

## АПОПТОЗ И ЕГО РОЛЬ В ФОРМИРОВАНИИ ФЕТОПЛАЦЕНТАРНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

© 2006 И.С. Липатов, Ю.В. Тезиков, А.В. Быков, Р.Н. Насихуллина,  
Г.А. Ергунова,<sup>1</sup> И.А. Потапова, П.П. Пурыгин, Ю.П. Зарубин<sup>2</sup>

Проведено исследование маркеров запрограммированной клеточной гибели при физиологической и осложненной гестации. Полученные результаты показали тесную патогенетическую связь между процессами тканевого роста, апоптоза и уровнем энергетического обмена в ткани плаценты. Усиление или ослабление апоптоза в плаценте ведет к формированию плацентарной недостаточности и различным клиническим вариантам и степени тяжести осложненной гестации.

### Введение

Термин "апоптоз" (с греч. — опадание листьев) введен в научный обиход в 1972 г. для обозначения формы гибели клеток [14]. Апоптоз, или запрограммированная смерть клетки, представляет собой процесс, посредством которого внутренние или внешние факторы, активируя генетическую программу, приводят к гибели клетки и ее эффективному удалению из ткани [10, 16]. Апоптоз — это механизм гибели клеток, который имеет ряд биохимических и морфологических отличий от некроза, это биохимически специфический тип гибели клетки, который характеризуется действием нелизосомальных эндогенных нуклеаз, расщепляющих ядерную ДНК на маленькие фрагменты [19].

Морфологически апоптоз проявляется гибелью единичных, беспорядочно расположенных клеток, что сопровождается формированием округлых, окруженных мембраной телец ("апоптотические тельца"), которые тут же фагоцитируются окружающими клетками, имеющими специфические рецепторы, в частности, рецептор витронектина, идентифицируемый как  $\beta_3$ -интегрин [17]. Это энергозависимый процесс, посредством которого удаляются нежелательные и дефектные клетки организма. Он играет большую роль в морфогенезе и является механизмом постоянного контроля размера органов. При снижении апоптоза происходит накопление клеток, пример — опухолевый рост [5]. При увеличении апоптоза наблюдается прогрессивное уменьшение клеток в ткани, пример — атрофия [3]. Запрограммированное разрушение клеток наблюдается во время эмбриогенеза (включая

<sup>1</sup>Липатов Игорь Станиславович, Тезиков Юрий Владимирович, Быков Андрей Владимирович, Насихуллина Раиса Низамовна, Ергунова Галина Александровна, кафедра акушерства и гинекологии Самарского государственного медицинского университета, 443001, Россия, г. Самара, ул. Чапаевская, 89.

<sup>2</sup>Потапова Ирина Анатольевна, Петр Петрович Пурыгин, Юрий Павлович Зарубин, кафедра органической химии Самарского государственного университета, 443011, Россия, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1.

имплантацию, органогенез). Несмотря на то, что при эмбриогенезе апоптоз не всегда является отражением "запрограммированной смерти клетки", это определение апоптоза широко используют различные исследователи [15].

Формированием условий, способствующих массовому апоптозу целых клеточных популяций, объясняют такие драматические события эмбриогенеза, как утрата хвоста зародышами амфибий или атрофия у них гипохорды [14]. В качестве причины внезапной утраты гемопоэтической функции печени эмбрионов называют тотальный апоптоз кроветворных клеток вследствие снижения восстановительного потенциала в их микроокружении [18].

Согласно современным представлениям в формировании и функционировании фетоплацентарного комплекса важная роль отводится оптимальному влиянию факторов роста и запрограммированной клеточной гибели [1, 7, 13]. Плацентарная недостаточность (ПН) является распространенным осложнением гестации. В ранние сроки нарушение плацентации и, как следствие, ПН приводят к самопроизвольным выкидышам и неразвивающейся беременности (несостоявшийся выкидыш), в поздние сроки — к фетоплацентарной недостаточности (ФПН), синдрому задержки развития плода (СЗРП), гипоксии плода [8, 9].

Целью настоящего исследования явилось выяснение роли апоптоза в формировании плацентарной недостаточности для оптимизации диагностики данной патологии.

## 1. Методика исследования

Маркеры апоптоза (Fas R (CD95) — мембранный рецептор инициации апоптоза; фактор некроза опухоли  $\alpha$  (ФНО  $\alpha$ ) — "лиганд смерти" семейства фактора некроза опухоли; аннексин-V-связывающие клетки — характеризуют число апоптотических клеток) исследовали в хориальной и децидуальной тканях при самопроизвольном и несостоявшемся аборт (CD95 и аннексин-V-связывающие клетки), в плацентарной ткани на поздних сроках гестации (Fas R), на лимфоцитах крови беременных женщин (CD95+), в сыворотке крови беременных (ФНО  $\alpha$ ). Параллельно в сыворотке крови беременных определяли уровень фактора роста плаценты (ФРП — разновидность сосудисто-эндотелиального фактора роста), щелочной фосфатазы (ЩФ — фермент регуляции энергетического обмена по принципу "фосфорилирование-дефосфорилирование" [4]) и плацентарной щелочной фосфатазы (ПЩФ). Определение Fas R, аннексин-V-связывающих клеток в плацентарной ткани осуществляли путем иммунолюминесцентного типирования с использованием специфических моноклональных антител [11]. Для контроля локализации святого объекта использовалась окраска серийных срезов гематоксилином и эозином. Идентификацию лимфоцитов с фенотипом CD95+ осуществляли стандартным методом иммунофлюоресцентного анализа с использованием моноклональных антител к поверхностным антигенам лимфоцитов человека, меченых FITS F<sub>ab</sub> фрагментами антимышиных иммуноглобулинов производства НПФ "МедБиоСпектор" (Россия).

ФНО  $\alpha$  в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа с применением наборов реагентов, выпускаемых ООО "Протеиновый контур" (г. Санкт-Петербург, 2004), по прилагаемым инструкциям. В качестве стандарта для сравнения служил рекомбинантный ФНО  $\alpha$ , входящий в состав набора реагентов. По данным титрования стандартных образцов строили калибровочный

график, по которому определяли концентрацию ФНО  $\alpha$  в исследуемой биологической среде.

Определение в сыворотке крови уровня ФРП осуществляли иммуноферментным методом с помощью наборов "P/D systems" (Великобритания), ЩФ и ПЩФ — на биохимическом анализаторе "Ultra" производства фирмы "Kohе" (Финляндия) в стандартных условиях с использованием реагентов фирмы "Kohе". Ретроспективно проводилось сопоставление уровней маркеров апоптоза, ПФР, ПЩФ со степенью плацентарной недостаточности, верифицированной при морфологическом исследовании последа [6].

Оценка маркеров апоптоза (МА) проведена у 55 женщин на ранних сроках гестации (1 группу составили 20 женщин с самопроизвольным выкидышем, 2 группу сравнения — 20 женщин с неразвивающейся беременностью, 3 группу (контрольную) составили 15 женщин, прервавших беременность путем медицинского аборта по социальным показаниям) и у 92 женщин в 3 триместре беременности, из которых были сформированы 3 группы сравнения: 1 группу составили 42 женщины с ФПН; 2 группу — 30 женщин с ФПН в сочетании с акушерской и экстрагенитальной патологией; 3 группу — 20 условно здоровых беременных женщин (контроль). Полученные результаты подвергнуты обработке методом вариационной статистики с заданной вероятностью, равной 95%, с использованием критерия Стьюдента и корреляционного анализа.

## 2. Результаты исследований и их обсуждение

Проведенные исследования на ранних и поздних сроках физиологической и осложненной ФПН беременности выявили как физиологические регулирующие функции апоптоза, так и патологические процессы, обусловленные его ослаблением или усилением. При физиологическом течении беременности уровень экспрессии Fas R в децидуальной ткани в среднем составил  $4.6 \pm 1.2\%$ , в хорионе  $9.2 \pm 1.2\%$ . Аннексин-V-связывающие клетки в хорионе составили  $6.5 \pm 1.4\%$ , в децидуальной ткани —  $4.6 \pm 1.2\%$ . При физиологическом течении беременности коэффициент отношения Fas R/аннексин-V-связывающие клетки равен  $\sim 1.4$  в хорионе и  $\sim 1$  — в децидуальной ткани, т. е. сохраняется равновесие между рецепцией и элиминацией клеток при помощи Fas-индуцированного апоптоза.

При раннем самопроизвольном выкидыше экспрессия маркера CD95 на клетках как хориона, так и децидуальной ткани приближается к физиологическим значениям, в то время как количество аннексин-V-связывающих клеток достоверно ( $p < 0,05$ ) больше, чем при физиологическом течении беременности, что может свидетельствовать об усилении апоптоза. Эти данные согласуются с исследованиями зарубежных авторов об увеличении числа апоптотических клеток в децидуальной ткани при самопроизвольном выкидыше [16], что может быть одним из механизмов самопроизвольного аборта. Отношение Fas R/аннексин-V-связывающие клетки составило  $\sim 0.8$  в хорионе,  $\sim 0.5$  в децидуальной ткани. Уменьшение коэффициента показывает на увеличение числа апоптотических клеток.

Экспрессия CD95 при неразвивающейся беременности обнаруживается почти в 3 раза чаще как в хорионе, так и в децидуальной ткани по сравнению с физиологической беременностью, тогда как количество аннексин-V-связывающих клеток увеличивается лишь в 1.5 раза. Отношение Fas R/аннексин-V-связывающие клетки равно  $\sim 2.2$  в хорионе и  $\sim 2.3$  в децидуальной ткани, что говорит об иммуноза-

висимой готовности материнского организма к отторжению эмбриона, но апоптоз в хорионе и децидуальной ткани недостаточен для этого отторжения.

Следовательно, запрограммированная клеточная гибель в тканях хориона и децидуальной ткани при физиологически протекающей беременности прямо пропорциональна экспрессии Fas R-соотношения Fas R/аннексин-V-связывающие клетки  $\sim 1$ , т. е. существует равновесие между рецепцией и элиминацией клеток Fas R-индуцированным апоптозом, тогда как при самопроизвольном выкидыше указанный показатель составляет  $\sim 0.8$ , т. е. происходит индукция апоптоза, а при неразвивающейся беременности  $\sim 2.3$ , что говорит об ингибции апоптоза.

Полученные результаты показывают важную роль апоптоза с ранних этапов формирования фетоплацентарной системы и разнонаправленность его действия при различных осложнениях гестации.

Таблица

**Содержание CD95<sup>+</sup>-лимфоцитов, фактора некроза опухоли  $\alpha$  и фактора роста плаценты в группах сравнения в зависимости от степени плацентарной недостаточности (M $\pm$  $\delta$ )**

Группы сравнения	Степень плацентарной недостаточности	CD95 <sup>+</sup> , %	ФНО $\alpha$ , нг/мл	ФРП, нг/мл
1 группа Беременные с ПН (n = 42) (n = 14, n = 13, n = 15)	Компенсированная (n = 14)	34.8 $\pm$ 2.7*	215 $\pm$ 19.7*	311 $\pm$ 24.6*
	Субкомпенсированная (n = 13)	51.2 $\pm$ 3.6	692 $\pm$ 59.4*	196 $\pm$ 17.2*
	Декомпенсированная (n = 15)	63.4 $\pm$ 3.5	1117 $\pm$ 118.9*	156 $\pm$ 11.3*
2 группа Беременные с ПН на фоне акушерской и экстрагенитальной патологии (n = 30) (n = 9, n = 9, n = 12)	Компенсированная (n = 9)	36.4 $\pm$ 3.3*	258 $\pm$ 23.2*	252 $\pm$ 19.4*
	Субкомпенсированная (n = 9)	58.9 $\pm$ 3.9*	813 $\pm$ 125.3*	168 $\pm$ 12.5*
	Декомпенсированная (n = 12)	71.7 $\pm$ 3.7*	1496 $\pm$ 125.3*	139 $\pm$ 8.9*
3 группа Неосложненная беременность (n = 20)	Плацента соответствует физиологической норме	23.7 $\pm$ 2.1**	88 $\pm$ 11.3**	388 $\pm$ 16.2**

\* — результаты достоверно отличаются от данных по неосложненной беременности ( $p < 0,05$ );

\* — результаты достоверно отличаются от данных полученных во 2 группе сравнения ( $p < 0,05$ )

ФПН на поздних сроках может быть следствием нарушения формирования фетоплацентарного комплекса (ФПК) с ранних сроков гестации, так и результатом действия повреждающих факторов на любом сроке беременности (акушерская патология, обострение экстрагенитальной патологии, эколого-профессиональные факторы, медико-социальные дезадаптации). Исследование экспрессии Fas R

(CD95) в плацентарной ткани показало повышение уровня его экспрессии при нарастании степени тяжести ПН и положительную корреляцию с уровнем экспрессии данного маркера на лимфоцитах ( $r_1 = 0.5$ ,  $r_2 = 0.7$ ,  $r_3 = 0.9$  — соответственно компенсированной, субкомпенсированной и декомпенсированной ПН). Данный факт, с одной стороны, объясняется тесными взаимоотношениями ФПК и иммунной системы материнского организма [1, 2, 12, 13], с другой стороны, позволяет использовать оценку уровня лимфоцитов с фенотипом CD95+, а также другие МА в качестве возможных диагностических критериев ФПН.

Результаты содержания CD95+-лимфоцитов, ФНО  $\alpha$  и ФРП в периферической крови беременных групп сравнения в зависимости от степени ПН представлены в таблице.

Анализ показывает, что при ФПН в отличие от физиологической беременности имеются статистически значимые различия по содержанию лимфоцитов (CD95+), ФНО  $\alpha$  и ФРП, кроме того, сдвиги изменения данных показателей нарастают по мере увеличения степени тяжести ПН при разнонаправленности изменений МА (Fas R, ФНО  $\alpha$ ) и факторов роста (ФРП). Нами также установлено, что нарушения продукции ФРП и МА сопровождаются изменением содержания ПЩФ (см. рисунок), характеризующимся повышением уровня фермента при компенсированной ПН и последующим резким падением при нарастании степени тяжести ПН.

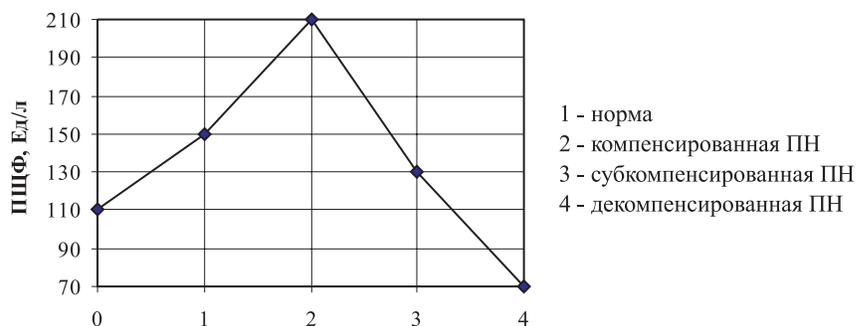


Рис. Изменение содержания ПЩФ в зависимости от степени плацентарной недостаточности

Следовательно, при формировании и прогрессировании ФПН имеется тесная патогенетическая связь между процессами тканевого роста апоптоза и уровнем энергетического обмена в тканях плаценты. Таким образом, комплексный подход к морфофункциональной оценке ФПК и выделение апоптоза в качестве одного из ведущих патогенетических звеньев ПН позволяет с новых позиций рассматривать проблему ФПН и открывает новые перспективы поиска новых диагностических критериев и путей лечения данной патологии.

## Литература

- [1] Аржанова, О.Н. Комплексная терапия плацентарной недостаточности у беременных с наличием в крови антифосфолипидных антител / О.Н. Аржанова, Т.Н. Шляхтенко, О.В. Тышкевич // Акуш. и гин. 2004. №6. С. 50–51.

- [2] Белокриницкая, Т.Е. Цитокины в системе мать-плод при синдроме задержки развития плода / Т.Е. Белокриницкая, Ю.А. Виктовский. Цитокины в системе мать-плод при синдроме задержки развития плода // Акуш. и гин. 1995. №5. С. 15–17.
- [3] Брюне, Б. Апоптотическая гибель клеток и оксид азота: механизмы активации и антогонестические сигнальные пути (обзор) / Б. Брюне, К. Сандахау, А. фон Кнетен // Биохимия. 1998. Т. 63. Вып. 7. С. 966–976.
- [4] Горячев, В.В. Активность термостабильной щелочной фосфатазы сыворотки крови беременных при хронической плацентарной недостаточности / В.В. Горячев, В.И. Дегтярев // Акуш. и гин. 1983. №10. С. 16–18.
- [5] Роль макроглобулинов в репродуктивной функции / Н.А. Зорин [и др.] // Акуш. и гин. 2005. №4. С. 7–8.
- [6] Милованов, А.П. Стандартизация методов морфометрии плаценты человека / А.П. Милованов, А.И. Брусиловский // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. 1986. №8. С. 72–78.
- [7] Павлович, С.В. Сосудисто-эндотелиальный фактор роста в патогенезе синдрома гиперстимуляции яичников / С.В. Павлович, В.А. Бурлев // Акуш. и гин. 2004. №2. С. 11–13.
- [8] Ранние сроки беременности / под ред. проф. В.Е. Радзинского и А.А. Оразмурадова. М., ООО "Медицинское информационное агентство". 2005. 448 с.
- [9] Серебров, В.Ю. Некоторые механизмы адаптации новорожденных с гипоксическим поражением ЦНС / В.Ю. Серебров, В.А. Желев, Н.В. Комская // Клиническая лабораторная диагностика. 2005. №10 С. 17–18.
- [10] Проллиферативная активность и апоптоз в гиперплазированной эндометрии / Г.Т. Сухих [и др.] // Акуш. и гин. 2005. №5. С. 25–29.
- [11] Иммунологические методы / под. ред. Х. Фримеля. М.: Мир, 1987. 472 с.
- [12] Особенности продукции цитокинов и характеристика моноцитов при осложненной гестозом беременности / Н.А. Хонина [и др.] // Иммунология. 2005. №3. С. 156–160.
- [13] Чистякова, Г.Н. Экспрессия маркеров активации иммунной системы в ранние сроки беременности / Г.Н. Чистякова, И.А. Газиев, Г.А. Черданцева // Иммунология. 2004. №6. С. 377–378.
- [14] Ярилин, А.А. Апоптоз. Природа феномена и его роль в целостности организма / А.А. Ярилин // Патол. физиол. и экспер. терапия. 1998. №2. С. 38–48.
- [15] Differential regulation and function of the Fas/Fas ligand system in human trophoblast cells / S. Aschkenazi [et al.] // Biol. Reprod. 2002. V. 66. No. 6. P. 1853–1861.
- [16] Effect of abnormal apoptosis in human decidua tissue during early gestation on pregnancy / F. Ding [et al.] // Di. Yi. Jun. Yi. Da. Xue. Xue. Bao. 2002. V. 2. No. 2. P. 145–147.
- [17] The role of Bcl-2 expression in EGF inhibition of TNF- $\alpha$ -IFN- $\gamma$ -induced villous trophoblast apoptosis / S. Ho [et al.] // Placenta. 1998. V. 39. No. 1. P. 423–430.

- [18] Mcl-1 deficiency results in peri-implantation embryonic lethality / J.L. Rinkenberger [et al.] // *Genes Development*. 2000. №14(1). P. 23–27.
- [19] Folate affects apoptosis in human trophoblastic cells / R.P.M. Steegers-Theunissen [et al.] // *Brit. J. Obstet. Gynecol.* 2000. No. 107(12). P. 1513–1515.

Поступила в редакцию 30/III/2006;  
в окончательном варианте — 30/III/2006.

## APOPTOSIS AND ITS ROLE TO FORMATION OF PLACENTIC INSUFFICIENCY

© 2006 I.S. Lipatov, Y.V. Tezikov, A.V. Bykov, R.N. Nasikhullina, G.A. Ergunova,<sup>3</sup>  
I.A. Potapova, P.P. Purygin, Y.P. Zarubin<sup>4</sup>

The research of markers programmed destruction is carried out at physiological and complicated gestation. The obtained results have shown close pathogenetic connection between processes of fabric growth, apoptosis and level of a power exchange in a fabric placenta. Enhancement or the abatement of apoptosis in placenta leads to formation of placentic insufficiency both various clinical variants and degree of weight of complications gestation.

Paper received 30/III/2006;  
Paper accepted 30/III/2006.

---

<sup>3</sup>Lipatov Igor Stanislavovich, Tezikov Yury Vladimirovich, Bykov Andrey Vladimirovich, Nasikhullina Raisa Nizamovna, Ergunova Galina Aleksandrovna, Dept. of Obstetrics and Gynecology, Samara State Medical University, Samara, 443001, Russia.

<sup>4</sup>Potapova Irina Anatolievna, Purygin Pyotr Petrovich, Zarubin Yury Pavlovich, Dept. of Organic Chemistry, Samara State University, Samara, 443011, Russia.