

ИЗМЕНЕНИЕ СОСТАВА СЛОЖНЫХ БЕЛКОВ В СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЯХ СИНЦИТИОТРОФОБЛАСТА ПРИ ПЛАЦЕНТАРНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Т.Н. Погорелова

д.б.н., профессор, гл. науч. сотрудник,
НИИ акушерства и педиатрии, Ростовский государственный медицинский университет (г. Ростов-на-Дону)
E-mail: tnp.miiar@yandex.ru

В.О. Гунько

к.б.н., ст. науч. сотрудник,
НИИ акушерства и педиатрии, Ростовский государственный медицинский университет (г. Ростов-на-Дону)

А.А. Никашина

к.б.н., науч. сотрудник,
НИИ акушерства и педиатрии, Ростовский государственный медицинский университет (г. Ростов-на-Дону)

Н.В. Палиева

д.м.н., гл. науч. сотрудник, акушерско-гинекологический отдел,
НИИ акушерства и педиатрии, Ростовский государственный медицинский университет (г. Ростов-на-Дону)

Л.В. Каушанская

д.м.н., гл. науч. сотрудник, акушерско-гинекологический отдел,
НИИ акушерства и педиатрии, Ростовский государственный медицинский университет (г. Ростов-на-Дону)

А.С. Дегтярева

к.б.н., науч. сотрудник,
НИИ акушерства и педиатрии, Ростовский государственный медицинский университет (г. Ростов-на-Дону)

Актуальность. В обеспечении нормального течения беременности и развития плода важную роль играют регуляторные процессы в плаценте, контролируемые метаболизмом ее белков. Нарушения указанных процессов могут приводить к недостаточности плаценты, занимающей ведущее место среди осложнений гестации.

Цель работы. Изучить состав сложных белков в субклеточных фракциях синцитиотрофобласта плаценты при плацентарной недостаточности.

Материал и методы. Материалом исследования служила ткань плаценты, субклеточные фракции синцитиотрофобласта которой получали путем дифференциального ультрацентрифугирования в градиенте сахарозы. Белки разделяли методом электрофореза в полиакриламидном геле. Количественную оценку глико-, липо- и нуклеопротеинов проводили денситометрически после их специфического окрашивания.

Результаты. Установлено нарушение продукции этих белков при плацентарной недостаточности, зависящее от их природы и характера клеточной фракции. Для большей части всех белков характерны не только снижение уровня, но и перераспределение в зонах с разной молекулярной массой, а также модификация электрофоретической подвижности. Наряду с различиями в составе и свойствах апопротеинов, нарушения затрагивают и входящие в состав сложных белков небелковые компоненты: нуклеиновые кислоты, фосфолипиды, олигосахаридные структуры гликопротеинов. Эти изменения отражаются на регуляторных функциях сложных белков плаценты.

Выводы. Выявленные повреждения, очевидно, являются важными звеньями в цепи молекулярно-клеточных нарушений, сопровождающихся развитием плацентарной недостаточности.

Ключевые слова: плацента, сложные белки, субклеточные фракции, плацентарная недостаточность.

Для цитирования: Погорелова Т.Н., Гунько В.О., Никашина А.А., Палиева Н.В., Каушанская Л.В., Дегтярева А.С. Изменение состава сложных белков в субклеточных фракциях синцитиотрофобласта при плацентарной недостаточности. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2021;24(1):38–42. <https://doi.org/10.29296/25877313-2021-01-06>

В настоящее время не вызывает сомнения необходимость выяснения особенностей регуляции метаболических процессов в репродуктивных органах при физиологической и осложненной беременности. Особую роль в обеспечении нормаль-

ного течения беременности и развития плода играет плацента, обеспечивающая гомеостаз во всей системе мать – плацента – плод. Недостаточность плаценты (дисфункция плаценты) – серьезное и наиболее часто встречающееся осложнение геста-

ции [1]. В структуре перинатальной заболеваемости и смертности плацентарной недостаточности (ПН) принадлежит от 35 до 50%.

Одним из приоритетных направлений в изучении патогенетических аспектов этой патологии является анализ ее белков, играющих ключевую роль в метаболизме клеток и их структурных составляющих: митохондрий, цитоплазмы, мембран. В каждой из них локализован ряд специфических механизмов, обеспечивающих жизнедеятельность клеток, в том числе: активный транспорт, контактные взаимодействия, рецепция, генерация энергии, обеспечение трофических процессов и иммунологической совместимости матери и плода. В выполнении перечисленных функций большая роль принадлежит сложным белкам, в состав которых входят глико-, липо-, нуклеопротеины, расширяющие регуляторные возможности белковых молекул. Нарушение синтеза и обмена этих белков в плаценте, несомненно, будет вносить немаловажный вклад в формирование и дальнейшее развитие ПН.

Цель работы – изучение состава сложных белков в субклеточных фракциях синцитиотрофобласта при физиологической беременности и недостаточности плаценты.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В проспективное исследование были включены 62 женщины в возрасте 22–28 лет. Контрольную группу составили 28 клинически здоровых женщин с неосложненным течением беременности и родов. Основная группа представлена 34 женщинами, беременность которых осложнилась ПН, верифицированной после родов. Работу проводили на базе подразделений Ростовского государственного медицинского университета с учетом требований Хельсинской Декларации (2008) и приказа Минздрава РФ от 01.11.2012 №572н.

Критериями исключения из исследования служили: инфекционные заболевания, декомпенсированные формы соматических болезней, доношенная беременность, признаки преэклампсии и задержки роста плода, отсутствие информированного согласия на расширенный протокол исследования. Критериями включения в основную группу были: нарушения кровотока в клеточно-плацентарном или плодово-плацентарном звене по данным доплерометрии, проявления гипоксии при кардиотокографии. Отставание роста плода по показателям УЗ-фетометрии отсутствовало. Микроскопические исследования выявили в плацентах

женщин основной группы патологические изменения, являющиеся морфологическими критериями ПН: участки кальциноза, фиброз, гиперваскуляризация ворсин, межворсинчатые кровоизлияния.

Материалом для исследования служила ткань плаценты, взятая сразу после родов при соблюдении холодого режима ($t = 2-4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Субклеточные фракции из гомогенатов плаценты получали с помощью классического метода дифференциального ультрацентрифугирования в градиенте сахарозы [2, 3]. Белки выделенных субклеточных фракций разделяли методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ), используя прибор Protein II xiMulti-Cell («Bio-Rad», США). Для выявления природы белков гели окрашивали пиронином Г (нуклеопротеины), суданом черным (липопротеины) и реактивом Шиффа (гликопротеины). Количественную оценку электрофореграмм после окрашивания выполняли на денситометре «Camag TLC Scanners II» (Швейцария) с интегратором фирмы «Hewlett Packard» (США). Более полную характеристику сложных белков получали с помощью определения их небелковых составляющих.

Для идентификации нуклеиновых компонентов нуклеопротеиновых зон проводили качественные реакции с орцином (окраска на рибозу) и дифенилаланином (окраска на дезоксирибозу). Углеводные компоненты гликопротеинов – гексозы, гексозамины, N-ацетилнейраминовые (сиаловые) кислоты – оценивали спектрофотометрическими методами с использованием специфических реактивов [4, 5]. Во фракциях окрашенных липопротеинов после их электрофоретического разделения определяли содержание неорганического фосфора, поскольку именно эти фракции особенно важны для функций плаценты. Для определения молекулярных масс белков часть гелей перед электрофорезом калибровали коммерческими препаратами белков с известными молекулярными массами от 250 до 12,5 кDa (Polyleltide SDS-PAG Estandards, «Bio-Rad», США).

Статистическую обработку данных осуществляли, используя лицензированный пакет программ Statistica 6,0 («StatSoft Inc.»). Данные представлены в виде среднего значения (M) и средней квадратической ошибки (m). Статистическую значимость различий между показателями определяли по критерию Стьюдента (t -критерий). Результаты оценивали как статистически значимые при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о высокой гетерогенности сложных белков субклеточных фракций плаценты. Для цитоплазматических белков при физиологической и осложненной беременности характерно наличие 15 фракций гликопротеинов, 11 – липопротеинов и 7 – нуклеопротеинов. Мембранные белки отличаются наиболее высоким содержанием гликопротеинов, представленных 18 фракциями. В митохондриальных белках по сравнению с другими в большем количестве обнаруживаются нуклеопротеины – 10 фракций. Разнокачественность физико-химических свойств сложных белков плаценты подтверждается их распределением по молекулярным массам (250–25 кDa).

При ПН обнаружены значительные изменения как в общем уровне сложных белков, так и их процентном содержании в разных электрофоретических (ЭФ) зонах. Уровень цитоплазматических белков, особенно в области «стартовых» нуклеопротеинов (молекулярная масса 250–240 кDa), снижается на 27,2% (в норме данная величина составляет $30,6 \pm 1,8$ мкмоль/мг белка, а при ПН – $22,3 \pm 1,4$ мкмоль/мг белка ($p < 0,01$)). В то же время этот показатель в быстромигрирующих фракциях (молекулярная масса 25–35 кDa), напротив, повышается на 22,3% ($p < 0,05$) и составляет $28,9 \pm 1,9$ мкмоль/мг белка (в норме – $23,6 \pm 1,7$ мкмоль/мг белка). Очевидно, это происходит за счет ограниченной деструкции макромолекул с освобождением мелких фрагментов, переходящих в зону белков с меньшими молекулярными массами. Обращает на себя внимание изменение состава нуклеиновых компонентов в нуклеопротеиновых зонах белков цитоплазмы: возрастает количество зон РНК-нуклеопротеинов на фоне снижения зон ДНК-нуклеопротеинов.

В состав цитоплазмы входит также большое количество (более 30% ее белкового фонда) специфических белков беременности плацентарного происхождения, имеющих гликопротеиновую природу и выполняющих важные клеточные функции. Они участвуют в осуществлении трофических, осмотических, транспортных процессов, обеспечении иммунологической совместимости матери и плода [6]. Общее содержание гликопротеинов во всех зонах цитоплазматической фракции снижается при ПН на 34,5% ($p < 0,01$) относительно контрольных показателей ($41,2 \pm 2,5$ мкмоль/мг белка) и составляет $27,0 \pm 1,9$ мкмоль/мг белка, что с учетом их роли в метаболизме плаценты приводит к существенным

негативным последствиям в гомеостазе фетоплацентарного комплекса. Аналогичная направленность изменений имеет место и для липопротеинов, концентрация которых снижается на 29,3% ($p < 0,01$). В норме эта величина равна $53,1 \pm 3,2$ мкмоль/мг белка, а при ПН – $36,4 \pm 2,3$ мкмоль/мг белка. Причем снижение обнаруживается как для «медленных», так и «быстрых» фракций.

Показатели глико-, липо- и нуклеопротеинов в мембранах плаценты женщин контрольной группы равны $56,5 \pm 3,7$; $42,1 \pm 2,8$; $30,6 \pm 2,1$ мкмоль/мг белка соответственно. В основной группе женщин эти величины составляют $38,7 \pm 2,7$, $26,9 \pm 1,9$, $22,9 \pm 1,5$ мкмоль/мг белка, что на 31,5% ($p < 0,01$), 36,2% ($p < 0,01$) и 25,4% ($p < 0,05$) ниже нормы. Причем наряду со снижением уровня белков наблюдается изменение ЭФ-подвижности некоторых фракций, что свидетельствует о модификации их качественных характеристик. Последнее подтверждается различиями при ПН в содержании отдельных углеводных компонентов мембранных гликопротеинов. На фоне снижения гексоз и N-ацетилнейраминовой кислоты (на 35–39% ($p < 0,001$)) повышается уровень гексозаминов (на 30,1% ($p < 0,01$)). Углеводные компоненты мембран, входящие в состав гликопротеинов плаценты, выполняют чрезвычайно важные функции. Они принимают активное участие в процессах дифференциации и взаимного распознавания клеток, межклеточных контактах, адгезии, служат рецепторами гормонов, медиаторов, антигенов и других веществ. Большие потенциальные возможности для такой всесторонней рецепции обусловлены разнообразием олигосахаридных структур гликопротеинов. Поэтому изменение их содержания при ПН несомненно приводит к нарушению регуляторных возможностей, прежде всего, апопротеинов в составе гликопротеиновых комплексов. Модификация компонентов сложных белков во многом объясняет ранее полученные данные об изменении первичной структуры цитоплазматических и мембранных белков плаценты при ее недостаточности [7].

Для митохондриальных структур при ПН также имеют место нарушения природы сложных белков. Особенно это касается липопротеинов, в состав которых входят фосфолипиды, а также РНК-нуклеопротеинов. Содержание липопротеинов снижается на 35,3% и составляет при ПН $0,87 \pm 0,05$ мкмоль/мг белка ($p < 0,001$). В контрольной группе этот показатель равен $1,34 \pm 0,07$ мкмоль/мг белка. По данным литературы, фосфолипидные

фракции и их составляющие могут быть одним из факторов, направленных на обеспечение эффективного внутри- и межклеточного транспорта пластических и энергетических продуктов [8], что особенно важно для митохондрий. Внутриклеточная ситуация при ПН усугубляется тем, что наряду с изменением состава липопротеинов нарушается их структура в результате снижения устойчивости к свободнорадикальному окислению [9]. Содержание РНК-нуклеопротеинов в митохондриях при недостаточности плаценты снижено на 29,3%. Если в норме их уровень равен $24,6 \pm 1,6$ мкмоль/мг белка, то при осложненной гестации – $17,4 \pm 1,1$ мкмоль/мг белка ($p < 0,01$). Что касается этих сложных белков, то особое значение имеют входящие в их состав адениннуклеотиды, присутствующие в плаценте в больших количествах [10]. Поскольку именно митохондрии ответственны за процессы генерации энергии, обнаруженное нами уменьшение уровня РНК-нуклеопротеинов и их структурных составляющих, в частности, адениннуклеотидов, будет сопровождаться снижением энергетического потенциала клеток.

Анализируя возможные последствия выявленных нарушений, следует подчеркнуть, что, с учетом функций белков изученных субклеточных фракций, важную роль будут играть: ухудшение внутри- и межклеточного транспорта компонентов, необходимых плаценте и плоду для обеспечения трофических, энергетических и иммунологических процессов; снижение рецепции молекул, осуществляющих передачу внеклеточного сигнала к эффекторным системам клетки и другие регуляторные реакции.

ВЫВОДЫ

Формирование ПН происходит на фоне нарушения состава сложных белков, локализован-

ных в митохондриях, цитоплазме, мембранах плаценты и выполняющих важные клеточные функции. Кроме содержания белков, изменения касаются и небелковых компонентов, входящих в их состав и расширяющих регуляторные возможности белковых молекул. Выявленные модификации липо-, глико- и нуклеопротеинов сопровождаются нарушением гомеостаза не только в плаценте, но и во всем фетоплацентарном комплексе.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Jansson T.* Placenta plays a critical role in maternal-fetal resource allocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016; 113(40):11066–11068.
2. *Dimauro I., Pearson T., Caporossi D., Jackson M.J.* A simple protocol for the subcellular fractionation of skeletal muscle cells and tissue. *BMC Res. Notes.* 2012; 5:513.
3. *Jimenez V., Henriquez M., Llanos P., Riquelme G.* Isolation and purification of human placental plasma membranes from normal and pre-eclamptic pregnancies. A comparative study. *Placenta.* 2004; 25(5): 422–437.
4. Медицинские лабораторные технологии: руководство по клинической лабораторной диагностике. Под ред. *А.И. Карпищенко.* Изд. 3-е. М.: ГЭОТАР-Медиа. 2013. Т. 2. 136 с.
5. Современные проблемы биохимии. Методы исследований: учеб. Пособие. Под ред. *А.А. Чиркина.* Минск: Вышэйшая школа. 2013. 492 с.
6. *Than G.N., Bohn H., Szabo D.G.* Advances in pregnancy-related protein research functional and clinical applications. Boca Raton: CRC Press. 2020. 352 p.
7. *Погорелова Т.Н., Гунько В.О., Никашина А.А.* Влияние модификации первичной структуры цитоплазматических и мембранных белков плаценты на развитие ее недостаточности. *Российский вестник акушера-гинеколога.* 2017; 17(1): 4–8.
8. *Погорелова Т.Н., Линде В.А., Гунько В.О., Крукиер И.И., Селютина С.Н.* Метаболизм, транспорт и состав липидов в плаценте. *Фундаментальные исследования.* 2015; (2–26): 5832–5836.
9. *Sastre J., Pallardó F.V., Viña J.* Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis. *IUBMB Life.* 2000; 49(5): 427–435.
10. *Погорелова Т.Н., Гунько В.О., Линде В.А.* Циклазные системы и механизмы клеточной регуляции в плаценте. *Успехи современного естествознания.* 2014; (5–2): 94–101.

Поступила 19 октября 2020 г.

CHANGES IN THE COMPOSITION OF COMPLEX PROTEINS IN SUBCELLULAR FRACTIONS OF SYNCYTIOTROPHOBLAST IN PLACENTAL INSUFFICIENCY

© Authors, 2021

T.N. Pogorelova

Dr.Sc. (Biol.), Professor, Chief Research Scientist,
Rostov State Medical University (Rostov-on-Don)
E-mail: tnp.miiap@yandex.ru

V.O. Gunko

Ph.D. (Biol.), Senior Research Scientist,
Rostov State Medical University (Rostov-on-Don)

A.A. Nikashina

Ph.D. (Biol.), Research Scientist,
Rostov State Medical University (Rostov-on-Don)

N.V. Palieva

Dr.Sc. (Med.), Chief Research Scientist,
Rostov State Medical University (Rostov-on-Don)

L.V. Kaushanskaya

Dr.Sc. (Med.), Chief Research Scientist,
Rostov State Medical University (Rostov-on-Don)

A.S. Degtyareva

Ph.D. (Biol.),
Research Scientist, Rostov State Medical University (Rostov-on-Don)

Relevance. Regulatory processes in the placenta, controlled by the metabolism of its proteins, play an important role in ensuring the normal course of pregnancy and fetal development. Violations of these processes can lead to failure of the placenta, which occupies a leading place among complications of gestation.

The aim of study: to study the composition of complex proteins in the subcellular fractions of placental syncytiotrophoblast in placental insufficiency (PI).

Material and methods. The material of the study was the placental tissue, the subcellular fractions of syncytiotrophoblast of which were obtained by differential ultracentrifugation in a sucrose gradient. Proteins were separated by polyacrylamide gel electrophoresis. Quantification of glyco-, lipo- and nucleoproteins was carried out densitometrically after their specific staining.

Results. Disruption of the production of these proteins in PI was established, depending on their nature and the nature of the cell fraction. Most of all proteins are characterized not only by a decrease in the level, but also by redistribution in zones with different molecular weights, as well as a modification of electrophoretic mobility. Along with differences in the composition and properties of apoproteins, disorders also affect non-protein components that are part of complex proteins: nucleic acids, phospholipids, oligosaccharide structures of glycoproteins. These changes are reflected in the regulatory functions of complex proteins in the placenta.

Conclusion. The revealed damages are obviously important links in the chain of molecular-cellular disorders, accompanied by the development of PI.

Key words: *placenta, complex proteins, subcellular fractions, placental insufficiency.*

For citation: Pogorelova T.N., Gunko V.O., Nikashina A.A., Palieva N.V., Kaushanskaya L.V., Degtyareva A.S. Changes in the composition of complex proteins in subcellular fractions of syncytiotrophoblast in placental insufficiency. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2021;24(1):38–42. <https://doi.org/10.29296/25877313-2021-01-06>

REFERENCES

1. Jansson T. Placenta plays a critical role in maternal-fetal resource allocation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2016; 113(40):11066–11068.
2. Dimauro I., Pearson T., Caporossi D., Jackson M.J. A simple protocol for the subcellular fractionation of skeletal muscle cells and tissue. BMC Res. Notes. 2012; 5:513.
3. Jimenez V., Henriquez M., Llanos P., Riquelme G. Isolation and purification of human placental plasma membranes from normal and pre-eclamptic pregnancies. A comparative study. Placenta. 2004; 25(5): 422–437.
4. Medicinskie laboratornye tehnologii: rukovodstvo po klinicheskoy laboratornoj diagnostike. Pod red. A.I. Karpishhenko. Izd. 3-e. M.: GJeOTAR-Media. 2013. T. 2. 136 s.
5. Sovremennyye problemy biohimii. Metody issledovaniy: ucheb. Posobie. Pod red. A.A. Chirkina. Minsk: Vyshhejschaya shkola. 2013. 492 s.
6. Than G.N., Bohn H., Szabo D.G. Advances in pregnancy-related protein research functional and clinical applications. Boca Raton: CRC Press. 2020. 352 p.
7. Pogorelova T.N., Gun'ko V.O., Nikashina A.A. Vliyanie modifikatsii pervichnoy struktury citoplazmaticheskikh i membrannykh belkov placenty na razvitiye ee dostatochnosti. Rossijskiy vestnik akushera-ginekologa. 2017; 17(1): 4–8.
8. Pogorelova T.N., Linde V.A., Gun'ko V.O., Krukier I.I., Seljutina S.N. Metabolizm, transport i sostav lipidov v placentе. Fundamental'nye issledovaniya. 2015; (2–26): 5832–5836.
9. Sastre J., Pallardó F.V., Viña J. Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis. IUBMB Life. 2000; 49(5): 427–435.
10. Pogorelova T.N., Gun'ko V.O., Linde V.A. Ciklaznyye sistemy i mehanizmy kletочноy regulatsii v placentе. Uspehi sovremennogo estestvoznaniya. 2014; (5-2): 94–101.