

ВВ-изофермент креатинкиназы – биохимический маркер внутриутробной гипоксии плода

С.А. Мкртчян, Л.С. Нерсесова, Ж.И. Акопян

Институт молекулярной биологии НАН РА

375014, Ереван, ул. Асратяна, 7

Ключевые слова: креатинкиназа, изоферменты, амниотическая жидкость, плацента, внутриутробная гипоксия, биохимический маркер

Креатинкиназа – ключевой фермент энергетического обмена клетки, физиологическая роль которого состоит в обеспечении транспорта и резервировании внутриклеточной энергии и, таким образом, в поддержании в клетке энергетического гомеостаза [8,13]. Креатинкиназа (КК) представляет собой ферментативную систему, состоящую из ряда изоферментов, специфически локализованных в клетке в местах производства и потребления энергии, как, например, митохондрии, миофибриллы, плазматическая мембрана, саркоплазматический ретикулум. Различают 4 основных изофермента КК: ММ-изофермент, характерный для мышечной ткани; ВВ-изофермент, характерный для мозга; МВ-изофермент, специфически присутствующий в сердце; митохондриальный изофермент креатинкиназы – МiMi. Благодаря микрогетерогенности субъединиц, каждый из них имеет свои субформы [8]. В клинической практике используется обычно определение 3 первых изоферментов КК [5,8,9]. Одной из особенностей КК как фермента является его способность тонко реагировать на структурно-функциональные изменения в клетке, что проявляется в адаптационных изменениях уровня активности КК и его изоферментного состава [7,8]. Именно эта способность КК лежит в основе широкого применения этого фермента в качестве биохимического маркера сердечно-сосудистых заболеваний, в первую очередь острого инфаркта миокарда, а также нейромышечных, опухолевых и других заболеваний [5,8,9].

Внутриутробная гипоксия одна из основных причин нарушения развития плода и, особенно, его нервной системы [12]. Многие заболевания матери, такие как поздний токсикоз, сопровождающийся гипертензией, сахарный диабет, резус-конфликт, вызывают развитие хронической внутриутробной гипоксии плода [1,10,12]. Адаптация к недостаточному снабжению кислородом ведет или к разрастанию плаценты и, таким образом, увеличению кровотока; и/или к изменению активности ферментативных систем плода и плаценты [1]. Последнее непосредственно отражается на

составе амниотической жидкости (АЖ), что является основанием для определения соответствующих биохимических тестов. Своевременное применение при осложненной беременности биохимических методов оценки фето-плацентарного комплекса помогает разработать меры по снижению перинатальной заболеваемости и смертности [12]. Предполагается, что активность ферментов в АЖ отражает особенности метаболизма в фето-плацентарном комплексе и в достаточной степени характеризует процессы внутриутробного развития плода [4].

В модельных опытах на кроликах, имитирующих ишемию плаценты и внутриутробную гипоксию плода, было показано возрастание активности КК в ряде органов плода, особенно в мозжечке, тогда как активность аденилаткиназы оставалась неизменной. Авторы пришли к выводу, что повышение уровня активности КК может рассматриваться как часть компенсаторных механизмов, направленных на преодоление снижения энергообеспечения в этих условиях, и служить метаболическим маркером кислородной недостаточности плода [6]. Учитывая ключевую роль КК в энергетическом обмене клетки, а также высокие адаптационные возможности фермента [5,6], мы решили изучить изменения уровня активности и изоферментного состава КК плаценты и АЖ при патологиях матери, ведущих к гипоксии плода, с тем чтобы выявить целесообразность использования креатинкиназного теста при определении внутриутробной гипоксии плода. Ранее нами были получены предварительные данные, касающиеся изменений КК в АЖ [3].

Материал и методы

Обследовано 25 женщин в возрасте от 25 до 40 лет. Из них 8 практически здоровых женщин с физиологическим течением беременности, закончившейся родами в 39–40 недель и рождением детей, оцененных по шкале Апгар в 9–10 баллов (контрольная группа).

Основную группу составили женщины с осложненной беременностью, ведущей к хронической внутриутробной гипоксии плода: 5 женщин, страдающих диабетом I типа, 7 – с поздним токсикозом, сопровождающимся гипертензией матери, и 5 – с гемолитической болезнью плода, обусловленной несовместимостью крови матери и плода по резус-фактору. Роды у всех женщин основной группы проходили через естественные родовые пути в сроки 38–41 неделя. Состояние новорожденных в этой группе было оценено по шкале Апгара в 5–8 баллов. Кровь после свертывания центрифугировали 10 мин при 3000 об/мин на холоду и отбирали сыворотку. В этом же режиме центрифугировали АЖ, которую отбирали до начала родовой деятельности. В опыт брали центральную часть плаценты, освобождали ее от кровеносных сосудов, тщательно отмывали от крови охлажденным 0.02% раствором ЭДТА pH 7.5, измельчали и гомогенизировали в 0.05M трис-HCl буфере pH 7.5, содержащем 5 ммоль/л ДТТ и 100 ммоль/л NaCl. Гомогенаты центрифугировали при 20000 об/мин в течение 20 мин, и полученные экстракты использовали для определения активности и изоферментного состава КК.

Активность фермента выражали в мкм креатина/г/мин для плаценты и в мкм креатина/л/мин для АЖ и сыворотки крови. Для разделения изоферментов КК использовали хроматографический метод Меркера с некоторыми модификациями [2]. Известно, что изоферменты КК в слабощелочной среде несут на себе различной величины отрицательный заряд. ВВ-изофермент, имеющий наибольший заряд, прочнее связывается с ДЕАЕ-целлюлозой, МВ – несколько слабее и ММ, имеющий наименьший заряд, – слабо. Ступенчатое увеличение концентрации NaCl в элюирующем буфере приводит к последовательной элюции изоферментов: сначала ММ, затем МВ и, наконец, ВВ.

Результаты и обсуждение

Для общего представления распределения активности и изоферментов КК в системе мать–плацента–амниотическая жидкость и определения контрольного уровня фермента в этой системе в предыдущей работе [3] мы получили данные, которые сведены в таблице. По нашим данным [2], контрольный уровень общей активности КК сыворотки крови для здоровых небеременных женщин колеблется от 20 до 50 мкм креатина/л/мин. Как видно из таблицы, величина активности сывороточной КК обследованных нами беременных женщин укладывается в пределы нормальных значений и, таким образом, можно утверждать, что состояние беременности при ее физиологическом течении не сказывается на уровне активности сывороточного фермента. То же касается изоферментного состава КК [2,5].

Таблица

Активность и изоферментный состав КК в системе мать–плацента–амниотическая жидкость при нормально протекающей беременности

Сыворотка крови матери	Плацента	Амниотическая жидкость
$30.8 \pm 1.8^{**}$	$1.53 \pm 0.12^*$	$0.36 \pm 0.04^{**}$
97% ММ, 3% МВ	100% ВВ	45% ММ, 30% МВ, 25% ВВ
(8)	(8)	(5)

* активность в мкм креатина/г/мин; ** активность в мкм креатина/л/мин

Активность КК плаценты значительно ниже, чем активность КК в скелетной мышце, сердце и мозге человека, и соизмерима с активностью фермента во внутренних органах человека [3,8]. Как и многие другие внутренние органы, плацента содержит исключительно ВВ-изофермент [3,8]. В АЖ обнаруживаются три изофермента КК, хотя их суммарная активность невелика – 0.36 мкм/л/мин. Доля каждого изофермента КК, выраженная в процентах от суммарной активности, составляет: ММ – $45 \pm 2.9\%$, МВ – $30 \pm 1.5\%$ и ВВ – $25 \pm 2.8\%$. Именно эти значения рассматриваются нами в дальнейшем в качестве контрольного уровня.

Основным патогенным влиянием на плод при поздних токсикозах беременных, сопровождающихся повышением артериального давления, является уменьшение маточно-плацентарного кровообращения, от интенсивности которого зависит поступление кислорода к плоду. Как известно, в этом случае адаптация к недостатку кислорода ведет к разрастанию плаценты и, таким образом, увеличению кровотока [1]. Действительно, у женщин этой группы размеры плаценты были крупнее, чем в контрольной группе, и уровень активности плацентарной КК и ее изоферментный состав почти не отличались от контрольных значений и составили 1.60 ± 0.32 мкм/г/мин, соответственно 100% ВВ-изофермента. На рисунке в виде диаграммы представлены данные по распределению изоферментов КК в АЖ в норме и в случае беременности, осложненной поздним токсикозом с повышением артериального давления, а также другими патологиями, ведущими к хронической внутриутробной гипоксии. Суммарная КК активность АЖ в указанной подгруппе равнялась 0.41 ± 0.05 мкм/л/мин и статистически достоверно превышала контрольный уровень на 14%. Более значи-

Значительные изменения были выявлены в распределении изоферментов КК АЖ. Как видно из рисунка (2), в случае позднего токсикоза при уменьшении доли

ММ- и МВ-изоферментов доля ВВ-изофермента возрастает более чем на 60%.

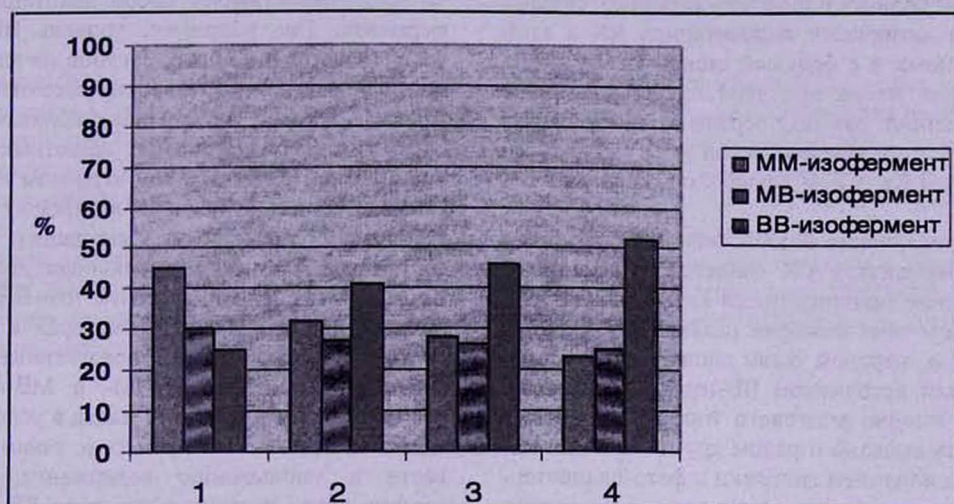


Рис. Распределение изоферментов КК в амниотической жидкости в норме (1) и при беременности, осложненной поздним токсикозом с гипертензией матери (2), сахарным диабетом I типа (3) и резус-конфликтом (4)

Известно, что у беременных, больных сахарным диабетом I типа, наблюдается ускоренный рост плода, поскольку до рождения гипофизарный гормон роста не оказывает существенного влияния на рост плода, эту функцию выполняет инсулин [1,11]. Являясь главным стимулятором роста плода, инсулин активирует липогенез и оказывает анаболическое влияние на белковый метаболизм. Снабжение кислородом не успевает за быстрым увеличением массы плода, несмотря на разрастание плаценты, и плод испытывает гипоксию. Таким образом, при сахарном диабете, так же как и в случае предыдущей патологии матери, адаптация к гипоксии плода осуществляется за счет увеличения размеров плаценты, соответственно этому КК активность плаценты, равная 1.59 ± 0.21 , и ее изоферментный состав – 100% ВВ-КК не отличаются от контрольных значений. Суммарная активность изоферментов КК в АЖ беременных этой подгруппы равнялась 0.43 ± 0.06 мкм/л/мин и превышала контрольный уровень на 20%. Как следует из диаграммы, при уменьшении доли ММ- и МВ-изоферментов доля ВВ-изофермента в случае беременности, осложненной сахарным диабетом, возрастает почти в 1.8 раза по сравнению с контрольным уровнем (рис., 3).

Гемолитическая болезнь плода (резус-конфликт) сопровождается развитием у плода анемической гипоксии различной степени тяжести [2,12]. В данном случае имеет место двукратное возрастание доли мозгового изофермента, активность которого в этом случае составляет 52% от суммарной активности изофер-

ментов КК АЖ против 25% в норме (рис., 4). При этом суммарная КК активность АЖ в этой группе беременных возрастает на 23% по сравнению с нормой и составляет 0.46 ± 0.04 мкм/л/мин. Представляет интерес тот факт, что КК активность плаценты указанной группы беременных, в отличие от рассмотренных выше случаев, возрастает по сравнению с контрольным уровнем на 42% и составляет 2.13 ± 0.26 мкм/л/мин. Это, по-видимому, тот случай, когда адаптация фетоплацентарного комплекса к гипоксии осуществляется за счет изменения активности плацентарных ферментов.

Обобщая приведенные выше данные, следует отметить 2 факта.

1. При изученных патологиях беременности адаптация плаценты к условиям гипоксии осуществляется как за счет разрастания плаценты, и тогда активность плацентарной КК не меняется – при позднем токсикозе и сахарном диабете, так и за счет изменения активности ферментных систем – при резус-конфликте, когда активность фермента возрастает примерно на 40%. Но и в этом случае вся КК активность плаценты принадлежит ВВ-изоферменту.

2. Исследованные заболевания беременных вызывают хотя и небольшое повышение суммарной активности КК АЖ (в пределах 14–23%), но значительное перераспределение изоферментов КК в сторону увеличения доли ВВ-изофермента (64–100%). Последнее, несомненно, может быть использовано в качестве метаболического маркера внутриутробной гипоксии

тельные изменения были выявлены в распределении плода. Наибольшее повышение суммарной КК активности и доли ВВ-изофермента в АЖ наблюдается при гемолитической болезни плода, что, вероятно, связано с повышением активности плацентарной КК в этой группе беременных и с большей степенью внутриутробной гипоксии плода при этой патологии. Такая корреляция лишней раз подтверждает диагностическую ценность определения активности и изоферментного состава КК АЖ в случаях осложненной беременности.

Причиной увеличения содержания КК, как и любого другого фермента, в АЖ является, по всей видимости, увеличение проницаемости клеток вследствие деструкции клеточных мембран различных тканей и, в первую очередь, нервной ткани плода, которая и является основным источником ВВ-изофермента. Увеличение доли именно мозгового изофермента КК в АЖ может быть вызвано и рядом других причин. Известно, что под влиянием гипоксии в фето-плацентарном комплексе матери возникают структурно-функциональные изменения на различных уровнях, сказывающиеся, в первую очередь, на ферментах энергетического обмена [1,12]. Одним из таких изменений может быть дерепрессия экспрессии ВВ-изофермента в плаценте и тканях плода. Анализ данных литературы свидетельствует о том, что при различных патологических процессах и других стрессо-

вых воздействиях на организм в клетках экспрессируется именно ВВ-изофермент КК, который в силу своей большей универсальности, чем другие изоферменты КК, представляет собой адаптационную форму фермента. Так, например, уровень ВВ-изофермента увеличивается в мышцах бегунов на длинные дистанции, а также при хронических сверхнагрузках в миокарде [8]. Такая же картина наблюдается в разных органах экспериментальных животных при острой и хронической интоксикации этанолом и ацетоном [8]. Наследственная мышечная дистрофия и ряд других заболеваний также ведут к смещению изоферментного спектра в сторону увеличения доли ВВ-КК [5]. Кроме того, следует отметить, что ВВ-изофермент – эмбриональная форма КК, которая в ходе развития плода человека в ряде органов постепенно замещается более специфическими ММ- и МВ-изоферментами [8]. Отставание в развитии плода в условиях гипоксии может замедлить этот процесс и, таким образом, привести к уменьшению содержания ММ- и МВ-изоферментов и увеличению доли ВВ-изофермента в тканях плода, что непосредственно отражается на составе АЖ.

Таким образом, активность и изоферментный состав КК АЖ отражают внутриутробное состояние плода и могут рассматриваться в качестве метаболического показателя внутриутробной гипоксии плода при осложненной беременности.

Поступила 23.06.04

Կրեատինինազի ВВ-իզոֆերմենտը որպես պտուղի ներարգանդային հիպոքսիայի կենսաքիմիական ցուցանիշ

Ս.Ա. Մկրտչյան, Լ.Ս. Ներսեսյան, Ժ.Ի. Հակոբյան

Ուսումնասիրվել են պլացենտար և ամնիոտիկ հեղուկի կրեատինինազի ակտիվությունը և իզոֆերմենտային սպեկտրը մայրական հիվանդություններով (մայրական հիպերտոնիկ հիվանդությամբ ուղեկցվող հղիության երկրորդ կեսի տոքսիկոզ, առաջին տիպի շաքարախտ, ռեգուս կոնֆլիկտ) բարդացած հղիությունների դեպքում, որոնց ընթացքում տեղի է ունենում պտղի խրոնիկական ներարգանդային հիպոքսիա:

Հղիության երկրորդ կեսի տոքսիկոզի և շաքարախտի դեպքում պլացենտար կրեատինինազի ակտիվությունը և իզոֆերմենտային սպեկտրը չեն փոփոխվում ստուգիչի համեմատ այն դեպքում, երբ ռեգուս կոնֆլիկտի ժամանակ պլացենտար կրեատինինազի ակ-

տիվությունը բարձրանում է 40%-ով՝ առանց իզոֆերմենտային սպեկտրի փոփոխության: Այդ փաստը, ամենայն հավանականությամբ, բացատրվում է ներարգանդային հիպոքսիայի նկատմամբ ֆետոպլացենտար համակարգի հարմարման տարբեր ձևերով:

Միևնույն ժամանակ, վերոհիշյալ հղիների ամնիոտիկ հեղուկում բացահայտվում է կրեատինինազի ակտիվության բարձրացում 14-23%-ով և իզոֆերմենտների վերաբաշխում՝ ուղղված դեպի ВВ-իզոֆերմենտի մակարդակի ավելացում 1.5-2 անգամ, ինչը կարող է օգտագործվել որպես պտղի հիպոքսիայի կենսաքիմիական ցուցանիշ:

BB-isoenzyme of creatine kinase – a biochemical marker of intrauterine hypoxia of fetus

S.A. Mkrtchyan, Z.S. Nersisova, Zh.I. Hakobyan

The activity and isoenzyme spectrum of placental and amniotic fluid creatine kinases have been examined during pregnancies, complicated by maternal diseases, which lead to chronic intrauterine hypoxia: toxicemia of the second half of pregnancy with hypertension, I type diabetes, and Rhesus-conflict.

During pregnancies complicated by maternal toxicemia and diabetes the placental creatine kinase activity and isoenzyme spectrum do not change compared to the control, while Rhesus-conflict leads to the placental enzyme

activity increase by about 40%, without isoenzyme spectrum changes. This may be explained by different forms of adaptation of feto-placental system to hypoxia.

At the same time, some increase in the common creatine kinase activity (by 14-28%) and essential isoenzyme redistribution increasing the share of BB-isoenzyme by 1.5-2 times have been observed in the amniotic fluid of pregnant women with above mentioned diseases, which may serve as a biochemical marker of intrauterine hypoxia.

Литература

1. Гармашева Н.Л., Константинова Н.Н. Введение в перинатальную медицину. М., 1985.
2. Нерсисова Л.С. Определение активности и изоферментного спектра креатинкиназы в сыворотке крови. Методические рекомендации, Ереван, 1987.
3. Нерсисова Л.С., Акопян Ж.И., Арутюнян А.В., Лыжлова С.Н. Мед. наука Армении, 2000, 40, 2, с. 56.
4. Цапок Г.И., Титова Е.Г. Акуш. и гинекол., 1985, 12, с. 21.
5. Burtic C.A., Ashwood E.P. 1994. Textbook of Clinical Chemistry. 2-nd ed., Philadelphia.
6. Kaye A.M., Kariv N., Binderman J. 1988. Vascular placental insufficiency in the rabbit. Changes in creatine kinase and adenilate kinase in fetal tissues. Biol. Neonate (Basel), 54, 2, 116-120.
7. Kaye A.M., Tae-Yeon Kim, Somjen D., Waisman A. 1999. Regulation of the creatine kinase B gene and its use as a marker of cell stimulation. [http://bioinfo.](http://bioinfo.weizmann.ac.il/~ls/alvin_kaye/alvin_kaye.html)
8. Lyslova S.N., Stefanov V.E. Phosphagen kinases. CRC Press, Boston, 1991.
9. Mair J. 1997. Progress in myocardial damage detection: new biochemical markers for clinicians, Crit.Rev. Clin.Lab.Sci.(USA), 34, 1, 1-66.
10. Papparella A., Berard P., Stonesereet B.S. Amer. J. Physiol., 1994, 266, 1, part 2, 250-257.
11. Pregnancy, complicated by maternal diabetes mellitus. 2004. http://www.centrus.com/Dipoloma_FMF/Series_FMF/dopler/capitolus.html/chapter_07.
12. Textbook of Child Neurology. 1995, Ed by Menkes J.H., 5th ed., Baltimor, Maryland.
13. Wallimann Th. Creatine kinase Oh! What a Protein. 2000, <http://attila.stevens-tech.edu/chembio/crodrick/ck.htm>.