

ПРОЦЕССЫ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ В ПЛАЦЕНТЕ ПРИ ПРЕЖДЕВРЕМЕННЫХ РОДАХ

Используя метод люминолзависимой хемилюминесценции в сочетании с другими методическими подходами, показано, что при преждевременных родах сроком 28-36 недель отмечается усиление процессов СРО в периферической части плаценты. Интенсификация процессов СРО ассоциируется с липидной перекисидацией. Образование активных форм кислорода в тканях плаценты осуществляется как СОД-зависимым, так и СОД-независимым путем, причем при преждевременных родах доля участия второго механизма существенно снижена. Содержание миелопероксидазы, основного фермента кислородзависимой антимикробной системы, снижается при преждевременных родах независимо от его локализации. Полученные результаты указывают на ослабление защитной функции фетоплацентарной системы, что является одним из важных патогенных факторов невынашивания беременности поздних сроков.

Одной из актуальных проблем в современном акушерстве является невынашивание беременности. Частота этой патологии колеблется в пределах 10-25% и служит причиной высокой перинатальной заболеваемости и смертности [8, 19]. Несмотря на развитие исследований, посвященных профилактике и лечению невынашивания, процент преждевременных родов в течение последних 20 лет не изменился и остался на уровне 8-12% [10].

В настоящее время установлено, что в большинстве случаев причины невынашивания беременности являются сочетанными, однако отмечается все больше сторонников инфекционной природы невынашивания, связанной с ростом числа заболеваний плода и новорожденного, вызванных условно-патогенной микрофлорой. В 6,2% случаев перинатальная смертность обусловлена инфекционными заболеваниями матери, в 10% - инфекциями плода и новорожденного [9, 18].

Исследования последних лет как отечественных, так и зарубежных авторов свидетельствуют о важной роли процессов свободнорадикального окисления (СРО) в патогенезе многих заболеваний человека. Избыточное усиление СРО может привести к синдрому перекисидации, включающему повреждение мембран, инактивацию или трансформацию ферментов, нарушения процессов деления и дифференцировки клеток и т.д. [3, 15].

Сведения о механизмах образования активных форм кислорода и их участии в процессах СРО в плаценте при преждевременных родах малочисленны. Изучение данного вопроса позволяет выявить структурно-функциональные нарушения, возникающие в фетоп-

лацентарной системе, и открывает возможности для осуществления рациональной и обоснованной терапии больных.

Целью данной работы явилось изучение процессов СРО при преждевременных родах сроком 28-36 недель.

Материалы и методы

Материалом для исследования служила ткань плаценты беременных женщин с неосложненным течением беременности и родов и преждевременным спонтанным прерыванием беременности в сроки 28-36 недель. Образцы ткани готовили из центральной и периферической зон плаценты, тщательно отмывали в ледяном физиологическом растворе, гомогенизировали в фосфатном буфере и центрифугировали на холоде. Супернатант использовали для дальнейших определений. Уровень интенсивности люминолзависимой хемилюминесценции (Л-ХЛ) измеряли при 37°C в течение 2 мин. Для инициации свечения вводили 200 мкл перекиси водорода ($E_{290} = 2,31$). Об интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ) судили по уровню диеновых конъюгатов (ДК) [8] и ТБК-окрашенных компонентов [2]. Об интенсивности перекисного окисления белков (ПОБ) судили по содержанию карбонильных производных [16]. Пероксидазную активность (ПО) измеряли, используя H_2O_2 -зависимое окисление тетраметилбензидина. За единицу энзиматической активности принимали количество фермента, которое изменяло величину абсорбции на 1,0 в мин. при 655 нм и 25°C [20]. Содержание миелопероксидазы (МПО) определяли с применением моноспецифических поликлональных антител в твердофазном иммуноферментном анализе [6].

Концентрацию белка определяли по методу Лоури [17]. Результаты экспериментов обрабатывали с использованием стандартных статистических программ.

Результаты исследования

Интенсивность Л-ХЛ периферических участков плаценты, являющихся своеобразной резервной зоной для осуществления компенсаторных реакций [11], при преждевременных родах сроком 28-36 недель увеличена по сравнению с таковой при физиологической беременности и родах. В центральной части плаценты достоверных изменений в уровне интенсивности СР реакций не выявлены (табл. 1).

Интенсивность Л-ХЛ, по данным ряда исследователей [12,15], тесно связана с процессами развития свободнорадикальных реакций ПОЛ и ПОБ. Выяснено, что при преждевременных родах в периферической части плаценты отмечается уменьшение ДК, которые являются первичными продуктами ПОЛ, и увеличение ТБК-активных компонентов (малонового диальдегида - МДА), представляющих конечные продукты данного процесса. Разнонаправленные сдвиги в содержании ДК и ТБК-активных соединений в периферической части при преждевременных родах могут быть связа-

ны с различным влиянием на начальные и конечные этапы развития ПОЛ в функционально неоднозначных частях плаценты. Интенсивность окислительной модификации плацентарных белков, определяемая нами по уровню содержания карбонильных производных, не изменяется. Полученные данные дают основание полагать, что при преждевременных родах усиление интенсивности ХЛ в периферической части плаценты связано преимущественно с интенсификацией процессов ПОЛ.

Как известно, Л-ХЛ, отражающая собственную ХЛ, связана с образованием супероксидного и гидроксильного и/или гипохлоритного радикалов [4]. Для выяснения относительного вклада двух систем радикалов в возникновение Л-ХЛ в тканях плаценты в норме и при преждевременных родах было изучено влияние специфических перехватчиков активных форм кислорода: супероксиддисмутазы (СОД), специфически катализирующей реакцию дисмутации супероксидного радикала (СОД-зависимый механизм), и азидата натрия, обладающего высокой специфичностью в отношении ХЛ, возникающей в результате взаимодействия люминола с гипохлоритным анионрадикалом (СОД-независимый механизм). Как видно из табл.2, в присутствии СОД

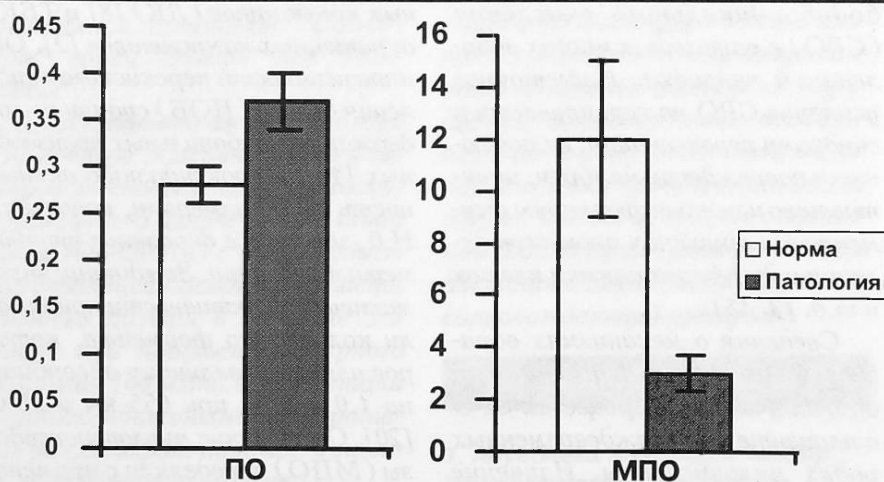
наблюдалось практически одинаковое тушение интенсивности ХЛ как в центре, так и по периферии плаценты. Добавление азидата натрия не изменяло степени ингибирования Л-ХЛ в центре плаценты у женщин со срочными родами и значительно слабее ингибировало интенсивность ХЛ в группе женщин с преждевременными родами как в центральной, так и в периферической части плаценты (табл.2).

Полученные результаты указывают на участие одновременно двух механизмов возникновения Л-ХЛ в тканях плаценты: СОД-зависимого и СОД-независимого, причем при преждевременных родах отмечается существенное снижение последнего.

Оценка эффективности взаимодействия низкомолекулярных соединений, в том числе присутствующих в крови, с продуктами, образующимися в ходе миелопероксидазной реакции в плаценте женщин с неосложненным течением беременности и родов и преждевременными родами, показала, что наиболее сильными тушителями ХЛ являются мочевая кислота, глутатион восстановленный, НАДН. Эффект аскорбиновой кислоты соизмерим с эффектом цистеина. Концентрации цистеина, аскорбиновой кислоты, НАДН, глутатиона восстановленного, обладающие 50%-ным ингибирующим эффектом на Л-ХЛ ткани плаценты, не отличались у женщин с физиологически протекающей беременностью и родами и при преждевременных родах. Концентрации мочевой кислоты и таурина, обладающие 50%-ным ингибирующим эффектом, выше в плаценте женщин с нормально протекающей беременностью и родами, чем при преждевременных родах сроком 28-36 недель (табл.3). Известно, что мочевая кислота и таурин являются ингибиторами образования в живых системах гипохлоритного анионрадикала [18].

Гипохлоритный анионрадикал, участвующий в хлорировании чужеродных белков и ДНК, образу-

Пероксидазы в плаценте человека



По оси ординат:

ПО - активность в Е/мг белка, МПО - содержание в нг/мл.

* $p < 0,02$ по сравнению с нормой.

Интенсивность свободнорадикальных процессов в плаценте человека

Таблица 1

Группа женщин	Участок плаценты	Интенсивность ХЛ(УЕ/г ткани)	Содержание ДК(нМ/мл)	Содержание МДА (нМ/мг б.)	Содержание карбонильных производных (мкМ/мг б.)
Норма	Центр.	3008,0 ± 487,6 n=16	13,41 ± 1,43 n=16	3,95 ± 0,64 n=16	1,85 ± 0,20 n=7
	Периф.	866,7 ± 60,8 n=16	П,54 ± 1,16 n=16	2,64 ± 0,3 n=16	1,74 ± 0,13 n=7
Преждевременные роды	Центр.	2067,6 ± 339,6 n=20	10,54 ± 1,68 n=20	4,18 ± 0,52 n=20	1,96 ± 0,34 n=9
	Периф.	1517,7 ± 208,1** n=20	7,78 ± 1,30* n=20	4,28 ± 0,85 n=20	2,22 ± 0,28 n=9

**p<0,01, *p<0,05 по сравнению с соответствующим контролем

Люминолзависимая хемилюминесценция (Л-ХЛ) в плаценте под влиянием тушителей

Таблица 2

Группа обследованных женщин	Участок плаценты	Тушение Л-ХЛ, %	
		СОД(250мкг/мл)	Азид натрия (0,025 мМ)
Норма	Центр.	49,4 ± 4,6 n=5	59,5 ± 8,2 n=6
	Периф.	69,6 ± 8,1 n=5	58,4 ± 7,2 n=6
Преждевременные роды	Центр.	52,5 ± 4,5 n=6	15,6 ± 1,9* * n=4
	Периф.	53,7 ± 6,3 n=6	28,0 ± 1,8** n=5

**p<0,01 по сравнению с соответствующим контролем

Величина I₅₀ для низкомолекулярных тушителей Л-ХЛ

Таблица 3

Соединение	Величина I ₅₀ (нмол/мл)	
	Норма (n=3)	Преждевременные роды (n=3)
Цистеин	290,0 ± 91,0	340,0 ± 75,0
Аскорбиновая кислота	3000,0 ± 65,0	250,0 ± 60,0
НАДН	3,0 ± 0,85	1,7 ± 0,41
Таурин	23100,0 ± 930,0	18600,0 ± 721,0*
Мочевая кислота	0,071 ± 0,01	0,028 ± 0,009
Глутатион восстановлен.	1,0 ± 0,3	1,0 ± 0,5

*p<0,05 по сравнению с соответствующим контролем

ется при участии специфического фермента МПО при наличии в среде ионов хлора и перекиси водорода [7]. Зрелые тканевые макрофаги, в том числе и плацентарные, сами по себе лишены МПО-активности, но способны путем эндоцитоза захватывать МПО из внеклеточного пространства. Нами было выяснено, что уровень

общей ПО-активности и содержание МПО не зависят от локализации в плаценте (периферическая и центральная часть) как при физиологическом течении беременности и родов, так и при преждевременных родах. Содержание МПО в плаценте при преждевременных родах в 4 раза ниже, чем при физиологическом течении бе-

ременности и родов, тогда как величина общей ПО достоверно выше (см. рисунок), что может быть связано с усилением интенсивности ПОЛ в периферической части плаценты. При физиологическом течении беременности и родов существует отрицательная корреляционная связь между содержанием МПО в плаценте и

уровнем активности ПО с величиной $r = -0,42$ ($p < 0,05$).

При преждевременных родах корреляционные связи между индивидуальными колебаниями МПО и активностью ПО не были выявлены.

Таким образом, на основании полученных результатов следует заключить, что при преждевременных родах сроком 28-36 недель отмечается усиление процессов СРО, наблюдаемое в периферической части плаценты. Интенсификация процессов СРО ассоциируется прежде всего с липидной перекиссацией. Образование активных форм кислорода в тканях плаценты осуществляется как СОД-зависимым, так и СОД-независимым путем, причем доля участия второго механизма существенно снижена при преждевременных родах. Содержание МПО, являющейся основным звеном кислородзависимой антимикробной системы, связанной с образованием гипохлоритного анионрадикала, снижается при преждевременных родах независимо от его локализации, что способствует ослаблению защитной функции фетоплацентарной системы и является, на наш взгляд, одним из важных патогенных факторов невынашивания беременности поздних сроков.

Выражаю глубокую благодарность кандидату биологических наук Алешиной Г.М., старшему научному сотруднику ИЭМ РАМН, за помощь в определении содержания МПО в плаценте.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андреева Л.Н., Кошемякин Л.А., Кишкун А.А. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой // Лабор. дело. - 1988. - № 11. - С. 41-43.
2. Бабиджаев М.А., Шведова А.А., Архипенко Ю.В., Каган В.В. Накопление продуктов перекисного окисления липидов в хрусталике при катаракте. // Бюлл. экспер. биол. и мед. - 1985. - № 9. - С. 299-301.
3. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. - М., 1972.
4. Владимиров Ю.А., Шерстнев М.П. Хемилюминесценция клеток животных. // Итоги науки и техники. Сер. Биофизика. 1989 - Т. 24. - С. 324.
5. Говорова Н.Ю., Шаронов Б.П., Лызлова С.Н. Влияние низкомолекулярных соединений на хемилюминесценцию люминола, обусловленную действием продуктов миелопероксидазного катализа и экзогенного гипохлорита. // Биохимия, - 1988. - т. 53 - вып. 4. - С. 2025-2031.
6. Жебрун А.Б., Янковский О.Ю., Кокряков В.Н., Алешина Г.М., Нурутдинова М.Н. Оценка количественного содержания миелопероксидазы в биологических жидкостях методом ИФА. Тез докл. Съезда иммунол. России, 1992. - Новосибирск - С. 161.
7. Меньшикова Е.Б., Зенков И.К. Антиоксиданты и ингибиторы радикальных окислительных процессов // Успехи соврем. биологии. - 1993. - т. 113, вып. 4. - С. 442-455.
8. Мурашко Л.Е. Преждевременные роды (клиника, патогенез, тактика ведения преждевременных родов): Автореф. дисс.... докт. мед. наук. - М., 1992. - 48 с.
9. Новиков Ю.И., Алипов В.И., Кошелева Н.Г. Угрожающие преждевременные роды. - 1980. - С. 6-14.
10. Сидельникова В.М. Невынашивание беременности. - М. Медицина, 1986 - 176 с.
11. Федорова М.В., Калашникова Е.П. Плацента и ее роль при беременности. М. Медицина - 1986. - 252 с.
12. Федорова Т.Н., Реброва О.Ю., Ларский Э.Г. Микромодификация метода определения активности процессов свободнорадикального окисления // Лаб. дело - 1991. - № 3 - С. 33-37.
13. Шафран М.Г. Миелопероксидаза нейтрофильных лейкоцитов. // Успехи соврем. биологии. - 1981. - т. 92, вып. 3 (6). - С. 365-378.
14. Шестаков В.А., Шерстнев М.П. Влияние биохемилюминесценции в медицине. - М., 1977.
15. Dandona P., Thusu K., Cook S. et al. Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. // Lancet - 1996. - N 8999. - P. 444-445.
16. Levine R.L., Garland D., Oliver C.X. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. // Meth. Enzym. - 1990. - v. 186. - P. 464-471.
17. Lowry O.H., Rosebrough N.J. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. // J. Biol. Chem. - 1951 - v. 193. - P. 265-275.
18. McGregor J.A., French F.G., Xawellin D., Fodd F.K. Preterm birth and infection: pathogenic possibilities. // Amer. J. Repr. Immunol. 1988. - v. 16. - P. 123-132.
19. Wilkins I., Creasy R. Preterm labor. // Clin. Obstetr. a. Gynecol. - 1990. - v. 33. - P. 502-513.
20. Yuji Naito, Toshikazu Yoshikawa, Kiichi Matsuyama et al. Neutrophils, lipid peroxidation and nitric oxide in gastric reperfusion injury in rats. // Free radical biol. and medicine. - 1998. - v. 24. - P. 494-502.