

# МОДИФИКАЦИЯ АКТИВНОСТИ ИЗОФЕРМЕНТНОГО СПЕКТРА И СУБКЛЕТОЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ ФЕРМЕНТОВ АМИНОКИСЛОТНОГО ОБМЕНА В ПЛАЦЕНТЕ ПРИ ЕЕ ДИСФУНКЦИИ

## Т.Н. Погорелова

д.б.н., профессор, гл. науч. сотрудник,  
Ростовский государственный медицинский университет (г. Ростов-на-Дону)  
E-mail: tnp.rniip@yandex.ru

## В.О. Гунько

к.б.н., ст. науч. сотрудник,  
Ростовский государственный медицинский университет (г. Ростов-на-Дону)

## А.А. Никашина

к.б.н., науч. сотрудник,  
Ростовский государственный медицинский университет (г. Ростов-на-Дону)

## А.В. Ларичкин

мл. науч. сотрудник,  
Ростовский государственный медицинский университет (г. Ростов-на-Дону)

На течение пренатального развития влияют различные нарушения в метаболизме плаценты, объединяющей организмы матери и плода. В связи с этим цель работы – изучение активности ферментов аминокислотного обмена при физиологической беременности и дисфункции плаценты, занимающей ведущее место среди осложнений гестации, приводящих к патологии плода. Материалом исследования служила ткань плаценты, в которой спектрофотометрическими методами определяли активность аминотрансфераз, дезаминаз и аминосинтетаз. Субклеточные фракции плаценты выделяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Количественную оценку зон активности на гелях проводили денситометрически. Установлены разнонаправленные изменения активности всех изученных ферментов в плаценте при ее дисфункции. Степень изменения зависит от субклеточной локализации и характера изоферментных спектров, которые также отличаются при данной акушерской патологии от нормальных показателей. Максимальное количество изоферментов характерно для митохондриальной фракции глутаматдегидрогеназы. Активность изоферментов аминотрансфераз имеет полицитоструктурную организацию. Выявленные нарушения могут быть важными звеньями в цепи биохимических повреждений, приводящих к дисфункции плаценты.

**Ключевые слова:** плацента, активность ферментов аминокислотного обмена, дисфункция плаценты.

**Для цитирования:** Погорелова Т.Н., Гунько В.О., Никашина А.А., Ларичкин А.В. Модификация активности, изоферментного спектра и субклеточной локализации ферментов аминокислотного обмена в плаценте при ее дисфункции. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2020; 23(3): 8–12. <https://doi.org/10.29296/25877313-2020-03-02>

Нормальное течение пренатального периода онтогенеза зависит от состояния гомеостаза в системе мать-плацента-плод и, прежде всего, в плаценте, являющейся связующим звеном между организмами матери и плода. Именно дисфункция плаценты занимает ведущее место среди осложнений беременности [1]. Необходимость обеспечения физиологического роста и развития плода значительно повышает его потребности в пластическом материале, важной частью которого являются свободные аминокислоты и их производные. Аминокислотам принадлежит особая роль в широком спектре метабо-

ломных превращений, затрагивающих в том числе и молекулярный уровень регуляции [2–4]. Поддержание оптимального уровня аминокислот в плаценте осуществляется различными путями, особое значение среди которых занимают ферментативные процессы синтеза и обмена аминокислот. Нарушение этих процессов будет отражаться на течении гестации и состоянии внутриутробного плода.

Ц е л ь р а б о т ы – изучение активности и некоторых свойств плацентарных ферментов аминокислотного обмена при физиологической беременности и дисфункции плаценты.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В проспективное исследование включены 60 женщин в возрасте 24–30 лет, составившие 2 группы: 1-я (контрольная) группа представлена 28 клинически здоровыми женщинами с неосложненным течением беременности и родов; во 2-ю (основную) группу вошли 32 женщины, беременность которых осложнилась дисфункцией плаценты, верифицированной после родов. Исследование проводилось с учетом требований Хельсинской Декларации (2008) и Приказа Минздрава РФ от 01.11.2012 №572н. Критериями исключения из исследования служили: инфекционные заболевания, декомпенсированные формы соматических заболеваний, признаки преэклампсии и задержки роста плода. Критериями при постановке диагноза (и для включения в основную группу) служили: нарушения кровотока в маточных артериях, сосудах пуповины или магистральных сосудах плода по данным доплерометрии. Кроме того, у женщин основной группы наблюдались начальные проявления гипоксии плода при кардиотокографии. Гистологическое исследование плаценты выявило ее патологические изменения: фиброз стромы ворсин, участки кальциноза, гиперваскуляризация ворсин.

Материалом для исследования служила ткань плаценты. Образцы плаценты получали сразу после родов при соблюдении холодового режима ( $t = +2...+4$  °C). Для проведения исследования брали центральную часть макроскопически нормальных участков плацентарного диска. Вырезанные образцы (10 г) промывали охлажденным физиологическим раствором и гомогенизировали (при  $t = +2...+4$  °C) с помощью гомогенизатора Ultra-Turrax (IKA) в PBS-буфере. В экстрактах, полученных из плацентарной ткани, определяли активность аспартат- (АСТ, КФ 2.6.1.1), аланин- (АЛТ, КФ 2.6.1.2), цистеин- (Цис-Т, КФ 2.6.1.3), тирозин- (Тир-Т, КФ 2.6.1.5) аминотрансфераз по приросту глутаминовой кислоты после инкубации соответствующей аминокислоты с  $\alpha$ -кетоглутаровой кислотой. Об активности фосфат-активируемой глутаминазы (ФАГ; КФ 3.5.1.2) и активности глутаминсинтетазы (ГС; КФ 6.3.1.2) судили по снижению количества глутамина или его приросту [5]. Содержание образовавшихся глутаминовой кислоты и ее амида – глутамина измеряли на автоматическом анализаторе AAA-400 («Micro-techno», Чехия). Активность глутамин-кетокислотной аминотрансферазы (ГКТ, КФ 2.6.1.15) определяли по накоплению количества аммиака, оценен-

ного спектрофотометрически с помощью реакции несслеризации после инкубации глутамина с щавелевоуксусной кислотой. Активность глутаматдегидрогеназы (ГДГ, КФ 1.4.13) определяли по приросту восстановленного никотинамидадениндинуклеотида при 340 нм. При проведении ферментативных реакций использовали известные инкубационные смеси [5]. Субклеточные фракции плацентарной ткани получали с помощью классического метода дифференциального ультрацентрифугирования в градиенте сахарозы [6]. Наряду с общей активностью ферментов определяли их изоферментный спектр. Активность изоферментов оценивали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, используя прибор Protein II Xi Multi-Cell («Bio-Rad», США). По окончании электрофореза гели извлекали и помещали в пробирки с соответствующими для каждого фермента инкубационными смесями [5]. Количественную оценку окрасившихся зон активности на гелях проводили на денситометре «Camag TLC Scanner II» (Швейцария).

Статистическую обработку данных выполняли, используя лицензионный пакет программ Statistica 6.0. («StatSoft Inc.»). Данные представлены в виде среднего значения ( $M$ ) и средней квадратической ошибки ( $m$ ). Статистическую значимость различий между показателями определяли по критерию Стьюдента ( $t$ -критерий). Результаты оценивали как статистически значимые при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные данные свидетельствуют о том, что развитие дисфункции плаценты происходит на фоне существенных изменений активности плацентарных ферментов аминокислотного обмена (табл. 1). Особенно важное значение в аминокислотном обмене плаценты имеют реакции, связанные с превращениями глутаминовой кислоты, ее амида глутамина, аспарагиновой кислоты и аланина. Активность ГДГ в плаценте женщин основной группы снижена на 30,7% ( $p = 0,002$ ) по сравнению с контрольным показателем. В среднем в аналогичной степени уменьшена активность АЛТ, ГКТ, Тир-Т, Цис-Т и ГС. Противоположная направленность изменений характерна для АСТ и ФАГ, активность которых в плаценте при ее дисфункции повышена на 37,8% ( $p = 0,001$ ) и 34,7% ( $p = 0,008$ ).

Анализ изменения активности ферментов в значительной степени объясняет имеющиеся в литературе данные о динамике содержания свободных аминокислот при беременности, развиваю-

щейся на фоне плацентарной недостаточности [7]. Так, увеличение активности АСТ обуславливает повышение количества аспарагиновой кислоты. Снижение активности ГДГ может быть причиной

избыточного накопления этой кислоты в плаценте. Еще одной реакцией, в результате которой увеличивается количество глутаминовой кислоты, является повышение активности глутаминазы (ФАГ).

**Таблица 1. Активность ферментов аминокислотного обмена (нмоль/мин·мг белка) в ткани плаценты при физиологической беременности и дисфункции плаценты ( $M \pm m$ )**

Показатель	Физиологическая беременность	Дисфункция плаценты	<i>p</i>
ГДГ	5,42±0,40	3,76±0,28	0,001
АСТ	6,05±0,44	8,34±0,52	0,002
АЛТ	1,47±0,14	0,99±0,08	0,003
ГКТ	0,94±0,07	0,71±0,05	0,009
Тир-Т	0,55±0,05	0,36±0,03	0,001
ЦисТ	0,41±0,03	0,32±0,02	0,013
ФАГ	1,38±0,11	1,86±0,14	0,011
ГС	1,87±0,13	1,42±0,10	0,007

Примечание: *p* – достоверность различий между показателями при физиологической беременности и дисфункции плаценты.

**Таблица 2. Активность ферментов аминокислотного обмена (нмоль/мин·мг белка) в субклеточных фракциях плаценты при физиологической беременности и дисфункции плаценты ( $M \pm m$ )**

Показатель	Физиологическая беременность			Дисфункция плаценты			<i>p</i>
	Митохондрии	Цитоплазма	Ядра	Митохондрии	Цитоплазма	Ядра	
ГДГ	4,36±0,29	0,59±0,05	0,47±0,04	3,04±0,31	0,40±0,03	0,30±0,03	<i>p</i> <sub>1</sub> =0,003 <i>p</i> <sub>2</sub> =0,001 <i>p</i> <sub>3</sub> =0,001
АСТ	2,26±0,14	3,18±0,23	0,61±0,03	2,87±0,15	4,53±0,33	0,75±0,04	<i>p</i> <sub>1</sub> =0,005 <i>p</i> <sub>2</sub> =0,002 <i>p</i> <sub>3</sub> =0,008
АЛТ	0,46±0,03	0,87±0,08	0,14±0,01	0,33±0,03	0,54±0,06	0,12±0,07	<i>p</i> <sub>1</sub> =0,003 <i>p</i> <sub>2</sub> =0,001 <i>p</i> <sub>3</sub> =0,792
ГКТ	0,38±0,02	0,47±0,04	0,15±0,01	0,31±0,02	0,30±0,03	0,12±0,07	<i>p</i> <sub>1</sub> =0,017 <i>p</i> <sub>2</sub> =0,001 <i>p</i> <sub>3</sub> =0,693
Тир-Т	0,22±0,02	0,28±0,03	0,05±0,01	0,15±0,01	0,17±0,02	0,04±0,01	<i>p</i> <sub>1</sub> =0,002 <i>p</i> <sub>2</sub> =0,003 <i>p</i> <sub>3</sub> =0,066
ЦисТ	0,15±0,01	0,23±0,02	0,03±0,01	0,11±0,01	0,17±0,01	0,02±0,01	<i>p</i> <sub>1</sub> =0,007 <i>p</i> <sub>2</sub> =0,007 <i>p</i> <sub>3</sub> =0,484
ФАГ	0,55±0,04	0,70±0,04	0,13±0,01	0,74±0,05	0,98±0,07	0,14±0,01	<i>p</i> <sub>1</sub> =0,005 <i>p</i> <sub>2</sub> =0,001 <i>p</i> <sub>3</sub> =0,348
ГС	0,65±0,04	1,12±0,08	0,10±0,01	0,50±0,04	0,78±0,06	0,09±0,01	<i>p</i> <sub>1</sub> =0,011 <i>p</i> <sub>2</sub> =0,001 <i>p</i> <sub>3</sub> =0,407

Примечание: достоверность различий между показателями *p*<sub>1</sub> – в митохондриях; *p*<sub>2</sub> – в цитоплазме; *p*<sub>3</sub> – в ядрах при физиологической беременности и дисфункции плаценты.

В свою очередь изменение активности ФАГ и ГКТ влияет на уровень глутамин. Кроме того, уменьшение активности ГКТ нарушает процессы освобождения и фиксации аммиака, а также снижает реакции выработки энергии на разных уровнях цикла Кребса, в зависимости от вовлечения в процесс той или иной кетокислоты. Уменьшение активности АЛТ отражается на уровне аланина, задействованного во многих метаболических процессах [2]. К негативным последствиям приводит снижение активности Тир-Т и Цис-Т, сопровождающееся изменением содержания субстратов этих ферментов – тирозина и цистеина. Уменьшение содержания активного антиоксиданта – тирозина – приводит к нарушению редокс-процессов и хронической внутриутробной гипоксии, характерной для дисфункции плаценты [8]. Опосредованное влияние на многие метаболические процессы в плаценте оказывает модификация активности Цис-Т, которая сопровождается уменьшением количества цистеина и, как следствие, снижением интенсивности синтеза внутриклеточного антиоксиданта – глутатиона.

Степень изменения активности ферментов различна в зависимости от их субклеточной локализации (табл. 2).

При дисфункции плаценты наиболее выраженное снижение общей активности ГДГ установлено в митохондриях (на 40,6%,  $p = 0,001$ ), в меньшей степени уменьшается активность этого фермента в цитоплазматической и ядерной фракциях (на 29,0 и 20,4% соответственно,  $p = 0,002$ ). Для АСТ максимальное повышение активности (на 42,5%,  $p = 0,001$ ) имеет место в цитоплазме. В митохондриях и ядрах она увеличена на 26,9% ( $p = 0,01$ ) и 22,9% ( $p = 0,01$ ). Что касается других аминотрансфераз, то приоритетность отклонений в субклеточных фракциях (цитоплазме и митохондриях) плаценты аналогична таковой АСТ, хотя имеет противоположную направленность. В ядерной фракции активность этих ферментов практически не изменяется. Для ФАГ и ГС характерны разнонаправленные изменения активности, максимальная степень которых также обнаружена в цитоплазме (+40,0%,  $p = 0,001$  и -30,3%,  $p = 0,001$  соответственно).

Проведенные исследования показали, что некоторые ферменты представлены несколькими молекулярными формами. Особенно это характерно для ГДГ, для которой обнаружено 6 изоформ, обозначенных в соответствии с их электрофоре-

тической подвижностью (от ГДГ<sub>1</sub> до ГДГ<sub>6</sub>). Существование дублирующих белков-ферментов и различная степень участия их в метаболизме клетки обеспечивает более тонкую регуляцию метаболизма, адекватно требованиям быстро развивающегося органа. При дисфункции плаценты характер изоферментных спектров изменяется. Наиболее выраженная степень снижения от общего содержания всех изоформ (на 50,4%,  $p = 0,001$ ) установлена для ГДГ<sub>6</sub>, регистрируемой в митохондриальной фракции. Это особенно негативно влияет на функциональное состояние плаценты, так как в митохондриях происходит сопряжение азотистого и энергетического обмена в реакциях цикла Кребса. Для цитоплазмы более характерны процессы глюкогенеза. Уменьшение активности изоферментов, локализованных в цитоплазматической фракции (ГДГ<sub>1</sub>, ГДГ<sub>2</sub>), составляет 20,3% ( $p = 0,02$ ) и 19,2% ( $p = 0,02$ ) соответственно. Для активности ГДГ<sub>3</sub> и ГДГ<sub>4</sub> с полицитоструктурной локализацией достоверные отличия отсутствуют. Ферменты АСТ, АЛТ представлены двумя изоформами, локализованными в цитоплазме (АСТ<sub>1</sub>, АЛТ<sub>1</sub>) и митохондриях (АСТ<sub>2</sub>, АЛТ<sub>2</sub>).

Плацентарная дисфункция сопровождается нарушением соотношения изоформ указанных ферментов. В контрольной группе это соотношение равно для АСТ<sub>1</sub>/АСТ<sub>2</sub>, –  $1,35 \pm 0,08$ , для АЛТ<sub>1</sub>/АЛТ<sub>2</sub> –  $2,05 \pm 0,14$ , при осложненной беременности данные показатели составляют  $1,75 \pm 0,10$  ( $p = 0,009$ ) и  $1,45 \pm 0,09$  ( $p = 0,005$ ) соответственно. Другие ферменты при электрофорезе не разделяются на фракции.

## ВЫВОДЫ

При дисфункции плаценты, происходят значительные отклонения в активности ферментов аминокислотного обмена. Кроме того, изменяется характер изоферментных спектров и субклеточная локализация ферментов, что усугубляет нарушение регуляторной системы обмена аминокислот и их производных в плаценте и фетоплацентарной системе в целом.

Результаты настоящего исследования позволяют расширить представления о биохимических механизмах развития дисфункции плаценты.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Стрижаков А.Н., Липатов И.С., Тезиков Ю.В. Плацентарная недостаточность. Самара: ООО «Офорт». 2014. 240 с.

2. D`Mello J.P.F. (ed.) Amino acids in human nutrition and health. Wallingford; CAB International. 2012. 584 p.
3. Wu G. Functional amino acids in nutrition and health. Amino Acids. 2013; 45(3):407–411.
4. Bröer S., Bröer A. Amino acid homeostasis and signaling in mammalian cells and organisms. Biochem. J. 2017; 474(12):1935–1963.
5. Медицинские лабораторные технологии. Под ред. А.И. Карпищенко. Изд. 3-е. М.: ГЭОТАР-Медиа. 2013. Т. 2. 136 с.
6. Dimauro I., Pearson T., Caporossi D., Jackson M.J. A simple protocol for the subcellular fractionation of skeletal muscle cells and tissue. BMC Res. Notes. 2012; 5:513.
7. Погорелова Т.Н., Гунько В.О., Авруцкая В.В. и др. Нарушение плацентарного обмена аминокислот при задержке роста плода. Биомедицинская химия. 2017; 63(3):266–271.
8. Макацария А.Д., Бицадзе В.О., Хизроева Д.Х., Хамани Н.М. Плацентарная недостаточность при осложненной беременности и возможности применения дипиридамола. Акушерство, гинекология и репродукция. 2016; 10(4):72–82.

Поступила 2 декабря 2019 г.

## MODIFICATION OF THE ACTIVITY, ISOENZYME SPECTRUM AND SUBCELLULAR LOCALIZATION OF AMINO ACID EXCHANGE ENZYMES IN THE PLACENTA DURING ITS DYSFUNCTION

© Authors, 2020

**T.N. Pogorelova**

Dr.Sc. (Biol.), Professor, Chief Research Scientist, Rostov State Medical University (Rostov-on-Don)

E-mail: tnp.rniap@yandex.ru

**V.O. Gunko**

Ph.D. (Biol.), Senior Research Scientist, Rostov State Medical University (Rostov-on-Don)

**A.A. Nikashina**

Ph.D. (Biol.), Research Scientist, Rostov State Medical University (Rostov-on-Don)

**A.V. Larichkin**

Junior Research Scientist, Rostov State Medical University (Rostov-on-Don)

During prenatal development, various disorders affect in the metabolism of placenta, uniting the organisms of the mother and fetus. In this regard, the aim of the work is to study the activity of enzymes of amino acid metabolism at physiological pregnancy and placental dysfunction, which occupy a leading place among the complications of gestation that lead to fetal pathology. Material studies served as placental tissue in which the activity of aminotransferases, deaminases, and aminosynthetases was determined by spectrophotometric methods. Subcellular fractions of the placenta were isolated by polyacrylamide gel electrophoresis. Quantitative assessment of activity zones on gels leads to densitometric method. Established multidirectional changes in the activity of all studied enzymes in the placenta during its dysfunction. The degree of changes depends on the subcellular localization and the nature of the isoenzyme spectrum, which also differ from the normal parameters of this obstetric pathology. The maximum amount of isoenzymes is typical for the mitochondrial glutamate dehydrogenase fraction. The activity of aminotransferases isoenzymes has polycyctostructural organization. In the chains of biochemical signals that lead to placental dysfunction.

**Key words:** placenta, the activity of enzymes of amino acid metabolism, dysfunction of the placenta.

**For citation:** Pogorelova T.N., Gunko V.O., Nikashina A.A., Larichkin A.V. Modification of the activity, isoenzyme spectrum and subcellular localization of amino acid exchange enzymes in the placenta during its dysfunction. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2020;23(3):8–12. <https://doi.org/10.29296/25877313-2020-03-02>

### REFERENCES

1. Strizhakov A.N., Lipatov I.S., Tezikov Yu.V. Placentarnaya nedostatochnost'. Samara: OOO «Ofort». 2014. 240 s.
2. D`Mello J.P.F. (ed.) Amino acids in human nutrition and health. Wallingford; CAB International. 2012. 584 p.
3. Wu G. Functional amino acids in nutrition and health. Amino Acids. 2013; 45(3):407–411.
4. Bröer S., Bröer A. Amino acid homeostasis and signaling in mammalian cells and organisms. Biochem. J. 2017; 474(12):1935–1963.
5. Medicinskie laboratornye tekhnologii. Pod red. A.I. Karpishchenko. Izd. 3-e. M.: GEOTAR-Media. 2013. Т. 2. 136 с.
6. Dimauro I., Pearson T., Caporossi D., Jackson M.J. A simple protocol for the subcellular fractionation of skeletal muscle cells and tissue. BMC Res. Notes. 2012; 5:513.
7. Pogorelova T.N., Gun'ko V.O., Avruckaya V.V. i dr. Narushenie placentarnogo obmena aminokislot pri zaderzhke rosta ploda. Biomedicinskaya himiya. 2017; 63(3):266–271.
8. Makacariya A.D., Bicadze V.O., Hizroeva D.H., Hamani N.M. Placentarnaya nedostatochnost' pri oslozhnennoj beremennosti i vozmozhnosti primeneniya dipiridamola. Akusherstvo, ginekologiya i reprodukcija. 2016; 10(4):72–82.