

© О. И. Степанова, К. Н. Фураева,  
И. П. Николаенков,  
С. А. Сельков, Д. И. Соколов

## ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ, СЕКРЕТИРУЕМЫХ ТКАНЬЮ ПЛАЦЕНТЫ, НА ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЛИНИИ EA.HY926

ФГБУ «НИИАГ им. Д. О. Отта»  
СЗО РАМН,  
Санкт-Петербург, Россия

УДК: 618.36-07

■ В работе было изучено влияние продуктов ткани плаценты на пролиферацию эндотелиальных клеток. Установлено, что факторы, секретируемые тканью плаценты при беременности с гестозом, ингибировали пролиферацию эндотелиальных клеток линии EA.hy926 по сравнению с факторами, секретируемыми тканью плаценты при физиологической беременности. Это свидетельствует о роли факторов, секретируемых тканью плаценты при гестозе, в индукции эндотелиальной дисфункции.

■ **Ключевые слова:** плацента; эндотелиальные клетки; пролиферация; гестоз.

### Введение

Физиологическое развитие беременности в значительной степени зависит от адекватного развития ткани плаценты, соответствующего потребностям плода на различных этапах развития беременности. В свою очередь морфология плаценты определяется развитием ее сосудистой сети за счет процессов васкулогенеза и ангиогенеза. На протяжении всей беременности непрерывно изменяются секреторные функции плаценты [5], а также изменяются фенотипические особенности эндотелиальных клеток (ЭК) [1]. Однако в настоящее время недостаточно изучено влияние, которое оказывают секреторные продукты ткани плаценты на функциональные свойства эндотелиальных клеток. Важными характеристиками эндотелиальных клеток в процессе ангиогенеза является их способность к пролиферации, от чего зависит скорость восстановления эндотелиальной выстилки сосудов при повреждении и скорость формирования ее при образовании новых сосудов. Поддержание жизнеспособности и пролиферативной активности эндотелиальных клеток в ткани плаценты осуществляют секретируемые тканью плаценты факторы VEGF, PlGF, Ang-1, Ang-2, bFGF, PDGF, MMP, IL-8 [7, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 20, 21].

При беременности, осложненной гестозом, отмечается нарушение инвазии трофобласта в децидуальную ткань и нарушение ангиогенеза в ткани плаценты. Гестоз также сопровождается эндотелиальной дисфункцией сосудистого русла матери. Ранее нами было показано изменение экспрессии и секреции тканью плаценты ангиогенных цитокинов, таких как VEGF, MMP-2, bFGF [2, 5], ангиопоэтины [6], а также антиангиогенных факторов (sVEGFR-1, TGF $\beta$  [2, 8], TSP-1[9]), что может быть причиной нарушения ангиогенеза при гестозе. Однако влияние выявленных изменений на функциональное состояние ЭК остается неизученным. Поэтому целью нашей работы было оценить влияние факторов, секретируемых тканью плаценты на ранних и поздних сроках физиологической беременности и при беременности, осложненной гестозом, на пролиферативную активность ЭК.

### Материалы и методы

Использовали плаценты, полученные при искусственном аборте у женщин с физиологическим течением беременности на сроке 9–11 недель (n = 15, группа 1); плаценты женщин, у которых беременность протекала без осложнений на сроке 38–39 недель (n = 20, группа 2); плаценты женщин с течением беременности, осложненным гестозом на сроке 38–39 недель (n = 25, группа 3). Все плаценты на сроке 38–39 недель получены при родоразрешении путем кесарева сечения. Получено информированное согласие пациенток на иссле-

дование. Диагноз гестоза установлен на основании ведущих клинических симптомов различной степени выраженности — наличия протеинурии, отеков, гипертензии (повышение систолического давления от 135 мм рт. ст. и выше, диастолического давления от 85 мм рт. ст. и выше). Кусочки ворсинчатого хориона из центральной части плацент культивировали 24 часа в питательной среде DMEM/F12 без эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС). Кондиционированные среды замораживали ( $-20^{\circ}\text{C}$ ). Поскольку различные цитокины оказывают митогенное действие в различных концентрациях, то в исследовании использовали разведения кондиционированных сред.

**Культура клеток.** Исследования проводили с использованием эндотелиальных клеток линии EA.hy926. Культура получена путем гибридизации первичной культуры человеческих эндотелиальных клеток вены пупочного канатика (HUVEC) с клетками карциномы легкого A-549 в 1983 году Dr. C. J. Edgell (Университет Северной Каролины, США). Клетки линии EA.hy926 воспроизводят основные морфологические, фенотипические и функциональные характеристики, присущие эндотелию. Для культивирования использовали среду DMEM/F12 (Sigma, США) с добавлением 10% инактивированной ЭТС (Sigma, США), 100 Ед/мл пенициллина (Sigma) и 100 мкг/мл стрептомицина (Sigma, США), 2 мМ L-глутамин («ICN», США), НАТ (Sigma, США). При помощи раствора трипанового синего оценивали жизнеспособность клеток, при этом она составляла не менее 96%.

**Оценку влияния секретируемых тканью плаценты факторов на пролиферативную активность эндотелиальных клеток линии EA.hy926** проводили при помощи метода, основанного на окраске белковых компонентов цитоплазмы ЭК витальным красителем кристаллическим фиолетовым. Указанный метод по чувствительности сопоставим с другими методами оценки пролиферативной активности [3]. Клетки линии EA.hy926 помещали в лунки 96-луночного плоскодонного планшета для адгезионных культур («Sarstedt», Австрия) в концентрации 5 000 клеток на лунку в 100 мкл среды DMEM/F12 с добавлением 10% ЭТС (Sigma, США) и культивировали сутки при  $37^{\circ}\text{C}$  во влажной атмосфере с 5% содержанием  $\text{CO}_2$  для прикрепления ЭК к поверхности планшета. Затем культуральную среду удаляли и вносили кондиционированные среды, полученные при культивировании ткани плаценты, в разведениях от 1:1 до 1:1024, приготовленных на среде DMEM/F12 с добавлением 2,5% ЭТС (Sigma, США), и культивировали 72 часа при  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ . Затем клетки линии

EA.hy926 окрашивали 0,2% раствором кристаллического фиолетового (Sigma, США), содержащего 5% метанола, для чего в каждую лунку вносили краситель в объеме 100 мкл на лунку и инкубировали 10 минут. После окраски производили 4-кратную отмывку лунок дистиллированной водой. Планшет высушивали, проводили экстракцию красителя 10% раствором уксусной кислоты. Учет оптической плотности проводили на микропланшетном ридере «Labsystems» (Финляндия) при длине волны 540 нм. По изменению оптической плотности оценивали интенсивность пролиферации ЭК. Положительным контролем функциональной активности ЭК служила их инкубация в среде DMEM/F12 с добавлением 5% и 10% ЭТС. Спонтанный уровень пролиферативной активности определяли после инкубации ЭК в среде DMEM/F12 с добавлением 2,5% ЭТС.

## Результаты

Установлено, что цельная кондиционированная среда, полученная после культивирования ткани плацент всех групп женщин, снижала пролиферативный потенциал клеток линии EA.hy926. Это, по-видимому, связано с полным истощением ростовых факторов культуральной среды клетками плаценты во время культивирования эксплантов плаценты в течение суток с целью получения кондиционированных сред. Отсутствие ростовых факторов не позволяло реализовать специфическую ангиогенную активность секреторных продуктов ткани плаценты. Инкубация клеток линии EA.hy926 с кондиционированными средами, полученными после культивирования ткани плаценты женщин с физиологической беременностью на сроке 9–11 недель, в разведениях от 1:2 до 1:32 и на сроке 38–39 недель в разведениях от 1:2 до 1:128 стимулировало пролиферативную активность этих клеток по сравнению с их инкубацией в присутствии среды DMEM/F12 с добавлением 2,5% ЭТС (рисунок 1).

Кондиционированные среды плацент женщин из групп 9–11 недель и группы 38–39 недель (физиологическая беременность) обладали одинаковым стимулирующим действием на пролиферативную активность ЭК линии EA.hy926. Однако по результатам медианного теста стимулирующий эффект в отношении пролиферативной активности кондиционированных сред ткани плацент женщин с физиологической беременностью на сроке 38–39 недель в разведениях от 1:2 до 1:128 был ниже по сравнению с влиянием кондиционированных сред ткани плацент женщин с физиологической беременностью на сроке 9–11 недель (рисунок 1).

Инкубация клеток линии EA.hy926 в присутствии кондиционированных сред, полученных после культивирования плацент беременных с гестозом, в разведениях от 1:2 до 1:128 также стимулировало пролиферативную активность клеток линии EA.hy926 по сравнению со спонтанным уровнем их пролиферативной активности в присутствии среды DMEM/F12 с добавлением 2,5% ЭТС (рисунок 1). По данным медианного теста эффект усиления пролиферативной активности под влиянием кондиционированных сред ткани плацент женщин с гестозом в разведениях от 1:2 до 1:128 был ниже по сравнению с влиянием кондиционированных сред ткани плацент женщин с физиологической беременностью на сроке 38–39 недель (рис. 1).

## Обсуждение

Кондиционированные среды всех исследованных групп стимулировали пролиферативную активность ЭК по сравнению со спонтанным уровнем (пролиферативная активность ЭК в присутствии среды DMEM/F12 с добавлением 2,5% ЭТС), что отражает наличие ангиогенных факторов в кондиционированных средах плацент женщин всех исследованных групп. Характер изменения пролиферативной активности ЭК линии EA.hy926 при разведении кондиционированных сред плацент был одинаков среди женщин всех

исследуемых групп. Наблюдаемое максимальное стимулирующее действие кондиционированных сред плацент на пролиферативную активность ЭК в разведениях 1:2 и 1:4 связано с действием ангиогенных факторов, секретируемых тканью плацент. При дальнейшем разведении кондиционированных сред при наличии в среде ростовых факторов, снижение концентрации ангиогенных факторов приводило к снижению пролиферативной активности ЭК.

В первом триместре физиологической беременности наряду с продукцией антиангиогенных факторов sVEGF-R1 [8], TSP-1 [9] ткань плаценты продуцирует в большом количестве стимулирующие пролиферативную активность ЭК ангиогенные факторы VEGF, PlGF, PDGF, bFGF, Ang-2 [4, 5, 6], что отражается в высоком уровне пролиферативной активности ЭК в присутствии секреторных продуктов ткани плацент первого триместра физиологической беременности. При разведении 1:4 стимулирующее действие кондиционированных сред ткани плацент первого триместра беременности было максимальным, при дальнейшем разведении эффект постепенно снижался при сохранении стимулирующего действия по сравнению с контролем. Таким образом, усиленная пролиферативная активность ЭК в присутствии факторов первого триместра физиологической беременности соответствует ра-

медианы значений оптической плотности усл. ед.

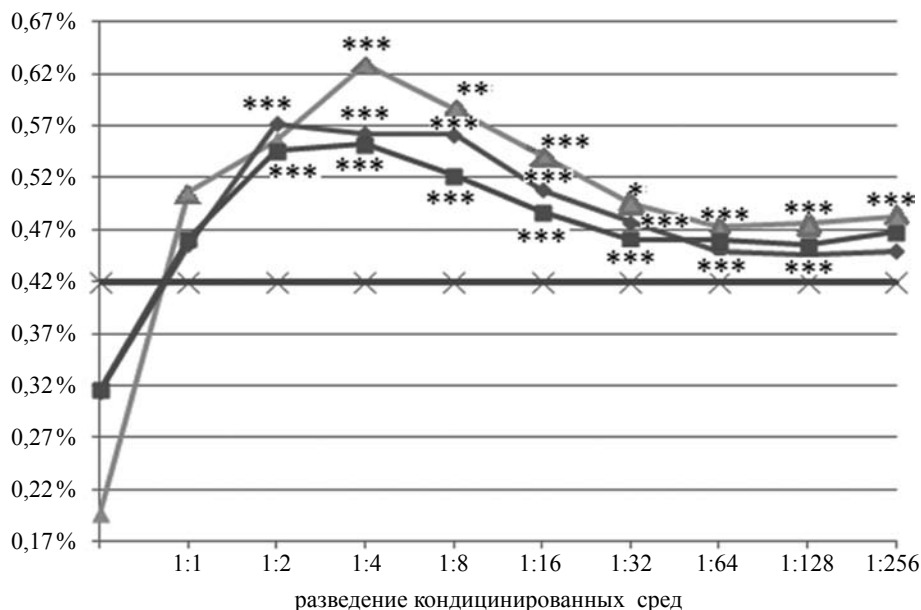


Рис. 1. Проллиферативная активность ЭК линии EA.hy926 в присутствии кондиционированных сред, полученных после культивирования ткани плацент: женщин с физиологической беременностью на сроке 9–11 недель беременности (—▲—); женщин с физиологической беременностью на сроке 38–39 недель (—◆—) и женщин с беременностью, осложненной гестозом, на сроке 38–39 недель (—■—). Достоверность различий значений пролиферативной активности в присутствии кондиционированных сред, полученных после культивирования ткани плацент и значений спонтанной пролиферативной активности клеток EA.hy926 (—×—); \*\*\* —  $p < 0,001$

нее полученным данным о повышенной секреции ангиогенных факторов тканью плаценты первого триместра и способствует процессу активного ангиогенеза в ткани плаценты и децидуальной ткани в начале беременности.

Пролиферативная активность ЭК была снижена под влиянием секреторных продуктов ткани плацент третьего триместра физиологической беременности по сравнению с первым триместром. При развитии ткани плаценты от первого к третьему триместру происходит смена факторов, контролирующих ангиогенез, приводящая к изменению характера пролиферативной активности ЭК. Ранее было показано, что продукция и секреция тканью плаценты ангиогенных факторов Ang-2, MMP-2, PlGF, VEGF [4, 6] снижалась в третьем триместре по сравнению с первым. Продукция тканью плаценты TSP-1 [4] и секреция растворимой формы VEGF-R1 [8], являющихся антиангиогенными факторами, также снижалась. Одновременно повышалась секреция Ang-1 [6], способного ингибировать пролиферативную активность ЭК [12]. Такое изменение секреторной функции ткани плаценты приводит к снижению пролиферативной активности ЭК, что может быть направлено на стабилизацию сосудистого русла плаценты к концу беременности и поддержание жизнеспособности ЭК.

Снижение пролиферативной активности ЭК под действием факторов, секреторируемых тканью плаценты при гестозе, связано с отмеченными нами ранее изменениями в секреции факторов тканью плаценты при беременности, осложненной гестозом [4, 6, 8]. В частности, снижение секреции Ang-1 и Ang-2 тканью плаценты при беременности, осложненной гестозом [6] и снижение экспрессии bFGF в ткани плаценты при гестозе [2], оказывающие влияние на пролиферативную активность ЭК [11, 18], могут способствовать снижению пролиферативной активности ЭК плаценты в условиях *in vivo*. Повышение при гестозе продукции тканью плаценты антиангиогенных факторов, таких как sVEGF-R1 [8] и TSP-1 [9], также может вносить вклад в подавление пролиферативной активности ЭК линии EA.hy926. Повышенная при гестозе экспрессия TGF $\beta$  тканью плаценты [2], что может подавлять пролиферацию и жизнеспособность ЭК [19]. Сниженная пролиферативная активность ЭК при гестозе может приводить к нарушению проницаемости сосудов и целостности эндотелиальной выстилки сосудов, что проявляется в виде отеков и протеинурии у женщин с гестозом.

Таким образом, секреторные продукты ткани плаценты стимулируют пролиферативную активность ЭК за счет секреции ангиогенных факторов VEGF, ангиопоэтинов, bFGF, PlGF,

PDGF. В первом триместре высокий уровень секреции этих факторов приводит в высокой пролиферативной активности ЭК. В третьем триместре наблюдается снижение секреции тканью плаценты ангиогенных факторов, что приводит к снижению пролиферативной активности ЭК и способствует стабилизации сосудистого русла плаценты к концу беременности. Нами выявлено снижение пролиферативной активности ЭК под влиянием факторов, секреторируемых тканью плаценты при гестозе, по сравнению с физиологической беременностью, что может вносить вклад в патогенез этой тяжелой формы акушерской патологии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ ГК № 02.740.11.0711. и грантов Президента РФ № НШ-131.2012.7. и МД-150.2011.7.

## Литература

1. Влияние растворимых продуктов ткани плаценты на экспрессию адгезионных молекул эндотелиальными клетками EA.hy926 / Степанова О. И. [и др.] // Медицинская иммунология. — 2011. — Т. 13, № 6. — С. 589–596.
2. Продукция тканью плаценты проангиогенных и антиангиогенных факторов Соколов Д. И. [и др.] // Молекулярная медицина. — 2009. — № 2. — С. 49–52.
3. Пролиферативная активность эндотелиальных клеток человека линии EA.hy926 и ее модуляция / Амчиславский Е.И. [и др.] // Цитология. — 2005. — Т. 47., № 5. — С. 393–403.
4. Роль проангиогенных и антиангиогенных факторов в развитии плаценты / Соколов Д. И. [и др.] // Медицинская иммунология. — 2008. — Т. 10, № 4–5. — С. 347–352.
5. Роль цитокинов в контроле развития плаценты в норме и при гестозе / Соколов Д.И. [и др.] // Иммунология. — 2009. — № 1. — С. 22–26.
6. Секреция ангиопоэтинов тканью плаценты при физиологическом развитии беременности и при гестозе. / Степанова О.И. [и др.] // Журнал акушерства и женских болезней. — 2010. — Т. LIX, № 6. — С. 69–74.
7. Соколов Д. И. Васкулогенез и ангиогенез в развитии плаценты // Журнал акушерства и женских болезней. — 2007. — Т. LVI, № 3. — С. 129–133.
8. Сравнительная оценка концентрации sVEGF-R1 и sVcadherin в сыворотке крови беременных и их продукции тканью плаценты / Степанова О. И. [и др.] // «Молекулярная медицина». — 2010. — № 2. — С. 43–47.
9. Экспрессия mPNC гена и белка тромбоспондина-1 в плаценте при гестозе / Останкова Ю.В. [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2011. — Т. 151, № 2. — С. 178–181.
10. Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 activate trophoblast Tie-2 to promote growth and migration during placental development / Dunk C. [et al]. // Am. J. Pathol. — 2000. — Vol.156. — P. 2185–2199.

11. Angiopoietin-1 inhibits endothelial cell apoptosis via the Akt/Survivin pathway / A. Papapetropoulos [et al.] // *J. Biological Chemistry*. — 2000. — Vol. 275, N 13. — P. 9102–9105.
12. Angiopoietin-1 is an antipermeability and anti-inflammatory agent in vitro and targets cell junctions / Gamble J.R. [et al.] // *Circ. Res*. — 2000. — Vol. 87. — P. 603–607.
13. Brindle N. P. J., Saharinen P., Alitalo K. Signaling and functions of angiopoietin-1 in vascular protection // *Circ. Res*. — 2006. — Vol. 98. — P. 1014–1023.
14. Comparative evaluation of FGF-2—, VEGF-A—, and VEGF-C—induced angiogenesis, lymphangiogenesis, vascular fenestrations, and permeability / Cao R. [et al.] // *Circ. Res*. — 2004. — Vol. 94. — P. 664–670.
15. Ferrara N., Gerber H. P., LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors // *Nat. Med*. — 2003. — Vol. 9. — P. 669–676.
16. Platelet-derived growth factor receptor- $\beta$  constitutive activity promotes angiogenesis in vivo and in vitro / Magnusson P. U. [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. — 2007. — Vol. 27. — P. 2142–2149.
17. Platelet-derived growth factor receptor- $\beta$  promotes early endothelial cell differentiation / Rolny C. [et al.] // *Blood*. — 2006. — Vol. 108. — P. 1877–1886.
18. Sahni A., Francis C. W. Stimulation of endothelial cell proliferation by FGF-2 in the presence of fibrinogen requires  $\alpha\beta3$  // *Blood*. — 2004. — Vol. 104. — P. 3635–3641.
19. Signaling by ALK5 mediates TGF- $\beta$ -induced ET-1 expression in endothelial cells: a role for migration and proliferation / Castañares C. [et al.] // *J. Cell Science*. — 2007. — Vol. 120. — P. 1256–1266.
20. The biology of vascular endothelial growth factors / Tammela T. [et al.] // *Cardiovascular Research*. — 2005. — Vol. 65. — P. 550–563.
21. Vu T. H., Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology // *Genes Dev*. — 2000. — Vol. 14. — P. 2123–2133.

Статья представлена И. М. Кветным  
ФГБУ «НИИАГ им. Д. О. Отта» СЗО РАМН,  
Санкт-Петербург

#### SECRETORY PLACENTAL FACTORS INFLUENCE TO ENDOTHELIAL CELLS EA.HY926 PROLIFERATION

Stepanova O. I., Furayeva K. N., Nikolayenkov I. P., Selkov S. A., Sokolov D. I.

**■ Summary:** We investigated the influence of placental secretory factors on endothelial cell proliferation during normal and preeclamptic pregnancy. Preeclamptic pregnancy placental factors inhibited proliferation of endothelial cells EA.hy926 in comparison with normal pregnancy placental factors. This data testify to the role of secretory placental factors in endothelial dysfunction induction during preeclamptic pregnancy.

**■ Key words:** placenta; endothelial cells; proliferation; preeclampsia.

#### ■ Адреса авторов для переписки

Степанова Ольга Игоревна — научный сотрудник. ФГБУ «НИИАГ им. Д. О. Отта» СЗО РАМН. 199034, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3, лаборатория иммунологии.

**E-mail:** alzass@mail.ru.

Фураева Ксения Николаевна — студент СПбГУ. ФГБУ «НИИАГ им. Д. О. Отта» СЗО РАМН. 199034, Россия, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3.

**E-mail:** Furaeva-Kseniya@mail.ru.

Николаенков Игорь Павлович — аспирант ФГБУ «НИИАГ им. Д. О. Отта» СЗО РАМН. 199034, Россия, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3.

**E-mail:** nikolaenkov\_igor@mail.ru.

Сельков Сергей Алексеевич — д. м. н., профессор, директор лаборатории иммунологии. ФГБУ «НИИАГ им. Д. О. Отта» СЗО РАМН. 199034, Россия, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3.

**E-mail:** selkovsa@mail.ru.

Соколов Дмитрий Игоревич — д. б. н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии. ФГБУ «НИИАГ им. Д. О. Отта» СЗО РАМН. 199034, Россия, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3.

**E-mail:** corbie@hotmail.ru.

Stepanova Olga Igorevna — scientist, laboratory of immunology. FSBI “The D. O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology” NWB RAMS. 199034, Saint-Petersburg, Mendeleyevskaya line, 3.

**E-mail:** alzass@mail.ru.

Furayeva Kseniya Nikolayevna — SPbGU student. FSBI “The D. O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology” NWB RAMS. 199034, Saint-Petersburg, Mendeleyevskaya line, 3.

**E-mail:** Furaeva-Kseniya@mail.ru.

Nikolayenkov Igor Pavlovich — post-graduate student. FSBI “The D. O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology” NWB RAMS. 199034, Saint-Petersburg, Mendeleyevskaya line, 3.

**E-mail:** nikolaenkov\_igor@mail.ru.

Selkov Sergey Alekseyevich — doctor of medical sciences, head of the laboratory of immunology. FSBI “The D. O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology” NWB RAMS. 199034, Saint-Petersburg, Mendeleyevskaya line, 3. **E-mail:** selkovsa@mail.ru.

Sokolov Dmitriy Igorevich — doctor of biological sciences, leading researcher. FSBI “The D. O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology” NWB RAMS. 199034, Saint-Petersburg, Mendeleyevskaya line, 3.

**E-mail:** corbie@hotmail.ru.