



<https://doi.org/10.34883/PI.2023.13.5.007>
УДК 618.3



Кошулько П.А. ✉, Шевченко А.А., Зайцев А.А., Зайцева А.П., Сергеев Д.Д.,
Гончар М.С., Юдина А.Г., Куницына Ю.О., Кошулько Д.А.
Рязанский государственный медицинский университет имени академика
И.П. Павлова, Рязань, Россия

Маркеры неполного выкидыша (неполного самопроизвольного аборта)

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция и дизайн исследования, редактирование – Кошулько П.А., Куницына Ю.О.; сбор и обработка материала – Зайцев А.А., Зайцева А.П., Сергеев Д.Д.; статистическая обработка данных – Юдина А.Г., Гончар М.С., Кошулько Д.А.; написание текста – Кошулько П.А., Шевченко А.А.

Подана: 18.10.2023

Принята: 30.10.2023

Контакты: nikolconnik@gmail.com

Резюме

Цель. Изучить активность катепсинов D и B в лейкоцитах крови при нормальной беременности и неполном самопроизвольном выкидыше. Оценить концентрации продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и карбонильных производных белков. На основании полученных данных доказать значимость катепсинов D и B как маркеров неполного выкидыша и необходимость дальнейшего исследования для создания методики ранней диагностики и прогнозирования неполного самопроизвольного аборта.

Материалы и методы. В исследование вошли 70 беременных на сроке 5–6 недель, которые составили две группы: 1-я (контрольная группа) была представлена 35 клинически здоровыми пациентками с физиологически текущей беременностью. А во вторую (основную) группу вошли остальные 35 пациенток, у которых впоследствии произошел неполный самопроизвольный аборт. Беременность пациенток групп исследования была подтверждена при проведении ультразвукового исследования. Активность протеаз исследовали при помощи наборов для определения активности катепсинов с дальнейшей ее оценкой спектрофлуориметрическими методами. Концентрацию продуктов ПОЛ определяли фотометрическим способом, а уровень карбонильных производных белков определяли методом R. Levine.

Результаты. Установлено, что активность катепсина D статистически значимо возросла в 2,3 раза ($p=0,0004$) у пациенток с неполным самопроизвольным абортом по сравнению с активностью катепсина у пациенток с физиологической беременностью, активность же катепсина B статистически значимо возросла в 4,5 раза ($p=0,00002$). При проведении ROC-анализа было выяснено, что чувствительность и специфичность используемого нами метода при анализе активности катепсина D составила 93,75% и 100%, а катепсина B – 81,25% и 100% соответственно. Достоверность полученных данных проверялась при проведении дисперсионного анализа ANOVA. По полученным нами данным можно резюмировать, что уровень достоверности данных высокий, так как $p<0,05$, а следовательно, и полученные данные достоверны. Повышение активности катепсинов D и B связано с процессами аутолиза и

стремлением организма пациентки с патологическим течением беременности к расщеплению и изгнанию чужеродного, патологического в данном случае для организма агента – плодного яйца, прекратившего свое нормальное функционирование. При неполном самопроизвольном аборте наблюдается увеличение содержания карбонильных производных белков, формирование которых происходит за счет их взаимодействия с продуктами перекисного окисления липидов, что представлено.

Заключение. В результате исследования были выяснены причины повышения активности катепсинов D и B, повышения концентрации продуктов перекисного окисления липидов и карбонильных производных белков при неполном самопроизвольном аборте. Доказана роль катепсинов D и B в качестве маркеров неполного самопроизвольного аборта. Обоснована важность дальнейшего исследования для создания методики ранней диагностики и прогнозирования неполного самопроизвольного аборта.

Ключевые слова: катепсины D, B, протеазы, неполный самопроизвольный аборт, невынашивание беременности, неполный выкидыш, перекисное окисление липидов, карбонильные производные белка

Koshulko P. ✉, Shevchenko A., Zaitsev A., Zaitseva A., Sergeev D., Gonchar M., Yudina A., Kunitsyna Y., Koshulko D.

Ryazan State Medical University named after acad. I.P. Pavlov, Ryazan, Russia

Markers of Incomplete Miscarriage (Incomplete Spontaneous Abortion)

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: research concept and design, editing – Koshulko P., Kunitsyna Y.; collection and processing of material – Zaitsev A., Zaitseva A., Sergeev D.; statistical data processing – Yudina A., Gonchar M., Koshulko D.; text writing – Koshulko P., Shevchenko A.

Submitted: 18.10.2023

Accepted: 30.10.2023

Contacts: nikolconnik@gmail.com

Abstract

Purpose. Study of the activity of cathepsins D and B in blood leukocytes during normal pregnancy and incomplete spontaneous miscarriage. Assess the concentration of lipid peroxidation (LPO) products and carbonyl derivatives of proteins. Based on the data obtained, prove the significance of cathepsins D and B as markers of incomplete miscarriage and the need for further research to create a method for early diagnosis and prediction of incomplete spontaneous abortion.

Materials and methods. The study included 70 pregnant women at a period of 5–6 weeks, who made up two groups: the 1st (control group) was represented by 35 clinically healthy patients with a physiologically ongoing pregnancy. And the second (main) group included the remaining 35 patients who subsequently had an incomplete spontaneous abortion. Pregnancy of patients in the study groups was confirmed by ultrasound examination. The activity of proteases was studied using kits for determining the activity of cathepsins,

with its further assessment by spectrofluorometric methods. The concentration of lipid peroxidation products was determined photometrically, and the level of carbonyl derivatives of proteins was determined by the method of R. Levine.

Results. It was found that the activity of cathepsin D statistically significantly increased by 2.3 times ($p=0.0004$) in patients with incomplete spontaneous abortion compared with the activity of cathepsin in patients with physiological pregnancy, while the activity of cathepsin B increased statistically significantly by 4.5 times ($p=0.00002$). When conducting ROC analysis, it was found that the sensitivity and specificity of the method we used when analyzing the activity of cathepsin D was 93.75% and 100%, and that of cathepsin B was 81.25% and 100%, respectively. The reliability of the obtained data was checked using ANOVA analysis of variance. Based on the data we obtained, we can summarize that the level of reliability of the data is high, since $p<0.05$, and, therefore, the data obtained are reliable. The increase in the activity of cathepsins D and B is associated with the processes of autolysis and the desire of the body of a patient with a pathological pregnancy to split and expel a foreign agent, pathological in this case for the body – the fertilized egg, which has ceased its normal functioning. With incomplete spontaneous abortion, an increase in the content of carbonyl derivatives of proteins is observed, the formation of which occurs due to their interaction with the products of lipid peroxidation, which is presented.

Conclusion. As a result of the study, the reasons for the increased activity of cathepsins D and B, the increased concentration of lipid peroxidation products and carbonyl derivatives of proteins during incomplete spontaneous abortion were clarified. The role of cathepsins D and B as markers of incomplete spontaneous abortion has been proven. The importance of further research to create a method for early diagnosis and prediction of incomplete spontaneous abortion is substantiated.

Keywords: cathepsins B, D, proteases, anembryony, incomplete spontaneous abortion, miscarriage, incomplete miscarriage, lipid peroxidation, protein carbonyl derivatives

■ ВВЕДЕНИЕ

Репродуктивное здоровье и функция женского населения являются основополагающим направлением гинекологии и репродуктологии XXI века [1]. Повышение шансов на наступление беременности, совершенствование методов и системы охраны репродуктивного здоровья женщин с использованием репродуктивных технологий, повышение уровня медицинской грамотности и информированности, повышение качества и доступности медицинской помощи является одним из направлений политики Министерства здравоохранения РФ.

Проблема невынашивания беременности представляет угрозу для репродуктивного здоровья современных женщин и сохраняет свою актуальность по сей день. Невынашивание беременности – один из основных факторов репродуктивных потерь. По статистике, от 15% до 25% зарегистрированных беременностей заканчиваются самопроизвольным выкидышем или неразвивающейся беременностью, из них от 5 до 20% составляют привычную неразвивающуюся беременность, а остальные 80% беременностей прерываются на сроке до 12 недель [2–4].

Несмотря на то, что причины и провоцирующие факторы невынашивания беременности достаточно изучены, в современных руководствах, клинических

протоколах отсутствуют рекомендации по своевременной диагностике и профилактике данной патологии. Сохраняется необходимость в создании методов своевременной диагностики и профилактики патологии беременности [5].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучить активность катепсинов D и B в лейкоцитах крови при нормальной беременности и неполном самопроизвольном выкидыше. Оценить концентрации продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и карбонильных производных белков. На основании полученных данных доказать значимость катепсинов D и B как маркеров неполного выкидыша и необходимость дальнейшего исследования для создания методики ранней диагностики и прогнозирования неполного самопроизвольного аборта.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 35 беременных клинически здоровых женщин с неосложненным течением беременности (контрольная группа) и 35 пациенток с диагнозом «угрожающий аборт», поступивших на стационарное лечение в возрасте от 18 до 36 лет. В дальнейшем у 32 пациенток из группы с угрожающим абортом по результатам исхода беременности диагноз был изменен на неполный самопроизвольный аборт.

Из кандидаток в группы исследования были исключены пациентки с декомпенсированными формами заболеваний, инфекционными заболеваниями, аутоиммунными заболеваниями и не подписавшие добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Проведение данного исследования было одобрено местным этическим комитетом.

Диагноз «неполный самопроизвольный аборт» был выставлен на основании клинической картины, данных инструментального обследования и гистологического заключения. Критериями при постановке диагноза (критериями для включения в основную группу) также являлись данные ультразвукового исследования органов малого таза (трансабдоминального или трансвагинального). Ультразвуковое исследование проводили в сроке 5–6 недель. Критериями постановки диагноза в данном случае являлись остатки хориальной ткани в полости матки, отсутствие плодного яйца.

Ультразвуковое исследование и взятие образцов крови производилось на двух базах: государственного бюджетного учреждения Рязанской области «Городская клиническая больница № 8» и Городского клинического родильного дома № 1. Дальнейший анализ образцов крови и определение активности протеаз проводились на базе кафедры биологической химии с курсом клинической лабораторной диагностики ФДПО Рязанского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова.

Материалом исследования являлась фракция лейкоцитов крови, полученная при госпитализации на стационарное лечение в Городскую клиническую больницу № 8 с диагнозом «угрожающий аборт» при беременности 5–6 недель. Образцы получали путем забора периферической крови в объеме 10 мл с помощью стерильных вакуумных пробирок APEXLAB, содержащих в качестве антикоагулянта ЭДТА-К3.

Для получения фракции мононуклеарных лейкоцитов из периферической крови использовали методику, основанную на седиментации в одноступенчатом градиенте плотности фиколл-урографина. В стерильную пластиковую пробирку вносили фиколл-урографин из расчета 0,5 мл на 1 мл полученной суспензии форменных элементов крови. Затем сверху осторожно наслаивали суспензию клеток и центрифугировали при 1800 g 30 мин. (ELMI, CM-6M, Латвия). В результате центрифугирования кровь разделяется на 4 отдельные фракции: первая фракция на дне пробирки содержит эритроциты и обломки клеток крови; вторая – это раствор фиколл-урографина; третья, расположенная над градиентом, – суспензия лимфоидных клеток; четвертая – образована плазмой с тромбоцитами. Далее в стерильных условиях пипеткой с границы раздела плотности отбирали фракцию лейкоцитов. Полученные клетки ресуспендировали в 500 мкл фосфатно-солевого буфера (ФСБ), pH=7,2 (производитель) и центрифугировали при 1800 g 15 мин. Отмывку клеток проводили трижды. Для каждого анализа клетки в количестве 1×10^6 ресуспендировали в 50 мкл лизис-буфера (название коммерческого набора для катепсинов), инкубировали на льду в течение 10 мин. и затем центрифугировали 5 мин. при 800 g (CM-50, Eppendorf, Германия). Супернатант переносили в отдельные пробирки и использовали для дальнейшего анализа.

Активность катепсинов В и D определяли флуоресцентным методом с использованием коммерческих наборов (AssayGenie, Ирландия). Полученные результаты выражали в единицах флуоресценции, отнесенных на мг белка (ед. фл/сек×мг белка). Количество белка в пробах анализировали методом Бредфорда (Pierce Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit, «ThermoFisher», США).

Концентрацию продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) определяли фотометрическим методом по реакции с тиобарбитуровой кислотой и путем дальнейшей экстракции бутанолом (ООО «Агат-Мед», Россия), выражали в мкмоль/мг белка. Уровень карбонильных производных белков определяли по методу R. Levine, концентрацию рассчитывали с использованием коэффициента молярной экстинкции $\epsilon_{\text{мМ}} = 22 \text{ мМ}^{-1} \times \text{см}^{-1}$. В последующем производили расчет в нмоль/мг белка.

Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью лицензионного пакета программ Statistica. Оценка же характера распределения данных осуществлялась при помощи критериев Шапиро – Уилка. Оценка данных критериев позволила выяснить нормальное распределение наших данных. Полученные данные были представлены в виде средней квадратической ошибки (m) и среднего значения (M). Для определения статической значимости различий между сравнимыми показателями пользовались критериями Стьюдента (t-критерий) для независимых выборок. В дальнейшем результаты оценивались как статистически значимые при $p < 0,05$.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Пациентки, участвующие в исследовании, не имели каких-либо различий как по возрасту, так и по соматической патологии ($p > 0,05$). В основной группе (группе с неполным самопроизвольным абортom) удалось сохранить 4 беременности, хотя уровни активности катепсинов у данных пациенток находились в пределах показателей данной патологии, что указано в табл. 1 и, возможно, связано с эффективностью проводимого лечения.

Таблица 1
Количество подтвердившихся случаев неполного выкидыша в зависимости от показателя
Table 1
Number of confirmed cases of incomplete miscarriage depending on the indicator

Показатель	Неполный самопроизвольный аборт подтвержден по уровню катепсинов и случился в исходе	Неполный самопроизвольный аборт подтвержден по уровню катепсинов, но не случился в исходе
Катепсин D	31 (88,57%)	4 (11,43%)
Катепсин В	31 (88,57%)	4 (11,43%)

Таблица 2
Показатели активности катепсинов В и D при физиологической беременности
Table 2
Indicators of activity of cathepsins B and D during physiological pregnancy

Показатель	Минимальная активность (ед. фл/секхмг белка)	Максимальная активность (ед. фл/секхмг белка)
Катепсин D	33897,3	44 979
Катепсин В	13987,3	24 899

Таблица 3
Показатели активности катепсинов В и D при неполном самопроизвольном аборте
Table 3
Indicators of activity of cathepsins B and D in incomplete spontaneous abortion

Показатель	Минимальная активность (ед. фл/секхмг белка)	Максимальная активность (ед. фл/секхмг белка)
Катепсин D	84397,6	95 394
Катепсин В	63897,3	75 273

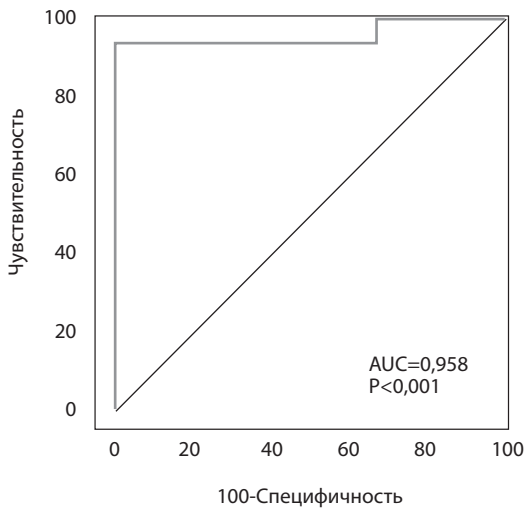


Рис. 1. ROC-кривая катепсина D при неполном выкидыше
Fig. 1. Cathepsin D ROC curve for incomplete miscarriage

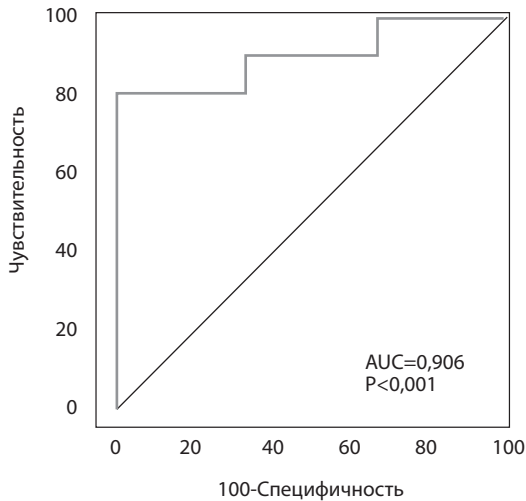


Рис. 2. ROC-кривая катепсина В при неполном выкидыше
Fig. 2. Cathepsin B ROC curve for incomplete miscarriage

Активность катепсина D статистически значимо возросла в 2,3 раза ($p=0,0004$) у пациенток с неполным самопроизвольным абортом (табл. 1) по сравнению с активностью катепсина у пациенток с физиологической беременностью (табл. 2), активность же катепсина В статистически значимо возросла в 4,5 раза ($p=0,00002$).

При проведении ROC-анализа было выяснено, что чувствительность и специфичность используемого нами метода при анализе активности катепсина D составила 93,75% и 100% (рис. 1), а катепсина В – 81,25% и 100% (рис. 2) соответственно. Достоверность полученных данных проверялась при проведении дисперсионного анализа ANOVA. По полученным нами данным можно резюмировать, что уровень достоверности данных высокий, так как $p<0,05$, а следовательно, и полученные данные достоверны.

Повышение активности катепсинов D и В связано с процессами аутолиза и стремлением организма пациентки с патологическим течением беременности к расщеплению и изгнанию чужеродного, патологического в данном случае для организма агента – плодного яйца, прекратившего свое нормальное функционирование.

Таблица 4
Оценка окислительного стресса в плазме крови пациенток
Table 4

Assessment of oxidative stress in the blood plasma of patients

Показатель	Физиологическая беременность	Неполный самопроизвольный аборт
Продукты перекисного окисления липидов, мкмоль/мг белка	1,37 [0,8; 1,9]	3,41 [3,2; 3,5]
Карбонильные производные белков, нмоль/мг белка	47,9 [44,7; 51,8]	85,5 [72,9; 96,6]

При неполном самопроизвольном аборте наблюдается увеличение содержания карбонильных производных белков, формирование которых происходит за счет их взаимодействия с продуктами перекисного окисления липидов, что представлено в табл. 4.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследования были выяснены причины повышения активности катепсинов D и В, повышения концентрации продуктов перекисного окисления липидов и карбонильных производных белков при неполном самопроизвольном аборте. Доказана роль катепсинов D и В в качестве маркеров неполного самопроизвольного аборта. Обоснована важность дальнейшего исследования для создания методики ранней диагностики и прогнозирования неполного самопроизвольного аборта.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Serova V., Sukhikh G. *Clinical recommendations for obstetrics and gynecology*. M., 2019. (In Russ.).
2. Akhundova G., Shamkhalova I. Causes of the threat of miscarriage and pregnancy loss in the first trimester. *Scientific research*. 2018. No. 4 (23). pp. 62-63. (In Russ.).
3. Zverko V., Kukharchik Yu., Gutikova L. Leading causes of miscarriage in the first trimester. *Medical and social ecology of personality: state and prospects materials of the XII International. Conf., 11-12 Apr. 2014*, Minsk, pp. 143-147. (In Russ.).
4. Sinyakova A., Shipitsyna E., Budilovskaya O., Martikaynen Z., Grigoryev A., Bolotskikh V., Savicheva A. Vaginal microbiota in the first trimester of pregnancy in women with a history of miscarriage. *Journal of obstetrics and women's diseases*. 2018. Vol. 67. N. 5. P. 32-41. doi: 10.17816/JOWD67532-41 (In Russ.).
5. Udonova T., Gavryuk S., Bordinova Zh., Petrushova O. The activity of cathepsin D in the placenta during mild gestosis. *Izvestiya Penzenskogo gosudarstvennogo pedagogicheskogo universiteta im. V.G. Belinskogo*. 2008;10(6):219-222. (In Russ.).