

БЕЛКИ-МАРКЕРЫ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ НАРУШЕНИЙ ПРИ ОСЛОЖНЕННОЙ ГЕСТАЦИИ

Погорелова Т.Н.¹, Куценко И.И.², Бутова О.А.³, Гунько В.О.¹, Никашина А.А.¹, Аллилуев И.А.¹

¹ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский институт акушерства и педиатрии» Минздрава России, Ростов-на-Дону, e-mail: tnr.rniiap@yandex.ru;

²ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Краснодар, e-mail: kucenkoi@mail.ru;

³ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет», Ставрополь, e-mail: olga_butova@mail.ru

Изучен протеомный профиль плаценты при физиологической беременности, плацентарной недостаточности и преэклампсии. Исследования, проведенные с помощью двумерного электрофореза и времяпролетной масс-спектрометрии, позволили выявить и идентифицировать белки с различными регуляторными свойствами, интенсивность продукции которых при осложненной беременности значительно отличается от аналогичных показателей при физиологической беременности. Сравнительный анализ протеомных спектров при изученных акушерских патологиях обнаружил межгрупповые различия в составе белков плаценты. При плацентарной недостаточности имеет место снижение экспрессии или даже отсутствие белков, участвующих в энергетическом, окислительно-восстановительном обменах, процессах межклеточного транспорта, клеточной трансдукции, пролиферации, а также выполняющих роль шаперонов. Развитие преэклампсии сопровождается нарушением продукции белков, ответственных за миграцию клеток, цитокинез, процессы трансляции, апоптоза, накопления активных форм кислорода. Выявленные белки отличия могут служить информативными специфическими маркерами клеточных повреждений при конкретных видах осложнений беременности, а нарушение их продукции, несомненно, играет патогенетическую роль в развитии акушерской патологии.

Ключевые слова: осложненная гестация, белки плаценты, плацентарная недостаточность, преэклампсия.

PROTEIN MARKERS OF METABOLIC AND FUNCTIONAL DISORDERS IN COMPLICATED GESTATION

Pogorelova T.N.¹, Kutsenko I.I.², Butova O.A.³, Gunko V.O.¹, Nikashina A.A.¹, Alliluev I.A.¹

¹FSBI "Rostov Scientific-Research Institute of Obstetrics and Pediatrics" of the Ministry of Health of Russia, Rostov-on-Don, e-mail: biochem@rniiap.ru;

²FGBOY VO "Kuban State Medical University" of The Ministry of Health of Russian Federation, Krasnodar, e-mail: kucenkoi@mail.ru;

³FGAOY VO "North Caucasus Federal University" Stavropol, e-mail: olga_butova@mail.ru

Proteomic profile of the placenta was studied the during normal pregnancy, placental insufficiency and preeclampsia. Studies conducted using two-dimensional electrophoresis, and time of flight mass spectrometry, allowed to reveal and identify proteins with different regulatory properties, the intensity of the production of which in complicated pregnancy is significantly different from the respective figures in physiological pregnancy. Comparative proteomic's analysis of the spectra in the study of obstetric pathologies found between-group differences in the composition of placental proteins. In placental insufficiency occurs down-regulation or absence of proteins involved in energy, redox exchanges, intercellular transport processes, cell transduction, proliferation, and also serve as a chaperone. The development of preeclampsia is accompanied by distortion of the production of proteins responsible for cell migration, cytokinesis, the processes of translation, apoptosis, accumulation of reactive oxygen species. Identified proteins differences can be informative, specific markers of cellular damage certain pregnancy complications, and a distortion of their products, carries a pathogenic role in the development of obstetric pathology.

Keywords: complicated gestation, placental proteins, placental insufficiency, preeclampsia.

В настоящее время не вызывает сомнения, что для наиболее успешного решения современных вопросов, связанных с проблемами репродуктивной медицины, в том числе в области акушерства и перинатологии, необходимо привлечение высокотехнологичных

методических подходов молекулярной биологии, в частности, постгеномных технологий. К таким технологиям относятся протеомные исследования, дающие представления о совокупности белков исследуемого объекта (протеоме) и позволяющие выяснить ранее неизвестные механизмы развития патологического процесса, а также создают качественно новые возможности для системных поисков его диагностических маркеров.

На протяжении последних десятилетий среди осложнений гестации, приводящих к перинатальной заболеваемости и смертности, важное место занимает плацентарная недостаточность (ПН) и преэклампсия. Однако, несмотря на большое число проведенных исследований, их патогенез остается недостаточно изученным [1,2]. В то же время именно модификация экспрессии таких полифункциональных молекул, как белки, играющие ключевую роль во всех клеточных процессах, может служить иницилирующим фактором в сложной цепи нарушений, приводящих к развитию этих осложнений.

Поскольку развитие беременности связано с глубокими функциональными и метаболическими преобразованиями не только в организмах матери и плода, но и в плаценте, осуществляющей тесную взаимосвязь между ними, изучение последней может дать чрезвычайно ценную информацию о механизмах формирования акушерской патологии. Однако данные о протеомном составе плаценты при указанных акушерских патологиях неоднозначны.

В связи с вышеизложенным **целью** настоящей работы явилось изучение протеомного спектра плаценты при физиологической беременности, плацентарной недостаточности и преэклампсии.

Материал и методы исследования

В исследование были включены 53 женщины в возрасте от 23 до 32 лет (в среднем $25,2 \pm 0,4$ года), составившие 3 группы. В 1-ю (контрольную) группу вошли 15 женщин с неосложненным течением беременности и родов, во 2-ю – 18 женщин с ПН, у 20 пациенток беременность осложнилась преэклампсией. Степень преэклампсии оценивали по международной классификации МКБ-10. По уровню артериального давления и протеинурии, наличию и степени отеков степень преэклампсии соответствовала коду O14.0 – преэклампсия (нефропатия) средней тяжести.

В 1-й группе 8 женщин были первобеременными и первородящими, у 7 имели место два и более прерывания беременности по желанию женщины. У 3 пациенток в анамнезе наблюдались воспалительные заболевания органов малого таза. Во 2-й группе были 8 первобеременных и первородящих, у 10 повторнобеременных и повторнородящих женщин имели место два и более прерывания беременности по желанию женщины. У 5 женщин в анамнезе отмечены воспалительные заболевания малого таза. В 3-й группе было 9

первобеременных и первородящих пациенток и 11 – повторнобеременных и повторнородящих. У 6 женщин отмечены воспалительные заболевания органов малого таза. По показаниям к оперативному родоразрешению со стороны плода у трех беременных с преэклампсией было произведено кесарево сечение. Самопроизвольные выкидыши у женщин обследованных групп отсутствовали. По возрасту, соматическому и акушерско-гинекологическому анамнезу пациентки были сопоставимы.

Материалом исследования служили плаценты, взятые сразу после родов при соблюдении холодового режима. Протеомные карты плацентарной ткани получали с помощью двумерного электрофореза в полиакриламидном геле (приборы Protein IEF Cell и Protean II xi Multi-Cell («Bio-Rad», США). После завершения электрофореза для визуализации белковых пятен в гелях фореграммы окрашивали азотнокислым серебром, сканировали и анализировали с использованием пакета программ PDQuest («Bio-Rad», США). Идентификацию белков после вырезания пятен из геля и процедуры трипсинолиза проводили методом времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF-MS) на масс-спектрометре Autoflex II («Bruker», Германия) с использованием программы Mascot MS Search (Matrix Science, Великобритания) и баз данных NCBI и Swiss-Prot.

Статистическую обработку данных протеомного анализа осуществляли с использованием лицензионного пакета программ Statistica (версия 6.0. фирмы StatSoft. Inc.). Достоверность различий между сравниваемыми группами для каждого белка отличия определяли с помощью χ^2 -критерия. Результаты оценивали как статистически значимые при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Данные, полученные с помощью двухмерного электрофореза, свидетельствовали о том, что плацентарная ткань характеризовалась широким спектром белков (до 250 фракций) с границами молекулярных масс от 15 до 115 кДа и диапазоном изоэлектрических точек от 3,0 до 10,0. Масс-спектрометрический анализ позволил идентифицировать белки с различными свойствами, обеспечивающими возможность многосторонней регуляции функционирования плаценты. Результаты исследования представлены в виде таблиц, включающих идентифицированные белки отличия, характерные преимущественно для одной из обследованных групп женщин, с указанием их молекулярных масс, изоэлектрических точек и номеров в базе данных Swiss-Prot (табл. 1, 2).

Таблица 1

Белки плаценты, идентифицированные при физиологически протекающей беременности и плацентарной недостаточности

№ №	Название белка	№ в базе Swiss-Prot	Мм, кДа	pI	Физ. бер.	ПН	p
1.	α-актинин-4 (alpha-actinin-4)	Q43707	105,4	5,2	–	+	<0,005
2.	Виментин (Vimentin)	P08670	53,7	4,4	–	+	<0,005
3.	Ингибитор диссоциации Rab (Rab GDP dissociation inhibitor β)	P50395	50,6	6,1	+	–	<0,005
4.	Цитратсинтаза митохондриальная (Citrate synthase, mitochondrial)	O75390	38,0	7,0	+	–	<0,005
5.	Кислый рибосомальный белок 60S (60S acidic ribosomal protein P0)	P05388	34,2	5,6	+	–	<0,005
6.	Тропомиозин β (Tropomyosin beta)	P07951	32,8	5,1	–	+	<0,005
7.	Актин-подобный белок 2 (actin-related protein subunit 2)	P61160	31,7	5,2	+	–	<0,005
8.	Диенол-КоА-изомераза митохондрий (δ(3.5)-δ(2.4)-Enoyl-CoA-isomerase, mitochondrial)	Q13011	30,1	6,9	+	–	<0,005
9.	Прохибитин (Prohibitin)	P35232	29,8	5,1	+	–	<0,005
10.	Эндоплазматический ретикулярный белок ERp29 (Endoplasmic reticulum protein ERp29)	P30040	29,0	5,2	+	–	<0,005
11.	Аннексин А2 (Annexin A2)	P07355	28,0	7,0	+	–	<0,005

Примечание. Здесь и далее: «+» – присутствие белка, «–» – отсутствие белка.

Сопоставление белкового состава плаценты при нормальной и осложненной беременности выявило различную частоту обнаружения ряда белков. При ПН среди белков, экспрессия которых была резко снижена или полностью отсутствовала при патологически протекающей гестации, большое значение в регуляторных процессах имеют следующие: шапероны ERp 29 и прохибитин, ингибитор диссоциации Rab, актин-2, аннексин А₂, митохондриальные цитратсинтаза и диеноил-КоА-изомераза, кислый рибосомальный белок 60S. Значительное уменьшение при ПН содержания указанных белков, участвующих в энергетическом обмене, окислительно-восстановительных реакциях, процессах межклеточного транспорта, может изменить метаболическую полноценность плаценты и гомеостаз во всей системе мать-плацента-плод.

Так, многофункциональный белок прохибитин, расположенный, преимущественно, на внутренней мембране митохондрий – шаперон этих субклеточных фракций, где он

регулирует клеточный цикл. Кроме того, являясь потенциальным опухолевым супрессором, этот белок действует как мощный транскрипционный модулятор α -рецептора эстрогена, что особенно важно для плацентарной ткани [3].

Таблица 2

Белки плаценты, идентифицированные при физиологически протекающей беременности и преэклампсии

№ №	Название белка	№ в базе Swiss-Prot	Mm, кДа	pI	Физ. бер.	Пре эклампсия	p
1.	Эндоплазмин (Endoplasmin)	P14625	92,4	4,9	–	+	<0,005
2.	Аконитаза митохондриальная (Aconitate hydratase, mitochondrial)	Q99798	85,4	7,9	–	+	<0,005
3.	Митохондриальный белок теплового шока 60кД (60 kDa heat shock protein, mitochondrial)	P10809	61,0	4,8	–	+	<0,005
4.	Актин цитоплазматический-1 (Actin cytoplasmic 1)	P60709	41,7	5,2	+	–	<0,005
5.	Аннексин А4 (Annexin A4)	P09525	32,9	5,4	+	–	<0,005
6.	Тропомиозин α (Tropomyosin alpha)	P09493	32,7	4,2	+	–	<0,005
7.	Пероксиредоксин-4 (Peroxiredoxin-4)	Q13162	30,8	5,2	–	+	<0,005
8.	Белок 14-3-3 эпсилон (14-3-3 protein ϵ)	P62258	29,2	5,8	–	+	<0,005
9.	Субъединица 2 комплекса актин-подобного белка 2/3 (actin-related protein 2/3 complex subunit 2)	O15144	28,3	6,9	+	–	<0,005
10.	α субъединица 6 типа протеосомы (Proteasome subunit α type 6)	P60900	27,4	6,4	+	–	<0,005

Примечание. Здесь и далее: «+» – присутствие белка, «–» – отсутствие белка.

Отсутствие прохибитина приводит также к повышению чувствительности к стимулам, вызывающим апоптоз и увеличение генерации активных форм кислорода, что сопровождается внутриклеточной гипоксией и развитием окислительного стресса, характерного для развития ПН. Уменьшение продукции при ПН еще двух белков, связанных с митохондриальными структурами – цитратсинтазы и диенол-КоА-изомеразы, ухудшает функционирование этих важных субклеточных органелл и приводит к уменьшению генерации энергии в клетках плаценты.

Важное значение в развитии ПН, по-видимому, играет снижение содержания эндоплазматического ретикулярного белка ERp29, который служит ключевым фактором в фолдинге эндогенных секреторных белков [9]. Уменьшение продукции данного белка модифицирует функции протеасом и степень клеточной пролиферации.

К числу белков, экспрессия которых практически отсутствует или значительно снижена при ПН, относится аннексин А2 – представитель группы аннексинов, локализованный как на плазматической мембране, так и в цитоплазме, и контролирующей связи между ними, что позволяет ему регулировать внутри- и межклеточный транспорт биосубстратов. Известна и роль этого белка в формировании цитоскелета [5]. Падение продукции в плаценте при ПН установлено также для кислого рибосомального белка 60S, который участвует в контроле над процессами трансляции. Приведенные функции вышеуказанных белков отличия подтверждают возможность развития гомеостатического дисбаланса при их значительном снижении или отсутствии.

Наряду с отсутствием ряда белков при ПН установлено появление дополнительных полипептидов. К их числу относится α -актинин-4. Этот цитоскелетный белок опосредованно участвует в передаче клеточных сигналов из цитоплазмы в ядро, способствуя увеличению экспрессии генов, усиливающих апоптоз (4). Повышенно экспрессируются при ПН белки цитоскелета – виментин и β -тропомиозин. Виментин представляет собой белок, отвечающий за сохранность структуры клетки, участвующий во взаимодействиях различных систем цитоскелета и мембранном транспорте. β -тропомиозин в комплексе с другими белками также принимает участие в формировании структуры и функционировании цитоскелета. Поэтому увеличение их продукции может иметь компенсаторное значение. Однако усиление экспрессии этих протеинов не компенсирует отрицательные последствия подавления продукции большого количества мультифункциональных белков, что создает условия для развития ПН и перинатальных осложнений.

Протеомный анализ плаценты при беременности, осложнившейся преэклампсией, в отличие от физиологической беременности, выявил отсутствие пяти белков. В их числе следует отметить цитоплазматический актин 1, субъединицу 2 комплекса Arp 2/3 (actin-related protein – актин-подобный белок), которая, соединяясь с другими структурными полипептидами, составляет центральное звено в передаче ряда внеклеточных сигналов, в том числе сигнала, вызывающего ядерную полимеризацию актина [8]. В свою очередь, поскольку немышечные изоформы актина находятся в цитоплазматических структурах в виде микрофиламентов, участвующих в переносе внешнего сигнала с поверхности клетки в ядро, то уменьшение их продукции приводит к нарушению внутриклеточного транспорта.

Определенный вклад в указанные процессы вносит снижение содержания α -тропомиозина. Он способен связываться с актиновыми филаментами, обеспечивая тем самым миграцию клеток и цитокинез [6]. Еще два белка, экспрессия которых уменьшается при преэклампсии – α субъединица 6 типа протеосомы, ответственная за интенсивность катаболической фазы плацентарного метаболизма и аннексин А4. Последний, подобно аннексину А2, снижающемуся при ПН, участвует в трансмембранных переходах и моделировании цитоскелета [7].

Развитие преэклампсии сопровождается также появлением дополнительных белков отличия. Повышение экспрессии митохондриальной аконитатгидратазы и пероксиредоксина-4, очевидно, играет значительную роль в изменении свободнорадикальных процессов и редокс-статуса плаценты, что является важной составляющей развития окислительного стресса, отмеченного при прогрессировании преэклампсии. Появление белка 14-3-3 эпсилон приводит к усилению апоптоза путем влияния на активность трансформирующего фактора роста- β и фактора некроза опухоли- α [10]. Установленная повышенная продукция митохондриального белка теплового шока 60кД и эндоплазмينا, контролирующих процессы ремоделирования нативного состояния белков, может в какой-то степени иметь компенсаторный характер в поддержании корректного фолдинга ряда регуляторных белков.

Выводы

Резюмируя полученные данные, можно заключить, что развитие осложнений беременности происходит на фоне изменения плацентарной продукции ряда регуляторных белков, ответственных за дифференцировку, пролиферацию клеток, апоптоз, редокс-статус, обладающих антиоксидантными свойствами, функциями шаперонов и трансдукторов клеточной сигнализации. Сравнительный анализ результатов исследования при ПН и преэклампсии выявил определенные отличия в протеомном спектре плаценты при этих акушерских патологиях. Поскольку именно белки осуществляют информационную программу клеток, полученные данные позволяют расширить наши представления о молекулярных механизмах развития ПН и преэклампсии, а идентифицированные белки отличия могут служить объективными диагностическими маркерами этих акушерских патологий.

Список литературы

1. Погорелова Т.Н. Метаболизм плаценты и молекулярные механизмы его регуляции / Т.Н. Погорелова, В.А. Линде. – М.: Lap Lambert Academic Publishing, 2012. – 200 с.

2. Сидорова И.С. Современный взгляд на проблему преэклампсии: аргументы и факты / И.С. Сидорова, Н.А. Никитина // *Акушерство и гинекология*. – 2013. – № 5. – С. 10-16.
3. Artal-Sanz M. Prohibitin and mitochondrial biology / M. Artal-Sanz, N. Tavernarakis // *Trends. Endocrinol. Metabol.* – 2009. – Vol. 20, № 8. – P. 394-401.
4. Jeon Y.J. Annexin A4 interacts with the NF-kappaB p50 subunit and modulates NF-kappaB transcriptional activity in a Ca^{2+} -dependent manner / Y.J. Jeon, D.H. Kim, H. Jung et al. // *Cell. Mol. Life. Sci.* – 2010. – Vol. 67, № 13. – P. 2271-2281.
5. Leffler J. Annexin-II, DNA, and histones serve as factor H ligands on the surface of apoptotic cells / J. Leffler, A.P. Herbert, E. Norström et al. // *J. Biol. Chem.* – 2010. – Vol. 285, № 6. – P. 3766-3776.
6. Lin J.J. Human tropomyosin isoforms in the regulation of cytoskeleton functions / J.J. Lin, R.D. Eppinga, K.S. Warren et al. // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2008. – Vol. 644. – P. 201-222.
7. Piljic A. Annexin A4 self-association modulates general membrane protein mobility in living cells / A. Piljic, C. Schultz // *Mol. Biol. Cell.* – 2006. – Vol. 17, № 7. – P. 3318-3328.
8. Rotty J.D. New insights into the regulation and cellular functions of the ARP2/3 complex / J. D. Rotty, C. Wu, J. E. Bear // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* – 2013. – Vol. 14, № 1. – P. 7-12.
9. Shnyder S.D. ERp29 is a ubiquitous resident of the endoplasmic reticulum with a distinct role in secretory protein production / S.D. Shnyder, M.J. Hubbard // *J. Histochem Cytochem.* – 2002. – Vol. 50, № 4. – P. 557-566.
10. Zuo S. 14-3-3 epsilon dynamically interacts with key components of mitogen-activated protein kinase signal module for selective modulation of the TNF-alpha-induced time course-dependent NF-kappaB activity / S. Zuo, Y. Xue, S. Tang et al. // *J. Proteome Res.* – 2010. – Vol. 9, № 7. – P. 3465-3478.