

АКТИВНОСТЬ ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ В СИНЦИТИОТРОФОБЛАСТЕ ВОРСИНОК ПЛАЦЕНТЫ У БЕРЕМЕННЫХ С ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

М.Т.Луценко, И.В.Довжикова

Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания Сибирского отделения РАН, 675000, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22

РЕЗЮМЕ

В работе дана оценка активности цитохромоксидазы и проведен подсчет числа апоптотически измененных ядер синцитиотрофобласта в 25 плацентах, полученных при родоразрешении беременных в срок 36 - 37 недель, у которых на сроке 30 - 34 недели диагностирован рецидив цитомегаловирусной инфекции. Выявлено статистически достоверное снижение количества продуктов реакции на цитохромоксидазу при увеличении числа ядер синцитиотрофобласта в состоянии апоптоза с максимальным проявлением при титре антител IgG к цитомегаловирусу 1:1600 ($p < 0,05$). При межсистемном анализе взаимозависимых величин установлена обратная зависимость между количеством ядер синцитиотрофобласта в состоянии апоптоза и показателями активности цитохромоксидазы при рецидиве цитомегаловирусной инфекции в период беременности. Полученные результаты свидетельствуют о вовлечении митохондриальных факторов – цитохромоксидазы и ее недостаточности в развитие метаболической дисфункции, в том числе и на уровне ДНК, что усиливало проявления апоптотических изменений в ядрах синцитиотрофобласта плаценты. Данный факт является, с одной стороны, вероятным отражением тканевой гипоксии, с другой – свидетельствует об инициации внутриклеточных ферментных механизмов апоптоза, обуславливающих развитие плацентарной недостаточности.

Ключевые слова: цитомегаловирус, беременность, плацента, цитохромоксидаза, апоптоз.

SUMMARY

CYTOCHROMOXIDASE ACTIVITY IN SYNCYTIOTROPHOBLAST OF PLACENTAL VILLI IN PREGNANT WOMEN WITH CYTOMEGALOVIRUS INFECTION

M.T.Lutsenko, I.V.Dovzhikova

Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration of Siberian Branch RAMS, 22 Kalinina Str., Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation

In this paper we evaluated the activity of cytochrome oxidase and counted the number of apoptotic syncytiotrophoblast nuclei in 25 placentas obtained at delivery in pregnant women with 36-37 weeks gestation period who had been diagnosed with recurrent cytomegalovirus infection at 30-34 weeks. A statistically significant reduction has been found in the amount of

reaction products for cytochrome oxidase in the presence of increased number of apoptotic nuclei of syncytiotrophoblast with a peak at 1:1600 titer of IgG antibodies to cytomegalovirus ($p < 0.05$). During inter-system analysis of mutually dependent variables, an inverse relationship has been established between the number of apoptotic nuclei of syncytiotrophoblast and parameters of cytochrome oxidase activity in recurrent cytomegalovirus infection during pregnancy. The results suggest the involvement of mitochondrial factors – cytochrome oxidase and its deficiency in the development of metabolic dysfunction, including dysfunction at DNA level that increase appearance of apoptotic changes in the nuclei of placental syncytiotrophoblast. On the one hand, this fact is a probable reflection of tissue hypoxia, on the other – it indicates the initiation of intracellular enzymatic mechanisms of apoptosis, causing the development of placental insufficiency.

Key words: cytomegalovirus, pregnancy, placenta, cytochrome oxidase, apoptosis.

Цитохромы – гемопротеиды, выполняют одну из важнейших ролей в тканевом дыхании, которая заключается в переносе электронов: $b-c_1-(c-a)-a_3-O_2$. В зависимости от конфигурации простетической группы и способности поглощать свет в определенной части спектра, цитохромы можно подразделить на четыре типа: a, b, c, d. Окисленный цитохром C восстанавливается химическими реагентами, такими как цитохромредуктазы [15]. Цитохром a_3 действует как цитохромоксидаза (цитохром C; O_2 -оксидоредуктаза) – основной фермент, переносящий электроны от цитохрома C на O_2 в процессе окислительного фосфорилирования [10]. Окисление цитохрома C сопровождается появлением мембранного протонного потенциала, который используется клеткой для обеспечения метаболических процессов, особенно для синтеза АТФ [11]. Фермент располагается на внутренней мембране митохондрий и зависит от ее фосфолипидного состава [5, 10, 16]. Цитохромоксидаза кодируется в митохондриальном геноме и синтезируется на митохондриальных рибосомах [13]. Цепочка, по которой электроны передаются к кислороду такова: цитохром C $\rightarrow Cu_A \rightarrow Heme_a \rightarrow Heme_a_3 \rightarrow Cu_B + O_2$. Перенос электрона сопровождается трансмембранным переносом двух протонов из матрикса в цитозольное пространство и сопровождается формированием протонного потенциала [12].

Цитохромоксидаза в клетках человека крайне необходима для обеспечения их жизнедеятельности. Нарушение активности цитохромоксидазы приводит к апоптозу клеток. В литературе имеются сведения о дисфункции митохондриального аппарата на уровне

цитохромоксидазы и его роли в развитии апоптоза в плаценте при рецидиве герпес-вирусной инфекции в период беременности [1, 2]. Тогда как данных о влиянии недостаточности цитохромоксидазы на развитие апоптоза в плаценте при цитомегаловирусной инфекции (ЦМВИ) нет.

Цель исследования – установить особенности функционирования дыхательной цепи переноса электронов на уровне цитохромоксидазы и ее влияние на биосинтетическую функцию плаценты на уровне ДНК при рецидиве ЦМВИ у беременных на сроке 30-34 недели гестации.

Материалы и методы исследования

На базе акушерского отделения патологии беременности ФГБУ «ДНЦ ФПД» СО РАМН было обследовано 35 беременных с рецидивом ЦМВИ на сроке 30-34 недели гестации (основная группа), и 30 беременных на тех же сроках гестации без таковой патологии (контрольная группа). У этих же женщин после родов на сроке 36-37 недель произведен забор плаценты для гистологических исследований. Исследование выполнено в соответствии с принципами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (2008 г.) и одобрено комитетом по биомедицинской этике ДНЦ ФПД СО РАМН в соответствии с принципами конвенции о биомедицине и правах человека, а также общепризнанными нормами международного права, от всех здоровых и больных лиц было получено информированное согласие.

У беременных ЦМВИ симптоматически проявлялась в виде острого респираторного заболевания, сопровождающегося ринофарингитом. Клинический диагноз обострения ЦМВИ устанавливался при комплексном исследовании периферической крови на наличие IgM или четырехкратного и более нарастания титра антител IgG в парных сыворотках в динамике через 10 дней, индекса авидности более 65%, а также ДНК ЦМВ. Верификация ЦМВ, определение типоспецифических антител класса M и G, индекса авидности осуществлялись методами ИФА на микропланшетном ридере Stat Fax-2100 (США) с использованием тест-систем ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск), выявление ДНК ЦМВ методами ПЦР проводилось на аппарате ДТ-96 с использованием наборов НПО «ДНК-технология» (Москва).

Морфологическая детекция апоптоза проводилась на парафиновых срезах по ISEL-методу [6, 9]. Определение цитохромоксидазы в плаценте выполнялось по методу Винклера-Шульце в модификации Муга [3, 4]. Срезы толщиной 7-10 мкм получали на замораживающем микротоме, помещая кусочки плаценты первоначально в физиологический раствор (рН 7,2), а затем переносили их в инкубационный раствор при 37°C следующего состава: смешивали в равном количестве 0,01 М (0,17%) диметил-р-фенилендиамин-НСl, растворенный в 0,066 М фосфатном буфере (рН 5,8), содержащем 1% NaCl и 0,14% раствор α -нафтола. Контрольные срезы промывали в растворе азида натрия, изготовленного на физиологическом растворе поваренной соли в

концентрации 0,005 М (0,019%). После инкубации в течение 10 мин. споласкивали в физиологическом растворе. Срез покрывали 5% раствором ацетата калия, накрывали покровным стеклом, окантовывая расплавленным парафином. Препараты изучали под цифровым микроскопом МТ (Meiji Techno, Япония), связанным с компьютером по программе Scion Corporation (США) с целью проведения цитофотометрической обработки продуктов реакции.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программного обеспечения Statistica 6.0. Проверку нормальности распределения проводили по критерию Колмогорова-Смирнова, гипотезу о статистической значимости различий двух выборок – по t-критерию Стьюдента. Корреляционную зависимость рассчитывали методом Спирмена.

Результаты исследования и их обсуждение

Описанные нами ранее морфофункциональные изменения в плаценте при ЦМВИ ведут к нарушению ее обменной функции [7, 8]. В частности, уменьшается переход кислорода и питательных веществ от матери к плоду, увеличивается накопление в организме плода недоокисленных продуктов метаболизма. Плацента начинает использовать дыхательную систему, представленную митохондриальными ферментами, только для нужд собственного обмена, что еще больше угнетает поступление кислорода к плоду. Эта плацентарная недостаточность вторично ведет к нарушению обмена веществ у плода, что вновь отражается на функции последа, создавая при этом замкнутый круг патологических процессов [14]. В дальнейшем эти изменения могут оказывать непосредственное действие на состояние плода и родовой деятельности.

В ходе гистохимического исследования плацент от женщин с рецидивом ЦМВИ на сроке 30-34 недели выявлено статистически значимое в сравнении с контрольной группой уменьшение количества продуктов реакции на цитохромоксидазу в синцитиотрофобласте ворсинок. Так, при титре антител IgG к ЦМВ 1:800 средние значения содержания цитохромоксидазы снижались до $4,0 \pm 0,02$ усл. ед. ($p < 0,001$), при титре антител 1:1600 – до $2,5 \pm 0,015$ усл. ед. ($p < 0,001$), в контроле данный показатель составил $7,5 \pm 0,03$ усл. ед. (рис.).

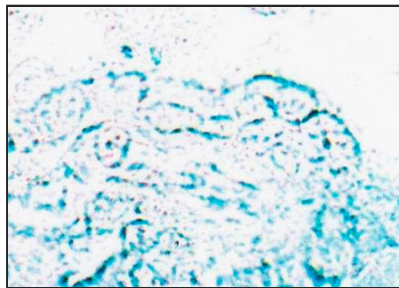
Одновременный подсчет апоптотически измененных ядер синцитиотрофобласта показал, что при титре антител IgG к ЦМВ 1:800 их количество в сравнении с контролем увеличивалось до $1,5 \pm 0,05\%$ ($p < 0,001$), при титре антител 1:1600 – до $5,3 \pm 0,02\%$ ($p < 0,001$), в контроле этот показатель составил $1,0 \pm 0,009\%$.

При интегральной оценке межсистемных взаимоотношений между показателями цитохромоксидазы и числа ядер синцитиотрофобласта в состоянии апоптоза при ЦМВИ у беременных на сроке 30-34 недели выявлена прямая корреляционная зависимость: средняя – при титре антител IgG к ЦМВ 1:800 ($r = -0,63$; $p < 0,05$) и высокая – при титре антител IgG к ЦМВ 1:1600 ($r = -0,78$; $p < 0,01$), что свидетельствовало о нарушении морфоструктуры и функциональной активности ферментных систем митохондрий, индуцируемых вы-

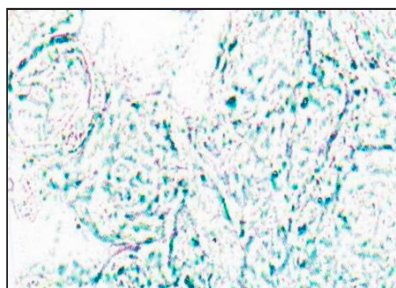
сокой активностью вируса и каскадом взаимообусловленных окислительных процессов.

Выявленные изменения в структуре межсистемных взаимодействий объясняются нарушением функционирования антиоксидантной системы плаценты при ЦМВИ, что приводило к накоплению в цитозоле сво-

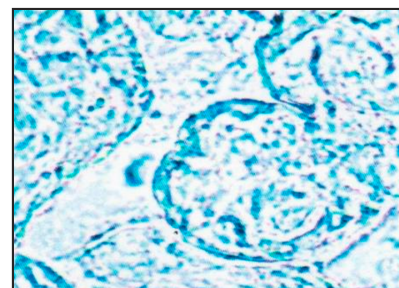
бодных радикалов кислорода. В результате нарушалась структура клеточных элементов, в том числе и митохондрий, их метаболическая активность, что, в свою очередь, инициировало митохондриальные факторы апоптоза и появление большого числа апоптотически измененных ядер синцитиотрофобласта.



а



б



в

Рис. Синцитиотрофобласт ворсинок плаценты на сроке 37 недель. Реакция по Винклеру-Шульце в модификации Муга. Увеличение: 10×100.

а – рецидив ЦМВИ на сроке 32 недели, титр антител IgG к ЦМВ 1:800, активность цитохромоксидазы снижена до $4,0 \pm 0,02$ усл. ед.;

б – рецидив ЦМВИ на сроке 32 недели, титр антител IgG к ЦМВ 1:1600, активность цитохромоксидазы снижена до $2,5 \pm 0,015$ усл. ед.;

в – контроль, активность цитохромоксидазы – $7,5 \pm 0,03$ усл. ед.

Таким образом, блокирование цитохромоксидазы в плаценте при рецидиве ЦМВИ на сроке 30-34 недели приводит к нарушению оттока электронов по цепи дыхательных ферментов, что является, с одной стороны, вероятным отражением тканевой гипоксии, с другой – свидетельствует об инициации внутриклеточных ферментных механизмов апоптоза, обуславливающих развитие плацентарной недостаточности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андриевская И.А. Механизмы и закономерности развития нарушений морфофункционального состояния плаценты и кислородтранспортной функции периферической крови рожениц и крови пуповины при обострении герпес-вирусной инфекции: дис. ... д-ра биол. наук. Благовещенск, 2011. 220 с.

2. Довжикова И.В. Изменение активности цитохромоксидазы и сукцинатдегидрогеназы в плаценте при беременности, осложненной обострением герпес-вирусной инфекции // Бюл. физиол. патол. дыхания. 2011. Вып.39. С.19–21.

3. Кисели Д. Практическая микротехника и гистохимия. Будапешт: АН Венгрии, 1962. 400 с.

4. Лилли Р.Д. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. М.: Мир, 1969. 645 с.

5. Луценко М.Т. Фосфолипиды при нарушении дыхательной функции организма. Благовещенск, 2006. 161 с.

6. Пат. 2370768 РФ. Способ диагностики вступления ядер симпласта ворсинок плаценты в апоптоз путем определения в гомогенате плаценты содержания цитохрома С у беременных, перенесших в третьем триместре герпес-вирусную инфекцию / М.Т.Луценко, И.А.Андриевская; опублик. 11.06.2008.

7. Луценко М.Т., Андриевская И.А. Морфометриче-

ские исследования фетоплацентарного барьера ворсинок плаценты при герпесной и цитомегаловирусной инфекциях // Бюл. СО РАМН. 2010. Т.30, №3. С.137–140.

8. Луценко М.Т., Андриевская И.А., Довжикова И.В. Морфофункциональная характеристика фетоплацентарного комплекса у беременных, перенесших обострение герпес-вирусной инфекции, и патоморфологические изменения в органах плода // Арх. патол. 2010. Т.72, №4. С.47–49.

9. Погорелов В.М., Козинцев Г.И. Морфология апоптоза при нормальном и злокачественном гемопоэзе // Гематол. и трансфузиол. 1995. Т.43, №5. С.21–24.

10. Скулачев В.П. Энергетика биологических мембран. М.: Наука, 1989. 564 с.

11. Скулачев В.П. Кислород в живой клетке: добро и зло // Сорос. образов. журн. 1996. №3. С.4–16.

12. Скулачев В.П. Законы биоэнергетики // Сорос. образов. журн. 1997. №1. С.9–14.

13. Филатов И.А., Кулиш М. А., Миронов А. Ф. Строение и свойства цитохромоксидазы // Биоорг. хим. 1988. Т.14, №6. С.725–745.

14. Цинзерлинг В.А., Мельникова В.М. Перинатальные инфекции: Вопросы патогенеза, морфологической диагностики и клинико-морфологических сопоставлений. СПб.: Элби СПб, 2002. 352 с.

15. Wikström M. Cytochrome c oxidase: 25 years of the elusive proton pump // Biochim. Biophys. Acta. 2004. Vol.1655, №1-3. P.241–247.

16. Effect of chemical modification of lysine amino groups on redox and protonmotive activity of bovine heart cytochrome c oxidase reconstituted in phospholipid membranes / D.Steverding [et al.] // Biochemistry. 1990. Vol.29, №12. P.2945–2950.

REFERENCES

1. Andrievskaya I.A. *Mekhanizmy i zakonomernosti razvitiya narusheniy morfofunktsional'nogo sostoyaniya platsenty i kislorodtransportnoy funktsii perifericheskoy krovi rozenits i krovi pupoviny pri obostrenii herpes-virusnoy infektsii: dissertatsiya doktora biologicheskikh nauk* [Developmental mechanisms and patterns of morphofunctional disorders of the placenta and disorders of the oxygen-transport function of peripheral blood in pregnant women and cord blood in acute herpes virus infection: thesis...doctor of biological sciences]. Blagoveshchensk; 2011.

2. Dovzhikova I.V. *Bülleten' fiziologii i patologii dyhaniya*. 2011; 39:19–21.

3. Kiseli D. *Prakticheskaya mikrotekhnik i gistokhimiya* [Practical microtechnology and histochemistry]. Budapest; 1962.

4. Lilli R.D. *Patogistologicheskaya teyhnika i prakticheskaya gistokhimiya* [Pathohistological technique and practical histochemistry]. Moscow: Mir; 1969.

5. Lutsenko M.T. *Fosfolipidy pri narushenii dykhatel'noy funktsii organizma* [Phospholipids in organism's respiratory function disorder]. Blagoveshchensk; 2006.

6. Lutsenko M.T., Andrievskaya I.A. *Patent 2370768 RU. Sposob diagnostiki vstupleniya yader simplasta vorsinok placenty v apoptoz putem opredeleniya v gomogenate placenty sodержaniya citohroma C u beremennykh, pere-nesshikh v tret'em trimestre herpes-virusnuyu infektsiyu* (Patent 2370768 RU. A method for diagnosing the entry of placental villi symplast nuclei to apoptosis by determining the cytochrome C in placenta homogenate of pregnant

women who had herpes virus infection in the third trimester); published 11.06.2008.

7. Lutsenko M.T., Andrievskaya I.A. *Bülleten' Sibirskogo Otdeleniya Rossiyskoy Akademii Meditsinskikh Nauk* 2010; 3:137–140.

8. Lutsenko M.T., Andrievskaya I.A., Dovzhikova I.V. *Arkhiv patologii* 2010; 72(4):47–49.

9. Pogorelov V.M., Kozinets G.I. *Gematologiya i transfuziologiya* 1995; 43(5):21–24.

10. Skulachev V.P. *Energetika biologicheskikh membran* [Energy properties of biological membranes]. Moscow: Nauka; 1989.

11. Skulachev V.P. *Sorosovskiy obrazovatel'nyy zhurnal* 1996; 3:4–16.

12. Skulachev V.P. *Sorosovskiy obrazovatel'nyy zhurnal* 1997; 1:9–14.

13. Filatov I.A., Kulish M. A., Mironov A. F. *Bioorganicheskaya khimiya* 1988; 14(6):725–745.

14. Cinzerling V.A., Mel'nikova V.M. *Perinatal'nye infektsii: Voprosy patogeneza, morfologicheskoy diagnostiki i kliniko-morfologicheskikh sopostavleniy* [Perinatal infections: pathogenesis, morphological diagnosis and clinical and morphological comparisons]. St. Petersburg: Elbi SPb; 2002.

15. Wikström M. Cytochrome c oxidase: 25 years of the elusive proton pump. *Biochim. Biophys. Acta* 2004; 1655(1-3): 241–247.

16. Steverding D., Kadenbach B., Capitanio N., Papa S. Effect of chemical modification of lysine amino groups on redox and protonmotive activity of bovine heart cytochrome c oxidase reconstituted in phospholipid membranes. *Biochemistry* 1990; 29(12):2945–2950.

Поступила 12.05.2014

Контактная информация
Михаил Тимофеевич Луценко,

доктор медицинских наук, профессор, академик РАМН, руководитель лаборатории механизмов этиопатогенеза и восстановительных процессов дыхательной системы при НЗЛ, Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания Сибирского отделения РАМН, 675000, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22.

E-mail: Lucenkomt@mail.ru

Correspondence should be addressed to

Mikhail T. Lutsenko,

MD, PhD, Professor, Academician RAMS, Head of Laboratory of Mechanisms of Etiopathogenesis and Recovery Processes of the Respiratory System at Non-Specific Lung Diseases, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration SB RAMS, 22 Kalinina Str., Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation.

E-mail: Lucenkomt@mail.ru