

УДК 612.015

©Коллектив авторов

ФЕРМЕНТЫ ОБМЕНА РЕГУЛЯТОРНЫХ ПЕПТИДОВ ПЛАЦЕНТЫ ПРИ ГЕСТОЗАХ ЛЕГКОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ

О.П. Петрушова, М.Т. Генгин, В.А. Сметанин, А.В. Кузнецова*

Пензенский государственный педагогический университет им. В.Г. Белинского,
Пенза; тел.: 8(8412)562566, 8(8412)478570; эл. почта: chorion@rambler.ru

ОПГ(отёки, протеинурия, гипертензия)-гестозы остаются одной из актуальных проблем акушерства. Исследована активность основных карбоксипептидаз (карбоксипептидазы Н (КПН), фенилметилсульфонилфторид-ингибируемой карбоксипептидазы (ФМСФ-КП), карбоксипептидазы М (КПМ)) и ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) в плацентарной ткани женщин в норме и при ОПГ-гестозах легкой степени тяжести. Показано, что гестозы сопровождаются понижением активности ферментов обмена регуляторных пептидов (АПФ, КПН, ФМСФ-КП, КПМ) по сравнению с их активностью в плаценте при физиологическом течении беременности. По данным корреляционного анализа, при ОПГ-гестозах выявлена положительная взаимосвязь между активностью КПН и КПМ в плаценте ($r=0,2735^*$).

Полученные данные позволяют предполагать участие протеолитических ферментов в формировании компенсаторно-приспособительных реакций в фетоплацентарном комплексе при ОПГ-гестозах и, кроме того, представляют интерес при разработке методов профилактики и коррекции нарушений метаболизма при патологиях беременности.

Ключевые слова: плацента, фетоплацентарный комплекс, ОПГ-гестозы, карбоксипептидазы, ангиотензинпревращающий фермент.

ВВЕДЕНИЕ. Гестоз – это осложнение беременности, при котором происходит расстройство функции жизненно важных органов, особенно сосудистой системы и кровотока. В настоящее время применяется термин “ОПГ(отёки, протеинурия, гипертензия)-гестозы”, обозначая основные симптомы данной патологии. До настоящего времени ОПГ-гестозы остаются одной из актуальных проблем акушерства. Высокая частота гестозов, тяжесть их клинических проявлений, большая вероятность неблагоприятного исхода беременности обуславливают повышенный интерес к исследованию патогенетических механизмов данной патологии [1-3].

Основными патофизиологическими и биохимическими аспектами развития ОПГ-гестоза являются нарушение плацентации, спазм артериол с дисфункцией эндотелия. Это сопровождается снижением в сыворотке крови ингибитора сывороточных протеаз – макроглобулина, выделением токсичных веществ – эндотелина и циркулирующего фактора эклампсии, уменьшением синтеза вазодилаторов, клеточных дезагрегантов – брадикинина, простаглицлина. Отмечаются нарушение реологических и коагуляционных свойств крови – повышение агрегации тромбоцитов, вязкости крови, дефицит антикоагулянтов, увеличение уровня прокоагулянтов; гиповолемия – уменьшение объема плазмы, повышение показателей гемоглобина и гематокрита; прогрессивное снижение

* - адресат для переписки

ПЛАЦЕНТАРНЫЕ ПРОТЕАЗЫ ПРИ ГЕСТОЗАХ

резистентности сосудов к прессорному действию катехоламинов и ангиотензина II; избыточный выброс ренина и ангиотензина, повышение активности альдостерона; активация процессов перекисного окисления липидов; снижение дезинтоксикационной и белковообразующей функции печени, развитие почечной недостаточности на фоне ишемии; задержка жидкости в интерстициальном пространстве. Возникает метаболический ацидоз, отек мозга, спазм сосудов головного мозга, кровоизлияния, которые проявляются мозговыми симптомами и наступлением судорожных припадков. Кроме того, при гестозе происходит нарушение микроциркуляции в сосудах маточно-плацентарного кровотока. На поверхности синцитио-капиллярных мембран отмечается избыточное отложение фибриноида, развивается склероз стромы и сосудов хориона, что приводит к хронической фетоплацентарной недостаточности. При этом отмечается нарушение всех функций плаценты, приводящее к гипоксии, внутриутробной задержке развития плода, патологии околоплодных вод, снижению продукции плацентарного лактогена, эстриола, хорионического гонадотропина и других гормонов [1].

Известно, что в патогенез ОПГ-гестозов вовлечены биологически активные пептиды, образующиеся в фетоплацентарном комплексе [1, 4-8]. Изменение уровня регуляторных пептидов по мере прогрессирования беременности определяется состоянием ферментов их обмена.

В связи с этим целью настоящей работы явилось исследование активности ферментов обмена регуляторных пептидов в плацентарной ткани при гестозах легкой степени тяжести: карбоксипептидазы Н (КПН; КФ 3.4.17.10), фенилметилсульфонилфторид-ингибируемой карбоксипептидазы (ФМСФ-КП), карбоксипептидазы М (КПМ; КФ 3.4.17.2), ангиотензинпревращающего фермента (АПФ; КФ 3.4.15.1). Данные ферменты участвуют в процессинге, модуляции и инактивации регуляторных пептидов [4, 9-14]. Отсюда представляет интерес изучение их активности в плаценте в норме и при патологиях.

МЕТОДИКА. Исследованы 96 родильниц, которые составили 4 группы (таблица). В I группу вошли пациентки с физиологическим течением беременности и родов; во II группу – пациентки с ОПГ-гестозом легкой степени тяжести, причем данная группа была разделена на следующие подгруппы: 1 – “чистый” ОПГ-гестоз (без экстрагенитальной патологии), 2 – “чистый” ОПГ-гестоз в сочетании с маловодием, 3 – “чистый” ОПГ-гестоз в сочетании с анемией, 4 – сочетанный ОПГ-гестоз (на фоне экстрагенитальной патологии: врожденного порока сердца, вегето-сосудистой дистонии, диффузного увеличения щитовидной железы, ожирения, пиелонефрита).

Таблица. Характеристика обследованных групп женщин.

Клиническая группа		Количество женщин	Первородящие, %	Повторнородящие, %	Средняя оценка по кардиотокмограмме, баллы	Средняя оценка новорожденных по шкале Апгар, баллы	
						1 мин	5 мин
Норма		27	74	26	8,2±0,3	8,00±0,07	8,40±0,13
ОПГ-гестозы	“чистый”	19	73,7	26,3	8,00±0,47	7,50±0,19	8,30±0,19
	“чистый”+маловодие	17	70,6	29,4	7,8±0,2	7,80±0,12	8,30±0,12
	“чистый”+анемия	18	72,2	27,8	8,00±0,12	7,90±0,05	8,40±0,12
	сочетанный	15	46,7	53,3	7,9±0,2	7,90±0,05	8,40±0,12

В периоде послеродовой адаптации у новорожденных детей от женщин с ОПГ-гестозом отмечалось нарушение мозгового кровообращения.

При гистологическом исследовании последов у пациенток с ОПГ-гестозом обнаружены умеренно-выраженные компенсаторно-приспособительные процессы, в некоторых случаях отмечены очаговые нарушения микроциркуляции, инволютивно-дистрофические изменения, признаки инфекции.

Диагноз ОПГ-гестоза поставлен на основании клинических проявлений, клинико-лабораторных данных; оценку степени тяжести гестоза проводили по унифицированной шкале Гоека-Савельевой [3].

Материалом для исследования служила плацентарная ткань, взятая сразу после родов. Образцы тканей брали с периферических областей плаценты, наиболее удаленных от места прикрепления пуповины. Исследуемый материал помещали в предварительно охлажденный физиологический раствор, очищали от крови, высушивали фильтровальной бумагой. Ткани взвешивали, навески гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком. Для определения активности КПН, ФМСФ-КП, КПМ при гомогенизировании использовали 10 мМ натрий-ацетатный буфер (рН 5,6), содержащий 50 мМ NaCl, в соотношении 1:50 (вес:объем); АПФ – 100 мМ трис-HCl (рН 7,6).

При определении активности КПН инкубационная смесь опытной пробы состояла из 50 мкл гомогената ткани, 150 мкл 50 мМ натрий-ацетатного буфера, рН 5,6, содержащего 50 мМ NaCl, и 50 мкл 210 мкМ раствора дансил-Фен-Ала-Арг; контрольная проба содержала 10 мкл 25 мкМ водного раствора ингибитора ГЭМЯК [10].

Для определения активности ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы инкубационная смесь состояла из 50 мкл гомогената ткани, 150 мкл 50 мМ натрий-ацетатного буфера, рН 5,6, содержащего 50 мМ NaCl, и 50 мкл 210 мкМ раствора дансил-Фен-Лей-Арг (в случае опытной пробы). Контрольная проба содержала 10 мкл 25 мМ ингибитора ФМСФ [14].

Определение активности КПМ проводили также, как определение активности КПН, с той лишь разницей, что в качестве буфера использовали 200 мМ трис-HCl, рН 7,4 [10].

Пробы инкубировали 60 минут при 37°C. Реакцию останавливали прибавлением 50 мкл 1 М раствора HCl.

Для экстракции продуктов реакции дансил-Фен-Ала (для КПН и КПМ) и дансил-Фен-Лей (для ФМСФ-КП) к пробам приливали по 1,5 мл хлороформа. Хлороформную и водную фазы разделяли центрифугированием в течение 10 минут при 3500 g.

Активность ферментов определяли как разницу в приросте флуоресценции в пробах, не содержащих и содержащих ингибиторы, и выражали в нмоль дансил-Фен-Ала (для КПН и КПМ) и дансил-Фен-Лей (для ФМСФ-КП), образовавшихся за 1 мин инкубации в пересчете на 1 мг белка. Концентрацию белка в пробах определяли методом Лоури [15].

При определении активности ангиотензинпревращающего фермента инкубационная смесь состояла из 40 мкл гомогената, 20 мкл буфера или 35 мкМ каптоприла в 100 мМ трис-HCl буфере, рН 7,6, 10 мкл раствора кбз-Гли-Гли-Арг (в случае опытной пробы). Через 120 мин реакцию останавливали прибавлением 30 мкл 10% трихлоруксусной кислоты. Пробы центрифугировали 30 мин при 220 g. Отбирали 50 мкл надосадочной жидкости и определяли количество образовавшегося Гли-Арг нингидриновым методом [13]. Активность ангиотензинпревращающего фермента определяли как разность в оптической плотности проб не содержащих и содержащих каптоприл. Активность фермента выражали в нмоль Гли-Арг, образовавшегося за 1 мин инкубации в пересчете на 1 мг белка. Концентрацию белка в пробах определяли методом Лоури [15].

Экспериментальные данные обрабатывали статистически с использованием t-критерия Стьюдента [16]. Корреляционный анализ проводили с помощью

ПЛАЦЕНТАРНЫЕ ПРОТЕАЗЫ ПРИ ГЕСТОЗАХ

программы Statgraphics (версия 3.0) ("STSC, Inc." США) в режимах Simple Correlation, One-Way ANOVA.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Результаты исследования (рис. 1) показали снижение активности КПН в плацентарной ткани при "чистом" ОПГ-гестозе, "чистом" ОПГ-гестозе в сочетании с маловодием, "чистом" ОПГ-гестозе в сочетании с анемией – в 1,3 раза, сочетанном ОПГ-гестозе – в 1,5 раза по сравнению с нормой. Кроме того, выявлено снижение активности фермента при сочетанном ОПГ-гестозе на 17% по сравнению с "чистым" ОПГ-гестозом, и на 17% по сравнению с "чистым" ОПГ-гестозом в сочетании с маловодием.

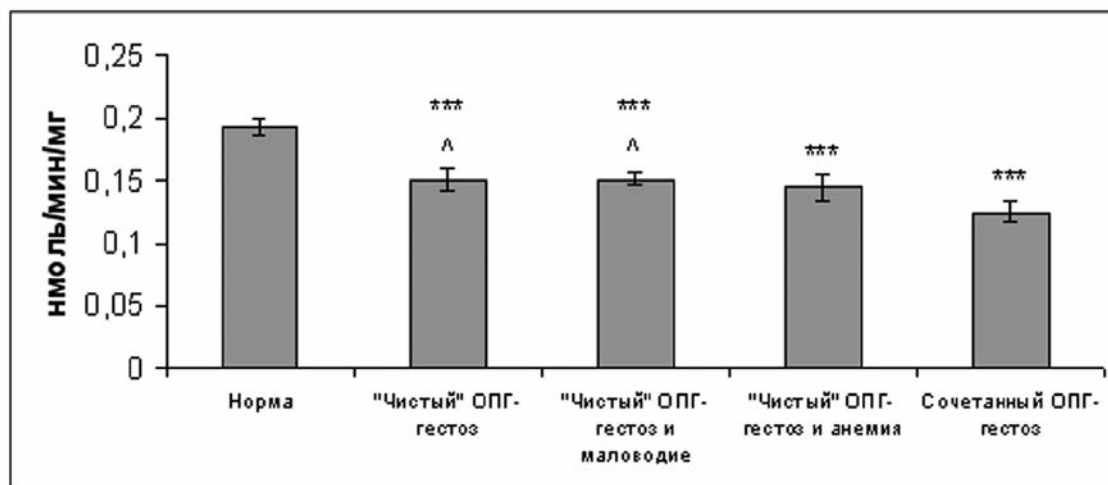


Рисунок 1.

Активность КПН в плаценте в норме и при патологии (нмоль продукта, образовавшегося за 1 мин инкубации на 1 мг белка; *** - $p < 0,001$, относительно нормы; ^ - $p < 0,05$ относительно сочетанного ОПГ-гестоза).

Активность ФМСФ-КП (рис. 2) снижалась в плацентарной ткани при "чистом" ОПГ-гестозе в сочетании с анемией – на 13%, сочетанном ОПГ-гестозе – на 11% по сравнению с нормой.

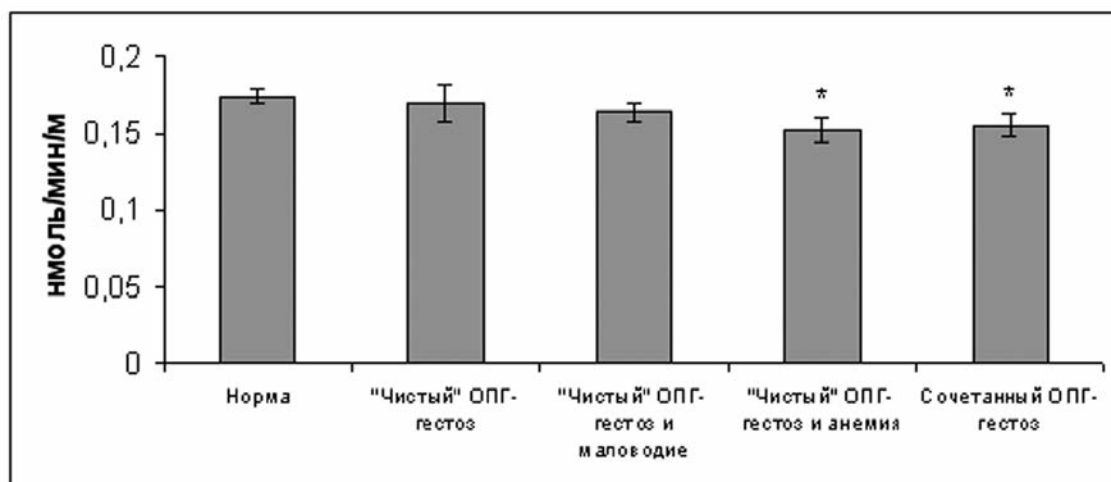


Рисунок 2.

Активность ФМСФ-КП в плаценте в норме и при патологии (нмоль продукта, образовавшегося за 1 мин инкубации на 1 мг белка; $M \pm m$; * - $p < 0,05$ относительно нормы).

Установлено также снижение активности КПМ (рис. 3) в плацентарной ткани при “чистом” ОПГ-гестозе в сочетании с маловодием – на 30%, “чистом” ОПГ-гестозе в сочетании с анемией – на 37%, сочетанном ОПГ-гестозе – на 22% по сравнению с нормой. Кроме того, выявлено снижение активности фермента при “чистом” ОПГ-гестозе в сочетании с анемией по сравнению с сочетанным ОПГ-гестозом и “чистым” ОПГ-гестозом в 1,2 и 1,3 раза соответственно.

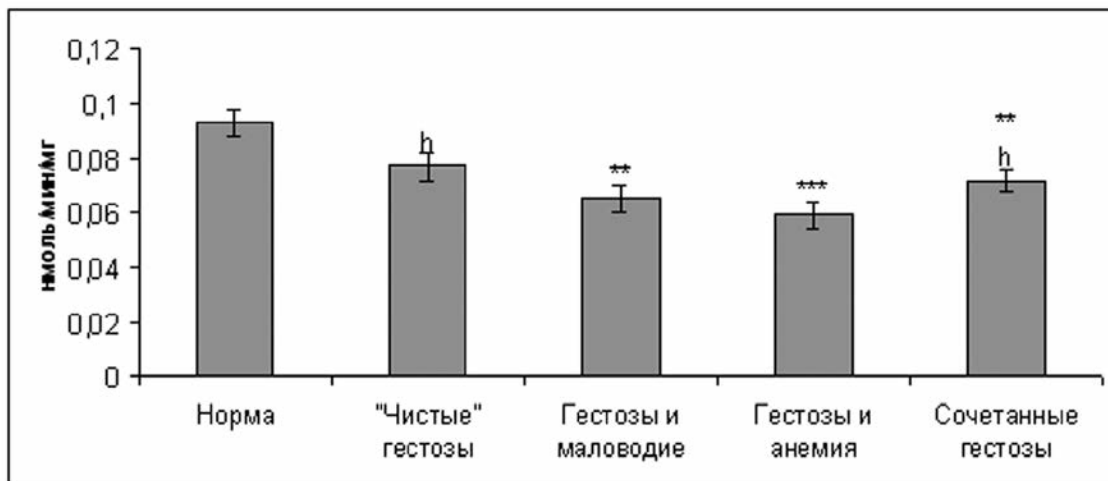


Рисунок 3.

Активность КПМ в плаценте в норме и при патологии (нмоль продукта, образовавшегося за 1 мин инкубации на 1 мг белка; ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$ относительно нормы; h - $p < 0,05$ относительно "чистого" ОПГ-гестоза в сочетании с анемией).

Результаты исследования (рис. 4) показали снижение активности ангиотензинпревращающего фермента в плацентарной ткани при “чистом” ОПГ-гестозе в сочетании с маловодием – на 21%, “чистом” ОПГ-гестозе в сочетании с анемией – на 20%, сочетанном ОПГ-гестозе – на 15% по сравнению с нормой. Кроме того, отмечено снижение активности АПФ при сочетанном ОПГ-гестозе – в 1,2 раза, “чистом” ОПГ-гестозе в сочетании с маловодием – в 1,3 раза, “чистом” ОПГ-гестозе в сочетании с анемией – в 1,2 раза по сравнению с “чистым” ОПГ-гестозом.

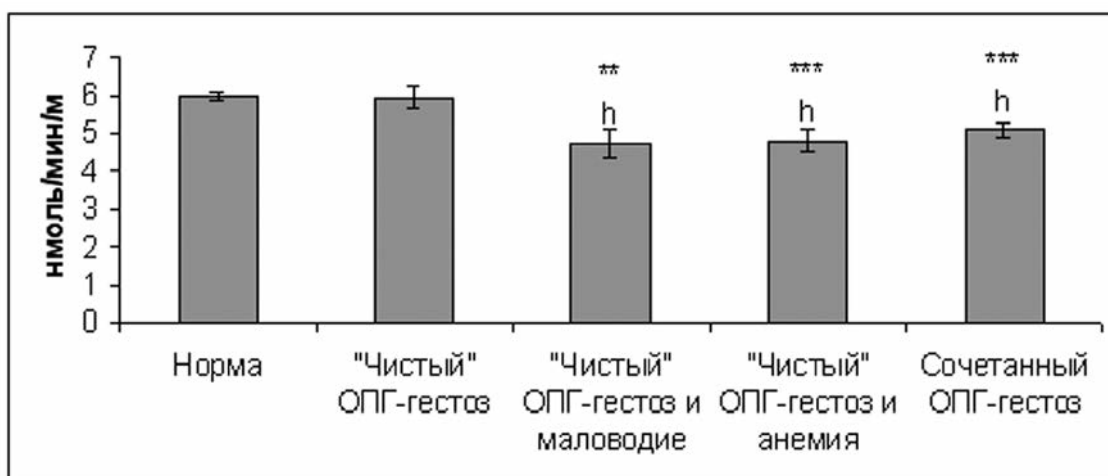


Рисунок 4.

Активность АПФ в плаценте в норме и при патологии (нмоль продукта, образовавшегося за 1 мин инкубации на 1 мг белка; ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$ относительно нормы; h - $p < 0,05$ относительно "чистого" ОПГ-гестоза).

По данным корреляционного анализа, при ОПГ-гестозах выявлена положительная взаимосвязь между активностью КПН и КПМ в плаценте ($r=0,2735^*$).

Известно, что морфофункциональные изменения, возникающие при патологии беременности, приводят к нарушению гормонопродуцирующей функции плаценты [1, 2]. Уменьшение активности КПН согласуется с данными литературы о снижении концентрации пептидных гормонов (хорионический гонадотропин (ХГЧ), плацентарный лактоген (ПЛ), пролактин, а также инсулин, инсулиноподобные факторы роста, С-пептид и др.) в фетоплацентарном комплексе (ФПК) при ОПГ-гестозах [3-9].

Любое осложнение беременности является стрессовым фактором для ФПК [17]. Известно, что α -неоэндофин, динарфин 1-13 в качестве С-концевой аминокислоты содержат лизин, следовательно, они могут выступать в качестве субстратов для КПМ [18, 19]. Обнаруженное снижение активности фермента, вероятно, замедляет разрушение этих пептидов, обладающих способностью проявлять седативное действие. По результатам корреляционного анализа, выявлена положительная взаимосвязь между активностью КПМ и КПН в плаценте при ОПГ-гестозах. Можно предположить, что в силу угнетения активности КПН, наблюдающегося в условиях патологического течения беременности, снижается процесс образования опиоидов под влиянием энкефалинконвертазы, но при этом уменьшается скорость их деградации под влиянием КПМ, что может расцениваться как компенсаторно-приспособительная реакция. Кроме того, карбоксипептидаза М в фетоплацентарном комплексе участвует в инактивации брадикинина – пептида, регулирующего сосудистый тонус.

Известно, что АПФ – ведущий фактор целостной ренин-ангиотензиновой системы [12, 20]. Основная функция фермента заключается в превращении ангиотензина I в физиологически активную форму ангиотензин II и в деструкции брадикинина путем удаления С-концевого дипептида, что способствует поддержанию тонуса сосудов. Ангиотензин II является вазопрессором, стимулятором синтеза ингибитора тканевого активатора плазминогена, образования свободных радикалов, в частности, супероксидных анионов, которые инактивируют NO, способствуют образованию пероксинитрита и снижают эффективность NO-опосредуемой сосудистой дилатации. Таким образом, ангиотензин II способствует развитию эндотелиальной дисфункции [1, 3, 12, 20, 21], в то время как брадикинин стимулирует синтез NO в эндотелии, участвуя в дилатации сосудов и усиливая скорость местного кровотока [21].

Доказано, что при физиологически протекающей беременности плацентарные сосуды находятся в состоянии дилатации и не реагируют на сокращающие стимулы [1-3, 6-8, 20]. Это обстоятельство обеспечивает равномерное поступление кислорода и питательных веществ к плоду. Рефрактерность сосудов плаценты и системы кровообращения матери в целом к вазопрессорам обеспечивается за счет возрастающей продукции эндотелиальных факторов релаксации – простациклина и оксида азота.

Патология плацентарного кровообращения развивается при дисфункции эндотелия, которая выражается в нарушении продукции факторов, обеспечивающих дилатацию плацентарных сосудов, что является важным этапом в патогенезе ОПГ-гестозов. Изменения в эндотелии на ранних стадиях заболевания приводят к выделению токсичных для эндотелия – эндотелина и циркулирующего фактора эклампсии, к снижению синтеза вазодилаторов, клеточных дезагрегантов (брадикинина, простациклина, NO). При этом обнажается мышечно-эластическая мембрана сосудов, что повышает их чувствительность к вазоактивным веществам. Таким образом, снижение биосинтеза простациклина и оксида азота в маточном и плодово-плацентарном кровообращении сопровождается спазмом сосудов в этом регионе и "отграничением" материнского кровотока от фетального. Описанные изменения приводят к нарушению микроциркуляции и локальным ишемическим изменениям в плацентарной ткани [1-3, 6-8, 20].

Результаты исследований позволяют предположить вовлечение КПМ и АПФ в коррекцию сосудистых нарушений путем регуляции уровня вазоактивных пептидов: снижение активности КПМ ведет к уменьшению деградации брадикинина, АПФ – снижению деградации брадикинина и образования ангиотензина II, что способствует, вероятно, улучшению микроциркуляции в фетоплацентарном комплексе.

Необходимо отметить, что особенностями сочетанного гестоза являются раннее начало заболевания, более тяжелое течение. Кроме того, усугубляется патологический процесс при присоединении к “чистой” форме гестоза маловодия и анемии. Возможно, с этим связано большее угнетение активности исследуемых пептид-гидролаз в группах “чистого” ОПГ-гестоза в сочетании с маловодием, анемией и сочетанного ОПГ-гестоза.

Таким образом, можно полагать, что пептидазы плаценты играют важную роль в патогенезе ОПГ-гестозов, участвуя в формировании компенсаторно-приспособительных реакций в ФПК, выраженность которых, вероятно, влияет на состояние плода и новорожденного. Полученные результаты исследования могут служить основой для дальнейшего исследования гомеостаза ФПК и изыскания способов профилактики и коррекции метаболических изменений в плаценте при патологическом течении беременности. Кроме того, ретроспективная оценка ферментативной функции плаценты может быть использована для прогноза течения раннего неонатального периода и состояния новорожденного.

ВЫВОДЫ:

- При ОПГ-гестозах лёгкой степени тяжести в плацентарной ткани обнаружено снижение активности карбоксипептидазы Н, фенилметилсульфонилфторид-ингибируемой карбоксипептидазы, карбоксипептидазы М, ангиотензин-превращающего фермента.

- По данным корреляционного анализа при ОПГ-гестозах выявлена положительная взаимосвязь между активностью КПН и КПМ в плаценте ($r=0,2735^*$).

- Исследуемые пептидгидролазы плаценты, вероятно, играют важную роль в патогенезе ОПГ-гестозов, участвуют в формировании компенсаторно-приспособительных реакций в фетоплацентарном комплексе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аржанова О.Н., Кошелева Н.Г., Ковалева Т.Г., Громыко Г.Л., Тышкевич О.В. (2000) Плацентарная недостаточность: диагностика и лечение, ИЗДАТ НОРМЕД, СПб.
2. Блощинская И.А., Давидович И.М. (2003) Бюлл. exper. биол. мед., **135**(3), 279-282.
3. Подтетенев А.Д., Братчикова Г.В. (2004) Тактика ведения родов при гестозе, РУДН, М.
4. Ломакин М.С., Арцимович Н.Г. (1991) Акуш. гинекол., №9, 6-10.
5. Шмагель К.В., Черешнев В.А. (2003) Акуш. гинекол., №3, 9-12.
6. Яковлева Э.Б., Зяблицев С.В., Богослав Ю.П., Демина Т.Н., Мирошникова Т.С. (1996) Диагностика и лечение плацентарной недостаточности, Донецк.
7. Радзинский В.Е., Смалько П.Я. (2001) Биохимия плацентарной недостаточности, РУДН, М.
8. Allen L.H. (2001) J. Nutr., **131**, 581-589.
9. Reznik S.E., Salafia C.M., Lage J.M., Fricker L.D. (1998) Histochem. Cytochem., **46**, 1359-1368.
10. Fricker L.D., Snyder S.H. (1983) J. Biol. Chem., **258**, 10950-10955.
11. Вернигора А.Н., Генгин М.Т. (2003) Биохимия, **68**, 96-102.
12. Вернигора А.Н., Генгин М.Т. (1998) Укр. биохим. журн., **70**(2), 3-14.

ПЛАЦЕНТАРНЫЕ ПРОТЕАЗЫ ПРИ ГЕСТОЗАХ

13. Вернигора А.Н., Генгин М.Т., Никишин Н.Н., Щетинина Н.В. (1994) Физиол. журн., №4, 23-25.
14. Вернигора А.Н., Никишин Н.Н., Генгин М.Т. (1995) Биохимия, **60**, 1860-1866.
15. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.G., Randall R.J. (1951) J. Biol. Chem., **193**, 265-275.
16. Гланц С. (1998) Медико-биологическая статистика (пер. с англ.), Практика, М.
17. Florio P., Severi F.M., Ciarmela P., Fiore G., Calonaci G., Merola A., De Felice C., Palumbo M., Petraglia F. (2002) Endocrine, **19**, 91-102.
18. Nagae A., Deddish P.A., Becker R.P., Anderson C.H., Abe M., Tan F., Skidgel R.A., Erdos E.G. (1992) J. Neurochem., **59**, 2201-2212.
19. Deddish P.A., Skidgel R.A., Kriho V.B., Li X.Y., Becker R.P., Erdos E.G. (1990) J. Biol. Chem., **265**, 15083-15089.
20. Rosenfeld C.R. (2001) Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., **281**, 1025-1040.
21. Яровая Г.А. (2001) Вопр. мед. химии, **47**(1), 20-24.

Поступила: 26. 12. 2007.

PROTEOLYTIC ACTIVITY OF PLACENTA WITH EPH-GESTOSIS

O.P. Petrushova, M.T. Gengin, V.A. Smetanin, A.V. Kuznetsova

Department of Biochemistry Penza State Pedagogic University, Penza State University;
tel.: 8(8412)562566, 8(8412)478570; e-mail: chorion@rambler.ru

Essential edema-proteinuria-hypertension (EPH) gestosis still represents an important obstetrical problem. We have investigated the activity of carboxypeptidase H (CPH), phenylmethylsulfonyl fluoride inhibited carboxypeptidase (PMSF-CP), carboxypeptidase M (CPM) and angiotensin-converting enzyme (ACE), the main carboxypeptidases in human placenta under normal conditions and mild EPH-gestosis. Gestosis was accompanied by the decrease in activity of the enzymes involved into metabolism of regulatory peptides (ACE, CPH, PMSF-CP, CPM) compared with their activity in placenta under physiological pregnancy. Correlation analysis revealed positive correlation between placental CPH and CPM ($r = 0.2735^*$) in EPH-gestosis.

These findings suggest involvement of placental proteases into formation of compensatory-adaptive reactions in the fetoplacental complex at EPH-gestosis; the data obtained may be also employed for the development of methods of prophylaxis and corrections of metabolic impairments in pathology of pregnancy.

Key words: placenta, fetoplacental complex, EPH-gestosis, carboxypeptidase, angiotensin-converting enzyme.