

© А. А. Шевелькова¹,
А. В. Вьюшина²

¹ СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова,

² Институт физиологии им. И. П. Павлова
РАН, Санкт-Петербург

Окислительная модификация белков и содержание тиолов в крови при физиологически протекающей беременности

УДК: 618.2-07

■ Проведено определение уровня окислительной модификации белков (ОМБ) сыворотки крови и состояния антиоксидантной системы (АОС) у 17 здоровых беременных и 33 здоровых небеременных женщин. Выявлено отсутствие достоверных различий в уровне ОМБ у женщин обеих групп, а также значительное снижение уровня восстановленных тиолов при беременности, что, по-видимому, объясняется более активным использованием их в качестве антиоксидантов.

■ **Ключевые слова:** окислительный стресс; антиоксидантная система; окислительная модификация белков; тиолы; физиологическая беременность.

В процессе адаптации к беременности в организме женщины происходят значительные изменения на системном, тканевом и клеточном уровнях, в обеспечении которых существенная роль принадлежит процессам свободнорадикального окисления [4, 15, 26]. Известно, что в норме существует баланс между интенсивностью свободнорадикального окисления и активацией механизмов антиоксидантной защиты, ее специфических и неспецифических компонентов. Нарушение этого баланса свидетельствует о развитии окислительного стресса и рассматривается как ведущее звено в патогенезе многих осложнений беременности, в частности, гестоза, плацентарной недостаточности, невынашивания беременности [4, 6, 16, 20].

Одним из ранних и наиболее надежных индикаторов окислительного стресса и поражений тканей при свободнорадикальной патологии является окислительная модификация белков (ОМБ), в результате которой изменяются структура, физико-химические и биологические свойства белковой молекулы [7], что, в свою очередь, является причиной инактивации большой группы ферментов [10, 25].

Диагностика окислительного стресса невозможна без учета состояния антиоксидантной системы организма, в работе которой принимает участие большое количество биологически активных веществ, и все они претерпевают разнонаправленные изменения во время беременности [1, 12]. Одним из основных показателей, характеризующих работу многих компонентов антиоксидантной системы, считается уровень в крови восстановленных тиолов, которые являются низкомолекулярными антиоксидантами, так называемыми «тушителями» активных форм кислорода, и проявляют как антирадикальное, так и антиперекисное действие [1, 2, 13]. От их концентрации зависит также активность «тиоловых» ферментов (глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы и др.), участвующих в антиоксидантной защите организма. Являясь водорастворимыми соединениями, они осуществляют свое протекторное действие в цитоплазме клетки и в плазме крови [7].

Данные литературы, касающиеся особенностей ОМБ [5, 8, 23] и содержания низкомолекулярных антиоксидантов [9, 12, 17] в крови во время беременности, немногочисленны и противоречивы. Вместе с тем, углубленное изучение проблемы ОМБ (наиболее раннего и надежного маркера развития окислительного стресса) сыворотки крови при физиологически протекающей беременности может помочь более целенаправленно подойти к ранней диагностике, комплексной терапии и профилактике таких тяжелых осложнений беременности, как гестоз и плацентарная недостаточность.

Цель настоящей работы — изучить состояние окислительной модификации белков и уровень восстановленных тиолов в сыворотке крови при физиологически протекающей беременности.

Материалы и методы исследований

Основную группу составили 17 здоровых женщин, имевших физиологическое течение беременности (средний возраст $26,9 \pm 1,2$ года). В контрольную группу вошли 33 здоровые небеременные женщины (средний возраст $26,7 \pm 1,0$ года). Критериями исключения для обеих групп являлись курение, перенесенное менее 2 недель назад острое респираторное заболевание или обострение хронического заболевания, наличие сахарного диабета, бронхиальной астмы, хронической обструктивной болезни легких. Забор крови проводили из кубитальной вены в утренние часы у беременных основной группы при сроке гестации $37,9 \pm 0,4$ нед., а у женщин контрольной группы — на 7–10-й день менструального цикла.

Для количественного определения продуктов окислительной модификации белков (ОМБ) применяли метод, основанный на реакции взаимодействия карбонильных производных окисленных аминокислотных остатков белков с 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДНФГ) с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов, которые регистрировали спектрофотометрически [7, 21]. Перед исследованием сыворотку крови разводили физиологическим раствором 1:10. Содержание белка в сыворотке измеряли по методу Лоури. Для исследования уровня спонтанной ОМБ к 0,05 мл разведенной сыворотки приливали 0,95 мл 0,01 М Na-K-фосфатного буфера. Для определения стимулированной ОМБ количество буфера уменьшали до 0,75 мл. В качестве стимулирующей системы Фентона в пробу добавляли 0,1 мл смеси 10 мМ Fe^{2+} и 10 мМ ЭДТА (1:1) и 0,1 мл 0,1 М H_2O_2 . Ставили 2 параллельные пробы, одна из которых служила контролем. Конечный объем проб составлял 1 мл. Контрольные и опытные пробы инкубировали в течение 15 минут при 370°C . После инкубации в пробы добавляли 1 мл холодной 20% ТХУ для осаждения белка, затем в опытные пробы добавляли 1 мл 0,1 М 2,4-динитрофенилгидразина для окрашивания продуктов ОМБ, а в контрольные добавляли 1 мл 2 М HCL. Окрашивание проводили при комнатной температуре в течение 1 часа. Затем пробы центрифугировали при 200g в течение 10 минут в центрифуге К-26. Осадок дважды промывали 2–3 мл смеси этанол-этилацетат (1:1), высушивали и растворяли в 3 мл 8 М мочевины с добавлением 1 капли 2 М HCL.

Продукты реакции — карбонильные производные белков, образовавшиеся на стадии инициации процесса, регистрировали при длине волны 270 нм, а на стадии элонгации — при 363 нм. Количество продуктов ОМБ выражали в единицах оптической плотности, рассчитанной на 1 мг

белка (Е/мг белка). Для оценки стимулированной ОМБ использовали величину приращения ОМБ, вычитая из значений, полученных в пробе после индукции реактивом Фентона, значения спонтанной ОМБ. Измерения проводили на спектрофотометре СФ 26.

Спонтанная ОМБ является показателем, характеризующим базальный уровень окисленных белков. Индуцированная ОМБ указывает на наличие субстрата для свободнорадикальных процессов, то есть является показателем устойчивости системы к переоислению.

Количество восстановленных тиолов определяли по методу Соколовского В.В. и соавт. [14]. Результаты выражали в мкМ в расчете на 1 мл.

Статистическую обработку материала проводили с помощью стандартного приложения прикладных программ «Statistica» для персонального компьютера. Для проверки нормальности распределения показателей каждого параметра использовали тест Шапиро-Уилка. Достоверность различий независимых выборок оценивали, используя ранговый критерий Манна-Уитни. Для выявления взаимосвязей между показателями, оценки их силы и направления применяли непараметрический корреляционный анализ Спирмена. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты исследований и их обсуждение

Результаты исследований показали, что содержание продуктов ОМБ в сыворотке крови женщин с физиологическим течением беременности существенно не отличается от такового у небеременных женщин (табл. 1). Однако можно отметить тенденцию к повышению в 1,5 раза спонтанной ОМБ на стадии инициации процесса в основной группе по сравнению с контрольной. При этом уровень восстановленных тиолов при беременности оказался значительно ниже, чем у небеременных женщин (табл. 1).

Полученные нами результаты согласуются с данными некоторых авторов, отметивших отсутствие у здоровых беременных женщин выраженного повышения уровня белков, подвергшихся окислительной модификации [5, 11, 23]. Это свидетельствует о том, что при физиологически протекающей беременности на фоне повышенного образования активных форм кислорода в условиях активации свободнорадикального окисления адекватное функционирование антиоксидантной системы позволяет предотвратить избыточное окисление белков, липидов, углеводов, нуклеиновых кислот. Этому, вероятно, способствует эндогенное повышение в третьем триместре беременности активности антиокис-

Таблица 1

Показатели окислительной модификации белков и уровень восстановленных тиолов в сыворотке крови при физиологически протекающей беременности и у небеременных женщин (M±m)

Группы	Окислительная модификация белков, Е/мг белка				Восстановленные тиолы, мкМ/л
	Стадия инициации		Стадия элонгации		
	Спонтанная	Индукцированная	Спонтанная	Индукцированная	
Здоровые беременные	0,038±0,011	0,144±0,016	0,022±0,005	0,159±0,015	0,334±0,013
Здоровые небеременные	0,024±0,004	0,128±0,012	0,016±0,003	0,153±0,008	0,435±0,014
p	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<0,001
p — достоверность различий показателей у здоровых беременных и небеременных женщин					

лительных ферментов, в том числе и плацентарного происхождения [3]

Однако при этом мы обнаружили значительное снижение уровня восстановленных тиолов в крови здоровых беременных женщин. В литературе имеются сведения об уменьшении активности «тиоловых» ферментов при физиологической беременности [12, 19]. Снижение уровня восстановленных тиолов у здоровых беременных женщин, по-видимому, связано с более активным их использованием в качестве антиоксидантов и может указывать на важную роль восстановленного глутатиона, глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы в механизмах антиоксидантной защиты на ранних стадиях развития окислительного стресса. Так, например, показано, что при нормально протекающей беременности внутриклеточный глутатион подвергается большей оксидации, чем у небеременных женщин [22]. Ослабление глутатион-зависимого звена антиоксидантной защиты, возможно, компенсируется увеличением общей буферной емкости антиоксидантной системы. В литературе есть данные о том, что во время физиологически протекающей беременности увеличивается активность супероксиддисмутазы и каталазы [23, 24], а также имеется тенденция к повышению уровня витамина Е [18].

Таким образом, данный уровень восстановленных тиолов в условиях физиологически протекающей беременности может считаться достаточным для предотвращения избыточного окисления белков.

Кроме того, поддержанию оптимального для беременности уровня ОМБ способствуют адаптивные изменения в составе и структуре белковых молекул [5]. Бурмистров и соавт. установили, что при беременности происходит изменение как аминокислотного состава молекул белков (например, увеличения содержания триптофана), так и третичной структуры белковой молекулы, в результате чего остатки определенных аминокислот становятся менее доступными для окисления активными формами кислорода.

Таким образом, полученные данные о содержании продуктов ОМБ и уровне восстанов-

ленных тиолов в крови здоровых беременных женщин можно рассматривать как биохимический критерий метаболических процессов, которые протекают на начальных этапах окислительного стресса, еще до активации перекисного окисления липидов. Определение данных показателей позволит своевременно выявлять эти нарушения и при необходимости применять патогенетическую терапию таких осложнений беременности, как гестоз и плацентарная недостаточность.

Литература.

1. Абрамченко В. В., Костюшов Е. В., Щербина Л. А. Антиоксиданты и антигипоксанты в акушерстве. — СПб.: Logos, 1995. — 117 с.
2. Антиоксиданты и адаптация / ред. В. В. Соколовский. — Л., 1984. — 64 с.
3. Биохимические механизмы формирования плаценты при физиологической и осложненной беременности / А. В. Арутюнян [и др.]. — СПб., 2010. — 189 с.
4. Бурлев В. А. Свободнорадикальное окисление в системе мать-плацента-плод при акушерской патологии: автореф. дис... д-ра мед. наук. — М., 1992. — 50 с.
5. Бурмистров О. С., Опарина Т. И., Арутюнян А. В. Изменение чувствительности белков сыворотки крови к окислению при беременности // Журнал акушерства и женских болезней. — 2004. — № 3. — С. 11–13.
6. Ванько Л. В., Сафронова В. Г., Мамвеева Н. К. Значение оксидативного стресса в развитии осложнений беременности и послеродового периода // Акушерство и гинекология. — 2010. — № 2. — С. 7–11.
7. Дубинина Е. Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение). Физиологические и клинико-биохимические аспекты. — СПб.: Медицинская пресса, 2006. — 400 с.
8. Костючек Д. Ф., Соколова Л. В. Окислительная модификация белка и эндогенная интоксикация как показатели тяжести гестоза // Журнал акушерства и женских болезней. — 1998. — № 2. — С. 31–35.
9. Костюшов Е. В. О роли тиол-дисульфидной и аскорбатной окислительно-восстановительных систем в патогенезе развития поздних токсикозов беременных // Тио-

- ловые соединения в биохимических механизмах патологических процессов: сборник научных трудов. — Л., 1979. — С. 77–84.
10. Окислительная модификация белков: проблемы и перспективы исследования / Муравлева Л.Е. [и др.] // Фундаментальные исследования. — 2010. — № 1. — С. 74–78.
 11. Особенности процесса деградации белков при беременности, осложненной гестозом и диабетом / Бурмистров С.О. [и др.] // Журнал акушерства и женских болезней. — 1998. — № 4. — С. 50–53.
 12. Показатели процесса деградации белков и антиокислительной системы при нормальной беременности / Бурмистров С.О. [и др.] // Акушерство и гинекология. — 2001. — № 6. — С. 17–20.
 13. Соколовский В.В. Тиоловые соединения в биохимических механизмах жизнедеятельности // Тиоловые соединения в биохимических механизмах патологических процессов: сборник научных трудов. — Л., 1979. — С. 5–9.
 14. Спектрометрическое определение тиолов в сыворотке крови / Соколовский В.В. [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. — 1997. — № 11. — С. 20–21.
 15. Agarwal A., Gupta S., Sharma R. Role of oxidative stress in female reproduction // *Reprod. Biol. Endocrinol.* — 2005. — Vol. 3. — P. 28–49.
 16. Al-Gubory K.H., Fowler P. A., Garrel C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* — 2010. — Vol. 42, N 10. — P. 1634–1650.
 17. Amino thiols, detoxification and oxidative stress in pre-eclampsia and other disorders of pregnancy / Rajmakers M.T.M. [et al.] // *Curr. Pharm. Des.* — 2005. — Vol. 11, N 6. — P. 711–734.
 18. Antioxidant vitamins and lipoperoxidation in non-pregnant, pregnant, and gestational diabetic women: erythrocytes osmotic fragility profiles / Suhail M. [et al.] // *J. Clin. Med. Res.* — 2010. — Vol. 2, N 6. — P. 266–273.
 19. Behne D., Wolters W. Selenium content and glutathione peroxidase activity in the plasma and erythrocytes of non-pregnant and pregnant women // *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* — 1979. — Vol. 17. — P. 133–135.
 20. Burton G., Jauniaux E. Placental oxidative stress: from miscarriage to preeclampsia // *J. Soc. Gynecol. Investig.* — 2004. — Vol. 11. — P. 342–352.
 21. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins / Levine R.L. [et al.] // *Methods of enzymology.* — 1990. — Vol. 186. — P. 464–478.
 22. Erythrocyte glutathione balance and membrane stability during preeclampsia / Spickett C.M. [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* — 1998. — Vol. 24, N 6. — P. 1049–1055.
 23. Leal C.A., Schetinger M.R., Leal D.B. Oxidative stress and antioxidant defenses in pregnant women // *Redox Rep.* — 2011. — Vol. 16, N 6. — P. 230–236.
 24. Lipid peroxidation products and antioxidant enzymes in red blood cells during normal and diabetic pregnancy / Carone D. [et al.] // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* — 1993. — Vol. 51, N 2. — P. 103–109.
 25. Stubbe J., van Der Donk W.A. Protein radicals in enzyme catalysis // *Chem. Rev.* — 1998. — Vol. 98, N 2. — P. 705–762.
 26. The role and modulation of the oxidative balance in pregnancy / Biondi C. [et al.] // *Curr. Pharm. Des.* — 2005. — N 11. — P. 2075–2089.

Статья представлена Э. К. Айламазяном,
ФГБУ «НИИАГ им. Д. О. Отта» СЗО РАМН,
Санкт-Петербург

OXIDATIVE MODIFICATION OF PROTEINS AND CONTENT OF REDUCED THIOLS IN BLOOD IN PHYSIOLOGICAL PREGNANCY

Shevelkova A. A., Vyushina A. V.

■ **Summary:** We studied the level of oxidative modification of proteins and the state of the antioxidant system in 17 healthy pregnant and 33 healthy nonpregnant women. Absence of any reliable differences in the levels of oxidative modification of proteins in both groups and considerable decrease of the reduced thiols' level in pregnant women were found. This is apparently explained as the reduced thiols are used more actively in physiological pregnancy.

■ **Key words:** oxidative stress; antioxidant system; oxidative modification of proteins; thiols; physiological pregnancy.

■ Адреса авторов для переписки

Шевелькова Анна Александровна — аспирант, Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени акад. И. П. Павлова, кафедра акушерства и гинекологии. 197022, г. Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, 6/8.
E-mail: gavriloaa@mail.ru.

Вьюшина Анна Вадимовна — к. б. н., научный сотрудник, Институт физиологии имени И. П. Павлова РАН. 199034, г. Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6.
E-mail: sts@infran.ru.

Shevelkova Anna Aleksandrovna — post-graduate student, St.-Petersburg Acad. I. P. Pavlov State Medical University, Department of Obstetrics and Gynecology. 197022, St.-Petersburg, L. Tolstoy st., 6/8. **E-mail:** gavriloaa@mail.ru.

Vyushina Anna Vadimovna — PhD, research assistant, Pavlov Institute of Physiology RAS. 199034, St.-Petersburg, Makarov emb., 6. **E-mail:** sts@infran.ru.