



УДК 618.2-46-3.06-36:577.12-577.2

В.О. Гунько, Т.Н. Погорелова, В.А. Линде, И.А. Аллилуев, А.В. Ларичкин

ПРОТЕОМНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ ПРИ АКУШЕРСКОЙ ПАТОЛОГИИ

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

Цель: выявить изменения протеомного спектра плаценты при осложненной беременности.

Материалы и методы: обследованы 52 женщины, из которых первую группу составили 15 женщин с неосложненной беременностью, вторую – 19 женщин с задержкой роста плода (ЗРП), третью – 18 пациенток, у которых беременность осложнилась преэклампсией. Протеомный анализ плаценты проводили с помощью двумерного электрофореза и времяпролетной масс-спектрометрии.

Результаты: проведенные исследования позволили выявить и идентифицировать белки, интенсивность продукции которых при осложненной беременности значительно отличается от таковой при физиологической беременности. Сравнительный анализ протеомных спектров плаценты женщин с ЗРП и преэклампсией обнаружил также межгрупповые различия.

Заключение: выявленные изменения в протеомном составе, очевидно, отражают нарушения молекулярно-клеточных взаимодействий в плаценте и имеют патогенетическое значение в формировании осложненной беременности. Специфика развития акушерской патологии может в определенной мере зависеть от различия протеомных спектров.

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

V.O. Gunko, T.N. Pogorelova, V.A. Linde, I.A. Alliluev, A.V. Larichkin

PROTEOMIC PROFILING IN OBSTETRIC PATHOLOGY

*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: rniiar@yandex.ru*

Purpose: detects changes in proteomic spectrum of placenta at the complicated pregnancy.

Materials and methods: 52 women are examined, of which the first group consisted of 15 women with uncomplicated pregnancy, the second - 19 women with fetal growth retardation (FGR), the third group consisted of 18 patients whose pregnancy was complicated by pre-eclampsia. Proteomic analysis of the placenta was performed using two-dimensional electrophoresis and time-of-flight mass spectrometry.

Results: the conducted researches allowed to detect and identify proteins, the intensity of which production in complicated pregnancy is significantly different from that in physiological pregnancy. Comparative proteomic analysis of proteomic spectrum of placenta of women with FGR and preeclampsia also found intergroup differences.

Summary: the revealed changes in the proteomic composition, obviously, reflect disturbances of molecular and cellular interactions in the placenta and have pathogenetic importance in formation of complicated pregnancy. The specifics of development of obstetric pathology may to some extent depend on differences proteomic spectrum.

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



Введение

Значительные успехи молекулярной медицины, достигнутые 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 [1, 2].

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. К числу лидирующих осложнений беременности, приводящих к пренатальной заболеваемости и смертности, относятся преэклампсия и задержка роста плода (ЗРП). Однако данные о протеомном спектре плаценты при этих состояниях малочисленны и неоднозначны [3].

Цель - изучение протеомного профиля плаценты при преэклампсии и ЗРП.

Материалы и методы

В исследование были включены 52 женщины 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 неосложненным течением беременности и родов, во 2-ю – 19 женщин с асимметричной формой ЗРП, 3-ю группу составили 18 пациенток, у которых беременность осложнилась преэклампсией. Степень преэклампсии оценивали, используя международную классификацию МКБ-10. По уровню артериального давления и протеинурии, а также наличию и степени выраженности отеков степень преэклампсии соответствовала коду O14.0 – преэклампсия (нефропатия) средней тяжести. В контрольной группе 7 женщин (46,7%) были первобеременными и первородящими, у 8 (53,3%) имели место два и более прерывания беременности по желанию женщины. У 3 пациенток (20%) в анамнезе наблюдались воспалительные заболевания органов малого таза. Во 2-й группе были 7 первобеременных и первородящих, у 11 повторнобеременных и повторно-родящих женщин имели место два и более прерывания беременности по желанию женщины. У 6 женщин в анамнезе были воспалительные заболевания малого таза. В 3-й группе первобеременные и первородящие составили 44,4% (8 женщин), у 10 (55,6%) повторнобеременных и повторно-родящих имели место два и более прерывания беременности по желанию женщины. У 38,8% (7 женщин) в анамнезе были воспалительные заболевания органов малого таза. Самопроизвольные выкидыши у женщин обследованных групп отсутствовали. Кесарево сечение по показаниям к оперативному родоразрешению со стороны плода было произведено у трех женщин с преэклампсией.

По возрасту, индексу массы тела, регулярности цикла, паритету беременности и родов, соматическому и акушерско-гинекологическому анамнезу пациентки обследованных групп были сопоставимы. Критериями исключения из исследования являлись декомпенсированные формы соматических заболеваний, многоплодная беременность, тяжелые формы преэклампсии, антенатальная гибель

плода, аутоиммунная патология, отсутствие информированного согласия женщины участвовать в исследовании. Для большей объективности полученных данных деление на группы проводили до биохимического исследования плаценты.

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 второго направления 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. Достоверность идентификации рассчитана по покрытию аминокислотной последовательности белка совпадающими пептидами.

Сравнительный анализ протеомных карт осуществляли по виртуальным интегрированным «мастер-гелям» двумерных электрофореграмм (программа PDQuest) плацентарной ткани. 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. Результаты оценивали как статистически значимые при $p < 0,05$.

Результаты и 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 (табл.1).

Так, при ЗРП обнаружено снижение экспрессии 18 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 [4]. Уменьшение экспрессии аннексинов A2 и A4, с учётом их роли в трансмембранном транспорте и ремоделировании цитоскелета [5], 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 [6].



Белки плаценты, идентифицированные при физиологической беременности, ЗРП и преэклампсии

№	Название белка	№ в базе Swiss-Prot	Мм, кДа	pI	Физиол. берем.	ЗРП	Преэклампсия
1	α-актинин-4 (alpha-actinin-4)	O43707	105.4	5.2	–	+*	+*
2	Эндоплазмин (endoplasmic)	P14625	92.4	4.9	–	+*	+*
3	β-тропомиозин (beta-tropomyosin)	P07951	32.8	5.1	–	+*	+*
4	α-кетоглутаратдегидро-геназа, митохондриальная (alpha-ketoglutarate dehydrogenase)	Q02218	115.9	7.0	–	+*	–*
5	Виментин (vimentin)	P08670	53.7	4.4	–	+*	–*
6	α-1-антитрипсин (alpha-1-antitrypsin)	P01009	46.9	4.4	–	+*	–*
7	Аконитатгидратаза, митохондриальная (aconitate hydratase, mitochondrial)	Q99798	85.4	7.9	–	–*	+*
8	Белок теплового шока 60 кДа, митохондриальный (60 kDa heat shock protein, mitochondrial)	P10809	61.0	4.8	–	–*	+*
9	Пероксиредоксин-4 (peroxiredoxin-4)	Q13162	30.8	5.2	–	–*	+*
10	Белок 14-3-3 эпсилон (14-3-3 protein epsilon)	P62258	29.2	5.8	–	–*	+*
11	β-актин (beta-actin)	P60709	41.7	5.2	+	–*	–*
12	α-субъединица 6 типа протеасомы (Proteasome subunit alpha type-6)	P60900	38.6	5.7	+	–*	–*
13	60S кислый рибосомальный белок (60S acidic ribosomal protein PO)	P05388	34.2	5.6	+	–*	–*
14	Аннексин А4 (annexin A4)	P09525	32.9	5.4	+	–*	–*
15	Субъединица 2 комплекса Arp 2/3 (Arp 2/3 complex subunit 2)	O15144	32.1	6.2	+	–*	–*
16	α-тропомиозин (alpha-tropomyosin)	P09493	32.7	4.2	+	–*	–*
17	α-центрактин (alpha-centractin)	P61163	42.6	6.2	+	–*	+*
18	γ-актин (gamma-actin)	P63261	41.7	5.3	+	–*	+*
19	Актин-подобный белок 2 (actin-related protein 2)	P61160	38.7	6.3	+	–*	+*
20	Актин-подобный белок 3 (Actin-related protein 3)	P61158	52.3	5.4	+	–*	+*
21	Нейтральная α-гликозидаза АВ (neutral alpha-glucosidase AB)	Q14697	96.8	5.7	+	–*	+*
22	γ-аминобутиральдегид-дегидрогеназа (4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase)	P49189	53.8	5.6	+	–*	+*
23	Цитратсинтаза, митохондриальная (citrate synthase mitochondrial)	O75390	38.0	7.0	+	–*	+*
24	Дельта(3.5)-Дельта(2.4)-диеноил-КоА-изомераза, митохондриальная (delta(3.5)-delta(2.4)-dienoyl-CoA isomerase mitochondrial)	Q13011	30.1	6.9	+	–*	+*
25	Прохибитин (prohibitin)	P35232	29.8	5.1	+	–*	+*
26	Эндоплазматический ретикулярный белок ERp29 (endoplasmic reticulum protein ERp29)	P30040	29.0	5.2	+	–*	+*
27	Аннексин А2 (annexin A2)	P07355	28.0	7.0	+	–*	+*
28	Ингибитор диссоциации 2 гуанозиндифосфата (guanosine diphosphate dissociation inhibitor 2)	P50395	50.6	6.1	+	–*	+*

Примечание. «+» - появление белка, «-» - отсутствие белка, Мм-молекулярная масса, pI - изоэлектрическая точка, * – появление или отсутствие белков при осложненной беременности относительно физиологической статистически значимо (p<0,001).



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 актиноподобных белков 2 и 3, а также β - и γ -актинов, выполняющих различные функции, в том числе контроль процессов транскрипции [7], то нарушение их продукции будет сопровождаться угнетением данных функций. Снижение экспрессии кислого рибосомального белка 60S, участвующего в регулировании реакций трансляции, усугубляет метаболический дисбаланс в плаценте при ЗРП.

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 частности, усиливает экспрессию генов, запускающих апоптоз [7]. Повышенная продукция виментина и β -тропомиозина, отвечающих за сохранность структуры цитоскелета [7], может иметь компенсаторное значение, направленное на поддержание клеточной целостности в условиях осложненной гестации. Не вполне ясны последствия для развития ЗРП увеличения экспрессии эндоплазматического шаперона, играющего важную роль в эндоплазматическом ретикулеуме при ядерной сигнализации, фолдинге и секреции ряда белков [8]. По-видимому, изменение его продукции в плаценте будет отражаться на процессах, находящихся в сфере влияния данного полипептида – белковом гомеостазе и клеточной дифференцировке.

Протеомный анализ плаценты при беременности, осложнившейся преэклампсией, выявил отсутствие 19 белков, из которых нами идентифицировано 6. В их числе следует отметить субъединицу 2 комплекса Agr 2/3 (actin-related protein – актин-подобный белок), 20S протеасому (α -субъединица 6-типа), ответственную за интенсивность катаболической фазы плацентарного метаболизма, 60S кислый рибосомальный белок, необходимый для осуществления процессов трансляции. Кроме того, обнаружено снижение экспрессии аннексина A4, β -актина и α -тропомиозина. Известно, что немышечные изоформы актина находятся в цитоплазматических структурах в виде микрофиламентов, участвующих в транспорте внешнего сигнала с поверхности клетки в ядро [7]. В то же время,

α -тропомиозин, комплексируясь с актиновыми филаментами, обеспечивает миграцию клеточных цитокенез [7].

Развитие преэклампсии сопровождается появлением дополнительных белков-отличия, из которых 7 идентифицировано. Выявленное повышение экспрессии митохондриальной аконитатгидратазы и пероксиредоксина-4 может играть значительную роль в изменении свободнорадикальных процессов и редокс-статуса плаценты, а также модификации степени восстановления электронов дыхательной цепи в митохондриях плаценты. Нарушение этих процессов является важной составляющей развития окислительного стресса, сопровождающего, как известно, прогрессирование преэклампсии.

Усиленная продукция таких молекулярных шаперонов как белок теплового шока 60 (Hsp60) и эндоплазматин, контролирующих процессы ремоделирования нативного состояния белков [8, 9], 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 [10]. 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. Различия в протеомных спектрах плаценты может определять специфику развития акушерской патологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Barbosa E.B., Vidotto A., Polachini G.M. et al. Proteomics: methodologies and applications to the study of human diseases // Rev. Assoc. Med. Bras. – 2012. – Vol. 58, N 3. – P. 366-375.
2. Upadhyay R.D., Balasinar N.H., Kumar A.V. et al. Proteomics in reproductive biology: beacon for unraveling the molecular complexities // Biochim. Biophys. Acta. – 2013. – Vol. 1834, N 1. – P. 8-15.
3. Gharesi-Fard B., Zolghadri J., Kamali-Sarvestani E. Proteome differences of placenta between pre-eclampsia and normal pregnancy // Placenta. – 2010. – Vol.31, N 2. – P.121-125.
4. 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, N 4. – P. 557-566.
5. Rescher U, Gerke V. Annexins-unique membrane binding proteins with diverse functions // J. Cell Sci. – 2004. – Vol.117, Pt 13. – P.2631-2639.
6. Artal-Sanz M., Tavernarakis N. Prohibitin and mitochondrial biology // Trends Endocrinol. Metab. – 2009. – Vol. 20, N 8. – P. 394-401.
7. Пинаев Г.П. Сократительные системы клетки: от мышечного сокращения к регуляции клеточных функций // Цитология. – 2009. – Т. 51, N 3. – С. 172-181.
8. Yang Y., Li Z. Roles of heat shock protein gp96 in the ER quality control: redundant or unique function? // Mol. Cells. – 2005. – Vol. 20, N 2. – P. 173-182.
9. Cappello F., Conway de Macario E., Marasà L. et al. Hsp60 expression, new locations, functions and perspectives for cancer diagnosis and therapy // Cancer Biol. Ther. – 2008. – Vol. 7, N 6. – P. 801-809.
10. Zuo S., Xue Y., Tang S. et al. 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, N 7. – P. 3465-3478.