

## Состояние процессов свободнорадикального окисления при активации внутрисосудистого свертывания и фибринолиза

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова

<sup>2</sup> Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. акад. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург

e-mail: laa2004@mail.ru

### Реферат

Цель работы состояла в исследовании показателей состояния свободнорадикального окисления (СРО) и антиоксидантной системы (АОС) в плазме крови больных с активацией внутрисосудистого свертывания и фибринолиза (АВСФ) на фоне лактоацидемии. В работе использовали плазму крови от 38 больных с тромбозами с уровнем D-димеров > 500 мкг/л и в качестве контроля — 30 здоровых лиц, сопоставимых по полу и возрасту. Процессы СРО в плазме крови оценивали по изменению уровня ТБК-реактивных продуктов и системы антиоксидантной защиты, контролируемой по суммарной супероксиддисмутазной (СОД) активности и концентрации SH-групп. Лактат в плазме крови определяли спектрофотометрическим методом в нашей модификации. Повышение концентрации D-димера, характерное для эндотелиальной дисфункции, коррелировало со снижением СОД в плазме крови. АВСФ сопровождалась лактоацидемой, по-видимому, вследствие митохондриальной дисфункции, вызванной окислительным стрессом.

**Ключевые слова:** активация внутрисосудистого свертывания и фибринолиза, окислительный стресс, D-димеры, лактоацидемия.

Alexandrova L. A.<sup>1, 2</sup>, Zhloba A. A.<sup>1, 2</sup>,  
Subbotina T. F.<sup>1, 2</sup>, Mayewskaya E. G.<sup>1</sup>

## Free radicals metabolism in activation intravascular coagulation and fibrinolysis and mitochondrial disfunction

<sup>1</sup> The Saint Petersburg State Pavlov Medical University, SC Department of Biochemistry

<sup>2</sup> V. A. Almasov Federal Heart, Blood and Endocrinology Center, Saint Petersburg

e-mail: laa2004@mail.ru

### Abstract

We studied thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), superoxide dismutase activity (SOD) and SH-group level in plasma of 38 patients with activation of intravascular coagulation and fibrinolysis (AIVCF). The D-dimer level in plasma was > 500 mkg/l. It was found the elevated concentration TBARS and decrease SOD activity and SH-group level in plasma of patients with lactoacidemia. The increased SOD activity and D-dimer level negatively correlated in AIVCF.

**Keywords:** activation of intravascular coagulation and fibrinolysis, D-dimer, TBARS.

### Введение

Окислительное повреждение эндотелия сосудов лежит в основе как артериальных, так и венозных сосудистых патологий. Чрезмерная продукция активных форм кислорода (АФК), в первую очередь, супероксидных анионов в сосудистой стенке, вносит вклад в эндотелиальную дисфункцию при заболевании сосудов. Основным эндогенным источником АФК — это митохондрии эндотелиальной клетки, в которых нарушается перенос электронов по цепи дыхательных ферментов. В митохондриях клеток нормально функционирующего организма, по разным данным, от 0,2 до 5 % молекулярного кислорода в процессе переноса электронов превращается в супероксид,

который инициирует процессы свободнорадикального окисления (СРО) [17]. Кроме того, генерирующая супероксид NADPH-оксидаза эндотелиоцитов идентифицирована как важный эндогенный источник свободных радикалов в сосудистых тканях [4, 10]. Экзогенным источником АФК в русле крови служат полиморфноядерные лейкоциты [7].

Внутренняя мембрана митохондрий защищена большим количеством ловушек свободных радикалов, включая восстановленный глутатион, витамин С, α-токоферол, а также ключевой антиоксидантный фермент — митохондриальную супероксиддисмутазу (СОД). Неспособность в полной мере

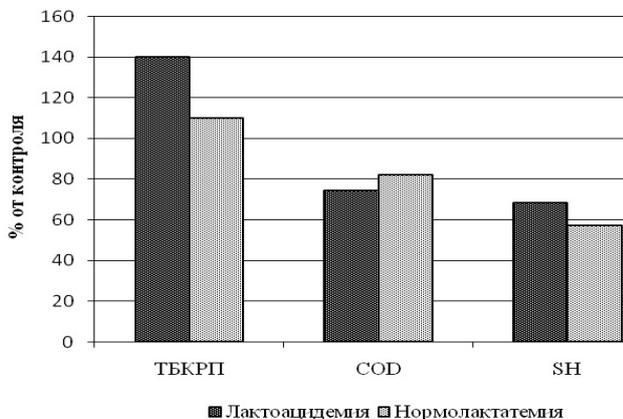
## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

нейтрализовать избыток АФК и недостаточность антиоксидантной системы (АОС) в эндотелиоцитах ведет к развитию окислительного стресса (ОС). Развитие патологического процесса сопровождается деструктивными морфологическими изменениями ультраструктуры митохондрий эндотелиоцитов [3], нарушением процесса клеточного дыхания и устойчивой лактоацидезией [5]. Подобное состояние характеризуется термином «митохондриальная дисфункция» (МД). Классические митохондриальные патологии представляют собой гетерогенную группу наследственных заболеваний, вызванных генетически детерминированным нарушением тканевого дыхания с разобщением процессов окислительного фосфорилирования и электронпереноса цепи [13]. Представление о наследственной митохондриальной дисфункции базируется на утверждении, что увеличенная генерация АФК митохондриями ответственна за состояние эндотелиальной функции, потерю способности релаксации и развитие воспаления в стенке сосуда, ведущего к возникновению сосудистых заболеваний [11]. Имеются указания на то, что развитие патологии артерий и в меньшей степени болезней вен в определенной степени связано с возрастной МД [19, 20]. Эндотелиальная клеточная дисфункция часто сочетается с нарушениями гемостаза вследствие активации процессов СРО [5, 6].

Исследование СРО при сочетании эндотелиальной и возрастной митохондриальной дисфункции ненаследственного генеза может представлять интерес для разработки методов ранней диагностики и новых подходов к коррекции патологии венозных сосудов. Цель работы состояла в исследовании показателей состояния СРО и АОС в плазме крови больных с активацией внутрисосудистого свертывания и фибринолиза на фоне лактоацидемии.

### Материал и методы исследования

D-димеры известны как маркеры активации свертывания и фибринолиза и являются признанным критерием диагностики тромбоза глубоких вен [12]. В работе использовали плазму крови, стабилизированную цитратом натрия, от 38 больных с тромбозами с уровнем D-димеров > 500 мкг/л. В качестве контроля



**Рис. 2.** Содержание ТБКРП, SH-групп и СОД-активность в плазме крови пациентов с лактоацидозом и нормолактатемией, в % от контроля: \* — различия по сравнению с контролем,  $p < 0,05$ , \*\* — различия между группами пациентов,  $p < 0,05$

использовали показатели крови 30 здоровых лиц, сопоставимых по полу и возрасту с пациентами основной группы. Количественно D-димеры определяли с помощью стандартного Smart-D-димер-теста.

Процессы СРО в плазме крови оценивали по изменению уровня ТБК-реактивных продуктов (ТБКРП) и системы антиоксидантной защиты, контролируемой по суммарной супероксиддисмутазной (СОД) активности и концентрации SH-групп методами, описанными ранее [1]. Белок в плазме крови определяли биуретовым методом с использованием набора реактивов фирмы «Синтакон». Лактат в плазме крови определяли спектрофотометрическим методом в нашей модификации [2].

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью программы «SPSS 15.0 for Windows». Непараметрический критерий Вилкоксона использовали для проверки гипотезы о различии выборок. При  $p < 0,05$  различия между выборками считались достоверными. Для оценки корреляционных связей использовали ранговый коэффициент корреляции Спирмена.

### Результаты исследования и их обсуждение

В группе обследованных с повышенным содержанием D-димеров в плазме крови уровень лактата в среднем был в 2,8 раза выше контроля ( $p < 0,05$ ). Интенсификация СРО выражалась в увеличении уровня ТБКРП в 1,3 раза, снижении содержания SH-групп в 1,5 раза. Активность СОД при этом была снижена в 1,4 раза по сравнению с группой доноров. Повышение концентрации D-димера коррелировало со снижением суммарной активности СОД в плазме крови.

По данным литературы [18], границей лактоацидемии можно считать величину 1,5 ммоль/л плазмы крови. При разделении данных на группы с лактоацидезией ( $3,2 \pm 0,28$ ,  $n = 30$ ) и нормолактатемией ( $1,0 \pm 0,20$ ,  $n = 7$ ) выявлены различия по степени ОС (рис. 1). В группе пациентов с лактоацидезией ОС характеризовался увеличением уровня ТБКРП ( $p < 0,05$ ) на 40 % при сравнении с донорами и почти на 30 % при сравнении с группой пациентов с нормолактатемией, в которой достоверных изменений этого показателя не обнаружено. Угнетение АОС у пациентов с лактоацидезией было выражено примерно в одинаковой степени по сравнению с группой нормолактатемии, при этом концентрация SH-групп составляла 68 %, а активность СОД — 74 % от контроля.

Снижение активности СОД и низкий уровень SH-групп могут вести к повреждению митохондрий и их дисфункции. Недостаточная инактивация свободных радикалов кислорода в митохондриальном матриксе воздействует на окислительно-восстановительный потенциал и является причиной повреждения внутренней митохондриальной мембраны. Это приводит к утечке протонов сквозь мембрану, нарушению окислительного фосфорилирования [11].

Супероксид анион кислорода, образуемый в эндотелии, связывает физиологически значимый NO, подавляя вазодилатацию, с образованием перокси-

нитрита (ONOO'). Перекисное окисление липидов (ПОЛ) в биомембранах связано с синтезом индукторов агрегации тромбоцитов — эндоперекисей, а также синтезом простагландинов и тромбоксанов [12]. Увеличение интенсивности ПОЛ в плазме крови и эндотелии приводит к подавлению фермента простаглицинсинтетазы, в результате чего снижается секреция эндотелием простаглицина — мощного естественного атромбогенного фактора [14]. Активными формами кислорода повреждаются ферменты, содержащие SH-группы [15]. Центральную роль защиты от АФК играет семейство СОД, которое эффективно инактивирует избыток супероксидных радикалов как в цитоплазме (Cu,Zn-СОД), внеклеточных жидкостях (ЕС-СОД), так и в митохондриях (Mn-СОД).

Различие функций артериальных и венозных сосудов, связанных с оксигенацией и реологическими свойствами протекающей по ним крови, не может не сказаться на особенностях процессов СРО в эндотелии этих сосудов. В эндотелии как артерий, так и вен, экспрессируются все три формы СОД, причем Cu, Zn-СОД экспрессируется в большем количестве, чем Mn-СОД и ЕС-СОД [8, 9]. Однако в условиях ОС гладкомышечные клетки сосудов увеличивают продукцию ЕС-СОД в большей степени, чем других форм фермента [16]. Если принять во внимание, что ЕС-СОД локализована в интерстициальном пространстве ткани сосуда, основная ее функция — защита от экзогенных АФК, образующихся в кровотоке.

Эндотелиальная дисфункция и реологические нарушения крови в зоне повреждения (капиллярная утечка, микротромбообразование) способствуют нарастанию гипоксии/ишемии не только в зоне повреждения, но и в более удаленных оболочках сосуда. Гипоксия тканей активизирует эндотелиальные клетки, которые освобождают медиаторы воспаления, индуцирующие адгезию и агрегацию лейкоцитов.

## Литература

Александрова, Л. А. *Метаболизм аминотиолов и антиоксидантный статус крыс в условиях односторонней ишемии почки* / Л. А. Александрова [и др.] // Проф. клин. мед. — 2010. — № 2. — С. 103–105.

2. Жлоба, А. А. *Дисфункция анаплеротического пути энергетического метаболизма от аминокислот к сукцинатам у лиц старшей возрастной группы* / А. А. Жлоба, Е. Г. Маевская // Артериальная гипертензия. — 2011. — Т. 17. — № 1. — С. 74–78.

3. Прасол, В. А. *Ультраструктура клеток венозной стенки больных острым тромбозом* / В. А. Прасол [и др.] // Международный. мед. журн. — 2011. — № 1. — С. 90–94.

4. Bayraktutan, U. *Molecular characterization and localization of the NAD(P)H oxidase components gp91-phox and p22-phox in endothelial cells* / U. Bayraktutan, L. Blayney, A. M. Shah // *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* — 2000. — № 20. — P. 1903–1911.

5. Chandeel, N. S. *Cellular oxygen sensing by mitochondria: old questions and new insight* / N. S. Chandeel, P. T. Schumacker // *J. Appl. Physiol.* — 2000. — Vol. 29. — № 5. — P. 1880–1889.

6. Cornelli, U. *Free-radical and vascular disease* / U.

Дисфункция эндотелия рассматривается как возможная причина патологических изменений в венозной стенке, нарушений системы свертывания крови, которые характерны для тромбоза глубоких вен [6, 7].

Ведущим звеном в развитии патологии сосудов является митохондриальная недостаточность эндотелиоцитов, что влечет за собой дефицит биоэнергетического обеспечения внутриклеточных синтетических реакций и репаративных процессов [17].

Нарушение функций митохондрий ведет к усилению ОС и дальнейшему снижению уровня антиоксидантов и снижению активности антиоксидантных ферментов, включая СОД, в результате чего образуется порочный круг. Этот пагубный циклический процесс будет сохраняться до тех пор, пока не воздействовать на одну из цепей. Таким образом, нарушение процессов СРО как внутри митохондрий, так и внешнего окружения, ведет к нарушению энергетики клетки, устойчивой лактоацидемии и может вносить вклад в развитие МД. Выявленные взаимосвязи энергетических и окислительных процессов при нарушениях внутрисосудистого свертывания и фибринолиза показывают необходимость более углубленного изучения биохимических механизмов развития возрастной митохондриальной дисфункции.

## Выводы

1. Активация внутрисосудистого свертывания и фибринолиза сопровождается лактоацидемии, по видимому, вследствие митохондриальной дисфункции, вызванной окислительным стрессом.

2. Повышение концентрации D-димера, характерное для эндотелиальной дисфункции, коррелирует со снижением суммарной активности СОД в плазме крови.

Cornelli, M. Cornelli, R. Terranova // *The International Union of Angiology's Bulletin.* — 1999. — Vol. 15. — P. 7–10.

7. Jones, S. A. *Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells* / S. A. Jones [et al] // *Am. J. Physiol.* — 1996. — № 271. — P. H1626–H1634.

8. Kamezaki, F. *Gene Transfer of Extracellular Superoxide Dismutase Ameliorates Pulmonary Hypertension in Rats* / F. Kamezaki [et al] // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 2008. — Vol. 177. — № 2. — P. 219–226.

9. Landeghem, G. F. *Manganese-containing superoxide dismutase signal sequence polymorphism associated with sporadic motor neuron disease* / G. F. Landeghem [et al] // *Europ. J. of Neurol.* — 1999. — № 6. — P. 639–644.

10. Li, J. *Essential Role of the NADPH Oxidase Subunit p47phox in Endothelial Cell Superoxide Production in Response to Phorbol Ester and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$*  / J. Li [et al] // *Circulation Research.* — 2002. — Vol. 90. — P. 143–150.

11. Li, J. M. *Endothelial cell superoxide generation: Regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology* / J. M. Li, A. M. Shah // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* — 2004. — Vol. 287. — P. R1014–R1030.

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

12. MacCallum, P. K. Haemostatic and lipid determinants of prothrombin fragment F1.2 and D-dimer in plasma / P. K. MacCallum [et al] // *Thromb. Haemost.* — 2000. — Vol. 83. — P. 421–426.
13. Minuz, P. Endothelial dysfunction and increased oxidative stress in mitochondrial diseases / P. Minuz [et al] // *Clinical Science.* — 2012. — Vol. 122. — P. 289–297.
14. Patterson, C. Stimulation of a vascular smooth muscle cell NAD(P)H oxidase by thrombin / C. Patterson [et al] // *J. Biol. Chem.* — 1999. — Vol. 274. — P. 19814–19822.
15. Re, G. Systemically circulating oxidative species in human deep venous thrombosis / G. Re [et al] // *European Journal of Emergency Medicine.* — 1998. — Vol. 5. — Is. 1. — P. 9–12.
16. Strålin, P. The Interstitium of the Human Arterial Wall Contains Very Large Amounts of Extracellular Superoxide Dismutase / P. Strålin [et al] // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* — 1995. — № 15. — P. 2032–2036.
17. St-Pierre, J. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain / J. St-Pierre [et al] // *J. Biol. Chem.* — 2002. — Vol. 277. — P. 44784–44790.
18. Svenmarker, S. What is a normal lactate level during cardiopulmonary bypass? / S. Svenmarker, S. Haggmark, M. Ostman // *Scandinavian Cardiovascular Journal.* — 2006. — Vol. 40. — P. 305–311.
19. Trotti, R. Activation of coagulation and fibrinolysis in HIV-infected patients: relationship to oxidative stress / R. Trotti [et al] // *Fibrinolysis.* — 1999. — Vol. 13. — P. 113–117.
20. Trotti, R. Oxidative stress and a thrombophilic condition in alcoholics without severe liver disease / R. Trotti [et al] // *Haematologica.* — 2001. — Vol. 86. — P. 85–91.