

О.С. Бурмистров,  
Т.И. Опарина, А.В. Арутюнян

НИИ акушерства и гинекологии  
им. Д.О. Отта РАМН,  
Санкт-Петербург

## ИЗМЕНЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ К ОКИСЛЕНИЮ ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ

■ В работе приведены данные, касающиеся изменения содержания при беременности продуктов перекисного окисления белков (ПОБ), образуемых при участии активных форм кислорода (АФК). При беременности наблюдалось некоторое недостоверное снижение количества продуктов ПОБ при спонтанном процессе окислительной модификации белков. Однако степень стимуляции образования продуктов ПОБ при беременности существенно возрастала при использовании в качестве стимуляторов образования продуктов ПОБ ионов железа и перекиси водорода. Эти данные свидетельствуют о повышении чувствительности белков сыворотки крови беременных к окисляющему действию АФК.

■ **Ключевые слова:** перекисное окисление белков, беременность, активные формы кислорода

Нашими предыдущими исследованиями было продемонстрировано, что в сыворотке крови беременных женщин содержание белков, подвергнутых окислительной модификации, существенно не изменено, хотя и имеет тенденцию к повышению [2]. Тем не менее есть все основания предполагать, что в процессе беременности устойчивость белковых молекул к окисляющему воздействию активных форм кислорода (АФК) изменена вследствие появления большого числа белков, образующихся при беременности и синтезируемых фетоплацентарным комплексом [6, 8]. К тому же данные литературы свидетельствуют об активации при беременности оксидативного стресса [1, 9] вследствие более активного образования самих АФК. Нами была поставлена задача сравнить содержание окисленно-модифицированных белков в сыворотке крови беременных женщин и доноров при спонтанном перекисном окислении белков (ПОБ) и в процессе ПОБ, индуцируемом ионами  $Fe^{2+}$  и  $H_2O_2$ . Данные окисляющие агенты опосредуют свое действие через гидроксильный  $OH^\cdot$  радикал, который образуется в реакции Фентона при их взаимодействии между собой [4].

### Материалы и методы

Было исследовано 67 образцов сыворотки крови доноров и беременных женщин (срок гестации 35–40 недель). Активность процесса ПОБ оценивали по содержанию карбонильных производных аминокислот [3, 10]. Были подобраны концентрации  $FeSO_4$  и  $H_2O_2$ , при которых содержание карбонильных производных (СОпр.) увеличивалась в 1,5–2 раза (для ионов железа) и в 2–3 раза (для перекиси водорода). Эти концентрации составляли 0,1 мМ в пробе для  $FeSO_4$  и 1М для перекиси водорода. При совместной стимуляции  $FeSO_4$  и  $H_2O_2$  концентрация перекиси водорода составляла 0,1 М в пробе. Об окислительной модификации остатков тирозина и триптофана белков сыворотки крови судили по величине флюоресценции сыворотки крови, измеренной на флюориметре Hitachi MPF-2A по описанному методу [7]. Интенсивность свободнорадикальных процессов оценивали по величине хемилюминесценции сыворотки крови (ХЛ), индуцированной перекисью водорода с применением люминола как [11]. Измерение проводили на хемилюминиметре Emilite-1105. Спектры ПОБ снимали на сканирующем спектрофотометре DU-65 (Beckman) в диапазоне длин волн 240–450 нм.

### Результаты исследования

Проведенные исследования показали, что в исследованных образцах сыворотки крови беременных содержание интактных продуктов ПОБ составляло  $1,14 \pm 0,07$  мкмоль СОпр./мг белка (доноры) и  $0,97 \pm 0,07$  мкмоль СОпр./мг белка (беременные). (табл.1). При стимуляции ионами железа эти величины возрастали до  $1,94 \pm 0,06$  мкмоль СОпр./мг белка и  $1,88 \pm 0,12$  мкмоль

СОпр./мг белка соответственно и достоверно не отличались между собой. При стимуляции перекисью водорода уровень ПОБ составлял  $2,80 \pm 0,1$  мкмоль СОпр./мг белка и  $2,65 \pm 0,18$  мкмоль СОпр./мг белка соответственно, причем между донорами и беременными также не наблюдалось достоверных различий (табл.1). Тем не менее стимулирующее воздействие используемых нами активаторов ПОБ было гораздо более выражено у беременных. Отношение величины стимулированного ПОБ к спонтанному как при стимуляции ионами  $Fe^{2+}$ , так и перекисью водорода было существенно выше у беременных при наличии высокой достоверности различия (табл. 1). Такое же достоверное различие наблюдалось при сочетанном стимулировании процесса ПОБ обеими агентами (табл. 2). Отношение стимулированного ПОБ к спонтанному в этом случае составляло  $1,43 \pm 0,17$  у доноров и  $2,00 \pm 0,19$  у беременных ( $p < 0,01$ ). Таким образом, полученные данные свидетельствуют о большей лабильности белковых молекул сыворотки крови беременных и об их меньшей устойчивости к окисляющему действию АФК.

Была проведена серия экспериментов по изучению спектра поглощения продуктов ПОБ, учитывая имеющиеся данные о появлении при

беременности пика поглощения при 415 нм наряду с пиком поглощения при 274 нм которые вместе с основным пиком поглощения при 370 нм возрастают при беременности в 4–5 раз [5]. Нами не было выявлено наличия пика поглощения продуктами ПОБ при 415 нм ни у доноров, ни у беременных (рис. 1). Пик поглощения при 274 нм в спектре присутствовал, но был очень нестабилен по форме и величине, вследствие чего его точная количественная оценка была затруднена. Оценка продуктов ПОБ при двух длинах волн приведена в табл. 3. Показано, что величина ПОБ, регистрируемая при длине волны 274 нм у беременных, значительно ниже, чем у доноров, особенно в I триместре беременности. В III триместре беременности интенсивность ПОБ по сравнению с I триместром слегка возрастает, но остается ниже, чем у доноров. Несколько выше у беременных величина ПОБ по оценке при длине волны 370 нм, но достоверных различий при этом также не было выявлено. Вследствие нестабильности пика оптической плотности при 274 нм оценку этой величины мы считаем проводить нецелесообразно. Эти данные еще раз подтвердили полученные ранее результаты о том, что при беременности абсолютная величина спонтанного ПОБ существенно не изме-

Таблица 1

ПОБ доноров и беременных при стимуляции ионами железа и перекисью водорода

Группа	ПОБспонт. (мкмольСОпр./мг белка)	ПОБ- $Fe^{2+}$ (мкмольСОпр./мг белка)	ПОБ- $H_2O_2$ (мкмольСОпр./мг белка)	Отношение ПОБ- $Fe^{2+}$ / ПОБспонт.	Отношение ПОБ- $H_2O_2$ / ПОБспонт.
Доноры (N=11)	$1,14 \pm 0,07$	$1,94 \pm 0,06$	$2,80 \pm 0,10$	$1,66 \pm 0,07$	$2,39 \pm 0,12$
Беременные (N=11)	$0,97 \pm 0,07$	$1,88 \pm 0,06$	$2,65 \pm 0,18$	$2,09 \pm 0,10$ $p < 0,05$	$3,03 \pm 0,10$ $p < 0,01$

Таблица 2

ПОБ доноров и беременных при совместной стимуляции ионами железа и перекисью водорода

Группа	ПОБспонт. мкмольСОпр./мг белка	ПОБ ( $Fe^{2+}+H_2O_2$ ) мкмольСОпр./мг белка	Отношение ПОБстим./ПОБспонт.
Доноры (N=11)	$1,13 \pm 0,11$	$1,42 \pm 0,07$	$1,43 \pm 0,17$
Беременные (N=11)	$0,90 \pm 0,05$	$1,75 \pm 0,10$ $p < 0,05$	$2,00 \pm 0,19$ $p < 0,01$

Таблица 3

Оценка величины ПОБ при беременности по измерению спектра поглощения продуктов ПОБ

Доноры (N=7)		Беременные, I триместр (N=8)		Беременные, III триместр (N=8)	
$OE_{274}$	(мкмольСОпр./мг белка)	$OE_{274}$	(мкмольСОпр./мг белка)	$OE_{274}$	(мкмольСОпр./мг белка)
$0,75 \pm 0,15$	$1,29 \pm 0,09$	$0,29 \pm 0,04$ $p < 0,05$	$1,58 \pm 0,34$ $p < 0,05$	$0,43 \pm 0,12$	$1,49 \pm 0,11$

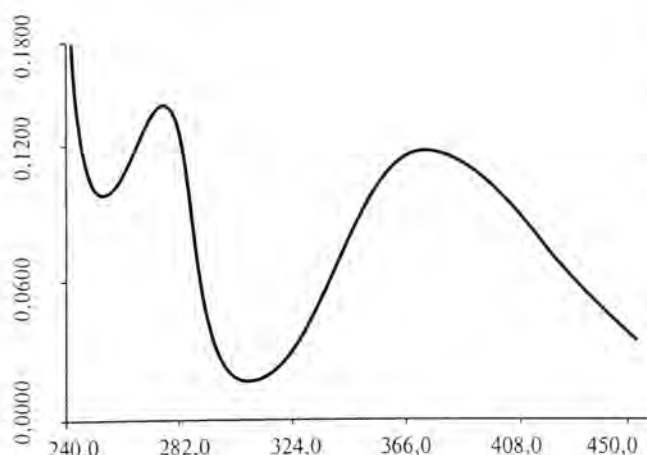


Рис. 1. Спектр поглощения продуктов перекисного окисления белков: по оси абсцисс — длина волны ( $\lambda$ ) нм; по оси ординат — оптическая плотность (в ед. оптической плотности)

нена, хотя, как уже было сказано, степень стимуляции ПОБ ионами железа и перекисью водорода существенно повышена.

### Обсуждение

Несмотря на полученные результаты о повышенной чувствительности белков сыворотки крови при беременности к окисляющему воздействию ионов железа и перекиси водорода, имеющиеся данные о некотором снижении ПОБ при беременности могут свидетельствовать и об адаптивных изменениях в составе и структуре белковых молекул. Проведенное ранее изучение флуоресценции белков у доноров и беременных с большим сроком гестации (35–40 недель) показало, что у беременных имеет место увеличение триптофановой флуоресценции при неизменной битирозиновой флуоресценции (неопубликованные данные), что характеризует наличие адаптивных изменений белков крови при беременности. Величина триптофановой флуоресценции составляла  $77 \pm 2\%$  (доноры) и  $86 \pm 2\%$   $p < 0,05$  (беременные) и битирозиновой соответственно  $59 \pm 4$  и  $54 \pm 4\%$ . Было обнаружено, что эти изменения происходили на фоне значительного увеличения уровня ХЛ:  $1625 \pm 129$

УЕ/мл (доноры) и  $2808 \pm 238$  УЕ/мл (беременные),  $p < 0,01$ , что свидетельствует об усиленном образовании АФК и может отражать повышение устойчивости белковых молекул к окисляющему действию АФК как за счет изменения аминокислотного состава молекул белков (например, увеличения содержания триптофана), так и за счет изменения третичной структуры белковой молекулы, в результате чего остатки определенных аминокислот становятся менее доступны для окисления АФК.

### Литература

1. Аккер Д.В., Варшавский Б.Я., Ельганинова С.А. и др. // Акуш. и гинекология. — 2000. — № 4. — С. 17–20.
2. Бурмистров С.О., Ковалева Т.Г., Бузурукова П.С. и др. // Ж. Акушерства и женск. болезней // 1998. — № 4. — С. 50–53.
3. Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А., Поротов И.Г. // Вопр. Мед. химии. — 1995. — № 1. — С. 24–26.
4. Зенков Н.К., Ланкин В.З. Окислительный стресс, МАИК, Наука Интерпериодика. — 2001. — 343 с.
5. Костючек Д.Ф., Соколова Л.Ф. // Журнал акушерства и женск. болезней. — 1998. — № 2. — С. 31–35.
6. Федорова М.В., Калашикова Е.П. Плацента и ее роль при беременности. — М.: Медицина, 1986. — 254 с.
7. Шаронов Б.Н., Говорова Н.Ю., Лызлова С.Н. // Биохимия. — 1988. — Т. 53, № 5. — С. 816–824.
8. Ширшев С.В. // Успехи совр. биологии. — 1993, Т. 113, вып. 2. — № 5. — С. 230–245.
9. Leverro G., Creco P., Capiano F. et al. // Eur. J. Obstetric Gynecol. Rep. Biol. — 1996. — Vol. 70. — P. 123–127.
10. Levine R.L., Gordon D., Oliver C.N. et al. // Meth Enzymol. — 1990. — Vol. 186. — P. 464–478.
11. Reiter R.A., Codens F., Beveris A.R. et al. // Proc. Natl Acad. Sci USA. — 1979. — Vol. 77. — P. 347–351.

### THE ALTERATION OF SERUM PROTEIN SENSIBILITY TO OXIDATION AT PREGNANCY

Burmistrov O.S., Oparina T.I., Arutjunyan A.V.

■ **Summary:** The article presents data on the protein peroxidation products (PPP) serum contents alteration at pregnancy. PPP are produced under the influence of reactive oxygen species (ROS). The level of PPP during spontaneous oxidation slightly decreased in serum from pregnant women. However, the PPP content was significantly elevated under the influence of  $Fe^{2+}$ -ions and  $H_2O_2$  at pregnancy. The data obtained testify to serum proteins being more sensitive to oxidation by ROS at pregnancy.

■ **Key words:** protein peroxydation, pregnancy, reactive oxygen species.