

УДК 618.36, 547.436

ВПЛИВ ГОМОЦИСТЕЇНУ НА СТРУКТУРУ ТА ФУНКЦІЇ ТРОФОБЛАСТА ПЛАЦЕНТИ ЛЮДИНИ

О. П. МАРЦЕНЮК^{1,2}, К. Л. РОМАНЕЦЬ², М. Ю. ОБОЛЕНСЬКА¹, Б. ХУПЕРТЦ³

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ;

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;

³Медичний університет, кафедра клітинної біології, гістології, ембріології, Грац, Австрія;
e-mail: oberih_m@ukr.net

Підвищений рівень гомоцистеїну у крові вагітної є фактором ризику для порушення функцій плаценти та виникнення дефектів у розвитку плода. В наших дослідженнях встановлено, що за підвищеної концентрації гомоцистеїну в культуральному середовищі (від 20 до 80 мкМ) відбувається посилення процесів апоптозу, інгібування проліферації, порушення структури трофобласта плаценти та дещо незначна активація транссульфування. Активація шляху транссульфування свідчить про здатність плаценти деякою мірою запобігати підвищеним концентраціям гомоцистеїну.

Ключові слова: плацента людини, гомоцистеїн, фолієва кислота, транссульфування.

Гіпергомоцистеїнемія (ГГЦ) і підвищений рівень гомоцистеїну (ГЦ) у крові супроводжує численні ускладнення вагітності, зокрема прееклампсію, спонтанні аборти, плацентарну недостатність, внутрішньоутробне затримання росту плода, дефекти розвитку нервової трубки тощо [1–3]. ГЦ є проміжною сполукою метіонінового циклу, яка реметилюється за участю ензиму метіонінсинтази (ЕС 1.16.1.8) та субстратів 5-метилтетрагідрофолату (5-метил-ТГФ) або рідше бетаїну – донорів метильної групи [4]. Реметилювання ГЦ відбувається у тканинах усіх типів, у т.ч. у плаценті [5]. ГЦ може необоротно транссульфуватися за участю цистатіонін-β-синтази (CBS, ЕС 4.2.1.22) та цистатіонін γ-ліази (CSE, ЕС 4.4.1.1) з утворенням цистеїну, який використовується для синтезу протеїнів, глутатіону, а також таурину та сульфату у процесі катаболізму. Цей процес спостерігається лише в деяких тканинах ссавців – у печінці, нирках, мозку, тонкому кишечнику та підшлунковій залозі [6, 7], а згідно з нещодавно опублікованими даними, і у тканинах матки, плаценти, амніона, хоріона людини та щура [8]. Тканини, в яких транссульфування не відбувається або відбувається на незначному рівні, особливо вразливі до ГГЦ та водночас залежні від надходження цистеїну ззовні. До них належать тканини плода. На відміну від дорослої людини, в печінці якої цистеїн активно синтезується шляхом транссульфування, в печінці плода загальна активність CBS не перевищує 20% активності такої у дорослих, а ензим CSE взагалі не виявлено [9].

Бар'єром між організмом матері та плода є плацента – орган, який забезпечує постійний метаболічний зв'язок між їхньою кров'ю в період внутрішньоутробного розвитку. Постає питання, як саме впливає ГГЦ на ключові функції плаценти і чи здатна плацента деякою мірою захистити себе та плід від її шкідливої дії. На жаль, цілеспрямовані дослідження в першому напрямі досить обмежені, переважно модельними експериментами з первинними трофобластами, виділеними зі зрілої плаценти та культивованими у присутності ГЦ. Di Simone et al. установили, що 20 мкМ ГЦ індукує фрагментацію ДНК та апоптоз і помітно знижує продукцію хоріального гонадотропіну [10]. Непрямі дослідження свідчать про істотні зміни у структурі, функціях та фенотипі плаценти пацієнток із прееклампсією [11–13], яка, зазвичай, супроводжується ГГЦ, але невідомо, чи такі зміни є наслідком, власне, ГГЦ або інших супутніх змін у метаболізмі вагітної.

Щодо можливого транссульфування ГЦ у плаценті людини, то відповідно до останніх повідомлень у її тотальній РНК першого та третього триместрів вагітності виявлено CBS-специфічну РНК, рівень якої майже у 30 разів нижчий, ніж у печінці [14]. У зрілій плаценті людини та щурів ідентифіковано протеїни CBS та CSE [8]. При цьому активність CBS у плаценті щурів у 20–30 разів менша, ніж у печінці їхніх ембріонів [15]. Активність ензимів катаболізму цистеїну у плаценті людини вважається досить вірогідною через продукцію H₂S – одного з кінцевих продуктів транссуль-

фування [8], але безпосередні докази наявності активності ензимів нам невідомі.

Метою роботи було виявити, як впливає ГЦ у підвищених концентраціях та у присутності додаткової кількості фолієвої кислоти (ФК) на проліферацію, апоптоз і структуру ворсинок хоріона у плаценті людини першого та третього триместрів вагітності, а також визначити за цих умов експресію *CBS*.

Матеріали і методи

Культивування експлантів плаценти. Об'єктом дослідження були експланти із шести плацент людини: 3 першого (8–10 тижнів) та 3 третього (38–40) триместрів вагітності. Зразки плаценти відбирали відразу після легального хірургічного переривання вагітності або після пологів. Дослідження проводили відповідно до вимог Гельсінської декларації. Протокол отримання плаценти та дозвіл на її дослідження були затверджені Комітетом з етики Медичного факультету університету м. Грац (Австрія) та Комітетом з етики Інституту молекулярної біології та генетики НАН України. Всі жінки дали письмову згоду на використання плаценти в дослідженнях.

Експланти плаценти отримували і культивували згідно з протоколом, поданим до статті Waszyk et al. [16]. Зразки плаценти занурювали у стерильний охолоджений фізіологічний розчин, забуферений фосфатами (PBS, pH 7,2), після чого відрізали під мікроскопом окремі ворсинки хоріона, які переносили до 48-лункових планшетів із культуральним середовищем DMEM/Hem^s-F12 (PAA Laboratories GmbH, Австрія), що містило 1% пеніциліну, 1% стрептоміцину, 1% амфотерицину В та 2% L-глутаміну (PAA Laboratories GmbH, Австрія). При моделюванні стану ГЦ до культурального середовища вносили ГЦ (Sigma-Aldrich, США) до кінцевої концентрації 20, 40 та 80 мкМ, а також ФК (Sigma-Aldrich, США) – до кінцевої концентрації 20 нМ, яка тотожна середній концентрації її у крові людини [17]. Експланти культивували 48 год при 37 °С в інкубаторі із 6% O₂ та 5% CO₂. Стандартними вважали такі умови, коли плаценту культивували в середовищі без додаткового внесення ГЦ та ФК. Після культивування експланти використовували для імуногістохімічного аналізу або з них виділяли РНК для проведення зворотної транскриптазної полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР), або проводили лізис для визначення вмісту протеїну CBS методом вестерн-блотингу.

Імуногістохімічний та імунофлуоресцентний метод визначення антигенів Ki67, M30, CBS,

Cyt 7 та DAPI. Експланти плаценти, зафіксовані у формаліні, дегідрували і заключали в парафін, використовуючи класичний метод. Зрізи, завтовшки 5 мкм, нарізані на мікротомі фірми Menzel GmbH & Co KG (Німеччина), розміщали на предметних скельцях. Препарати після вилучення з них парафіну промивали в розчині 1xPBS (pH 7,2). Для підвищення антигенних властивостей протеїнів препарати в цитратному буфері (pH 6,2) тричі по 5 хв нагрівали у мікрохвильовій печі при 500 W, щоразу додаючи буфер по мірі його випаровування. Після 20-хвилинного охолодження при кімнатній температурі препарати промивали в 1xTBS-буфері, що містив 0,05% твіну. Блокування ендogenous пероксидаз та наступний імуногістохімічний аналіз здійснювали з UltraVision LP Detection System HRP Polymer & AEC Chromogen (Labvision corporation, США) відповідно до рекомендацій виробника. Одні препарати 60 хв інкубували з первинними мишиними антитілами до Ki67 (DakoCytomatin, Данія; розведення 1 : 100), другі – 30 хв з первинними мишиними антитілами до M30 CytoDEATH (Roche Diagnostics GmbH, США; розведення 1 : 125), а треті – 1 год з моноклональними антитілами до CBS (клон 3E1, Abnova Corporation, Тайвань, концентрація 3 мкг/мл). Інкубацію з антитілами здійснювали при кімнатній температурі. Вторинні антитіла були кон'юговані з пероксидазою хрину. Для визначення пероксидазної активності використовували HRP-полімер та AEC-хромогенний субстрат (3-аміно-9-етилкарбазол; Labvision corporation, США). Контрастне фарбування проводили з гематоксиліном.

Для імунофлуоресцентного аналізу препарати готували як зазначено вище, але без нагрівання в цитратному буфері. Їх інкубували з первинними мишиними антитілами до кератину 7 (Labvision, США) в розведенні 1 : 200 (30 хв, t_{кім}) та вторинними флуоресцентними козячими антимишиними антитілами Alexa Fluor 555 (Invitrogen, США) в розведенні 1 : 200 (1 год, t_{кім}) та DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole) – синім флуоресцентним маркером дволанцюгової ДНК (Invitrogen, США) в розведенні 1 : 2000 (5 хв, t_{кім}). Структурні особливості ворсинки хоріона аналізували, застосовуючи флуоресцентний мікроскоп (Zeiss AxioPhot, Німеччина) при збільшенні x200.

Визначення проліферативного та апоптотичного індексів в експлантах плаценти. Після виявлення специфічних антигенів у кожному із препаратів вибирали під мікроскопом 5 випадкових полів зору (збільшення x100), які фо-

тографували і обчислювали з використанням програми NIS-Elements AR 2,3 (Nikon, США). Визначали: площу зрізу ворсинок хоріона та площу з М30 позитивною зафарбованістю в кожній ворсинці; окружність ворсинок і кількість Ki67-позитивних клітин у зрізі кожної з них. Проліферативний індекс обчислювали як кількість Ki67-позитивних клітин/100 мкм окружності ворсинки хоріона. Апоптотичний індекс визначали у відсотках як величину відношення площі із М30 позитивною зафарбованістю в кожній ворсинці до загальної площі відповідної ворсинки.

Визначення експресії CBS в експлантах плаценти. Експресію гена в експлантах плаценти оцінювали за вмістом специфічної РНК у тотальній РНК методом ЗТ-ПЛР та за вмістом специфічного протеїну у лізаті експлантів аналізом вестерн-блотингу.

Для проведення аналізу ЗТ-ПЛР виділяли загальну РНК за допомогою реагенту TRI (RNA Isolation Reagent; Molecular Research Center, США) відповідно до інструкції виробника. РНК обробляли дезоксирибонуклеазою I (Fermentas, Литва) і транскрибували з використанням комерційного набору RevertAid™ (M-MuLV Reverse Transcriptase; Fermentas, Литва). Послідовність праймерів та умови ампліфікації були використані як у статті Persa et al. [18]. Розмір продукту ампліфікації становив 151 п.н.

Вестерн-блот-аналіз здійснювали з використанням Western Breeze Chemiluminiscent Immunodetection System (Invitrogen, США) відповідно до протоколу виробника. Експлант (близько 15 мг) гомогенізували в 400 мкл буфера для лізису, який містив 0,01 М трис (pH 7,0), 1% SDS, 1 мМ натрій ортованадат та 1 х коктейль інгібіторів протеаз (Roche Diagnostics GmbH, США). Гомогенат центрифугували (16 000 g, 4 °C, 10 хв) і в надосадовій рідині вимірювали концентрацію протеїну, застосовуючи стандартний метод О. Н. Lowry et al. [19]. Аліквоту супернатанту (20 мкг протеїну) інкубували 10 хв при 70 °C із 7,5 мкл 4 х LDS Sample Buffer та 3 мкл 10 х NuPAGE Sample Reducing Agent (Invitrogen, USA) в 30 мкл реакційної суміші, розділяли в 4–12%-у NuPAGE Bis-Tris (Invitrogen, США) гелі в 1 х MOPS-буфері (pH 7,0) та переносили упродовж 35 хв на нітроцелюлозну мембрану напівсухим методом в 1 х NuPAGE Transfer Buffer (Invitrogen, США).

Відмиту та заблоковану згідно з протоколом мембрану інкубували 12 год із первинними моноклональними антитілами до CBS (1 мкг/мл) при + 4 °C, після чого її відмивали

в буфері (10 мМ трис з pH 7,5; 100 мМ NaCl, 0,1%-й твін 20) та інкубували із вторинними антитілами (30 хв, $t_{кім}$). На мембрану наносили хемілюмінісцентний реагент (Invitrogen, США) і експонували її 1–2 хв із рентгенівською плівкою Amersham Hyperfilm (GE Healthcare, Велика Британія). Плівку проявляли, сканували і проводили денситометрию у програмі GelPro 3.1

Статистичне оброблення результатів. Результати наводили у вигляді медіан (Me) та нижніх і верхніх квартилей (Lq-Uq). Значущість відмінностей між контрольною та дослідною групами оцінювали за критерієм Вілкоксона. Статистичний аналіз даних здійснювали з використанням програми Statistica 7,0 (Stat-Soft 2004, США) [20].

Результати та обговорення

Вплив ГЦ та ФК на проліферативний і апоптотичний індекси в експлантах плаценти людини першого триместру вагітності. Моноклональні антитіла до антигену Ki-67 (Mib1) спроможні розпізнати ядерний антиген, який є маркером клітинної проліферації, оскільки він присутній у фазах G₁, S, G₂ та M клітинного циклу і відсутній в G₀-фазі [21]. Аналіз препаратів експлантів першого триместру вагітності свідчить про наявність Ki67-позитивних клітин серед клітин цитотрофобласту. Відповідне значення проліферативного індексу становило 4,2 (Lq-Uq, 3,1–5,1). Культивування експлантів з ГЦ (концентрація 20, 40 та 80 мкМ) зумовлює поступове статистичне вірогідне зниження проліферативного індексу в інтервалі 0–40 мкМ ГЦ (тест Вілкоксона, 0,001 < p < 0,02; табл. 1). Культивування експлантів у присутності тільки 20 нМ ФК також спричинює статистичне вірогідне зниження проліферативного індексу до 2,7 (Lq-Uq, 1,8–3,7; p = 0,011), а додавання ГЦ в дедалі більшій концентрації вірогідно не змінює цей показник. Також з підвищенням концентрації ГЦ додавання ФК істотно не впливає на проліферативний індекс.

За допомогою моноклональних антитіл М30 в експлантах першого триместру було виявлено специфічний неоепітоп цитокератину 18, який утворюється під час розщеплення цитокератину каспазою 3 на ранніх стадіях апоптозу [22]. Апоптотичний індекс в інтактних експлантах становив 0,8% (Lq-Uq, 0,1–1,1; табл. 1). Він зростає залежно від концентрації ГЦ за відсутності ФК у 2–7 разів (0,0002 < p < 0,0015). Культивування експлантів у присутності 20 нМ ФК і за відсутності

Таблиця 1. Проліферативний та апоптотичний індекси в експлантах плаценти першого триместру вагітності

Умови культивування	Без ФК		20 нМ ФК	
	Абсолютні одиниці	Відносні одиниці	Абсолютні одиниці	Відносні одиниці
<i>Проліферативний індекс</i>				
0 мкМ ГЦ	4,2 (3,1–5,1)	1	2,7* (1,8–3,7)	1
20 мкМ ГЦ	2,2* (1,0–3,2)	0,6	2,3* (0,2–2,9)	0,7
40 мкМ ГЦ	1,5* (1,1–2,3)	0,4	2,1* (1,5–3,0)	0,8
80 мкМ ГЦ	1,5* (1,2–2,2)	0,4	1,7* (1,3–2,6)	0,7
<i>Апоптотичний індекс</i>				
0 мкМ ГЦ	0,8 (0,1–1,1)	1	1,5* (0,6–2,8)	1
20 мкМ ГЦ	2,0* (1,7–3,2)	2,5	2,5*# (2,3–10,6)	1,8
40 мкМ ГЦ	4,2* (2,2–6,2)	5,3	5,1*# (2,2–7,8)	3,2
80 мкМ ГЦ	5,4* (4,1–6,7)*	6,8	6,3*# (5,4–7,3)	4,8

Проліферативний індекс, наведений у вигляді медіан абсолютних та відносних значень, відображує кількість Кі67-позитивних клітин на 100 мкм окружності ворсинки хоріона. В дужках наведено значення нижньої та верхньої квартилі абсолютних значень.

Апоптотичний індекс відображує частку площі (у %) з М30 позитивою зафарбованістю у ворсинці хоріона до загальної площі зрізу ворсинки (наведено у вигляді медіан абсолютних та відносних значень). В дужках подано значення нижньої та верхньої квартилі абсолютних значень.

* Значення індексів зі статистичною вірогідністю відрізняються від таких за стандартних умов культивування (тест Вілкоксона, $p < 0,05$); # значення індексів зі статистичною вірогідністю відрізняються від відповідних значень за умов культивування у присутності 20 нМ ФК (тест Вілкоксона, $p < 0,05$).

ГЦ вірогідно підвищує апоптотичний індекс до 1,5% (Lq-Uq, 0,6–2,8) порівняно зі стандартними умовами культивування ($p = 0,0002$). В разі підвищення концентрації ГЦ у присутності ФК апоптотичний індекс збільшується майже у 5 разів ($0,0006 < p < 0,0015$). Наявність у середовищі ГЦ в усіх концентраціях дещо підвищує апоптотичний індекс ($0,07 < p < 0,14$). Зростання значення апоптотичного індексу зі збільшенням концентрації ГЦ як у присутності, так і за відсутності ФК, істотно перевищує темпи зниження проліферативного індексу (табл. 1).

Таким чином, інкубація з ГЦ спричинює порушення рівноваги між проліферацією та апоптозом. Зниження проліферативного індексу в експлантах плаценти першого триместру у присутності ГЦ, імовірно, обумовлено кількома причинами. Підвищений рівень ГЦ як одного

із субстратів реметилювання потребує більшої кількості другого субстрату – 5-метил-ТГФ. За цих умов, вірогідно, відбувається зміщення реакцій тетрагідрофолатного циклу в бік утворення 5-метил-ТГФ і його подальшого використання в реакції реметилювання на тлі зменшення утворення N⁵,N¹⁰метилен-, N⁵,N¹⁰-метеніл- та N¹⁰-формілтетрагідрофолатів – донорів одновуглецевих фрагментів для синтезу пуринового кільця і тимідину. До деякої міри це припущення підтверджується даними, що свідчать про тенденцію до підвищення проліферативного індексу, яке спостерігається в культурі експлантів плаценти першого триместру вагітності під час сумісної інкубації з ГЦ та ФК. Слід також відзначити, що ГЦ токсично впливає на проліферацію клітин внаслідок утворення активних похідних кисню та оксиду азоту, активацію оксидативного

стресу [23] і пероксидного окислення ліпідів [24], зниження антиоксидантної спроможності ензимів [25], а також і на проліферацію через підвищення рівня апоптозу.

Нині дані літератури щодо впливу ГЦ на проліферативні процеси в концентраціях, які спостерігаються у клінічній практиці і використані в цих експериментах, свідчать про клітинно-специфічний характер його дії. Згідно з численними даними, ГЦ активує проліферацію клітин гладеньких м'язів судин [26–28], зірчатих клітин печінки [29] та клітин мікроглії [30], тобто клітин мезодермального походження. У клітинах ентодермального походження ГЦ, навпаки, пригнічує проліферацію, зокрема в попередниках нейронів [31] і в ендотелії судин [32, 33]. Здатність ГЦ інгібувати проліферацію ендотеліальних клітин пов'язують з інактивацією екстрацелюлярної сигнально-регуляторної кінази (Erk ½), пригніченням Erk ½-залежної експресії цикліну E [31], метилюванням p21 gas [34], супресією транскрипції цикліну A через зниження активності метилтрансферази I та деметилювання промотору цикліну A [35]. Ворсинчастий трофобласт – це неklasичний епітелій, оскільки він формується перед утворенням трьох шарів зародка і, отже, не походить із них. Однак трофобласту притаманні типові властивості епітелію [36], а його проліферація знижується за дії ГЦ. Тому мішені ГЦ в ендотеліальних клітинах можуть бути потенційними «кандидатами» для з'ясування їхньої участі в індукованому ГЦ інгібуванні проліферації у плаценті.

Дані щодо підвищення апоптозу в експлантах плаценти після інкубування з ГЦ збігаються з такими в експериментах із клітинами трофобласта [10]. Імовірно, що в цих об'єктах дослідження апоптоз опосередковується шляхом його активації мітохондріями. При цьому відбувається вивільнення цитохрому c до цитоплазми, розщеплення та фрагментація ядерної ДНК [10, 37, 38], активація p53 і експресія проапоптичного Ваk, у той час як проапоптичний Ваx та антиапоптичний Bcl-2 залишаються незмінними. Однак ці припущення вимагають подальшого експериментального підтвердження.

На відміну від досліджень Di Simone et al. [39], в яких показано, що ФК послаблює проапоптичний ефект ГЦ, ми виявили протилежну тенденцію: проапоптичний ефект ГЦ у присутності ФК дещо підвищується. Основні відмінності між цими експериментами полягають, насамперед, у тому, що в них було використано різні об'єкти дослідження (експланти

плаценти в наших дослідженнях і первинна культура клітин трофобласта зрілої плаценти в дослідженнях Di Simone et al. [39]). При цьому варто відзначити, що експланти плаценти є складнішою системою, яка більше наближається до функціонування плаценти *in vivo*, ніж культура клітин трофобласта [40]. Крім того, в експериментах Di Simone et al. використовували 2-годинну преінкубацію клітин із ФК перед додаванням до середовища ГЦ, тоді як в наших експериментах ГЦ та ФК додавали до середовища одночасно. З огляду на наведені відмінності в постановці експериментів, ми не можемо пояснити механізм цих розбіжностей. Дані літератури щодо проапоптичної дії ФК обмежені. Відомо, що вона підвищує апоптоз у ділянці премалігнізованого переродження шлунку [41] та у клітинах печінки щурів після введення їм CCl_4 [42]. В обох випадках ФК використовували у високих дозах (10 мг тричі на день для пацієнтів) та 1,5–25,0 мг/кг протягом 1,5–3,0 місяців в експериментах зі щурами. Це ускладнює порівняння результатів наших досліджень із даними літератури.

Вплив ГЦ і ФК на проліферативний та апоптичний індекси в експлантах плаценти людини третього триместру вагітності. Проліферативний індекс у культивованих експлантах третього триместру вагітності майже у 6 разів нижчий за такий в першому триместрі (табл. 2), що збігається з даними інших публікацій [43]. Інкубація експлантів зрілої плаценти у присутності як ГЦ, так і ГЦ сумісно з ФК істотно не впливає на початково низький проліферативний індекс трофобласта і на характер змін, пов'язаних із підвищенням концентрації ГЦ.

Одержані нами дані свідчать, що упродовж культивування експлантів зрілої плаценти за стандартних умов їхній апоптичний індекс удвічі перевищує такий в експлантах першого триместру. Відмінності між експлантами двох триместрів гестації стають ще наочнішими, оскільки зі зростанням концентрації ГЦ апоптичний індекс «зрілих» експлантів збільшується у понад 10 разів. Культивування експлантів лише у присутності 20 нМ ФК призводить до підвищення апоптичного індексу, однак додавання її до середовища дещо знижує залежність цього параметра від концентрації ГЦ і, вірогідно, не впливає на нього за умов культивування з ГЦ в жодній із досліджених концентрацій. Різниця між експлантами першого та третього триместрів гестації, культивованих за відсутності в середовищі ГЦ і ФК, була очікуваною. Відомо, що на ранніх стадіях

Таблиця 2. Проліферативний та апоптотичний індекси в експлантах плаценти третього триместру вагітності

Умови культивування	Без ФК		20 нМ ФК	
	Абсолютні одиниці	Відносні одиниці	Абсолютні одиниці	Відносні одиниці
<i>Проліферативний індекс</i>				
0 мкМ ГЦ	0,70 (0,5–0,9)	1,0	0,70 (0,5–1,0)	1,0
20 мкМ ГЦ	0,53 (0,3–0,8)	0,7	0,61 (0,5–1,1)	1,3
40 мкМ ГЦ	0,50 (0,4–0,8)	0,6	0,48 (0,3–0,5)	1,0
80 мкМ ГЦ	0,52 (0,5–0,9)	0,7	0,67 (0,4–0,7)	0,8
<i>Апоптотичний індекс</i>				
0 мкМ ГЦ	1,5 (1,4–2,8)	1,0	2,80* (2,4–4,3)	1,0
20 мкМ ГЦ	14,65 * (8,9–20,1)	10,9	15,70*# (4,2–18,2)	6,0
40 мкМ ГЦ	16,15* (4,3–20,7)	11,7	16,30*# (6,4–21,2)	6,2
80 мкМ ГЦ	16,35 * (9,3–21,8)	11,2	14,60*# (8,6–16,5)	5,7

* Значення індексів відрізняються від відповідних значень за стандартних умов культивування зі статистичною вірогідністю (тест Вілкоксона, $p < 0,05$);

Значення індексів відрізняються від відповідних значень за умов культивування у присутності 20 нМ ФК із статистичною вірогідністю (тест Вілкоксона, $p < 0,05$).

гестації переважають процеси проліферації, тоді як у зрілій плаценті – процеси апоптозу [44]. Ми припускаємо, що більшу чутливість експлантів зрілої плаценти до підвищеного рівня ГЦ, частково обумовлено змінами у фолатзалежному метаболізмі зрілої плаценти порівняно із плацентою першого триместру.

Експресія CBS у плаценті людини. Для експериментальної перевірки вищезазначеного припущення ми дослідили експресію гена CBS на рівні мРНК і протеїну та локалізацію CBS у плаценті людини першого і третього триместрів гестації.

У експлантах плаценти першого та третього триместрів вагітності нами було виявлено CBS-специфічну мРНК методом ЗТ-ПЛР (рис. 1, А) і CBS-специфічний протеїн вестерн-блот-аналізом (рис. 1, Б).

Локалізацію CBS у плаценті досліджували методом імуногістохімії. У зразках плаценти першого і третього триместрів вагітності спостерігали позитивну реакцію антитіл з антигеном CBS в синцитіотрофобласті і ци-

тотрофобласті та у клітинах строми (рис. 2, А, Б). Найінтенсивнішу реакцію виявили у зразках плаценти першого триместру вагітності. У стромі ворсинок першого триместру вагітності інтенсивність реакції була значно слабшою, ніж у трофобласті, тоді як у зразках третього триместру вона майже не відрізнялась у трофобласті та стромі.

Експресія CBS та структурні зміни у трофобласті за дії ГЦ та ФК. Вміст протеїну CBS залежно від концентрації ГЦ та ФК у культуральному середовищі досліджували в експлантах першого триместру вагітності за допомогою вестерн-блотингу. Дані електрофореграми та денситограми свідчать, що протягом культивування експлантів з 20 мкМ ГЦ у присутності та за відсутності ФК вміст протеїну CBS зростає майже утричі порівняно із стандартними умовами. При культивуванні експлантів з 40 та 80 мкМ ГЦ вміст протеїну CBS перевищує вихідний рівень тільки в 1,5–2,0 рази, а додавання до культурального середовища 20 нМ ФК трохи знижує його (рис. 3). Ми припус-

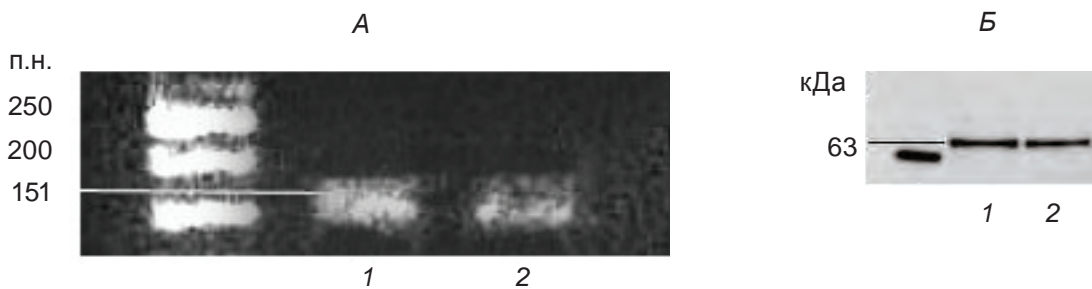


Рис. 1. Експресія CBS в експлантатах плаценти першого та третього триместрів вагітності: А – визначення мРНК CBS методом ЗТ-ПЛР; Б – результати вестерн-блотингу із антитілами проти CBS; 1 – препарати експлантів першого триместру; 2 – препарати експлантів третього триместру

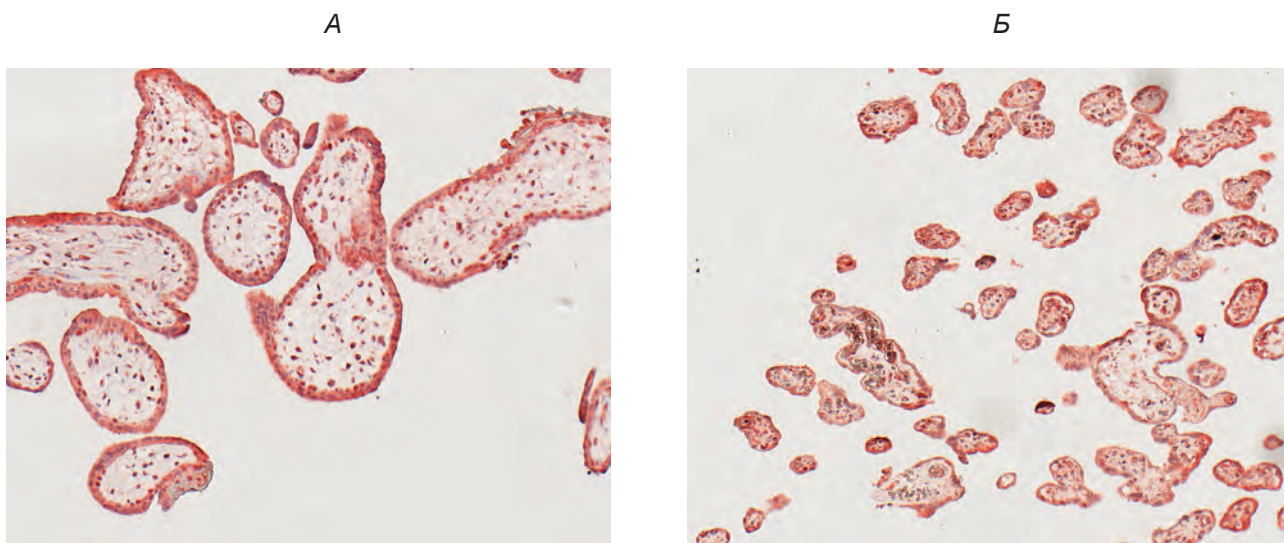


Рис. 2. Локалізація антигену CBS у плаценті людини першого (А) та третього (Б) триместрів вагітності (збільшення мікроскопа $\times 100$)

каємо, що збільшення вмісту протеїну CBS в експлантах плаценти при культивуванні з ГЦ у помірно підвищеній концентрації (близько 20 мкМ) є наслідком компенсаторної активації експресії гена *CBS*, за якої усувається надлишок ГЦ шляхом транссульфування. Імовірно, що зі збільшенням концентрації ГЦ (від 20 до 40 та 80 мкМ) компенсаторні можливості зменшуються через токсичний ефект ГЦ. ФК не компенсує цей ефект ГЦ, а, навпаки, виявляє тенденцію до його посилення. Таким чином, наведені вище результати стосовно тенденції до підвищення апоптотичного індексу у присутності ФК частково можна пояснити зниженням експресії *CBS* і відповідно уповільненням елімінації ГЦ шляхом транссульфування.

Ми дослідили також структуру трофобласта плаценти за наведених умов культивування.

Виявлено, що культивування за стандартних умов, а також у присутності 20 та 40 мкМ ГЦ і 20 нМ ФК істотно не впливає на структуру експлантів, тоді як за 80 мкМ ГЦ спостерігається часткове відшарування цито- та синцитіотрофобласта від строми (рис. 4).

Отже, у плаценті людини першого та третього триместрів гестації експресується *CBS* і в разі підвищеної концентрації ГЦ кількість протеїну CBS зростає. Підвищений вміст ГЦ призводить до змін у фолатзалежному метаболізмі плаценти людини, зумовлює дисбаланс між проліферацією та апоптозом і провокує суттєві порушення у структурі ворсинок хоріона. Безсумнівно, що ці зміни впливають на фізіологічний перебіг вагітності, розвиток плода та здоров'я новонароджених.

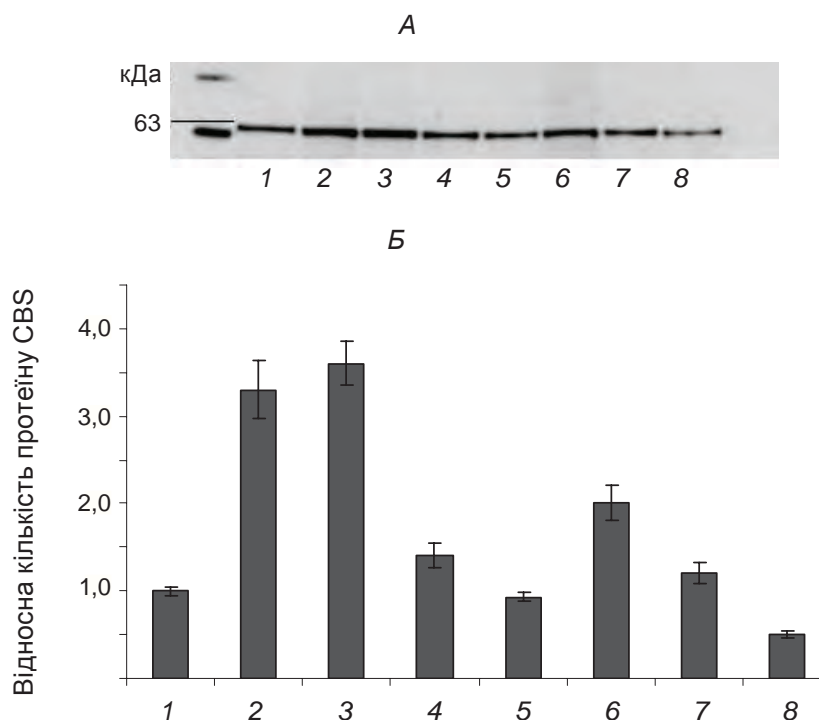


Рис. 3. Вміст CBS протеїну у тотальному протеїні плаценти людини. Електрофореграма (А) і денситограма (Б) вестерн-блот-аналізу експлантів плаценти з використанням специфічних антитіл проти CBS. Експланти плаценти першого триместру вагітності культивували впродовж 48 год за стандартних умов (1); у присутності ГЦ в концентраціях 20 (2), 40 (4) та 80 мкМ (6); у присутності 20 нМ ФК і ГЦ в концентраціях 20 (3), 40 (5) та 80 мкМ (7) і у присутності лише 20 нМ ФК (8)

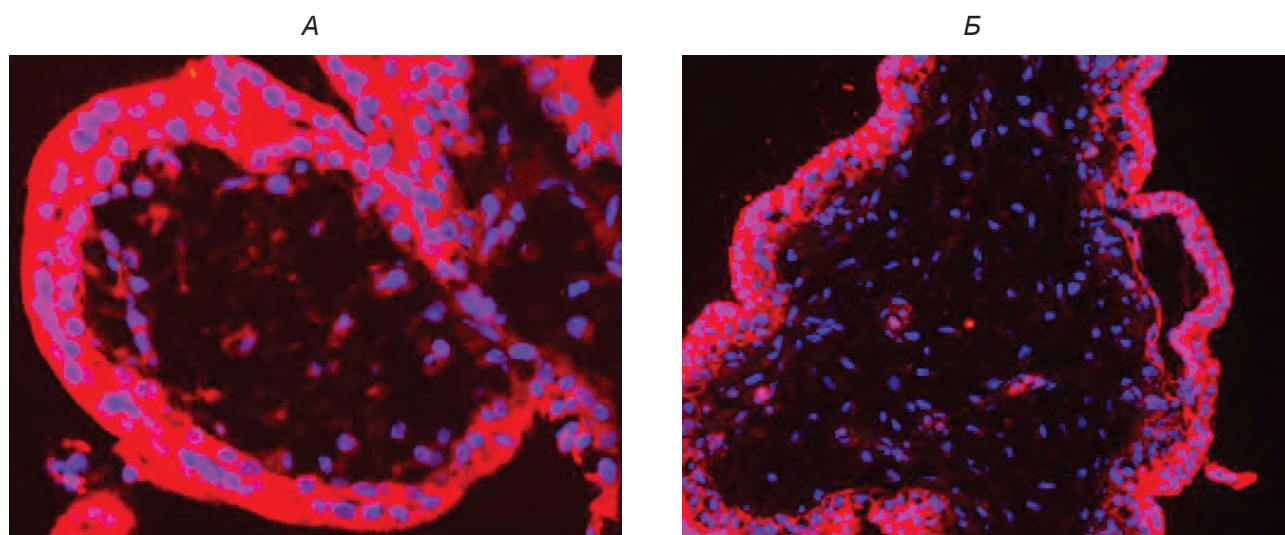


Рис. 4. Вплив гомоцистеїну на структуру ворсинок хоріона (флуоресцентна мікроскопія; збільшення $\times 200$): А – ворсинка хоріона після 48 год культивування за стандартних умов; Б – ворсинка хоріона після 48 год культивування у присутності 80 мкМ ГЦ. Спостерігається часткове відшарування трофобласту від стромы

Роботу виконано за підтримки грантів МОН №152-2006, 28-2008, INTAS YSF 06-1000014-5961 та гранта Президента України для обдарованої молоді №4, 2006 року.

ВЛИЯНИЕ ГОМОЦИСТЕИНА НА СТРУКТУРУ И ФУНКЦИИ ТРОФОБЛАСТА ПЛАЦЕНТЫ ЧЕЛОВЕКА

О. П. Марценюк^{1,2}, К. Л. Романец², М. Ю. Оболенская¹, Б. Хупертц³

¹Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев;

²Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Украина;

³Медицинский университет Грац, кафедра клеточной биологии, гистологии, эмбриологии, Австрия; e-mail: oberih_m@ukr.net

Повышенный уровень гомоцистеина в крови беременных является фактором риска, вызывающим нарушение функций плаценты и возникновение дефектов развития плода. Наши исследования показали, что в условиях повышенных концентраций гомоцистеина в культуральной среде (от 20 до 80 мкМ) происходит повышение процессов апоптоза, ингибирование пролиферации, нарушение структуры трофобласта плаценты и, в некоторой степени, активация процесса транссульфирования. Активация транссульфирования свидетельствует о способности плаценты в какой-то мере противостоять повышенным концентрациям гомоцистеина.

Ключевые слова: плацента человека, гомоцистеин, фолиевая кислота, транссульфирование.

EFFECT OF HOMOCYSTEINE ON THE STRUCTURE AND FUNCTIONS OF HUMAN PLACENTA TROPHOBLAST

O. P. Martsenyuk^{1,2}, K. L. Romanets², M. Yu. Obolenska¹, B. Huppertz³

¹Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Science of Ukraine, Kyiv;

²Taras Shevchenko Kyiv National University, Ukraine;

³Medical University of Graz, Department of Cell Biology, Histology and Embryology, Austria; e-mail: oberih_m@ukr.net

Summary

Elevated level of homocysteine in blood serum of pregnant women is the risk factor for placental malfunction and fetal abnormalities. Our study has shown the activation of apoptosis, inhibition of proliferation, destruction of placental trophoblast and activation of the transsulfuration pathway under elevated homocysteine level in the incubation medium in the range of 20-80 μM. The activation of the transsulfuration pathway indicates that placenta may to some extent withstand elevated homocysteine level.

Key words: human placenta, homocysteine, folic acid, transsulfuration.

1. *Van der Put N. M. J., van Straaten H. W. M., Trijbels F. J. M., Blom H. J.* // *Exp. Biol. Med.* – 2001. – **226**, N 4. – P. 243–270.
2. *Mignini L. E., Latthe P. M., Villar J. et al.* // *Obstet. Gynecol.* – 2005. – **105**, N 2. – P. 411–425.
3. *Пентюк О. О., Луцюк М. Б., Андрушко І. І., Постовітенко К. П.* // *Укр. біохім. журн.* – 2003. – **75**, № 1. – P. 5–17.
4. *Finkelstein J. D.* // *J. Nutr. Biochem.* – 1990. – **1**, N 5. – P. 228–237.

5. Utey C. S., Marcell P. D., Allen R. H. et al. // *J. Biol. Chem.* – 1985. – **260**, N 25. – P. 13656–13665.
6. Kery V., Poneleit L., Kraus J. P. // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1998. – **355**, N 2. – P. 222–232.
7. Finkelstein J. D. // *Semin. Thromb. Hemost.* – 2000. – **26**, N 3. – P. 219–225.
8. Patel P., Vatish M., Heptinstall J. et al. // *Reprod. Biol. Endocrinol.* – 2009. – **7**. – P. 10.
9. Sturman J. A., Gaull G., Raiha N. C. R. // *Science.* – 1970. – **169**, N 3940. – P. 74–76.
10. Di Simone N., Maggiano N., Caliandro D. et al. // *Biol. Reprod.* – 2003. – **69**, N 4. – P. 1129–1134.
11. Arnholdt H., Meisel F., Fandrey K., Lohrs U. // *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* – 1991. – **60**, N 6. – P. 365–372.
12. Lachmeijer A. M., Arngrimsson R., Bastiaans E. J. et al. // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2001. – **9**, N 10. – P. 758–764.
13. Allaire A. D., Ballenger K. A., Wells S. R. et al. // *Obstet. Gynecol.* – 2000. – **96**, N 2. – P. 271–276.
14. Solanky N., Requena Jimenez A, Tsitsiou E et al. // *Placenta.* – 2008. – **29**, N 8. – P. A.59.
15. VanAerts L. A. G. J., Poirrot C. M., Herberts C. A. et al. // *J. Reprod. Fertil.* – 1995. – **103**, N 2. – P. 227–232.
16. Baczyk D., Dunk C., Huppertz B. et al. // *Placenta.* – 2006. – **27**, N 4–5. – P. 367–374.
17. Selhub J., Jacques P. F., Wilson P. W. et al. // *JAMA.* – 1993. – **270**, N 22. – P. 2693–2698.
18. Persa C., Osmotherly K., Chao-Wei C. K. et al. // *Exp. Eye Res.* – 2006. – **83**, N 4. – P. 817–823.
19. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randal R. J. // *J. Biol. Chem.* – 1951. – **193**, N 1. – P. 265–275.
20. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. – М.: Медиа Сфера, 2003. – 305 с.
21. Bullwinkel J., Baron-Luhr B., Ludemann A. et al. // *J. Cell Physiol.* – 2006. – **206**, N 3. – P. 624–635.
22. MacFarlane M., Merrison W., Dinsdale D., Cohen G. M. // *J. Cell Biol.* – 2000. – **148**, N 6. – P. 1239–1254.
23. Loscalzo J. // *J. Clin. Invest.* – 1996. – **98**, N 1. – P. 5–7.
24. Young P. B., Kennedy S., Molloy A. M. et al. // *Atherosclerosis.* – 1997. – **129**, N 1. – P. 67–71.
25. Upchurch J., Welch G. N., Fabian A. J. et al. // *J. Biol. Chem.* – 1997. – **272**, N 27. – P. 17012–17017.
26. Zou C. G., Banerjee R. // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2005. – **7**, N 5–6. – P. 547–559.
27. Liu X., Shen J., Zhan R. et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2009. – **1794**, N 2. – P. 177–184.
28. Carmody B. J., Arora S., Avena R. et al. // *J. Vasc. Surg.* – 1999. – **30**, N 6. – P. 1121–1128.
29. Zou C. G., Gao S. Y., Zhao Y. S. et al. // *J. Mol. Med.* – 2009. – **87**, N 1. – P. 75–84.
30. Zou C. G., Zhao Y. S., Gao S. Y. et al. // *Neurobiol. Aging.* – 2009. – Jan. 6. [Epub ahead of print].
31. Rabaneda L. G., Carrasco M., Lopez-Toledano M. A. et al. // *FASEB J.* – 2008. – **22**, N 11. – P. 3823–3835.
32. Outinen P. A., Sood S. K., Pfeifer S. I. et al. // *Blood.* – 1999. – **94**, N 3. – P. 959–967.
33. Lee M. E., Wang H. // *Trends Cardiovasc. Med.* – 1999. – **9**, N 1–2. – P. 49–54.
34. Wang H., Yoshizumi M., Lai K. et al. // *J. Biol. Chem.* – 1997. – **272**, N 40. – P. 25380–25385.
35. Jamaluddin M. S., Yang X., Wang H. // *Clin. Chem. Lab. Med.* – 2007. – **45**, N 12. – P. 1660–1666.
36. Huppertz B., Burton G., Cross J. C., Kingdom J. C. // *Placenta.* – 2006. – **27 Suppl A.** – P. S3–S8.
37. Kwon K. B., Yang J. Y., Ryu D. G. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2001. – **276**(50). – P. 47518–47523.
38. De Falco M., Penta R., Lalforgia V. et al. // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* – 2005. – **24**, N 1. – P. 25–33.
39. Di Simone N., Riccardi P., Maggiano N. et al. // *Mol. Hum. Reprod.* – 2004. – **10**, N 9. – P. 665–669.
40. Miller R. K., Genbacev O., Turner M. A. et al. // *Placenta.* – 2005. – **26**, N 6. – P. 439–448.
41. Cao D. Z., Sun W. H., Ou X. L. et al. // *World J. Gastroenterol.* – 2005. – **11**, N 11. – P. 1571–1576.
42. Marsillach J., Ferre N., Camps J. et al. // *Mol. Cell Biochem.* – 2008. – **308**, N 1–2. – P. 101–109.
43. Danihel L., Gomolcak P., Korbel M. et al. // *Acta Histochem.* – 2002. – **104**, N 4. – P. 335–338.
44. Huppertz B., Kadyrov M., Kingdom J. C. // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2006. – **195**, N 1. – P. 29–39.

Отримано 13.08.2009