

СОДЕРЖАНИЕ СТАБИЛЬНЫХ МЕТАБОЛИТОВ NO В ПЛАЦЕНТЕ БЕРЕМЕННЫХ, ПЕРЕНЕСШИХ В ТРЕТЬЕМ ТРИМЕСТРЕ ОБОСТРЕНИЕ ГЕРПЕС-ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ**Михаил Тимофеевич ЛУЦЕНКО, Ирина Анатольевна АНДРИЕВСКАЯ, Наталья Александровна ИШУТИНА***Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания СО РАМН
675000, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22*

Исследовались беременные, перенесшие в третьем триместре герпес простого типа. По мере нарастания титра антител к возбудителю в гомогенате плаценты повышалось содержание NO_2^- и NO_3^- и увеличивалась активность NO-синтазы, что, вероятно, приводило к повышению уровня NO. В симпласте ворсинок плаценты увеличивалось содержание ионов кальция и перекисей жирных кислот, а также возрастал процент ядер синцитиотрофобласта в состоянии апоптоза, что приводило к фетоплацентарной недостаточности.

Ключевые слова: фетоплацентарный барьер, беременность, синцитиотрофобласт, нитросоединения, герпес-вирусная инфекция.

Большой интерес к оксиду азота (NO) обусловлен прежде всего тем, что она является экстенсивным эндогенным продуктом в большинстве тканей и вовлекается в регуляцию множества функций: сосудистый тонус, сердечная сократимость, агрегация тромбоцитов, нейротрансмиссия, клеточное повреждение [1, 2]. Если синтез NO активируется при повышении концентрации внутриклеточного Ca^{++} , то цГМФ, действуя по механизму отрицательной связи, ограничивает поступление ионов кальция в клетку, усиливает отток кальция из клетки во внеклеточную среду, эндоплазматический ретикулум, митохондрии и осуществляет регуляцию активности фосфоинозитидного цикла [3, 4]. Эффективность взаимодействия NO с гуанилатциклазой может нарушиться при появлении гемдефицитной формы фермента, изменении его окислительно-восстановительного состояния [5], изменении и развитии десенсинтизации гуанилатциклазы при избыточной выработке NO в результате экспрессии индуцибельной NO-синтазы (NOS) [6].

Вирусные и бактериальные эндотоксины усиливают синтез NOS и соответственно секрецию NO. Выделяемый NO быстро проникает в клетки, где может ингибировать жизненно важные группы ферментов: H-электроннотранспортирующие, цикла Кребса и синтеза ДНК. В этих условиях энергопродукция и деление клеток становится невозможными, что ведет к их преждевременной гибели. Таким образом, NO вызывает цитотоксический эффект: при эндотоксическом шоке, инфекционных повреждениях. Не менее важным на сегодня оказался вопрос, почему простые молекулы NO_2^- и NO_3^- обладают

широким спектром токсического действия. Было установлено, что NO_2^- может превращаться в NO. Свободнорадикальные продукты NO и NO_2^- обладают способностью повреждать белки и ненасыщенные жирные кислоты, уменьшать активность большинства ферментных систем, нарушать целостность клеточных и субклеточных структур, разобщать окислительное фосфорилирование, ингибировать транспорт электронов по дыхательной цепи митохондрий, снижать уровень АТФ в крови и тканях. Эти вещества обладают мутагенной и тератогенной активностью [1, 7, 8].

Мы поставили задачу исследовать содержание NO_2^- и NO_3^- в гомогенате плаценты рожениц, поскольку они рассматриваются как источник образования NO и по всей вероятности этот процесс усиливается под влиянием герпес-вирусной инфекции. Подобных исследований в литературе не отмечено. Повышенное образование NO становится фактором повреждения синцитиотрофобласта, в том числе индуктором вступления ядер преждевременно в состояние апоптоза.

Материалы и методы

Исследовались плаценты после родов у 20 беременных, перенесших в третьем триместре вспышку герпес-вирусной инфекции и 20 беременных, не болевших в течение всего периода гестации (контроль). Исследования проводились на базе стационара гинекологического отделения клиники Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания СО РАМН в соответствии с рекомендациями Хельсинкской декларации Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г.

*Луценко М.Т. — академик РАМН, советник при дирекции**Андреевская И.А. — канд.б.н., e-mail: tatiana1383@list.ru**Ишутина Н.А. — канд.б.н., н.с. лаб. механизмов патогенеза неспецифических заболеваний органов дыхания*

и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266.

Для оценки содержания NO_2^- и NO_3^- готовили гомогенат из плацент, взятых через 10–15 мин после родов. В размороженном супернатанте определяли с помощью «Nitric Oxide Assy Kit» (США) содержание NO_2^- и NO_3^- . Титр антител к вирусу герпеса (1:1600, 1:6400 и 1:12800), а также NO_2^- и NO_3^- определяли на ридере «Stat-Fax-2100» (США); концентрацию ионизированного кальция в супернатанте определяли с использованием реагентов «Bayer» ЗАО «Интермедика» (Москва) на автоматическом анализаторе «Chiron» (США).

Оценка активности NO-синтазы выполнялась на свежемороженых срезах гистохимическим методом по Коржевскому [9]. Количественный подсчет активности NO-синтазы выполнялся методом компьютерной цитофотометрии. Ядра синцитиотрофобласта, находившиеся в состоянии апоптоза, выявлялись на парафиновых срезах плаценты по метке повреждающихся концов фрагментов ДНК *in situ* end-labeling (ISEL-метод) [10]. Гистохимическая оценка содержания в плаценте перекисей жирных кислот выполнялась на парафиновых срезах с помощью реакции по Винклеру-Шульце [11].

Статистическую обработку результатов исследования проводили, вычисляя среднее арифметическое значение (M), ошибку среднего арифметического значения (m) и представляли

в виде $M \pm m$. Различия между группами оценивали с помощью критерия Стьюдента, достоверными считались результаты при $p < 0,05$.

Результаты исследования

Полученные нами данные о содержании NO_2^- и NO_3^- в гомогенате плаценты здоровых беременных и перенесших герпес-вирусную инфекцию в третьем триместре гестации показали, что по мере нарастания агрессивности герпесной инфекции в гомогенате плаценты резко возрастает концентрация NO_2^- ; несколько меньше в гомогенате плаценты было содержание NO_3^- (табл. 1).

Поскольку последними исследованиями [1, 6, 12, 13] доказано, что NO_2^- в организме становится базой для формирования NO, а усиление этого процесса происходит при активизации NO-синтазы [1], следует полагать, что при высокой агрессивности герпес-вирусной инфекции, когда в гомогенате плаценты нарастали содержание NO_2^- (табл. 1) и интенсивность реакции на NO-синтазу (табл. 2), следует ожидать повышение содержания NO и его повреждающего действия на синцитиотрофобласт. При титре антител к вирусу герпеса 1:12800 активность NO-синтазы в синцитиотрофобласте поднималась до $225,0 \pm 1,3$ усл.ед. (контроль — $65,3 \pm 0,81$ усл.ед.; $p < 0,001$) (рис. 1, 2).

Параллельно с определением содержания NO_2^- и NO_3^- в гомогенате плаценты определялось и содержание Ca^{2+} . Было обнаружено, что концентрация общего кальция существенно увеличивалась в гомогенате плацент, взятых от рожениц, перенесших

Таблица 1

Содержание NO и NO_2^- (мкмоль/л) в гомогенате плаценты от рожениц, перенесших герпес-вирусную инфекцию в третьем триместре беременности различной степени агрессивности

Титр антител к вирусу герпеса	Содержание NO_2^-	Содержание NO_3^-
1:1600	$38,8 \pm 1,1^*$	$25,5 \pm 0,9^*$
1:6400	$92,1 \pm 1,2^{**}$	$62,2 \pm 1,3^{**}$
1:12800	$105,7 \pm 1,5^{***}$	$89,8 \pm 0,8^{***}$
Контроль	$25,6 \pm 0,4$	$20,31 \pm 0,9$

Примечание: здесь и в таблице 2 отличие от контроля достоверно при $p < 0,05$ (*), $< 0,01$ (**), $< 0,001$ (***).

Таблица 2

Активность NO-синтазы в синцитиотрофобласте плаценты при различной степени агрессивности герпес-вирусной инфекции

Титр антител к вирусу герпеса	Активность NO-синтазы по данным компьютерной цитофотометрии (усл. ед.)
1:1600	$120,9 \pm 3,1^{***}$
1:6400	$180,5 \pm 2,9^{***}$
1:12800	$225,0 \pm 1,3^{***}$
Контроль	$65,3 \pm 0,81$



Рис. 1. Синцитиотрофобласт ворсинок плаценты рожениц, перенесших в третьем триместре герпес-вирусную инфекцию (титр антител к вирусу герпеса 1:128000). Интенсивная реакция на NO-синтазу. Реакция по Коржескому. Увел. 40×15 .

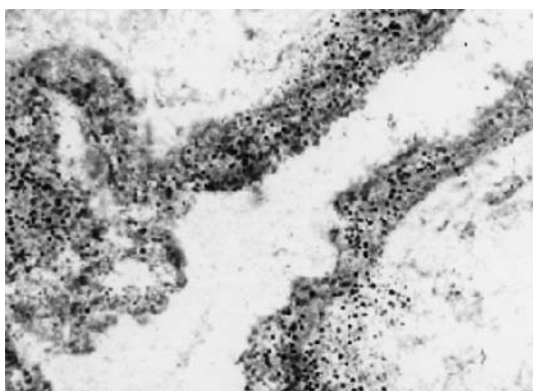


Рис. 2. Контроль. Увел. 40×15 .

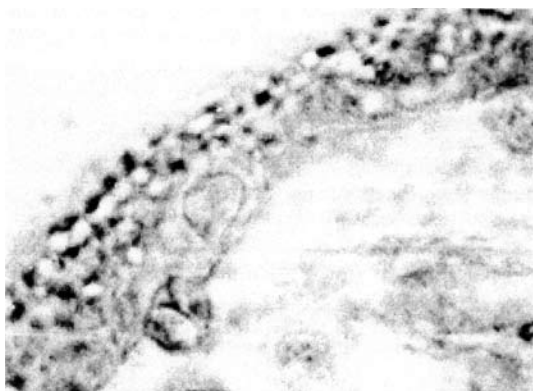


Рис. 3. Синцитиотрофобласт ворсинок плаценты рожениц, перенесших в третьем триместре герпес-вирусную инфекцию (титр антител к вирусу герпеса 1:128000). Интенсивная реакция по Коссу на кальций. Увел. 40×15 .

герпес-вирусную инфекцию в третьем триместре с титром антител 1:12800: до $3,41 \pm 0,09$ мкмоль/л (контроль — $2,61 \pm 0,07$ мкмоль/л, $p < 0,01$). Это подтвердили и гистохимические исследования, показавшие, что у данных пациенток содер-

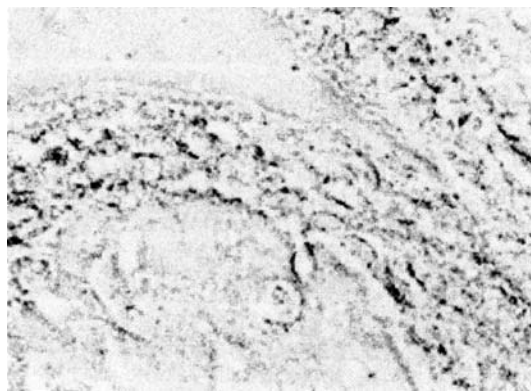


Рис. 4. Контроль. Увел. 40×15 .

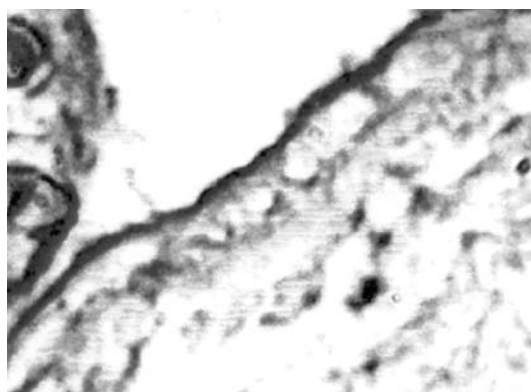


Рис. 5. Синцитиотрофобласт ворсинок плаценты рожениц, перенесших в третьем триместре герпес-вирусную инфекцию (титр антител к вирусу герпеса 1: 128000). Интенсивная реакция на выявление перекисей жирных кислот по Винклеру—Шульце. Увел. 40×15 .

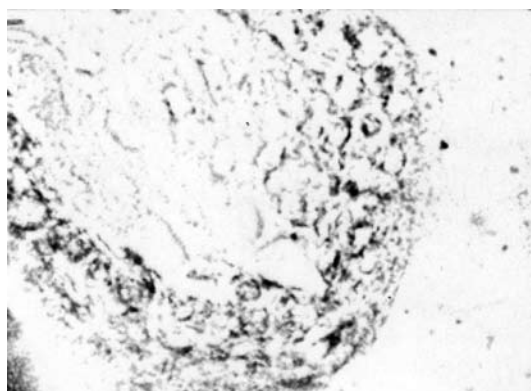


Рис. 6. Контроль. Увел. 40×15 .

жание кальция, выраженное в усл. ед., составляет до $185,5 \pm 0,95$ (контроль — $49,8 \pm 0,6$ усл. ед., $p < 0,001$) (**рис. 3, 4**). Выполненная гистохимическая реакция, отражающая содержание в синцитиотрофобласте перекисей жирных кислот (**рис. 5, 6**), показала, что при обострении герпеса у беременных в третьем триместре (титр антител 1:12800) оно в несколько раз ($170,4 \pm 8,2$ усл. ед.)



Рис. 7. Синцитиотрофобласт ворсинок плаценты рожениц, перенесших в третьем триместре герпес-вирусную инфекцию (титр антител к вирусу герпеса 1:12800). Реакция на апоптоз в ядрах синцитиотрофобласта по ISEL-методу. Увел. 40 × 15.

превосходить таковую в контроле ($34,9 \pm 6,5$, $p < 0,001$). Это свидетельствует, что повышенное содержание NO и перекисей жирных кислот, а также ионизированного кальция в синцитиотрофобласте приводит к глубоким деструктивным изменениям на уровне фетоплацентарного барьера. Исследование синцитиотрофобласта плаценты рожениц, перенесших герпес-вирусную инфекцию высокой агрессивности в третьем триместре, показало, что количество ядер синцитиотрофобласта, вступающих на путь апоптоза, увеличивается до $4,5 \pm 0,1\%$ (контроль — $1,000 \pm 0,002\%$, $p < 0,001$) (рис. 7).

Заключение

Затронутые вопросы имеют очень важное значение в оценке регуляции метаболических процессов в организме, особенно в тканях беременной женщины (фетоплацентарный барьер), от чего зависит его целостность и уязвимость при поражении вирусом герпеса, приводящая к проникновению возбудителя в кровь плода.

Высокое содержание NO₂ в гомогенате плаценты, возникающего, как мы полагаем, под влиянием затронутых патологическим процессом митохондрий синцитиотрофобласта [6] с участием цитохромоксидазы [6, 7] и ферментов цепи переноса электронов, а также NOS, способствует дополнительной генерации NO, что позволяет развиваться токсическому воздействию на ферменты цикла Кребса, активность АТФ-азы, а также способствуя выработке эндонуклеаз, в том числе каспазы-3, стимулирующей начало изменений в молекулах ДНК, приводя к начальным этапам апоптоза. Эти процессы мы постарались отразить в данной работе.

При высокой агрессивности герпес-вирусной инфекции, при достаточно высоком содержании плаценты беременной NO₂ и стимуляции активности NO-синтазы, усиливается синтез NO, под влиянием которого нарушается в синцитиотрофобласте обмен кальция, накапливаются перекиси жирных кислот и активизируется вступление ядер фетоплацентарного барьера в апоптоз. Включение в работу этих метаболических процессов приводит к повреждению синцитиотрофобласта, что делает его, по-видимому, уязвимым для проникновения возбудителя инфекции в кровь плода.

Выводы

1. У беременных, перенесших в третьем триместре вспышку герпес-вирусной инфекции, наблюдается повышенное содержание в гомогенате плаценты NO₂ и NO₃.
2. Гистохимическими методами в плацете рожениц отмечена повышенная интенсивность реакции на NO-синтазу.
3. Увеличение реакции на NO-синтазу при одновременном высоком содержании в плаценте NO₂ позволяет предполагать о повышенном образовании NO, который становится повреждающим фактором синцитиотрофобласта ворсинок плаценты.
4. В синцитиотрофобласте наблюдается гистохимически повышенная реакция на ионы кальция и перекиси жирных кислот. Увеличивается количество ядер в состоянии апоптоза.

Литература

1. Реутов В.П., Охотин В.Е., Шуклин А.В. и др. Оксид азота (NO) и цикл NO в миокарде: молекулярные, биохимические и физиологические аспекты // Успехи физиол. наук. 2007. 38. (4). 39–58.
Reutov V.P., Okhotin V.E., Shuklin A.V. etc. Nitric oxide (NO) and NO cycle in myocardium: molecular, biochemical and physiological aspects // Uspekhi fisiol. nauk. 2007. 38. (4). 39–58.
2. Северина И.С. Растворимая форма гуанилатциклазы в молекулярном механизме физиологических эффектов окиси азота и в регуляции процесса агрегации тромбоцитов // Бюлл. эксперим. биологии и медицины. 1995. (3). 230–235.
Severina I.S. Guanylate cyclase soluble form in nitric oxide molecular mechanism of physiological effects and in regulation of platelets aggregation process // Byull. eksperim. biologii i meditsyny. 1995. (3). 230–235.
3. 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). 124–135.
Reutov V.P., Orlov S.N. Physiological significance of guanylate cyclase and role of nitric oxide and nitrocompounds in regulation of the ferment activity // Fisiologiya cheloveka. 1993. 19. (1). 124–135.

4. Ажипа Я.И., Реутов В.П., Каюшин Л.П. Экологические и медико-биологические аспекты проблемы загрязнения окружающей среде нитратами и нитритами // Физиология человека. 1990. 16. (3). 131–135.
Azhipa Ya.I., Reutov V.P., Kayushin L.P. Ecological and medical biological aspects of the problem of environmental pollution with nitrates and nitrites // *Fisiologiya cheloveka*. 1990. 16. (3). 131–135.
5. Волкова Н.В. Влияние нитритов и нитратов натрия на синтез ДНК, митотическую активность и ядерно-цитоплазматические отношения клеток печени крыс и их потомства // Гигиеническое нормирование факторов экологической среды человека. Л.: Тр. Ленингр. санит.-гигиен. ин-та. 1980. 130. 38.
Volkova N.V. Influence of sodium nitrates and nitrites on DNA synthesis, mitotic activity and nuclear cytoplasmic ratio of liver cells of rats and their geniture // *Hygienic regulation of human environmental factors*. L.: Tr. Leningr. Sanit.-gigien. In-ta. 1980. 130. 38.
6. Коржевский Д.Э. Определение активности НАДФ-диафоразы в головном мозге крыс после фиксации разной длительности // Морфология. 1996. 109. (3). 76–77.
Korzhevski D.E. Determination of NADPH-diaphorase activity in rats cerebrum after different activities fixation // *Morfologiya*. 1996. 109. (3). 76–77.
7. Погорелов В.М., Козинец Г.И. Морфология апоптоза при нормальном и злокачественном гемопоэзе // Гематология и трансфузиология. 1995. 43. (5). 21–24.
Pogorelov V.M., Kozinets G.I. Morphology of apoptosis under normal and malignant haemopoiesis // *Gematologiya i transfusiologiya*. 1995. 43. (5). 21–24.
8. Лили Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия // М.: Мир, 1969. 643 с.
Lili R. Pathohistologic technique and practical histochemistry // М.: Mir, 1969. 643 p.
9. Реутов В.П. Изучение механизмов восстановления ионов NO в крови и митохондриях клеток тканей млекопитающих: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. М., 1988.
Reutov V.P. Investigation of mechanisms of NO ions reduction in blood and mitochondrions of mammals tissues cells: Abstract of thesis of Candidate of Biological Sciences. М. 1988.
10. Реутов В.П., Каюшин Л.П., Сорокина Е.Г. Физиологическая роль цикла окиси азота в организме человека и животных // Физиология человека. 1994. 20. (3). 165–174.
Reutov V.P., Kayushin L.P., Sorokina E.G. Physiologic role of nitric oxide cycle in human and animal organisms // *Fisiologiya cheloveka*. 1994. 20. (3). 165–174.

THE MAINTENANCE OF STABLE NO METABOLITES IN THE PLACENTA PREGNANT, ENDURED IN THE THIRD TRIMESTER THE EXACERBATION OF THE HERPES VIRUS INFECTION CONTAMINATION

Mikhail Timofeevich LUTSENKO, Irina Anatolievna ANDRIEVSKAYA, Natalia Aleksandrovna ICHUTINA

Far Eastern Research Center for Physiology and Respiratory Pathology of SB RAMS
22, Kalinin str., Blagoveshtchensk, 675000

Were investigated pregnant, endured in the third trimester herpes of a primary type. On a measure of increase of an antiserum capacity to the originator in a homogenate of a placenta maintenance NO_2^- and NO_3^- increased, and activity of NO synthase enlarged, that probably resulted in NO level rising. In placenta villi symplast content of calcium ions and fatty acid peroxides enlarged, and also percent of syntrophoblast in state of apoptosis increased, leading to fetoplacental failure.

Keywords: fetoplacental barrier, pregnancy, syncytiotrophoblast, nitrocompounds, herpes viral infection.

Lutsenko M.T. — academician of RAMS, counselor of directorate

Andrievskaya I.A. — senior scientist, Candidate of Biological Sciences, e-mail: tatiana1383@list.ru

Ishutina N.A. — Candidate of Biological Sciences, scientific researcher of the laboratory of mechanisms of respiratory apparatus nonspecific diseases pathogenesis