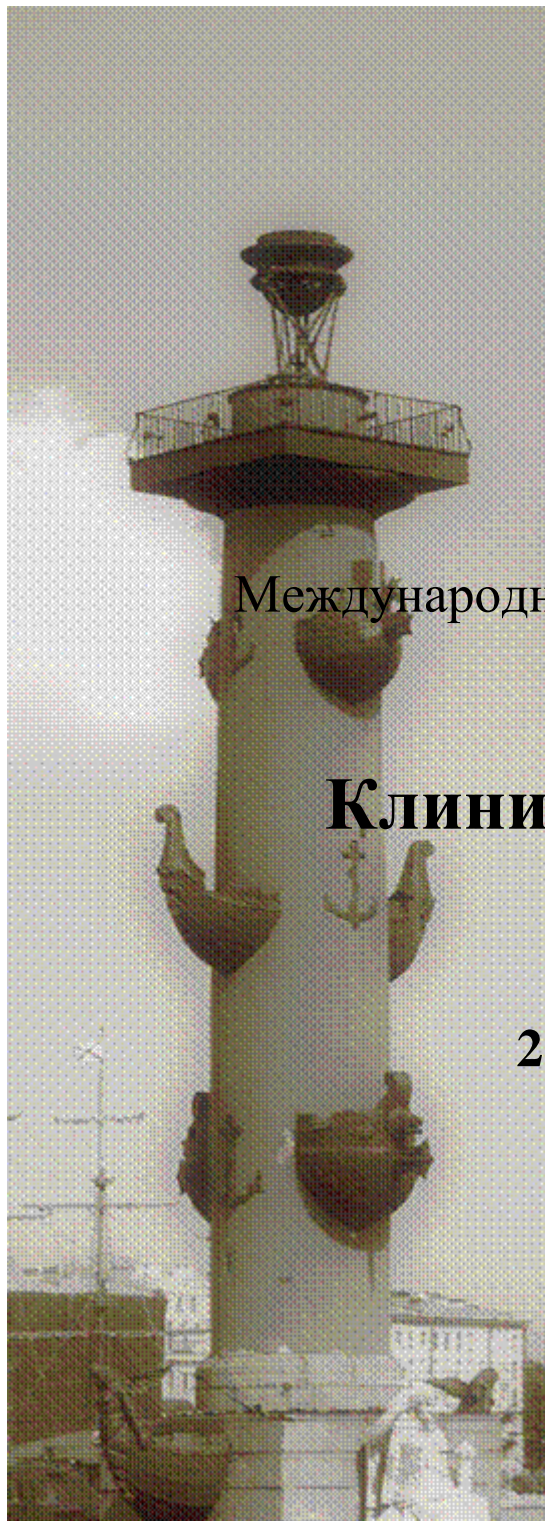


Первый Санкт-Петербургский государственный
медицинский университет им. акад. И.П.Павлова



Международная VI-я научная конференция

по

Клинической биохимии

21-24 апреля 2014

Санкт-Петербург
2014

Государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
**«ПЕРВЫЙ САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. АКАД. И.П. ПАВЛОВА»**
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Отдел биохимии Научно-исследовательского центра

Международная VI-я научная конференция

ПО

Клинической биохимии

Санкт-Петербург, 21-24 апреля 2014 года

Бюллетень

Тематика бюллетеня:

Аналитика как инструмент клинической химии

*Метаболом, пептидом и протеом плазмы крови при
митохондриальной и эндотелиальной дисфункциях*

Клинико-биохимическая характеристика нутритивного статуса

Метаболические мишени и лекарственный мониторинг

Санкт-Петербург
2014

УДК 543/545 (063)
ББК 24.4
А 64

Международная VI-я научная конференция по Клинической биохимии
А 64 (Санкт-Петербург, 21-24 апреля 2014 г.): бюллетень конференции / Санкт-Петербург: Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, 2014. – 158 с.

Бюллетень Международной VI-я научной конференции по Клинической биохимии включает результаты научных исследований специалистов в области клинической биохимии, в том числе работы студентов по актуальным проблемам лабораторной медицины. Значительную часть тезисов докладов и полнотекстовых статей составляют исследования с использованием методов разделения (ВЭЖХ-анализ).

Адресовано специалистам в области клинико-биохимических исследований, врачам и студентам медицинских вузов.

В 2015 году ежегодная конференция в рамках секции «Клиническая биохимия» традиционно состоится в конце апреля.

In 2015, the annual conference of the section "Clinical Biochemistry" will be traditionally held in late April.

Тексты приведены в редакции авторов без правок оргкомитета конференции

© Первый Санкт-Петербургский
государственный
медицинский университет
им. акад. И.П. Павлова, 2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

Раздел I. Научные труды Отдела биохимии НИЦ ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, опубликованные и принятые в печать в 2013-2014гг	5
А.А. Жлоба, Т.Ф. Субботина, Д.С. Лупан, В.А. Богова, О.А. Кушелева АРГИНИН И ЛИЗИН – ПРОДУКТЫ КАРБОКСИПЕПТИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ, АССОЦИИРОВАННОЙ С ФИБРИНОЛИЗОМ.....	6
А.А. Жлоба, Т.Ф. Субботина ОЦЕНКА СВЯЗЫВАНИЯ ГОМОЦИСТЕИНА С ФРАКЦИЕЙ БЕЛКОВ ПЛАЗМЫ, АССОЦИИРОВАННЫХ С РЕМОДЕЛИРОВАНИЕМ СОСУДИСТОЙ СТЕНКИ.....	19
Т.Ф.Субботина, А.А. Жлоба ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИЯ КАК ФАКТОР СНИЖЕНИЯ ФИБРИНОЛИТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ПРИ АКТИВИРОВАННОМ ВНУТРИСОСУДИСТОМ СВЕРТЫВАНИИ.....	31
Е.С. Алексеевская, А.А. Жлоба, Т.Ф. Субботина УЛЬТРАФИЛЬТРАЦИЯ В КАЧЕСТВЕ ПРЕАНАЛИТИЧЕСКОЙ СТАДИИ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ КОНЦЕНТРАЦИИ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ В ПЛАЗМЕ КРОВИ.....	43
Л.А. Александрова, А.А. Жлоба, Е.С. Алексеевская ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС ПРИ АКТИВАЦИИ ВНУТРИСОСУДИСТОГО СВЕРТЫВАНИЯ И ФИБРИНОЛИЗА.....	53
L.A. Alexandrova, A.A. Zhloba, E.S. Alexeevskaya OXIDATIVE STRESS IN PATIENTS WITH INTRAVASCULAR COAGULATION DISTURBANCE.....	62
E.S. Alekseevskaya, T.F. Subbotina, A.A. Zhloba CHARACTERIZATION OF THE SECONDARY MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION BY MULTI-SCALE SHIFTS OF PLASMA ANALYTES.....	74
A.A. Zhloba, T.F. Subbotina, E.S. Alexeevskaya, I.A. Rodin, A.N. Stavrianidi, O.A. Shpigun SAMPLE PREPARATION WITH AMINOTHIOL DERIVATIZATION FOR METABOLIC CHARACTERIZATION OF ENDOTHELIAL DYSFUNCTION.....	76
A.A. Zhloba, T.F. Subbotina LARGE-SCALE METHOD OF BLOOD PLASMA FRACTIONATION FOR SULFUR AMINO ACIDS TRANSPORT EVALUATION.....	78
T.F. Subbotina, A.A. Zhloba FIBRINOLYSIS AS AN ADDITIONAL SOURCE OF BASIC AMINO ACIDS IN PLASMA.....	79
A.A. Zhloba, T.F. Subbotina SCORE HOMOCYSTEINYLATION OF HIGH MOLECULAR WEIGHT PLASMA PROTEINS.....	80
A.A. Zhloba, T.F. Subbotina, E.S. Alekseevskaya, O.M. Moiseeva THE PLASMA PROFILE OF METABOLITES INFLUENCING NITRIC OXIDE PRODUCTION.....	94
T.F. Subbotina, A.A. Zhloba FIBRINOLYSIS-INDUCED SHIFTS IN PLASMA AMINO ACID PROFILE: POSSIBLE CONTRIBUTION TO VASCULAR METABOLISM.....	96
E.S. Alekseevskaya, T.F. Subbotina, A.A. Zhloba, O.M. Moiseeva, O.B. Irtyuga THE FACTORS OF MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION AND THEIR ASSOCIATION WITH ADMA.....	98
Раздел II Конкурсные научные работы молодых ученых и студентов	100
Е.С. Алексеевская МЕТАБОЛОМНЫЕ И ПРОТЕОМНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ.....	101
А.Д. Виноходов, Ю.Н. Шарфи СОДЕРЖАНИЕ ФАКТОРОВ РОСТА TGF-BETA1, GMCSF, VEGF-A ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ИСХОДАХ ПЕРЕНОСОВ ЭМБРИОНОВ В ЦИКЛАХ ЭКО У ПАЦИЕНТОК С ХРОНИЧЕСКИМ ЭНДОМЕТРИТОМ.....	103
О.А. Емельянова МЕНЕДЖМЕНТ КАЧЕСТВА ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛУГ.....	105
Т.Д. Логачева РОЛЬ PGC1 α В КООРДИНАЦИИ ЯДЕРНО-МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ.....	107

Е.В. Лоцман МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ ФУНКЦИЯ И ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ТРИМЕТИЛ-ЛИЗИНА.....	109
М.М. Мусийчук ПРОДУКТЫ NO-СИНТАЗНОЙ АКТИВНОСТИ И ЭНДОТЕЛИАЛЬНАЯ ДИСФУНКЦИЯ У БОЛЬНЫХ СИСТЕМНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ.....	110
М.О. Новак ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ ВЫСШИХ ОКИСЛОВ АЗОТА И НИТРОЗОТИОЛОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВИДА БИОМАТЕРИАЛА.....	111
А.А. Новокшонова, А.М. Борисов, С.А. Божкова ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ЛЕКАРСТВЕННЫЙ МОНИТОРИНГ ВАНКОМИЦИНА У ПАЦИЕНТОВ ТРАВМАТОЛОГО-ОРТОПЕДИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ.....	112
В.В. Олешкевич ОТМЕНА ЦИКЛОФОСФАМИДА И ЕГО ВЛИЯНИЕ НА ОБЩИЙ БЕЛОК ПЛАЗМЫ КРОВИ.....	115
Т.И. Орлова, А.И. Уколов ЭКСТРАКТИВНОЕ АЛКИЛИРОВАНИЕ СВОБОДНЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ ПЛАЗМЫ КРОВИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С МАСС-СЕЛЕКТИВНЫМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ.....	117
М.О. Попова, А.Г. Волкова, В.М. Кравцова ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ВОРИКОНАЗОЛА В ПЛАЗМЕ КРОВИ С ПОМОЩЬЮ ВЭЖХ АНАЛИЗА С ФОТОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ.....	119
А.А. Самсонова МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ ФУНКЦИЯ И ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ КОРОТКОЦЕПОЧЕЧНЫХ И ДЛИННОЦЕПОЧЕЧНЫХ АЦИЛКАРТНИТИНОВ.....	122
М.В. Семёнова, Л.А. Сабирова РЕЗУЛЬТАТЫ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЙ ВЕРИФИКАЦИИ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ ЛЕГКОГО.....	123
П.Н. Сорокоумов УСТАНОВЛЕНИЕ КОРРЕЛЯЦИИ МЕЖДУ КОНЦЕНТРАЦИЕЙ МЕЛЬДОНИЯ И КОНЦЕНТРАЦИЯМИ ЖИРНЫХ И ТРИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА.....	125
К.А. Шипаева НАРУШЕНИЯ МЕТАБОЛИЗМА АМИНОКИСЛОТ С РАЗВЕТВЛЕННОЙ ЦЕПЬЮ И ИХ ДИАГНОСТИКА.....	128
Н.М. Шурыгина, И.С. Белецкая ВОЗМОЖНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ МАТРИКСНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ-9 В ДИАГНОСТИКЕ ГЛАУКОМ.....	129
J. Suraj, M. Olkowicz, A. Kij, M. Walczak COMPARISON OF TWO TYPES OF LC-MS/MS TECHNIQUES AND THEIR MODIFICATIONS FOR THE IMPROVED SEPARATION AND IDENTIFICATION OF SELECTED ENDOTHELIAL BIOMARKERS.....	130
Раздел III Научные работы молодых ученых – врачам и пациентам.....	132
Т.Д. Логачева РОЛЬ PGC1 α В КООРДИНАЦИИ ЯДЕРНО-МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ.....	133
Е.В. Лоцман МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ ФУНКЦИЯ И ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ТРИМЕТИЛ-ЛИЗИНА.....	139
А.А. Самсонова МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ ФУНКЦИЯ И ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ КОРОТКОЦЕПОЧЕЧНЫХ И ДЛИННОЦЕПОЧЕЧНЫХ АЦИЛКАРТНИТИНОВ.....	145
К.А. Шипаева НАРУШЕНИЯ МЕТАБОЛИЗМА АМИНОКИСЛОТ С РАЗВЕТВЛЕННОЙ ЦЕПЬЮ И ИХ ДИАГНОСТИКА.....	151

Раздел I

Научные труды Отдела биохимии НИЦ
ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова,
опубликованные и принятые в печать в 2013-2014гг.

АРГИНИН И ЛИЗИН – ПРОДУКТЫ КАРБОКСИПЕПТИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ, АССОЦИИРОВАННОЙ С ФИБРИНОЛИЗОМ

А.А. Жлоба, Т.Ф. Субботина, Д.С. Лупан, В.А. Богова, О.А. Кушелева

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П.Павлова

Статья опубликована в журнале «Биомедицинская химия», 2013. – № 5. – С.570-577.

Карбоксипептидазы крови являются одним из факторов регуляции фибринолиза. Разработана методика определения ассоциированной с коагуляцией/фибринолизом карбоксипептидазной активности с использованием естественного субстрата – фибрина – и определением продуктов реакции – основных аминокислот лизина и аргинина, в среде, максимально приближенной к условиям *in vivo*. Исследование выполнено на 15 образцах плазмы крови пациентов с артериальной гипертензией. Коагуляцию и последующий фибринолиз в образцах плазмы инициировали добавлением стандартных количеств тромбина и тканевого активатора плазминогена. Концентрации аргинина и лизина до, в процессе и после завершения фибринолиза определяли ВЭЖХ-анализом. Параметры фибринолиза оценивали турбидиметрически.

После завершения цикла коагуляции/фибринолиза отмечено достоверное и весьма значительное увеличение концентраций аргинина и лизина в инкубационной среде, которое составило в среднем 101 и 81% для аргинина и лизина, соответственно. Длительность инициации фибринолиза достоверно коррелирует со степенью прироста этих аминокислот: $r_s = -0,733$ и $-0,761$ ($p < 0,05$). Генерация аргинина имеет два максимума – в начале процесса лизиса сгустка и в его конце, тогда как лизин высвобождается преимущественно в середине процесса. Таким образом, возникающая в ходе фибринолиза карбоксипептидазная активность может иметь положительное значение, обеспечивая местную поставку незаменимых аминокислот, источником которых является деградирующий фибриновый сгусток.

Ключевые слова: фибринолиз, основные карбоксипептидазы, аргинин, лизин

ВВЕДЕНИЕ. Плазмин – главный фермент системы фибринолиза - является сериновой эндопротеиназой с широкой специфичностью, которая атакует пептидные связи своего естественного субстрата, фибрина, гидролизуя преимущественно связи Арг-Х и Лиз-Х. Таким образом, продукты деградации фибрина плазмином характеризуются большим количеством С-концевых остатков лизина и аргинина. Активация предшественника плазмина – плазминогена - в естественных условиях инициируется в ранний период плазменной коагуляции при появлении первых нитей фибрина. Фибрин обладает участками специфической сорбции плазминогена и его главнейшего активатора – тканевого активатора плазминогена (тАП). Связывание плазминогена происходит по лизиновым остаткам фибрина [1]. По мере начинающегося разрушения фибрина, становятся доступными новые лизиновые остатки, и процесс фибринолиза ускоряется. Считается, что этими дополнительными участками связывания могут быть С-концевые остатки лизина в составе продуктов деградации фибрина [2]. Основные карбоксипептидазы крови, которые отщепляют от белков С-концевые лизин и аргинин, могут, по мнению некоторых исследователей нарушать связывание плазминогена с фибрином и таким образом тормозить фибринолиз. В частности, в крови человека присутствуют несколько ферментов, обладающих подобной активностью [3]. Из них наиболее известны карбоксипептидаза N (СрN, КФ 3.4.17.3) и карбоксипептидаза U (СрU, КФ 3.4.17.20), чаще обозначаемая как активируемый тромбином ингибитор фибринолиза (ТАFI – thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor). В небольших, но измеряемых количествах в крови здорового человека также присутствует карбоксипептидаза В тканевого происхождения (СрВ, КФ 3.4.17.2); активность этого фермента

резко возрастает при остром панкреатите [4]. CrN обладает конститутивной активностью, тогда как CrU присутствует в крови в виде неактивного предшественника, который активируется тромбином, комплексом тромбин-тромбомодулин или плазмином. Чистый тромбин является «плохим» активатором CrU, но в комплексе с тромбомодулином активация усиливается в 1250 раз [5]. CrU отличается крайней нестабильностью и при 37°C утрачивает активность через 10-20 минут [2]. Обычно определяют CrU либо иммуноферментным методом, либо весь имеющийся в образце профермент переводят в активную форму и тестируют с использованием низкомолекулярного синтетического субстрата [6]. Эти методики оценивают концентрацию CrU, но не могут дать представление о его реальном вкладе в ингибирование фибринолиза, которое лежит в основе некоторых тромбофилий. Относительно CrN известно, что эта карбоксипептидаза сохраняет активность в процессе и после завершения фибринолиза; эта активность может быть зарегистрирована с помощью синтетического субстрата. По имеющимся данным, CrN уменьшает связывание плазмينا с фибрином, но не тормозит фибринолиз [7]. В литературе отсутствуют данные о связи между активностью карбоксипептидаз и протеканием фибринолиза, а также сведения о нем, как о процессе, генерирующем существенные количества основных аминокислот.

Нашей целью являлась разработка методики определения ассоциированной с фибринолизом экзопептидазной активности с использованием естественного субстрата – фибрина - и определением продуктов реакции - основных аминокислот лизина и аргинина, - в среде, максимально приближенной к условиям *in vivo*. Принимая во внимание то, что ВЭЖХ анализ, - наиболее точный метод определения аминокислот - является относительно труднодоступным в клинической лаборатории, мы

решили параллельно определить концентрацию аргинина в образцах с помощью реакции Сакагучи.

МЕТОДИКА. В работе использованы коммерческие белковые препараты: тромбин человека (ООО «Технология-Стандарт», Барнаул) и тканевой активатор пламиногена (тАП, Actilyse), (Boehringer Ingelheim, Германия). Вероналовый буфер содержал 0,02 М барбитурат натрия (веронал), 0,13 М NaCl и 1 мМ CaCl₂, pH доводили до 7,4 с помощью HCl. Все остальные реагенты имели квалификацию не ниже ч.д.а.

Исследованы образцы бедной тромбоцитами цитратной плазмы крови, полученной из локтевой вены натощак у 15 пациентов с артериальной гипертензией (4 мужчины и 9 женщин, средний возраст 54 года), находящихся под наблюдением в поликлинике № 31 г. Санкт-Петербурга. Исследование проводили в течение 1 часа после забора крови.

Моделирование фибринолиза. К 0,3 мл плазмы добавляли 0,5 мкг тАП в объеме 0,05 мл вероналового буфера, и через 1 минуту после этого – 0,05 мл раствора тромбина (0,125 ед. НИН). Образовавшийся фибриновый сгусток инкубировали на водяной бане при 37°C. После завершения лизиса (45 – 120 мин), который регистрировали визуально, среду депротенизировали добавлением 0,4 мл 5% сульфосалициловой кислоты с последующим центрифугированием (4000 g, 20 мин). Контролем служил образец той же плазмы, инкубировавшийся параллельно с 0,05 мл буфера и 0,05 мл тАП. Таким образом, получали образцы для анализа совокупного результата карбоксипептидазной активности, включая активность CrU, за время, превышающее как его «быструю» активацию с участием тромбина и тромбомодулина, так и «медленную» активацию с участием только тромбина. Оценку карбоксипептидазной активности определяли за дискретные промежутки времени или за весь период опыта по приросту концентрации лизина и аргинина. Подобный методический подход, но с использованием синтетического субстрата [3, 7], позволил выявить в ходе

фибринолиза два вида карбоксипептидазной активности – чувствительной к специфическому ингибитору CrU и нечувствительной. С целью оценки кинетики накопления аминокислот, в отдельной серии экспериментов, проведенных на 3 образцах пуловых плазм, через 5-минутные интервалы из инкубационной среды отбирали по 0,02 мл и депротеинизировали равным количеством сульфосалициловой кислоты.

Определение лизина и аргинина проводили на хроматографе Agilent методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с дериватизацией орто-фталевым альдегидом на колонке Zorbax Eclipse AAA C18 (200x2,1) мм. После нанесения на колонку 1 мкл супернатанта, проводили элюцию при 40°C в 40 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 7,8, градиентом ацетонитрила и метанола с УФ-детектированием (338 нм) в соответствии с рекомендациями фирмы Agilent Technologies [8]. Концентрации аминокислот рассчитывали на миллилитр плазмы с использованием введенного в пробу внутреннего стандарта - норвалина. Параллельно в тех же пробах определяли концентрацию аргинина одной из модификаций метода Сакагучи [9].

Параметры тромбин-индуцированного фибринообразования и фибринолиза, активируемого тАП, регистрировали турбидиметрическим методом [10] с использованием спектрофотометра СФ2000 на длине волны 340 нм в образце плазмы, разведенной в 20 раз вероналовым буфером. Данный метод позволяет оценить не только суммарное время фибринолиза, но и дифференцировать его, с одной стороны, на лаг-период, когда на кривой оптической плотности наблюдается плато, соответствующее сорбции плазминогена и тАП на фибрине, начальной активации плазминогена и началу деградации фибрина, и, с другой стороны, время наблюдаемого лизиса, которое сопровождается снижением оптической плотности. Продолжительность цикла коагуляции/фибринолиза согласно данной методике составляет 5-10

минут. Важным параметром является также величина максимальной оптической плотности, которая тесно коррелирует с концентрацией фибриногена в образце.

Статистическую обработку проводили методами непараметрической статистики с использованием программы Statistica 7.0. Оценку достоверности различий проводили с помощью критерия Вилкоксона для парных наблюдений. При корреляционном анализе вычисляли ранговый коэффициент корреляции Спирмена. Критический уровень значимости (p) при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимался равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Из данных, представленных в таблице 1, видно, что почти по всем оцениваемым показателям отмечаются значительные индивидуальные вариации. После завершения цикла коагуляции/фибринолиза отмечается достоверное увеличение концентраций аргинина и лизина в инкубационной среде. Это возрастание регистрируется не только с помощью ВЭЖХ анализа, но и более простой реакцией Сакагучи, причем результаты этих методов достоверно коррелируют между собой ($r_s=0,697$; $p < 0,05$). Увеличение концентраций аминокислот после фибринолиза весьма значительно: по данным ВЭЖХ анализа оно составляет 101 и 81% для аргинина и лизина, соответственно. Определение аргинина методом Сакагучи дает несколько меньший относительный прирост – 62%, хотя все концентрации, определенные этим методом, значительно выше, чем по данным ВЭЖХ. Исходные концентрации аргинина и лизина не коррелируют достоверно с их приростами после завершения лизиса ($r_s=0,042$ и $0,383$ для аргинина и лизина, соответственно), что позволяет более уверенно судить о выявленном эффекте как о результате активируемого в ходе фибринолиза ферментативного процесса. В то же время не выявлено ни одной достоверной корреляции максимальной оптической плотности сгустка,

отражающей концентрацию фибриногена, с другими регистрируемыми параметрами.

Таблица 1.

Варьирование параметров фибринолиза и концентраций основных аминокислот в образцах плазмы крови (n = 15)

Название параметра		Среднее и ошибка средней (M±m)	Минимум	Максимум
Лаг-период фибринолиза, с		526 ± 88	174	1452
Время наблюдаемого лизиса, с		560 ± 98	150	1207
Общее время фибринолиза, с		1086 ± 180	324	2659
Максимальная оптическая плотность сгустка, о.е.		0,170 ± 0,015	0,060	0,270
Концентрация аргинина (реакция Сакагучи), мкМ	Контроль	307,6 ± 31,8	160,8	508,8
	После лизиса	496,8 ± 46,9*	220,8	754,0
	Прирост	189,2 ± 37,6	0	593,2
Концентрация аргинина (ВЭЖХ анализ), мкМ	Контроль	94,5 ± 13,7	41,6	217,3
	После лизиса	190,4 ± 54,1*	63,0	792,2
	Прирост	95,8 ± 49,5	2,3	692,1
Концентрация лизина (ВЭЖХ анализ), мкМ	Контроль	116,8 ± 8,3	62,4	160,3
	После лизиса	211,3 ± 36,6*	81,5	609,1
	Прирост	94,5 ± 33,6	19,1	479,4

Примечания: концентрации аминокислот приведены в расчете на цельную плазму; * - достоверное отличие от уровня контроля (p < 0,01).

Из параметров фибринолиза, оцениваемых турбидиметрическим методом, тесные и высоко достоверные корреляционные связи с приростом основных аминокислот (но не с их исходными концентрациями) обнаруживаются только для показателя длительности лаг-периода: $r_s = -0,733$ и $-0,761$ для аргинина и лизина (p < 0,05). Следует подчеркнуть, что эти связи отрицательные; иными словами, чем быстрее запускается процесс фибринолиза, то есть длительность лаг-периода меньше, тем выше регистрируемая экзопептидазная активность.

В отдельной серии экспериментов, проведенной на трех образцах пуловых плазм, мы попытались выяснить, каким этапам фибринолиза соответствует наиболее интенсивное образование лизина и аргинина. Данные, приведенные на рис.1 (А, Б), показывают, что скорости высвобождения аминокислот в ходе фибринолиза изменяются по-разному: генерация аргинина имеет два максимума – в начале процесса лизиса сгустка и в его конце, тогда как лизин высвобождается преимущественно в середине процесса – через 30-40 минут после формирования сгустка.

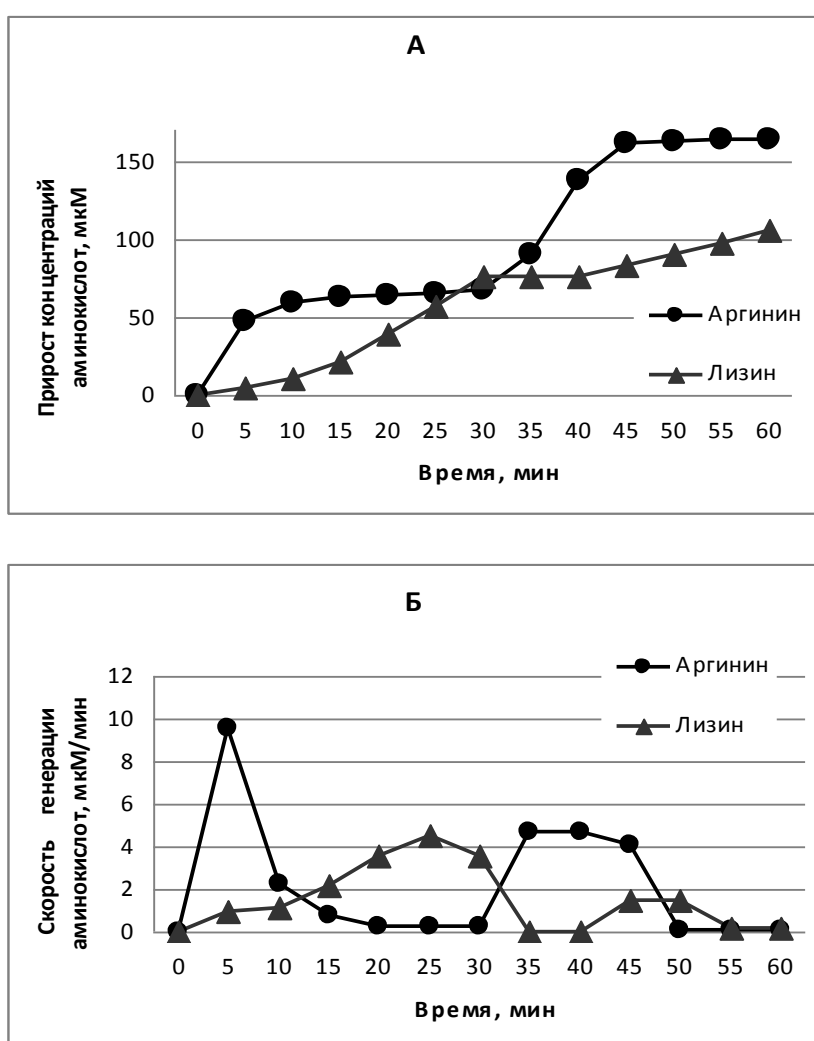


Рис. 1. Динамика (А) и средние скорости (Б) прироста концентраций аргинина и лизина в процессе фибринолиза (n=3)

Наиболее интересным результатом настоящего исследования следует считать регистрацию ассоциированного с фибринолизом освобождения значительных количеств основных аминокислот – аргинина и лизина. Выраженность этого явления достоверно коррелирует с эффективностью начальной фазы фибринолиза. Несмотря на то, что условия модельного эксперимента соответствовали оптимальным для нормального функционирования CrU [3], и использовался тест на карбоксипептидазную активность не с синтетическим, а с эндогенным белковым субстратом, торможения образования продуктов реакции в виде аргинина или лизина, свойственного проявлению активности, CrU [6] не обнаружено. По всей вероятности, эти аминокислоты появляются в результате действия карбоксипептидаз на пептидные субстраты, образующиеся в результате лизиса фибрина плазмином. По направленности выявленного эффекта эта карбоксипептидазная активность не может быть приписана CrU, поскольку в последнем случае корреляции с активностью фибринолиза были бы обратными. Учитывая зарегистрированное нами относительно позднее высвобождение лизина, следует предположить, что активация CrU в данной экспериментальной системе задерживается и происходит тогда, когда удаление С-концевых лизиновых остатков уже не имеет значения для успешного завершения фибринолиза. Можно также думать о том, что CrU-активность, изученная в системах с синтетическим субстратом, не может быть перенесена на активность по отношению к дериватам фибрина. Возможно, в небольшой группе пациентов, обследованных нами, не встретилось таких, у которых активность CrU имела бы существенное патогенетическое значение. Таким образом, короткое плато на кривой оптической плотности в сочетании с выраженным возрастанием концентрации основных аминокислот можно считать достоверным маркером активации фибринолиза, а разработанный нами метод – пригодным для дальнейшего использования при тестировании суммарной

активности карбоксипептидаз, но не индивидуальной активности CrU. Не ясным остается вопрос о более специфичных субстратах для CrU - это фрагменты фибрина или производные основных аминокислот, подобные гиппурил-L-Аргинину? Результаты, полученные с использованием метода Сакагучи, тесно и достоверно коррелируют с данными ВЭЖХ анализа, поэтому более простой метод Сакагучи также можно использовать. При этом следует учитывать его недостатки: для получения надежных результатов необходимо большое количество материала для анализа, кроме того, этот метод всегда дает завышенные результаты. Последнее объясняется недостаточной специфичностью реакции Сакагучи: она положительна не только с аргинином, но и с другими метаболитами, содержащими гуанидиновую группу, а также с аргинином в составе коротких неосаждаемых пептидов. Следует отметить, что средние концентрации аргинина и лизина в контрольных образцах, определенные методом ВЭЖХ, соответствуют референтному интервалу нормы: аргинин 21 – 138 мкМ, лизин 83 – 238 мкМ [11]. Повышение положительно заряженных аминокислот в крови, соответственно приведенным данным, может увеличивать их транспорт не только в эндотелиоциты, но и в макрофаги, где они образуют производные, модулирующие свойства этих клеток. Аргинин и лизин являются предшественниками биологически активных полиаминов, регулирующих дифференцировку макрофагов. Кроме того, из лизина может образовываться промежуточный метаболит – триметиллизин, необходимый для синтеза карнитина. Следует также отметить, что метилирование лизина происходит только после его включения в состав белков, которые в большинстве своем относятся к регуляторным белкам внутриклеточных сигнальных систем. Синтез карнитина в организме существенно ограничен протеолизом этих белков. Обычно пищевые источники карнитина не вполне удовлетворяют потребности организма в этом переносчике жирных кислот.

Зарегистрированное нами в ходе фибринолиза увеличение концентрации аргинина оказалось значительным, в среднем, примерно двукратным. Это дает основание предположить, что в ходе фибринолиза появляется существенная прибавка субстрата эндотелиальной NO-синтазы (eNOS). Доступность аргинина для eNOS из системного кровотока может быть существенно ограничена [12]. Известно, что аргинин, полученный перорально, обладает вазодилатирующим эффектом при нарушениях кровообращения [13]. Возникновение из аргинина ингибитора этого эффекта известного асимметричного диметил-аргинина (АДМА) происходит не сразу после повышения уровня аргинина. В связи с этим, ингибирующий эффект за счет свободного аргинина не может быть обусловлен накоплением АДМА. Напротив, известно, что лучше всего вазодилатирующий эффект аргинина наблюдается при высоком содержании АДМА. Из работы [13] следует, что вазодилатирующий и другие опосредованные эндотелием реакции за счет добавок аргинина в кровотоки существенны у лиц, имеющих исходный высокий уровень АДМА. Для образования АДМА требуется длинный метаболический путь. Сначала в клетках должно произойти включение аргинина в белки, затем - постсинтетическое образование их метилированных производных, затем - их ограниченный протеолиз и лишь затем, после деструктивного протеолиза, могут высвободиться метилированные производные аминокислот. Использование аргинина в качестве субстрата eNOS происходит после его транспорта в область caveол эндотелиоцитов и может ингибироваться за счет гомоцистеина (и его окисленных форм) [14] или АДМА [12]. Значительное выделение аргинина в ходе фибринолиза, происходящего на поверхности эндотелия, может рассматриваться в качестве дополнительного источника субстрата для eNOS. Таким образом, активно протекающий фибринолиз, возможно обеспечивает не только

лизис тромба, но и может способствовать вазодилатации и восстановлению кровообращения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Методы определения аргинина и лизина, предложенные в данной работе, использованы для оценки суммарной карбоксипептидазной активности сопутствующей фибринолизу. Эта методика, в отличие от известных методов оценки сопутствующей фибринолизу карбоксипептидазной активности с синтетическими низкомолекулярными субстратами, содержащими одну аминокислоту, основана на использовании в качестве субстрата пептидного материала, нарастающего в модельной системе при фибринолизе. Пополнение заряженными аминокислотами пула плазмы крови положительно коррелировало со скоростью фибринолиза. Контроль за карбоксипептидазной активностью по отношению к временной кривой тромбообразования и лизиса сгустка, позволил выявить отрезки времени, на которых происходит быстрое накопление основных аминокислот, а также потенциал их прироста по отношению к исходному. В работе показано, что в ходе фибринолиза, изученного *in vitro*, могут высвобождаться значительные количества аргинина и лизина.

Предложенная методика оценки суммарной карбоксипептидазной активности пригодна для тестирования генерации дополнительных количеств основных аминокислот в образцах крови при тромболитической терапии.

Список литературы

1. Medved L., Nieuwenhuisen W. (2003) Thromb. Haemost., 89(3), 409-419.
2. Bajzar L., Nesheim M., Morser J., Tracy P.B. (1998) J. Biol. Chem., 273(5), 2792–2798.
3. Redlitz A., Tan A.K., Eaton D.L., Plow E.F. (1995) J. Clin. Invest., 96, 2534-2538.
4. Borgström A., Regnér S. (2005) Pancreatology, 5(6):530-536.
5. Mosnier L.O., Bouma B.N. (2006) Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 26 (11), 2445-2453.
6. Willemse J.L., Hendriks D.F. (2006) Clin. Chem., 52(1), 30–36.
7. Plow E.F., Allampallam K., Redlitz A. (1997) Trends in Cardiovasc. Med., 7(3), 71-75.

8. *Mengerink Y., Kutlán D., Tóth F., Csámpai A., Molnár-Perl I.* (2002) *J. Chromatogr. A*, 949 (1-2), 99–124.
9. *Cerioti G., Spandrio L.* (1957), *J. Biochem.*, 66(4), 603–607.
10. *Субботина Т.Ф., Галебская Л.В.* (2005) *Биомедицинская химия*, 51(1), 60-65.
11. *Туз Н.У.* (1986) *Клиническая оценка лабораторных тестов* (пер. с нем.), Медицина, М.
12. *Жлоба А.А.* (2007) *Регионарное кровообращение и микроциркуляция* 6(3), 4-14.
13. *Böger R.H.* (2007) *J. Nutr.*, 137(6), 1650S-1655S.
14. *Jin L., Caldwell R.B., Li-Masters T., Caldwell R.W.* (2007) *J Physiol Pharmacol.* 58(2),191-206.

ОЦЕНКА СВЯЗЫВАНИЯ ГОМОЦИСТЕИНА С ФРАКЦИЕЙ БЕЛКОВ ПЛАЗМЫ, АССОЦИИРОВАННЫХ С РЕМОДЕЛИРОВАНИЕМ СОСУДИСТОЙ СТЕНКИ

А.А. Жлоба, Т.Ф. Субботина

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова

Статья опубликована в журнале «Артериальная гипертензия», 2013. – № 2. – С. 184-188.

Резюме

Повышение общей концентрации различных химических форм гомоцистеина (Гци) выше 12 μM носит название гипергомоцистеинемия. Термин «общий гомоцистеин» плазмы (оГци) обозначает сумму концентраций восстановленной (-SH) и окисленных форм Гци (-SS-). Предполагают, что S- и особенно N-гомоцистеинилирование белков играют важную роль в развитии токсических эффектов Гци. Уровень оГци в плазме не проявляет тесной корреляции с выраженностью патологического процесса с ремоделированием сосудистой стенки и поэтому не очень подходит для проспективных исследований. В статье описан метод исследования оГци и его фракции после ультрафильтрации, позволяющей отсечь белки, масса которых превышает 300 кДа. К белкам этой фракции, которые могут образовывать смешанные дисульфиды Гци, относятся апоВ и активированный альфа-2-макроглобулин. Предлагаемое определение Гци в препаратах плазмы до и после ультрафильтрации доступно в любой лаборатории с помощью наборов реактивов для определения Гци в плазме. Определение фракции Гци, связанной с белками, с помощью центрифужного устройства Vivaspin 300,000 MWCO PES «Сарториус» дает информацию о дополнительных путях транспорта Гци в макрофаги, эндотелиальные клетки, гладкомышечные и другие клетки сосудистой стенки путем рецепторного эндоцитоза.

Ключевые слова: общий гомоцистеин, гипергомоцистеинемия, глутатион, альфа-2-макроглобулин, ультрафильтрация, ВЭЖХ.

EVALUATION OF HOMOCYSTEINE BINDING WITH A FRACTION OF PLASMA PROTEINS ASSOCIATED WITH REMODELING OF THE VASCULAR WALL

A.A. Zhloba, T.F. Subbotina

First Pavlov St Petersburg State Medical University, St Petersburg, Russia

Abstract

Objective. Elevated levels of homocysteine (Hcy) in tissues cause cytotoxic effects. Increase in the overall concentration of the various Hcy chemical forms above 12 μM is called hyperhomocysteinemia. The term "total homocysteine" of plasma (tHcy) is the sum of concentrations of aminothiols in reduced (-SH) and oxidized (-SS-) forms. It was suggested that the S- and partially, N-homocysteinylation of proteins plays a major role in the toxic effects of Hcy. The rate of tHcy in plasma is not closely related to pathological process with remodeling of the vascular wall and not entirely suitable for prospective evaluation of the pathologic process. The paper presents the method of evaluation the tHcy and its fraction after ultrafiltration, allowing cut off proteins with mass above 300 kDa. Proteins in this fraction which can form a mixing disulfides of Hcy include apoB protein and activated alpha-2-macroglobulin.

The proposed Hcy estimation in plasma preparations prior and after ultrafiltration may be performed in any laboratory with kits for tHcy evaluation in plasma. Evaluation of Hcy fraction associated with > 300 kDa plasma proteins by means of centrifugal device Vivaspin 300 000 MWCO PES «Sartorius» provides information about Hcy transport by an additional way in macrophages, endothelial cells, smooth muscle cells and others in vascular wall by receptorial endocytosis.

Key words: total homocystein, glutathione, hyperhomocysteinemia, alpha-2-macroglobulin, ultrafiltration, HPLC.

Введение

Повышение суммарного содержания различных фракций гомоцистеина (Гци) в крови выше 12 мкМ принято называть гипергомоцистеинемией (ГГЦ). Термин "общий гомоцистеин" плазмы крови (oГци, tHcy) обозначает сумму концентраций аминотиола в восстановленной (-SH) и окисленных (-S-S-) формах. Предполагают, что S- и, частично, N-гомоцистеинилирование белков играет основную роль в токсических эффектах Гци [1, 2, 3, 4, 5, 6]. Соотношения свободного и связанного с белком аминотиола составляют 0,2 для Гци, около 0,5-0,6 для цистеина и 4-5 для глутатиона (Глт) [7, 8, 9]. Таким образом, за счет образования дисульфидных связей Гци прочнее других аминотиолов связывается с белками. Это может быть объяснено довольно высокой рКа = 10,0 Гци. С возрастом происходит увеличение количества Гци и других аминотиолов, связанных с белками крови [10, 11, 12]. Благодаря низкой рКа 34 цистеинового остатка альбумина, Гци в норме транспортируется в плазме крови, в основном, с этим белком [13]. Участие в патофизиологических процессах данного аминотиола объясняется образованием смешанных дисульфидов с другими белками, включая фибронектин, транстретин и металлотioneин. Цитотоксичность повышенного уровня Гци можно объяснить S-гомоцистеинилированием цистеиновых остатков белков [4]. Возможно, гомоцистеинилирование апопротеина В в составе липопротеидов может приводить к переносу Гци в клетки сосудистой стенки, включая эндотелиоциты [14].

При помощи гель-фильтрации было показано, что этот аминотиол может также транспортироваться в значительном количестве в составе альфа-2-макроглобулина [15, 16]. Связывающая способность белков плазмы крови в отношении Гци составляет $4,88 \pm 0,51$ и $4,74 \pm 0,68$ мкмоль/г для здоровых мужчин и женщин, соответственно [17]. В соответствии с полученными ранее данными, при ГГЦ значительная доля

Гци переносится высокомолекулярными фракциями, содержащими альфа-2-макроглобулин (МГ) [15, 18].

Определение оГци не вполне удовлетворяет своей информативностью при проспективной оценке патологического процесса в области сосудистой стенки [19].

В работе уделяется внимание дальнейшему изучению механизма, при помощи которого Гци мог бы избирательно накапливаться именно в клетках меди сосудистой стенки, экспрессирующих LRP-рецептор.

Материалы и методы

В исследовании использовали кровь пациентов, взятую из кубитальной вены утром натощак в вакутейнеры с цитратом натрия в качестве антикоагулянта, для проведения исследований показателей гемостаза. Кровь объемом не менее 5 мл центрифугировали 10 минут при 580 g (3000 об/ мин). Исследование оГци и содержание аминотиолов в форме связанной с фракциями белков плазмы крови проводили в отделе биохимии научно-исследовательского центра ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации. ЭДТА-стабилизированная плазма добровольных доноров была использована после проведения обязательных тестов на вирусные инфекции. Исследование с образцами доноров и пациентов проведено с 2009 по 2012 годы. Образцы плазмы до анализа хранили порциями по 0,5 – 1,0 мл при температуре -70°C . Ретроспективное исследование проводилось с анонимным использованием полученных данных.

Всего в исследование было включено пять групп образцов плазмы крови.

В основную группу было отобрано 23 образца, взятых у пациентов старше 55 лет с сердечно-сосудистыми заболеваниями с повышенным уровнем диастолического и систолического артериального давления (> 90 -

135 мм рт. ст.). У них отмечалась умеренная ГГЦ, в среднем – $19,1 \pm 3,2$ мкМ (Ме 22,9), а средний уровень фолиевой кислоты в плазме крови составил – $10,3 \pm 7,7$ нМ.

Группа сравнения включала плазму крови 13 здоровых доноров 19-20 летнего возраста со средним уровнем оГци 7,9 (от 5 до 11) мкМ.

Наряду с этим, 8 образцов плазмы крови пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями и уровнем общего холестерина крови (от 5,28 до 7,33 мМ), С-реактивного белка (от 1,65 до 9,57 мг/л) и ГГци от 15,6 до 18,5 мкМ были использованы для сравнения фильтрующей способности мембран Vivaspin100 000 и 300 000 MWCO PES.

Во всех образцах были определены уровни оГци и Гци, как в препаратах плазмы, так и их ультрафильтратах. Это позволило рассчитать параметр фильтруемости Гци в виде коэффициента фильтрации Кф.

Уровень оГци и глутатиона (Глт) в плазме крови и их препаратах определяли так, как описано ранее с небольшими изменениями [20]. Анализ аминотиолов проводили с использованием хроматографа Agilent 1100 в комплектации с насосом, аутосамплером и детектором с изменяемой длиной волны (Agilent Technologies, Germany). Для пробоподготовки в пробирку Эппендорф объемом 1,5 мл приливали 100 мкл исследуемого образца или внешнего стандарта (препарат плазмы крови с известным содержанием Гци, Глт или пенициллина) и 25 мкл 10 мМ раствора дитиотреитола, приготовленного на 1 мМ растворе ЭДТА динатриевой соли. После перемешивания в течение 10 секунд, пробы термостатировали при 60°C в течение 10 минут. Затем приливали по 100 мкл 10 мМ раствора 5',5'-дитиобиснитробензойной кислоты (ДТНБ) на 0,1 М калий фосфатном буфере, рН 8,0. После перемешивания в течение 10 секунд и выдерживания в течение 5 минут, в пробы приливали раствор 0,15 мл 10%-ной сульфосалициловой кислоты, приготовленной на 1 мМ растворе ЭДТА динатриевой соли. Отделение выпавшего осадка

проводили путем центрифугирования при 8000 об/мин в течение 10 минут. Надосадочную жидкость фильтровали через мембранные нейлоновые фильтры с порами 0,2 микрона. Далее проводили хроматографию. На колонку Zorbax Eclipse XDB C18 5 мкм; 250 x 4,6 мм (Agilent Technologies, Germany) наносили по 10 мкл тионитробензоатные производных аминотиолов. Изократическая элюция со скоростью 1,0 мл/мин проведена подвижной фазой, содержащей 12 % ацетонитрила в 0,1 М калий фосфатном буфере pH 3,7-3,8 в течение 7 минут. Пробоподготовку для определения фракций гомоцистеина и глутатиона в ультрафильтратах осуществляли так же, как и в отношении цельной плазмы крови.

Получение фракций гомоцистеина и глутатиона в фильтрах плазмы крови было проведено с использованием центрифужных устройств Vivaspin 500 фирмы Sartorius (Германия) с порами 300 000 и 100 000 MWCO PES. Ультрафильтрация препаратов плазмы была проведена в соответствии с рекомендациями производителя. Фильтруемость аминотиолов сравнивали по коэффициенту фильтрации. Коэффициент или фактор фильтрации Кф представлял собой соотношение концентрации Гци или Глт в ультрафильтрате к общей концентрации аминотиола в препарате плазмы.

Для определения **МГ** использован иммунотурбидиметрический метод фирмы Beckman Coulter, Inc. Уровень фолиевой кислоты определяли методом хемилюминесцентного иммунологического анализа с тест-системами фирмы Beckman Coulter (США) с использованием анализатора Access-2 и наборов фирмы Beckman Coulter, Inc (США). Белок в препаратах определяли биуретовым способом.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием методов параметрической и непараметрической статистики. Методом дескриптивной статистики проводили оценку

среднего арифметического и среднеквадратического отклонения ($M \pm SD$) или медианы и квартилей. Степень соответствия параметров наблюдаемого статистического распределения теоретическим распределениям оценивали с помощью критериев Колмогорова – Смирнова и Пирсона. Для оценки межгрупповых различий использован непараметрический тест Вилкоксона. Критический уровень достоверности нулевой статистической гипотезы принимали равным 0,05. Статистическую обработку материала выполняли с использованием статистической программы SPSS16.

Результаты исследования

С использованием центрифужных фильтрующих устройств Vivaspin 500 (Sartorius, Germany) с порами 100 000 и 300 000 единиц MWCO PES (Sartorius) была проведена оценка фильтруемости белков и оГци. Сравнение фильтрующей способности в отношении белков плазмы крови было необходимо, так как единицы MWCO PES приблизительно указывают на способность удерживать растворенные белки выше 100 или 300 кДа, соответственно. Целью этих опытов было определение типа фильтров, не пропускающих в ультрафильтрат молекулы или диссоциированные субъединицы МГ. Для этого была использована плазма крови восьми пациентов с умеренной ГГЦ: Me 17,4 (межквартильный размах 15,6 - 18,5) мкМ.

При использовании фильтров Vivaspin 500 с порами 100 000 MWCO PES в низкомолекулярных фракциях этих образцов обнаружили от 8 до 37 % Гци (Me = 21 %) и от 7 до 33 % белка (Me = 21 %). После ультрафильтрации этих же препаратов плазмы через фильтры 300 000 MWCO PES в фильтратах обнаружено от 20 до 39 % Гци (Me = 28 %) и от 37 до 56 % белка. По данным ИФА-анализа, МГ сохранялся в нефилтрующемся высокомолекулярном материале и не выявлялся в

фильтратах. В связи с этим, в дальнейшем были использованы фильтры 300 000 MWCO PES.

Проведенные эксперименты позволили перейти к оценке фильтруемости Гци, содержащегося в препаратах плазмы крови пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями.

Изменение Кф Гци в препаратах плазмы пациентов с нарушениями кровообращения оценивали по отношению к референтным интервалам доноров. Для определения референтных границ коэффициента фильтруемости Гци у лиц без нарушений системы кровообращения использовали образцы плазмы доноров. Кф Гци плазмы крови пациентов с нарушениями кровообращения был значительно понижен ($p < 0,05$) по отношению к референтной группе. Уровень глутатиона в полученных фракциях и его Кф достоверно не изменялся по отношению к референтной группе.

В образцах фильтратов доноров обнаружено в среднем $56 \pm 5,6$ %, а в образцах фильтратов группы пациентов выявлено 37 ± 5 % от содержания Гци в препаратах плазмы. В референтной группе нижняя граница (25 перцентиль) Кф составляет 0,43. При снижении фильтруемости Гци наблюдается понижение Кф, характеризующее удерживание Гци, преимущественно связанного белками плазмы с молекулярной массой более 300 кДа. Верхняя граница (75 %) интервала Кф в группе пациентов составляет 0,62, что выше 0,43 и разница составляет 0,19. Опираясь на полученные данные, можно сделать вывод о том, что в группе пациентов с заболеваниями сердечно-сосудистой системы Кф у значительной части пациентов существенно ниже, чем в группе здоровых доноров. В группе пациентов таких случаев было 8. При использовании для ультрафильтрации плазмы пациентов с уровнем оГци от 15 до 20 мкМ в фильтратах в среднем выявляли $6,9 \pm 1,8$ мкМ Гци, а в фильтратах препаратов плазмы с уровнем оГци от 20 до 70 мкМ в среднем

обнаруживали $13,0 \pm 3,5$ мкМ Гци, что существенно не отражалось на величине его Кф. Возможно, пациенты с сохранившимся высоким уровнем Кф характеризуются менее опасной ГГЦ, тогда как пациенты без ГГЦ и с низкими значениями Кф могут быть охарактеризованы повышенной вероятностью удерживания Гци в клетках сосудистой стенки за счет рецепторного эндоцитоза вместе с МГ или липопротеинами низкой плотности (ЛПНП).

Обсуждение результатов

В опытах с очищенными препаратами продемонстрирована способность МГ связывать Гци [16]. Известно, что при активации, то есть связывании протеиназ и некоторых других молекул этим поливалентным ингибитором, экспрессируется из тиоэфирных связей 4 свободные тиоловые группировки. По-видимому, при патологических состояниях, сопровождающихся активацией протеолитических систем, происходит увеличение доли Гци, транспортируемого в составе активированного МГ. Известно, что активированный МГ быстро извлекается из кровотока макрофагами, экспрессирующими рецептор LRP (Lipoprotein-Related-Protein-receptor). Активированные макрофаги являются носителями этого рецептора и в большом количестве обнаруживаются при развитии атеросклероза в субэндотелиальном пространстве [21]. По-видимому, не только этот белок способен к транспорту Гци в клетки сосудистой стенки. Показано, что апоВ липопротеинов низкой плотности (550 кДа) может связывать Гци. Следует учитывать, что к рецепторам ЛПНП имеет высокое сродство активированный МГ [22, 23].

Возможно, большую роль в обеспечении альтернативного транспорта Гци через рецепторный эндоцитоз МГ могут играть процессы активации этого белка секретруемыми в кровь протеиназами. Следует ожидать, что транспорт Гци с МГ может активировать перенос Гци в клетки меди сосудистой стенки. Этому может благоприятствовать экспрессия альфа-2-

макроглобулинового рецептора макрофагами, гладкомышечными и другими клетками сосудистой стенки. По-видимому, определение Кф дает информацию о части оГци, транспортируемой путем рецепторного эндоцитоза в клетки, экспрессирующие рецепторы, связывающие активированный МГ. На основании полученных данных, можно сделать вывод, что при оценке роли Гци в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний большое значение имеет определение величины Кф этого аминотиола и, тем самым, удерживание его крупномолекулярной фракцией белков крови. Определение оГци и его Кф дает более полную информацию с учетом части Гци, транспортируемой путем рецепторного эндоцитоза в клетки, экспрессирующие рецепторы к активированному МГ и ЛПНП.

Благодарность

Работа выполнена при поддержке научной части ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Список литературы

1. Жлоба А.А. Диагностика, патогенез и интерпретация лабораторного исследования при гипергомоцистеинемии // В книге: "Клиническая и экспериментальная кардиология" под ред. чл.-корр. РАМН проф. Е.В. Шляхто. — Издательство ООО "Академический медицинский центр". — СПб 2005. — С 198- 208.
2. Fridman O., Fuchs A.G., Porcile R., Morales A.V., Gariglio L.O. Paraoxonase: its multiple functions and pharmacological regulation // Arch Cardiol Mex. — 2011. — V 81. — № 3.- P 251-260.
3. Głowacki R., Bald Jakubowski E. An on-column derivatization method for the determination of homocysteine-thiolactone and protein N-linked homocysteine // Amino Acids. — 2011. — V 41. — P 187-194.
4. Glushchenko A. V. and Jacobsen D. W. Molecular Targeting of Proteins by L-Homocysteine: Mechanistic Implications for Vascular Disease// Antioxid Redox Signal. 2007. — V 9. — № 11. — P. 1883–1898.
5. Jakubowski H., Głowacki R. Chemical biology of homocysteine thiolactone and related metabolites // Adv Clin Chem. 2011. — V 55. — P. 81-103.
6. Ueland P.M., Mansoor M.A., Guttormsen A.B. et al. Reduced, oxidized and protein-bound forms of homocysteine and other aminothiols in plasma comprise the redox thiol status – A possible element of the extracellular antioxidant defense system // J Nutr. – 1996. – V 126. – P. 1281S – 1284S.

7. Mansoor M.A., Svardal A.M., Ueland P.M. Determination of the *in vivo* redox status of cysteine, cysteinylglycine, homocysteine, and glutathione in human plasma // *Anal Biochem.* — 1992. — V 200. — P 218–229.
8. Mansoor M.A., Svardal A.M., Schneede J., Ueland P.M. Dynamic relation between reduced, oxidized and protein-bound homocysteine and other thiol components in plasma during methionine loading in healthy men // *Clin Chem* 1992. — V 38. — P 1316–1321.
9. Mansoor M.A., Ueland P.M., Svardal A.M. Redox status and protein binding of plasma homocysteine and other aminothiols in patients with hyperhomocysteinemia due to cobalamin deficiency // *Am J Clin Nutr.* — 1994. — V 59. — P 631–635.
10. Giustarini D., Dalle-Donne I., Lorenzini S. et al. Age-related influence on thiol, disulphide and protein mixed disulphide levels in human plasma // *J Gerontol A.* — 2006. — V 61. — P 1030–1038.
11. Rossi E, Beilby JP, McQuillan BM, Hung J. Biological variability and reference intervals for total plasma homocysteine// *Ann Clin Biochem.* - 1999. - V 36. - P 56-61.
12. Rossi R., Giustarini D., Milzani A., Dalle-Donne I. Cysteinylolation and homocysteinylolation of plasma protein thiols during ageing of healthy human beings // *J Cell Mol Med.* — 2009. — V 13.- No. 9b. — P 3131–3140.
13. Sengupta S., Chen H., Togawa T. et al. Albumin thiolate anion is an intermediate in the formation of albumin-S-S-homocysteine // *J Biol Chem.* — 2001. — V 276. — P 30111–30117.
14. Zinellu A., Sotgia S., Scanu B. et al. S-homocysteinylated LDL apolipoprotein B adversely affects human endothelial cells *in vitro*//*Atherosclerosis.* — 2009. — V 206. — № 1. — P. 40-46.
15. Жлоба А.А. Блашко Э.Л., Шляхто Е.В. Связывание гомоцистеина высокомолекулярными белками α 2-макроглобулином в плазме крови у пациентов с гипергомоцистеинемией// Бюллетень научно-исследовательского института кардиологии имени В.А. Алмазова. — 2005. — Т3. — № 1. — С. 67.
16. Catanescu C.O., Willard B.B., Kinter M.T., Zhloba A.A., Jacobsen DW. Structural modifications of homocysteinylated- α -2-macroglobulin. *FASEB J.* — 2008. — V 22. — P. 1057–1063.
17. Togawa T., Sengupta S., Chen H. et al. Mechanisms for the formation of protein-bound homocysteine in human plasma// *Biochem Biophys Res Commun.* — 2000. — V 277. — P 668–674.
18. Catanescu C.O., Barbato J.C., DiBello P.M, Willard B., Kinter M.T., Zhloba A.A., Jacobsen D.W. Molecular targeting of α -2-macroglobulin by homocysteine: stoichiometry and possible implications in inflammatory diseases // *FASEB J.* - 2007. — V 21. — P. 641–648.
19. Xiao Y., Zhang Y., Lv X., Su D., Li D. and Xia M. et al. Relationship between lipid profiles and plasma total homocysteine, cysteine and the risk of coronary artery disease in coronary angiographic subjects // *Lipids Health Dis* 2011. — V 10. —P. 137.
20. Zhloba A.A., Blashko E.L. Liquid chromatographic determination of total homocysteine in blood plasma with photometric detection // *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* — 2004. — Vol. 800, № 1–2. — P. 275–280.
21. Жлоба А.А., Иванова С.Ю. Изучение свойств и выявление экспрессии рецептора активированного альфа-2-макроглобулина человека // *Клиническая лабораторная диагностика.* — 2002. — № 4. — С. 7–11.

22. Luoma J., Hiltunen T., Särkioja T., et al. Expression of alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein and scavenger receptor in human atherosclerotic lesions// *J Clin Invest.* — 1994. — V 93. — №5. — P 2014-2021.

23. Schulz S., Birkenmeier G., Schagdarsurengin U. et al. Role of LDL receptor-related protein (LRP) in coronary atherosclerosis// *Int J Cardiol.* — 2003. — V 92. — № 2-3. — P 137-144.

ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИЯ КАК ФАКТОР СНИЖЕНИЯ ФИБРИНОЛИТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ПРИ АКТИВИРОВАННОМ ВНУТРИСОСУДИСТОМ СВЕРТЫВАНИИ

Т.Ф.Субботина, А.А. Жлоба

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова,
Федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург

Статья опубликована в журнале «Артериальная гипертензия», 2013. – № 5. – С. 435-441.

Введение.

Концентрация в крови D-димера – конечного продукта лизиса поперечно-сшитого фибрина плазмином – используется в клинических исследованиях в качестве надежного и чувствительного маркера активации внутрисосудистого свертывания и индуцируемого этим процессом (т.е. вторично-активируемого) фибринолиза. Определение уровня D-димера было надежно апробировано в диагностике тромбоза глубоких вен, тромбоемболии легочной артерии, тромботических осложнений атеросклероза, гестоза и других осложнений беременности, аутоиммунных воспалительных процессах [1]. Вместе с тем, этот показатель нельзя признать надежной характеристикой функционального потенциала фибринолитической системы, поскольку концентрация D-димера в крови, в первую очередь, определяется распространенностью и локализацией тромботического процесса. Высокий уровень D-димера не исключает состояния гипофибринолиза [2, 3], он является лишь указанием на распространенные отложения стабилизированного фибрина, в лизисе которого могут участвовать не только плазмин, но и другие протеиназы, в частности, эластаза и катепсин G нейтрофильных гранулоцитов [4].

Нарушения фибринолиза при активированном внутрисосудистом свертывании могут иметь самое различное происхождение, поскольку фибринолиз является многокомпонентным и сложно регулируемым процессом. Это могут быть нарушения активности или количества тканевого активатора плазминогена (т-АП) [2]; повышенная секреция его

ингибитора (ИАП-1) вследствие эндотелиальной дисфункции; резистентность фибриновых отложений к фибринолизу вследствие генетических особенностей фибриногена, либо воздействия других компонентов крови [5].

Исследования последних лет показывают, что одним из факторов, оказывающих неблагоприятное действие на процесс фибринолиза, может являться повышенный уровень гомоцистеина (Гци). Так, исследование, охватившее 3216 индивидуумов, не страдающих сердечно-сосудистыми заболеваниями, (Framingham Offspring Study, cycle 5), выявило ассоциацию повышенного уровня Гци с возрастанием содержания в крови ИАП-1, т-АП антигена, фактора фон Виллебранда и фибриногена [6], что характеризуется как протромботическое состояние. В ряде работ *in vitro* доказано, что, помимо широко известных свойств Гци вступать в реакции тиол-дисульфидного обмена с SH-группами белков, Гци в форме тиолактона способен к взаимодействию с первичными аминами. Продукты реакции Гци-тиолактона с лизином, в частности, с лизиновыми остатками фибриногена, образуются *in vivo*. В процессе коагуляции гомоцистеинилированный по остаткам лизина фибрин связывает т-АП и плазминоген, однако активация последнего происходит медленнее [7]. Другие авторы [8] *in vitro* не выявили отрицательного воздействия Гци на биологические свойства плазминогена, плазмина, т-АП и у-АП, однако показали, что в присутствии повышенной концентрации Гци образуются более тонкие, разветвленные и компактные фибриновые волокна, резистентные к фибринолизу. Это может быть объяснено тем, что N-гомоцистеинилирование вводит в состав фибриногена дополнительные сульфгидрильные группы, что может привести к изменению агрегационных свойств фибрина.

Цель настоящего исследования заключалась в выяснении реального вклада гипергомоцистеинемии (ГГци) в нарушения фибринолиза при

активированном внутрисосудистом свертывании. Для этого были использованы образцы плазмы пациентов с активированным внутрисосудистым свертыванием различной этиологии, в которых определяли уровень Гци, а потенциал системы фибринолиза характеризовали с помощью турбидиметрического глобального теста свертывания и фибринолиза. В связи с тем, что Гци имеет большое сродство к SH-группам альбумина, мы также сочли целесообразным определить в образцах количество свободных тиоловых групп.

Материалы и методы.

Характеристика образцов

В исследовании были использованы образцы бедной тромбоцитами цитратной плазмы пациентов, находящихся на стационарном лечении в клиниках Санкт-Петербургского медицинского университета с марта 2011 по май 2012, и которым по назначению лечащего врача выполняли исследование уровня D-димера. Кровь брали из локтевой вены утром натощак и анализировали в течение 1 часа после взятия. В наше исследование был включен 141 образец оставшейся после анализа плазмы (82 женщины (58,2%) и 59 мужчин (41,8%), средний возраст $53,2 \pm 7,8$ лет) с уровнем D-димера, превышавшим 500 нг/мл. Беременные и женщины, принимавшие оральные контрацептивы, в исследование не включались. Турбидиметрическое исследование фибринообразования и фибринолиза было выполнено у 57 пациентов из общей выборки. Оно включало образцы 33 женщин и 24 мужчин, средний возраст $50,6 \pm 5,7$ лет. В качестве контроля исследовано 20 аналогичным образом полученных образцов здоровых лиц, подобранных по возрасту и полу: 12 женщин и 8 мужчин, средний возраст $57,9 \pm 2,5$ лет. Образцы были предоставлены донорским пунктом Университета. Все перечисленные группы существенно не различались по полу и возрасту. *Определение D-димера*

Концентрацию D-димера определяли количественно с помощью наборов Smart D-dimer test (Eurolyser Diagnostica GmbH, Австрия). В наборе использованы моноклональные антитела, агглютинированные на частицах латекса; турбидиметрическая регистрация при 700 нм.

Определение гомоцистеина

Концентрацию общего Гци (оГци) определяли с помощью обращенно-фазового ВЭЖХ анализа согласно методу, разработанному в нашей лаборатории [9], на хроматографе Agilent 1100 (США). Использована колонка Zorbax XDB C18 (250 x 4,6) мм, УФ-детекция при 330 нм.

Турбидиметрическая регистрация свертывания и фибринолиза

Турбидиметрическую регистрацию проводили в соответствии с описанным ранее методом [10] с небольшими модификациями. 0,1 мл образца плазмы разводили в 20 раз изотоническим натрий-барбиталовым буфером, рН=7,4, содержащим 1 мМ хлорид кальция. В качестве индуктора фибринообразования использовали 0,5 единиц НИИ тромбина человека («Технология-Стандарт», Россия), а в качестве индуктора фибринолиза добавляли т-АП (Actilyse; Boehringer Ingelheim, Германия) в конечной концентрации 25 нг/мл. Динамику изменения оптической плотности регистрировали при длине волны 340 нм при 37° С на спектрофотометре СФ2000 (Россия). Расчет показателей включал определение времени свертывания (СТ – clotting time): от начала регистрации до достижения максимальной оптической плотности и время фибринолиза (CLT – clot lysis time): от начала регистрации до снижения оптической плотности на 50% от максимума. Регистрировалось также значение максимальной оптической плотности (ΔAbs).

Концентрацию свободных тиоловых групп определяли с помощью модифицированного метода Элмана [11].

Статистические методы

Анализ проводили с использованием пакета статистических программ SPSS 16.0. Поскольку подавляющее большинство исследуемых параметров имело распределение, резко отличающееся от нормального, были использованы непараметрические методы. Для характеристики данных использовали значения медиан и 25-75%-го межквартильного размаха, оценку достоверности различий проводили с помощью теста Манна-Уитни, а корреляционные связи оценивали путем вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена Rs. Критический уровень значимости (p) при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05.

Результаты.

Общий гомоцистеин

В общей выборке образцов пациентов с активированным внутрисосудистым свертыванием ($n=141$) уровень D-димера составил 1143 (725-2000) нг/мл, а концентрация оГци 9,4 (6,1-14,1) мкМ. Корреляция между этими показателями отсутствовала. Обращала на себя внимание большая вариабельность показателя оГци с минимумом 2,1 и максимумом 63,1 мкМ, чего не отмечалось в образцах контрольной группы: 10,6 (7,9 – 11,7) мкМ. Достоверной разницы между выборками обнаружено не было. Тем не менее, у 52 пациентов (36,9%) уровень оГци превышал верхний квартиль контрольной группы. Таким образом, принимая за точку cutoff значение 75-го перцентиля оГци=12 мкМ, следует заключить, что у значительного числа пациентов отмечалась умеренная ГГци. Среди них оказалось 30 мужчин, что составило 57,7% от числа пациентов с ГГци, тогда как в общей выборке мужчин было только 41,8%.

Фибринообразование и фибринолиз

Результаты, полученные при турбидиметрическом исследовании образцов, и другие данные представлены в таблице 1. Турбидиметрические показатели всей группы пациентов с активированным внутрисосудистым

свертыванием ($n=57$) не имеют достоверных отличий от контрольной группы, однако характеризуются широкой вариабельностью, в особенности время фибринолиза CLT. Межквартильный размах этого показателя у пациентов (340 – 451 с) более чем в три раза превышает таковой в контрольной группе (362 – 392 с). Гистограмма CLT пациентов (рис. 1) имеет два максимума, соответствующих ускоренному (340-360 с) и замедленному (480-500 с) фибринолизу. Таким образом, по функциональному состоянию фибринолиза исследуемая группа неоднородна. Это дает основание разделить ее на две соответствующие подгруппы. Границей между ними принято значение $CLT=395$ с, которое хорошо согласуется с гистограммой (рис.1), и одновременно соответствует 90-му перцентилю контрольной группы. Из данных таблицы 1 видно, что образцы пациентов с пролонгированным фибринолизом в сравнении с образцами пациентов с нормальным или ускоренным фибринолизом, характеризуются достоверно более высокой максимальной оптической плотностью ($p=0,026$), и более высокими уровнями оГци ($p=0,0001$) при существенно пониженном содержании SH-групп ($p=0,022$). Уровень D-димера в этой подгруппе также выше, однако разница не достигает статистической значимости ($p=0,065$). Показатели CLT, ΔAbs и оГци пациентов с гипофибринолизом достоверно отличаются также от контрольной группы.

Более наглядно распределение концентраций оГци в группах наблюдений показано на рис. 2. ГГци отмечается только у 5 пациентов с нормальным или ускоренным фибринолизом (17,9%), и у 17 (51,7%) пациентов с гипофибринолизом.

Корреляционные связи между показателями

В представленной выборке пациентов наиболее сильная корреляционная связь обнаружена между временем фибринолиза CLT и концентрацией оГци ($R_s= 0,564$, $p=0,0001$). С временем фибринолиза

также достоверно коррелирует уровень D-димера ($R_s = 0,313$, $p = 0,018$). Максимальная оптическая плотность сгустка отрицательно коррелирует с временем свертывания СТ и с содержанием свободных тиоловых групп ($R_s = -0,419$, $p = 0,001$ и $R_s = -0,345$, $p = 0,039$, соответственно). Наконец, обнаружена отрицательная корреляционная связь оГци и тиоловых групп, хотя уровень значимости немного превышает пороговое значение ($R_s = -0,315$, $p = 0,052$). При разделении выборки на подгруппы соответственно длительности фибринолиза характер корреляционных связей сохраняется в обеих подгруппах, однако есть некоторые особенности. В подгруппе с нормальным или укороченным временем фибринолиза обнаруживается высоко достоверная корреляция показателей СТ и CLT ($R_s = 0,658$, $p = 0,0001$), отсутствующая в общей выборке, а в подгруппе с пролонгированным фибринолизом корреляция уровня D-димера и показателя CLT близка к нулю ($R_s = 0,074$); корреляция же оГци и времени фибринолиза значительно ослабляется и не достигает достоверного уровня ($R_s = 0,251$, $p = 0,189$).

Обсуждение.

В настоящем исследовании мы показали, что состояние активации внутрисосудистого свертывания и фибринолиза, тестируемое по уровню D-димера, весьма часто ассоциируется с повышенной концентрацией оГци. В общей выборке из 141 пациента с активацией внутрисосудистого свертывания и уровнем D-димера > 500 нг/мл частота ГГци составила 36,9%, она носила умеренный характер и отмечалась преимущественно у мужчин. Таким образом, ГГци можно рассматривать в качестве одного из факторов риска развития данного нарушения гемостаза. Наше исследование не выявило ассоциации уровня оГци и времени свертывания СТ. Однако в использованной нами тестовой системе, где в качестве индуктора свертывания использовали тромбин, такой результат показывает лишь то, что мы не обнаружили влияния Гци на процесс

агрегации фибриновых волокон. Наиболее вероятным представляется, что протромботический эффект Гци опосредуется его действием на предшествующие звенья коагуляционного каскада, на эндотелиальные клетки и тромбоциты. Так, S-гомоцистеинилирование фактора V приводит к тому, что образующийся из него под действием тромбина фактор Va более устойчив к инактивации и, таким образом, пролонгирует действие тромбина на его основной субстрат – фибриноген [12].

Анализ частоты встречаемости ГГци в зависимости от длительности фибринолиза показывает, что среди пациентов с пролонгированным фибринолизом частота ГГци составляет более половины (51,7%) наблюдений (рис. 2). Таким образом, представляется, что умеренная ГГци не только играет роль в развитии активации внутрисосудистого свертывания, но и предрасполагает к нарушению фибринолиза при этом патологическом состоянии.

Выявленная нами корреляция уровня оГци и длительности фибринолиза согласуется с данными других авторов [13]. Однако в нашем исследовании эта корреляционная связь была достоверной только в группах пациентов с нормальным или ускоренным фибринолизом, а также в группе доноров и отсутствовала в группе пациентов с гипофибринолизом, т.е. как раз там, где уровень оГци был выше (табл. 1). Это позволяет прийти к выводу о том, что Гци даже в нормальных концентрациях является одним из многочисленных факторов, определяющих длительность фибринолиза. Что касается ингибирующего воздействия повышенных концентраций Гци на активность фибринолиза, то этот эффект является, вероятно, опосредованным каким-либо фактором, оставшимся за рамками нашего исследования. Например, известно, что Гци облегчает присоединение липопротеина(а) к т-АП-связывающим участкам фибрина, тем самым замедляя активацию плазминогена и последующий фибринолиз [14].

В нашем исследовании выявлено также, что пролонгирование фибринолиза при активированном внутрисосудистом свертывании ассоциируется также с пониженным содержанием свободных сульфгидрильных групп, причем существует отрицательная корреляционная связь между их уровнем и концентрацией оГци. Эта связь вполне объяснима, поскольку известно участие Гци в развитии оксидативного стресса, опосредованное его воздействием на эндотелиальные клетки и тромбоциты. Так, в эндотелиальных клетках, снижая доступность внутриклеточного тетрагидробиоптерина, Гци вызывает понижение активности эндотелиальной NO-синтазы, следствием чего является уменьшение продукции оксида азота и повышенное образование перксинитрита и активных форм кислорода [15]. Нами выявлена отрицательная корреляция максимальной оптической плотности ΔAbs и уровня свободных сульфгидрильных групп. Вероятно, окислительная модификация белковых и липидных компонентов плазмы может привести к модификации свойств фибринового сгустка и понижению его доступности для фибринолиза.

Список литературы

1. Tripodi A. D-dimer testing in laboratory practice // *Clin Chem.* - 2011. – V. 57. – P. 1256-1262.
2. Yurdakul S, Hekim N, Soysal T et al. Fibrinolytic activity and d-dimer levels in Behçet's syndrome // *Clin Exp Rheumatol.* – 2005. – V. 23(Suppl 38). – P. S53-58.
3. Undas A, Zawilska K, Ciesla-Dul M et al. Altered fibrin clot structure/function in patients with idiopathic venous thromboembolism and in their relatives // *Blood.* – 2009. – V. 114. – P. 4272-4278.
4. Matsumoto T, Wada H, Nobori T et al. Elevated plasma levels of fibrin degradation products by granulocyte-derived elastase in patients with disseminated intravascular coagulation // *Clin Appl Thromb Hemost.* – 2005. – V. 11. – P. 391-400.
5. Okraska-Bylica A, Wilkosz T, Slowik L et al. Altered fibrin clot properties in patients with premature peripheral artery disease // *Pol Arch Med Wewn.* – 2012. – V. 122. – P. 608-615.
6. Tofler GH, D'Agostino RB, Jacques PF et al. Association between increased homocysteine levels and impaired fibrinolytic potential: potential mechanism for cardiovascular risk // *Thromb Haemost.* – 2002. – V. 88. – P. 799-804.
7. Sauls DL, Lockhart E, Warren ME et al. Modification of fibrinogen by homocysteine thiolactone increases resistance to fibrinolysis: a potential mechanism of the thrombotic tendency in hyperhomocysteinemia // *Biochemistry.* – 2006. – V. 45. – P. 2480-2487.

8. Lauricella AM, Quintana I, Castañon M et al. Influence of homocysteine on fibrin network lysis // *Blood Coagul Fibrinolysis*. – 2006. – V. 17. – P. 181-186.
9. Zhloba AA, Blashko EL. Liquid chromatographic determination of total homocysteine in blood plasma with photometric detection // *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. – 2004. – V. 800. – P. 275-280.
10. Zhloba AA, Subbotina TF, Lupan DS et al. Arginine and lysine as products of basic carboxypeptidase activity associated with fibrinolysis // *Biochemistry (Moscow) Suppl B: Biomed Chem*. – 2012. – V. 6. – P. 261–265.
11. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups // *Arch Biochem Biophys*. – 1959. – V. 82. – P. 70–77.
12. Undas A, Williams EB, Butenas S et al. Homocysteine inhibits inactivation of factor Va by activated protein C // *J Biol Chem*. – 2001. – V. 276. – P. 4389–4397.
13. Undas A, Brozek J, Jankowski M et al. Plasma homocysteine affects fibrin clot permeability and resistance to lysis in human subjects // *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. – 2006. – V. 26. – P. 1397–1404.
14. Harpel PC, Chang VT, Borth W. Homocysteine and other sulfhydryl compounds enhances the binding of lipoprotein (a) to fibrin: a potential biochemical link between thrombosis, atherogenesis, and sulfhydryl compound metabolism // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 1992. – V. 89. – P. 10193–10197.
15. Topal G, Brunet A, Millanvoye E et al. Homocysteine induces oxidative stress by uncoupling of NO synthase activity through reduction of tetrahydrobiopterin // *Free Radic Biol Med*. – 2004. – V. 36. – P. 1532-1541.

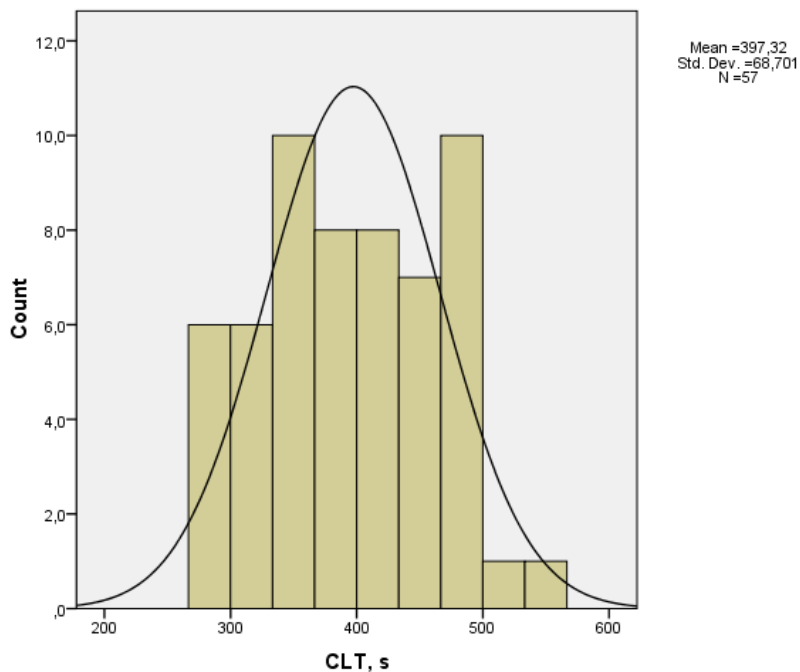


Рис. 1. Гистограмма времени фибринолиза (CLT) у пациентов с активированным внутрисосудистым свертыванием (n=57) имеет два максимума, соответствующих ускоренному и замедленному фибринолизу.

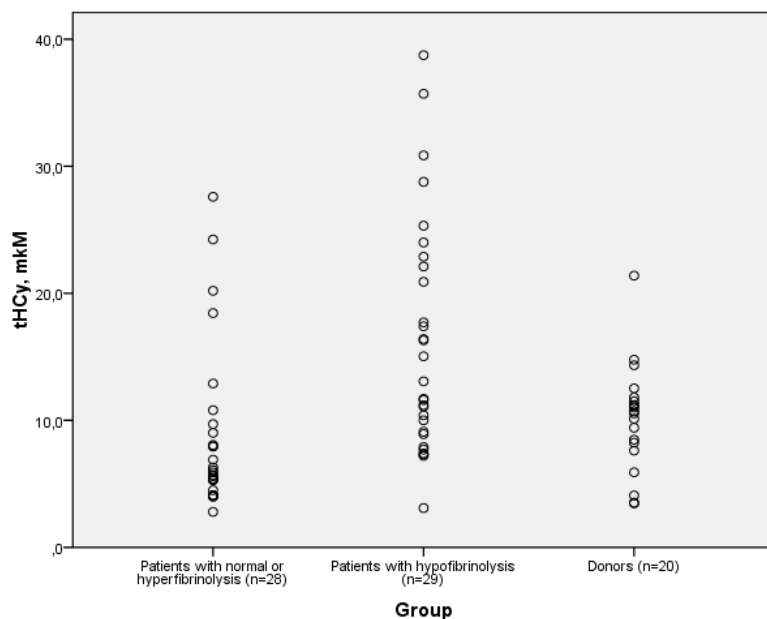


Рис. 2. Диаграмма рассеяния концентраций общего гомоцистеина (oГци) у пациентов с активированным внутрисосудистым свертыванием и различными функциональными характеристиками фибринолиза в сравнении с контрольной группой (доноры).

Таблица 1

Анализируемые показатели в общей группе пациентов и при разделении ее на подгруппы в зависимости от длительности фибринолиза в сравнении с контролем

	Все пациенты (n=57)	Пациенты с CLT < 395 с (n=28)	Пациенты с CLT ≥ 395 с (n=29)	Контрольная группа (n=20)
СТ, с	75 (68 – 83)	75,5 (69 – 83,5)	75 (67 – 83)	80 (75 – 88)
CLT, с	395 (340 - 451)	339 (319 – 361)	451 * # (425 – 488)	377,5 (362 – 392)
ΔAbs 340 нм	0,210 (0,166 – 0,283)	0,185 (0,147 – 0,245)	0,220 * # (0,186 – 0,400)	0,181 (0,162 – 0,200)
D-димер, нг/мл	1000 * (700 - 2000)	861 * (675 – 1618)	1500 * (800 – 2300)	< 250
oГци, мкМ	9,1 (5,9 – 17,4)	6,0 (4,9 – 9,4)	13,1 *# (9,1 – 22,1)	10,6 (7,9 – 11,7)
SH-группы, мкМ	121,1 (96,4 – 150)	136,9 (105,6 – 168,9)	106,1 *# (57,4 – 141,4)	178,8 (128,7 – 226,1)

Приведены значения медиан (25-75% межквартильный размах). СТ= время свертывания; CLT= время фибринолиза; ΔAbs= максимальная оптическая плотность; oГци= общий гомоцистеин. * $p < 0.05$ в сравнении с контрольной группой; # $p < 0.05$ в сравнении с группой пациентов без замедления фибринолиза.

УЛЬТРАФИЛЬТРАЦИЯ В КАЧЕСТВЕ ПРЕАНАЛИТИЧЕСКОЙ СТАДИИ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ КОНЦЕНТРАЦИИ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ В ПЛАЗМЕ КРОВИ

Е.С. Алексеевская, А.А. Жлоба, Т.Ф. Субботина

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова
Федеральный медицинский исследовательский центр им. акад. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург

Статья опубликована в журнале «Клиническая лабораторная диагностика», 2013. – № 11. – С.27-30.

Резюме: Определение уровня молочной кислоты в плазме крови и других объектах особенно часто используют для выявления дисфункции митохондрий. В ходе исследования проанализированы образцы плазмы крови и ультрафильтраты плазмы 80 здоровых лиц и 73 пациентов с активацией внутрисосудистого свертывания и фибринолиза с использованием лактатоксидазного теста. При сравнении результатов определения уровня молочной кислоты в плазме крови и ее ультрафильтрате в 72% случаев наблюдали более высокие значения концентрации обнаруживаемой молочной кислоты после процедуры ультрафильтрации, позволившей отделить подавляющее количество белка. В соответствии с накопленным опытом в клинико-диагностической практике следует использовать энзиматические тесты для определения уровня молочной кислоты в плазме крови и других объектах. В настоящем исследовании показана целесообразность использования ультрафильтрата плазмы для определения уровня молочной кислоты.

Ключевые слова: молочная кислота; ультрафильтрация; преаналитический этап; митохондриальная дисфункция; диагностика.

Концентрация *L*-молочной кислоты (МК) в крови, цереброспинальной жидкости и других объектах исследования является одним из наиболее распространенных показателей митохондриальной дисфункции (МД) [1], а также прогностическим показателем адекватности системной перфузии [2], однако не обладающим абсолютной диагностической специфичностью [3, 4, 5, 6, 7]. Метаболомный профиль плазмы крови при МД характеризуется изменением как концентрации МК [1, 8], так и других органических кислот – участников митохондриального метаболизма, а также аминокислот – источников интермедиатов цикла Кребса [9, 10, 11].

При определениях МК и других органических кислот конечный результат во многом зависит от условий пробоподготовки образцов, преаналитического этапа анализа. Ошибки на данном этапе определяют более половины всех неправильных результатов лабораторных тестов [12]. Несоблюдение пациентом правил сбора биологического образца также может исказить результаты теста на МК. Физическая нагрузка, психологический стресс, прием алкоголя и некоторых лекарственных средств накануне анализа ведут к повышению концентрации МК [13, 14, 15, 16].

Концентрация МК в цельной крови может быстро увеличиться в результате процессов внутриклеточного гликолиза. Поэтому для получения правильных результатов необходимо сразу выполнить отделение клеточных элементов. Кровь до центрифугирования должна храниться на льду. Допускается хранение цельной крови при комнатной температуре не более 15 мин [17]. Однако в настоящее время отсутствуют единые методические указания в отношении пробоподготовки биологических жидкостей до анализа концентрации МК. Большинство производителей тест-систем для определения МК в качестве объекта исследования указывают плазму крови, несмотря на наличие в этом материале ферментов, влияющих как на содержание МК, так и на

ферментативные реакции, обеспечиваемые тест-системой в ходе аналитической процедуры.

Целью настоящей работы явилась оценка влияния отделения белков при помощи ультрафильтрации на уровень МК в анализируемом образце. Работа предпринята ввиду отсутствия данных в инструкциях к тест-системам о возможном влиянии белковых факторов крови на результат анализа.

Материалы и методы. В работе было изучено 73 образца пациентов (34 мужчин и 39 женщин) с активацией внутрисосудистого свертывания и фибринолиза в возрасте от 21 года до 75 лет (средний возраст 61,5 лет). Плазму крови этих пациентов получали спустя 30 мин после взятия. Для оценки влияния длительного выдерживания крови перед отделением плазмы перед анализом в работе приняли участие 80 здоровых доноров (33 мужчины и 47 женщин) в возрасте от 30 лет до 61 года (средний возраст в группе составил 41,3 лет). Плазму доноров получали спустя 1,5 – 3 часа от момента забора крови.

Ультрафильтрат плазмы получали центрифугированием при 2000 g в течение 1 часа с использованием центробежных концентраторов Vivaspin с мембраной 3,000 MWCO PES (Sartorius Stedim Biotech, Germany) при температуре +4 °C. Эти фильтры не пропускают в фильтрат молекулы с массой более 3 кДа. Для получения ультрафильтрата плазму крови смешивали с 0,9 % раствором *NaCl* в соотношении 1:4. Потери жидкости за счет испарения предотвращали путем закрытия концентраторов плотной крышкой.

Концентрацию МК в плазме и ультрафильтрате плазмы крови определяли колориметрически с помощью лактатоксидазного теста по набору фирмы *Olvex Diagnosticum* (Россия). Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета прикладных программ *SPSS* 16.0. Учитывая существенные отклонения в распределении данных от

нормального распределения, описательная статистика основывается на медианных оценках и межквартильном размахе. Достоверность различий между связанными и независимыми выборками оценивалась с помощью тестов Вилкоксона и Манна-Уитни, соответственно. Уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. В первой серии опытов проведено изучение содержания МК в 6 образцах плазмы крови пациентов с активированным внутрисосудистым свертыванием при помощи двух ферментативных тест-систем (Таблица 1). В таблице представлены данные, полученные с использованием ферментативных наборов фирм *Olvex Diagnosticum* и *Vital Development Corporation* (Россия). Получены близкие данные, показывающие достоверно более высокие значения концентраций МК в ультрафильтратах плазмы ($p < 0,05$). Эта прибавка не может быть объяснена разведением образца перед анализом, в том числе при ультрафильтрации, а зависит от удаления белков из препарата плазмы.

Таблица 1.

В экспонированных образцах от доноров, как и ожидалось, среднее значение концентрации МК в плазме крови оказалось существенно выше референтных пределов и составило, в среднем, $3,45 \pm 0,13$ ммоль/л (Рис. 1). Из них в 69 образцах (86%) концентрация МК в плазме превысила верхнюю границу референтного интервала, равную 2,44 ммоль/л [18]. Данные результаты показали важность соблюдения принципа минимизации времени процессирования образца крови при комнатной температуре. Несвоевременное отделение плазмы от форменных элементов привело к значительному завышению результатов теста, по данным которого, более чем у половины обследованных здоровых лиц имеется повышенный уровень МК, что может привести к ложноположительному выводу о лактоацидозе.

После ультрафильтрации в плазме доноров выявляемая концентрация МК оказалась существенно выше и составила $4,23 \pm 0,15$ ммоль/л. Из них в 57 образцах концентрация МК в пересчете на ее уровень в плазме крови была выше, чем в плазме без ультрафильтрации, в среднем на $39,0 \pm 3,7\%$ (Рис. 1). Только в 18 образцах концентрация МК, определяемая в плазме и ее ультрафильтрате, отличалась несущественно, и лишь у пяти лиц уровень МК в ультрафильтрате плазмы был ниже, чем в плазме.

Рисунок 1.

Развитие методических возможностей определяет появление новых диагностических тест-систем. Вид пробоподготовки и преаналитическая стадия влияют на получаемые результаты. Несколько десятилетий назад наиболее широко в исследовании нарушений углеводного метаболизма применяли метод Баркера-Саммерсона, основанный на том, что из МК в присутствии серной, фосфорной кислот и солей меди образуется уксусный альдегид, который реагирует с п-оксидифенилом с образованием окрашенного в фиолетовый цвет соединения (1,1-ди-(оксидифенил)-этан). Появление более точных и чувствительных ферментативных методов определения МК привело к существенному изменению референтных границ данного аналита. Данные из *Human Metabolome Database* [18] демонстрируют, что за последние 30 лет референтный диапазон для МК сократился практически в 1,5 раза. Так, по данным исследований 1981-1992 годов концентрация МК у взрослых здоровых людей варьировала от 1,7 до 3,1 ммоль/л. В работе 2011 года референтный интервал для МК указан уже в пределах 1,1-2,1 ммоль/л [19].

Однако при использовании ферментативных методов для определения уровня МК также существует ряд аналитических проблем. Исторически более ранний, основанный на оптической реакции Варбурга, метод Хохорста заключается в том, что в присутствии лактатдегидрогеназы и NAD^+ лактат переходит в пируват. Поглощение образуемого NADH при

340 нм пропорционально концентрации МК в образце. Так как данный фермент катализирует и прямую, и обратную реакцию, для полного окисления лактата необходимо удалять из реакционной среды образующийся пируват. С этой целью используется гидразин-глициновый буфер. Однако гидразин является нестойким соединением, быстро подвергающимся окислению при хранении, что усложняет стандартизацию данной методики.

На развитии цветной реакции основан современный вариант ферментативных тестов, который и был использован в ходе данного исследования. В процессе пероксидазной реакции, сопряженной с реакцией окисления МК под действием лактатоксидазы, образуется хромоген, поглощение которого при соответствующей длине волны пропорционально концентрации МК в образце [20]. Рекомендательный Ассоциацией клинической биохимии Великобритании (*The Association for Clinical Biochemistry*) референтный интервал 0,6-2,5 ммоль/л для МК приводится исключительно для лактатоксидазного метода (*Pathology Harmony Group, Clinical Biochemistry Outcomes, January 2011*).

Результаты наших исследований показали, что при интерпретации результатов данного вида тестов необходимо учитывать ряд новых факторов. В 72% случаев мы получили повышение концентрации МК в фильтрате плазмы относительно образцов, не подвергавшихся ультрафильтрации. По-видимому, полученные результаты связаны с тем, что ферменты плазмы, а именно каталаза, влияют на развитие цветной реакции, связанной с образованием H_2O_2 и приводят к искажению результатов анализа.

В группе лиц с активированным внутрисосудистым свертыванием среднее значение концентрации МК в ультрафильтрате плазмы крови составило $3,47 \pm 0,17$ ммоль/л (Рис.1). Концентрация МК была выше верхней границы референтного интервала (2,44 ммоль/л) у 55 пациентов

(75%). Приведенные результаты демонстрируют особую важность преаналитического этапа для определения уровня МК в крови. Длительное процессирование крови приводит к повышению уровня МК за счет активного гликолиза в эритроцитах. Это объясняет высокую, на уровне лактоацидемии, концентрацию МК у здоровых лиц, обнаруженную после 3-х часового экспонирования при комнатной температуре.

Следует обратить внимание и на *D*-лактат в качестве потенциального показателя для оценки МД. Данный энантиомер МК образуется не только в результате жизнедеятельности микрофлоры кишечника, но под действием митохондриального фермента глиоксалазы II (КФ 3.1.2.6). В литературе описано повышение *D*-лактата при сахарном диабете 2 типа – заболевании, в патогенезе которого ключевую роль играют именно метаболические нарушения. Таким образом, лабораторно-диагностические технологии количественного определения энантиомеров МК также развиваются [21].

Заключение. При использовании для определения уровня МК ферментативных тестов, в которых концентрация хромогена зависит от пероксидазной реакции, целесообразно использовать в качестве биопробы не плазму крови, а ее ультрафильтрат. С точки зрения диагностики МД, анализ ультрафильтрата при определении МК также предпочтителен, так как наиболее информативен показатель отношения концентрации лактата к пирувату, а для определения уровня последнего, как правило, используется прием ультрафильтрации. Процедура ультрафильтрации позволяет удалить белковые факторы плазмы массой более 3 кДа, которые, как показали данные нашего исследования, могут в значительной степени влиять на конечный результат анализа, причем степень этого влияния для каждого пациента исходно не известна. Использование ультрафильтрата плазмы для определения уровня МК требует доработки референтного интервала.

Список литературы

1. Haas R.H., Parikh S., Falk M.J., Saneto R.P., Wolf N.I., Darin N. et al. *The In-Depth Evaluation of Suspected Mitochondrial Disease. Molecular Genetics and Metabolism.* 2008; 94 (1): 16–37.
2. Hameed S.M., Aird W.C., Cohn S.M. *Oxygen delivery. Critical Care Medicine.* 2003; 31 (12 Suppl): S658-67.
3. Gutierrez G., Wulf M.E. *Lactic acidosis in sepsis: another commentary. Critical Care Medicine.* 2005; 33 (10): 2420-2.
4. Levraut J., Ciebiera J.P., Chave S., Rabary O., Jambou P., Carles M. et al. *Mild hyperlactatemia in stable septic patients is due to impaired lactate clearance rather than overproduction. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* 1998; 157 (4 Pt 1): 1021-6.
5. Luft E.C. *Lactic acidosis update for critical care clinicians. Journal of the American Society of Nephrology.* 2001; 12 (Suppl 17): S15-9.
6. Sillos E.M., Shenep J.L., Burghen G.A., Pui C.H., Behm F.G., Sandlund J.T. *Lactic acidosis: a metabolic complication of hematologic malignancies: case report and review of the literature. Cancer.* 2001; 92 (9): 2237-46.
7. Торшин В.А. *Уровень лактата в крови как показатель СТАТ-анализа. Лаборатория.* 2001; 6 (4): 17-9.
8. Rodenburg R.J.T. *Biochemical diagnosis of mitochondrial disorders. Journal of Inherited Metabolic Disease.* 2011; 34 (2): 283–292.
9. Жлоба А.А., Маевская Е.Г. *Дисфункция анаплеротического пути энергетического метаболизма от аминокислот к сукцинату у лиц старшей возрастной группы. Артериальная гипертензия.* 2011; 17 (1): 74-8.
10. Жлоба А.А., Маевская Е.Г., Катышева Н.С. *Метилмалоновая ацидемия и аминокислоты–источники метилмалоновой кислоты и интермедиатов цикла Кребса у лиц старшего возраста. Клиническая геронтология.* 2012; 18 (5-6): 35-9.
11. Chan Y.C., Suzuki M., Yamamoto S. *A comparison of anthropometry, biochemical variables and plasma amino acids among centenarians, elderly and young subjects. Journal of the American College of Nutrition.* 1999; 18 (4): 358-65.
12. Plebani M., Carraro P. *Mistakes in a stat laboratory: types and frequency. Clinical Chemistry.* 1997; 43: 1348-51.
13. Beam A.G., Billing B., Sherlock S. *The effect of adrenaline and noradrenaline on hepatic blood flow and splanchnic carbohydrate metabolism in man. The Journal of Physiology.* 1951; 115 (4): 430–41.
14. Cesur M., Sekmen N., Badalov P., Erdemli O., Zetinbae R.R. *Клинический случай развития молочнокислого ацидоза у больного сахарным диабетом, применяющего метформин. Анестезиология и реаниматология.* 2009; (2): 74-5.
15. Marceau G., Sapin V., Jacomet C., Ughetto S., Cormerais L., Regagnon C. et al. *Frequency, risk factors, and outcome of hyperlactatemia in HIV-positive persons: implications for the management of treated patients. Clinical Chemistry.* 2003; 49 (7): 1154-62.

16. Wohl D.A., Pilcher C.D., Evans S., Revuelta M., McComsey G., Yang Y. et al. Absence of sustained hyperlactatemia in HIV-infected patients with risk factors for mitochondrial toxicity. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 2004; 35 (3): 274-8.
17. Toffaletti J.G. Blood lactate: biochemistry, laboratory methods, and clinical interpretation. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 1991; 28 (4): 253-68.
18. Human Metabolome Database. Version 3.0 (2005-2012). Available at: <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB00190.html>.
19. Psychogios N., Hau D.D., Peng J. Guo A.C., Mandal R., Bouatra S. et al. The Human Serum Metabolome. *PLoS ONE*. 2011; 6 (2). Available at: <http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0016957>.
20. Artiss J.D., Karcher R.E., Cavanagh K.T., Collins S.L., Peterson V.J., Varma S. et al. A Liquid-Stable Reagent for Lactic Acid Levels. *American Journal of Clinical Pathology*. 2000; 114: 139-43.
21. Scheijen J.L., Hanssen N.M., van de Waarenburg M.P., Jonkers D.M., Stehouwer C.D., Schalkwijk C.G. L(+) and D(-) lactate are increased in plasma and urine samples of type 2 diabetes as measured by a simultaneous quantification of L(+) and D(-) lactate by reversed-phase liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Experimental Diabetes Research*. 2012; 2012: 234812.

Таблица 1

Концентрация молочной кислоты в плазме крови пациентов (n=6) по данным анализа цельной плазмы и ее ультрафильтрата с помощью тест-систем двух производителей

Тест-система	Концентрация молочной кислоты в плазме крови Me (IQR), ммоль/л			Увеличение обнаруживаемой молочной кислоты в результате фильтрации (в % к уровню без фильтрации) Me (IQR)	Количество ультрафильтрата (от – до в % к исходному объему)
	Без фильтрации	С фильтрацией	Без фильтрации, разведение 1:4		
OD	1,5 (1,4-1,8)	2,2 (2,0-3,1)*	1,4 (1,1-2,0)#	41,7 (37,9-60,0)	76-86
Vital	1,3 (1,2-1,6)	1,9 (1,4-2,0)#	-	26,1 (12,0-46,7)	

Примечания: Me – медиана; IQR – межквартильный размах; OD – тест-система фирмы Olvex Diagnosticum; Vital – тест-система фирмы Vital Development Corporation;

* – $p < 0,05$ при сравнении с цельной плазмой;

– $p > 0,05$ при сравнении с цельной плазмой.

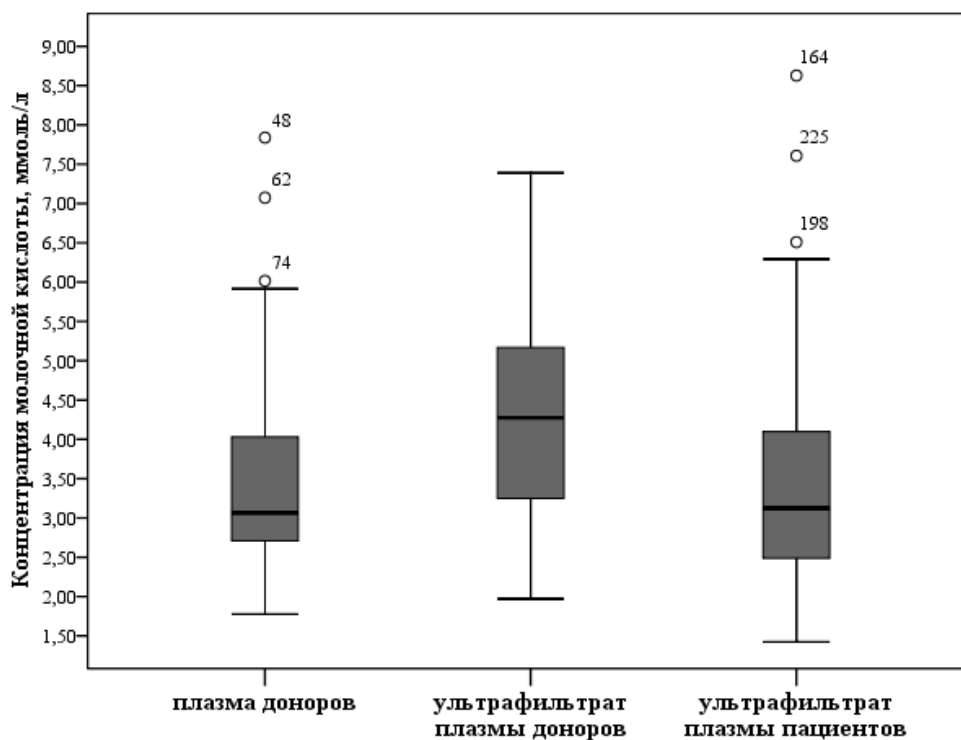


Рис. 1. Концентрация молочной кислоты при анализе цельной плазмы и ультрафильтратов в изученных образцах пациентов и доноров.

Примечание: концентрации в ультрафильтратах приведены в пересчете на цельную плазму.

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС ПРИ АКТИВАЦИИ ВНУТРИСОСУДИСТОГО СВЕРТЫВАНИЯ И ФИБРИНОЛИЗААлександрова Л.А.^{1, 2*}, Жлоба А.А.^{1, 2}, Алексеевская Е.С.^{1, 2}¹ Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова, отдел биохимии НИЦ² Федеральный медицинский исследовательский центр им. академика В. А. Алмазова, группа протеомики, Санкт-Петербург* E-mail: laa2004@mail.ru*Статья направлена в журнал «Регионарное кровообращение и микроциркуляция» в 2014 году***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 женщин) с активацией внутрисосудистого свертывания и фибринолиза (АВСФ) в возрастном аспекте. С помощью кластерного анализа получены 2 возрастные группы: группа 1 с возрастной медианой 34 (28–45) года и группа 2 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; оксидативный стресс; лактацидемия, митохондриальная дисфункция; возраст

**OXIDATIVE STRESS IN PATIENTS WITH INTRAVASCULAR COAGULATION
DISTURBANCE**Alexandrova L.A.,^{1,2} Zhloba A.A.,^{1,2} Alexeevskaya E.S.^{1,2}¹First Pavlov State Medical University of St. Petersburg.²Federal Almazov Medical Research Centre, St. Petersburg, Russia.**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 (TBARP and SOD activity in plasma) and lactacidemia may be used for case study development and new therapeutic team approach to the AIVCF.

Key words: superoxide dismutase; thiobarbituric acid reactive substances; activation of intravascular coagulation and fibrinolysis; lactacidemia

Введение

Патологические изменения сосудов тесно связаны со старением организма, в механизме развития которого вовлечены оксидативный стресс (ОС) и митохондриальная дисфункции (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 инициируют процессы свободно-радикального 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 зависит 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 ($p \leq 0,05$) и снижение СОД-активности, снижение концентрации свободных SH-групп и увеличение концентрации ТБКРП и лактата, при сравнении с контрольной группой (табл.1).

Табл.1.

Показатели плазмы крови пациентов с АВСФ и контрольной группы

№ Гр. пп		Возраст, год	ТБКРП Мкмоль/л	СОД-активность Ед./мл	SH-группы Мкмоль/л	Лактат Ммоль/л
1.	Общая группа 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)
2.	Группа 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)
3.	Группа 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)
4.	Контрольная группа 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:

1. Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха.

2. * - достоверность различий показателей при сравнении с показателями контрольной группы ($P < 0,05$).

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 2 группы больных. В группу I вошли пациенты от 20 лет до 50 и 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, (таб.1) в образцах плазмы крови больных с АВСФ была снижена независимо от возраста, как в группе I, так и в группе II при сравнении 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].

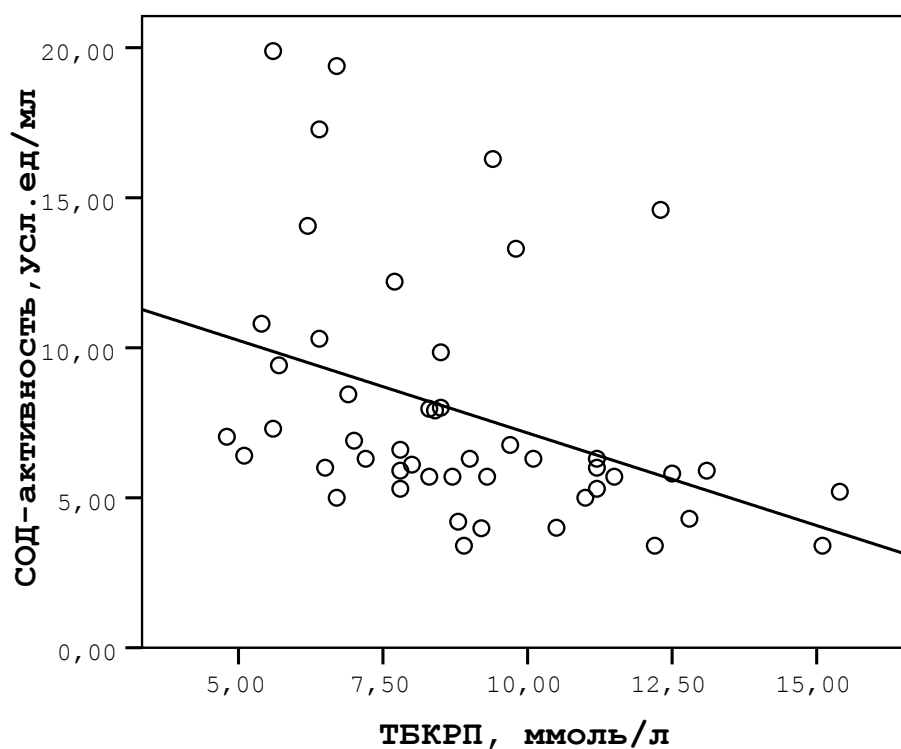


Рис. 1. Регрессионная зависимость СОД-активности от концентрации ТВКРП в плазме крови больных с АВСФ старшей возрастной группы ($y=-0,617x + 13,33$).

Концентрация лактата была достоверно ($p<0,05$) повышена независимо от возраста в обеих группах(табл.1).

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.

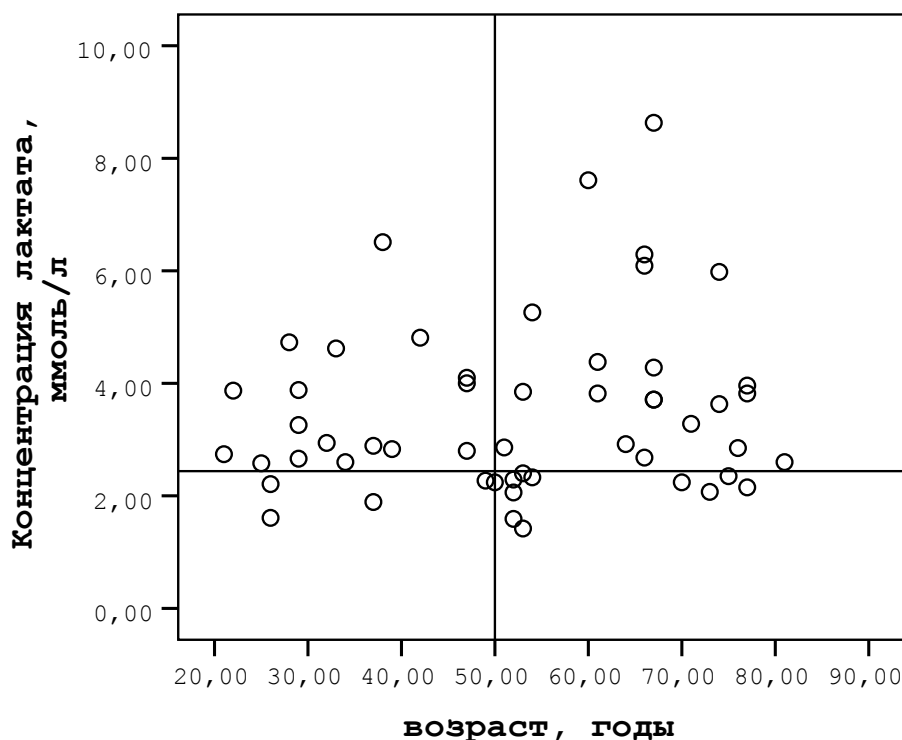


Рис. 2. Зависимость от возраста концентрации лактата в плазме крови пациентов с АВСФ

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 более 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.

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

Список литературы

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; 11:43-46.
2. Ashfaq S., Abramson J. L., Jones D. P. et al. Endothelial Function and Aminothiols Biomarkers of Oxidative Stress in Healthy Adults. Hypertension. 2008; 52:80-85.
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: 1903–1911.
4. Carter D.C and Ho J.X. Structure of serum albumin. Adv Protein Chem. 1994;45: 153-203.
5. Cui H, Kong, Y, Zhang H. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and aging. J. Signal. Transduct. 2012; 2012: Article ID 646354, 13 pages.
6. El Assar M, Angulo J, Vallejo S. et al. Mechanisms involved in the aging-induced vascular dysfunction. 2012;3: 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; 39:1391-400.
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: H1626–H1634.
9. Pandey KB and Rizvi SI. Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans. Oxid Med Cell Longev. 2010;3: 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): 9-12.
11. Rizvi S.I., Maurya P.K. Alterations in antioxidant enzymes during aging in humans. Mol Biotechnol 2007; 37:58-61.
12. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. Exp Physiol. 1997;82: 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: 44784–44790.
14. Voss P, Siems W. Clinical oxidation parameters of aging. Free Radic Res. 2006 Dec;40(12):1339-49.

**OXIDATIVE STRESS IN PATIENTS WITH INTRAVASCULAR COAGULATION
DISTURBANCE**L.A. Alexandrova^{1,2}, A.A. Zhloba^{1,2}, E.S. Alexeevskaya^{1,2}¹ The First Pavlov State Medical University of St. Petersburg, SC Department of Biochemistry, Russia² Proteomics Group, Federal Almazov Medical Research Centre, St. Petersburg, Russia*Статья, направленная в редакцию журнала "Biochemia medica" (Хорватия) в 2013 году***Abstract**

Introduction. 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.

Materials and methods. 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].

Results. 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.

Conclusion: AIVCF is accompanied by oxidative stress and lactic acidemia independently of age. Appearance markers of oxidative stress (TBARP and

SOD activity in plasma) and lactacidemia may be used for case study development and new therapeutic team approach to the AIVCF.

Key words: superoxide dismutase, thiobarbituric acid reactive substances, activation of intravascular coagulation and fibrinolysis, lactacidemia

Introduction

Vascular pathology is closely associated with aging, oxidative stress, endothelial and mitochondrial dysfunctions (1). There are several sources of reactive oxygen species (ROS) within a cell. Mitochondria are the major producer of ROS and are generated as by-products of the electron transport chain. In physiological conditions, about 0.2% to 2% of molecular oxygen are converted to superoxide anion in the mitochondria (2).

The toxic effect of excess ROS is prevented by antioxidant defenses. Under pathologic conditions, these defenses become overwhelmed, causing oxidative stress and eventually damaging mitochondria and other cell compartments, leading to cell death. Aside from mitochondria, another important source of ROS is endothelial NADPH oxidase, which generates superoxide anion radicals by transferring electrons from NADPH inside the cell across the membrane and coupling these to molecular oxygen (3). This way is one of the major causes of atherosclerosis (4). Mitochondria, when subjected to oxidative stress, become decoupled or inhibited, thus affecting energy production.

Aging is an independent cardiovascular risk factor associated with an impairment of endothelial function under pathological conditions, increased ROS levels that lead to accumulation of damaged proteins, increased mutagenesis rate, inflammation, and endothelial dysfunction. This enhanced oxidative stress can be a consequence of either an increased ROS production and/or a reduction in the antioxidant defenses (5). In human mesenteric micro vessels, this age-related endothelial dysfunction is improved by scavenging

superoxide anion radical with superoxide dismutase (SOD), which correlates with an increase in superoxide anion radical levels in these same vessels (6).

Blood vessels express three isoforms of SOD: cytosolic or Cu, Zn-SOD, Mn-SOD localized in mitochondria, and an extracellular form of Cu, Zn-SOD (EC-SOD) (7).

In view of the fact that there are no selective pharmacological inhibitors of individual SOD isoforms, the functional importance of the different SODs has been difficult to define.

Aging is accompanied by a decrease in the level of the most important antioxidant glutathione, and of cysteine (8), which can be a result of both an elevated demand and an inhibited GSH biosynthesis. Free sulfhydryl groups (SH) of glutathione and cysteine play a prominent role in antioxidant reactions, and also in reactions of catalysis, regulation, electron transport, and those preserving the correct structure of proteins (9).

A better understanding interrelationship of oxidative stress and mitochondrial dysfunctions may be useful for the prevention of age-associated vascular diseases.

The aim of the study was to assess the parameters of oxidative stress and mitochondrial dysfunctions in blood plasma changes in patients with activation of intravascular coagulation and fibrinolysis (AIVCF) in various aspects of aging.

Materials and methods

The specimens of blood plasma of 109 patients (76 males and 33 females; median age: 52 years; IQR 37 to 67 years) with AIVCF and d-dimer level >500 µg/L were selected at biochemical laboratories of The Saint Petersburg State Pavlov Medical University. Thirty subjects who underwent prophylactic medical examination and who were sex- and age-matched were used as controls. The samples were stored for analysis at -75⁰C in polyethylene tubes for 1 month.

All chemicals and solvents were of high analytical grade and were obtained from commercial sources.

Determination of TBARS.

The concentration of malondialdehyde (MDA) is used as a biomarker to measure the level of oxidative stress and is correctly determined as thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in blood plasma. TBARS were determined by reaction 2-thiobarbituric acid (TBA) with products of lipid peroxidation using the spectrophotometric technique (10). The TBARS concentration was calculated using an extinction coefficient of $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ and was expressed in $\mu\text{mol/L}$ of MDA equivalents.

Determination of SOD activity.

The family of SOD is the main component of the antiradical defense system. SOD carries out the first-line defense against oxidative stress and is used as a marker of this process. We estimated total plasma SOD activity, including the whole SOD family (11). Results have been expressed in units per milliliter of plasma.

Determination of total plasma SH-groups (tSH).

The tSH were measured using the spectrophotometric method of Ellman (12). This method is based on the ability of SH groups to bind to 5, 5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), DTNB. A 50- μl plasma was mixed with 1.45 ml 0.1 mmol/L DTNB in 0.1M Na,K-phosphate buffer, pH 8.0 in a spectrophotometric cuvette and took a background scan using the solution as background. The resulting yellow color after 10 min was monitored in the spectrophotometer at 412 nm at room temperature. The concentration of tSH, using the extinction coefficient of $14\,150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, was expressed as $\mu\text{mol/L}$ plasma.

Determination of lactate plasma level.

Respiratory chain disorders are clinically, biochemically, and molecularly heterogeneous. The lack of standardized diagnostic criteria poses difficulties in evaluating diagnostic methodologies. The assumption that mitochondrial

dysfunction is generally accompanied by increases in the plasma lactate (13) levels was evaluated in all specimens.

Lactate levels were measured in plasma by the lactic oxidase method using commercial kits (Olvex Diagnosticum, Russia).

Statistical methods

The Kolmogorov-Smirnov test was applied to test for a normal distribution. The nonparametric tests do not assume normality and were used to test ordinal variables.

Cluster analysis was performed using the binary squared Euclidean distance method for estimating aging groups.

Relationships in oxidative stress markers between controls and patients were analyzed using the unpaired Mann-Whitney *U* test. The Spearman correlation coefficient was calculated to estimate the linear correlations between variables. Statistical significance was defined as $P < 0.05$. The results were presented as median and interquartile range (Q1-Q3). Statistical analysis was performed on SPSS 15 statistical program for Windows (IBM, USA).

Results

The analysis of specimens showed high levels of TBARS, low tSH level and low SOD activity, when compared to controls (Table 1). However, a correlation between the parameters of oxidative status, lactate level, and d-dimers was not found.

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], a significant negative two-tailed correlation was found ($r = -0.528$; $P = 0.01$) between TBARS and SOD in Group 2. There seems to be a general agreement that the increase in TBARS is accompanied by a decrease in the antioxidant enzyme SOD activity during patients' aging. Unfortunately, we cannot strongly confirm that the decrease in antioxidant power in the body may be a reason for increased oxidative stress during aging.

Concentrations of tSH (Table 1) in the specimens of blood plasma were significantly lower in total group ($P=0.001$), Group 1 ($P=0.001$), and Group 2 ($P=0.001$), when compared with the control. Differences in tSH between Group 1 and Group 2 were not statistically significant ($P=0.386$).

Plasma lactate levels (Table 1) in the specimens of blood plasma of elderly patients (Group 2) did not differ from those in the younger age group (Group 1), although were significantly ($P=0.001$) increased in the both groups when compared with the control. Despite expectations, the frequencies of lactacidemia in the elderly and young contingent have no differences (Figure 1), but the lactate level of the 75-quartile was higher in Group 2.

Discussion

ROS, in particular O_2^- , bring to bear influence on the integrity of the endothelium as well as on the oxidant-mediated alterations of major factors of thrombosis, such as endothelial-derived relaxing factor and coagulation factors, through their interactions with NO, their modulation of redox-sensitive signaling system, or direct effects on lipids, enzymes, and DNA (3).

There are some data showing that ROS generation takes part in the physiological regulation of the vascular tone (3). The study performed (14) indicated that H_2O_2 released from the endothelium may account for endothelium-derived hyperpolarizing factor activity in human mesenteric arteries and coronary arterioles, where it is involved in flow-induced dilatation. Endothelial SOD plays a central role in converting $O_2^- \cdot$ to H_2O_2 . (15).

The family of SODs is the major enzyme component of antioxidant defense mechanisms of the cells. There is an opinion that the increased enzyme activity reflects the compensatory mechanism against high levels of ROS. However, the significant decrease in SOD activity, which we registered among aged patients (Group 2), should be regarded as broken antioxidant system and sign of oxidative stress. In Group 1, multidirectional changes of SOD activity were observed and the distinctions were not statistically reliable (Table 1). In our

opinion, such differences may be explained by higher adaptive capacity of a young age, which do not allow essential reduction in the activity of SOD.

This concept is not supported by our findings with regard to indirect marker of oxidative stress tSH groups. The low plasma level of tSH determined at AIVCF, independent of aging, may be the reflection of disruption of antioxidant defense system, and disturbance of the thiol metabolism is a possibility that cannot be ruled out and we need to proceed with a detailed research.

Currently, there are some evidences that stable decrease in endothelial SOD activity has a key role in constrictive remodeling after injury, promoting oxidative and nitrosative stresses accompanied by iNOS-derived NO bioavailability (16). As early as 1995, the study performed by Strålin P. et al. (17) using immunohistochemistry analysis demonstrated that the EC-SOD quantitatively prevails in the blood vessel walls, especially in arteries, while the levels of cytoplasmic Cu,Zn-SOD and mitochondrial Mn-SOD are lower, when compared with those in other tissues. Unfortunately, we were unable to estimate SOD isoforms in our study to clarify their role at AIVCF.

The review of Pandey KB et al. (18) showed an important role of the activity of antioxidant enzymes, especially SOD, in determining the human life span. There is no common opinion on the role of SOD in aging. Some researchers have shown the decrease in SOD activity during oxidative stress as well as aging (19, 20), but some studies could not detect an age-related difference or showed an increase with age (21).

Based on the mitochondrial theory of aging, closely related to the free radical theory, the proposed oxidative modifications of mitochondrial macromolecules lead to uncoupling of oxidative phosphorylation and the Krebs cycle. The prevalence of an anaerobic glycolysis gives rise to excess accumulation of lactic acid and its accumulation in plasma. Chronic lactic acidosis is a common symptom of mitochondrial disease (22).

It is known that mitochondrial dysfunction and oxidative stress are closely related. Impairment of mitochondrial function leads to increase in the oxidative stress and reduces the antioxidants further, resulting in a “circulus vitiosus.” It is conceivable that use of antioxidants breaks this cycle, but some repeated attempts of antioxidant therapy have failed (23). Good results are expected in the near term in the development of the mitochondria-targeted antioxidants (23, 24,).

The results of our study do not deny the fact of aging mitochondrial dysfunction in patients with AIVCF; however, we presume that lactacidemia appears independently of age in this pathology and may be induced by other reasons, such as ischemia-reperfusion. Furthermore, despite the fact that the lactate level is not the main marker of mitochondrial dysfunction, we cannot exclude the presence of mitochondrial disorders at AIVCF in younger.

Conclusion

These observations point to the conclusion that activation of intravascular coagulation and fibrinolysis is accompanied by oxidative stress and lactacidemia independently of age. The detection of markers of oxidative stress (high level of TBARP, low SOD activity, and low tSH in plasma) and high level of lactic acid concentration may be used for the case study development and new therapeutic team approach to the AIVCF pathology state. More detailed studies of new mitochondrial markers are needed to elucidate the role of mitochondria in AIVCF.

Tables and figures.

Table 1 Parameters of oxidative status and lactate level in the total group, young patients (Group 1), and old patients (Group 2).

Parameters*	TBARS μmol/L	SOD-activity u/ml	SH-groups μmol/L	Lac mmol/L
Total group (I) N=109	8.5 (6.5-10.6)	7.6 (5.8-12.4)	106.4 (84.8-140.8)	2.9 (2.2-3.9)
Group 1 (II) N=32	8.4 (6.6-10.2)	10.8 (5.8-15.9)	96.1 (78.2-143.6)	2.8 (2.1-3.8)
Group 2 (III) N=69	9.1 (6.1-10.8)	7.0 (5.7-10.4)	106.7 (84.5-146.0)	2.9 (2.5-4.0)
Control (IV) N=30	6.8 (5.8-7.4)	17.1 (13.9-19.6)	168.2 (140.2-214.3)	1.5 (0.4-1.6)
P I vs IV	0.001	0.001	0.001	0.001
P II vs IV	0.068	0.041	0.001	0.001
P III vs IV	0.001	0.001	0.001	0.001
p II vs III	0.979	0.053	0.396	0.371
*Values are represented as median (interquartile range)				

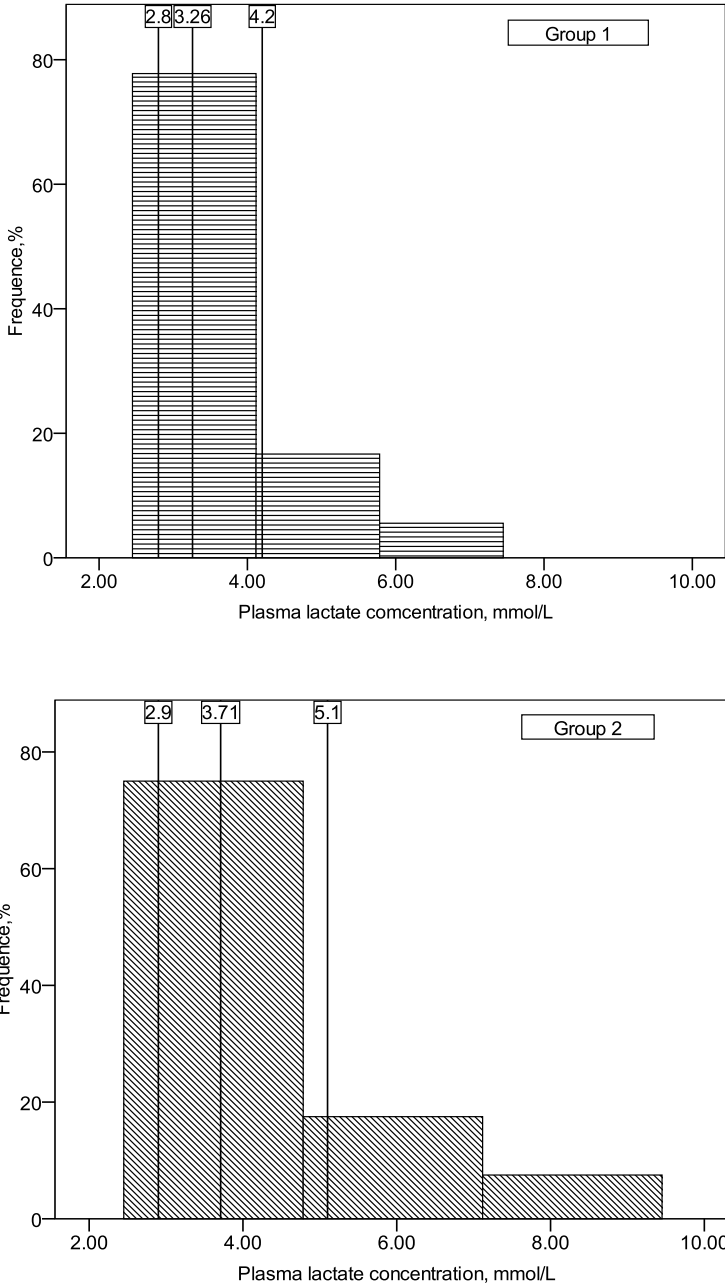


Figure 1. Frequencies (%) of cases of lactacidemia in young (Group 1) and elderly (Group 2) patients with activation of intravascular coagulation and fibrinolysis. Vertical reference lines are represented as median and interquartile range.

References

1. Cui H, Kong, Y, Zhang H. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and aging. *J Signal Transduct.* 2012;2012:Article ID 646354, 13 pages.
2. Murphy M. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 2009; 417: 1–13.
3. Bedard K and Krause KH. Expression and functional significance of NADPH oxidase 5 (Nox5) and its splice variants in human blood vessels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012; 302:(10) H1919-H1928.
4. Li JM and Shah AM. Endothelial cell superoxide generation: Regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004;287:R1014-30.
5. El Assar MM, Angulo JJ Rodríguez-Mañás LL. Mechanisms involved in the aging-induced vascular dysfunction. *Front Physiol* 2012;3:132.
6. Rodríguez-Mañás L, El-Assar M, Vallejo S, Lopez-Doriga P, Solis J, Petidier R et al. Endothelial dysfunction in aged humans is related with oxidative stress and vascular inflammation. *Aging Cell* 2009;8:226–38.
7. Faraci FM, Didion SP. Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;8:1367-73.
8. Samiec PS, Drews-Botsch C, Flagg EW, Kurtz JC, Sternberg PJr, Reed RL, et.al. Glutathione in human plasma: decline in association with aging, age-related macular degeneration, and diabetes. *Free Radic Biol Med* 1998; 24:699-704.
9. Ueland PM, Mansoor MA, Guttormsen AB, Müller F, Aukrust P, Refsum H, et al. Reduced, oxidized and protein-bound forms of homocysteine and other aminothiols in plasma comprise the redox thiol status--a possible element of the extracellular antioxidant defense system. *J Nutr* 1996; 126(4 Suppl):1281S-4S.
10. Konyukhova SG, Dubikaitis AYu, Shabunovich LV, Strashnov VI, Belotserkovskii MV. Role of activation of lipid peroxidation in the pathogenesis of experimental peritonitis. *B Exp Biol Med* 1989;107:635–37.
11. Kostyuk VA, Potapovich AI. Superoxide--driven oxidation of quercetin and a simple sensitive assay for determination of superoxide dismutase. *Biochem Int* 1989; 19:1117-24.
12. Ellman, GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959;82: 70-77.
13. Bernier FP, Boneh A, Dennett X, Chow CW, Cleary MA, Thorburn DR. Diagnostic criteria for respiratory chain disorders in adults and children. *Neurology* 2002;59:1406-11.
14. Miura H, Bosnjak JJ, Ning G, Saito T, Miura M, and Gutterman DD. Role for hydrogen peroxide in flow-induced dilation of human coronary arterioles. *Circ Res* 2003;92: e31–e40.

15. Morikawa K, Shimokawa H, Matoba T, Kubota H, Akaike T, Talukder MAH, et al. Pivotal role of Cu,Zn-superoxide dismutase in endothelium-dependent hyperpolarization. *J Clin Invest* 2003;112: 1871–79.
16. Leite PF, Danilovic A, Moriel P, Dantas K, Marklund S, Dantas AP, et al. Sustained Decrease in Superoxide Dismutase Activity Underlies Constrictive Remodeling After Balloon Injury in Rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:2197-2202.
17. Strålin P, Karlsson K, Johansson B, Marklund S. The Interstitium of the Human Arterial Wall Contains Very Large Amounts of Extracellular Superoxide Dismutase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15: 2032-36.
18. Pandey KB and Rizvi SI. Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans. *Oxid Med Cell Longev.* 2010;3: 2–12.
19. Tokunaga K, Kanno K, Ochi M, Nishimiya T, Shishino K, Murase M. Lipid peroxide and antioxidants in the elderly. *Rinsho Byori.* 1998;46:783–89.
20. Voss P and Siems W. Clinical oxidation parameters of aging. *Free Radic. Res.* 2006;40:1339–49.
20. Gianni P, Jan KJ, Douglas MJ, Stuart PM, Tarnopolsky MA. Oxidative stress and mitochondrial theory of aging in human skeletal muscle. *Exp. Gerontol.* 2004;39:1391-1400.
21. Fukai T and Fukai MU. Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. *Antioxid Redox Signal.* 2011;15: 1583–1606.
22. Thornton SN and Hess K. Exercise, lactate, and mitochondrial function in aging and diabetes. *Am J Clin Nutr.* 2009;89:1476.
23. Smith RA, Murphy MP. Mitochondria-targeted antioxidants as therapies. *Discov Med.* 2011; 57:106-14.
24. Skulachev VP. Mitochondria-targeted antioxidants as promising drugs for treatment of age-related brain diseases. *J Alzheimers Dis.* 2012; 28(2):283-9. doi: 10.3233/JAD-2011-111391.

CHARACTERIZATION OF THE SECONDARY MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION BY MULTI-SCALE SHIFTS OF PLASMA ANALYTES

Elizaveta S. Alekseevskaya, Tatiana F. Subbotina, Alexander A. Zhloba

Biochemical Department of Scientific Centre, First Pavlov State Medical University of St.Petersburg, Russia.
Proteomics Group, Federal Almazov Medical Research Centre, St. Petersburg, Russia.

Тезисы доклада на 38th FEBS Congress, 6-11 июля 2013, St. Petersburg, Russia

Опубликованы в «FEBS Journal», 2013. – V. 280 (Suppl. 1). – P. 256-257.

Metabolic profiling is the most informative laboratory characteristic of organism phenotype state [1]. The secondary mitochondrial dysfunction is characterized by deep changing in substrates utilization from plasma and mitochondrial proteins loosing from organelle.

The aim of the present study was to evaluate metabolic shifts as a characteristic of mitochondrial dysfunction (MD) in patients with activation of intravascular coagulation and fibrinolysis.

The results of testing blood plasma samples from patients (n=34, from 50 to 83 years) with D-dimer level above 500 ng/mL and lactic acid (LA) concentration above 2.2 mmol/L were compared with those of healthy donors (n=20, from 55 to 61 years). The concentrations of cytochrome C (CytC, ELISA, eBioscience, Austria), total homocysteine (tHcy) and rates of the amino acids (AA, HPLC) were determined. Statistical analysis of the data included descriptive statistics (data are presented as medians and interquartile range), comparison (Mann-Whitney's test), correlation (Spearman's criterion), and factor analysis.

The rates of analytes in a group of patients were: CytC 77(28-285) ng/L, LA 3.0(2.3-4.1) mmol/L, tHcy 13(9-19) μ mol/L, Ala 538(431-705), Gly 298(203-365), Ile 104(90-124), Leu 179(145-202), Val 203(178-248) μ mol/L. The tHcy level in patient species was significantly higher than in donors' plasma 11(8-12) μ mol/L. Median values of Ala, Ile, and Leu in patients group were greater than the corresponded 75 percentiles rates of the reference group. Besides that, the positive relationship between CytC concentration and the

unidirectional shifts of Ile and Gly in the patients group ($r=0.41$ and $r=0.42$ respectively; $p<0.05$) confirmed the presence of MD which was established by LA level. The 30% of patients had Ala/(Phe+Tyr) ratio value > 4 , which had been considered as an additional sign of MD [2]. This ratio was positively correlated with LA level in patients group ($r=0.47$; $p<0.05$). Some importance for the progression of intravascular coagulation has elevated tHcy level. Positive correlation of tHcy and CytC ($r=0.49$; $p=0.03$) demonstrated the association of mitochondrial and endothelial dysfunction. Factor analysis distributed the investigated parameters into four groups (Ft). The Ft1 included the fourteen AA. The Ft2 included LA and a ratio of Ala/(Phe+Tyr), and the Ft3 included Arg, Orn, and Cit, to the Ft4 referred tHcy, CytC, Gly, Ile, and (-)Ser. It is known that the conversion of Ser to Gly is a reaction of the one-carbon fragment formation. This reaction partially uses for Hcy remethylation. Coordinated Gly and Ile shifts correspond to their catabolism in mitochondrion.

Thus, the observed MD signs in the patients' plasma included the AA shifts associated with the mitochondrial decarboxylation pathways and Krebs cycle precursors or intermediates. The study revealed the characteristic plasma metabolite shifts which should be taken into account for MD diagnostic criteria working up. Evaluation of a multi-scale plasma proteomic and metabolomic shifts with modern analytical techniques will be find a further development in clinical biochemistry.

[1] Barrett D (2012) *Advances in metabolic profiling. Bioanalysis* 4, 643-644.

[2] [Haas](#) RH et al (2008) *The in-depth evaluation of suspected mitochondrial disease. Mol Genet Metab* 94, 16-37.

SAMPLE PREPARATION WITH AMINOTHIOL DERIVATIZATION FOR METABOLIC CHARACTERIZATION OF ENDOTHELIAL DYSFUNCTIONA.A. Zhloba^{1,2}; T.F. Subbotina^{1,2}; E.S. Alexeevskaya^{1,2}; I.A. Rodin³; A.N. Stavriani³; O.A. Shpigun³

1 Biochemical Department of Scientific Centre, First Pavlov State Medical University of St.Petersburg, Russia.

2 Proteomics Group, Federal Almazov Medical Research Centre, St. Petersburg, Russia.

3 Chemistry Department, Lomonosov Moscow State University, Russia.

*Тезисы доклада на 1st International Symposium on Profiling, Costa da Caparica (Portugal)
2-4 сентября 2013*

Abstract

High-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) method has proven to be a useful method in clinical screening. Plasma metabolic markers (free carnitine, 17 amino acids and 7 low molecular mass organic acids) associated with mitochondrial and endothelial dysfunction were recently investigated by our group [1]. Metabolic markers of endothelial dysfunction should be evaluated with quantitative determination of aminothiols [2]. The evaluation of aminothiols in plasma has been reported in many valuable and interesting works [3,4]. Disulfide-exchange and oxidative reactions take place in plasma samples, causing a protein-bound homocysteine formation. It was shown that aminothiols, especially homocysteine were lost after proteins sedimentation. In this study, a HPLC-MS/MS assay of metabolic markers of endothelial dysfunction, was developed. The HPLC part of the analytical apparatus combined a binary pump, an autosampler (injection volume - 20 μ l) and a column oven. Chromatographic separation occurred on a Synergi Polar RP-C18 column, 2.0 mm \times 250 mm, 4 μ m (Phenomenex, USA) at a flow rate of 0.5 ml*min⁻¹. The column was eluted with 20 mM ammonium acetate in water (A) and acetonitrile (B) in isocratic mode with the ratio: 95:5 (A:B). Mass spectrometric detection was done with an Applied Biosystems/Sciex Q-Trap 3200 (Darmstadt, Germany) triple quadrupole instrument in sensitive MRM mode, equipped with ElectroSpray Ionization (ESI) interface which was operated in positive and negative ion modes, separately. Data handling and

quantification were done with AppliedBiosystems/MDS Analyst 1.5 software. Random human plasma specimens were used for above mentioned markers assay. Recovery, precision and linearity were determined using acetonitrile standard solutions of carnitine, amino acids and low molecular mass organic acids and three aminothiols at various concentrations. Experiments with 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid), (DTNB) derivatization technique of aminothiols were done as previously described [5]. Each aminothiol in plasma is the sum of species including mixed disulfides with cysteine residues of plasma proteins. To accomplish these goals, we had to modify the assay to be able to measure total aminothiols in human plasma or serum, besides other targeted metabolites. Total plasma aminothiol rates were revealed after reduction step with dithiothreitol or dimercaptopropansulfonate. Plasma samples were further processed after deproteinization. Conclusion: The experimental results suggest that proposed procedure of sample preparation have practical application in clinical characterization of endothelial dysfunction. Quantitative profiling of metabolites related to endothelial dysfunction should be realized by quantification of amino acids, carnitine, low molecular mass organic acids and aminothiols with total homocysteine.

References

1. Stavriani A., Braun A., Ananieva I., Rodin I., Shpigun O., Zhloba A. LC-MS/MS method for simultaneous determination of anaplerotic dysfunction, methylmalonic acidemia and endothelial dysfunction metabolic markers in human plasma. 8th ANNUAL LC/MS/MS WORKSHOP ON ENVIRONMENTAL APPLICATIONS AND FOOD SAFETY. 2-4 July 2012; Barcelona, Spain.
2. Ueland, P.M., Midttun, O., Windelberg, A., Svardal, A., Skålevik, R., Hustad, S. Quantitative profiling of folate and one-carbon metabolism in large-scale epidemiological studies by mass spectrometry. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2007;45(12):1737–1745.
3. Jacobsen D.W. Total Plasma Homocysteine: The Mediator/Marker Controversy Continues. *Clin Chem* 2009; 55(9):1742-1743.
4. Ueland P.M. Citation classic: importance of chemical reduction in plasma and serum homocysteine analysis. *Clin Chem* 2008;54: 1085-1086.
5. Zhloba A., Blashko, E. Liquid chromatographic determination of total homocysteine in blood plasma with photometric detection. *Journal of Chromatography B.* 2004; 800: 275-80.

LARGE-SCALE METHOD OF BLOOD PLASMA FRACTIONATION FOR SULFUR AMINO ACIDS TRANSPORT EVALUATION**Alexandr A. Zhloba, Tatiana F. Subbotina**

Biochemical Department of Scientific Centre, Pavlov State Medical University of St.-Petersburg, Russia.

Proteomics Group, Federal Almazov Medical Research Centre, St. Petersburg, Russia.

E-mail: zhloba@mail.spbnit.ru

*Тезисы доклада на 13th International Congress on Amino Acids, Peptides and Proteins (ICAPP), 5-7 октября 2013, Galveston, Texas, U.S.A.**Опубликованы в журнале «Amino acids», 2013. – V. 45, № 3. – P. 586.*

Protein-bound mixed homocysteine-disulfide can be formed not only with albumin, but also especially under pathological conditions with other proteins, including apolipoprotein B and alpha 2 - macroglobulin. The distribution assessment of homocysteine (Hcy) between proteins is made by a gel-filtration method. An assessment of Hcy redistribution between fractions of proteins by means centrifugal ultrafiltration is offered.

We used blood plasma from healthy donors and cardiovascular patients including a group with elevated d-dimer level. Work represents a method of evaluation the tHcy and its fraction after ultrafiltration, allowing cut off proteins with mass above 300 kDa. Ultrafiltrates were obtained using Vivaspin 500 (Sartorius, Germany) 100 MWCO PES (~100-kDa cutoff) и 300 MWCO PES(~300-kDa cutoff) centrifugal devices. The data provide evidence the Hcy elevation in macromolecular fraction of plasmas after activation of alpha 2 - macroglobulin.

The proposed Hcy evaluation in plasma preparations prior and after ultrafiltration may be performed in any laboratory with kits for tHcy evaluation in plasma. Evaluation of Hcy fraction associated with > 300 kDa plasma proteins by means of centrifugal device Vivaspin 300 000 MWCO PES «Sartorius» provides information about Hcy transport by an additional way in macrophages, endothelial cells, smooth muscle cells and others in vascular wall by receptorial endocytosis.

FIBRINOLYSIS AS AN ADDITIONAL SOURCE OF BASIC AMINO ACIDS IN PLASMA

Tatiana F. Subbotina^{1,2}, Alexander A. Zhloba^{1,2}

Biochemical Department of Scientific Centre, Pavlov State Medical University of St.-Petersburg, Russia.
Proteomics Group, Federal Almazov Medical Research Centre, St. Petersburg, Russia.
E-mail: subbotina2002@mail.ru

Тезисы доклада на 13th International Congress on Amino Acids, Peptides and Proteins (ICAPP), 5-7 октября 2013, Galveston, Texas, U.S.A.

Опубликованы в журнале «Amino acids», 2013. – V. 45, № 3. – P. 586.

Exopeptidase activity may appear during coagulation and subsequent fibrinolysis including thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor, carboxypeptidase N, and small amounts of carboxypeptidase B. All these enzymes can cleave the C-terminal lysine and arginine residues from fibrin.

The aim was the development of a method for detection of blood carboxypeptidase activity associated with coagulation/fibrinolysis using the natural substrate fibrin by means of detection of reaction products, lysine and arginine. Plasma samples from 35 patients with cardiovascular diseases, 20 donors and 14 plasma pools have been investigated. Coagulation and subsequent fibrinolysis were initiated by addition of thrombin (or tissue factor) and tissue plasminogen activator, respectively. Arginine and lysine concentrations before and after completion of fibrinolysis were determined by RP-HPLC using C18 column. The parameters of fibrinolysis were evaluated by the clot turbidity assay.

The coagulation/fibrinolysis was accompanied by a significant (near 2-fold) increase in concentrations of arginine and lysine. The degree of increase significantly correlated with time of fibrinolysis initiation. Thereby fibrinolysis can be considered as a local source of the essential amino acids originated from fibrin clot degradation. This on-site increase in arginine concentration can be important for endothelial nitric oxide synthase activity, subsequent increase in NO production, and vasodilation. Thus, fibrinolysis provides not only clot lysis but also restoration of circulation.

SCORE HOMOCYSTEINYLACTION OF HIGH MOLECULAR WEIGHT PLASMA PROTEINS

Alexandr A. Zhloba, Tatiana F. Subbotina

Biochemical Department of Scientific Centre, First Pavlov State Medical University of St. Petersburg, Russia.
Proteomics Group, Federal Almazov Medical Research Centre, St. Petersburg, Russia.

Zhloba@mail.spbnit.ru

Статья опубликована в журнале «Amino Acids», 2014. –V. 46, №4. – P. 893-899.

Abstract

Ultrafiltration rates (filterability) of protein-bound homocysteine (Hcy), unlike glutathione, are significantly decreased in patients with cardiovascular disorders, end-stage renal diseases, and prothrombotic conditions. Reduced filterability of Hcy through 300,000 MWCO PES membranes in these groups of patients was observed, regardless of hyperhomocysteinemia degree. Filterability of homocysteine, but not of glutathione, was impaired in plasma preparations. It is possible that the patients with impaired filterability of Hcy in mixed disulfide state are characterized by increased ability of partial Hcy retention by proteins and complexes with higher-than-albumin molecular weight. These findings led us to conclude that evaluation of protein-bound Hcy filterability may provide more complete diagnostic data, in order to interpret clinical significance of hyperhomocysteinemia. The proposed Hcy filterability test may be performed as a simple laboratory procedure, in addition to conventional tests for total Hcy.

Key words: homocysteine, glutathione, centrifugal ultrafiltration

Introduction

Hyperhomocysteinemia (HHcy) is defined as elevated ($>12 \mu\text{mol/L}$) blood plasma levels of the homocysteine species (Hcy). The term “total homocysteine” (tHcy) refers to Hcy values in plasma preparations after mixed disulfides reduction. It is possible to assume that S- and N-homocysteinylation of proteins may explain some principal toxic effects of high tHcy levels. (Glushchenko and Jacobsen 2007; Ueland et al. 1996; Fridman et al. 2011; Jakubowski and

Głowacki 2011; Głowacki et al. 2011). Protein binding, as a ratio of free-to-mixed disulfides was assayed at different proportions for various plasma aminothiols, being approximately 0.2, 0.6, and 5 for Hcy, cysteine, and glutathione (Glt), respectively (Mansoor et al. 1992, 1994). Lower Hcy ratio is due to the very high Hcy *pKa* value (~10.0) therefore causing a more strong disulfide bond of its mixed disulfides. It was estimated that Hcy plasma protein binding capacity reached 4.88 ± 0.51 and 4.74 ± 0.68 $\mu\text{mol/g}$ for healthy men and women, respectively (Togawa et al. 2000). Plasma albumin, due to its Cys-34 residue, serves as the main Hcy transporter under normal condition (Sengupta et al. 2001). With increasing age, an elevation of tHcy and other aminothiols bound to blood proteins was shown (Giustarini 2006; Rossi 2009). Homocysteinylation of other proteins including fibronectin, transthyretin, and metallothionein may present a mechanistic explanation for endotoxicity of elevated tHcy (Glushchenko and Jacobsen 2007; Hubmacher et al. 2011; Silla et al. 2013). Among the large proteins, alpha-2-macroglobulin (A2M, 720 kDa) is characterized by substantial capacity of Hcy binding (Catanescu et al. 2007). It was also suggested that apolipoprotein B ($M_r > 300$ kDa) homocysteinylation can cause a receptor-mediated endocytosis of Hcy by the cells of vascular lining (Zinellu et al. 2006). Hypothetically, this homocysteinylation may play a quite significant role in the vascular wall remodeling in the course of atherogenesis.

According to our assumption, detection of elevated Hcy binding to high-molecular-weight proteins (> 300 kDa) and its reduced binding to middle-sized proteins, e.g., albumin, may be of additional diagnostic and prognostic significance. Hcy redistribution between the plasma proteins can be detected by the same analytic procedures, as tHcy assay. The procedure includes comparisons between test results obtained before and after filtration of plasma preparations through molecular filters. The aim of present study was to evaluate the levels of tHcy in fresh and thawed plasma samples and their ultrafiltrates.

Materials and methods

Chemicals

DL-Homocysteine, L-cysteine, glutathione oxidized form, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), dithiothreitol (DTT), and 5-sulfosalicylic acid were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). HPLC-grade acetonitrile was purchased from Cryochrom (St. Petersburg, Russia). Human serum albumin was obtained from Serva Chemicals (Heilderberg, Germany). Potassium dihydrogen phosphate, o-phosphoric acid, and all other chemicals used in this study were of analytical grade.

Plasma samples

Our study included healthy blood donors, patients with cardiovascular diseases (CVD), and subjects with end-stage renal disease treated at the First State I.Pavlov Medical University Hospital from 2009 to 2013. After obtaining the approval of the University Ethics Committee, the study has been performed in accordance with standards of Helsinki Declaration and its later amendments. Peripheral blood samples were collected after overnight fast (for CVD) by venipuncture into cooled tubes with EDTA. The tubes were placed on ice and processed within 20 min. After centrifugation at 3000 rpm at 4° C for 15 min, the clear plasma supernate was collected and stored at -80° C until analysis (for 1 to 4 wk). In some cases, the plasma samples were split into two aliquots. One of them was ultrafiltered and analyzed within subsequent 2 hours and the other was treated in similar way after 12-15 hours of freezing at -80° C and subsequent thawing. In all cases, there was informed consent for anonymous use of the resultant data mining.

Five groups of samples have been included in this study (tab. 1). Plasma samples of the first group were obtained from CVD patients with mildly elevated tHcy level ($19.1 \pm 3.2 \mu\text{mol/L}$), mild folic acid deficiency and methylmalonic acidemia, whereas B₁₂ contents were within a reference interval

of 133 – 675 pmol/L. The second group included CVD patients with tHcy levels approaching the upper reference limit ($12.0 \pm 6.5 \mu\text{mol/L}$), along with elevated D-dimer amounts ($> 600 \mu\text{g/L}$). Blood samples of the third group were taken from healthy donors (19 to 58 years old), being characterized by normal tHcy levels ranging from 5 to $11.7 \mu\text{mol/L}$. Nine samples from this group were ultrafiltered and analyzed without freezing, as described above. The fourth group consisted of CVD patients characterized by HHcy and hypercholesterolemia. A series of twenty-three nonfasting blood samples obtained before hemodialysis from patients with end-stage renal disease and markedly elevated tHcy were designated as Group 5 (Table 1). Routine biochemical data and clinical characteristics of the patients were gathered retrospectively.

Table 1. Plasma samples characterization

	1	2	3	4	5	
Clinical state	CVD patients with documented folate deficiency, freeze samples	CVD patients with activated intravascular coagulation, freeze samples	Donors, freeze samples	Donors, fresh samples	CVD high-cholesterolemic patients with folate deficiency, freeze samples	Hemodialysis patients with end-stage renal disease, fresh and freeze samples
N	20	17	22	9	8	23
Male/Female	10/10	7/10	8/14	3/6	2/6	11/12
Age, years	55 - 80	35 - 67	19 – 58	27 - 58	> 55	55 - 73
tHcy, $\mu\text{mol/L}$ M \pm SD (Me)	19.1 ± 3.2 (22.9)	12.0 ± 6.5 (10.8)	7.4 ± 2.5 (6.9)	7.2 ± 2.3 (6.9)	15.6 – 18.5	31.8 ± 14.4 (28.9)
Comment	Methylmalonic acid: $> 0.6 \mu\text{mol/L}$ Low folate level: $10.3 \pm 7.7 \text{ ng/mL}$; B_{12} : normal. Without vitamin supplementation	D-dimer level $> 600 \mu\text{g/L}$. Without vitamin supplementation	Without vitamin supplementation	Used for experiments with fresh and freeze samples	Total cholesterol $5.28 - 7.33 \text{ mmol/L}$; C-reactive protein: $1.65 - 9.57 \text{ mg/L}$	Dialysis-dependence > 3 years; With supplementation of B6 and folic acid. Samples taken before hemodialysis procedure; creatinine: $0.993 \pm 0.288 \text{ mM}$. Used for experiments with fresh and freeze samples.

Notes: CVD: cardiovascular diseases; tHcy: total homocysteine

Centrifugal ultrafiltration

Low-molecular-mass ultrafiltrates were obtained using Vivaspin 500 (Sartorius, Germany) 100,000 MWCO PES (~100-kDa cutoff) and 300,000 MWCO PES (~300-kDa cutoff) centrifugal devices. These membranes were used according to the manufacturer's specifications. Centrifugal ultrafiltration was carried out after 5-fold dilution of plasma with 9 g/L NaCl solution. The samples of diluted plasma were centrifuged at $6,000 \times g$ in a fixed-angle rotor for 60 min at 23-25°C, and then tHcy was measured in diluted plasma and its ultrafiltrate. Protein-bound Hcy was evaluated using ultrafiltration coefficient which was designated as *F* factor and calculated as: ***F* = tHcy in ultrafiltrate/tHcy in plasma**. Factor *F* for Glt was evaluated with the same calculations.

Homocysteine and other aminothiols assay

THcy was determined by HPLC method described previously with some modifications (Zhloba and Blashko 2004). Briefly, 100 µL of sample was mixed with 50 µL of water or calibrator, incubated with 25 µL of DTT (10 mmol/L, dissolved in 1 mmol/L EDTA) for 10 min at 60° C to reduce the disulfides and release protein-bound Hcy. Then it was mixed with 100 µL of 10 mmol/L DTNB dissolved in the 100 mmol/L potassium buffer, pH 8.0 and approximately 5 min later deproteinization was achieved by the addition of 150 µL of sulfosalicylic acid (100.0 g/L) containing 0.2 mmol/L EDTA. Precipitated proteins were removed by centrifugation at $8000 \times g$ for 5 min, and the supernatant was filtered through 0.2-µm pore-sized filter.

Agilent 1100 HPLC system (Agilent Technologies, Germany) with a degasser, a quaternary pump with low-pressure gradient flow control valve, a thermostat for the column, an autosampler, a VWD detector with a 14-µl cell and chemstation Leochem RUS verA08.03 were used. A reversed-phase Zorbax

Eclipse XDB-C8 (150×4.6 mm i.d., 5µm) column was placed in the thermostat at 30° C. A mobile phase of 9% acetonitrile and 91% of 0.1M pH 3.78 potassium phosphate buffer with the flow rate of 0.8 ml/min was used for isocratic elution of aminothiols which lasted to 4.7 min. Then, with the flow rate of 1.6 ml/min the buffer was substituted in the linear gradient mode for water by the 6.0 min, with the increase of acetonitrile amount up to 35%. From the 6.1 min up to the 7.0 min isocratic elution was going on with 80% acetonitrile and 20% of water and then by the 11.0 min a return to the initial amounts of the mobile phase components was achieved with the linear gradient mode. The aminothiol- derivative peaks were detected at 330 nm.

Supporting measurements

A2M was measured in plasma immunoturbidimetrically using Beckman Coulter, Inc. assay kit. D-dimer concentration was determined quantitatively with Smart D-dimer test reagent kit (Eurolyser Diagnostica GmbH, Austria). Plasma folic acid and vitamin B12 measurements as levels of the two important cofactors of homocysteine metabolism were performed by chemiluminescent immunoassay with an Access 2 system and reagent kits (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). Plasma methylmalonic acid concentration was determined by HPLC method (Babidge and Babidge, 1994) with fluorimetric detection (Agilent 1100, Agilent Technologies, Germany). Plasma creatinine, albumin levels and electrophoresis of plasma preparations were performed by means of standard equipment for clinical laboratories.

Statistical analysis

The statistical analysis was performed by methods of nonparametric statistics using SPSS 16.0 for Windows software package (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Between-group differences were assessed by Mann-Whitney U test, whereas Wilcoxon matched-pairs test was used for dependent variables.

Correlation analysis was performed using the Spearman correlation coefficient. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

The aim of the initial experiments was to determine the type of filter which does not transmit in ultrafiltrate the A2M molecule or its dissociated subunits. Eight samples from CVD patients of group 4 with moderate HHcy were used. After ultrafiltration through Vivaspin 100,000 MWCO PES from 8 to 37% tHcy (Me = 21%) and from 7 to 33% protein (Me = 21%) were found in ultrafiltrates. After ultrafiltration of the same plasma specimen through filters 300,000 MWCO PES ultrafiltrates contained 20 to 39% tHcy (Me = 28%) and 37 to 56% protein. In this regard, in all subsequent experiments 300,000 MWCO PES filters were used. To assess the reproducibility of Hcy filterability, seven membrane devices Vivaspin 300,000 MWCO PES were taken in experiments with one plasma preparation with tHcy content of 55 $\mu\text{mol/L}$. At 7 parallel experiments on the average 14.2 $\mu\text{mol/L}$ tHcy was found in ultrafiltrates. The coefficient of variation was 7.75%.

The subsequent experiments allowed us to proceed with evaluation of filterability for Hcy contained in preparations of plasma samples from subjects with different CVD, including the intravascular coagulation/ fibrinolysis syndrome. The *F* Factor values for Hcy were estimated in the sample groups 1, 2, and 4, with respect to the reference range of donors (Table 2).

Table 2. Ultrafiltration rates of homocysteine across Vivaspin 300,000 MWCO PES membranes for species from freeze plasma

Sample Group	Ultrafiltration factor <i>F</i> ($M \pm SD$)	Median (25%-75% percentile)
1- CVD patients with folate deficiency (N=20)	0.38 \pm 0.052	0.27*(0.18 - 0.62)
2 - CVD patients with prothrombotic state (N=17)	0.29 \pm 0.032	0.27* (0.18 - 0.36)
3 – Donors, Reference group (N=22)	0.60 \pm 0.189	0.62 (0.44 - 0.79)
4 - CVD high-cholesterolemic patients (N=8)	0.28 \pm 0.061	0.27*(0.23 - 0.32)

Notes: CVD: cardiovascular diseases; *F*: ultrafiltration coefficient which is calculated as: $F = \text{tHcy in ultrafiltrate} / \text{tHcy in plasma}$; *- $p < 0.05$ compared to Reference Group 3

Filterability of Hcy in plasma of patients with CVD was significantly reduced, as compared with reference group 3 ($p < 0.05$). In particular, reduced filterability of Hcy was more pronounced when CVD was accompanied by a prothrombotic state (Group 2), where the average value of the F factor comprised only a half of that for normal subjects (0.29 ± 0.032 vs 0.60 ± 0.189 , respectively). Such low F -values characterize a possible retention of Hcy by plasma proteins with a molecular weight of >300 kDa. It is essential to note that none of the studied groups revealed significant correlations between tHcy concentrations in plasma and ultrafiltrates.

In the reference group 3, the F value at the lower limit of interquartile range (25 percentile) was 0.44. This borderline level was used to determine the bottom reference value characterizing filterability of Hcy bound to plasma proteins. More clearly the relationship between the plasma tHcy concentrations and its filterability is shown in Fig. 1. The lines, being parallel to X and Y axes, correspond to the reference limits of 0.44 for filterability and $12.0 \mu\text{mol/L}$ for plasma tHcy levels, respectively. When considering these data, an attention should be drawn to larger scatter of variables in the samples from group 1, rather than in groups 2 and 4. We can conclude that the F values in patients with CVD are not always significantly lower than in healthy donors. Eight samples from Group 1 had $F \Rightarrow 0.44$, but were characterized by plasma tHcy $\Rightarrow 12 \mu\text{mol/L}$. On the contrary, tHcy levels were not increased in 14 samples from Group 2 (4.0 to $11.7 \mu\text{mol/L}$), but their filterability was impaired.

The abovementioned data have been obtained with samples stored at -80° . Meanwhile, sensitivity of F factor to the sample freezing/thawing remained unclear. In the following series of experiments we compared the variables, including factor F for Hcy and Glt, having been assayed in fresh plasma samples and after storage of the specimens in frozen state. For this purpose were used 23 plasma samples from the patients with end-stage renal disease treated with

hemodialysis for several years (group 5) and nine plasma samples taken from healthy donors (Group 3). The results are shown in Table 3.

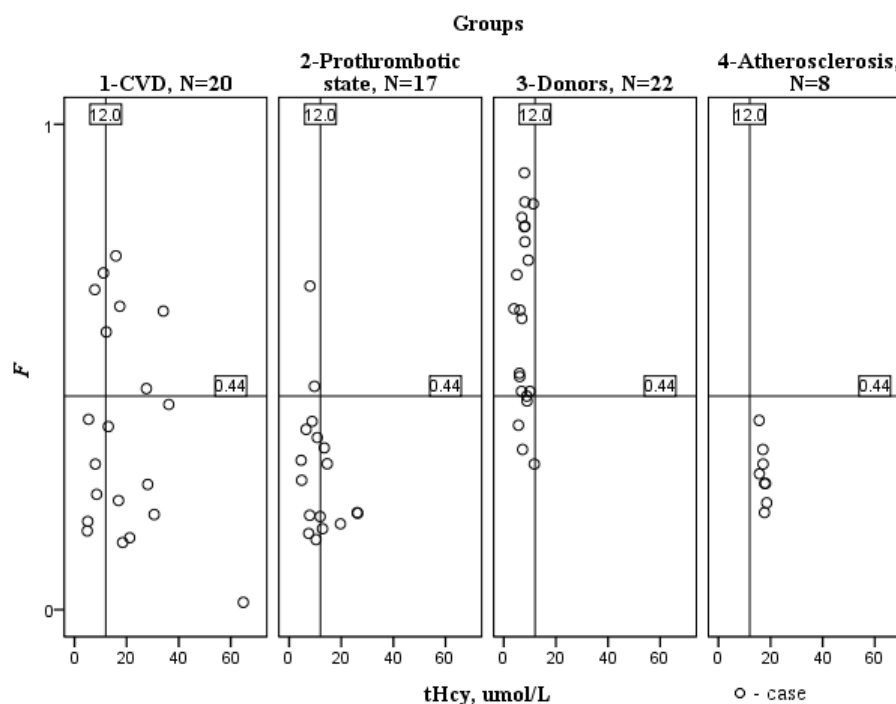


Fig. 1 Dot plots of tHcy and F in the groups of patients and donors

Lines parallel to the axes X and Y are the boundaries of the reference ranges of F (0.44) and o tHcy (12 $\mu\text{mol/L}$), respectively; CVD: cardiovascular diseases; tHcy: total homocysteine; F : ultrafiltration coefficient which is calculated as: $F = \text{tHcy in ultrafiltrate} / \text{tHcy in plasma}$

Table 3. Effect of freezing on ultrafiltration rates of homocysteine and glutathione across Vivaspin 300,000 MWCO PES membranes

Variables	Fresh sample		After freezing	
	Hemodialysis patients (group 5), N=23	Donors (from group 3), N=9	Hemodialysis patients (group 5), N=23	Donors (group 3), N=22 ^a
tHcy, $\mu\text{mol/L}$	28.9 # (20.3 – 36.3)	6.9 (6.0 – 8.1)	28.1 * # (18.9 – 33.6)	6.9 (6.1 – 8.8)
Ultrafiltration factor F for Hcy	0.40 # (0.35 – 0.52)	0.81 (0.77 – 0.84)	0.36 * # (0.33 – 0.43)	0.62 (0.44 – 0.79)
Glt, $\mu\text{mol/L}$	8.3 # (7.3 – 9.9)	6.0 (4.7 – 7.4)	7.5 # (7.2 – 9.1)	5.5 (4.4 – 7.3)
Ultrafiltration factor F for Glt	0.82 (0.75 – 0.92)	0.83 (0.75 – 0.88)	0.74 * (0.70 – 0.82)	0.81 (0.75 – 0.86)

Notes: tHcy: total homocysteine; Glt: glutathione; data are presented as Median (25-75% percentile); F : ultrafiltration coefficient which is calculated as: $F = \text{tHcy in ultrafiltrate} / \text{tHcy in plasma}$ and similarly for Glt.:

^a N=9 for matched-pairs comparison

* - $p < 0.05$ compared to fresh sample (matched-pairs test)

- $p < 0.05$ between-group difference

As seen from Table 3, the group of patients was characterized by moderate HHcy. In any case the level of tHcy was normal (range: 15.2 – 59.0 $\mu\text{mol/L}$). Storage of samples at low temperature was accompanied by a small decrease of detectable amounts of tHcy and Glt. This tendency was observed in both groups, but reached statistical significance for tHcy in patients group. In absolute value, the reduction in detectable tHcy content was about 0.8 $\mu\text{mol/L}$, which is less than 3%. Also, slight but significant reduction in factor *F* values for Hcy and Glt was observed after freezing of patients' plasma. The *F* values for Hcy, in contrast to those for Glt, were significantly lower in samples of hemodialysis patients compared to reference group. Only in two cases *F* was above reference limit of 0.44 (for freeze samples).

A moderate HHcy was found in the samples of group 5. In our earlier work (Zhloba and Blashko, 2004) performed with a large clinical sample, we have shown that, in patients under chronic hemodialysis, the HHcy level may reach $45.5 \pm 41.2 \mu\text{mol/L}$. A lower level of HHcy of group 5 patients in present study is clearly due to vitamin therapy (Table 1). In spite of this treatment, the tHcy concentrations in the samples from group 5 are significantly higher than in other experimental groups. Interestingly, despite high concentration of tHcy, its filterability *F* in group 5 was significantly better (0.36 for freeze samples) than in the groups 2 and 4 (0.27 for the both cases, see Table 2) and were not significantly different from that in group 1 ($p = 0.004$; 0.001, and 0.436, resp.). All this shows once again that there is no simple inverse relationship between the Hcy concentrations and its filterability.

In order to compare filtration efficiency for various plasma proteins, the preparations from six randomly selected samples were analyzed using standard electrophoretic procedure. It was found that, on average, ultrafiltrates contained 76% of albumin, 70% of alpha-1-globulins, but less than 10% of alpha-2- and beta globulins from the initial plasma levels (see Online Resource 1 for the example of a case report). According to the immunoturbidimetric data, A2M

was retained in the non-filterable fraction and was not detected in the filtrates. The effect of freezing on filtration efficiency of proteins across 300,000 MWCO PES membranes was insignificant, according to the data of electrophoretic fractionation.

Discussion

The purpose for *F* factor determination is to obtain more information about the degree of Hcy binding by the high-molecular-weight plasma proteins. We did not observe any correlations between tHcy and filterability factor *F* in the groups 1, 2, 3, and 5, with respective R(p) values were: -0.1 (0.6), -0.2 (0.3), 0.04 (0.9), -0.2 (0.3). Our study shows that the *F* factor was significantly decreased in cases of atherogenic processes (groups 4 and 5). In group 4 (n = 8), a decreased filterability of Hcy was accompanied by HHcy in all cases, whereas a significant reduction of *F* factor below the reference range (< 0.44) were found in 21 cases from the group 5 (n = 23) the. This tendency was observed in group 1 of samples taken from patients with various CVD (N=20), for which the *F* factor was decreased in 14 cases, being accompanied by low Hcy rates (< 12 $\mu\text{mol/L}$) in six of these cases (Figure 1). Since a significant reduction of Hcy filterability was observed in groups 4 and 5 marked by the progression of atherosclerosis, there may be assumed, that the *F* factor indicates a presence of characteristic bound Hcy fraction. A mechanism for decreased filterability of protein-bound Hcy remains unclear. Our findings allow of a conclusion that Hcy bonding in mixed disulfide with other non-albumin proteins may cause some changes in filterability of Hcy. Apparently, a variety of proteins may be involved in the transport of Hcy in plasma (Silla et al. 2013). It should be noted that there is a rather short list of candidates in plasma proteome with a molecular mass equal or exceeding 300 kDa and thiolate-anion expressing capability; or having a large number of sites for thiol- disulfide exchange. In particular, such proteins may be complement component C3 (190 kDa, 5-15). Also, immunoglobulins with a total concentration of light and heavy chains

about 500 $\mu\text{mol/L}$ may have unpaired thiols in some of the variable regions. A2M (720 kDa) is characterized by rapid disulfide bond formation with Hcy (Catanescu et al. 2007) with a capacity in plasma of about 20 $\mu\text{mol/L}$ after proteinase-induced activation of A2M. It was also shown that apoB of low density lipoproteins (550 kDa) can bind Hcy (Luoma et al. 1994; Schulz et al. 2003), therefore internalization of the activated A2M as well as LDL carrying Hcy happens at the expense of LDL receptors (Zinellu et al. 2006, 2009, 2010). Thereby, proteins remaining in the retentate chamber contain potential carriers of Hcy, however, our data do not indicate specifically on any of them and make it necessary to study this in the future.

Decreased filterability of Hcy only, but normal passage of Glt was revealed for the samples of group 5, as compared both in fresh samples and those after freezing/thawing. Most likely, this is due to higher ability of Hcy to form mixed disulfides with plasma proteins, since Hcy forms strong disulfide bonds, causing displacement of other aminothiols by a thiol-disulfide exchange (Sengupta et al. 2001; Glushchenko and Jacobsen, 2007; Zinellu et al. 2006, 2010; Rossi et al. 2009).

Concerning a decrease of Hcy in plasma samples after storage in frozen state, one may suggest a conversion of aminothiols into other forms, including N-derivatives by protein homocysteinylolation (Jakubowski and Głowacki 2011).

Perhaps, those patients who maintain high F levels, may be characterized by the less “dangerous” HHcy, whereas patients without HHcy and with low values of F can be described by an increased ability of Hcy retention in their tissues, including vascular cell lining, e.g. by endocytosis with various proteins. Hence, the present results lead us to a conclusion that the Hcy filterability assays allow us to estimate its retention by various plasma proteins, including their modified forms and complexes with higher molecular mass, than the albumin monomers. This approach may offer a more complete diagnostic information useful for evaluation of clinical significance of HHcy. The proposed testing of

Hcy filterability may be performed as a simple laboratory procedure, in addition to conventional tests for total homocysteine. We suggest that the poor filterability of Hcy may be indicative for unfavorable transfer of Hcy to alternative targets, thus, likely, causing adverse biological effects. Therefore, some extensive clinical trials with a large number of observations would be necessary, in order to explain possible significance of the *F* factor, as a marker of altered Hcy transport forms in blood, and to reveal a potential role of this test as a predictor of adverse outcomes in cardiovascular diseases.

Acknowledgments

This research is supported by scientific program of First Pavlov State Medical University of St. Petersburg. We would like to give special thanks to Alexei Chukhlov, professor in the First Pavlov State Medical University, for valuable advice in editing the manuscript text.

Declaration of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research project. This research did not receive any specific grant from any funding agency in the commercial or not-for-profit sector.

Reference list

1. Babidge PJ, Babidge WJ (1994) Determination of methylmalonic acid by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 216:424–426
2. Catanescu CO, Barbato JC, DiBello PM, Willard B, Kinter MT, Zhloba AA, Jacobsen DW (2007) Molecular targeting of alpha-2-macroglobulin by homocysteine: stoichiometry and possible implications in inflammatory diseases. *FASEB J* 21(Meeting Abstract Supplement)A629:641.8
3. Fridman O, Fuchs AG, Porcile R, Morales AV, Gariglio LO (2011) Paraoxonase: its multiple functions and pharmacological regulation. *Arch Cardiol Mex* 81:251-260
4. Giustarini D, Dalle-Donne I, Lorenzini S. et al. (2006) Age-related influence on thiol, disulphide and protein mixed disulphide levels in human plasma. *J Gerontol A* 61:1030-1038
5. Głowacki R, Bald E, Jakubowski E (2011) An on-column derivatization method for the determination of homocysteine-thiolactone and protein N-linked homocysteine. *Am Acids* 41:187-194
6. Glushchenko AV and Jacobsen DW (2007) Molecular Targeting of Proteins by L-Homocysteine: Mechanistic Implications for Vascular Disease. *Antioxid Redox Signal* 9: 1883–1898

7. Hubmacher D, Sabatier L, Annis DS, Mosher DF and Reinhardt DP (2011) Homocysteine modifies structural and functional properties of fibronectin and interferes with the fibronectin-fibrillin-1 interaction. *Biochemistry* 50:5322–5332, DOI: 10.1021/bi200183z
 8. Jakubowski H, Głowacki R (2011) Chemical biology of homocysteine thiolactone and related metabolites. *Adv Clin Chem.* 55:81-103
 9. Luoma J, Hiltunen T, Särkioja T et al. (1994) Expression of alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein and scavenger receptor in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 93: P 2014-2021
 10. Mansoor MA, Svardal AM, Ueland PM (1992) Determination of the in vivo redox status of cysteine, cysteinylglycine, homocysteine, and glutathione in human plasma. *Anal Biochem* 200:218–229
 11. Mansoor MA, Ueland PM, Svardal AM (1994) Redox status and protein binding of plasma homocysteine and other aminothiols in patients with hyperhomocysteinemia due to cobalamin deficiency. *Am J Clin Nutr* 59:631–635
 12. Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Dalle-Donne I (2009) Cysteinylation and homocysteinylation of plasma protein thiols during ageing of healthy human beings. *J Cell Mol Med* 13:3131-3140
 13. Schulz S, Birkenmeier G, Schagdarsurengin U, et al. (2003) Role of LDL receptor-related protein (LRP) in coronary atherosclerosis. *Int J Cardiol* 92:137-144
 14. Sengupta S, Chen H, Togawa T et al. (2001) Albumin thiolate anion is an intermediate in the formation of albumin-S-S-homocysteine. *J Biol Chem* 276:30111–30117
 15. Silla Y, Sundaramoorthy E, Talwar P, Sengupta S (2013) S-linked protein homocysteinylation: identifying targets based on structural, physicochemical and protein-protein interactions of homocysteinylation. *Amino Acids* 44:1307-1316. doi: 10.1007/s00726-013-1465-5.
 16. Togawa T, Sengupta S, Chen H, et al. (2000) Mechanisms for the formation of protein-bound homocysteine in human plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 277:668-674
 17. Ueland PM, Mansoor MA, Guttormsen AB et al. (1996) Reduced, oxidized and protein-bound forms of homocysteine and other aminothiols in plasma comprise the redox thiol status - A possible element of the extracellular antioxidant defense system. *J Nutr* 126:1281S–1284S
 18. Xiao Y, Zhang Y, Lv X, Su D, Li D, Xia Met al.(2011) Relationship between lipid profiles and plasma total homocysteine, cysteine and the risk of coronary artery disease in coronary angiographic subjects. *Lipids Health Dis* 10:137. doi: 10.1186/1476-511X-10-137
 19. Zhloba AA, Blashko EL (2004) Liquid chromatographic determination of total homocysteine in blood plasma with photometric detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 800:275-280
 20. Zinellu A, Sotgia S, Scanu B et al. (2009) S-homocysteinylation of LDL apolipoprotein B adversely affects human endothelial cells in vitro. *Atherosclerosis* 206:40-46
 21. Zinellu A, Loriga G, Scanu B, et al. (2010) Increased Low-Density Lipoprotein S-Homocysteinylation in Chronic Kidney Disease. *Am J Nephrol* 32:242-248
- Zinellu A, Zinellu E, Sotgia S, et al. (2006) Factors affecting S-homocysteinylation of LDL apoprotein B. *Clin Chem* 52:2054-2059

THE PLASMA PROFILE OF METABOLITES INFLUENCING NITRIC OXIDE PRODUCTION

Aleksandr A. Zhloba^{1,2}, Tatiana F. Subbotina^{1,2},
Elizaveta S. Alekseevskaya^{1,2}, Olga M. Moiseeva²

1. First Pavlov State Medical University of St. Petersburg, St.-Petersburg, Russian Federation
2. Federal Almazov Medical Research Centre, St.-Petersburg, Russian Federation

Тезисы доклада на 7th International Symposium on ADMA, который состоится в период с 30 июня по 2 июля 2014 года в Санкт-Петербурге

<http://www.uiowa.edu/~confinst/adma-2014/index.html>

Introduction. Plasma metabolome depends on cellular metabolism and creates conditions for endothelial generation of nitric oxide by influencing directly on endothelial NO-synthase (eNOS) and/or through mitochondria on eNOS subunits aggregation to active state.

The aim of this study was to evaluate plasma metabolite shifts directly modulating NOS activity on the one hand and associated with mitochondrial metabolism on the other hand in cardiovascular disease (CVD) patients with endothelial dysfunction.

Material and Methods. Plasma samples from 122 patients with CVD and 40 donors have been used to study the profile of the 20 amino acids, 3 methylated derivatives of basic amino acids, 2 aminothiols, nitric oxides and nitrosothiols levels. Amino acids profiles have also been studied in patients (n = 34) with a prothrombotic state. 68 plasma species of CVD patients and 22 donors were used for evaluation of homocysteine binding to plasma proteins with Mr > 300 kDa. All samples used in this retrospective study were characterized by other routine data. SAS Statistical Software version 9.3 was applied to obtain descriptive statistic data, compare values (Mann-Whitney's test) and assess correlations.

Results. In CVD patients, including 57 with aortic dilatation and 48 with aortic valve stenosis increased level of asymmetric dimethylarginine (ADMA) compared with donors (p < 0.001) was found. In 17 hypertensive patients without end-organ damage this difference was not significant (p = 0.15). Increasing symmetric dimethylarginine (SDMA) and decreasing trimethyllysine

(TML) levels comparing to donors' samples was detected in all these three subgroups ($p < 0.0001$, for each). Correlation between ADMA and SDMA values in all three subgroups ($R=0.38$, $p=0.004$; $R=0.39$, $p=0.007$; $R=0.46$, $p=0.053$), but not for TML with each ones were established. Observed changes were accompanied by Ala, Gly and branched chain amino acids positive shifts and as to Arg, Citrulline pair, upward trend of the last one was detected. In CVD patients with moderate hyperhomocysteinemia, an increase of homocysteine binding by proteins with molecular weight above 300 kDa was observed. The significant increasing of the level of NOS activity products was revealed in samples from CVD patients, but no correlations with the levels of methylated arginine derivatives or the amino acids rates were observed. It should also be noted elevated C-reactive protein in these patients.

Conclusion. Plasma metabolic shifts in studied CVD patients were characterized by: 1) an imbalance of sulfur amino acids and increased homocysteine transport with high molecular mass proteins, 2) a positive shifts of amino acids metabolized in the mitochondria, 3) a significant changes in metabolism of methylated derivatives of basic amino acids, including an increase in ADMA and SDMA and reduced formation of TML.

**FIBRINOLYSIS-INDUCED SHIFTS IN PLASMA AMINO ACID PROFILE:
POSSIBLE CONTRIBUTION TO VASCULAR METABOLISM**

Tatiana Subbotina, Aleksandr Zhloba

First Pavlov State Medical University of St. Petersburg, St.-Petersburg, Russian Federation
Federal Almazov Medical Research Centre, St.-Petersburg, Russian Federation*Тезисы доклада на 7th International Symposium on ADMA, который состоится в период с 30 июня по 2 июля 2014 года в Санкт-Петербурге*<http://www.uiowa.edu/~confinst/adma-2014/index.html>

Background. Components of the coagulation and fibrinolytic systems are proteases with different substrate specificity that may activate some exopeptidases, which can produce some amounts of free amino acids derived from fibrin, its degradation products or other proteins.

Aims were the estimation of coagulation/fibrinolysis-induced modification of broad amino acid profile in plasma samples of healthy persons and patients with cardiovascular pathology.

Materials and methods. Fresh platelet-poor citrated individual plasma samples from 30 patients with cardiovascular diseases (CVD), 18 donors and 14 pools from patients with normal total homocysteine level have been investigated. Coagulation and subsequent fibrinolysis were initiated by addition of thrombin (or tissue factor) and tissue plasminogen activator, respectively. Amino acid profile before and after completion of coagulation/fibrinolysis was evaluated by RP-HPLC using C18 column after OPA-derivatization. The parameters of fibrinolysis were evaluated by the clot turbidity assay at 405 nm.

Results. Coagulation/fibrinolysis in the human plasma is associated with a significant increase in the concentrations of some amino acids, including serine, alanine, arginine, valine, methionine, leucine, and lysine ($p < 0.001$ for all); but only three of them, namely Arg, Lys, and Met are elevated so much that their concentrations exceed the reference boundaries. The duration of fibrinolysis significantly correlated with the degree of increase of basic amino acids arginine and lysine: $r_s = -0.447$ ($p = 0.012$) and -0.495 ($p = 0.008$), respectively, but not with methionine concentrations. The degree of increasing the concentration of Lys

and Met in CVD patients was significantly reduced compared with donors ($p < 0.0001$ and $p = 0.006$, resp.).

Conclusions. At metabolomics studies with amino acid profiling it should be considered the possibility of a substantial modification of amino acid profile due to the activation of proteolytic processes such as coagulation and fibrinolysis during sample preparation. The clinical significance of elevated concentrations of Arg, Lys, and Met is explained, primarily, by the fact that arginine is a substrate of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) which provides adequate vasodilation. Lys and Met can metabolically participate in vascular wall remodeling, being the precursor of polylysines and suppliers of C1-fragments.

THE FACTORS OF MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION AND THEIR ASSOCIATION WITH ADMA

Elizaveta S. Alekseevskaya^{1,2}, Alexander A. Zhloba^{1,2}, Tatiana F. Subbotina^{1,2},
Ol'ga M. Moiseeva², Ol'ga B. Irtyuga²

1 – First Pavlov State Medical University of St. Petersburg, St.-Petersburg, Russian Federation

2 – Federal Almazov Medical Research Centre, St.-Petersburg, Russian Federation

Тезисы доклада на 7th International Symposium on ADMA, который состоится в период с 30 июня по 2 июля 2014 года в Санкт-Петербурге

<http://www.uiowa.edu/~confinst/adma-2014/index.html>

Introduction. Elevated levels of homocysteine and methylated arginine derivatives ADMA and SDMA are cardiovascular risk factors. Endothelial dysfunction and impairment of blood circulation may cause secondary mitochondrial dysfunction.

The aim of the present study was to evaluate parameters of mitochondrial dysfunction (MD) and methylated amino acid metabolism in patients with thoracic aortic aneurysms (TAA) and aortic stenosis (AS) complicated by arterial hypertension.

Material and Methods. The results of testing blood plasma samples from patients (n=94, from 30 to 77 years, mean age in group 59.2 ± 8.6 years, 62 males) were compared with those of healthy donors (n=34, from 18 to 25 years, 7 males). Patients with TAA (n=69, 52 males) and AS (n=25, 10 males) were comparable by age. The concentrations of lactic (LA) and pyruvic acids (PA), cytochrome C (CytC, ELISA), peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC1a, ELISA), ADMA (HPLC), SDMA (HPLC) and total homocysteine (tHcy, HPLC) were determined. Statistical analysis was performed using SAS Statistical Software version 9.3 and included comparison (Mann-Whitney's test) analysis. A *p* value <0.05 was considered significant.

Results. The patients were characterized of elevated levels of LA ($p < 0.0001$), PGC1a ($p < 0.0001$), ADMA ($p < 0.0001$), SDMA ($p < 0.0001$), tHcy ($p < 0.0001$) and higher values of LA/PA ($p = 0.0002$) and SDMA/ADMA ($p < 0.0001$) ratios in comparisons with donors. Evaluation of the CytC level in

patient species for excluding influence of physiological apoptosis during the menstrual cycle as comparison group were used healthy donors from 56 to 61 years (n=20, 10 male) data. Concentration of CytC also was higher in patients group (p=0.0026). The patients with TAA and AS differed only in values SDMA/ADMA ratios (p=0.05) and this parameter was higher in group patients with TAA. All patients were apportioned into two groups: with level of ADMA above and below than 95 percentile of ADMA concentration in donors. The patients with high levels of ADMA (n=30) had higher levels of PGC1a (p=0,028) and LA/PA values (p=0,033) than patients with lower ADMA (n=64).

Conclusion. In patients with aortic dilatation and aortic valve stenosis complicated by arterial hypertension found higher levels of ADMA, SDMA, tHcy and metabolic shifts typical for MD. The strongest differences in MD parameters with donors detected in concentrations proteomic markers especially CytC. It should be noted that Cyt C and PGC1a characterize MD from different angles as indicators of mitochondrial permeability and biogenesis efficiency respectively. The most informative metabolomic marker of MD in present study was LA. Thus, in patients with high risk of cardiovascular events is advisable to monitor not only endothelial dysfunction markers but also markers of MD.

Раздел II

Конкурсные научные работы молодых ученых и студентов

Авторы научных работ могут обсудить полученные ими результаты со всеми желающими при обращении к ним путем переписки по электронной почте.
Адреса авторов приведены после заголовка работы.

МЕТАБОЛОМНЫЕ И ПРОТЕОМНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ

Е.С. Алексеевская

(научный руководитель – д.м.н., проф. А.А. Жлоба)

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова

Отдел биохимии НИЦ

Федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург

Группа протеомики

alizlex@mail.ru

Введение. В виду недостаточной информативности маркеров митохондриальной дисфункции (МД) среди представителей метаболома поиск белковых показателей функционирования митохондрий является актуальной задачей клинической биохимии.

Цель. Оценка цитохрома *C* (*CytC*) и 1-альфа коактиватора гамма-рецептора, активирующего пролиферацию пероксисом (*PGC1a*) в качестве показателей МД.

Материалы и методы. Проанализированы образцы плазмы крови 110 пациентов с артериальной гипертензией в возрасте 61,0 (55,0-64,0) лет, а также 30 здоровых лиц в возрасте от 18 до 25 лет. Уровни *PGC1a* и *CytC* определяли методом ИФА, концентрацию молочной (МК) и пировиноградной (ПВК) кислот – фотоколориметрически. Сравнительный анализ проведен с применением критерия Манна-Уитни.

Результаты. Концентрация МК в группе пациентов была достоверно выше, чем в контрольной группе, в то время как уровень ПВК между группами не различался. Соответственно в группе пациентов повышенным оказалось и соотношение МК/ПВК. В контрольной группе уровень *PGC1a* варьировал незначительно и был достоверно ниже, чем у пациентов. Для исключения влияния физиологического апоптоза в ходе менструального цикла в качестве референтной группы при определении *CytC* было обследовано 20 добровольных доноров крови в возрасте 55 лет до 61 года. В группе пациентов *CytC* определялся в крови только у 18 человек (16%), но был достоверно выше, чем у доноров старшей возрастной группы.

Выводы. В группе пациентов обнаружено согласованное изменение концентраций метаболитов и белков, характеризующих функцию митохондрий. Параллельное исследование белковых факторов и метаболитов, отражающих функцию митохондрий, повышает диагностическую значимость результатов лабораторных тестов.

СОДЕРЖАНИЕ ФАКТОРОВ РОСТА TGF-БЕТА1, GMCSF, VEGF-A ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ИСХОДАХ ПЕРЕНОСОВ ЭМБРИОНОВ В ЦИКЛАХ ЭКО У ПАЦИЕНТОК С ХРОНИЧЕСКИМ ЭНДОМЕТРИТОМ

А.Д. Виноходов, Ю.Н. Шарфи

(научный руководитель – д.м.н., проф. А.М. Гзззян)

Санкт-Петербургский государственный университет

Кафедра акушерства, гинекологии и репродуктологии

yinivv@yandex.ru

Введение. Хронический эндометрит часто является сопутствующим заболеванием у пациенток проходящих экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО). Его влияние на успешность цикла ЭКО недостаточно изучена, также как и изменение внутриматочного баланса факторов роста. Представляется актуальной оценка частоты наступления беременности в циклах ЭКО при данной патологии и выявление ассоциированных с успехом изменений в содержании факторов роста цервикальной слизи.

Цель. Оценка содержания цитокинов цервикальной слизи при различных исходах циклов ЭКО у пациенток с хроническим эндометритом.

Материалы и методы. Исследование проводилось на базе отделения вспомогательных репродуктивных технологий ФГБУ НИИАГ им.Д.О.Отта. Оценивалось содержание в цервикальной слизи сосудистого фактора роста-A (VEGF-A), трансформирующего фактора роста-бета-1 (TGF-beta-1) и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF). В группу исследуемых включено 8 женщины, проходящих циклы ЭКО или ЭКО\ИКСИ с хроническим эндометритом. Контрольная группа включала 54 случайным образом выбранных больных бесплодием проходивших циклы ЭКО или ЭКО/ИКСИ.

Цикл ЭКО проводился с использованием короткого протокола с антагонистами ГнРГ. Цервикальная слизь забиралась непосредственно перед переносом с использованием FLOQSwab системы. После визуальной оценки контаминации кровью слизь суспензировалась в 1мл физиологического раствора и замораживалась при температуре -70°C .

Содержание цитокинов определялось с помощью мультиплексного хемилюминесцентного иммуноанализа BD Cytometric Bead Array с использованием стандартных протоколов. Количество белка в анализируемой жидкости оценивалось фотометрически. Для вычисления значимости различий использовался непараметрический критерий Манна-Уитни и критерий Фишера. Различия признавались значимыми при $p < 0,05$. Данные приведены в формате: медиана (25-й;75й процентиля)

Результаты. Обнаруженные данные свидетельствуют об изменении содержания цитокинов в группе больных с эндометритом и влиянии эндометрита на частоту наступления беременности. В группе с эндометритом беременность в цикле ЭКО наступила у 37,5% пациенток, что меньше чем в группе без него (53,7%), но достоверности различий не было. Достоверно увеличено содержание GM-CSF 47,53 (22,44;67,66) пг\мг и TGF-beta-1 668,11 (511,69;1752,85)пг\мг, в сравнении с 19,57 (14,20;32,60) пг\мг и 327,38 (185,00;691,97) пг\мг в группе больных без эндометрита. Уровень VEGF-A у больных с эндометритом и без него достоверно не различался.

Выводы. При хроническом эндометрите частота успешных циклов ЭКО достоверно не различается с контрольной группой. У пациентов с хроническим эндометритом наблюдается достоверно повышенное содержание GM-CSF и TGF-beta-1 в цервикальной слизи в день переноса эмбрионов, по сравнению с контрольной группой.

МЕНЕДЖМЕНТ КАЧЕСТВА ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛУГ

О.А. Емельянова

(научный руководитель – к.м.н. С.А. Кадина)

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова

Кафедра сестринского дела

EmelyanovaOA@mc21.ru

Введение. Медицинская лаборатория требует управления с позиций системы тотального менеджмента качества, предполагающего руководство и управление организацией, ориентированные на достижение высокого уровня качества. В полной мере это применимо к качеству лабораторных услуг, которое, как известно, складывается из трех составляющих: преаналитического, аналитического, постаналитического этапов.

Материалы и методы. Базой настоящего исследования является лабораторная служба Медицинского центра «XXI век». Прайс МЦ «XXI век». Был проведен аудит работы лаборатории на преаналитическом этапе.

Результаты. Максимальную долю в спектре лабораторных услуг занимают иммунохимические исследования (32%) и общеклинические (23%). Изучение характера ошибок на преаналитическом этапе показало, что они связаны с недостаточной информированностью пациентов (и соответственно с недостаточной или неправильной их подготовленностью к сдаче материала на исследование); неточной формулировкой назначений врача (когда проводятся не те или не все исследования); гемолизом *in vitro* (33%), связанным с неправильным забором крови; наличием сгустков в образцах (24%); недостаточным количеством биоматериала (14%), неадекватными условиями его транспортировки и хранения (12%) и рядом других. Это ведет к необходимости повторения забора крови (исследования), вызывает неудовлетворенность пациентов, снижает экономическую эффективность функционирования лаборатории.

Вывод. Улучшение подготовленности персонала лабораторий и других клинических подразделений по вопросам повышения качества преаналитического этапа лабораторного исследования является важным

условием совершенствования качества работы лабораторной службы в целом.

РОЛЬ PGC1 α В КООРДИНАЦИИ ЯДЕРНО-МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

Т.Д. Логачева

(научный руководитель – н.с. Е.С. Алексеевская)

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова

Отдел биохимии НИЦ

tanya071994@yandex.ru

Введение. Помимо ключевой роли в энергетическом обмене митохондрии (МХ) участвуют в реализации программы апоптоза, гомеостазе кальция, а также выполняют важную биосинтетическую функцию (стероиды, липоевая кислота, цикл мочевины и др.). Несмотря на наличие собственной мтДНК, подавляющее большинство белков МХ закодировано в ядерном геноме. Скоординированная экспрессия генов ядерного и митохондриального геномов – необходимое условие нормального функционирования МХ. В настоящее время наиболее изученным фактором регуляции экспрессии генов митохондриальных белков является PGC1 α .

Цель. Оценить роль PGC1 α в координации ядерно-митохондриального взаимодействия на основании литературных данных.

Материалы и методы. Проанализированы оригинальные и обзорные статьи в зарубежных рецензируемых журналах.

Результаты. Контроль функции МХ со стороны ядра осуществляется посредством транскрипционных факторов (NRF-1, NRF-2, YY1, TFAM и др.), экспрессию генов которых регулирует PGC1 α . Ретроградная сигнализация от МХ к ядру также реализуется посредством PGC1 α -ассоциированного пути: изменение окислительного статуса, концентрации кальция и соотношения ADP/АТФ в клетке при нарушении работы МХ влияет на активность различных ферментов (SIRT1, АМПК и др.), модулирующих в свою очередь активность PGC1 α .

Изменение экспрессии гена PGC1 α обнаружено при ряде заболеваний, в том числе нейродегенеративных, сахарном диабете и сердечной недостаточности, а также в ходе старения.

Выводы. PGC1 α является ключевым фактором ядерно-митохондриального взаимодействия. Разработка способов терапевтической модуляции PGC1 α -ассоциированного сигнального пути имеет огромный потенциал для коррекции митохондриальной дисфункции.

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ ФУНКЦИЯ И ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ТРИМЕТИЛ-ЛИЗИНА

Е.В. Лоцман

(научный руководитель – д.м.н., проф. А.А. Жлоба)

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова
Отдел биохимии НИЦ

goriunova.elizaveta@yandex.ru

Введение. Триметил-лизин (ТМЛ) является единственным эндогенным источником карнитина. Исходя из этого, ТМЛ имеет диагностическое значение для оценки способности организма к образованию карнитина.

Цель. Согласно данным научной литературы и на основе результатов лабораторных анализов биологических жидкостей человека исследовать влияние концентраций ТМЛ в плазме крови на активность биосинтеза карнитина.

Материалы и методы. Анализ научных публикаций, посвящённых метаболическим функциям ТМЛ. Использование ВЭЖХ-анализа с твёрдофазной экстракцией крови.

Результаты. Проведен анализ связей уровня ТМЛ в плазме крови, содержания карнитина и активности метилирования остатков лизина в составе белка.

Вывод. Содержание ТМЛ и его производных в плазме крови может служить важным диагностическим признаком при определении метаболических нарушений, связанных с биосинтезом карнитина и его последующим участием в катаболизме жирных кислот.

**ПРОДУКТЫ NO-СИНТАЗНОЙ АКТИВНОСТИ И ЭНДОТЕЛИАЛЬНАЯ
ДИСФУНКЦИЯ У БОЛЬНЫХ СИСТЕМНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ
СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ**

М.М. Мусийчук

(научный руководитель – к.м.н., доцент Н.А. Филиппова)

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова

Кафедра госпитальной терапии

m.m.musiychuk@gmail.com

Введение. Эндотелиальная дисфункция и нарушение работы NO-синтаз, продуцирующих оксид азота, нитраты, нитриты, нитрозотиолы, являются важными факторами патогенеза системных заболеваний соединительной ткани (системной красной волчанки и системной склеродермии).

Цель. Анализ содержания продуктов NO-синтазной активности в сыворотке крови больных с системными заболеваниями соединительной ткани.

Материалы и методы. Обследовано 80 практически здоровых доноров и 10 больных (5 с системной красной волчанкой и 5 с системной склеродермией). Суммарное содержание высших окислов азота в сыворотке крови (NO+NO₃; NO_x) определялось нитратредуктазным методом, нитрозотиолов – флуорентным анализом в проточно-инжекционной системе.

Результаты. Выявлено повышение уровня высших окислов азота и нитрозотиолов в сыворотке крови больных системными заболеваниями соединительной ткани. Различия с группой здоровых доноров статистически значимы.

Вывод. Значительное повышение уровня продуктов NO-синтазной активности в сыворотке крови больных системными заболеваниями соединительной ткани по сравнению с группой здоровых доноров, в перспективе, может оказаться полезным для оценки эффективности лечения при базисной и биологической терапии.

ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ ВЫСШИХ ОКИСЛОВ АЗОТА И НИТРОЗОТИОЛОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВИДА БИОМАТЕРИАЛА

М.О. Новак

(научный руководитель – д.м.н., проф. Т.Ф. Субботина)

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова

Отдел биохимии НИЦ

margarita-novak@yandex.ru

Введение. Оксид азота, как признанный маркер функции эндотелия, отличается крайней нестабильностью. Диагностическая значимость и количественная оценка уровня S-нитрозотиолов (RSNO), как стабильной формы NO, зависит от вида исследуемого биоматериала. Оптимальным субстратом для неинвазивной лабораторной диагностики является слюна.

Цель. Исследовать взаимосвязь между уровнем RSNO слюны, плазмы, показателями системной гемодинамики и системными соматическими патологиями, связанными с эндотелиальной дисфункцией.

Материалы и методы. Обследовано 10 соматически здоровых лиц обоего пола в возрасте 18-35 лет, а также группа пациентов обоего пола 23-70 лет. Сбор слюны проводили в дневное время после 2-3-часового голодания без стимуляции. RSNO слюны и плазмы крови определяли после УФ-декомпозиции флуориметрически в проточно-инжекционной системе с использованием флуоресцентного зонда DAF-2 и S-нитрозоглутатиона в качестве калибратора. Определение высших окислов азота проводилось с помощью реактива Грисса. Проводился осмотр полости рта с использованием основных и дополнительных методов диагностики.

Результаты. Методика определения RSNO адаптирована для исследования слюны. Предварительные результаты определения уровня высших окислов азота и нитрозотиолов подтверждают корреляцию с наблюдаемой системной патологией.

Выводы. Оптимальным методом для неинвазивной диагностики эндотелиальной дисфункции является определение S-нитрозотиолов слюны.

ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ЛЕКАРСТВЕННЫЙ МОНИТОРИНГ ВАНКОМИЦИНА У ПАЦИЕНТОВ ТРАВМАТОЛОГО-ОРТОПЕДИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ

А.А. Новокшонова, А.М. Борисов, С.А. Божкова

*(научный руководитель – заведующая отделением клинической фармакологии, руководитель научного отделения профилактики и лечения раневой инфекции, к.м.н. С.А. Божкова)*Российский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии имени Р.Р. Вредена,
Санкт-Петербургaanovokshonova@rniito.ruamborisov@rniito.ru

Введение. Стафилококки являются наиболее частыми возбудителями инфекции области хирургического вмешательства (ИОХВ) после травматолого-ортопедических операций. По данным РНИИТО им. Р. Р. Вредена в 2011-2012 гг 45% случаев ИОХВ были вызваны *S. aureus*; 12% – *S. epidermidis*.

Благодаря сохраняющейся активности в отношении метициллин-резистентных (MRS) штаммов стафилококков и наличием зарегистрированных показаний для лечения инфекции костей и суставов, ванкомицин остаётся препаратом выбора при лечении ИОХВ в ортопедической клинике.

Однако, чувствительность возбудителей к ванкомицину, определяемая *in vitro*, не всегда обеспечивает клиническое выздоровление и эрадикацию возбудителя *in vivo* в очаге инфекции. Причиной этого может быть как появление штаммов, устойчивых к ванкомицину [2], так и недостаточная концентрация препарата в инфекционном очаге [3].

Для повышения эффективности антибактериальной терапии MRS-инфекций в настоящее время рекомендуют рассчитывать дозу ванкомицина с учетом массы тела пациента, проводя при этом мониторинг его остаточной концентрации (ОК) в сыворотке крови [4, 1].

Цель. Оценить уровень ОК ванкомицина при лечении пациентов с ИОХВ после крупных ортопедических операций в зависимости от возраста и выделительной функции почек.

Материалы и методы. Обследован 91 человек в возрасте от 24 до 86 лет, из них 49 женщин. Пациентов раздели по возрасту на 3 группы:

группу «молодых» составили 26 пациентов (28,6%) в возрасте до 45 лет ($M_{cp}=32,7\pm 6,5$); в группу «среднего возраста» вошли 29 пациентов (31,9%) от 45 до 59 лет ($M_{cp}=50,3\pm 3,8$); в группу «пожилых» включили 36 пациентов (39,6%) от 60 лет и старше ($M_{cp}=65,5\pm 7,3$).

Максимальная суточная доза Ван составила 4 г/сут. ОК ванкомицина определяли в сыворотке крови методом ВЭЖХ на хроматографе (Perkin Elmer) на 3-и сутки терапии.

Целевыми значениями ОК считали 15-20 мкг/мл; ОК менее 15 мкг/мл оценивали как недостаточную; выше 20 мкг/мл – как избыточную. Клиренс креатинина (КК) рассчитали до начала терапии по формуле Кокрофта-Голта.

Результаты и обсуждение. Были выявлены статистически значимые различия по расчетному клиренсу креатинина между исследуемыми группами ($p<0.01$). Также было показано существенное различие по уровню ОК ванкомицина между группами «молодых» и «пожилых» и между «пожилыми» и группой «среднего возраста» ($p<0.01$).

Не выявлено отличий в суточной дозировке ванкомицина у пациентов анализируемых групп.

В группе «молодых» целевые значения ОК ванкомицина были достигнуты в 2 случаях (7,7%), у 23 человек (88,5%) ОК была низкой, лишь у 1 пациента (3,8%) ОК формально превысила целевые значения, составив 20,5 мкг/мл.

В группе «среднего возраста» у 3 пациентов (10,3%) была достигнута целевая и у 2 (6,9%) – избыточная ОК; в остальных 82,8% случаев ОК была низкой.

В группе «пожилых» целевую ОК удалось достигнуть у 4 пациентов (11,1%); недостаточная ОК была у 22 человек (61,1%).

Превышение целевых значений ОК у пациентов 60 лет и старше развивалось в 4 раза чаще по сравнению с пациентами среднего возраста (27,8% vs 6,9%).

В результате исследования установлено, что в большинстве случаев не удаётся достичь целевых значений ванкомицина, обеспечивающих его терапевтический эффект. По-видимому, это может быть одной из причин неэффективности антибактериальной терапии и селекции штаммов стафилококков, резистентных к ванкомицину [2,3].

Рекомендованные режимы терапии [4, 1] требуют дальнейшего изучения их эффективности и безопасности, в том числе, в сравнении с терапией альтернативными препаратами, обладающими анти-MRS активностью.

Выводы. Только в 9,8% случаев целевой уровень ОК ванкомицина был достигнут на 3 сутки терапии. Большинству пациентов (5,8%) потребовалось увеличение дозы антибиотика и повторное определение ОК. Пациенты 60 лет и старше являются группой риска развития почечной недостаточности из-за снижения фильтрационной функции почек, что следует учитывать при дозировке препарата и мониторинге безопасности терапии.

Литература

1. Федеральное руководство по использованию лекарственных средств. Выпуск XII. М., 2011. С. 635-636;
2. Benjamin P. Howden, John K. Davies, Paul D. R. Johnson, Timothy P., Stinear and M. Lindsay Grayson. *Reduced vancomycin susceptibility in Staphylococcus aureus, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications // Clinical Microbiology Reviews. 2010; Jan, p. 99–139;*
3. Hidayat L.K., Hsu D.I., Quist R., Shriner K.A., Wong-Beringer A. *High-dose vancomycin therapy for methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections // Arch. Intern. Med. 2006; 166(19), p. 2138-2144;*
4. Rybak M.J., Lomaestro B.M., Rotschaher J.C., Moellering R.C., Craig W.A., Billeter M., Dalovisio J.R., Levine D.P. *Vancomycin therapeutic guidelines: a summary of consensus recommendations from the infectious diseases Society of America, the American Society of Health-System Pharmacists, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists // Clin. Infect. Dis. 2009; 49(3). p. 325-327.*

ОТМЕНА ЦИКЛОФОСФАМИДА И ЕГО ВЛИЯНИЕ НА ОБЩИЙ БЕЛОК ПЛАЗМЫ КРОВИ

В.В. Олешкевич

(научные руководители – д.м.н., проф. В.М. Шейбак, ассист. А.Ю. Павлюковец)

Гродненский государственный медицинский университет, Республика Беларусь

Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии им. С. И. Гельберга

Кафедра биологической химии

petryshko@mail.ru

Введение. Циклофосфамид является одним из цитостатических препаратов алкилирующего ряда, обладающий избирательной противоопухолевой активностью. Циклофосфамид в печени превращается в два химических вещества – акролеин и фосфорамид, которые и обуславливают цитостатическое действие циклофосфамида препятствуя пролиферации клеток. Поскольку метаболиты циклофосфамида не обладают селективным действием по отношению к клеткам опухолевых тканей, его введение приводит к повреждению всех быстро пролиферирующих клеток. Действие цитостатика распространяется на клетки-предшественники гранулоцитов, эритроидные ядродержащие клетки и клетки-предшественники лимфоцитов. Циклофосфамид усиливает апоптоз, подавляет образование и пролиферацию лимфоидных клеток, вызывая лейкопению и анемию. Введение цитостатика вызывает повреждение ДНК. Применение циклофосфамида приводит к гипопроотеинемии, развивающейся как следствие повреждения мембран клеток свободными радикалами, угнетения синтеза белка и связывания метаболитов цитостатика с транспортными белками. Между тем, исследования показывающие динамические изменения уровня белка в плазме крови после введения циклофосфамида отсутствуют.

Цель. Определить изменение концентрации общего белка в плазме крови крыс после отмены циклофосфамида.

Материалы и методы. Эксперименты проведены на 18 крысах-самцах, массой 110-120 г., разделенных на 2 группы – контроль и циклофосфамид. Циклофосфамид вводили в общей дозе 160 мг/кг (по 40 мг/кг 4 раза в день с интервалом 48 ч., внутривенно), крыс

декапитировали через 24 ч., 4 суток, 8 суток после последнего введения циклофосфамида. Определение общего белка в сыворотке крови было проведено биуретовым методом.

Результаты. Нами обнаружено, что на всех следуемых сроках после отмены циклофосфамида наблюдается гипопроотеинемия. Так, если через 24 часа и 4 суток концентрация общего белка снижалась незначительно, то через 8 суток после отмены циклофосфамида наблюдали статистически значимое уменьшение (на 18,1%) данного показателя по сравнению с контрольной группой.

Выводы. Введение циклофосфамида приводит к снижению концентрации общего белка в плазме крови крыс, которая сохраняется длительное время после отмены цитостатика и усиливается на 8 сутки.

ЭКСТРАКТИВНОЕ АЛКИЛИРОВАНИЕ СВОБОДНЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ ПЛАЗМЫ КРОВИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С МАСС-СЕЛЕКТИВНЫМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

Т.И. Орлова, А.И. Уколов

(научный руководитель – к.х.н. А.И. Уколов)

НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека, Санкт-Петербург

orlovatatianagpeh@mail.ru

Нарушение метаболизма жирных кислот имеет значительные последствия, такие как резистентность к инсулину, ожирение печени, может быть связано с кистозным фиброзом, астмой, раком, ухудшением общей функции лимфоцитов. Жирные кислоты являются маркерами различных заболеваний, и определение их в биологических жидкостях играет значительную роль в диагностике наследственных и онкологических заболеваний.

Нами был разработан хроматомасс-спектрометрический метод определения 39 свободных жирных кислот (СЖК) в биологических образцах (плазма крови и моча). Среди аналитов 19 насыщенных кислот (C_6-C_{24}) и 20 ненасыщенных кислот ($C_{16}-C_{24}$), среди которых омега-3, омега-6, омега-9, включая незаменимые кислоты – линоленовая и ленолевая. Для извлечения СЖК из матрицы и преобразования их в метиловые эфиры разработан метод экстрактивного алкилирования раствором йодистого метила в хлористом метиле в присутствии катализатора межфазного переноса. Особенностью этого метода является то, что в нём объединены стадии экстракции и получения летучих производных анализируемых соединений. Реакции протекают в мягких условиях, причём использование межфазных агентов позволяет уменьшить продолжительность реакции и увеличить выходы продуктов. Процессы гидролиза и переэтерификации липидов, а также изомеризации ненасыщенных жирных кислот в условиях экстрактивного алкилирования протекают в незначительной степени и не вносят заметного вклада в результаты определения. Степень извлечения/превращения составляет от 60 до 90%.

Количественное определение аналитов производили методом относительной градуировки с дейтерированным внутренним стандартом. Линейный диапазон измеряемых концентраций составил от 0,02 до 20 мкг/мл образца. Разработанный метод был валидирован и отвечает критериям точности и достоверности. Оценено влияние на результаты измерений нескольких циклов замораживания образцов.

В качестве апробации определены концентрации жирных кислот в плазме крови 20 практически здоровых людей.

Разработанный метод был применен в экспериментальной работе по исследованию воздействия фторацетата на организм крыс. Изучению механизма токсического действия и поиску средств терапии было посвящено большое количество работ, однако существующие пробелы в понимании взаимосвязи между молекулярными первопричинами и ответом целого организма не позволяет исследователям разработать эффективные средства терапии. Нами были измерены изменения содержания триглицеридов и СЖК после острой интоксикации натриевой солью фтор ацетата у крыс, пероральная доза составила 2 мг кг⁻¹ (1/2LD₅₀). ГХ-МС анализ 39 жирных кислот после экстрактивного алкилирования показал достоверное изменение концентрации для семи ЖК, в соответствии с общими изменениями СЖК.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ВОРИКОНАЗОЛА В ПЛАЗМЕ КРОВИ С ПОМОЩЬЮ ВЭЖХ АНАЛИЗА С ФОТОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

М.О. Попова, А.Г. Волкова, В.М. Кравцова

(научные руководители – д.м.н., проф. А.А. Жлоба, д.м.н., проф. Б.В. Афанасьев)

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова

Отдел биохимии НИЦ

Кафедра гематологии, трансфузиологии и трансплантологии ФПО

marina.popova.spb@gmail.com

Работа поддержана грантом «Молодые ученые» ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, 2013

Введение. В исследованиях многих авторов подтверждено влияние фармакокинетики и фармакодинамики азолов на эффективность терапии в группе пациентов с инвазивным аспергиллезом, который развивается после противоопухолевой химиотерапии (ПХТ) и трансплантации костного мозга (ТКМ). Фармакокинетика и фармакодинамика азолов у пациентов с инвазивным аспергиллезом (ИА) после аллогенной трансплантации костного мозга (алло-ТКМ) изучена недостаточно. Методика мониторинга фармакокинетики и фармакодинамики азолов внедрена в большинстве крупных зарубежных центров, где больные получают ПХТ и ТКМ. Исходя из данных опубликованных исследований, вориконазол обладает фунгицидным действием при концентрации в плазме крови от 2 до 5 мкг/мл с вероятностью достижения клинического эффекта более чем 85%[1]. В российской практике лабораторной диагностики данное исследование не выполнялось, что связано с отсутствием разработанных и утвержденных методик в официальных рекомендациях МЗ РФ. Поскольку в настоящее время хроматографические методики получают распространение в крупных лабораторных центрах, и в клинике ТКМ ПСПбГМУ проводится все больше алло-ТКМ определение концентрации вориконазола становится актуальной проблемой.

Цель. Разработка модификации методики определения концентрации вориконазола, характеризующейся пределом обнаружения субстанции в плазме крови до 0,1 мкг/мл плазмы, обеспечивающую точность и вариабельность определения целевой субстанции и определение

клинического значения концентрации вориконазола у пациентов после алло-ТКМ.

Материалы и методы. Образцы для исследования были получены от 12 пациентов после алло-ТКМ, которые получали вориконазол в качестве профилактики (50%) и лечения ИА (50%). Выполнено 30 исследований в плазме крови, которые были получены по следующим точкам: 7-14-21-28 дни терапии вориконазолом. Клиническое значение концентрации вориконазола определяли с помощью оценки эффективности терапии (профилактика – отсутствие ИА, лечение – достижение частичного или полного ответа на терапию) в течение 12 недель в соответствии с критериями EORTC/MSG 2008.

Результаты. Предложен метод определения концентрации вориконазола следующей модификации. Этапы: 1. Экстракция из плазмы крови с использованием картриджей Oasis HLB 1cc (30 mg), Waters USA; 2. Нанесение на хроматографическую колонку Zorbax Eclipse XDB C8 (5x150), 5μ с фотометрическим детектированием при 285 нм. Перед анализом серии опытных образцов пациентов были определены аналитические параметры модифицированного метода. По данным 6-ти опытов с концентрациями вориконазола добавленного к плазме в конечной концентрации от 1 до 6 мкг/мл было показано, что при соотношении сигнала вещества к фону прибора равному 10 среднее его значение составило 0,081 мкг/мл (+0,029/-0,019), что меньше 0,1 мкг/мл, что свидетельствует о том, что цель достигнута. Следует отметить, что аналитическая надежность методики считается приемлемой при соотношении сигнала к фону = 3. Предложенная методика более надежна, поскольку предел обнаружения вещества был выбран = 10. Сопоставление предложенной методики с известными [2-4] показывает, что она принадлежит к числу наилучших по параметрам предела детектирования вориконазола. При достижении терапевтической концентрации

вориконазола в плазме крови от 2 до 5 мкг/мл у 9 пациентов (75%) наблюдали эффективность 8 пациентов (89%) в соответствии с критериями EORTC/MSG 2008. У одного пациента с ИА, где концентрация вориконазола была в пределах терапевтического диапазона, был лабораторно подтвержден возбудитель *Aspergillus flavus*, резистентный к вориконазолу.

Выводы. Разработан метод определения концентрации вориконазола в плазме крови с помощью ВЭЖХ анализа с фотометрическим детектированием с пределом обнаружения субстанции в плазме крови 0,081 мкг/мл (+0,029/-0,019) плазмы, обеспечивающий высокую точность и вариабельность определения целевой субстанции. Предложенный метод принадлежит к числу наилучших известных методик по параметрам предела детектирования вориконазола. Достижение терапевтической концентрации вориконазола демонстрирует клиническую эффективность у 89% пациентов, что подтверждает клиническое значение определения концентрации у пациентов, получающих терапию вориконазолом после алло-ТКМ.

Литература

1. Siow-Chin Heng, et al. Voriconazole ELF and plasma relationship. Abstract / *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013 doi:10.1128/AAC.00942-13;
2. L. Zufia et al. Validation of an LC method for therapeutic monitoring of voriconazole in patient / *J Bioanal Biomed.* – 2010 – V 2(2), p 035-043;
3. Shan Cheng et al. Development and validation of a simple and rapid HPLC method for the quantitative determination of voriconazole in rat and beagle dog plasma // *J of Chromatographic Science*, 2007 – V 45, p 409-414;
4. J. Bharathi et al. Validated RP-HPLC method for estimation of voriconazole in bulk and tablet dosage form // *Int J of Research in Pharmaceutical and Biomedical Science*, 2012 – V 1(1), p 14-18.

**МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ ФУНКЦИЯ И ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ
КОРОТКОЦЕПОЧЕЧНЫХ И ДЛИННОЦЕПОЧЕЧНЫХ АЦИЛ-КАРНИТИНОВ**

А.А. Самсонова

(научный руководитель – д.м.н., проф. А.А. Жлоба)

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова

Отдел биохимии НИЦ

ali4fan1@gmail.com

Введение. Карнитин и ацил-карнитины (аК) участвуют не только в метаболизме и окислении жирных кислот, но также в их транспорте. Спектр аК в плазме крови варьирует при миопатиях, ишемических повреждениях тканей и при возрастной митохондриальной дисфункции.

Цель. Используя научную литературу и данные лабораторных исследований, оценить участие ацил-карнитинов в метаболизме жирных кислот, формировании митохондриальной дисфункции, а также их диагностическое значение.

Материалы и методы. Проведен анализ научной литературы, использованы данные масс-спектрометрического детектирования.

Результаты. По уровню свободного карнитина и спектру его ацильных форм в плазме крови возможно оценить не только β -окисление жирных кислот, но и функцию митохондрий по утилизации органических кислот.

Вывод. Исследование ацил-карнитинов в плазме крови может быть использовано как для выявления генетических аномалий метаболизма жирных кислот у детей и новорожденных, так и изучения митохондриальной дисфункции у взрослых.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЙ ВЕРИФИКАЦИИ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ ЛЕГКОГО

М.В. Семёнова, Л.А. Сабирова

(научный руководитель – д.м.н., проф. С.В. Петров)

Казанский государственный медицинский университет

nyamk2010@yandex.ru, lesyasab93@mail.ru

Введение. В России рак легкого занимает 1 место среди онкологических заболеваний. Самым частым гистологическим типом рака легкого является аденокарцинома. Успешное применение таргетной (направленной на молекулярную мишень) терапии при аденокарциноме легкого принципиально изменило требования к морфологической диагностике.

Цель. Оценка результатов морфо-молекулярной диагностики 509 раков легкого (материал РКОД МЗ РТ).

Материалы и методы. На биопсийном материале проведена морфологическая диагностика новообразований легкого методом иммуногистохимии с использованием маркеров р63, ck7, TTF-1, напсин–А, синаптофизин, CD56 и ряда других высокоспецифичных антител. Также проведен анализ результатов морфологической диагностики с целью выявления наиболее чувствительных маркеров часто встречающихся опухолей лёгкого. В диагностике аденокарцином лёгкого (203 наблюдения) чувствительность цитокератина №7 составила 78%, маркера TTF-1 – 77%. Наиболее чувствительным маркером плоскоклеточного рака (78 случаев) оказался р63 (94%), а нейроэндокринных раков (130 наблюдений) – синаптофизин+CD56 (84%). Метастазов в лёгкое других опухолей было 24 случая, в то время как других неэпителиальных опухолей было 74 наблюдения.

Результаты. В 2012-13 гг 40% из всех случаев рака легкого составила аденокарцинома. Вид таргетной терапии (анти- EGFR или анти-ALK) аденокарциномы и ее эффективность напрямую зависит от наличия мутаций в гене рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) или в гене киназы анапластической лимфомы (EML4 – ALK).

Вывод. Аденокарцинома – часто диагностируемая опухоль с большими перспективами на лечение. Для более качественного подбора типа таргетной терапии требуется мультидисциплинарная диагностика.

УСТАНОВЛЕНИЕ КОРРЕЛЯЦИИ МЕЖДУ КОНЦЕНТРАЦИЕЙ МЕЛЬДОНИЯ И КОНЦЕНТРАЦИЯМИ ЖИРНЫХ И ТРИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

П.Н. Сорокоумов

(научный руководитель – д.х.н. Е.И. Савельева)

НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека, Санкт-Петербург

sorokoumov_pavel@mail.ru

Введение. Фармакометабономика – новое направление биоаналитических исследований, развивающееся в рамках разработки новых лекарственных средств (ЛС), а также персонализированных подходов к применению известных ЛС. Фармакометабономика объединяет метаболическое профилирование (как целевое, так и нецелевое) и различные приемы хеометрики для моделирования и предсказания мишеней воздействия ЛС, их фармакодинамики и токсичности как на индивидуальном, так и на популяционном уровне. В настоящей работе представлены результаты исследования метаболических профилей трикарбонных и жирных кислот плазмы крови при фармакокинетическом (ФК) исследовании ЛС «Мельдоний» – 3-(2,2,2-триметилгидразин) пропионат. Мельдоний применяется в клинической практике при лечении ишемической болезни сердца, хронической сердечной недостаточности, абстинентном алкогольном синдроме, острых нарушениях мозгового кровообращения и др. Мельдоний является ингибитором гамма-бутиробетаин гидроксилазы – основного фермента биосинтеза L-карнитина, блокирует синтез карнитина и ограничивает транспорт длинноцепочечных жирных кислот через клеточные мембраны.

Материалы и методы. Пробы крови объемом по 10 мл отбирали в вакутейнеры с ЭДТА у здорового мужчины 25 лет непосредственно перед приемом мельдония (2 капсулы по 500 мг) и через 15; 30; 45; 120; 150; 180; 240; 300; 330; 360 минут после приема. Плазму готовили сразу после отбора проб крови и хранили до проведения анализа при температуре -70°C. В пробах плазмы крови были определены концентрации мельдония, 36-ти жирных кислот от C6 до C24, как насыщенных, так и ненасыщенных,

а также фумаровой, яблочной, лимонной, изолимонной и α -кетоглутаровой кислот. Концентрации мельдония и трикарбоновых кислот в плазме определяли методом ВЭЖХ/МС. Депротенинизацию плазмы для ВЭЖХ анализа проводили методом ультрафильтрации. Жирные кислоты в плазме определяли методом ГХ/МС в виде метиловых эфиров. Подготовку проб к ГХ анализу проводили методом экстрактивного алкилирования с использованием хлористого метилена в качестве экстрагента, иодистого метила в качестве алкилирующего агента и гидроокиси тетрабутиламмония в качестве катализатора межфазового переноса. ФК кривую мельдония в плазме крови добровольца сравнивали с кривой «концентрация-время» для жирных и трикарбоновых кислот. Сравнение проводилось с помощью g -критерия Пирсона.

Результаты. При проверке на корреляцию двух независимых массивов по выборкам объемом по 10 величин, критическим значением g -критерия Пирсона является 0,632. Для α -кетоглутаровой, линолелаидиновой (C18), стеариновой (C 18) и арахидиновой (C 20) кислот значения g -критерия Пирсона при сравнении их профилей «концентрация-время» с ФК кривой мельдония превысили порог критического значения. Близкие к критическому значения критерия Пирсона установлены для гондоиновой (C20), гондэйкозановой (C21) и лигноцеридиновой (C24) кислот. Максимальные концентрации указанных жирных кислот приходятся на интервал 2-4 часа после введения мельдония. Повышение концентрации α -кетоглутарата также приходится на этот период. Наблюдаемая динамика изменений концентраций жирных кислот и α -кетоглутарата в плазме соответствует представлениям о том, что мельдоний ограничивает транспорт через мембраны митохондрий только длинноцепочечных жирных кислот, в то время как короткоцепочечные могут свободно проникать в митохондрии и окисляться там, при этом не происходит накопления недоокисленных жирных кислот внутри митохондрий.

Выводы. Представленные результаты получены в рамках нового подхода: проведения синхронного ФК исследования ЛС и биогенных метаболических профилей в одномоментных ФК точках. Такой подход интересен для более глубокого понимания как прямых, так и побочных эффектов, связанных с воздействием ЛС на организм. Поиск наличия (либо отсутствия) корреляционной зависимости между кинетическими кривыми ЛС и биогенных компонентов может рассматриваться как одно из перспективных направлений фармакометабономики, особенно актуальное для ЛС, находящихся на ранних стадиях разработки.

НАРУШЕНИЯ МЕТАБОЛИЗМА АМИНОКИСЛОТ С РАЗВЕТВЛЕННОЙ ЦЕПЬЮ И ИХ ДИАГНОСТИКА

К.А. Шипаева

(научный руководитель – д.м.н., проф. Т.Ф. Субботина)

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова

Отдел биохимии НИЦ

karish_ej@mail.ru

Введение. Заболевания, вызванные нарушениями метаболизма аминокислот с разветвленной цепью, многие из которых проявляются ацидемиями в периоде новорожденности, встречаются с частотой 1:1000 новорожденных.

Цель. По данным литературы изучить нарушения метаболизма, клинической манифестации и методы диагностики данных заболеваний.

Материалы и методы. В рамках реферативной работы проводился анализ литературы теоретической (механизмы нарушения метаболизма аминокислот с разветвленной цепью) и практической направленности (методы клинической и лабораторной диагностики).

Результаты. Первую линию в диагностике занимает анализ органических кислот в моче методами жидкостной и газовой хроматографии. Главный метод предотвращения заболеваний – пренатальная диагностика.

Вывод. Дифференциальный диагноз различных заболеваний, сопровождающихся неврологическими симптомами, ацидозом и гипераммониемией, чрезвычайно широк. Точная диагностика конкретного вида нарушения метаболизма аминокислот с разветвленной цепью требует сложных видов хроматографического анализа для выявления специфических ацидемий.

**ВОЗМОЖНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ МАТРИКСНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ-9
В ДИАГНОСТИКЕ ГЛАУКОМ**

Н.М. Шурыгина, И.С. Белецкая

*(научный руководитель – к.б.н. О.В. Галкина)*Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П.Павлова
НИИ нефрологииshurygina07@mail.ru

Введение. Глаукома – это хроническое заболевание органа зрения, приводящее к атрофии зрительного нерва, слепоте и инвалидности. Современные методы диагностики фиксируют наличие уже необратимых изменений, не являются ранними и не дают представлений о динамике процесса. В последнее время появились данные об увеличении уровня матриксной металлопротеиназы 9 (ММР-9) в крови пациентов с первичной открытоугольной (ПОУГ) и псевдоэксфолиативной (ПЭГ) глаукомой на начальных стадиях заболевания. В литературе существуют данные указывающие на возможность применения ММР-9 для дифференциальной диагностики глауком.

Цель. Сравнить концентрацию ММР-9 у больных ПОУГ, ПЭГ и у контрольной группы, оценить возможность применения данного показателя для ранней диагностики глаукомы.

Материалы и методы. Уровень ММР-9 определяли в сыворотке крови пациентов с ПОУГ и ПЭГ и в контрольной группе (условно здоровые доноры) методом иммуноферментного анализа.

Результаты. Концентрация ММР-9 в крови пациентов с ПОУГ (41 ± 4.7 нг/мл) и ПЭГ (30 ± 3.1 нг/мл) достоверно различалась и была выше, чем в контрольной группе (25 ± 1.6 нг/мл), $p < 0,05$.

Выводы. Определение концентрации ММР-9 в сыворотке крови может применяться при ранней диагностике и дифференцировке типа глаукомы.

COMPARISON OF TWO TYPES OF LC-MS/MS TECHNIQUES AND THEIR MODIFICATIONS FOR THE IMPROVED SEPARATION AND IDENTIFICATION OF SELECTED ENDOTHELIAL BIOMARKERS

J. Suraj^{1,2}, M. Olkowicz³, A. Kij¹, M. Walczak^{1,2}

(научный руководитель – Ph.D. Maria Walczak)

¹Jagiellonian Centre for Experimental Therapeutics (JCET), Jagiellonian University, Bobrzyńskiego 14, 30-348 Kraków, Poland

²Department of Pharmacokinetics and Physical Pharmacy, Jagiellonian University Collegium Medicum, Medyczna 9, 30-688 Kraków, Poland

³Department of Biochemistry, Medical University of Gdańsk, Poland

joanna.suraj@jcet.eu

Introduction. The recent studies have shown that determination of the proper panel of endogenous substances is crucial in the initial diagnosis of cardiovascular diseases. The rapid development of advanced analytical techniques including high resolution mass spectrometry allows both for identification and quantification of peptides and proteins in the biological sciences and medicine. To continue this thought we have decided to examine the selected biomarkers of endothelial dysfunction using specific analytical techniques. The list of peptides includes not only endothelin 1 (ET-1) and angiotensin II (Ang II) as the main markers of their families but also angiotensins III, IV, 1-7 and others. They are involved in many pathological states of endothelium and myocardium.

The aim of this research was comparison of two types of LC-MS/MS techniques and their modification to emphasize the advantages each of them during the identification analysis of biological compounds.

Materials and methods. In this study selected endothelial biomarkers were separated and identified using two LC-MS/MS techniques. Initial analyses were performed using ultra fast liquid chromatography (UFLC) Nexera (Shimadzu) coupled with tandem (QqQ) mass spectrometry QTRAP API 5500 (AB SCIEX). Other experiments were also performed using high resolution LTQ XL Orbitrap Discovery mass spectrometer combined with microHPLC Dionex Ultimate 3000. Additionally, to estimate the μ HPLC-HRMS system performance, two different analytical configurations were compared. Discontinuous one was used to indicate a setup in which the trap and analytical

columns were separated by a switching valve, while the second configuration enabled direct injection of sample on to the PicoChip column (used both for separation and as ion source). All preliminary analyses were done using standard solutions of peptides.

Results. The results confirmed our expectations that LTQ XL Orbitrap with Fourier Transformation is a great tool not only for identification of native peptides but also their fragments after digestion. It provides high resolution, high mass accuracy, and linear dynamic range. Moreover, the direct injection allowed to improve the efficiency and sensitivity of the analytical system in comparison with discontinuous configuration. However, ultra fast liquid chromatography coupled with the tandem (QqQ) mass spectrometry seems to be irreplaceable in the quantitative analysis of the molecules of our interest due to mainly its high selectivity, sensitivity and throughput.

Conclusions. The results described here demonstrate that Orbitrap is a powerful mass spectrometer that can be used to examine a variety of types of chemical compounds. In the future, these quantitative studies of biological samples will be done using triple quadrupole mass spectrometer coupled with nanoHPLC.

Acknowledgments:

This study was supported by the European Union from the resources of the European Regional Development Fund under the Innovative Economy Programme (grant coordinated by JCET-UJ, No POIG.01.01.02-00-069/09) and TEAM program of Foundation for Polish Science (TEAM/2011-8/7).

Раздел III

Научные работы молодых ученых – врачам и пациентам

В данном разделе приведены расширенные работы по актуальным вопросам
диагностики нарушений обмена веществ

РОЛЬ PGC1 α В КООРДИНАЦИИ ЯДЕРНО-МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

Т.Д. Логачева

(научный руководитель – н.с. Е.С. Алексеевская)

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова

Отдел биохимии НИЦ

tanya071994@yandex.ru

Помимо ключевой роли в энергетическом обмене митохондрии (МХ) участвуют в реализации программы апоптоза, гомеостазе кальция, а также выполняют важную биосинтетическую функцию (стероиды, липоевая кислота, цикл мочевины и др.). Несмотря на наличие собственной мтДНК, подавляющее большинство белков МХ закодировано в ядерном геноме. Скоординированная экспрессия генов ядерного и митохондриального геномов – необходимое условие нормального функционирования МХ. За последние несколько лет было показано, что решающую роль в регуляции биогенеза и функций МХ играют представители семейства транскрипционных коактиваторов PGC, наиболее изученным из которых является PGC1 α .

Контроль функции МХ со стороны ядра осуществляется посредством транскрипционных факторов (NRF-1, NRF-2, YY1, TFAM и др.), активность которых регулирует PGC1 α (Рис. 1). PGC1 α выполняет свою функцию путем физического взаимодействия с факторами транскрипции, связанными напрямую с промоторными участками ДНК.

Активация ядерных дыхательных факторов 1 и 2 (NRF-1 и NRF-2) приводит к повышению экспрессии многих митохондриальных белков, в том числе митохондриального фактора транскрипции А (TFAM). TFAM имеет большое значение для репликации, транскрипции и поддержания структуры мтДНК. Таким образом, влияя на NRF и, как следствие, на TFAM, PGC1 α обеспечивает координацию ядерного и митохондриального геномов в биогенезе.

Другой мишенью PGC1 α является эстроген-связанный рецептор (EER). EER напоминает рецептор эстрогена, но не связывается с эстрогеном или другими лигандами. Он участвует в регуляции окислительного метаболизма, поэтому его довольно много в тканях характеризующихся высоким уровнем окисления. Примером такой ткани может служить сердечная мышца, где ERR играет ключевую роль в контроле генетической регуляции энергетического обмена. Данный рецептор активирует гены, участвующие в работе дыхательной цепи МХ. ERR индуцирует более 90 различных генов, среди которых гены кодирующие ферменты, участвующие в энергетическом обмене клеток, а также компоненты других метаболических путей

(гликолиза и холестеринового обмена). Также стимуляция PGC1 α не приводит к экспрессии генов, участвующих в защите от окислительного стресса, в клетках, лишенных ERR α . Таким образом, PGC1 α является связующим звеном между ядерным рецептором ERR и МХ.

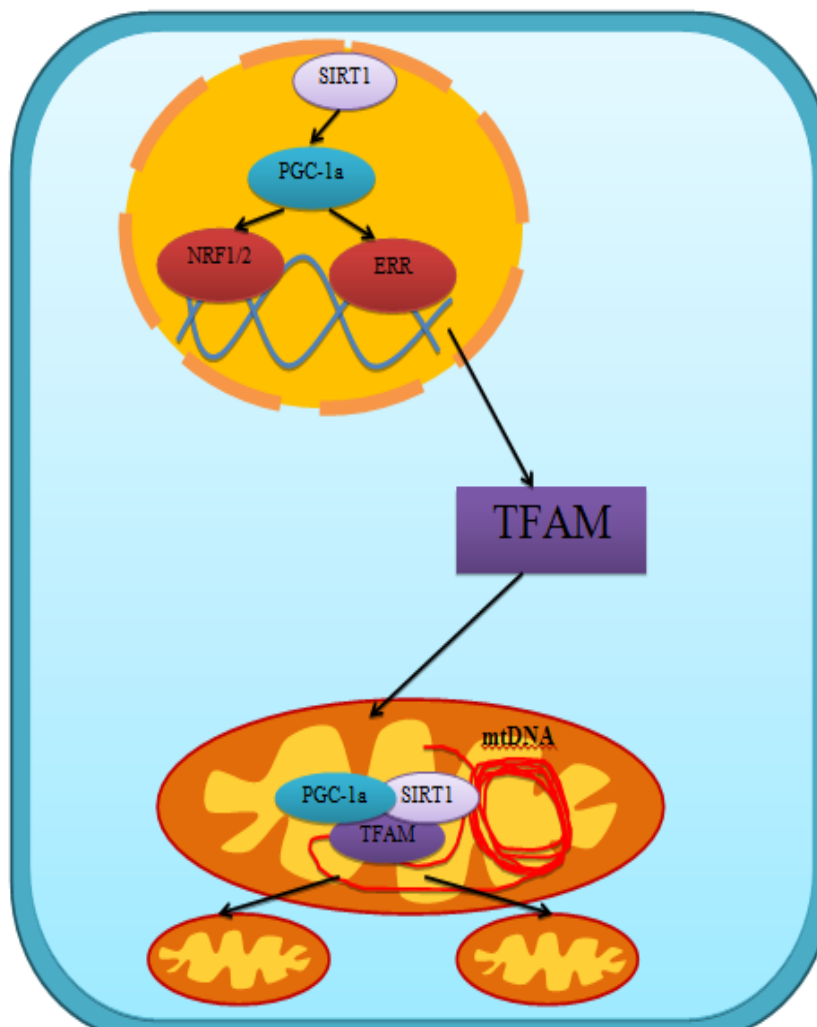


Рис.1. PGC1 α и биогенез митохондрий

mtDNA – митохондриальная ДНК;

ERR – эстроген-связанный ядерный рецептор;

NRF – ядерный респираторный фактор;

PGC-1 α – 1-альфа коактиватор гамма-рецептора, активирующего пролиферацию пероксисом (PPAR γ);

SIRT1 – сиртуин 1 – NAD⁺-зависимая деацетилаза;

TFAM – митохондриальный транскрипционный фактор А

Хотя PGC1 α действует главным образом в ядре, недавние эксперименты показали, что PGC1 α и SIRT1 локализованы также в МХ (Adeel afdar, Jonathan P. et al., 2011). Обнаружено, что они косвенно связаны с областью D-петли мтДНК. Эта область является местом инициации репликации и транскрипции мтДНК. PGC1 α и SIRT1 в данной области взаимодействуют с TFAM, который связывается с D-петлей непосредственно. На основании этих данных было сделано предположение, что SIRT1

и PGC1 α участвуют в транскрипции и репликации мтДНК. Вероятно, SIRT1 активирует TFAM и PGC1 α деацетилизацией, а PGC1 α , в свою очередь, коактивирует TFAM.

Ретроградная сигнализация от МХ к ядру также реализуется посредством PGC1 α -ассоциированного пути через изменение окислительного статуса, концентрации кальция и соотношения АМФ/АТФ в клетке. Нарушение работы МХ влияет на активность различных ферментов (SIRT1, АМПК и др.), модулирующих, в свою очередь, активность PGC1 α (Рис. 2).

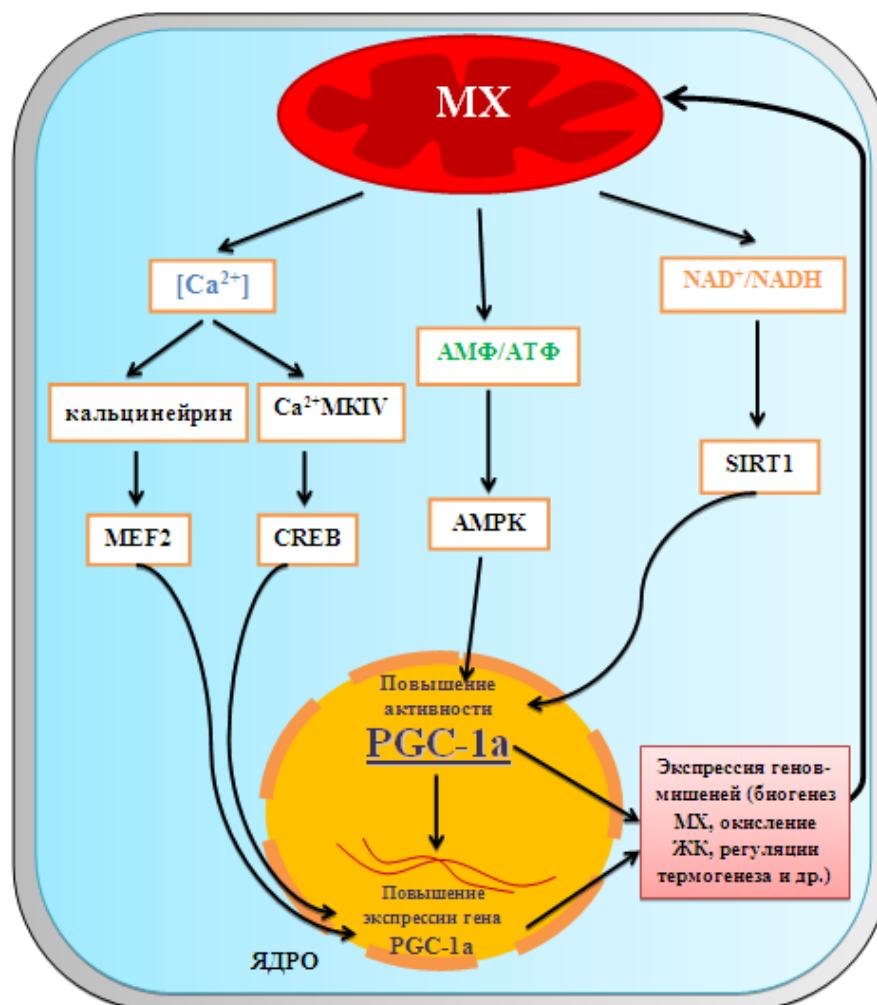


Рис.2. Роль PGC1 α в ядерно-митохондриальном взаимодействии

МХ – митохондрий;

ЖК – жирные кислоты;

АМПК – цАМФ-зависимая протеинкиназа;

Ca²⁺ МК IV – Ca²⁺-кальмодулин-зависимая протеинкиназа IV;

CREB – белок, связывающийся с цАМФ-зависимыми элементами (CRE) ДНК, транскрипционный фактор;

MEF2 – фактор стимуляции миоцитов 2, транскрипционный фактор;

PGC-1 α – 1-альфа коактиватор гамма-рецептора, активирующего пролиферацию пероксисом (PPAR γ);

SIRT1 – сиртуин 1 – NAD⁺-зависимая деацетилаза.

SIRT1 действует на PGC-1 α путем деацетилирования. SIRT1 является NAD⁺-зависимым ферментом. Поэтому при голодании, когда уровень окисления питательных

веществ снижен и количество окисленного NAD⁺ преобладает над восстановленным, происходит активация SIRT1. Впоследствии SIRT1 деацетилюет PGC1 α тем самым повышая генерацию АТФ и восстановительных эквивалентов с помощью субстратного митохондриального окисления.

Повышение [Ca²⁺] в миоцитах при повышенной физической нагрузке приводит к активации Ca²⁺-кальмодулин-зависимой протеинкиназы IV (CaMKIV), одной из мишеней которой белок, связывающийся с цАМФ-зависимыми элементами (CRE) ДНК (CREB). Ген PGC1 α имеет сайт для связывания с CREB. При этом взаимодействии происходит усиление экспрессии PGC1 α . Повышение концентрации Ca²⁺ приводит также к активации Ca²⁺-зависимой фосфатазы (кальцийнейрина), которая в свою очередь влияет на транскрипционный фактор стимуляции миоцитов 2 (MEF2), а он активирует экспрессию PGC1 α .

Другой механизм регуляции PGC1 α связан с прямым фосфорилированием, которое осуществляет цАМФ-зависимая киназа (АМПК). АМПК является центром метаболического контроля во всех эукариотических клетках. При усиленной тренировке мышцам требуется большее количество энергии, поэтому изменяется соотношение АМФ/ АТФ, что приводит к активации АМПК. АМПК непосредственно фосфорилирует PGC1 α , который повышает активность собственного промотора и, тем самым, увеличивает свою экспрессию.

Изменение экспрессии гена PGC1 α обнаружено при ряде заболеваний, в том числе нейродегенеративных, сахарном диабете и сердечной недостаточности, а также в ходе старения (Таблица 1).

Таблица 1

Роль PGC-1 α в патогенезе различных заболеваний

	Нейродегенеративные заболевания	Заболевания сердечно-сосудистой системы	Заболевания поджелудочной железы
Экспрессия и активность PGC1α	Снижается	Снижается	Увеличивается на ранних стадиях, на более поздних – снижается
Возникшие нарушения	<ul style="list-style-type: none"> Снижение индукции антиоксидантных генов; Появление мутантного белка хантингтина; Уменьшение экспрессии генов нервно-мышечного соединения. 	<ul style="list-style-type: none"> Снижение окисления жирных кислот в МХ; Накопление токсичных липидов; Накопление активных форм кислорода. 	<ul style="list-style-type: none"> Увеличение резистентности к инсулину; Уменьшение экспрессии генов митохондриального окисления.
Примеры заболеваний	Болезнь Альцгеймера, болезнь Хантингтона, болезнь Паркинсона, синдром Дюшенна	Сердечная недостаточность, ишемическая болезнь сердца, миопатия	Диабет 2 типа

Так у больных сахарным диабетом снижение экспрессии PGC1 α наблюдается гораздо чаще, чем у здоровых людей. PGC1 α активирует экспрессию GLUT4, который транспортирует глюкозу в клетки и является инсулин-регулируемым. Также в экспериментах было показано, что повышенная экспрессия PGC1 α в скелетных мышцах защищает мышечные клетки от высокого содержания жиров, вызванного ожирением и резистентностью к инсулину. В связи с этим, предполагают, что PGC1 α может защитить от развития резистентности к инсулину. Однако PGC1 α активирует глюконеогенез в печени, тем самым внося потенциальный вклад в развитие диабета, связанного с ожирением.

В связи с этим, разработка способов терапевтической модуляции PGC1 α -ассоциированного сигнального пути имеет огромный потенциал для лечения больных с различными митохондриальными дисфункциями (МД). Препараты, которые активируют AMPK и SIRT1, потенциально могут привести к активации PGC1 α , а значит, к увеличению биогенеза митохондрий, окислительного метаболизма, продолжительности жизни и к снижению вероятности развития ряда заболеваний (Таблица 2).

Таблица 2

Перспективы лекарственного модулирования активности PGC1 α

Фармакологический агент	Мишень в PGC1 α -ассоциированном пути	Применение и эффекты
Безафибрат	Все рецепторы семейства PPAR	<ul style="list-style-type: none"> • гиполипидемическое, антиатеросклеротическое средство из группы фибратов; • в эксперименте показано, что безафибрат повышает экспрессию PGC-1α и активирует окисление жирных кислот в митохондриях скелетных мышц у мышей (Dillon L.M. et al., 2012).
Метформин	AMPK SIRT1	<ul style="list-style-type: none"> • гипогликемическое средство из группы бигуанидов, используется при лечении сахарного диабета 2 типа; • подавляет глюконеогенез, а также образование свободных жирных кислот и окисление жиров с помощью активации PGC-1α через AMPK-зависимый путь (приводит к повышению концентрации цАМФ в клетке); • показано, что метформин также активирует SIRT1 и GCN5, что приводит к ингибированию глюконеогенеза через PGC-1α-сигнальный путь (Caton P.W., 2010).
Ресвератрол	SIRT1	<ul style="list-style-type: none"> • природный фитоалексин, в большом количестве содержащийся в винограде; • активирует SIRT1; • в экспериментах и клинических исследованиях показан широкий спектр действия, в том числе влияние на продолжительность жизни, противоопухолевый эффект; • в настоящее время выпускается как БАД; • 2011 году компания GlaxoSmithKline, занимавшаяся разработкой и продвижением препарата "Сиртрис" на основе ресвератрола, заявила о прекращении дальнейшей работы над препаратом в связи с рядом выявленных негативных последствий от его применения.
AICAR	AMPK	<ul style="list-style-type: none"> • 5-аминоимдазол-4-карбоксамид рибонуклеозид; • аналог цАМФ; • используется в спорте для развития выносливости; • в настоящее время российскими учеными ведутся испытания нового препарата (Акадезин) с широким терапевтическим спектром действия на основе AICAR (Антонова С., 2012).

Таким образом, PGC1 α является ключевым фактором ядерно-митохондриального взаимодействия. Разработка способов терапевтической модуляции PGC1 α -ассоциированного сигнального пути имеет огромный потенциал для коррекции МД.

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ ФУНКЦИЯ И ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ТРИМЕТИЛ-ЛИЗИНА

Е.В. Лоцман

(научный руководитель – д.м.н., проф. А.А. Жлоба)

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова
Отдел биохимии НИЦ

goriunova.elizaveta@yandex.ru

Введение. У людей уровень L-карнитина определяется доступностью триметил-лизина (ТМЛ) во внутримитохондриальном пространстве, где его использует триметил-лизин-гидроксилаза (рис.1). Сам ТМЛ образуется исключительно после лизосомального протеолиза. Следует отметить, что пищевой ТМЛ также усваивается организмом в целях биосинтеза L-карнитина. Таким образом, известно, что ТМЛ, образующийся в организме, как и пищевой ТМЛ, является единственным метаболитическим предшественником карнитина, необходимого для внутриклеточного переноса длинноцепочечных жирных кислот.

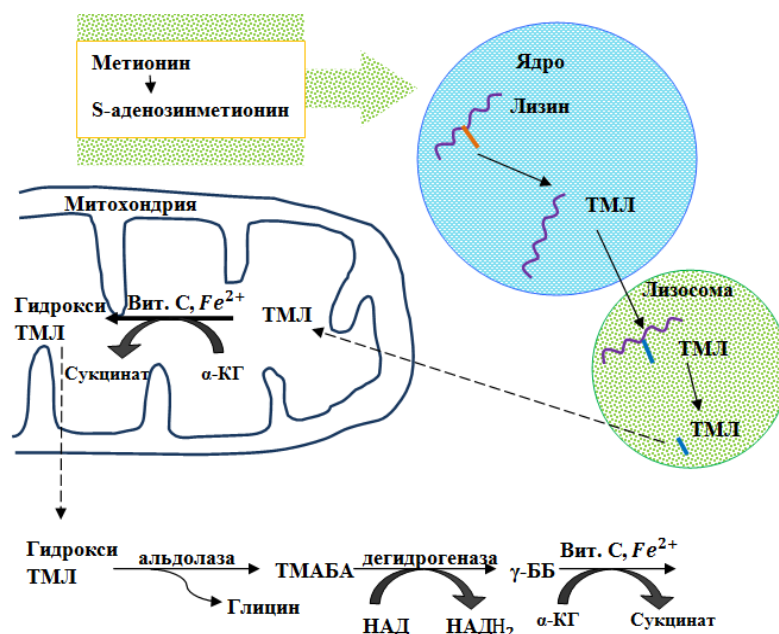


Рис.1. Образование триметил-лизина. ТМЛ – триметил-лизин; ТМАБА – 4-метиламинобутиральдегид; γ-ББ – γ-бутиробетанин

В норме и при патологических состояниях L-карнитин может обнаруживаться в плазме крови и моче. Известно, что собственного карнитина за счёт ТМЛ из указанных источников (рис.2) образуется примерно 1-2 мкмоль на 1кг веса в сутки, или приблизительно 0,1 ммоль на весь организм. Известно также, что в норме концентрация ТМЛ в плазме крови выше 0,4 мкмоль/л. При патологических состояниях концентрация ТМЛ в плазме крови достигает нижней границы и колеблется в пределах от 0,05 мкмоль/л до 0,2 мкмоль/л [Fre`de`ric M. VAZ et al.(2002)].

L-карнитин является главным переносчиком жирных кислот в клетке. Порядка 75% этого переносчика имеет экзогенное происхождение, меньшая часть (25%) представлена эндогенным L-карнитином [Fre`de`ric M. VAZ et al.(2002)]. Биосинтез L-карнитина происходит в печени, почках и мозге с участием триметил-лизина и метионина (рис.2) [Fre`de`ric M. VAZ et al.(2002)].

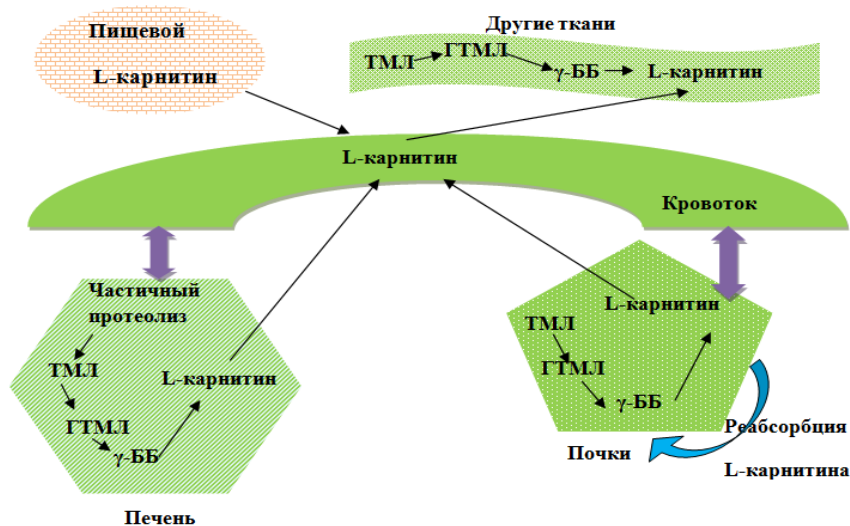


Рис.2. Источники карнитина

В процессе биогенеза молекул переносчика образуются молекулы триметил-лизина. Для определения ТМЛ в плазме крови используются методы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ-анализ). Т.к. концентрация L-карнитина в плазме крови может составлять менее 0,1 мкмоль/л, то для его определения с целью повышения чувствительности концентрируют пробу за счёт приема твёрдофазной экстракции.

Образование триметил-лизина. Доступность триметил-лизина для синтеза карнитина определяется посттрансляционными модификациями остатков лизина в составе протеина [Fre`de`ric M. VAZ et al.(2002)]. Следовательно, активность биогенеза карнитина находится в прямо пропорциональной зависимости от скорости метилирования белок-связанного лизина. Эта взаимосвязь может выполнять важную роль для поддержания баланса эндогенный/экзогенный карнитин [Fre`de`ric M. VAZ et al.(2002)].

В основе образования ТМЛ лежат реакции метилирования. Данная модификация лизина происходит в ядрах клеток (рис.1). Донором 4-N-метильной группы является S-аденозилметионин, который после её переноса на акцептор при участии S-аденозилметилтрансферазы переходит в форму S-аденозилгомоцистеина.

Образовавшийся триметил-лизин, связанный с полипептидом, подвергается ограниченному протеолизу высокоспецифичными пептидазами в протеасомах с появлением ТМЛ пептидов и последующей деградации их в лизосомах с отщеплением свободного ТМЛ. Данный процесс опосредован убиквитином, который при помощи остатка глицина присоединяется к ε-аминогруппе остатка лизина в белке.

Предшественник ТМЛ – остаток аминокислоты лизин в составе белков является незаменимой, поскольку в организме человека не существует углеродных скелетов, которые могли бы подвергаться аминированию с образованием ТМЛ [Daniel Tome et al.(2007)](рис.4). Потребности организма в лизине составляют приблизительно 12-45 мг/кг в день [Daniel Tome et al.(2007)]. Эти значения не абсолютны и могут варьировать в зависимости от пола, возраста, характера питания, состояния здоровья. Синтез ТМЛ определяется уровнем метионина, витаминов группы В и витамина С, катионов Fe.

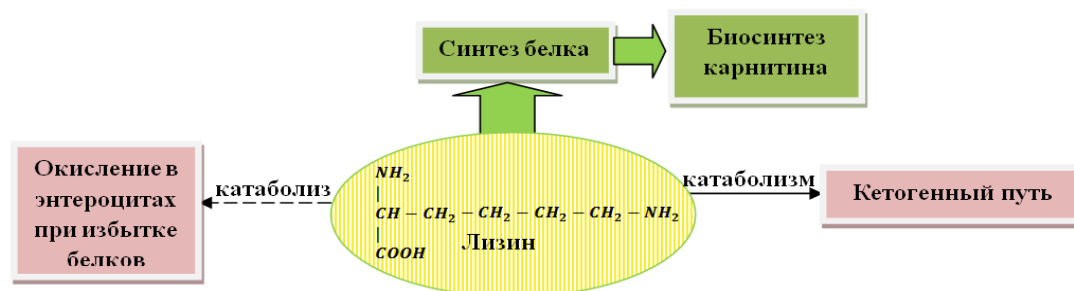


Рис.3. Пути метаболизма лизина

Анаболизм карнитина. Источниками синтеза карнитина являются ТМЛ и метионин. За счёт углеродного скелета лизина происходит весь синтез карнитина, метионин является донором 4-N-метильной группы. Метилирование остатков триметил-лизина в составе белков обуславливает их посттрансляционные изменения (рис.6). Данная реакция происходит при участии активной формы метионина как донора метильной группы. Лизосомальный протеолиз протеин-связанного модифицированного лизина приводит к образованию ТМЛ-содержащих пептидов. Гидроксилирование высвободившихся в результате гидролиза ТМЛ является ферментативным процессом и катализируется ТМЛдиоксигеназой. Альдолирование этого продукта субстратоспецифичной альдолазой расщепляет исходную молекулу на глицин и триметиламинобутиральдегид. Дальнейшее дегидрогенирование триметиламинобутиральдегида дегидрогеназой приводит к образованию 4-метиламинобутирата (γ-бутиробетаина). Последний этап – гидроксилирование γ-бутиробетаина по положению 3 с участием диоксигеназы и с образованием конечного продукта-карнитина.

Методы диагностики. Все методы обнаружения ТМЛ в биологических жидкостях представлены двумя группами: ВЭЖХ-анализ и tandemные методы MS спектрометрии. ВЭЖХ-анализ позволяет выявить определённые классы веществ в спектре минорных белков(рис.4,5). С этой целью белки подвергаются предварительному концентрированию (твёрдо-фазная экстракция). При получении данных значимыми являются концентрации метил-аргинина: асимметричный аналог ингибирует NO-синтазу и влияет на метаболизм и гомеостатические концентрации аминокислот посредством блокирования их транспортёров в составе ЦПМ.

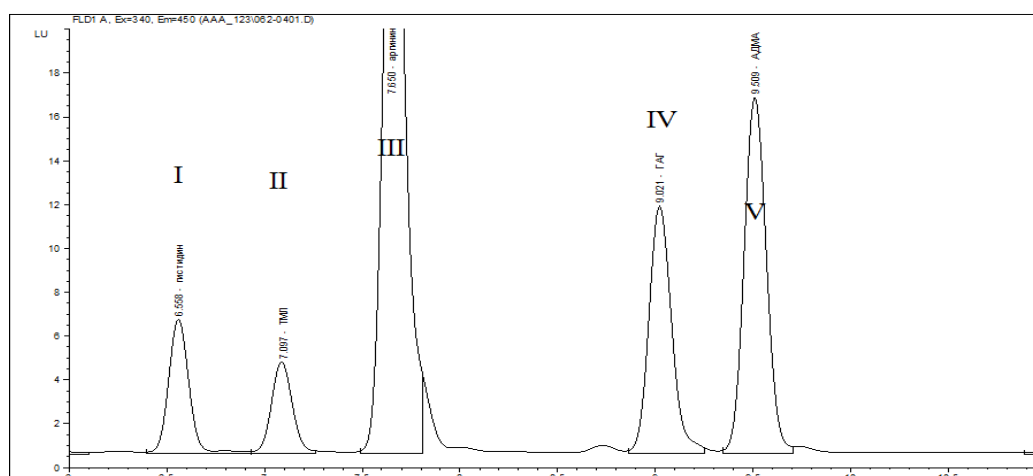


Рис. 4. Хроматограмма получена на хроматографе **Egilent -1100** после твёрдо-фазной экстракции и дериватизации ортофталевым альдегидом по α -аминогруппе, путём флуоресцентного детектирования полученных производных образца плазмы с добавлением ТМЛ- 4 мкМ, АДМА -17,5 мкМ.

I - гистидин; II - ТМЛ; III – аргинин; IV – ГАГ; V - АДМА

Ось X – время элюции или время удержания аналита (retention time)

Ось Y – единицы флуоресценции

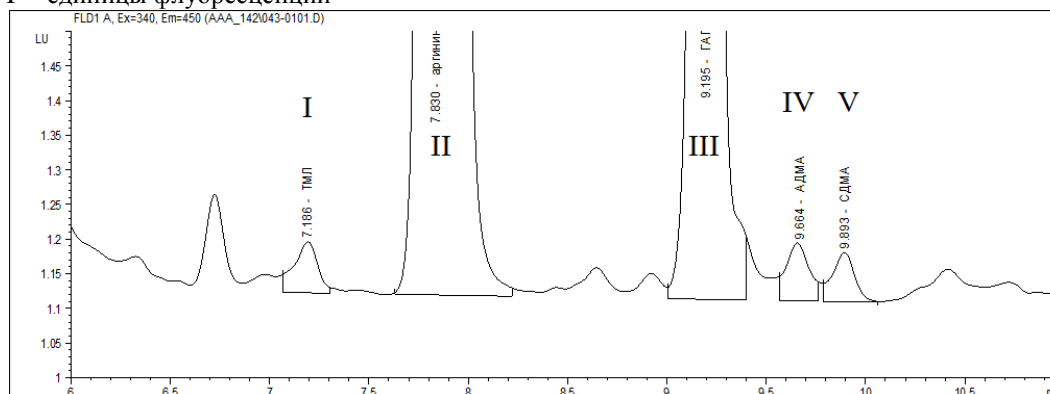


Рис.5. Хроматограмма метилированных производных основных аминокислот: ТМЛ (0,34мкМ), АДМА(0,25), СДМА(0,24 мкМ)

I – ТМЛ; II – аргинин; III – ГАГ; IV – АДМА; V – СДМА.

Хроматограммы получены на колонке для разделения ортофталевых производных аминокислот: Zorbax AAA – 150·4,6 мм, зерно 3,6 микрон.

Метилирование белков. Метилирование белков протекает в ядре клетки с участием S-аденозилметилтрансферазы, что обеспечивает метилирование аминокислот в составе белков гистонов и влияет на экспрессию генов, функциональную активность клеток (рис.6).



Рис. 6. Метилирование белков

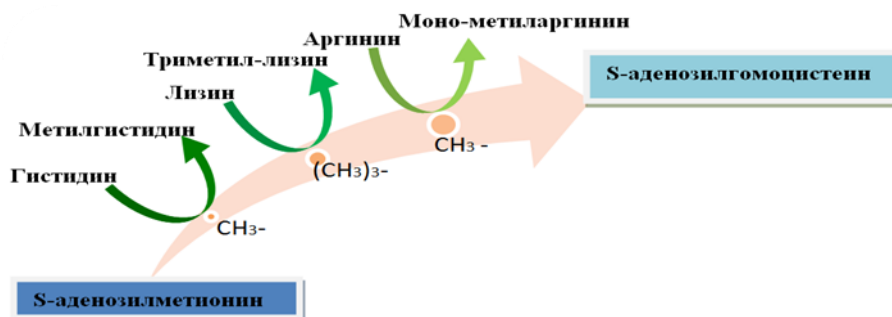


Рис.7. Метилирование аминокислот

При изменении активности метилирования L-аргинина возможны дефекты биогенеза NO. Причиной нарушений метилирования могут быть воспалительные процессы, окислительный стресс, приводящий к деградации белков (рис.7). Продукты метилирования аргинина способны блокировать катионные переносчики для аминокислот, что приводит к развитию заболеваний сердечно-сосудистой и выделительной систем.

Концентрации ТМЛ в моче и плазме крови в норме и при патологических состояниях. Для анализа данных, полученных у пациентов следует опираться на

референтные показатели у здоровых доноров. Содержание ТМЛ в плазме крови постоянно, коррелирует с массой тела и составляет 0,2-1,3 м Моль/л. Т.к. ТМЛ не реабсорбируется в почках, то концентрации ТМЛ в моче прямо пропорциональна уровню экскреции креатинина и варьирует в пределах от 2 до 8 мМоль на 1 мМоль креатинина (табл.1).

Среднее значение, мМоль/ Моль креатинина	Число испытуемых
2,8 (0,8) [1,3-4,7]	40
3,4	3
4,3	25
5,3(1,7) [3,8-10,4]	13
4,7(0,9) [3,5-6,2]	7
6,2(0,3)	16

Табл. 1. Концентрации ТМЛ в моче (группа из 40 испытуемых: 23 мужчины, 17 женщин возрастом 2-66 лет)

Вывод. ТМЛ является единственным эндогенным предшественником карнитина. При недостатке ТМЛ в организме требуется увеличение его концентраций и γ -бутиробетаина, или самого карнитина за счёт внешних источников. Таким образом, определение концентраций ТМЛ позволяет оценить уровень снабжения тканей карнитином за счёт эндогенных источников ТМЛ. Для рекомендации определения ТМЛ в клинко-биохимическую практику требуются дальнейшие исследования варьирующих данных, полученных от различных когорт пациентов с сердечно-сосудистыми и почечными заболеваниями.

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ ФУНКЦИЯ И ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ КОРОТКОЦЕПОЧЕЧНЫХ И ДЛИННОЦЕПОЧЕЧНЫХ АЦИЛ-КАРНИТИНОВ

А.А. Самсонова

(научный руководитель – д.м.н., проф. А.А. Жлоба)

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова

Отдел биохимии НИЦ

ali4fan1@gmail.com

Карнитин и ацил-карнитины участвуют не только в метаболизме и окислении жирных кислот, но также принимают участие во внутриклеточном и внеклеточном транспорте. Среди ацил-карнитинов можно выделить водорастворимые (до C5) и жирорастворимые (C16-C18). Недостаток карнитина, составляющий 10-20% от нормы, приводит к неблагоприятному изменению метаболизма и к патологическому состоянию. По уровню карнитина и спектру его ацилированных форм в плазме возможно оценить не только полноту β -окисления жирных кислот, но и функцию митохондрия по утилизации органических кислот, происходящих не только из жиров.

Для исследования ацил-карнитинов в плазме крови в основном применяют метод масс-спектрометрического детектирования. Он позволяет выделять ацил-карнитины по длине цепи, так как их длина пропорциональна массе. При нарушении метаболизма кислот с нечетным числом углеродных атомов, что часто проявляется при возрастной митохондриальной дисфункции, применяется определение метилмалоновой кислоты и пропионил-карнитина путем ВЭЖХ анализа и масс-спектрометрии, но с предварительной твердофазной экстракцией крови.

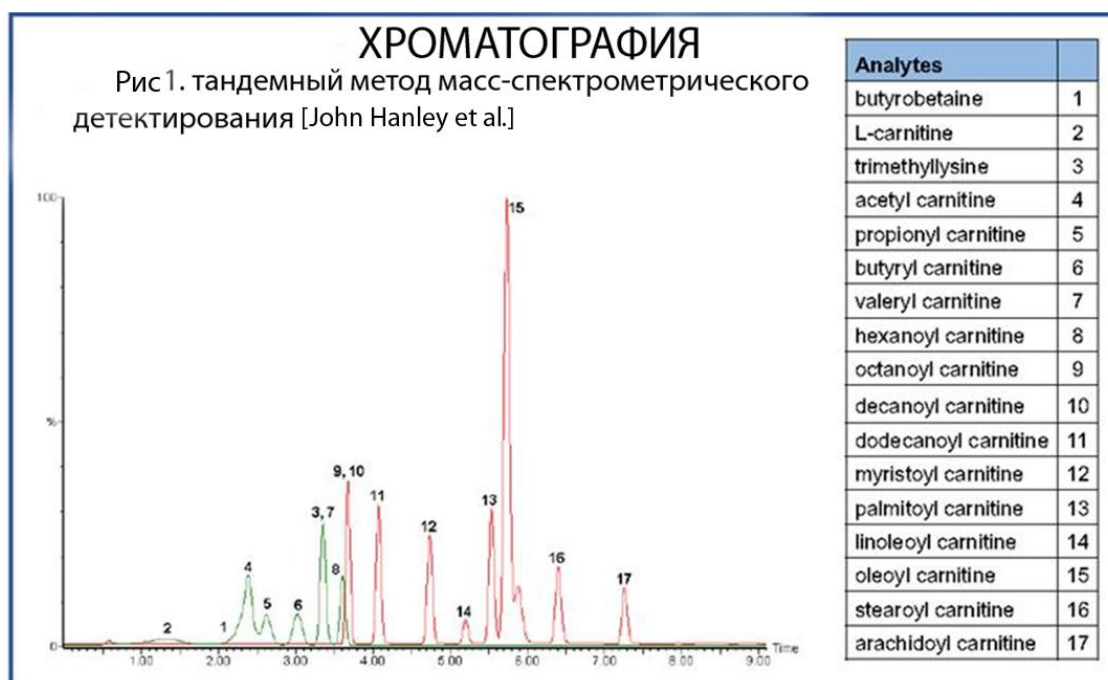


Таблица 1. Референтные интервалы карнитина и ацил-карнитинов в плазме крови.**В исследование включены пациенты с глютеновой болезнью [J.V.Berentene et al. (2008)]**

	Пациенты n=33	Контрольная группа n=35
Free carnitine (C0)	27.191 ± 1.194	30.029 ± 1.902
Short-chain acylcarnitines		
Acetylcarnitine (C2)	4.703 ± 0.205*	10.227 ± 0.368
Propionylcarnitine (C3)	0.247 ± 0.014*	0.400 ± 0.021
Butyrylcarnitine (C4)	0.152 ± 0.011*	0.267 ± 0.013
Isovalerylcarnitine (C5)	0.111 ± 0.010	0.138 ± 0.010
Tiglylcarnitine (C5:1)	0.034 ± 0.002	0.033 ± 0.003
Medium-chain acylcarnitines		
Hexanoylcarnitine (C6)	0.060 ± 0.004*	0.080 ± 0.006
Octanoylcarnitine (C8)	0.086 ± 0.006*	0.121 ± 0.009
Octenoylcarnitine (C8:1)	0.037 ± 0.003*	0.071 ± 0.008
Decanoylcarnitine (C10)	0.103 ± 0.008*	0.141 ± 0.009
Decenoylcarnitine (C10:1)	0.063 ± 0.005*	0.108 ± 0.010
Lauroylcarnitine (C12)	0.032 ± 0.002*	0.052 ± 0.004
Long-chain acylcarnitines		
Myristoylcarnitine (C14)	0.016 ± 0.001*	0.024 ± 0.001
Myristoleylcarnitine (C14:1)	0.025 ± 0.002*	0.040 ± 0.004
Palmitoylcarnitine (C16)	0.097 ± 0.006	0.113 ± 0.006
Palmitoleylcarnitine (C16:1)	0.037 ± 0.003	0.032 ± 0.002
Stearoylcarnitine (C18)	0.076 ± 0.004	0.080 ± 0.004
Oleylcarnitine (C18:1)	0.137 ± 0.007*	0.169 ± 0.008
Hydroxymyristoylcarnitine (C14OH)	0.007 ± 0.001	0.005 ± 0.001
Hydroxypalmitoylcarnitine (C16OH)	0.022 ± 0.001	0.023 ± 0.002
Hydroxypalmitoleylcarnitine (C16:1OH)	0.026 ± 0.002	0.029 ± 0.002
Hydroxyoleylcarnitine (C18:1OH)	0.016 ± 0.002	0.013 ± 0.002

Карнитин и его роль

– синтезируется de novo в тканях животных (печень, почки, мозг) до 1,2 ммоль/кг*сут, а также – путем получения из пищи (мясо, рыба, молочные продукты) 2-12 ммоль/кг*сут.

Основные функции:

- транспорт жирных кислот в митохондрии для их дальнейшего окисления
- экспорт ацетила и других короткоцепочечных ацильных групп из пероксисом (пероксисомное В-окисление)
- сохранение баланса между свободным и эстерифицированным ацетил-КоА (повышение уровня ацетил-КоА токсично)
- удаление лишних групп ацилов из митохондрий

- хранение энергии в составе ацил-карнитина
- влияние на регуляцию секреции инсулина и чувствительности ткани к инсулину

Транспорт карнитина

Транспорт карнитина опосредуется семейством органических катионных переносчиков:

OCTN1 – митохондриальный переносчик карнитина, имеющий низкое сродство к субстрату. Широкоспецифичный, рН – зависимый и Na⁺-независимый переносчик **OCTN2** – самый важный, имеющий высокое сродство к субстрату (особенно, в печени и тканях мозга) Na⁺-зависимый переносчик, (в ЦПМ). Ингибируется ацетил-карнитином и бутиро-бетаином (является их переносчиком).

OCTN3 – транспортер карнитина, расположенный в мембране пероксисом. Находится в почках, кишечника и яйцках, высокоспецифичен к карнитину.

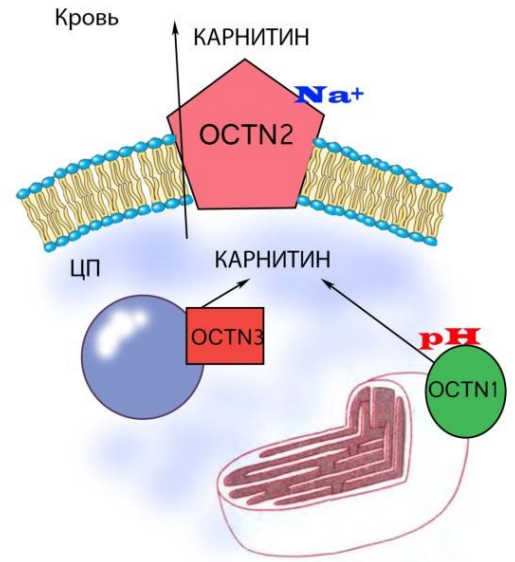


Рис.2. Транспортеры карнитина

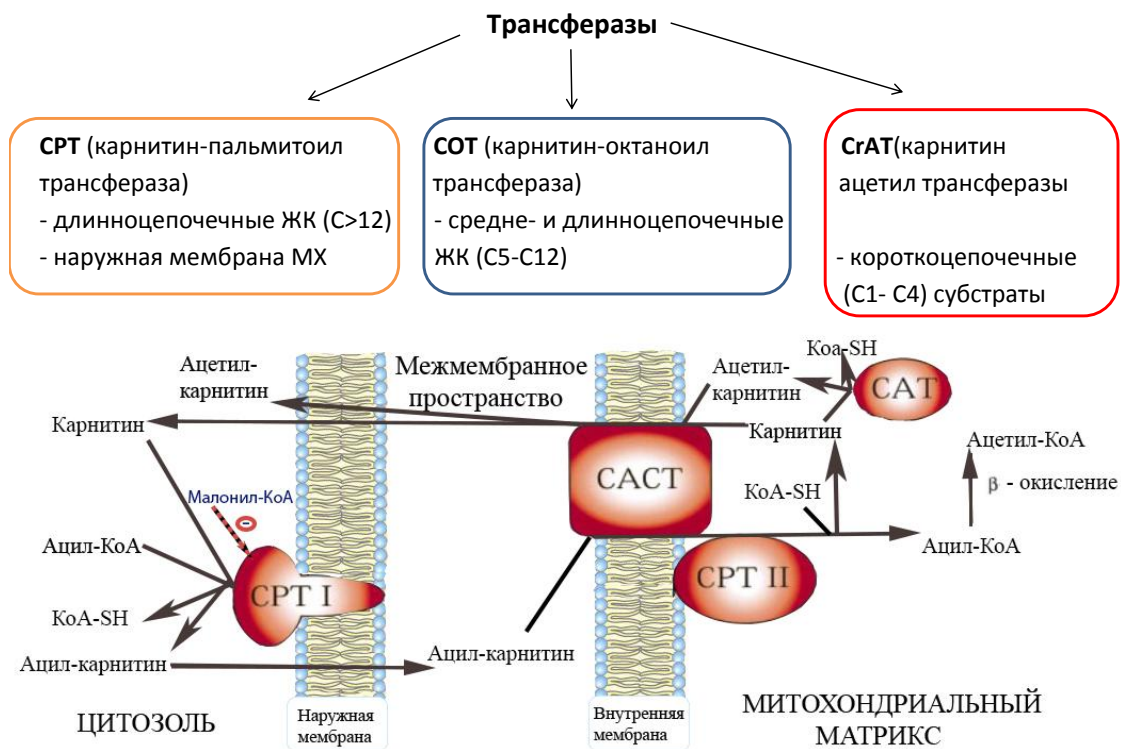


Рис.3 . Транспорт жирных кислот

Цитоплазматические длинноцепочечные жирные кислоты трансэстерифицируются с L-карнитином при участии карнитин-пальмитоил трансферазой I (CPT I), и далее переносятся с помощью карнитин – пальмитоил трансферазы II (CPT II) с участием карнитин-ацил-карнитин транслоказы (CACT) через внутреннюю мембрану в матрикс в форме длинноцепочечных эфиров КоА.

В матриксе при неполном β -окислении фермент карнитин ацил-трансфераза (CAT) преобразует короткие и средней длины цепи ацил-КоА в ацил-карнитины, которые могут транспортироваться из митохондрий и из клетки в кровотоки.

Таблица.2. Генетические нарушения спектра ацил-карнитинов и свободного карнитина

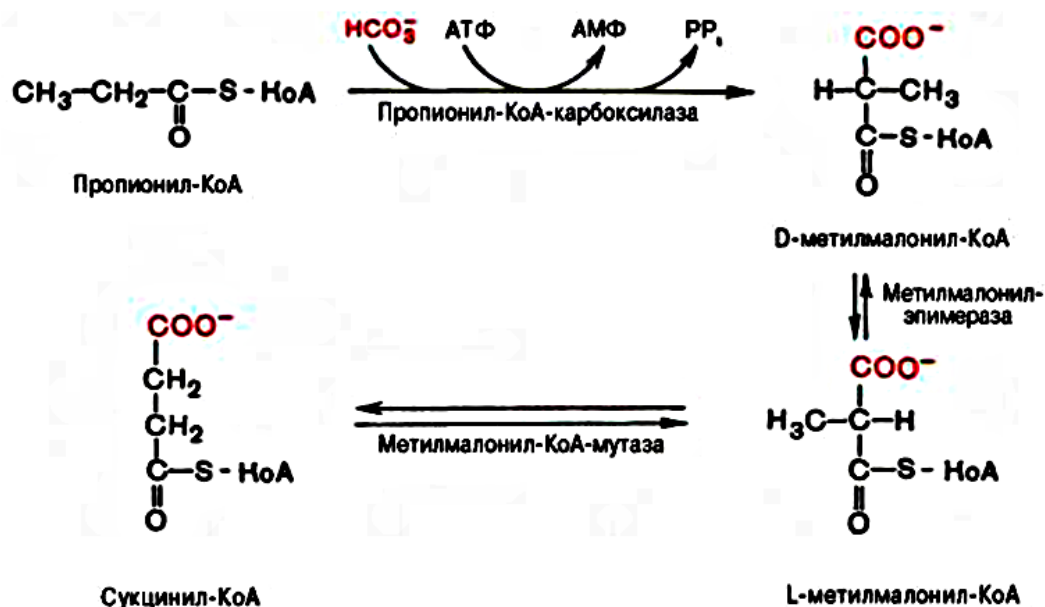
Название	Причина	Патогенез
	Собственный дефицит карнитина	
Системная недостаточность карнитина	Гетерозиготная мутация гена SLC22A5, кодирующего высокоспецифичный транспортер карнитина OCTN2	Повышение выделения карнитина с мочой, понижение уровня карнитина в плазме
Мышечная недостаточность карнитина	Дефект OCTN1	Снижение уровня карнитина в мышцах на 20% при нормальном уровне в печени и плазме
	Дефицит предшественника	
Нарушения переноса предшественников	Воспаление, окислительный стресс. Из N-монометил аргинина образуется 2 изоформы (симметричную и ассиметричную)	Ассиметричная - блокирует переносчик для ак в мембране; симметричная - блокирует катионный аргининовый транспорт, что ведет к понижению уровня 3-метил- лизина в плазме, снижению показателей карнитина
Нарушение ферментов синтеза	Генетические нарушения ферментов синтеза карнитина из 3-метил-лизина	Снижения уровня предшественников карнитина
	Накопление токсичного субстрата	
Нарушения ферментов переноса ЖК	1) CPT-1 2) CPT-2 3) CACT	Накопление токсических длинноцепочечных субстратов, затруднение β -окисления ЖК. Повышение уровня свободного карнитина и короткоцепочечных ацил-карнитинов с понижением длинноцепочечных в плазме Нарушение превращения длинных цепей в ацил-КоА; увеличение содержания длинноцепочечных ацил-карнитинов в плазме Нарушение транспорта ЖК и карнитина
Пропионовая ацидемия	Дефект пропионил-КоА карбоксилазы	Накопление пропионовой кислоты
Метилмалоновая ацидемия	Дефект гена MUT (локализован на участке p21 хромосомы 6) – нарушение преобразования метил-малонил-КоА в сукцинил-КоА	Накопление метил-малонил-КоА

Нарушения метаболизма карнитина и ацил-карнитинов

Регистрируется много видов нарушения ацил-карнитинового спектра и собственного недостатка карнитина, а также суммы карнитинов в плазме крови. Это может быть обусловлено с одной стороны первичной митохондриальной дисфункцией, а с другой – вызывать вторичную.

В настоящее время имеются методы позволяющие одновременно и быстро определять весь спектр ацил-КоА и их производных, В том числе метил-малонил-КоА, пропионил-КоА. Именно их избыток в плазме крови и моче указывает на дефекты метаболизма, которые с возрастом встречаются часто и ведут к вторичной митохондриальной дисфункции за счет дефицита коферментной функции витамина В12 или снижения экспрессии самого фермента метил-малонил-КоА мутазы.

Схема. Метаболизм пропионил-КоА



Метил-малонил-КоА мутаза (кофермент - S-аденозинкобаламина) является ферментом, участвующим в β-окислении жирных кислот и других веществ с нечетным числом углеродных атомов. Снижение его активности приводит к экскреции метилмалоновой кислоты, а также пропионил-карнитина с мочой и аккумуляции органических кислот в тканях организма.

Таким образом, недостаток В12 приводит к нарушению утилизации жирных кислот с нечетным количеством углеродных атомов, что приводит к повышению уровня пропионил-карнитина. Пропионил-карнитин является сильным ингибитором митохондриального ПВК дегидрогеназного комплекса и вызывает торможение метаболизма ПВК в митохондриях, что ведет к накоплению молочной кислоты и других

промежуточных метаболитов (аланина, например в клетке и крови). Закисление среды может сопровождаться нарушением функций клетки (является причиной гибели клеток в результате апоптоза, сопровождаться нарушением проводящей системы сердца и неврологическими расстройствами).

Этому отдельному виду нарушений в спектре ацил-карнитинов, ведущему к накоплению как пропионил-КоА, так и метил-малонил-Коа, в связи с повышением частоты встречаемости в старших возрастных группах (>45), а также у пациентов после операционных вмешательств на ЖКТ в связи с плохой усвояемостью витамина В12, придается важное диагностическое значение. Пропионил-карнитинная и метил-малононовая ацидемия очень часто встречается у взрослых и пожилых.

Выводы

Масс-спектрометрическое детектирование для выявления полного спектра ацил-карнитинов и других метаболитов используют при неонатальном скрининге новорожденных в целях диагностики вида наследственного нарушения метаболизма жирных кислот. Для диагностики нарушения метаболизма жирных кислот у взрослых большее значение имеет возрастание содержания в плазме и/или моче пропионил-карнитина или, метил-малоновой кислоты путем ВЭЖХ-анализа с флуориметрическим или масс-спектрометрическим детектированием.

НАРУШЕНИЯ МЕТАБОЛИЗМА АМИНОКИСЛОТ С РАЗВЕТВЛЕННОЙ ЦЕПЬЮ И ИХ ДИАГНОСТИКА

К.А. Шипаева

(научный руководитель – д.м.н., проф. Т.Ф. Субботина)

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова

Отдел биохимии НИЦ

karish_ej@mail.ru

Введение.

Аминокислоты с разветвленной цепью: лейцин, изолейцин, валин – самые распространенные из незаменимых аминокислот. В дополнение к их главной роли – субстрата белкового синтеза, они несут ряд других функций: они выступают источниками энергии в энергетическом метаболизме, пополняют пул промежуточных метаболитов цикла трикарбоновых кислот, служат сигнальными молекулами, модулирующими ряд клеточных функций, регулируют протеиновый синтез и деградацию, секрецию инсулина, а также вовлечены в энергетический баланс в нервной и мышечной ткани. Катаболизм аминокислот с разветвленной цепью осуществляется не в печени (место распада большинства остальных аминокислот), а в мышечной и жировой тканях, почках и, главным образом, в ткани мозга. Сначала аминокислоты с разветвленной цепью подвергаются трансаминированию с альфа-кетоглутаратом под действием общего и специфического фермента – аминотрансферазы аминокислот с разветвленной цепью с образованием соответствующих альфа-кетокислот. Последующее окислительное декарбоксилирование альфа-кетокислот дегидрогеназным комплексом альфа-кетокислот с разветвленной цепью приводит к образованию соответствующих КоА-производных. Далее каждая из трех аминокислот идет по индивидуальному пути катаболизма.



Нарушения метаболизма аминокислот с разветвленной цепью может быть обусловлено:

1. Снижением активности дегидрогеназного комплекса альфа-кетокислот с разветвленной цепью в большей или меньшей мере. Проявлением данных нарушений могут быть:

- «Болезнь мочи кленового сиропа»

- Гипервалинемия
- Скачкообразная кетонурия
- Изовалериановая ацидемия

2. Недостаточностью витамина В12. Его производное – 5' – дезоксиаденозил-кобаламин выступает коферментом метилмалонил–КоА–мутаза – ключевого фермента пути, ведущего к образованию сукцинил-КоА – промежуточного метаболита цикла трикарбоновых кислот. Проявление данных нарушений:

- Пропионовая ацидурия
- Метилмалоновая ацидурия.

Болезнь мочи кленового сиропа: гентика и метаболизм.

Болезнь мочи кленового сиропа (англ. MSUD, рус. БМКС) (другое название заболевания – кетоацидурия с органических кислот с разветвленной цепью, или лейциноз) – наиболее распространенное проявление нарушения метаболизма аминокислот с разветвленной цепью. Это расстройство является одним из видов органических ацидурий. Свое название заболевание получило от специфического сладкого запаха мочи у больных младенцев. При рождении у детей нет никаких видимых признаков заболевания. Однако при отсутствии специфической терапии у больных возникают серьезные повреждения головного мозга, которые могут привести к смерти ребенка. Все нарушения метаболизма аминокислот с разветвленной цепью, в том числе и БМКС, носят аутосомно-рецессивный характер. БМКС встречается с частотой 1 на 180000 новорожденных.

Болезнь мочи кленового сиропа обусловлена дисфункцией дегидрогеназного комплекса альфа-кетокислот с разветвленной цепью. Дегидрогеназный комплекс имеет 4 субъединицы (E1a, E1b, E2 и E3). Мутации в обоих аллелях, кодирующих любую субъединицу, приводят к дисфункции ферментативного комплекса и накоплению аминокислот с разветвленной цепью (**преимущественно лейцина**) и их **альфа-кетопредшественников** в тканях и плазме крови. Биохимические нарушения, характерные для БМКС, связаны с мутациями в генах, кодирующих декарбоксилазную альфа-субъединицу (E1a), декарбоксилазную бета-субъединицу (E1b), и дигидролипоил трансацилазную субъединицу (E2). Субъединица E3 (липоамид дегидрогеназа) является общей для всех дегидрогеназных комплексов альфа-кетокислот (с разветвленной цепью, пирувата и альфа-кетоглутарата). БМКС 3 типа характеризуется не только накоплением аминокислот с разветвленной цепью и соответствующих альфа-кетокислот, но и повышением концентрации лактата, пирувата и аланина.

Существуют три гена, мутации в которых ассоциированы с БМКС

1. Ген *BCKDHA*, кодирующий декарбоксилазу альфа-кетокислот с разветвленной цепью (E1 альфа-субъединица) – БМКС тип 1А
2. Ген *BCKDHB*, кодирующий декарбоксилазу альфа-кетокислот с разветвленной цепью (E1 бета-субъединица) – БМКС тип 1В
3. Ген *DBT*, кодирующий дегидролипоилтрансацилазу (E2 субъединица) – БМКС тип 2.

Таблица 1. БМКС: локализация генов и кодируемые белки

СИМВОЛ ГЕНА	ЛОКУС В ХРОМОСОМЕ	КОДИРУЕМЫЙ БЕЛОК	МУТАЦИЯ
<i>BCKDHA</i>	19q13.2	Митохондриальная 2-оксисовалериат дегидрогеназа альфа-субъединица	Замена нуклеотида с. 1312 T>A, Делеция экзона или гена
<i>BCKDHB</i>	6q14.1	Митохондриальная 2-оксисовалериат дегидрогеназа бета-субъединица	Замена нуклеотида с. 548G>C; с. 832 G>A; с. 1114G>T, Делеция экзона или гена
<i>DBT</i>	1p21.2	Митохондриальная липоамид трансацилаза альфа-кетокислот с разветвленной цепью	Замена нуклеотида, Делеция экзона или гена

Болезнь мочи кленового сиропа: патофизиология.

Тяжелые расстройства центральной нервной системы при БМКС объясняются тем, что **лейцин**, который имеет наиболее низкую Км для главного транспортера нейтральных аминокислот – **LAT1**, - насыщает его в гематоэнцефалическом барьере и **блокирует поглощение своих конкурентов: тирозина, фенилаланина, триптофана, изолейцина, гистамина, валина, метионина, глутамина и треонина**. Многие из них являются предшественниками нейромедиаторов (дофамина, норадреналина, серотонина и гистамина) и S-аденозилметионина (С- АдоМет) - главного донора метильных групп в мозговой ткани. Альфа-кетоизокапроновая кислота (аКИК) поступает в мозг через монокарбоксилатный транспортер (МКТ) и меняет поток аминокислот через трансминазы (ТА). Это истощает резервы глутамата, ГАМК и глутамина, увеличивая образование лейцина и альфа-кетоглутарата (аКГ). Глутамат и ГАМК являются наиболее распространенными возбуждающими и тормозными нейромедиаторами в мозге человека, соответственно. Также возможно блокирование окислительного фосфорилирования: **аКИК конкурентно ингибирует пируват- и**

альфа-кетоглутаратдегидрогеназные комплексы (ПДГ и аКГДГ) и ряд комплексов электрон-транспортной цепи. Накопление альфа-кетоглутарата может угнетать малат-аспартатную транслоказу в результате увеличивается отношение $\text{НАД}^+/\text{НАД}^{\text{H}}$, препятствующее переходу лактата в пируват. Снижение активности дегидрогеназы кетосислот с разветвленной цепью влияет на использование лейцина для синтеза миелина. В сочетании с нарушениями синтеза белка это приводит к демиелинизации. Нарушение окислительного фосфорилирования приводит к недостаточности функций Na^+ -зависимой АТФ-азы и развитию отека мозга.[2].

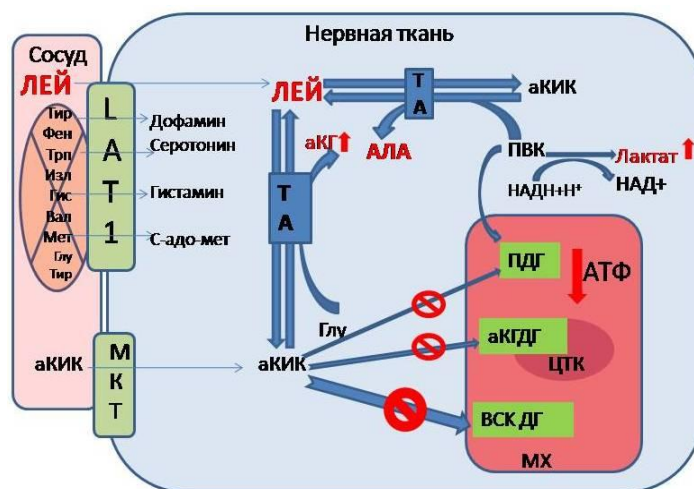


Рисунок 1. Модель нейротоксичности лейцина и альфа-кетоиокапроновой кислоты при БМКС

Болезнь мочи кленового сиропа: диагностика.

Тест стратегия



1. На первом этапе проводится скрининг новорожденных, с целью обнаружения грубых нарушений метаболизма, косвенно указывающих на БМКС. Самый доступный, но не специфичный — ДНФГ-тест, выявляющий избыток кетонных групп любой природы. Тандемная масс-спектрометрия капли крови — высокотехнологичный метод, который в настоящее время становится все более доступным. Однако идентификация и

количественная оценка пиков чаще всего не производится, поэтому информацию о глубине метаболических расстройств получить трудно.

2. На втором этапе проводится молекулярно-генетический анализ различными методами (анализ нуклеотидной последовательности, анализ мутаций, анализ выявления делеции или дупликации), позволяющими выявить мутации в генах, кодирующих субъединицы дегидрогеназного комплекса, и документировать наличие болезни.

3. На третьем этапе проводится углубленное исследование степени метаболических нарушений, так как клинический фенотип БМКС может быть различным: классический, промежуточный, перемежающийся и тиамин-чувствительный. Исследование можно проводить различными методами:

- Расширенный спектр аминокислот плазмы крови
- Органические кислоты мочи методом газовой хроматографии
- Определение активности дегидрогеназного комплекса кетокислот с разветвленной цепью – энзиматическими методами в лейкоцитах крови.

Аминокислотный профиль плазмы крови, выполненный методами ВЭЖХ-анализа выявляет следующие закономерности:

1. **Повышение концентрации в плазме лейцина – до 400 и более мкмоль/л (у здоровых лиц 75 – 175 мкмоль/л), а также изменение концентрации других заменимых и незаменимых аминокислот: аланин, глутамат, глутамин, триптофан, метионин, гистидин, фенилаланин, тирозин. Концентрация изолейцина и валина обычно повышается, но может быть нормальной или даже пониженной** Характерно, что **концентрации аланина и лейцина отчетливо реципрокны** (рис. 2). Диагностически значимо **отношение концентраций (лейцин + изолейцин) к (аланин + фенилаланин)**.

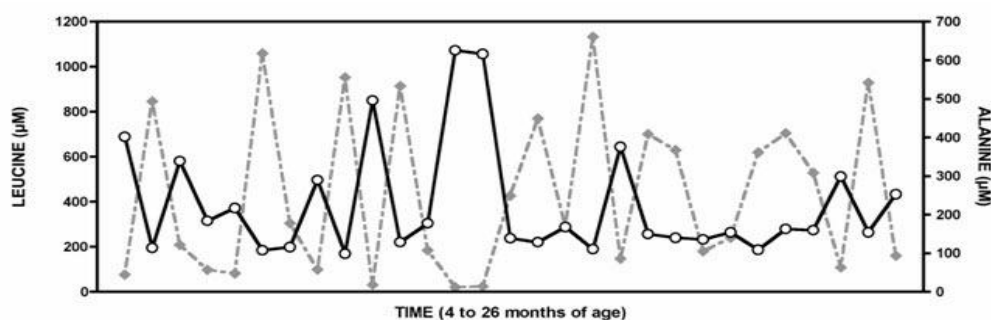


Рисунок 2. Реципрокное соотношение концентраций лейцина (темный график) и аланина (светлый пунктирный график) в плазме ребенка с классической формой БМКС, наблюдавшегося в течение двух лет.

2. Повышение концентрации в плазме крови алло-изолейцина. Это метаболит, присутствующий при всех формах БКМС. Алло-изолейцин – стереоизомер изолейцина, образующийся как побочный продукт трансаминирования изолейцина, одна из 4х аминокислот с асимметричным атомом углерода (другие: треонин, гидроксипролин, гидроксизин). L-алло-изолейцин может использоваться как более специфичный и чувствительный диагностический маркер всех форм БКМС. Уровень алло-изолейцина у взрослых (> 18 лет): $1,9 \pm 0,6$ мкмоль/л; у детей (1-13 лет) : $1,6 \pm 0,4$ мкмоль/л; у детей (1-13 лет) на фоне БКМС : 127 ± 1 мкмоль/л.

Научное издание

Международная VI-я научная конференция

по

Клинической биохимии

Санкт-Петербург, 21-24 апреля 2014 года

Бюллетень

Отдел биохимии НИЦ ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова
197022, г. Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6/8, корп. 3
тел.: 8(812) 499-71-08

E-mail: ovinokur@spmu.rssi.ru
