

УДК 577.352.332:611-018.1:618.36:616.523-036.65

М.Т.Луценко, И.А.Андреевская, Н.Н.Дорофиев

ОЦЕНКА РОЛИ БЕЛКА HPS 70 В СИНЦИТИОТРОФОБЛАСТЕ ПЛАЦЕНТЫ ПРИ ОБОСТРЕНИИ ГЕРПЕС-ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ В ПЕРИОД ГЕСТАЦИИ*Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания Сибирского отделения РАМН, Благовещенск***РЕЗЮМЕ**

Изучена роль белка теплового шока Hps 70 в гомогенатах плацент от женщин с герпесной инфекцией во время беременности и его влияние на структуру цитозоля и апоптоз ядер синцитиотрофобласта. Установлено уменьшение содержания Hps 70 в гомогенатах плацент от женщин с герпесной инфекцией во время беременности, нарушение структуры цитозоля (вакуолизация) и увеличение ядер синцитио-трофобласта в состоянии апоптоза.

Ключевые слова: синцитиотрофобласт, вирус герпеса, белок теплового шока 70, апоптоз.

SUMMARY

M.T.Lutsenko, I.A.Andriyevskaya, N.N.Dorofienko

ESTIMATION OF PROTEIN HPS 70 ROLE IN SYNCYTIOTROPHOBLAST OF PLACENTA AT EXACERBATION OF HERPES-VIRUS INFECTION DURING GESTATION

The role of protein Hps 70 in homogenate of placentas from women with herpes infection during pregnancy and its influence on the structure of cytosol and syncytiotrophoblast nuclei apoptosis were studied. The decrease of protein Hps 70 in homogenate of placentas from women with herpes virus infection during pregnancy, the disorder of cytosol structure (vacuolization) and the increase of nuclei of syncytiotrophoblast in the state of apoptosis were revealed.

Key words: syncytiotrophoblast, herpes virus, protein Hps 70, apoptosis.

Белок теплового шока Hps 70 принимает участие в процессах репарации и элиминации неправильно свернутых или денатурированных белков [10, 11, 13, 15, 18]. Воздействие неблагоприятных факторов приводит к повышению экспрессии белков Hps 70 и удерживает цитозоль от повреждения, предотвращая агрегацию частично денатурированных белков [4, 5, 14]. Белки теплового шока принимают участие в регуляции апоптоза. Строение белков Hps 70 может изменяться при воздействии на клетку IL-1 или TNF α [6, 7]. Однако в литературе отсутствуют данные, отражающие влияние вирусных инфекций на структуру и содержание в цитоплазме белков теплового шока.

Задачей нашего исследования явилось изучение содержания белка Hps 70 в гомогенате плаценты при поражении организма женщины вирусом простого герпеса 1 типа (ВПГ-1) во время беременности. Одновременно изучалось строение цитозоля синцитиотрофобласта ворсин плацент от этих женщин.

Материалы и методы исследования

Материалом для исследования послужила плацента от женщин, перенесших во время беременности обострение герпес-вирусной инфекции с титром антител IgG к ВПГ-1 1:1600 (20 случаев), титром антител 1:6400 (20 случаев) и титром антител 1:12800 (20 случаев). Контролем служили плаценты от 20 рожениц с физиологическим течением беременности. Исследования проводились на базе родильного отделения Областного родильного дома г. Благовещенска. Исследования выполнялись с учетом рекомендаций Хельсинкской декларации Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правил клинической практики в Российской Федерации», утвержденных приказом МЗ РФ от 19.06.2003 г. № 266.

Для получения гомогената плодовая часть плаценты (ворсинчатый хорион) срезалась скальпелем небольшими пластинками площадью до 2-3 см и толщиной 1 мм. Кусочки ткани помещали в химические стаканы, содержащие 200 мл физиологического раствора, отмывали от клеток крови, перемешивая на магнитной мешалке в течение 15 мин. и подсушивали на фильтровальной бумаге. Затем ткань растирали пестиком в фарфоровой ступке и гомогенизировали до однородной массы. К полученному гомогенату добавляли физиологический раствор в объеме, равном изначальному весу ткани (на 1 г – 1 мл физиологического раствора). Гомогенат замораживали при -20°C в течение суток. Затем его размораживали и центрифугировали при 4000 об/мин при температуре +4°C. Надосадочную жидкость разливали мелкими аликвотами и хранили при -20°C до проведения ИФА.

Определение белка Hps 70 проводили с использованием наборов «ELISA Kit» (США). Верификацию ВПГ-1 и степень выраженности обострения инфекционного процесса оценивали по динамике титров антител IgG в парных сыворотках с использованием стандартных тест систем ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск).

Электронно-микроскопические исследования выполняли по стандартным методикам с конечной заливкой в аралдит. Ультратонкие срезы готовили на ультрамикротоме «LKB» (Швеция), контрастировали уранил-ацетатом. Для просмотра и цифрового фотографирования использовали микроскоп «Tesla» (Чехия). Морфологическую детекцию апоптоза проводили на парафиновых срезах плаценты по метке концов фрагментов ДНК по ISEL-методу (*in situ end labeling*) [1].

Все данные обработаны с помощью пакета программных документов методом вариационной статистики с использованием непарного критерия Стьюдента (t).

Результаты исследования и их обсуждение

Исследования показали, что среднее содержание белка Hps 70 в гомогенатах плацент достоверно снижалось по мере нарастания титра антител IgG к ВПГ-1. Если в контроле количество Hps 70 составило $56,1 \pm 2,6$ нг/мл, то при обострении герпесной инфекции во время беременности его содержание в гомогенатах плацент снижалось до следующих значений: при титре антител IgG к ВПГ-1 1:1600 до $34,7 \pm 1,9$ нг/мл ($p < 0,001$ в сравнении с контролем), при титре антител 1:6400 до $30,4 \pm 2,4$ нг/мл ($p < 0,001$ в сравнении с контролем) и при титре антител 1:12800 до $22,3 \pm 2,9$ нг/мл ($p < 0,001$ в сравнении с контролем).

Следовательно, обострение герпесной инфекции во время беременности приводит к уменьшению содержания свободной формы белка Hps 70 в плаценте, что соответствует степени агрессивности инфекции.

Причиной такого явления, прежде всего, является проникновение возбудителя в синцитиотрофобласт ворсинок плаценты (рис. 1), что оказывает непосредственное влияние на содержание белка Hps 70 и приводит к нарушению его функциональной роли – способности удерживать белки цитозоля от повреждения. Электронно-микроскопические исследования показали, что при снижении содержания свободной формы белка Hps 70 в цитозоле синцитиотрофобласта плаценты, которое характерно для титра антител IgG к ВПГ-1 1:1600, обнаруживались немногочисленные мелкие вакуоли. По мере увеличения агрессивности инфекции во время беременности, которой соответствовал титр антител 1:6400, их число и размеры заметно увеличивались (рис. 2). При титре антител 1:12800 вакуолизация цитозоля приобретала большие масштабы: вакуоли становились крупными, сдавливая рядом расположенные ядра (рис. 3).

Следовательно, прямое действие антигенов ВПГ-1 снижает функциональную активность белка Hps 70, что приводит к индукции апоптоза ядер синцитиотрофобласта.

Морфологические исследования показали, что при титре антител IgG к ВПГ-1 1:12800 в синцитиотрофобласте ворсин плаценты число ядер в состоянии апоптоза увеличивалось до $4,5 \pm 0,07\%$ (в контроле – $1,0 \pm 0,04\%$; $p < 0,001$) (рис. 4).

При обсуждении полученных нами результатов следует отметить, что белки семейства Hps 70 взаимодействуют с вновь синтезируемой на рибосомах полипептидной цепью, предотвращают преждевременное неправильное сворачивание незрелой полипептидной цепи и участвуют в транспорте белка к митохондриям, эндоплазматическому ретикулуму [17, 19]. Белки теплового шока увеличивают резистентность клеток к по-

вреждающим факторам. Они предотвращают агрегацию частично денатурированных белков в клетке – термоагрегацию таких ферментов, как малатдегидрогеназа, лактатдегидрогеназа.

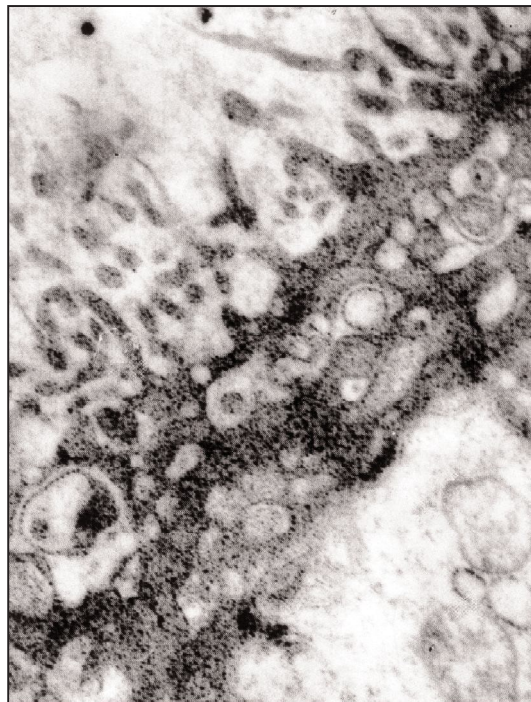


Рис.1 Синцитиотрофобласт ворсинок плаценты – внедрение вируса герпеса. Электронная микроскопия. Увеличение: 40000.



Рис. 2 Формирование вакуолей в цитозоле синцитиотрофобласта плаценты. Электронная микроскопия. Увеличение: 40000.

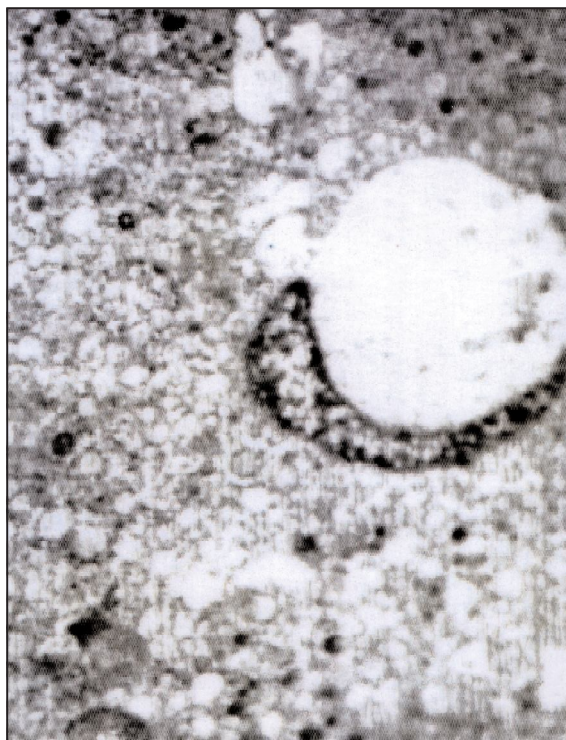


Рис. 3 Рост вакуолей в цитозоле синцитиотрофобласта плаценты. Титр антител IgG к ВПГ-1 1:12800. Электронная микроскопия. Увеличение: 15×90.

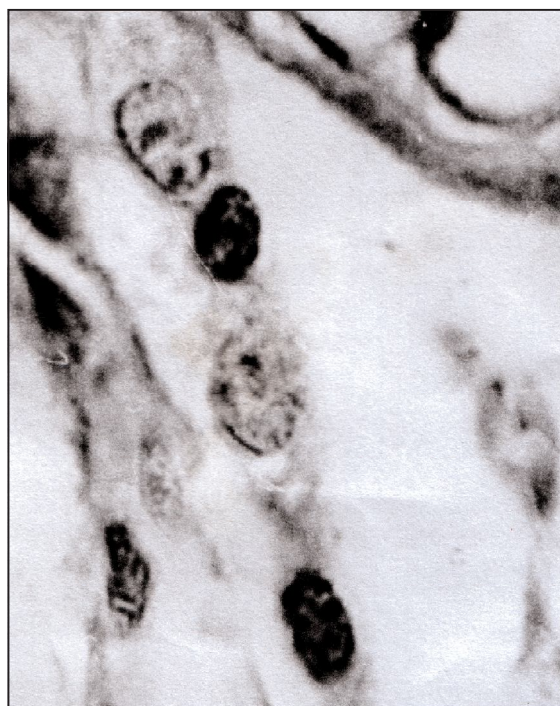


Рис. 4 В синцитиотрофобласте плаценты увеличивается число ядер в состоянии апоптоза. ISEL-метод. Увеличение: 40000.

Hsp-белки узнают и избирательно взаимодействуют с белками, находящимися в частично денатурированном состоянии. Белки теплового шока взаимодействуют преимущественно с белками-субстратами, находящимися в неупорядоченном состоянии, которые склонны к агрегации и образованию нерастворимых осадков [4, 5, 14]. Будучи в комплексе

с белком теплового шока, белки-субстраты не агрегируют и остаются в такой конформации, которая делает возможным их реактивацию под действием Hsp 70 и АТФ [16]. В последнее время установлено, что АТФ оказывает влияние на функциональную активность белков теплового шока и белков-субстратов, что приводит к более прочному связыванию частично денатурированных белков-субстратов с белками теплового шока [3, 8, 9].

Известно, что накопление белковых агрегатов является результатом их неправильного сворачивания, что нарушает нормально протекающий метаболический цикл в клетке. Белки Hsp 70 предотвращают агрегацию белков в цитозоле [2, 12, 15, 21]. Повышенное содержание белков теплового шока защищает клетку от апоптоза, связывая деятельность ферментов каспазного цикла [20]. Это свидетельствует о том, что белки теплового шока обеспечивают в клетке регуляцию процессов дифференцировки и апоптоза [6, 7].

Таким образом, группа белков теплового шока участвует в процессах предотвращения агрегации и защищает клетку от накопления денатурированных белков.

Исследуя действие ВПГ-1 в организме беременной мы находим, что проникновение вируса в синцитиотрофобласт плаценты является сильным повреждающим фактором, значительно уменьшающим содержание свободной формы белка Hsp 70, что нарушает конформацию белков цитозоля, изменяет функционирование митохондрий, приводит к освобождению в большом количестве цитохрома С, активирует каспазу-3 и приводит к усилению апоптоза ядер синцитиотрофобласта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Погорелов В.М., Козинец Г.И. Морфология апоптоза при нормальном и злокачественном гемопоэзе // Гематология и трансфузиология. 1995. Т.43, №5. С.21–24.
2. Characterization of a lidless form of the molecular chaperone DnaK: DnaK's lid inhibits transition to the low affinity state / Buczynski G. [et al.] // J. Biol. Chem. 2001. Vol.276, Iss.29. P.27231–27236.
3. A cycle of binding and release of the DnaK, DnaJ and GrpE chaperones regulates activity of the Escherichia coli heat shock transcription factor sigma 32 / Gamer J. [et al.] // EMBO J. 1996. Vol.15. P.607–617.
4. Glover J.R., Lindquist S. Hps 104, Hps 70, Hps 40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins // Cell. 1998. Vol.94. P.73–82.
5. Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bichaperon net work / Goloubinoff P. [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. Vol.96. P.13732–13737.
6. Hps 70 exerts anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases/ Jaattela M. [et al.] // EMBO J. 1998. Vol.17. P.6124–6134.
7. Jaattela M. Escaping cell death: survival proteins in cancer // Exp. Cell. Res. 1999. Vol.248. P.30–34.
8. Karzai A., McMacken R. A bipartite signaling mech-

anism involved in DnaJ-mediated activation of the Escherichia coli DnaK protein // J. Biol. Chem. 1996. Vol.271. P.11236–11246.

9. DnaJ proteins / Laufer T. [et al.] // Molecular Chaperones in proteins: structure, function and mode of action. New York: Fink A. and Goto Y. Marcel Dekker, 1998. P.241–274.

10. Heat shock resistance conferred by expression of human Hps 27 gene in rodent cells / Landry I. [et al.] // J. Cell. Biol. 1989. Vol.109. P. 715.

11. Lee G.J., Garrett J. Method for the expression of proteins in vitro translation systems with co expression of folding helper proteins // J. Biol. Chem. 1995. Vol.270. P.1042–1048.

12. Multistep mechanism of substrate binding determines chaperone activity of Hps 70 / Mayer M.P. [et al.] // Nat. Struct. Biol. 2000. Vol.7. P.586–593.

13. Mayer M.P., Bakau B. Hps 70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism // Cell. Mol. Life Sci. 2005. Vol.62, №6. P.670–684.

14. Heat-inactivated proteins are rescued by the DnaK. J-GrpE set and ClpB chaperones / Motohashi K. [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. Vol.96. P.7184–7189.

15. Structural insights into substrate binding by the mo-

lecular chaperone DnaK / Pellecchia M. [et al.] // Nat. Struct. Biol. 2000. Vol.7. P.289–303.

16. Pratt W.B. The role of the Hps 90-based chaperone system in signal transduction by nuclear receptors and receptors signaling via MAP kinase // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 1997. Vol.37. P.297–326.

17. Queitsch C., Sangster T.A., Lindquist S. Hps 90 as capacitor of phenotypic variation // Nature. 2002. Vol.417. P.618–624.

18. Roger J., Frappier H., Walden D.B. Translation of some Maire Small Heat Shock Proteins is initiated from internal in-frame AuGs // Genetics Society of America. 1998. Vol.148. P.471–478.

19. Rutherford S., Lindquist S. Hps 90 as a capacitor for morphological evolution // Nature. 1998. Vol.396. P.336–342.

20. Sakahira H., Nagata S. Co-translational folding of caspase-activated DNase with Hps 70, Hps 40 and inhibitor of caspase-activated DNase // J. Biol. Chem. 1998. Vol.277. P.3364–3370.

21. Slepnev S., Witt S. Kinetic analysis of interdomain coupling in a lidless variant of the molecular chaperone DnaK: DnaK's lid inhibits transition to the low affinity state // J. Biol. Chem.. 2002. Vol.41. P.12224–12235.

Поступила 02.02.2011

Михаил Тимофеевич Луценко, руководитель лаборатории,
675000, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22;
Mikhail T. Lutsenko,
22 Kalinina Str., Blagoveshensk, 675000;
E-mail: Lucenkomt@mail.ru

