

СОСТОЯНИЕ ФЕТОПЛАЦЕНТАРНОГО БАРЬЕРА ПРИ ГЕРПЕС-ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ У БЕРЕМЕННЫХ**Михаил Тимофеевич ЛУЦЕНКО, Ирина Анатольевна АНДРИЕВСКАЯ***ГУ Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания СО РАМН
675000, Амурская область, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22*

Исследовались беременные, перенесшие на различных этапах гестации герпес простого типа. По мере нарастания титра антител к возбудителю повышалось содержание циркулирующих иммунных комплексов, отмечалось проникновение вируса в симпласт ворсинок плаценты.

Антитела к вирусу герпеса определялись в пуповинной крови плода, что вызывало повреждение его органов. В симпласте ворсинок плаценты увеличивалось количество ядер в состоянии апоптоза. Снижался синтез гормонов (эстрадиол, эстриол, прогестерон, дегидроэпиандростерон), что приводило к фетоплацентарной недостаточности.

Ключевые слова: фетоплацентарный барьер, беременность, герпес-вирусная инфекция, апоптоз, ворсинка плаценты.

Введение

В настоящее время особое внимание привлекает проблема персистирующих инфекций в человеческом организме, особенно если это касается беременных женщин. Наиболее распространенной персистирующей инфекцией является вирус простого герпеса [1–8]. При герпес-вирусной инфекции возбудитель, присутствующий в больших количествах в нервных ганглиях, постоянно выбрасывается в кровь и достигает практически всех органов. Особая опасность создается у беременных, так как вирус герпеса может вступить в контакт с фетоплацентарным барьером ворсинок плаценты.

Фетоплацентарный барьер — это морфофункциональная структура, обеспечивающая, с одной стороны, постоянное поступление жизненно важных продуктов для построения и регуляции роста плода. С другой стороны, через него происходит постоянный обмен между кровью плода и кровью матери вырабатываемыми плодом продуктами тканевого метаболизма и газами крови. В этом плане плацента становится на период развития плода дыхательным органом. Возникающие сбои в формировании зародыша на ранних стадиях развития происходят в основном от функционально-генетического неблагополучия фетоплацентарного барьера. Нарушения гормонального и метаболического статуса в ворсинчатом симпласте, вызываемые эпигенетическими факторами, к числу которых следует отнести вирусные инфекции, резко меняют процессы дифференцировки и роста зародыша.

Материалы и методы исследования

Исследования проводились у беременных женщин, перенесших герпес-вирусную инфекцию различной силы агрессивности (по титру антител к возбудителю), на всех этапах беременности. Титр антител определялся иммуноферментным методом на спектрофотометре «Stat-Fax-2100» (USA) с использованием стандартных наборов ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск). На I–III триместрах беременности в периферической крови беременных определяли количество циркулирующих иммунных комплексов спектрофотометрическим методом на спектрофотометре «Stat-Fax-1900» (USA).

Контрольную группу для каждого триместра составили беременные, не имевшие признаков других заболеваний, а также герпес-вирусной инфекции (18 женщин). Отдельно была составлена группа беременных (20 человек), за которыми проводилось наблюдение с 4 недели беременности до родов. У этих женщин исследовалась динамика изменений гормональной активности на трех этапах:

- 1) первоначально — до момента вспышки герпес-вирусной инфекции;
- 2) в момент обострения герпес-вирусной инфекции;
- 3) через 2–3 месяца после обострения герпес-вирусной инфекции.

Для изучения влияния герпес-вирусной инфекции на развивающийся плод на протяжении нескольких лет собирался материал от плодов после кесарева сечения по показаниям в связи с тяжестью беременности, осложненной тяжелой формой герпес-вирусной инфекции.

*Андреевская И.А. — канд.б.н., e-mail: tatiana1383@list.ru
Луценко М.Т. — академик РАМН, советник при дирекции*

Таблица 1

Содержание циркулирующих иммунных комплексов в периферической крови беременных при вспышке герпес-вирусной инфекции (ед. оптической плотности, $M \pm m$)

Триместр	Титр антител к вирусу герпеса				
	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800
I	$0,130 \pm 0,005^{**}$ $0,095 \pm 0,008$	$0,168 \pm 0,006^{***}$ $0,0087 \pm 0,008$	$0,189 \pm 0,004^{***}$ $0,087 \pm 0,008$	$0,176 \pm 0,04^{***}$ $0,087 \pm 0,008$	$0,190 \pm 0,008^{***}$ $0,087 \pm 0,008$
II	$0,138 \pm 0,009^{**}$ $0,085 \pm 0,006$	$0,168 \pm 0,075^{***}$ $0,091 \pm 0,06$	$0,179 \pm 0,03^{***}$ $0,091 \pm 0,006$	$0,178 \pm 0,005^{***}$ $0,091 \pm 0,006$	$0,186 \pm 0,01^{***}$ $0,091 \pm 0,006$
III	$0,140 \pm 0,005^{**}$ $0,087 \pm 0,002$	$0,171 \pm 0,008^{***}$ $0,095 \pm 0,002$	$0,173 \pm 0,04^{***}$ $0,095 \pm 0,02$	$0,189 \pm 0,006^{***}$ $0,095 \pm 0,02$	$0,194 \pm 0,006^{***}$ $0,095 \pm 0,02$

Примечания: Числитель – герпес-вирусная инфекция, знаменатель – контроль; здесь и в таблицах 3 и 4:

** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ по сравнению с контролем.

Во время родов титр антител к вирусу герпеса определялся как в крови матери, так и в крови плода. У плодов, погибших после кесарева сечения, титр антител к вирусу герпеса в крови был от 1:6400 до 1:12800.

Поскольку основной задачей данной работы было изучение состояния фетоплацентарного барьера и его роль в метаболизме плацентарных гормонов, особенно дегидроэпандростерона (ДЭАС) особое внимание было уделено состоянию надпочечников плода, так как от их функционирования напрямую зависит синтез ДЭАС. Гормональную активность фетоплацентарного комплекса определяли с использованием стандартных тест-систем для ИФА: эстрадиол, эстриол, 17-ОН-прогестерон – DRG (USA), прогестерон – ЗАО «НВО Иммунотех» (Москва), ДЭАС, кортизол – ЗАО «Алкор-Био» (Санкт-Петербург), α -фетопротеин – ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск). Иммунологические исследования выполнялись у беременных на проточном цитофотометре «Beckman coulter Epics XI-MCL» (USA).

Для морфологического исследования фетоплацентарного барьера забиралась плацента у рожениц, перенесших герпес-вирусную инфекцию как во II триместре – 35 случаев, так и в III триместре – 45 случаев. Подсчет ядер симпласта ворсинок плаценты, находившихся в состоянии апоптоза, проводили на 100 концевых ворсинках в каждом отдельно взятом случае. В подсчет на каждую ворсинку отбиралось по 2000 ядер.

Морфологическая классификация апоптоза на парафиновых срезах проводилась по метке концов фрагментов ДНК (in situ end-labeling method, ISEL) [9, 10, 11] с инкубацией в смеси 4 нуклеотидов dATF, dGTF, dCTF, biotin II dUTP, ДНК полимеразы-I E. coli («Sigma», USA). Метод обладает высокой чувстви-

тельностью даже для клеток, которые только начинают запрограммированную гибель.

Для электронно-микроскопического исследования кусочки плаценты размером 2-3 мм обрабатывали по стандартным методикам с конечной заливкой в арадит. Ультратонкие срезы изготавливали на ультрамикротоме LKB-8800 (Швеция), контрастировали уранилацетатом.

Переокси жирных кислот выявляли по методу Винклера-Шульце; реакция на NO-синтазу 1 (NOS1) проводилась по методу Коржевского Д.Э. [12]. Исследования проводились с рекомендациями Хельсинской декларации Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003г. №266.

Результаты исследования

Вспышка герпес-вирусной инфекции приводит к тяжелым нарушениям иммунного статуса беременной. Резко уменьшается в периферической крови процентное содержание лимфоцитов-супрессоров. Так, если к моменту родов у беременных без осложнений оно достигает $20 \pm 1,1\%$, то при обострении вирусной инфекции снижается до $9,0 \pm 0,8$ (титр антител – 1:6400) и даже до $5,3 \pm 0,2$ (титр антител – 1:12800). В периферической крови беременных резко нарастает содержание циркулирующих иммунных комплексов, которое увеличивается по мере повышения титра антител к возбудителю инфекции (табл. 1).

Вирусы герпеса и циркулирующие иммунные комплексы с кровью матери достигают фетоплацентарного барьера ворсинок плаценты. Электронно-микроскопические исследования позволяют проследить проникновение вируса в цитоплазму фетоплацентарного

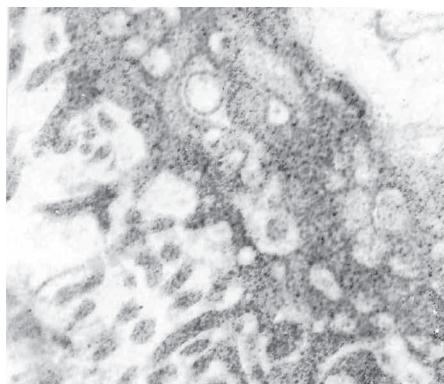
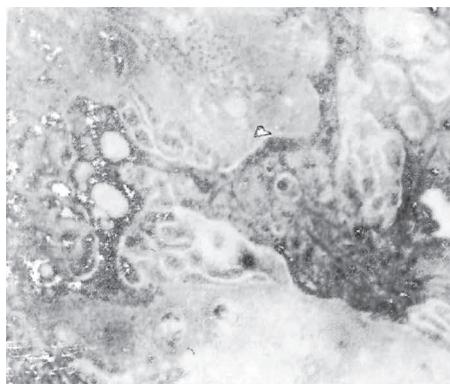


Рис. 1, 2. Фетоплацентарный барьер ворсинки плаценты. Вспышка герпеса (титр антител 1:12800). Проникновение вируса герпеса в симпласт ворсинки. Разрушение митохондрий, вакуолизация цитоплазмы. Электронная микроскопия. Увеличение $\times 40000$.



Рис. 3. Фетоплацентарный барьер ворсинки плаценты. Повышенная реакция на пероксидазу жирных кислот. Реакция по Винклеру-Шульце. Увеличение $\times 900$.

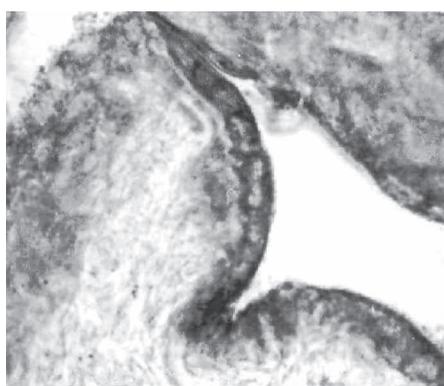


Рис. 4. Ворсинка зрелой плаценты. Беременная перенесла вспышку герпес-вирусной инфекции (титр антител 1:12800). Высокая реакция на NOS1. Увеличение $\times 900$.



Рис. 5. Вспышка герпесной инфекции в III триместре (титр антител 1:12800); ядра симпласта в пределах 3% в состоянии апоптоза.

барьера (рис. 1,2), которое резко изменяет как морфофункциональное состояние самого барьера, так и происходящие в нем метаболические процессы. Частично фетоплацентарный барьер разрушается, а вирус и циркулирующие иммунные комплексы проникают в кровь плода, внедряясь в стенку кровеносных сосудов пуповины, а также поражая жизненно важные органы плода.

Вследствие внедрения вирусов герпеса в симпласт фетоплацентарного барьера развивается цепная реакция ферментативных и метаболических процессов, приводящих к нарушению структуры как цитоплазмы, так и ядерного вещества в симпласте ворсинок плаценты. Прежде всего, мы отмечаем активизацию процессов перекисного окисления липидов фетоплацентарного барьера (рис. 3), это увеличивает риск нарушения целостности структур симпласта.

Одновременно наблюдается резкое усиление ферментативной активности NOS1 (рис. 4). Ультрамикроскопические исследования показали, что на фоне внедрения вируса герпеса в симпласте ворсинок плаценты развиваются деструктивные процессы в митохондриях: происходит набухание и разрушение крист. Это приводит к еще большему риску нарушения нормального метаболизма ядер фетоплацентарного барьера. Прибегая к методу иммуногистохимического анализа (ISEL-метод), мы отмечаем нарастающие деструктивные изменения в ДНКП ядер симпласта. Формируются фигуры, характерные для апоптоза (рис. 5), кото-

Таблица 2

Содержание гормонов в периферической крови беременных женщин ($n = 20$) при герпес-вирусной инфекции в зависимости от титра антител ($M \pm m$)

Титр антител	ДЭАС, мкмоль/л	Эстрадиол, пмоль/л	Эстриол, нмоль/л	Прогестерон, нмоль/л
До обострения	12,35 ± 0,98	34958,5 ± 185	53,96 ± 1,3	259,52 ± 3,5
Во время вспышки герпес-вирусной инфекции:				
1:400	15,12 ± 0,83	24738,4 ± 205	45,46 ± 0,9	189,76 ± 2,1
1:800	12,15 ± 0,90	24896,6 ± 201	52,05 ± 1,1	166,08 ± 2,1
1:1600	11,34 ± 0,91	25813,2 ± 130	42,68 ± 1,3	151,04 ± 1,6
1:3200	10,81 ± 0,85	21663,8 ± 98	37,13 ± 0,8	151,36 ± 2,5
1:6400	9,72 ± 0,69	21916,6 ± 125	36,78 ± 0,5	151,36 ± 3,1
1:12800	8,91 ± 0,42	12073,5 ± 109	35,05 ± 0,6	133,12 ± 2,7
Ремиссия, через 2–3 месяца	10,72 ± 0,73	26906,2 ± 115	54,27 ± 0,5	202,24 ± 2,9

Таблица 3

Содержание гормонов в гомогенате ворсинчатого хориона, полученного от беременных с герпес-вирусной инфекцией на 6–7 неделе гестации ($M \pm m$)

Показатели	Герпес-вирусная инфекция ($n = 15$)	Контроль ($n = 15$)
ДЭАС, мкмоль/л	1,053 ± 0,09**	2,64 ± 0,31
17-ОН-прогестерон, нмоль/л	8,45 ± 0,96***	19,54 ± 0,98
Эстрадиол, пмоль/л	11145 ± 231,01***	21811,0 ± 129,54
Эстриол, нмоль/л	3,57 ± 0,91***	31,42 ± 0,95
Прогестерон, нмоль/л	23,4 ± 5,7***	152,2 ± 38,9
Кортизол, нмоль/л	1199,8 ± 31,44***	128,7 ± 24,51
α-фетопротеин, МЕ/мл	14,17 ± 1,03**	32,69 ± 0,90

рые по мере нарастания агрессивности герпес-вирусной инфекции (титр антител – 1:12800) могут охватить до 3–4% ядер фетоплацентарного барьера (контроль – 0–2%).

Как известно, плацента во время гестации становится органом, активно принимающим участие в синтезе из холестерина стероидных гормонов: прогестерона, андростерона, тестостерона, эстрадиола, эстриола и, совместно с надпочечниками и печенью плода, – дегидроэпиандростеронсульфата.

Присутствие в организме беременной высокой концентрации вируса герпеса приводит к нарушению синтеза крайне необходимых для периода гестации гормонов. Это отражается, прежде всего, на их содержании в периферической крови (табл. 2). Одновременно проводилось изучение содержания стероидных гормонов и в гомогенате плаценты, что позволило установить нарушение процессов стероидогенеза в системе «мать-плацента-плод».

Отмечалось снижение содержания в гомогенате плаценты не только ДЭАС, но также эстрадиола, эстриола и прогестерона практи-

чески в 2 раза по сравнению с контролем. Уменьшение содержания промежуточных продуктов стероидогенеза (эстрадиола и 17-ОН-прогестерона) (табл. 3) привело к значительному снижению (в 5–8 раз) содержания конечных продуктов стероидогенеза-эстриола и прогестерона. Общая гормональная недостаточность на фоне формирующейся морфофункциональной перестройки хориальных тканей при герпесе повлияла и на синтез фетальных гормонов, в частности – α-фетопротеина, уровень которого также понижался и составил 14,17 ± 1,03 МЕ/мл (в контроле – 32,69 ± 0,90 МЕ/мл) (табл. 3).

Характер синтеза гормонов, в особенности ДЭАС и 17-ОН-прогестерона, в различных зонах плаценты имеет существенные отличия (табл. 4), что, вероятно, связано с неравномерным кровоснабжением плаценты.

Характер изменений нейрогормональных проявлений фетоплацентарного барьера, по-нашему мнению, свидетельствовал о сниженной адаптивной реакции системы «мать-плацента-плод» на стресс, в данном случае на

Таблица 4

Содержание гормонов в гомогенате зрелой плаценты из различных её зон при герпесной инфекции ($M \pm m$)

Показатели	Герпес-вирусная инфекция		Контроль	
	ЗОНЫ ПЛАЦЕНТЫ			
	периферическая (n = 20)	центральная (n = 20)	периферическая (n = 20)	центральная (n = 20)
ДЭАС, мкмоль/л	0,27 ± 0,03**	0,57 ± 0,07**	0,62 ± 0,04	1,27 ± 0,03
17-ОН-прогестерон, нмоль/л	39,72 ± 1,92**	55,23 ± 1,3***	71,72 ± 1,34	122,71 ± 2,31
Эстрадиол, пмоль/л	18201,2 ± 124,5*	21346,2 ± 110,3*	29138,7 ± 102,7	32325,9 ± 125,8
Эстриол, нмоль/л	169,47 ± 7,57	177,94 ± 6,11*	198,64 ± 7,89	251,09 ± 9,02
Прогестерон, нмоль/л	145,34 ± 10,3*	182,87 ± 7,18*	176,65 ± 5,66	240,55 ± 9,05
Кортизол, нмоль/л	639,15 ± 5,03*	897,49 ± 6,05*	408,13 ± 7,21	724,35 ± 7,08
α-фетопротеин, МЕ/мл	64,2 ± 2,19*	73,4 ± 2,58*	78,5 ± 3,12	84,6 ± 2,51

Примечания: * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

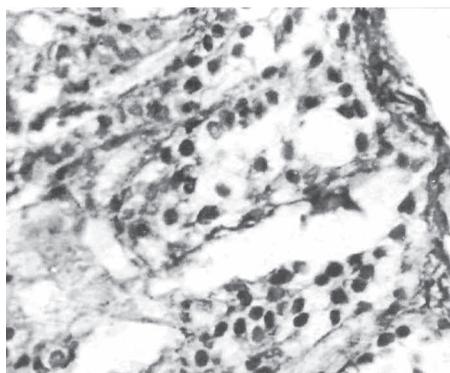


Рис. 6. Надпочечник плода после перенесенной герпесной инфекции у беременной. Увеличение $\times 400$.

присутствие в организме беременной герпес-вирусной инфекции. Естественно, что в такой ситуации появлялись существенные изменения в эндокринных процессах фетоплацентарного комплекса. Тяжелые морфофункциональные нарушения при герпес-вирусной инфекции в фетоплацентарного барьера не могли не сказаться на состоянии целого ряда органов развивающегося плода.

Надпочечники плода характеризовались при тяжелой форме герпес-вирусной инфекции недоразвитием коркового вещества (рис. 6), появлением множества расширенных капилляров, заполненных лимфоцитоподобными клетками. Формировались многочисленные узелковые структуры из эпителиальных клеток, окруженных соединительной тканью (рис. 6), клубочки были разрушены. В пучковой зоне клетки увеличивались в диаметре, цитоплазма их становилась просветленной, сильно вакуолизированной. Все это указывало на выра-

женные дегенеративные изменения в корковом веществе надпочечника при обострении герпес-вирусной инфекции. Этим во многом объясняется нарушение синтеза ДЭАС, поскольку этот процесс протекает с участием надпочечников плода. Циркулирующие иммунные комплексы, проникая через фетоплацентарный барьер, вызывают изменения в стенке сосудов пуповины (титр антител к возбудителю – 1:6400; 1:128000).

Отмечается активная реакция в отдельных участках сосудов эндотелиальных клеток на NOS1, перекиси жирных кислот и щелочную фосфатазу, свидетельствующая о нарушении морфофункционального состояния эндотелия сосудов пуповины.

Выводы

1. Обострение герпес-вирусной инфекции во время беременности приводит к тяжелым нарушениям иммунной системы и повреждению фетоплацентарного барьера ворсинок плаценты.

2. При вспышке герпес-вирусной инфекции в крови у беременных женщин увеличивается содержание циркулирующих иммунных комплексов.

3. Часто отмечается внедрение вируса герпеса в цитоплазму симпласта фетоплацентарного барьера, что приводит к увеличению числа ядер в симпласте ворсинок в состоянии апоптоза.

4. При проникновении вируса герпеса в цитоплазму фетоплацентарного барьера нарушается синтез плацентарных гормонов: эстрадиола, эстриола, прогестерона, ДЭАС.

5. У плодов, погибших при обострении герпес-вирусной инфекции, наблюдаются морфофункциональные изменения в надпочечниках и стенках сосудов пуповины.

Литература

1. Баринский, И.Ф. Герпес-вирусные инфекции – иммунодефицитные заболевания XXI века // Аллергология и иммунология. 2004. 5 (1). 202–203.
2. Barinski I.F. Herpes-viral infections – immunodeficit diseases of XXI century // Allergologiya i immunologiya. 2004. 5 (1). 2002–2003.
3. Исаков В.А., Борисова В.В., Исаков Д.В. Герпес: патогенез и лабораторная диагностика. СПб.: Лань, 1999. 190.
4. Isakov V.A., Borisova V.V., Isakov D.V. Herpes: pathogenesis and laboratory diagnostics. SPb.: Lan', 1999. 190.
5. Луценко М.Т., Соловьева А.С., Андриевская И.А. Механизмы изменений иммунной системы у беременных с герпес-вирусной инфекцией. Благовещенск: АМГУ, 2007. 170 с.
6. Lutsenko M.T., Solov'eva A.S., Andrievskaya I.A. Mechanisms of immune system changes in pregnant with herpes-viral infection // Blagoveschensk: ASMU, 2007. 170.
7. Макаров О.В., Бахарева И.В., Таранец А.Н. Современные представления о внутриутробной инфекции // Акушерство и гинекология. 2004. (1). 10–12.
8. Makarov O.V., Bakhareva I.V., Taranets A.N. Modern conceptions on prenatal infection // Akusherstvo i ginekologiya. 2004. (1). 10–12.
9. Соловьева А.С. Показатели клеточного и гуморального иммунитета у беременных, перенесших герпес-вирусную инфекцию // Бюлл. физиологии и патологии дыхания. 2005. (20). 7–11.
10. Solov'eva A.S. Characteristics of cellular and humoral immunity in pregnant had herpes-viral infection // Byul. Fiziologii i patologii dykhaniya. 2005. (20). 7–11.
11. Соловьева А.С. Морфофункциональная характеристика лимфоэпителиальной ткани верхних дыхательных путей у беременных с герпес-вирусной инфекции // Бюлл. физиологии и патологии дыхания. 2006. (22). 37–41.
12. Solov'eva A.S. Morphofunctional characteristic of lymphoepithelial tissue of upper airways in pregnant with herpes-viral infection // Byul. Fiziologii i patologii dykhaniya. 2006. (22). 37–41.
13. Соловьева А.С., Луценко М.Т. Характеристика местного иммунитета на поверхности небных миндалин у беременных с герпес-вирусной инфекцией // Дальневосточный мед. журн. 2007. (3). 22–24.
14. Solov'eva A.S., Lutsenko M.T. Characteristic of local immunity on the surface of palatine glands in pregnant with herpes-viral infection // Dal'nevostochnyi med. zhurn. 2007. (3). 22–24.
15. Карбоне Ф.Р., Спек П.Г. Hide and seek: the immunology of HSV persistence // Immunity. 2003. 18. 583–584.
16. Погорелов В.М., Козинец Г.И. Морфология апоптоза при нормальном и злокачественном гемопоэзе // Гематология и трансфузиология. 1995. 43 (5). 21–24.
17. Pogorelov V.M., Kozinets G.I. Morphology of apoptosis under normal and malignant hemopoiesis // Gematologiya i transfuziologiya. 1995. 43 (5). 21–24.
18. Малори У., Фэйс С., Фиорентини С. Morphological aspects of apoptosis // Lab. Virology. 1–23.
19. Pollack M., Phaneut S., Dirks A. The role of apoptosis in the normal aging brain, skeletal muscle and heart // Ann. N. Y. Acad. Sci. 2002. 959. 93–107.
20. Коржевский Д.Э. Определение активности НАДФ-диафоразы в головном мозге крыс после фиксации разной длительности // Морфологии. 1996. 109 (3). 76–77.
21. Korzhevskii D.E. Determination of activity of NADP-diaphorase in rats' brain after fixation of different activity // Morfologiya. 1996. 109 (3). 76–77.

THE STATE OF FETOPLACENTAL BARRIER AT HERPES VIRAL INFECTION IN PREGNANT WOMEN

Mikhail Timofeevich LUTSENKO, Irina Anatolievna ANDRIEVSKAYA

SI Far Eastern Research Center for physiology and respiratory pathology of SB RAMS
22, Kalinin str., 675000, Blagoveshtchensk

The pregnant women that suffered herpes simplex at different periods of gestation were studied. Alongside with the growth of antibody titers to the virus, the content of circulating immune complexes rose and virus penetrating into the symplast of placenta villi was found out. The antibodies to herpes virus were studied in the fetus umbilical blood, which brought about the injury of its organs. In the placenta villi symplast, the number of nuclei in the state of apoptosis rose: synthesis of hormones (estradiol, estriol, progesterone, DEAS) fell, which led to fetoplacental insufficiency.

Andrievskaya I.A. – senior scientist, Candidate of Biological Sciences, e-mail: tatiana1383@list.ru
Lutsenko M.T. – academician of RAMS, counselor of directorate