

УДК 618.36-06:543.866

ИССЛЕДОВАНИЕ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ В ТКАНИ ПЛАЦЕНТЫ ПРИ ГЕСТОЗАХ

Ахушкова Л.А., Николаев А.А., Сухарев А.Е.

*ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия Минздрава России»,
Астрахань, e-mail: chimnik@mail.ru*

Проведен анализ взаимосвязи уровней активности щелочной фосфатазы в водно-солевых и бутанольных экстрактах плацент, полученных при нормальных родах, и плацент, полученных при родах женщин, страдавших гестозами. Изучена концентрация специфической плацентарной щелочной фосфатазы методом ракетного иммуноэлектрофореза. Расчет удельной активности валовой термостабильной щелочной фосфатазы показывает, что в нормально развивающейся плаценте в водно-солевых экстрактах удельная активность щелочной фосфатазы составляет $1,3 \pm 0,02$ ед./мкг плацентарной щелочной фосфатазы, а в бутанольных экстрактах $1,43 \pm 0,02$ ед./мкг ПЩФ. В плацентах, полученных от женщин, страдавших гестозом, удельная активность щелочной фосфатазы в водно-солевых экстрактах составляет $1,18 \pm 0,025$ ед./мкг ПЩФ, а в бутанольных экстрактах $0,91 \pm 0,01$ ед./мкг ПЩФ. Анализ этих данных показывает, что самое значительное снижение удельной активности происходит при сравнении бутанольных экстрактов нормальной плаценты и плаценты женщин, страдавших гестозами. Здесь различие составляет более 36%. В нормальной плаценте отмечено недостоверное различие в удельной активности щелочной фосфатазы в водно-солевых и бутанольных экстрактах, несмотря на то, что при определении активности щелочной фосфатазы в водно-солевых и бутанольных экстрактах эти различия очень значительны и составляют более 230%.

Ключевые слова: гестоз, плацента, щелочная фосфатаза

STUDY OF ALKALINE PHOSPHATASE IN PLACENTAL TISSUE IN PREECLAMPSIA

Achuschkova L.A., Nikolaev A.A., Sukharev A.E.

Astrakhan State medical Academy Ministry of health of Russia», Astrakhan, e-mail: chimnik@mail.ru

The analysis of the relationship of the levels of alkaline phosphatase activity in water-salt and butanol extracts placenta, received normal birth and placenta received during childbirth, the women who suffered preeclampsia. Studied the concentration of specific placental alkaline phosphatase method rocket immunoelectrophoresis. Calculation of specific activity of gross thermostable alkaline phosphatase shows that in normally developing placenta in water-salt extracts specific activity of alkaline phosphatase is 1.3 ± 0.02 ed./mcg placental alkaline phosphatase and butanol extracts 1.43 ± 0.02 UNITS/mcg PAP. In placenta obtained from women suffering from eclampsia specific activity of alkaline phosphatase in water-salt extracts is 1.18 ± 0.025 U/mcg PAP, and in butanol extracts 0.91 ± 0.01 IU/mcg PAP. Analysis of these data shows that the most significant reduction of the specific activity occur when compared butanol extracts normal placenta and placenta of women suffering preeclampsia. Here the difference is more than 36%. In a normal placenta noted unreliable difference in specific alkaline phosphatase activity in water-salt and butanol extracts, despite the fact that during determination of alkaline phosphatase activity in water-salt and butanol extracts these differences are very significant and amounts to more than 230%.

Keywords: preeclampsia, placenta, alkaline phosphatase

Гестозы занимают второе место в статистике акушерских осложнений [3]. Их патогенез окончательно не изучен, а диагностика и прогнозирование до настоящего времени представляют собой трудную задачу [5].

В последние годы была экспериментально доказана связь между ишемией плаценты и повреждением эндотелия, вначале – в зоне маточно-плацентарного кровообращения, а затем – генерализованно. Авторы указывают на возможную связь между повышенным уровнем плацентарных изоферментов ЩФ и уровнем плацентарной недостаточности [6].

Плацентарная щелочная фосфатаза (ПЩФ) продуцируется микроворсинками плаценты и эндотелием её новообразующихся сосудов, является органоспецифическим антигеном плаценты, в связи с чем логично предположить непосредственное

участие этого фермента в указанных патологических процессах.

Исследованию ПЩФ как маркера эмбриональных и малигнизированных тканей, в последние десятилетия уделено большое внимание [8]. Однако в тени ПЩФ остаются другие ферменты этого органа, обладающие фосфатазной активностью.

Целью нашей работы стало комплексное исследование активности и концентрации щелочных фосфатаз в ткани плаценты здоровых женщин и при гестозах.

В работе использованы экстракты 14 плацент, полученных при нормальных родах, и 48 плацент, полученных при родах женщин, страдавших гестозами.

Для приготовления водно-солевого экстракта кусочки плаценты гомогенизировали до однородной массы, добавляя при этом 10 mM Tris-HCl, буфер pH 7,4 в соотношении 1:4. Гомогенат центрифугировали

и надосадочную жидкость использовали для исследования.

Для приготовления бутанольного экстракта осадок, полученный на 1 этапе, ресуспендировали в 10 mM Tris-HCl, буфер pH 7,4, содержащем бутанол (20%,v/v), и перемешивали в течении 6–8 часов при температуре –2–4°C. Через сутки указанную смесь центрифугировали с эфиром в течение 40–45 минут при 10000 об/мин в рефрижераторной центрифуге 2–3 раза в соотношении 1 часть эфира и 5 частей гомогената. После центрифугирования отделяли водную фазу, определяли общий белок и активность щелочной фосфатазы в надосадочной жидкости.

Активность щелочной фосфатазы определяли по расщеплению *p*-нитрофенилфосфата и нафтол-AS-фосфата, а количество органоспецифической плацентарной фосфатазы определяли методом ракетного электрофореза. Активность термостабильной плацентарной щелочной фосфатазы определяли после термической обработки водно-солевых и бутанольных экстрактов.

В водно-солевых экстрактах послеродовой плаценты содержится от 512 до 2048 ME общей активности щелочной фос-

фатазы и от 2048 до 4096 ME – в бутанольных экстрактах. По нашим данным, использование субстратов *p*-нитрофенилфосфата и нафтол-AS-фосфата не оказывает достоверного влияния на уровень активности общей щелочной фосфатазы плаценты, и далее мы не акцентируем внимание на субстратной специфичности. Выявленная активность общей плацентарной щелочной фосфатазы соответствует $7,6 \pm 1,0$ ME/100 г ткани в водно-солевых экстрактах и $22,8 \pm 3,0$ ME/100 г – в бутанольных экстрактах плаценты. То есть существует цитозольная (вероятно, она же – секретируемая в кровотоки) плацентарная щелочная фосфатаза и мембраносвязанная плацентарная щелочная фосфатаза, обеспечивающая метаболизм фетоплацентарного комплекса.

В водно-солевых экстрактах плаценты при гестозах отмечается достоверное снижение активности термостабильной щелочной фосфатазы (табл. 1). Причем характерно значительное снижение различия между уровнем щелочной фосфатазы в водно-солевых и бутанольных экстрактах (более чем на 42%). Наблюдается опережающее снижение уровня именно мембраносвязанного фермента, что, видимо, усугубляет функциональное состояние фетоплацентарного комплекса.

Таблица 1

Активность термостабильной щелочной фосфатазы в экстрактах плаценты здоровых женщин и страдающих гестозом

Донор плаценты	Водно-солевой экстракт ME	Бутанольный экстракт ME
Здоровые женщины ($n = 14$)	$1316,57 \pm 108,5$	$3120,27 \pm 142,7$
Женщины, страдавшие гестозом ($n = 48$)	$998,55 \pm 112,8$	$1677,57 \pm 156,6$

Получение поликлональных антител к очищенному препарату плацентарной щелочной фосфатазы позволило разработать моноспецифическую тест-систему на этот фермент.

Плацентарная щелочная фосфатаза по данным двумерного иммуноэлектрофореза состоит из 2-х иммунохимически идентичных компонентов с относительной электрофоретической подвижностью $0,65 \pm 0,04$ и $0,52 \pm 0,02$, что соответствует описанным в литературе [Mosbah A.A., 2011] F и S изоформам (рис. 1). Прогревание при 56°C в течение 30 минут или 60°C – 10–15 минут сохраняет активность ПЩФ, что свидетельствует о её основном отличии от других изоформ ЩФ свойстве – термостабильности.

В работе использован препарат плацентарной щелочной фосфатазы полученный в лаборатории кафедры химии Астраханской медицинской академии.

С помощью очищенного препарата ПЩФ нами были получены гипериммунные сыворотки к этому белку, которые позволили раз-

работать методы количественного определения ПЩФ в экстрактах плаценты, используя минимальное количество биоматериала.

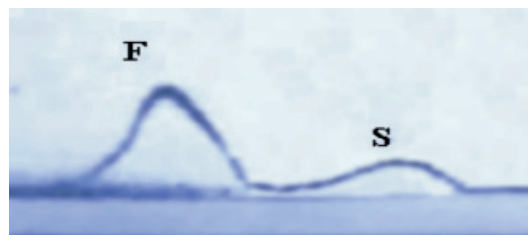


Рис. 1. Двумерный иммуноэлектрофорез экстракта плаценты. F-фракция с электрофоретической подвижностью 0,65, S-фракция с электрофоретической подвижностью 0,52. Агароза содержит антитела к плацентарной щелочной фосфатазе

Для количественного определения ПЩФ использовали метод ракетного иммуноэлектрофореза (РИЭФ). Метод

предполагает использование калибровочного графика при каждом анализе. В качестве стандартного образца используют одну из серий очищенного препарата ПЩФ.

Для стандартизации в этом случае может быть использован очищенный лиофилизированный ПЩФ: его раствор приготовлен по точной навеске. Однако разные серии ПЩФ различаются между собой в пределах ошибки препаративных методов, а образцы кроличьей сыворотки отличаются по концентрации антител, а это может влиять на

результаты определения содержания ПЩФ методом РИЭФ.

На рис. 2 представлена типичная электрофореграмма данного эксперимента. С помощью программы Excel для каждого образца строили график зависимости «ПЩФ – высота «ракеты» и находили уравнение линейной регрессии. Для оценки значимости различий линий регрессии применяли регрессионный анализ, заключающийся в сравнении коэффициентов наклона b , коэффициентов сдвига a , сравнения двух линий в целом (по F-критерию) [1].

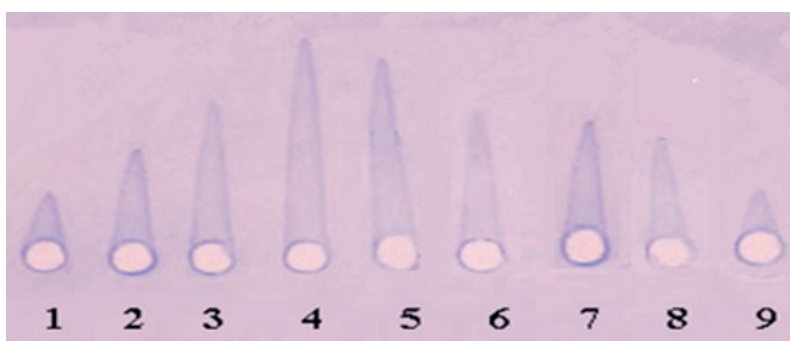


Рис. 2. Типичная электрофореграмма при определении ПЩФ; 1–4 – Разведения ПЩФ. Концентрации 5; 10; 15; 20 мкг/мл; 5, 6, 7, 8, 9 – образцы тканей плаценты

Таблица 2

Концентрация плацентарной термостабильной щелочной фосфатазы в экстрактах плаценты здоровых женщин и страдающих гестозом

Донор плаценты	Водно-солевой экстракт мкг/100 г ткани	Бутанольный экстракт мкг/100 г ткани
Здоровые женщины ($n = 18$)	1017,517 ± 14,5	2176,6 ± 42,1
Женщины, страдавшие гестозом ($n = 48$)	804,11 ± 12,3 *	1836,8 ± 26,0*

Примечание. * – $P \leq 0,01$.

На этих условиях было проведено 17 опытов ракетного иммуноэлектрофореза, в которых испытано 136 образцов ткани плацент и образцов биологических жидкостей.

В водно-солевых экстрактах плаценты при гестозах отмечается достоверное (более 20%) снижение концентрации ПЩФ, а бутанольных чуть менее 16% (табл. 2). Причем наблюдается заметное отличие в динамике изменений концентрации плацентарной щелочной фосфатазы, определенной иммунохимическими методами и изменения активности термостабильной щелочной фосфатазы (табл. 3).

Таким образом, на основании исследования водно-солевых и бутаноловых экс-

трактов послеродовой плаценты мы пришли к выводу, что существует цитозольная (вероятно, она же – секретлируемая в кровотоки) плацентарная щелочная фосфатаза и мембраносвязанная плацентарная щелочная фосфатаза, обеспечивающая метаболизм фетоплацентарного комплекса. Дисбаланс динамики активности термостабильной щелочной фосфатазы и концентрации специфической плацентарной щелочной фосфатазы подтверждает не только факт значительного присутствия фосфатаз различного происхождения в водно-солевой фракции, но и следует признать, что специфическая плацентарная фосфатаза не единственная мембраносвязанная фосфатаза.

Интересно, что снижение концентрации менее выражено (табл. 3), чем снижение активности. Расчет удельной активности валовой термостабильной щелочной фосфатазы показывает, что в нормально развивающейся плаценте в водно-солевых экстрактах удельная активность щелочной фосфатазы составляет $1,3 \pm 0,02$ ед./мкг плацентарной щелочной фосфатазы, а в бутанольных экстрактах $1,43 \pm 0,02$ ед./мкг ПЩФ. В плацентах, полученных от женщин, страдавших

гестозом, удельная активность щелочной фосфатазы в водно-солевых экстрактах составляет $1,18 \pm 0,025$ ед./мкг ПЩФ, а в бутанольных экстрактах $0,91 \pm 0,01$ ед./мкг ПЩФ. Анализ этих данных показывает, что самое значительное снижение удельной активности происходит при сравнении бутанольных экстрактов нормальной плаценты и плаценты женщин, страдавших гестозами. Здесь различие составляет более 36%.

Таблица 3

Сравнительная активность плацентарной термостабильной щелочной фосфатазы в экстрактах плаценты здоровых женщин и страдающих гестозом

Донор плаценты	Водно-солевой экстракт			Бутанольный экстракт		
	Активность ТЩФ МЕ	Концентрация ПЩФ, мкг/100 г ткани	Удельная активность, ед./мкг	Активность ТЩФ МЕ	Концентрация ПЩФ, мкг/100 г ткани	Удельная активность, ед./мкг
Здоровые женщины ($n = 21$)	$1316,57 \pm 108,5$	$1017,517 \pm 14,5$	$1,3 \pm 0,02$	$3120,27 \pm 142,7$	$2176,6 \pm 42,1$	$1,43 \pm 0,02$
Женщины, страдавшие гестозом ($n = 33$)	$998,55 \pm 112,8$	$804,11 \pm 12,3$	$1,18 \pm 0,025$	$1677,57 \pm 156,6$	$1836,8 \pm 26,0$	$0,91 \pm 0,01$

В нормальной плаценте отмечено недостоверное различие в удельной активности щелочной фосфатазы в водно-солевых и бутанольных экстрактах, несмотря на то, что при определении активности щелочной фосфатазы в водно-солевых и бутанольных экстрактах эти различия очень значительны и составляют более 230%. Это кажущееся противоречие можно объяснить примерно равноценной долей специфической плацентарной фосфатазы в общем фосфатазном пуле как водно-солевого, так и бутанольного экстрактов. Эту точку зрения подтверждает и наблюдение Zhabin S.G., Луценко М.Т [9,2]

Резкое снижение на 36% удельной активности в бутанольных экстрактах плаценты женщин, страдавших гестозами, по сравнению с нормальной плацентой, свидетельствует об опережающем снижении уровня специфической плацентарной фосфатазы в мембрансвязанной фракции, а значительное увеличение различия между удельной активностью щелочной фосфатазы в водно-солевых и бутанольных экстрактах (более чем на 23%) может свидетельствовать в пользу представления о более активном вымывании именно специфической плацентарной фосфатазы в цитозольную фракцию [4].

Следовательно, при гестозах происходит не только количественное изменение

уровня плацентарной щелочной фосфатазы, но и, во-первых, дисбаланс между цитозольной и мембранной фракциями щелочной фосфатазы и, во-вторых, изменение профиля многочисленных фосфатаз, клеток плаценты, с опережающим снижением уровня специфической плацентарной щелочной фосфатазы, что усугубляет функциональное состояние фетоплацентарного комплекса.

Список литературы

1. Гланц С. Медико-биологическая статистика: пер. с англ. – М.: Практика 1999. – 459 с.
2. Луценко М.Т. Цитологическая характеристика белкового обмена в цитозоле синцитиотрофобласта ворсинок плаценты у беременных, перенесших в период гестации обострение герпес-вирусной инфекции // Фундаментальные исследования 2012. – № 7. – С. 106–112.
3. Однокозова О.С. Прогнозирование и превентивное лечение гестоза: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Волгоград, 2010. – 24 с.
4. Burlev V.A., Il'yasova N.A., Dubinskaya E.D. Proliferative activity of microvessels and angiogenesis in eutopic endometrium in patients with peritoneal endometriosis // Bull Exp Biol Med. – 2005. – Vol. 139. – № 6. – P. 727–731.
5. Davidson J.M., Lindheimer M.D. New develops in preeclampsia // Am. Soc. Nephrol. – 2011. – Vol. 32. – P. 517–525
6. Ferianec V., Linhartová L. Extreme elevation of placental alkaline phosphatase as a marker of preterm delivery, placental insufficiency and low birth weight // Neuro Endocrinol Lett. – 2011. – Vol. 32. – № 2. – P. 154–157.

7. Mosbah A.A., Abd-Ellatif N.A., Sorour E.I., El-Halaby A.F. Placental alkaline phosphatase activity and its relation to foetal growth and nutrition in appropriate and small for gestational age newborns at term // *J Egypt Soc Parasitol.* – 2011. – Vol. 41. – № 3. – P. 745–52.

8. Tang X., Yang F., Jia L., Yao X.Y., Yang K.X. Placental proteins site trophoblastic cells in the pelvic wall: review of the literature // *Indian J Pathol Microbiol.* – 2013. – Vol. 56. – № 3. – P. 300–312.

9. Zhabin SG, Gorin VS, Judin NS. Review: immunomodulatory activity of pregnancy-associated protein // *J Clin Lab Immunol.* – 2011. – Vol. 52. – P. 41–50.

References

1. Glanc S. Mediko-biologicheskaja statistika. Per. s angl., M.: Praktika 1999; 459 p.

2. Odnokozova O.S. Prognozirovanie i preventivnoe lechenie gestoza // Avtoreferat diss. kand. med. nauk. Volgograd. 2010. 24 p.

3. Lucenko M.T. Citologicheskaja harakteristika belkovogo obmena v citozole sincitiotrofoblasta vorsinok placenty u beremennyh, perenes6ih v period gestacii obstrenie gerpesvirusnoj infekcii // *Fundamental'nye issledovanija* 2012 no. 7 pp. 106–112.

4. Burlev VA, Il'yasova NA, Dubinskaya ED Proliferative activity of microvessels and angiogenesis in eutopic endometrium in patients with peritoneal endometriosis // *Bull Exp Biol Med.* 2005 Vol. 139 no. 6 pp. 727–731.

5. Davidson J.M., Lindheimer M.D. New develops in preeclampsia // *Am. Soc. Nephrol.* 2011. Vol. 32. pp. 517–525.

6. Ferianec V, Linhartová L. Extreme elevation of placental alkaline phosphatase as a marker of preterm delivery, placental insufficiency and low birth weight // *Neuro Endocrinol Lett.* 2011. Vol. 32. no. 2. pp. 154–157.

7. Mosbah A.A., Abd-Ellatif N.A., Sorour E.I., El-Halaby A.F. Placental alkaline phosphatase activity and its relation to foetal growth and nutrition in appropriate and small for gestational age newborns at term // *J Egypt Soc Parasitol.* 2011 Vol. 41. no. 3. pp. 745–752.

8. Tang X., Yang F., Jia L., Yao X.Y., Yang K.X. Placental proteins site trophoblastic cells in the pelvic wall: review of the literature // *Indian J Pathol Microbiol.* 2013 Vol. 56 no. 3 pp. 300–312.

9. Zhabin S.G., Gorin V.S., Judin N.S. Review: immunomodulatory activity of pregnancy-associated protein // *J Clin Lab Immunol.* 2011. Vol. 52. p. 41–50.

Рецензенты:

Мажитова М.В., д.б.н., доцент, зав. кафедрой химии фармацевтического факультета ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия», г. Астрахань;

Молдавская А.А., д.м.н., профессор кафедры анатомии человека, ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия», г. Астрахань.

Работа поступила в редакцию 21.12.2013.