

О. А. БУДЮХИНА¹, Е. И. БАРАНОВСКАЯ¹, А. И. ГРИЦУК¹, Д. Р. ПЕТРЕНЁВ²

РОЛЬ ФАКТОРОВ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ СЫВОРОТКИ КРОВИ И АМНИОТИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ У БЕРЕМЕННЫХ В ПАТОГЕНЕЗЕ РАЗВИТИЯ ХРОНИЧЕСКОЙ ПЛАЦЕНТАРНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

*Гомельский государственный медицинский университет, Беларусь,
²Институт радиобиологии ИЛИ Беларуси, Гомель*

(Поступила в редакцию 01.07.2010)

Введение. Плацентарная недостаточность (ПН) - это клинический симптомокомплекс, вызванный функциональными и морфологическими изменениями плаценты с нарушением компенсаторно-приспособительных реакций в системе мать-плацента-плод [1, 2]. ПН является важнейшей проблемой современного акушерства и неонатологии, так как осложняет до 60% всех беременностей, играет ведущую роль в структуре перинатальной заболеваемости и смертности. Несмотря на доступность высокотехнологичных методов диагностики и появление новых способов лечения, доля тяжелых форм ПН не снижается и составляет 22-26%, а наличие декомпенсированной ПН при критическом внутриутробном состоянии плода является основанием для досрочного оперативного родоразрешения [1-4].

Структурные и функциональные изменения в плаценте, обусловленные различными факторами, носят неспецифический характер и реализуются за счет усиления процессов свободнорадикального окисления низкомолекулярных соединений и белков [5]. Установлено четыре Мишени окислительной цитотоксической атаки активных форм кислорода: индукция процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в биологических мембранах, повреждение мембраносвязанных белков, инактивация ферментов и повреждение ДНК клеток. При физиологически протекающей беременности, которая сопровождается изменениями в прооксидантно-антиоксидантном статусе, окислительный стресс временный, локальный, так как отмечается надежное функционирование механизмов антиоксидантной защиты (АОЗ) [6]. Свободные радикалы запускают механизмы пролиферации и дифференцировки клеток в первом триместре беременности, участвуют в процессах апоптоза, элиминации ксенобиотиков, активируют внутриклеточные бактерицидные факторы, участвуют в синтезе гидроперекиси холестерина, являющейся предшественником прогестерона. Образующиеся в процессе ПОЛ токсичные радикалы обладают способностью инактивировать эндотелиальные факторы релаксации (простациклин, оксид азота), способствуя вазоконстрикции, повышению агрегации тромбоцитов и нарушению микроциркуляции в плаценте, а также оказывают повреждающее действие на белки и липиды клеточных мембран, что приводит к ферментативной и гормональной недостаточности плаценты [5, 7].

При ПН изменяется свободнорадикальная активность и антиоксидантный статус плаценты, а при антенатальной гибели плода подавляется активность компонентов антиокислительных систем сыворотки крови и усиливаются процессы липопероксидации [2, 8-11].

Цель работы - оценить состояние прооксидантно-антиоксидантного баланса при плацентарной недостаточности и диагностическую значимость показателей перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы защиты при различных клинических формах хронической ПН.

Материалы и методы исследования. Всего обследовано 33 женщины с физиологическим течением беременности (контрольная группа) и 109 беременных с хронической ПН (основная

группа). В зависимости от клинической формы ПН основная группа была разделена на следующие подгруппы: женщины с хронической ПН, проявляющейся гипоксией плода ($n = 46$), пациентки с ПН с развитием задержки роста плода ($n = 48$) и беременные с декомпенсированной ПН с развитием антенатальной гибели плода ($n = 15$). Диагноз ПН выставлен в период беременности на основании динамического наблюдения за развитием беременности, данных кардиотокографии, ультразвукового исследования, доплерометрии кровотока в системе мать-плацента-плод и подтвержден при морфологическом исследовании последов.

Забор крови для исследования проводили в 7-8 ч утра в стандартных условиях, натощак. Сыворотки, полученные путем центрифугирования (2000 об/мин) в течение 20 мин при комнатной температуре, замораживали и хранили до проведения анализа при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Для оценки состояния системы ПОЛ-АОС сыворотки крови определяли уровень общей антиокислительной активности сыворотки крови (ОАОА), активность супероксиддисмутазы (СОД) и уровень одного из конечных продуктов ПОЛ - малонового диальдегида (МДА). Антиокислительную активность околоплодных вод (ОВ) определяли по их общей антиокислительной активности.

Определение состояния антиокислительной системы сыворотки крови. Для оценки антиокислительной активности сыворотки крови использован метод индуцированной хемилюминесценции (ХЛ) [12]. Метод основан на способности компонентов сыворотки задерживать время люминесцентной вспышки в системе, содержащей 2,2'-азо-бис-(2-амидинопропан) дигидрохлорид (ААРН) и люминол. В ячейки 96-луночного планшета вносили 10 мкл образца сыворотки или раствора Тролокс - водорастворимого аналога витамина Е. Добавляли 200 мкл мМ раствора люминола в среде Хенкса и термостатировали при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 10 мин, после чего индуцировали радикалообразование путем добавления 100 мкл 50 мМ свежеприготовленного раствора ААРН в среде Хенкса. Введение азосоединения ААРН в среду, содержащую люминол, сопровождалось вспышкой ХЛ после некоторого латентного периода. Содержавшиеся в сыворотке крови антиоксиданты увеличивали продолжительность так называемой лаг-фазы - периода, необходимого для развития реакции аутоокисления по радикальному типу, которая регистрировалась как усиление ХЛ. Антиоксидантный потенциал сыворотки выражали в эквивалентах тролокса (в мкМ). Дополнительно оценивали интенсивность ХЛ образцов сыворотки, которая пропорциональна пулу промежуточных продуктов ПОЛ (липоперекисей, диеновых конъюгатов, а возможно, и других биомолекул, окисляемых по свободнорадикальному механизму). Интенсивность вспышки оценивали по площади под кривой ХЛ, регистрируемой в течение часа, и выражали в относительных единицах люминесценции (relative luminescent unit).

Определение общей антиокислительной активности околоплодных вод. ОВ были получены до начала родовой деятельности путем трансвагинальной амниотомии с целью индукции родов или путем интраоперационного амниоцентеза при плановом кесаревом сечении. Антиокислительную активность ОВ оценивали по их способности влиять на скорость реакции аутоокисления адреналина в щелочной среде (метод Т. В. Сирота) [13]. В измерительную кювету с 2 мл карбонатного буфера (рН 10,55) вносили 0,1 мл 0,1%-ного раствора адреналина гидрохлорида (ФГУП «Московский эндокринный завод», Россия), в опытную пробу добавляли 0,1 мл ОВ. Скорость окисления адреналина была прямо пропорциональна скорости образования промежуточного продукта окисления адреналина, регистрируемого спектрофотометрически при $\lambda = 347$ нм. Измерения оптической плотности проводили каждые 5 с в течение 135 с на спектрофотометре СФ-46 (ЛЮМО). Кривые окисления адреналина имели линейную зависимость, следовательно, оптическая плотность является функцией времени $D = f(t)$, а показатель $\Delta D/\Delta t$ постоянен в каждой точке определения, т. е. скорость окисления адреналина возрастает с течением времени линейно. Скорость реакции аутоокисления адреналина выражали в единицах оптической плотности в минуту ($\Delta D/\Delta t$). Расчет скоростей окисления адреналина производили в соответствии с законом Бугера-Ламберта-Бера, согласно которому $c = D/(exl)$. В таком случае $dc/dt = (dD/dt) xl/(exl)$. Коэффициент изменения скорости окисления адреналина (K) для каждого исследуемого образца ОВ был рассчитан по формуле $K = (dD/dt)l/(dD_{буфера}/dt)$.

Активность супероксиддисмутазы сыворотки крови выражали как ингибирование скорости аутоокисления адреналина (в %). Для изучения показателей кинетики реакции аутоокисления

адреналина в щелочной среде в ячейки планшета вносили 5 мкл сыворотки, добавляли 10 мкл 0,1%-ного раствора адреналина гидрохлорида, вносили 200 мкл карбонатного буфера (0,2 М, рН 10,2) и регистрировали кинетику изменения оптической плотности ($\lambda = 347$ нм) в течение 70 мин при 37 °С [13].

Уровень МДА сыворотки крови определяли в реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) по методу Н. Н. Ohkawa [14]. К образцам сыворотки добавляли трихлоруксусную кислоту в конечной концентрации 5% для осаждения белков, выдерживали 10 мин при комнатной температуре и центрифугировали 3 мин при 9000 g. Супернатант переносили в новые пробирки и добавляли 2,5% ТБК, растворенной в диметилсульфоксиде, для получения конечной концентрации 0,25%. Процессы ПОЛ останавливали путем добавления бутилгидрокситолуена (2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol, Fluka) в конечной концентрации в пробе 0,03%. Для образования окрашенного триметинового комплекса пробы инкубировали 15 мин при постоянном перемешивании (100 °С) в твердотельном термостате Biosan TS-100. После охлаждения образцы центрифугировали 3 мин при 9000 g. Супернатант переносили в 96-луночные планшеты в повторях по 200 мкл и спектрофотометрировали на сканирующем спектрофотометре TECAN Safire2 при $\lambda = 532$ нм. Для построения калибровочной кривой использовали серийно разведенный метиловый эфир МДА (1,1,3,3-Tetramethoxypropan, Aldrich).

Статистическую обработку количественных данных проводили с определением доли (р, %) изучаемого признака и стандартной ошибки доли (s %), вычисляли двухсторонний критерий Фишера (Р) и критерий χ^2 . Характер распределения признаков оценивали с помощью теста Шапиро-Уилка. Применяли непараметрические статистические методы: рассчитывали квартили Me (25-75), критерий Манна-Уитни с поправкой Йейтса (Z_T), критерий Данна (Q), критерий Крускала-Уоллиса (H) и коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r_s). Различия считали статистически значимыми при $P < 0,05$. Статистическую обработку показателей кинетики аутоокисления адреналина с ОВ проводили с помощью программного пакета Origin.

Результаты и их обсуждение. Общая антиокислительная активность является интегральным показателем, отражающим потенциальную антиокислительную активность во всем многообразии взаимодействия различных компонентов биологической жидкости [15]. Интенсивность ХЛ, напротив, отражает прооксидантную активность сыворотки крови, соответствующую запасу промежуточных продуктов ПОЛ.

Распределение общей антиокислительной активности и интенсивности ХЛ сыворотки крови у пациенток исследуемых групп не соответствовало нормальному распределению. Выявлена обратная корреляционная связь между индивидуальными ОАОА и интенсивностью ХЛ ($r_s = -0,5$; $P = 0,000001$), что подтверждается статистически значимыми различиями при сопоставлении процентильных категорий данных показателей (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Прооксидантная активность сыворотки крови беременных в зависимости от процентильных категорий ОАОА (Me 25-75 процентилей)

Процентильные уровни ОАОА	Интенсивность ХЛ, отн. ед.	Количество случаев
Менее 25	104,82 (94,94-116) ^{#^}	36
25-75	97,27 (92,67-106,46) ^{*^}	70
Более 75	91,18(84,97-99,01) ^{* #}	36

П р и м е ч а н и е. Различия статистически значимы ($P < 0,05$) по сравнению с интенсивностью ХЛ: * - при ОАОА от 0 до 25 процентилей; # - при ОАОА от 25 до 75 процентилей; ^ - при ОАОА более 75 процентилей.

Выявлены различия ОАОА ($H = 9,22$; $P = 0,027$) и интенсивности ХЛ ($H = 9,88$; $P = 0,02$) у пациенток исследуемых групп (табл. 2). Однако показатели ОАОА сыворотки крови у беременных с физиологическим течением беременности и хронической ПН, проявляющейся гипоксией плода, не различались и составили 0,396 (0,322-0,492) и 0,398 (0,330-0,487) мкМ эквивалента тролокса соответственно. У пациенток при задержке роста плода ОАОА сыворотки крови была выше на 17%, при антенатальной гибели плода- на 11%. Учитывая, что показатели антиокисли-

тельной и прооксидантной активности изменяются в динамике гестационного процесса, проведена оценка ОАОА и интенсивности ХЛ при доношенной беременности. Определено статистически значимое повышение ОАОА при доношенной беременности, сопровождающейся формированием СЗРП ($Q = 3,36$; $P < 0,05$). Показатели ОАОА и интенсивности ХЛ у пациенток при доношенной беременности представлены в табл. 3.

Т а б л и ц а 2. Показатели антиокислительной и прооксидантной активности у беременных (Ме 25-75 перцентилей)

Группа	ОАОА, мкМ эквивалента тролокса	Интенсивность ХЛ, отн. ед.
Контрольная ($n = 33$)	0,396 (0,322-0,492)	101,08 (93,29-106,54)
Гипоксия плода ($n = 46$)	0,398 (0,330-0,487)	100,21 (91,23-108,15)
СЗРП ($n = 48$)	0,464 (0,383-0,586)	99,17 (88,54-100,83)
Аntenатальная гибель плода ($n = 15$)	0,440 (0,397-0,522)	96,73 (93,05-103,26)

Т а б л и ц а 3. Показатели антиокислительной и прооксидантной активности у обследованных при доношенной беременности (Ме 25-75%)

Группа	ОАОА, мкМ эквивалента тролокса	Интенсивность ХЛ, отн. ед.
Контрольная ($n = 33$)	0,396 (0,322-0,492)	101,08 (93,29-106,54)
Гипоксия плода ($n = 43$)	0,397(0,331-0,494)	100,27 (91,63-109,26)
СЗРП ($n = 47$)	0,468 (0,383-0,577)*	99,21 (88,45-100,84)
Аntenатальная гибель плода ($n = 7$)	0,476 (0,405-0,522)	96,73 (94,63-99,62)

*Статистически значимое различие ($P < 0,05$) с группой контроля и ПН.

Величина ингибирования скорости аутоокисления адреналина сывороткой крови прямо пропорциональна активности СОД, одному из ключевых ферментов антиокислительной системы. В контрольной группе этот показатель составил 31,63 (30,37-33,0)%, в основной - 28,14 (27,28-30,8)%, что явилось статистически значимым различием ($Z_T = 2,15$; $P = 0,03$). Таким образом, при ПН, несмотря на повышение общей антиокислительной активности, наблюдается снижение ферментативного звена антиокислительной системы.

Уровень конечного продукта перекисного окисления липидов МДА был ниже в основной группе и составил соответственно 0,28 (0,21-0,37) мкмоль/л в основной и 0,46 (0,34-0,60) мкмоль/л в контрольной группе, различия явились статистически значимыми ($Z_T = 2,19$; $P = 0,028$). Корреляционная связь между уровнем МДА и интенсивностью ХЛ не выявлена, что объясняется вкладом в интенсивность ХЛ других прооксидантов, в частности промежуточных продуктов липопероксидации.

При изучении состояния плода большое внимание уделяется исследованию ОВ. Последние обладают высокой аутоокисляемостью и слабой элиминирующей способностью в отношении продуктов перекисного окисления [16-19]. Определена общая антиокислительная активность 52 образцов ОВ. Околоплодные воды способны ингибировать или потенцировать процесс аутоокисления адреналина. В случае, если добавление ОВ приводило к ускорению процесса аутоокисления адреналина и величина коэффициента составляла более 1, активность ОВ была оценена как проокислительная, при коэффициенте менее 1 - как антиокислительная. Коэффициент изменения скорости окисления адреналина околоплодными водами составил 1,062 (0,86-1,77) в основной и 0,76 (0,64-0,85) в контрольной группе. ОАОА околоплодных вод при хронической ПН статистически ниже ($Z_T = 2,55$; $P = 0,01$). Низкие перцентильные значения коэффициента (менее 25 перцентилей) статистически чаще выявлены у женщин контрольной группы ($55,56 \pm 16,56\%$ в контрольной группе против $8,6 \pm 5,9\%$ в основной группе; $P_{Филлер} = 0,033$).

Анализ результатов функционирования системы ПОЛ-АОС показал различия показателей при физиологическом течении беременности и при формировании хронической ПН. Определено повышение ОАОА сыворотки крови у беременных при развитии синдрома задержки роста плода, что можно объяснить компенсаторно-приспособительными изменениями метаболических

процессов при ранней активации антиокислительной системы и вкладом длительной поддерживающей лекарственной терапии в суммарную антиокислительную активность сыворотки крови у таких пациенток.

Как известно, первой реакцией в системе перекисные процессы-антиокислительная защита на патологическое воздействие является активация ферментативного звена антиокислительной системы. При физиологически протекающей беременности к III триместру СОД увеличивается в 10 раз [20]. Выявленное нами снижение СОД после 37 недель беременности при ПН подтверждает предположение о длительном воздействии на антиокислительную систему, что приводит к истощению ферментативного звена АОЗ у пациенток данной группы. Низкая ферментативная активность СОД может быть объяснена также сниженной индукцией образования фермента, так как основной субстрат реакции дисмутации - супероксиданион радикал реагирует с оксидом азота с образованием пероксинитрита [21]. Согласованная работа ферментативного и неферментативного звеньев антиокислительной защиты обеспечивает резервные адаптационные возможности фетоплацентарного комплекса, а угнетение ферментативного компонента АОС накануне родоразрешения может иметь неблагоприятные последствия в процессе родов.

Установлено снижение ОАОА околоплодных вод при хронической ПН, что является отражением сниженных компенсаторно-приспособительных реакций фетоплацентарного комплекса и, учитывая низкую элиминирующую способность ОВ в отношении прооксидантов, может оказывать неблагоприятное воздействие на плод.

Несколько неожиданным стало снижение уровня конечного продукта липопероксидации МДА при хронической ПН. Данные литературы об изменениях МДА при плацентарной недостаточности противоречивы [9], но большинство исследователей указывают на повышение конечного продукта ПОЛ при данном осложнении беременности [2, 8, 14]. Можно предположить, что выявленное снижение МДА при ПН является также следствием более ранней активации звеньев АОС с развитием компенсаторно-приспособительных реакций фетоплацентарного комплекса.

Выводы

1. Хроническая плацентарная недостаточность формируется при измененном балансе системы перекисное окисление-антиокислительная защита.

2. При хронической плацентарной недостаточности наблюдаются разнонаправленные изменения антиокислительной активности: снижение ОАОА околоплодных вод ($P = 0,01$) и повышение ОАОА сыворотки крови при формировании задержки роста плода ($P < 0,05$).

3. Угнетение СОД ($P = 0,03$), одного из основных ферментов антиокислительной системы, при хронической плацентарной недостаточности позволяет рассматривать его в качестве ведущей причины оксидативного стресса.

Литература

1. Малевич Ю. К., Шостак В. А. Фетоплацентарная недостаточность. Минск, 2007.
2. Савельева Г. М. Плацентарная недостаточность. М., 1991.
3. Вильчук К. У., Харкевич О. Н., Горбач Л. А. // Современные перинатальные медицинские технологии в решении проблем демографической безопасности: сб. науч. тр. и материалов науч.-практ. конф. Минск, 2008. С. 7-10.
4. Переседа О. А., Писаренко Е. А. // Мед. новости. 2007. № 10. С. 47-49.
5. Доброхотова Ю. Э. [и др.] // Рос. вестн. акушера-гинеколога. 2008. № 6. С. 33-36.
6. Абрамченко В. В. Антиоксиданты и антигипоксанты в акушерстве. СПб., 2001.
7. Бурмистров С. О. [и др.] // Акушерство и гинекология. 2001. № 6. С. 17-20.
8. Котова Г. С., Одинцова Н. А. // Безопасное материнство в XXI веке: сб. материалов VIII съезда акушеров-гинекологов и неонатологов РБ. Витебск, 2007. С. 204-207.
9. Флоренсов В. В., Протопопова Н. В., Колесникова Л. И. // Журн. акушерства и женских болезней. 2005. № 2. С. 44-49.
10. Kim Y. J. [et al.] // Reprod. Toxicol. 2005. Vol. 19, N 4. P. 487-492.
11. Viri A. [et al.] // Gynecol. Obstet. Invest. 2007. Vol. 64, N 4. P. 187-192.
12. Шкурупий В. А. [и др.] // Бюл. РАМН. 2006. № 2. С. 159-165.

13. Сирота Т. В. // Вопр. мед. химии. 1999. № 45 (3). С. 263-272.
14. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. // Anal. Biochem. 1979. Vol. 95. N 2. P. 351-358.
15. Беляков Н. А., Семесько С. Г. // Эфферентная терапия. 2005. Т. 11. ЛГ» 1. С. 5-21.
16. Бурлев В. А. Свободнорадикальное окисление в системе мать-плацента-плод при акушерской патологии: автореф. ... дис. д-ра мед. наук: 14.00.01, 03.00.04. М, 1992.
17. Чернуха Е. А. [и др.] // Акушерство и гинекология. 1986. № 12. С. 31-32.
18. Макаров О. В., Бахарева И. В., Идрисова Л. С. // Рос. вестн. акушера-гинеколога. 2004. № 4. С. 24-29.
19. Виглингем J. M. [et al.] // Obstet. Gynecol. 2003. Vol. 101, N 4. P. 756-761.
20. Шестопалов В. А. Метаболическая активность плацентарных макрофагов и молекулярные механизмы формирования плаценты при различных вариантах течения беременности: автореф. ... дис. д-ра мед. наук: 03.00.04. Ростов н/Д, 2007.
21. Chamy V M. [et al.] // Biol. Res. 2006. Vol. 39. P. 229-236.

O. A. BUDJUKHINA¹, E. I. BARANOVSKAJA¹, A. I. GRITSUK¹, D. R. PETRENYOV²

ROLE OF FACTORS OF PROOXIDANT-ANTIOXIDANT SYSTEMS OF BLOOD AND AMNIOTIC FLUID IN PREGNANT WOMEN IN PATHOGENESIS OF DEVELOPMENT OF CHRONIC FETOPLACENTAL

INSUFFICIENCY

*¹Gomel State Medical University, Belarus,
²institute of Radiobiology ofNAS of Belarus,
 Gomel*

Summary

Parameters of antioxidant and prooxidant activity in 109 pregnant women with chronic fetoplacental insufficiency and 33 pregnant women without thigh complication of pregnancy are investigated. Contrary changes in the total antioxidant activity (TAOA) are established: TAOA decrease of amniotic fluid and TAOA increase of maternal blood with fetal growth retardation. In pregnant women with fetoplacental insufficiency after 37 week gestation, the fermentative link activity of antioxidant protection of superoxide dismutase is suppressed and the malondialdehyde level increases.