

СТРЕСС-ИНДУЦИРОВАННАЯ ДИСФУНКЦИЯ ТРОМБОЦИТОВ У КРЫС С ФОЛАТ-ЗАВИСИМОЙ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИЕЙ

С. В. Алисиевич, А. Г. Дубичев, А. А. Левина*, Г. А. Назарова,
Н. Н. Золотов, В. В. Кржечковская, Н. Н. Павлова, Е. П. Романова,
И. А. Рудько, К. А. Черкасова, А. А. Кубатиев

ГУ НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН, Москва

* ГУ Гематологический научный центр РАМН, Москва

Stress Induced Platelet Dysfunction in Rats with Folic Acid-Deficient Hyperhomocysteinemia

S. V. Alisievitich, A. G. Dubichev, A. A. Levina*, G. A. Nazarova, N. N. Zolotov, V. V. Krzhechkovskaya,
N. N. Pavlova, E. P. Romanova, I. A. Rudko, K. A. Cherkasova, A. A. Kubatiev

Research Institute of General Pathology and Pathophysiology, Russian Academy of Medical Sciences

* Hematology Research Center, Russian Academy of Medical Sciences

На модели экспериментальной гипергомоцистеинемии (ГГЦ) у крыс, вызванной хроническим дефицитом в организме фолиевой кислоты, изучалось влияние плавательного стресса на показатели агонист-индуцированной агрегации тромбоцитов и реакцию высвобождения из них АТФ. Показано, что на восьмой неделе развития ГГЦ агрегационная способность тромбоцитов, как и уровень АТФ на все исследованные индукторы (АДФ, тромбин, коллаген), умеренно повышались. После стрессовой нагрузки интенсивность агрегации тромбоцитов у крыс с ГГЦ еще более возрастала, однако прирост ее был менее выраженным, чем в контрольной группе. Аналогичная динамика зарегистрирована со стороны АТФ, выброс которого из плотных тромбоцитарных гранул опытных животных, подвергнутых стрессу, уменьшался по сравнению с контролем. Результаты экспериментов свидетельствуют о потенцирующем влиянии стресса на дисфункцию тромбоцитов при ГГЦ. *Ключевые слова:* фолиевая кислота, стресс, агрегация тромбоцитов.

A rat model of experimental hyperhomocysteinemia (HNC) caused by chronic folic acid deficiency was used to study the impact of swimming stress on the values of agonist-induced platelet aggregation and ATP release. At week 8 of HNC development, platelet aggregability and ATP levels in response to test inductors (ADP, thrombin, and collagen) moderately increased. After stress, the rate of platelet aggregation showed a more increase in rats with HNC; however, the increment was less pronounced than in the control group. The similar changes was observed in ATP, the release of which from dense platelet granules decreased in the experimental animals exposed to stress changes as compared to the controls. The experimental findings suggest that the stress potentiates platelet dysfunction in HNC. *Key words:* folic acid, stress, platelet aggregation.

Широкие эпидемиологические и лабораторные исследования выявили негативное влияние эмоционального стресса, психологических и физических перегрузок на развитие сосудистых осложнений, а также смертельных исходов инфаркта миокарда [1–4].

Усиленный нейрогормональный ответ на стресс стимулирует множественные изменения в организме, затрагивающие липидный обмен, гемодинамику, свертывание крови, активность тромбоцитов и эндотелиальных клеток [5]. При этом действие стрессовых факторов отличается у здоровых лиц и людей с различными видами сосудистых патологий, активизируя у последних артериальное тромбообразование [6, 7].

Гипергомоцистеинемия (ГГЦ), развивающаяся вследствие нарушения метаболизма гомоци-

стеина, продукта деметилирования метионина, признана одним из независимых факторов риска тромбозов и сердечно-сосудистых заболеваний.

В то же время, влияние стресса на риск развития артериальных тромбозов при ГГЦ и метаболизм гомоцистеина практически не исследовано.

В связи с этим целью настоящей работы явилось изучение функции тромбоцитов, одного из основных триггеров артериального тромбоза, у крыс с хронической ГГЦ на фоне стресса.

Материалы и методы

Эксперименты выполнены на 40 самцах крыс линии Вистар, массой тела 270 ± 20 г, из которых 20 крыс (опытная группа) в течение 8 недель находились на диете со сниженным содержанием фолатов. Контролем служили 20 крыс, получавших тот же рацион, но с добавлением фолиевой кислоты.

Таблица 1

Влияние стрессовой нагрузки на концентрацию гомоцистеина (мкмоль/л) в плазме крови у крыс

Экспериментальные группы	Значения гомоцистеина
Опытная группа	
до стресса	32,39±3,6 [#]
после стресса	26,27±8,6*
Контрольная группа	
до стресса	9,1±3,3
после стресса	25,75±2,7*

Примечание. * — $p < 0,05$ — по сравнению с концентрацией ГЦ до стресса; [#] — $p < 0,05$ — по сравнению с контролем.

Таблица 2

Влияние стрессовой нагрузки на концентрацию катехоламинов (нг/мл) в плазме крови у крыс с ГЦ

Экспериментальные группы	Значения показателей	
	адреналин	норадреналин
Опытная группа		
до стресса	2854±503 [#]	4259±418 [#]
после стресса	5050±749*	6428±899*
Контрольная группа		
до стресса	1252±224	2880±273
после стресса	4349±329*	4470±830*

Примечание. * — $p < 0,05$ — по сравнению с концентрацией катехоламинов до стресса; [#] — $p < 0,05$ — по сравнению с контролем.

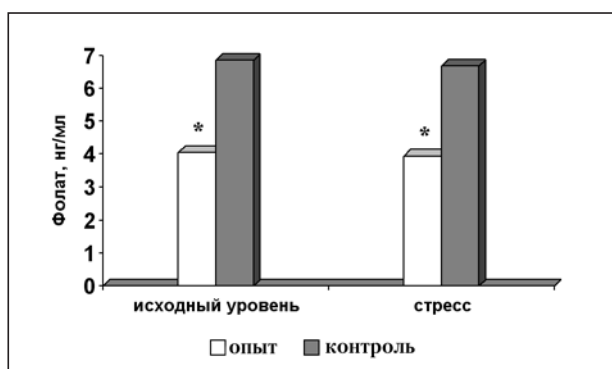


Рис. 1. Концентрация фолатов в плазме.

* — $p < 0,05$ относительно контроля.

Стресс у крыс вызывали методом «неизбегаемого плавания» в воде при температуре 22°C в течение 15 мин.

Лабораторные исследования. Взятие крови для исследования производили до и после стресса в пластиковую пробирку с 40 ЕД/мл гепарином в соотношении 1:9 (v/v). Содержание общего гомоцистеина в плазме крови определяли модифицированным методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовой детекцией [8] на хроматографе Perkin Elmer (USA). Концентрацию адреналина и норадреналина в плазме крови определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией на Bioanalytical System хроматографе (USA) [9]. Концентрацию фолатов в плазме крови исследовали иммуноферментным методом [10].

Функциональное состояние тромбоцитов оценивали по их агрегации в цельной крови [11] и суспензии [12–14] на Whole blood Chrono-Log агрегометре (USA) с использованием следующих индукторов агрегации: АДФ (Eastman) в конечных концентрациях от 5,0 до 10,0 мкМ; коллагена (Chrono-Log Corporation) в конечных концентрациях от 2 мкг/мл до 4 мкг/мл и тромбина в конечных концентрациях от 0,3 до 0,5 Ед/мл. Достоверные различия в амплитуде агрегации и скоро-

сти ее достижения получены при конечной концентрации АДФ 10 мкМ, коллагена 4 мкг/мл и тромбина 0,5 Ед/мл. Амплитуду агрегации выражали в Ом для цельной крови и в % падения оптической плотности для суспензии тромбоцитов. Суспензию тромбоцитов получали из плазмы богатой тромбоцитами с последующим осаждением тромбоцитов центрифугированием. После однократной промывки тромбоциты ресуспендировали в Tris-фосфатном буфере (рН 7,4). В процессе АДФ-индуцированной агрегации на агрегометре оценивали уровень высвобождения АТФ из тромбоцитов с использованием набора Chrono-Lume (Chrono-Log, США), содержавшего 2 мкМ/л люциферин-люциферазу и стандартный раствор 2нМ АТФ. Расчет концентрации (К) АТФ (нМ) при одинаковом коэффициенте усиления люминесценции пробы и стандарта АТФ производили по формуле: $K = 2 \text{ нМ} \times \text{люминесценция пробы} / \text{люминесценция стандарта АТФ}$.

Результаты обрабатывали с помощью пакета программ STATISTICA и оценивали по критерию Стьюдента.

Состав фолат-дефицитной диеты (в % от массы смеси): казеин (18%), сахараза (21,4%), волокнистая целлюлоза (5%), кукурузная крупа (42,4%), витаминная смесь (0,5% от веса), солевая смесь (2% от веса), масло кукурузное (9%), холин хлорид (0,2% от веса), D,L-метионин (0,5% от веса), и фталазол (1% от веса). Фталазол введен в диету для того, чтобы подавить пролиферацию кишечной микрофлоры и не допустить синтез фолиевой кислоты в организме.

Жировой состав диеты включал (в % от массы жиров) ненасыщенные жирные кислоты — 86,1%, насыщенные жирные кислоты — 13,9%. Солевая смесь состояла (в граммах) из: поваренной соли — 23,36 г; сернокислого марганца — 2,46 г; двуосновного фосфорнокислого натрия — 35,8 г; двуосновного фосфорнокислого калия — 69,6 г; фосфорнокислого кальция — 68,8 г; молочнокислого кальция — 15,4 г; лимоннокислого железа — 5,98 г и йодида калия — 0,16 г. Витаминная смесь состояла из витамина К — 0,0014 мг, витамин В₁ — 0,018 мг, В₂ — 0,018 мг, В₃ — 0,15 мг, В₅ — 0,07 мг, витамин В₆ — 0,018 мг и витамин В₁₂ — 0,02 мкг [15, 16]. Кроме того, животные контрольной группы получали фолиевую кислоту в количестве 750 мкг на кг корма [17].

Результаты и обсуждение

После 8 недель содержания животных на диете, обедненной фолиевой кислотой, значительной разницы в прибавке веса у животных контрольной и опытной групп не наблюдалось. Концентрация фолатов в плазме крови опытных крыс к этому времени была ниже по сравнению с контрольной группой (соответственно, 4,05±0,82 и 6,85±0,95 нг/мл, $p < 0,05$), а уровень ОГП был значительно выше (соответственно, 32,39±3,6 и 9,1±3,3 мкмоль/л) (табл. 1, рис. 1). Была установлена отрицательная зависимость между концентрацией фолатов плазмы и уровнем ОГП ($r = -0,6474$) (рис. 2 D). После стрессового воздействия в опытной группе отмечали снижение концентрации ГЦ в плазме крови, тогда как в контрольной, напротив, на фоне стресса отмечено почти двукратное увеличение концентрации ГЦ (табл. 1). Содержание фолатов в плазме крови после плавательного стресса осталось на исходном уровне как в опытной, так и в контрольной группах (соответственно, 3,94±0,92 и 6,68±0,84) (рис. 1).

В опытной группе животных была выявлена повышенная концентрация адреналина и норадре-

Изменение агрегации тромбоцитов у крыс с ГГЦ на фоне стресса

Экспериментальные группы	Значения агрегации тромбоцитов в зависимости от индуктора		
	10 мкМ АДФ (ом)	4 мкг/мл коллаген (ом)	0,5 ЕД/мл тромбин(%)
Опытная группа			
до стресса	53,85±9,8 [#]	77,5±8,1 [#]	42±9,3*
после стресса	76,3±4,7	92,7±3,6*	53±8,8*
Контрольная группа			
до стресса	32,5±9,2	31,0±5,6	39±7,9
после стресса	62,8±3,5*	79,3±3,4*	46,7±6,8*

Примечание. * – $p < 0,05$ – по сравнению с агрегацией тромбоцитов до стресса; [#] – $p < 0,05$ – по сравнению с контролем.

налина в плазме крови по сравнению с контрольной группой. После стресса значительное повышение концентрации катехоламинов в плазме крови наблюдалось у животных обеих групп. При этом в крови крыс с ГГЦ их концентрация была выше, чем в контроле (табл. 2).

У крыс с ГГЦ установлена повышенная агрегация тромбоцитов на все используемые индукторы (табл. 3) и положительная корреляция между амплитудой агрегации и ОГП (рис. 2 А, В, С). После стресса у всех животных наблюдалось возрастание агрегации. При этом амплитуда агрегации была выше у крыс опытной группы, но прирост амплитуды агрегации был больше у крыс контрольной группы.

В процессе агрегации, индуцированной АДФ и тромбином, у крыс с ГГЦ было повышено высвобождение АТФ из тромбоцитов по сравнению с контрольной группой (табл. 4). При этом в обеих группах тромбин, а не АДФ вызывал большее высвобождение АТФ. После стресса в контрольной группе происходило увеличение высвобождения

Таблица 4

Высвобождение АТФ (нМ) из тромбоцитов крыс с ГГЦ на фоне стресса

Экспериментальные группы	Количество АТФ в зависимости от индукторов	
	10 мкМ АДФ	0,5 ЕД/мл тромбин
Опытная группа		
до стресса	2,6±0,4	3,5±0,7
после стресса	1,9±0,5	2,7±0,3
Контрольная группа		
до стресса	0,8±0,1	2,3±0,4
после стресса	1,3±0,4	2,7±0,5

Примечание. * – $p < 0,05$ – по сравнению с высвобождением АТФ до стресса; [#] – $p < 0,05$ – по сравнению с контролем.

АТФ. Напротив, у крыс опытной группы стресс приводил к снижению высвобождения АТФ в процессе агрегации, индуцированной как АДФ, так и тромбином.

Как следует из результатов, представленных в табл. 1 и рис. 1, у крыс, находившихся на диете, наблюдалось существенное снижение фолатов и

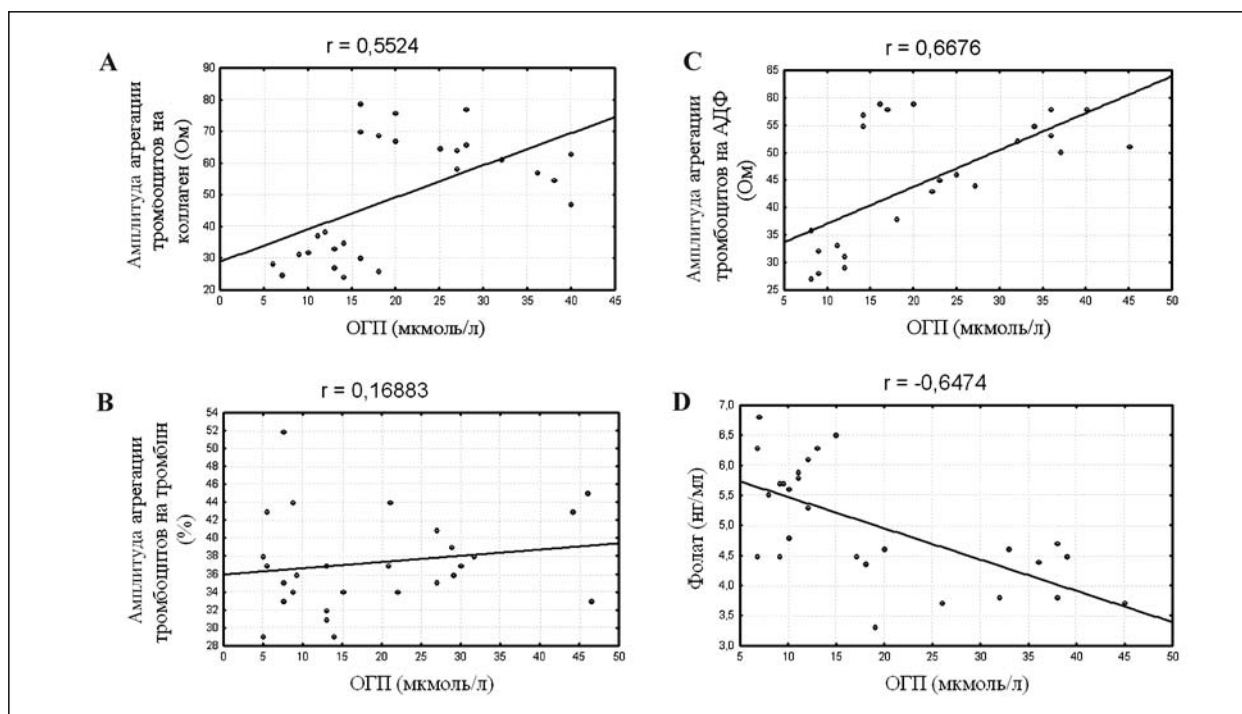


Рис. 2. Зависимость между концентрацией ОГП и амплитудой агрегации тромбоцитов в ответ на коллаген (А), тромбин (В), АДФ (С) и уровнем фолатов в плазме (D).

повышение концентрации гомоцистеина в плазме крови, что свидетельствует о развитии у животных средней ГГЦ, и подтверждает адекватность выбранной нами модели. Кроме того, была выявлена отрицательная зависимость между концентрацией ОГП и уровнем фолатов плазмы ($r = -0,6474$) (рис. 2 D).

Обращает внимание, что до стресса концентрация катехоламинов в плазме крови опытных животных была существенно (более чем в 2 раза) выше, чем в контроле. Ранее Zhu (2002) было установлено, что при ГГЦ происходит накопление S-аденозил-L-гомоцистеина, сильного неконкурентного ингибитора метилирования различных катехоловых субстратов (таких, как катехоламины и катехоловые эстрогены), в котором участвует катехол-O-метилтрансфераза [18]. Подавление S-аденозил-L-гомоцистеином метилирования эндогенных катехоламинов в периферических тканях вызывает повышение их содержания в крови. Как следствие, эндотелиальные клетки сосудов подвергаются хроническому накапливающемуся повреждению, вызванному большим количеством окисленных продуктов (катехолквинины/семиквинины и оксирадикалы), образуемых эндогенными катехоламинами, что приводит в дальнейшем к гиперактивации сердечно-сосудистой системы [18].

После стресса наблюдалось ожидаемое повышение уровня катехоламинов в обеих экспериментальных группах. Однако концентрации как адреналина, так и норадреналина в плазме крови животных опытной группы была выше.

Установленная в результате наших экспериментов повышенная агрегация тромбоцитов с одновременным увеличением высвобождения из них АТФ в опытной группе животных и сильная положительная корреляция между уровнем ОГП и амплитудой агрегации в ответ на АДФ и коллаген позволяет считать, что функциональная активность тромбоцитов у крыс с ГГЦ повышена (рис. 2 А, В). Это наблюдение совпадает с данными Ungvary Z. и др., которые наблюдали значительное повышение агрегации тромбоцитов в ответ на коллаген и АДФ [19]. Ранее повышение АДФ-индуцированной агрегации крыс с ГГЦ было также выявлено Durand [20]. В то же время, гомоцистеин в концентрациях, соответствующих средней и тяжелой ГГЦ *per se* не влияет на агрегацию и высвобождение АТФ из тромбоцитов.

К активации тромбоцитов при ГГЦ может приводить действие разных факторов, включая активацию свободно-радикального окисления, повреждение эндотелия сосудов, повышенное образование медиаторов воспаления [21]. В то же время нельзя исключить, что повышение содержания катехоламинов, выявленное нами у крыс с ГГЦ, также ответственно за повышение агрега-

ции тромбоцитов. Несмотря на то, что адреналин непосредственно не вызывает агрегацию тромбоцитов у крыс, он может усиливать ответ кровяных пластинок на многочисленные агонисты [22]. Так, через активацию α_2 -адренорецепторов адреналин вызывает агрегацию тромбоцитов в присутствии низких (субпороговых) концентраций коллагена, при которой происходит лишь изменение формы, но нет еще агрегации [23]. Усиление АДФ-зависимой агрегации тромбоцитов при ГГЦ может быть также обусловлено повышением уровня АДФ в крови, поскольку гомоцистеин ингибирует экто-АДФ-азу эндотелиальных клеток, разрушающую АДФ [24]. Кроме того, наблюдаемая активация тромбоцитов может быть обусловлена увеличением синтеза ими ТхА₂ при ГГЦ. Усиленное высвобождение тромбоцитами арахидоновой кислоты, предшественника ТхА₂, в условиях ГГЦ отмечали у крыс Durand [20], а у человека Signorello и др. [25], и связывали это с интенсификацией процессов свободно-радикального окисления.

Нельзя исключить, что наблюдаемое нами усиление агрегации тромбоцитов при ГГЦ может быть обусловлено активирующим влиянием АТФ, которая у человека в низких концентрациях значительно усиливает агрегацию тромбоцитов, вызываемую различными агонистами. В частности Birk и др. [26] выявлено, что АТФ усиливает агрегацию тромбоцитов человека, индуцируемую норадреналином или адреналином в концентрациях, которые в 10–100 раз ниже, чем концентрации АТФ, ингибирующие АДФ-индуцируемую агрегацию тромбоцитов.

Менее выраженное, чем у здоровых животных, повышение агрегации у крыс опытной группы после стресса, по-видимому, связано с хронической активацией при ГГЦ тромбоцитов и опустошением гранул кровяных пластинок, о чем свидетельствует снижение количества высвобождаемого АТФ. Таким образом, стрессовое воздействие на фоне ГГЦ вызывает дальнейшую активацию уже возбужденных тромбоцитов, что может быть одной из причин развития сердечно-сосудистой патологии.

ГГЦ, как и стресс, приводит к увеличению концентрации катехоламинов в плазме крови, запуская в организме каскад нарушений, что может способствовать повышенному риску развития сосудистой дисфункции. Следовательно, механизмы патологического действия стресса и ГГЦ на организм имеют общие черты. Обращает внимание существенное повышение концентрации гомоцистеина в плазме здоровых животных на фоне стресса. Эти наблюдения позволяют предполагать существование взаимосвязи между стрессовым состоянием и ГГЦ, что, безусловно, требует дальнейших исследований.

Литература

1. Wang H. X., Mittleman M. A., Orth-Gomer K. Influence of social support on progression of coronary artery disease in women. *Soc. Sci. Med.* 2005; 60 (3): 599–607.
2. Orth-Gomer K., Wamala S. P., Horsten M. et al. Marital stress worsens prognosis in women with coronary heart disease: The Stockholm Female Coronary Risk Study. *J. A. M. A.* 2000; 284: 3008–3014.
3. Nemeroff C. B., Musselman D. L., Evans D. L. Depression and cardiac disease. *Depress. Anxiety* 1998; 8 (Suppl. 1): 71–79.
4. Rozanski A., Blumenthal J. A., Kaplan J. Impact of psychological factors on the pathogenesis of cardiovascular disease and implications for therapy. *Circulation* 2000; 25: 177–178.
5. Gidron Y., Gilutz H., Berger R., Huleihel M. Molecular and cellular interface between behavior and acute coronary syndromes. *Cardiovasc. Res.* 2002; 56 (1): 15–21.
6. von Kanel R., Mills P. J., Fainman C., Dimsdale J. E. Effects of psychological stress and psychiatric disorders on blood coagulation and fibrinolysis: a biobehavioral pathway to coronary artery disease. *Psychosom. Med.* 2001; 63 (4): 531–544.
7. Kario K., Matsuo T., Kobayashi H. et al. Earthquake-induced potentiation of acute risk factors in hypertensive elderly patients: possible triggering of cardiovascular events after a major earthquake. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1997; 29 (5): 926–933.
8. Araki A., Sako Y. Determination of free and total homocysteine in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.* 1987; 422–443.
9. Кудрин В. С., Мирошниченко И. И., Раевский К. С. Различия в механизмах ауторецепторной регуляции биосинтеза и высвобождения дофамина в подкорковых структурах мозга крыс. *Нейрохимия* 1988; 1: 3–8.
10. Левина А. А., Мелик-Нубаров Н. С., Казюкова Т. В. и др. Разработка иммуноферментного метода для определения витамина В12 и фолиевой кислоты. В кн.: *Биомедприбор-2000: Тез. докл. конф. М.; 2000.*
11. Cardinal D. C., Flower R. J. The electronic aggregometer: A novel device for assessing platelet behavior in blood. *J. Pharmacol. Meth.* 1980; 3: 135–158.
12. Born G. V. Aggregation of blood platelets by ADP and its reversal. *Nature* 1962; 194: 927–929.
13. O'Brien J. R. Platelet aggregation. Part I Some effect of the adenosine phosphates, thrombin, and cocaine upon platelet adhesiveness. *J. Clin. Path.* 1962; 15 (5): 446–452.
14. O'Brien J. R. Platelet aggregation. Part II Some results from a new method of study. *J. Clin. Path.* 1962; 15 (5): 452–455.
15. Островский Ю. М. (ред.) Экспериментальная витаминология. Минск.: Наука и техника; 1979.
16. Langley-Evans S. C., Gardner D. S., Jackson A. A. Association of disproportionate growth of fetal rats in late gestation with raised systolic blood pressure in later life. *J. Reprod. Fertil.* 1996; 106: 307–312.
17. Akesson B., Fehling C., Jagerstad M., Stenram U. Effect of experimental folate deficiency on lipid metabolism in liver and brain. *Br. J. Nutr.* 1982; 47: 505.
18. Zhu B. T. On the mechanism of homocysteine pathophysiology and pathogenesis: a unknown hypothesis. *Histol. Histopathol.* 2002; 17 (4): 1283–1291.
19. Ungvari Z., Sarkadi-Nagy E., Bagi Z. et al. Simultaneously increased TxA₂ activity in isolated arterioles and platelets of rats with hyperhomocysteinemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000; 20 (5): 1203–1208.
20. Durand P., Prost M., Blache D. Folic acid deficiency enhances oral contraceptive-induced platelet hyperactivity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997; 17: 1939–1946.
21. Wilson K. M., Lentz S. R. Mechanisms of the atherogenic effects of elevated homocysteine in experimental models. *Semin. Vasc. Med.* 2005; 5 (2): 163–171.
22. Maayani S., Schwarz T., Craddock-Royal B., Tagliente T. M. Activation of the alpha(2A)-adrenoceptor mediates deceleration of the deaggregation component of the response to ADP or 5-HT in human platelets in vitro. *Platelets* 2001; 12 (6): 359–375.
23. Yun-Choi H. S., Pyo M. K., Chang K. C., Lee D. H. The effects of heparin on LPS-induced experimental disseminated intravascular coagulation (DIC) in rats. *Planta Med.* 2002; 68 (4): 326–329.
24. Harpel P. C., Zhang X., Borth W. Homocysteine and hemostasis: pathogenic mechanisms predisposing to thrombosis. *J. Nutr.* 1996; 126 (4 Suppl): 1285–1291.
25. Signorello M. G., Pascale R., Leoncini G. Effect of homocysteine on arachidonic acid release in human platelets. *Eur. J. Clin. Invest.* 2002; 32 (4): 279–284.
26. Birk A. V., Endri L., Robertson H. D. et al. Interaction between ATP and catecholamines in stimulation of platelet aggregation. *Am. J. Physiol. Heart Circ.* 2003; 284 (2): 619–625.

Поступила 01.08.06