

УДК 618.444:578.825.12

АКТИВНОСТЬ SH-ГРУПП В СИНЦИТИОТРОФБЛАСТЕ ВОРСИНОК ХОРИОНА ПРИ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

М.Т.Луценко

*Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания,
675000, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22*

РЕЗЮМЕ

Цель исследования – определить состояние активности SH-групп в синцитиотрофобласте ворсинок хориона при рецидиве цитомегаловирусной инфекции (ЦМВИ) в сроке беременности 5-7 недель. Для оценки активности SH-групп, выявляемых по методу Барнетта-Зелигмана, исследованы 15 ворсинчатых хорионов в сроке 8-9 недель, полученных при медицинском аборте от женщин с рецидивом ЦМВИ (титр антител IgG 1:1600) в сроке 5-7 недель. Контролем служили 15 ворсинчатых хорионов от ЦМВ-серонегативных женщин на тех же сроках беременности. Анализ парафиновых срезов, окрашенных по методу Барнетта-Зелигмана, выполняли цитофотометрическим методом по программе Scion. В результате исследования выявлено снижение содержания SH-групп в наружной мембране синцитиотрофобласта ворсинок хориона при рецидиве ЦМВИ (титр антител IgG 1:1600) в сроке 5-7 недель до $10,6 \pm 0,4$ усл. ед. (контроль – $20,5 \pm 0,8$ усл. ед., $p < 0,001$). Таким образом, экспрессия ЦМВ на поверхности синцитиотрофобласта ворсинок хориона, которая наиболее вероятна в период рецидива инфекции, ассоциирована со снижением содержания SH-групп и нарушением трофических процессов в фетоплацентарном барьере на ранних этапах развития эмбриона.

Ключевые слова: цитомегаловирусная инфекция, беременность, синцитиотрофобласт ворсинок хориона, SH-группы.

SUMMARY

THE ACTIVITY OF SH-GROUP IN SYNCYTIOTROPHBLAST OF CHORION VILLI AT CYTOMEGALOVIRUS INFECTION

M.T.Lutsenko

*Far Eastern Scientific Center of Physiology and
Pathology of Respiration, 22 Kalinina Str.,
Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation*

The aim of the research is to define the state of SH-group activity in syncytiotrophoblast of chorion villi under the relapse of cytomegalovirus infection (CMVI) at the stage of pregnancy of 5-7 weeks. To estimate the activity of SH-group identified by Barnett-Seligman method 15 villous chorions of 8-9 weeks obtained at the medical abortion from women with the relapse of CMVI (IgG antibody titer was 1:1600) at the stage of 5-7 weeks were studied. The control group included 15 villous chorions from CMV-seronegative women at the same stages of pregnancy. The analysis of paraffin sec-

tion dyed by Barnett-Seligman method was done by cytophotometric method by Scion program. As a result of the study the decrease of SH-group concentration was found out in the outer membrane of syncytiotrophoblast of chorion villi under CMVI relapse (IgG antibody titer was 1:1600) at the stage of 5-7 weeks till 10.6 ± 0.4 arb. units (the control was 20.5 ± 0.8 arb. units, $p < 0.001$). Thus, the expression of CMV at the surface of chorion villi syncytiotrophoblast which is the most evident during the relapse of infection is associated with the decrease of SH-group concentration and the disturbance of trophic processes in fetoplacental barrier at the early stages of embryo development.

Key words: cytomegalovirus infection, pregnancy, syncytiotrophoblast of chorion villi, SH-groups.

В белковой молекуле среди боковых цепей аминокислотных остатков большая роль принадлежит SH-группам. Это объясняется их высокой химической реакционной способностью при вступлении в разнообразные реакции со многими типами соединений. Наряду с этим привлекает внимание существенное значение SH-групп для специфических функций ряда ферментов, гормонов и других биологически активных белков, способствующих выполнению метаболических процессов в организме [2, 3, 7, 8].

В настоящее время установлено, что SH-группы играют важную роль во многих физиологических процессах: мышечном сокращении, регуляции проницаемости мембран, окислительном фосфорилировании [4, 5]. Многие реагенты могут оказывать блокирующее влияние на SH-группы [6]. Торможение активности ряда ферментов под влиянием реагентов на SH-группы обусловлено нарушением трехмерной структуры (конформации) этих ферментов. Такое нарушение может происходить либо в результате разрыва внутримолекулярных связей, в образование которых вовлечены SH-группы, либо в результате деформирующего действия ингибитора, присоединяющегося к SH-группе на соседние участки макромолекулы белка. В роли ингибиторов молекул белка клеточных мембран могут выступать антигены многих вирусов, поскольку они, сливаясь с мембраной клеток, в которую они проникают, вызывают нарушение конформации белков и подавляют активность SH-групп.

Цель исследования – определить состояние активности SH-групп в синцитиотрофобласте ворсинок хориона при рецидиве цитомегаловирусной инфекции (ЦМВИ) в сроке 5-7 недель.

Материалы и методы исследования

Исследованы 30 ворсинчатых хорионов в сроке 8-9 недель, из которых 15 получены при медицинском

аборте от серопозитивных женщин с рецидивом ЦМВИ (титр антител IgG 1:1600) в сроке 5-7 недель (основная группа) и 15 – от ЦМВ-серонегативных женщин на тех же сроках беременности (контрольная группа).

Критерии включения в основную группу: лабораторно подтвержденный молекулярно-биологическими и серологическими методами исследования рецидив ЦМВИ в сроке 5-7 недель, наличие в периферической крови беременных на момент исследования титра антител класса IgG к ЦМВ 1:1600, стойкая клиническая ремиссия герпесвирусной инфекции. К критериям исключения относили первичную ЦМВИ, обострение других воспалительных заболеваний экстрагенитальной патологии и инфекций, передающихся половым путем.

Рецидив ЦМВИ устанавливали на основании результатов комплексного исследования периферической крови: при наличии антител класса IgM или четырехкратного и более нарастания титра антител класса IgG к ЦМВ в парных сыворотках в динамике через 10 суток, при индексе avidности антител класса IgG к ЦМВ более 65%, а также в случае выявления ДНК ЦМВ методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в крови, моче, в соскобах с буккального эпителия или слизистой оболочки шейки матки.

Исследования выполнены в лаборатории механизмов этиопатогенеза и восстановительных процессов дыхательной системы при неспецифических заболеваниях легких и акушерском отделении патологии беременности при ДНЦ ФПД, Городской клинической больнице г. Благовещенска с учетом требований Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki, 2008) и Правил клинической практики в Российской Федерации, утвержденных приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. №266. Работа одобрена комитетом по биомедицинской этике при ДНЦ ФПД (решение №88 от 12.01.2015 г.) в соответствии с принципами конвенции о биомедицине и правах человека, а также общепризнанными нормами международного права. Все женщины подписали письменное информированное согласие.

У обследуемых беременных взятие крови проводили из локтевой вены в стандартные вакуумные пробирки с коагулянтом в количестве 5 мл для получения образцов мононуклеарных клеток. Для серологических исследований использовали кровь, не содержащую антикоагулянты. Выделение мононуклеарных клеток крови для ПЦР проводилось с использованием раствора фиколл-урографина плотностью 1,077 г/мл (ООО «НПО ДНК-технология», Россия). Серологические исследования проводили в парных сыворотках с интервалом 10-14 суток.

Верификация ЦМВ, определение типоспецифических антител, индекса avidности осуществляли методами ИФА на спектрофотометре Stat Fax 2100 (США) с использованием тест-систем ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск), ДНК ЦМВ выявляли методами ПЦР на ап-

парате ДТ-96 с использованием наборов НПО «ДНК-технология» (Россия).

Активность SH-групп в синцитиотрофобласте ворсинок хориона определяли гистохимическим методом по Барнетту-Зелигману с диоксидинафтилдисульфидом (ДДД) [9] на парафиновых срезах после фиксации 4% раствором параформальдегида на фосфатном буфере (pH 7,4). Оценка активности SH-групп проводилась цитофотометрическим методом с помощью компьютерной программы Scion (США).

Статистический анализ и обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.0. Для определения достоверности различий использовали непарный параметрический критерий Стьюдента. Данные представлены как среднее арифметическое (M) \pm стандартная ошибка среднего (m).

Результаты исследования и их обсуждение

Устойчивость клеточных мембран, в том числе и фетоплацентарного барьера, а также антиокислительные свойства ферментных систем цитозоля во многом определяются функциональной активностью SH-групп. Дитиол-дисульфидные превращения в активных центрах некоторых окислительных ферментов играют большую роль в промежуточных стадиях переноса электронов и протонов от субстратов к акцепторам, а именно, в процессах тканевого дыхания. Кроме того, SH-группы могут участвовать в образовании связей между ферментами и субстратами или кофакторами. Наконец, SH-группы участвуют в стабилизации каталитически активной конформации белковой молекулы ферментов. Торможение активности ряда ферментов обусловлено нарушением их конформационной структуры, которое может происходить либо в результате разрыва внутримолекулярных связей, в образование которых вовлечены SH-группы, либо в результате деформирующего воздействия ингибитора, присоединяющегося к SH-группе на соседние участки макромолекулы белка. Во многих случаях имеет место разрыв S-S-связей, что приводит к утрате белком его уникальной конформации и биологической активности. Результатом таких взаимообусловленных процессов может явиться нарушение структурной целостности белкового компонента мембран фетоплацентарного барьера, а также функциональной активности ряда ферментов цитозоля, что определяет изменение обменных и метаболических процессов, осуществляемых между матерью и развивающимся плодом в условиях рецидива ЦМВИ, наиболее опасного в ранние сроки беременности.

Доказательством явилось значительное снижение содержания SH-групп в синцитиотрофобласте ворсинок хориона до $10,6 \pm 0,4$ усл. ед. (контроль – $20,5 \pm 0,8$ усл. ед., $p < 0,001$) при рецидиве ЦМВИ (титр антител IgG к ЦМВ 1:1600) в сроке 5-7 недель (рис. 1, 2).

Одним из механизмов, запускающих каскад мембранодестабилизирующих процессов, является экспрессия ЦМВ на клеточной поверхности. Связыванию наружной мембраны ЦМВ с мембраной клетки и его

проникновению внутрь клетки способствуют тегументные белки gP64. В процессе слияния вируса и клетки нарушается конформационная устойчивость белков клеточной мембраны, происходит дезинтеграция фосфолипидного слоя, что, по мнению многих авторов [7, 8], является решающим фактором в подавлении активности SH-групп, входящих в состав

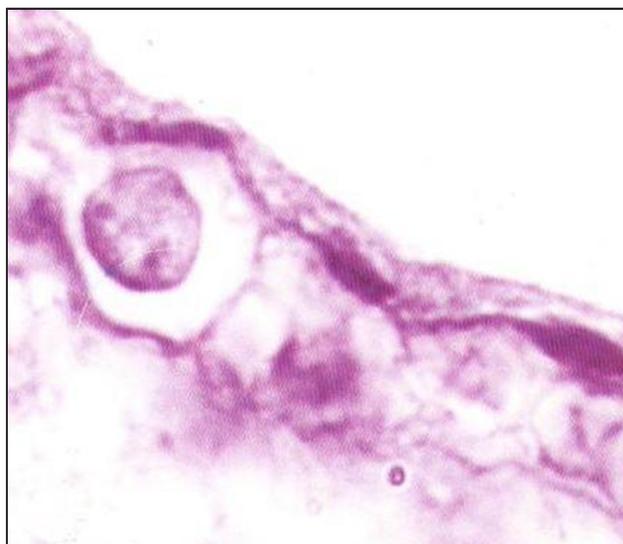


Рис. 1. Синцитиотрофобласт ворсинки хориона в сроке 9 недель беременности при рецидиве ЦМВИ в сроке 7 недель. Интенсивность реакции на SH-группы снижена ($10,6 \pm 0,4$ усл. ед.). Окраска по методу Барнетта-Зелигмана с реактивом ДДД. Увеличение: 15×100 .

мембранных белков и белков цитозоля. В результате усиливаются процессы перекисного окисления липидов и окислительной денатурации белков мембраны, изменяется состав и свойства белков цитозоля синцитиотрофобласта ворсинок хориона [1], что и приводит к нарушению трофических процессов на ранних этапах развития эмбриона.

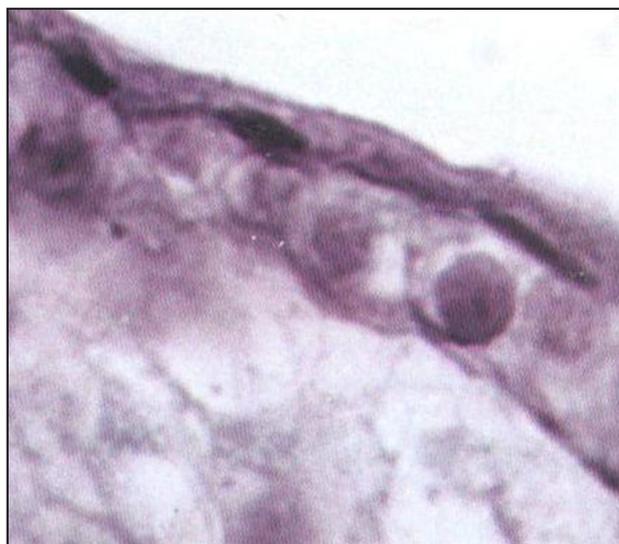


Рис. 2. Синцитиотрофобласт ворсинки хориона в сроке 9 недель беременности. Контроль. Интенсивность реакции на SH-группы высокая ($20,5 \pm 0,8$ усл. ед.). Окраска по методу Барнетта-Зелигмана с реактивом ДДД. Увеличение: 15×100 .

ЛИТЕРАТУРА

1. Плацентарная недостаточность / Т.С.Быстрицкая, М.Т.Луценко, Д.С.Лысяк, В.П.Колосов. Благовещенск, 2010. 135 с.
2. Ильин В.С., Титова Г.В. Химические факторы регуляции активности и биосинтеза ферментов. М.: Медицина, 1969. 360 с.
3. Кленова Н.А., Кленов Р.О. Механизмы генерации пептидов эритроцитами человека // Вестник СамГУ. Естеств.-науч. серия. Биология. 2006. №7(47). С.75–79.
4. Активность ферментов антиоксидантной защиты и окисление мембранных белков эритроцитов при некоторых патологиях беременности / Н.М.Козлова, Л.П.Касько, А.Г.Кутько, В.А.Петрович, Т.А.Сержан, Э.И.Слобожанина // Изв. Нац. академии наук Беларуси. Сер. мед. наук. 2010, №3. С.97–102.
5. Нагиев Э.Р., Газимагомедова М.М. Структурно-функциональное состояние мембран эритроцитов при остром отравлении метафосом и введении перфторана // Биомед. химия. 2003. Т.49, №2. С.138–144.
6. Патент 2142135 RU. Способ диагностики прерморбидного состояния / В.Н.Потапов; опубл. 27.11.1999.
7. Торчинский Ю.М. Сульфгидрильные и дисульфидные группы белков. М.: Наука, 1971. 228 с.
8. Baker B.R. Design of active-site-directed irreversible enzyme inhibitors. New York: Wiley & Sons, 1967. 202 p.

9. Lillie R.D. Histopatologic technic and practical histochemistry. 3d ed. New York: McGraw-Hill, 1965. 642 p.

REFERENCES

1. Bystritskaya T.S., Lutsenko M.T., Lysyak D.S., Kolosov V.P. Placental insufficiency. Blagoveshchensk; 2010 (in russian).
2. Ilyin V.S. Titov G.V. *Khimicheskie faktory regulyatsii aktivnosti i biosinteza fermentov* [Chemical factors regulating enzymes activity and biosynthesis]. Moscow: Meditsina; 1969 (in russian).
3. Klenova N.A., Klenov R.O. *Mekhanizmy generatsii peptidov eritrotsitami cheloveka* [Mechanisms of peptides generation by erythrocytes of a man]. *Vestnik Samarского gosudarstvennogo universiteta. Estestvenno-nauchnaya seriya. Biologiya* 2006; 7:75–79 (in russian).
4. Kozlova N.M., Kas'ko L.P., Kut'ko A.G., Petrovich V.A., Serzhan T.A., Slobozhanina E.I. *Aktivnost' fermentov antioksidantnoy zashchity i okislenie membrannykh belkov eritrotsitov pri nekotorykh patologiyakh beremennosti* [Activity of antioxidant defence enzymes and membrane proteins oxidation in erythrocytes of women with some pathologies of pregnancy]. *Izvestiya Natsional'noy akademii nauk Belarusi. Seriya meditsinskikh nauk* 2010; 3:97–102 (in russian).
5. Nagiev E.R., Gazimagomedova M.M. *Strukturno-funktsional'noe sostoyanie membran eritrotsitov pri ostrom otravlenii metafosom i vvedenii perftorana* [The effect of

perforan on structure-functional state of erythrocyte membrane in acute intoxication with metaphos]. *Biomeditsinskaya khimiya* 2003; 49(2):138–144 (in russian).

6. Potapov V.N. Patent 2142135 RU. *Sposob diagnostiki premorbidnogo sostoyaniya* (Patent 2142135 RU. A method of diagnosing premorbid state); published 27.11.1999 (in russian).

7. Torchinskiy Y.M. *Sul'fgidril'nye i disul'fidnye gruppy belkov* [Sulphydryl and disulfide groups of proteins]. Moscow: Nauka; 1971 (in russian).

8. Baker B.R. Design of active-site-directed irreversible enzyme inhibitors. New York: Wiley & Sons; 1967.

9. Lillie R.D. Histopatologic technic and practical histochemistry. 3d ed. New York: McGraw-Hill; 1965.

Поступила 03.04.2015

Контактная информация

Михаил Тимофеевич Луценко,

доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, руководитель лаборатории механизмов этиопатогенеза и восстановительных процессов дыхательной системы при НЗЛ,

Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания,

675000, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22.

E-mail: Lucenkomt@mail.ru

Correspondence should be addressed to

Mikhail T. Lutsenko,

MD, PhD, Professor, Academician of RAS,

Head of Laboratory of Mechanisms of Etiopathogenesis and Recovery

Processes of the Respiratory System at Non-Specific Lung Diseases,

Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration,

22 Kalinina Str., Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation.

E-mail: Lucenkomt@mail.ru