

Экспрессия активности генов ферментов окиси азота в трофобласте человека

Э.М. Амбарцумян, А.А. Енгибарян

Медицинский центр "Шенгавит", кафедра биологии ЕрГМУ им. М. Гераци

375025, Ереван, ул. Корюна, 2

Ключевые слова: окись азота, цитотрофобласт, фактор, ингибирующий лейкемию, синцитиотрофобласт, ген, iNOS, eNOS

В настоящее время считается установленным, что многие эндогенноактивные факторы медиаторного спектра действия – цитокины, принимают активное участие в процессах формирования и деятельности репродуктивной функции млекопитающих [4–6,8,9,11,14,15]. Нашими предыдущими исследованиями [1] установлено, что "специализированные клетки" органов репродуктивной системы продуцируют фактор, ингибирующий лейкемию (ФИЛ), который, действуя локально, играет важную роль в процессах прогрессирования беременности. В то же время считается установленным, что в рамках репродуктивной системы задействованы также процессы свободнорадикальной активности [10]. Так, в плаценте человека задействован каскад ферментативных реакций, обеспечивающих местный синтез оксида азота (NO). Главными энзимами, ответственными за продукцию NO *in situ*, являются три изофермента NOS (Nitric Oxide Synthase): нейрональная NOS (nNOS), эндотелиальная NOS (eNOS) и Ca-независимая или индуцируемая NOS (iNOS). Учитывая то обстоятельство, что роль ФИЛ не ограничивается только процессами модуляции клеток миелоидного ряда, можно предположить, что ФИЛ обладает также и модулирующими потенциями – в плане активации процессов синтеза NO, тем более, что ФИЛ имеет много сходных с IL-6 эффектов, который, как известно, принимает активное участие в процессах синтеза NO. Не исключено, что аналогичный механизм, лежащий в основе синтеза NO, реализуется и на уровне органов половой сферы в условиях формирования репродуктивных процессов.

Материал и методы

Трофобластические клетки были изолированы из человеческой плаценты и культивированы по схеме Kliman [7]. Виллозная ткань помещалась в среду, содержащую 0.25% трипсина и 500 ед ДН-азы. Полученная клеточная суспензия очищалась путем прерывистой фильтрации с

использованием градиента перкола (от 5 до 70%). Трофобластические клетки культивировались в среде, содержащей ДМЕМ, 10% плазму бычьего плода с примесью антибиотиков.

Клетки помещались в 24-ячеечную чашечку с концентрацией 8×10^5 клеток на одну ячейку, при $t=37^\circ\text{C}$.

Уровень ФИЛ в среде определялся методом Taupin et al. [13]. Вариации оптических плотностей измерялись при помощи ELISA-читающего сканнера при длине волны 450 и 570 нм.

Определение уровней экспрессии генов iNOS и eNOS производилось путем выделения РНК и RT-PCR. РНК выделялась из трофобластов при помощи TRI-зол реагента. Количество РНК оценивалось абсорбцией при 260 нм. Комплементарная ДНК употреблялась для PCR амплификации, с применением специфических для iNOS или eNOS генов праймеров в смеси, содержащей Tag полимеразу.

Цитотрофобластические (ЦТБ) и синцитиотрофобластические (СТБ) клетки подвергались воздействию ФИЛ (1 нг/мл) в течение 24 ч для определения их эффекта на экспрессию eNOS-генов.

Результаты и обсуждение

Результаты наших экспериментов показали, что как ЦТБ, так и СТБ клетки могут вырабатывать iNOS, eNOS иРНК, что допускает участие NOS изоформ не только при патологических, но и при физиологических процессах, происходящих в плаценте человека. В процессе дифференциации ЦТБ в СТБ уровни экспрессии как iNOS иРНК, так и eNOS иРНК (рис. 1 и 2) заметно повышаются. Данное обстоятельство свидетельствует о том, что экспрессия обоих энзимов может рассматриваться в качестве одной из функций трофобласта на разных этапах его дифференциации.

В указанном плане считается установленным, что стероидные гормоны и гонадотропины в СТБ клетках прямо и/или косвенно модулируют местный синтез

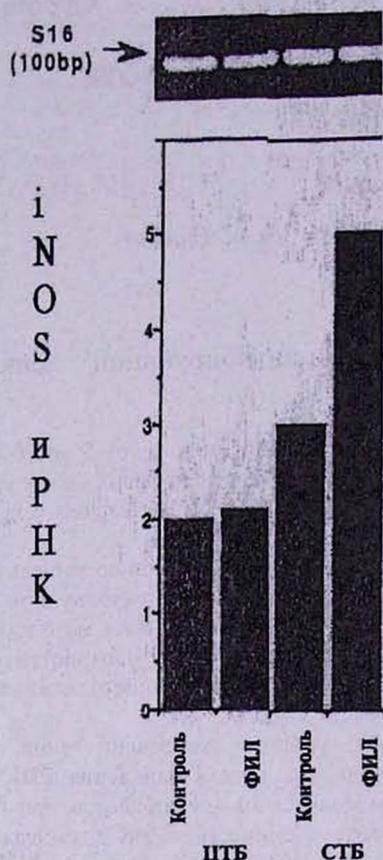


Рис. 1. Эффект ингибирующего лейкомию цитокин-фактора на экспрессию iNOS и pRK в цитотрофобласте (ЦТБ) и синцитиотрофобласте (СТБ) человека

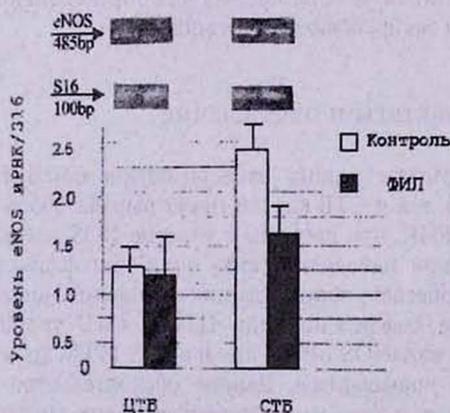


Рис. 2. Эффект ингибирующего лейкомию цитокин-фактора на экспрессию eNOS и pRK в цитотрофобласте (ЦТБ) и синцитиотрофобласте (СТБ) человека

iNOS, иРНК, eNOS иРНК. При этом задействован также и триггерный механизм, опосредованный цитокинами [3].

Эти данные, правда косвенно, свидетельствуют о том, что в рамках репродуктивной системы ФИЛ способен модулировать экспрессию iNOS и eNOS и РНК в "гормонально активных" СТБ клетках, но не в ЦТБ клетках. Подтверждением выдвинутого нами допущения свидетельствуют и наши предыдущие исследования [2], согласно которым в ряде внутренних органов ФИЛ выступает также в качестве мощного стимулятора продукции iNOS и РНК, в функциональном отношении аналогичного с γ -IFN. Однако в трофобластах ФИЛ подавляет экспрессию eNOS иРНК.

Биологическое значение дифференцированного воздействия ФИЛ на экспрессию iNOS и eNOS генов в клетках плаценты остается неизученным. На основании способности NO расслаблять миометрий матки, а также индуцировать сосудистое ремоделирование [12] можно полагать, что относительно стабильное количество NO продукции (eNOS происхождения) трофобластами может играть важную роль в развитии матки и фетотрофобласта, а также в механизме эмбриональной неоваскуляризации. В то же время высокие уровни NO (iNOS происхождения) в СТБклетках могут участвовать в региональных процессах неспецифической и специфической иммунологической, а также антибактериальной активности. Выраженная способность ФИЛ, наряду с γ -IFN, стимулировать продукцию NO в трофобласте указывает на его вероятное участие в NO опосредованном оксидативном стрессе, сопровождающемся, в частности, поражением плаценты. В то же время молекулярные механизмы регуляции ФИЛ продукции NO остаются невыясненными. ФИЛ и γ -IFN имеют общие сигнальные пути трансдукции и индуцирования некоторых транскрипционных факторов, таких как AP-1 и NF-kB, которые, в свою очередь, участвуют в регуляции продукции NO-синтаз [10]. Эти данные отражают наличие схожих механизмов, заинтересованных в процессах направленной активации NO-синтаз.

Таким образом, собственными исследованиями удалось установить, что экспрессия генов iNOS и eNOS возрастает в процессе дифференциации трофобласта из ЦТБ в СТБ. При этом ФИЛ избирательно активирует процессы экспрессии iNOS иРНК в клетках СТБ и подавляет выработку eNOS иРНК.

Поступила 31.03.06

Մարդու փրոֆորլասպներում ազոտի մոնօքսիդի գենների ակտիվության դրսևորումը

Է.Մ. Նամբարձումյան, Ա.Ա. Ենգիբարյան

Փորձանոթային պայմաններում հետազոտված է մարդու ընկերքի բջիջների տարբերակման գործընթացում ազոտի մոնօքսիդի գենների iNOS-ի և eNOS-ի էքսպրեսիան: Հաստատված է, որ լեյկեմիան

արգելակող գործոնը մասնակցում է ազոտի մոնօքսիդի գենների ակտիվության կարգավորմանը: Այն խթանում է մարդու տրոֆորլաստի iNOS գենը և ճնշում է սինցիտիոտրոֆորլաստի eNOS գենի էքսպրեսիան:

Differential expression and regulation of iNOS and eNOS mRNA in human trophoblast cells

E.M. Hambartzumyan, A.A. Yengibaryan

Our objective was to determine the expression of inducible and endothelial nitric oxide synthase (iNOS and eNOS) in human trophoblast and to examine the possible regulation of these genes by cytokine leukemia inhibitory factor (LIF). Expression of iNOS and eNOS genes was detected using PCR technique. Human trophoblast cells were cultured in vitro into cytotrophoblast (CTB) and

syncytiotrophoblast (STB) cells. The effects of LIF on iNOS mRNA were only observed in STB cells, but not in CTB cells. LIF induced the iNOS mRNA expression and inhibited eNOS mRNA in syncytiotrophoblast cells in vitro, suggesting possible similar regulatory mechanisms in vivo.

Литература

1. *Ամբարձումյան Է.Մ.* Автореф. докт. дис. Ереван, 2004, 46 с.
2. *Ամբարձումյան Է.Մ., Տեյբել Մ., Ենգիբարյան Ա.Ա.* Мед. наука Армения НАН РА, 2002, т. XLII, 4, с. 22-25.
3. *Vauche F., Stephan J.P., Touzalin A.M., Jegou B.* In vitro regulation of an inducible type NO synthase in the rat seminiferous tubule cells, *Biol. Reprod.*, 1998;58: 431-438.
4. *Breard E., Benhaim A., Feral C., Leymarie P.* Rabbit ovarian production of interleukin-6 and its potential effects on gonadotropin-induced progesterone secretion in granulosa and theca cells, *J. Endocrinol.*, 1998 Dec;159(3):479-487.
5. *Deb S., Tessier C., Prigent-Tessier A., Barkai U., Ferguson-Gottschall S. et al.* The expression of interleukin-6 (IL-6), IL-6 receptor, and gp130-kilodalton glycoprotein in the rat decidua and a decidual cell line: regulation by 17beta-estradiol and prolactin, *Endocrinology*, 1999 Oct;140(10):4442-4450.
6. *Irahara M., Ando M., Kol S., Adashi E.Y.* Expression and hormonal regulation of rat ovarian interleukin-1beta converting enzyme, a putative apoptotic marker: endocrine- and paracrine-dependence, *J. Reprod. Immunol.*, 1999 Nov;45(1):67-79.
7. *Kliman H.J., Nestler J.E., Sermasi E., Sanger J.M., Strauss J.F.* 3rd. Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae, *Endocrinology*, 1986 Apr;118(4):1567-82.
8. *Loret de Mola J.R., Goldfarb J.M., Hecht B.R. et al.* Gonadotropins induce the release of interleukin-1 beta, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha from the human preovulatory follicle, *Am. J. Reprod. Immunol.*, 1998 Jun;39(6):387-390.
9. *Mathialagan N., Roberts R.M.* A role for cytokines in early pregnancy, *Indian J. Physiol. Pharmacol.*, 1994 Jul;38(3):153-162.
10. *Nathan C., Xie Q.W.* Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls, *Cell*, 1994 Sep; 23;78(6):915-918.
11. *Putowski L., Kotarski J.* The effect of TNF-alpha (tumor necrosis factor-alpha) on progesterone synthesis in vitro by cells from ovarian follicular fluid in women, *Ginekol. Pol.*, 1995 Jun;66(6):330-334.
12. *Rudic R.D., Shesely E.G., Maeda N., Smithies O., Segal S.S., Sessa W.C.* Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling, *J. Clin Invest.*, 1998 Feb; 15;101(4):731-736.
13. *Taupin J.L., Acres B., Dott K., Schmitt D. et al.* Immunogenicity of HILDA/LIF either in a soluble or in a membrane anchored form expressed in vivo by recombinant vaccinia viruses, *Scand. J. Immunol.*, 1993 Sep;38 (3):293-301.
14. *Telleria C.M., Ou J., Sugino N., Ferguson S., Gilzri G.* The expression of interleukin-6 in the pregnant rat corpus luteum and its regulation by progesterone and glucocorticoid, *Endocrinology*, 1998 Aug;139(8):3597-3605.
15. *Tsigos C., Papanicolaou D.A., Kyrou I., Raptis S.A., Chrousos G.P.* Dose-dependent effects of recombinant human interleukin-6 on the pituitary-testicular axis, *J. Interferon Cytokine Res.*, 1999 Nov;19(11):1271-1276.