

АЛЕКСАНДРОВА Л. А.<sup>1, 2</sup>,

ЖЛОБА А. А.<sup>1, 2</sup>, АЛЕКСЕЕВСКАЯ Е. С.<sup>1, 2</sup>

## Окислительный стресс при активации внутрисосудистого свертывания и фибринолиза

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

<sup>2</sup> *Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург*  
e-mail: laa2004@mail.ru

### Реферат

Сосудистые заболевания тесно связаны с возрастными изменениями, окислительным стрессом и митохондриальной дисфункцией. Цель работы состояла в исследовании показателей состояния процессов свободнорадикального окисления (ПСРО) и антиоксидантной системы (АОС) в плазме крови 109 больных (76 мужчин и 33 женщины) с активацией внутрисосудистого свертывания и фибринолиза (АВСФ) в возрастном аспекте.

С помощью кластерного анализа получены две возрастные группы: группа I с возрастной медианой 34 (28–45) года и группа II с медианой 67 (65–75) лет. АВСФ сопровождалась снижением АОС и интенсификацией ПСРО независимо от возраста. В старшей возрастной группе выявлена значимая ( $p < 0,001$ ) отрицательная корреляционная связь по Спирмену умеренной силы ( $R = -0,528$ ) между показателями ТБКРП и СОД. Лактацидемия, выявленная у больных с АВСФ, предполагает возможность возникновения вторичной митохондриальной дисфункции уже в молодом возрасте.

**Ключевые слова:** активация внутрисосудистого свертывания и фибринолиза, супероксиддисмутаза, окислительный стресс, лактацидемия, митохондриальная дисфункция, возраст.

### Введение

Патологические изменения сосудов тесно связаны со старением организма, в механизм развития которого вовлечены окислительный стресс (ОС) и митохондриальная дисфункция (МД) [5]. Основным эндогенным источником активных форм кислорода АФК в эндотелии являются митохондрии клетки, в которых нарушается перенос электронов по цепи дыхательных ферментов.

В митохондриях клеток в физиологических условиях, по разным данным, от 0,2 до 5 % молекулярного кислорода в процессе переноса электронов превращается в супероксид-анион-радикалы, которые иницируют процессы свободнорадикального окисления (ПСРО) [13]. Важным эндогенным источником свободных радикалов в кровеносных сосудах является NADPH-оксидаза эндотелиоцитов, генерирующая супероксидные радикалы [3].

Экзогенным источником АФК в русле крови служат полиморфноядерные лейкоциты [8, 10]. Представление о возрастной ненаследственной митохондриальной дисфункции в значительной степени базируется на том, что увеличенная генерация АФК митохондриями ответственна за состояние эндотелиальной функции, потерю способности к релаксации, а также развитие воспаления в стенке сосуда, ведущего к возникновению сосудистых заболеваний [6].

Исследование ПСРО при возрастной митохондриальной дисфункции ненаследственного генеза может представлять интерес для разработки методов ранней диагностики и новых подходов к коррекции патологии сосудов.

Цель работы состояла в исследовании показателей состояния ПСРО и антиоксидантной системы (АОС) в плазме крови больных с активацией внутрисосудистого свертывания и фибринолиза (АВСФ) в возрастном аспекте.

### Материал и методы исследования

В работе использовали плазму крови, стабилизированную цитратом натрия, от 109 больных (76 мужчин и 33 женщины) с тромбозами с уровнем D-димеров  $> 500$  мкг/л. Возраст больных колебался от 20 до 83 лет. В качестве контроля использовали показатели крови 30 здоровых лиц, сопоставимых по полу и возрасту с пациентами основной группы. Количественно D-димеры определяли иммунотурбодиметрическим методом с использованием тест-наборов фирмы *Simens* (Германия).

Состояние ПСРО в плазме крови оценивали по изменению уровня ТБК-реактивных продуктов (ТБКРП) и АОС, контролируемой по суммарной супероксиддисмутазной (СОД) активности и концентрации SH-групп методами, описанными ранее [1]. Лактат в плазме крови определяли энзиматическим методом с лактатоксидазой с использованием тест-наборов фирмы «Ольвекс» (Россия).

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью программы «SPSS 15.0 for Windows». Критерий Колмогорова–Смирнова использовали для выявления характера распределения переменных. Непараметрический непарный критерий Манна–Уитни использовали для проверки гипотезы о различии выборок, поскольку он не за-

Показатели плазмы крови пациентов с АВСФ и контрольной группы

Таблица

Группа	Возраст, лет	ТБКРП, Мкмоль/л	СОД-активность, ед./мл	SH-группы, Мкмоль/л	Лактат, Ммоль/л
Общая (N=109)	52 (37–67)	8,5* (6,5–10,6)	7,6* (5,8–12,4)	106,4* (84,8–140,8)	2,9* (2,2–3,9)
I (N=32)	34 (28–45)	8,4 (6,6–10,2)	10,8* (5,8–15,9)	96,1* (78,2–143,6)	2,8* (2,1–3,8)
II (N=69)	67 (65–75)	9,1* (6,1–10,8)	7,0* (5,7–10,4)	106,7* (84,5–146,0)	2,9* (2,5–4,0)
Контрольная (N=30)	54 (33–65)	6,8 (5,8–7,4)	17,1 (13,9–19,6)	168,2 (140,2–214,3)	1,5 (0,4–1,6)

Примечание: данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха; \* — достоверность различий показателей при сравнении с показателями контрольной группы (P<0,05).

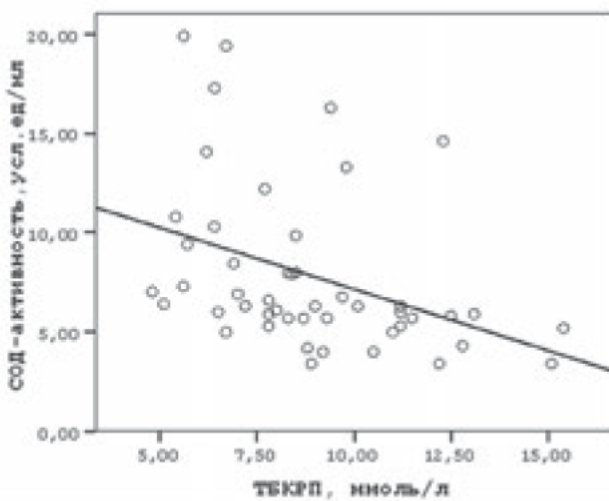


Рис. 1. Регрессионная зависимость СОД-активности от концентрации ТБКРП в плазме крови больных с АВСФ старшей возрастной группы ( $y = -0,617x + 13,33$ )

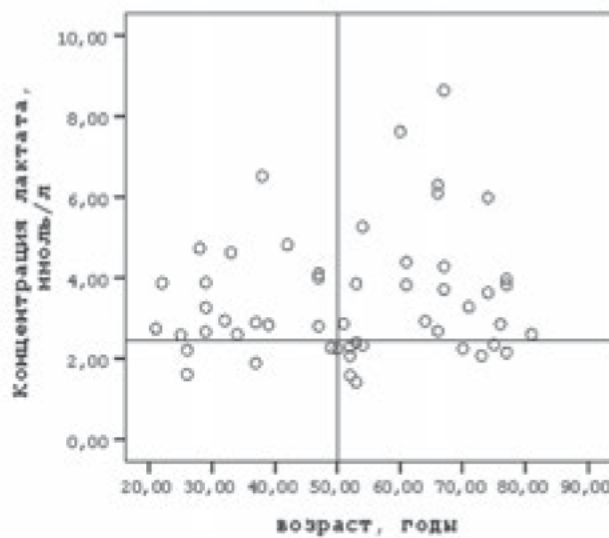


Рис. 2. Зависимость от возраста концентрации лактата в плазме крови пациентов с АВСФ

висит от нормальности распределения. При  $p < 0,05$  различия между выборками считались достоверными. Результаты представляли в виде медианы и межквартильного размаха  $M (Q1-Q3)$ . Для оценки корреляционных связей использовали ранговый коэффициент корреляции Спирмена.

**Результаты исследования и их обсуждение**

Анализ общей выборки больных с АВСФ в плазме крови показал достоверное ( $p < 0,05$ ) снижение СОД-активности, снижение концентрации свободных SH-групп и увеличение концентрации ТБКРП и лактата, при сравнении с контрольной группой (таблица).

Корреляционный анализ не выявил взаимосвязи между исследованными показателями в пределах всей выборки. При разделении основного массива данных по возрастной категории с помощью кластерного анализа образовалось две группы больных.

В группу I вошли пациенты от 20 лет до 50, в группу II — от 51 до 83 лет. В группе II обнаружили значимую двустороннюю корреляционную связь по Спирмену между показателями ТБКРП и СОД.

С помощью регрессионного анализа в этой группе установлена значимая ( $p < 0,001$ ) отрицательная взаимосвязь умеренной силы ( $R = -0,528$ ) между СОД активностью и концентрацией ТБКРП (рис. 1). Снижение активности антиоксидантных ферментов, в особенности СОД, приводит к интенсификации ПСРО и увеличению концентрации вторичных продуктов перекисного окисления липидов, ТБКРП [12, 14].

Адаптивная функция СОД в качестве «уборщика» избыточных супероксидных радикалов в физиологических условиях проявляется повышением активности фермента адекватно росту концентрации супероксида до определенного предела. Избыточный рост концентрации супероксида приводит к срыву защитной антиоксидантной системы и снижению активности СОД. В старшей возрастной группе II наблюдаемое увеличение уровня ТБКРП коррелирует со снижением СОД-активности, что свидетельствует об устойчивом оксидативном стрессе у пациентов этой группы.

В группе пациентов более молодого возраста показатель активности СОД обнаруживал разнонаправленные изменения, что объясняется большим резервом антиоксидантной защиты. По литературным данным, возрастных изменений общей СОД-активности в плазме людей популяций США и Европы не наблюдали, за исключением митохондриальной Мп-СОД, активность которой с возрастом росла [7]. При исследовании индийской популяции, напротив, отмечали увеличение общей СОД-активности в плазме [11] как компенсацию на возрастное увеличение образования активных форм кислорода.

Концентрация общих SH-групп как маркера АОС (таблица) в образцах плазмы крови больных с АВСФ была снижена независимо от возраста, как в группе I, так и в группе II по сравнению с контролем. Существенных различий между возрастными группами по этому показателю не было. Основными источниками свободных SH-групп в плазме крови служат аминокислоты цистеин, глутатион и альбумин [2, 4]. Глутатион, важный компонент антиоксидантной системы клетки, связан с удалением гидроперекисей липидов с участием ферментов глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы и глутатионтрансферазы [9]. Развитие окислительного стресса приводит к окислению SH-групп и истощению пула глутатиона [2]. Кроме того, глутатион, как и другие аминокислоты, тесно связан с обменом оксида азота, играющего важную роль в эндотелии [6]. Окисление свободных SH-групп ферментов, в том числе СОД, может приводить к снижению их активности [12]. Концентрация лактата была достоверно ( $p < 0,05$ ) повышена независимо от возраста в обеих группах (таблица). Существующее представление о возрастной вторичной митохондриальной дисфункции, которая лежит в основе теории

старения, предполагает высокую частоту лактацидемии. Вопреки ожиданиям, в данном исследовании лактацидемия обнаруживалась у больных с АВСФ и в более молодом возрасте не реже, чем в старшей возрастной группе (рис. 2). По-видимому, для данной патологии характерно появление маркера вторичной митохондриальной дисфункции уже на ранних этапах независимо от возраста.

Таким образом, при нарушениях внутрисосудистого свертывания и фибринолиза, независимо от возраста, в плазме крови обнаруживаются признаки окислительного стресса и лактацидемии. Нарушение процессов СРО, как внутри митохондрий, так и во внешнем окружении, ведет к нарушению энергетики клетки, устойчивой лактацидемии 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 вторичной митохондриальной дисфункции в молодом возрасте.

### Выводы

1. Активация внутрисосудистого свертывания и фибринолиза сопровождается снижением АОС и интенсификацией ПСРО независимо от возраста.

2. Повышение концентрации ТБКРП, характерное для окислительного стресса, коррелирует со снижением суммарной активности СОД в плазме крови лиц старшей возрастной категории с АВСФ.

3. Лактацидемия, выявленная у больных с АВСФ, предполагает возможность возникновения вторичной митохондриальной дисфункции уже в молодом возрасте.

### Литература

1. Александрова Л. А., Жлоба А. А., Субботина Т. Ф. и др. Состояние процессов свободнорадикального окисления при активации внутрисосудистого свертывания и фибринолиза // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2012. № 11. С. 43–46.
2. Ashfaq S., Abramson J. L., Jones D. P. et al. Endothelial Function and Amino Thiols // *Biomarkers of Oxidative Stress in Healthy Adults // Hypertension*. 2008. № 52. P. 80–85.
3. Bayraktutan U., Blayney L., Shah A. M. Molecular characterization and localization of the NAD(P)H oxidase components gp91-phox and p22-phox in endothelial cells // *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* 2000. № 20. P. 1903–1911.
4. Carter D. C., Ho J. X. Structure of serum albumin // *Adv. Protein Chem.* 1994. № 45. P. 153–203.
5. Cui H., Kong Y., Zhang H. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and aging // *J. Signal. Transduct.* 2012. ID 646354, 13 pages.
6. El Assar M., Angulo J., Vallejo S. et al. Mechanisms involved in the aging-induced vascular dysfunction. 2012. № 3. P. 132.
7. Gianni P., Jan K. J., Douglas M. J. et al. Oxidative stress and mitochondrial theory of aging in human skeletal muscle // *Exp. Gerontol.* 2004. № 39. P. 1391–400.
8. Jones S. A., O'Donnell V. B., Wood J. D. et al. Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells // *Am. J. Physiol.* 1996. № 271. P. H1626–H1634.
9. Pandey K. B., Rizvi S. I. Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2010. № 3. P. 2–12.
10. Re G., Lazarini C., Vanini I. et al. Systemically circulating oxidative species in human deep venous thrombosis // *European Journal of Emergency Medicine.* 1998. № 5(1). P. 9–12.
11. Rizvi S. I., Maurya P. K. Alterations in antioxidant enzymes during aging in humans // *Mol. Biotechnol.* 2007. № 37. P. 58–61.
12. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants // *Exp. Physiol.* 1997. № 82. P. 291–295.
13. St-Pierre J., Buckingham J. A., Roebuck S. J., Brand M. D. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain // *J. Biol. Chem.* 2002. № 277. P. 44784–44790.
14. Voss P., Siems W. Clinical oxidation parameters of aging // *Free Radic. Res.* 2006. № 40(12). P. 1339–1349.

UDK 612.015.32:612 615

Alexandrova L. A.<sup>1,2</sup>, Zhloba A. A.<sup>1,2</sup>, Alexeevskaya E. S.<sup>1,2</sup>

## Oxidative stress in patients with intravascular coagulation disturbance

<sup>1</sup> First Pavlov State Medical University of St. Petersburg<sup>2</sup> V. A. Almasov Federal Heart, Blood and Endocrinology Center, Saint Petersburg

e-mail: laa2004@mail.ru

## Abstract

Vascular pathology is closely associated with aging, oxidative stress, and endothelial or mitochondrial dysfunctions. The aim of the study was to assess whether the oxidant/antioxidant status of blood plasma changes in patients with activation of intravascular coagulation and fibrinolysis (AIVCF) in aspects of aging. We studied the specimens of blood plasma of 109 patients [76 males and 33 females; median age 52 (QIR 37–67) with AIVCF and d-dimer level >500 µg/L and 30 healthy controls]. The concentration of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) was higher in patients [8,5 (QIR 6,5–10,6) µmol/L vs. 6,8 (QIR 5,8–7,4) µmol/L; respectively (P<0,001)], SH-groups level was lower [106,4 (84,8–140,8) µmol/L vs. 168,2 (QIR 140,2–214,3) µmol/L], and superoxide dismutase (SOD) activity was lower [7,6 (QIR 5,8–12,4) U/ml vs. 17,1 (QIR 13,9–19,6) U/ml; respectively; P=0,001] when compared with the healthy controls. When all of the patients were divided into two age-related groups: Group 1 [34 (QIR 28–45) years] and Group 2 [67 (QIR 65–75) years], we estimated a significant negative correlation ( $r = -0,528$ ,  $P = 0,01$ ) between TBARS and SOD in Group 2. Plasma lactate level in elderly patients (Group 2) did not differ from those in Group 1, although it was significantly higher in the both groups when compared with the control group. We presume that AIVCF is accompanied by oxidative stress and lactacidemia independently of age. Appearance markers of oxidative stress (TBARS and SOD activity in plasma) and lactacidemia may be used for case study development and new therapeutic team approach to the AIVCF.

**Keywords:** superoxide dismutase, thiobarbituric acid reactive substances, activation of intravascular coagulation and fibrinolysis, lactacidemia.

## References

- Alexandrova L.A., Zhloba A.A., Subbotina T.F., Mayewskaya E.G. Sostojanie processov svobodnoradikal'nogo okislenija pri aktivacii vnutrisudistogo svertyvanija i fibrinoliza. [Free radicals metabolism in activation intravascular coagulation and fibrinolysis and mitochondrial disfunction] Regionarnoe krovoobrashhenie i mikrocirkuljacija, 2012, vol.11, no. 2, pp. 43-46. (In Russian).
- Ashfaq S., Abramson J. L., Jones D. P. et al. Endothelial Function and Aminoalcohol Biomarkers of Oxidative Stress in Healthy Adults // Hypertension. 2008. № 52. P. 80–85.
- Bayraktutan U., Blayney L., Shah A.M. Molecular characterization and localization of the NAD(P)H oxidase components gp91-phox and p22-phox in endothelial cells // Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol. 2000. № 20. P. 1903–1911.
- Carter D. C., Ho J. X. Structure of serum albumin // Adv. Protein Chem. 1994. № 45. P. 153–203.
- Cui H., Kong Y., Zhang H. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and aging // J. Signal. Transduct. 2012. ID 646354, 13 pages.
- El Assar M., Angulo J., Vallejo S. et al. Mechanisms involved in the aging-induced vascular dysfunction. He xva-taet žurnala. 2012. № 3. P. 132.
- Gianni P., Jan K. J., Douglas M. J. et al. Oxidative stress and mitochondrial theory of aging in human skeletal muscle // Exp. Gerontol. 2004. № 39. P. 1391–400.
- Jones S. A., O'Donnell V. B., Wood J. D. et al. Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells // Am. J. Physiol. 1996. № 271. P. H1626–H1634.
- Pandey K. B., Rizvi S. I. Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans // Oxid. Med. Cell. Longev. 2010. № 3. P. 2–12.
- Re G., Lazarini C., Vanini, I. et al. Systemically circulating oxidative species in human deep venous thrombosis // European Journal of Emergency Medicine. 1998. № 5 (1). P. 9–12.
- Rizvi S. I., Maurya P. K. Alterations in antioxidant enzymes during aging in humans // Mol. Biotechnol. 2007. № 37. P. 58–61.
- Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants // Exp. Physiol. 1997. № 82. P. 291–295.
- St-Pierre J., Buckingham J. A., Roebuck S. J., Brand M. D. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain // J. Biol. Chem. 2002. № 277. P. 44784–44790.
- Voss P., Siems W. Clinical oxidation parameters of aging // Free Radic. Res. 2006. № 40 (12). P. 1339–1349.