

РОЛЬ ГЛУТАТИОНПЕРОКСИДАЗ В ТКАНИ ЭНДОМЕТРИЯ: ФАКТЫ, ГИПОТЕЗЫ, ПЕРСПЕКТИВЫ ИЗУЧЕНИЯ

© А.В. Разыграев^{1,2}, М.О. Матросова³, И.А. Титович²

¹ФГБНУ «НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта», Санкт-Петербург;

²ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия», Санкт-Петербург;

³Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург

Для цитирования: Журнал акушерства и женских болезней. – 2017. – Т. 66. – № 2. – С. 104–111. doi: 10.17816/JOWD662104-111

Поступила в редакцию: 02.03.2017

Принята к печати: 07.04.2017

■ Ферменты группы глутатионпероксидаз (GPX) наряду с пероксиредоксинами составляют семейство тиолпероксидаз — ферментов, катализирующих тиолзависимое восстановление H_2O_2 и органических гидропероксидов. Это обуславливает их защитную роль при окислительном стрессе. Среди GPX у человека различают 8 форм, 5 из которых (GPX1,2,3,4 и 6) — селензависимые. Наибольшее число фактов, подтверждающих большое значение GPX в функционировании эндометрия матки, относятся к ферменту GPX3 (секретируемая GPX). Промотор гена *GPX3* содержит больше вероятных прогестерон-чувствительных элементов нежели эстроген-чувствительных; экспрессия гена *GPX3* в эндометрии усиливается после овуляции и во время беременности; в строме эндометрия прогестерон усиливает транскрипцию *Gpx3* через транскрипционный фактор HIF1 α . На лабораторных животных показана сопряженность активации гена *Gpx3* и экспрессии белка GPX3 в строме и имплантации бластоцисты в стенку матки. Подтверждено, что GPX3 снижает концентрацию H_2O_2 в эндометрии при беременности и при децидуализации *in vitro*. Предполагается уязвимость репродуктивной функции при физиологическом стрессе при недостаточной экспрессии GPX3 в эндометрии. Количественно и селективно ферментативная активность GPX3 в эндометрии изучена очень слабо. Сформирована гипотеза о возможной эффективности селенсодержащих препаратов для повышения рецептивности эндометрия и поддержания нормального развития эмбриона (особенно в условиях физиологического стресса) через усиление посттранскрипционного этапа синтеза GPX3 в эндометрии. Вероятно, экспрессия GPX3 в эндометрии может быть увеличена также за счет применения гестагенных стероидных препаратов (через усиление транскрипции гена *GPX3*). GPX3 имеет широкую тиоловую специфичность по сравнению с цитозольным ферментом GPX1 и, вероятно, по сравнению с большинством других форм GPX. Исследование ферментативной активности GPX3 предлагается проводить с использованием гомоцистеина и цистеина в качестве тиоловых субстратов вместо глутатиона.

■ **Ключевые слова:** экспрессия гена *GPX3*; эндометрий; периодичность; селен; прогестерон.

SIGNIFICANCE OF GLUTATHIONE PEROXIDASES IN ENDOMETRIUM FUNCTION: FACTS, HYPOTHESES, AND RESEARCH PERSPECTIVES

© A.V. Razygraev^{1,2}, M.O. Matrosova³, I.A. Titovich²

¹FSBSI “The Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology named after D.O. Ott”, Saint Petersburg, Russia;

²Saint Petersburg State Chemical-Pharmaceutical Academy, Saint Petersburg, Russia;

³Peter the Great Saint Petersburg Polytechnic University, Saint Petersburg, Russia

For citation: Journal of Obstetrics and Women's Diseases. 2017;66(2):104-111. doi: 10.17816/JOWD662104-111

Received: 02.03.2017

Accepted: 07.04.2017

■ Enzymes of glutathione peroxidase (GPX) family, together with peroxiredoxins, form thiol peroxidase superfamily, the property of which is the thiol-dependent catalysis of the hydroperoxide reduction. This property determines them as antioxidant protectors. Among human GPXs the eight forms are known, five of which are selenium-dependent (GPX1,2,3,4, and 6). The most number of facts supporting the substantial role of GPX in functioning of endometrium are linked with the GPX3, which is the secretory GPX. The number of candidate progesterone response elements in the promoter of *GPX3* gene prevails over the number of candidate estrogen response elements; *GPX3* is upregulated gene during postovulatory phase of reproductive cycle and during pregnancy; in the endometrial stroma, the transcription of *Gpx3* is stimulated through the transcription factor HIF1 α . Using laboratory animals, the spatial and temporal

coincidence of *Gpx3* activation and blastocyst implantation was observed. It was confirmed that GPX3 decreases hydrogen peroxide concentration in endometrium in pregnant animals and during *in vitro* decidualization. The vulnerability of reproductive function to physiological stress at the insufficient expression of GPX3 is hypothesized. The GPX3 enzymatic activity in endometrium is poorly investigated. It has been hypothesized that selenium-containing medications are effective in the endometrium receptivity improvement and in the supporting the normal embryo development (especially during the influence of physiological stressors) by the maintenance of the posttranscriptional, selenium-dependent stage of GPX3 biosynthesis in endometrium. Probably, the GPX3 expression can be increased by the steroids with gestagenic activity (through the increase of *Gpx3* transcription, analogously to effect of progesterone). In contrast with the «classic» GPX (GPX1) and probably with most of other members of GPX family, GPX3 has a wide thiol specificity. It is proposed to assess the activity of GPX3 using the reduced homocysteine and cysteine as thiol substrates instead of the reduced glutathione.

■ **Keywords:** glutathione peroxidase; gene expression; endometrium; periodicity; selenium; progesterone.

Ферменты группы глутатионпероксидаз (GPX) распространены по всему животному царству [1, 2]. Эти ферменты входят в суперсемейство тиолпероксидаз, катализирующих тиолзависимое восстановление неорганических (H_2O_2) и органических гидропероксидов.

Восстановленный глутатион (GSH) — тиол, который *in vivo* является донором электронов, вовлеченным в каталитический цикл GPX [1, 3]. Катализ восстановления гидропероксидов посредством GPX протекает в три этапа, два последних из которых являются тиолзависимыми (GSH-зависимыми); общая схема реакции выглядит следующим образом:



где GS-SG, ROOH и ROH означают соответственно окисленный глутатион, гидропероксид и гидроксипроизводное (в том случае, если восстанавливаемый гидропероксид H_2O_2 в качестве гидроксипроизводного выступает вторая молекула воды [1]). Аэробный метаболизм ведет к продукции пероксида водорода и органических гидропероксидов в тканях; GPX наряду с другими тиолпероксидазами принимает участие в регуляции уровня гидропероксидов, которые при повышенной продукции оказывают токсическое действие [4]. Среди других функций GPX — ингибирование апоптоза и воспалительных процессов, модуляция каскадов сигналинга, участие в активации транскрипционных факторов [1].

У человека различают восемь форм GPX, пять из которых (GPX1,2,3,4 и 6) являются селензависимыми, а именно содержат остаток селеноцистеина в активном центре. Селензависимые GPX преобладают у позвоночных, тогда как гомологи GPX, у которых вместо селеноцистеинового остатка в активном центре находится остаток цистеина, найдены у растений, дрожжей, простейших и бактерий. Селеновые GPX

спорадически обнаруживаются у беспозвоночных, таких как членистоногие и трематоды; селеноцистеин-содержащая GPX также найдена у зеленых водорослей [1].

«Классическая», или цитоплазматическая, GPX (GPX1) состоит из четырех субъединиц, функционирует внутри клеток тканей и является необходимой в защите от генерализованного окислительного стресса. Мыши, мутантные по обоим аллелям гена *Gpx1*, гибнут при остром окислительном стрессе независимо от обеспечения организма селеном, тогда как мыши, имеющие аллели дикого типа, выживают в этих условиях при обеспечении селеном [5].

GPX желудочно-кишечного тракта (GPX2) — цитозольный гомотетрамер, сходный с GPX1. Экспрессируется главным образом в эпителии пищеварительного тракта, включая эпителий пищевода. У человека экспрессируется также и в печени. Наибольшие концентрации GPX2 найдены у основания крипт кишечника. В развивающемся эмбрионе экспрессия мРНК *Gpx2* преобладает в быстрорастущих тканях. Очень вероятно, что функции GPX2 тесно связаны с пролиферацией тканей [5, 6].

GPX плазмы, или экстраклеточная GPX (GPX3), как и многие белки плазмы крови, является гликопротеином. Так же как GPX1 и GPX2, это гомотетрамерный фермент. Кроме плазмы крови GPX3 обнаруживается в других жидкостях тела, в том числе в амниотической жидкости. Основным источником секреции GPX3 — почки. GPX3, секретированная почками, обладает способностью связываться с базальными мембранами эпителиальных тканей в других органах. Для плазмы крови характерны низкие концентрации GSH, и поэтому предполагается, что GPX3 не может эффективно с ним взаимодействовать. Функции GPX3 во многом

остаются загадкой. Гиперметилирование промотора гена *Gpx3* встречается в подавляющем большинстве образцов при некоторых видах онкологических заболеваний, включая рак эндометрия и простаты [5, 7].

GPX гидроперекисей фосфолипидов (GPX4) — мономерный белок, существует в трех изоформах (цитозольная, митохондриальная и GPX4 ядер клеток спермы), синтезирующихся с одного и того же гена за счет наличия альтернативных транскрипционных стартов. Цитозольная изоформа экспрессируется во всех тканях, тогда как остальные две — преимущественно в семенниках. Системный нокаут всего гена *Gpx4* летален (без цитозольной GPX4 невозможен нормальный эмбриогенез), но при нокауте, приводящем к отсутствию митохондриальной формы, мыши полностью жизнеспособны (правда, самцы при этом полностью инфертильны). Цитозольная GPX4 важна не только в эмбриогенезе, она выполняет нейропротекторную функцию у взрослых, возможно, благодаря своему высокому сродству к гидроперекисям липидов [5].

GPX5 — гомотетрамерная неселеновая GPX, специфичная для придатков семенников (образуется в эпителии головки придатка семенника), ее ближайший гомолог — GPX3, вместе с которой они составляют более 95 % мРНК и белков GPX в эпидидимисе. GPX5 секретируется в лумен эпидидимиса, связывается с головками сперматозоидов и предотвращает их повреждение гидропероксидами. Возможно, GPX5 предотвращает преждевременную реакцию акросом сперматозоидов во время их хранения в хвосте придатка яичка [5, 8].

GPX6 — гомотетрамер, также гомолог GPX3, селенопротеин у человека и неселеновая GPX у грызунов и других животных. Экспрессия *Gpx6* выявлена в эмбрионах мышей и в боуменовых железах под обонятельным эпителием. О функциях GPX6 не известно ничего определенного [5].

GPX7 — мономерная неселеновая GPX гидроперекисей фосфолипидов, гомологичная селеновой GPX4. Это белок цитозоля и лумена эндоплазматического ретикулума, не тканеспецифичен. GPX8 — GPX, по своим структурным характеристикам также относимая к белкам эндоплазматического ретикулума. Предполагается, что GPX7 и GPX8 участвуют в фолдинге белков, включающем в себя формирование дисульфидных связей [5].

Строгая зависимость функционирования селензависимых GPX от GSH характерна

не для всех ферментов этого семейства. Хотя GPX принято называть глутатионзависимыми ферментами, GPX3 (секретируемая GPX) хорошо функционирует как тиолпероксидаза с широкой тиоловой специфичностью и может использовать цистеин, тиоредоксин и глутаредоксин вместо GSH [3, 9], становясь полностью независимой от GSH в своем каталитическом цикле при наличии других тиолов в среде. Статистически обосновано (на фракциях белков плазмы крови), что GPX3 способна использовать гомоцистеин (HcySH) вместо GSH; опять же присутствие GSH в среде совершенно не требуется [10]. Для GPX4 также характерна способность использовать другие тиоловые восстановители вместо GSH — белки хроматина, цистеинбогатые белки, связанные с митохондриями клеток спермы, и даже саму GPX4 в качестве тиолового восстановителя. При этом, правда, GPX4 не способна использовать для своей функции тиоредоксин. Внутриклеточная GPX1, напротив, довольно строго специфична к GSH, но в условиях недостатка GSH GPX1 успешно использует его предшественник (гамма-глутамилцистеин) [5]. В старых работах, когда еще не было известно вышеперечисленное разнообразие GPX, для GPX митохондрий печени было установлено, что на одном из двух тиолзависимых этапов каталитической реакции GPX строго специфична к GSH; на другом тиолзависимом этапе GSH может быть заменен на другой тиол [11, 12].

Как GPX могут функционировать и некоторые другие белки, не относимые к данному семейству: это пероксиредоксины, входящие вместе с GPX в суперсемейство тиолпероксидаз, а также глутатионтрансферазы, селенопротеин Р и даже сывороточный альбумин. Последние три из упомянутых белков и групп ферментов, правда, имеют иную, более узкую субстратную специфичность по отношению к гидропероксидам в тиолпероксидазной реакции [3, 13–15].

Исследования экспрессии глутатионпероксидаз в ткани эндометрия женщин

Эндометрий человека — сложная ткань, подвергающаяся циклическим изменениям, что требует взаимодействия друг с другом сотен биохимических факторов. В идеале нормальный эндометрий человека имеет 28-дневный цикл изменений, контролируемых половыми стероидными гормонами — эстрогеном и прогестероном. Стероидные гормоны осущест-

влияют свое действие посредством связывания со своими рецепторами (эстрогеновые рецепторы- α и - β (ER- α и ER- β) и рецептор прогестерона (PR)). Рецепторы лиганд-зависимым путем регулируют транскрипцию генов в клетках эндометрия. Для запуска транскрипции рецепторы образуют гомодимеры и связываются с соответствующим гормоном; образовавшийся комплекс связывается со стероид-реактивным участком ДНК (стероид-реактивным элементом), регулирующим ген-мишень, что активирует транскрипционные факторы и инициирует транскрипцию гена. Вышеописанные события происходят в стромальных клетках эндометрия, которые в ответ на стероидный стимул продуцируют паракринные факторы, приводящие к митозам клеток эпителия матки [16].

Существует ряд работ по изучению транскрипционного профиля эндометрия человека в ходе менструального цикла и при нарушениях рецептивности эндометрия; при этом среди генов ферментов группы GPX исследователи наблюдают существенные изменения в активности гена *GPX3* [16–20]. *GPX3*-транскрипт имеет очень низкий уровень в эндометриальной ткани в пролиферативной фазе менструального цикла, тогда как в секреторной фазе, когда доминирует уровень прогестерона, уровень *GPX3*-транскрипта повышается в десятки раз [16]. При этом в промоторной части гена *GPX3* идентифицируется три вероятных прогестерон-реактивных элемента и два вероятных эстроген-реактивных элемента. (Аналогичным образом у других генов, транскрибируемых преимущественно в секреторной фазе, количество вероятных прогестерон-реактивных элементов преобладает над количеством вероятных эстроген-реактивных элементов.) Данные факты свидетельствуют в пользу того, что ген *GPX3* позитивно регулируется прогестероном [16]. Поскольку уровень экспрессии гена *GPX3* растет и после времени имплантации (т. е. далее после 7-го дня, считая от времени пика секреции лютеинизирующего гормона), есть мнение, что экспрессия *GPX3* в эндометрии важна больше в процессах, связанных с менструацией нежели с имплантацией эмбриона [19].

Свободнорадикальные повреждения вовлечены в патофизиологию многих органов и тканей, включая эндометрий. Биосинтез секретируемой GPX, GPX3, устраняющей продукты перекисного окисления биомолекул во внеклеточной среде, зависит от наличия селена.

При этом имеются данные о том, что дефицит селена ассоциирован со спонтанными абортми и бесплодием [21]. На основании этих данных и совокупности перечисленных данных о GPX3 остается обоснованным предположение, что GPX3 эндометрия функционирует в перимплантационный период для защиты развивающегося эмбриона от окислительных повреждений, в том числе для обеспечения его безопасной (в этом же смысле) имплантации в стенку матки [16].

Другим ферментом семейства GPX, для которого показаны циклические изменения экспрессии в эндометрии в ходе менструального цикла, является GPX1 [16, 22]. Экспрессия GPX1 была идентифицирована в поверхностных и железистых эпителиальных клетках иммуногистохимически с использованием поликлональных антител к белку-ферменту. Уровень экспрессии GPX1 в железистых клетках эпителия был низким в ранней пролиферативной фазе, затем постепенно увеличивался, достигал максимума в ранней секреторной фазе и снижался к концу секреторной фазы. В поверхностном эпителии динамика экспрессии была аналогичной. Получается, что, в отличие от экспрессии GPX3, уровень мРНК которой высок в период имплантации, уровень экспрессии GPX1 в данный период уже снижается. Вероятно, цикличность продукции GPX1 в эпителии эндометрия и цикличность экспрессии GPX3 эндометрием имеют существенные различия в функциональном отношении.

Исследования экспрессии глутатионпероксидаз в ткани эндометрия лабораторных животных

В 2014 г. в *FEBS Letters* была опубликована работа [23], выполненная главным образом на мышах, указывающая на тесную связь экспрессии GPX3 в стромальных клетках эндометрия с децидуализацией эндометрия и имплантацией бластоцисты в стенку матки. Результаты этой работы объясняют механизмы, по которым происходит регуляция экспрессии GPX3 в эндометрии.

Заранее оговоримся, что у грызунов имплантация эмбриона в стенку матки у разных особей может происходить очень несинхронно, начиная с начала 4-го дня беременности. Даже в конце 5-го дня нормальной беременности имплантация может все еще не произойти [24]. Но, вероятно, мыши, используемые в работе [23], были очень сходны между собой по времени имплантации

при нормальной беременности. С использованием меченой дигоксигенином кРНК (комплементарной к мРНК *Gpx3* (метод гибридизации *in situ*)) было установлено, что мРНК *Gpx3* не экспрессируется в регистрируемых количествах с 1-го по 4-й день нормальной беременности. Начиная с 5-го дня мРНК *Gpx3* проявляется в строме эндометрия ближе к просвету матки, причем непосредственно вокруг имплантирующейся бластоцисты. В последующие дни беременности экспрессия мРНК *Gpx3* усиливается и распространяется по строме в процессе децидуализации. В ходе количественной оценки методом ПЦР (ПЦР в реальном времени) установлено, что к 8-му дню беременности экспрессия мРНК *Gpx3* в эндометрии возрастает в сотни раз по сравнению с 4-м днем (при использовании этого метода в эндометрии на 4-й день беременности регистрируется некоторый (не нулевой) уровень мРНК *Gpx3*, принятый за единицу). Экспрессия мРНК *Gpx4* тоже повышается к 8-му дню по сравнению с уровнями в 4-й и 5-й дни, но не столь значительно, а экспрессия мРНК *Gpx2*, наоборот, к 8-му дню сильно снижается. Выявленное авторами увеличение экспрессии мРНК *Gpx1* на 8-й день беременности, возможно, не является статистически значимым, поскольку из работы не ясно, каким методом пользовались авторы для статистических сравнений, а прирост экспрессии по сравнению с 4-м и 5-м днями сравнительно мал. Экспрессия мРНК *Gpx5*, *Gpx6* и *Gpx7* в эндометрии была очень слабой в исследуемый период (1–8-й дни беременности) [23].

При задержке имплантации с последующей ее активацией эстрогеном опять-таки выявлено увеличение экспрессии мРНК *Gpx3* методом гибридизации *in situ* до хорошо детектируемого уровня в строме, окружающей имплантирующийся эмбрион. При искусственной децидуализации посредством инъекции масла в рог матки также выявлен высокий уровень экспрессии мРНК *Gpx3* в клетках стромы. В роге матки, который не подвергался инъекции, экспрессия мРНК *Gpx3* регистрировалась в поверхностном эпителии эндометрия и в меньшей степени в железистом эпителии, но не в клетках стромы [23].

На овариэктомированных мышах и на эндометриальных стромальных клетках *in vitro* было установлено, что прогестерон усиливает экспрессию мРНК *Gpx3*; этот эффект опосредован рецептором прогестерона и транскрипционным фактором NFI α . При децидуализации *in vitro* (при обработке прогестероном вместе

с эстрогеном) экспрессия мРНК *Gpx3* усиливается в клетках стромы в несколько десятков раз в течение 96 часов от начала обработки. В опытах *in vitro* установлена необходимость добавления соединений селена (селенит натрия — в концентрациях порядка 0,1 мкМ) в культуральную среду с клетками эндометрия для экспрессии в них белка GPX3, что понятно, поскольку селен включается в состав молекулы фермента при трансляции (без него белковая молекула не синтезируется [25]). Получены данные, свидетельствующие в пользу того, что GPX3 снижает концентрацию пероксида водорода в строме [23].

В других исследованиях показано наличие GPX3 в жидкостях, окружающих развивающийся эмбрион. *Gpx3* экспрессируется в тканях на контакте развивающегося эмбриона и материнского организма — материнском децидууме, эндодерме желточного мешка и в эмбриональной коже [21].

Ранние этапы беременности уязвимы для стрессовых состояний, что может выражаться как в нарушении имплантации, так и в патологиях развития раннего эмбриона. Реактивные формы кислорода часто вовлечены в возникновение различных патологий, включая infertility. Как видно из рассмотренных данных, среди GPX, устраняющих продукты реакций свободнорадикальных соединений кислорода, в эндометриальной ткани во время беременности, по-видимому, основную роль в защите развивающегося плода (в этом смысле) со стороны материнского организма играет секретируемая эндометрием GPX3. Большинство генов других ферментов группы GPX не претерпевают столь серьезных изменений экспрессии в эндометрии во время беременности, как это имеет место в случае *Gpx3*; сопоставимого внимания, вероятно, заслуживает лишь факт сильного снижения экспрессии *Gpx2*, отмеченный в работе X. Xu et al [23].

Хотя *Gpx3* обильно экспрессируется в децидууме, мышы, генетически дефектные по обоим аллелям *Gpx3*, не проявляют отклонений в репродуктивной функции по сравнению с мышами дикого типа. При этом неизвестно, что происходит с другими GPX в эндометрии, компенсируют ли они отсутствие GPX3 у таких генетически дефектных мышей. В отношении одного маркера децидуализации, белка DTPRP, известно, что мышы, гомозиготные по его выключенному гену, *Dtprp*, жизнеспособны, фертильны и дают

приплод нормальной численности — явление, сходное с тем, что наблюдается при выключенном гене *Gpx3*. Однако у *Dtprp*-дефектных мышей протекание беременности уязвимо к гипоксии — количество погибших и подвергшихся резорбции зародышей значительно больше в условиях гипоксии, чем у мышей дикого типа в тех же условиях. Это свидетельствует об утрате материнской способности адаптироваться к влиянию стрессирующего фактора в ходе беременности. Возможно, в случае утраты нормальных аллелей *Gpx3* могут быть получены аналогичные результаты в условиях стресса. GPX3, возможно, является белком, присутствие которого в эндометрии необходимо для сохранения беременности в условиях гипоксии, в стрессовых условиях. На возможность этого также указывает известный факт зависимости экспрессии *Gpx3* от гипоксия-индуцибельного фактора HIF1 α [23, 26].

Перспективы определения активности и исследования роли глутатионпероксидаз в функционировании эндометрия

Обратим внимание на то, что в большинстве вышеперечисленных работ для изучения была доступна экспрессия генов разных GPX; также регистрировались уровни белков GPX. Об изменениях ферментативной активности судили косвенно [23]; при этом не проводились полноценные количественные измерения активности различных форм GPX как скорости каталитической реакции, отнесенной к количеству биоматериала (или конкретнее — белка-фермента). Между тем именно каталитическая активность является показателем функциональной активности фермента, а не само количество белка-фермента, измеренное, например, иммунохимически, и тем более не уровень экспрессии его гена.

В наших пилотных исследованиях выявлено, что как в гомогенатах цельной матки, так и в гомогенатах эндометрия лабораторных животных принципиально возможно определять ферментативную активность тиолпероксидаз, причем можно подобрать условия, в которых определяется очень высокая активность. В цельной матке мышей тиолпероксидазная активность (*Me* (*q1-q3*)) составляет 154 (122–214) нмоль HcySH/мин/мг белка (субстраты — HcySH (0,9–1,1 мМ) и трет-бутилгидропероксид (1,6 мМ), рН 8,5, *t* = 37 °С; другие параметры метода см. в работе [27]). Тиолпероксидазная активность (*Me* (*q1-q3*)) в эндометрии матки крыс составляет 112 (98–112) нмоль HcySH/мин/мг

белка (субстраты — HcySH (1,1 мМ) и пероксид водорода (0,192 мМ), рН 8,5, *t* = 37 °С; использовался метод из работы [10]). Отметим, что в случае сочетания HcySH и пероксида водорода нами получено статистическое подтверждение того, что такая тиолпероксидазная активность принадлежит ферменту GPX3 [10] (при этом использовалась плазма крови в качестве источника ферментативной активности). Цистеин, также являясь хорошим субстратом для GPX3, аналогичным образом может быть использован для определения активности этой формы GPX [9, 10, 28, 29].

Как показано в вышеизложенном обзоре, существуют данные, служащие основаниями для гипотезы о том, что GPX3 является ферментом, активность которого служит фактором, обеспечивающим успешную имплантацию бластоцисты в стенку матки и последующую защиту эмбриона от окислительного стресса. В связи с этим перспективным подходом для проверки этой гипотезы являются оценка размера приплода у животных, содержащихся на селенодефицитной диете в периимплантационный период и подвергающихся воздействию стрессовых факторов, и оценка гомоцистеинпероксидазной активности в эндометрии в тех же условиях и в тот же период. Как известно, помещение генетически нормальных мышей в условия гипобарической гипоксии (концентрация кислорода — 11 %) с 5,5-го по 11,5-й день беременности приводит к гибели части эмбрионов [26]. Перспективной представляется попытка предотвращения гибели имплантировавшихся эмбрионов в данных условиях за счет применения препаратов селена. Оценка гомоцистеинпероксидазной активности в ткани стенки матки, проводимая в параллельной группе в тех же условиях, позволит оценить связь между изменениями в количестве погибших эмбрионов и активностью GPX3.

Актуально также провести измерение динамики активности GPX3 в эндометрии при искусственной задержке и активации имплантации, а также в децидуоме, вызванной инъекцией масла в рог матки животного. Это также, вероятно, позволит дополнительно подтвердить увеличение активности фермента при децидуализации (напомним, что ранее аналогичные опыты проводились с изучением экспрессии гена *Gpx3*, а не с изучением активности фермента GPX3 [23]).

Как уже упоминалось выше, перспективным является получение нокаутных животных по гену *Gpx3* с последующей оценкой влияния гипоксии

в пери- или постимплантационный период на исход беременности. Контроль над гомоцистеинпероксидазной активностью (с высокой вероятностью, свойственной ферменту GPX3) в ткани стенки матки остается актуальным и в таких экспериментах, несмотря на генетический дефект по *Gpx3*. Таким образом может быть получен ответ на вопрос об активации компенсаторных биохимических механизмов в условиях физиологического стресса во время беременности при отсутствии данного фермента.

Такого рода исследования не только могут подтвердить необходимость минимизации физиологического стресса в периимплантационный и ранний постимплантационный периоды, вскрывая при этом механизмы его негативного влияния на исход беременности, но и могут послужить обоснованием увеличения потребления физиологически безопасных соединений селена в рационе в период ранней беременности (в особенности, если в силу обстоятельств не удастся полностью устранить стрессовые состояния в организме матери).

Поскольку получены свидетельства того, что экспрессия *Gpx3* в эндометрии лабораторных животных и человека активируется прогестероном [16, 23], перспективным представляется определение активности GPX3 при проверке гестагенной активности новых синтетических стероидов в экспериментах *in vivo* и в культуре клеток эндометрия (при обязательном добавлении соединений селена в культуральную среду). Уровень активации GPX3 может послужить показателем эффективности препаратов с предполагаемой гестагенной активностью.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Авторы признательны ведущему научному сотруднику группы фармакологии НИИ АГиР им. Д.О. Отта, канд. биол. наук М.А. Петросян и директору Центра фармакологических исследований СПХФА, канд. биол. наук Д.Ю. Ивкину за предоставленную возможность выполнения проверочных опытов по оценке гомоцистеинпероксидазной активности в эндометрии лабораторных животных.

Литература

- Flohé L, Brigelius-Flohé R. Selenoproteins of the glutathione peroxidase family. In: Yafield DL, et al. (Ed.) Selenium: Its Molecular Biology and Role in Human Health. New York: Springer; 2012. P. 167-180. doi: 10.1007/978-1-4614-1025-6_13.
- Mittapalli O, Neal JJ, Shukle RH. Antioxidant defense response in a galling insect. *PNAS*. 2007;104(6):1889-94. doi: 10.1073/pnas.0604722104.
- Torres WH. Biología de las especies de oxígeno reactivas. *Mensaje Bioquímico*. 2002;26:19-54.
- Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., и др. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. – М.: Слово, 2006. [Men'shnikova EB, Lankin VZ, Zenkov NK, et al. Okislitel'nyj stress. Prooksidanty i antioksidanty. Moscow: Slovo; 2006. (In Russ.)]
- Brigelius-Flohé R, Maiorino M. Glutathione peroxidases. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013;1830(5):3289-3303. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.11.020.
- Chu FF, Doroshov JH, Esworthy RS. Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *J Biol Chem*. 1993;268(4):2571-2576.
- Avissar N, Ornt DB, Yagil Y, et al. Human kidney proximal tubules are the main source of plasma glutathione peroxidase. *Am J Physiol*. 1994;266(2):367-375.
- Okamura N, Iwaki Y, Hiramoto S, et al. Molecular cloning and characterization of the epididymis-specific glutathione peroxidase-like protein secreted in the porcine epididymal fluid. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 1997;1336(1):99-109. doi: 10.1016/S0304-4165(97)00016-0.
- Takebe G, Yarimuzu J, Saito Y, et al. A comparative study on the hydroperoxide and thiol specificity of the glutathione peroxidase family and selenoprotein P. *J Biol Chem*. 2002;277(43):41254-8. doi: 10.1074/jbc.M202773200.
- Разыграев А.В., Таборская К.И., Петросян М.А., Тумасова Ж.Н. Тиолпероксидазные активности плазмы крови крыс, определяемые с использованием пероксида водорода и 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной кислоты) // Биомедицинская химия. – 2016. – Т. 62. – № 4. – С. 431–438. [Razygraev AV, Taborskaya KI, Petrosyan MA, Tumasova ZhN. Thiol peroxidase activities in rat blood plasma determined with hydrogen peroxide and 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid). *Biomed Khim*. 2016;62(4):431-8. (In Russ.)] doi: 10.18097/PBMC20166204431.
- Wendel A. Glutathione peroxidase. In: Jakoby WB. (Ed.) Enzymatic Basis of Detoxication. V. 1. N.Y.: Academic Press; 1980. P. 333-353.
- Zakowski JJ, Tappel AL. A semiautomated system for measurement of glutathione in the assay of glutathione peroxidase. *Anal Biochem*. 1978;89(2):430-436.
- Колесниченко Л.С., Кулинский В.И. Глутатионтрансферазы // Успехи современной биологии. – 1989. – Т. 107. – С. 179–194. [Kolesnichenko LS, Kulinskij VI. Glutathiontransferazy. *Uspekhi sovremennoj biologii*. 1989;107:179-194. (In Russ.)]
- Hurst R, Bao Y, Ridley S, Williamson G. Phospholipid hydroperoxide cysteine peroxidase activity of human serum albumin. *Biochem J*. 1999;338:723-728.

15. Saito Y, Hayashi T, Tanaka T, et al. Selenoprotein P in human plasma as an extracellular phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. Isolation and enzymatic characterization of human selenoprotein P. *J Biol Chem.* 1999;274:2866-2871. doi: 10.1074/jbc.274.5.2866.
16. Borthwick JM, Charnock Jones DS, Tom BD, et al. Determination of the transcript profile of human endometrium. *Mol Hum Reprod.* 2003;9(1):19-33.
17. Horcajadas JA, Riesewijk A, Polman J, et al. Effect of controlled ovarian hyperstimulation in IVF on endometrial gene expression profiles. *Mol Hum Reprod.* 2004;11(3):195-205.
18. Horcajadas JA, Mínguez P, Dopazo J, et al. Controlled ovarian stimulation induces a functional genomic delay of the endometrium with potential clinical implications. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(11):4500-4510. doi: 10.1210/jc.2008-0588.
19. Ponnampalam AP, Weston GC, Trajstman AC, et al. Molecular classification of human endometrial cycle stages by transcriptional profiling. *Mol Hum Reprod.* 2004;10(12):879-893. doi: 10.1093/molehr/gah121.
20. Riesewijk A, Martín J, van OsR, et al. Gene expression profiling of human endometrial receptivity on days LH+ 2 versus LH+ 7 by microarray technology. *Mol Hum Reprod.* 2003;9(5):253-264. doi: 10.1093/molehr/gag037.
21. Kingsley PD, Whitin JC, Cohen HJ, Pails J. Developmental expression of extracellular glutathione peroxidase suggests antioxidant roles in deciduum, visceral yolk sac and skin. *Mol Reprod Dev.* 1998;44:343-355.
22. Ota H, Igarashi S, Kato N, Tanaka T. Aberrant expression of glutathione peroxidase in eutopic and ectopic endometrium in endometriosis and adenomyosis. *Fertil Steril.* 2000;74:313-318. doi: 10.1016/S0015-0282(00)00638-5.
23. Xu X, Leng JY, Gao F, et al. Differential expression and antioxidant function of glutathione peroxidase 3 in mouse uterus during decidualization. *FEBS Letters.* 2014;588(9):1580-9. doi: 10.1016/j.febslet.2014.02.043.
24. Christofferson RH, Wassberg BE, Nilsson BO. Angiogenesis in the rat uterus during pregnancy. In: S.R. Glasser et al. (Ed.) *Endocrinology of Embryo-Endometrium Interactions.* Springer US; 1994. P. 77-92.
25. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Структура, свойства, биологическая роль и регуляция глутатионпероксидазы // Успехи современной биологии. – 1993. – Т. 113. – С. 107–122. [Kulinskij VI, Kolesnichenko LS. Struktura, svojstva, biologicheskaja rol' i regulatsija glutationperoksidazy. *Uspekhi sovremennoj biologii.* 1993;113:107-122. (In Russ.)]
26. Alam SK, Konno T, Dai G, et al. A uterine decidual cell cytokine ensures pregnancy-dependent adaptations to a physiological stressor. *Development.* 2007;134(2):407-415. doi: 10.1242/dev.02743.
27. Разыграев А.В. Определение тиолпероксидазной активности в сыворотке крови крыс с использованием трет-бутилгидропероксида и гомоцистеина // Буллеровские сообщения. – 2016. – Т. 47. – № 9. – С. 156–162. [Razygraev AV. Determination of thiol peroxidase activity in the rat blood serum using tert-butyl hydroperoxide and homocysteine. *Butlerov Communications.* 2016;47(9):156-162. (In Russ.)]
28. Разыграев А.В. Опыт использования цистеина для определения тиолпероксидазной активности в плазме и сыворотке крови // Фундаментальная наука и клиническая медицина. Человек и его здоровье: тезисы XVIII Всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей (с международным участием). – СПб., 2015. – С. 449–450. [Razygraev AV. Opyt ispol'zovaniya tsisteina dlja opredelenija tiolperoksidaznoj aktivnosti v plazme i syvorotke krovi. *Fundamental'naja nauka i klinicheskaja meditsina. Chelovek i ego zdorov'e: tezisy XVIII Vserossijskoj mediko-biologicheskoy konferentsii molodyh issledovatelej (conference proceedings).* Saint Petersburg; 2015. P. 449-50. (In Russ.)]
29. Razygraev AV. Cysteine peroxidase activity in rat blood plasma. *Egyptian Journal of Biology.* 2013;15:54-58. doi: 10.4314/ejb.v15i1.8.

■ Адреса авторов для переписки (Information about the authors)

Алексей Вячеславович Разыграев — канд. биол. наук, научный сотрудник. НИИ АГиР им. Д.О. Отта; научный сотрудник СПХФА, Санкт-Петербург. **E-mail:** alexeyrh@mail.ru.

Мария Олеговна Матросова — студент. СПбПУ Петра Великого, Санкт-Петербург. **E-mail:** rollic402018@gmail.com.

Ирина Александровна Титович — аспирант СПХФА. Санкт-Петербург. **E-mail:** irina.titovich@pharminnotech.com.

Alexey V. Razygraev — PhD, scientific researcher, D.O. Ott Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology. St Petersburg State Chemical-Pharmaceutical Academy, Saint Peterburg, Russia. **E-mail:** alexeyrh@mail.ru.

Mariya O. Matrosova — student, Peter the Great Saint Petersburg Polytechnic University, Saint Petersburg, Russia. **E-mail:** rollic402018@gmail.com.

Irina A. Titovich — graduate student, St Petersburg State Chemical-Pharmaceutical Academy, Saint Petersburg, Russia. **E-mail:** irina.titovich@pharminnotech.com.