УДК 611-018.1:612.015.348:618.3]616.523-036.65

ЦИТОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БЕЛКОВОГО ОБМЕНА В ЦИТОЗОЛЕ СИНЦИТИОТРОФОБЛАСТА ВОРСИНОК ПЛАЦЕНТЫ У БЕРЕМЕННЫХ, ПЕРЕНЕСШИХ В ПЕРИОД ГЕСТАЦИИ ОБОСТРЕНИЕ ГЕРПЕС-ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Луценко М.Т.

ФГБУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» СО РАМН, Благовещенск, e-mail: lucencomt@mail.ru

Герпес-вирусная инфекция в период беременности вызывает нарушение белкового обмена в синцитиотрофобласте ворсинок плаценты путем разрушения связей в цитозоле между РНК и белками. Было установлено, что в цитозоле синцитиотрофобласта ворсинок плаценты женщин, не болевших в течение периода гестации, определяется на единицу площади 135.5 ± 0.01 усл. ед. РНК. У беременных с обострением герпесвирусной инфекции количество РНК на единицу площади цитозоля снижалось до 94.66 ± 0.9 усл. ед. Причины снижения РНК в цитозоле синцитиотрофобласта зависят от нарушения плотности связи РНК с белками цитозоля. Эту связь можно разорвать путем воздействия на синцитиотрофобласт 0.5 М раствором NaCl при температуре 60 °C в течение 120 мин. Таким образом, методом экстракции можно установить, что герпесвирусная инфекция наносит большое повреждение синтезу и строению белка в синцитиотрофобласте плаценты, нарушая связь РНК с белками цитозоля.

Ключевые слова: беременность, герпес, РНК

THE CYTOLOGIC CHARACTERISTIC PROTEINS EXCHANGE IN CYTOSOL CYNCYTHIOTROPHOBLASTS VILLUS OF THE PLACENTA AT THE PREGNANT WOMEN WHO TRANSFERRED IN PERIOD GESTATION THE AGGRAVATION HERPES-VIRUS INFECTION

Lutsenko M.T.

Institution of the Russian Academy of Medical Sciences Far Eastern Research Center for physiology and respiratory pathology of SB RAMS, Blagoveshensk, e-mail: lucencomt@mail.ru

Herpes-virus the infection during the period pregnancy causes infringement proteins exchange in cytosol cyncythiotrophoblast villus placente destroying connection RNA with villus cytosol. It has established, that in cytosol cyncythiotrophoblast villus placental of pregnant women not was ill during gestation on unit it is the area 135.5 ± 0.01 unit RNA. At pregnant women with aggravation of a herpes-virus infection quantity RNA on unit the areas cytosol it reduced to 94.66 ± 0.9 by a unit. The reduction RNA in cyncythiotrophoblast depend on infringement of density of connection RNA with protein cytosol. This connection can be broken off by influence on cyncythiotrophoblast 0.5 M solution NaCl at temperature 60 °C within 120 minutes. Thus a method extraction it is possible to establish, that the herpes-virus infection to render the big damage to syntheses and a structure of protein in cyncythiotrophoblast placente breaking connection RNA with protein cytosol.

Keywords: pregnant, herpes, RNA

Рибонуклеиновые кислоты (РНК) – фосфосодержащие биополимеры, имеющие универсальное распространение в живой клетке. Носителем наследственной информации в большинстве случаев служат молекулы ДНК, однако РНК также может выполнять аналогичную роль. РНК синтезируется комплементарно на молекуле ДНК в виде молекул-предшественников (пре-РНК). Пре-РНК имеют больший молекулярный вес, чем функционально активные молекулы. Эти молекулы-предшественники проходят многостадийный процесс созревания — так называемый посттранскрипционный процессинг.

Функция РНК в клетке сложна и многообразна. В соответствии с функциональным назначением и структурными особенностями в любой клетке различают три основные типа РНК: рибосомальные РНК (рРНК), транспортные РНК (тРНК) и информационные РНК (иРНК) [1, 2].

Рибосомальная РНК характеризуется метаболической стабильностью, а по весу рРНК составляет от 50 до 65% всего материала рибосом. Роль рРНК связана с белоксинтезирующей функцией клетки. Синтез белка рРНК в клетках происходит в ядре и осуществляется при участии фермента РНК-полимеразы I. Рибосомальные гены сгруппированы в виде тандемных повторов и локализованы в одной или нескольких хромосомах. Эти участки генома являются составной частью нуклеопротеида, образующего ядрышки, в пределах которых и синтезируется рРНК. Синтез рРНК – многостадийный процесс, в котором представлены метилирование, изомеризация и так далее.

Транспортная РНК составляет приблизительно 15% от общего количества клеточных РНК. В транспортной РНК содержится много минорных нуклеотидов. Структура тРНК отличается большой консервативностью, что, по-видимому, связано с высокой степенью ее функциональной специализации. Этот класс молекул в ходе биосинтеза белков выполняет по отношению к аминокислотам функцию адаптеров, которые с помощью высокоспециализированных ферментов – аминоацил-тРНК-синтаз – присоединяют к себе ту или иную аминокислоту и переносят ее на рибосому. В ходе синтеза полипептида на рибосоме, тРНК узнает специфическую аминоацил-тРНК-синтазу, от которой она принимает соответствующую активированную аминокислоту, присоединяется к кодону иРНК на рибосоме и, тем самым, обеспечивает строгую специфичность выбора и встраивания аминокислоты в аминокислотную последовательность растущего полипептида; после образования пептидной связи тРНК удерживает на рибосоме растущую полипептидную цепь.

Информационная (матричная) РНК составляет незначительную часть общей массы клеточной РНК – 5–10%. Фракция иРНК отличается высокой гетерогенностью. В отличие от тРНК и рРНК, отличающихся устойчивостью, иРНК является короткоживущей. Значительная часть цитоплазматической иРНК животной клетки локализуется в виде полирибосом. Определение нуклеотидных последовательностей индивидуальных иРНК представляет большой интерес. Это, в частности, путь идентификации мутагенных генов и расшифровки молекулярных механизмов, лежащих в основе синтеза аномальных белков и генетических дефектов при различных формах наследственной патологии человека. К этим процессам можно отнести злокачественные новообразования, нарушение дифференцировки клеток, нарушения синтеза гормонов, нарушения синтеза белка в цитоплазме, приводящее к преждевременной смерти клетки.

Цель исследования — проанализировать влияние герпес-вирусной инфекции на связь РНК с белками цитозоля в синцитиотрофобласте ворсинок плаценты рожениц, перенесших в третьем триместре гестации обострение герпес-вирусной инфекции (титр антител к вирусу — 1:12800).

Материалы и методы исследования

Исследования проводились на базе стационара акушерско-гинекологического отделения Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания СО РАМН. Материалом служила плацента от 20 рожениц, перенесших в третьем триместре, на 34—35 неделях гестации обострение герпес-вирусной инфекции с титром антител к вирусу герпеса — 1:12800. Контролем послужили плаценты от 20 рожениц, не болевших в течение гестации.

Материал заливался в парафин. Срезы после депарафинизации окрашивались. Срезы помещали на 48 часов при комнатной температуре в раствор галлоцианина при рН 1,64N. После инкубации ополаскивали в дистиллированной воде, обезвоживали и заключали в бальзам.

Связь белков цитозоля с РНК выполняли по методу экстракции на срезах РНК при температуре 60 °C в 0,5 М растворе NaCl в течение 2 часов, с последующей окраской галлоцианином. Количественное содержание РНК в цитозоле синцитиотрофобласта ворсинок плаценты определялось компьютерной цитофотометрией. Величина зонда — 0,1×0,1. Статическая обработка проводилась по методу Стьюдента-Фишера.

Обследование пациенток выполнялось с соблюдением всех этических принципов проведения научных медицинских исследований с участием человека, в соответствии с рекомендациями Хельсинской декларации Всемирной ассоциации (с поправками 2000 г.) и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266.

Результаты исследования и их обсуждение

В ходе исследования цитофотометрическим методом содержания в синцитиотрофобласте плаценты РНК было установлено, что в цитозоле синцитиотрофобласта ворсинок плаценты рожениц, не болевших в течение всего периода гестации, на единицу площади приходится $135,5\pm0,01$ усл. ед. РНК. Как показывают цитофотометрические данные, РНК равномерно располагается по всему цитозолю (рис. 1).

Если роженица перенесла в третьем триместре гестации, на 34–35 неделе беременности обострение герпес-вирусной инфекции, цитологические и цитофотометрические исследования показывают резкое снижение в цитозоле синцитиотрофобласта ворсинок содержания РНК. Это подтверждается как микроскопическим (рис. 2), так и компьютерным цитофотометрическим анализами, при которых содержание РНК на единицу площади цитозоля синцитиотрофобласта снижается до $94,66 \pm 0,9$ усл. ед., по сравнению с контролем; p(t) < 0,05, p(F) < 0,05.

Причины снижения РНК в цитозоле синцитиотрофобласта, как видимо, зависят от нарушения плотности связи РНК с белками цитозоля. Эту связь можно разорвать путем воздействия на синцитиотрофобласт 0,5 М раствором NaCl при температуре 60°C в течение 120 мин.

Воздействуя 0,5 М раствором NaCl при $60\,^{\circ}$ C на срезы плаценты в течение 120 мин., мы отмечаем, что в цитозоле синцитиотрофобласта здоровых рожениц после экстракции PHK количество PHK на единицу площади составляло $135,5\pm0,01$ усл. ед. В том случае, когда в третьем триместре гестации беременная на 34-35 неделях беременно-

сти перенесла обострение герпес-вирусной инфекции, связь РНК с белками цитозоля резко нарушалась и после экстракции РНК 0,5 М раствором NaCl из синцитиотрофобласта количество его на единицу площади снижалось до 94,66 ± 0,9 усл. ед. Та-

ким образом, методом экстракции можно установить, что герпес-вирусная инфекция наносит большие повреждения синтезу и строению белка в синцитиотрофобласте плаценты, разрывая молекулярные связи РНК с белками цитозоля.

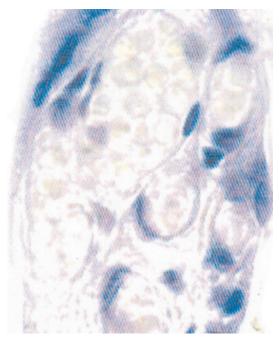


Рис. 1. Синцитиотрофобласт ворсинок плаценты роженицы, перенесшей на 35 неделе гестации обострение герпес-вирусной инфекции. Резкое снижение содержания в цитозоле РНК. Окраска галлоцианином. Увеличение 15×40

Синтез всех РНК клетки находится под контролем ДНК, которая определяет объем белкового синтеза через рибосомальную РНК. Некоторые молекулы РНК функционируют как катализаторы [4]. Было установлено, что синтезированная интронная последовательность длиной в 400 нуклеотидов сворачивается с образованием структуры, способной функционировать как фермент в реакциях с другими молекулами РНК.

С участка одной из цепей ДНК снимается комплементарная копия — матричная РНК. Затем нуклеотиды матричной РНК последовательно — триплет за триплетом — связывают комплементарные нуклеотиды антикодоновой петли определенных молекул тРНК.

К противоположному концу каждой молекулы транспортной РНК прикреплена специфически аминокислота, и после спаривания эта аминокислота присоединяется к концу растущей белковой цепи. Таким образом, перевод последовательности нуклеотидов тРНК в последовательность аминокислот белка основан на комплементарном

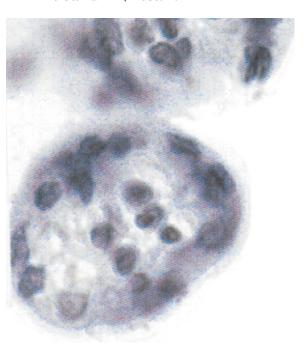


Рис. 2. Синцитиотрофобласт ворсинок плаценты роженицы, не болевшей в течение беременности. В синцитиотрофобласте содержится на 40 % больше РНК. Окраска галлоцианином. Увеличение 15×40

спаривании кодонов тРНК с антикодонами соответствующих молекул тРНК. Молекулярные основы переноса информации при трансляции оказываются аналогичными таковым при репликации и транскрипции ДНК.

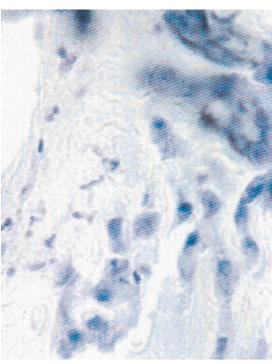
Белки цитоплазмы клеток имеют различные уровни пространственной организации. Аминокислотную последовательность называют первичной структурой белка. Регулярные водородные связи по всей длине непрерывной полипептидной цепи приводят к образованию α-спиралей и β-слоев, которые представляют собой вторичную структуру белка. Некоторые комбинации α-спиралей и β-слоев, упакованные вместе, формируют компактно уложенные глобулярные единицы, каждая из которых носит название белкового домена.

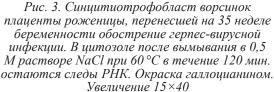
Домены обычно состоят из отрезков полипептидной цепи, содержащих от 50 до 400 аминокислот. Это и есть те модульные единицы, из которых строятся белки. Маленькие белки могут содержать только один домен [7]. Более крупные белки состоят из

нескольких доменов, связанных открытыми участками полипептидной цепи. Отдельные полипептиды служат субъединицами для формирования более крупных молекул, которые называют белковыми агрегатами. Взаимодействия между молекулами стабилизируются дисульфидными связями [8].

Структура большого белка относится к разным уровням организации, каждый из которых иерархическим образом строится из предыдущих. Эти уровни возрастающей структурной организации соответствуют стадиям свертывания новосинтезированного белка в конечную нативную структуру внутри клетки. Новые белки в цитозоле клеток могут создаваться в результате объединения двух или более индивидуальных белков путем нековалентных взаимодействий. Для клеток такое объединение характерно для глобулярных белков в более крупные функциональные белковые агрегаты: молекулярная масса многих агрегатов достигает 1 млн и более.

Другой способ образования новых белков из существующих полипептидных цепей - слияние соответствующих последовательностей ДНК таким образом, что образуется ген, кодирующий одну большую полипептидную цепь. Белки, возникшие таким путем, в разных частях полипептидной цепи свертываются независимо в отдельные глобулярные домены. Такая мультидоменная структура характерна для многих белков [5]. Реальная конформация белков все же зависит от последовательности аминокислот





синтезирующая белковые агрегаты, остается с ними в тесной связи, составляя единую

морфофункциональную систему, наруше-

Белковые структуры в клетках, а также в вирусах построены из белковых субъединиц и молекул РНК. Это доказано на экспериментальных исследованиях, когда путем самосборки макромолекулярного агрегата и РНК восстанавливается структура вируса [6]. Таким образом, в цитозоле клеток РНК,

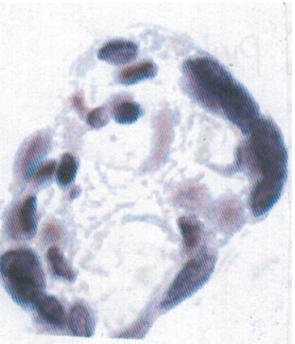


Рис. 4. Синцитиотрофобласт ворсинок плаценты роженицы, не болевшей в период гестации. В цитозоле синцитиотрофобласта после вымывания в 0,5 M растворе NaCl при 60°С в течение 120 мин. остается РНК на 60% больше, чем при герпесе. Окраска галлоцианином. Увеличение 15×40

ние которой приводит к дезинтеграции цитозоля. Антигены многих вирусов, попадая в клетки, токсически действуют на эти связи и приводят к подавлению не только метаболических процессов, но и к преждевременной гибели клеток [3].

Выводы

Изучая морфофункциональное состояние белковой структуры синцитиотрофобласта у рожениц, перенесших в третьем триместре обострение герпес-вирусной инфекции, было отмечено, что герпесная инфекция повреждает связи РНК с белками цитозоля и снижает содержание рибонукленновой кислоты в цитозоле.

Список литературы

- 1. Басс И.В., Гвоздев В.А. Информационные РНК и синтез белка. Биосинтез белка и нуклеиновых кислот. М.: Наука. 1965. С. 50–85.
- 2. Георгиев Г.П. Проблема синтеза и воспроизведения РНК в клетке. Биосинтез белка и нуклеиновых кислот. М.: Наука, 1965. С. 312–347.
- 3. Луценко М.Т., Дорофиенко Н.Н., Андриевская И.А. Морфофункциональная характеристика синцитиотрофобласта и содержание в нем белка теплового шока-70 при обострении во время беременности герпес-вирусной инфекции // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2010. № 3. С. 165–169.
- 4. Alman S., Baer M., Guerrier-Takada C. Enzymatic cleavage of RNA by RNA // Trends Biochem. Sci. 1986. Vol. 11. P. 515–518.
- 5. Bajaj M., Blundell T. Evolution and the tertiary structure of proteins // Annu. Rev. Biophys. Bioerg. 1984. Vol. 13. P. 453–492.
- 6. Fraenkel-Conrat H., Williams R.C. Reconstruction of active tobacco mosaic virus from its inactive protein and nucleic acid components // Pro. Natl. Acad. Sci. USA. 1955. Vol. 41. P. 690–698.
- 7. Hardie D.G., Coggins I.R. Multidomain proteins-structure and evolution. Amsterdam, 1986.-401~p.

8. Pauling L., Corey R.B., Branson H.R. The structure of proteins: two hydrogenbonden helical configurations of the polypeptide chain // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1951. – Vol. 27. – P. 205м211.

References

- 1. Bass I.V., Gvozdev V.A. Moskva, Nauka, 1965, pp. 50–85.
 - 2. Georgiev G.P. Moskva, Nauka, 1965, pp. 312-347.
- 3. Lutsenko M.T., Dorofienko N.N., Andrievskaja I.A. *Kletochnye tehnologii v biologii i medicine* Celluar technologies in biologies and medicine, 2010, no. 3, pp. 165–169.
- 4. Alman S., Baer M., Guerrier-Takada C. Trends Biochem. Sci., 1986, no. 11, pp. 515–518.
- 5. Bajaj M., Blundell T. Annu. Rev. Biophys. Bioerg., 1984, no. 13, pp. 453–492.
- 6. Fraenkel-Conrat H., Williams R.C. Pro. Natl. Acad. Sci., USA, 1955, no. 41, pp. 690–698.
 - 7. Hardie D.G., Coggins I.R. Amsterdam, 1986, p. 401.
- 8. Pauling L., Corey R.B., Branson H.R. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1951, no. 27, pp. 205–211.

Рецензенты:

Перельман Ю.М., д.м.н., профессор, старший научный сотрудник Амурского государственного университета, г. Благовещенск;

Самсонов В.П., д.м.н., профессор, старший научный сотрудник Амурского государственного университета, г. Благовещенск.

Работа поступила в редакцию 10.05.2012.