

Морфофункциональная характеристика фетоплацентарного барьера при герпес-вирусной инфекции

Луценко М.Т., Андриевская И.А.

Morphofunctional characteristic of fetoplacental barrier at the pregnancy complicated herpes-virus infection

Lutsenko M.T., Andriyevskaya I.A.

Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания СО РАМН, г. Благовещенск

© Луценко М.Т., Андриевская И.А.

При обострении герпес-вирусной инфекции во время беременности на фетоплацентарный барьер повреждающее влияние оказывают интерлейкин, фактор некроза опухоли α , нитросоединения, приводящее к подавлению активности белка Bcl-2 и увеличению активности каспазы-3.

Ключевые слова: герпес, синцитиотрофобласт, фактор некроза опухолей α , Bcl-2, каспаза-3.

Herpes-virus infection decrease of activity of villus Bcl-2 was increased in process of increase of a credit of antibodies to virus herpes. The increase of activity kaspasa-3 created action on DNK nucleus sincythiotrophoblast.

Key words: herpes, sincythiotrophoblast, tumor necrosis factor α , Bcl-2, kaspasa-3.

УДК 618.36:57.016.6:578.825.13

Введение

В настоящее время внимание специалистов привлекает частое обострение герпес-вирусной инфекции во время беременности [1, 9], приводящее к нарушению обмена основных веществ и ферментативных процессов в синцитиотрофобласте ворсинок плаценты [3, 5, 10].

Причины, обуславливающие повреждение фетоплацентарного барьера при герпес-вирусной инфекции, могут быть разнообразными. Наименее изученными являются процессы, вызываемые сильнодействующими повреждающими факторами, такими как нитросоединения [6, 8], которые могут привести к активизации в синцитиотрофобласте каспазного цикла и снижению защитной функции белка Bcl-2. Это провоцирует нарушение апоптоза в ядрах синцитиотрофобласта ворсинок плаценты.

Материал и методы

Материалом для исследования послужила периферическая кровь и плаценты, полученные в результате своевременных родов на сроке 38—40 нед гестации. Обследовано 60 женщин с различной степенью

агрессивности герпесной инфекции первого типа: с титрами антител иммуноглобулина G (IgG) 1 : 1 600 (I группа), 1 : 6 400 (II группа) и 1 : 12 800 (III группа). В каждую группу вошли по 20 беременных. Контрольную группу составили 20 женщин с неосложненным течением беременности.

Исследования проводились на базе стационара акушерского отделения клиники Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания СО РАМН (г. Благовещенск). Все исследования были проведены с учетом требований Хельсинкской декларации Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и Правил клинической практики в Российской Федерации, утвержденных приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 № 226.

Плаценту получали в течение 10—15 мин после родов. Поверхность плаценты со стороны базальной пластинки отмывали большим количеством физиологического раствора (ФР). Плодовая часть плаценты (ворсинчатый хорион) срезалась скальпелем небольшими пластинками площадью до 2—3 см², толщина срезаемого слоя не превышала 1 мм. Кусочки ткани помещали в

химические стаканы, содержащие 200 мл ФР, отмывали от клеток крови, перемешивая на магнитной мешалке в течение 15 мин. Для получения экстрактов отмывые кусочки плаценты слегка подсушивали на фильтровальной бумаге и взвешивали. Затем ткань растирали пестиком в фарфоровой ступке и гомогенизировали до однородной кремообразной массы. К полученному гомогенату добавляли ФР в объеме, равном изначальной массе ткани (на 1 г — 1 мл ФР). Взвесь помещали в пластиковые пробирки Falcon и подвергали замораживанию при температуре -20°C в течение суток. Затем гомогенат размораживали и ультрацентрифугировали при 4 000 об/мин при температуре 4°C . Надосадочную жидкость разливали мелкими аликвотами и хранили при температуре -20°C до проведения иммуноферментного анализа (ИФА).

В гомогенате плаценты белок Bcl-2, каспазу-3 и NO_2^- определяли, используя наборы компании Bender MedSystems (Австрия). По динамике титров антител IgG в периферической крови с помощью стандартных тест-систем фирмы «Вектор-Бест» (г. Новосибирск) проводилась верификация вируса простого герпеса типа 1 (ВПГ-1) и оценивалась степень агрессивности инфекции. Анализ проводили на микропланшетном ридере Stat-Fax2100 (США). Электронно-микроскопические исследования выполняли по стандартным методикам с конечной заливкой в аралдит. Ультратонкие срезы изготавливали на ультрамикротоме LKB (Швеция), контрастировали уранилацетатом. Для просмотра и цифрового фотографирования использовали микроскоп Tesla (Чехия).

Морфологическая детекция апоптоза проводилась на парафиновых срезах плаценты по метке концов фрагментов ДНК по методу *in situ* end-labeling (ISEL) [4]. Содержание фактора некроза опухоли α (ФНО- α) определяли с помощью твердофазного ИФА с использованием наборов ООО «Цитокин» (г. Санкт-Петербург).

Для световой микроскопии материал фиксировали в 0,5%-м растворе параформальдегида на 80%-м этаноле и заливали в парафин. На срезах иммуногистохимически выявляли белок Bcl-2 с помощью моноклональных антител (клон 124, Dako Cytomation, Дания).

Статистическую обработку данных проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента. Результаты представлены в виде $X \pm m$, где X — выборочное среднее

значение, m — стандартное отклонение. Статистически значимыми считали отклонения при уровне $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Проведенные исследования показали, что при беременности, осложненной герпес-вирусной инфекцией, основными экзогенными индукторами влияния на фетоплацентарный барьер ворсинок плаценты были в той или иной степени выраженности антигенная перегрузка и выработка иммунокомпетентными клетками ФНО- α . Количество ФНО- α в гомогенате плаценты в I группе составило $(21,10 \pm 0,08)$ пг/мл; во II группе — $(84,3 \pm 0,3)$ пг/мл и в III группе — $(89,98 \pm 0,34)$ пг/мл (в контроле — $(11,6 \pm 0,09)$ пг/мл).

В гомогенате плаценты на этом фоне резко нарастало содержание каспазы-3: в I группе $(26,70 \pm 0,08)$ нг/мл; во II группе — $(79,50 \pm 0,40)$ нг/мл и в III группе — $(103,70 \pm 0,80)$ нг/мл.

Одновременно оценивалась динамика содержания в этих же гомогенатах белка Bcl-2, являющегося антиапоптозным фактором в клетках. В I группе содержание белка Bcl-2 нарастало и составило $(9,24 \pm 0,09)$ пг/мл (контроль — $(3,80 \pm 0,02)$). Максимум содержания Bcl-2 достигало во II группе — $(42,5 \pm 0,6)$ пг/мл, но затем, по мере нарастания титра антител IgG к вирусу герпеса до 1 : 12 800, его содержание начинало резко снижаться — до $(28,14 \pm 0,70)$ пг/мл (таблица, рис. 1).

Динамика изменений содержания каспазы-3, белка Bcl-2 и NO_2^- в гомогенате плацент от женщин, перенесших в третьем триместре обострение герпес-вирусной инфекции

Показатель	Контроль	Группа I	Группа II	Группа III
Каспаза-3, нг/мл	$19,00 \pm 0,09$	$26,70 \pm 0,05^*$	$79,50 \pm 0,40^*$	$103,70 \pm 0,80^*$
Белок Bcl-2, пг/мл	$3,80 \pm 0,02$	$9,24 \pm 0,09^*$	$42,50 \pm 0,30^*$	$28,14 \pm 0,79^*$
NO_2^- , мкмоль/л	$20,31 \pm 0,09$	$38,80 \pm 1,50^*$	$92,10 \pm 1,20^*$	$105,70 \pm 1,50^*$

* Различия по сравнению с контролем $p < 0,001$.

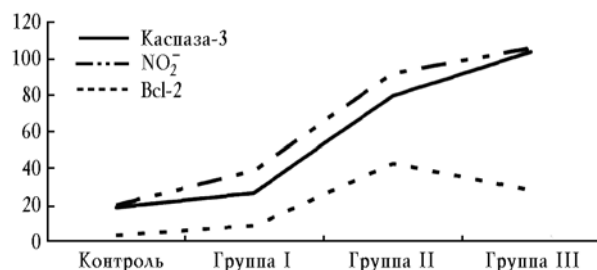


Рис. 1. Взаимоотношения каспазы-3, Bcl-2 и NO_2^- в гомогенате плаценты рожениц после перенесенной герпес-вирусной инфекции

По мере нарастания агрессивности герпес-вирусной инфекции в гомогенате плаценты увеличивалось содержание NO_2^- . Антиапоптозная функция симпласта начала снижаться, что и проявлялось в увеличении числа ядер в фетоплацентарном барьере в состоянии апоптоза до $(4,00 \pm 0,02)\%$ (в контроле — $1,00 \pm 0,01$).

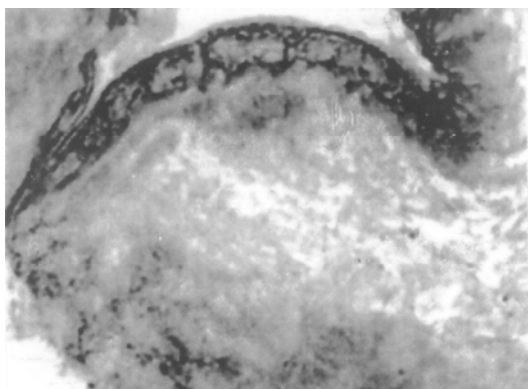


Рис. 2. Белок Bcl-2 в синцитиотрофобласте ворсинок плаценты роженицы, не имевшей вирусных заболеваний во время беременности.

Иммуногистохимическая реакция. Ув. 400



Рис. 3. Белок Bcl-2 в синцитиотрофобласте ворсинок плаценты роженицы, перенесшей вспышку герпес-вирусной инфекции в третьем триместре (титр антител к вирусу герпеса 1 : 12 800). Иммуногисто-

химическая реакция. Ув. 400

Таким образом, проявление антиапоптозной функции клеток (в данном случае симпласта) зависит от концентрации антигена, возникающего в крови беременной при вспышке герпес-вирусной инфекции. Если на начальном этапе развития инфекции защитные свойства синцитиотрофобласта могут противостоять вступлению ядер в апоптоз, содержание белка

Bcl-2 увеличивается почти в 11 раз по сравнению с контролем, то при тяжелой форме герпес-вирусной инфекции (титр антител 1 : 12 800) синтез Bcl-2 подавляется и создается благоприятная почва для преждевременного формирования апоптоза ядер в синцитиотрофобласте фетоплацентарного барьера (рис. 2, 3).

Заключение

Герпес-вирусная инфекция подавляет активность белка Bcl-2 в плаценте беременной и способствует наращиванию активности каспазы-3 и NO_2^- , увеличивая вхождение в апоптоз ядер симпласта ворсинок.

Литература

1. Андриевская И.А. Гормональные и микробицидные изменения у беременных с герпес-вирусной инфекцией // Бюл. физиологии и патологии дыхания. 2004. Вып. 17. С. 65—68.
2. Кобозева Н.В., Гуркин Ю.А. Перинатальная эндокринология. Л.: Медицина, 1986. 310 с.
3. Марусов А.П. Доклиническая форма позднего токсикоза беременных: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М., 1991. 32 с.
4. Погорелов В.М., Козинец Г.И. Гематология и трансфузиология. 1995. Т. 43, № 5. С. 21—24.
5. Протопопова Н.В., Колесникова Л.И., Ильин В.П. Метаболизм и гемодинамика у беременных с артериальной гипертензией. Новосибирск: Наука, 2000. 146 с.
6. Реутов В.П. Изучение механизмов восстановления ионов NO_2^- в крови и митохондриях клеток тканей млекопитающих: дис. ... канд. биол. наук. М., 1988. 245 с.
7. Реутов В.П., Орлов С.Н. Физиологическое значение гуанилатциклазы и роль окиси азота и нитросоединений в регуляции активности этого фермента // Физиология человека. 1993. № 19 (1). С. 124—135.
8. Реутов В.П., Каюшин Л.П., Сорокина Е.Г. Физиологическая роль цикла окиси азота в организме человека и животных // Физиология человека. 1994. № 20 (3). С. 165—174.
9. Соловьёва А.С., Луценко М.Т. Характеристика местного иммунитета на поверхности небных миндалин у беременных с герпес-вирусной инфекцией // Дальневост. мед. журн. 2007. № 3. С. 22—24.
10. Cambein J., Jacqueson V. At the level of serum triglycerides a significant predictor of coronary death in normocholesterolemic subjects // Amer. J. Epidemiol. 1986. V. 124. № 4. P. 624—632.
11. Demura R., Odagiri E., Yoshimura M. Placental secretion of prolactin, ACTH and immunoreactive β -endorphin during pregnancy // Acta endocrinol (Kbh). 1982. V. 100. № 1. P. 114—119.

Поступила в редакцию 13.08.2009 г.

Утверждена к печати 17.03.2010 г.

Экспериментальные и клинические исследования

М.Т. Луценко — академик РАМН, советник при дирекции Дальневосточного НЦ физиологии и патологии дыхания СО РАМН (г. Благовещенск).

И.А. Андриевская — канд. биол. наук, научный сотрудник Дальневосточного НЦ физиологии и патологии дыхания СО РАМН (г. Благовещенск).

Для корреспонденции

Луценко Михаил Тимофеевич, e-mail: Lucenko@mail.ru, tatiana1383@list.ru