

Мальгина Л.Ю.

Участие апоптоза и факторов его регулирующих в патогенезе гестоза

«Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства им. В.Н. Городкова» Минздрава России

Одним из наиболее тяжелых осложнений беременности является гестоз, который до сих пор, занимает ведущее место в структуре материнской и перинатальной заболеваемости и смертности. В процессе гестации апоптоз необходим для децидуализации маточного эндометрия, адекватного ремоделирования тканей материнской децидуальной оболочки, инвазии развивающегося эмбриона, обеспечения иммунной толерантности к беременности, подготовке к родам. Цель исследования - установить новые патогенетические механизмы развития гестоза у беременных женщин на основании изучения процессов генной регуляции апоптоза периферических и плацентарных лимфоцитов, моноцитов/макрофагов, клеток децидуальной оболочки и ворсинчатого хориона на основании чего разработать критерии дифференциальной диагностики степени тяжести гестоза. Установлено, что в группу риска на развитие гестоза следует относить женщин с экстрагенитальной патологией (артериальная гипертензия, ВСД по гипертоническому типу, хронический пиелонефрит, ожирение, диффузное увеличение щитовидной железы, хронический тонзиллит). Для уточнения степени тяжести гестоза целесообразно проводить иммуногистохимическое исследование плаценты, полученной после родов от женщин с гестозом, с определением индекса экспрессии маркеров апоптоза p53 и bcl-2.

Ключевые слова: гестоз, апоптоз, p53, bcl-2

Malgina L.Y.

Involvement of apoptosis and its regulatory factors in the pathogenesis of gestosis

Ivanovo Research Institute of mother and child name of Horodkov V.N. of Ministry of Health of Russia

One of the most serious complications of pregnancy is preeclampsia, which still occupies the leading place in the structure of maternal and perinatal morbidity and mortality. In the process of gestation is required for apoptosis of uterine decidualization of endometrial tissue remodeling adequate maternal decidua invasion of the developing embryo, ensure immune tolerance in pregnancy, preparation for childbirth. The purpose of the study - to establish new pathogenetic mechanisms of preeclampsia in pregnant women on the basis of study of the processes of gene regulation of apoptosis of peripheral and placental lymphocytes, monocytes / macrophages, cells decidua and chorionic villi on the basis of which to develop criteria for the differential diagnosis of the severity of preeclampsia. It was established that at risk for the development of preeclampsia should be classified women with extragenital pathology (hypertension, vascular dystonia of hypertensive type, chronic pyelonephritis, obesity, diffuse enlargement of the thyroid gland, chronic tonsillitis). To clarify the severity of preeclampsia is advantageously carried out immunohistochemical study of the placenta obtained after delivery from women with preeclampsia, with the definition of the index expression of apoptosis markers p53 and bcl-2.

Key words: gestosis, apoptosis, p53, bcl-2

Одним из наиболее тяжелых осложнений беременности является гестоз, который до сих пор, занимает ведущее место в структуре материнской и перинатальной заболеваемости и смертности. Одним из важнейших механизмов регуляции гестационного процесса является апоптоз. В процессе гестации апоптоз необходим для децидуализации маточного эндометрия, адекватного ремоделирования тканей материнской децидуальной оболочки, инвазии развивающегося эмбриона, обеспечения иммунной толерантности к беременности, подготовке к родам. Нарушение апоптоза на системном и локальном уровнях отмечается при развитии осложненной беременности в том числе и гестоза. Однако особенности апоптоза клеток плаценты при гестозе рассматриваются без учета локализации тканей цитотрофобласта в базальной децидуаль-

ной пластинке и в ворсинах хориона. Практически не исследованы характеристики апоптоза децидуальных клеток как при неосложненной беременности, так и при гестозе.

В работах ряда авторов было показано, что в плаценте при гестозе возникает дисбаланс в продукции про- и анти-апоптотических факторов. Но данные, приводимые различными исследователями, не всегда соответствуют друг другу, что не позволяет сделать однозначных выводов о роли апоптоза в патогенезе гестоза.

Большинство исследователей показывают, что при гестозе в периферической крови матери и в плаценте усиливаются процессы активации иммунных клеток, что сопровождается повышением их готовности к апоптозу. Однако характер апоптоза клеток иммунной системы при данной патологии остается практически не изученным. Остаются не

исследованными характеристики раннего и завершеного апоптоза лимфоцитов и клеток макрофагального ряда при гестозе, как в периферической крови, так и на уровне плаценты. В литературе отсутствуют данные о характере синтеза клетками иммунной системы апоптоз-регулирующих белков АРАФ и XIAP при неосложненном течении беременности и при гестозе. Имеются лишь отдельные сведения о том, что изменения в балансе bcl-2 и p53 играют роль в развитии патологии плода и не столь значимы в регуляции апоптоза на системном уровне при гестозе.

Имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о том, что в регуляции апоптоза во время беременности важную роль играет TGFβ [Liu Z., et al, 2002; Smith S., et al, 2002]. В литературе имеются сведения о том, что TGFβ может оказывать как негативный, так и позитивный эффект в регуляции программ-

руемой клеточной гибели. Но работы о влиянии TGF β на апоптоз клеток при неосложненной беременности и при гестозе крайне не многочисленны, и не исследуют характер апоптоз-регулирующего действия этого фактора на иммунокомпетентные клетки в периферической крови и в плаценте.

Таким образом, изучение характера апоптоза и его регуляции на генном и молекулярном уровнях в иммунных клетках периферической крови, децидуальной оболочки и ворсинчатого хориона, в тканях плаценты при неосложненной гестозом беременности и при гестозе различной степени тяжести представляется несомненно актуальным.

Цель исследования: установить новые патогенетические механизмы развития гестоза у беременных женщин на основании изучения процессов генной регуляции апоптоза периферических и плацентарных лимфоцитов, моноцитов/макрофагов, клеток децидуальной оболочки и ворсинчатого хориона на основании чего разработать критерии дифференциальной диагностики степени тяжести гестоза.

Материалы и методы исследования

Всего обследовано 150 беременных женщин в III триместре. Среди пациентов были выделены основная группа – 100 женщин с гестозом разной степени тяжести (50 женщин с гестозом легкой и 50 – с гестозом тяжелой степени) и контрольная группа – 50 женщин без признаков гестоза. Степень тяжести гестоза определяли по бальной шкале Гоека в модификации Г.М. Савельевой (1996). Материалом для исследования служили периферическая кровь из локтевой вены, децидуальная ткань и ткань ворсинчатого хориона зрелой плаценты.

Проводилось общеклиническое обследование, в том числе общепринятое лабораторное и биохимическое обследование. Ультразвуковое исследование беременных женщин проводилось на аппарате Aloka SSD-650, кардиотокографическое исследование – на аппарате Analogic Fetalgard -2000.

Иммунологические методы исследования

Исследование стадий апоптоза производили методом двухцветной проточной цитофлуориметрии на приборе FACSscan (Becton Dickinson,

США). Для определения количества клеток, вступивших в апоптоз, проводили тест с одновременным окрашиванием клеток Annexin V (CALTAG Laboratories, США) и пропиридином иодидом (PI) (CALTAG Laboratories, США). Для определения экспрессии в клетках мРНК APAF и XIAP использовали количественный метод RT-PCR в реальном времени. Процедуру выделения тотальной РНК из клеток проводили стандартным гуанидин-тиоцианат-фенол-хлороформ методом с использованием набора реагентов «Онкоскрин» ООО «ГеноТехнология» (Россия). Содержание TGF β 2 оценивали методом ELISA на микропланшетном ридере Multiscan EX Labsystems (Финляндия) с использованием тест системы фирмы R&D Systems (США). Стимуляцию периферических мононуклеарных клеток и плацентарных эксплантов осуществляли рекомбинантным TGF β 2 (R&D Systems, США) в концентрации 1000 пг/мл в течение 24 часов при 37°C и 5% CO $_2$. В качестве контроля использовали клетки и экспланты, инкубированные в аналогичных условиях в среде RPMI-1640 с 10% FCS.

Морфологические методы исследования

Комплексная оценка структурных изменений последа включала макроскопическое описание, органомерию плацент с определением массы, объема и площади материнской поверхности, световую микроскопию с использованием обзорных электролитических методов окраски. Экспрессию апоптоз-регулирующих белков p53 и bcl2 в образцах ткани плаценты определяли методом иммуногистохимии с использованием моноклональных антител и реактивов для иммуногистохимического окрашивания фирмы «Dako» (Германия). Оценка результатов проводилась с учетом иммуногистохимического коэффициента, рассчитываемого по трехбалльной системе.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием персонального компьютера с набором стандартных программ в системе Windows XP 2000. Материалы исследования обрабатывались методом вариационной статистики с использованием программы Microsoft Excell из комплекта Microsoft Office 2000.

Результаты исследования и их обсуждение

Возраст обследованных женщин колебался от 15 до 40 лет. Соматические заболевания в анамнезе, среди которых преобладали детские инфекции и простудные заболевания, имели 100% беременных контрольной группы и 100% беременных основной группы. Женщины во всех исследуемых были сопоставимы по возрасту, перенесенным заболеваниям, по наличию самопроизвольных выкидышей и гинекологических заболеваний в анамнезе. Тяжелый гестоз при предыдущей беременности имели 5% основной группы против 2% в группе контроля. Обращает на себя внимание высокая частота экстрагенитальной патологии, выявленной во время беременности: у 88% женщин основной группы и у 36% контрольной группы ($p < 0,001$). По литературным данным подавляющее большинство соматических заболеваний имеют тенденцию к прогрессированию во время гестационного процесса и, как правило, ухудшают течение беременности и исход родов [Гурьева В.М. и соавт., 2009]. Среди экстрагенитальной патологии в основной группе с гестозом чаще встречались артериальная гипертензия ($p < 0,001$), вегетососудистая дистония по гипертоническому типу ($p < 0,001$), хронический пиелонефрит ($p < 0,001$), ожирение ($p < 0,001$), диффузное увеличение щитовидной железы ($p < 0,001$), хронический тонзиллит ($p < 0,001$), что согласуется с данными о роли экстрагенитальной патологии в развитии гестоза.

Изучение характера течения настоящей беременности показало, что осложнения гестационного процесса имели место у 100% обследованных основной группы и 24% контрольной группы ($p < 0,001$). Развитие тяжелых форм гестоза характеризовалось ранним началом, длительным течением и более выраженными клиническими проявлениями.

Наиболее неблагоприятными исходами беременности отличается группа с тяжелыми формами гестоза. У женщин этой группы чаще встречались преждевременные роды (в 48% случаев), рождение ребенка с перинатальной патологией у 64,7% женщин (СЗРП, перинатальные поражения ЦНС гипоксического и геморрагического генеза, инфекционно-воспалительная патология), что согласуется с современным мнением ведущих ученых.

Таким образом наиболее значимыми факторами риска развития гестоза являются: высокая частота экстрагенитальных заболеваний (вегетосудистая дистония по гипертоническому типу, артериальная гипертензия, ожирение, хронический пиелонефрит, хронический тонзиллит, диффузное увеличение щитовидной железы).

С целью уточнения роли иммунных механизмов в патогенезе гестоза мы исследовали изменения апоптоза лимфоцитов и моноцитов/макрофагов, а также механизмов его эндо- и экзогенной регуляции на системном и локальном уровне при беременности неосложненной гестозом и при гестозе.

Независимо от характера инициирующего сигнала к апоптозу, приобретение клеткой способность фиксировать белок AnnexinV свидетельствует о вступлении клетки в состояние апоптоза. Клетки, находящиеся на ранних, обратимых этапах апоптоза, не способны накапливать внутриклеточно PI и имеют фенотип AnnexinV+PI-. В тех случаях, когда апоптоз клеток приобретает необратимый характер, PI свободно поступает в цитоплазму гибнущей клетки, такие клетки приобретают фенотип AnnexinV+PI+.

По нашим данным в периферической крови беременных с гестозом отмечалось повышенное по сравнению с показателями в контрольной группе содержание AnnexinV+ периферических лимфоцитов (20,30±0,94 в контрольной группе; 27,56±1,49 в группе с легким гестозом, $p<0,001$; 24,23±1,47 в группе с тяжелым гестозом, $p<0,02$), но находящихся на ранних, обратимых, этапах апоптоза (15,78±0,91 в контрольной группе, 19,64±0,83 в группе с легким гестозом, $p<0,001$; 19,22±0,60 в группе с тяжелым гестозом, $p<0,001$). Только при гестозе легкой степени было выявлено и повышенное содержание лимфоцитов, находящихся на поздних этапах апоптоза по сравнению с показателями контрольной группы (4,37±0,67 в контрольной группе, 7,41±1,09 в группе с легким гестозом, $p<0,02$). При тяжелом гестозе данный показатель не отличался от такового в группе женщин без гестоза ($p>0,05$). Нарушение завершенности апоптоза периферических лимфоцитов при тяжелом гестозе может приводить к накоплению активированных ЦТЛ и ЕК, отмечаемому большинством авторов

при гестозе и способствовать развитию цитотоксических реакций в различных органах и тканях при гестозе [Панова И.А., 2006; Мамалыга, 2008].

Процесс апоптоза клеток, регулируется различными экзо- и эндогенными сигналами, среди которых важная роль принадлежит проапоптотическому фактору АРАФ и антиапоптотическому – XIAP. Как показали результаты RT-PCR, отмеченное нами при гестозе повышение содержания AnnexinV-позитивных периферических лимфоцитов, не определялось усилением экспрессии мРНК проапоптотического белка АРАФ, так как во всех исследуемых группах уровень экспрессии мРНК АРАФ лимфоцитами был крайне незначителен (0,56±0,56 в контрольной группе, 2,40±2,40 в группе с легким гестозом; 0,16±0,16 в группе с тяжелым гестозом; $p>0,05$ во всех случаях). Известно, что белок АРАФ играет важную роль в митохондриальном пути апоптоза клеток. Вероятно, митохондриальный путь апоптоза не имеет большой значимости для лимфоцитов периферической крови, как при неосложненной беременности, так и при гестозе. Это согласуется с данными других исследователей, которые показали, что для иммунных клеток периферической крови основным является апоптоз, включаемый рецепторами плазматической мембраны. В тоже время, нами было отмечено достоверное снижение экспрессии периферическими лимфоцитами антиапоптотического белка XIAP при легкой и тяжелой степени гестоза по сравнению с показателями в контрольной группе (5,05±1,75 в контрольной группе, 0,74±0,22 в группе с легким гестозом, $p<0,05$; 0,46±0,06 в группе с тяжелым гестозом, $p<0,02$). Известно, что XIAP не влияет на индукцию апоптоза, но способен подавлять эффекторные механизмы данного процесса, связывая активные формы каспазы-3, -7 и -9, то есть подавлять переход апоптоза в заключительную фазу деградации клеток. Таким образом, отмеченное нами усиление ранних обратимых этапов апоптоза периферических лимфоцитов при гестозе могло быть обусловлено угнетением синтеза XIAP.

Одним из важнейших экзогенных факторов регуляции апоптоза является TGFβ, способный осуществлять проапоптотическое действие на уровне каспаз. Результаты наших исследо-

ваний свидетельствуют о сниженном уровне TGFβ2 в периферической крови при гестозе легкой степени тяжести по сравнению с группой контроля (3,43±0,38 в контрольной группе, 2,33±0,36 в группе с легким гестозом, $p<0,05$), при отсутствии достоверных изменений в сывороточном содержании TGFβ2 при тяжелом гестозе (3,35±0,27, $p>0,05$).

В эксперименте *in vitro* TGFβ2 вызывал повышение содержания апоптирующих периферических лимфоцитов во всех исследуемых группах, в большей степени стимулируя развитие поздних этапов апоптоза ($p<0,001$ во всех исследуемых группах). Увеличение уровня погибших лимфоцитов после стимуляции TGFβ2 отмечалось только в группах без гестоза и с тяжелым гестозом ($p<0,05$ по сравнению с 24-часовым контролем в обеих группах). По данным RT-PCR TGFβ2 во всех группах не оказывал существенного влияния на показатели экспрессии периферическими лимфоцитами мРНК АРАФ ($p>0,05$ по сравнению с 24-часовым контролем во всех группах), но достоверно усиливал синтез XIAP при беременности неосложненной гестозом ($p<0,05$).

Анализируя характер апоптоза моноцитов, мы установили, что не зависимо от тяжести гестоза отмечалась лишь тенденцию к увеличению периферических моноцитов, вступивших в апоптоз и находящихся на ранних этапах апоптоза, по сравнению с группой контроля ($p>0,05$ во всех случаях). Уровень периферических моноцитов, находящихся на необратимых этапах апоптоза, оставался неизменным по сравнению с контрольной группой и не зависел от степени гестоза ($p>0,05$ во всех случаях). Экспрессия мРНК XIAP моноцитами также имела лишь тенденцию к увеличению в обеих исследуемых группах с гестозом ($p>0,05$ во всех случаях). Во всех исследуемых группах в моноцитах не амплифицировалась мРНК АРАФ.

Стимуляция препаратом TGFβ2 во всех исследуемых группах приводила к переходу моноцитов на необратимые этапы апоптоза ($p<0,001$ в группе без гестоза; $p<0,001$ в группе с легким гестозом; $p<0,02$ в группе с тяжелым гестозом, по сравнению с показателями 24-часового контроля), а в группе с тяжелым гестозом у к увеличению уровня погибших клеток ($p<0,02$). При этом во

всех исследуемых группах TGF β 2 не оказывал какого-либо влияния на показатели экспрессии мРНК АРАФ и XIAP.

Полученные нами данные свидетельствовали о том, что в периферической крови женщин с гестозом, особенно при его тяжелых формах, накопление активированных лимфоцитов и моноцитов может определяться нарушением завершенности апоптоза. Вероятно, эти изменения апоптоза периферических лимфоцитов и моноцитов при гестозе определяются угнетением синтеза XIAP лимфоцитами и снижением влияния TGF β 2 в результате нарушения экспрессии его рецепторов, либо в результате недостаточного уровня его продукции, как это отмечалось при легкой степени гестоза.

При проведении иммуногистохимических исследований экспрессии проапоптотического белка p53 и антиапоптотического белка bcl-2 в различных структурах плаценты мы выявили различное распределение этих факторов в децидуальной оболочке и в хорионе плаценты как при беременности, протекавшей без гестоза, так и при гестозе. Так, нами впервые было показано, что в децидуальных клетках базальной пластинки экспрессия p53 и bcl-2 не определялась ни при неосложненной беременности, ни при гестозе. Как в норме, так и при гестозе белок p53 в максимальной степени накапливался в ядрах клеток цитотрофобласта в децидуальной базальной пластинке и в единичных клетках цитотрофобласта ворсин хориона.

Анализируя полученные нами данные, мы установили, что в контрольной группе проапоптотический белок p53 максимально экспрессировался в клетках цитотрофобласта базальной децидуальной оболочки (12% клеток), и в единичных случаях в цитотрофобласте в ворсинчатом хорионе (1% клеток). С другой стороны, антиапоптотический белок Bcl-2 содержался в ворсинчатом хорионе, и не определялся в базальной децидуальной оболочке. Вероятно, в норме усиление экспрессии p53 и отсутствие выраженной продукции bcl-2 в базальной децидуальной оболочке является одним из механизмов отторжения плаценты во время родов. Нами так же отмечено увеличение проапоптотического белка p53 в группе женщин, беременность кото-

рых протекала на фоне легкого гестоза в базальной децидуальной оболочке. С другой стороны нами обнаружено увеличение количества антиапоптотического белка Bcl-2. Наблюдаемый нами дисбаланс между проапоптотическим и антиапоптотическим факторами совпадает и не противоречит ранее опубликованным сведениям о соотношении проапоптотических и антиапоптотических белков при легкой степени тяжести гестоза. Несомненно, дисбаланс между изучаемыми факторами является одной из этиологических причин развития гестоза.

Анализируя полученные нами данные, мы выявили повышенное содержание проапоптотического белка p53 в базальной децидуальной оболочке в группе женщин, беременность которых протекала на фоне тяжелого гестоза. Уровень антиапоптотического белка Bcl-2 в синцитиотрофобласте так же увеличивался с утяжелением гестоза. По нашему мнению, увеличение синтеза и секреции проапоптотического фактора в 4,3 раза по сравнению с контролем по мере утяжеления гестоза сопровождается повышением экспрессии антиапоптотического белка, что расценено как компенсаторная реакция в зонах формирования синцитиальных почеч в связи с повышением интенсивности апоптоза цитотрофобластических клеток при тяжелой степени тяжести гестоза. Таким образом, по нашему мнению, развитие гестоза на локальном уровне сопровождается превалированием продукции проапоптотических факторов при недостаточной компенсации со стороны антиапоптотических факторов. Вероятно, именно эти процессы приводят к усилению апоптоза. Отсутствие выраженной экспрессии p53 и bcl-2 в децидуальных клетках позволяют предположить, что митохондриальный путь апоптоза не играет существенной роли в их апоптозе. В цитотрофобластических клетках децидуальной базальной пластинки и ворсин хориона, как при неосложненной беременности, так и при гестозе, данный путь регуляции апоптоза представляется значимым. Это подтверждается нашими результатами о корреляции уровня экспрессии p53 в клетках цитотрофобласта в децидуальной базальной пластинке и в ворсинах хориона с развитием гестоза.

При развившемся гестозе нами отмечалось нарушение созревания ворсинчатого хориона по диссоциированному типу. При гестозе обращала на себя внимание неравномерная толщина цитотрофобластического слоя в базальной децидуальной оболочке за счет чередования участков истончения, где клетки располагались в 2–3 ряда, с зонами цитотрофобластической пролиферации. Количество эозинофильных, активно секретирующих форм клеток цитотрофобласта, в базальной пластинке несколько меньше количества больших децидуальных клеток.

Исследование апоптоза иммунных клеток в плаценте показало, что при легкой и тяжелой степени гестоза по сравнению с показателями контрольной группы повышалось содержание AnnexinV+ (p<0,01 и p<0,001, соответственно) и AnnexinV+PI- (p<0,02 и p<0,001, соответственно) децидуальных лимфоцитов. Только при гестозе легкой степени в децидуальной оболочке плаценты также как и в периферической крови, отмечалось увеличение количества лимфоцитов, находящихся на необратимых этапах апоптоза, но лишь на уровне тенденции (p>0,05). Для децидуальных макрофагов при гестозе было характерным, достоверное повышение уровня клеток, находящихся на ранних этапах апоптоза (p<0,02 в группе с легким гестозом и p<0,001 в группе с тяжелым гестозом) и тенденция к снижению уровня клеток, находящихся на поздних этапах апоптоза (p>0,05 в обоих случаях).

Эти изменения характера апоптоза иммунных клеток в тканях плаценты могли вызывать те же патологические реакции со стороны активированных цитотоксических клеток, В-лимфоцитов и макрофагов, которые отмечаются на системном уровне.

В отличие от периферической крови при неосложненной беременности и при гестозе децидуальные лимфоциты и макрофаги в высокой степени экспрессировали мРНК проапоптотического белка АРАФ, уровень экспрессии XIAP соответствовал таковому в периферической крови. Причем, при гестозе в децидуальной оболочке плаценты отмечалось многократное усиление синтеза проапоптотического белка АРАФ лимфоцитами (7,18 \pm 1,28 в контрольной группе, 36,59 \pm 9,40 в группе с гестозом, p<0,05) и макрофагами (7,77 \pm 2,18 в кон-

трольной группе, $33,67 \pm 8,05$ в группе с гестозом, $p < 0,01$). Характер экспрессии мРНК XIAP децидуальными лимфоцитами и макрофагами при гестозе не отличался от такового при неосложненной беременности ($p > 0,05$).

Полученные нами данные о повышении синтеза APAF свидетельствовали об усилении митохондриального пути апоптоза иммунными клетками на уровне децидуальной оболочки плаценты и о высокой значимости XIAP в регуляции этого процесса. Отмеченные нами особенности синтеза про- и анти-апоптотических белков на уровне децидуальной оболочки плаценты показали, что при неосложненной беременности в популяциях лимфоцитов и макрофагов также как и в периферической крови преобладало апоптоз-ингибирующее влияние XIAP, в то время как при гестозе превалировало апоптоз-активирующее влияние APAF. Это позволило нам предположить, что при гестозе на уровне децидуальной оболочки плаценты механизмы инициации апоптоза лимфоцитов и макрофагов значительно отличались от аналогичных в периферической крови, а усиление апоптоза иммунных клеток определялось высоким уровнем экспрессии APAF.

Исследование особенностей влияния TGF β 2 на показатели апоптоза децидуальных мононуклеарных клеток показало, что в группе без гестоза фактор роста не вызывал существенных изменений показателей раннего и позднего апоптоза лимфоцитов ($p > 0,05$ в обоих случаях по сравнению с показателями 24-часового контроля), но угнетал переход макрофагов в необратимый апоптоз ($p < 0,05$). Стимуляция клеток препаратом TGF β 2 в группе с гестозом приводила к достоверному повышению уровня апоптирующих лимфоцитов, вызывая усиление, как ранних, так и необратимых этапов их апоптоза ($p < 0,01$ в обоих случаях по сравнению с показателями 24-часового контроля). Действие TGF β 2 на апоптоз децидуальных макрофагов при гестозе было аналогичным в контрольной группе и определялось снижением уровня апоптирующих децидуальных макрофагов, в результате угнетения содержания клеток, находящихся на поздних этапах апоптоза ($p < 0,05$ в обоих случаях по сравнению с показателями 24-часового контроля).

По данным RT-PCR при неосложненной гестозом беременности и при гестозе TGF β 2 не влиял на экспрессию мРНК APAF лимфоцитами и макрофагами децидуальной оболочки ($p > 0,05$ во всех случаях по сравнению с показателями 24-часового контроля), но усиливал синтез XIAP в обеих клеточных популяциях ($p < 0,05$ во всех случаях по сравнению с показателями 24-часового контроля).

Вероятно, неоднозначность воздействия TGF β 2 на апоптоз децидуальных лимфоцитов и макрофагов определяется особенностями экспрессии его рецепторов в различных клеточных пулах и исходным характером процессов инициации их апоптоза в норме и при патологии. Отсутствие значимых изменений в регуляции раннего и позднего апоптоза децидуальных мононуклеарных клеток при воздействии TGF β 2 в группе без гестоза могло быть обусловлено низким уровнем экспрессии его рецепторов, а изменения в группе с гестозом – усилением экспрессии рецепторов к TGF β . Косвенным подтверждением высказанного нами предположения могут служить полученные данные об усилении продукции TGF β 2 в децидуальной оболочке при легкой и тяжелой степени гестоза, свидетельствующие о высокой значимости данного фактора роста в процессах иммунорегуляции на локальном уровне при гестозе. Возможно, при гестозе TGF β 2 усиливал лишь рецептор-опосредованный путь апоптоза децидуальных лимфоцитов, так как показано, что TGF β влияет именно на рецепторный путь апоптоза в различных клетках, индуцируя экспрессию Fas и активацию каспазы-8. При этом стимулированный фактором роста синтез XIAP не был достаточным для блокирования данного процесса. Изменения параметров апоптоза децидуальных макрофагов при воздействии TGF β 2 при гестозе были иными, чем в популяции децидуальных лимфоцитов. Возможно, для них индукция синтеза антиапоптотических факторов, таких как XIAP, при воздействии TGF β 2 была более значимой.

Изменения при гестозе параметров апоптоза лимфоцитов и макрофагов ворсинчатого хориона были минимальными. Для обеих клеточных популяций при гестозе было характерным небольшое повышение содержания клеток,

находящихся на поздних этапах апоптоза ($p < 0,05$ в популяции лимфоцитов и $p > 0,05$ в популяции макрофагов, по сравнению с показателями контрольной группы). Характер экспрессии APAF лимфоцитами и макрофагами ворсинчатого хориона не различался в сравниваемых группах, но при гестозе было выявлено снижение синтеза XIAP лимфоцитами ($p < 0,05$). Выявленные нами изменения могли отражать развитие компенсаторных реакций, подавляющих патологическое воздействие активированных иммунных клеток в системной циркуляции плода. По данным литературы снижение готовности к апоптозу пуповинных ЦТЛ и 56+ ЕК, уменьшение уровня апоптирующих лимфоцитов, усиление экспрессии FasL на поверхности ЦТЛ и ЕК является одним из патогенетических механизмов поражения ЦНС плода. Кроме того, именно в ворсинчатом хорионе по данным иммуногистохимического исследования при гестозе отмечалось усиление продукции bcl-2 в синцитиотрофобласте, что можно также рассматривать как компенсаторную реакцию, способствующую сохранению структуры хориона в окружении повреждающих факторов. Нарушение этих компенсаторных реакций могло определять максимальную выраженность апоптотических процессов в цитотрофобласте базальной децидуальной пластинке, в ворсинчатом хорионе и межворсинчатом пространстве при тяжелых формах гестоза.

Результаты эксперимента показали, что на уровне ворсинчатого хориона TGF β 2 вызывал однотипные апоптоз-регулирующие реакции при неосложненной гестозом беременности и при гестозе. В обеих исследуемых группах усиливался AnnexinV+ лимфоцитов под воздействием TGF β 2 ($p < 0,05$ в контрольной группе и $p < 0,001$ в группе с гестозом по сравнению с показателями 24-часового контроля). Но в группе без гестоза рост апоптирующих лимфоцитов определялся стимуляцией ранних этапов апоптоза ($p < 0,01$ по сравнению с показателями 24-часового контроля), а в группе с гестозом его поздних этапов ($p < 0,001$ по сравнению с показателями 24-часового контроля). Стимуляция TGF β 2 не вызывала достоверных изменений в показателях раннего и позднего апоптоза макрофагов ворсинчатого хориона в обеих исследуемых

группах ($p > 0,05$ во всех случаях по сравнению с показателями 24-часового контроля).

В ворсинчатом хорионе TGF β 2 не вызывал изменений в экспрессии мРНК анализируемых апоптоз-регулирующих генов лимфоцитами и макрофагами при неосложненной гестозом беременности и лимфоцитами в группе с гестозом ($p > 0,05$ по сравнению с показателями 24-часового контроля во всех случаях). Усиление экспрессии мРНК XIAP макрофагами при воздействии фактора роста отмечалось только в группе с гестозом ($p < 0,05$ по сравнению с показателями 24-часового контроля). Вероятно апоптоз-регулирующее влияние TGF β 2 на иммунные клетки плодового происхождения, также как и на клетки периферической крови матери в большей степени затрагивает рецептор-опосредованный путь апоптоза.

Таким образом, развитие гестоза ассоциируется с изменением апоптоза клеток иммунной системы и тканей плаценты. Дисбаланс продукции апоптоз-регулирующих факторов с усилением влияния проапоптотического белка p53 по-видимому лежит в основе усиление апоптоза в плаценте при гестозе, что приводит к повреждению фетоплацентарного барьера и усиленному поступлению в кровотока матери микрочастиц трофобласта и клеток плодового происхождения. Повышенная антигенная стимуляция материнской иммунной системы в свою очередь может инициировать цитотоксические и аутоиммунные

реакции, обуславливая полиорганную недостаточность при гестозе и повреждение тканей плаценты, что формирует порочный круг патологических реакций. Нарушение эндо- и экзогенной регуляции иммунного апоптоза на генном и молекулярном уровнях, приводящее к накоплению активированных цитотоксических лимфоцитов и моноцитов/макрофагов, вероятно, способствует развитию этих реакций.

Определение уровня содержания в плаценте экспрессии p53 и bcl-2 у беременных женщин с гестозом позволяет проводить дифференциальную диагностику степени тяжести гестоза.

Выводы

1. В группу риска на развитие гестоза следует относить женщин с экстрагенитальной патологией (артериальная гипертензия, ВСД по гипертоническому типу, хронический пиелонефрит, ожирение, диффузное увеличение щитовидной железы, хронический тонзиллит).

2. Для уточнения степени тяжести гестоза целесообразно проводить иммуногистохимическое исследование плаценты, полученной после родов от женщин с гестозом, с определением индекса экспрессии маркеров апоптоза p53 и bcl-2.

3. При значении p53 равном или более 2,4 у.е. и bcl-2 равном или более 2,2 у.е. диагностируют гестоз тяжелой степени, а при значении p53 2,0–2,39 у.е. и bcl-2 1,8–2,19 у.е. диагностируют гестоз легкой степени тяжести.

Литература

1. Кудряшова А.В., Сотникова Н.Ю., Мальгина Л.Ю., Панова И.А. Влияние трансформирующего фактора роста бета-2 на показатели апоптоза децидуальных лимфоцитов и макрофагов // Аллергология и иммунология. – 2009. – т.10, №2. – С.170–171.
2. Мальгина Л.Ю., Кудряшова А.В., Панова И.А. Параметры апоптоза периферических лимфоцитов при гестозе и возможности их регуляции трансформирующим фактором роста-бета2. // Вестник Российской военно-медицинской академии (Приложение). – 2009. – Ч.II. – №1(25). – С.499.
3. Кудряшова А.В., Сотникова Н.Ю., Панова И.А., Мальгина Л.Ю., Мамалыга И.Н. Нарушение регуляции апоптоза лимфоцитов при гестозе // Медицинская иммунология. – 2009. – Т.11. – № 4–5. – С.411.
4. Kudryashova A.V., Sotnikova N.Yu., Malgina L.Yu., Panova I.A. The influence of the transforming growth factor beta (TGF- β 2) upon the parameters of apoptosis of decidual lymphocytes and macrophages // New horizons in allergy, asthma and immunology / Ed. R. Sepiashvili. - Bologna, Italy.: MEDIMOND– 2009. – P.173–177.
5. Мальгина Л.Ю., Кудряшова А.В., Панова И.А. Механизмы регуляции апоптоза клеток иммунной системы при неосложненной беременности и гестозе // Проблемы репродукции (специальный выпуск по материалам IV международного конгресса по репродуктивной медицине) – Москва. – 2010. – С.93–94.

Сведения об авторах:

Мальгина Л.Ю., кандидат мед. наук, «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова» Минздрава России

153045, г. Иваново, ул. Победы, д. 20. Тел.: +7 (4932) 33-62-63.

About the authors:

Malgina L.Y., Candidate of Medicine, Ivanovo Research Institute of motherhood and the childhood name V.N. Horodkova of Ministry of health of Russia.

Pobedy Street 20, Ivanovo, 153045, Russia. Tel.: +7 (4932) 33-62-63.