

## КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 618.3:612.051.1:543.866

© Коллектив авторов

### ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ОКСИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ СЫВОРОТОЧНОГО ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА У БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН

*Т.А. Крайнова<sup>1</sup>, Ю.В. Морозова<sup>2</sup>, Л.М. Ефремова<sup>1</sup>, Л.А. Шерер<sup>1</sup>, Т.С. Качалина<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Нижегородское государственное предприятие по производству бактериальных препаратов – фирма “ИмБио”; г. Нижний Новгород, 603950, ул.Грузинская, 44; тел.: (8312)34-38-56, эл.почта: IMBIO-LAB@MAIL.RU

<sup>2</sup>Нижегородская государственная медицинская академия, г. Нижний Новгород, 603005, пл. Минина и Пожарского, 10/1; тел.: (8312)38-95-43.

Исследовали специфическую оксидазную активность (т.е. активность на единицу массы фермента) церулоплазмينا сыворотки крови беременных женщин с различными патологиями: гестоз, фето-плацентарная недостаточность, перенашивание беременности. Установлено снижение специфической оксидазной активности во всех группах с патологией беременности. Отмечалось также снижение концентрации церулоплазмينا при перенашивании беременности.

**Ключевые слова:** церулоплазмин, беременность, специфическая оксидазная активность.

**ВВЕДЕНИЕ.** Нормально протекающая беременность связана с возрастанием окислительного стресса и уровня перекисного окисления липидов [1]. Одним из важных звеньев антиоксидантной системы организма является церулоплазмин – медь-содержащий альфа-2-глобулин плазмы крови, Fe II: кислородоксидоредуктаза (К.Ф.1.16.3.1). Содержание церулоплазмينا (ЦП) в крови значительно увеличивается при беременности. Это связано не только с необходимостью защиты организма от окислительного стресса, но и с возрастанием потребности в меди, необходимой для нормального развития плода. Поскольку в процессе беременности тканевые резервы меди в материнском организме уменьшаются, возрастает относительное количество неактивного фермента, и снижается оксидазная активность ЦП [2]. Недавние исследования показали, что специфическая ферментативная активность ЦП (т.е. активность на единицу массы ЦП) является более чувствительным индикатором нарушений метаболизма меди, чем концентрация меди или ЦП в сыворотке [3]. Поэтому определение этого параметра может иметь как диагностическое, так и прогностическое значение при различных патологиях беременности.

Целью настоящей работы явилось изучение специфической активности ЦП в плазме крови при различных патологиях беременности.

**МЕТОДИКА.** Определение ферментативной активности ЦП в сыворотке крови пациентов осуществляли по модифицированному методу Равина [4]. В 2 пробирки вносили по 100 мкл исследуемой сыворотки и по 3,85 мл 0,1 М натрий-ацетатного буферного раствора, рН 5,45, предварительно нагретого до температуры 37°C. Затем в пробирки добавляли по 2 мл раствора *пара*-фенилендиамин-гидрохлорида (3 мг/мл), отмечая время добавления с помощью

## ЦЕРУЛОПЛАЗМИН В КРОВИ БЕРЕМЕННЫХ

секундомера. Пробы инкубировали при температуре 37°C. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл 1,5 М раствора азид натрия, спустя 5 и 15 минут после начала инкубации, добавляя азид натрия вначале в первую, затем во вторую пробирку. В контрольную пробу вместо плазмы вносили 100 мкл буферного раствора, сразу останавливая реакцию добавлением азид натрия. Измеряли оптическую плотность проб против контрольной при длине волны 530 нм и величине оптического слоя 10 мм на спектрофотометре СФ-26 ("ЛОМО", г. Санкт-Петербург). Оксидазную активность рассчитывали как отношение разности оптической плотности проб с различным временем инкубации к разности времени инкубации  $((D_{15}-D_5)/10)$ . Единицу активности при этом определяли как количество образца, изменяющее оптическую плотность раствора на 0,001 в минуту.

Количественное определение ЦП проводили методом радиальной иммунодиффузии по Манчини [5]. При этом использовали моноспецифическую антисыворотку, полученную при иммунизации кроликов высокоочищенным церулоплазмином.

ЦП получали по методике, используемой на Нижегородском государственном предприятии по производству бакпрепаратов [6]. Отбирали образцы высокоочищенного ЦП, не содержащего примесей, со степенью очистки (цветовой показатель, характеризующий соотношение синих и не синих ионов меди с различной валентностью в молекуле церулоплазмина) не менее 0,045. Степень очистки ЦП определяли как соотношение оптических плотностей образца при длине волны 610 нм и 280 нм. Наличие примесей в образцах ЦП контролировали методом иммуноэлектрофореза по Грабару [7], используя антисыворотку к белкам плазмы крови человека ("ИмБио", Н.Новгород).

Радиальную иммунодиффузию проводили в 1% агаровом геле ("Difco", США) слоем 1 мм в 0,1 М веронал-мединаловом буфере, pH 8,6. В качестве контроля использовали образцы, содержащие 200, 400 и 800 мкг/мл ЦП. Концентрацию белка определяли по методу Лоури. После внесения проб объемом 10 мкл в лунки пластины инкубировали 48 часов. По истечении срока инкубации пластины геля высушивали и окрашивали раствором амидочерного 10Б. Диаметр колец преципитации измеряли с помощью линейки. Строили калибровочный график по результатам определения контрольных проб ЦП. Исходя из калибровочного графика, рассчитывали концентрацию ЦП в опытных пробах.

Антисыворотку к ЦП получали при иммунизации лабораторных кроликов породы шиншилла обоего пола весом 2,5-3 кг. Животных иммунизировали 5-кратно с интервалом 7-10 дней: при первых четырех инъекциях антиген (раствор церулоплазмина) вводили внутрикожно, при пятой инъекции – внутривенно. Для иммунизации использовали препараты ЦП со степенью очистки не менее 0,045. Доза на одного животного составляла 1 мг белка на одну инъекцию. Антиген вводили в несколько точек, предварительно смешав с равным объемом адьюванта Фрейнда; на 5 этапе иммунизации раствор ЦП вводили в ушную вену. Через 6-7 дней после окончания цикла иммунизации производили пробное взятие крови. После свертывания крови отделяли сыворотку и определяли в ней титр специфических антител методом Ухтерлони [8], используя в качестве антигена раствор очищенного церулоплазмина. Отбирали сыворотки с титром антител не ниже 1:4. Контроль сывороток на специфичность проводили методом иммуноэлектрофореза, используя в качестве антигена стандартную сыворотку крови человека ("ИмБио", Н.Новгород). Отбраковывали сыворотки, дававшие более 1 дуги преципитации. Объединенный пул сывороток использовали в дальнейших экспериментах.

Анализировали 48 образцов плазмы крови беременных в возрасте от 16 до 42 лет, находившихся в стационаре родильного дома №4 г. Н. Новгорода. Пациентки были разделены на 4 группы. В первую группу вошли 18 женщин с физиологическим течением беременности (сроки беременности от 25 до 40 недель). Вторую группу составили 11 женщин с гестозом средней тяжести и

тяжелым гестозом (сроки беременности от 32 до 39 недель). В третью группу вошли 9 женщин с диагностированной фетоплацентарной недостаточностью (ФПН) (сроки беременности от 27 до 37 недель). В 4 группу были включены 10 беременных со сроком 41 неделя (перенашивание). Кроме того, проанализировано 30 образцов плазмы здоровых доноров, предоставленных Нижегородской станцией переливания крови.

Полученные результаты обрабатывали статистически с использованием критерия Стьюдента [9].

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Результаты исследования представлены в таблице и на рисунках 1-3. У беременных отмечается значительное возрастание оксидазной активности плазмы, по сравнению с группой доноров (рис. 1). При наличии патологии наблюдается достоверное снижение оксидазной активности, по сравнению с нормально протекающей беременностью.

*Таблица.* Зависимость содержания и активности церулоплазмينا в плазме крови беременных от вида патологии.

№ группы	группы беременных	концентрация ЦП, мкг/мл	оксидазная активность плазмы, ед/мл	специфическая активность ЦП плазмы, ед/мкг ЦП
1	нормально протекающая беременность, n=18	777,2±104,2	75,9±17,0	0,098±0,02
2	гестозы, n=11	760,9±116,8	50,2±16,6*	0,067±0,025*
3	ФПН, n=9	763,3±107,5	52,8±21,7*	0,069±0,027*
4	перенашивание, n=10	674±155,3 *	36,4±14,2 *	0,054±0,020*
5	здоровые доноры, n=30	375,0±62,2	32,8±6,5	0,089±0,019

Примечания: \*- достоверные различия с нормой,  $p \leq 0,001$ .

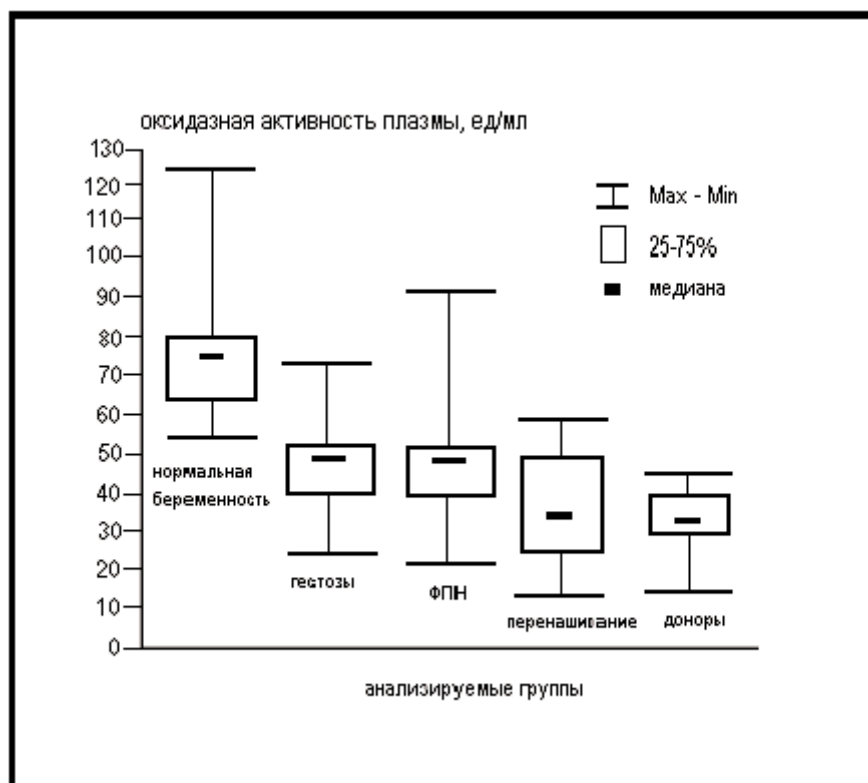


Рисунок 1.

Оксидазная активность плазмы. По оси ординат - активность, ед/мл.

## ЦЕРУЛОПЛАЗМИН В КРОВИ БЕРЕМЕННЫХ

Концентрация церулоплазмينا у здоровых доноров ( $375 \pm 62,2$  мкг/мл) соответствовала нормальным величинам при определении ЦП с помощью антител (200-500 мкг/мл) [10]. Мы не выявили статистически достоверных различий между концентрациями ЦП в норме, при гестозах и ФПН (рис. 2). Наиболее выраженное достоверное снижение всех исследуемых параметров наблюдалось в группе беременных при перенашивании. Интересно, что несмотря на значительное отличие этих параметров от группы с нормально протекающей беременностью, не отмечалось заметного ухудшения общего состояния этих женщин.

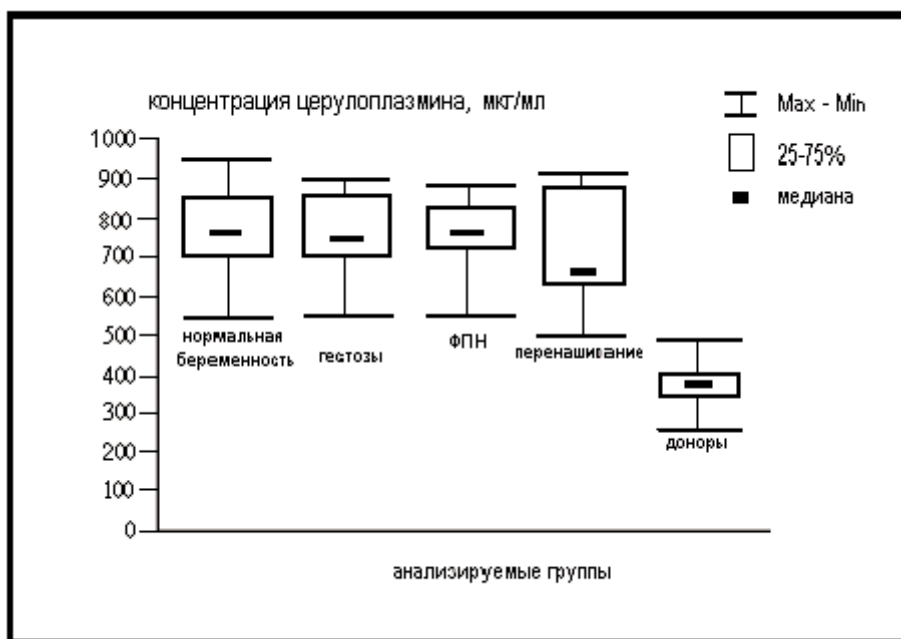


Рисунок 2.

Концентрация церулоплазмينا в плазме крови. По оси ординат - концентрация ЦП, мкг/мл.

К сожалению, следует отметить, что в настоящее время повсеместно приняты методы оценки концентрации ЦП по оксидазной активности. В основе этих тестов лежат различные модификации метода Равина [11,12], при этом концентрация рассчитывается по соотношению ферментативной активности тестируемого и стандартного образцов ЦП. Этот метод не позволяет судить об истинной концентрации ЦП в плазме и о соотношении его активной и неактивной форм. В последние годы внимание исследователей привлечено к специфической активности ЦП, как более чувствительному индикатору состояния антиоксидантной системы и метаболизма меди в организме, чем концентрация ЦП в плазме крови [3,13].

Появилось много работ, свидетельствующих о том, что соотношение различных форм фермента зависит от состояния организма и вида патологии. Например, при преэклампсии наблюдается выраженное снижение специфической активности ЦП [14]. При воспалительных заболеваниях, например, ревматоидном артрите, напротив, происходит повышение специфической активности ЦП [15]. Механизмы, лежащие в основе регуляции активности ЦП, остаются неясными. Хотя при беременности синтез ЦП возрастает, снижение его специфической активности может быть показателем степени уменьшения материнских резервов меди. Предполагается, что увеличение доли неактивного фермента при беременности вызвано усилением потребления тканями плода меди, получаемой из ЦП материнской плазмы. Получены данные, что феррооксидазная активность ЦП снижается при воздействии супероксидных радикалов [16], и увеличение доли

неактивного фермента свидетельствует о возрастании уровня свободнорадикального окисления при беременности.

Достоверное снижение оксидазной активности плазмы ( $p \leq 0,001$ ) наблюдалось во всех группах с патологией беременности (рис. 3). При этом изменялась как оксидазная активность плазмы, так и специфическая активность ЦП. В особенности заметными эти изменения были при перенашивании беременности.

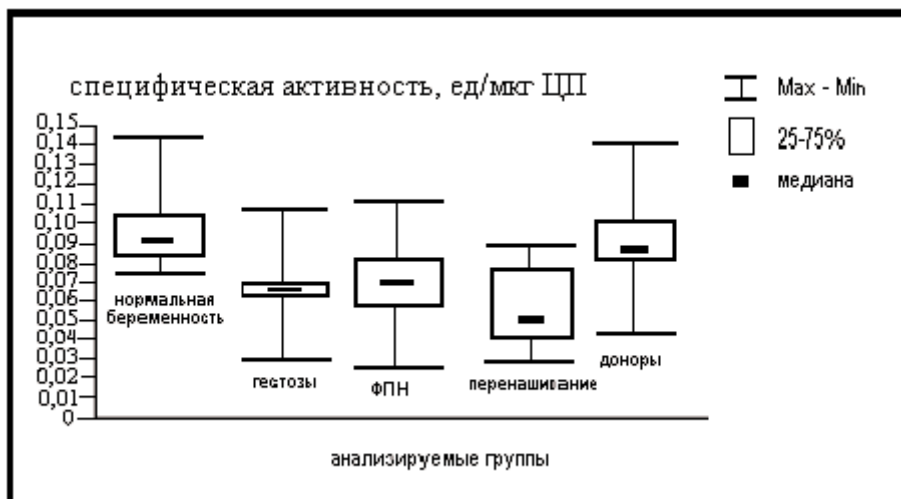


Рисунок 3.

Специфическая активность церулоплазмينا. По оси ординат - активность, ед/мкг ЦП.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что специфическая активность ЦП является дополнительным критерием оценки состояния организма беременных. В особенности этот параметр интересен как показатель готовности организма беременной к родам, и может быть использован в качестве прогностического критерия при перенашивании беременности.

#### ЛИТЕРАТУРА.

1. Wand Y., Walsh S.W., Guo J., Zang J. (1991) Am. J. Obstet. Gynecol., **165**, 1690-1694.
2. Louro M.O., Cocho J.A., Tutor J.C. (2001) Clin. Chim. Acta, **312**, 123-127.
3. Milne D.B. (1994) Clin. Chem., **40**, 1479-1484.
4. Arnaud P., Gianazza E., Miribel L. (1988) Meth. Enzymol., **163**, 441-452.
5. Фримель Х. (1979) Иммунологические методы. Мир, Москва, с. 49-57.
6. Пискарева Ю.К., Крайнова Т.А., Анастасиев В.В., Ефремова Л.М. (2001) Патент №2162338, опубл. 27.01.01, бюлл.№3.
7. Аксельсен Н., Крелль Й., Бееке Б. (1977) Руководство по количественному иммуноэлектрофорезу. Мир, Москва, с. 11-42.
8. Фримель Х. (1979) Иммунологические методы. Мир, Москва, с. 31-37.
9. Лакин Г.Ф. (1990) Биометрия. Высшая Школа, Москва, с. 113-128.
10. Putnam F.W. (1984) Plasma proteins, 2<sup>nd</sup> Edn., **4**, 5.
11. Колб В.Г., Камышников В.С. (1982) Справочник по клинической химии. Минск, с. 290-291.
12. Сиверина О.Б., Басевич В.В., Басова Р.В., Гаврилин И.Н., Ярополов А.Н. (1986) Лаб. дело, **10**, 612-618.
13. Milne D.B., Johnson P.E. (1993) Clin. Chem., **39**, 883-887.
14. Vitoratos N., Salamakelis E., Dalamaga N., Kassanos D., Creatsas G. (1999) Eur. J. Obstet. Gynecol., **84**, 63-67.
15. Louro M.O., Cocho J.A., Mera A., Tutor J.C. (2000) J. Trace Elem. Med. Biol., **14**(3), 174-178.
16. Winyard P., Lunec J., Brailsford S., Blake D. (1984) Int. J. Biochem., **16**, 1273-1278.

Поступила: 25. 04 .2003

ASSESSMENT OF THE SPECIFIC OXIDASE ACTIVITY OF CERULOPLASMIN IN  
PREGNANT WOMEN

*T.A. Krainova<sup>1</sup>, Ju.V. Morozova<sup>2</sup>, L.M. Efremova<sup>1</sup>, L.A. Sherer<sup>1</sup>, T.S. Kachalina<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Nizhny Novgorod State Bacteric Preparation Enterprise "ImBio", Gruzinskaya str., 44, Nizhny Novgorod, 603950 Russia; tel.: (8312)34-38-56; e-mail: imbio-lab@mail.ru.

<sup>2</sup>Nizhny Novgorod State Medical Academy, Minin and Pozharsky sq., 10/1, Nizhny Novgorod, 603005 Russia; tel.: (8312)38-95-43.

The specific oxidase activity of ceruloplasmin (activity per unit mass of enzyme protein) was studied in plasma of pregnant women with gestosis, feto-placental insufficiency, postmature and in normal pregnancy. The specific oxidase activity decreased in all groups with pathology. The ceruloplasmin concentration decreased in the postmature group.

**Key words:** ceruloplasmin, pregnancy, specific oxidase activity.