

© М.Т. Луценко, И.А. Андриевская, 2009
УДК 611.013.85:616.98

М.Т. Луценко и И.А. Андриевская

СТЕПЕНЬ ВЫРАЖЕННОСТИ АПОПТОЗА В ЯДРАХ СИНЦИТИОТРОФОБЛАСТА ВОРСИН ПЛАЦЕНТЫ ПРИ ГЕРПЕСВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Лаборатория «Механизмы этиопатогенеза и восстановительных процессов органов дыхания при неспецифических заболеваниях легких» (зав. — академик РАМН проф. М.Т. Луценко) Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания СО РАМН, г. Благовещенск

При использовании световой, электронной микроскопии и иммуноцитохимии (ISEL-метод) изучали ядра синцитиотрофобласта ворсин плаценты родильниц, перенесших во второй половине беременности вспышку герпесвирусной инфекции (титр антител 1:6400 — 1:12 800). Проведенные исследования показали, что внедрение вируса герпеса в фетоплацентарный барьер изменяет метаболизм ядер синцитиотрофобласта, приводя к появлению признаков апоптоза. Количество ядер с признаками апоптоза увеличивается по мере нарастания агрессивности герпесвирусной инфекции.

Ключевые слова: плацента, синцитиотрофобласт, ядро, апоптоз, герпесвирусная инфекция.

Фетоплацентарный барьер — сложный комплекс, обеспечивающий функциональную связь матери и развивающегося плода на протяжении всей беременности. Через него осуществляется передача не только жизненнонеобходимых для развивающегося плода веществ, но и детоксикация вредных метаболитов. Ткани фетоплацентарного барьера часто подвергаются воздействию различных вирусно-бактериальных инфекций. Токсины могут вырабатываться непосредственно в толще симпласта ворсинок плаценты. Так, при обострении герпесвирусной инфекции во время беременности при высоком уровне агрессивности вируса (титр антител 1:6400 — 1:12 800) обнаруживается проникновение возбудителя в синцитиотрофобласт ворсин плаценты. В периферической крови в это время нарастает уровень α -ФНО (фактор некроза опухолей). Не вызывает сомнения, что в такой ситуации вирус герпеса и продукты его обмена оказывают воздействие на синцитиотрофобласт, запуская программу его гибели [1–3].

Целью нашего исследования явилось изучение степени выраженности апоптоза ядер синцитиотрофобласта ворсин плаценты женщин, перенесших вспышку герпесвирусной инфекции в III триместре беременности.

Материал и методы. Исследовали плаценту после родов у 40 женщин, перенесших вспышку герпесвирусной инфекции в III триместре беременности. Титр антител к вирусу простого герпеса второго типа у 20 из них равнялся 1:6400, у 20 других — 1:12 800. Контролем служила плацента 20 женщин, которые за период беременности не переносили никаких заболеваний. Все женщины от начала беременности до поступления в родильное отделение находились под контролем (ежемесячное плановое углубленное обследование) в клинике физиологии и патологии беременных

Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания Сибирского отделения РАМН (г. Благовещенск). Беременность завершилась у всех обследованных в нормальные сроки. Возраст женщин колебался от 20 до 25 лет.

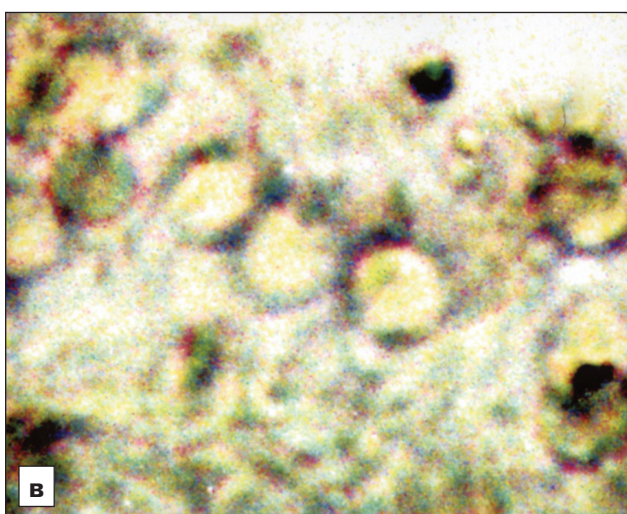
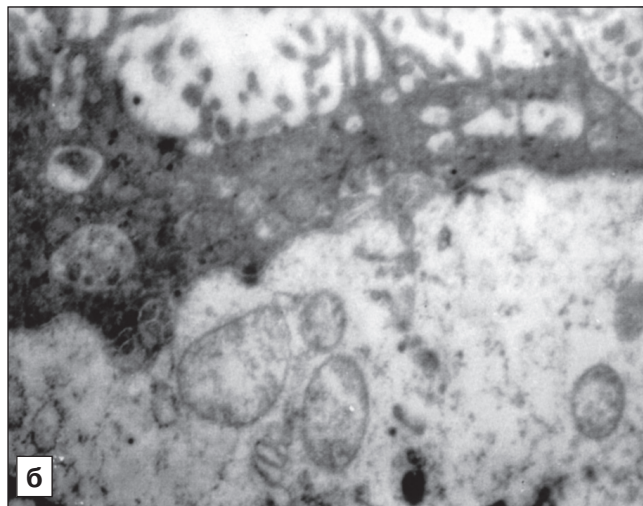
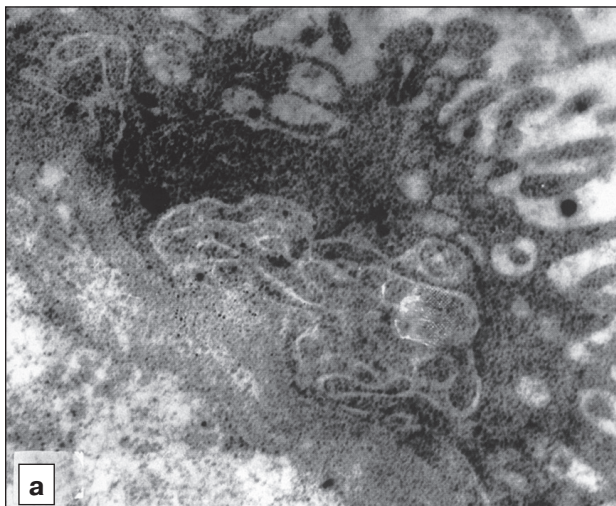
Материал изучали параллельно, как под электронным микроскопом, так и на парафиновых срезах, на предмет наличия в ядрах синцитиотрофобласта ворсин плаценты признаков апоптоза.

Для электронно-микроскопического исследования кусочки плаценты размером 2–3 мм обрабатывали по стандартным методикам с конечной заливкой в аралдит. Ультратонкие срезы изготовляли на ультрамикротоме LKB-8800 (Швеция), контрастировали уранилацетатом. Для просмотра и фотографирования использовали микроскоп Tesla (Чехословакия).

Морфологическое выявление апоптоза в парафиновых срезах проводили ISEL-методом (in situ end-labeling method), основанном на мечении концов фрагментов ДНК [5, 7]. Подробнее методика постановки реакции описана ранее [4]. Метод обладает высокой чувствительностью даже для клеток, которые только начинают запрограммированную гибель. С помощью этого метода можно увидеть конденсацию хроматина в плотный прилегающий к ядерной оболочке полукруг, изучение которого раньше было возможным лишь с использованием электронной микроскопии.

Титр антител к вирусу простого герпеса определяли методом иммуноферментного анализа с использованием стандартных тест-систем (Вектор-Бест, Россия) на спектрофотометре Stat-Fax-2100 (США). α -ФНО выявляли с помощью тест-систем для иммуноферментного анализа (Цитокин, Россия). Определение доли ядер синцитиотрофобласта, находившихся в состоянии апоптоза, проводили в 100 терминальных ворсинах плаценты в каждом отдельно взятом случае, при этом исследовали 2000 ядер.

Результаты исследования. Вирус герпеса и продукты его обмена изменяли структуру наружной поверхности синцитиотрофобласта. Его микроворсинки укорачивались, становились тонкими и часто разрушались. В синцитиотрофобласте появлялись одиночные либо сгруппи-



Фетоплацентарный барьер. Терминальные ворсины плаценты родильницы, перенесшей в III триместре беременности вспышку герпесвирусной инфекции (титр антител к вирусу герпеса — 1:12 800).

а — тельца вируса герпеса, проникшие в толщу синцитиотрофобласта; б — в толще синцитиотрофобласта расположены митохондрии, потерявшие кристы; в — в ядрах синцитиотрофобласта начальные стадии апоптоза: хроматин расположен под ядерной оболочкой, конденсирован и даёт реакцию на апоптоз. а, б — электронные микрофотографии; в — парафиновый срез. ISEL-метод. Ув.: а, б — 18 000; в — об. 40, ок. 15.

рованные пузырьки, в которых располагались осмиофильные тельца (рисунок).

При обострении герпесвирусной инфекции в конце III триместра беременности вакуолей с тельцами возбудителя обнаруживалось больше. Вирусные тельца иногда мощным комплексом погружались внутрь цитоплазмы синцитиотрофобласта и отшнуровывались. Нередко вся цитоплазма сильно вакуолизировалась, появлялись осмиофильные ламеллярные тельца. Многие митохондрии теряли кристы, превращаясь в опустошенные пузырьки (см. рисунок, б).

После проведения реакции на апоптоз обнаружено появление ядер в синцитиотрофобласте ворсин, на периферии которых под ядерной оболочкой отмечалось скопление хроматина, дающего реакцию на апоптоз (см. рисунок, в). В некоторых случаях конденсация хроматина была более выраженной, и почти всё ядро становилось окрашенным продуктом реакции выявления апоптоза. В периферической крови рожениц показатели α -ФНО повышались до $89,3 \pm 1,2$ пг/мл (контроль — $14,6 \pm 0,4$ пг/мл).

Исследование большего количества ворсин плаценты, полученной от 20 женщин, показало, что число ядер синцитиотрофобласта, переходящих в состояние апоптоза, находится в прямой зависимости от интенсивности инфекции. Так при титре антител к вирусу простого герпеса 1:6400 доля ядер в состоянии апоптоза составляла $2,5 \pm 0,6\%$ (контроль — $0,20 \pm 0,05\%$), тогда как при титре антител к вирусу простого герпеса 1:12 800 — $3,7 \pm 0,8\%$ (контроль — $0,25 \pm 0,07\%$).

Обсуждение полученных данных. Апоптоз, пожалуй, правильнее считать регулируемой гибелью клеток [6], которая определяется рядом факторов экзогенной и эндогенной природы. В представленном случае особенно отчетливо просматривается зависимость ускорения процессов апоптоза в ядрах синцитиотрофобласта ворсин плаценты вследствие взаимодействия возбудителя и индукторов апоптоза в ядрах синцитиотрофобласта ворсин плаценты от выраженности вирусной инфекции. Это происходит вследствие взаимодействия возбудителя индукторов апоптоза (α -ФНО), вступающих в контакт с рецепторами

фетоплацентарного барьера передающими сигналы гибели клеток из микросреды в цитоплазму и запускающими каскад реакций как в митохондриях, так и в группе каспазных ферментов. При герпесвирусной инфекции в периферической крови беременных увеличивается содержание α -ФНО. В результате образуется проапоптозный сигнальный комплекс (death-inducing signaling complex), ускоряющий процессы апоптоза в ядрах синцитиотрофобласта ворсин. Следует заметить, что отчетливо выраженного цитотоксического повреждения фетоплацентарного барьера ворсин при инфекции, просто вызванной вирусом герпеса, мы не наблюдали. Вероятно, наличие такового привело бы к тяжелым последствиям, не совместимым с целостностью фетоплацентарного барьера. Регистрируемое, таким образом, повышение количества ядер синцитиотрофобласта в состоянии апоптоза является результатом одностороннего действия всех компонентов проапоптозного сигнального комплекса.

Следовательно, осмысление роли апоптоза и идентификация его морфологических маркеров в синцитиотрофобласте плаценты могут явиться новым подходом к оценке функционального состояния фетоплацентарного барьера, которое является важным прогностическим признаком характера антенатального развития плода в условиях вирусемии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андриевская И.А. Гормональные и микробицидные изменения у беременных с герпесвирусной инфекцией. Бюл. физиол. и патол. дыхания, 2003, вып. 15, с. 41–44.
2. Андриевская И.А. Особенности белкового обмена у беременных с герпесной инфекцией. Бюл. физиол. и патол. дыхания, 2006, вып. 23, с. 13–16.

3. Луценко М.Т. Процессы синтеза белка в симпласте хориона при герпес-вирусной инфекции. Бюл. физиол. и патол. дыхания, 2003, вып. 15, с. 7–14.
4. Луценко М.Т. Компьютерная оценка динамики процесса апоптоза в ядрах синцитиотрофобласта ворсин плаценты у родильниц, перенесших вспышку герпесвирусной инфекции. Морфология, 2008, т. 134, вып. 6, с. 79–83.
5. Погорелов В.М. и Козинец Г.И. Морфология апоптоза при нормальном и злокачественном гемопоэзе. Гематол. и трансфузиол., 1995, т. 43, № 5, с. 21–24.
6. Pollack M., Phaneuf S., Dirks A. and Leeuwenburgh C. The role of apoptosis in the normal aging brain, skeletal muscle and heart. Ann. N. Y. Acad. Sci., 2002, v. 959, p. 93–107.
7. Wijsman J.H., Jonker R.R., Keijzer R. et al. A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end labeling of fragmented DNA. J. Histochem. Cytochem., 1993, v. 41, p. 7–12.

Поступила в редакцию 15.06.07
Получена после доработки 10.07.08

THE DEGREE OF APOPTOSIS EXPRESSION IN THE NUCLEI OF PLACENTAL VILLI SYNCYTIOTROPHOBLAST IN HERPES VIRUS INFECTION

M.T. Lutsenko and I.A. Andriyevskaya

Using light, electron microscopy and immunocytochemistry (ISEL-method) the nuclei of placental villi syncytiotrophoblast were studied in puerperas, who had the outburst of Herpes virus infection in the second half of their pregnancy (antibody titre 1:6400 — 1:12800). The results obtained have shown that Herpes virus invasion into the placental barrier caused the changes of metabolism in syncytiotrophoblast nuclei, that lead to the appearance of signs of apoptosis. The number of nuclei demonstrating apoptotic changes was increased in proportion with the increase of the severity of Herpes virus infection

Key words: *placenta, syncytiotrophoblast, nucleus, apoptosis, Herpes virus infection.*

Laboratory of the Mechanisms of Etiopathogenesis and Regenerative Processes of Respiratory Organs in Non-specific Pulmonary Diseases, Far Eastern Center of Respiratory Physiology and Pathology, RAMS SB, Blagoveshchensk