

УДК 577·1:618·36:616-007·12+618·2/3

ПРОТЕОМНЫЙ СПЕКТР ПЛАЦЕНТЫ ПРИ ОСЛОЖНЕННОЙ БЕРЕМЕННОСТИ

Погорелова Т.Н., Гулько В.О., Линде В.А.

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

Изучен протеомный профиль плаценты при физиологической беременности, преэклампсии и задержке роста плода (ЗРП). 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 таковой при физиологической беременности. При ЗРП имеет место снижение экспрессии ряда белков, участвующих в трансмембранных процессах, ремоделировании цитоскелета, регуляции клеточного цикла, пролиферации, а также выполняющих роль шаперонов. Повышенная экспрессия отмечена для белков, опосредованно стимулирующих реакцию апоптоза. Развитие преэклампсии сопровождается нарушением продукции белков, регулирующих редокс-статус в плаценте, процессы трансляции, внутриклеточного транспорта, миграции клеток, цитогенеза и продукции активных форм кислорода. Сравнительный анализ результатов исследований протеомных спектров плаценты у женщин с ЗРП и преэклампсией обнаружил также межгрупповые различия. Выявленные изменения в протеомном профиле, очевидно, отражают нарушения молекулярно-клеточных взаимодействий в плаценте и имеют патогенетическое значение в формировании осложненной беременности. Специфика развития акушерской патологии может зависеть от различия протеомных спектров плаценты.

Ключевые слова: протеомный анализ, плацента, преэклампсия, задержка роста плода

PROTEOMIC SPECTRUM OF PLACENTA IN COMPLICATED PREGNANCY

Pogorelova T.N., Gunko V.O., Linde V.A.

*Rostov Scientific Research Institute of Obstetrics and Pediatrics, Rostov-on-Don,
e-mail: tnp-rniiap@yandex.ru*

Studied the proteomic profile of the placenta during physiological pregnancy, preeclampsia and fetal growth retardation. Studies conducted using two-dimensional electrophoresis and time-of-flight mass spectrometry, allowed us to detect and identify proteins with different regulatory properties, the intensity of which production in complicated pregnancy is significantly different from that in physiological pregnancy. In case of FGR is a reduction of protein's expression of involved in transmembrane processes, remodeling of the cytoskeleton, cell cycle regulation, proliferation, as well as acting as chaperones. Superexpression marked for proteins stimulating reactions apoptosis. In case of pre-eclampsia is a distortion of protein's production that regulates the redox status in the placenta, the translation process, intracellular transport, cell migration, cytogenesis and production of reactive oxygen species. Comparative analysis of the results of studies proteomic spectrum of placenta of women with FGR and pre-eclampsia also found intergroup differences. The revealed changes in the proteomic profile, obviously, reflect disturbances of molecular and cellular interactions in the placenta and have pathogenetic importance in the formation of a complicated pregnancy. The specifics of development of obstetric pathology may depend on differences proteomic spectrum of placenta.

Keywords: proteomic analysis, placenta, pre-eclampsia, fetal growth retardation

Высокотехнологичные методические подходы молекулярной медицины с использованием современных постгеномных технологий позволяют выяснить ранее неизвестные механизмы развития осложненной беременности. К числу таких технологий относится протеомный анализ, дающий представление о совокупности белков исследуемой ткани и создающий качественно новые возможности для системных поисков молекулярных маркеров патологического процесса [3, 12].

Поскольку развитие беременности связано с молекулярно-клеточными изменениями не только в организмах матери и плода, но и в плаценте, обеспечивающей их взаимосвязь, изучение плацентарного протеомного профиля может дать важную информацию о механизмах развития акушерской патологии. Лидирующими ос-

ложнениями беременности, приводящими к пренатальной заболеваемости и смертности, являются преэклампсия и ЗРП. Однако данные о протеомном спектре плаценты при этих состояниях малочисленны и неоднозначны [6].

Целью настоящей работы явилось изучение протеомного профиля плаценты при преэклампсии и ЗРП.

Материалы и методы исследования

Исследованы плаценты 52 женщин в возрасте от 23 до 33 лет (в среднем $25,9 \pm 0,4$ года), составившие 3 группы. В 1-ю группу вошли 15 женщин с несложненным течением беременности и родов, во 2-ю – 18 женщин, у которых беременность осложнилась преэклампсией средней степени тяжести в соответствии с международной классификацией болезней (МКБ-10, код-014.0), в 3-ю группу – 19 женщин, с асимметричной формой ЗРП (МКБ-10, код – P.05.0). По возрасту, соматическому и акушерско-гинекологиче-

скому анамнезу пациентки обследуемых групп были сопоставимы.

Материалом исследования служили плаценты, взятые сразу после родов. Протеомные карты плацентарной ткани получали с помощью высокоэффективного двумерного электрофореза в полиакриламидном геле (приборы Protein IEF Cell и Protean II xi Multi-Cell, «Bio-Rad», США), который включал в первом направлении изоэлектрическое фокусирование (IPC – стрипы pH 3,0–10,0, прибор IEF Cell, «Bio-Rad», США), во втором – вертикальный электрофорез (8–16,5% гель, прибор Protein II xi Multi-Cell, «Bio-Rad», США). Для получения аналитических гелей использовали загрузку белка – 180 мкг/гель. Окрасивание белковых пятен осуществили азотно-кислым серебром, затем фореграммы 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 [4] на масс-спектрометре Autoflex II («Bruker», Германия) с помощью программы Mascot MS Search (Matrix Science, Великобритания) и баз данных NCBI и Swiss-Prot.

Статистическую обработку данных 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 и четырехпольных таблиц сопряженности качественных признаков. Результаты оценивали как статистически значимые при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Проведенный протеомный анализ позволил идентифицировать белки с различными функциями и свойствами, обеспечивающими возможность многосторонней регуляции метаболизма плаценты, значительная часть которых обнаруживается во всех обследованных группах женщин. В то же время белковый состав плацентарной ткани при физиологической и осложненной беременности имеет определенные отличия (таблица).

Белки плаценты, идентифицированные при физиологической беременности, ЗРП и преэклампсии

№ п/п	Название белка	№ в базе Swiss-Prot	Mm, кДа	pI	Физ. бер.	ЗРП	Пре-экл.
1	α -актинин-4	O43707	105.4	5.2	–	+	+
2	Эндоплазмин	P14625	92.4	4.9	–	+	+
3	β -тропомиозин	P07951	32.8	5.1	–	+	+
4	Виментин	P08670	53.7	4.4	–	+	–
5	Аконитатгидратаза, митохондриальная	Q99798	85.4	7.9	–	–	+
6	Белок теплового шока 60 кДа, митохондриальный	P10809	61.0	4.8	–	–	+
7	Пероксиредоксин-4	Q13162	30.8	5.2	–	–	+
8	Белок 14-3-3 эпсилон	P62258	29.2	5.8	–	–	+
9	β -актин	P60709	41.7	5.2	+	–	–
10	α -субъединица 6 типа протеасомы	P60900	38.6	5.7	+	–	–
11	60S кислый рибосомальный белок	P05388	34.2	5.6	+	–	–
12	Аннексин A4	P09525	32.9	5.4	+	–	–
13	Субъединица 2 комплекса Agr 2/3	O15144	32.1	6.2	+	–	–
14	α -тропомиозин	P09493	32.7	4.2	+	–	–
15	γ -актин	P63261	41.7	5.3	+	–	+
16	Актин-подобный белок 2	P61160	38.7	6.3	+	–	+
17	Актин-подобный белок 3	P61158	52.3	5.4	+	–	+
18	Нейтральная α -гликозидаза АВ	Q14697	96.8	5.7	+	–	+
19	γ -аминобутиральдегид-дегидрогеназа	P49189	53.8	5.6	+	–	+
20	Цитратсинтаза, митохондриальная	O75390	38.0	7.0	+	–	+
21	Дельта (3.5)-Дельта (2.4)-диеноил-КоА-изомераза, митохондриальная	Q13011	30.1	6.9	+	–	+
22	Прохибитин	P35232	29.8	5.1	+	–	+
23	Эндоплазматический ретикулярный белок ERp29	P30040	29.0	5.2	+	–	+
24	Аннексин A2	P07355	28.0	7.0	+	–	+

Примечание. «+» – появление белка, «–» – отсутствие белка, Mm-молекулярная масса, pI – изоэлектрическая точка, * – появление или отсутствие белков при осложненной беременности относительно физиологической статистически значимо, ** – появление или отсутствие белков при ЗРП относительно преэклампсии статистически значимо.

Так, при ЗРП обнаружено снижение экспрессии белков, имеющих важное значение в регуляторных процессах. Эндоплазматический ретикулярный белок ERp29 является шапероном и ключевым фактором в фолдинге эндогенных секреторных белков. Подавление продукции этого белка может приводить к дисфункции протеасом и изменению интенсивности клеточной пролиферации [11]. Уменьшение экспрессии аннексинов А2 и А4, учитывая их роль в трансмембранном транспорте и ремоделировании цитоскелета [9, 10], очевидно, сопровождается нарушением этих процессов в плаценте. К выраженным отрицательным последствиям приводит снижение уровня прохибитина – многофункционального белка, расположенного на внутренней мембране митохондрий. Являясь шапероном этих субклеточных фракций, он регулирует в них клеточный цикл на уровне фаз G1 и S. Кроме того, прохибитин действует как транскрипционный модулятор α -рецептора эстрогена, что особенно важно для плацентарной ткани [1]. Снижение экспрессии еще двух белков, связанных с митохондриями, – цитратсинтазы и диеноил-КоА-изомеразы, в свою очередь, ухудшает работу данных клеточных структур и может сопровождаться уменьшением генерации энергии в плацентарной ткани.

Что касается актин-подобных белков 2 и 3, а также β – и γ – актинов, выполняющих различные функции в клеточных структурах, то нарушение их продукции будет сопровождаться угнетением этих функций, в частности, регуляции транспортных процессов. Снижение экспрессии кислого рибосомального белка 60S, участвующего в регулировании реакций трансляции, усугубляет метаболический дисбаланс в плаценте при ЗРП [5].

Изменение продукции белков при ЗРП проявляется не только в снижении, но и увеличении уровня некоторых из них. К числу таких белков относится α -актинин-4, связывание которого с транскрипционным фактором NF- κ B, модифицирует внутриклеточные функции последнего, в том числе, усиливает экспрессию генов, запускающих апоптоз [2]. Повышенная продукция виментина и β -тропомиозина, отвечающих за сохранность структуры цитоскелета, может иметь компенсаторное значение, направленное на поддержание клеточной целостности в условиях осложненной гестации. Увеличение экспрессии молекулярного шаперона – эндоплазматического ретикула – при ядерной сигнализации, фолдинге и секреции ряда белков [13], по-видимому,

будет отражаться на процессах, находящихся в сфере влияния данного полипептида – белковом гомеостазе и клеточной дифференцировке.

Протеомный анализ плаценты при беременности, осложнившейся преэклампсией, выявил отсутствие 6 белков. В их числе следует отметить субъединицу 2 комплекса Actp 2/3 (actin-related protein – актин-подобный белок), необходимого для поддержания сосудистого компонента плацентарной ткани, 60S кислый рибосомальный белок, 20S протеасому (α -субъединица 6-типа), ответственную за интенсивность катаболической фазы плацентарного метаболизма. Кроме того, обнаружено снижение экспрессии аннексина А4, α -тропомиозина и β -актина. Поскольку немышечные изоформы актина находятся в цитоплазматических структурах в виде микрофиламентов, участвующих в транспорте внешнего сигнала с поверхности клетки в ядро, то модификация их продукции приводит к нарушению внутриклеточного транспорта. В то же время, α -тропомиозин, комплексируясь с актиновыми филаментами, обеспечивает миграцию клеток и цитокенез [8].

Развитие преэклампсии сопровождается также появлением дополнительных белков-отличия. Выявленное повышение экспрессии митохондриальной аконитатгидратазы и пероксиредоксина-4 может играть значительную роль в изменении свободнорадикальных процессов и редокс-статуса плаценты, что является важной составляющей развития окислительного стресса, сопровождающего прогрессирование преэклампсии.

Усиленная продукция таких молекулярных шаперонов, как белок теплового шока 60 (Hsp60) и эндоплазмин, контролирующая процессы ремоделирования нативного состояния белков [5,13], возможно, имеет компенсаторный характер в поддержании корректного фолдинга ряда регуляторных белков. Появление белка 14-3-3 эпсилон, связанного с модулированием эффекторных влияний трансформирующего фактора роста- β и фактора некроза опухоли- α , может приводить к усилению апоптоза [14]. В свою очередь, повышение экспрессии проапоптозных генов может способствовать увеличению продукции α -актинина-4, образующего мультимолекулярный комплекс с ядерным фактором NF- κ B [7].

Сравнительный анализ результатов исследования плаценты при ЗРП и преэклампсии позволил обнаружить как общие изменения протеомного профиля по сравнению с таковым при физиологической беременности, так и определенные отличия.

Заключение

Таким образом, материалы настоящей работы свидетельствуют о том, что развитие осложненной беременности происходит на фоне изменения продукции белков, участвующих в регуляции апоптоза, редокс-статуса, клеточной дифференцировки и пролиферации, обладающих функциями шаперонов, трансдукторов клеточной сигнализации. Данные изменения, очевидно, имеют патогенетическое значение в формировании осложненной беременности. Различие в протеомных спектрах плаценты может определять специфику развития акушерской патологии.

Список литературы/References

1. Artal-Sanz M., Tavernarakis N. Prohibitin and mitochondrial biology. M. Artal-Sanz, N. Tavernarakis. // Trends Endocrinol. Metab. – 2009. – Vol. 20, № 8. – P. 394–401.
2. Babakov V.N., Petukhova O.A., Turoverova L.V., Kropacheva I.V., Tentler D.G., Bolshakova A.V., Podolskaya E.P., Magnusson K.E., Pinaev G.P. RelA/NF-kappaB transcription factor associates with alpha-actinin-4. // Exp. Cell Res. – 2008, Vol. 314, № 5, P. 1030–1038.
3. Barbosa E.B., Vidotto A., Polachini G.M., Henrique T. Proteomics: methodologies and applications to the study of human diseases. // Rev. Assoc. Med. Bras. – 2012. – Vol. 58, № 3. – P. 366–375.
4. Bernard K.R., Jonscher K.R., Resing K.A., Ahn N.G. Methods in functional proteomics: two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with immobilized pH gradients, in-gel digestion and identification of proteins by mass spectrometry. // Methods Mol. Biol. – 2004. – Vol. 250. – P. 263–282.
5. Cappello F., E. Conway de Macario, Marasà L. Hsp60 expression, new locations, functions and perspectives for cancer diagnosis and therapy. // Cancer Biol. Ther. – 2008. – Vol. 7, № 6, P. 801–809.
6. Ghareh-Sard B., J. Zolghadri, E. Kamali-Sarvestani. Proteome differences of placenta between pre-eclampsia and normal pregnancy // Placenta. – 2010. – Vol. 31, № 2. – P. 121–125.
7. Jeon Y.J., Kim D.H., Jung H., Chung S.J., Chi S.W., Cho S., Lee S.C., Park S.G., Bae K.N. Annexin A4 interacts with the NF-kappaB p50 subunit and modulates NF-kappaB transcriptional activity in a Ca²⁺-dependent manner. // Cell Mol Life Sci. – 2010. – Vol. 67, № 13. – P. 2271–2281.
8. Lin J.J., Eppinga R.D., Warren K.S., McCrae K.R. Human tropomyosin isoforms in the regulation of cytoskeleton functions. // Advol. Exp. Med. Biol. – 2008. – Vol. 644, P. 201–222.
9. Rescher U, Gerke VOL. Annexins-unique membrane binding proteins with diverse functions. // J. Cell Sci. – 2004. – Vol. 117, pt. 13. – P. 2631–2639.
10. Piljic A., Schultz C. Annexin A4 self-association modulates general membrane protein mobility in living cells. // Mol. Biol. Cell. – 2006. – Vol. 17, № 7. – P. 3318–3328.
11. Shnyder S.D., Hubbard M.J. ERp29 is a ubiquitous resident of the endoplasmic reticulum with a distinct role in secretory protein production. // J. Histochem Cytochem. – 2002. – Vol. 50, № 4. – P. 557–566.
12. Upadhyay R.D., Balasinar N.H., Kumar A.V., Sachdeva G. Proteomics in reproductive biology: beacon for unravelling the molecular complexities. // Biochim. Biophys. Acta. – 2013. – Vol. 1834, № 1. – P. 8–15.
13. Yang Y., Li Z. Roles of heat shock protein gp96 in the ER quality control: redundant or unique function? // Mol. Cells. – 2005. – Vol. 20, № 2. – P. 173–182.
14. Zuo S., Xue Y, Tang 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. // J. Proteome Res. – 2010. – Vol. 9, № 7. – P. 3465–3478.

Рецензенты:

Друккер Н.А., д.б.н., главный научный сотрудник отдела медико-биологических проблем в акушерстве, гинекологии и педиатрии, ФГБУ «РНИИAP» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону;

Микашинович З.И., д.б.н., профессор, заведующая кафедрой общей и клинической биохимии № 1 с курсом органической и неорганической химии, ГБОУ ВПО «РостГМУ» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону.