

## **ЭКСПРЕССИЯ СИГНАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ – РЕГУЛЯТОРОВ АПОПТОЗА В ПЛАЦЕНТЕ У ЖЕНЩИН РАЗНОГО ВОЗРАСТА**

**Е.А. Лапина<sup>1</sup>, Н.С. Линькова<sup>2</sup>,  
А.О. Дурнова<sup>2</sup>, В.О. Полякова<sup>2</sup>,  
Н.А. Пальченко<sup>3</sup>, А.В. Костылев<sup>3</sup>,  
С.С. Коновалов<sup>3</sup>, И.М. Квотной<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *Международный центр  
репродукции человека  
г. Санкт-Петербург*

<sup>2</sup> *НИИ акушерства и гинекологии  
им. Д.О. Отта  
СЗО РАМН  
г. Санкт-Петербург*

<sup>3</sup> *Санкт-Петербургский институт  
биорегуляции и геронтологии  
СЗО РАМН  
г. Санкт-Петербург*

*e-mail: miauy@yandex.ru*

В статье впервые рассматривается вопрос о старении плаценты с точки зрения усиления апоптоза, который является универсальным проявлением инволюции в различных органах и тканях. Показано, что у женщин старшего репродуктивного возраста, в особенности после 40 лет усиливается экспрессия проапоптотического белка p53. В то же время показано, что у женщин старше 35 лет возрастает экспрессия антиапоптотического белка Mcl-1, что свидетельствует о развитии компенсаторно-приспособительных механизмов.

Ключевые слова: плацента, апоптоз, p53, Mcl-1, старение.

Усиление апоптоза является одним из основных проявлений возрастной инволюции различных органов и тканей. Поскольку в плаценте были обнаружены признаки старения, характерные и для других тканей [1], представляется возможным утверждать, что апоптоз играет важную роль в поддержании морфофункционального состояния плаценты как в норме, так и при ее инволюции.

Интенсивность апоптоза зависит от восприятия множества вне- и внутриклеточных сигналов, интеграции и амплификации этих сигналов вторичными мессенжерами и, наконец, активации протеаз, непосредственно вызывающих гибель клетки [8-10].

Основной функциональной единицей зрелой плаценты человека служат терминальные ворсины, состоящие из стромы с кровеносными сосудами и хориального эпителия, представленного в доношенной плаценте синцитиотрофобластом [3-4]. Хориальный эпителий является наиболее метаболически активной тканью плаценты, именно здесь происходит синтез и обмен многих жизненно важных веществ. В третьем триместре беременности синцитиотрофобласт значительно истончается, образуются синцитиокапиллярные мембраны, а цитотрофобласт почти полностью исчезает [4]. Число клеток, подвергшихся апоптозу в третьем триместре, значительно выше, чем в первом. По некоторым данным, апоптоз синцитиотрофобласта является одним из факторов, приводящих к деградации синцития [8].

В регуляции клеточного цикла участвует белковый продукт гена опухолевого супрессора p53. Включение гена p53 может привести к аресту клеточного цикла, следствием которого является репарация ДНК или апоптоз [10]. Взаимодействуя со многими клеточными белками, p53 формирует комплекс, который является критичным для контроля клеточного цикла, регуляции генов, процессов дифференцировки, апоптоза и опухолевой супрессии. В плаценте ген p53 экспрессируется в цито- и синцитиотрофобласте, в клетках базальной пластинки, тогда как в строме и эндотелии экспрессии данного белка не наблюдается. Высокая экспрессия p53 верифицирована во внутренних слоях цитотрофобласта и в колоннах клеток цитотрофобласта, в синцитии экспрессия несколько ниже [10].

На ранних этапах роста и развития плаценты в цитотрофобласте запускается апоптозный каскад, который препятствует слиянию клеток в синцитий. Включению этого каскада противодействуют белковые продукты генов Bcl-2 и Mcl-1, экспресси-

рующиеся в синцитиотрофобласте [9]. Белковый продукт гена Mcl-1 блокирует апоптоз, вызываемый различными эндо- и экзогенными факторами.

Таким образом, гены и их белковые продукты p53 и Mcl-1 вовлечены в регуляцию процессов дифференцировки и пролиферации структурных элементов плаценты.

**Материал и методы.** Для проведения оценки степени экспрессии p53 и Mcl-1 использовали образцы 10 доношенных плацент, полученных при родах в НИИАГ им. Д.О. Отта СЗО РАМН у женщин различного возраста как с нормально протекающей беременностью, так и с различными осложнениями. Кусочки плацент фиксировались в 4% нейтральном формалине (рН 7,0-7,2). Проводка и заливка материала в парафин осуществлялась согласно общепринятым гистологическим методикам. На стеклах, предварительно обработанных адгезивом, наносились срезы толщиной 5 мкм. Для детекции белковых продуктов p53 и Mcl-1 использовался авидин-биотиновый иммунопероксидазный метод.

После депарафинизации и дегидратации срезы помещались в 3% раствор перекиси водорода для блокирования эндогенной пероксидазы, а затем промывались дважды в дистиллированной воде и трис-НСI-буфере (рН 7,6). Для оптимизации условий проведения реакции и минимизации фоновой окраски для антител к p53 после депарафинизации использовали высокотемпературную демаскировку в цитратном буфере. После промывок на срезы наносили по 50 мкл нормальной, не иммунной, сыворотки и инкубировали во влажной камере в течение 30 минут при комнатной температуре. Затем стряхивали сыворотку с препаратов и наносили по 50 мкл первых (специфичных) антител, разбавленных концентрированным раствором трис-НСI-буфера в соотношении 1:100, и инкубировали при +37°C в течение 1 часа. После инкубации срезы дважды промывали в рабочем растворе трис-НСI-буфера и инкубировали со вторыми биотинилированными антителами в течение 30 минут при комнатной температуре. Препараты дважды промывали в рабочем растворе трис-НСI-буфера и инкубировали с авидин-биотин-пероксидазным комплексом в течение 30 минут, после чего срезы промывали в рабочем растворе трис-НСI-буфера и производили детекцию пероксидазы хрена диаминобензидином. После выявления реакции с ДАБ препараты дважды промывали в воде и дегидратировали, а затем заключали в бальзам.

Анализ препаратов проводили с помощью системы анализа микроскопических изображений Nikon и программы обработки микроскопических изображений ВидеоТест. Для каждого образца проводили измерение оптической плотности и площади экспрессии исследуемых маркеров на 5 терминальных ворсинах хориона плаценты. Статистическая оценка полученных результатов проводилась с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни.

В ходе проведения исследования были сформированы следующие возрастные группы женщин: 1 группа – беременные до 18 лет; 2 группа – от 18 до 28 лет, 3 группа – от 29 до 35 лет, 4 группа – от 36 до 40 лет и 5 группа – старше 40 лет. Группой сравнения нами были выбраны женщины от 18 до 28 лет.

Для идентификации белкового продукта p53 нами использовались моноклональные антитела (NCL-p53-DO7, Novocastra). Эти антитела распознают как мутантные, так и дикие формы белка p53 человека, окрашивая ядро клетки. Число ядер, экспрессирующих p53, во всех исследованных случаях в эпителии ворсинчатого хориона было значительно больше, чем в элементах стромы. Для идентификации белкового продукта Mcl-1 нами использовались моноклональные антитела (NCL-Mcl-1; Novocastra). Антитела к этому маркеру связывают цитоплазматический и ядерный продукт гена.

**Результаты и обсуждение.** При сравнении степени экспрессии p53 в эпителии ворсин у женщин 1 и 2 групп, 3 и 2 групп, 4 и 2 групп нами не было выявлено достоверных отличий. Однако, в плаценте 40-летних женщин зарегистрировано большее число ядер синцития, позитивно окрашенных к p53, чем в плаценте женщин нормального репродуктивного возраста (1 и 2 группы,  $P < 0,01$ ). Полученные результаты согласуются с данными литературы о нарастании дегенеративно-дистрофических процессов в связи с возрастом беременной. У женщин старше 35 лет отмечается истончение хориального эпителия опорных ворсин, частые дефекты синцитиотрофобласта мелких ворсин, увеличение фибриноидных отложений на местах дефектов синцитиотрофобласта,

утолщение его базальной мембраны. Возможно, что вышеперечисленные структурные изменения ворсинчатого хориона могли быть связаны с регуляторной функцией p53.

С другой стороны, принимая во внимание тот факт, что беременность у женщины была осложнена гестозом и гипотрофией плода, увеличение площади экспрессии p53 может быть связано с патологичным течением беременности. При гестозе – патологии, связанной с нарушением иммунного статуса плаценты, уменьшается объем хориального эпителия, что сопровождается снижением большинства его функций: транспортной, барьерной и гормональной [2, 5-6]. Согласно последним литературным данным, дисфункция плаценты тесно связана с апоптозом. Так, при преэклампсии нарушается дифференцировка цитотрофобласта и процесс его инвазии в матку, что тесно связано с запрограммированной клеточной гибелью [7]. Многочисленные исследования указывают на гиперэкспрессию p53, а следовательно, и увеличение числа апоптозных клеток в цитотрофобласте при хорионкарциноме и пузырном заносе [4, 10].

Экспрессия белка Mcl-1 в ткани ворсинчатого хориона была достаточно высокой, что свидетельствует о высокой антиапоптозной активности ткани плаценты. Иммунопозитивное окрашивание на Mcl-1 наблюдалось как в эпителии, так и в строме ворсинчатого хориона. Достоверного влияния возраста женщины на степень экспрессии маркера выявить не удалось.

Несмотря на это, наблюдались индивидуальные различия в характере экспрессии белка Mcl-1. Так, сильная степень экспрессии была выявлена в плаценте у 2 женщин из 2 и 4 групп, при этом у обеих женщин беременность была осложнена. У 36-летней женщины (4 группа) беременность отягощалась отеками, крупным плодом, анемией, варикозной болезнью, синдромом гипоксии. У 24-летней беременной (2 группа) беременность была осложнена хронической плацентарной недостаточностью. Некоторыми авторами отмечается, что при гипоксии плода возрастает доля хориального эпителия в общем объеме плаценты и увеличивается площадь поверхности, что свидетельствует о возросшей нагрузке на эти элементы [3]. При хронической плацентарной недостаточности в плаценте встречаются участки незрелых ворсин с выраженной пролиферацией цитотрофобласта и атрофией синцития [3]. Возможно, что повышенная экспрессия белка Mcl-1 в этих случаях связана с включением компенсаторно-приспособительных процессов в ворсинчатом хорионе, направленных на увеличение площади обменной поверхности хориального эпителия между матерью и плодом.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что регуляторные белки p53 и Mcl-1 играют важную роль в процессе регуляции клеточного цикла в плаценте, причем у женщин старшего репродуктивного возраста их соотношение смещается в сторону увеличения экспрессии проапоптогического белка P53.

### Литература

1. Айламазян, Э.К. Старение плаценты / Э.К. Айламазян, Е.А. Лапина, А.В. Колобов // Журнал акушерства и женских болезней. – 2004. – Т. 53. – № 2. – С. 4-10.
2. Айламазян, Э.К. Выявление эндотелиальной NO-синтазы в плаценте и оксида азота в сыворотке крови беременных женщин в комплексной оценке эффективности лечения гестоза / Э.К. Айламазян (и др.) // Арх. патол. – 2010. – Т. 72. – № 1. – С. 26-29.
3. Глуховец, Б.И. Патология последа / Глуховец Б.И., Глуховец Н.Г. – СПб., 2002. 447 с.
4. Кветной, И.М. Сигнальные молекулы – маркеры зрелости плаценты / И.М. Кветной (и др.) – М., 2005. – 96 с.
5. Линькова, Н.С. Экспрессия CD8 как маркера риска невынашивания беременности у женщин с гестозом / Н.С. Линькова (и др.) // Вестник РУДН. Акуш. и гинек. – 2009. – № 6. – С. 326-331.
6. Линькова, Н.С. Роль плацентарных макрофагов в патогенезе гестоза у женщин разных возрастных групп / Н.С. Линькова (и др.) // Усп. геронтол. – 2009. – Т. 22, № 3. – С. 503-506.
7. Aziziech, F. Maternal cytokine production patterns in women with pre-eclampsia / F. Aziziech, R. Raghupathy, M. Makheed // Am. J. Reprod. Immunol. – 2005. – Vol. 54. – № 1. – P. 30-37.
8. Chen, Z.Y. Effect of Bushen Yiqi Huoxue Recipe on placental trophoblast apoptosis in fetal growth restricted pregnant rat / Z.Y. Chen, Q. Wang, G.Y. Huang // Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi. – 2010. – Vol. 6. – P. 611-616.



9. Ray, J. IFPA Trophoblast Research Award Lecture: the dynamic role of Bcl-2 family members in trophoblast cell fate / J. Ray, A. Jurisicova, I. Caniggia // *Placenta*. – 2009. – Vol. 30. – Suppl. A. – P. 96-100.

10. Staun-Ram, E. Ets-2 and p53 mediate cAMP-induced MMP-2 expression, activity and trophoblast invasion / E. Staun-Ram, S. Goldman, E. Shalev // *Reprod Biol Endocrinol*. – 2009. – Vol. 7. – P. 135-138.

## **EXPRESSION OF SIGNAL MOLECULES – REGULATORS OF PLACENTA APOPTOSIS IN WOMAN OF VARIOUS AGE**

**E.A. Lapina<sup>1</sup>, N.S. Linkova<sup>2</sup>,  
A.O. Durnova<sup>2</sup>, V.O. Polyakova<sup>2</sup>,  
N.A. Palchenko<sup>3</sup>, A.V. Kostylev<sup>3</sup>,  
S.S. Konovalov<sup>3</sup>, I.M. Kvetnoy<sup>2</sup>**

*<sup>1</sup>International Center  
of Human Reproduction  
Saint-Petersburg*

*<sup>2</sup>Ott Institute  
of Obstetrics and Gynecology  
of NWB RAMS,  
Saint-Petersburg*

*<sup>3</sup>Institute of bioregulation  
and gerontology  
Russian Academy  
of Medical Sciences,  
Saint-Petersburg*

*e-mail: miayy@yandex.ru*

There are investigated aging of placenta as the universal involution mechanism – apoptosis at the first time. The immunohistochemical research showed, that expression of proapoptosis protein p53 increased of placenta of older age group woman. However, aging placenta had compensatory processes, one of which is increasing expression antiapoptosis protein Mcl-1.

Key words: placenta, apoptosis, p53, Mcl-1, ageing