Биомедицинская химия, 2014 том 60, вып. 3, с. 389-396.

УДК 612.015
©Петрушова, Микуляк

АКТИВНОСТЬ ПЕПТИДАЗ ФЕТОПЛАЦЕНТАРНОГО КОМПЛЕКСА В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

О.П. Петрушова*, Н.И. Микуляк

Пензенский государственный университет, Пенза, ул. Красная, 40;
тел: 8(8412)368413; эл. почта: chorion@rambler.ru

Исследовали активность ангиотензинпревращающего фермента (АПФ), карбоксипептидазы N (КПN), лейцинаминопептидазы (ЛАП) в фетоплацентарном комплексе (ФПК) в норме и при фетоплацентарной недостаточности (ФПН). Показано, что активность АПФ и ЛАП достоверно выше в плацентарной ткани, чем в сыворотке крови рожениц в вене пуповины. Активность КПN достоверно ниже в сыворотке крови вены пуповины по сравнению с таковой рожениц. Вероятно, исследуемые ферменты участвуют в формировании сниженной чувствительности сосудов ФПК при физиологической беременности. При ФПН обнаружено достоверное увеличение активности ЛАП в плацентарной ткани, сыворотке крови вены пуповины. Кроме того, при патологическом течении беременности выявлено достоверное повышение активности КПN в сыворотке крови беременных по сравнению с нормой. Полученные данные позволяют предполагать участие протеолитических ферментов в формировании компенсаторно-приспособительных реакций в фетоплацентарном комплексе при ФПН и, кроме того, представляют интерес при разработке методов профилактики и коррекции нарушений метаболизма при патологиях беременности.

Ключевые слова: плацента, фетоплацентарный комплекс, лейцинаминопептидаза, карбоксипептидаза N, ангиотензинпревращающий фермент.

ВВЕДЕНИЕ. Фетоплацентарная недостаточность (ФПН) – клинический синдром, характеризующийся структурными и функциональными изменениями в плаценте и проявляющийся задержкой внутриутробного развития и гипоксией плода. Данный синдром является результатом сложной реакции плода и плаценты на различные патологические состояния материнского организма (гестозы, анемии беременных, экстрагенитальные заболевания и др.) [1-3].

Природа синдрома ФПН до конца не изучена. Под воздействием патологических факторов происходит активация функций плаценты, повышение в ней уровня компенсаторно-приспособительных и метаболических процессов. Однако, при длительном или повторном воздействии повреждающих факторов происходят чрезмерная активация деятельности плаценты и напряжение всех имеющихся компенсаторных механизмов, которое в последующем сменяется стадией угнетения, дезорганизации основных функций и развитием необратимых деструктивных процессов в плаценте [4].

* - адресат для переписки

В фетоплацентарном комплексе (ФПК) вырабатываются вазоактивные пептиды: окситоцин, вазопрессин, ангиотензины, брадикинин, участвующие в регуляции гомеостаза. В условиях патологии уровень пептидов существенно меняется, при этом они вовлекаются в патогенез гестационных осложнений, ведущих к развитию ПН и, следовательно, внутриутробной задержке развития плода и его гипоксии [3, 5, 6].

Изменение уровня вазоактивных пептидов в ФПК при физиологическом и патологическом течении беременности определяется ферментами их обмена, к которым, в частности, относятся ангиотензинпревращающий фермент (АПФ, КФ 3.4.15.1) [7, 8], лейцинаминопептидаза (ЛАП, КФ 3.4.11.1) [9], карбоксипептидаза N (КПN КФ) [10]. Данные ферменты участвуют в процессинге, модуляции и инактивации регуляторных пептидов. Отсюда представляет интерес изучение их активности в ФПК при физиологическом и патологическом течении беременности.

В связи с этим целью настоящей работы явилось исследование активности АПФ, ЛАП, КПN в фетоплацентарном комплексе в норме и при ФПН.

МЕТОДИКА. 70 родильниц, давших информированное согласие на участие в данном исследовании, составили 2 группы обследуемых. В I группу вошли пациентки с физиологическим течением беременности и родов (n=25); во II группу (n=45) – пациентки с ФПН. У женщин с патологическим течением беременности диагностированы хроническая внутриутробная гипоксия плода (ХВГП), внутриутробная задержка развития плода (ВЗРП), сочетание ХВГП и ВЗРП.

В периоде адаптации у детей, рожденных от матерей с ФПН, отмечалось нарушение мозгового кровообращения.

При гистологическом исследовании последов у пациенток с фетоплацентарной недостаточностью отмечены очаговые нарушения микроциркуляции, инволютивно-дистрофические изменения, признаки инфекции.

Диагноз ФПН поставлен на основании клинических проявлений, наружного осмотра, ультразвукового исследования, результатов кардиотокограммы, клинико-лабораторных данных.

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. В полученных образцах плаценты определяли активность АПФ, ЛАП, КПN.

Кроме того, были исследованы образцы сыворотки крови родильниц и вены пуповины. Цельную кровь инкубировали 30 минут при комнатной температуре, центрифугировали 20 минут при 800 g и получали сыворотку, в которой определяли активность АПФ, ЛАП, КПN.

Активность ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) определяли по образованию гли-арг из карбобензокси-гли-гли-арг при pH 8,2 как активность, ингибируемую каптоприлом. Препарат фермента (40 мкл) смешивали с 20 мкл 35 мкМ каптоприла в 100 мМ Трис-HCl буфере, pH 8,2, или 20 мкл буфера и преинкубировали 8 мин при 37°С. В опытные пробы каптоприл не добавляли. Реакцию начинали добавлением 10 мкл раствора карбобензокси-гли-гли-арг в вышеуказанном буфере (конечная концентрация

в пробе 5 мМ). Через 120 мин реакцию останавливали 30 мкл 10% трихлоруксусной кислоты. Пробы центрифугировали 30 мин при 800 g, отбирали 50 мкл надосадочной жидкости и определяли количество образовавшегося гли-арг нингидриновым методом. Пробы колориметрировали на КФК-2 при λ=590 нм. 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 пересчёте на 1 мг белка. Концентрацию белка определяли методом Лоури.

Для определения активности лейцинаминопептидазы (ЛАП) 90 мкл сыворотки крови добавляли к 10 мкл раствора пуромицина, приготовленного на соответствующем буфере (в случае опытной пробы (I)) и к 10 мкл 20 мМ фосфатного буфера (рН 7,4) (в случае опытной пробы (II) и контрольной пробы). Далее проводили преинкубацию 8 мин при 37°С. Реакцию начинали добавлением в опытные пробы 100 мкл 310 мкМ раствора лей-β-нафтиламина, приготовленного на 20 мМ фосфатном буфере (рН 7,4). Через 30 мин реакцию останавливали прибавлением 40 мкл 10% раствора трихлоруксусной кислоты. В контрольные пробы добавляли 100 мкл субстрата. Пробы центрифугировали 30 мин при 800 g, отбирали 100 мкл надосадочной жидкости, добавляли по 1,5 мл натрий-ацетатного буфера (рН 4,2). Измерение флуоресценции образовавшегося β-нафтиламина проводили на флуориметре ФМЦ-2 при λ_{ex}=360 нм и λ_{em}=420 нм в кювете толщиной 1 см. Активность фермента определяли как разность между опытной пробой (I) и контрольной пробой и выражали в мкмоль β-нафтиламина, образовавшегося за 1 мин инкубации в пересчёте на 1 мг белка.

Активность карбоксипептидазы N определяли по образованию аргинина из гиппурил-аргинина при рН 7,6 как активность, активируемую ионами кобальта. Препарат фермента (40 мкл) смешивали с 30 мкл 100 мМ Трис-HCl, рН 7,6 (контрольные пробы) или с 20 мкл 3,5 мМ $CoSO_4$ в том же буфере (опытные пробы) Далее проводили преинкубацию 8 мин при 37°С. Реакцию начинали прибавлением 10 мкл раствора гиппурил-аргинина в опытные пробы. Через 120 мин реакцию останавливали прибавлением 30 мкл 10% трихлоруксусной кислоты. Пробы центрифугировали 30 мин при 800 g. Отбирали 50 мкл надосадочной жидкости и определяли количество образовавшегося аргинина нингидриновым методом. Пробы колориметрировали на КФК-2 при λ=590 нм. Активность карбоксипептидазы N определяли как разность в оптической плотности проб не содержащих и содержащих $CoSO_4$ и выражали в нмоль аргинина, образовавшегося за 1 мин инкубации в пересчете на 1 мг белка.

Экспериментальные данные обрабатывали статистически с использованием t-критерия Стьюдента. Корреляционный анализ проводили с помощью программы Statgraphics (версия 6.0).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Результаты исследования показали достоверно высокую активность АПФ в плацентарной ткани по сравнению с таковой в сыворотке крови матерей и вены пуповины (рис. 1). Выявлена положительная корреляция активности АПФ с толщиной плаценты. Как известно, АПФ участвует в ангиогенезе, пролиферации, фибропластических процессах [11, 12]. Фермент обнаружен в эпителиальных клетках ворсинок плаценты [7, 12]. Вероятно, высокая активность АПФ в плацентарной ткани, очевидно, связана с его участием в формировании сосудистой сети, спиральных артерий, в процессах реабсорбции и транспорта ионов и воды в ФПК.

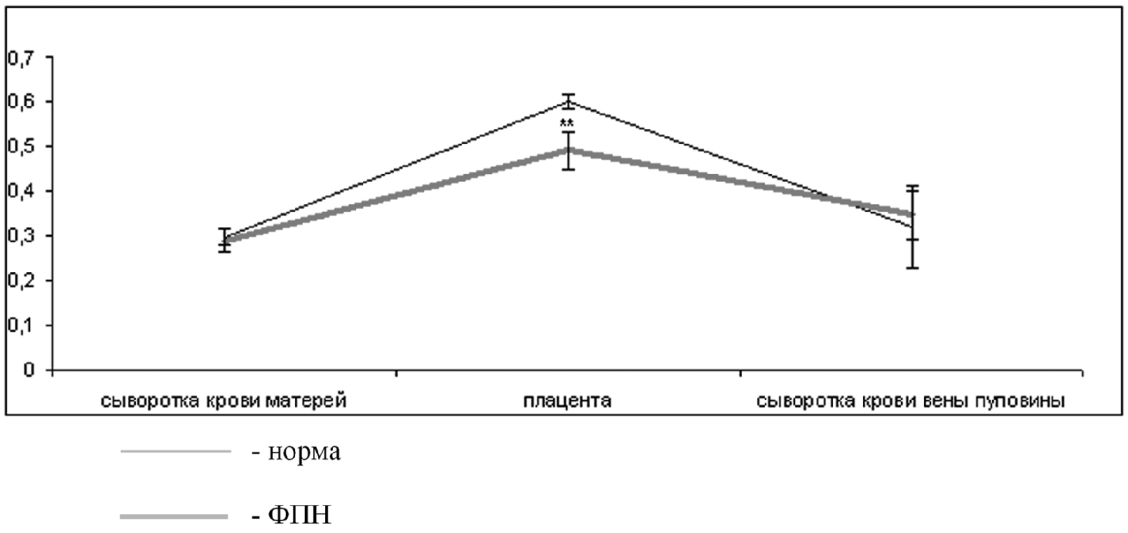

Рисунок 1.
Активность ангиотензинпревращающего фермента в сыворотке крови матерей, вены пуповины и плаценте в норме и при фетоплацентарной недостаточности (нмоль продукта, образовавшегося за 1 мин инкубации на 1 мг белка; ** - $p<0,01$ относительно нормы).
Здесь и на других рисунках данные представлены в виде средней величины ± ошибка средней.

Известно, что АПФ способствует образованию ангиотензина II (AII), уровень которого выше в сыворотке крови вены пуповины по сравнению с таковой в артерии пуповины [13]. Возможно, источником AII для плода и матери является плацента, где активность АПФ выше. Вероятно, происходит взаимодействие ангиотензина II с рецепторами, локализованными в эндотелии маточно- и плодовоплацентарных сосудов пуповины, что способствует поддержанию нормального кровотока в ФПК.

При ФПН обнаружено снижение активности АПФ в плацентарной ткани по сравнению с нормой (рис. 1). Ангиотензин-превращающий фермент является частью целостной ренин-ангиотензиновой системы [7, 11, 12]. При ФПН в плацентарной ткани отмечается повышение уровня кортиколиберина, который оказывает вазодиллатирующий эффект с помощью гуанилатциклазной системы, что способствует увеличению концентрации циклического гуанозинмонофосфата (cGMP) [14, 15]. cGMP оказывает ингибирующее действие на ренин [16], что, в свою очередь, может приводить к снижению скорости деградации ангиотензиногена до ангиотензина I – субстрата АПФ. Вероятно, снижение активности АПФ при патологическом течении беременности может быть связано с уменьшением образования ангиотензина I. При этом снижается скорость синтеза AII (проявляющего вазоконстрикторное действие) с участием АПФ, что можно расценивать как компенсаторно-приспособительную реакцию в условиях нарушенной микроциркуляции при осложненном течении беременности. В связи с этим можно предположить, что АПФ участвует в поддержании сниженной чувствительности сосудов к прессорным агентам, влияя на их уровень в ФПК.

Результаты исследования показали достоверно высокую активность ЛАП в плацентарной ткани по сравнению с таковой в сыворотке крови матерей и вены пуповины (рис. 2). Показано, что содержание окситоцина и вазопрессина выше в сыворотке крови артерии пуповины, чем вены [7].

Возможно, вазоконстрикторы поступают от плода в плаценту, где подвергаются распаду и инактивации под действием ЛАП. Таким образом, плацентарный фермент регулирует уровень окситоцина и вазопрессина, способствуя снижению чувствительности маточно- и фетоплацентарных сосудов к прессорам и поддержанию кровотока в ФПК.

При ФПН обнаружено достоверное снижение активности ЛАП в сыворотке крови матерей и нарастание активности фермента в плаценте и в сыворотке крови вены пуповины по сравнению с нормой (рис. 2). Показано, что при гипоксии усиливается синтез вазоактивных пептидов в организме плода, что выражается в увеличении содержания окситоцина и вазопрессина в сыворотке крови артерии пуповины [17-19]. Кроме того, в плаценте в условиях патологии может происходить усиление ангиогенеза, в котором принимает участие AII [12]. Содержание окситоцина, вазопрессина и AII находится под контролем ЛАП [9, 13]. Возможно, нарастание активности фермента в плаценте связано с увеличением уровня прессорных пептидов в ФПК. Вероятно, при гестационных осложнениях ЛАП участвует в снижении спазма сосудов в фетоплацентарном комплексе путем деградации вазоконстрикторов, что может способствовать улучшению микроциркуляции. Это можно расценивать как компенсаторно-приспособительную реакцию в условиях нарушенного маточно- и фетоплацентарного кровотока.

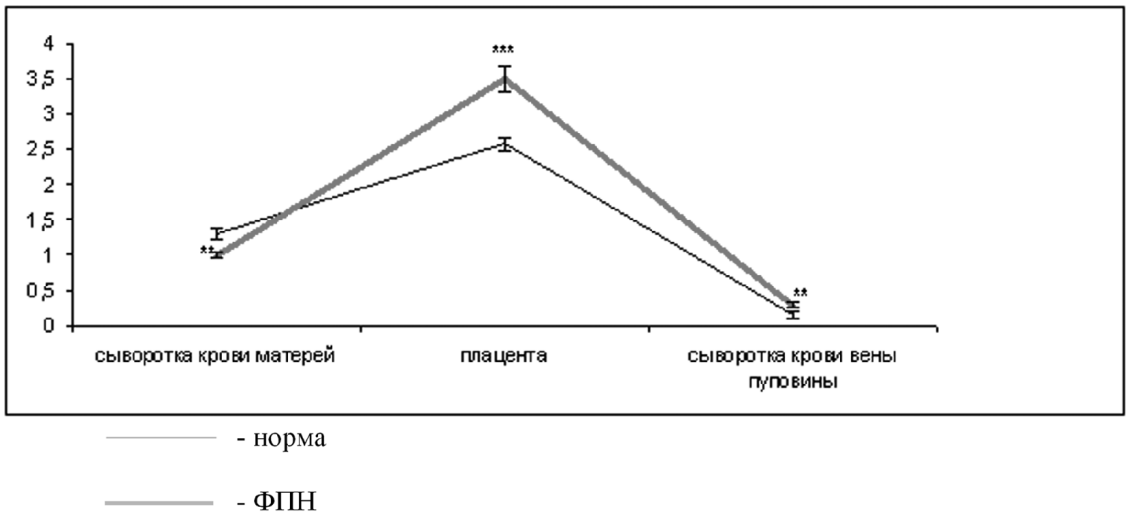

Рисунок 2.

Активность лейцинаминопептидазы в сыворотке крови матерей, вены пуповины и плаценте в норме и при фетоплацентарной недостаточности (мкмоль продукта, образовавшегося за 1 мин инкубации на 1 мг белка; *** - $p<0,001$,** - $p<0,01$ относительно нормы).

Выявлено, что при ФПН активность карбоксипептидазы N в сыворотке крови матерей достоверно выше по сравнению с нормой (рис. 3). При беременности появление маточно- и фетоплацентарного кровотока связано со снижением сосудистого сопротивления, что необходимо для нормального обмена веществ в ФПК. Для поддержания этого процесса эндотелий усиленно продуцирует простациклин и оксид азота, которые усиливают кровоток и снижают прессорное воздействие вазоконстрикторов. Синтез простациклина и оксида азота активируется брадикинином, который является компонентом

калликреин-кининовой системы, обладает вазодиллататорным действием, высвобождает активатор плазминогена, участвует в процессах ангиогенеза [17]. При патологии, возможно, имеет место активация калликреин-кининовой системы. В результате происходит увеличение уровня брадикинина, деградация которого находится под контролем КПN. При этом, возможно, формируются компенсаторно-приспособительные реакции с целью улучшения кровотока в условиях нарушенной микроциркуляции в ФПК.

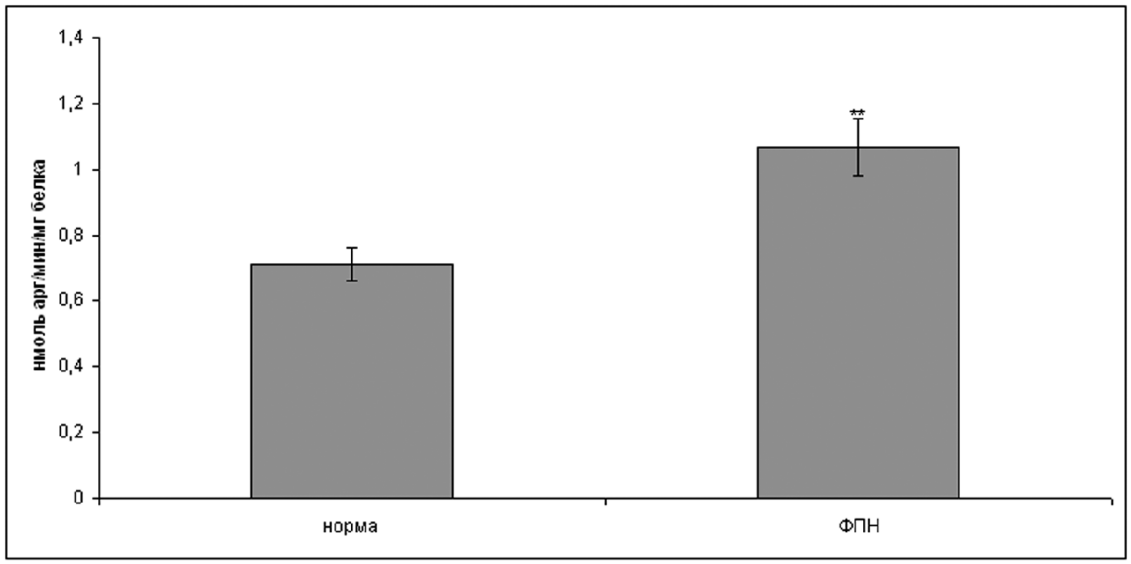

Рисунок 3.
Активность карбоксипептидазы N в сыворотке крови матерей в норме и при фетоплацентарной недостаточности (нмоль продукта, образовавшегося за 1 мин инкубации на 1 мг белка; ** - $p<0,01$ относительно нормы).

Таким образом, АПФ, ЛАП, КПN, участвуя в процессинге, модуляции и инактивации биологически активных пептидов, играют важную роль в поддержании гомеостаза в ФПК во время физиологической беременности.

Полученные результаты свидетельствуют об участии исследуемых ферментов в формировании компенсаторно-приспособительных реакций в ФПК при патологии, выраженность которых может влиять на состояние плода и новорожденного. Вероятно, представленные результаты могут быть основой для дальнейшего исследования гомеостаза фетоплацентарного комплекса и изыскания способов коррекции метаболических изменений в плаценте при осложненном течении беременности. Кроме того, ретроспективная оценка ферментативной функции плаценты может быть использована для прогноза течения раннего неонатального периода и состояния новорожденного.

ВЫВОДЫ.

— При физиологической беременности ангиотензинпревращающий фермент, лейцинаминопептидаза, карбоксипептидаза N участвуют в формировании сниженной чувствительности сосудов к вазопрессорам, что обеспечивает нормальный кровоток в фетоплацентарном комплексе.

— Исследуемые пептидгидролазы, вероятно, играют важную роль в патогенезе фетоплацентарной недостаточности, участвуя в формировании адаптивных реакций, что способствует сохранению беременности в условиях патологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Стрижаков А.Н., Добровольская И.В., Игнатко И.В.* (2011) Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии, **10**(1), 56-66.
2. *Иванова Л.А., Ильин А.Б., Абашин В.Г.* (2010) Журнал акушерства и женских болезней, **59**(2), 34-37.
3. *Радзинский В.Е., Смалько П.Я.* (2001) Биохимия плацентарной недостаточности, РУДН, М.
4. *Климов В.А.* (2008) Акушерство и гинекология, №2, 7-10.
5. *Page N.M., Кетр C.F., Butlin D.J., Lowry P.J.* (2002) J. Reproduction, **123**, 487-495.
6. *Орлов В.И., Авруцкая В.В., Крымшокалова З.С., Крукиер И.И.* (2008) Журнал акушерства и женских болезней, **57**(2), 84-89.
7. *Brameld J.M., Hold R., Pipkin F.B.* (2011) Placenta, **32**, 906-908.
8. *Петрушова О.П., Генгин М.Т., Сметанин В.А., Кузнецова А.В.* (2009) Биомед. химия, **55**, 673-680.
9. *Mizutani S., Wright John W., Kobayashi H.* (2011) Life Sci., **3**, 17-23.
10. *Kuno N., Mizutani S., Ohno Y., Goto K., Itakura A., Kondo I., Kurauchi O., Kikkawa F., Tomoda Y.* (1997) Reprod. Fertil. Dev., **9**, 633-639.
11. *Ager E.I., Neo J., Christophi C.* (2008) Cancerogenesis, **29**, 1675-1684.
12. *Clapp C., Thebalt S., Jeziorski M.C., Dela Escalera C.M.* (2009) Physiol., **89**, 1177-1215.
13. *Ito M., Itakura A., Ohno Y., Nomura M., Senga T., Nagasaka T., Mizutani S.* (2002) J. Clin. Endocrinol. Metab., **87**, 1871-1878.
14. *Karteris E., Goumenou A., Koumantakis E., Hillhouse E.W., Grammatopoulos D.K.* (2003) J. Clin. Endocrinol. Metab., **88**, 363-370.
15. *Mastorakos G., Ilias I.* (2003) Ann. NY Acad. Sci., **997**, 136-149.
16. *Кобалава Ж.Д., Котовская Ю.В., Моисеев В.С.* (2009) Артериальная гипертония: ключик к диагностике и лечению, ГЭОТАР-Медиа, М.
17. *Rosenfeld C.R.* (2001) Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., **281**, 1025-1040.
18. *Shi L., Mao C., Zeng* (2008) BMC Dev. Biol., **2**(8), 95.
19. *Kim Y.S., Kwon J.S., Hong M.H., Kim J., Song C.H., Jeong M.H., Cho J.G., Park J.C., Kang J.C., Ahn Y.* (2010) Artif. Organs., **34**, 453-461.

Поступила: 09. 11. 12.

PROTEOLYTIC ACTIVITY OF FETOPLACENTAL COMPLEX IN NORMAL AND PATHOLOGY

O.P. Petrushova, N.I. Mikulyak

Penza State University, ul. Krasnaya, 40, Penza, Russia; tel.: 8(8412)368413;
e-mail: chorion@rambler.ru

The activity of angiotensin converting enzyme (ACE), carboxypeptidase N (CPN), and leucine aminopeptidase (LAP) has been investigated in the fetoplacental complex (FPC) in normal and placental insufficiency (FPI). ACE and LAP activities were significantly higher in the placental tissue than in maternal serum and umbilical vein serum. CPN activity was significantly lower in umbilical vein serum as compared to that of women in childbirth. Probably, the studied enzymes are involved in formation of reduced sensitivity of FPC of blood vessels during physiological pregnancy.

In cases of placental insufficiency a significant increase of LAP activity was found in the placental tissue and umbilical vein serum. In addition, the pathological course of pregnancy caused a significant increase of CPN activity in serum of pregnant women in comparison to the norm. The obtained data suggest that during FPI proteolytic enzymes participate in the formation of compensatoty-adaptive reactions in the FPC. Results of this study are interesting in context of development of methods for prevention and correction of metabolic disorders in pathologies of pregnancy.

Key words: placenta, fetoplacental complex, carboxypeptidase N, angiotensin-converting enzyme, leucine aminopeptidase.