

А.С. Роткина, Е.П. Романова, А.А. Московцев, А.А. Кубатиев

## **Динамика изменений АДФ- и тромбин-индуцированной агрегационной активности тромбоцитов в присутствии избытка гомоцистеина *in vitro***

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» Российской академии медицинских наук, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

Гипергомоцистеинемия (ГГЦ) — повышение уровня общего гомоцистеина (ГЦ) в плазме крови выше 12 мкМ — ассоциирована с дисфункцией эндотелия, изменением плазменных факторов свертывания крови и повышением агрегации тромбоцитов [7, 18]. Несмотря на растущее число исследований, механизмы, приводящие к изменениям агрегационной активности тромбоцитов в присутствии ГЦ изучены недостаточно. Данное экспериментальное исследование выполнено на богатой тромбоцитами плазме кролика (PRP) и суспензиях отмывтых тромбоцитов кролика и человека (WP). Были проведены инкубации различной продолжительности тромбоцитов с повышенными концентрациями ГЦ, а также ГЦ в комбинации с блокатором сульфгидрильных групп *N*-этилmaleимидом (NEM). Установлено, что ГЦ оказывает прямое влияние на агрегацию тромбоцитов, индуцированную АДФ и тромбином. Данное влияние носит время- и дозозависимый характер. Обнаружены различия эффектов ГЦ в PRP и WP. NEM оказывал дозозависимое ингибирующее действие на агрегацию тромбоцитов, преинкубация с NEM полностью снимала стимулирующий эффект ГЦ на агрегацию. Эффекты гомоцистеина могут быть опосредованы его участием в реакциях тиол-дисульфидного обмена с тиолами плазмы и поверхностными белками тромбоцитов. Характер временных изменений агрегационной активности в присутствии ГЦ позволяет предположить многофакторность его влияния на тромбоциты.

**Ключевые слова:** гомоцистеин, тромбоциты, агрегация, АДФ, тромбин

A.S. Rotkina, E.P. Romanova, A.A. Moskovtsev, A.A. Kybatiev

## **Dynamics of changes of ADP-, thrombin-induced platelet aggregation activity in the presence of an excess of homocysteine *in vitro***

Institute of general pathology and pathophysiology RAMS, 8, Baltiyskaya str., Moscow, 125315, Russia

Recent evidence indicates that hyperhomocysteinemia (HHc) leads to endothelial dysfunction, changes in plasma factors and increased platelet aggregation [7, 18]. However, the mechanisms of platelet aggregation alterations in the presence of homocysteine (Hcy) are established not. This study was performed in platelet rich plasma (PRP) and platelet suspension, incubated in the presence of Hcy (10, 50, 100 μM) for 120 minutes and in combination Hcy with NEM. Results indicate that Hcy has a direct effect on platelet aggregation induced by ADP and thrombin. This effect has a time and dose dependent character. NEM has a dose-dependent inhibitory effect on platelet aggregation and pre-incubation with NEM eliminates the stimulating effect on the aggregation of Hcy completely. The effects of Hcy may be mediated by its participation in the reactions of thiol-disulfide exchange with thiols of plasma and platelet surface proteins. The specificity of the time dependence proves multifactor effect of Hcy on platelet activity.

**Key words:** homocysteine, platelets, aggregation, ADP, thrombin

Гипергомоцистеинемия (ГГЦ) — повышение уровня гомоцистеина (ГЦ) в плазме крови выше 12 мкМ — является независимым фактором риска сердечно-сосудистых заболеваний [3]. ГГЦ ассоциирована с рядом заболеваний, таких, как болезнь Альцгеймера, шизофрения, заболевания почек, остеопороз, инсулиннезависимый диабет [6]. В ряде исследований показано, что ГГЦ

приводит к дисфункции эндотелия, изменению плазменных факторов свертывания крови и повышению агрегации тромбоцитов [7, 18].

Предложено несколько возможных механизмов нарушений функций тромбоцитов при ГГЦ [13] и могущих приводить к активации агрегационной активности:

- инициируемый аутоокислением ГЦ окислительный стресс [4], вызывающий повреждение клеточных мембран и повышение уровня окисленных липопротеинов низкой плотности [9, 22];

Для корреспонденции: Роткина Анна Сергеевна, научн. сотр. лаб. молекулярных механизмов тромбогенеза и тромболитизиса ФГБУ «НИИОПП» РАМН. E-mail: annanum@mail.ru

- повышение GPIIb-IIIa/фибриногензависимой адгезии тромбоцитов к эндотелию [8];
- ингибирование образования оксида азота в тромбоцитах [17];
- возрастание чувствительности тромбоцитов к агонистам при параллельном снижении чувствительности к агентам, ингибирующим агрегацию [20];
- ингибирование гидролиза внеклеточной АТФ и АДФ [25] и некоторые другие.

При анализе изменений агрегации тромбоцитов под влиянием Гц *in vitro* большинством исследователей было установлено повышение агрегации, индуцированной тромбином и АДФ [19, 24], однако существуют работы, не подтверждающие эти данные [27]. По нашему мнению, выявление временной зависимости воздействия Гц на агрегацию тромбоцитов может быть полезным при определении характера механизма активации тромбоцитов в присутствии Гц. Применение блокатора сульфидрильных групп N-этилмалеимида (NEM) позволяет оценить вклад реакций тиол-дисульфидного обмена в молекулярные механизмы модулирования гомоцистеином функционального состояния тромбоцитов.

### Методика

Эксперименты проведены на 10 кроликах-самцах Шиншилла, массой 3—3,5 кг. Здоровые животные содержались в стандартных условиях вивария. Взятие крови производили из краевой ушной вены методом свободного истечения.

Кровь для получения тромбоцитов человека получали от регулярных доноров Гематологического научного центра РАМН. Образцы транспортировались при 37°C в лабораторию, где осуществлялась пробоподготовка. Для получения богатой тромбоцитами плазмы (PRP) кровь брали в пробирки, содержащие в качестве антикоагулянта 3,8%-ный раствор цитрата натрия в соотношении 9:1; для работы с суспензией тромбоцитов — кислый цитратный буфер (ACD): лимонная кислота 85 мМ, трехзамещенный цитрат натрия 66 мМ, глюкоза 111 мМ в соотношении 6:1.

#### Получение богатой тромбоцитами плазмы

Кровь центрифугировали (Jouan BR4i multifunction Centrifuge, Франция) 10 мин 70 г при 23°C. Затем производили отбор PRP, а оставшийся осадок центрифугировали для получения бедной тромбоцитами плазмы (PPP) в течение 15 мин при 780 г.

#### Получение суспензии тромбоцитов (WP) кролика

Для осаждения тромбоцитов PRP центрифугировали 2 мин при 340 г. Супернатант сливали, тщательно просушивали пробирки и небольшими порциями добавляли, размешивая мягким постукиванием тром-

боцитарный осадок, буфер Тироде (рН 7,35: 136, 89 мМ NaCl, 2,68 мМ KCl, 1,8 мМ CaCl<sub>2</sub>, 0,36 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 11,9 мМ NaHCO<sub>3</sub>, 5,5 мМ glucose, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,02% апураза (Sigma)), в объеме равном объему PRP.

#### Получение WP человека

Суспензию тромбоцитов человека получали путём гельфильтрации с использованием сефарозы (Sephagosa 2B, Sigma).

Подсчет общего количества тромбоцитов проводили в камере Горяева по стандартной методике с использованием светового микроскопа СЕТ1 0406025. Количество тромбоцитов в рабочем образце доводили бедной тромбоцитами плазмой (при работе с PRP) или буфером Тироде (при работе с суспензией) до  $(180-200) \times 10^9$ /л. Рабочий раствор гомоцистеина (D,L-homocysteine, Sigma) 50 ммоль/л готовили из сухого вещества. Пробы инкубировали при комнатной температуре с конечными концентрациями гомоцистеина — 10, 50, 100 мкМ. Начиная с 5 мин инкубации, во временные интервалы 15-30 мин отбирали из опытной и контрольной пробирки аликвоты и оценивали функциональное состояние тромбоцитов по их агрегации в PRP и в суспензии тромбоцитов с использованием следующих индукторов агрегации: АДФ (Chrono-Log) в конечной концентрации от 0,625-1,25 мкМ и тромбина (Chrono-Log) в конечной концентрации 0,025 Ед/мл. Концентрация АДФ была подобрана таким образом, чтобы в контрольной пробе в начале эксперимента агрегационная активность тромбоцитов составляла 20-25%. Функциональная активность тромбоцитов оценивалась фотометрически с помощью двухканального агрегометра (Chrono-Log 700).

Определение содержания свободного гомоцистеина в плазме крови проводили с использованием методики высокоэффективной жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии. Уровень свободного гомоцистеина в плазме крови кролика составил от 3 до 5 мкМ [2]

Анализ экспрессии Р-селектина проводили с использованием моноклональных антител Абсам (США), меченых фикоэритрином, методом проточной цитометрии (FACSCalibur BD, США).

Статистическая обработка результатов проводилась по методу Стьюдента для связанных наблюдений. В качестве нуль-гипотезы была принята гипотеза, что средние значения уровня агрегации в опыте и контроле совпадают. Альтернативой служила гипотеза, что средний уровень агрегации в опыте выше, чем в контроле (если эмпирическое среднее положительно) или средний уровень агрегации в опыте ниже, чем в контроле (если эмпирическое среднее отрицательно). Достоверными считались различия показателей при  $p < 0,05$ .

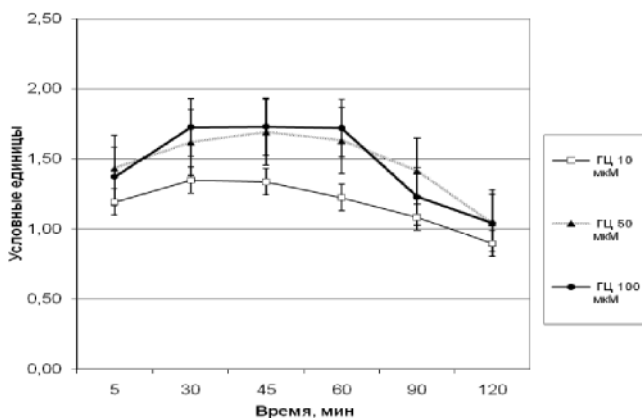


Рис. 1. Среднее изменение агрегации тромбоцитов кролика относительно контроля при инкубации тромбоцитов в богатой плазме с Гц (10, 50, 100 мкМ) относительно контроля, индуктор АДФ (0,625–1,25 мкМ)

## Результаты и обсуждение

### Влияние Гц на АДФ-индуцированную агрегацию в богатой тромбоцитами плазме кролика

Как видно из рис. 1, Гц в концентрациях 10, 50, 100 мкМ уже к 5-й минуте инкубации вызывает статистически значимое повышение агрегации тромбоцитов кролика относительно контроля ( $p < 0,05$ ). В последующие сроки инкубации в опытных образцах агрегация возрастала, достигая максимального значения к 30-й — 60-й минуте. К 90-й — 120-й мин агрегация в опытных пробах снижалась до контрольных значений. Гц в концентрациях 50 и 100 мкМ вызывает практически одинаковое усиление агрегации, тогда как рост агрегации под действием Гц 10 мкМ был существенно ниже ( $p < 0,05$ ). Таким образом, выражен прямой дозозависимый эффект между концентрациями Гц 10 и 50 мкМ и Гц 10 и 100 мкМ.

### Влияние Гц на АДФ-индуцированную (0,625–1,25 мкМ) агрегацию в суспензии тромбоцитов кролика и человека

Агрегационная активность тромбоцитов кролика (рис. 2) в суспензии в присутствии Гц (10 мкМ и 50 мкМ) к 5-й минуте инкубации в большинстве опытных образцов была существенно выше, чем в контроле, а под действием Гц 100 мкМ наблюдалось снижение агрегации. В дальнейшие сроки наблюдения агрегация снижалась во всех опытных образцах, достигая минимума к 120-й минуте при концентрациях Гц 10 мкМ, 50 мкМ, а при концентрации Гц 100 мкМ к 60-й минуте чувствительность тромбоцитов к АДФ (1,25 мкМ) отсутствовала. Достоверное снижение агрегации наблюдалось к 30-й, 45-й, 60-й минуте при концентрациях Гц 10, 50, 100 мкМ соответственно.

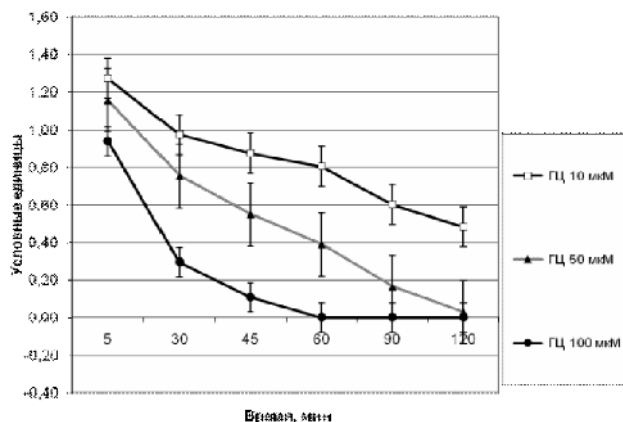


Рис. 2. Среднее изменение агрегации в суспензии тромбоцитов кролика при инкубации с Гц (10, 50, 100 мкМ) относительно контроля, индуктор АДФ (0,625–1,25 мкМ)

Агрегационная активность тромбоцитов человека (рис. 3) на 5-й минуте инкубации с Гц в концентрации 10 мкМ и 50 мкМ была незначительно выше контроля, при 100 мкМ Гц наблюдалось, как и для тромбоцитов кролика, снижение агрегации. В более поздних временных точках агрегационная активность тромбоцитов человека снижалась сходным образом, отсутствие чувствительности к АДФ имело место на 45-й минуте для концентрации 100 мкМ. Тромбоциты человека, инкубированные с Гц в концентрации 10 мкМ, 50 мкМ, сохраняли, в отличие от кроличьих, низкую чувствительность к АДФ на 120-й минуте (рис. 3). Таким образом, Гц оказывает обратный дозозависимый эффект на величину и прямой дозозависимый на скорость снижения агрегации отмытых тромбоцитов кролика.

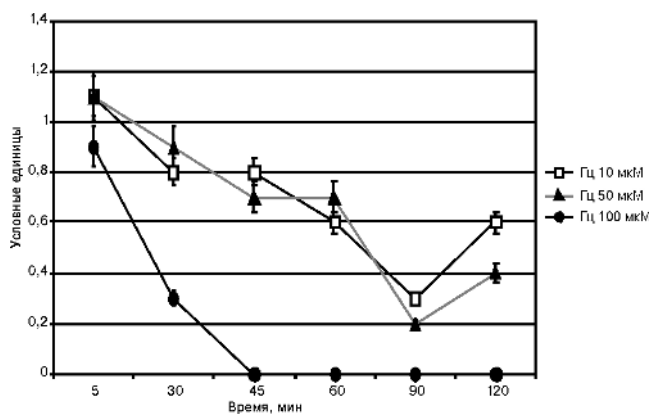
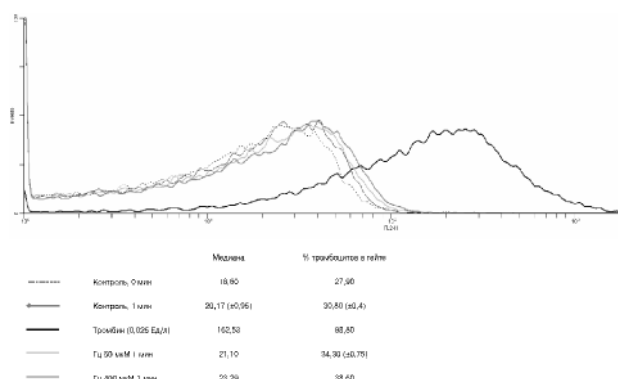
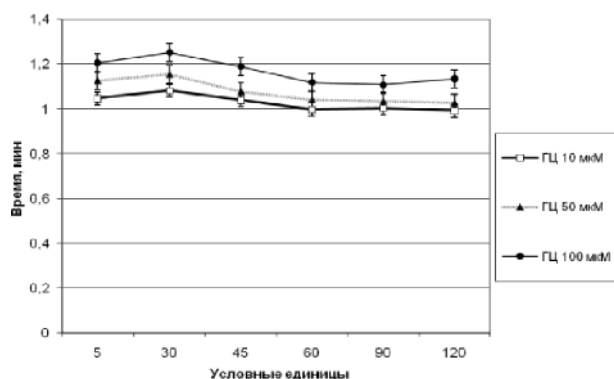


Рис. 3. Среднее изменение агрегации в суспензии тромбоцитов человека при инкубации с Гц (10, 50, 100 мкМ) относительно контроля, индуктор АДФ (0,625–1,25 мкМ)



*Влияние Гц на агрегацию, индуцированную тромбином в суспензии тромбоцитов кролика*

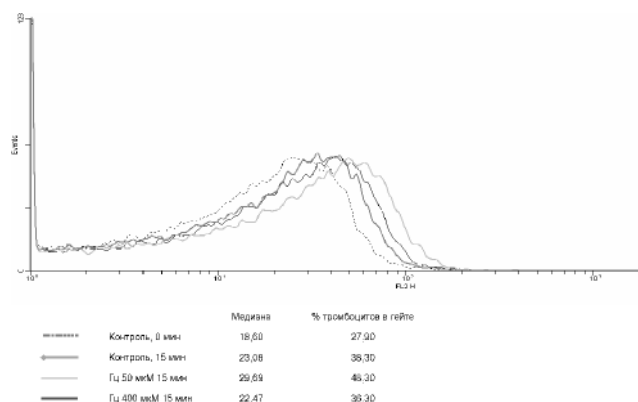
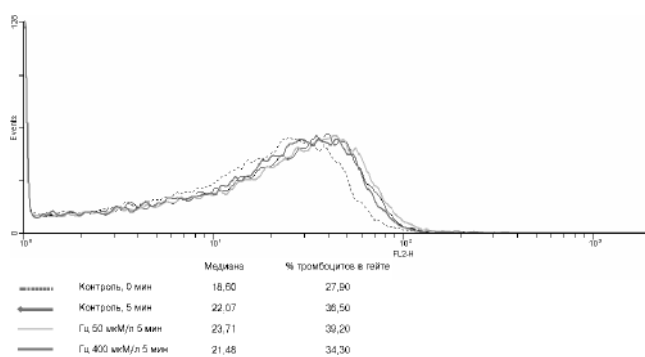
На 5-й минуте инкубации (рис. 4) с Гц 10 мкМ тромбин-индуцированная агрегация тромбоцитов имела незначительную тенденцию к повышению, а при Гц 50 мкМ, 100 мкМ — была достоверно выше относительно контроля ( $p < 0,05$ ). При этом повышение агрегационной активности носило прямой дозозависимый характер. Максимум повышения агрегации достигался к 30-й минуте и в последующие сроки инкубации наблюдалось снижение: при Гц 10 мкМ и 50 мкМ приближалось к контрольным значениям, а при Гц 100 мкМ — оставалось выше контроля.

*Влияние избытка гомоцистеина на экспрессию Р-селектина тромбоцитами человека in vitro*

Для оценки функционального состояния тромбоцитов человека, инкубированных с Гц, мы провели

исследование экспрессии ими Р-селектина. Избыток Гц приводил к сравнительно слабой экспрессии Р-селектина на поверхности тромбоцитов, которая имела незначительную тенденцию к повышению при увеличении концентрации Гц (с 50 мкМ до 400 мкМ) и времени инкубации от 1 до 15 мин (рис. 5—7). Для концентрации Гц 400 мкМ смещение пика флуоресценции отмечалось только для кратковременной инкубации 1 мин, для временных точек в 5 и 15 мин отличий от контроля не наблюдалось. Для меньших концентраций Гц 50 мкМ и 100 мкМ регистрировали сравнительно небольшой рост интенсивности флуоресценции с увеличением времени инкубации, т.е. имела место зависимость экспрессии Р-селектина от времени инкубации.

Полученные данные по экспрессии Р-селектина тромбоцитами человека, инкубированных с Гц, позволяют утверждать, что Гц в концентрации 50 и 100 мкМ приводит к незначительному росту экспрессии Р-селектина, зависящему от времени инкубации.



По-видимому,  $\text{G}_{\text{II}}$  не приводит к существенной деградации тромбоцитов. В связи с этим интересно отметить, что более сильный восстановитель дитиотрейтол способен в отсутствие индукторов вызывать медленную обратимую агрегацию тромбоцитов [3].

*Влияние NEM, NEM в сочетании с  $\text{G}_{\text{II}}$  на АДФ-индуцированную агрегацию в суспензии тромбоцитов кролика и человека*

Проведенные исследования показали, что влияние N-этилмалеимида на агрегационную активность тромбоцитов в суспензии носит ингибирующий дозозависимый характер. При использовании концентрации индуктора агрегации АДФ 1,25 мкМ, обеспечивавшей ~30% агрегацию в контроле, 50% ингибирование достигалось для концентраций NEM в диапазоне 10—15 мкМ для тромбоцитов кролика (рис. 8) и 5—10 мкМ для тромбоцитов человека (рис. 9) в интервалы инкубации в пределах 15 мин. Достоверной зависимости снижения агрегационной активности тромбоцитов от времени инкубации с NEM нами не было зафиксировано. Предварительная инкубация с NEM полностью устраняет эффект увеличения агрегационной активности, индуцируемый гомоцистеином. В результате предварительной инкубации тромбоцитов с NEM и последующей с  $\text{G}_{\text{II}}$  агрегационная активность снижалась более, чем при инкубации только с NEM.

### Обсуждение

$\text{G}_{\text{II}}$  принадлежит к ряду биологически значимых низкомолекулярных тиолов. Оценки значения  $\text{pK}_a$  сульфгидрильной группы гомоцистеина находятся в диапазоне 8,7—10, и чуть менее 1% молекул гомоцистеина при физиологическом pH находится в форме тиолат-аниона. Основная форма гомоцистеина в плазме крови — смешанные дисульфиды с белками

плазмы — составляет около 70% общего гомоцистеина. Альбумин, содержащий 35 цистеиновых остатков, 34 из которых представляют собой дисульфидные межцепочечные связи, предполагается основным переносчиком тиолов в циркуляции, при этом для переноса цистеина или глутатиона в виде дисульфидов задействуется единственный свободный цистеин в N-концевой части альбумина в позиции 34 [6]. При метиониновой и гомоцистеиновой нагрузках у здоровых добровольцев, белок-связанный цистеин замещался гомоцистеином [6]. Считается, что в этом случае имеет место реакция тиол-дисульфидного обмена, в процессе которого тиолат-анион гомоцистеина атакует белок-связанный цистеин с формированием смешанного дисульфида гомоцистеин-альбумин и высвобождением тиолат-аниона цистеина. Так как тиолат-анион гомоцистеина обладает большей нуклеофильностью, равновесие реакции сдвинуто в сторону образования белок-связанного гомоцистеина. Эта модель соответствует ситуации в физиологических условиях, где в циркуляции большая часть гомоцистеина находится в связанном с белком виде на фоне относительно высокой концентрации свободного восстановленного цистеина.

Растущее количество исследований указывает на важную роль тиоловых групп и дисульфидных связей в сложном динамическом процессе, регулирующем функции белков и клетки в целом. В процессе активации тромбоцитов ряд дисульфидных связей поверхностных белков восстанавливается в сульфгидрильные группы [5, 10]. Предположено, что процесс модификации сульфгидрильных групп и дисульфидных связей может активно модулироваться тромбоцитами — плазматическая мембрана тромбоцитов содержит элементы электронотранспортной цепи, способной восстанавливать дисульфидные связи [11, 12]. В ряде недавних работ на поверхности тромбоцитов были обнаружены не только белки из семейства протеиндису-

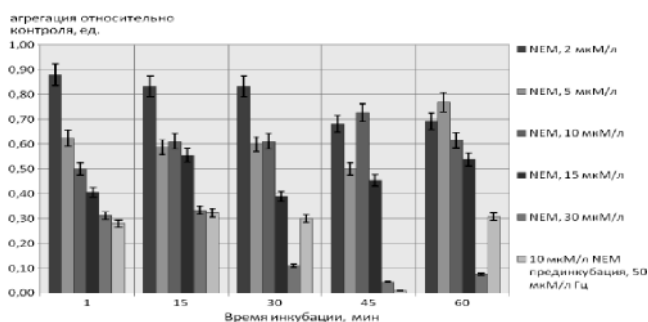


Рис. 8. АДФ-индуцированная (АДФ 1,25 мкМ) агрегация при инкубации разной продолжительности суспензии тромбоцитов кролика с различными концентрациями N-этилмалеимида NEM, а также прединкубации с NEM и последующей инкубацией с гомоцистеином

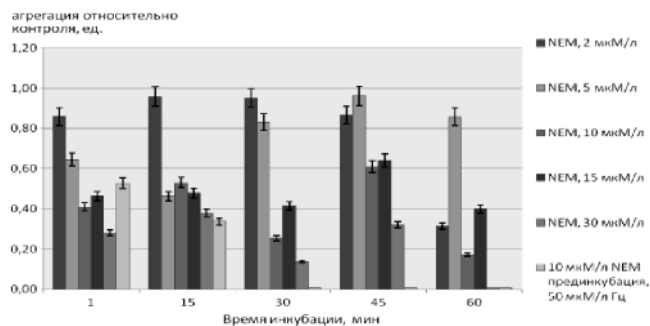


Рис. 9. АДФ-индуцированная (АДФ 1,25 мкМ) агрегация при инкубации разной продолжительности суспензии тромбоцитов человека с различными концентрациями N-этилмалеимида NEM, а также прединкубации с NEM и последующей инкубацией с  $\text{G}_{\text{II}}$

льфоизомераз, но и оксидоредуктаза Ego1, а также шаперон HSPA5. Физиологические концентрации низкомолекулярных тиолов потенцируют активацию тромбоцитов путем генерации вицинальных, т.е. стерически близких, тиоловых групп из редокс-чувствительных дисульфидных связей [10]. Таким образом, регуляция окислительно-восстановительного баланса, включая процессы окисления-восстановления дисульфидных связей, выполняющие и сигнальные функции, является важным элементом межклеточных взаимодействий в системе гемостаза.

В нашей работе действие Гц на агрегацию тромбоцитов заключалось преимущественно в дозозависимом росте агрегационной активности тромбоцитов кролика с максимумом для времени инкубации 45 мин в PRR. В WP и PRR агрегационная активность тромбоцитов уже при 5-минутной инкубации была достоверно выше контроля. Это может быть обусловлено, в частности, разрывом аллостерических дисульфидных связей фракцией восстановленного Гц и активацией ряда белков, участвующих в адгезии. При более длительных инкубациях с избытком Гц в суспензии дальнейшего роста активности не происходило. По-видимому, после добавления в плазму Гц (восстановленной формы) в сравнительно высокой концентрации происходит быстрое связывание Гц с альбумином, что снижает концентрацию свободного Гц. Отсроченный пик роста агрегационной активности тромбоцитов в плазме может быть обусловлен вторичными изменениями редокс-статуса тиолов в плазме и тиоловых групп на поверхности тромбоцитов. Так, например, тиолат-анион альбумина, образуемый в результате диссоциации сульфгидрильной группы Cys34, рКа которой составляет 5,0 [21], может взаимодействовать с гомоцистином или Гц-цистеин смешанным дисульфидом с образованием белок-связанного Гц. Таким образом, сложный характер зависимости агрегационной активности тромбоцитов в богатой плазме может быть обусловлен протекающими с разными скоростями реакциями тиол-дисульфидного обмена между смешанными дисульфидами, гомоцистином, гомоцистеином, альбумином, поверхностными белками тромбоцитов, что приводит к изменениям окислительно-восстановительного баланса микроокружения тромбоцитов.

Кроме того, побочными продуктами окисления Гц могут быть активные формы кислорода (АФК) [15]. Различия между АДФ-индуцированной агрегацией тромбоцитов в PRR и WP в присутствии Гц могут быть обусловлены окисленными ЛПНП [1, 7]. Рост агрегационной активности при инкубации с Гц был более выражен у тромбоцитов кролика по сравнению с тромбоцитами человека, и характерен для невысоких концентраций Гц.

В нашем исследовании мы показали, что NEM дозозависимо ингибирует агрегацию тромбоцитов, индуцированную АДФ. Известно, что NEM эффективно блокирует сульфгидрильные группы, что, по-видимому, в данном случае приводит к исключению части тиолов из процессов адгезии и агрегации и соответствующему снижению агрегационной активности. В ряде других работ обнаружены сходные эффекты NEM, в частности, при использовании в качестве индуктора тромбина [14]. Предварительная инкубация с NEM полностью устраняет эффект увеличения агрегационной активности, индуцируемый Гц. Следует отметить, что расположение пика агрегационной активности на временной шкале практически не зависит от концентрации Гц в плазме, т.е. временные максимумы агрегационной активности тромбоцитов для концентраций 10, 50 и 100 мкМ достаточно близки. Для объяснения этого явления требуется проведение дополнительных исследований. Необходимо отметить, что зависимости влияния NEM на агрегационную активность тромбоцитов от времени инкубации с NEM нами достоверно не зафиксировано для использованного диапазона концентраций NEM.

Наблюдаемое увеличение агрегационной активности тромбоцитов при инкубации с Гц может быть связано с его участием в реакциях тиол-дисульфидного обмена с рядом поверхностных белков. В исследовании [16] показано, что восстановитель дитиотрейтол усиливал агрегацию тромбоцитов, индуцированную АДФ или коллагеном. Дозозависимый эффект Гц на агрегацию был отмечен нами и в случае индукции тромбином в суспензии тромбоцитов. Это может указывать на возможное модулирование ряда рецепторов тромбоцитов, участвующих в адгезии и агрегации, в частности,  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, GPVI [16].

Сравнение агрегационной активности при индукции АДФ и тромбином в суспензии тромбоцитов кролика показывает, что в течение 120 мин клетки остаются функционально состоятельными, а существенно снижается только АДФ-индуцированная активность. Дозозависимое снижение чувствительности тромбоцитов к АДФ на более поздних сроках инкубации при инкубации WP с Гц может быть связано с инактивацией рецептора к АДФ. В данном случае нельзя исключать окислительно-восстановительный механизм модификации рецепторов к АДФ. Рецепторы типа P2Y имеют ряд дисульфидных связей и сульфгидрильных групп. В частности, наиболее представленный среди P2Y рецепторов вид P2Y<sub>12</sub> имеет тиоловые группы у Cys17 и Cys270, являющиеся мишенями для соединений, реагирующих с тиоловыми группами.

Характер изменения агрегационной активности в PRR и в WP, индуцированной тромбином, в присут-

ствии Гц (постепенное достижение максимума и последующее постепенное снижение — рис. 4) позволяет предположить дополнительные возможные механизмы снижения агрегации — постепенное ингибирование активности  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азы [23], а также дисфункция эндоплазматического ретикулаума тромбоцитов [26].

Таким образом, в нашей работе впервые показана двухфазная временная зависимость агрегации тромбоцитов, опосредованной активацией рецептора к АДФ, при инкубации с Гц *in vitro*, которая носит выраженный дозависимый характер. Кроме перечисленных для интерпретации возможных механизмов, нельзя исключать и другие, преимущественно отсроченные и не опосредованные рецепторами эффекты Гц на функциональное состояние тромбоцитов. Они могут быть обусловлены внутриклеточными процессами, которые меняют активность рецепторов, ионных каналов и других сигнальных белков [1, 9]. Наши результаты, а также анализ литературных данных свидетельствуют в большей степени о многофакторном характере влияния Гц на функциональное состояние тромбоцита.

Интересно отметить, что при использовании более высоких доз индукторов агрегации, как АДФ, так и тромбина, различия агрегационной активности тромбоцитов в опытных и контрольных образцах были менее выражены (данные не приводятся), что позволяет рекомендовать низкие дозы индукторов для исследования действия Гц на тромбоциты.

### Список литературы

1. **Бочков В.Н., Ткачук В.А.** Влияние липопротеидов на системы передачи регуляторных сигналов в тромбоцитах и клетках сосудистой стенки // Рос. Физиол. Журн. им. Сеченова. — 2005. — Т. 91, №1. — С. 12—30.
2. **Иванов А.В., Лузянин Б.П., Московцев А.А., Поткина А.С., Кубатиев А.А.** Определение содержания общего гомоцистеина в плазме крови методом капиллярного электрофореза с масс-спектрометрическим детектированием // Аналитическая химия. — 2011. — Т. 3. — С. 317—321.
3. **Austin R.C., Lentz S.R., Werstuck G.H.** Role of hyperhomocysteinemia in endothelial dysfunction and atherothrombotic disease // Cell Death Differ. — 2004. — Vol. 11, №7. — Suppl. 1. — P. 56—64.
4. **Bocci V., Valacchi G., Corradeschi F., Aldinucci C., Silvestri S., Paccagnini E., Gerli R.** Studies on the biological effects of ozone. Generation of reactive oxygen species (ROS) after exposure of human blood to ozone // J. Biol. Regul. Homeost. Agents. — 1998. — Vol. 12, №3. — P. 67—75.
5. **Burgess J.K., Hotchkiss K.A., Suter C., Dudman N.P., Szollosi J., Chesterman C.N., Chong B.H., Hogg P.J.** Physical proximity and functional association of glycoprotein Iba and protein-disulfide isomerase on the platelet plasma membrane // J. Biol. Chem. — 2000. — Vol. 275. — P. 9758—9766.
6. **Carmel R., Jacobsen D.W.** Homocysteine in Health and Disease // Cambridge University Press. — 2001. — P. 510.
7. **Coppola A., Davi G., De Stefano V., Mancini F.P., Cerbone A.M., Di Minno G.** Homocysteine, coagulation, platelet function, and thrombosis // Semin. Thromb. Hemost. — 2000. — Vol. 26, №3. — P. 243—254.
8. **Dardik R., Varon D., Tamarin I., Zivelin A., Salomon O., Shenkman B., Savion N.** Homocysteine and oxidized low density lipoprotein enhanced platelet adhesion to endothelial cells under flow conditions: distinct mechanisms of thrombogenic modulation // Thromb Haemost. — 2000. — Vol. 83, №2. — P. 338—344.
9. **Essex D.W., Li M.** Redox modification of platelet glycoproteins // Curr. Drug Targets. — 2006. — Vol. 7, №10. — P. 1233—1241.
10. **Essex D.W., Li M.** Redox control of platelet aggregation // Biochemistry. — 2003. — Vol. 42. — P. 129—136.
11. **Essex D.W., Li M., Feinman R.D., Miller A.** Platelet surface glutathione reductase-like activity // Blood. — 2004. — Vol. 104. — P. 1383—1385.
12. **Gitler C., Zarmi B., Kalef E.** Use of cationic detergents to enhance reactivity of protein sulfhydryls // Methods Enzymol. — 1995. — Vol. 251. — P. 366—375.
13. **Jakubowski H.** The molecular basis of homocysteine thiolactone-mediated vascular disease // Clin. Chem. Lab. Med. — 2007. — Vol. 45, №12. — P. 1704—1716.
14. **Leoncini G., Signorello M.G.** N-ethylmaleimide inhibition of thrombin-induced platelet aggregation // Biochem. Pharmacol. — 1999. — Vol. 58. — P. 1293—1299.
15. **Margalit M., Attias E., Attias D., Elstein D., Zimran A., Matzner Y.** Effect of ozone on neutrophil function in vitro // Clin. Lab. Haematol. — 2001. — Vol. 23, №4. — P. 243—247.
16. **Margaritisa A., Prioraa R., Frosali S., Giuseppa D., Summaa D., Coppoa L., Stefanob A., Simplicioa P.** The role of protein sulfhydryl groups and protein disulfides of the platelet surface in aggregation processes involving thiol exchange reactions // Pharmacological Research. — 2011. — Vol. 63. — P. 77—84.
17. **Mutus B., Rabini R.A., Staffolani R., Ricciotti R., Fumelli P., Moretti N., Martarelli D., Mazzanti L.** Homocysteine-induced inhibition of nitric oxide production in platelets: a study on healthy and diabetic subjects // Diabetologia. — 2001. — Vol. 44, №8. — P. 979—982.
18. **Nightingale A.K., James P.P., Morris—Thurgood J., Harrold F., Tong R., Jackson S.K., Cockcroft J.R., Frenneaux M.P.** Evidence against oxidative stress as mechanism of endothelial dysfunction in methionine loading model // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. — 2001. — Vol. 280, №3. — P. H1334—9.
19. **Olas B., Kedzierska M., Wachowicz B.** Comparative studies on homocysteine and its metabolite-homocysteine thiolactone action in blood platelets *in vitro* // Platelets. — 2008. — Vol. 19, №11. — P. 520—527.
20. **Riba R., Nicolaou A., Troxler M., Homer-Vaniasinkam S., Naseem K.M.** Altered platelet reactivity in peripheral vascular disease complicated with elevated plasma homocysteine levels // Atherosclerosis. — 2004. — Vol. 175, №7. — P. 69—75.
21. **Sengupta S., Chen H., Togawa T., DiBello P.M., Majors A.K., Budy B., Ketterer M.E., Jacobsen D.W.** Albumin thiolate anion is an intermediate in the formation of albumin-S-homocysteine // J. Biol. Chem. — 2001. — Vol. 276. — P. 30111—30117.
22. **Signorello M.G., Pascale R., Leoncini G.** Effect of homocysteine on arachidonic acid release in human platelets // Eur. J. Clin. Invest. — 2002. — Vol. 32, №4. — P. 279—284.

23. *Stefanello F.M., Franzon R., Wannmacher C.M., Wajner M., Wyse A.T.* In vitro homocysteine inhibits platelet  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase and serum butyrylcholinesterase activities of young rats // *Metab. Brain Dis.* — 2003. — Vol. 18, №4. — P. 273–280.

24. *Zaichko N.V., Pentiuk O.O., Karbovs'kyi V.L.* Effect of homocysteine, cysteine, and their derivatives on the platelet link of hemostasis system // *Ukr. Biokhim. Zh.* — 2007. — Vol. 79, №5. — P. 122–132.

25. *Zanin R.F., Campesato L.F., Braganhol E., Schetinger M.R., Wyse A.T., Battastini A.M.* Homocysteine decreases extracellular nucleotide hydrolysis in rat platelets // *Thromb Res.* — 2010. — Vol. 125, №3. — P. 87–92.

26. *Zbidi H., Redondo P.C., Lopez J.J., Bartegi A., Salido G.M., Rosado J.A.* Homocysteine induces caspase activation by endoplasmic reticulum stress in platelets from type 2 diabetics and healthy donors // *Thromb Haemost.* — 2010. — Vol. 3, 103, №5. — P. 1022–1032.

27. *Zhang L., Zhang G.* Thrombosis induced by homocysteine does not depend on platelet aggregation or heparin cofactor's antithrombin activity // *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao.* — 1999. — Vol. 24, №4. — P. 309–312, 340.

Поступила 01.03.12

#### Сведения об авторах:

*Романова Елизавета Петровна*, канд. биол. наук, вед. научн. сотр. лаб. молекулярных механизмов тромбогенеза и тромболизиса ФГБУ «НИИОПП» РАМН

*Московцев Алексей Алексеевич*, канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник лаб. молекулярных механизмов тромбогенеза и тромболизиса ФГБУ «НИИОПП» РАМН

*Кубатиев Аслан Амирханович*, д-р мед. наук, проф., акад. РАМН, зав. лаб. молекулярных механизмов тромбогенеза и тромболизиса, дир. ФГБУ «НИИОПП» РАМН