Экспериментальные статьи

ΥΔΚ 612.015.32:612 615

АЛЕКСАНДРОВА Л. А.^{1,2}, МИРОНОВА Ж. А.¹, АГАФОНОВА Ю. И.¹, ФИЛИППОВА Н. А.¹,ТРОФИМОВ В. И.¹

Состояние системы глутатиона в эритроцитах у пациентов с пароксизмальной ночной гемоглобинурией

¹ Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова, 197022/1, ул. Льва Толстого 6-8, Санкт-Петербург, Россия ² Северо-Западный федеральный медицинский центр им. Вю А. Алмазова 197341, Россия, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, 2 e-mail: laa2004@mail.ru

Реферат

Введение. Процессы свободно-радикального окисления вовлечены в развитие воспаления и нарушение гемостаза при пароксизмальной ночной гемоглобинурии (ПНГ). Мы предположили, что при ПНГ может страдать GSH-зависимая система антиоксидантной защиты, провоцируя обострение воспалительного процесса сосудов и активацию внутрисосудистого свертывания и фибринолиза (АВСФ).

Материал и методы исследования. Было обследовано 63 пациента с ПНГ и 75 здоровых людей. Определяли концентрацию GSH, активность глутатионпероксидазы (ГПО), глутатионредуктазы (ГР) и супероксиддисмутазы (СОД) в эритроцитах.

Результаты исследования. При сравнении со здоровыми людьми, у больных с ПНГ наблюдалось угнетение метаболизма глутатиона и признаки оксидативного стресса, выражавшиеся в значительном снижении уровня GSH и активности антиоксидантных ферментов ГПО, ГР и СОД в эритроцитах. Корреляционный анализ с применением критерия Спирмена выявил у больных с ПНГ значимую положительную корреляцию между активностью ГР и ГПО (R = 0,376; p<0,01) в эритроцитах, а также слабую отрицательную связь (R= −0,338; p<0,05) между активностью ГПО в эритроцитах и концентрацией Д-димеров в плазме крови. Установлена положительная (R=0,626; p<0,001) связь между уровнем GSH в эритроцитах и концентрации СРБ в плазме при значениях концентрации СРБ в диапазоне референсного интервала.

Выводы. Результаты согласуются с литературными данными о нарушении метаболизма GSH при ПНГ. Показатели GSH и ГПО в эритроцитах могут рассматриваться как потенциальные маркеры развития АВСФ и воспалительных процессов в сосудах при ПНГ.

Ключевые слова: активация внутрисосудистого свертывания и фибринолиза, глутатион, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, эритроциты.

Введение

Пароксизмальная ночная гемоглобинурия (ПНГ) — приобретенная гемолитическая анемия, связанная с дефектом клеточных мембран, приводящим к разрушению клеток системой комплемента.

Субстратом болезни служит дефект мембраны клеток, т. е. отсутствие белков, ответственных за узнавание клеток крови собственной системой комплемента. Дефект возникает при соматической мутации PIG-А-гена, локализованного на коротком плече Х-хромосомы и кодирующего регуляторный белок, контролирующий биосинтез гликозилфосфатидилинозитола (ГФИ; «якорный» белок мембран клеток крови). Это приводит к блоку синтеза ГФИ и невозможности экспрессии на мембране целого семейства ГФИ-связанных белков и возникновению их частичного или полного дефицита. В частности, при полном или частичном отсутствии белков CD55 и CD59, ответственных за узнавание клеток крови собственной системой комплемента, существенно снижается продолжительность жизни эритроцитов, что проявляется синдромом хронического внутрисосудистого гемолиза разной степени выраженности [18]. При этом наблюдается повышенная чувствительность клеток крови к литическим действиям комплемента. С другой стороны, активация комплемента косвенно стимулирует агрегацию тромбоцитов и повышает свертываемость крови. Отсутствие других GPI белков может проявляться замедленным фибринолизом [18].

У больных ПНГ отмечаются признаки окислительного стресса (ОС), выраженные в избытке активных форм кислорода (АФК) и угнетении антиоксидантой системы (АОС) в плазме крови и в эритроцитах, как нормальных, так и мутантных клонов [12, 14], в частности, снижение концентрации восстановленного глутатиона (GSH) в CD55/CD59-негативных клетках крови [5].

Важнейшим внутриклеточным регуляторным пептидом является восстановленный глутатион (GSH). Как антиоксидант GSH является важнейшим звеном АОС, предупреждения и ограничения ОС. Гомеостаз GSH в клетке поддерживается согласо-

АЛЕКСАНДРОВА Л. А., МИРОНОВА Ж. А., АГАФОНОВА Ю. И., ФИЛИППОВА Н. А.,ТРОФИМОВ В. И.

ванным действием глутатионпероксидазы (ГПО) и глутатионредуктазы (ГР). ГПО использует GSH в качестве косубстрата для восстановления гидроперекиси и липидопероксидов. Основная функция ГР состоит в восстановлении окисленного глутатиона до сульфгидрильной формы GSH. Наряду с супероксидисмутазой (СОД), инактивирующей избыточные супероксидные анионрадикалы, ГПО и ГР входят в состав ферментативной АОС клетки.

ПНГ нередко сопровождается активацией внутрисосудистого свертывания и фибринолиза (АВСФ) и воспалением сосудов [16,19], и тромбозы часто возникают в качестве осложнений. Исследованиями последних лет установлена особая роль С-реактивного белка (СРБ) в развитии воспаления сосудов и тромбозов, и этот показатель рассматривают не только в качестве общепринятого маркера воспаления, но и в качестве прямого участника процесса [11, 15]. Показано, что СРБ является эффекторной молекулой, способной к прямой индуции пролиферации эндотелиоцитов про-атеротромботического фенотипа в стенке сосуда [22]. Увеличение уровня СРБ в плазме свыше 3-5 мг/л рассматривают как прогностический фактор в отношении развития кардиоваскулярной патологии [23] и риска развития тромбозов [24].

В предыдущих исследованиях нами были установлены интенсификация СРО и снижение АОС у больных с АВСФ различной этиологии [1,2].

Поскольку СРО вовлечено в процессы развития воспаления и нарушения гемостаза при хронических заболеваниях сосудов [12, 20, 21], мы предположили, что при ПНГ может страдать GSH-зависимая система антиоксидантной защиты, провоцируя АВСФ.

Целью исследования являлось изучение взаимосвязи метаболизма GSH эритроцитов с наличием АВСФ при ПНГ.

Материал и методы исследования

Были обследованы 63 пациента с пароксизмальной ночной гемоглобинурией, наблюдавшихся в клинике госпитальной терапии ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова в период с января 2013 по март 2015 г. Данный диагноз поставлен на основании выявления популяций клеток крови с дефицитом экспрессии ГФИ-связанных белков при помощи моноклональных антител и диагностикума FLAER методом проточной цитометрии.

Группу сравнения составили 75 здоровых лиц. Во всех случаях имелось информированное согласие обследуемых на анонимное использование полученных данных, а протокол исследования был одобрен этическим комитетом.

Как видно из данных табл. 1, в группе здоровых лиц возраст и соотношение мужчин и женщин в обеих группах было сходным. Хронический внутрисосудистый гемолиз у пациентов был обусловлен основным заболеванием — пароксизмальной ночной гемоглобинурией. Умеренное повышение билирубина за счет непрямой фракции отмечалось у 70 % пациентов. У большинства пациентов также отмечались признаки активации внутрисосудистого свертывания: уровень Д-димера был повышен у 82 % обследуемых. У 55 % пациентов выявлена тромбоэмболия ветвей легочной артерии по данным однофотонной эмиссионной компьютерной томографии с макроагрегатами альбумина сыворотки человеческой крови. Функция почек была сохранной. Следует отметить, что 29 пациентов (46 %) получали циклофосфан в анамнезе по поводу основного заболевания.

Эритроциты из образцов крови, стабилизированные цитратом, отмывали дважды холодным физиологическим раствором, замораживали и хранили в морозильной камере при $-82~^{\circ}$ С до проведения анализа. Гемолизировали пробы бидистиллированной водой в соотношении «эритроциты: H_2 O»=1:9 по объему. В 10 % гемолизатах проводили определение активности ферментов ГПО, ГР, СОД и содержания GSH. Концентрацию гемоглобина измеряли гемоглобинцианидным методом, используя наборы реагентов фирмы «Синтакон» (Россия).

В основу определения активности ГР положен спектрофотометрический метод [6]. Реакционная смесь содержала фосфатный буфер 0,05 M, pH 7,4; глутатион окисленный 0,5 мМ, NADPH 0,1 mM и 10 % гемолизат, содержащий 500–900 мкг белка в пробе. Скорость реакции измеряли в спектрофотометрической кювете при t= 37 °C в спектрофотометре СФ–2000 (ОКБ «Спектр», Россия) в программе «Кинетика». Активность фермента выражали в Ед/г НЬ, что соответствует мкмоль/мин/г гемоглобина.

Активность ГПО определяли методом [4] в нашей модификации, которая заключалась в адаптации методики фотометрирования проб к биохимическому

Клиническая характеристика обследованных лиц					
Таблица 1					
Показатель	Пациенты с ПНГ	Группа контроля			
N	63	75			
Возраст, лет	32 (28–42)	37 (32–39)			
Мужчины/женщины	18/45	30/46			
Общий билирубин, мкМ	26,7 (17,7–49,1)	<20			
Непрямой билирубин, мкМ	22,6 (14,3–39,6)	<20			
Скорость клубочковой фильтрации, мл/мин	112,8 (92,6–144,8)	>100			
Д-димер, мкг/л	395 (300–696)	<250			
С-реактивный белок, мг/л	2,00 (1,20–4,40)	<5			
Примечание: данные представлены как Me (Q1–Q3).					

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

анализатору BS 3000P («Sinnova», КНР). Активность выражали в $E_{\rm J}/\Gamma$ Hb, что соответствует (мкмоль/мин/г гемоглобина).

Определение концентрации GSH в эритроцитах проводили в безбелковых гемолизатах. Для осаждения белка к 100 мкл гемолизата добавляли 100 мкл 5 %-сульфосалициловой кислоты в пробирках Эппендорфа и центрифугировали на микроцентрифуге LV—1100 (Elmi, Latvia) 5 мин 8000 об./мин. В другие пробирки вносили 20 мкл гемолизата,1,0 мл Трис и 20 мл 10 % ДТНБ. Через 10 мин измеряли на биоанализаторе BS 3000P («Sinnova», КНР). Концентрацию выражали в мкмоль/г гемоглобина.

Активность СОД определяли в хлороформ-этанольных экстрактах эритроцитов, осаждая на холоду 10 % гемолизат в соотношении на 1 мл гемолизата 400 мкл хлороформ-этанольной смеси и 100 мкл Н₂О. Хлороформ-этанольная смесь содержала 3 объемные части хлороформа и 5 частей этанола. Реакцию проводили в спектрофотометрической кювете в натрийфосфатном буфере, рН 7,8, 0,015 М, содержащем 0,08 мМ N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамина, 0,008 мМ ЭДТА и 0,014 мМ кверцетина в объеме 2,8 мл. Объем 10 % гемолизата варьировал от 20 до 30 мкл. Скорость реакции измеряли на спектрофотометре СФ-2000 в программе «Кинетика» и рассчитывали в ед/г гемоглобина. За 1 ед. принимали 50 % ингибирование скорости основной реакции аутоокисления кверцетина.

Результаты исследования анализировали с применением статистической программы «SPSS 21» для Windows. Для определения характера распределения и описательной статистики переменных использовали одновыборочный критерий Колмогорова-Смирнова; для анализа различий между группами использовали непараметрический критерий Манна–Уитни; корреляционный анализ проводили с использованием критерия Спирмена.

Результаты исследования и их обсуждение

Статистический анализ исследуемых параметров показал, что переменные во всех группах имеют нормальное распределение, но ввиду малочисленности групп были тестированы по непараметрическим критериям. Как видно из данных табл. 2, при сравнении со здоровыми людьми у больных ПНГ наблюдалось

угнетение метаболизма глутатиона и признаки ОС, выражавшиеся в значительном снижении уровня GSH и активности антиоксидантных ферментов ГПО, ГР и СОД в эритроцитах. Различия исследованных показателей в зависимости от пола и лечения больных ПНГ не были обнаружены.

Корреляционный анализ с применением критерия Спирмена выявил в группе больных ПНГ значимую положительную корреляцию между активностью ГР и ГПО (R=0,376; p<0,01) в эритроцитах, а также слабую отрицательную связь (R=-0,338; p<0,05) между активностью ГПО в эритроцитах и концентрацией ДД в плазме крови. Кроме того, обнаружена положительная корреляция ДД с СРБ (R=0,490; p<0,001).

Согласно своему предназначению, ГПО использует GSH для восстановления пероксида водорода и липопероксидов, переводя его в окисленную форму GSSG, а ГР восстанавливает последний. Полагают, что соотношение активности этих ферментов отражает окислительно-восстановительный потенциал клетки [26] и может иметь прогностический характер.

Для выяснения взаимосвязи показателей метаболизма GSH с развитием воспалительного процесса больных распределили по критерию С-реактивного белка (СРБ) на 2 группы. В группу 1 включили пациентов ПНГ со значениями СРБ >5 мг/л, а в группу 2 больных ПНГ с концентрацией СРБ ≤5 мг/л.

Как видно из таблицы 2, у больных ПНГ в обеих группах при сравнении со здоровыми людьми значительно угнетен метаболизм глутатиона, о чем свидетельствует низкая активность ГПО и ГР. Низкая активность СОД по сравнению с контролем указывает на ослабление АОС независимо от уровня СРБ.

Уровень GSH у больных группы 2 незначительно, но достоверно отличался от контрольных величин, при этом примерно в 1,5 раза по медиане превышал этот показатель в группе 1.

В группе 1 обнаружена отрицательная корреляция уровня GSH с активностью ГР (R=-636; p<0.05) и активностью СОД (R=-0.727; p<0.05), а также положительная корреляция между концентрацией ДД и СРБ.

В группе 2 положительная корреляция между активностью ГПО и ГР (R= 0,521, p<0,001), характерная для всей выборки, в целом сохранялась. Однако связь между уровнем GSH в эритроцитах и

Содержание GSH, активность ГПО, ГР и СОД в эритроцитах у больных ПНГ и здоровых людей					
Таблица 2					
Показатель	GSH, мкмоль/г Hb	ГПО, ед/г Hb	ГР, ед∕г Hb	СОД, ед/г Hb	
ПНГ (N=63)	1,96 (1,32–2,54) *P<0,001	10,5 (7,01–12,6) *P<0,001	0,79 (0,58–1,05) *P<0,001	9,34 (3,25–14,54) *P<0,001	
Группа 1 (N= 12)	1,45 (1,09–1,85) *P<0,001	11,10 (9,44–12,19) *P<0,001	0,77 (0,54–0,97) *P<0,001	12,40 (6,28–17,36) *P<0,001	
Группа 2 (N=51)	2,18 (1,34–2,71) *P<0,01; **P<0,05	10,5 (7,6–13,1) *P<0,001	0,79 (0,58–1,1) *P<0,001	9,51(1,29–15,08) *P<0,001	
Контроль (N=75)	3,60 (2,61–4,74)	14,25 (10,9–17,98)	1,34 (1,21–1,64)	17,90 (14,65–28,5)	

Примечания: показатели выражены в Me(Q1-Q3); *P — статистическая значимость различий между показателями 1 и 2 групп с группой доноров; **P — статистическая значимость различий между показателями 1 и 2 групп.

АЛЕКСАНДРОВА Л. А., МИРОНОВА Ж. А., АГАФОНОВА Ю. И., ФИЛИППОВА Н. А.,ТРОФИМОВ В. И.

концентрации СРБ в плазме оказалась положительной (R=0,626; p<0,001) при значениях концентрации СРБ в диапазоне референсного интервала. Концентрация ДД в плазме отрицательно коррелировала с активностью ГПО в эритроцитах (R=-0,331; P<0,05) и положительно с концентрацией СРБ (R=0,358; P<0,05). Концентрация GSH, хотя и была ниже, чем у здоровых людей, но достоверно превышала этот показатель у больных группы 1.

Учитывая взаимосвязь изменения показателей GSH и CPБ, можно предположить участие глутатиона в развитии воспаления сосудов при ПНГ. В этот процесс также вовлечены ферменты ГПО и ГР, которые тесно связаны между собой и зависят от концентрации восстановленной формы GSH.

Взаимосвязь воспаления с риском возникновения тромбозов продемонстрирована при различных васкулярных заболеваниях [3, 8, 25]. У людей с факторами риска атеросклероза установлена сильная корреляция между уровенем АФК в крови и концентрацией СРБ [10]. У здоровых людей белой расы популяции Южной Африки с низкой активностью ГПО изменен гемостатический профиль, включая нарушение лизиса фибрина [17].

Корреляция ДД, общепринятого маркера АВСФ, с СРБ, маркером воспаления, в нашем исследовании при наличии связи с активностью ГПО, подтверждает вовлеченность системы глутатиона, как в процесс развития воспаления, так и возникновения тромбозов [5].

Хотя ОС, по мнению некоторых исследователей, не является этиологическим фактором ПНГ, влияние его на развитие сосудистых осложнений, в частности, гемолиза и тромбозов, существенно [5]. Механизмы патогенеза могут быть связаны как с прямым разрушительным воздействием АФК на биологические структуры, так и с нарушением сигнальных регуляторов, связанных с окислительно-восстановительными процессами в эндотелии [8, 9, 16].

Избыток АФК вызывает существенные изменения функции эндотелия сосудов: торможение эндотелийзависимой вазодилатации; увеличение синтеза адгезивных молекул, что ведет к прилипанию и проникновению моноцитов в сосудистую стенку, превращению их в макрофаги; повышение агрегации тромбоцитов и тромбообразования, характерные для ПНГ.

Устойчивое снижение АО ферментативной функции, наблюдаемое при ПНГ, независимо от того, является ли оно первичным или вторичным, нуждается в коррекции, поэтому представляются логичными исследования эффективности применения антиоксидантов при этом сложном заболевании. Сложная взаимосвязь метаболизма глутатиона с воспалительным процессом и нарушением гемостаза при ПНГ, установленная в данной работе, нуждается в детализации и дальнейших исследованиях.

Выводы

- 1. В организме больных ПНГ установлен устойчивый окислительный стресс с низкой активностью СОД, с нарушением метаболизма глутатиона, выражающимся в низкой активности ферментов ГПО и ГР, а также низком уровне восстановленной формы глутатиона GSH.
- 2. Повышение образования продуктов фибринолиза Д-димеров как маркера активации внутрисосудистого свертывания и фибринолиза коррелирует со снижением активности ГПО и повышением концентрации СРБ, что указывает на сложную взаимосвязь между процессами свободно-радикального окисления, воспаления и активации внутрисосудистого свертывания и фибринолиза.
- 3. Показатели GSH и ГПО эритроцитов могут быть потенциальными маркерами развития воспаления сосудов и активации внутрисосудистого свертывания и фибринолиза при пароксизмальной ночной гемоглобинурии.

Литература

- 1. Александрова Л. А., Жлоба А. А., Субботина Т. Ф., Маевская Е. Г. Состояние процессов свободнорадикального окисления при активации внутрисосудистого свертывания и фибринолиза // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2012. Т. 11. № 2. С. 43–46.
- 2. Александрова Л. А., Жлоба А. А., Алексеевская Е. С. Окислительный стресс при активации внутрисосудистого свертывания и фибринолиза // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2014. Т. 13. № 1. С. 79–82.
- 3. Субботина Т. Ф.,. Жлоба А. А. Гипергомоцистеинемия как фактор снижения фибринолитического потенциала при активированном внутрисосудистом свертывании // Артериальная гипертензия. 2013. Т. 19. № 5. С. 435–441.
- 4. Моин В. И. Простой и чувствительный метод определения глутатионпероксидазы в эритроцитах // Лаборат. дело. 1986. № 12. С. 724—727.
- 5. Amer J., Zelig O., Fibach E. Oxidative status of red blood cells, neutrophils, and platelets in paroxysmal nocturnal

- hemoglobinuria // Exp. Hematol. 2008. Vol. 36. № 4. P. 369–377. doi: 10.1016/j.exphem.2007.12.003. Epub 2008 Feb 8.
- 6. Buckley D. I., Fu R., Freeman M., et al. C-reactive protein as a risk factor for coronary heart disease: A systematic review and meta-analyses for the U. S. preventive services task force // Annals of Internal Medicine. 2009. Vol. 151. P. 483–495.
- 7. Carbery J., Mannervic B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver // J. Biol. Chem. 1975. Vol. 250. P. 5475–5480.
- 8. Cid M. Endothelial cell biology, perivascular inflammation, and vasculitis // Clev. Clin. J. Med. 2002. Vol. 69. Suppl. 2. P. S1145–S1149.
- 9. Day S., Duquaine D., Mundada L. et al. Chronic iron administration increases vascular oxidative stress and accelerates arterial thrombosis // Circulation. 2003. Vol. 107. P. 2601–2606. doi: 10.1161/01.CIR.0000066910.02844.
- 10. Di Napoli M., Papa F., Villa. Inflammation, hemostatic markers, and antithrombotic agents in relation to long-term

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

risk of new cardiovascular events in first-ever ischemic stroke patients // Stroke. 2002. Vol. 33. № 7. P. 1763–1771. doi: 10.1161/01.STR.0000019124.54361.08.

- 11. Fay W. P. Linking inflammation and thrombosis: Role of C-reactive protein // World J. Cardiol. 2010. Vol. 2. P. 365–369. doi: org/10.4330/wjc.v2.i11.365.
- 12. Fibach E., Rachmilewitz E. The role of oxidative stress in hemolytic anemia // Curr. Mol. Med. 2008. Vol. 8. № 7. P. 609-619. doi: 10.2174/156652408786241384.
- 13. Folsom A. R., Lutsey P. L., Astor B. C., Cushman M. C-reactive protein and venous thromboembolism. A prospective investigation in the ARIC cohort // Thromb. Haemost. 2009. Vol. 102. P. 615-619.
- 14. Ghoti H., Rosenbaum H., Fibach E., Rachmilewitz E. A. Decreased hemolysis following administration of antioxidant fermented papaya preparation (FPP) to a patient with PNH // Ann. Hematol. 2010. Vol. 89. P. 429-430.
- 15. Grad E., Pachino R. M., FitzGerald G. A., Danenberg H. D. Role of Thromboxane Receptor in C-Reactive Protein— Induced Thrombosis // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2012. Vol. 32. P. 2468–2474. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.256073.
- 16. Kim Young-Woong, Byzova T. V. Oxidative stress in angiogenesis and vascular disease // Blood. 2014. Vol. 123. № 5. P. 625–631.
- 17. Lammertyn L., Mels C. M. C., Peters M. Ethnicspecific relationships between haemostatic and oxidative stress markers in black and white South Africans: The SABPA study // Clin. Exp. Hypertens. 2015. № 28. P. 1–7. doi: 10.3109/10641963.2015.1013123.
- 18. Luzzatto L., Gianfaldoni G., Notaro R. Management of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: a personal view // British Jornal of Haematology. 2011. Vol. 153. P. 709–720.
 - 19. Martinon F. Signaling by ROS drives inflammasome

- activation // Eur. J. Immunol. 2010. Vol. 40. P. 616-619. doi: 10.1002/eji.200940168.
- 20. Nwose E., Richards R., Kerr R. et al. Oxidative damage indices for the assessment of subclinical diabetic macrovascular complications // Br. J. Biomed. Sci. 2008. Vol. 65. № 3. P. 136–141.
- 21. Nwose E., Jelinek H., Richards R. et al. Atherothrombosis and oxidative stress: the connection and correlation in diabetes // Redox Rep. 2009. Vol. 14. № 2. P. 55-60. doi: 10.1179/135100009X392458.
- 22. Pandolfi A. C-reactive protein: A potential new molecular link between inflammation,
- thrombosis and vascular cell proliferation // Cardiovascular Research. 2005. Vol. 68. P. 3–4. doi: 10.1016/j. cardiores. 2005.07.019.
- 23. Ridker P. M. C-Reactive Protein. A Simple Test to Help Predict Risk of Heart Attack and Stroke // Circulation. 2003. Vol. 108. P. 81–85. doi: 10.1161/01.CIR.0000093381.57779.67.
- 24. Roshani S., Vossen C. Y, Christiansen S. C. et al. *Inflammation markers, D-dimer and the risk of recurrent venous* thrombosis // Venous and arterial thrombosis: associations and risk factors. Department of Clinical Epidemiology, Leiden University, 2012. P. 113–132.
- 25. Tohgi H., Konno S., Takahashi S. et al. Activated coagulation/fibrinolysis system and platelet function in acute thrombotic stroke patients with increased C-reactive protein levels // Thromb Res. 2000. Vol. 100. № 5. P. 373–379. doi. org/10.1016/S0049-3848(00)00356-X.
- 26. Yang M., Chan H., Yu L. Glutathione peroxidase and glutathione reductase activities are partially responsible for determining the susceptibility of cells to oxidative stress // Toxicology. 2006. Vol. 226. № 2. P. 126–130. doi: 10.1016/j. tox.2006.06.008.

UDK 612.015.32:612 615

Alexandrova L. A.^{1,2}, , Mironova J. A.¹, Agafonova U. I.¹, Filippova N. A.¹, Trofimov V. I.¹

Glutathione metabolism of erythrocytes in the paroxysmal nocturnal hemoglobinuria

¹ First Pavlov State Medical University of St. Petersburg 197022, Lev Tolstoy str. 6-8, St. Petersburg, Russia ² Federal North-West Medical Research Centre 197341, Akkuratova str. 2, St. Petersburg, Russia e-mail: laa2004@mail.ru

Abstract

Introduction. Oxidative stress (OS) is involved in the development of vascular inflammation and hemostasis. The aim. We hypothesized that GSH-dependent antioxidant defense system may be affected in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH), causing exacerbation of inflammation and activation of intravascular coagulation and fibrinolysis (AIVCF).

Methods. The study involved 63 patients with PNH and 75 healthy people. The concentration of GSH and the activity of glutathione peroxidase (GP), glutathione reductase (GR) and superoxide dismutase (SOD) have been determined in the erythrocytes.

Results. We have demonstrated the inhibition of glutathione metabolism and signs of OS, expressed in a significant reduction in levels of GSH and decreased activity of antioxidant enzymes GP, GR and SOD in erythrocytes when compared PNH patients with healthy people. Spearman's test showed significant positive correlation between the activity of GR and GP (R = 0.376; p<0.01) in red blood cells, as well as a weak negative correlation (R = -0.338; p<0.05) between GP activity in erythrocytes and the concentration of D-dimer in the blood plasma in patients with PNH. A positive (R = 0,626; p<0,001) correlation was found between GSH in erythrocytes and plasma concentrations of CRP at CRP concentration values in the range of reference interval.

АЛЕКСАНДРОВА Л. А., МИРОНОВА Ж. А., АГАФОНОВА Ю. И., ФИЛИППОВА Н. А.,ТРОФИМОВ В. И.

Conclusion. The results are consistent with previously published data on disorders of glutathione metabolism in PNH. The indicators GSH and GP in erythrocytes can be considered as potential markers of AIVCF and vascular inflammation in PNH.

Keywords: activation of intravascular coagulation and fibrinolysis, glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione, intravascular hemolysis.

References

- 1. Alexandrova L.A., Jerk A.A., Subbotin T.F., Mayevsky E.G. Sostojanie processov svobodnoradikal'nogo okislenija pri aktivacii vnutrisosudistogo svertyvanija i fibrinoliza [Free radical oxidation process at activation of intra vascular clotting and a fibrinolysis] // Regionarnoe krovoobrashhenie i mikrocirkuljacija [Regional hemodynamics and microcirculation]. 2012. V.11. N 2. P. 43–46. [In Russian].
- 2. Aleksandrova L.A., Zhloba A.A., Alekseevskaja E.S. Okislitel'nyj stress pri aktivacii vnutrisosudistogo svertyvanija i fibrinoliza [Oxidative stress at activation of intra vascular clotting and a fibrinolysis] // Regionarnoe krovoobrashhenie i mikrocirkuljacija [Regional hemodynamics and microcirculation]. 2014. V.13. N1. P. 79–82. [In Russian].
- 3. Subbotina T.F., Zhloba A.A. Gipergomocisteinemija kak faktor snizhenija fibrinoliticheskogo potenciala pri aktivirovannom vnutrisosudistom svertyvanii [Hyperhomocisteinemia as a factor of decrease fibrinolysis at activated intra vascular clotting] // Arterial'naja gipertenzija [Arterial hypertension]. 2013. V.19. N5. P. 435–441. [In Russian].
- 4. Moin V.I. Prostoj i chuvstvitel'nyj metod opredelenija glutationperoksidazy v jeritrocitah [Simple and sensitive method of glutathione peroxidases detection in erythrocytes] // Laboratornoe Delo. [Laboratory Business]. 1986. N12. P. 724–727. [In Russian].
- 5. Amer J., Zelig O., Fibach E. Oxidative status of red blood cells, neutrophils, and platelets in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria // Exp Hematol. 2008. V. 36. N4. P. 369–377. doi: 10.1016/j.exphem.2007.12.003.
- 6. Buckley D.I., Fu R., Freeman M. et al. C-reactive protein as a risk factor for coronary heart disease: A systematic review and meta-analyses for the U.S. preventive services task force // Annals of Internal Medicine. 2009. V. 151. P. 483–495.
- 7. Carbery J., Mannervic B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver // J Biol Chem. 1975. V. 250. P. 5475 –5480.
- 8. Cid M. Endothelial cell biology, perivascular inflammation, and vasculitis // Clev Clin J Med. 2002. V. 69. Suppl.2. P. S1145–1149.
- 9. Day S., Duquaine D., Mundada L. et al. Chronic iron administration increases vascular oxidative stress and accelerates arterial thrombosis // Circulation. 2003. V.107.P. 2601–2606. doi: 10.1161/01.CIR.0000066910.02844.
- 10. Di Napoli M. and Papa F. Inflammation, hemostatic markers, and antithrombotic agents in relation to long-term risk of new cardiovascular events in first-ever ischemic stroke patients
- // Stroke. 2002. V. 33. N7. P. 1763–1771. doi:10.1161/01. STR.0000019124.54361.08.
- 11. Fay W.P. Linking inflammation and thrombosis: Role of C-reactive protein // World J Cardiol. 2010. V.2. P. 365–369. Doi: doi.org/10.4330/wjc.v2.i11.365.
- 12. Fibach E., Rachmilewitz E. The role of oxidative stress in hemolytic anemia // Curr Mol Med. 2008. V. 8. N 7. P. 609–619. doi: 10.2174/156652408786241384.

- 13. Folsom A.R., Lutsey P.L., Astor B.C., Cushman M. C-reactive protein and venous thromboembolism. A prospective investigation in the ARIC cohort // Thromb Haemost. 2009. V. 102. P. 615–619.
- 14. Ghoti H., Rosenbaum H., Fibach E., Rachmilewitz E.A. Decreased hemolysis following administration of antioxidant fermented papaya preparation (FPP) to a patient with PNH // Ann Hematol. 2010. V. 89. P. 429–430.
- 15. Grad E., Pachino R.M., FitzGerald G.A., Danenberg H.D. Role of Thromboxane Receptor in C-Reactive Protein—Induced Thrombosis // Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2012. V.32. P. 2468–2474. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.256073.
- 16. Kim Young-Woong and. Byzova T. V. Oxidative stress in angiogenesis and vascular disease // Blood. 2014. V. 123. N5. P. 625–631.
- 17. Lammertyn L., Mels C.M.C., Peters M. Ethnic-specific relationships between haemostatic and oxidative stress markers in black and white South Africans: The SABPA study // Clin Exp Hypertens. 2015. N28. P. 1–7. doi: 10.3109/10641963.2015.1013123.
- 18. Luzzatto L., Gianfaldoni G., Notaro R. Management of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: a personal view // British Jornal of Haematology. 2011. V. 153. P. 709–720.
- 19. Martinon F. Signaling by ROS drives inflammasome activation // Eur J Immunol. 2010. V. 40. P. 616–619. doi: 10.1002/eji.200940168.
- 20. Nwose E., Richards R., Kerr R. et al. Oxidative damage indices for the assessment of subclinical diabetic macrovascular complications // Br J Biomed Sci. 2008. V. 65. N3. P. 136–141.
- 21. Nwose E., Jelinek H., Richards R. et al. Atherothrombosis and oxidative stress: the connection and correlation in diabetes // Redox Rep. 2009. V.14. N2. P. 55–60. doi:10.1179/135100009X392458.
- 22. Pandolfi A. C-reactive protein: A potential new molecular link between inflammation, thrombosis and vascular cell proliferation // Cardiovascular Research. 2005. V. 68. P. 3–4. doi:10.1016/j.cardiores.2005.07.019.
- 23. Ridker P.M. C-Reactive Protein. A Simple Test to Help Predict Risk of Heart Attack and Stroke // Circulation. 2003. V.108. P. 81–85. doi: 10.1161/01.CIR.0000093381. 57779.67.
- 24. Roshani S., Vossen C.Y., Christiansen S.C. et al. Inflammation markers, D-dimer and the risk of recurrent venous thrombosis // In: "Venous and arterial thrombosis: associations and risk factors". Department of Clinical Epidemiology. Leiden University. 2012. P. 113–132.
- 25. Tohgi H., Konno S., Takahashi S. et al. Activated coagulation/fibrinolysis system and platelet function in acute thrombotic stroke patients with increased C-reactive protein levels // Thromb Res. 2000. V. 100. N5. P. 373–379. doi. org/10.1016/S0049-3848(00)00356-X.
- 26. Yang M., Chan H., Yu L. Glutathione peroxidase and glutathione reductase activities are partially responsible for determining the susceptibility of cells to oxidative stress // Toxicology. 2006. V. 226. N2. P.126-130. doi:10.1016/j. tox.2006.06.008.

2015