

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

Институт Фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра Медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующая кафедрой

_____ Е. И. Шишацкая
«_____» _____ 2021 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Анализ состояния про- и антиоксидантной системы у беременных при
преэклампсии

06.04.01- Биология

06.04.01.05 - Реконструктивная биоинженерия

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

Красноярск 2021

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
1 Обзор литературы.....	5
1.1 Активные формы кислорода – характеристика и биологическая роль	5
1.2 Перекисное окисление липидов	7
1.3 Антиоксидантная система человека.....	11
1.4 Супероксиддисмутаза.....	13
1.5 Каталаза.....	15
1.6 Церулоплазмин.....	18
1.7 Преэклампсия и эклампсия	21
1.8 Состояние прооксидантной и антиоксидантной системы при преэклампсии и эклампсии	22
2 Материалы и методы.....	24
2.1 Объект исследования	24
2.2 Определение активности супероксиддисмутазы	25
2.3 Определение активности каталазы.....	26
2.4 Определение содержания малонового диальдегида.....	27
2.5 Определение содержания церулоплазмينا в плазме крови модифицированным методом Ревена.....	28
2.6 Определение концентрации общего белка	30
2.7 Статистические методы исследования	32
3 Результаты исследований и их обсуждение	33
3.1 Активность супероксиддисмутазы, каталазы и содержание малонового диальдегида в эритроцитах	33
3.2 Активность супероксиддисмутазы, церулоплазмина и содержание малонового диальдегида в плазме крови.....	36
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	41
Список сокращений	42
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	43

ВВЕДЕНИЕ

Преэклампсия (ПЭ)- мультисистемное патологическое состояние беременных, при котором возникает артериальная гипертензия сопровождающаяся значимой протеинурией. Как правило, возникает во второй половине беременности. Согласно статистическим данным встречается у 10 % рожениц и является одним из самых тяжелых осложнений.

В настоящее время, физиологическая причина возникновения ПЭ определяется как неадекватное ремоделирование спиральных артерий, ведущее к перфузии плода и выделение в кровотоки матери провоспалительных белков, что приводит к дисфункции эндотелия у матери. Все чаще предполагается влияние окислительного стресса, способствующего эндотелиальной дисфункции, ведущей к ПЭ, что может рассматриваться в качестве универсального неспецифического механизма при клинко-патологическом проявлении данного гестоза.

Целью настоящей работы явилась сравнительная оценка состояния прооксидантной и антиоксидантной систем крови женщин при нормально протекающей беременности и преэклампсии.

На основании поставленной цели сформулированы следующие задачи:

1. определить уровень малонового диальдегида (МДА) – показателя прооксидантной системы, в эритроцитах условно здоровых небеременных женщин, женщин с нормально протекающей беременностью и умеренной ПЭ;
2. исследовать состояние антиоксидантной системы в эритроцитах условно здоровых небеременных женщин, женщин с нормально протекающей беременностью и умеренной ПЭ по активности супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы (КТ);
3. оценить содержание малонового диальдегида в плазме крови условно здоровых небеременных женщин, женщин с нормально протекающей беременностью и умеренной ПЭ;

4. исследовать активность СОД и церулоплазмينا (ЦП) в плазме крови условно здоровых небеременных женщин, женщин с нормально протекающей беременностью и преэклампсией средней степени тяжести.

Работа является частью исследований свободнорадикальных процессов и их регуляции у здоровых людей и при различных патологиях на базе Федерального Сибирского научно-клинического центра, Медцентр Сибирского федерального университета.

1 Обзор литературы

1.1 Активные формы кислорода – характеристика и биологическая роль

Кислород является неотъемлемой частью жизнедеятельности большинства живых организмов, принимая участие почти во всех процессах организма. В основном состоянии молекула кислорода спонтанно не реагирует с другими молекулами, однако многие процессы с участием кислорода сопровождаются образованием высокореакционных форм кислорода: перенос электронов на дыхательной цепи митохондрии, микросомальное окисление, окисление гемоглобина в эритроцитах и т.д. [1].

Активные формы кислорода (АФК) — высоко реактивные формы кислорода, образование которых связано с неполным восстановлением кислорода. К наиболее известным АФК относят: супероксидный анион-радикал, пероксид водорода, гидроксильный радикал. Среди всех наивысшей активностью обладает короткоживущий (время его жизни составляет всего 10^{-9} с.) и чрезвычайно реакционноспособный гидроксильный радикал. Чуть менее активной АФК принято считать супероксид-радикал с временем жизни 10^{-6} с. Наиболее долгоживущей формой АФК принято считать пероксид водорода, который также весьма реакционноспособен [2].

АФК могут генерироваться в клетках при воздействии как экзогенных, так и эндогенных стимулов. Эндогенная продукция АФК, особенно супероксид-аниона возникает в основном из-за утечек электронов во время их переноса по электрон-транспортной цепи внутренней мембраны митохондрий. Двумя основными центрами образования супероксида являются комплексы I и III дыхательной цепи.

Супероксидный анион-радикал может также продуцироваться NADPH-оксидазами, локализованными на мембране, ксантиноксидазами, ферментативной активацией редуктаз цитохрома P450, NAD(P)-зависимыми дегидрогеназами [3]. Взаимодействуя с оксидом азота или реактивным

азотом супероксид способен образовывать мощный окислитель – пероксинитрит. Устраняется супероксидный радикал в спонтанной реакции дисмутации, либо под действием СОД быстро разлагается на кислород и пероксид водорода.

Пероксид водорода используется при воспалительных процессах макрофагами или может восстанавливаться ионами металлов, таких как железо или медь, с образованием гидроксил радикала посредством реакции Фентона. Гидроксил-радикал обладает высокой реакционной способностью и опасен для биологических макромолекул. Чтобы избежать его образования пероксид водорода детоксицируется антиоксидантными ферментами, такими как каталаза и глутатионпероксидазы [4] (рис. 1).

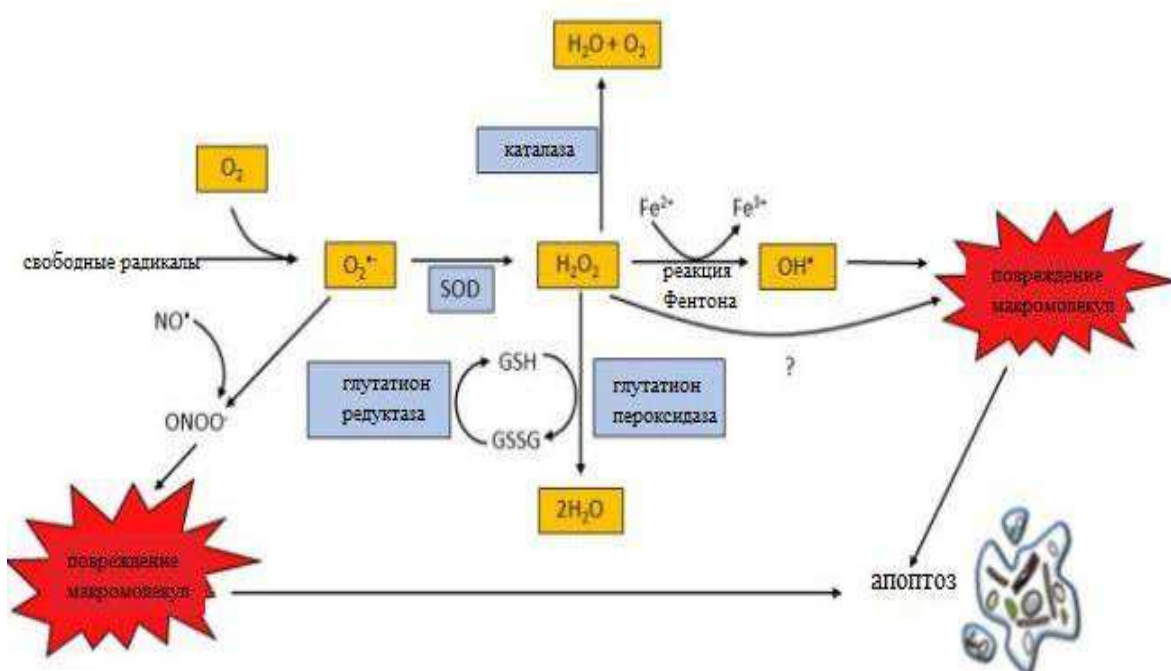


Рисунок 1 – Пути образования и детоксикации АФК [5] в модификации

Избыточное производство АФК может привести к окислительному повреждению биомолекул, таких как липиды, белки и ДНК. Это может стать фактором, провоцирующим развитие патологических процессов [4].

1.2 Перекисное окисление липидов

Считается, что в низких и умеренных дозах АФК необходимы для регуляции нормальных физиологических процессов: пролиферации, дифференцировки, миграции и гибели клеток. АФК также играют важную роль в иммунной системе и в поддержании окислительно-восстановительного баланса, вовлечены в функционирование различных клеточных сигнальных путей [6].

С другой стороны, если системы антиоксидантной детоксикации не могут поддерживать низкие- физиологические уровни АФК, то излишний синтез АФК способен приводить к развитию окислительного стресса. Окислительный стресс определяется как «серьезный дисбаланс между производством АФК и антиоксидантной защитой в пользу АФК, вызывающий чрезмерное окислительное повреждение» [7].

Повышенное производство АФК связано с развитием таких патологий, как рак, диабет, атеросклероз, инсульт, артроз, боковой амиотрофический склероз и нейродегенеративные расстройства, такие как болезни Паркинсона и Альцгеймера. Однако клинические данные подтверждают скорее ассоциацию, чем причинную роль АФК с заболеваниями, а задействованные молекулярные механизмы еще не полностью поняты [8].

К последствиям неконтролируемого окислительного стресса можно отнести повреждение клеток, тканей и органов. Еще одним из серьезных последствий является окислительная модификация липидов, нуклеиновых кислот и белков. Является давно признанным фактом, что высокие уровни АФК негативно влияют на липиды. Данный процесс принято называть перекисным окислением липидов. В целом механизм выглядит следующим образом: свободные радикалы, являясь окислителями, атакуют липиды в которых содержится двойная связь, при этом наиболее подвержены такому влиянию полиненасыщенные жирные кислоты [9].

Процесс перекисного окисления липидов можно описать в три стадии . Первая- инициация, на этой стадии прооксиданты производят отщепление

аллильного водорода и совместно образуют углерод-центрированный липидный радикал. На следующем этапе липидный радикал, реагируя с кислородом, образует липидный пероксирадикал. Пироксирадикал играет важную роль в данном процессе благодаря тому, что отщепляет водород от другой липидной молекулы, продолжая генерацию нового гидропероксид-липид, который продолжает цепную реакцию [10].

Распространение цепных реакций происходит до появления продуктов обрыва цепи. Антиоксиданты, вступая в реакцию обрыва, отдают атом водорода и образуют соответствующий радикал, который может вступить в реакцию с другими образующимися нерадикальными продуктами. (рис. 2) [11].

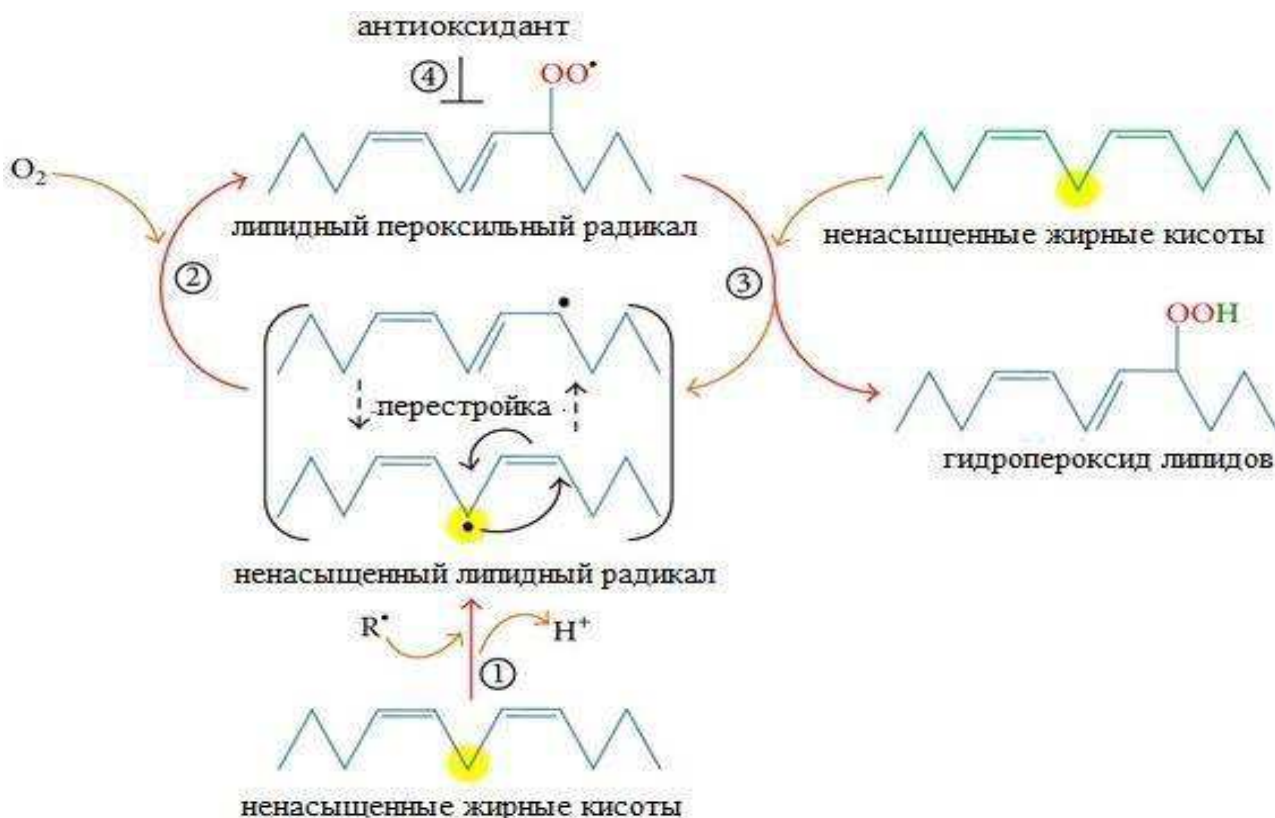


Рисунок 2 – Процесс перекисного окисления липидов в модификации [10]

В ходе реакции перекисного окисления липидов образуется широкий спектр продуктов окисления. Основными из которых принято считать - гидропероксиды липидов. Среди большого количества альдегидов, которые

образовываются в роле вторичных продуктов, наиболее глубоко изученным является малоновый диальдегид (МДА) [10,11].

МДА – вторичный (промежуточный) продукт, который образуется ферментативным и неферментативным путями при окислении арахидоновой кислоты или крупных полиненасыщенных жирных. К образованию МДА ферментативным путем можно отнести механизм биосинтеза тромбоксана А₂. Этот процесс является хорошо изученным, однако биологическая роль МДА, не смотря на то, что этот продукт более стабильный и проницаемый для мембран, чем АФК, остается не изученным [12].

В нескольких статьях сообщается, что МДА может выступать в роле сигнального посредника, регулирующего экспрессию генов. В частности, МДА способен регулировать секрецию инсулина, выступая мессенджером [12].

Производство МДА неферментативными процессами имеет большое терапевтическое значение, поскольку считается, что данный продукт реакции возникает в стрессовых условиях и имеет высокую способность реагировать с множеством биомолекул с образованием аддуктов. Поэтому избыточную продукцию МДА связывают с различными патологическими состояниями [13].

К производству МДА неферментативным путем относится процесс ПОЛ, в ходе которого происходит образование диеновых гидропероксидов. Пероксильный радикал гидропероксидов с цис-двойной связью гомоаллильный по отношению к пероксильной группе, что делает возможным их легкую циклизацию, благодаря внутримолекулярному радикальному присоединению к двойной связи и образованию нового радикала [14].

Полученные промежуточные свободные радикалы, способны к повторной циклизации с образованием бициклоэндпероксидов. Такие продукты структурно связаны с простагландинами и в ходе их расщепления образуется МДА [15].

Наиболее опасным процессом внутри организма является ферментативный метаболизм МДА и его взаимодействие с клеточными и тканевыми белками или ДНК. Образованные аддукты приводят к биомолекулярным повреждениям. Вероятный биохимический путь метаболизма МДА может быть представлен следующим образом: МДА подвергается окислению митохондриальной альдегиддегидрогеназой с последующим декарбоксилированием и образованием ацетальдегида. При взаимодействии с альдегиддегидрогеназой образуется ацетат, который в последующем распадается до углекислого газа и воды. Однако можно предполагать, что, фосфоглюкозоизомераза, вероятно, может быть ответственна за метаболизм цитоплазматического МДА до метилглиоксаля и далее до D-лактата ферментами глиоксалазной системы с использованием GSH в качестве кофактора [16].

МДА не подвергшиеся ферментативному метаболизму вступают в реакции с белками, свободными аминокислотами или, генерируя аддукты – основания Шиффа. Такие аддукты- конечные продукты ПОЛ. При наличие ацетальальдегида (продукт метаболизма МДА) и наличие свободного МДА происходит генерация аддуктов малонового диальдегида и ацетальдегида (МАО), который обладает высокой иммуногенностью.

Вторичные реакции аддуктов МДА приводят к внутри- и межмолекулярному сшиванию белков и ДНК. Итогом данного процесса является изменение биохимических свойств молекул и последующее их накопление, которое провоцирует старение различные заболевания [17].

Одним из белков, подверженным влиянию МДА является фактор элонгации 2, фактор H (eEF2), функция которого заключается в катализе реакций, способствующих движению рибосомы вдоль мРНК при синтезе белка. Образующиеся аддукты МДА с eEF2 снижают синтеза белка [18].

Фактор H является основным регулятором альтернативного пути в плазме, который строго контролирует активацию комплемента для предотвращения атаки на клетки-хозяева. Аддукты МДА с фактором H могут

блокировать поглощение МДА-модифицированных белков макрофагами [19].

Протеинкиназа С (ПКС), как известно, играет важную роль во внутриклеточной передаче сигнала и влияет практически на все жизненно важные процессы: пролиферацию, дифференцировку, миграцию, воспаление и организацию цитоскелета. ПКС также подвержена влиянию аддуктов МДА, которые активируют ПКС- α , локализованные в звездчатых клетках печени, что индуцирует излишнюю секрецию плазминогена урокиназного типа. Плазминоген урокиназного типа, являясь одним из главных компонентов генерации плазмина, способствует прогрессированию фиброза печени [20].

МДА вносит важный вклад в повреждение и мутации ДНК. Аддукты МДА могут приводить к точечным мутациям, сдвигу рамки считывания, разрывам полинуклеотидной цепи. Такое изменение ДНК, может вносить значительный вклад в развитие рака и других генетических заболеваний [21].

МДА возникает в стрессовых условиях и, имея высокую способность реагировать с множеством биомолекул, непосредственно связан с различными патологическими состояниями. Определение количества продукции МДА *in vivo* и ее роли в биологии важны, о чем говорит большое количество литературных данных, где изучается вовлечение этого соединения в ряд токсических повреждений тканей и различных патологических процессов [19, 20, 21].

1.3 Антиоксидантная система человека

В качестве защиты от повреждающего действия свободных радикалов и перекисных соединений выступает сложная и многокомпонентная антиокислительная система, которая включает в себя два звена: ферментативное и ферментативное. Ферментативное звено представлено антиоксидантами небелковой природы, в том числе: жирорастворимые –

витамин Е, β -каротин, убихиноны и водорастворимые – аскорбат, рутин, глутатион [22].

Эти антиоксиданты уменьшают интенсивность свободнорадикальных процессов, осуществляя и другие метаболические функции. Например, ряд биохимических процессов с участием глутатиона, аскорбата, которые не являются напрямую связанными с их антиоксидантными свойствами. Уровень содержания низкомолекулярных АО в тканях складывается из соотношения активности ферментных систем, их синтеза и метаболических превращений, транспорта и выведения из организма [23].

Исследование большинства низкомолекулярных антиоксидантов демонстрирует прямую зависимость между их концентрацией и степенью ингибирования свободнорадикальных процессов. Увеличение тканевой концентрации веществ, с выраженными антиоксидантными свойствами, может благоприятно влиять на активации побочных реакций, в ходе которых осуществляется синтез токсичных метаболитов, прооксидантов и даже непосредственно АФК [24].

К ферментам, защищающим клетки от действия активных форм кислорода, относят: СОД, КТ, глутатионпероксидазу, глутатион-S-трансферазу. Работа каждого фермента, является важной составляющей для всего ферментативного звена защиты. Примером может служить цепное взаимодействие СОД и КТ, где первый фермент устраняет супероксидный анион – радикал с образованием пероксида водорода. Второй же фермент играет роль устранивателя перекиси с образованием воды и восстановленного кислорода. Таким образом, сбалансированная активность всех ферментов является ключевым моментом, так как ингибирование активности одного из ферментов может привести к излишнему накоплению АФК и разрушению клеток [25].

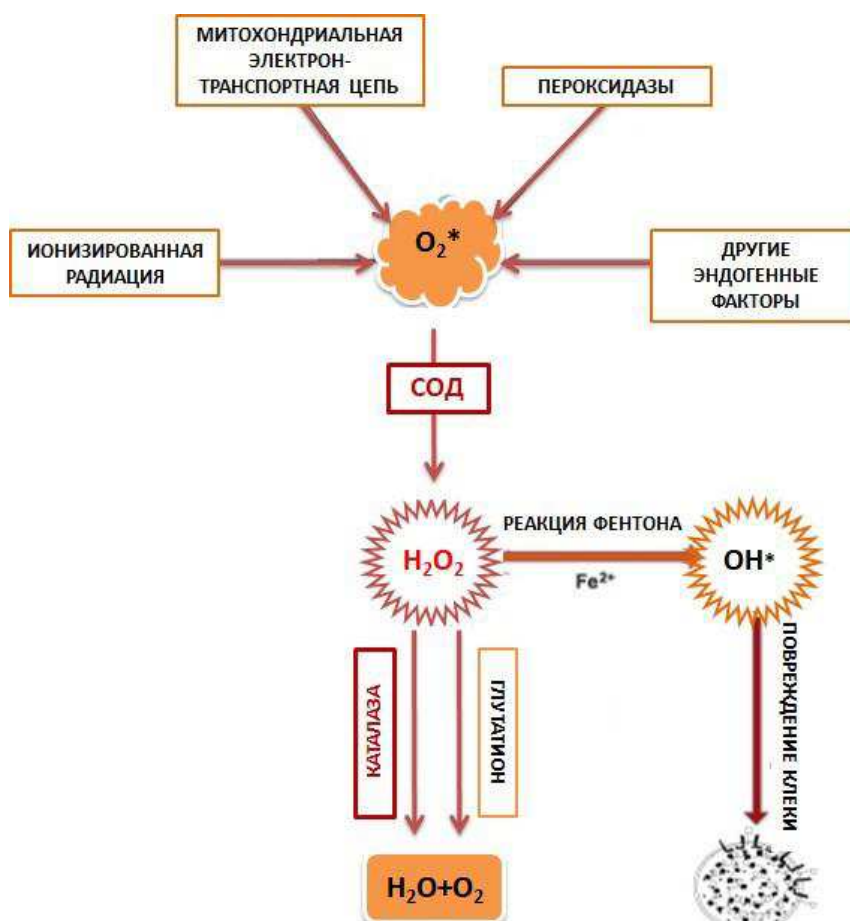


Рисунок 3 – Антиоксидантная защита первой линии от активных форм кислорода в модификации [25]

1.4 Супероксиддисмутаза

Супероксиддисмутазы (КФ 1.15.1.1, СОД)– это семейство ферментов, которые эффективно катализируют дисмутацию супероксидных анион=радикалов. Биохимически и молекулярно охарактеризованы три уникальные и высоко компартиментированные СОД млекопитающих [25].

СОД 1, или Cu,Zn-СОД – гомодимер, содержащий медь и цинк, который встречается исключительно во внутриклеточных цитоплазматических пространствах. СОД 2, или Mn-СОД, существует в виде тетрамера и выявлена в матриксе митохондрий. СОД 3, или ЕС-СОД, является недавно охарактеризованным ферментом, существующим в форме

Cu,Zn- тетрамера, содержащего сигнальный пептид, который направляет этот фермент во внеклеточные пространства [26].

СОД 1 представляет собой гомодимер, где субъединицы связаны между собой приближенной осью вращения. Это ориентирует активный сайт одной субъединицы на противоположную сторону молекулы относительно другой субъединицы. Димер удерживается вместе в основном гидрофобными контактами. Димеризация СОД 1 уменьшает доступную растворителю площадь поверхности, значительно повышая его стабильность [27].

СОД 1 является одним из самых стабильных известных протеинов. Полностью металлизированный белок плавится при 85-95°C и ферментативно активен в мочеvine. Каждый мономер СОД 1 содержит два иона металла, один медный и один цинковый, которые играют каталитическую и структурную роль в ферменте. Каталитическая медь координирована с четырьмя гистидинами. СОД 1 является частью семейства иммуноглобулиновых фолдов, из которых каждый мономер состоит в основном из восьмичленного бета-барреля с двумя большими петлями, так называемой "электростатической петлей" и "металл- связывающей петлей"[28].

Созревание и активация СОД1 – это строго регулируемые процессы, требующие нескольких посттрансляционных модификаций. Созревание СОД 1 инициируется включением ионов цинка и меди с последующим окислением дисульфидов, приводя к образованию ферментативно активных гомодимеров [29].

Структуру СОД 2 составляет полипептидная цепь, разделенная на N-концевые спирали и С-концевой α/β домен. N-концевой домен опосредует мультимеризацию, причем большинство бактериальных структур образуют димеры. Активный сайт СОД 2 расположен между N-и С-концевыми доменами и отличается от Cu,Zn СОД тем, что содержит один ион металла. Ион марганца координируется в напряженной тригональной бипирамидной геометрии четырьмя аминокислотными боковыми цепями His26, His74,

Asp159 и His163 (человеческая последовательность) и одной молекулой растворителя, как это наблюдается в структуре фермента человека [30].

СОД 3 – секретлируемый гидрофобный гликопротеин, обычно существующий в виде гомотетрамера с приблизительной молекулярной массой 135 000 Да. После удаления сигнального пептида зрелый белок ЕС-СОД состоит из трех доменов: аминотерминального домена, содержащего сайты гликозилирования, активного домена, демонстрирующего сильную гомологию с Cu/Zn СОД, и короткого карбоксильного терминального домена. Одной из уникальных характеристик ЕС-СОД, выявленных при первичной очистке, является его сильное сродство к гепарину и другим гепаринсульфатам [31].

1.5 Каталаза

Каталаза (КФ 1.11.1.6) – один из двух ферментов на ряду с глутатионпероксидазой, функция которого – устранение перекиси водорода. В ходе реакции устранения перекиси каталазой (КТ) образуются вода и молекулярный кислород. Перекись водорода образуется в клетках в ходе работы ряда флавопротеиновых оксидаз, которые обеспечивают действенную защиту клеточных структур от разрушения, которое осуществляет перекись водорода. Многие исследования доказывают, что генетически обусловленная недостаточность данного фермента является одной из причин наследственного заболевания у человека [32].

КТ широко представлена во многих живых организмах: животные, растения и в микроорганизмы. КТ содержится в печени, эритроцитах млекопитающих и составляет 0,1—0,2%. В отдельных же штаммах микроорганизмов содержание КТ может представлять до 5% сухого веса. Встречаются случаи при которых фермент полностью отсутствует, например, у некоторых анаэробных микроорганизмов, но присутствует в растениях в небольших количествах [33].

КТ, локализованная в пероксисомах, имеет молекулярную массу примерно 220-240 кДа. Представляет собой тетрамерный белок, в каждой субъединице которого четыре домена: N-концевая часть полипептидной цепи, С-концевые спирали, оборачивающую петлю и β -бочки. Каждая субъединица имеет гидрофобное ядро, состоящее из восьми антипараллельных β -бочек, окруженных α -спиралями. Гем-дистальная сторона субъединицы состоит из первых четырех β -бочек ($\beta 1$ - $\beta 4$), а оставшиеся четыре цепи ($\beta 5$ - $\beta 8$) играют роль кармана для связывания NADPH [34].

N-концевая субъединица (аминокислотные остатки 5-70) соединяет две субъединицы, через длинную оборачивающую петлю (остатки 380-438). Спиральный домен на одной стороне β -бочки состоит из четырех С-концевых спиралей. Тетрамеризация вынуждает N-концевые ответвления от димера покрывать активный сайт гема. По всему белку вода заполняет дефекты упаковки между четырьмя доменами субъединицы и между субъединицами внутри тетрамера. Эти структурные молекулы воды практически отсутствуют только в гидрофобной β -бочке и в непосредственной близости от активного центра [35].

Кристаллические структуры каталазы человека показывают, что железо в активном центре пентакоординировано. Отрицательно заряженный карбоксилатный радикал гема образует солевые мостики с тремя остатками аргинина (Arg72, Arg117 и Arg365), которые, вероятно, способствуют захоронению гема и помогают увеличить окислительно-восстановительный потенциал порфиринового радикала соединения I и сохраняются у бактерий, грибов, растений и каталазы животных. Помимо гемовой группы, активная конформация фермента включает по одной прочно связанной молекулы NADPH в каждой субъединице, но ее роль остается не выясненной. этой молекулы NADPH.

С увеличением числа доступных полных последовательностей были обнаружены различные гомологии, и каталазы стали классифицироваться на

три группы в зависимости от их структуры и функции. Типичные каталазы (истинные) и каталаза-пероксидазы являются гемсодержащими ферментами, а третья группа – марганцевые каталазы гем не содержат [37].

Наиболее многочисленной группой считаются типичные каталазы, они встречаются в основном в аэробно дышащих организмах, являются гомотетрамерами размером от 200 до 340 кДа и содержат четыре простетические группы. В активных центрах большинства истинных каталаз обнаружен протопорфирин IX (гем *b*) [38].

Типичные каталазы делятся на три группы. Первая включает в себя бактериальные, водорослевые и растительные каталазы с размером субъединицы 55–69 кДа и гемом *b* в качестве простетической группы. Вторая группа – бактериальные и грибковые каталазы с размером субъединицы 75–84 кДа, гемом *d* в качестве простетической группы и дополнительного домена флаводоксина. Третья группа является наиболее распространенным подсемейством (грибы, протисты, растения и животные), в нее входит и каталаза человека [39].

Основным местом локализации клеточной КТ является пероксисомы, в которые они импортируются с помощью сигнальной последовательности на карбоксиконцевом хвосте, направленной на пероксисому (PTS). Наиболее распространенным нацеливающим сигналом является SKL (серин-лизин-лейцин), но для КТ характерен другой сигнал, а именно сигнал KANL (лизин-аланин-аспарагин-лейцин). Белки, несущие эти сигналы, распознаются рецептором PTS1, называемым PEX5p для людей. Некоторые заболевания, связанные с дефектами в биогенезе пероксисом, такие как синдром Зеллвегера, характеризуются мутациями в рецепторе PEX5p и перепроизводством клеточной перекиси водорода из-за нарушения импорта по умолчанию каталазы в пероксисомы. Этот синдром чаще всего называют «синдромом пустой пероксисомы». В пероксисомах КТ проходит тетрамеризацию и присоединение гема. Так же фермент был обнаружен в цитозоле, митохондриях, клеточной мембране [40].

КТ человека экспрессируется в каждом органе. Самые высокие уровни активности фермента измеряются в печени, почках и эритроцитах. В эритроцитах продукция пероксида водорода связана с высоким содержанием кислорода, транспортируемым этой клеткой, где КТ ответственна за более чем 50% устранения этой АФК [41].

Дефицит или нарушение функции каталазы связано со многими заболеваниями, такими как сахарный диабет, витилиго, сердечно-сосудистые патологии, болезнь Вильсона, анемия, некоторые дерматологические расстройства, болезнь Альцгеймера, биполярное расстройство и шизофрения. Сообщалось, что аномалия активности каталазы наследуется при акаталаземии, которая является редким генетическим заболеванием (также известным как болезнь Такахага). Это аутосомно-рецессивный признак, характеризующийся пониженным уровнем каталазы [42].

Каталаза играет главную роль в регуляции клеточного уровня перекиси водорода, катаболизм которой защищает клетки от окислительного воздействия.[43].

1.6 Церулоплазмин

Церулоплазмин (ЦП) – медьсодержащий фермент плазмы крови, ответственный за 90% транспорта меди. ЦП является катализатором окислительно - восстановительных реакций в плазме. К основным функциям этого фермента следует отнести окисление железа с двухвалентного до трехвалентного состояния, без образования гидроксил-радикала, предотвращение окисления липидов, разрушение свободных радикалов [44].

ЦП кодируется одним геном. Основная форма ЦП содержит 1046 аминокислот и имеет общую массу около 132 кДа, из которых 120 кДа составляет белок и 12 кДа представляет собой N-связанный углевод. Белок имеет компактную структуру с 3 последовательными гомологичными областями, которые каждая из них состоит из двух частей (то есть 6 доменов). Медь в виде шести прочно связанных атомов включена в домены

2, 4 и 6 по одному атому и оставшиеся 3 в трехъядерном кластере. Медь стабилизирует компактную трехмерную структуру [45].

Главным местом синтеза ЦП являются гепатоциты печени. Синтез ЦП происходит в два этапа. На первом образуется предшественник ЦП - апоцерулоплазмин, в молекуле которого отсутствует медь. На втором этапе внутриклеточный фермент АТФаза внедряется в молекулу апоцерулоплазмина (апо-ЦП) с образованием ЦП. Цркулоплазмин также синтезируется в почках, молочных железах, плаценте и сосудистом сплетении головного мозга [46].

Также макрофаги и мононуклеарные клетки в крови во время воспаления экспрессируют две особые формы ЦП. Одна из которых, находится на поверхности клетки, связана с мембраной гликофосфатидилинозитолом. Здесь альтернативный сплайсинг экзонов 19 и 20 на С-конце транскрипта привел к добавлению 30 альтернативных аминокислот. Такая форма впервые была обнаружена в головном мозге. Также значительная экспрессия была отмечена в мембранах селезенки и почек, а меньшее количество – в сердце и печени. Предполагается, что эта форма также содержит 6 атомов меди. Вторая, ранее неизвестная форма ЦП, на 4 аминокислоты длиннее ЦП плазмы крови, селективно экспрессируется в плаценте. Функция этих альтернативных ЦП на данный момент изучается [47].

Стоит отметить, что циркулирующий ЦП в крови находится не только в холо- форме, но и в виде апо- ЦП (до 50% или более). Некоторые апоЦП, по-видимому, секретируются вместе с холо- ЦП и является основной секретлируемой формой при дефиците меди. Апо- ЦП также производится во время перенос меди от холо- ЦП к клеткам на поверхности клетки.

ЦП – один из лучших примеров многофункционального белка. Все установленные функции ЦП основаны на том, что он содержит и несет медь. Большинство ролей являются ферментативными, включая поглощение и перенос электронов с различных субстратов на кислород [48].

ЦП наиболее известен своей способностью окислять Fe^{2+} до Fe^{3+} (ферроокисление), и это основная феррооксидаза в крови. Принято считать, что способность ЦП окислять железо способствует высвобождению этого металла и позволяет железу связывание с трансферрином во внеклеточной жидкости и крови. На роль ЦП в этом процессе первоначально указали исследования с дефицитом меди свиньи и собаки, у которых накопление железа происходило в печени и других тканях [49].

ЦП является одним из основных поглотителей внеклеточных радикалов. Его способность ослабить или свести на нет эффекты активных форм кислорода были продемонстрированы еще в 80-х годах. Для исследования использовали очищенный ЦП, который включали в различные окислительные реакции, продуцирующие пероксид и супероксид, реакцию Фентона, в которой образуется $\cdot OH$ радикал из H_2O_2 и супероксида. Многочисленные исследования также продемонстрировали специфическое ингибирование ЦП повреждений в биомолекулах [50].

Существуют заболевания, связанные с нарушением синтеза ЦП, которые демонстрируют увеличение окислительного стресса. Например, пациенты, не экспрессирующие ЦП (ацерулоплазминемия), имеют повышенный уровень перекисного окисления липидов в определенных частях тела, накопление железа в коре головного мозга и мозжечка. Повреждение при ацерулоплазминемии может быть связано с отсутствием антиоксидантная функция ЦП для борьбы с радикалами и предотвращения клеточного повреждения [51].

Основными детерминантами уровня ЦП в плазме крови являются: воспалительные цитокины, эстрогены, прогестагены, дефицит меди. ЦП входит в группу белков, положительно реагирующих на воспаление и инфекцию (т.е. синтез и секреция увеличиваются) [52].

Наивысшая концентрация ЦП зарегистрирована в плазме крови и составляет от 300 до 580 мг/л. Так же этот фермент был обнаружен в клетках легких (на всем протяжении воздухоносных путей) и в альвеолах. Некоторые

исследования отмечают, что уровень ЦП значительно возрастал при воспалительных процессах в клетках бронхиального эпителия. Интересно, что пациенты с болезнью Паркинсона имеют более низкие уровни ЦП в плазме крови, однако причину меньшей экспрессии ЦП при данном заболевании еще предстоит выяснить [53].

1.7 Преэклампсия и эклампсия

ПЭ и эклампсия патологическое состояние, встречающееся исключительно у беременных, и не являющиеся самостоятельными заболеваниями. ПЭ проявляется в следующей симптоматике: синдром полиорганной недостаточности, различные симптомы поражения центральной нервной системы различных степеней тяжести[54].

Механизмы развития данной патологии и причины таких состояний остаются не до конца изученными. Однако, даже на этом этапе мнения исследователей расходятся: ученые из стран Европы считают ПЭ и эклампсию проявлением гипертонической болезни беременных женщин. То есть, эклампсия и ПЭ- это разновидности артериальной гипертонии у беременных женщин. При этом в России и в некоторых странах бывшего СССР ПЭ и эклампсию относят к разновидностям гестоза и считают вариантом совершенно другой патологии [55].

Постановка данного диагноза осуществляется по ряду признаков: повышенному артериальному давлению и значимой потере белка организмом. При этом ПЭ принято подразделять на умеренную ПЭ и тяжелую ПЭ. Для умеренной ПЭ характерно давление, превышающее 140/90. При этом протеинурия составляет 0,3 г/стуки. При ухудшении состояния – давлении выше 160/110 и протеинурии 5г/ сутки констатируют тяжёлую форму ПЭ [56].

Эклампсия – состояние при котором сохраняется симптоматика ПЭ и появляется клинические проявления поражения головного мозга с судорогами и комой. Развитие судорог и комы провоцируется чрезмерно

высоким артериальным давлением, которое приводит к поражению центральной нервной системы [57].

ПЭ принято разделять на две формы, исходя из степени тяжести повреждения внутренних органов беременной женщины. Согласно такой классификации при тяжелой ПЭ происходит значительное повреждение внутренних органов, что связано с увеличением рисков для матери и плода. В случаях, если тяжелая ПЭ не поддается медикаментозной терапии, тогда на ранних сроках производят вынужденное прерывание беременности и родоразрешение в случаях более поздних [58].

При ПЭ активируются процессы свободно-радикального окисления, которые приводят к повреждению и повышению проницаемости сосудистых, клеточных мембран. Следствием является дисфункция внутриклеточных метаболических процессов, что способствует развитию и прогрессированию полиорганной недостаточности [59].

1.8 Состояние прооксидантной и антиоксидантной системы при преэклампсии и эклампсии

Активная выработка АФК и подавление внутренних механизмов антиоксидантной защиты, действующие в тканях, провоцирует возникновение окислительного стресса. Считается, что причиной окислительного стресса в плацентах женщин с ПЭ является прерывистая гипоксия [60].

При физиологически протекающей беременности маточный кровоток увеличивается, для обеспечения перфузии межвиткового пространства плаценты и поддержать рост плода. Увеличение кровотока происходит путем физиологической трансформацией спиральных артерий матки, при этом трофобласты вторгаются в артериальную стенку, разрушают среду и трансформируют спиральные артерии из сосудов узкого диаметра в сосуды большого диаметра. Таким образом, в норме осуществляется достаточная перфузия плаценты [61].

У беременных, страдающих ПЭ, ключевой особенностью, связанной с недостаточностью физиологической трансформации спиральных артерий, является отсутствие инвазии трофобластов в миометриальный сегмент спиральной артерии. В результате недостаточной трансформации кровеносных сосудов образуются узкие спиральные артерии, нарушается картина кровотока и снижается маточно-плацентарная перфузия. Перфузия плода сопровождается выделением провоспалительных белков в кровеносное русло матери, которые вызывают дисфункцию эндотелиоцитов [62].

Последствием этой дисфункции является вазоконстрикция, которая исходя из места локализации, вызывает протеинурию, скотому, увеличение и повреждение печени. Увеличенная проницаемость стенок сосудов и значимая потеря белка провоцирует генерализованные, легочные и церебральные отёки [63].

Гипоксия сопровождается повышенным превращением ксантиндегидрогеназы в ксантиноксидазу, что способствует выработке мочевой кислоты и супероксида из деградированных пуринов (таких как ксантин и гипоксантин). Исследователи отмечают повышенную экспрессию и активность ксантиноксидазы в инвазивных трофобластах, полученных от пациентов с ПЭ [64].

Кроме того, у пациентов с ПЭ нарушаются плацентарные антиоксидантные механизмы, о чем свидетельствует снижение у них экспрессии СОД, КТ и глутатионпероксидазы по сравнению с женщинами с нормальной беременностью [64,65].

Так же исследования демонстрируют снижение уровня антиоксидантов в крови у женщин с ПЭ. Возможным объяснением этого могут быть вредные эффекты свободных радикалов, высвобождающихся в результате ПЭ [65].

На основании проводимых исследований мнения ученых разошлись, одни считают, что окислительный стресс может быть причиной заболевания, а другие считают его возникновение следствием развития патологии [66].

2 Материалы и методы

20.1 Объект исследования

В качестве объекта исследования были выбраны эритроциты и плазма крови. В обследовании приняли участие 76 женщин, из них: 25 относительно здоровых не беременных женщин, 27 беременных относительно здоровых женщин и 24 беременных женщин с ПЭ. Срок беременности женщин, участвующих в данном исследовании, варьировался от 35 до 40 недели, что позволило объединить и сравнивать группы на основании протекания третьего триместра.

Оценка состояния беременных и распределение по группам производилась на основании диагнозов, поставленных лечащими врачами пациенток. Средний возраст обследованных женщин составил $29 \pm 1,1$ лет. Исследования были выполнены с письменного информированного согласия испытуемых и 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.

Взятие крови производилось из локтевой вены пациенток. Для предотвращения свертывания крови был использован гепарин. Цельная гепаринизированная кровь подверглась центрифугированию в течение 10 мин при 3000 об/мин. По завершении центрифугирования был отобран слой плазмы и сохранен для дальнейших исследований. Оставшиеся эритроциты ресуспендировали с физиологическим раствором и центрифугировали в течение 10 мин при 3000 об/мин. Данную манипуляцию производили трижды, полученные упакованные эритроциты были сохранены для исследований. Все показатели АОС и ПОЛ были измерены спектрофотометрическими методами с использованием спектрофотометра GENESYSTM (США).

20.2 Определение активности супероксиддисмутазы

Данный метод определения активности СОД основан на ингибировании реакции аутоокисления адреналина в присутствии СОД в щелочной среде. Реакция происходит вследствие дисмутации супероксидных анион-радикалов, которые являются продуктом одного из этапов окисления адреналина.

Реагенты:

- 1) этанол-хлороформная смесь (2:1).
- 2) 0,2 М бикарбонатный буфер, рН 11.
- 3) 5,46 мМ раствор адреналина (0,1% аптечный раствор).

Приготовление бикарбонатного буфера: 2,12 г Na_2CO_3 , 0,168 г NaHCO_3 , 0,074 г ЭДТА, растворить в дистиллированной воде (довести до отметки 200 мл); рН довели до нужного значения добавлением NaOH .

Протокол анализа:

В пробирку вносили 50 мкл эритроцитов и 450 мкл дистиллированной воды, охлажденной до 0°C . Добавляли 250 мкл этанол-хлороформной смеси, устраняющей мешающее влияние Hb . Далее содержимое проб перемешивали и оставляли инкубироваться при комнатной температуре 10 мин. Полученную суспензию центрифугировали 10 мин при 6000g. При исследовании плазмы крови добавление воды и этано- хлороформной смеси не проводилось. Для определения СОД использовали супернатант. Готовили контрольную и опытные пробы по схеме, представленной в табл. 1

Таблица 1 Порядок внесения реагентов в пробу (мл)

Реагент	Контроль	Опыт
Бикарбонатный буфер	3	3
Дистиллированная вода	0,05	-
Супернатант	-	0,05
Раствор адреналина	0,15	0,15

Изменение оптической плотности регистрировали в течение 3-х мин каждые 30 с при длине волны – 347 нм в кювете с толщиной слоя 1,0 см. Для расчета активности использовали показатели величины поглощения контрольной и опытной проб. Активность СОД выражают в усл. ед.* мин/л, либо в усл. ед.* мин/г Нв.

20.3 Определение активности каталазы

Метод определения: в ходе реакции перекиси водорода и молибдата аммония, катализируемой КТ происходит образование комплекса, который имеет желтый цвет с максимумом поглощения при $\lambda = 400$ нм.

Реагенты:

1. 0,03%-ный раствор пероксида водорода
2. 4%-ный раствор молибдата аммония

Протокол анализа:

Приготовление проб производилось последовательным внесением реагентов согласно табл. 2

Таблица 2 Порядок внесения реагентов в пробу (мл)

Реагент	Контроль	Опыт
Пероксид водорода 0,03 % - ный	2	2
Гемолизат (1:49)	-	0,01
Дистиллированная вода	0,01	-
Инкубация 10 мин. при комнатной температуре в темноте		
4%-ный раствор молибдата аммония	1	1

Измерения экстинкции опытных и контрольной проб осуществлялись с использованием спектрофотометра, при длине волны 400 нм против дистиллированной воды в кювете с толщиной слоя 0,5 см. Активность фермента рассчитали по формуле приведенной ниже:

$$A = (O_{Пх} - O_{По}) \cdot V \cdot 1000 / \varepsilon \cdot v \cdot l \cdot t \cdot H_b, \text{ где}$$

$O_{Пх}$ – оптическая плотность контрольного раствора (безразмерная);

ОПо – оптическая плотность опытного раствора;
 V – объём реакционной среды (по методике = 3,01 мл);
 t – время регистрации оптической плотности, равное 10 минут;
 l – длина оптического пути (см) ;
 ε – коэффициент микромолярной экстинкции для H₂O₂ при длине волны 400 нм, равный $22,2 \times 10^{-3} \text{ мкМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$;
 Hb – концентрация гемоглобина.

20.4 Определение содержания малонового диальдегида

МДА – один из продуктов ПОЛ, который может быть обнаружен путем взаимодействия с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК). В ходе реакции образуется хромоген, максимум поглощения которого находится в красной области видимого спектра, длина волны – 532 нм.

Реагенты:

- 1) 0,9%-ный раствор NaCl (физиологический раствор),
- 2) 30%-ный раствор трихлоруксусной кислоты),
- 3) 0,1М раствор динатриевой соли этилендиаминтетраацетата (ЭДТА),
- 4) 0,05 н раствор NaOH,
- 5) 1%-ный раствор 2-тиобарбитуровой кислоты (ТБК), приготовленный на 0,05 н растворе NaOH.

Протокол анализа:

Пробы были приготовлены последовательным внесением реагентов согласно табл.3

Таблица 3 Порядок внесения реагентов в пробу (мл)

Реагент	Опытная проба	Контрольная проба
Физиологический раствор	0,8	0,8
Дистиллированная вода	-	0,2
Плазма крови	0,2	-
ТХУ	0,5	0,5

Центрифугировали 15 мин при 1700g, отбирали супернатант		
Супернатант	1,0	1,0
ЭДТА	0,075	0,075
ТБК	0,25	0,25
Каждую пробирку перемешивали и устанавливали в кипящую водяную баню на 15 мин. После чего, охлаждали пробирки до комнатной температуры		

Измеряли поглощение опытной пробы против контрольной на спектрофотометре при длине волны 532 нм в кюветах с толщиной слоя 1 см. Расчет содержания МДА проводили с учетом коэффициента молярной экстинкции образовавшегося хромогена, равного $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ и выражали в мкмоль/л плазмы, либо в мкмоль/г белка.

$$C = D_{532} \cdot V_{pr} \cdot c \cdot F \cdot 1000 / (V_{np} \cdot \varepsilon \cdot d \cdot Pr), \text{ где:}$$

C – содержание МДА, мкмоль/г белка,

D_{532} – оптическая плотность при длине волны 532 нм;

V p.c.- объем реакционной смеси (1,325 мл);

F – фактор разведения (7,5);

ε – коэффициент молярной экстинкции образовавшегося хромогена ($1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$);

V пр. – объем супернатанта, используемый для определения содержания МДА (1 мл);

d – длина оптического пути кюветы (1 см);

$1000/Pr$ – коэффициент пересчета на г /Pr.

20.5 Определение содержания церулоплазмينا в плазме кровимодифицированным методом Ревена

Принцип метода: метод основан на окислении p-фенилендиамина при участии церулоплазмينا.

Реагенты:

1. 0.4 М ацетатный буфер (рН 5,5), приготовленный путем смешивания растворов 1 и 2 (в соотношении 9:1). 1-й раствор: 54,44 г ацетата натрия помещают в мерную колбу на 1 л и доводят до метки дистиллированной водой. 2-й раствор: 22,6 мл ледяной уксусной кислоты помещают в мерную колбу на 1 и доводят до метки дистиллированной водой.

2. 1.3%-ный раствор фтористого натрия.

3. 0,5%-ный раствор солянокислого р-фенилендиамина.

Протокол анализа:

В контрольную и опытные пробы вносили по 0,1 мл плазмы, дальнейшее внесение реагентов (мл) представлено в табл. 4

Таблица 4 Порядок внесения реагентов в пробу (мл)

Реагент	Контроль	Опыт
Ацетатный буфер	8	8
Раствор фтористого натрия	2	-
Солянокислый р-фенилендиамин	1	1
Инкубация 60 мин. в термостате при температуре 37°C.		
Раствор фтористого натрия	-	2

Содержимое проб перемешивали и поставили холодильник на 30 мин. Далее пробы колориметрировали против контроля в кюветах с толщиной слоя 1,0 см при длине волны 530 нм.

Содержание церулоплазмينا в плазме крови рассчитывали по формуле:

$$\text{ЦП (мг\мл)} = D \cdot 875, \text{ где}$$

D - оптическая плотность анализируемого образца.

20.6 Определение концентрации общего белка

Концентрация общего белка в плазме крови был определен определяли биуретовым методом. В данном исследовании был использован набор реактивов фирмы «Витал».

Принцип метода: образование окрашенный комплекс белков с ионами меди в щелочной среде.

Реагенты:

- 1) Биуретовый реагент
- 2) Калибратор (альбумин сывороточный – 70 г/л, натрий хлористый – 154 ммоль/л).

Протокол анализа:

Перед исследованием рабочий реагент необходимо развести с водой в соотношении 1: 4 . Последующее внесение реагентов происходило согласно табл. 5

Таблица 5 Порядок внесения реагентов в пробу (мл)

Реагент	опытная проба, мл	калибровочная проба, мл	контрольная пробы, мл
Рабочий реагент	5,0	5,0	5,0
Плазма крови	0,1	-	-
Калибратор	-	0,1	-
Дистиллированная вода	-	-	0,1

Содержимое пробирок перемешивали и выдерживали при комнатной температуре в течение 30 мин.

Пробы были колориметрированы против контрольной пробы при длине волны 540 нм в кювете с толщиной поглощающего слоя 1 см не позже, чем через час после начала инкубации.

Концентрация общего белка была рассчитана в г/л по формуле

$$C=(E_{\text{пр}}/E_{\text{кал}})*70, \text{ где}$$

$E_{\text{пр}}$ – экстинкция опытной пробы;

$E_{\text{кал}}$ - экстинкция калибровочной пробы;

70 – концентрация белка в калибраторе в г/л[67].

20.7 Статистические методы исследования

Результаты исследования были внесены в базу данных пакета электронных таблиц MSExcel 2010, используя которую, с помощью пакета прикладных программ и Statistica 10 производился статистический анализ. Выборка была описана с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25 и 75 перцентилей (C25 и C75). Достоверность различий между исследуемыми группами оценивали по непараметрическому критерию Манна-Уитни.

3 Результаты исследований и их обсуждение

3.1 Активность супероксиддисмутазы, каталазы и содержание малонового диальдегида в эритроцитах

[изъято 3 страницы]

3.2 Активность супероксиддисмутазы, церулоплазмина и содержание малонового диальдегида в плазме крови

[изъято 5 страницы]

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. У беременных женщин с преэклампсией в эритроцитах достоверно повышен уровень продукта ПОЛ – малонового диальдегида по сравнению с аналогичными показателями у небеременных женщин и женщин с нормально протекающей беременностью

2. Активность супероксиддисмутазы возрастает как при физиологической беременности, так и для беременности с ПЭ. При этом активность этого фермента остается на одном уровне для обеих групп. Активность каталазы значительно возрастает при беременности с ПЭ относительно небеременных женщин и женщин с нормально протекающей беременностью.

3. Содержание малонового диальдегида в плазме крови значительно возрастает при ПЭ относительно обеих контрольных групп.

4. Активность супероксиддисмутазы плазмы крови достоверно возрастает при беременности с ПЭ по сравнению с аналогичными показателями у небеременных женщин и женщин с нормально протекающей беременностью. Активность церулоплазмينا имеет достоверное увеличение при беременности с ПЭ относительно контрольных групп, где активность этого фермента остается на одном уровне для обеих групп.

Коэффициент окислительного стресса в эритроцитах женщин с ПЭ относительно беременных с физиологически протекающей беременностью приблизительно равен единице, что говорит о том, что антиоксидантная система этих клеток способна справляться с АФК при ПЭ. Коэффициент окислительного стресса в плазме крови равен 1,3, что указывает на состояние окислительного стресса.

Список сокращений

АФК – активные формы кислорода

ПОЛ – перекисное окисление липидов

АОС – антиоксидантная система

ОС – окислительный стресс

СОД – супероксиддисмутаза

КТ – каталаза

ЦП – церулоплазмин

ПЭ – преэклампсия

МДА – малоновый диальдегид

ТБК – тиобарбитуровая кислота

ТХУ – трихлоруксусная тбкислота

ЭДТА – этилдиминтетраацетат

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Schieber, M ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress / M. Schieber, S. Chandel // *Current biology*. – 2014. – N 24. – P. 453 – 462.
2. Valko, M. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease / M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol // *Biochemistry Cell Biology*. – 2017. – N 39. – P. 76 – 84.
3. Dalle-Donne, I Proteins asbiomarkers of oxidative stress in diseases: The contribution of redox proteomics / I. Dalle-Donne, A. Scaloni, D. Giustarini, E. Cavarra // *Mass Spectr. Rev.* – 2005. – N24. – P. 55 – 99.
4. Oloruntoba, A. E. Interrelationship Between Markers of Oxidative Stress, Inflammation and Hematological Parameters Among Preeclamptic Nigerian Women / A. E. Oloruntoba, O. O. Nkeiruka, A. L. Rukayat // *Medicalscience*. – 2018. – N 24. – P. 225 – 231.
5. Tamarit, J. Oxidative stress and altered lipid metabolism in Friedreich ataxia / J. Tamarit, È. Obis, J. Ros // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2016. – N 100. – P. 138 – 146.
6. Yu, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species / B. P. Yu // *Physiol.* – 1994. – Rev.74. – P. 139 – 162.
7. Angelova, P. Functional role of mitochondrial reactive oxygen species in physiology / P. Angelova, A. Abramov // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2016. – N 100. – P. 81 – 85.
8. Ighodaro, O. M. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid / O. M. Ighodaro, O. A. Akinloye // *Alexandria journal of medicine*. – 2018. – T. 54. – N 4. – P. 287 – 293.
9. Ramana, K. V. Lipid peroxidation products in human health and disease / K. V. Ramana, S. Srivastava, S. S. Singhal // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2014 . –N 15. – P. 201- 206.
10. Ayala, A. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal / A. Ayala, M. F.

- Muñoz, S. Argüelles // *Oxidative medicine and cellular longevity*. – 2014. – T. 54. – N 8. – P. 289 – 296.
11. Nair, J. High urinary excretion of lipid peroxidation-derived DNA damage in patients with cancer-prone liver diseases / J. Nair, P. Srivatanakul, C. Haas // *Mutation Research: Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* . – 2010. – T. 683. – N 8. – P. 23 – 28.
12. Massey, A. Lipidomics of polyunsaturated-fatty-acid-derived oxygenated metabolites / A. Massey, A. Nicolaou // *Biochemical Society Transaction*. – 2016. – Vol. 39. – N5. – P. 1240 – 1246.
13. Giera, M. Recent advancements in the LC- and GC-based analysis of malondialdehyde (MDA): a brief overview / M Giera, H. Lingeman, and W. M. A. Niessen // *Chromatographia*. – 2012. – Vol. 75. – P. 433 – 440.
14. Grune, T .Markers of oxidative stress in ICU clinical settings: present and future // *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*. – 2007. – T. 10. – №. 6. – P. 712 – 717.
15. Slatter, D. A. The importance of lipid-derived malondialdehyde in diabetes mellitus / D. A. Slatter, C. H. Bolton, A. J. Bailey // *Diabetologia*. – 2000. – T. 43. – N. 5. – P. 550 – 557.
16. Foettinger, A. Derivatisation of arginine residues with malondialdehyde for the analysis of peptides and protein digests by LC- ESI- MS/MS / A. Foettinger, A. Leitner, W. Lindner // *Journal of mass spectrometry*. – 2006. – T. 41. – N 5. – P. 623 – 632.
17. Janero D. R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury // *Free radical biology and medicine*. – 1990. – T. 9. – N. 6. – P. 515 – 540.
18. Spectrophotometry V. Determination of Malondialdehyde as Dithiobarbituric Acid Adduct in Biological Samples by HPLC with Fluorescence Detection: Comparison with Ultraviolet // *Gastroenterology*. – 1998. – T. 115. – P. 1317 – 1321.

19. Sim A. S. Improved method for plasma malondialdehyde measurement by high-performance liquid chromatography using methyl malondialdehyde as an internal standard // *Journal of Chromatography B.* – 2003. – T. 785. – N 2. – P. 337 – 344.
20. Esterbauer, H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal / H. Esterbauer, K. Cheeseman // *Methods in enzymology.* – 1990. – T. 186. – P. 407 – 421.
21. Blair I. A. DNA adducts with lipid peroxidation products // *The Journal of biological chemistry.* – 2008. – T. 283. – N. 23. – P. 15545.
22. Halliwell B. Free radicals and antioxidants—quo vadis? // *Trends in pharmacological sciences.* – 2011. – T. 32. – N 3. – P. 125 – 130.
23. Malhotra J. D. Antioxidants reduce endoplasmic reticulum stress and improve protein secretion // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 2008. – T. 105. – N 47. – P. 18525 – 18530.
24. Zhang A. Y. Acid sphingomyelinase and its redox amplification in formation of lipid raft redox signaling platforms in endothelial cells // *Antioxidants & redox signaling.* – 2007. – T. 9. – N 7. – P. 817 – 828.
25. Kaminsky, V. O. Free radicals in cross talk between autophagy and apoptosis / V. O. Kaminsky, B. Zhivotovsky // *Antioxidants & redox signaling.* – 2014. – T. 21. – N. 1. – P. 86-102.
26. Quint, P. Crystal structure of nitrated human manganese superoxide dismutase: mechanism of inactivation / P. Quint, R. Reutzel, R. Mikulski // *Free Radic Biol Med.* - 2006.- N 17.- P. 45- 52.
27. Perry, J. J. The structural biochemistry of the superoxide dismutases / J. J. Perry , D. S. Shin, E. D. Getzoff, J. A. Tainer // Elsevier. – 2009. – N 13. - P. 34 – 42.
28. He, L Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species // *Cellular Physiology and Biochemistry.* – 2017. – N 13. - P. 34 – 42.

29. Park, M. C. The maternal change of malondialdehyde levels in plasma and superoxide dismutase levels in plasma and erythrocyte as biologic markers of oxidative stress in pregnancy with preeclampsia/ M. C. Park, J. Korean // *Obstet Gynecol.* – 2015. – N 48. – P. 25 – 37.
30. Whittaker, M. M. Low-temperature thermochromism marks a change in coordination for the metal ion in manganese superoxide dismutase/ M. M. Whittaker, J. W. Whittaker// *Biochemistry.* – 2017. – N 14. – P. 567- 574.
31. Ademuyiwa O. Endogenous antioxidant defences in plasma and erythrocytes of pregnant women during different trimesters of pregnancy // *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica.* – 2007. – T. 86. – N 10. – C. 1175 – 1180.
32. Brunelli, L. Modulation of catalase peroxidatic and catalatic activity by nitricoxide / L. Brunelli, V. Yermilov, J. S. Beckman // *Bilological medicine .* – 2011. – N 30. – P. 709 – 714.
33. Glorieuxa, C. Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach / C. Glorieuxa, P. B. Calderon// *Biological Chemistry.* – 2017. – N 398. – P. 1095 – 1108.
34. Безручко, Н. В. Каталаза биологических сред организма человека и ее клинико-биологическое значение в оценке эндотоксикоза / Безручко Н. В., Г. К. Рубцов, Н. Б. Ганяева, Г. А. Козлова, Д. Г. Садовникова // *Вестник Томского государственного педагогического университета.* – 2012. – N 7. – P. 94 – 99.
35. Гудков, С. В. Биоантиоксиданты / С. В. Гудков, В. И. Брусков А.В. Куликов // *Альманах клинической медицины.* – 2014. – N 31. – С. 61 – 65.
36. Vu, H.V. Catalase and glutathione peroxidase expression in bovine corpus luteum during the estrous cycle and their modulation by prostaglandin F₂ α and H₂O₂ / H.V. Vu, T.J. Acosta // *Anim. Reprod.* – 2014. – Vol. 11, N 2. – P. 74 – 84.
37. Коепке J. I. Restoration of peroxisomal catalase import in a model of human cellular aging // *Traffic.* – 2007. – T. 8. – N 11. – P. 1590 – 1600.

38. Brown G. C. Reversible binding and inhibition of catalase by nitric oxide // *European Journal of Biochemistry*. – 1995. – Т. 232. – №. 1. – P. 188 – 191.
39. Bauer, G. The antitumor effect of single-domain antibodies directed towards membrane-associated catalase and superoxide dismutase / G. Bauer., M. Motz // *Anticancer research*. – 2016. – Т. 36. – N 11. – С. 5945 – 5956.
40. Габитова, Д. М. Антиоксидантная защитная система организма / Д. М. Габитова., В. О. Рыжикова, М. А. Рыжикова // *Башкирский химический журнал*. – 2006. – Т. 13. – N 2. – С. 35.
41. Чеснокова, Н. П. Общая характеристика источников образования свободных радикалов и антиоксидантных систем / Н. П. Чеснокова, Е. В. Понукалина // *Успехи современного естествознания*. – 2006. – №. 7. – С. 37-41.
42. Böhm B. Extracellular localization of catalase is associated with the transformed state of malignant cells // *Biological Chemistry*. – 2015. – Т. 396. – N 12. – P. 1339 – 1356.
43. Anderson K. M. Free radicals and reactive oxygen species in programmed cell death // *Medical hypotheses*. – 1999. – Т. 52. – N 5. – P. 451 – 463.
44. N. E. Hellman Ceruloplasmin metabolism and function / N. E. Hellman, J. D. Gitlin // *Annual review of nutrition*. – 2002. – Т. 22. – N 1. – P. 439 – 458.
45. Hellman N. E. Mechanisms of copper incorporation into human ceruloplasmin // *Journal of Biological Chemistry*. – 2002. – Т. 277. – N 48. – P. 46632-46638.
46. Куценко, Л. А. Место церулоплазмينا среди белков острой фазы как маркера системного воспаления / Л. А. Куценко, И. П. Кайдашев // *Лабораторна діагностика*. – 2011. – N 3. – С. 59 – 68.
47. Haram K. The role of oxidative stress, adhesion molecules and antioxidants in preeclampsia // *Current hypertension reviews*. – 2019. – Т. 15. – №. 2. – P. 105 – 112.

48. Frieden, E. The biological role of ceruloplasmin and its oxidase activity / E. Frieden, H. S. Hsieh // Iron and copper proteins. – Springer, Boston, MA, 1976. – P. 505 – 529.
49. Shiva S. Ceruloplasmin is a NO oxidase and nitrite synthase that determines endocrine NO homeostasis // Nature chemical biology. – 2006. – Т. 2. – N 9. – P. 486 – 493.
50. Lannon B. The inhibition of bovine ceruloplasmin oxidase activity by thiomolybdates in vivo and in vitro: a reversible interaction // Journal of inorganic biochemistry. – 2006. – Т. 26. – N. 2. – P. 107 – 115.
51. Leelakunakorn, W. Ceruloplasmin oxidase activity as a biomarker of lead exposure / W. Leelakunakorn, R. Sriworawit, S. Soontaros // Journal of occupational health. – 2005. – Т. 47. – N 1. – P. 56 – 60.
52. Blakley B. R. Ceruloplasmin as an indicator of copper status in cattle and sheep // Canadian Journal of Comparative Medicine. – 2015. – Т. 49. – N 4. – P. 405.
53. Musci G. The multifunctional oxidase activity of ceruloplasmin as revealed by anion binding studies // European journal of biochemistry. – 2009. – Т. 265. – N 2. – P. 589 – 597.
54. Ержан З. Е. и др. Тяжелая преэклампсия—актуальная проблема современного акушерства (Обзор литературы) // Вестник Казахского национального медицинского университета. – 2013. – N4. – С. 15 – 17.
55. Salles, A. M. Antioxidants for preventing preeclampsia: A systematic review/ A. M. Salles, T. F. Galvao, M. T. Silva // Scientif. World J. – 2012. – N 12. – P. 243 – 247.
56. Мирошина Е. Д. Диагностика преэклампсии на современном этапе (обзор литературы) // Проблемы репродукции. – 2017. – Т. 23. – №. 1. – С.96 – 102.
57. Tenório M. B. Cross-Talk between Oxidative Stress and Inflammation in Preeclampsia // Oxidative medicine and cellular longevity. – 2019. – N 19. – P. 224–231.

58. Taysi, S. Radicals, Oxidative Nitrosative Stress and Preeclampsia / S. Taysi, A. S. Tascan, M. G. Ugur // Medicinal Chemistry. – 2019. – N 19. – P. 178 – 193.
59. Duley L. The global impact of pre-eclampsia and eclampsia // Seminars Perinatol. – 2009. – N 33. – P. 130 – 137.
60. Rossi, A. C. Prevention of pre- eclampsia with lowdose aspirin or vitamins C and E in women at high or low risk: a systematic review with meta-analysis / A. C. Rossi , P. M. Mullin, J. O. Europ // Reproduct. Biol. – 2011. – N15. – P. 9 – 16.
61. Serdar, Z. Serum iron and copper status and oxidative stress in severe and mild preeclampsia / Z. Serdar, E. Gur, O. Develioglu // Cell Biochemistry. – 2006. – N 24. – P. 209 – 215.
62. Chappell, L.C. A longitudinal study of biochemical variables in women at risk of preeclampsia / L. C. Chappell, P.T. Seed, F.J. Kelly, Hunt, B.J. // Obstetrics and Gynecology. – 2002. – N 187. – P. 127 – 136.
63. Кокоева Ф. Б. Роль окислительного стресса в патогенезе преэклампсии // Проблемы репродукции. – 2014. – N 4. – С. 7 – 10.
64. Дубровина С. О., Муцалханова Ю. С., Васильева В. В. Раннее прогнозирование преэклампсии (обзор литературы) // Проблемы репродукции. – 2018. – Т. 24. – №. 3. – С. 67 – 73.
65. Orhan, H. Circulating biomarkers of oxidative stress in complicated pregnancies / H. Orhan, L. Onderoglu, A. Yiicel // Arch Gynecol Obstet. – 2013. – N26.– P.189 – 95.
66. Aksoy, H. Antioxidant potential and transferrin, ceruloplasmin, and lipid peroxidation levels in women with preeclampsia / H. Aksoy, J. Altinkaynak, N. Bakan // Investig.Med. – 2003. – N51. – P. 284 – 287.
67. Титова, Н. М. Оценка структурно-функционального состояния клетки: метод. Указания к практическим занятиям / Н. М. Титова, Т. Н. Замай, Т. Н. Субботина, А. А. Савченко. – Красноярск: ИПК СФУ, 2009. - №1- С. 18.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица 1 - Результаты исследования в эритроцитах

Исследуемые показатели	Контроль (не беременные) n=25	Контроль (беременные) n=27	Умеренная преэклампсия n=24
	Me (Q ₂₅ -Q ₇₅)	Me (Q ₂₅ -Q ₇₅)	Me (Q ₂₅ -Q ₇₅)
МДА мкмоль/Нв	1,3 (0,9-2,1)	2,7 (2-2,9) p ₁₋₂ <0,001	3,4 (3-4,5) p ₁₋₃ <0,001 p ₂₋₃ <0,001
СОД у.е./мин* Нв	1301 (1258-1464)	1700(1418-1765) p ₁₋₂ <0,001	1746(1583 -1729) p ₁₋₃ <0,001
КТ ммоль/мин*Нв	226 (216 -238)	217(177 -267)	264(221-273) p ₁₋₃ =0,03 p ₂₋₃ =0,04

Таблица 2 - Результаты исследования в плазме крови

Плазма	Контроль (не беременные) n=25	Контроль (Беременные) n=27	Умеренная преэклампсия n=24
	Me(Q ₂₅ -Q ₇₅)	Me (Q ₂₅ -Q ₇₅)	Me (Q ₂₅ -Q ₇₅)
МДА мкмоль/л	1,62 (1,38-2,03)	1,93 (1,59-2,81) p ₁₋₂ =0,03	3,72 (3,08-5,46) p ₁₋₃ =0,000005 p ₂₋₃ =0,000004
СОД у.е./мин	13(12,6-4,6)	15,3 (14,9-16,2) p ₁₋₂ =0,0001	16,6 (15,4-17,2) p ₁₋₃ =0,000001 p ₂₋₃ =0,008
ЦП мг/л	211(171-270)	209 (166-269)	270 (203-377) p ₁₋₃ =0,03 p ₂₋₃ =0,003


Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования

«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт Фундаментальной биологии и биотехнологии

Кафедра Медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ


Заведующая кафедрой
Е. И. Шишацкая




« 24 » июля 2021 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Анализ состояния про- и антиоксидантной системы у беременных при
преэклампсии

06.04.01- Биология

06.04.01.05 - Реконструктивная биоинженерия

Научный руководитель	 подпись, дата	доцент, к.б.н. должность, ученая степень	<u>Н. М. Титова</u>
Выпускник	 подпись, дата		<u>Ю. А. Дубынина</u>
Рецензент	 подпись, дата	доцент, к.б.н. должность, ученая степень	<u>Р. Н. Белоногов</u>

Красноярск 2021