

ГІНЕКОЛОГІЯ

УДК 618.177-06:618.12-007.272-07:577

*В.В. Орлова**Національна медична академія післядипломної освіти ім. П.Л. Шупика, м. Київ***СТАН ПРО / АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ
В РЕПРОДУКТИВНОМУ ТРАКТІ ЖІНОК
З ТРУБНО-ПЕРИТОНЕАЛЬНИМ БЕЗПЛІДДЯМ**

Вивчали стан про/антиоксидантної системи в ендометрії та фолікулярній рідині жінок з безпліддям трубно-перитонеального генезу. Оцінювали маркери окислювального стресу. Показано порушення балансу між про- та антиоксидантами з тенденцією до розвитку окислювального стресу.

Ключові слова: окислювальний стрес, трубно-перитонеальне безпліддя, ендометрій, фолікулярна рідина.

Вступ

У сучасній репродуктивній медицині велика увага приділяється вивченню балансу між прооксидантами й антиоксидантами, тому що рівновага цієї системи підтримує нормальне функціонування ооцитів, клітин ендометрія тощо та дисбаланс у ній призводить до виникнення окислювального стресу.

На сьогодні підтверджено негативний вплив окислювального стресу на репродуктивну функцію. Так, встановлено, що надмірна кількість активних форм кисню (АФК) може бути первинною причиною поганої якості ооцитів [1]. Патологічний вміст АФК впливає не тільки на дозрівання, якість ооцитів та може впливати на імплантаційну здатність ендометрія, від чого залежить настання вагітності.

Деякі патологічні процеси в ендометрії супроводжуються розвитком окислювального стресу. Досліджено, що АФК мають місце при різних факторах безпліддя: перитонеальному, матковому, ендометріозі та безплідді неясного генезу [2–4]. У жінок з трубно-перитонеальним безпліддям виявлено підвищення рівнів маркерів прооксидантної системи (АФК, NO, загального антиоксидантного ста-

тусу та ін.), що корелює з поганою якістю ооцитів та ембріонів [5].

В ендометрії існує баланс між реактивними формами кисню і різними системами захисту від окислювального стресу для підтримки таких важливих фізіологічних процесів, наприклад, як менструація та імплантація. Порушення цього балансу може спричинити розлад фізіологічних функцій репродуктивної системи. Отже, дві системи, а саме: прооксидантна та антиоксидантна, баланують одна одну і відіграють дуже важливу роль у фізіології репродукції. У зв'язку з цим актуальним є дослідження стану репродуктивного тракту жінок з безпліддям трубно-перитонеального походження на наявність окислювального стресу, які проходять лікування в клініках репродуктивних технологій.

Мета дослідження – оцінити стан про/антиоксидантної системи в тканині і рідині репродуктивного тракту жінок з трубно-перитонеальним фактором безпліддя.

Матеріал і методи

У дослідженні взяли участь 65 жінок основної групи з безпліддям трубно-перитонеального генезу, що проходили лікування в клініці репродуктивних технологій Україн-

© В.В. Орлова, 2018

ського державного інституту репродуктології в місті Київ. Для комплексного оцінювання стану репродуктивної системи всі пацієнтки були обстежені згідно з Наказом Міністерства охорони здоров'я України від 09.09.13 № 787 «Про затвердження Порядку застосування допоміжних репродуктивних технологій в Україні». У групу контролю ввійшли 35 здорових жінок. Віковий діапазон досліджуваних жінок обох груп коливався від 25 до 42 років.

Обстеження пацієнток проводилось за допомогою рутинних методів: збір анамнезу, скарги, гінекологічний огляд, клініко-лабораторне дослідження за стандартними методиками.

Для визначення розвитку окислювального стресу в жінок з безпліддям було оцінено прота антиоксидантні показники в ендометрії і фолікулярній рідині, у здорових жінок – тільки в ендометрії. Забір ендометрія проводили всім жінкам у другій фазі циклу на 19–21-й день шляхом пайпель-біопсії. Отриманий зразок тканини поділяли на фрагменти для постановки біохімічних методик. Фолікулярну рідину для дослідження отримували шляхом трансвагінальної пункції фолікулів після вилучення яйцеклітин у жінок з безпліддям, що проходили лікування методами допоміжних репродуктивних технологій. У зразках було визначено: інтенсивність окислювальної модифікації білка (ОМБ), вміст ТБК-активних продуктів, активність супероксиддисмутази (СОД) та каталази.

Рівні продуктів пероксидного окиснення білків визначали за методикою Е. Дубининой [6], яка ґрунтується на спектрофотометричному визначенні альдегідних і кетонних похідних 2,4-динітрофенілгідразину (2,4-ДНФГ). Продукти ОМБ нейтрального характеру визначали при $\lambda=356$ нм (альдегідні продукти) та $\lambda=370$ нм (кетонні продукти). Продукти ОМБ основного характеру визначали при $\lambda=430$ нм (альдегідні продукти) та $\lambda=530$ нм (кетонні продукти). ТБК-активні продукти визначали за загальноприйнятою методикою, яка заснована на здатності тіобарбітурової кислоти реагувати з малоновим діальдегідом – проміжним продуктом етапу ензиматичного окиснення арахідонової кислоти і кінцевим продуктом окислювальної деградації ліпідів [7]. Активність СОД визначали методом Чеварі зі співавт. [8], активність каталази – за Корольок зі співавт. [9].

Статистичну обробку даних проводили за допомогою надбудови «Аналіз даних» електронних таблиць Microsoft Office Excel 2003 і програми для рангової кореляції методом Спірмена. Статистичні відмінності даних оцінювали за Уїлкоксоном. За міру статистичної значущості кореляційного зв'язку був прийнятий рівень $p=0,05$.

Результати та їх обговорення

Середній період безпліддя в жінок основної групи тривав від 1 до 16 років [(6,75±1,43) року]. Первинне безпліддя було у 27,6 % жінок та вторинне – у 72,4 %. Усі досліджені жінки мали безпліддя трубно-перитонеального генезу. Цей фактор можна поділити на три складові: відсутність маткових труб (у 72,3 % жінок), їхню непрохідність (у 18,4 %) або поєднання обох компонентів трубного фактора (у 9,2 % жінок).

У жінок із вторинним безпліддям у середньому вагітностей було 1,92±0,42. У структурі вагітностей 58,5 % було позаматкових, 26,2 % – маткових, з них лише в 3 % випадків закінчились самостійними пологами, у 20 % – самовільними викиднями та у 12,3 % – артифіційним абортom.

Першу групу становили жінки з безпліддям, другу – відносно здорові жінки, з нормальним перебігом вагітності і фізіологічними пологами.

Результати дослідження показників прооксидантної системи в ендометрії свідчать про те, що рівні ТБК та ОМБ у пацієнток з безпліддям підвищені відносно контролю. Рівень ТБК-активних продуктів у першій групі дорівнював (51,87±0,97) нмоль/мг білка, тоді як у другій – (27,75±0,71) нмоль/мг білка, підвищення рівня ТБК є статистично значущим ($p<0,05$). У дослідженні порушення фізіологічного рівня реакцій перебігу перекисного окиснення ліпідів підтверджено, що воно є однією з основних причин клітинної деструкції [10].

Вміст продуктів ОМБ нейтрального характеру в групі жінок з безпліддям збільшився і достовірно перевищує їхній рівень у пацієнток другої групи. При цьому вміст альдопохідних підвищений на 31,8 %, а рівень кетопохідних – на 25 % (табл. 1). Пероксидація білка з накопиченням продуктів основного характеру супроводжувалась накопиченням як АФГ, так і КФГ на 38,5 і 41,7 % для першої

Таблиця 1. Окислювальна модифікація білка в ендометрії пацієнток, од./мг білка

Група пацієнток	Продукти ОМБ, характеру			
	нейтрального		основного	
	альдопохідні (АФГ)	кетопохідні (КФГ)	альдопохідні (АФГ)	кетопохідні (КФГ)
Перша (основна)	0,220±0,005*	0,200±0,005*	0,130±0,004*	0,120±0,004*
Друга (контрольна)	0,150±0,003	0,150±0,001	0,080±0,001	0,070±0,001

* $p < 0,05$, достовірна різниця з показником другої групи.

групи в порівнянні з показниками пацієнток другої групи.

За отриманими даними, в ендометрії жінок з безпліддям спостерігається підвищення окислювального потенціалу тканини в середню лютеїнову фазу. За даними [11], підвищення інтенсифікації ОМБ і ліпопероксидації в ендометрії характерно для пізньої лютеїнової фази. Наші результати відповідають даним [5] та підтверджують наявність дисбалансу про/антиоксидантної системи в ендометрії в період відкриття вікна імплантації при трубно-перитонеальному безплідді.

На сьогодні, безумовно, виникає ще досить багато питань, які стосуються інтенсивності окиснення ліпідів і білків при різних факторах безпліддя, у тому числі й при перитонеальному [2–4]. Так, залишається нез'ясованим спосіб регулювання процесів ОМБ шляхом збільшення концентрацій реакції АФК / активних карбонілів при фертилізації ооцита і навіть пригніченні саме запліднення. Активно ведеться пошук білків, найбільш схильних до окислювальної модифікації. Неясно, який зі шляхів спрямованого карбоксилювання певних білків переважно запускається в репродуктивному тракті і на яких його ділянках [12].

ум. од./ $(\text{хв} \times \text{мг білка})$

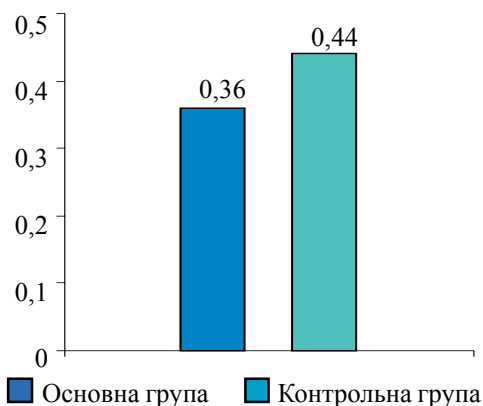


Рис. 1. Активність СОД ендометрія: $p < 0,05$ у порівнянні з контролем

Супероксиддисмутазу вважають первинною ланкою антиоксидантного захисту. Нами встановлено, що в ендометрії жінок першої групи активність антиоксидантних ензимів СОД і каталази була достовірно нижчою за показники жінок другої групи. Так, активність СОД знизилась у 1,2 разу до $(0,36 \pm 0)$ ум. од. / $(\text{хв} \times \text{мг білка})$, активність каталази – в 1,5 разу до $(0,19 \pm 0,01)$ нмоль / $(\text{хв} \times \text{мг білка})$ (рис. 1, 2).

Отже, ми спостерігаємо в тканині ендометрія жінок з трубно-перитонеальним безпліддям неспроможність антиоксидантної системи до негативних наслідків впливу прооксидантів.

Особливістю метаболізму ендометрія в нормі є інтенсивні аеробні окислювальні процеси і точно збалансована система прооксидантів та антиоксидантів. Відповідно, для такої тканини патологічним є не саме вільнорадикальне окиснення, а порушення його регуляції антиоксидантною системою [2–4].

Проведено кореляційний аналіз отриманих даних у системі прооксиданти – антиоксиданти для ендометрія з трубно-перитонеальним фактором. Було встановлено сильний негативний кореляційний зв'язок активності СОД з рівнем ТБК-продуктів з коефіцієнтом кореляції $r = -0,96$.

нмоль/ $(\text{хв} \times \text{мг білка})$

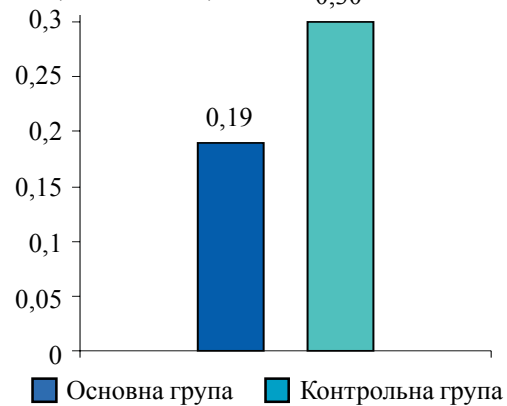


Рис. 2. Активність каталази ендометрія: $p < 0,05$ у порівнянні з контролем

Для пероксидації білків і активності ензимів виявлено статистично незначний негативний кореляційний зв'язок (табл. 2). Інакше кажучи, спостерігається залежність між підвищенням пероксидації ліпідів і зниженням активності СОД. Можливо, це пов'язано з тим, що накопичення вільних радикалів першою чергою відбувається в біліпідному шарі мембран.

тання, як описано у [5], має декілька шляхів, за якими можуть накопичуватись вільні радикали. Надлишок вільних радикалів може зашкодити клітинам гранульози і яйцеклітині шляхом пригнічення АТФ-синтетази, порушення функцій мітохондрій. А значне зниження вмісту АТФ як джерела енергії може негативно вплинути на дозрівання ооцитів до стадії метафази II [1, 13]. Крім того, такі наслідки окис-

Таблиця 2. Матриця кореляційних зв'язків активності СОД, каталази та інтенсивності ОМБ, накопичення ТБК-продуктів у тканині ендометрія і фолікулярній рідині

Пари кореляційних зв'язків	Коефіцієнт кореляції, r	Достовірність кореляційних зв'язків
<i>Тканина ендометрія</i>		
ТБК-продукти – СОД	-0,96	p<0,05
ТБК-продукти – каталаза	-0,32	p<0,05
АФГ – СОД	-0,40	p<0,05
КФГ – СОД	-0,36	p<0,05
АФГ – каталаза	-0,18	p<0,05
КФГ – каталаза	-0,33	p<0,05
<i>Фолікулярна рідина</i>		
ТБК-продукти – СОД	-0,76	p<0,05
ТБК-продукти – каталаза	-0,87	p<0,05
АФГ – СОД	-0,75	p<0,05
КФГ – СОД	-0,78	p<0,05
АФГ – каталаза	-0,88	p<0,05
КФГ – каталаза	-0,80	p<0,05

Таким чином, у ендометрії жінок з безпліддям порушується баланс між про- та антиоксидантами, а саме: підвищений рівень продуктів пероксидації ліпідів і білків супроводжується зниженням активності захисних ензимів, що вказує на розвиток окислювального стресу та пошкодження важливих метаболічних ланок клітин.

Проведено дослідження показників про-антиоксидантної системи у фолікулярній рідині в жінок з безпліддям (група основна, n=32) та у пацієток, що пройшли антиоксидантну терапію (група порівняння, n=33).

У жінок групи порівняння було встановлено зниження рівнів як ТБК-продуктів, так і продуктів ОМБ відносно показників пацієток основної групи. Істотне зниження ступеня деструкції білків було відмічено для КФГ (і основного, і нейтрального характеру) – на 63,3 % (рис. 3, 4).

Нами встановлено, що жінки з безпліддям мають підвищений рівень прооксидантів як в ендометрії, так і у фолікулярній рідині. Ос-

лювального стресу, як пригнічення вироблення прогестерону лютеїновими клітинами, окисне пошкодження клітинних мембран часто розглядають як причину регресу жовтого тіла.

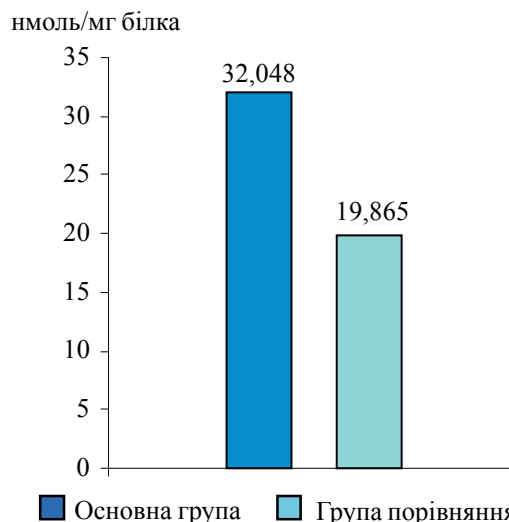


Рис. 3. Вміст ТБК-продуктів у фолікулярній рідині: p<0,05

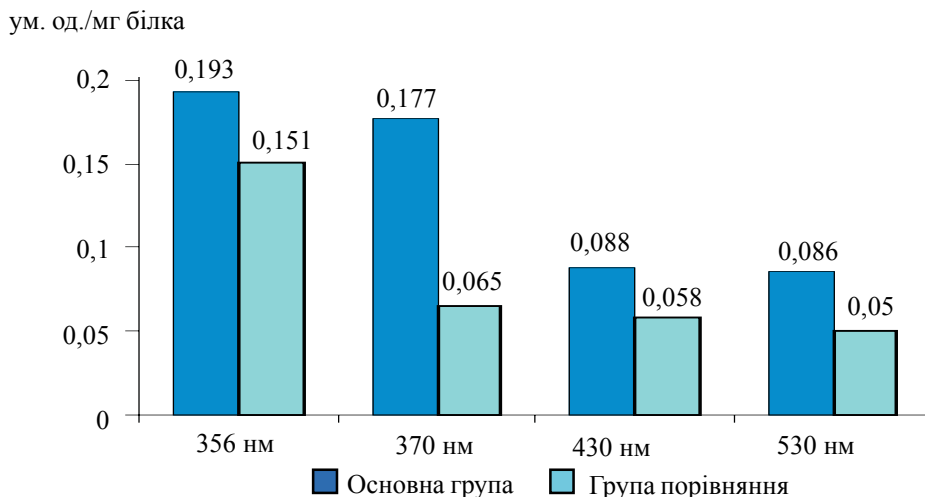


Рис. 4. Вміст продуктів ОМБ у фолікулярній рідині: 356 і 370 нм – альдо- та кетопохідні продукти нейтрального характеру; 430 і 530 нм – альдо- та кетопохідні продукти основного характеру; $p < 0,05$

Простежено позитивну тенденцію (статистично значущу) до зниження рівня прооксидантів у фолікулярній рідині в групі пацієнток після антиоксидантної терапії.

Оцінивши антиоксидантний захист у фолікулярній рідині, ми дійшли висновку, що в групі жінок з безпліддям активність СОД була статистично нижчою на 36,7 %, а каталазна активність – майже у 2 рази меншою, ніж у жінок групи контролю (рис. 5, 6).

Таким чином, у фолікулярній рідині жінок з трубно-перитонеальним фактором спостерігається порушення балансу в системі прооксиданти – антиоксиданти з тенденцією до розвитку окислювального стресу, як і в ендометрії.

При кореляційному аналізі маркерів окислювального стресу у фолікулярній рідині встановлено статистично значущу залежність між ТБК та ензимами, ОМБ та ензимами антиоксидантного захисту. Дані подано в табл. 2. Негативні кореляційні зв'язки вказують на дисбаланс у системі про/антиоксидантів при безплідді трубного походження, що співпадає з даними [5].

Висновок

Стан про/антиоксидантної системи в жінок з безпліддям трубно-перитонеального походження зазнав змін: рівні ТБК-продуктів і продуктів окислювальної модифікації білка мають тенденцію до збільшення, а активність

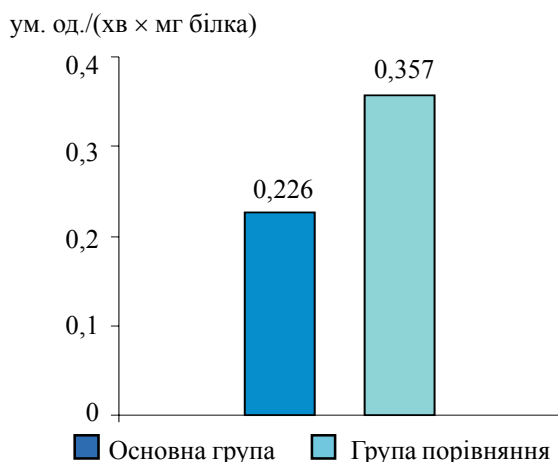


Рис. 5. Активність СОД у фолікулярній рідині: $p < 0,05$

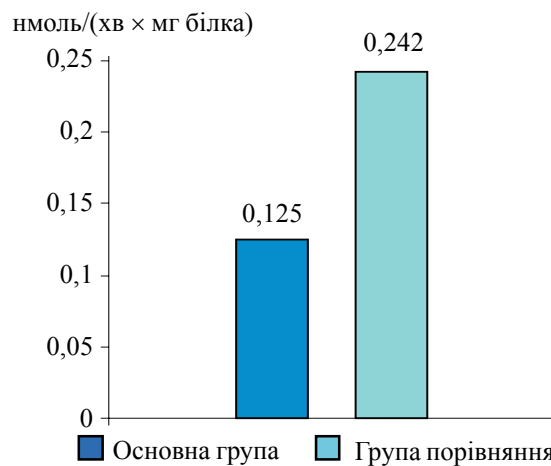


Рис. 6. Активність каталази у фолікулярній рідині: $p < 0,05$

ензимів антиоксидантного захисту недостатня, щоб нейтралізувати вільні радикали. Отже, виявлено порушення балансу між про- та антиоксидантами з тенденцією розвитку окислювального стресу.

Отримані результати дозволяють пропонувати необхідність корекції окислювального стресу при безплідді трубно-перитонеального генезу засобами як специфічної, так і неспецифічної антиоксидантної терапії.

Список літератури

1. Lawlor D. W. Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: a critical evaluation of mechanisms and integration of processes / D. W. Lawlor, W. Tezara // *Ann. Bot.* – 2009. – Vol. 103 (4). – P. 561–579.
2. Oxidative stress and chromium (VI) carcinogenesis / H. Yao, L. Guo, B. H. Jiang [et al.] // *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* – 2008. – Vol. 27 (2). – P. 77–88.
3. Rizk B. The uterine factor in infertility / B. Rizk, H. N. Sallam // *Clinical infertility and in vitro fertilization* / ed. by B. Rizk, H. N. Sallam. – St. Louis : Jaypee Brothers Medical Publishers, 2012. – P. 84–96.
4. Oxidative and antioxidative status in the endometrium of patients with benign gynecological disorders / C. Nayki, U. Nayki, M. Gunay [et al.] // *J. Gynecol. Obstet. Hum. Reprod.* – 2017. – Vol. 46 (3). – P. 243–247.
5. Markers of oxidative stress in follicular fluid of women with endometriosis and tubal infertility undergoing IVF / A. K. Singh, R. Chattopadhyay, B. Chakravarty, K. Chaudhury // *Reprod. Toxicol.* – 2013. – Vol. 42. – P. 116–124.
6. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения / Е. Дубинина, С. Бурмистров, Д. Ходов, И. Поротов // *Вопросы медицинской химии.* – 1995. – Т. 41, № 1. – С. 24–26.
7. Орехович В. Н. Современные методы в биохимии / В. Н. Орехович. – М. : Медицина, 1977. – С. 66–68.
8. Чевари С. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах / С. Чевари, И. Чаба, Й. Секей // *Лабораторное дело.* – 1985. – Вып. 11. – С. 678–681.
9. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова, В. Е. Токарев // *Лабораторное дело.* – 1988. – Вып. 1. – С. 16–18.
10. Окислительная модификация белков и липидов плазмы крови больных раком легкого / Р. Н. Белоногов, Н. М. Титова, Ю. А. Дыхно, А. А. Савченко // *Сибирский онкологический журнал.* – 2009. – № 4 (34). – С. 48–53.
11. Changes in activity of superoxide dismutase in the human endometrium throughout the menstrual cycle and in early pregnancy / N. Sugino, K. Shimamura, S. Takiguchi [et al.] // *Human Reproduction.* – 1996. – Vol. 11, № 5. – P. 1073–1078.
12. Halliwell B. Free radical in biology and medicine / B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge. – Oxford : Oxford University Press, 2000. – 320 p.
13. Regulation of cytosolic and mitochondrial ATP levels in mouse eggs and zygotes / R. Dumollard, K. Campbell, G. Halet [et al.] // *Dev. Biol.* – 2008. – Vol. 316 (2). – P. 431–440.

References

1. Lawlor D.W., Tezara W. (2009). Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: a critical evaluation of mechanisms and integration of processes. *Ann. Bot.*, vol. 103 (4), pp. 561–579.
2. Yao H., Guo L., Jiang B.H., Luo J., Shi X. (2008). Oxidative stress and chromium (VI) carcinogenesis. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, vol. 27 (2), pp. 77–88.
3. Rizk B., Sallam H.N. (2012). The uterine factor in infertility. *Clinical infertility and in vitro fertilization*. B. Rizk, H.N. Sallam (Ed.). (Pp. 84–96). St. Louis: Jaypee Brothers Medical Publishers.
4. Nayki C., Nayki U., Gunay M., Kulhan M., Cankaya M., Humeyra Taskin Kafa A., Balci G. (2017). Oxidative and antioxidative status in the endometrium of patients with benign gynecological disorders. *J. Gynecol. Obstet. Hum. Reprod.*, vol. 46 (3), pp. 243–247.

5. Singh A.K., Chattopadhyay R., Chakravarty B., Chaudhury K. (2013). Markers of oxidative stress in follicular fluid of women with endometriosis and tubal infertility undergoing IVF. *Reprod. Toxicol.*, vol. 42, pp. 116–124.
6. Dubinina Ye., Burmistrov S., Khodov D., Porotov I. (1995). Okislitelnaia modifikatsiia belkov syvorotki krovi cheloveka, metod yeie opredeleniia [Oxidizing modification of proteins of serum of blood of person, method of her determination]. *Voprosy meditsinskoi khimii – Questions of Medical Chemistry*, vol. 41, № 1, pp. 24–26 [in Russian].
7. Orekhovich V.N. (1977). *Sovremennyye metody v biokhimiі* [Modern methods are in biochemistry]. Moscow: Meditsina, pp. 66–68 [in Russian].
8. Chevri S., Chaba I., Sekey Y. (1985). Rol superoksiddismutazy v okislitelnykh protsessakh kletki i metod opredeleniia yeie v biologicheskikh materialakh [The role of superoxide dismutase in the oxidative processes of the cell and the method for determining it in biological materials]. *Laboratornoie delo – Laboratory Work*, issue 11, pp. 678–681 [in Russian].
9. Koroliuk M.A., Ivanova L.I., Mayorova I.H., Tokarev V.Ye. (1988). Metod opredeleniia aktivnosti katalazy [Method for the determination of catalase activity]. *Laboratornoie delo – Laboratory Work*, issue 1, pp. 16–18 [in Russian].
10. Belonohov R.N., Titova N.M., Dykhno Yu.A., Savchenko A.A. (2009). Okislitelnaia modifikatsiia belkov i lipidov plazmy krovi bolnykh rakom lehkoho [Oxidative modification of plasma proteins and lipids in patients with lung cancer]. *Sibirskii onkologicheskii zhurnal – Siberian Oncology Journal*, № 4 (34), pp. 48–53 [in Russian].
11. Sugino N., Shimamura K., Takiguchi S., Tamura H., Ono M., Nakata M. (1996). Changes in activity of superoxide dismutase in the human endometrium throughout the menstrual cycle and in early pregnancy. *Human Reproduction*, vol. 11, № 5, pp. 1073–1078.
12. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (2000). *Free radical in biology and medicine*. Oxford: Oxford University Press, 320 p.
13. Dumollard R., Campbell K., Halet G., Carroll J., Swann K. (2008). Regulation of cytosolic and mitochondrial ATP levels in mouse eggs and zygotes. *Dev. Biol.*, vol. 316 (2), pp. 431–440.

В.В. Орлова

СОСТОЯНИЕ ПРО/АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ В РЕПРОДУКТИВНОМ ТРАКТЕ ЖЕНЩИН С ТРУБНО-ПЕРИТОНЕАЛЬНЫМ БЕСПЛОДИЕМ

Изучали состояние про/антиоксидантной системы в эндометрии и фолликулярной жидкости женщин с бесплодием трубно-перитонеального генеза. Оценивали маркеры окислительного стресса. Показано нарушение баланса между про- и антиоксидантами с тенденцией к развитию окислительного стресса.

Ключевые слова: окислительный стресс, трубно-перитонеальное бесплодие, эндометрий, фолликулярная жидкость.

V.V. Orlova

OXIDATIVE STRESS BIOMARKERS IN REPRODUCTIVE TRACT OF WOMEN WITH TUBO-PERITONEAL INFERTILITY

Prooxidant and antioxidant systems' condition in the endometrial secretions and follicular fluid of women with tubo-peritoneal infertility factor was studied. Oxidative stress markers were estimated. Disbalance between pro- and antioxidants with a tendency to develop of oxidative stress is shown.

Keywords: oxidative stress, tubo-peritoneal infertility, endometrium, follicular fluid.

Надійшла 28.02.18

Відомості про автора

Орлова Вікторія Вікторівна – аспірант кафедри акушерства, гінекології та репродуктології Українського державного інституту репродуктології Національної медичної академії післядипломної освіти імені П.Л. Шупика.

Адреса: 03150, м. Київ, бульвар Дружби Народів, 3б, кв. 56.

Тел: +38(095)059-09-93.

E-mail: dr.viktoriaorlova@gmail.com.

ORCID: 0000-0003-2821-4767.