

П.А. ХОВХАЕВА, А.М. КРАСНЫЙ, к.б.н., Н.В. ТЮТЮННИК, О.А. СЕРГУНИНА, М.Б. ГАНИЧКИНА, Э.Ю. АМИРАСЛАНОВ, к.м.н., Н.Е. КАН, д.м.н., В.Л. ТЮТЮННИК, д.м.н., Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова Минздрава России, Москва

АПОПТОЗ В ПЛАЦЕНТЕ ПРИ ПРЕЭКЛАМПСИИ

Цель – определить наличие и степень выраженности апоптоза в плаценте при преэклампсии. В исследование была включена 31 пациентка. Все пациентки были разделены на 2 группы: I (основную группу) составили 11 беременных с преэклампсией, II (группу сравнения) – 20 здоровых пациенток. Проведена оценка апоптоза методом TUNEL в плаценте. Выявлено, что при преэклампсии уровень апоптоза в плаценте значительно выше уровня апоптоза у условно здоровых, а в отдельных случаях наблюдается разрушение стволовых ворсин за счет программируемой клеточной гибели стромы ворсин и синцитиотрофобласта. При преэклампсии окислительный стресс приводит к повышению уровня апоптоза в ворсинах плаценты. Апоптозу могут подвергаться не только клетки трофобласта, но и в некоторых случаях клетки стромы ворсин.

Ключевые слова:

преэклампсия, апоптоз
окислительный стресс

Окислительный стресс (ОС) играет важную роль в обеспечении иммунологической толерантности во время беременности [1]. Вместе с тем чрезмерно высокий уровень активных форм кислорода (АФК) или недостаток ферментов антиоксидантной защиты может вызывать неизбирательное повреждение биологических молекул, нарушать функции или приводить к клеточной смерти. Существуют механизмы физиологической адаптации, реагирующие на повышение АФК во внеклеточной среде и приводящие к повышению экспрессии генов ферментов антиоксидантной защиты. Осложненное течение беременности в III триместре часто бывает ассоциировано с системным воспалительным ответом, связанным с активностью периферических гранулоцитов, моноцитов и лимфоцитов, продуцирующих АФК [2–4]. Одним из наиболее тяжелых осложнений беременности является преэклампсия (ПЭ) [5]. Уровень ОС и системного воспаления при ПЭ значительно выше, чем при нормальной беременности [6]. По данным L. Myatt и X. Cui [7], G.J. Burton et al. [8], ОС развивается на ранних этапах формирования ПЭ.

Кроме того, ОС может быть причиной возникновения апоптоза в различных тканях. Клетки, имеющие дефекты антиоксидантной защиты, наиболее чувствительны к воздействиям, вызывающим их запрограммированную гибель [9, 10]. При исследовании плацент женщин с ПЭ было показано увеличение уровня апоптоза по сравнению с нормой [5, 11]. Таким образом, актуальным является исследование ОС как причины апоптоза клеток плаценты и последующего развития ПЭ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование была включена 31 пациентка. Все пациентки были разделены на 2 группы: I (основную

группу) составили 11 беременных с ПЭ, II (группу сравнения) – 20 условно здоровых пациенток. Проведены исследования экспрессии генов методом qPCR и оценка апоптоза методом TUNEL в плаценте.

Критерии включения в исследование:

Для основной группы:

■ Однoplодная беременность, наступившая в естественном цикле, осложненная ПЭ.

Для группы сравнения:

■ Неосложненное течение данной однoplодной беременности, наступившей в естественном цикле.

Критерии исключения общие:

- многоплодная беременность,
- острые воспалительные заболевания,
- тяжелая экстрагенитальная патология,
- аутоиммунные и онкологические заболевания.

Гистохимическое исследование. Ткань плаценты фиксировали в течение 24 ч в 4%-ном параформальдегиде на фосфатном буфере (PBS) при температуре 4 °C. Затем без отмывания переносили в 30%-ную сахарозу еще на 24 ч при температуре 4 °C. После этого ткань замораживали в среде для заключения замороженных образцов О.С.Т. Compaund (Sakura Finetek, USA). Срезы готовили на криостате Microm HM 525 (Thermo Scientifi, UK) толщиной 12 мкм. Реакцию TUNEL проводили с использованием набора In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein (Roche, Germany) по рекомендациям производителя с последующим окрашиванием пропидий йодидом в концентрации 2 мкм на PBS всей ДНК. Срезы исследовали на конфокальном микроскопе Leica SP5 (Germany).

Статистическую обработку результатов проводили при помощи программы «OriginPro 8». Значимость различий между выборками оценивали с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) со значением $p < 0,05$. Величины представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего (SEM).

Рисунок. Реакция TUNEL для обнаружения клеток плаценты



а – преэклампсия, апоптоз в клетках трофобласта; б – тяжелая преэклампсия, апоптоз в клетках трофобласта и в строме стволовых ворсин; в – норма.
Красный цвет – пропидий йодид; зеленый цвет – реакция TUNEL

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Возраст беременных, включенных в исследование, составил $31,5 \pm 0,9$ и $30,8 \pm 1,9$ года (по группам соответственно). Достоверных различий в частоте перенесенных в детстве детских инфекционных заболеваний, соматических и гинекологических заболеваний отмечено не было. Заметим, что у всех пациенток, включенных в исследование, не было артериальной гипертензии до наступления настоящей беременности.

Анализ течения настоящей беременности установил, что ее течение у пациенток основной группы чаще осложнялось угрозой прерывания в I и II триместрах, однако различия не достигали статистической значимости. В подавляющем большинстве случаев (81,8%) имела место поздняя ПЭ с дебютом проявлений после 32-й нед. беременности. При этом уровень систолического артериального давления составил $140,1 \pm 11,2$ мм рт. ст. и $117,5 \pm 8,9$ мм рт. ст. (по группам соответственно) и диастолического артериального давления $90,5 \pm 1,4$ мм рт. ст. и $71,5 \pm 2,4$ мм рт. ст. Отеки нижних конечностей отмечены в 54,5% наблюдениях. Уровень протеинурии составил $0,7 \pm 0,3$ г/л и $0,1 \pm 0,1$ г/л (по группам соответственно). Анализ показателей клинико-лабораторных данных не выявил статистически значимых различий между группами. Так, уровень тромбоцитов составил (по группам соответственно) $231,5 \pm 12,9 \times 10^9/\text{л}$ и $317,5 \pm 17,2 \times 10^9/\text{л}$, аланинамино-трансферазы $31,7 \pm 1,9$ ЕД/л и $21,5 \pm 0,4$ ЕД/л; аспартатаминотрансферазы $35,7 \pm 2,9$ ЕД/л и $27,5 \pm 1,8$ ЕД/л.

Все пациентки были родоразрешены в связи с нарастанием степени тяжести ПЭ путем операции кесарева сечения, которая была проведена типично. Достоверных различий в осложнениях послеоперационного периода выявлено не было. Следует отметить, что статистически значимых различий в оценке состояния детей при рождении и массо-ростовых соотношений в 63,6% случаев не выявлено. Вместе с тем следует отметить, что в 18,2% дети родились в асфиксии тяжелой степени при родоразрешении в сроке 37 нед. беременности и в 18,2% – при ранней тяжелой ПЭ (24–26-я нед. беременности) имело место досрочное родоразрешение с неблагоприятным неонатальным исходом.

Для обнаружения клеток плаценты в поздней стадии апоптоза была проведена реакция TUNEL. Выявлено, что при ПЭ наблюдается гибель клеток трофобласта по пути апоптоза (рис., а), а в некоторых случаях тяжелой ПЭ раз-

вивается апоптоз клеток трофобласта и стромы стволовых ворсин (рис., б). В плацентах группы сравнения вышеуказанных явлений не наблюдалось (рис., в).

Сосуды плаценты при ПЭ подвергаются сильному ОС, приводящему к системному воспалению [2]. В исследованиях M. Lappas et al. [4] было показано увеличение экспрессии генов антиоксидантной защиты относительно нормы в большинстве наблюдений в плаценте при гестационном сахарном диабете.

Следует отметить, что в данном исследовании в подавляющем большинстве анализируемых случаев имела место умеренная поздняя ПЭ, верифицированная согласно критериям тяжести. Учитывая отсутствие достоверных различий в осложнениях раннего неонatalного периода, можно предположить, что при умеренной ПЭ в плаценте, приводящей к возникновению апоптоза клеток трофобласта, ОС можно расценивать как компенсаторный. В случаях же ранней тяжелой ПЭ на сроках 24–26 нед., когда родоразрешение сопровождалось неблагоприятными перинатальными исходами, апоптоз выявляли не только в клетках трофобласта, но и в ворсинах плаценты, что свидетельствует о тяжести поражения.

Таким образом, ОС приводит к повышению уровня апоптоза в ворсинах плаценты при ПЭ. Установлено, что при тяжелой ПЭ апоптоз могут подвергаться не только клетки трофобласта, но и в некоторых случаях клетки стромы ворсин, что приводит к их гибели. При этом разрушение ворсин приводит к попаданию крови плода в материнский кровоток, что, вероятно, может являться предиктором развития тяжелой формы ПЭ.

ЛИТЕРАТУРА

- Redman CW, Sargent IL. Pre-eclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response – a review. *Placenta*, 2003, 24(Suppl. A): 21–27.
- Redman CW, Sargent IL. Placental stress and pre-eclampsia: a revised view. *Placenta*, 2009, 30(Suppl. A): 38–42.
- Can M, Guven B, Bektas S, Arikan I. Oxidative stress and apoptosis in preeclampsia. *Tissue Cell*, 2014 Dec, 46(6): 477–81. doi: 10.1016/j.tice.2014.08.004.
- Lappas M, Mitton A, Peermezel M. In response to oxidative stress, the expression of inflammatory cytokines and antioxidant enzymes are impaired in placenta, but not adipose tissue, of women with gestational diabetes. *J Endocrinol*, 2010, 204, 1: 75–84.
- Сухих Г.Т., Красный А.М., Кан Н.Е. и др. Апоптоз и экспрессия генов ферментов антиоксидантной защиты в плаценте при преэклампсии. *Акушерство и гинекология*, 2015, 3: 11–15.
- Sandstrom PA, Mannie MD, Buttke TM. Inhibition of activation-induced death in T cell hybridomas by thiol antioxidants: oxidative stress as a mediator of apoptosis. *J Leukoc Biol*, 1994, 55, 2: 221–226.
- Myatt L, Cui X. Oxidative stress in the placenta. *Histochem Cell Biol*, 2004, 122, 4: 369–382.
- Burton GJ, Yung HW, Cindrova-Davies T, Charnock-Jones DS. Placental endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in the pathophysiology of unexplained intrauterine growth restriction and early onset preeclampsia. *Placenta*, 2009, 30(Suppl. A): 43–48.
- Stehbens WE. Oxidative stress in viral hepatitis and AIDS. *Exp Mol Pathol*, 2004, 77, 2: 121–132.
- Iskusnykh IY, Popova RN, Agarkov AA et al. Expression of glutathione peroxidase and glutathione reductase and level of free radical processes under toxic hepatitis in rats. *J Toxicol*, 2013, 2013: 870628.
- Hubel CA, Roberts JM, Taylor RN et al. Lipid peroxidation in pregnancy: new perspectives on preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 1989, 161, 4: 1025–1034.

