УДК 612.398.145.2:618.2/.36:6.16.523-036.11

СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОХРОМА С И КОЛИЧЕСТВО ЯДЕР В СОСТОЯНИИ АПОПТОЗА В ПЛАЦЕНТЕ БЕРЕМЕННЫХ, ПЕРЕНЕСШИХ ОБОСТРЕНИЕ ГЕРПЕС-ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

М.Т. Луценко, И.А. Андриевская

Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания СО РАМН, lucenkomt@mail.ru

Установлено, что в гомогенате плаценты от беременных, перенесших обострение герпес-вирусной инфекции, увеличивается содержание цитохрома С, что приводит к увеличению числа ядер в синцитиотрофобласте в состоянии апоптоза.

Ключевые слова: цитохром С, апоптоз, плацента, герпес.

THE CONTENTS CYTOCHROM C AND QUANTITIES OF NUCLEUS IN A CONDITION APOPTOSIS IN THE PLACENTA PREGNANT, TRANSFERRED AN AGGRAVATION HERPES

M.T. Lutsenko, I.A. Andrievskaja

Far Eastern Research Center for Physiology and Respiratory Pathology of SB RAMS lucenkomt@mail.ru

It is established, that in homogenal placentae pregnant, transferred the aggravation of herpes-virus infection in a placenta contents cytochrom C, that results in increase of number of nucleus in sincythiotrophoblasts in a condition apoptosis.

Key words: cytochrom C, herpes, apoptosis, placenta.

Митохондрии клеток предосохраняют себя от активных форм кислорода (АФК) благодаря активному процессу поглощения кислорода (O_2) цитохромоксидазой, которая с высокой скоростью переносит четыре электрона на O_2 с образованием нейтрального продукта — H_2O даже при низкой концентрации O_2. Благодаря этому в митохондриях поддерживается на низком уровне концентрация O_2 [1, 4, 5, 6, 7, 8, 9].

В митохондриальном матриксе превращение O_2 в перекись водорода происходит под влиянием супероксиддисмутазы. Утилизация H_2O_2 происходит в митохондриальном матриксе глутатионпероксидазой и каталазой, превращая H_2O_2 в H_2O и O_2.

Под действием токсических продуктов, попадающих в клетку (нитраты, антиген вирусов, токсических веществ и т.д.), механизмы защиты от АФК снижаются, что приводит к формированию неспецифических каналов во внутренней мембране митохондрий «permeability transition pore», через которые происходит проникновение низкомолекулярных веществ в матрикс.

Прежде всего нарушается осмотический баланс между матриксом и межмембранным пространством митохондрий. Так как в матриксе белковых молекул больше, чем в межмембранном пространстве, вода поступает в матрикс, в силу чего он набухает, и наружная мембрана разрывается, так как ее площадь меньше площади внутренней мембраны. Содержимое межмембранного пространства (в том числе и цитохром С) выбрасывается в цитозоль клетки.

Внемитохондриальный цитохром С связывается с цитозольным белком, который получил название первого фактора, активизирующего апоптоз (Apaf-1), так с ним связываются дезоксиАТР (dATP) и несколько молекул прокаспазы 9, что приводит к образованию каспазы-3, осуществляющей протеолу основных ферментов клетки, и индуцирует развитие апоптоза в ядрах [2, 6, 8, 9].

Цель исследования

Определить содержание цитохрома С в гомогенате плаценты беременных, перенесших обострение герпес-вирусной инфекции в третьем триместре, и провести корреляцию между увеличивающимся в синцитиотрофобласте количеством цитохрома С и нарастанием в нем числа ядер, вступающих в апоптоз.

Материал и методы

1. Исследовались плаценты после родов у 20 беременных, перенесших вспышку герпес-вирусной инфекции в третьем триместре с титром антител к вирусу простого герпеса 1:6400 (герпесная инфекция средней тяжести), и у 20 беременных, перенесших вспышку герпес-вирусной инфекции в третьем триместре с титром антител к вирусу герпеса 1:12800 (герпесная инфекция тяжелой формы). Исследования проводились на базе стационара акушерского отделения клиники Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания СО РАМН. Все исследования были проведены с учетом требований Хельсинской декларации Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. №266.

2. Титр антител к вирусу герпеса определяли иммуноферментным методом (ИФА) на спектрофотометре «Stat-Fax-2100» (США).

3. У родильниц, перенесших в третьем триместре беременности вспышку герпес-вирусной инфекции, забирались кусочки плаценты, из которых приготовляли гомогенат для определения цитохрома С. В другом кусочке плаценты после фиксации в формалине и заливки в парафин приготовлялись гистологические срезы для определения иммуногистохимическим методом числа ядер в симпласте ворсинок, вступающих в апоптоз.

Для оценки содержания цитохрома С приготовляли гомогенат из тех же плацент. Поверхность плаценты, полученной в течение 10–15 минут после родов, отмывали большим количеством физиологического раствора (ФР). Плодовая часть плаценты (ворсинчатый хорион) срезалась скальпелем небольшими пластинками площадью до 2–3 см, причем толщина срезаемого слоя не превышала 1 мм. Кусочки ткани помещались в химические стаканы,

содержащие 200 мл ФР, отмывались от клеток крови и перемешивались на магнитной мешалке в течение 15 минут. Для получения экстрактов отмытые кусочки плаценты слегка подсушивали на фильтрованной бумаге и взвешивали. Затем ткань растирали пестиком в фарфоровой ступке и гомогенизировали до однородной кремообразной массы. К полученному гомогенату добавляли ФР в объеме, равном изначальному весу ткани (на 1 г — 1 мл ФР). Взвесь помещали в пластиковые пробирки Falcon и подвергали замораживанию при -20°С в течение суток. Затем гомогенат размораживали и ультрацентрифугировали при 400 об/мин при температуре +4°С. Размноженный супернант из гомогената плаценты использовали для количественного определения цитохрома С иммуноферментным методом на ридере «Stat-Fax-2100» (USA) с использованием наборов «Bender Medsystems» (Austria).

Морфологические исследования апоптоза проводились на парафиновых срезах плаценты по метке, повреждающихся концов фрагментов ДНК in situ end-labeling (ISEL - метод). Срезы после дегидратации в дистиллированной воде в течение 30 мин инкубируют в 3%-ном растворе перекиси водорода и отмывают 0,15 М забуференным солевым раствором (PBS) (0,15 М NaCl на 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,5). Затем срезы инкубируют в смеси 0,3 М NaCl и 30 мМ цитрата натрия (pH 7,0; 800°С, 20 мин) и отмывают в 0,15 М PBS. После чего срезы инкубируют в растворе проназы при комнатной температуре в течение 30 минут. (Calbiochem; 1 мг/мл на 0,15 М PBS). Отмывают в 0,15 М PBS и буфером А (50 мМ трис-гидрохлорид, 5 мМ хлорид магния, 10 мМ β-меркаптоэтанол и 0,005%-ный раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА), pH 7,5).

Последовательно инкубируют (180°С, 2 ч.) в смеси из 4 нуклеотидов (0,01 мМ dATF, dCTF, dGTF; «Promega Madison WI», 0,001 мМ biotin-II-dUTP, «Sigma») и ДНК полимеразе-1 E coli (20 ед/мл; «Promega»), приготовленной на буфере А. Затем отмывают буфером А, а вслед за ним 0,5 М PBS (0,5 М NaCl на 0,1 М фосфатном буфере pH 7,5).

Окончательно срезы инкубируют с конъюгатом пероксидазы (Vectastam Elite ABC Kit-Vector, Burliname, CA), разведенным 1:25 0,5 М PBS, в который введены 1% БСА (бычьего сывороточного альбумина) и 0,5% твин-20, и в течение 10 мин окрашивают 0,04%-ным раствором ДАБ (3,3-диаминобензидин тетрахлорид) на 0,05 М трис — буфере pH 7,5 и перекиси водорода в конечной концентрации 0,015% из 30%-ного раствора. Промывают дистиллированной водой, обезвоживают и заключают в бальзам.

Метод обладает высокой чувствительностью даже для ядер, которые только начинают запрограммированную гибель. С помощью этого метода можно увидеть конденсацию хроматина, плотно прилегающего к ядерной оболочке. Титр антител к вирусу герпеса определялся методом иммуноферментного анализа на спектрофотометре «Stat-Fax-2100» (USA). Подсчет ядер, находившихся в состоянии апоптоза, проводился на 100 концевых ворсинках плаценты в каждом отдельно взятом случае. В подсчет на 100 ворсинок отбиралось 2000 ядер.

Материалы исследования

Исследования показали, что по мере нарастания титра антител к вирусу герпеса в гомогенате плаценты нарастает содержание цитохрома С: при титре антител 1:6400 определяется 13,9±0,06 пг/мл; при титре 12:12800 — 18,8±0,08 пг/мл (контроль — 10,7±0,04 пг/мл). При подсчете числа ядер симпласта ворсинок плаценты, находившихся в состоянии апоптоза, установлено: если количество цитохрома С в гомогенате в пределах 13,9±0,06 пг/мл, в симпласте содержится 1,5±0,002% ядер в состоянии апоптоза. При увеличении содержания цитохрома С до 18,8±0,08 пг/мл количество ядер в состоянии апоптоза увеличивалось до 3,0±0,03% (контроль — 0-1,0±0,002%).

Выводы

Установлено, что в гомогенате плаценты от родильниц, перенесших герпес-вирусную инфекцию в третьем триместре, процентное содержание цитохрома С прогрессивно увеличивается по мере нарастания агрессивности герпес-вирусной инфекции. Это приводит к увеличению числа ядер симпласта ворсинок плаценты, вступающих в апоптоз. Так, при титре антител к вирусу герпеса 1:6400 в гомогенате плаценты содержится 13,9±0,06 пг/мл цитохрома С, а процент ядер в состоянии апоптоза в симпласте ворсинок не превышает 1,5±0,002%. По мере нарастания титра антител к вирусу герпеса до 1:12800 количество цитохрома С в гомогенате плаценты увеличивается до 18,8±0,08 пг/мл, а процент ядер в симпласте ворсинок плаценты нарастает до 3,0±0,03%.

Полученные данные свидетельствуют, что обострение в третьем триместре беременности герпес-вирусной инфекции приводит к нарушению строения в синцитиотрофобласте плаценты митохондрий, выбросу в цитозоль большого количества цитохрома С и индукции апоптоза в ядрах синцитиотрофобласта, что в конечном итоге приводит к формированию фетоплацентарной недостаточности.

Список литературы

1. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы в биологических системах // Соросовский образовательный журнал. — 2000. — Т.6., №12. — С. 13–19.

2. Князькин И.В. Апоптоз в онкоурологии. — Спб.: Наука, 2007. — 240 с.

3. Погорелов В.М., Козинец Г.К. Морфология апоптоза при нормальном и злокачественном гемопоэзе / В.М. Погорелов, Г.К. Козинец // Гематология и трансфузиология. — 1995. — Т.43, №5. — С. 21–24.

4. Скулачев В.П. Альтернативные функции клеточного дыхания // Соросовский образовательный журнал. — 1998, №8. — С. 2–7.

5. Скулачев В.П. Эволюция, митохондрии и кислород // Соросовский образовательный журнал. — 1999, №9. — С. 1–7.

6. Скулачев В.П. Старение как атавистическая программа, которую можно попытаться отметить // Вестн. РАМН. — 2005. — Т. 75, №9. — С. 831–843.

7. Brailovskaja I.V., Korotkov S.M., Emeljanova L.V. Stimulation by cytochrome C of the external pathway of NADH oxidation and ascorbate oxidation in the presence of TMPD // Doklady Biochemistry and Biophysics. — 2007. — Vol.43, №1. — P. 72–75.

8. Mathiasen I.S. Triggering caspases-independent cell death to combat

cancer / I.S. Mathiasen, M. Jaattela // Trends. Vol. Med. — 2002. — №8. — P. 212–220.

9. Pan G. Caspase-9, BCL-XL and Apaf-1 form a ternaly complex // J. Biol. Chem. — 1998. — Vol. 273. — P. 5841–5845.