

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

УДК 618.346: 577.11+618.3-06

©Коллектив авторов

БЕЛКИ-МАРКЕРЫ ПЛАЦЕНТАРНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Т.Н. Погорелова, В.О. Гунько, Н.А. Друккер, В.А. Линде*

ФГУ «Ростовский НИИ акушерства и педиатрии Росмедтехнологий», 344012, Ростов-на-Дону, ул. Мечникова, 43; тел.: (863)227-50-77, факс: (863) 232-57-63; эл. почта: nniir@yandex.ru

Протеомный анализ околоплодных вод, проведенный во II и III триместрах у женщин с физиологической беременностью и беременностью, осложнившейся плацентарной недостаточностью. Выявлены и идентифицированы белки отличия, отсутствующие при плацентарной недостаточности в указанные периоды гестации: пероксиредоксин-2, эпидермальный белок, связывающий жирные кислоты и гаптоглобин, а также белки, появившиеся при данной патологии и отсутствующие при физиологической беременности — гиппокальцин-подобный белок 1, CDC37-подобный белок, NKG2D лиганд 2, в III триместре — CDC37-подобный белок и NKG2D лиганд 2. Установленные различия в протеомном спектре околоплодных вод, очевидно, имеют патогенетическое значение в развитии плацентарной недостаточности. Обнаруженные белки отличия могут служить маркерами этой акушерской патологии.

Ключевые слова: протеомный анализ, различие белковых паттернов, плацентарная недостаточность, околоплодные воды.

ВВЕДЕНИЕ. Развитие гестации во многом зависит от метаболической полноценности плаценты, обеспечивающей нормальное функционирование биологической системы мать-плод на всем протяжении внутриутробного онтогенеза. Плацентарная недостаточность (ПН), являющаяся одной из основных причин перинатальной заболеваемости и смертности, характеризуется различными нарушениями метаболизма в этом органе [1-3]. Однако, несмотря на возросшее количество работ, посвященных проблеме данной акушерской патологии, вопросы молекулярных механизмов её развития еще далеки от разрешения.

Принципиально новую информацию о ключевых аспектах формирования и прогрессирования осложнений беременности, в том числе и ПН, может дать использование современных медико-биологических технологий, получивших интенсивное развитие в течение двух последних десятилетий. К их числу относятся протеомные исследования, позволяющие оценить совокупность белков анализируемого объекта [4-6]. Ранее неизвестные сведения о белках тканей и биологических жидкостей не только углубят теоретические представления о путях развития патологического процесса, но и существенно повысят практические возможности его прогнозирования и ранней диагностики.

Поскольку плацента является одним из главных источников белков околоплодных вод [7], протеомный анализ последних может дать представление

* - адресат для переписки

об изменении экспрессии белков плаценты при осложнённой беременности и выявить маркеры ПН.

Цель настоящей работы — изучить протеомный спектр околоплодных вод в процессе физиологической беременности и при ПН.

МЕТОДИКА. Исследования проведены в околоплодных водах, взятых у 28 женщин в возрасте 22-28 лет в сроки гестации 23-28 недель и 39-40 недель. В первом случае околоплодные воды получали путем трансабдоминального амниоцентеза по акушерским показаниям, во втором - при вскрытии плодного пузыря в I период родов. У 20 из обследованных пациенток беременность протекала нормально и закончилась своевременными родами (контрольная группа), у 8 пациенток доношенная беременность осложнилась ПН (верифицированной после родов по данным морфологического и гистохимического исследования последа) на фоне внутриутробной гипоксии плода (основная группа). О степени гипоксии судили по показателям газового состава, кислотно-основного состояния и уровню ксантина и гуанина в крови [8].

Фракционирование белков проводили методом двумерного электрофореза (ДЭ) в полиакриламидном геле (ПААГ) [9]. Электрофорез в первом направлении - изоэлектрофокусирование (ИЭФ) осуществляли с использованием иммобилиновых стрипов с градиентом pH=3-10 на приборе Protein IEF Cell ("Bio-Rad", США). Программа ИЭФ после активной регидратации в течение 14 часов включала 4 этапа с различной величиной напряжения и времени (250 В - 15 мин; 10000 В - 2 часа; 1000 В - 6 часов; 500 В - 12 часов) до достижения общих 40000 В·ч. Электрофорез во втором направлении (вертикальный SDS-электрофорез в градиенте ПААГ 8-16%) проводили в камере Protean II xi Multi-Cell ("Bio-Rad", США) при силе тока 10 мА на гель в течение 18 часов.

Для визуализации белковых пятен в гелях (после завершения 2-ого направления ДЭ), электрофореграммы окрашивали азотнокислым серебром с предварительной обработкой тиосульфатом, сканировали и сохраняли как графический файл в формате JPG. Полученные материалы анализировали с использованием пакета программ PDQuest ("Bio-Rad"). После вырезания белкового пятна из геля и процедуры трипсинолиза [10] идентификацию белков проводили методом MALDI-TOF масс-спектрометрии. Масс-спектры триптических пептидов получали на масс-спектрометре Autoflex II ("Bruker", Германия) и анализировали с помощью программы Mascot MS Search ("Matrix Science", США) и баз данных NCBI и Swiss-Prot.

Сравнительный анализ протеомных карт осуществляли по виртуальным интегрированным "мастер-гелям" двумерных электрофореграмм (программа PDQuest) амниотической жидкости при физиологической беременности и осложнённой ПН.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Полученные результаты свидетельствуют о том, что протеомный профиль околоплодных вод, взятых во II триместре беременности у женщин с ПН, отличается от такового у беременных контрольной группы (таблица). В нём отсутствуют семь белков, с молекулярными массами в диапазоне от 24 до 32 кДа и изоэлектрическими точками от 5,3 до 6,5, которые характерны для периода нормальной гестации. Из них были идентифицированы три белка: связывающий жирные кислоты эпидермальный белок, гаптоглобин и пероксиредоксин-2. Указанные белки выполняют важные регуляторные функции, в частности неферментативный антиоксидант гаптоглобин и антиоксидантный фермент пероксиредоксин-2, участвуют в поддержании физиологического баланса про- и антиоксидантов в фетоплацентарной системе, а их отсутствие вносит определенный вклад в развитие внутриутробной гипоксии, имеющей место при ПН. Отсутствие связывающего жирные кислоты эпидермального белка, участвующего в обеспечении проницаемости клеточных мембран [11], может способствовать нарушению трансмембранных процессов в плаценте, которое наблюдается при её функциональной недостаточности [12].

Таблица. Белки околоплодных вод, идентифицированные при физиологической беременности и плацентарной недостаточности.

№	Название белка	Код в базе Swiss-Prot	Мм, кДа	pI	Физ. бер. (n = 20)		ЗРП (n = 8)	
					триместр			
					II	III	II	III
1	Serotransferrin	P02787	77	6,24	+	+	+	+
2	Serum albumin	P02768	69,3	5,9	+	+	+	+
3	Alpha-1-antitrypsin	P01009	46,7	5,3	+	+	+	+
4	HLA class II histocompati- bility antigen gamma chain	P04441	32,3	6,83	+	+	+	+
5	Apolipoprotein A-I	P02647	30,8	5,5	+	+	+	+
6	Hemoglobin subunit beta	P68871	15,9	6,9	+	+	+	+
7	Carbonyl reductase [NADPH] 3	O75828	32,3	5,57	+	+	+	+
8	NKG2D ligand 2	Q9BZM5	31,9	6,03	-	-	+	+
9	Peroxiredoxin-2	P32119	28,9	5,3	+	+	-	-
10	Putative CDC37-like protein LOC390688	O75198	21,9	5,93	-	-	+	+
11	Hippocalcin-like protein 1	P37235	21,5	6,15	-	-	+	-
12	Haptoglobin	P00738	18,6	5,84	+	+	-	-
13	Transthyretin	P02766	17	5,38	-	+	-	-
14	Fatty acid-binding protein, epidermal	Q01469	14,7	6,18	+	+	-	-
15	Protein S100-A9	P06702	13,2	5,2	-	+	-	-
16	Protein S100-A8	P05109	12,9	6,61	-	+	-	-

Примечание: pI - изоэлектрическая точка, Мм-молекулярная масса, "+"- присутствие белка, "-" - отсутствие белка.

Наряду с отсутствием в околоплодных водах во II триместре осложненной беременности вышеуказанных белков, отмечено появление 10 белков (с молекулярными массами в диапазоне от 16 до 33,5 кДа и изоэлектрическими точками от 5,8 до 7,6), не обнаруженных при физиологической беременности. В их числе были идентифицированы: гиппокальцин-подобный белок 1, CDC37-подобный белок и NKG2D лиганд 2. Можно предположить, что появление при ПН белков, экспрессия которых отсутствует при нормальной беременности, также имеет определенное значение в возникновении этой акушерской патологии.

Известно, что важнейшую роль в развитии плаценты играет апоптоз, с которым связаны различные стадии ее функционирования: инвазия и дифференциация трофобласта, трансформация спиральных артерий и др. [13, 14]. Очевидно, модификация регуляции апоптоза, изменение соотношения про- и антиапоптогенных факторов, возникновение дисбаланса в системе апоптоз-пролиферация, приводит к нарушению формирования плаценты.

Поэтому появление при плацентарной недостаточности NKG2D лиганда 2, стимулирующего секрецию эмбриотоксических цитокинов, в том числе фактора некроза опухоли-альфа, может усиливать этот процесс по сравнению с физиологическими условиями [15]. Что касается двух других белков, отсутствующих в околоплодных водах во II триместре нормальной беременности: CDC37-подобного белка, обладающего шаперонной активностью и регулирующего циклин-зависимые киназы [16] и гиппокальцин-подобного белка 1 — считающегося одним из регуляторов рецепторной сигнальной трансдукции [17], то причины их появления при ПН и участие в механизмах развития этого гестационного осложнения на данном этапе пока трудно объяснимы.

По мере течения беременности изменения в протеомном спектре околоплодных вод в целом сохраняются, хотя к моменту родов появляются определенные отличия (таблица). Так, количество белков, отсутствующих при ПН во II триместре, в этот период увеличивается. К их числу относятся транстиретин, обеспечивающий транспорт тироксина и ретинола, кальгранулин А (белок S100-A8) и кальгранулин В (белок S100-A9). Два последних белка осуществляют контроль за клеточной дифференцировкой, а также участвуют в регуляции каскада арахидоновой кислоты и синтеза эйкозаноидов, необходимых для процесса родовозбуждения [18]. Очевидно, отсутствие (или снижение) продукции этих белков в более поздние сроки гестации также вносят определенный вклад в пролонгирование нарушений метаболических реакций при ПН.

В отличие от возрастающего к концу беременности количества белков, отсутствующих при ПН, число появляющихся, напротив, снижается относительно динамики при физиологической беременности. Если в 23-28 недель в околоплодных водах женщин с ПН появлялось десять белков отличия, то в 39-40 недель — лишь пять, из которых идентифицировано два — NKG2D лиганд 2 и CDC37-подобный белок. Третий идентифицированный белок, характерный для II триместра осложнённой беременности, — гиппокальцин-подобный белок 1, в конце беременности отсутствовал. Как уже указывалось выше, значение появления его при ПН, причем лишь на определенный период, не совсем ясно. Учитывая, что одной из функций этого белка является регуляция нейронального апоптоза на ранних стадиях дифференциации нейронов [17], можно предположить компенсаторное значение его экспрессии при ПН для предотвращения перехода апоптоза в апонекроз в структурах мозга плода, когда усиление апоптоза ещё не приобрело необратимый характер. В конце беременности необходимость в регуляторном воздействии гиппокальцин-подобного белка 1, по-видимому, уже отпадает, в связи со сформированностью мозга внутриутробного плода.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Таким образом, полученные данные позволяют заключить, что ПН развивается на фоне изменения продукции белков, выполняющих важные регуляторные функции. Выявленные белки отличия, обнаруженные в околоплодных водах, прежде всего во II триместре беременности, могут служить маркерами плацентарной недостаточности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Радзинский В.Е., Смалько П.Я. (2001) Биохимия плацентарной недостаточности, Изд-во РУДН, М.
2. Погорелова Т.Н., Крукиер И.И., Друкер Н.А. (2005) Изв. ВУЗов. Сев.-Кавк. регион. Ест. науки. Спецвыпуск, 57-60.
3. Chaddha V., Viero S., Huppertz B., Kingdom J.C. (2004) J. Semin. Fetal Neonatal Med., 9(5), 357-369.
4. Арчаков А.И. (2000) Вопр. мед. химии, 46, 335-343.
5. Peltonen L., McKusick V.A. (2001) Science, 291, 1224-1229.
6. Говорун В.М., Арчаков А.И. (2002) Биохимия, 67, 1341-1359.

7. Орлов В.И., Погорелова Т.Н., Крукиер И.И., Сагамонова К.Ю., Друккер Н.А. (2009) Околоплодные воды. Химический состав и биологические функции. Эверест, РнД.
8. Жданов Г.Г., Михельсон В.А., Друккер Н.А. (1980) Способ диагностики гипоксии. А.С.799728.
9. Görg A., Postel W., Günther S. (1988) Electrophoresis, **9**(9), 531-546.
10. Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M. (1996) Anal. Chem., **68**, 850-858.
11. Chmurzycka A. (2006) J. Appl. Genet., **47**(1), 39-48.
12. Погорелова Т.Н., Орлов В.И., Друккер Н.А., Крукиер И.И. (1997) Молекулярные аспекты плацентарной недостаточности. Изд. РГУ, РнД.
13. Ishihara N., Matsuo H., Murakoshi H. et al. (2002) Am. J. Obstet. Gynecol., **186**, 158-166.
14. Huppertz B., Kingdom J.C. (2004) J. Soc. Gynecol. Investig., **11**, 353-362.
15. Emmer P.V., Nelen W.L., Steegers E.A., Hendriks J.C., Veerhoek M., Joosten I. (2000) Human Reprod., **15**, 1163-1169.
16. MacLean M., Picard D. (2003) Cell Stress Chaperones, **8**, 114-119.
17. Krishnan A., Duda T., Pertzev A., Kobayashi M., Takamatsu K., Sharma R.K. (2009) Mol. Cell Biochem., **325**, 1-14.
18. Havelock J.C., Keller P., Muleba N., Mayhew B.A., Casey B.M., Rainey W.E., Word R.A. (2005) Biol. Reprod., **72**, 707-719.

Поступила: 30. 04. 2010.

PROTEINS-MARKERS OF PLACENTAL INSUFFICIENCY

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

Federal State Institution "Rostov Scientific Research Institute of Obstetrics and Pediatrics of Rusmedtechnologies", Mechnikova str., 43, Rostov-on-Don, 344012 Russia; tel.: (863)227-50-77; fax: (863) 232-57-63; e-mail: rniap@yandex.ru

The proteomic analysis of the amniotic fluids of women with physiological pregnancy and pregnancy, complicated with placental insufficiency has been carried out on the II and III trimesters. The following difference in protein patterns have been recognized: i) appearance of several proteins lacking in physiological pregnancy; ii) absence of several proteins detectable during physiological pregnancy - hippocalcin-like protein 1, CDC37-like protein, NKG2D ligand 2 (II trimester), CDC37-like protein, NKG2D ligand 2 (III trimester). The established differences in the amniotic fluid spectrum, obviously, have the pathogenetic meaning in the placental insufficiency development. The revealed proteins of distinction may serve as markers of this obstetrical pathology.

Key words: proteomic analysis, different protein patterns, placental insufficiency, amniotic fluids.