

## Роль фактора ингибирующего лейкемию в продукции окиси азота клетками трофобласта *in vitro*

Э.М.Амбарцумян, М. Сейбел, А.А. Енгибарян

*Репродуктивный центр Новой Англии, Школа медицины Бостонского университета, ЕрГМУ им. М. Гераци*

375025 Ереван, Корюна, 2

**Ключевые слова:** окись азота, синтетаза эндотелиальной окиси азота, синцитиотрофобласт, трофобласт, фактор ингибирующий лейкемию, цитотрофобласт

Окись азота (NO-nitric oxide) является сигнальной молекулой с полифункциональным биологическим действием, включая вазодилатацию, нейротрансмиссию, иммуномодуляцию, антимикробную и антиопухолевую активность [14, 17]. NO продуцируется как свободный радикал в процессе ферментативной конверсии L-аргинина в L-цитрулин при помощи ряда синтетаз NO (Nitric Oxide Synthase – NOS) [19]. Три главные изоформы NOS были выделены из различных тканей. Установлено, что их продукция регулируется тремя специальными генами. Ca-зависимые изоформы первоначально выделены в нервной ткани и эндотелиальных клетках, откуда и получили свои названия: neuronal NOS (nNOS) и endothelial NOS (eNOS). Третья изоформа синтетазы является Ca-независимой или индуцируемой (inducible – iNOS). Впервые она была определена в макрофагах и позднее – в различных тканях и клетках [16]. Продукция этих изоформ может стимулироваться различными цитокинами, такими как интерферон гамма (IFN- $\gamma$ ), интерлейкин-бета (IL- $\beta$ ), тумор-некротизирующий фактор-альфа (TNF- $\alpha$ ) и эндотоксин [14]. Выявлено, что биологические эффекты многих цитокинов могут опосредоваться NO iNOS происхождения [12]. NO также играет важную посредническую роль в индукции цитокином IL- $\beta$  роста фолликула, овуляции и атрезии фолликулов у крыс [3].

В течение беременности NO способствует поддержанию низкого базального тонуса кровообращения в системе фетотрофобласта путем предотвращения адгезии и агрегации друг с другом тромбоцитов и лейкоцитов на поверхности синцитиотрофобласта [4, 13, 18]. Предполагается, что NO играет роль барьера по отношению к инфекционным агентам, предотвращает отторжение фетоплацентарного гемияллографта [5], участвует в процессах роста и пролиферации трофобластных клеток, а также в релаксации миометрия матки [7]. Показана важная функция NO для созревания шейки матки и ее готовности к родам [6].

Исследования на животных показали, что eNOS наряду с iNOS маточного происхождения являются главными ферментами, ответственными за продукцию NO в течение беременности [5]. При этом выявлено, что основным источником eNOS фермента у человека является синцитиотрофобласт. Однако механизмы, регулирующие экспрессию eNOS в плаценте в процессе беременности, не изучены.

Исходя из этого, мы решили исследовать специфику клеточной продукции eNOS РНК в человеческой плаценте. Мы также исследовали возможную регуляцию цитокином ФИЛ на продукцию гена eNOS клетками человеческого трофобласта *in vitro*. ФИЛ, как показали наши исследования [1, 8–10] и исследования других авторов [2], относится к ряду цитокинов, которые играют важнейшую роль в имплантации эмбриона и функции трофобласта.

### Материал и методы

*Изолирование и культивирование трофобластических клеток.* В этой серии экспериментов использована человеческая плацента, полученная при неотяженной срочной беременности и доставленная в лабораторию в течение одного часа после родов. Цитотрофобластические клетки изолировались, очищались и культивировались, согласно методике Н.Ж. Kliman и др. [11], в течение 72 ч до их полной дифференциации в синцитиотрофобласт. Клеточные культуры замораживались на 24 ч (цитотрофобласт) и 72 ч (синцитиотрофобласт) культивирования.

Как цитотрофобластические, так и синцитиотрофобластические клетки подвергались воздействию ФИЛ (1 нг/мл) в течение 24 ч для определения их эффекта на экспрессию eNOS генов. После этого клеточные культуры замораживались ледяным PBS и хранились при  $-80^{\circ}\text{C}$  до экстракции общего РНК и после-

дующего RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) анализа. Часть клеток фиксировалась в 4% параформальдегиде в PBS для иммуноцитохимического анализа. В качестве позитивного контроля для eNOS употреблялись эндотелиальные клетки плацентарных артерий.

**Выделение и определение информационного РНК с применением обратной транскрипционной полимеразной цепной реакции (RT-PCR).** Тотальная РНК выделялась из плацентарной ткани и трофобластов при помощи TRI-зол реагента. Количество РНК оценивалось абсорбцией при 260 нм. Первый этап синтеза ДНК проводился путем применения 2–5 мг тотальной РНК при помощи суперскрипт – преамплификационной системы (Life Technology, США) в 20 мл реактивной смеси. Использование праймеров для eNOS и амплификация проводилась по описанию van Voohris B.J. et al. [20]. Для определения размеров полученных продуктов использовалась шкала “лестничной” ДНК с молекулярным весом 100 bp base раег. Последняя загружалась в гель аналогично исследуемым образцам. В качестве негативного контроля комплементарная ДНК заменялась таким же количеством DEPC обработанной воды.

**Иммуноцитохимия.** Культивированные трофобластические клетки иммуноокрашивались с использованием пероксидазы. Далее инкубировались в 24 - ячеечных чашках (Falcon) или Nunc чашечках, после чего фиксировались в течение 30 мин в 4% параформальдегиде в PBS.

Трофобластные клетки блокировались эндогенной

пероксидазой в течение 30 мин в 1% растворе перекиси водорода. Клетки инкубировались в присутствии первичных антител (разведение 1:150) в течение ночи при  $t$  40°C. Используются кроличьи поликлональные антитела (ABC staining System, Санта Круз, США). Процедура была продолжена согласно рекомендациям изготовителей. Цифровые данные уровня экспрессии иРНК выражены как среднее  $\pm$  SEM и анализировались, применяя  $t$  тест Стьюдента для парных результатов. Различия считались значимыми при значениях  $P < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

В проведенной серии экспериментов в качестве цитотрофобластов были приняты клетки, культивированные в среде в течение 24 часов. Синцитиотрофобластами считалась культура клеток, культивированная в течение 72 часов. Последние способны вырабатывать значительное количество гормонов беременности (ХГ, ПЛ), а также других факторов роста.

Система выращивания трофобласта *in vitro* по многим параметрам успешно симулирует процессы, происходящие в плаценте *in vivo*. Данные иммунологических и биохимических исследований подтвердили, что трофобласт в указанной системе не содержит примесей фибробластов, нейтрофилов, макрофагов и эндотелиальных клеток [11], являясь идеальной моделью для исследований функции человеческой плаценты *in vitro*.

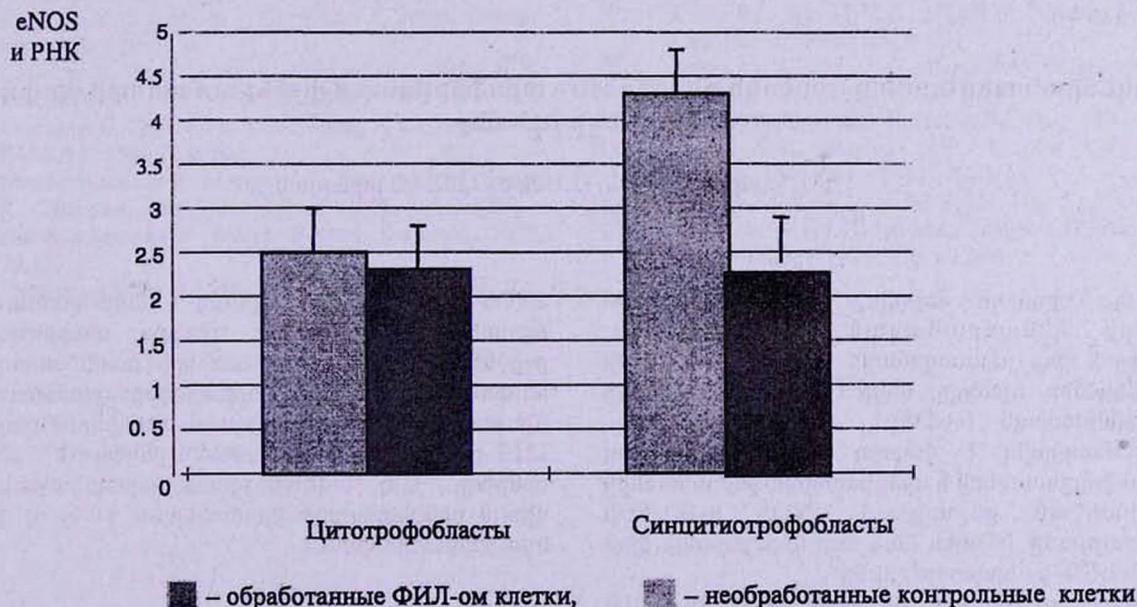


Рис. Уровень продукции eNOS и РНК трофобластов и эффект цитокина ФИЛ на этот процесс

Результаты наших исследований показали, что иРНК eNOS вырабатывается как цитотрофобластом, так и синцитиотрофобластом. Однако уровни экспрессии обоих иРНК были выше в синцитиотрофобластических, чем в цитотрофобластических клетках.

Для оценки эффектов цитокина ФИЛ на экспрессию eNOS иРНК в отдельной серии опытов цитотрофобластические и синцитиотрофобластические клетки обрабатывались ФИЛ в дозе 1 нг/мл. Результаты исследования показывают, что ФИЛ подавляет экспрессию иРНК eNOS в трофобластных клетках *in vitro*. Эффект этого цитокина на иРНК eNOS наблюдался только в синцитиотрофобластных, но не в цитотрофобластных клетках).

Иммунпероксидазное окрашивание клеток в культуре показывает, что цитотрофобласты и синцитиотрофобласты иммунореактивны в отношении eNOS. Иммуноокрашивание имело место в пределах цитоплазмы одноядерных цитотрофобластов и многоядерных синцитиотрофобластов.

Эндотелиальные клетки плацентарных артерий (положительный контроль для eNOS) были окрашены положительно. Трофобластические клетки, обработанные без первичных антител или в комбинации со специфическим к первичному антителу протеином (негативный контроль), не были окрашены.

Результаты наших экспериментов *in vitro* свидетельствуют, что и цитотрофобластические, и синцитиотрофобластические клетки могут вырабатывать

иРНК eNOS и что их уровень в дифференцированных синцитиотрофобластных клетках выше, чем в цитотрофобластных. Эти данные дают основание предположить, что экспрессия eNOS может быть функцией клеточной зрелости. На основании способности NO расслаблять миометрий матки [18] и индуцировать сосудистое ремоделирование [15] можно полагать, что относительно стабильное количество NO продукции (eNOS происхождения) трофобластами может играть важную роль в росте и развитии матки и трофобласта, а также в эмбриональной неоваскуляризации. Высокий уровень NO синтаз в синцитиотрофобластных клетках, находящихся в постоянном контакте с материнской кровью и внешними агентами, может быть необходим для модуляции специфической иммунной реакции и антимикробной активности. Очевидная регуляция NO в трофобластных клетках человека цитокинами ФИЛ указывает на важную роль NO в опосредовании эффектов ФИЛ в трофобласте человека. Интересно, что, как нами ранее показано, ФИЛ способен выраженно стимулировать продукцию iNOS иРНК в трофобластической культуре клеток [10]. Тем не менее в отношении eNOS этот цитокин играет роль ингибитора. Биологическую роль дифференцированного эффекта ФИЛ на продукцию iNOS и eNOS иРНК предстоит выяснить. По имеющимся у нас данным, это первое сообщение, свидетельствующее об ингибирующем эффекте ФИЛ на продукцию eNOS гена в человеческих клетках.

Поступила 03.07.02

## Լեյկեմիան արգելակող գործոնի դերը *in vitro* տրոֆոբլաստ բջիջներում ազոպի օքսիդի արտադրման մեջ

Է.Մ. Նամբարձումյան, Մ. Սեյբել, Ա. Ա. Ենգիբարյան

Ազոպի օքսիդի մոլեկուլը օժտված է լայն սպեկտրի կենսաբանական ակտիվությամբ: Բջիջներում դրա արտադրմանը մասնակցում են մի շարք էնզիմներ, որոնցից մեկը էնդոթելային ազոպի օքսիդի սինթետազն է (eNOS):

Ուսումնասիրվել է մարդու տրոֆոբլաստներից ցիտոտրոֆոբլաստների և սինցիտիոտրոֆոբլաստների տարբերակման ընթացքում eNOS ի-Ռ-Ն-Թ-ի արտադրությունը, ինչպես նաև այդ գործընթացի վրա ցիտոկին ԼՄԳ-ի ներգործությունը:

Հետազոտությունների արդյունքները ցույց են տալիս, որ մարդու տրոֆոբլաստներն արտադրում են

eNOS ի-Ռ-Ն-Թ և դրանց համապատասխան պրոտեիններ: Ընդորում պակաս տարբերակված բջիջների ցիտոտրոֆոբլաստների համեմատությամբ հասուն ձևերում՝ սինցիտիոտրոֆոբլաստներում այդ նյութերի սինթեզի մակարդակն զգալիորեն բարձր է: ԼՄԳ-ը *in vitro* տրոֆոբլաստում ընկճում է eNOS-ի սինթեզը: Այդ ազդեցությունը արտահայտվում է միայն սինցիտիոտրոֆոբլաստներում, բայց ոչ՝ ցիտոտրոֆոբլաստներում:

## The role of leukemia inhibitory factor in production of nitric oxide in human trophoblast cells in vitro

E. M. Hambartsoumian, M. Seibel, A.A. Yengibararian

NO-nitric oxide is a molecule with a wide scale of biological activity. A number of synthases of NO take part in its production, one of which is the endothelial synthase of NO (e-NOS).

In the given series of experiments we examined the expression of e-NOS mRNA in human trophoblasts during the cell differentiation from cytotrophoblast into syncytiotrophoblast. We also examined the LIF cytokine effect on e-NOS mRNA production level.

The results of our study demonstrated that human trophoblast produces e-NOS mRNA, as well as their proteins. The expression level of mRNA is authentically higher in syncytiotrophoblasts in vitro. This effect is revealed in syncytiotrophoblasts, but not in cytotrophoblasts.

### Литература

1. Амбарцумян Э. В кн.: Вопросы теоретической и клинической медицины Армении, 2, 8. Ереван, 1999.
2. Arici A., Engin O., Atar E., Olive D.L. J. Clin. Endocrinol. Metab., 1995, 80, p. 1908.
3. Bonello N., McKie K., Jasper M., Andrew L. et al. Biol. Reprod., 54, p. 436.
4. Buttery L.D.K., McCarthy A., Springall D.R. et al. Placenta. 1994, 15, p. 257.
5. Chwalisz K., Buhimschi I., Garfield R.E. Prenat. Neonat. Med., 1961, 292.
6. Chwalisz K., Shao-Quing S., Garfield R.E., Beier H.M. Hum. Reprod., 1997, 12, p. 2093.
7. Conrad K.P., Joffe C.M., Kruszyna H., Kruszyna R. et al. FASEB J., 1993, 7, p. 566.
8. Hambartsoumian E., Moreau J.F., Taupin J.L., Frydman R., Chaouat G. Mol. Hum. Reprod., 1998, 4 (11);1039.
9. Hambartsoumian E. Am. J. Reprod. Immunol., 1998, 39:137.
10. Hambartsoumian E., Srivastava R.K., Seibel M.M. Am. J. Reprod. Immunol., 2001, 45; 78.
11. Kliman H.J., Nestler J.E., Sermasi E. Sanger J.M., Strauss J.F. Endocrinology., 1986, 118:567.
12. Maciejewski J.P., Selleri C., Sato T., Cho H.J., Keefer L.K. et al. J. Clin. Invest., 1995, 96:1085.
13. Myatt I., Brewer A.S., Brockman D.E. Am. J. Obstet. Gynecol., 1991, 164, p. 687.
14. Nathan C., Xie Q.W. Cell, 1994, 78, p. 915.
15. Rudic R.D., Shesely E.G., Maeda N., Smithies O. et al. J. Clin. Invest., 1998, 101, p. 731.
16. Salter M., Knowles R.G., Moncada S. FEBS, 1991, 291, p. 145.
17. Schmidt H.H., Walter U. Cell, 1994, 78, p. 919.
18. Sladek S.M., Magness R.R., Conrad K.P. Am. J. Physiol., 1997, 272, (2 Pt2), R441.
19. Stamler J.S. Cell, 1994, 78, p. 931.
20. Van Voorhis B.J., Dunn M.S., Snyder G.D., Weiner C.P. Endocrinology, 1994, 135, p.1799.