

УДК 616-005.1-08:616.153.922

ВЛИЯНИЕ КОБАЛАМИНА НА ГЕМОСТАЗ И ЛИПИДПЕРОКСИДАЦИЮ ПРИ ГИПЕРХОЛЕСТЕРОЛЕМИИ

**Тарасов Д.Б., Бышевский А.Ш., Волосатов А.А., Сулкарнаева Г.А.,
Шаповалов П.Я., Шаповалова Е.М., Шумкова М.В.**

*ГБОУ ВПО «Тюменская государственная медицинская академия» Минздрава России,
Тюмень, e-mail: tgma@tyumsma.ru*

Дополнительное введение высоких доз холестерина с рационом ускоряет непрерывное внутрисосудистое свертывание крови до уровня начальной стадии ДВС крови. Избыток кобаламина в дозах, адекватных малым лечебным, ограничивает эти сдвиги, а в дозах, адекватных высоким – усиливает их, и ограничивает вызываемое введением холестерина снижение толерантности к тромбину. Сдвигам скорости внутрисосудистого свертывания сопутствует ускорение липидпероксидации, снижение антиоксидантного потенциала тромбоцитов и активация фибринолиза. Всё это обуславливает необходимость изучения эффектов разных доз кобаламина на НВСК и ТкТР в клинике, особенно при состояниях с гипертромбинемией. Состояние гемостаза зависит от обеспеченности организма кобаламином, влияющим на тромбоцитопоз, активность тромбоцитов и плазминовой системы, особенно на фоне атеросклеротических изменений в сердечно-сосудистой системе.

Ключевые слова: кобаламин, гемостаз, липидпероксидация, гиперхолестеролемиа

THE INFLUENCE OF KOBALAMINA ON THE HEMOSTASIS AND LIPIDPEROXIDATION BEI HYPERCHOLESTEROLEMIA

**Tarasov D.B., Byshevskii A.S., Volosatov A.A., Sulkarnaeva G.A., Shapovalov P.I.,
Shapovalova E.M., Shumkova M.V.**

*GBOU VPO «Tyumen State Medical Academy of the Ministry of Health of Russia»,
Tyumen, e-mail: tgma@tyumsma.ru*

Additional introduction of high doses of cholesterol in the diet accelerates continuous clotting the blood up to the level of the initial phase of ICE. Excess kobalamina in doses appropriate to the small therapeutic limits these shifts, and at doses of adequate high-makes them and limit caused by the introduction of cholesterol reduced tolerance to trombinu. Change the speed of the intravascular coagulation now lipidperoksidacii acceleration, welcomed the antioxidant potential of tromboci and activation of fibrinolysis. All this makes it necessary to study the effects of different doses of cobalamin on NVSK and TkTR in clinic, especially in States with gipertrombinemiei. State of homeostasis of the organism depends on the availability of cobalamin affecting thrombocytopenesis, platelet activity and plasmin system, especially given the atherosclerotic changes in the cardiovascular system.

Keywords: kobalamin, hemostas, lipidperoxidation, hypercholesterolemia

Сведения о связи кобаламин-гемостаз ограничены, но позволяют утверждать:

1. Состояние гемостаза зависит от обеспеченности организма кобаламином (КБ), влияющим на тромбоцитопоз, активность тромбоцитов и плазминовой системы, особенно на фоне атеросклеротических изменений в сердечно-сосудистой системе [2, 5, 17, 18].

2. Известны заболевания, протекающие с нарушениями гемостаза и дефицитом КБ [15, 19].

3. В эксперименте и клинике выявлено влияние КБ на некоторые про- и антикоагулянты, однако неясно, как влияет дефицит или дополнительное введение КБ на гемостаз в целом [13].

4. Данные о влиянии КБ на интегральные показатели гемостаза (непрерывное внутрисосудистое свертывание крови и толерантность к тромбину) единичны [14].

Следовательно, необходимо далее изучать связи между обеспеченностью организма КБ и гемостазом, обращая внимание на эффекты его дефицита и избытка при

состояниях, протекающих с тромбофилией или кровоточивостью [14].

Цель работы – изучить влияние на НВСК, фибринолиз и толерантность к тромбину (ТкТР), на липидпероксидацию (ЛПО) и антиоксидантный потенциал (АОП) тромбоцитов при содержании животных на рационе с разными дозами КБ на фоне алиментарной гиперхолестеролемии разного уровня.

Материалы и методы исследований

Опыты провели на нелинейных белых крысах (самцы, 180 ± 16 г), получавших сбалансированный пищевой рацион [4, 9, 10, 18]. Выбор крыс связан с тем, что большинство исследований по изучению гемостаза выполняли на этих животных [17]. В атерогенный рацион входил холестерол (ХЛ) по 0,2 г на особь в сут, чему предшествовало введение 6-метилтиоурацила (0,3 мг на особь в сут, 30 дней), который нарушает обмен липидов, снижая функциональную активность щитовидной железы, что ускоряет развитие гиперхолестеролемии и атеросклеротических сдвигов у крыс, устойчивых к избыточному поступлению с пищей ХЛ [4]. Контрольные группы полу-

чали рацион питания без 6-метилтиоурацила и холестерина.

Пробы крови брали в шприц с 3,8%-м раствором цитрата натрия (9:1 по объему) из обнаженной яремной вены у наркотизированного диэтиловым эфиром животного, фиксированного на препаровочном станке. Рану закрывали 2–3 швами (кетгут). В плазме крови устанавливали уровень маркеров НВСК: продуктов деградации фибрина (ПДФ) [6], растворимых комплексов мономерного фибрина (РКМФ) [11], D-димеров («D-dimer test», Roche), фф. P₃ и P₄ в плазме по описанию [1]. Концентрацию в плазме осаждаемого тромбином фибриногена (ФГ) определяли спектрофотометрически [5], а Хагеман-зависимый фибринолиз по описанию [3]. Толерантность к тромбину (ТкТР) устанавливали согласно патенту [7]. Липидпероксидацию (ЛПО) в тромбоцитах и их антиоксидантный потенциал (АОП) оценивали, определяя уровень диеновых конъюгатов (ДК) и продуктов, реагирующих с тиобарбитуратом (ТБК), период индукции (ПИ) и скорость окисления (СО) устанавливали по описанию [12] на флуориметре «Биан 130». Число *n* составляло 8–9 во всех группах и этапах.

Статистический анализ проводили с помощью медико-биологической программы Biostat 4.03 [8], используя вариационную статистику для малых рядов, вычисляя среднюю арифметическую, среднюю ошибку, среднеквадратическое отклонение, доверительный коэффициент Стьюдента и степень вероятности (*p*). Различия считали достоверными при значениях степени вероятности < 0,05.

Использованы: тромбин, фибриноген (ФГ) бычьей крови, тромбопластин, каолин и буфер Михазлиса («Технология-стандарт»), набор «D-dimer test» («Roche»), изопропанол, хлорбензол, бутанол и кальция хлорид х.ч., цианкобаламин (ЗАО «Уфавит»),

казеин и крахмал маисовый пищевой, масло подсолнечное рафинированное, смесь Осборна-Менделя (все реагенты х.ч.реагенты), ледяная уксусная кислота, концентрированная серная кислота, уксусный ангидрид, абсолютный этанол. Число *n* во всех группах крыс равно 8.

Результаты исследований и их обсуждение

Вначале изучили эффекты возрастающих доз ХЛ на НВСК, фибринолиз и ТкТР на фоне рациона с кобаламином в соответствии с суточной потребностью (1 мкг/кг – полноценный рацион). Подопытные группы получали ХЛ по 0,2, 0,4 или 0,8 г/кг в сут, пробы брали в конце 6-й и 8-й недели. Из данных таблицы следует, что введение ХЛ (0,2 г/кг) заметно повышает уровень всех плазменных маркеров НВСК (наименьшая доза, используемая при оценке влияния ХЛ на атерогенез) к концу 6-й и особенно 8-й недели. Активность фибринолиза не меняется, а ТкТР падает к концу опыта. Увеличение дозы ХЛ в рационе сопровождается пропорциональным ускорением НВСК (выше доза – выше уровни всех маркеров), снижается уровень ФГ, что указывает на его ускоренное потребление, усиливающееся с дозой ХЛ.

Падает и ТкТР, а фибринолиз меняется мало. Уровень липидпероксидов с увеличением дозы ХЛ и длительности введения также повышается, а АОП, напротив, падает.

Изменения НВСК, фибринолиза, ТкТР, ЛПО и АОП при введении возрастающих доз холестерина (0,2, 0,4 или 0,8 г/кг в течение 6 или 8 недель)

Показатели	Полноценный рацион без ХЛ	Тот же рацион с ХЛ (0,2 г, 0,4 и 0,8 в сут) в строках 1, 3 и 3-й через:	
		6 недель	8 недель
1	2	3	4
Ф, P ₃ , %	87,9 ± 1,2	101 ± 1,8* 112 ± 1,9* 122 ± 2,3* 101 ± 1,8*	122 ± 1,8*» 127 ± 1,9*» 134 ± 2,2*»
Ф, P ₄ , с	3,1 ± 0,02	6,2 ± 0,04* 7,9 ± 0,05* 8,8 ± 0,04*	8,2 ± 0,05*» 8,9 ± 0,03*» 10,2 ± 0,06*»
ФГ, г/л	2,1 ± 0,02	1,7 ± 0,08* 1,6 ± 0,04* 1,4 ± 0,09*	1,5 ± 0,08*» 1,3 ± 0,03*» 1,2 ± 0,02*»
ПДФ, мг%	15,1 ± 0,3	19,7 ± 1,1* 23,7 ± 1,4* 29,7 ± 1,8*	23,7 ± 1,4*» 25,7 ± 1,5*» 29,8 ± 1,7*»
РКМФ, мкг/мл	24,1 ± 1,1	31,1 ± 1,2* 35,2 ± 1,4* 41,0 ± 1,8*	31,1 ± 1,2* 38,8 ± 1,3* 40,9 ± 1,6*
D-Д, мкг/мл	0,20 ± 0,008	0,29 ± 0,004* 0,35 ± 0,003* 0,40 ± 0,005*	0,34 ± 0,006*» 0,42 ± 0,007*» 0,54 ± 0,010*»
Фибринолиз, мин	8,5 ± 0,03	9,1 ± 0,09 10,8 ± 0,06 12,3 ± 0,11	9,9 ± 0,09* 11,4 ± 0,11* 13,8 ± 0,09*

Окончание таблицы

1	2	3	4
ТкТР, %	100 ± 2,9	80,3±1,2* 75,7±1,9* 69,3±2,2*	72,3±1,2*» 65,3±1,5*» 54,3±1,8*»
ДК, мг ЛП	0,051 ± 0,002	0,067 ± 0,006* 0,067 ± 0,006* 0,067 ± 0,006*	0,073 ± 0,008*» 0,088 ± 0,006*» 0,093 ± 0,009*»
ТБК, ед./мг ЛП	0,70 ± 0,03	0,85 ± 0,04* 0,85 ± 0,04* 0,85 ± 0,04*	0,93 ± 0,03*» 1,53 ± 0,04*» 1,70 ± 0,06*»
ПИ, мин/мл	45,7 ± 1,1	34,3 ± 1,1* 34,3 ± 1,1* 34,3 ± 1,1*	27,3 ± 1,0*» 29,8 ± 1,1*» 32,4 ± 1,2*»
СО ₂ , мм ³ /мл/мин	0,75 ± 0,02	0,87 ± 0,05* 0,87 ± 0,05* 0,87 ± 0,05*	1,26 ± 0,08*» 1,44 ± 0,09*» 1,97 ± 0,10*»

Во 2-й группе опытов изучали влияние ХЛ на те же показатели, увеличивая дозу КБ в рационе и длительность опыта (6 и 8 недель крысы получали ХЛ в дозах 0,4; 0,6 или 0,8 г на особь в сут на фоне КБ в дозах, превышающих суточную потребность в 2, 8 или 16 раз).

И в этом случае подтвердилось свойство ХЛ ускорять НВСК – достоверно вырос уровень в плазме маркеров НВСК и выявилось, что введение КБ при всех испытанных дозах ХЛ ограничивает эффекты липида на НВСК и ТкТР, а фибринолиз активируется при 8- и 16-кратной дозе КБ. Скорость ЛПО под влиянием КБ уменьшалась, а АОП возрастал.

Заключая, выделим основные положения:

1. Высокие дозы ХЛ в полноценном рационе ускоряют НВСК до степени, которую можно рассматривать как начальную стадию ДВС крови.

2. Избыток КБ в дозах, адекватных малым лечебным, ограничивает эти сдвиги, а в дозах, адекватных высоким лечебным, усиливает их, и независимо от дозы ограничивает вызываемое введением холестерина снижение толерантности к тромбину.

3. Сдвигам скорости НВСК при гиперхолестеринемии сопутствуют ускорение ЛПО, снижение антиоксидантного потенциала тромбоцитов и активация фибринолиза.

Список литературы

1. Лабораторные методы исследования системы гемостаза / В.П. Балуда, З.С. Баркаган, Е.Д. Гольдберг и др. – Томск, 1980. – 310 с.
2. Баркаган З.С., Рудницкая Т.А., Колпаков М.А. Нарушение обмена гомоцистеина у больных сахарным диабетом 2 типа / Тромбоз, гемостаз и реология. – 2006. – № 3(27). – С. 20–24
3. Баркаган З.С., Момот А.П. Основные методы лабораторной диагностики нарушений системы гемостаза. – Барнаул, 1998. – С. 83–84.

4. Бышевский А.Ш. Витамины и гемокоагуляция. – Свердловск: Средне-Уральское книжное издательство, 1978. – 124 с.

5. Бышевский А.Ш., Мохнатов В. Метод определения антиплазмينا в сыворотке крови / Система свертывания крови и фибринолиза. – Киев: Здоровья. – 1969. – С. 220–221.

6. Бышевский А.Ш. Способ определения содержания продуктов деградации фибрина: а.с. № 1659855, регистрация 1.03. 1991, публикация – Бюлл. № 24, 30.06. 1991.

7. Бышевский А.Ш. Способ определения толерантности животных к тромбину / А.Ш. Бышевский, Л.В. Михайлова, Р.Г.Алборов и др. // Патент № 2219546, приоритет от 04.05.2000, зарегистрирован в Госреестре изобретений РФ 20.12.2003.

8. Гланц С.А. Медикобиологическая статистика. – М.: Практика, 1998. – 112 с

9. Кудряшов Б.А. Биологические проблемы регуляции жидкого состояния крови. – М.: Медицина. – 1975. – 488 с.

10. Лавров Б.А., Терентьева Е.Л. Содержание лимонной кислоты в крови крыс при длительной даче больших доз витамина Д // Вопр. питания. – 1963. – № 3. – С. 68–72.

11. Момот А.П., Елькомов В.А., Баркаган З.С. Методика и клиническое значение фенантролинового теста // Клин. лабор. Диагностика. – 1999. – № 4. – С. 17–20.

12. Комплексный анализ липидов крови спектрофотометрическим, флуорометрическим и кинетическим методами / В.Н. Ушкалова, Н.В. Иоанидис, З.М. Деева и др. // Лаб. дело. – 1987. – № 6. – С. 446–460.

13. Шараев П.Н. Витамины и здоровье. – Ижевск: Экспертиза, 2004. – 108 с.

14. Шаповалова Е.А. Механизмы гемостатических сдвигов при отсутствии и избытке витаминов с антиоксидантными свойствами в рационе питания (экспериментальное исследование): автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Челябинск, 2010. – 48 с.

15. Cetin O, Bekpinar, Unlucerci Y.e.a. Hyperhomocysteinemia in chronic renal failure patients: relation to tissue factor and platelet aggregation // Clin. Nephrol. – 2006. – № 65(2). – P. 97–102.

16. Hawk P.W. Practical Physiological Chemistry // Pract. Physiol. Chem. – Phyladelphia. – 1923. – P. 953.

17. Herrmann W., Schorr H., R Obeid e.a. Vitamin B12-status, particularly holotranscobalamin II and methylmalonic acid concentrations, and hyperhomocysteinemia in vegetarians // Am. J. Clin. Nutr. – 2003. – № 78(1). – P. 131–136.

18. Morel C.F., Lerner J.P., Rosenblatt D.S. Combined methylmalonic aciduria and homocystinuria (cblC): phenotype-

genotype correlations and ethnic-specific observations // *Mol. Genet. Metab.* – 2006. – № 88(4). – P. 315–421.

19. Nadir Y., Hoffman R, Brenner B. Association of HC, vitamin B12, folic acid in patients with a thrombotic event or recurrent fetal loss // *Ann. Hematol.* – 2007. – № 86 (1). – P. 35–40.

References

1. Baluda V.P., Barkagan Z.S., Gol'dberg E.D. i dr. Laboratornye metody issledovaniya sistemy gemostaza. Tomsk. 1980. 310 p.

2. Barkagan Z.S., Rudnickaja T.A., Kolpakov M.A. Narushenie obmena gomocisteina u bol'nyh sahar-nym diabetom 2 tipa / *Tromboz, gemostaz i reologija.* 2006. no. 3(27). pp. 20–24.

3. Barkagan Z.S., Momot A.P. Osnovnye metody labora-tornoj diagnostiki narushenij sistemy gemostaza. Barnaul. 1998. pp. 83–84

4. Byshevskij A.Sh. Vitaminy i gemokoagulacija. Sverdlovsk: Sredne-Ural'skoe knizhnoe izdatel'stvo. 1978. 124 p.

5. Byshevskij A.Sh., Mohnatov V. Metod opredelenija antiplazmina v syvorotke krovi / *Sistema svertyvaniya krovi i fibrinoliza.* Kiev: Zdorov'ja. 1969. pp. 220–221.

6. Byshevskij A.Sh. A.S. «Sposob opredelenija sodержaniya produktov degradacii fibrina» № 1659855, registracija 1.03. 1991, publikacija *Bjull.* no. 24, 30.06. 1991.

7. Byshevskij A.Sh. Sposob opredelenija tolerantnosti zhivotnyh k trombinu / A.Sh. Byshevskij, L.V. Mihajlova, R.G. Alborov i dr. // Patent no. 2219546, prioritet ot 04.05.2000, zaregistrirovann v Gosreestre izobretenij RF 20.12.2003.

8. Glanc S.A. Medikobiologicheskaja statistika // M.: Praktika. 1998. 112 p.

9. Kudrjashov B.A. Biologicheskie problemy reguljacii zhidkogo sostojaniya krovi. M.: Medicina. 1975. 488 p.

10. Lavrov B.A., Terent'eva E.L. Soderzhanie limonnoj kisloty v krovi krysa pri dlitel'noj dache bol'shih doz vitamina D. *Vopr. Pitaniya.* 1963. no. 3. pp. 68–72.

11. Momot A.P., Elykomov V.A., Barkagan Z.S. Metodika i klinicheskoe znachenie fenantrolinovogo testa / A.P. Momot, *Klin. labor. Diagnostika.* 1999. no. 4. pp. 17–20

12. Ushkalova V.N., Ushkalova, Ioanidis N.V. Deeva Z.M. i dr. Kompleksnyj analiz lipidov krovi spektrofotometricheskim, fluorometricheskim i kineticheskim metodami / *Lab. delo.* 1987. no. 6. pp. 446–460.

13. Sharaev P.N. Vitaminy i zdorov'e / P.N. Sharaev // *Izhevsk: «Jekspertiza».* 2004. 108 p.

14. Shapovalova E.A. Mehanizmy gemostaticeskikh sdvigo-v pri otsutstvii i izbytkе vitaminov s antioksidantymi svoystva-mi v racione pitaniya (jeksperimental'noe issledovanie): Avtoref. dis. ... dokt. biol. nauk, Cheljabinsk, 2010. 48 p.

15. Cetin O. Bekpinar, Unlucerci Ye.a. Hyperhomocysteinemia in chronic renal failure patients: relation to tissue factor and platelet aggregation / *Clin. Nephrol.* 2006. no. 65(2). pp. 97–102.

16. Hawk P.W. *Practical Physiological Chemistry / Pract. Physiol. Chem.* – Philadelphia. 1923. pp. 953.

17. Herrmann W., Schorr H., R Obeid e.a. Vitamin B₁₂-status, particularly holotranscobalamin II and methylmalonic acid concentrations, and hyperhomocysteinemia in vegetarians / *Am. J. Clin. Nutr.* 2003 no. 78(1). pp. 131–136.

18. Morel C.F., Lerner J.P., Rosenblatt D.S. Combined methylmalonic aciduria and homocystinuria (cblC): phenotype-genotype correlations and ethnic-specific observations / *Mol. Genet. Metab.* 2006. no. 88(4). pp. 315–421.

19. Nadir Y., Hoffman R, Brenner B. Association of HC, vitamin B₁₂, folic acid in patients with a thrombotic event or recurrent fetal loss / *Ann. Hematol.* 2007. no. 86 (1). pp. 35–40.

Рецензенты:

Ральченко И.В., д.б.н., профессор кафедры фармацевтической технологии и фармакогнозии с курсом ботаники ГБОУ ВПО ТюмГМА Минздравсоцразвития России, г. Тюмень №

Цейликман В.Э., д.б.н., профессор, зав. кафедрой биохимии ГБОУ ВПО «Челябинская медицинская академия» Минздравсоцразвития России, г. Челябинск.

Работа поступила в редакцию 12.12.2012.