMi ja PLPga 6 patsiendi PRPs.

danud. B<sub>6</sub>-vitamiini vitameeride kolme- ja neljakaupa kombinatsioonid olid veel efektiivsemad (vt jn 5). Koostoimeefekte andsid nad väikeste kontsentratsioonide korral, eraldi võetuna nad nendes kontsentratsioonides trombotsüütidele toimet ei avaldanud. Seega annavad PN, PL, PLP ja PLP sünergilisi efekte koronaarhaigete PRPs.

**ARUTELU**

B<sub>6</sub>-vitamiini vitameerid PN, PLP, PM ja PL inhibeerisid trombotsüütide ADPst indutseeritud agregatsiooni koronaarhaigetel *in vitro* (vt jn 1–4). Nende IC<sub>50</sub> väärtused ei erinenud oluliselt optilise ja impedantsmeetodi võrdlemisel (vt tabel 2). B<sub>6</sub>-vitamiini

vitameerid eraldi võetuna olid suhteliselt nõrgad antiagregandid. Kõige tugevam antiagregant oli nendest PLP, mis toimis mikromolaarses kontsentratsioonis. Teised vitameerid PL, PM ja PN inhibeerisid agregatsiooni PLPst suurematel (millimolaarsetel) kontsentratsioonidel, mis seab kahtluse alla vitameeride *in vivo* antiagregatiivse efekti. Meie töö näitab, et peale PLP ja PN on trombotsüütide agregatsiooni inhibeerimise seisukohalt olulised ka PM ja PL. Kuna B<sub>6</sub>-vitamiini vitameerid annavad omavahel koostoimeefekte (vt jn 5) ka väikeste (mikromolaarsete) kontsentratsioonide korral, võib neil olla siiski füsioloogiline roll trombotsüütide agregatsioonis. Pärast



**Joonis 5.** Trombotsüütide ADPst indutseeritud agregatsiooni inhibeerimine koostaines PLi, PNi, PMi ja PLPga 6 patsiendi PRPs. Kõik vitameerid on lisatud kontsentratsioonis 4 µM.

B<sub>6</sub>-vitamiini manustamist suu kaudu võib tema kontsentratsioon veres suurenda mikromolaarse kontsentratsioonini (10). PN, PL, PM ja PLP annavad sünergilisi efekte kolme- ja neljakaupa (vt jn 5), mis võimaldab neid kasutada väikestes kontsentratsioonides.

B<sub>6</sub>-vitamiini vitameeride inhibitoorne efekt trombotsüütidele võib olla seotud erinevate toimemehhanismidega. Arvatakse, et PN ja PLP inhibitoorne efekt trombotsüütide agregatsioonile on seotud nende toimega fibrinogeeni retseptorile GPIIb/IIIa (11). Teisest küljest on B<sub>6</sub>-vitamiini vitameerid struktuuri poolest sarnased dihidropüridiiniga, kaltsiumikanali blokaatoriga. B<sub>6</sub>-vitamiin inhibeerib kaltsiumiioonide sisenemist veresoone silelihasrakkude rakusisestesse

struktuuridesse (12). Võib oletada, et B<sub>6</sub>-vitamiini toime trombotsüütidele võib olla sarnane: blokeerida kaltsiumikanaleid, et takistada kaltsiumiioonide sisenemist raku. PLP ei läbi rakumembraani ja esmalt ta muundatakse ensümaatilisel PLiks membraanseoseliste aluseliste fosfataasidega. PL ja PN difundeeruvad kergesti läbi rakumembraani ja muundatakse vastavateks 5'-fosfaatideks rakusisese PL kinaasi ensüümiga (13). Uute antiagregatiivsete ainete sünteesimine, võttes aluseks PNi keemilise struktuuri, on loonud võimaluse saada uusi antiagregatiivseid aineid. Zang koos oma kaastöötajatega kirjeldas mitmete PN derivaatide sünteesi, mis vähendasid ADP, kollageeni ja trombiini poolt indutseeritud trombotsüütide agregatsiooni (14).

B<sub>6</sub>-vitamiin ei inhibeerii mitte ainult trombotsüütide agregatsiooni, vaid kaitses ka veresoone endoteelirakke kahjustuste eest (4, 6, 15). Lisaks homotsüsteiini taseme alandamisele ja PGI<sub>2</sub> sünteesi suurendamisele suurendab ta ka lämmastikoksiidi vabastamist veresoone endoteelirakkude poolt, kaitses nii neid rakke LDLi kahjustava toime eest. Seega võiksid B<sub>6</sub>-vitamiini vitameerid olla kasulikuks terapeutiliseks vahendiks, et hoida ära trombotsüütide agregatsiooni ja kaitses veresoone endoteeli kahjustuste eest koronaarhaigetel.

**TÄNUAVALDUS**

Tööd on rahastanud Haridus- ja Teadusministeerium (sihtfinantseerimine nr SF0142499s03).

*Vilja@chemnet.ee*

**KIRJANDUS**

1. Krishnamurthi S, Westwick J, Kakkar VV. Effect of pyridoxal 5'-phosphate on human platelet aggregation, dense granule release and thromboxane B<sub>2</sub> generation-role of Schiff base formation. *Thromb Haemost* 1982;48:131-41.
2. Schoene NW, Chanmugam P, Reynolds RD. Effect of oral vitamin B<sub>6</sub> supplementation on in vitro platelet aggregation. *Am J Clin Nutr* 1986;43(5):825-30.
3. Kobzar G, Mardla V. Inhibition of platelet aggregation by pyridoxine. *Nutr Res* 2002;22:997-01.
4. Chang SJ. Vitamin B<sub>6</sub> protects vascular endothelial injury by activated platelets. *Nutr Res* 1999;11:1613-24.
5. Lin P, Cheng C, Liaw Y, et al. Low pyridoxal 5'-phosphate is associated with increased risk of coronary artery disease. *Nutr* 2006;22(11-12):1146-51.
6. Kerkeni M, Addad F, Chauffert M, et al. Hyperhomocysteinemia, paroxonase activity and risk of coronary artery disease. *Clin Biochem* 2006;8:821-25.
7. Mashavi M, Hanah R, Boaz M, et al. Effect of homocysteine-lowering therapy on arterial elasticity and metabolic parameters in metformin - treated diabetic patients. *Atherosclerosis* 2008 (in press).
8. Spence D. Homocysteine - lowering therapy: a role in stroke prevention? *Lancet Neurol* 2007;6:830-38.

9. Mardla V, Kobzar G, Rätsep I, et al. Sensitivity of platelets to prostaglandins in patients with coronary artery disease. *Proc Estonian Acad Sci Biol Ecol* 2001;50(1):33–6.
10. Bor MV, Refsum H, Bisp MR, et al. Plasma vitamin B<sub>6</sub> vitamers before and after oral vitamin B<sub>6</sub> treatment: a randomised placebo-controlled study. *Clin Chem* 2003;49,1:155–61.
11. Chang SJ, Chang CN, Chen CW. Occupancy of glycoprotein IIb/IIIa by B-6 vitamers inhibits platelet aggregation. *J Nutr* 2002;132(12):3603–06.
12. Dakshinamurti K, Lal KJ, Ganguly PK. Hypertension, calcium channel, and pyridoxine (vitamin B<sub>6</sub>). *Mol Cell Biochem* 1998;1888:137–48.
13. Brin M. Vitamin B<sub>6</sub>. Chemistry, adsorption, metabolism, catabolism, and toxicity. In: Sauberlich EE, Brown ML, eds. *Human vitamin B2 requirements*. Washington, DC: National Academy of Sciences; 1978. p.1–20.
14. Zhang W, Yao J, Pham V, et al. Pyridoxine as a template for design of antiplatelet agents. *Biorg Med Chem Lett* 2004;14:4747–50.
15. Ji Y, Diao J, Han Y, et al. Pyridoxine prevents dysfunction of endothelial cell nitric oxide production in response to low-density lipoprotein. *Atherosclerosis* 2006;188:84–94.

## SUMMARY

### Inhibition of platelet aggregation by vitamin B<sub>6</sub> vitamers in vitro in patients with coronary artery disease

**AIM.** The main purpose of this work was to study the antiplatelet effect of the vitamin B<sub>6</sub> vitamers pyridoxine (PN), pyridoxamine (PM), pyridoxal (PL) and pyridoxal phosphate (PLP) in patients with coronary artery disease.

**METHODS.** Patients suffering from coronary artery disease were included in the study. Venous blood was collected in tubes with 3.8% trisodium citrate solution. Platelet-rich plasma (PRP) was obtained after the centrifugation of citrated blood at 160 x g for 10 min at room temperature. Platelets were counted in a Swelab cell counter and adjusted to a final concentration of 250 x 10<sup>9</sup> cells/l. The IC<sub>50</sub> values for the vitamers of vitamin B<sub>6</sub> were measured simultaneously by the optical method in a Chronolog aggregometer and by the impedance method in a Swelab cell counter.

**RESULTS.** The IC<sub>50</sub> values obtained by the optical method were (mM) 1.5 ± 0.2, 1.3 ± 0.3, 1.6 ± 0.4 and 0.14 ± 0.04 for PN, PL, PM and PLP. The respective values obtained by the impedance method were (mM) 1.7 ± 0.3, 1.3 ± 0.3, 1.9 ± 0.3 and 0.22 ± 0.07. The respective values obtained by either method did not differ significantly. Since different vitamers of vitamin B<sub>6</sub> are simultaneously present in blood plasma, the effect of their combination was studied. The same vitamers used in a combination were essentially more effective for inhibiting platelet aggregation.

**CONCLUSION.** Vitamin B<sub>6</sub> vitamers each alone inhibit platelet aggregation at millimolar concentrations. The same vitamers in combination are effective at micromolar concentrations. This may suggest that vitamin B<sub>6</sub> vitamers in combinations may play some role in atherothrombosis.