



его содержания в подгруппе Ia по сравнению с контрольной группой и подгруппой 1b как в сыворотке крови, так и в околоплодных водах ($77,4 \pm 12,4$ пг/мл против $24 \pm 3,1$ пг/мл и $35 \pm 5,2$ пг/мл соответственно, $p < 0,05$, и $78,4 \pm 12,1$ пг/мл против $15 \pm 3,1$ пг/мл и $19 \pm 7,1$ пг/мл соответственно, $p < 0,05$).

Выводы

1) Критерием риска развития перинатального поражения ЦНС у новорожденных от матерей с плацентарной недостаточностью является повышение в крови матери уровня CD16+ NK-клеток, маркеров активации CD69+, CD25+ Т-лимфоцитов, маркеров апоптоза CD95+,

AnnexinV+, AnnexinV+PI+, смещение цитокинового баланса в сторону продукции провоспалительных цитокинов (TNF- α , IL -6, IFN- γ), как в сыворотке крови, так и в околоплодных водах, что свидетельствует о существенной роли иммунологических изменений на системном и локальном уровне.

2) Выявление характера иммунного ответа у беременных с плацентарной недостаточностью позволит разработать прогностические критерии степени тяжести и сроков реализации гипоксически-ишемического поражения ЦНС у их новорожденных, что будет способствовать повышению эффективности терапевтических мероприятий и снижению детской инвалидизации путем раннего назначения патогенетической терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Барашнев Ю.И., Розанов А.В., Панов В.О., Волобуев А.И. Роль гипоксически-травматических повреждений головного мозга в формировании инвалидности с детства // Рос. вестник перинат. и педиатрии. — 2006. — № 4. — С. 41-46.
2. Холичев Д. А. , Боженков Ю. А. Особенности течения воспалительной реакции у новорожденных детей с церебральной ишемией различной степени тяжести// Дальневосточный медицинский журнал. - 2008. - №1. - С. 44-46.
3. Сидорова И.С., Макаров И.О. Клинико-диагностические аспекты фетоплацентарной недостаточности.- М.: Медицинское информационное агентство, 2005.-296с.
4. Рогалева Т.Е., Белокрыцкая Т.Е., Короленко Т.Г. Патогенетические механизмы развития перинатальных поражений центральной нервной системы у новорожденных от матерей с гестозами // Забайкальский мед. вестник.-2008.-№ 1.- С. 12-14.
5. Neerhof M.G., Thaete L.G. The fetal response to chronic placental insufficiency. // Semin. Perinatol.-2008.- Vol. 32.- P.201-205.
6. Филькина О.М., Чаша Т.В., Самсонова Т.В. и др. Перинатальные поражения нервной системы и их последствия у детей: клиника, прогнозирование, диагностика, профилактика и коррекция, соматическое здоровье. – Иваново: ОАО «Издательство «Иваново», -2007. -240 с.
7. Воробьев А.А., Быков А.С., Караулов А.В. Иммунология и аллергология. – М.: Практическая медицина, 2006. – С. 77-79.
8. Сотникова Н.Ю. Анциферова Ю.С., Кудряшова А.В. Иммунологическая загадка беременности.- Иваново, 2005. – С. 130-132.
9. Крукиер И.И. Динамика цитокинов в разные сроки развития плаценты при физиологической и осложненной беременности //Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.-2005.- № 1.-С.18-21.

ПОСТУПИЛА 10.10.2013

УДК 618.2+618.36+618.3-06+577.1

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

БЕЛКОВЫЙ СОСТАВ СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЙ СИНЦИТИОТРОФОБЛАСТА ПРИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕРЕМЕННОСТИ И ПЛАЦЕНТАРНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

*Ростовский научно-исследовательский институт акушерства и педиатрии,
отдел медико-биологический проблем в акушерстве, гинекологии и педиатрии
Россия, 344012, г. Ростов-на-Дону, ул. Мечникова, 43. E-mail: rniiar@yandex.ru*

Purpose: identify changes in the composition of cytoplasmic and membrane proteins of syncytiotrophoblast during placental insufficiency (PI).

Materials and methods: we examined 64 women, the study group consisted of 34 patients with PI, a control group of 30 women with physiological pregnancy. Analysis of proteins was performed using a one-dimensional electrophoresis and gel-chromatography.



Results: carried out researches have allowed to establish in PI reliable differences in the quantity and the mobility of cytoplasmic and membrane proteins of syncytiotrophoblast with different molecular weights. For membrane proteins is also a change in the degree solubilize various detergents.

Summary: detected modification of the composition and properties of proteins syncytiotrophoblast expands our understanding of the molecular mechanisms of development of PI.

Keywords: placenta, cytoplasmic and membrane proteins of syncytiotrophoblast, placental insufficiency.

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

THE PROTEIN COMPOSITION OF SUBCELLULAR FRACTIONS SYNCYTIOTROPHOBLAST DURING PHYSIOLOGICAL PREGNANCY AND PLACENTAL INSUFFICIENCY

*Rostov Scientific Research Institute of Obstetrics and Pediatrics,
department of medical-biological problems in obstetrics, gynecology and pediatrics
43 Mechnikova St., Rostov-on-Don, 344012, Russia. E-mail: rniap@yandex.ru*

Purpose: identify changes in the composition of cytoplasmic and membrane proteins of syncytiotrophoblast during placental insufficiency (PI).

Materials and methods: we examined 64 women, the study group consisted of 34 patients with PI, a control group of 30 women with physiological pregnancy. Analysis of proteins was performed using a one-dimensional electrophoresis and gel-chromatography.

Results: carried out researches have allowed to establish in PI reliable differences in the quantity and the mobility of cytoplasmic and membrane proteins of syncytiotrophoblast with different molecular weights. For membrane proteins is also a change in the degree solubilize various detergents.

Summary: detected modification of the composition and properties of proteins syncytiotrophoblast expands our understanding of the molecular mechanisms of development of PI.

Keywords: placenta, cytoplasmic and membrane proteins of syncytiotrophoblast, placental insufficiency.

Введение

Проблема плацентарной недостаточности (ПН) является одной из актуальных в современном акушерстве, что связано, прежде всего, с высоким риском перинатальных потерь и заболеваемости новорожденных. Несмотря на возрастающее количество исследований, посвященных указанной проблеме, частота данной патологии остается достаточно высокой [1,2]. Это обосновывает актуальность дальнейшего исследования клеточно-молекулярных механизмов формирования и развития ПН. Участие плаценты в интеграции практически всех обменных процессов между организмами матери и плода обеспечивает нормальное функционирование системы мать-плацента-плод на протяжении всей беременности.

Одним из приоритетных направлений в изучении патогенетических аспектов недостаточности плаценты является анализ ее белков, играющих ключевую роль в метаболизме клеток и их структурных составляющих. Функционирование плацентарного барьера во многом определяется состоянием белкового компонента клеточных мембран. Мембранные белки играют важную роль в механизмах активного транспорта, контактных взаимодействиях, рецепции различных биоактивных соединений и сигнальных биомолекул, ответственных за процессы

внутри- и межклеточной регуляции. Не менее важное значение имеют цитоплазматические белки синцитиотрофобласта, выполняющие трофические, ферментативные функции и включающие различные специфические протеины беременности. Ранее неизвестные сведения о белках анализируемого объекта дают возможность не только углубить теоретические представления о путях развития патологического процесса, но и повысить практические возможности его диагностики. Цель работы - изучение растворимых и мембранных белков синцитиотрофобласта при физиологической беременности и ПН.

Материалы и методы

В проспективное исследование включены 64 женщины в возрасте 24-32 лет (в среднем $26,1 \pm 0,4$ года), у 30 из которых беременность протекала без осложнений и закончилась своевременными родами (контрольная группа), у 34 – доношенная беременность осложнилась ПН компенсированной и субкомпенсированной форм (основная группа), верифицированной после родов. Критериями при постановке диагноза (и для включения в исследование) служили: выявление анамнестических факторов риска, снижение фето- и маточно-плацентарного кровотока при доплерометрии, отставание роста плода по данным ультразвуковой биометрии, снижение свороточной ак-



тивности специфического плацентарного изофермента глутаматдегидрогеназы, обнаружение признаков гипоксии внутриутробного плода при проведении кардиотокографии и по показателям гуанина+ксантина в крови.

В контрольной группе 14 (46,7%) женщин были первобеременными и первородящими. У 16 (53,3%) повторнобеременных и повторнородящих имели место 2 и более прерывания беременности по желанию женщин. У 32 (20%) пациенток в анамнезе наблюдались воспалительные заболевания органов малого таза. В основной группе первобеременные и первородящие составили 47,4% (16 женщин). У 18 (52,6%) повторнобеременных и повторнородящих имели место 2 и более прерывания беременности по желанию женщины. У 10 (29,4%) пациенток основной группы в анамнезе были воспалительные заболевания органов малого таза. По возрасту, индексу массы тела, паритету беременностей и родов, соматическому и акушерско-гинекологическому анамнезу пациентки обследуемых групп были сопоставимы. Критериями исключения из исследования являлись декомпенсированные формы соматических заболеваний, многоплодная беременность, декомпенсированная ПН, антенатальная гибель плода, отсутствие информированного согласия женщины участвовать в исследовании. Для большей объективности полученных данных деление на группы проводили до биохимического исследования плаценты. Все пациентки наблюдались в женской консультации по месту жительства и в консультативной поликлинике ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский институт акушерства и педиатрии» по программе «Акушерский мониторинг», предусматривающей расширенный протокол обследования. Беременные были родоразрешены в родильном отделении института.

Материалом исследования служили плаценты, взятые сразу после родов в сроке 39-40 недель при соблюдении холодового режима. Из гомогенатов плаценты методом дифференциального центрифугирования, разработанным для этой ткани, выделяли мембраны микроворсин синцитиотрофобласта [3]. Супернатант после ультрацентрифугирования в градиенте сахарозы при 110 тыс.г содержал цитоплазматические белки. Чистоту фракций проверяли микроскопически, а также по активности маркерных ферментов (5'-нуклеотидазы, Na+K+-АТФазы).

Цитоплазматические и мембранные (после последовательной солиubilизации растворами детергентов) белки разделяли методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ), используя прибор Protean II xi Multi-Cell («Bio-Rad», США). Количественную оценку электрофореграмм после окрашивания кумасси бриллиантовым голубым R-250 проводили на денситометре «Camag» TLC Scanner II» (Швейцария) с интегратором фирмы «Hewlett Packard» (США). Для выявления природы белков часть гелей окрашивали пиронином Г (нуклеотпротеины), суданом черным (липопротеины) и реактивом Шиффа (гликопротеины).

Гель-хроматографию цитоплазматических белков проводили на колонках с сефадексом G-200. Для определения молекулярных масс белков колонки калибровали коммерческими препаратами белков с известными молекулярными массами (от 12,5 до 420 кДа).

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью лицензионного пакета программ Statistica (версия 5.1. фирмы StatSoft, Inc.). Достоверность различий между сравниваемыми показателями определяли по кри-

терию Стьюдента (t-критерий) и его аналогу для непараметрических распределений – критерию Манна-Уитни. Результаты оценивали как статистически значимые при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Полученные результаты свидетельствуют о высокой гетерогенности как цитоплазматических, так и мембранных белков плаценты. По данным одномерного электрофореза в ПААГ цитоплазматические белки синцитиотрофобласта женщин контрольной группы представлены 24-26 фракциями (рис.1). Четыре фракции по ЭФ-подвижности (R_m) подобные преальбуминам сыворотки крови ($0,6-1,0$) содержат $0,96 \pm 0,01$ мг/г ткани. Область альбуминов представлена двумя фракциями с количеством белка $5,02 \pm 0,03$ мг/г ткани. В области α -глобулинов ($0,39-0,35$) выявлено 3 фракции, содержащие $2,9 \pm 0,02$ мг/г ткани. В зоне трансферринов обнаруживаются 2 фракции ($0,23-0,25$) с количеством белка около $2,9 \pm 0,01$ мг/г ткани. Посттрансферриновая зона белков включает в себя 5 фракций, каждая из которых содержит 1-1,5 мг/г ткани. Область белков с ЭФ-подвижностью гаптоглобинов ($0,05-0,10$) состоит из 4 фракций, суммарное количество белка в которых равно $6,5 \pm 0,03$ мг/г ткани. В зоне белков, обладающих ЭФ-подвижностью макроглобулинов (в том числе γ -глобулинов) располагается 4 фракции с содержанием белка $7,2 \pm 0,06$ мг/г ткани.

Сопоставление содержания белков в плаценте, взятой после родов в 39-40 недель, с полученными нами данными в более ранние сроки гестации [4] свидетельствует о достоверном снижении в доношенной плаценте уровня белков преальбуминовой, альбуминовой и α -глобулиновой областей и повышении содержания слабо мигрирующих белков γ -глобулиновой зоны. Это, очевидно, имеет определенный биологический смысл и связано с уменьшением в указанный период потребности плаценты в пластическом материале и в то же время с необходимостью повышения иммунокомпетентности плода перед его рождением.

Для белков плаценты характерно образование комплексов с различными небелковыми соединениями. Специфическая окраска ПААГ позволила выявить в спектре цитоплазматических белков наличие нуклео-, липо- и гликопротеинов. Особенно широко в синцитиотрофобласте ворсин представлены углеводно-белковые комплексы, обнаруживающиеся почти во всех ЭФ-зонах, что, вероятно, связано с их важной ролью в осуществлении функций плаценты. Причем весьма много гликопротеиновых фракций выявлено и среди белков плазматических мембран, где они в значительной степени обеспечивают межклеточные контакты, необходимые для полноценного функционирования органа.

Одним из показателей разнокачественности физико-химических свойств белков плаценты является распределение их по молекулярным массам. Результаты проведенных нами исследований показали, что при гель-хроматографии цитоплазматических белков плаценты на колонках сефадекса G-200 обнаруживаются три пика с максимумами оптической плотности, соответствующими значениям молекулярной массы 330 кДа, 85 кДа, 22 кДа и относительным содержанием белка в них 63%, 26% и 11% (рис. 2).

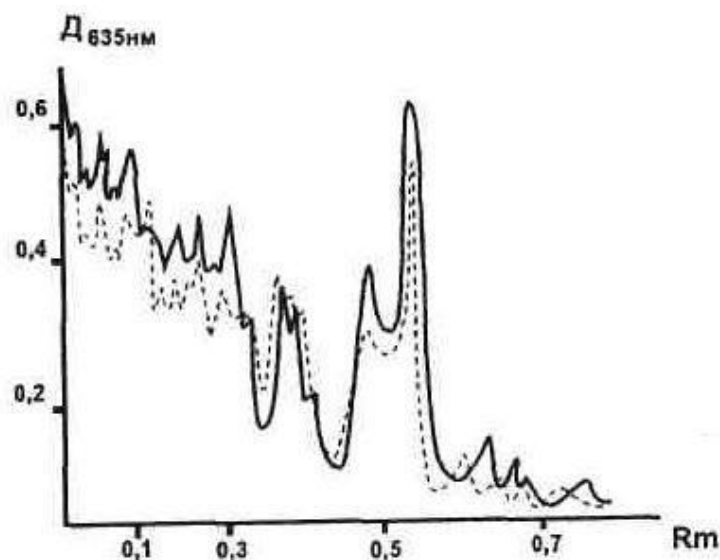


Рис. 1. Денситограммы цитоплазматических белков синцитиотрофобласта при физиологической (—) и осложненной (---) беременности.

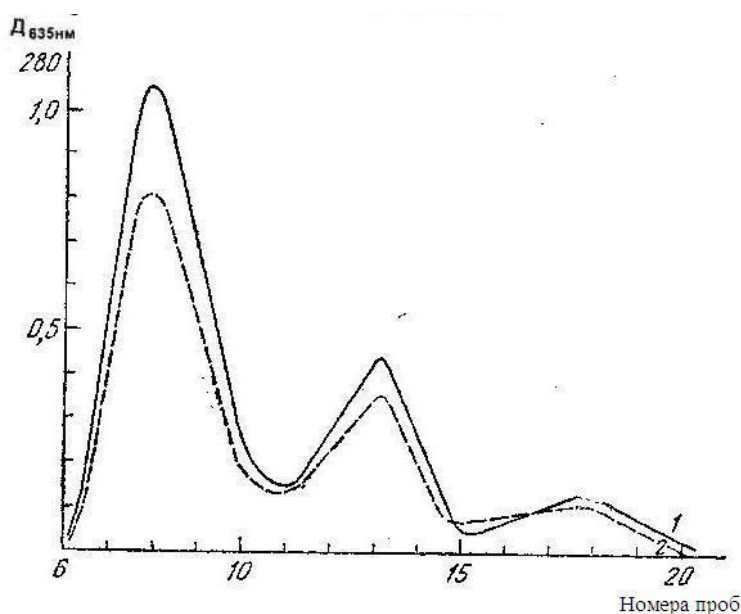


Рис. 2. Профили гель-хроматографии на сефадексе G-200 цитоплазматических белков синцитиотрофобласта при физиологической (—) и осложненной (---) беременности.

Последующее разделение белков из разных гель-хроматографических фракций методом электрофореза в ПААГ позволило обнаружить в них зоны белков с одинаковой ЭФ-подвижностью. Такое несоответствие между молекулярной массой (по данным гель-хроматографии) и ЭФ-подвижностью в ПААГ можно объяснить тем, что некоторые цитоплазматические белки находятся в виде надмолекулярных комплексов, частично диссоциирующих при электрофорезе.

Что касается белков плазматических мембран ворсин синцитиотрофобласта, то их спектр также достаточно гетерогенен (рис.3). Белки, экстрагированные тритоном X-100 (общее содержание $32,1 \pm 1,8$ мг/г ткани), разделяются

в ПААГ на 12-13 фракций, расположенных в зонах с ЭФ-подвижностью от 0 до 42. Дальнейшая обработка мембранных белков (не экстрагируемых тритоном-100) раствором додецилсульфата натрия способствовала дополнительной солюбилизации еще 20% белков ($22,3 \pm 1,2$ мг/г ткани), которые разделялись на 9-10 фракций (ЭФ от 0 до 0,4). Относительное количество белка во фракциях с аналогичной подвижностью в образцах, солюбилизованных различными детергентами, значительно отличается. Очевидно, такая ситуация объясняется тем, что использованные детергенты в соответствии с особенностями их структуры солюбилизируют из мембранных препаратов плаценты белки с разными физико-химическими свойствами.

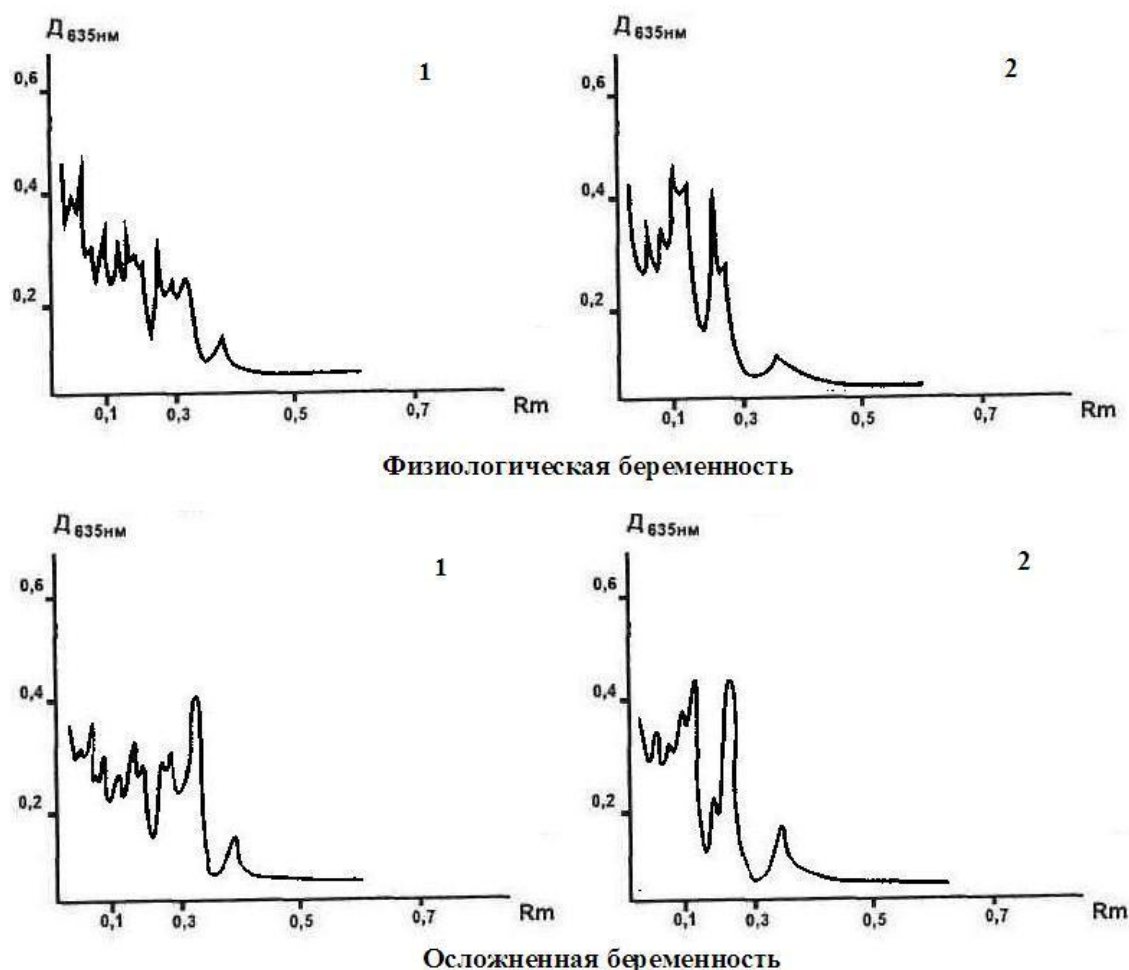


Рис. 3. Денситограммы мембранных белков синцитиотрофобласта, экстрагированных тритоном X-100 (1) и додецилсульфатом натрия (2), при физиологической и осложненной беременности.

При беременности, осложнившейся ПН, содержание цитоплазматических белков синцитиотрофобласта снизилось на 21%. Число фракций на электрофореграммах при ПН не отличается от такового в контрольной группе, однако относительный уровень белка и ЭФ-подвижность отдельных фракций претерпевают определенные изменения. Так, содержание белка в максимально мигрирующей фракции уменьшается в среднем на 40% ($p < 0,01$), ЭФ-подвижность снижается с $0,80 \pm 0,01$ до $0,77 \pm 0,01$. Уменьшение количества белка на 32% ($p < 0,05$) при осложненной беременности имеет место и во фракции, аналогичной альбумину. Для белков с подвижностью $\alpha 1$ -глобулинов, напротив характерно повышение содержания (на 45%, $p < 0,05$). Такая же направленность динамики установлена и для белков посттрансферриновой зоны: их относительное количество возрастает в среднем на 34% ($p < 0,05$). Содержание трансферринов и медленно мигрирующих гаптоглобинов, подобно уровню белков преальбуминовой и альбуминовой зон, снижается на 36% ($p < 0,05$) и 41% ($p < 0,01$) соответственно относительно контрольных показателей.

Антиоксидантные функции гаптоглобина и трансферрина позволяют полагать, что снижение их содержания

вносит определенный вклад в нарушение баланса про- и антиоксидантов в фетоплацентарной системе, в усиление хронической гипоксии и развитие окислительного стресса, имеющих место при ПН [5]. Уменьшение количества альбумина, очевидно, будет отрицательно сказываться на динамике роста плода, способствуя развитию у него гипотрофии.

Наряду с изменениями электрофоретического спектра цитоплазматических белков синцитиотрофобласта модифицируется и профиль их гель-хроматограмм (рис.2). Снижается уровень белков первого пика с молекулярными массами выше 300 кДа (особенно в области «стартовых» нуклеопротеинов) и повышается количество белковых фракций в низкомолекулярной зоне (мол. массы ниже 60 кДа) третьего хроматографического пика, что, по-видимому, указывает на возможность диссоциации белковых комплексов, характерных для нормально развивающейся плаценты. Модификация затрагивает и ЭФ-подвижность: высокая анодная подвижность ряда фракций второго и третьего пиков при ПН уменьшается, что подтверждает изменения не только количественных, но и качественных характеристик цитоплазматических белков, свидетельствующие о нарушении физико-хими-



ческих свойств и, следовательно, биологических функций белков.

Развитие ПН сопровождается также изменениями белкового компонента плазматических мембран ворсин синцитиотрофобласта. Содержание мембранных белков, экстрагированных тритоном X-100, снижается по сравнению с контрольной величиной на 22,6% и составляет $24,8 \pm 1,4$ мг/г ткани ($p < 0,05$), для белков, экстрагированных додецилсульфатом натрия, снижение содержания составляет 27,2% ($16,2 \pm 1,1$ мг/г ткани). Наряду с абсолютным уменьшением содержания мембранных белков изменяется соотношение между уровнем белков, солюбилизированных разными детергентами. Перераспределение белков при их экстракции, очевидно, свидетельствует о модуляции гидрофобных взаимодействий в белково-липидных компонентах мембран.

Определенные отличия обнаружены и в содержании мембранных белков в отдельных фракциях, а также в ЭФ-подвижности некоторых из них (рис.3). Уровень высокомолекулярных белков тритонового экстракта с наименьшей ЭФ-подвижностью (мол.масса 250 кДа) снижается на 25%, а белков с наибольшей анодной подвижностью (мол. масса 25-30 кДа) увеличивается в 1,5 раза относительно аналогичных данных при нормальной гестации. При этом установлено отсутствие одной белковой фракции в зоне белков с молекулярными массами 150-160 кДа. Для спектра белков, экстрагированных додецилсульфатом натрия, также имеет место более чем двукратное повышение содержания «быстрых» низкомолекулярных фракций и уменьшение количества стартовых белков. Подвижность в ПААГ одной из фракций, равная в норме $0,12 \pm 0,01$, увеличивается до $0,15 \pm 0,01$. Уменьшение содержания белков в медленно мигрирующих высокомолекулярных фракциях, очевидно, свидетельствует о дезагрегации белковых ассоциатов мембранных структур плаценты. Сдвиги в белковом составе мембран плаценты могут быть вызва-

ны различными причинами, в том числе усилением атакуемости пептид-гидролазами, которое имеет место при ПН [6]. Обнаруженные изменения, по-видимому, являются молекулярной основой нарушений транспортных функций плаценты, особенно активного транспорта, сопряженного с функционированием определенных ферментативных систем. Как показали наши исследования, наряду со структурными перестройками мембран плаценты уменьшается активность мембраносвязанного фермента Na^+ , K^+ – АТФазы [7]. Известно, что натрий-калий-зависимая транспортная система, представленная в плазматических мембранах синцитиотрофобласта и зависящая от активности этого фермента, обеспечивает значительный объем межклеточного перехода веществ, прежде всего, аминокислот [8]. Необходимо учитывать, что изменение состава и структуры мембран существенно модифицирует ответ клетки на те или иные воздействия за счет регуляции не только ферментативной активности, но и характера рецепции. Поэтому можно полагать, что нарушение баланса биоактивных клеточных компонентов в плаценте при ее недостаточности зависит как от нарушения их продукции [9], так и от изменения чувствительности рецепторов на уровне узнавания и связывания биорегуляторов, вызванного модификацией мембран. Очевидно, что повреждение нативного состояния клеточных мембран плаценты в результате модификации их белков, ухудшает обмен веществ в фетоплацентарной системе и нарушает процессы роста и развития плода.

Заключение

Резюмируя полученные данные можно заключить, что при ПН происходят значительные изменения в белковом спектре цитоплазмы и плазматических мембран ворсин синцитиотрофобласта, которые могут явиться молекулярной основой метаболических и, как следствие, функциональных нарушений в плаценте.

ЛИТЕРАТУРА

1. Стрижаков А.Н., Тимохина Т.Ф., Баев О.Р. Фетоплацентарная недостаточность: патогенез, диагностика, лечение // *Вопр. гин. акуш. и перинатол.* – 2003. – Т.2, N 2. – С. 53–64.
2. Сидорова И.С., Макаров И.О. Клинико-диагностические аспекты фетоплацентарной недостаточности. – М.: МИА, 2005. – 296 с.
3. Smith N.C., Brush M.G., Luckett S. Preparation of human placental villous surface membrane // *Nature*. – 1974. – Vol. 252. – P. 302-303.
4. Pogorelova T.N., Gunko V.O., Linde V.A., Elzhorukaeva Zh.A. The impact of the modification of composition and physicochemical properties of placental proteins on the development of preterm labor // *J. Perinat. Med.* – 2013. – Vol.41. – P.638.
5. Ванько Л.В., Сафронова В.Г., Матвеева Н.К., Сухих Г.Т. Оксидативный стресс в генезе акушерских осложнений. – М.: ГЭОТАР Медиа, 2010. – 264 с.
6. Погорелова Т.Н., Гунько В.О., Друккер Н.А., Крукиер И.И., Аллилуев И.А. Усиление активности пептидгидролазных систем плаценты как фактор развития осложненной беременности // *Мат. VII международного конгресса по репродуктивной медицине.* – Москва, 2013. – С. 199-201.
7. Погорелова Т.Н., Линде В.А. Метаболизм плаценты и молекулярные механизмы его регуляции. Клинико-экспериментальное исследование. – LAP LAMBERT Academic Publishing, 2012. – 200 с.
8. Hoeltzli S.D., Kelley L.K., Moe A.J., Smith C.H. Anionic amino acid transport systems in isolated basal plasma membrane of human placenta // *Am. J. Physiol.* – 1990. – Vol.259. – P.C47–C55.
9. Крукиер И.И., Погорелова Т.Н. Продукция сосудисто-эндотелиального фактора роста и эндотелина в плаценте и пуповине при нормальной и осложненной беременности // *Бюл. эксп. биол. и мед.* – 2006. – N 2. – С. 177-179.

ПОСТУПИЛА 27.07.2013