

УДК:618.36:576.32/36+576.38

## ДИНАМИКА АКТИВНОСТИ $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ЗАВИСИМОЙ ЭНДУКЛЕАЗЫ В ПЛАЦЕНТЕ НА ПРОТЯЖЕНИИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ ПРОТЕКАЮЩЕЙ БЕРЕМЕННОСТИ

© 2004 г. А.В. Шестопалов, З.И. Микашинович, О.В. Борисенко, И.В. Корниенко, И.О. Крыжановская

To investigate possible apoptotic changes, the activity of  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -dependent endonuclease in human placenta was examined. We have revealed significant increase of endonuclease activity during first and second trimester of pregnancy and slight decrease of this parameter in term placenta.

Одним из этапов апоптотической гибели клетки является межнуклеосомное расщепление ДНК, ключевую роль в котором играет семейство  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -зависимых эндонуклеаз, локализованных в клеточном ядре [1, 2]. В процессе апоптоза происходит активация каспаз и, в частности, каспазы 3, далее идет расщепление ингибитора нуклеазы CAD/DFF 45 и активация эндонуклеаз, обеспечивающих деградацию ДНК [3]. В связи с этим активность  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -зависимой эндонуклеазы можно рассматривать как показатель потенциальной готовности клетки к апоптозу. В литературе имеется ряд работ, посвященных исследованию активности  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -зависимой эндонуклеазы при некоторых неопластических процессах, в том числе в репродуктивной системе [4], показано снижение этого показателя в эндометрии при раке [5]. Данные об активности  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -зависимой эндонуклеазы в плаценте на сегодняшний день отсутствовали, несмотря на интерес многих исследователей к молекулярным механизмам, лежащим в основе формирования этого уникального в своем роде органа [6]. Поэтому нами было предпринято исследование активности  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -зависимой эндонуклеазы в формирующейся плаценте в динамике физиологической беременности.

Объектом изучения явились ткани хориона из материала медицинских аборт в I триместре ( $n = 18$ ), плаценты практически здоровых женщин, беременность которых была прервана по социальным показаниям во II триместре ( $n = 12$ ) и доношенные плаценты ( $n = 10$ ). Активность  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -зависимой эндонуклеазы определяли по методу, описанному в [7, 8]. Расчет активности проводили согласно принципу, описанному [9].

Для определения эндонуклеазной активности окрашенный бромидом этидия гель сканировали с помощью системы Gel Doc 1000 и в программе QuantiScan на электрофореграмме выделяли три области, включающие фрагменты анализируемой ДНК, в среднем различающиеся по длине в 2,2 и 5,5 раз (менее 800, 800–1200, 1200–3200 п. н.). Этим областям были присвоены коэффициенты 5,5, 2,2 и 1 соответственно. Расчет производили по формуле:  $\text{ЭА} = (5,5(\text{X3} - \text{Y3}) + 2,2(\text{X2} - \text{Y2}) + (\text{X1} - \text{Y1})) / (\text{X4} - \text{Y4})$ , где ЭА – эндонуклеаз-

ная активность, X1, X2 и X3 – суммарная интенсивность свечения трех областей электрофореграммы исследуемого образца (1200–3200, 800–1200 и менее 800 п. н. соответственно); Y1, Y2 и Y3 – суммарная интенсивность свечения соответствующих им областей с интактной ДНК; X4 – суммарная интенсивность свечения ДНК во всем образце и Y4 – суммарная интенсивность фонового свечения.

При исследовании активности  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -зависимой эндонуклеазы в плаценте при физиологически протекающей беременности нами выявлена следующая динамика, представленная в таблице.

Нами установлено, что на протяжении первых двух триместров беременности активность  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -зависимой эндонуклеазы возрастает. На сроке 4 – 7 неделя гестации активность  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -зависимой эндонуклеазы чрезвычайно низка, составляя лишь 6,4% от таковой в 9 – 12 недели ( $P < 0,05$ ). В 7 – 9 неделях показатель активности  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -зависимой эндонуклеазы приближается к величинам, присущим концу I триместра, составляя 86,5% от соответствующего показателя в 9 – 12 недели. Во II триместре продолжается повышение активности  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -зависимой эндонуклеазы, и этот показатель увеличивается в 2,15 раза по сравнению с I триместром ( $P < 0,05$ ). В последующем отмечается снижение исследуемого показателя, однако он все равно несколько превышает соответствующее значение, присущее I триместру, хотя это различие статистически недостоверно.

### Активность $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -зависимой эндонуклеазы в плаценте в зависимости от срока гестации

Анализируемая группа	Активность $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -зависимой эндонуклеазы мЕД/г. белка, $M \pm m$	
4–7 недели беременности	$5,42 \pm 3,31$	$P_2 < 0,05, P_3 < 0,05, P_5 < 0,01$
7–9 недели беременности	$72,88 \pm 7,03$	$P_1 < 0,05, P_5 < 0,05$
9–12 недели беременности	$84,26 \pm 13,36$	$P_1 < 0,05, P_5 < 0,05$
В целом, I триместр	$56,39 \pm 9,52$	$P_5 < 0,05$
II триместр	$120,99 \pm 7,82$	$P_1 < 0,01, P_2 < 0,05, P_3 < 0,05, P_4 < 0,005, P_6 < 0,05$
III триместр, роды	$88,60 \pm 11,79$	$P_5 < 0,05$

Примечание.  $P_1$  – сравнение с 4 – 7 неделями беременности;  $P_2$  – сравнение с 7 – 9 неделями беременности;  $P_3$  – сравнение с 9 – 12 неделями беременности;  $P_4$  – сравнение с I триместром;  $P_5$  – сравнение со II триместром;  $P_6$  – сравнение с III триместром, родами.

Таким образом нами выявлено достоверное возрастание активности  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -зависимой эндонуклеазы на протяжении первых двух триместров беременности, связанное, по-видимому, с тем, что в процессе формирования плаценты происходит изменение соотношения пролиферации и апоптоза кле-

ток этого органа и апоптотические процессы приобретают большой удельный вес [10]. Пик активности  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -зависимой эндонуклеазы в плацентах II триместра беременности может быть отчасти обусловлен способом прерывания беременности, сопряженным с повреждением фетоплацентарных тканей и, вероятно, вытекающей отсюда активацией апоптотических процессов.

Остается труднообъяснимым факт снижения активности  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -зависимой эндонуклеазы в доношенных плацентах, полученных путем естественного родоразрешения, поскольку трудно представить, что в доношенной плаценте преобладают пролиферативные процессы, а родовая деятельность и отторжение плаценты не ассоциированы с активацией апоптотических процессов. В качестве гипотезы можно предположить, что в конце беременности процессы обновления клеток плаценты минимальны, в связи с чем процессы апоптоза и пролиферации сбалансированы на низком уровне. Кроме того, перед родами сложный и энергоемкий процесс апоптоза, вероятно, биологически нецелесообразен в связи с предстоящим отторжением плаценты целиком.

Таким образом, нами установлена физиологическая динамика активности  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -зависимой эндонуклеазы в плаценте в зависимости от срока беременности, проявляющаяся в возрастании  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -зависимой эндонуклеазной активности ядерных экстрактов плаценты с увеличением гестационного срока на протяжении первых двух триместров беременности, что свидетельствует о повышении потенциальной способности клеток плаценты вступать в апоптоз по мере ее формирования.

## Литература

1. Липская Л.А. // Цитология. 1994. Т. 36. № 3. С. 303–309.
2. Волгина В.В. Характеристика представленности, внутриядерной локализации и органоспецифических изменений  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -зависимой эндонуклеазы лимфоцитов с помощью биохимических и иммунохимических подходов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1990.
3. Барышников А.Ю., Шишкин Ю.В. Иммунологические проблемы апоптоза. М., 2002.
4. Кулаков В.И., Сухих Г.Т., Гатаулина Р.Г. // Пробл. репродукции. 1999. № 2. С. 15–26.
5. Дементьева М.М. Оценка показателей апоптоза при гиперпластических процессах и раке эндометрия: Автореф дис. ... канд. мед. наук. М., 1999.
6. Levy R., Nelson D.M. // Placenta. 2000. Vol. 21. P. 1–13.
7. Баснакьян А.Г., Бубнов Н.В., Вотрин И.И. // Биохимия. 1989. Т. 54. Вып. 2. С. 273–283.

8. Кожура В.Л. и др. // Бюллетень эксперим. биол. и медицины. 1991. Т. 112. № 12. С. 583–585.
9. Жданов А. В. и др. // Клини. лаб. диагностика. 2000. № 11. С. 33–37.
10. Halperin R. et al. // Gynecol. Obstet. Invest. 2000. Vol. 50. P. 84–87.

Ростовский государственный медицинский университет  
124 Центральная лаборатория медико-криминалистической  
идентификации МО РФ

9 января 2004 г.