

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт Фундаментальной Биологии и Биотехнологии  
Кафедра Медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

\_\_\_\_\_ Е. И. Шишацкая

« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2021 г.

**МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ**

Оценка глутатионовой редокс-системы крови у беременных  
женщин с преэклампсией

06.04.01 – Биология

06.04.01.05 – Реконструктивная биоинженерия

Научный руководитель	_____	<u>доцент, к.б.н.</u>	<u>Н.М. Титова</u>
	подпись, дата	должность, ученая степень	инициалы, фамилия
Выпускник	_____		<u>В.А. Мишина</u>
	подпись, дата		инициалы, фамилия
Рецензент	_____	<u>доцент, к.б.н.</u>	<u>Р.Н. Белоногов</u>
	подпись, дата	должность, ученая степень	инициалы, фамилия

Красноярск 2021

## Аннотация

Преэклампсия занимает одно из ведущих мест в структуре материнской и перинатальной смертности по всему миру и относится к наиболее сложным и важным проблемам научного и практического акушерства. В мировой статистике преэклампсия осложняет течение беременности в 28% случаев, а частота преждевременных родов при этом доходит до 25 %. Уровень заболеваемости новорожденных на фоне преэклампсии колеблется от 64 % до 78 %, а перинатальная смертность составляет 18-30%. У каждого пятого ребенка, родившегося с преэклампсией, нарушается физическое и психоэмоциональное развитие, выше уровень заболеваемости в младенческом и раннем детском возрасте. По данным ВОЗ при преэклампсии нарушаются функции жизненно важных органов: почек, головного мозга, печени, лёгких, что нередко приводит к развитию полиорганной недостаточности и не остается бесследным в последующие годы жизни женщины.

В связи с важностью изучения данной патологии, в качестве объекта исследования была выбрана кровь, поскольку кровь отображает все изменения, которые происходят в организме и ее легко получить как объект исследования.

Для оценки состояния глутатионовой антиоксидантной системы крови использовались спектрофотометрические методы, основанные на поглощении света в определенных участках спектра соединениями, которые являются активными группами ферментов, субстратами или продуктами реакции. Спектрофотометрические методы отличаются высокой чувствительностью, точностью, быстротой определения, малым расходом фермента и реактивов, позволяют следить за течением реакции во времени и проводить количественное определение веществ в широком интервале длин волн (185-1100 нм).

Ключевые слова: ПРЕЭКЛАМПСИЯ, КРОВЬ, ГЛУТАТИОНОВАЯ АНТИОКСИДАНТНАЯ СИСТЕМА, СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ.

## Реферат

Магистерская диссертация по теме «Оценка глутатионовой редокс-системы крови у беременных женщин с преэклампсией» содержит 57 страниц текстового документа, 11 иллюстраций, 84 использованных источников.

ГЛУТАТИОНОВАЯ АНТИОКСИДАНТНАЯ СИСТЕМА, ГЛУТАТИОН, ГЛУТАТИОНПЕРОКСИДАЗА, ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗА, ЭРИТРОЦИТЫ, ПЛАЗМА КРОВИ, АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА, ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС, ПРЕЭКЛАМПСИЯ.

Объект исследования: эритроциты и плазма крови относительно здоровых небеременных женщин, женщин с физиологической протекающей беременностью и беременных с преэклампсией.

Цель исследования – провести сравнительный анализ состояния глутатионовой редокс-системы крови у беременных женщин с преэклампсией.

Задачи исследования:

1. Определить содержание восстановленного глутатиона и активность глутатион – зависимых ферментов – глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы в эритроцитах и плазме крови здоровых небеременных женщин.

2. Исследовать концентрацию восстановленного глутатиона и активность глутатион-зависимых ферментов в эритроцитах и плазме крови женщин с физиологической протекающей беременностью.

3. Оценить содержание восстановленного глутатиона и активность глутатион-зависимых ферментов в эритроцитах и плазме крови беременных с преэклампсией.

## Содержание

Введение.....	5
1 Обзор литературы .....	7
1.1 Глутатионовая антиоксидантная система.....	7
1.1.1 Глутатион .....	7
1.1.2 Глутатионпероксидаза .....	10
1.1.3 Глутатион-S-трансфераза .....	14
1.2 Роль системы глутатиона в обезвреживании АФК в эритроцитах .....	17
1.3 Антиоксидантная система плазмы крови .....	22
1.4 Преэклампсия .....	23
1.5 Роль окислительного стресса в развитии преэклампсии .....	26
2 Материалы и методы .....	31
2.1 Объект исследования .....	31
2.2 Приготовление упакованных эритроцитов и получение плазмы крови ...	31
2.3 Определение содержания гемоглобина .....	32
2.4 Определение содержания общего белка в плазме крови .....	33
2.5 Определение содержания восстановленного глутатиона .....	34
2.6 Определение активности глутатионпероксидазы.....	35
2.7 Определение активности глутатион-S-трансферазы.....	36
2.8 Статистическая обработка результатов .....	37
3 Результаты исследований и их обсуждение .....	38
3.1 Оценка глутатионовой редокс-системы плазмы крови у беременных с преэклампсией .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
3.2 Состояние глутатионовой редокс-системы эритроцитов у беременных с преэклампсией .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
Заключение .....	39
Список использованных источников .....	40

## Введение

Преэклампсия — мультисистемное патологическое состояние, развивающееся после 20-й недели беременности, характеризуется артериальной гипертензией в сочетании с протеинурией и нередко проявлениями полиорганной недостаточности [1].

Одним из основных факторов, способствующим развитию преэклампсии, является гиперпродукция активных форм кислорода и развитие окислительного стресса.

Глутатионовая антиоксидантная система, включающая восстановленный глутатион, глутатионпероксидазу, глутатион-S-трансферазу, глутатионредуктазу и NADPH играет решающую роль в минимизации окислительного стресса, вступая в реакции прямого взаимодействия с АФК, либо снижая уровень продуктов окислительной модификации липидов и белков [2].

Антиоксиданты глутатионовой системы могут быть классифицированы либо как поглотители свободных радикалов (глутатион), которые захватывают или разлагают существующие свободные радикалы, либо как клеточные и внеклеточные ферменты, которые ингибируют пероксидазные реакции, участвующие в производстве свободных радикалов (глутатионпероксидаза и глутатион-S-трансфераза) [3].

Целью исследования являлось проведение сравнительного анализа состояния глутатионовой редокс-системы крови у беременных женщин с преэклампсией.

Исходя из цели, сформулированы следующие задачи:

1. Определить содержание восстановленного глутатиона и активность глутатион – зависимых ферментов – глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы в эритроцитах и плазме крови здоровых небеременных женщин.

2. Исследовать содержание восстановленного глутатиона и активность глутатион-зависимых ферментов в эритроцитах и плазме крови женщин с физиологической протекающей беременностью.

3. Оценить содержание восстановленного глутатиона и активность глутатион-зависимых ферментов в эритроцитах и плазме крови беременных с преэклампсией.

Работа проведена на базе медицинского центра Сибирского федерального университета и является частью комплексных исследований по изучению редокс-состояния глутатионового звена антиоксидантной системы в норме и при различных патологических состояниях.

# 1 Обзор литературы

## 1.1 Глутатионовая антиоксидантная система

Глутатионовая редокс-система, включающая глутатион, глутатионпероксидазу, глутатион-S-трансферазу, глутатионредуктазу и NADPH участвует в обезвреживании свободных радикалов, перекисей, продуктов перекисного окисления липидов, белков, нуклеиновых кислот и выведении их из организма в виде нетоксичных конъюгатов [1,2].

Глутатионовая антипероксидазная система эффективно защищает клетки от оксидативного стресса, при ее недостаточности или истощении возникают нарушения работы различных органов, повышается риск развития онкологических и ряда других заболеваний [3].

Глутатионовая антиоксидантная система – это единственная система, которая участвует в 3 линиях защиты из 4 и вносит существенный вклад в функционирование антиоксидантной защиты организма [4].

### 1.1.1 Глутатион

Глутатион ( $\gamma$ -глутамил-цистеинил-глицин, GSH) – внутриклеточный трипептид глутаминовой кислоты, цистеина и глицина с пептидной связью между  $\gamma$ -карбоксильной группой боковой цепи глутамата и аминогруппой цистеина [5,6].

GSH находится в клетке в восстановленной и окисленной формах, количество окисленной формы (GSSG) не превышает 1% от его общего внутриклеточного содержания [7]. 85–90% GSH находится в цитозоле, но некоторая его часть после синтеза оказывается в митохондриях, ядре, пероксисомах и эндоплазматическом ретикулуме [8].

Восстановленные и окисленные формы глутатиона (GSH и GSSG) действуют совместно с другими окислительно-восстановительными соединениями (например, NAD(P)H), регулируя и поддерживая окислительно-восстановительный статус клеток. Поддержание оптимального

соотношения GSH/GSSG в клетке является существенным для нормального ее функционирования и выживания [9,10].

### **Биосинтез глутатиона**

Глутатион синтезируется только в цитозоле, откуда он переносится в остальные компартменты клеток. Синтез GSH происходит посредством двухэтапного ферментативного процесса при участии АТФ-зависимых ферментов – глутамат-цистеинлигазы (GCL) и глутатионсинтазы (GS) [11].

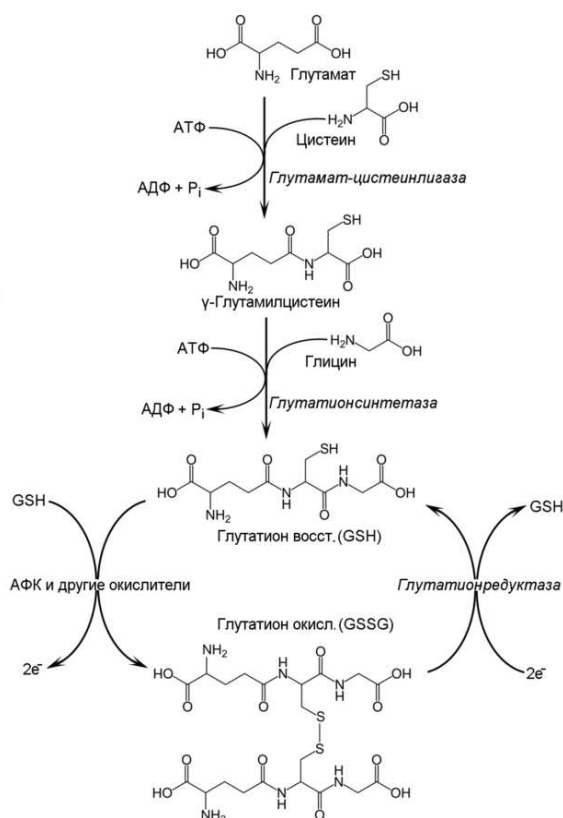


Рисунок 1 – Биосинтез глутатиона и его окислительно-восстановительные превращения [11]

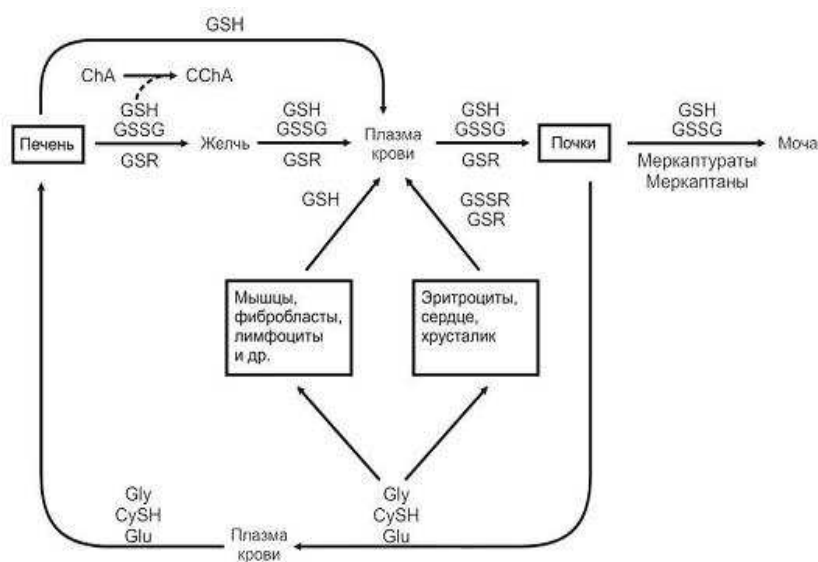
Первый этап катализируется глутамат-цистеинлигазой (GCL), которая состоит из каталитических и модифицирующих субъединиц (GCLC и GCLM). На этом этапе цистеин конъюгирует с глутаматом, образуя  $\gamma$ -глутамилцистеин (рис.1). На втором этапе синтез GSH катализируется GSH-синтетазой, которая присоединяет остаток глицина к С-концевой группе  $\gamma$ -глутамилцистеина, с образованием  $\gamma$ -глутамилцистеинилглицина или GSH. GS состоит из двух идентичных субъединиц и не подлежит ингибированию



[9]. Считается, что GS играет важную роль в определении общей синтетической способности GSH в тканях и / или в стрессовых условиях. При развитии патологий и заболеваний различного генеза синтез GSH нарушается [12,13].

Регуляция глутамилцистеинсинтетазы осуществляется 2 путями: конкурентным ингибированием глутатионом (восстановленный глутатион связывается с глутаматным сайтом фермента) и доступностью цистеина, избыток которого убиквитинируется и деградирует [13].

В иерархии различных видов транспорта GSH целесообразно различать три разных вида: внутриклеточный, межклеточный и межорганный. Характерная особенность внутриклеточного транспорта – зависимость от жидкостности мембран. Чем ниже жидкостность мембраны митохондрий, тем ниже концентрация восстановленного глутатиона [14]. Межорганный транспорт восстановленного глутатиона, его конъюгатов и окисленного глутатиона осуществляется 3 группами белков: белками множественной лекарственной резистентности, полипептидами, транспортирующими органические анионы и ГТФ-связывающими белками [15].



ChA – желчные кислоты, CChA – конъюгаты желчных кислот

Рисунок 2 – Межорганный обмен восстановленного глутатиона [15]

Все 3 группы белков транспортируют через клеточные мембраны в биологические жидкости, в том числе, в эритроциты, восстановленный и

окисленный глутатион, а также различные эндо- и ксенобиотики [15]. Межорганный обмен глутатиона реализуется циклом печень-почка (рис. 2).

### ***Биологическая роль глутатиона.***

Ключевым функциональным элементом в молекуле GSH является остаток цистеина, обеспечивающий наличие реакционно способной тиольной группы [11]. Данное соединение имеет большое значение для окислительно-восстановительных реакций. Благодаря своему строению и высокой внутриклеточной концентрации, GSH выполняет антиоксидантные функции, играя роль «ловушки» свободных радикалов, косубстрата в реакциях детоксикации пероксидов [7]. Также глутатион выступает в качестве агента, восстанавливающего окисленный глутаредоксин, необходимый для восстановления дисульфидов, участвует в поддержании клеточного редокс-статуса, в работе системы детоксикации, в синтезе эйкозаноидов, в регуляции многих механизмов клеточного сигналинга, в частности при регуляции клеточного цикла, экспрессии генов и апоптоза [13].

Адекватные уровни GSH необходимы для оптимального функционирования иммунной системы в целом и активации и дифференцировки Т-клеток в частности. GSH является повсеместным регулятором клеточного цикла как такового. GSH также выполняет важные функции в головном мозге в качестве антиоксиданта, нейромодулятора, нейромедиатора и фактора, способствующего выживанию нейронов [9].

Истощение GSH приводит к обострению поражения окислительным и нитрозативным стрессом; гипернитрозилированию; повышенному уровню провоспалительных медиаторов и воспалительного потенциала; снижению пролиферации клеток и синтеза ДНК [10].

### **1.1.2 Глутатионпероксидаза**

Глутатионпероксидаза (EC 1.11.1.9, GPx) – семейство селенсодержащих гомотетрамерных ферментов, в состав которых входит селеноцистеин, глутамин и триптофан.

GPx – это общее название семейства множественных изоферментов, которые катализируют восстановление  $H_2O_2$  или органических гидропероксидов до воды или соответствующих спиртов с использованием восстановленного глутатиона (GSH) в качестве донора электронов [16,17].

В настоящее время выявлено 8 изоферментных форм селенсодержащей глутатионпероксидазы. Изоформы кодируются разными генами, различаются по локализации в клетке, структуре субъединиц, первичной структуре и ферментативному действию [18].

Глутатионпероксидаза-1 – «классическая» глутатионпероксидаза, обнаруживается в эритроцитах, печени, кишечника, легких и почках. Является Se-содержащим ферментом с молекулярной массой 22кДа, состоящим из 4 идентичных субъединиц, каждая из которых включает атом селена. Ее функция заключается в защите клетки от индуцированного апоптоза и ингибировании 5-липоксигеназы в клетках крови. Гиперэкспрессия гена этой изоформы задерживает рост эндотелиальных клеток и повышает устойчивость к токсинам [19].

Глутатионпероксидаза-2 – изофермент кишечного эпителия, функцией которого является обезвреживание пероксидов липидов, поступающих с пищей в ЖКТ. По цитозольной локализации и идентичности аминокислотной последовательности ближе других к 1 изоформе. Важна для роста и дифференциации эпителиальных клеток. У человека локализована в печени и толстой кишке [20].

Глутатионпероксидаза-3 – внеклеточный изофермент плазмы крови. Представляет собой гликопротеин с 40-50% гомологией с глутатионпероксидазой-1. Данная изоформа преобладает в почках, особенно в эпителии проксимальных канальцев, обнаружена во многих органах, легких, придатка яичка, семявыносящих протоках, плаценте, семенных пузырьках, сердце и мышцах, молоке, амниотической и альвеолярной жидкости. Имеет ограниченную специфичность к восстановленному глутатиону, участвует в восстановлении циркулирующих пероксидов [21].

Глутатионпероксидаза-4 – изофермент, содержащий 1 атом селена. Участвует в ингибировании перекисного окисления липидов. Являясь липофильным соединением, активно взаимодействует с гидроперекисями фосфатидилхолина, холестерина, и эфиров холестерина в мембранах и липопротеинах низкой плотности. Богата остатками гидрофобных аминокислот, поэтому легко взаимодействует с мембранами и наполовину находится в них. Существуют две формы данной изоформы: короткая, высоко экспрессируемая в ядрышке, ядре, ретикулуме и цитозоле, и длинная, обладающая сигнальным пептидом [19].

GPX4 уникальна своей способностью снижать количество продуктов перекисного окисления липидов в биологических мембранах.

Глутатионпероксидаза-5 – эпидермальный андроген связанный белок. Экспрессируется и секретируется как селен-независимый мономер. Участвует в защите мембран сперматозоидов от перекисного окисления липидов.

Глутатионпероксидаза-6 – изофермент, функционирующий в зрительной системе [20].

Глутатионпероксидаза-7 – экспрессируется в эндоплазматическом ретикулуме. Активность этой изоформы обратно связана с пролиферацией клеток [19]. Данная изоформа была описана совсем недавно, содержит цистеин вместо селеноцистеина. Выполняет важную роль в снижении окислительного стресса, вызванного метаболизмом полиненасыщенных жирных кислот, восстанавливает гидропероксиды мембранных фосфолипидов до спирта [18].

Глутатионпероксидаза-8 – трансмембранный белок II типа с высоким сходством с GPx7. GPx8 – плохо изученный фермент, который находится в эндоплазматическом ретикулуме и является важным регулятором агрессивности опухоли. Несмотря на сходство с другими членами семейства GPx, GPx7 и GPx8 демонстрируют низкую активность, поскольку у них отсутствует GSH-связывающий домен [20].

GPx1, 2 и 3 действуют как гомотетрамеры, тогда как GPx4 функционирует как мономер [18]. GPx также имеют различные субклеточные местоположения: GPx1 был идентифицирован в цитозоле, ядре и митохондриях; GPx2 накапливается в цитозоле и ядре; GPx3 – это секретируемый белок, также обнаруживаемый в цитозоле, тогда как GPx4 присутствует в ядре, цитозоле, митохондриях и связан с мембранами [19]. Два других изофермента, GPx5 и GPx6, идентифицированные у млекопитающих, оба тесно связаны с GPx3. Однако GPx5 лишен селеноцистеина в активном центре и секретируется в придатке яичка [17]. GPx-6 представляет собой селен-зависимый GPx, обнаруженный в обонятельном эпителии [21].

### ***Роль глутатионпероксидазы в антиоксидантной системе***

GPx является важнейшим ферментом антиоксидантной системы, она утилизирует органические и неорганические пероксиды свободных жирных кислот, нуклеотидов, нуклеиновых кислот, белков, переводит пероксиды липидов в соответствующие спирты, используя в качестве субстрата восстановленный глутатион, а также защищает организм от оксидативного повреждения [22].

Наиболее высокая активность глутатионпероксидазы наблюдается в цитозоле (70%), в митохондриях млекопитающих (20-30%), печени, эритроцитах, надпочечниках [23]. Также значительное ее количество содержится в нижних дыхательных путях, где она нейтрализует поступающие из внешней среды озон, окись азота и другие активные вещества [24].

Активность глутатионпероксидазы в организме во многом определяет динамику патологических процессов и зависит от содержания восстановленного глутатиона, активности глутатионредуктазы и уровня NADPH в клетке [25].

В эритроцитах GSH-Px является наиболее эффективным антиоксидантом против оксидантного стресса и выполняет некоторые важные функции в фагоцитарных клетках [26].

### 1.1.3 Глутатион-S-трансфераза

Значительная роль в клеточных редокс-зависимых процессах принадлежит глутатион-S-трансферазе (EC 2.5.1.18, GST), образующей суперсемействоизоформ, катализирующих конъюгацию глутатиона с широким рядом неполярных соединений эндогенного и экзогенного происхождения [27].

Глутатион-S-трансфераза представляет собой цитоплазматический белок, ответственный за конъюгацию сульфгидрильной SH<sub>2</sub> группы с электрофильными атомами C, N, S, O молекул ксенобиотиков, с отщеплением GSH, детоксикацию, пролиферацию и миграцию этих молекул [28].

GST являются глобулярными белками с N-концевым смешанным спиральным и бета-спиральным доменом и полностью спиральным C-концевым доменом.

В суперсемействе GST выделяют три субсемейства изоформ: цитозольные, митохондриальные и микросомальные [29]. На долю цитозольных изоформ приходится примерно 90% активности GST в клетке.

*Цитозольные изоформы* в свою очередь подразделяются на 6 классов:  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\omega$ ,  $\pi$ ,  $\theta$  и  $\zeta$  на основе комбинации критериев, таких как специфичность субстрата / ингибитора, сходство первичной и третичной структуры и иммунологическая идентичность [30].

Цитозольные GST являются димерными, причем обе субъединицы принадлежат к одному классу GST, хотя и не обязательно идентичны. Размер мономеров составляет приблизительно 25 кДа [31]. Существуют внутриклеточно в виде гомодимера, который находится в обратимом равновесии со своими мономерными субъединицами. Каждая субъединица

состоит из двух доменов, соединенных небольшим неупорядоченным участком []. N-концевой домен (G-сайт) – место связывания субстратов – состоит из четырех  $\beta$ -складчатых слоев ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$  и  $\beta 4$ ), три из которых расположены антипараллельно, и трех  $\alpha$ -спиралей. C-концевой домен (H-сайт) – место связывания косубстрата – это полностью  $\alpha$ -спиральный участок, состоящий либо из 5, либо из 6  $\alpha$ -спиралей [29].

*Митохондриальные GST* включают всего 1 класс – каппа (GSTK1).

GSTK1 является гомодимером, содержит тиоредоксин-подобный домен и спиральный домен. Однако GSTK1 существенно отличается по своей вторичной структуре от других GST. Кроме того, димер GSTK1 имеет форму бабочки, а не V-образную щель, как в других классах. GSTK1 находится в ЭПР, а также в митохондриях, пероксисомах и гепатоцитах [31]. GSTK1 участвует в детоксикации перекисей липидов, созданных в пероксисоме, на основе активности пероксидазы по отношению к трем субстратам: трет-бутилгидропероксид, гидропероксид кумола и 15-S-гидроперокси-5,8,11,13-эйкозатетраеновая кислота.

*Микросомальные глутатион-S-трансферазы* подразделяются на 3 класса: MGST1, MGST2, MGST3 и структурно отличаются от других семейств тем, что они являются гомо- и гетеротримерами, а не димерами с единым активным сайтом. Микросомальные GST играют ключевую роль в эндогенном метаболизме лейкотриенов и простагландинов [32].

MGST-мембранно-ассоциированные белки, участвующие в метаболизме эйкозаноидов и глутатиона, в клеточной защите от токсичных, канцерогенных и фармакологически активных электрофильных соединений. MGST1 локализован в эндоплазматическом ретикулуме и митохондриях. Катализируют конъюгацию глутатиона с электрофилами и восстановление гидропероксидов липидов [28].

MGST2 катализируют конъюгацию лейкотриена A<sub>4</sub> и восстановленного глутатиона с образованием лейкотриена C<sub>4</sub>.

MGST3 обладает глутатион-зависимой пероксидазной активностью по отношению к гидропероксидам липидов.

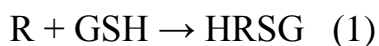
К основным функциям GST наряду с важной ролью в системе детоксикации относится участие в работе антиоксидантной системы благодаря способности восстанавливать органические гидроперекиси до спиртов, используя GSH в качестве кофактора [27].

За счет селен-независимой глутатион-пероксидазной активности GST восстанавливает гидроперекиси полиненасыщенных высших жирных кислот, фосфолипидов и холестерина [29].

Существенной является роль GST в регуляции клеточного сигналинга за счет белок-белковых взаимодействий с киназами. Примером таких взаимодействий является восстановление пероксидазной активности глутатионпероксидазы.

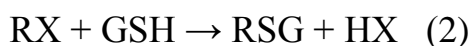
Большинство реакций осуществляемых глутатион-S-трансферазой можно разделить на 4 типа [28]:

1. Присоединение к субстрату (R) полной молекулы восстановленного глутатиона:



Так протекают реакции GSH с алкенами, особенно  $\alpha$ ,  $\beta$ -ненасыщенными карбонилами, например, с 4-гидроксиалкеналями, диэтилмалеатами и эпоксидами (например, эпоксидами бенз(a)пирена и холестерина), при этом кольцо эпоксида разрывается.

2. Нуклеофильное замещение:



3. Восстановление органических гидропероксидов и эндопероксидов до спиртов:



4. Изомеризация.

Механизм реакции включает промежуточное присоединение восстановленного глутатиона, который используется как кофермент.



В первых двух реакциях образуются тиоэфиры (GSR, конъюгаты глутатиона), при тиолизе которых образуются сложные тиоэфиры. в реакциях с электрофильной серой – смешанные дисульфиды. В реакциях третьего типа появляется окисленный глутатион GSSG. В реакциях четвертого типа GSH не тратится и работает как кофермент [27].

## **1.2 Роль системы глутатиона в обезвреживании АФК в эритроцитах**

Эритроциты – высокоспециализированные клетки крови, которые переносят кислород от легких к тканям и диоксид углерода из тканей к альвеолам легких. Являются самыми многочисленными форменными элементами крови.

Клеточная мембрана эритроцитов представляет собой липидный бислой, содержащий два типа мембранных белков: интегральные и периферические [33]. Интегральные мембранные белки более многочисленны, они проходят через всю толщину клеточной мембраны, связывают гемоглобин и служат якорными точками для цитоскелетной сети эритроцитов. Белки периферической мембраны проецируются только в цитоплазму, располагаясь на внутренней поверхности плазматической мембраны [34]. Эти белки связаны между собой множеством внутриклеточных филаментов, образуя сложную сетчатую цитоскелетную сеть вдоль внутренней клеточной мембраны, которая придает эритроцитам эластичность и прочность, позволяя им проходить даже через мельчайшие капилляры в нашем теле, не разрушаясь [35,36].

Наряду с липидами и белками в мембране присутствуют углеводы.

Плазматическая мембрана, обладает селективной проницаемостью для различных веществ, обеспечивает поддержание постоянства внутриклеточной среды, а также защищает клетку от воздействия неблагоприятных факторов внешней среды [37].

Цитоплазма эритроцитов заполнена гемоглобином - белком, который обратимо связывает и транспортирует кислород и углекислый газ [38]. Гемоглобин представляет собой тетрамер, который состоит из четырех полипептидных субъединиц, называемых цепями глобина. Существует четыре типа цепей глобина ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ), которые могут дать начало трем основным классам гемоглобина, называемым HbA, HbA2 и HbF [39]. Каждая субъединица глобина содержит атом железа, связанный с молекулой, называемой гемом. Железо играет основную роль в связывании газов, каждый гемоглобин может переносить до четырех молекул кислорода или углекислого газа [40].

Эритроциты содержат мощную ферментативную систему, предотвращающую токсическое действие активных форм кислорода и разрушение мембран эритроцитов. Антиоксидантная система эритроцитов представлена супероксиддисмутазой, каталазой, восстановленным глутатионом, глутатионпероксидазой, глутатион-S-трансферазой и глутатионредуктазой.

Восстановленный глутатион — главный антиоксидант эритроцитов, который участвует в поддержании структурной целостности мембраны эритроцитов, служит коферментом при восстановлении метгемоглобина в функционально активный гемоглобин, защите гемоглобина от действия разнообразных окислителей [41]. Состояние системы глутатиона в эритроцитах существенно влияет на активность гемоглобина и механизмы регуляции кислородтранспортной функции крови в целом. С помощью восстановленного глутатиона осуществляется детоксикация  $H_2O_2$  и гидроперекисей, которые образуются при реакции активных радикалов кислорода с ненасыщенными жирными кислотами мембраны эритроцитов [42,43].

В эритроцитах GSH присутствует в высоких концентрациях (2–10 мМ) и действует сам по себе или через глутатионпероксидазу в качестве

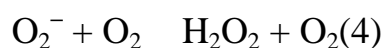
основного восстанавливающего источника для удаления низких концентраций перекиси водорода и липидов / алкилпероксидов [44].

Вторым важным защитным ферментом в эритроцитах является селеносодержащая глутатионпероксидаза. В эритроцитах содержится 2 изоформы данного фермента – GPx1 и GPx4.

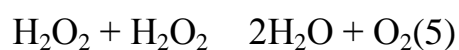
Глутатионпероксидаза-1 является Se-содержащим ферментом с молекулярной массой 22кДа, состоит из 4 идентичных субъединиц, каждая из которых включает атом селена. GPx1 участвует в модуляции клеточного оксидантного стресса и окислительно-восстановительных сигнальных реакциях, защищает клетки от индуцированного апоптоза и ингибирования 5-липоксигеназы [18].

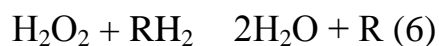
Глутатионпероксидаза-4 – изофермент, содержащий 1 атом селена. Участвует в ингибировании перекисного окисления липидов. Являясь липофильным соединением, активно взаимодействует с гидроперекисями фосфатидилхолина, холестерина, и эфиров холестерина в мембранах и липопротеинах низкой плотности. Богата остатками гидрофобных аминокислот, поэтому легко взаимодействует с мембранами и наполовину находится в них. Существуют две формы данной изоформы: короткая, высоко экспрессируемая в ядрышке, ядре, ретикулуме и цитозоле, и длинная, обладающая сигнальным пептидом [19].

Эритроциты также содержат высокоактивную супероксиддисмутазу, которая осуществляет дисмутацию  $O_2^-$  с образованием перекиси водорода [45]:



Образовавшаяся перекись водорода, частично нейтрализуется неферментативным путём при непосредственном участии аскорбата или других антиоксидантов (α-токоферол, восстановленный глутатион). Основное количество  $H_2O_2$  расщепляется в реакциях, катализируемых каталазой и глутатионпероксидазой [46]:





Важную роль в антиоксидантной системе эритроцитов играют и легкоокисляющиеся пептиды, содержащие аминокислоты с SH-группой: метионин, цистеин [47].

Немаловажный вклад в защиту клетки от органических радикалов вносят неферментативные антиоксиданты. Эффективными перехватчиками органических радикалов являются фенольные антиоксиданты, имеющие в структуре ароматическое кольцо, связанное с одной или несколькими гидроксильными группами [48]. Имеется несколько тысяч фенольных соединений, обладающих антиоксидантным эффектом: витамины группы E и K, триптофан, фенилаланин, убихиноны, большинство животных и растительных (каротиноиды, флавоноиды) пигментов.

Антиоксидантными свойствами обладают хелатные соединения, связывающие металлы переменной валентности (церулоплазмин, мочева кислота, трансферрин). Тем самым они препятствуют вовлечению их в реакции разложения перекисей, поскольку в присутствии металлов переменной валентности образование высокорекреационных радикалов усиливается [49,50].

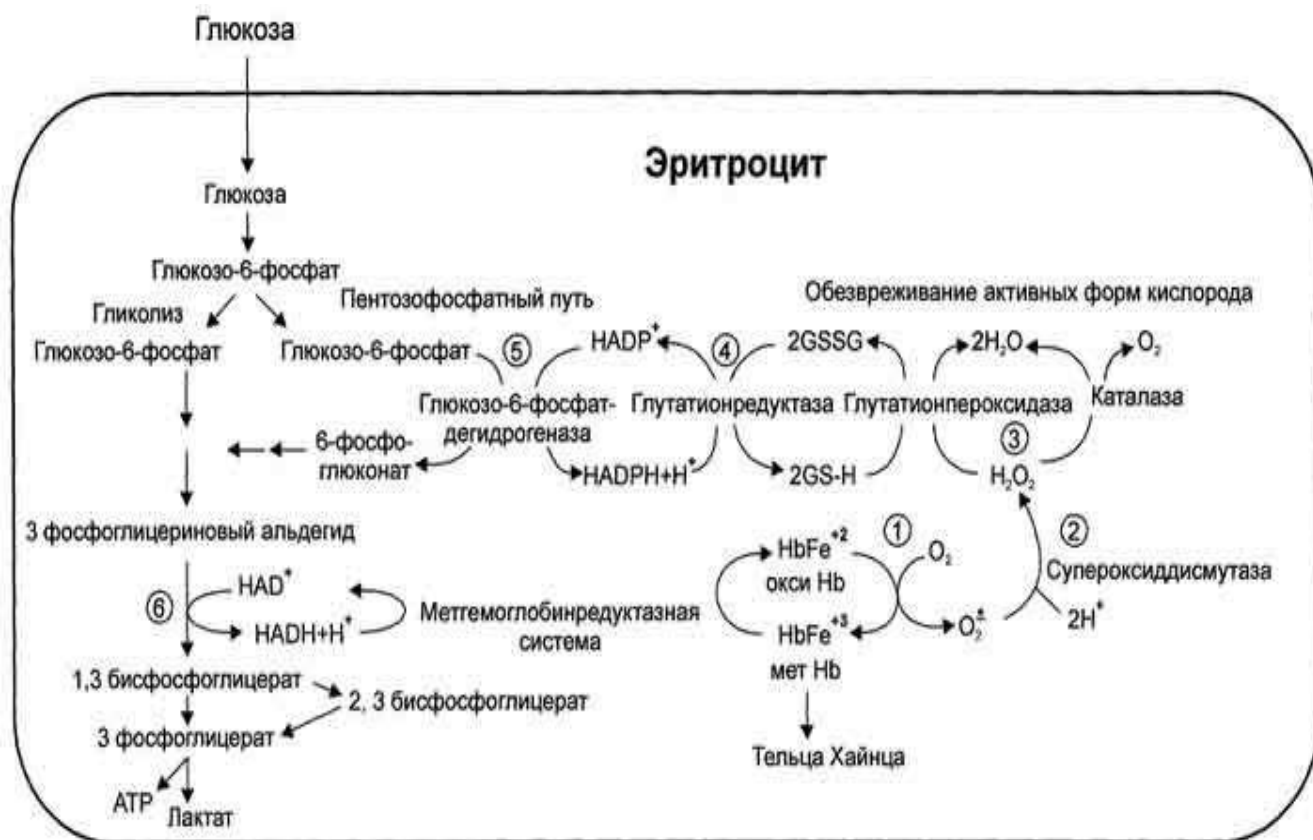
$\alpha$ -Токоферол оказывает защитное действие на мембраны эритроцитов от перекисного окисления липидов [51]. Аскорбиновая кислота может снижать уровень  $\text{O}_2^-$  и является важным регенератором  $\alpha$ -токоферола. Мочевая кислота также может действовать как антиоксидант и непосредственно улавливать  $\text{OH}^\cdot$ .

Постоянный источник активных форм кислорода в эритроцитах – неферментативное окисление гемоглобина в метгемоглобин (рис.3) [50]:



Рисунок 3 – Неферментативное окисление гемоглобина в метгемоглобин [50]

Восстановление метгемоглобина в гемоглобин осуществляется в эритроцитах метгемоглобинредуктазной системой, которая состоит из цитохрома – b<sub>5</sub> и флавопротеинацитохром – b<sub>5</sub>–редуктазы (рис.4) [52].



1–спонтанное окисление Fe<sup>2+</sup> в геме гемоглобин–источник супероксидного аниона в эритроцитах; 2 – супероксиддисмутаза; 3 – каталаза; 4 – глутатионредуктаза; 5 – NADPH, необходимый для восстановления глутатиона; 6 – NADH, необходимый для восстановления гемоглобина метгемоглобинредуктазной системой

Рисунок 4 – Образование и обезвреживание активных форм кислорода в эритроцитах [52]

Образование АФК также стимулируют различные окислители – нитраты, сульфаниламиды. Образующиеся АФК запускают реакции свободно-радикального окисления, которые приводят к разрушению мембраны и структуры липидов, белков, углеводов, а также других органических молекул и являются причиной старения и гемолиза эритроцитов [51].

При необратимых процессах окислительной модификации аминокислотных остатков эритроцитарных белков происходит окисление SH-групп белков, которые способны восстанавливаться в тиолтрансферазной реакции с участием глутатиона и компонентов, участвующих в его метаболизме (глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (G6PDG), глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы, глутатион-S-трансферазы, аскорбата, токоферола) [49].

### **1.3 Антиоксидантная система плазмы крови**

Плазма крови состоит на 90-93% из воды и 7-10% сухого остатка – белков, углеводов, липидов, органических метаболитов и электролитов.

Сухой остаток на 66-85% состоит из белков плазмы крови и 15-35% - органических метаболитов (углеводы, липиды, азотосодержащие продукты) и ~10% электролитов ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$  и др.) [47].

**Ферменты плазмы крови** разделяют на секреторные и клеточные. К секреторным относятся ферменты свертывания крови (в том числе компоненты глутатионовой антиоксидантной системы) и холинэстераза. Клеточные ферменты в плазме содержатся в очень малых количествах, т.к. не секретируются, а функционируют в клетках. Попадают они в кровь при различных патологических состояниях, поэтому их часто называют маркерными ферментами. К таковым относятся: АлАТ, АсАТ, ЛДГ, липаза, амилаза, кислая и щелочная фосфатазы, креатинфосфокиназа [44].

Цистеин, глутатион, цистеинилглицин и гомоцистеин являются наиболее распространенными низкомолекулярными тиолами, которые встречаются в плазме крови [38]. Эти молекулы метаболически взаимосвязаны, определяют окислительно-восстановительное состояние и представляют собой защиту от повреждений, опосредованных АФК и реактивными формами азота. Концентрация низкомолекулярных тиолов в плазме крови колеблется в диапазоне 0,1–20 мкМ [45].

Основная часть GSH в плазме происходит из печени, которая играет центральную роль в межорганном гомеостазе GSH, экспортируя почти весь синтезируемый GSH в плазму и желчь [14]. Нарушение регуляции синтеза GSH в печени оказывает системное влияние на гомеостаз GSH.

Тиол-дисульфидный баланс внеклеточных жидкостей вместе с относительным количеством низкомолекулярных тиолов влияет на физиологические клеточные функции, экспрессию молекул адгезии, функцию тромбоцитов, чувствительность к передаче сигналов, опосредованной оксидом азота, и клеточную пролиферацию [37].

Не менее важную роль в антиоксидантной системе плазмы крови играют глутатион-зависимые ферменты глутатионовой редокс-системы. В плазме крови присутствует глутатионпероксидаза-3 и 2 изоформы GST:  $\alpha$ -GST и  $\pi$ -GST [28,32].

Глутатионпероксидаза-3—внеклеточный изофермент, представляет собой гликопротеин. Имеет ограниченную специфичность к восстановленному глутатиону, участвует в восстановлении циркулирующих пероксидов [20].

$\alpha$ - и  $\pi$ -GST являются представителями малых цитозольных белков, в первую очередь участвующих в реакциях клеточной детоксикации.  $\alpha$ -GST составляет приблизительно 51 кДа, экспрессируется в гепатоцитах. До 80% от общего содержания  $\alpha$ -GST находится в печени.

#### **1.4 Преэклампсия**

Преэклампсия (ПЭ) - это многофакторное заболевание, развивающееся после 20-й недели беременности, характеризуется артериальной гипертензией в сочетании с протеинурией и нередко проявлениями полиорганной недостаточности [53]. ПЭ является основной причиной материнской заболеваемости и смертности во всем мире, от которой страдают 3–8% беременных женщин во всем мире [54,55]. Заболеваемость зависит от различных географических, пищевых или этнических факторов, а

также чаще встречается у пациентов, страдающих хронической гипертензией, диабетом или ожирением [53].

Преэклампсия остается частым и потенциально опасным осложнением беременности. При преэклампсии нарушаются функции жизненно важных органов: почек, головного мозга, печени, лёгких, что нередко приводит к развитию полиорганной недостаточности. Последствия перенесённой преэклампсии проявляются не только в раннем послеродовом периоде, но и в последующие годы жизни женщины [55].

При отсутствии лечения ПЭ может перерасти в опасные для жизни осложнения, такие как эклампсия (необъяснимое появление генерализованных судорог или судорожный синдром); HELLP-синдром (для которого характерны гемолиз эритроцитов, повышение ферментов печени, в частности АЛТ и АСТ, тромбоцитопения), ограничение роста плода и внутриутробная или перинатальная смерть [56,57].

Механизмы, участвующие в возникновении ПЭ, до сих пор неясны, но окислительный стресс и общее воспалительное состояние играют немаловажную роль в развитии данного материнского синдрома [58]. Плацента является основным источником синтеза свободных радикалов, материнские лейкоциты и материнский эндотелий также, вероятно, вносят свой вклад. Недавние сообщения предполагают важную роль NADPH оксидазы трофобласта плаценты в генерации свободных радикалов при преэклампсии [54].

Согласно последним исследованиям, механизмы, участвующие в возникновении ПЭ могут быть связаны с аномальной плацентой в результате нарушения маточно-плацентарного кровообращения, а также трофобластической инвазией спиральных артерий, что усиливает продукцию активных форм кислорода (АФК), вызывает окислительный стресс, гипоксию, снижение плацентарной перфузии и эндотелиальную дисфункцию [59].



Основной причиной аномальной плацентации и эндотелиальной дисфункции при ПЭ, по данным авторов, является сниженная биодоступность оксида азота (NO) – ключевого вазодилататора и регулятора артериального давления в плаценте [53]. В эндотелии и плаценте NO синтезируется эндотелиальной синтазой оксида азота [54]. Кроме того, NO участвует в плацентации и синтезе фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) [55]. Считается, что окислительный стресс играет ключевую роль в снижении биодоступности NO в патофизиологии ПЭ *через* несколько механизмов, включая образование пероксинитрита (ONOO<sup>-</sup>), а также реакцию NO с супероксидом анион-радикала O<sub>2</sub><sup>-</sup> [56].

Нарушение метаболизма глутатиона в тканях плаценты вносит свой вклад в патогенез преэклампсии.

ПЭ характеризуется чрезмерной и прогрессирующей активацией иммунной системы наряду с увеличением провоспалительных цитокинов и антиангиогенных факторов в фетоплацентарной единице и в материнском эндотелии [57,58].

Патофизиология ПЭ включает хроническую активацию материнской иммунной системы, характеризующуюся длительным воспалительным ответом во время патологической беременности [59,60].

Окислительный стресс играет ключевую роль на протяжении всей патофизиологии ПЭ, в большей степени в раннем начале, чем в позднем, потому что плохая маточно-плацентарная перфузия, возникающая в результате дефектного ремоделирования спиральной артерии, генерирует большое количество АФК [61,62]. В результате окислительного стресса высвобождаются цитокины и антиангиогенные факторы в кровоток матери, что впоследствии приводит к эндотелиальной дисфункции и воспалению, а также к снижению биодоступности NO и дисфункциональной активности eNOS в плаценте [63,64]. Причины этих событий полностью не определены.

Нарушение трофобластической инвазии, вместе с последующей плохой плацентой и сниженной плацентарной перфузией, приводит к

повторяющимся волнам гипоксии / реоксигенации, которые стимулируют выработку АФК в межворсинчатой камере [65]. Производство АФК включает стимуляцию дыхательной цепи митохондрий и активацию ферментов, продуцирующих АФК, включая НАДФН-оксидазу и ксантинооксидазу [66,67]. Происходит активация моноцитов и нейтрофилов, которые продуцируют провоспалительные цитокины, ангиогенные факторы и микрочастицы и стимулируют продукцию АФК [68,69].

### **1.5 Роль окислительного стресса в развитии преэклампсии**

Окислительный стресс – нарушение равновесия между количеством образующихся АФК и антиоксидантными защитными механизмами клетки [70].

Чтобы противодействовать окислительному стрессу, существуют многочисленные антиоксиданты, поддерживающие гомеостаз клеток и тканей. Система глутатиона является наиболее важной антиоксидантной защитой для жизнеспособности и нормального функционирования клеток. Соотношение GSH: GSSG является надежным маркером окислительно-восстановительного гомеостаза клеток [71,72].

Наиболее распространенными активными формами кислорода являются супероксид ( $O_2^{\cdot-}$ ), пероксид водорода ( $H_2O_2$ ) и гидроксильный радикал ( $\cdot HO$ ) (рис.5) [73].

Повышенный окислительный стресс запускает определенный "метаболический каскад", в результате которого происходят неконтролируемые процессы перекисного окисления липидов, нарушается структура и репликация ДНК, белки, в том числе и ферменты, теряют биологическую активность, что в конечном итоге приводит к гибели клеток [74]. В результате перекисного окисления полиненасыщенных жирных кислот образуется огромное количество липопероксидов, гидропероксидов и альдегидов, производных перекисного окисления липидов, которые вызывают клеточную дисфункцию, воспаление и апоптоз [73].

Окисление полиненасыщенных жирных кислот приводит к образованию продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), в том числе альдегидов, производных окисления липидов, включая акролеин, 4-гидрокси-2-ноненаль, малоновый диальдегид, 4-оксо-2-ноненаль, которые ковалентно связываются с нуклеофильными сульфгидрильными и первичными аминогруппами белков, образуя основания Шиффа, аддукты Михаэля и сшивки белков [75].

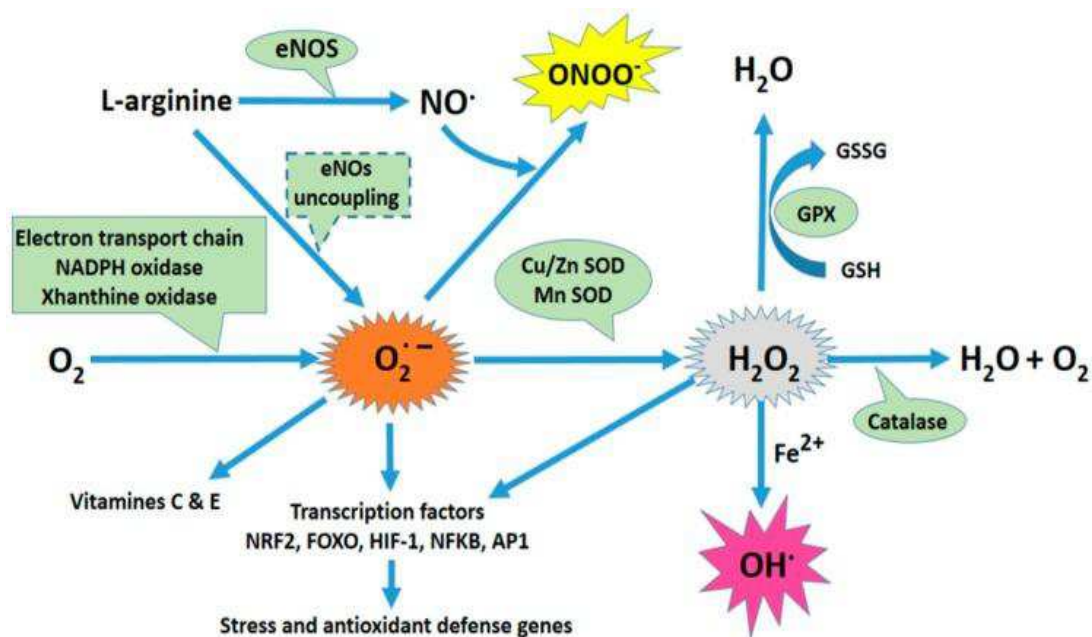


Рисунок 5 – Схема основных источников окислительного стресса и его антиоксидантных механизмов [73]

Модификация белков с помощью ПОЛ зависит от их природы, экспрессии и конформации, интенсивности и продолжительности окислительного стресса, типа клеток, локальной концентрации ПОЛ и генерирует различные биологические ответы от экспрессии защитных и адаптивных факторов до белковой дисфункции, воспаления, старения и апоптоза [76].

АФК способны реагировать и окислять любые биологические молекулы, такие как белки, липиды и нуклеиновые кислоты, вызывая структурные и функциональные изменения [72]. В физиологических

условиях такие окислительные события / реакции предотвращаются антиоксидантной защитой, опосредованной ферментными и неферментативными антиоксидантами, которые конкурируют с окисляемыми субстратами, таким образом, значительно задерживая или ингибируя их окисление. Дополнительная система защиты обеспечивается ферментативным удалением или восстановлением поврежденных биомолекул до их накопления, что может привести к изменениям клеточного метаболизма [74]. Система антиоксидантной защиты также позволяет опосредовать передачу клеточных сигналов и окислительно-восстановительную регуляцию, что впоследствии приводит к повышенной экспрессии генов различных антиоксидантных белков, которые модулируют соответствующую индукцию процессов адаптации или, альтернативно, активацию механизмов гибели клеток [65].

Во время нормальной беременности увеличивается продукция АФК, включая NO, супероксид анион-радикала  $O_2^{\bullet -}$ , перекись водорода ( $H_2O_2$ ), гидроксильный радикал  $\bullet OH$  и пероксинитрит  $ONOO^-$  [66].

АФК связаны с быстрым развитием плаценты [71] и в основном являются результатом повышенной активности митохондрий в ворсинчатых и вневорсинчатых трофобластах. Плаценте требуется энергия для собственного метаболизма и ремоделирования, а также для синтеза субстратов и гормонов, необходимых для развития плода. Более 50–70%  $O_2$ , поступающего из маточного кровотока, используется плацентой, а потребности в энергии возрастают с ростом плода [70].

Умеренные уровни АФК участвуют в пролиферации и созревании клеток, необходимых для поддержания беременности и развития эмбриона [75]. АФК также участвуют в дегенерации ворсинчатой ткани в периферической области, что важно для образования плацентарных оболочек [76].

Согласно многочисленным исследованиям, степень окислительного стресса у пациенток с ПЭ значительно выше, чем при нормальной беременности [77].

### **1.6 Основные источники образования АФК при преэклампсии**

Источниками образования АФК при преэклампсии служат активность ряда ферментов, в частности NADPH-оксидазы и ксантинооксидазы, а также митохондриальная утечка электронов [71].

NADPH-оксидаза представляет собой многокомпонентный белковый комплекс, который продуцирует  $O_2^{\bullet -}$  путем передачи одного электрона к кислороду от NADPH к  $NADP^+$  [72]. Комплекс NADPH-оксидазы включает цитозольные белки (p47phox, p67phox и p40phox) и связанные с мембраной белки (p22phox и gp91phox). Во время беременности, умеренные дозы  $O_2^{\bullet -}$  производимые NADPH -оксидазами, могут помочь регулировать сосудистый тонус, в то время как высокий уровень генерации  $O_2^{\bullet -}$  приводит к окислительному стрессу и способствует сосудистой дисфункции [60].

Ксантинооксидаза (ксантинооксидоредуктаза) – еще один важный источник  $O_2^{\bullet -}$  при ПЭ [75]. Ксантинооксидоредуктаза существует в двух взаимопревращаемых, но различных формах, различают конститутивно экспрессируемую ксантиндегидрогеназу и ксантинооксидазу, которая активируется окислением тиоловых групп и превращает ксантиндегидрогеназу в ксантинооксидазу [54]. Ксантинооксидаза представляет собой железо и молибден-содержащий флавопротеин, который окисляет гипоксантин от метаболитов нуклеиновой кислоты до ксантина, а ксантин до мочевой кислоты, производя  $O_2^{\bullet -}$  и  $H_2O_2$  [76,77]. Его активность невысока в нормальных условиях, но может быстро стимулироваться воспалительными цитокинами и условиями ишемии / реперфузии, как это наблюдается при ПЭ [74]. Ксантиндегидрогеназа переносит электроны от гипоксантина и ксантина к  $NAD^+$ , генерирует NADH и мочевую кислоту.

Поскольку у пациентов с ПЭ часто наблюдается гиперурикемия, повышенная активность ксантиндегидрогеназы может, способствовать выработке высоких уровней  $O_2^{\cdot-}$  и окислительному стрессу при ПЭ.

Производство АФК в митохондриях плаценты и окислительные повреждения увеличиваются при ПЭ в ответ на события гипоксии / реоксигенации в зависимости от степени тяжести ПЭ [73]. Гипоксия/реоксигенация стимулирует выработку митохондриального  $O_2^{\cdot-}$  комплексами I и II дыхательной цепи, который быстро дисмутируется в  $H_2O_2$  митохондриальной MnSOD или CuZnSOD [71]. Затем  $H_2O_2$  нейтрализуется (восстанавливается до воды) глутатионпероксидазой (GPx) или каталазой [70,76]. Передача сигналов митохондриальных АФК в плаценте умеренной ПЭ может стимулировать компенсаторные антиоксидантные ответы, экспрессию генов и активацию разобщающих белков, что позволяет поддерживать функцию митохондрий, тогда как при более тяжелых клинических формах ПЭ в цитотрофобластах и синцитиотрофобластах наблюдаются митохондриальная дисфункция и измененные митохондриальные процессы, что в значительной степени способствует развитию ПЭ [77].

## **2 Материалы и методы**

### **2.1 Объект исследования**

В качестве объекта исследования использовали эритроциты и плазму крови 25 относительно здоровых небеременных женщин и 51 женщины с беременностью. Образцы крови были предоставлены Красноярским краевым центром крови №1 и Государственным бюджетным учреждением здравоохранения Республики Хакасия «Республиканским клиническим перинатальным центром» г. Абакана. Взятие крови осуществлялось с 35-40 недели беременности. Средний возраст беременных женщин во всех исследуемых группах составил  $29 \pm 1,1$  лет. Критериями для включения в группу с преэклампсией служили показатели артериального давления, наличие протеинурии и отеков.

Каждый пациент подписал согласие на участие в исследовании, которое было одобрено Локальным этическим комитетом ФГБУ «НИИ медицинских проблем Севера» СО РАН.

Все исследования выполнены в соответствии с Хельсинкской Декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. №266.

### **2.2 Приготовление упакованных эритроцитов и получение плазмы крови**

Кровь забиралась из локтевой вены обследуемых в вакутейнеры с гепарином, в качестве антикоагулянта для предотвращения свертывания крови. Гепаринизированную кровь центрифугировали 10 мин при 1700 g и 4°C. После центрифугирования отбирали плазму крови, которая сохранялась для дальнейших исследований. Плазму хранили при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ ,

небольшими порциями-аликвотами (0,2–0,5 мл). Размораживали аликвоты один раз, использовали в опытах по мере необходимости, поскольку при повторной разморозке-заморозке активность ферментов плазмы крови резко падает.

Для приготовления упакованных эритроцитов клеточную массу, оставшуюся после отбора плазмы, трижды отмывали физиологическим раствором и центрифугировали 10 мин при 1700 g. Последнее центрифугирование выполнялось в течение 20 минут для более плотной упаковки клеток. Полученные супернатанты отбрасывали, клетки крови хранили в виде аликвот при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  до использования [78].

### **2.3 Определение содержания гемоглобина**

Принцип метода основан на том, что гемоглобин крови, взаимодействуя с железосинеродистым калием, окисляется в метгемоглобин. Метгемоглобин в свою очередь образует с ацетонциангидриномгемиглобинцианид (цианметгемоглобин), оптическая плотность которого при 540 нм пропорциональна концентрации Hb в образце крови. Определение содержания гемоглобина осуществляли с помощью набора реагентов фирмы «Витал-диагностикум»

Реактивы:

1. Трансформирующий реагент (натрий углекислый кислый, 1,0 г; калий железосинеродистый, 200 мг);
2. Калибровочный раствор гемоглобина с концентрацией 120 г/л;

Ход работы:

К 5 мл трансформирующего раствора добавляют 0,02 мл гемолизата, приготовленного в соотношении 1:2 (эритроциты: дистиллированная вода, охлажденная до  $0^{\circ}\text{C}$ ), тщательно перемешивают. Через 10 мин проводят измерение оптической плотности в кювете с толщиной слоя 1 см при длине волны 540 нм против трансформирующего раствора. Содержание гемоглобина (г/л) рассчитывают по формуле [78]:



$$Hb(z/l) = D_{540} \cdot 367,7$$

## 2.4 Определение содержания общего белка в плазме крови

Принцип метода: белок образует окрашенный комплекс с ионами меди в щелочной среде. Интенсивность окраски при длине волны 540 нм прямо пропорциональна концентрации общего белка в пробе [79].

Определение содержания общего белка в плазме крови проводили с помощью набора «Витал-диагностикум», в который входит:

1. Биуретовый реагент- 2×100 мл
  - Натрия гидроокись - 0,5 моль/л
  - Калий-натрий виннокислый – 80 ммоль/л
  - Калий йодистый – 75 ммоль/л
  - Сульфат меди – 30 ммоль/л
2. Калибратор 1×2,0 мл
  - Альбумин сывороточный – 70 г/л
  - Натрий хлористый – 154 ммоль/л

Для приготовления рабочего реагента необходимое количество Биуретового реагента разводят бидистиллированной или деионизированной водой в 5 раз. Стабильность рабочего реагента должна составлять не менее 6 месяцев при температуре 18-25°C, в темном месте, в плотно закрытой посуде.

Ход работы:

В опытные, калибровочные и холостые пробы вносят рабочий реагент по 5,0 мл (). В опытные пробирки добавляют 0,1 мл плазмы крови. Затем в калибровочную пробу вносится 0,1 мл калибратора, а в холостую - 0,1 мл воды. Пробы тщательно перемешивают и инкубируют 30 мин при 18-25°C. Измерение оптической плотности опытной ( $E_{оп}$ ) и калибровочной ( $E_k$ ) проб проводят против холостой пробы при длине волны 540 нм [79].

Расчетная формула:

— , где:

$C$  – концентрация белка в образце, выражается в г/л

$E_0$  – оптическая плотность опытной пробы;

$E_k$  – оптическая плотность контрольной пробы;

70 – коэффициент пересчета.

## 2.5 Определение содержания восстановленного глутатиона

Содержание восстановленного глутатиона определяют по взаимодействию восстановленного глутатиона с 5,5'- дитио-бис(нитро)бензойной кислотой (ДТНБК). В результате реакции образуются окрашенные в желтый цвет анионы 2-нитро-5-тиобензоата. Увеличение концентрации желтого аниона в ходе данной реакции регистрируется спектрофотометрически при длине волны 412 нм [78].

Реактивы:

1. Осаждающий раствор (1,67 г ледяной ортофосфорной кислоты, 0,2 г ЭДТА и 30 г хлористого натрия растворяют в дистиллированной воде и доводят до метки 100 мл).

2. Фосфатный буфер (0,3 М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ).

3. 1 %-ный раствор цитрата натрия.

4. 0,02%-ный раствор дитионитро(бис)бензойной кислоты, приготовленный на 1 %-ном растворе цитрата натрия.

Ход работы:

Гемолизат готовят добавлением 0,1 мл эритроцитов к 0,9 мл дистиллированной воды, охлажденной до 0 °С. Для осаждения белков к гемолизату добавляют 1,5 мл осаждающего раствора. В случае использования плазмы крови разведение не требуется. Пробы тщательно перемешивают и после 20-мин стояния при комнатной температуре фильтруют через крупнопористый фильтр. В спектрофотометрическую кювету с толщиной слоя 1,0 см помещают 0,5 мл фильтрата, добавляют 2,0 мл фосфатного буфера. Поскольку раствор ДТНБК имеет слабожелтую окраску, параллельно с опытной пробой готовят контрольную, содержащую

вместо фильтрата осаждающий раствор, разведенный дистиллированной водой в отношении 2:5. Пробы фотометрируют до и после добавления ДТНБК. Затем в контрольную и опытные пробы вносят по 0,25 мл раствора ДТНБК. Сразу же после перемешивания должна появиться желтая окраска из-за образования дисульфида глутатиона с ДТНБК. Пробы фотометрируют при длине волны 412 нм в кювете с толщиной слоя 1,0 см против воздуха [78].

## 2.6 Определение активности глутатионпероксидазы

Активность фермента оценивают по изменению содержания GSH в пробах до и после инкубации с модельным субстратом в ходе цветной реакции с ДТНБК [78].

Реактивы:

1. 0,1 М трис-НСl буфер с 0,01%-ным содержанием ЭДТА, pH = 8,5.
2. Сложный буфер (78 мг азида натрия, 100 мг восстановленного глутатиона растворяют в 100 мл 0,1 М трис-НСl буфера с 0,01%-ным содержанием ЭДТА pH = 8,5). Готовится новый реактив перед каждым определением.
3. 0,14%-ный раствор ГПТБ (трет-бутилгидропероксида, коммерческий препарат, готовится разведением 10 мкл ГПТБ в 5 мл дистиллированной воды). Перед каждым определением готовится новый реактив.
4. 20%-ный раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ).
5. Метанол.
6. 0,4%-ный раствор ДТНБК, разведенный на метаноле.

Ход работы:

Отмытые и упакованные эритроциты гемолизируют охлажденной до 0°C водой в соотношении 1:200. В случае использования плазмы крови разведение не требуется. 0,2 мл гемолизата смешивают с 0,73 мл сложного буфера и термостатируют 10 мин при 37 °C. Реакцию инициируют внесением в реакционную смесь 0,07 мл раствора ГПТБ. Строго по секундомеру через 5

мин инкубации при 37°C реакцию останавливают добавлением 0,2 мл раствора ТХУ. В контрольные пробы раствор ГПТБ вносят после осаждения белка ТХУ. Полученные пробы центрифугируют при 1700 g в течение 10 мин. Супернатант используют для определения количества восстановленного глутатиона. Для этого к 0,1 мл супернатанта добавляют 2,65 мл 0,1 М Трис-НСl буфера и 0,025 мл раствора ДТНБК. После перемешивания пробы фотометрируют на спектрофотометре при длине волны 412 нм в кювете с длиной оптического пути 1,0 см против дистиллированной воды.

Активность фермента в эритроцитах выражают в микромолях GSH, окисленного за 1 мин на грамм Hb, используя коэффициент молярной экстинкции ( $13600 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) окрашенного аниона, образующегося при взаимодействии GSH с ДТНБК [78].

## 2.7 Определение активности глутатион-S-трансферазы

Активность глутатион-S-трансферазы определяют по скорости образования глутатион-S-конъюгатов между GSH и 1-хлор-2,4-динитробензолом (ХДНБ) [78]:



Увеличение концентрации конъюгатов в ходе реакции регистрируют спектрофотометрически при длине волны 340 нм.

Реактивы:

1. 0,1 М калий-фосфатный буфер, pH = 6,5.
2. 0,015 М раствор восстановленного глутатиона.
3. Метанол.
4. 0,015 М раствор ХДНБ (готовится на абсолютном метаноле).

Ход работы:

В кювету с длиной оптического пути 1,0 см помещают 2,5 мл калий-фосфатного буфера (pH = 6,5), добавляют 0,2 мл раствора восстановленного глутатиона и 0,1 мл гемолизата или плазмы крови. Реакцию инициируют внесением в кювету 0,2 мл раствора ХДНБ. Сразу же после этого

перемешивают пробу и зануляют прибор. Регистрацию оптической плотности проводили в течение 2 мин при температуре 25°C и длине волны 340 нм [78].

## **2.8 Статистическая обработка результатов**

По результатам проведенных исследований была сформирована база данных, которую использовали для проведения статистического анализа с помощью пакета прикладных программ Statistica 13 и Microsoft Office Excel 2016. Рассчитывали медиану и интерквартильный разброс (С25-С75 процентиля). Достоверность различий между обследованными группами оценивали по критерию Манна-Уитни (при  $p < 0,05$ ).

### **3 Результаты исследований и их обсуждение**

[изъято 10 страниц]

## Заключение

В ходе исследований по изучению состояния глутатионовой антиоксидантной системы в эритроцитах и плазме крови беременных с преэклампсией умеренной степени тяжести было установлено:

1. Значительное повышение уровня восстановленного глутатиона в эритроцитах женщин с умеренной преэклампсией по сравнению с соответствующими показателями в контрольных группах (в 2,07 и 1,32 раза соответственно).

2. В эритроцитах женщин с патологией беременности активность глутатион-S-трансферазы существенно увеличивается относительно групп контроля (в 2,36 и 1,4 раза). Активность глутатионпероксидазы в аналогичной группе беременных увеличивается менее значительно (в 1,32 и 1,1 раза) по сравнению с группами относительно здоровых небеременных женщин и женщин с нормальным течением беременности.

3. В плазме крови беременных с умеренной преэклампсией содержание восстановленного глутатиона повышается в большей степени, чем в эритроцитах (в 2,5 и 1,6 раза относительно групп контроля).

4. Активность глутатион-S-трансферазы в плазме крови женщин с патологией беременности увеличивается более существенно, чем в эритроцитах (в 2,7 и 1,91 раза относительно групп контроля). В плазме крови беременных с преэклампсией умеренной степени тяжести активность глутатионпероксидазы увеличивается в большей степени, чем в эритроцитах, по сравнению с показателями в контрольных группах (в 1,55 и 1,24 раза соответственно).

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Cheng, S.B. Changes of Oxidative Stress, Glutathione, and Its Dependent Antioxidant Enzyme Activities in Patients with Hepatocellular Carcinoma before and after Tumor Resection / H.T. Liu, S.Y. Chen, P.T. Lin // *Journal Biochimica et Biophysica Acta*. – 2017. – V. 12, I. 1. – P. 1213-1220.
2. Sies, H. Glutathione and its role in cellular functions / H. Sies // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2019. – V. 27, I. 10. – P. 916–921.
3. Калинина, Е.В. Роль глутатиона, глутатионтрансферазы и глутаредоксина в регуляции редокс-зависимых процессов / Е.В. Калинина, Н. Н. Чернов, М. Д. Новичкова // *Успехи биологической химии*. – 2014. – Т. 54. – С. 300-306.
4. Bachhawat, A. K. The glutathione cycle: Glutathione metabolism beyond the  $\gamma$ -glutamyl cycle / A. K. Bachhawat, S. Yadav // *International Union Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. – 2018. – V. 70, I. 7. – P. 585-592.
5. Robaczewska, J. Role of glutathione metabolism and glutathione-related antioxidant defense systems in hypertension / J. Robaczewska, K. Kedziora-Kornatowska, M. Kozakiewicz, E. Zary-Sikorska // *Physiol Pharmacol*. – 2016. – V. 67, I. 3. – P. 331-337.
6. Lushchak, V. I. Glutathione Homeostasis and Functions: Potential Targets for Medical Interventions / V. I. Lushchak // *Journal of Amino Acids*. – 2012. – V. 2012.
7. Deponte, M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes / M. Deponte // *Journal Biochimica et Biophysica Acta*. – 2013. – V.1830, I. 5. – P. 3217–3266.
8. Sampath, V. Prooxidant effects of glutathione in aerobic hemoglobin solutions. Superoxide generation from uncoordinated dioxygen / V. Sampath, W. S. Caughey // *Journal of the American Chemical Society*. – 2016. – V. 107, I. 13. – P. 4076–4078



9. Lu, S. C. Regulation of glutathione synthesis / S. C. Lu // *Molecular Aspects of Medicine*. – 2009. – V. 30, I. 2. – P. 42–59.
10. Fernandez-Checa, J. C. Hepatic mitochondrial glutathione: transport and role in disease and toxicity / J. C. Fernandez-Checa, N. Kaplowitz // *Toxicology and Applied Pharmacology*. – 2005. - V. 204, I. 3. - P. 263–273.
11. Garrido, N. Cisplatin-mediated impairment of mitochondrial DNA metabolism inversely correlates with glutathione levels / N. Garrido, A. Pérez-Martos, M. Faro // *Biochemical Journal*. – 2018. – V. 414, I. 1. – P. 93–102.
12. Townsend, D. M. The importance of glutathione in human disease / D. M. Townsend, K. D. Tew, H. Tapiero // *Biomedicine and Pharmacotherapy*. – 2013. – V. 57, I. 3. – P. 145–155.
13. Marí, M. Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant / M. Marí, A. Morales, A. Colell, C. García-Ruiz // *Antioxidants and Redox Signaling*. – 2009. - V. 11, I. 11. – P. 2685–2700.
14. Толпыгина, О.А. Роль глутатиона в системе антиоксидантной защиты / О.А. Толпыгина // *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*. – 2012. – Т. 2, № 2. – С. 5-9.
15. Кулинский, В.И. Система глутатиона: синтез, транспорт глутатионтрансферазы, глутатионпероксидазы / В.И. Кулинский, Л.С. Колесниченко // *Биомедицинская химия*. – 2016. – Т. 55, № 3. – С. 255-277.
16. Матейкович, П.А. Глутатионпероксидаза как фермент системы антиоксидантной защиты клеток / П.А. Матейкович // *International Scientific Journal*. – 2016. – Т. 3, № 6. – С. 3–28.
17. Conrad, M. Glutathione Peroxidases / M. Conrad, J. Pedro, F. Angeli // *Comprehensive Toxicology*. – 2018. – V. 10. – P. 260-276.
18. Brigelius-Flohe, R. Glutathione peroxidases / R. Brigelius-Flohé, M. Maiorino // *Biochim Biophys Acta*. – 2013. – V. 1830, I. 5. – P. 3289-303.
19. Peng, X. Evaluation of Glutathione Peroxidase 4 role in Preeclampsia / X. Peng, Y. Lin, J. Li, M. Liu // *Scientific Reports*. – 2016. – V. 19, I. 6. – P. 33300.

20. Lei, X. G. Metabolic Regulation and Function of Glutathione Peroxidase-1 / X. G. Lei, W. H. Cheng, J. P. McClung // Annual Review of Nutrition. – 2007. – V. 27. – P. 41-46.
21. Nirgude, S. Insights into the role of GPX3, a highly efficient.. plasma antioxidant / S. Nirgude, B. Choudhary // Biochemical Pharmacology. – 2021. – V. 184.
22. Altamura, S. Glutathione peroxidase 4 and vitamin E control reticulocyte maturation, stress erythropoiesis and iron homeostasis / S. Altamura, N. M. Vegi, P. S. Hoppe, T. Schroeder // Haematologica. – 2020. – V. 105, I. 4. – P. 937–950.
23. Peng, X. Evaluation of Glutathione Peroxidase 4 role in Preeclampsia / X. Peng, Y. Lin, J. Li, M. Liu // Scientific Reports. – 2016. - V. 6.
24. Wang, L. Glutathione Peroxidase 7 Utilizes Hydrogen Peroxide Generated by Ero1 $\alpha$  to Promote Oxidative Protein Folding / L. Wang, L. Zhang, Y. Niu, R. Sitia // Antioxid Redox Signal. – 2014. – V.1, I. 20(4). – P. 545–556.
25. Burns, J. Metabolic pathways of the Warburg effect in health and disease: perspectives of choice, chain or chance / J. Burns, G. Manda. International Journal of Molecular Sciences. – 2017. – V. 18, I. 12. – P. 2755.
26. Mannervik, B. Nomenclature for human glutathione transferases / B. Mannervik, Y.C. Awasthi, P.G. Board, J.D. Hayes and [et al] // Biochemical Journal. - 2016. – V. 282, I. 1. – P. 305–306.
27. Wu, B. Human cytosolic glutathione transferases: structure, function, and drug discovery / B. Wu, D. Dong // Trends in Pharmacological Sciences. – 2017. – V.33, I. 12. – P. 656–668.
28. Bocedi, A. Glutathione Transferase P1-1 an Enzyme Useful in Biomedicine and as Biomarker in Clinical Practice and in Environmental Pollution / A. Bocedi, A. Noce, G. Marrone, G. Noce // Nutrients. – 2019. – V. 11, I. 8. – P. 1741.

29. Brock, J. Structural Insights into Omega-Class Glutathione Transferases: A Snapshot of Enzyme Reduction and Identification of a Non-Catalytic Ligandin Site / J. Brock, P. G. Board, A. J. Oakley // Plos one. – 2013.
30. Sheehan, D. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily / D. Sheehan, G. Meade, V. M. Foley, C. A. Dowd // Biochem J. – 2017. – V. 15, I. 360. – P. 1–16.
31. Dong, S. C. Glutathione S-transferase  $\pi$ : a potential role in antitumor therapy / S. C. Dong, H. H. Sha, X. Y. Xu, T. M. Hu // Drug Des Devel Ther. – 2018. – V. 12. – P. 3535–3547.
32. Henderson, C. J. Pi-class glutathione S-transferase: regulation and function/ C. J. Henderson, A. W. McLaren, G. J. Moffat, E. J. Bacon, C. R. Wolf // Chem Biol Interact. – 2008. – V. 24, I. 12. – P. 69-82.
33. Липунова, Е.А. Система красной крови: Сравнительная физиология / Е.А. Липунова, М.Ю. Скоркина. – Белгород: БелГУ, 2014. – 216 с.
34. Kuhn, V. Red Blood Cell Function and Dysfunction: Redox Regulation, Nitric Oxide Metabolism, Anemia / V. Kuhn, L. Diederich, T.C. Stevenson Keller IV, C. M. Kramer // Antioxidants & redox signaling. – 2017. – V. 26, I. 13.
35. Giustarini, D. Red blood cells as a physiological source of glutathione for extracellular fluids / D. Giustarini, A. Milzani, I. Dalle-Donne, R. Rossi // Blood Cells Molecules and Diseases. – 2018. – V. 40, I. 2. – P. 174-179.
36. Чеснокова, Н.П. Метаболические особенности эритроцитов / Н.П. Чеснокова, Е.В. Понукалина, М.Н. Бизенкова // Успехи современного естествознания. – 2015. – Т. 2. – С. 331–332.
37. Kuhn, V. Red blood cell function and dysfunction: redox regulation, nitric oxide metabolism, anemia / V. Kuhn, L. Diederich, S. Keller [et al] // Antioxidants and redox signaling. – 2017. – Т. 26, № 13. – P. 718-742.

38. Franco, R. Antioxidant Defense Mechanisms in Erythrocytes / R. Franco, G. Navarro, E. Martínez-Pinilla // *Antioxidants*. – 2019. – V. 8. – P. 46-50.
39. Mohanty, J. G. Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging / J. G. Mohanty, E. Nagababu, J. M. Rifkind // *Frontiers in Physiology*. – 2016. – V. 5, I. 84. – P. 1-6.
40. Hattangadi, S. M. Regulation of erythrocyte lifespan: do reactive oxygen species set the clock? / S. M. Hattangadi, H. F. Lodish // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2017. – T. 117, № 8. – P. 2075-2077.
41. Németh, I. Blood glutathione redox status in gestational hypertension / I. Németh, H. Orvos, D. Boda // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2017. – V. 30, I. 7. – P. 715-721.
42. Pandey, K. B. Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans / K. B. Pandey, S. I. Rizvi // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2016. – V. 3, I. 1. – P. 2-12.
43. Ford, J. Red blood cell morphology / J. Ford // *International Journal of Laboratory Hematology*. – 2013. – V. 35, I. 3. – P. 351-357.
44. Gwozdziński, K. Reactive Oxygen Species and Their Involvement in Red Blood Cell / K. Gwozdziński, A. Pieniazek, L. Gwozdziński // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2021. – V. 2021. – P. 19.
45. Лановенко, И. И. Взаимодействие глутатиона эритроцитов и кислородтранспортной функции крови при гемической гипоксии железодефицитного генеза / И. И. Лановенко, А. П. Гашук // *Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine*. – 2012. – Т. 12. – С. 178-185.
46. Melo, D. Interplay between Erythrocyte Peroxidases and Membrane / D. Melo, S. Rocha, S. Coimbra, A. S. Silva // *Molecular Aspects of Medicine*. – 2018. – V. 2018. – P. 1203-213.
47. Sies, H. Oxidative Stress / H. Sies, C. Berndt, D. P. Jones // *Annual Review of Biochemistry*. – 2017. – V. 86. – P. 715-748.

48. Rodrigues de Freitas, M. A. The role of the erythrocyte in the outcome of pregnancy with preeclampsia / M. A. Rodrigues de Freitas, A. Vieira da Costa, L. A. Medeiros, L. M. Cunha // *PLoS One*. – 2019. – V. 14, I. 3.
49. Spickett, C.M. Erythrocyte glutathione balance and membrane stability during preeclampsia / C.M. Spickett, J. Reglinski, W.E. Smith, R. Wilson and [et al] // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2008. – V. 24. – P. 1049–1055.
50. Starling, S. A molecular signal for preeclampsia / S. Starling // *Nature Reviews Endocrinology*. – 2020. – V. 16. – P. 471.
51. Cynober, T. Red cell abnormalities in hereditary spherocytosis: relevance to diagnosis and understanding of the variable expression of clinical severity / T. Cynober, N. Mohandas, G. Tchernia // *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. – 2016. – V. 128, I. 3. – P. 259-269.
52. Kumar, P. Biomarkers of oxidative stress in erythrocytes as a function of human age / P. Kumar, M. P. Kumar, P. Chandra // *World J Methodol*. – 2015. – V. 26, I. 5. – P. 216–222.
53. Rodrigues de Freitas, M. A. Are There Differences in the Anthropometric, Hemodynamic, Hematologic, and Biochemical Profiles between Late- and Early-Onset Preeclampsia? / M. A. Rodrigues de Freitas, A. Vieira da Costa, L. Alves de Medeiros, M. S. Garrote Filho and [et al] // *Obstetrics and Gynecology International*. – 2018. – V. –2018.
54. Boulanger, H. Potential value of placental angiogenic factors as biomarkers in preeclampsia for clinical physicians/ H. Boulanger, G. Lefèvre, S. A. Saksi, J. Achiche // *Néphrologie and Thérapeutique*. – 2019. – V. 15, I. 6. – P. 413-429.
55. Filipek, A. Preeclampsia - a disease of pregnant women / A. Filipek, E. Jurewicz // *Postepy Biochemii*. – 2018. – V. 64, I. 4. – P. 232-229.
56. Taysi, S. Radicals, Oxidative/Nitrosative Stress and Preeclampsia / S. Taysi, A. S. Tascan, M. G. Ugur, M. Demir // *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. – 2019. – V. 19, I. 3. – P. 178-193.

57. Matsubara, K. Role of nitric oxide and reactive oxygen species in the pathogenesis of preeclampsia / K. Matsubara, Y. Matsubara, S. Hyodo, T. Katayama // *The journal of obstetrics and gynaecology research*. – 2016. – V. 36. – P. 239–247.
58. Peres, G.M. Pre-Eclampsia and Eclampsia: An Update on the Pharmacological Treatment / G. M. Peres, M. Mariana, E. Cairrão // *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* – 2018. – V. 5, I. 1. – P. 303-315.
59. Rana, S. Preeclampsia: Pathophysiology, Challenges, and Perspectives / S. Rana, E. Lemoine, J. P. Granger, S. A. Karumanchi // *Circulation Research*. – 2019. – V. 124, I. 7. – P. 1094-1112.
60. Silasi, M. Abnormal placentation, angiogenic factors, and the pathogenesis of preeclampsia / M. Silasi, B. Cohen, S. A. Karumanchi, S. Rana // *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*. – 2020. – V. 37, I. 2. – P. 239-53.
61. Baumwell, S. Pre-eclampsia: clinical manifestations and molecular mechanisms/ S. Baumwell // *Nephron Clinical Practice*. – 2007. – V. 106, I. 2. – P. 72-81.
62. Noori, M. Prospective study of placental angiogenic factors and maternal vascular function before and after preeclampsia and gestational hypertension / M. Noori, A. E. Donald, A. Angelakopoulou, A. D. Hingorani // *Circulation*. – 2018. – V. 122, I. 5. – P. 478-87.
63. Phipps, E. A. Pre-eclampsia: pathogenesis, novel diagnostics and therapies / E. A. Phipps, R. Thadhani, T. Benzing, S. A. Karumanchi // *Nature reviews nephrology*. – 2019. – V. 15, I. 5. – P. 275-289.
64. Hansson, S. R. Oxidative stress in preeclampsia and the role of free fetal hemoglobin / S. R. Hansson, A. Naav, L. Erlandsson // *Frontiers in physiology*. – 2016. – V. 516.
65. Rana, S. Angiogenic factors in diagnosis, management, and research in preeclampsia / S. Rana, S. A. Karumanchi, M. D. Lindheimer // *Hypertension*. – 2014. – V. 63. – P. 198–202.

66. Suhail, M. Alterations in antioxidant and pro-oxidant balance in preeclampsia – impact on erythrocyte osmotic fragility / M. Suhail, M. F. Suhail, H. Khan // *Biochemia Medica*. – 2016. – V. 18, I. 3. – P. 331–341.
67. Wisdom, S. J. Antioxidant systems in normal pregnancy and in pregnancy-induced hypertension / S. J. Wisdom, R. Wilson, J. H. McKillop, J. J. Walker // *Am J Obstet Gynecol*. – 2016. – V. 165, I. 6. – P. 1701-1714.
68. Haram, K. The Role of Oxidative Stress, Adhesion Molecules and Antioxidants in Preeclampsia / K. Haram, J. H. Mortensen, O. Myking, E. F. Magann // *Current Hypertension Reviews*. – 2019. – V. 15, I. 2. – P. 105-112.
69. Rana, S. Preeclampsia: Pathophysiology, Challenges, and Perspectives / S. Rana, E. Lemoine, J. P. Granger, S. A. Karumanchi // *Circulation Research*. – 2019. – V. 124, I. 7. – P. 1094-1112.
70. Карбышев, М.С. Биохимия оксидативного стресса: учебно-методическое пособие / М.С. Карбышев, Ш.П. Абдуллаев. – Москва, 2018. – 60 с.
71. Iman, M. Oxidative Stress in Early Pregnancy and the Risk of Preeclampsia / I. M. Ahmad, M. C. Zimmerman, T. A. Moore // *Pregnancy Hypertens*. – 2019. – V. 18. – P. 99–102.
72. Li, R. Defining ROS in Biology and Medicine // R. Li, Z. Jia, M. A. Trush // *Reactive Oxygen Species*. – 2016. – V. 1, I. 1. – P. 9-21.
73. Mannaerts, D. Oxidative stress in healthy pregnancy and preeclampsia is linked to chronic inflammation, iron status and vascular function / D. Mannaerts, E. Faes, P. Cos, J.J. Briede and [et al] // *PLoS One*. – 2018. – V. 13, I. 9.
74. D'Souza, V. Increased oxidative stress from early pregnancy in women who develop preeclampsia / V. D'Souza, A. Rani, V. Patil, H. Pisal // *Clinical and Experimental Hypertension*. – 2016. – V. 38, I. 2. – P. 225–32.
75. Đorđević, N. Z. Oxidative stress and changes in antioxidative defense system in erythrocytes of preeclampsia in women / N.Z. Đorđević, G.M. Babić, S.D. Marković, B.I. Ognjanović and [et al] // *Reproductive Toxicology*. – 2018. – V. 25, I. 2. – P. 213-218.

76. Llurba, E. A comprehensive study of oxidative stress and antioxidant status in preeclampsia and normal pregnancy / E. Llurba, E. Gratacós, P. Martín-Gallán, L. Cabero and [et al] // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2004. – V. 15, I. 4. – P. 557-70.
77. Taravati, A. Comprehensive analysis of oxidative stress markers and antioxidants status in preeclampsia / A. Taravati, F. Tohidi // *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology*. – 2018. – V. 57, I. 6. – P. 779-790.
78. Титова, Н.М. Оценка структурно-функционального состояния клетки / Н.М. Титова, Т.Н. Замай, Т.Н. Субботина, А.А. Савченко. – Красноярск : ИПК СФУ, 2009. – 18-19 с.
79. Alisik, M. A colorimetric method to measure oxidized, reduced and total glutathione levels in erythrocytes / M. Alisik, S. Neselioglu, O. Erel // *Journal of Laboratory Medicine*. – 2019. – V. 43, I. 5. – P. 269–277.
80. Rahman, I. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method / I. Rahman, A. Kode, S. K. Biswas // *Nature Protocols*. – 2016. – V. 1, I. 6. – P. 3159-3165.
81. Дубынина, Ю.А. Сравнительный анализ про- и антиоксидантных систем у беременных при преэклампсии / Ю. А. Дубынина. – Красноярск. – 2021. – 55 с.
82. Sharma, J. B. Oxidative stress markers and antioxidant levels in normal pregnancy and pre-eclampsia / J.B. Sharma, A. Sharma, A. Bahadur, N. Vimala and [et al] // *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. – 2006. – V. 94, I. 1. – P. 23-27.
83. Carone, D. Lipid peroxidation products and antioxidant enzymes in red blood cells during normal and diabetic pregnancy / D. Carone, G. Loverro, P. Greco, F. Capuano // *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. – 2013. – V. 51, I. 2. - P. 103-109.
84. Ayala, A. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal / A. Ayala, M. F. Muñoz, S. Argüelle // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2014. – V. 2014.




Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт Фундаментальной Биологии и Биотехнологии  
Кафедра Медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

  
Е. И. Шишацкая

« 24 » июня 2021 г.

**МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ**

Оценка глутатионовой редокс-системы крови у беременных  
женщин с преэклампсией

06.04.01 – Биология

06.04.01.05 – Реконструктивная биоинженерия

Научный руководитель

  
подпись, дата

доцент, к.б.н.

должность, ученая степень

Н. М. Титова

инициалы, фамилия

Выпускник

  
подпись, дата

В.А. Мишина

инициалы, фамилия

Рецензент

  
подпись, дата

доцент, к.б.н.

должность, ученая степень

Р. Н. Белоногов

инициалы, фамилия

Красноярск 2021