

П. П. Хохлов, С. А. Сельков

Научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта РАМН, Санкт Петербург

## АССОЦИИРОВАННЫЙ С БЕРЕМЕННОСТЬЮ БЕЛКОВЫЙ КОМПЛЕКС «РАРР-А/PROMBP». ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА, МОЛЕКУЛЯРНОЕ СТРОЕНИЕ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ

■ В представленном обзоре сведены фактические данные об открытии, строении и физиологии ассоциированного с беременностью протеинового комплекса РАРР-А/ргоМВР. Приведены современные представления о первичной структуре, аминокислотной последовательности, третичной и четвертичной (субъединичной) структуре интактной молекулы. Приведены результаты экспериментальных исследований, которые говорят в пользу двоякого — трофобластического и эндометриального происхождения циркулирующего белкового комплекса. Высказаны соображения о возможной роли РАРР-А/ргоМВР в иммунных взаимоотношениях материнского организма и фетоплацентарного комплекса. Приведены аргументы в пользу актуальности более детального изучения воздействия протеинового комплекса на компоненты иммунной системы материнского организма в ходе гестационного процесса.

■ **Ключевые слова:** беременность, белки беременности, биохимические маркеры, плацента, трофобласт, эндометрий, РАРР-А, РАРР-А/ргоМВР

Под неточным, но широко распространенным термином «белки беременности» понимают чаще всего сложные белки, и именно гликопротеины, продукция и функция которых прямо или косвенно связаны с репродуктивной системой и с гестационным процессом. Существует несколько классификаций многочисленных так называемых белков беременности, основанных на различных подходах: химическом строении, местах синтеза, физиологических свойствах. По своим физиологическим свойствам комплекс РАРР-А/ргоМВР следует отнести к так называемым циркулирующим белкам [11], то есть обнаруживаемым в плазме крови в ходе гестационного процесса. Кроме того, различают специфические белки беременности и белки, ассоциированные с беременностью (соответственно pregnancy — specific и pregnancy — associated). Первые обнаруживаются в физиологических условиях исключительно у беременных женщин, вторые могут присутствовать в меньших количествах у женщин вне беременности и у мужчин. Рассматриваемый в настоящем обзоре РАРР-А/ргоМВР относят ко второй группе [11, 27]. По своему химическому строению РАРР-А/ргоМВР следует отнести к гликопротеинам, в отношении гормоноподобной активности какого-либо рода его считают нейтральным.

Ассоциированный с беременностью белок РАРР-А/ргоМВР был впервые выявлен под названием «pregnancy associated plasma protein А» или сокращенно РАРР-А. В 1974 году [30] впервые РАРР-А/ргоМВР был идентифицирован среди трех других белков циркуляции электрофоретическими методами в сыворотке крови беременных женщин группой американских исследователей при помощи иммунной антисыворотки против белков плазмы крови беременных. Выявленные белки были обозначены как «Pregnancy associated plasma proteins — РАРР» соответственно «А», «В», «С» и «D». Позднее РАРР-С и РАРР-D были соответственно отождествлены с трофобластическим бета-гликопротеином и с плацентарным лактогеном [23, 27], а РАРР-А и РАРР-В рассматривают в качестве самостоятельных белков.

На основании позднейших исследований, когда было выяснено молекулярное строение белка, термин РАРР-А стали применять только к одной из субъединиц. Было установлено, что другая субъединица идентична предшественнику главного щелочного белка эозинофилов (Major basic protein — МВР), и ее стали обозначать как «ргоМВР». Физиологически интактную форму белка, обнаруживаемую в сыворотках беременных, стали обозначать как «РАРР-А/ргоМВР» [33, 34]. Это наиболее современное обозначение и употребляется в настоящей работе.

После открытия РАРР-А/ргоМВР и его обнаружения в периферической крови беременных женщин исследования белка развивались в трех основных направлениях. Первое можно условно назвать клиническим и лабораторно-клиническим: это изучение кинетики белка в плазме крови и других биологических жидкостях как в ходе нормальной беременности, так и при различных патологических

процессах. Во-вторых, большое внимание было уделено изучению локализации секрета белка и его выявлению в клетках и тканях репродуктивной системы. Третьим важным направлением изучения белка можно считать биохимическое: это изучение физико-химических свойств и молекулярного строения.

Белок беременности РАРР-А/ргоМВР обнаруживается в наибольших концентрациях прежде всего в плазме крови в кровотоке беременной женщины. Мониторинг периферической крови демонстрирует монотонно равномерное повышение концентрации с момента имплантации. После имплантации концентрация РАРР-А/ргоМВР начинает постепенно возрастать в ходе гестационного процесса от 0,05 мкг/мл и достигает максимума в 100–150 мкг/мл к моменту родов в случае нормального течения беременности. По завершении родов уровень РАРР-А/ргоМВР резко падает до основного уровня в течение 36–48 часов. Сразу после родов концентрация падает практически до нуля в течение 3-х суток [8, 12, 27, 31]. Обращает на себя внимание, что динамика концентрации белка отличается от соответствующих характеристик иных белков беременности, например ТБГ и т.п. Для РАРР-А/ргоМВР характерно монотонное и равномерное нарастание концентрации до 70–100 мкг/мл к моменту родов. Характерно, что профиль концентраций РАРР-А/ргоМВР в зависимости от срока нормальной беременности имеет характерный вид и отличен от подобных профилей большинства других белков беременности. Существенно, что концентрация белка продолжает монотонно возрастать в период от 36 до 40 недели беременности, то есть когда рост и развитие плаценты можно считать завершенным, так же как по существу и развитие зародыша. Эта особенность отличает РАРР-А/ргоМВР от, например, ТБГ, для которого характерно нарастание концентрации до 36 недель, после чего величина последней сохраняется постоянной [8, 12, 21, 27, 31, 40]. Существенно, что в отличие от ряда других известных белков беременности (трофобластического бета-глобулина — ТБГ, хорионического гонадотропина — ХГЧ, плацентарного лактогена — ПЛЧ и др.), профиль концентрации РАРР-А/ргоМВР не выходит на «плато», а продолжает монотонно возрастать на протяжении 36–40-й недель беременности вплоть до момента родов и физиологического отторжения плаценты. Была проведена попытка сравнительного анализа профиля концентраций ряда белков беременности с построением математических моделей, описывающих кривые роста белков в циркуляции [40]. Авторы пришли к выводу, что характер зависимости различен для плацентарного

лактогена (ПЛ), ТБГ и РАРР-А/ргоМВР. Авторы представили результаты в шкале молярных концентраций белков, то есть относительно молекулярной массы, и пришли к выводу, что профили концентраций в течение 1–17 недель беременности имеют различную форму и их следует описывать различными уравнениями. Например, концентрация ТБГ и, отчасти, ПЛЧ в высокой степени коррелирует с общей массой плаценты на данном сроке беременности и может являться косвенным показателем пролиферативной и секреторной активности цито- и синцитиотрофобласта. Профили РАРР-А/ргоМВР и ХГЧ отражают более сложную зависимость. В частности в интервале 3–10 недель гестации кривая носит приблизительно экспоненциальный характер, но далее относительный коэффициент роста снижается. Попытка экстраполировать экспоненциальную кривую на весь срок гестации привела бы, по мнению авторов, к результатам, почти в 100 раз превышающим опытные. Из этого наблюдения авторы делают вывод о существовании механизма регуляции, в частности ингибирования секреции РАРР-А/ргоМВР в материнскую циркуляцию в ходе беременности. Любопытно сравнение приведенной удельной молярной продукции белков беременности плацентой, выраженные в нмоль белка/г ткани/сутки. Такой показатель в интервале 1–17 недель беременности сравнительно постоянен для ТБГ, но монотонно растет в I триместре беременности для РАРР-А/ргоМВР. Последнее также наводит на мысль о существовании механизма регуляции продукции белка в процессе гестации. Период полураспада РАРР-А/ргоМВР в циркуляции составляет 48–60 часов, что и соответствует физиологическому падению концентрации после отхождения плаценты [21, 27, 40].

Кривая изменения концентрации РАРР-А/ргоМВР в ходе беременности достаточно своеобразна и отличается от подобных кривых для большинства других известных белков беременности и гормонов: альфа-фетопротеина — АФП, ТБГ, ХГЧ и т. п. Концентрация РАРР-А/ргоМВР монотонно увеличивается вплоть до момента родов и резко снижается практически до нуля через 48–72 часа после родов. Наиболее интенсивный синтез большинства плацентарных и фетальных белков многие специалисты связывают с периодами активной клеточной пролиферации и тканевого роста. Считают, например, что продукция трофобласт-специфического глобулина достаточно однозначно отражает пролиферацию цито- и синцитиотрофобласта и «общую активность» плаценты [40]. Максимальную секрецию альфа-фетопротеина связывают с периодом активного гистогенеза зародыша, что, возможно, связано

с рецепцией белка исключительно недифференцированными клетками [2]. Кинетика уровня PAPP-A/проМВР не демонстрирует подобной однозначной корреляции.

Белок секретируется главным образом в кровоток материнского организма. Данные относительно обнаружения белка в различных средах и тканях как материнского организма, так и фетоплацентарного комплекса показали, что наиболее высокие концентрации белка свойственны циркуляции в материнском организме. К концу гестационного периода наиболее высокий уровень PAPP-A/проМВР был выявлен в периферической циркуляции и венах матки [27]. В составе ретроплацентарной крови уровень белка значительно ниже. Низкие концентрации PAPP-A/проМВР в составе крови плода и амниотической жидкости. Соотношение концентраций белка косвенно указывает на участие в продукции белка не только фетоплацентарного комплекса, но и органов репродуктивной системы матери, что было экспериментально показано позднее.

Большое количество работ было посвящено измерению PAPP-A/проМВР при различных патологиях беременности и оценке диагностической значимости количественного определения белка. В области клинического акушерства PAPP-A/проМВР признан одним из наиболее значимых в качестве биохимического маркера генетически обусловленных аномалий развития [Всеросс. Симп. «Современные аспекты пренатального скрининга». СПб, 2002]. К настоящему времени можно считать практически установленным достоверное снижение концентрации белка в течение I триместра беременности в случае синдрома Дауна. Начат выпуск коммерческих наборов для биохимической пренатальной диагностики трисомии и PAPP-A/проМВР «узаконен» в качестве биохимического маркера синдрома Дауна в течение I триместра беременности. К настоящему времени можно считать твердо установленным, что при синдроме Дауна плода кривая зависимости концентрации белка от срока гестации деформирована. Так, в интервале 10–14 недель гестации концентрация PAPP-A/проМВР в периферической крови достоверно снижена, что позволяет рассматривать PAPP-A/проМВР в качестве эффективного маркера для пренатальной биохимической диагностики синдрома Дауна. Также существуют данные, правда, не столь убедительные, о том, что пониженное содержание белка характерно для синдрома Корнелия де Ланге [42].

Хотя и не получили пока всеобщего признания, но достаточно обширны и разнообразны лабораторно-клинические данные о зависимости профилей концентраций PAPP-A/проМВР и различных нарушений развития плода и функцио-

нирования репродуктивной системы материнского организма в ходе беременности [8, 12, 21, 27, 31]. Определение уровня содержания PAPP-A/проМВР продемонстрировало достоверную значимость в прогнозировании процесса гестации. Статистически достоверное снижение уровня белка наблюдали у женщин с угрозой спонтанного выкидыша и у большинства женщин с замершей беременностью.

До недавнего времени было принято считать, что в плазме крови небеременных женщин уровень PAPP-A/проМВР приблизительно соответствует границе чувствительности диагностических методов. Разработка и появление в исследовательской лабораторной практике высокочувствительных лабораторных методов позволило установить наличие и кинетику секреции белка вне гестационного процесса, что будет подробнее рассмотрено ниже. Важно отдельно отметить достоверное обнаружение PAPP-A/проМВР у женщин вне гестационного процесса и у мужчин. Было показано, что содержание PAPP-A/проМВР в периферической крови мужчин и небеременных женщин находится на грани чувствительности радиоиммунного и иммуноферментного анализов и не превышает 5 нг/мл. Высокочувствительными иммунохимическими методами была выявлена секреция клетками эндометрия в пролиферативной и секреторной фазах менструального цикла соответственно 1,0 и 1,7 мкг/мл в супернатантах эндометрия в экспериментальных условиях. Средние показатели для периферической крови небеременных женщин составляют соответственно 0,13 и 0,12 мкг/мл [11]. Интересно, что индуцированная приемом оральных контрацептивов децидуализация эндометрия приводит к резкому усилению секреции PAPP-A/проМВР. Соответствующие показатели достигают 4,8 и 0,16 мкг/мл для супернатанта эндометрия и периферической крови. Кроме того, PAPP-A/проМВР обнаружен в составе фолликулярной жидкости яичников [38], и выявлен иммунохимически крайне сходный белок в составе семенной плазмы мужчин [16]. Первые исследователи белка предполагали, что он продуцируется исключительно тканями плодной части плаценты, в частности цито- или/и синцитиотрофобластом. Наличие PAPP-A/проМВР на поверхности трофобласта было подтверждено посредством иммунофлюоресцентных методов с использованием поликлональных анти-PAPP-A/проМВР антител [9, 11]. С развитием высокочувствительных иммунохимических методов PAPP-A/проМВР был также обнаружен в плазме периферической крови небеременных женщин и была выявлена секреция белка эндометрием, причем преимущественно в секреторной фазе менструального цикла.

Позднее была убедительно продемонстрирована продукция RAPP-A/proMBP как изолированными клетками трофобласта в культуре, так и еще в большей степени изолированными клетками децидуальной ткани [15]. Было показано, что секреция RAPP-A/proMBP децидуальными клетками может быть дозозависимо стимулирована добавлением в культуральную среду сыворотки беременных. Из этих экспериментальных исследований авторы сделали вывод о том, что на ранних сроках беременности синтез и секреция RAPP-A/proMBP происходит в симпласте инвазивного трофобласта. Приблизительно к концу I триместра роль основного продуцента белка переходит к клеткам децидуальной ткани. Было также показано, что секреция белка клетками эндометрия *in vitro* имеет прогестерон-зависимый характер. При помощи высокочувствительного радиоиммунного метода RAPP-A/proMBP был выявлен во внутриматочной жидкости [18].

Путем иммуногистохимических исследований RAPP-A/proMBP был обнаружен в синцитиотрофобласте плаценты и децидуальной ткани беременных [30, 31, 36]. Прямые измерения RAPP-A/proMBP в тканях плода и материнских тканях репродуктивной системы подтвердили наличие белка в тканях трофобласта, децидуальной ткани [36], равно как и эндометрия [14]. Иммуногистохимические исследования локализации, как и прямые биохимические измерения продемонстрировали двойное происхождение белка: трофобластическое и децидуальное. Более детальное исследование синтеза и секреции RAPP-A/proMBP было проведено с помощью тканевых культур эксплантатов трофобласта плаценты и децидуальной ткани [15]. Авторы исследования показали, что RAPP-A/proMBP продуцируется *in vitro* изолированными культурами как трофобласта, так и децидуальной ткани. При этом продукция белка активно стимулируется в несколько раз (потенцируется) при добавлении в культуральную среду сыворотки беременных женщин. Авторы приходят к заключению, что на ранних сроках беременности RAPP-A/proMBP секретируется главным образом трофобластом плаценты, тогда как с увеличением срока гестации постепенно начинает превалировать белок децидуального происхождения и к моменту родов продукция белка трофобластом незначительна [11].

Интересны результаты экспериментальных исследований, проведенные над эксплантатами трофобласта и децидуальной ткани, полученными от беременных женщин на разных сроках беременности. Клетки того и другого вида ткани культивировали независимо после искусственного механического разделения плодного и материнского

слоев плаценты. В случае материала, взятого на ранних сроках беременности, более интенсивную секрецию демонстрировали клетки трофобласта. В случае материала, полученного при срочных или преждевременных родах, была выявлена противоположная картина: наиболее секреторно активными проявляли себя децидуальные клетки. В обоих случаях секреция белка могла быть эффективно стимулирована сывороткой крови беременных женщин. Авторы пришли к заключению, что RAPP-A/proMBP способны секретировать как трофобласт плода, так и децидуальный слой матки, причем преимущественный источник продукции белка меняется в течение гестационного процесса [11, 15].

Если наличие цельного тетрамерного комплекса RAPP-A/proMBP, по всей видимости, неразрывно связано с процессами репродукции, то каждый из мономеров в отдельности обнаруживают вне явлений физиологической репродукции. Кроме характерной для гранул эозинофилов субъединицы proMBP, другая субъединица — RAPP-A выявлена в супернатантах кондиционированной фибробластами человека культуральной среде в концентрации 0,18 мкг/мл [35].

Подробные исследования биофизической химии RAPP-A/proMBP, особенно в последнем десятилетии, привели к детальным представлениям о его молекулярном строении. С одной стороны, были изучены физико-химические свойства интактной димерной молекулы, с другой, — тонкое молекулярное строение каждой субъединицы в отдельности. Согласно первоначальному описанию белка, его молекулярная масса составляет 750 000–800 000 Да, а изоэлектрическая точка соответствует 4,1–4,4. Несколько позже пришли к заключению, что RAPP-A представляет собой гликопротеин с димерным молекулярным строением, где каждый из идентичных мономеров состоит из двух субъединиц с молекулярной массой 200 000 Да каждая [40].

Согласно современным представлениям, RAPP-A/proMBP представляет собой гликопротеин, обладающий сложной четвертичной структурой. Интактная молекула с молекулярной массой ~650 кДа обладает альфа-2 подвижностью при электрофорезе и имеет изоэлектрическую точку  $pI$  4,1–4,5. Наличие «размытой» изоэлектрической точки объясняется микрогетерогенностью, свойственной гликопротеинам с высоким содержанием углеводной составляющей. Димерная молекула содержит 17,5 % углеводов. Интактная молекула составлена из двух идентичных мономеров, каждый из которых состоит из двух субъединиц. Субъединицы связаны друг с другом дисульфидными мостиками.

После того, как было показано субъединичное строение RAPP-A/proMBP, были достаточно подробно исследованы молекулярные свойства каждой из субъединиц в отдельности. К настоящему времени их молекулярное строение описано детально в [34, 40]. Изучение аминокислотной последовательности каждой из субъединиц показали, что одна из них представляет собой полипептидную цепь из 222 аминокислотных остатков и представляет собой предшественник цитотоксичного «главного щелочного белка» (Major Basic Protein), находящегося в гранулах эозинофилов. При этом субъединица-предшественник очень сильно гликозилирована — углеводная часть субъединицы составляет 38,6 %. Сильно выращенная гликозидная часть субъединицы с массивными углеводными «антеннами» не постоянна по своему составу, в результате чего молекулярная масса (ММ) субъединицы варьирует в интервале 50–90 кДа. Строение другой субъединицы оригинально. Как показали результаты секвенирования, эта субъединица RAPP-A представлена аминокислотной последовательностью из 1547 остатков [34]. Углеводный компонент субъединицы RAPP-A составляет 13,4 % [34, 40]. Две разноименные субъединицы связаны дисульфидными мостиками и образуют протомер с молекулярной массой 187–265 кДа. Два идентичных протомера образуют путем нековалентных связей интактную молекулу, ММ которой по данным ПАГ-электрофореза соответствует приблизительно 700–750 кДа. Последние цифры, возможно, завышены из-за значительной углеводной части молекулы. В интактной молекуле 19–20 % молекулярной массы приходится на углеводы, в том числе уроновые кислоты. Было показано, что RAPP-A/proMBP эффективно связывает гепарин [20]; некоторые исследователи указывают, что интактная молекула содержит  $Zn^{++}$ . Выяснено, что субъединицы RAPP-A и proMBP кодируются генами, локализованными соответственно в 9-й и 11-й хромосомах [24, 37]. Выказано предположение, что RAPP-A и proMBP не только кодируются генетически, но и синтезируются независимо друг от друга как синтицитотрофобластом плаценты, так и клетками децидуальной оболочки матки, а образование четвертичной структуры происходит в ходе посттрансляционного процессинга, механизм которого пока неясен.

Физиологическая роль RAPP-A/proMBP как в гестационном процессе, так и помимо него остается неясной. Начиная с момента первоначального открытия белка RAPP-A/proMBP, были проведены многочисленные попытки исследовать физиологическую роль белка при беременности, его влияние на организм матери и плода. Возникает естественный вопрос о взаимоотношениях

RAPP-A/proMBP с молекулярными и клеточными компонентами иммунной системы материнского организма в ходе гестационного процесса. Особый интерес вызывает у специалистов разных областей иммунологическая роль белка, в частности его взаимодействие с молекулярными и клеточными компонентами иммунной системы матери, возможная иммуносупрессивная или, во всяком случае, иммуномодулирующая роль в ходе гестационного процесса. Достаточно многочисленные исследования взаимодействия RAPP-A/proMBP с компонентами иммунной системы материнского организма фрагментарны и зачастую противоречивы. Различные авторы продемонстрировали торможение реакции бласттрансформации в смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ); было отмечено ингибирующее влияние на систему комплемента [10]. Экспериментальные данные привели в дальнейшем к оценке RAPP-A/proMBP как иммуномодулятора [11, 13]. Однако позднее авторы пришли к заключению, что причиной подобных результатов может быть присутствие примесного гепарина, высокоаффинно связываемого белковым комплексом, а также влияние иных примесных компонентов. Анализ полученных результатов заставил признать, что результаты иммунологических экспериментов могут зависеть от условий и методов получения очищенной формы RAPP-A/proMBP [11].

Существенно, что конкретные молекулярные и клеточные механизмы подобного ингибирования остаются неясными. Кроме того, значительное число иммунологических исследований проведено на уровне знаний 1980-х годов и их крайне затруднительно трактовать с позиций и представлений современной иммунологии. В свою очередь RAPP-A/proMBP является наименее изученным среди других белков беременности.

В то время как представления о биохимических, иммунологических и физиологических свойствах интактного димерного комплекса далеки от исчерпывающих, накоплено немало сведений о свойствах отдельных субъединиц, обнаруживаемых вне репродуктивного аппарата и репродуктивной функции. Субъединица RAPP-A обнаружена в качестве одного из продуктов секреции фибробластов и остеобластов *in vitro* в соответствующих кондиционированных средах клеточных культур. Крайне интересна идентификация субъединицы RAPP-A из культуры фибробластов человека в качестве протеазы, расщепляющей связывающий белок-4 инсулиноподобного фактора роста (Insulin-like Growth Factor Binding Protein-4: IGFBP-4). В свою очередь, само явление IGF-зависимого IGFBP-4 протеолиза достаточно хорошо известно и было описано для культур нормальных

остеобластов человека, клеток гладкой мускулатуры сосудов и клеток стромы эндометрия, децидуальных клеток, клеток гранулезного слоя и жидкости фолликула яичника, однако во всех указанных случаях соответствующий фермент не был идентифицирован [29].

Анализ аминокислотной последовательности RAPP-A привел к выявлению аминокислотной последовательности («мотива»), характерной для металлопротеаз, в том числе  $Zn^{++}$ -связывающего сайта [28, 29, 33, 34]. Последний факт вызывает особенный интерес в связи с признанием роли металлопротеаз и регуляции их активности при инвазии трофобласта в децидуальную ткань и в регулятивных биохимических взаимоотношениях между тканями. Обнаружение свойств металлопротеаз и протеазной активности RAPP-A-субъединицы с одной стороны, и признание важной роли металлопротеаз в регуляции отношений инвазивного трофобласта и децидуальной ткани, с другой, наводят на мысль о возможной роли RAPP-A/ргоМВР в процессе имплантации. Присутствие в составе ргоМВР-субъединицы участка аминокислотной последовательности со свойствами катионного белка, а также наличие протеогликановой части [28, 33, 34] указывает на вероятное участие RAPP-A/ргоМВР в явлениях клеточной адгезии и связанных с адгезией регуляторных процессах. На это косвенно указывает высокоаффинное сродство к гепарину и то, что гепарин-сульфат протеогликан представляет собой химическое соединение, вовлеченное в процесс фазы адгезии при имплантации [3].

Вполне вероятно, что противоречивые данные могли быть обусловлены различными методами получения очищенных форм белка. В связи с последним представляется немаловажным соотнести результаты иммунологических и физиологических исследований с методом выделения и физико-химическими характеристиками белка. В связи с достаточно разноречивыми результатами экспериментов и мнениями различных исследователей небезынтересно проследить и проанализировать разнообразные методы получения очищенного белка, используемого для биохимических и физиологических исследований *in vitro*, а главное, попытаться увязать физиологические свойства белка с химическими воздействиями на него в ходе выделения.

Параллельно с совершенствованием методов получения очищенного белка обогащались знания о его строении и физико-химических свойствах. Вскоре после открытия RAPP-A/ргоМВР были проделаны многочисленные более или менее успешные попытки получения очищенной формы белка для разработки иммунохимических

методов его определения и количественного мониторинга в ходе беременности. Основной целью большинства биохимических и физико-химических исследований было получение белка в иммуногенной форме для иммунизации лабораторных животных-продуцентов и получение специфических антисывороток для диагностических целей.

В подавляющем большинстве случаев в качестве исходного материала для получения очищенного белка использовали плазму крови беременных женщин [22, 23, 27]. Детально разработанная в свое время универсальная схема фракционирования плазмы крови беременных женщин и белков плаценты не позволила выявить RAPP-A/ргоМВР, возможно, по причине применения в качестве осаждающего агента риванола, который денатурирует сложный белок. Было выяснено, что белок можно осадить в бессолевом водном растворе, так что его следует отнести к группе так называемых эуглобулинов [27], а в 2,05-молярном растворе сульфата аммония белок осаждается количественно. Первые образцы очищенных иммуногенных препаратов белка удалось получить с применением ионообменной хроматографии и гель-фильтрации [27]. Процедуры выделения отличались трудоемкостью, многоэтапностью и низким выходом — до 4 %. Достаточно эффективными проявили себя многочисленные варианты аффинной, в том числе иммуноаффинной хроматографии [41]. Были получены достаточно высокоочищенные препараты RAPP-A/ргоМВР с помощью позитивной иммуноаффинной хроматографии на иммобилизованных поликлональных специфичных антителах [22]. Хорошие результаты были достигнуты путем аффинной хроматографии с применением лектинов [22, 27]. Представлялось весьма многообещающим использование иммобилизованного гепарина в качестве хроматографической матрицы [20]. Последний метод включал в себя ограниченное число промежуточных процедур и давал весьма высокий выход. Сильной стороной метода является то, что он позволяет успешно разделить RAPP-A/ргоМВР и весьма схожий по физико-химическим свойствам альфа-2-макроглобулин плазмы. Отрицательные стороны этого метода выделения были выявлены позднее. Так, было отмечено присутствие в элюате связавшегося с RAPP-A/ргоМВР использованного в качестве лиганда гепарина. Относительно недавно для получения очищенного RAPP-A/ргоМВР был предложен сравнительно новый метод с использованием металл-хелатной аффинной хроматографии. Было продемонстрировано эффективное разделение целого белка и основных контаминирующих белков при использовании в качестве

лиганда иона  $Ni^{++}$  [33,34]. Была предложена компактная процедура получения очищенного белка, которая включала три «ключевых» этапа: 1) осаждение белков сыворотки 16 %-ным полиэтиленгликолем; 2) адсорбция белков супернатанта на ионообменнике; 3) металл-хелатная хроматография с использованием  $Ni^{++}$ . Окончательную очистку белка проводили с помощью гель-фильтрации и негативной иммуноаффинной хроматографии. Последний метод можно считать одним из наиболее эффективных на сегодняшний день.

Предпринятая попытка систематизировать иммуномодулирующие эффекты различных белков фетоплацентарного комплекса привела к представлению о двух типах регуляторных воздействий белков беременности на иммунную систему [6], среди которых различают эффекторные, оказывающие непосредственное ингибирующее воздействие на клетки иммунной системы, и индукторные, которые опосредуют свой эффект путем индукции супрессорных факторов иммунокомпетентными клетками. К первой группе относятся преимущественно плацентарные белки, ко второй — фетальные [6]. Если принять данную гипотезу, то при дальнейших исследованиях иммунологической роли RAPP-A/proMBP следует обратить особое внимание на изучение возможных механизмов влияния белкового комплекса беременности на эффекторное звено иммунных реакций материнского организма. Последнее интересно оценить в сравнении с недавно обнаруженным связыванием эндометриального белка PP14 с T-клеточными рецепторами с участием PP14 в контактном взаимодействии T-клеток с антиген-презентирующими клетками [35]. С другой стороны, теоретические предположения о возможном значении RAPP-A/proMBP в иммунных взаимодействиях начинают получать новые фактические подтверждения. Предварительные результаты исследований с использованием  $Eu^{+++}$ -меченных моноклональных антител к RAPP-A/proMBP позволили выявить специфическое связывание *in vitro* комплекса RAPP-A/proMBP с мононуклеарами периферической крови человека [5].

В заключение можно кратко подытожить существующие в современных информационных источниках данные следующим образом:

1. RAPP-A/proMBP представляет собой ассоциированный с беременностью гликопротеин, секретируемый в ходе гестационного процесса главным образом в периферическую кровь материнского организма.

2. RAPP-A/proMBP представляет собой один из важных продуктов секреции эндометрия, особенно в секреторной фазе менструального цикла, а также децидуальной ткани при беременности.

3. Представляется достаточно обоснованным признание как синцитиотрофобласта, так и эндометрия, в том числе децидуализованного основными местами биосинтеза и секреции RAPP-A/proMBP. По видимому, плаценту следует считать важным продуцентом белка на ранних сроках беременности, скорее всего в период высокой активности инвазивного трофобласта.

4. Секреция RAPP-A/proMBP происходит главным образом во внутреннюю среду материнского организма, прежде всего в лакунарное пространство плаценты и кровеносное русло.

5. Мономер RAPP-A *in vitro* демонстрирует свойства IGF-зависимой металлопротеазы, расщепляющей IGF-связывающий белок IGFBP-4.

6. На основании молекулярного строения следует сделать предположение, что proMBP может обладать физиологическими свойствами, характерными для связанных с процессами адгезии гликопротеинов.

7. Существующие сведения заставляют признать, что RAPP-A/proMBP играет весьма важную роль в регуляции процессов клеточного роста и межклеточных отношений трофобласта и децидуальной ткани в ходе процесса гестации, при этом регуляция, возможно, осуществляется вследствие энзиматической активности белкового комплекса.

8. Можно с большой степенью вероятности допустить важную самостоятельную роль RAPP-A/proMBP во взаимоотношениях с иммунной системой материнского организма на локальном и системном уровнях. Детальное исследование механизмов таких взаимоотношений на молекулярном и клеточном уровнях должно внести определенную ясность в понимание тонкой «настройки» и регуляции иммунного баланса в системе материнский организм—фетоплацентарный комплекс.

## Литература

1. Всероссийский симпозиум: «Современные аспекты пренатального скрининга». С-Петербург, 07–08. 02. — 2002.
2. Дудич Е. И., Семенова Л. Н., Дудич И. В., Николаева М. А., Горбатова Е. А., Хромых Л. М., Гречко Г. К., Сухих Г. Т. Изучение процесса апоптоза раковых клеток, индуцированного альфа- фетопротеином// Бюлл. Эксп. Биол. Мед. — 2000. — Т. 130. — № 12. — С. 604–612.
3. Светлаков А. В., Яманова М. В., Егорова А. В., Михуткина С. В. Молекулярно-биологические аспекты имплантации у человека и животных// Проблемы репродукции. — 2002. — Т. 2. — С. 16–28.
4. Сухих Г. Т., Верясов В. Н., Ванько Л. В. Иммунология беременности//5-й конгресс «Современные проблемы аллергологии, иммунологии и иммунофармакологии». 12–14 ноября 2002 г., Москва.
5. Хохлов П. П., Соколов Д. И., Сельков С. А., Селютин А. В. Иммунофлуоресцентное выявление

- связывания *in vitro*, ассоциированного с беременностью комплекса PAPP-A/проMVP с иммобилизованными моноклелуарами человека// Шестая Всеросс. Научн. Конф. «Дни иммунол. В СПб». — СПб., 20–23 мая 2002 г. — Мед. Иммунол. — Т. 4. — № 2. — С. 286–287.
6. Шуршев С. В. Белки фетоплацентарного комплекса в регуляции иммунных реакций//Усп. Совр. Биол. — 1993. — Т. 113. — Вып. 2. — С. 230–246.
  7. Bersinger N. A., Klopper A. Observations on the source of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A)//Br. J. Obstet. Gynecol. — 1984. — Vol. 91. — P. 1074–1076.
  8. Bersinger N. A., Marguerat P., Pescia G., Schneider H. Pregnancy-associated Plasma Protein A (PAPP-A): Measurement by Highly Sensitive and Specific Enzyme Immunoassay, Importance of First-trimester Serum Determinations and Stability Studies//Reprod. Fert. Dev. — 1995. — Vol. 7. — P. 1419–1423.
  9. Bischof P. Purification and characterization of pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A)//Arch. Gynecol. — 1979. — Vol. 227. — P. 315.
  10. Bischof P. Pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A): an inhibitor of the complement system//Placenta. — 1981. — Vol. 2. — P. 29.
  11. Bischof P. Les proteines de la grossesse//Annales d'endocrinologie. — 1987. — P. 289–299.
  12. Bischof P., DuBerg S., Herrmann W. L., Sizonenko P. C. Amniotic fluid and circulating levels of pregnancy. Comparison with other foeto-placental products//Brit. J. Obstet. Gynecol. — 1982. — Vol. 89. — P. 358.
  13. Bischof P., DuBerg S., Schindler A. M. Is pregnancy associated plasma protein A (PAPP-A) an immunomodulator during pregnancy?//Placenta (Suppl.). — 1982. — Vol. 4. — P. 93.
  14. Bischof P., DuBerg S., Schindler A. M., Obradovich D., Weil A., Faigaux R., Herrmann W. L., Sizonenko P. C. Endometrial and plasma concentrations of pregnancy associated plasma protein A (PAPP-A)//Br. J. Obstet. Gynecol. — 1982. — Vol. 89. — P. 701.
  15. Bischof P., DuBerg S., Sizonenko M. T., Schindler A. M., Beguin F., Herrmann W. L., Sizonenko P. C. In vitro production of pregnancy-associated plasma protein-A by human deciduas and trophoblast//Am. J. Obstet. Gynecol. — 1984. — Vol. 148. — N. 1. — P. 13–18.
  16. Bischof P., Herrmann W. L., Sizonenko P. C. Human seminal plasma contains a proteins that shares physicochemical, immunochemical and immunosuppressive properties with pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A)//J. Clin. Endocrinol. Metab. — 1983. — Vol. 56.
  17. Bischof P., Lauber K., de Werstemberger B., Girard J. P. Inhibition of lymphocyte transformation by pregnancy associated plasma protein A (PAPP-A)//J. Clin. Labor. Immunol. — 1982. — Vol. 7. — P. 21.
  18. Bischof P., Schindler A. M., Uner F., Mensi N., Herrmann W. L., Sizonenko P. C. Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) concentration in uterine fluid immunohistochemical localization in the endometrium//J. Obstet. Gynecol. — 1984. — Vol. 91. — P. 863–869.
  19. Bischof P., Tseng L. In vitro release of pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A) by human endometrial cells//Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol. — 1986. — Vol. 10. — P. 139–142.
  20. Davey M., Teisner B., Sinosich M., Grudzinskas J. Interaction between heparin and human pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A): a simple purification procedure//Analyt. Biochem. — 1983. — Vol. 131. — P. 18–24.
  21. Folkens J., Grudzinskas J. G., Hindersson p., Teisner B., Westergaard J. G. Pregnancy associated plasma protein A: Circulating levels during normal pregnancy//Am. J. Obstet. Gynecol. — 1981. — Vol. 139. — P. 910.
  22. Gore C. H., Sutcliff R. G. Pregnancy-associated plasma protein-A: purification under mild conditions, peptide mapping and tests for possible interaction with trypsin, plasmin and complement//Placenta. — 1984. — Vol. 5. — P. 293–314.
  23. Halbert S. P., Lin T.-M. Pregnancy Associated Plasma Proteins: PAPP-A and PAPP-B//In: Klopper A., Chard T. (Ed.) Placental Proteins. Brln-Hdlb. — NY. — 1979.
  24. Hamann K. J., Barker R. L., Ten R. M., Gleich G. J. The molecular biology of eosinophil granule proteins//Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. — 1991. — Vol. 94. — P. 202–209.
  25. Johnson M. R., Riddle A. F., Grudzinskas J. G., Sharma., Collins W. P., Nikolaides K. H. Reduced circulating placental protein concentrations during development of the human placenta//Hum. Reprod. — 1993. — Vol. 8. — P. 1942–1947.
  26. Kansaki S., Hiliker S., Baylink D. G., Mohan S. Evidence? That human bone cells in culture produce insuline-like growth factor-binding protein-4 nad -5 proteins//Endocrinology. — 1994. — Vol. 134. — P. 383–392.
  27. Klopper A., Smith R., Davidson I. The Measurement of Trophoblastic Proteins as a test of placental function//In: Klopper A., Chard T. (Ed.) Placental Proteins. Brln-Hdlb. — NY. — 1979.
  28. Kristensen T., Oxvig C., Sand O., Hundahl-Moller N. P., Sottrup-Jensen L. Amino acid sequence of human pregnancy-associated plasma protein A derived from cloned cDNA//Biochemistry. — 1994. — Vol. 33. — P. 1592–1598.
  29. Lawrence J. B., Oxvig C., Overgaard M. T., Sottrup-J. L., Gleich G. J., Hays L. G., Yates J. R., Conover C. A. The insulin-like growth factor (IGF)-dependent IGF binding protein-4 protease secreted by human fibroblasts is pregnancy-associated plasma peroteine A//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1999. — Vol. 96. — Issue 6. — P. 3149–3153.
  30. Lin T. M., Halbert S. P., Kiefer D., Spellacy W. N. Three pregnancy associated human plasma proteins: purification, monospecific antisera and immunological identification//Int. Arch. Allergy. — 1974. — Vol. 47. — P. 35.
  31. Lin T. M., Halbert S. P., Spellacy W. N. Measurements of pregnancy-associated plasma proteins during human gestation//J. Clin. Invest. — 1974. — Vol. 54. — P. 576.
  32. Macintosh M. C. M., Iles R., Teisner B., Sharma K., Chard T., Grudzinskas J. C., Ward R. H. T., Muller F. Maternal serum human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein A, markers for fetal Down syndrome at 8–14 weeks//Prenat. Diagn. — 1994. — Vol. 14. — P. 203–208.
  33. Oxvig C., Sand O., Kristensen L., Gleich G. J., Sottrup-Jensen L. Isolation and characterization of circulating complex between human pregnancy associated plasma protein A and proform of eosinophil major basic protein//J. Biol. Chem. — 1993. — Vol. 268. — P. 12243–12246.
  34. Oxvig C., Sand O., Kristensen L., Sottrup-Jensen L. Isolation and characterization of circulating complex between human pregnancy-associated plasma protein A and proform of eosinophile major basic protein//Biochim. Biophys. Acta. — 1994. — Vol. 1201. — P. 415–423.
  35. Rachmilevitz J., Borovsky Z., Mishan-Eisenberg G., Yaniv E., Riely G. J., Tykocinsky M. L. Focal localization of placental protein 14 toward sites of TCR engagement//J. Immunol. — 2002. — Vol. 168. — P. 2745–2750.
  36. Schindler A. M., Bordignon P., Bischof P. Immunohistochemical localization of pregnancy associated plasma protein A (PAPP-A) in decidua and trophoblast. Comparison with HCG and fibrin//Placenta. — 1983.
  37. Silaharoglu A. N., Tumer Z., Kristensen T., Sottrup-Jensen L., Tommerup N. Assignment of the human gene for pregnancy-associated plasma protein A(PAPPA) to 9q33.1 by fluorescence in situ hybridization to mitotic and meiotic chromosomes//Cytogen. Cell Genet. — 1993. — Vol. 62. — P. 214–216.
  38. Sinosich M., Porter R., Sloss P., Bonifacio M., Saunders D. Pregnancy-associated plasma protein-A in human



- ovarian follicular fluid//*J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 1984. — Vol. 58. — P. 500–504.
39. *Sinosich M. J., Smith D. H., Grudzinskas J. G., Saunders D. M., Westergaard J. J., Teisner B.* The prediction of pregnancy failure by measurement of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) following in vitro fertilization and embryo transfer//*Fertil. Steril.* — 1983. — Vol. 40. — P. 539–541.
40. *Sorensen S., Momsen G., Ruge S., Pedersen J. F.* Differential increase in the maternal serum concentrations of the placental proteins human chorionic gonadotropin, pregnancy-specific  $\beta_1$ -glycoprotein and pregnancy-associated plasma protein-A during the first half of normal pregnancy, elucidated by means of a mathematical model//*Hum. Reprod.* — 1995. — Vol. 10. — N.2. — P. 453–453.
41. *Sutcliffe R. G., Kukulska-Linglands B. M., Coggins J. R., Hunter J. B., Gore G. H.* Studies on human pregnancy associated plasma protein A (PAPP-A). Purification by affinity chromatography and structural comparison with 6–2-macroglobulin//*Biochem. J.* — 1980. — Vol. 191. — P. 799.
42. *Westergaard J. G., Chemnitz J., Teisner B., Poulsen H. K., Ipsen L., Bech B., Grudzinskas J. G.* Pregnancy associated plasma protein-A: a possible marker in the classification and prenatal diagnostics of Cornelia de Lange syndrome//*Prenatal Diagn.* — 1983. — Vol. 3. — P. 225–232.

PREGNANCY-ASSOCIATED PROTEIN COMPLEX «PAPP-A/proMBR». ВЫЯВЛЕНИЕ, КИНЕТИКА И КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ В ТЕЧЕНИИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ И ПАТОЛОГИЧЕСКИХ БЕРЕМЕННОСТЕЙ, МОЛЕКУЛЯРНАЯ СТРУКТУРА, РОЛЬ В ФИЗИОЛОГИИ

Khokhlov P. P., Selkov S. A.

■ **The summary:** Presented review is a accumulation of published data concerning discovery and investigations of pregnancy-associated protein complex PAPP-A/proMBR. Pregnancy-associated protein complex PAPP-A/proMBR belongs to pregnancy-associated protein sensu stricto but not to pregnancy specific. It is produced mainly into maternal blood circulation in the course of gestation. Certain experimental investigations suggested circulated complex PAPP-A/pro MBR to have a double origin: trophoblastic and endometrial one. Nowadays molecular structure of monomers and subunits and amino-acid sequence is almost fully investigated. In spite of plentiful information concerning structure and chemical properties the mechanisms of interaction with maternal immune system is not clear. Digest of available data suggested PAPP-A/proMBR to play a role in immunomodulation during pregnancy.

■ **Key words:** pregnancy, pregnancy proteins, biochemical markers, placenta, trophoblast, endometrium, PAPP-A, PAPP-A/proMBR