

УДК 618.36

*Боков Д. А., Горьков Д. А., Шаблинская М. Е., Осипова Г. С.***АКТИВАЦИЯ SRC-КИНАЗ КОНТРОЛИРУЕТ КОМПЕНСАТОРНО-ПРИСПОСОБИТЕЛЬНЫЕ ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ ГИСТОГЕНЕЗЫ ПЛАЦЕНТЫ ПОСЛЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ***Оренбургский государственный медицинский университет, Оренбург, Российская Федерация*

Аннотация. Цель работы: показать значение трансдукции внутриклеточных сигналов с участием src-киназ в регуляции компенсаторно-приспособительных процессов в плаценте — в контроле репаративной тканевой динамики.

Материалы и методы. Плаценту повреждали через токсическое поражение организма наночастицами меди. Дисбаланс меди приводит к нарушению клеточного дыхания и функции матриксных металлопротеиназ. Крысам Wistar шесть раз каждые три дня беременности инъецировали 0,2 мл взвеси наночастиц меди в концентрации 0,5 мг/кг. После выведения животных из эксперимента органы изучались гистологически: с использованием светооптических методов (окраска гематоксилином Майера и эозином), иммуногистохимического выявления белковых продуктов гена SRC, морфометрического анализа и статистической обработки количественных данных.

Результаты исследования. Деструктивные изменения плаценты (наличие фокусов некроза), уменьшение объема балочной сети, формирование избыточных депозитов фибриноида коррелировали с новообразованием терминальных балок. Процесс был активным, о чем свидетельствует статистически значимое изменение ширины распределения диаметров балок с возрастанием доли классов, которым принадлежат новообразуемые трабекулы. В хориальном эпителии накапливалась Src-позитивная метка, что указывает на роль Src-киназ в перестройке плаценты.

Ключевые слова: плацента, микроэлементоз меди, плацентарная недостаточность, ген SRC, регенерация.

*Bokov D. A., Gorkov D. A., Shablinskaya M. E., Osipova G. S.***SRC KINASES ACTIVATION CONTROLS ADAPTIVE AND REGENERATIVE HISTOGENESIS IN THE PLACENTA AFTER EXPERIMENTAL DAMAGE***Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation*

Abstract. The aim of the work. To show the role of intracellular signaling pathways that involve src-kinases in regulation of adaptive response of the placenta and its reparative tissue dynamics.

The methodology of the work. Placenta was damaged through toxic exposure of animal bodies to copper nanoparticles. Copper imbalance leads to disruption of cellular res-

piration and failure of matrix metalloproteinases. A copper nanoparticles suspension (0.2 ml) was injected into Wistar rats in concentration 0.5 mg/kg every three days, six times along the pregnancy. After the animals were euthanized, organs were studied using optical microscopy (hematoxylin and eosin stain), immunohistochemical assays to detect SRC gene products and morphometric analysis followed by statistical assessment of data.

The main results of the work. Destruction of placenta (focal areas of necrosis), decrease in the volume of trabecular network, excessive fibrinoid deposition correlated to de novo formation of terminal trabeculae. This process was intensive that is evidenced by statistically significant difference of distribution width of trabecular diameter and increased ratio of classes related to newly formed trabeculae. Src-positive markers accumulated in the chorionic epithelium, demonstrating the role of Src kinases in structural rearrangements of the placenta.

Keywords: placenta, copper imbalance, placental insufficiency, SRC gene, regeneration.

ВВЕДЕНИЕ

Повреждения плаценты, ее незрелость обуславливают плацентарную недостаточность [1]. Дисбаланс меди в организме как фактор нарушения структурно-функциональных параметров плаценты изучен недостаточно. Кроме того, представляет интерес активность компенсаторно-приспособительных, регенераторных процессов в плаценте в условиях нарушения уровня содержания меди в организме и их эффективность. Медь — эссенциальный микроэлемент. Медь в качестве кофермента входит в состав более тридцати энзимных систем. Например, динамика окислительно-восстановительных реакций в митохондриях, регенераторная перестройка соединительной ткани в регуляции репарации паренхиматозных элементов или сократительная активность миокарда являются металлозависимыми функциями [2]. Дисбаланс меди в организме приводит к нарушению содержания в тканях цинка и молибдена [3]. Медь в организме может избыточно накапливаться вследствие эндогенных причин (например, болезнь Вильсона), а также поступать из внешней среды. Здесь особую роль играют так называемые пылевые формы меди, в значительной доле частиц которой преобладают наноструктурированные формы. Пылевой медью окружающая среда загрязняется медеплавильными предприятиями [4]. Также предлагается использовать наночастицы меди как пищевую добавку сельскохозяйственным животным: для цыплят-бройлеров или в аквакультуре [5]. И в этом случае медь будет поступать в организм человека. Наночастицы меди тестируются в медицинских целях как переносчик искусственных ферментов, антител, лекарств [2].

Другим важнейшим аспектом изучения повреждений и незрелости плаценты является установление механизмов, структурных условий становления и восстановления параметров развития. В основе здесь — гистогенетические процессы. Большой интерес в их контроле представляет активность Src-киназ — участников сигнальных путей от тирозинкиназных рецепторов, лигандами для которых являются факторы роста. Еще совсем недавно в литературе имелись лишь ограниченные сведения о гене SRC, его белковых продуктах и роли их работы в клетке. На сегодняшний день появилось большое количество новых данных, информирующих о разнообразных функциях гена SRC и функциональной активности соответствующих белков. В частности, сообщается, что ген SRC в дефинитивных

тканях неактивен. Это протоонкоген, и в случае его сверхэкспрессии может возникать колоректальный рак, неопластические трансформации нервной ткани или эпителиев молочной железы. С другой стороны, появились сведения, что Src-киназы работают в лимфоцитах, обеспечивая трансдукцию внутрь клетки информации от связывания рецепторов с интерлейкинами. Кроме того, стало известно и о внутриядерных функциях SRC, непосредственно взаимодействующих с транскрипционными факторами. В любом случае, конечный эффект — пролиферация, дифференцировка клеток, перестройка их цитоскелета, сборка-разборка межклеточных контактов, контроль экспрессии молекул адгезии в мембранах. Пока неизвестно, в каких случаях задействуются пути с участием Src-киназ [6, 7].

Имеющиеся в литературе сведения относительно роли гена SRC и его фосфорилирующих тирозинкиназ позволили предположить, что ген может быть активен в перестраивающихся, регенерирующих тканях, в том числе провизорных, существующих до рождения человека.

Цель работы — показать регуляторную роль Src-киназ в развитии компенсаторно-приспособительных процессов в плаценте и в восстановлении ее структур при избыточном поступлении наноструктурированной меди в организм.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для эксперимента сформировали две группы крыс Wistar массой 180–220 г. Первой группе ($n = 30$) в бедренную группу мышц вводили инъекции взвеси наночастиц меди. Вторая группа — контрольная ($n = 10$). Здесь животные аналогичным способом получали физиологический раствор. Наночастицы получены в Институте энергетических проблем химической физики РАН (Москва). Взвесь наночастиц меди готовили в ультразвуковой ванне и в объеме 0,2 мл в концентрации 0,5 мг/кг вводили животным, начиная с первого дня беременности. Всего сделано шесть инъекций: процедуру проводили каждые три дня. Выбор дозы наночастиц обусловлен их токсическими свойствами. Известно, что наночастицы такой марки $\text{Cu}10\times$ (диаметр 102 нм, покрыты оксидной пленкой толщиной 6 нм) характеризуются величиной максимальной переносимой дозы, равной 2,5 мг/кг, а также полуметальной дозой, равной 7,0 мг/кг [8]. На восемнадцатый день беременности животных выводили из опыта. Физиологической зрелости плацента у крыс достигает к четырнадцатым суткам беременности. Плаценты забирались для гистологических исследований. При этом срезы окрашивались гематоксилином Майера и эозином, производилась морфометрия (при статистической обработке количественных данных уровень значимости принимали не превышающим 5%-ного уровня). Работу гена SRC определяли по накоплению в клетках его белковых продуктов. Для этого использовали мышинные моноклональные антитела против Src-киназ для парафиновых срезов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Моделируемые в эксперименте условия поступления наноструктурированной меди в организм способствовали накоплению меди в организме и его токсическому поражению. При этом в плаценте зарегистрированы признаки деструктивных и дистрофических изменений, а также сохраняющейся незрелости. Параметры нарушения развития и структурно-функционального состояния плаценты отражены в таблице. Представленные отдельные количественные данные

со всей очевидностью демонстрируют ограничение функциональных возможностей плаценты вследствие снижения величин роста и дифференцировки ее структур.

Таблица 1

МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПЛАЦЕНТЫ КРЫС
ПРИ ПОСТУПЛЕНИИ В ОРГАНИЗМ НАНОЧАСТИЦ МЕДИ

Наименование параметра	Контроль	Группа 0,5 мг/кг
Масса плаценты, мг	608,1 ± 16,5 N _p = 34	511,0 ± 9,1* t = 2,02 > 1,98, p ≤ 0,05 N _p = 120
Объемная плотность балок лабиринтной зоны плаценты, %	55,2 ± 0,6 nα = 6750	41,3 ± 0,6* t = 16,33 > 3,29, p ≤ 0,001 nα = 6750
Относительная площадь незрелого трофобласта лабиринтной зоны, %	4,9 ± 0,3 nα = 4500	10,4 ± 0,4* t = 6,00 > 3,29, p ≤ 0,001 nα = 6750

* — различия достоверны;

nα — количество гистологических элементов учтенное у каждого животного в среднем;

N_p — всего плацент изучено в группе.

Кроме того, в лабиринтной зоне наблюдалось резкое утолщение мембраны Райхерта, склерозирование балок, фокусы некроза с расплавлением трабекул.

Несмотря на описанные неблагоприятные структурные изменения плаценты, не зарегистрировано гибели ни одного животного, а число мертворождений не отличалось от группы интактных крыс. Вероятно, комплекс компенсаторно-приспособительных процессов, активно протекающих в плаценте, контролируется эффективным механизмом сохранения и восстановления структурной целостности и функциональной динамики.

В частности, в интактной группе установлено резкое увеличение ширины диапазона распределения балок по диаметру: минимальная граница сдвигалась в меньшую сторону, а максимальная граница сдвигалась в большую сторону. Лабиринт перестраивался. Толстые, так называемые промежуточные балки с развитой стромой реактивно утолщались; возрастала доля терминальных трабекул в классах с наименьшими диаметрами. При обзоре микропрепаратов визуализируется явление новообразования балок (рис. 1).

В лабиринтной зоне обнаруживается большое количество симпластических почек (исключая признак Tenney-Parker). Их объем достоверно возрастает в два раза. В межбалочном пространстве интенсифицируется материнский кровоток: объем лакун достоверно увеличивается, они переполняются кровью. Структурные изменения лабиринтной зоны коррелируют с накоплением иммунопозитивной метки Src-киназ в хориональном эпителии балок в местах формирования отростков терминальных трабекул (рис. 2).

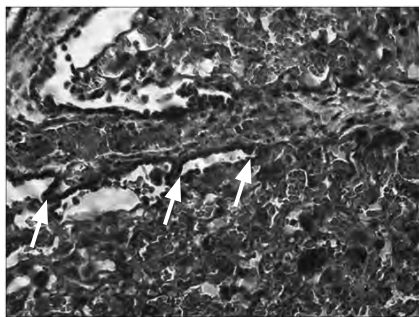


Рис. 1. Формирование новых генераций балок в плаценте (стрелки). Окраска: гематоксилин Майера и эозин. Ув. 200

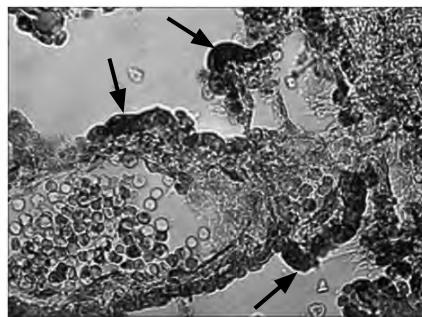


Рис. 2. SRC+ клетки (стрелки) в хориональном эпителии промежуточных балок. Окраска: иммуногистохимическое выявление фосфорилирующих тирозинкиназ Src. Ув. 400

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование позволяет рассматривать экспрессию гена SRC и активность Src-киназ в плаценте как один из элементов регуляторного механизма и новое условие, контролирующее компенсаторно-приспособительные восстановительные гистогенезы в плаценте.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Шеголев А. И.* Современная морфологическая классификация повреждений плаценты // *Акушерство и гинекология.* 2016. № 4. С. 16–23.
2. *Полякова В. С., Сизова Е. А., Мирошников С. А.* Морфофункциональная характеристика щитовидной железы при введении наночастиц меди // *Морфология.* 2015. Т. 148. № 6. С. 54–58.
3. *Касиков А. Г.* Пылевые выбросы медно-никелевого производства и последствия их воздействия на организм человека в условиях Крайнего Севера // *Вестник Кольского научного центра РАН.* 2017. Т. 10. № 4. С. 58–63.
4. *Мухачева С. В., Безель В. С.* Тяжелые металлы в системе мать-плацента-плод у рыжей полевки в условиях загрязнения среды выбросами медеплавильного комбината // *Экология.* 2015. № 6. С. 444–453.
5. *Нотова С. В., Казакова Т. В., Маршинская О. В.* Изучение химических форм меди и марганца в живом организме // *Животноводство и кормопроизводство.* 2020. Т. 103. № 1. С. 47–64.
6. *Bagnato G., Leopizzi M., Urciuoli E.* Nuclear Functions of the Tyrosine Kinase Src. *International Journal of Molecular Sciences.* 2020; 21(2675):1–14.
7. *Parsons S., Parsons J.* Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene.* 2004; 23:7906–7909.
8. *Андрусишина И. Н., Голуб И. А., Дидикин Г. Г.* Структура, свойства и токсичность наночастиц оксидов серебра и меди // *Биотехнология.* 2011. Т. 4. № 6. С. 51–59.