

Реализация апоптоза в ядрах синцитиотрофобласта ворсинок плаценты у беременных, перенесших обострение герпес-вирусной инфекции в зависимости от содержания в гомогенате плаценты аннексина V

Луценко М.Т., Андриевская И.А.

Realization apoptosis in nucleus syncytiotrophoblast villus of placenta at pregnant, transferred an aggravation of a herpes-virus infection depending on the contents in homogenate placentaе annexin V

Lutsenko M.T., Andriyevskaya I.A.

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

© Луценко М.Т., Андриевская И.А.

Причиной увеличения апоптоза в синцитиотрофобласте является подавление активности аденозинтрифосфатазы, перемещение фосфатидилсерина на внешнюю мембрану синцитиотрофобласта, повышение количества аннексина V в гомогенате плаценты.

Ключевые слова: апоптоз, фосфатидилсерин, аннексин V, герпес.

The reason of increase apoptosis in syncytiotrophoblast is suppression of activity ATP-ase, moving phosphatidylserin on an external membrane syncytiotrophoblast, and increase of quantity annexin V in homogenate placentaе.

Key words: apoptosis, phosphatidylserin, annexin V, herpes.

УДК 618.36-091.818:576.3:618.3-06:616.523

Введение

Особого внимания исследователей заслуживают механизмы инициации апоптоза с участием фосфолипида фосфатидилсерина PS, находящегося обычно во внутреннем липидном слое плазматической мембраны клетки. Такое расположение фосфатидилсерина контролируется действием транспортной аденозинтрифосфатазы (АТФ-азы) [2, 3]. При неблагоприятных условиях среды, окружающей клетку, происходит инактивация АТФ-азы, что способствует снижению активности и аминофосфолипидной трансферазы, отвечающей за сохранение асимметрии мембранного бислоя, что в конечном итоге и приводит к перемещению фосфатидилсерина на внешний липидный слой.

По-видимому, имеется специальный рецептор, обнаруживающий фосфатидилсерин в наружном липидном слое [3]. В случае контакта рецептора с фактором некроза опухоли α (ФНО- α) или аннексином V,

который с высокой аффинностью связывается с фосфатидилсерином, расположенными на поверхности клетки, с рецептора идут сигналы во внутрь клетки, инициирующие апоптоз [5—7].

Проведенные исследования позволяют предполагать, что, по-видимому, усиление связи фосфатидилсерина в синцитиотрофобласте с аннексином V активнее проявляется при обострении герпес-вирусной инфекции в третьем триместре беременности.

Материал и методы

Проводились исследования экстрактов плацент рожениц, перенесших герпес-вирусную инфекцию в третьем триместре с титром антител к вирусу простого герпеса-1 (ВПГ-1) 1 : 1 600 (14 случаев), с титром антител к ВПГ-1 1 : 6 400 (14 случаев) и с титром антител к ВПГ-1 1 : 12 800 (14 случаев). Контроль представлен исследованиями плацент от 14 беременных, не имевших заболеваний на протяжении всего перио-

да гестации. Исследования проводились на базе стационара гинекологического отделения клиники Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания СО РАМН (г. Благовещенск) в соответствии

с рекомендациями Хельсинкской 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 19.06.2003 г. № 266.

Морфологическая детекция апоптоза проводилась на парафиновых срезах плаценты по метке концов фрагментов ДНК *in situ* end labeling (ISEL-метод) [1]. Срезы после дегидратации в дистиллированной воде в течение 30 мин инкубировали в 3%-м растворе перекиси водорода и отмывали забуференным солевым раствором (PBS) с концентрацией 0,15 моль (NaCl 0,15 моль на фосфатном буфере с концентрацией 0,11 моль, pH 7,5). Затем срезы инкубировали в смеси NaCl с концентрацией 0,3 моль и цитрата натрия с концентрацией 30 ммоль (pH 7,0; температура 80 °С, в течение 20 мин) и отмывали в PBS с концентрацией 0,15 моль. После чего их инкубировали в растворе проназы при комнатной температуре в течение 30 мин (Calbiochem; 1 мг/мл на PBS с концентрацией 0,15 моль). Отмывали в PBS с концентрацией 0,15 моль и буфером А (трис-гидрохлорид 50 ммоль, хлорид магния 5 ммоль, β-меркаптоэтанол 10 ммоль и 0,005%-й раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА), (pH 7,5). Последовательно инкубировали (при температуре 18 °С в течение 2 ч) в смеси из четырех нуклеотидов (dATF, dCTF, dGTF 0,01 ммоль (Promega Madison WI), biotin-H-dUTP 0,001 ммоль (Sigma, США)) и ДНК полимеразе-1 *E. coli* (20 ед/мл (Promega)), приготовленной на буфере А. Отмывали буфером А, а затем PBS в концентрации 0,5 моль (0,5 моль NaCl на фосфатном буфере с концентрацией 0,1 моль, pH 7,5). Окончательно срезы инкубировали с конъюгатом пероксидазы (Vectastam Elite ABC Kit-Vector, Burliname, CA), разведенным 1 : 25 PBS с концентрацией 0,5 моль, в который введены 1% БСА и 0,5% твин-20, и в течение 10 мин окрашивали 0,04%-м раствором 3,3-диаминобензидин тетрагидрохлорида (ДАВ) на трис-буфере с концентрацией 0,05 моль, pH 7,5 и перекиси водорода в конечной концентрации 0,015%

из 30% раствора. Промывали дистиллированной водой, обезвоживали и заключали в бальзам. Подсчет ядер, находившихся в состоянии апоптоза, проводился на 100 концевых ворсинках плаценты в каждом отдельно взятом случае. В подсчет на 100 ворсинок отбиралось 2 тыс. ядер.

Активность АТФ-азы, выявленная гистохимическим методом по Падикула—Херману на свежемороженых срезах, определяли путем компьютерной цитофотометрии.

Для получения гомогената плодовая часть плаценты (ворсинчатый хорион) срезалась скальпелем небольшими пластинками площадью до 2—3 см и толщиной 1 мм. Кусочки ткани помещали в химические стаканы, содержащие 200 мл физиологического раствора, отмывали от клеток крови, перемешивая на магнитной мешалке в течение 15 мин, и подсушивали на фильтровальной бумаге. Затем ткань растирали пестиком в фарфоровой ступке и гомогенизировали до однородной массы. К полученному гомогенату добавляли физиологический раствор в объеме, равном начальному весу ткани (на 1 г гомогената 1 мл физиологического раствора). Взвесь помещали в пластиковые пробирки «Falcon» и подвергали замораживанию при температуре –20 °С в течение суток. Затем гомогенат размораживали и центрифугировали при 4 000 об/мин при температуре 4 °С. Надосадочную жидкость разливали мелкими аликвотами и хранили при температуре –20 °С до проведения иммуноферментного анализа.

Содержание аннексина V и антител к фосфатидилсерину классов IgG и IgM определяли с помощью твердофазного иммуноферментного анализа с использованием наборов компании Bender MedSystems (Австрия). Верификацию вируса простого герпеса и выраженность заболевания оценивали по динамике титров антител IgG с помощью стандартных тест-систем фирмы «Вектор-Бест» (г. Новосибирск). Анализ проводили на микропланшетном ридере Stat-Fax 2100 (США).

Статистическая обработка данных проводилась с использованием *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Исследования показали, что обострение герпесвирусной инфекции сопровождалось нарастанием в экстрактах плацент антител к фосфатидилсерину (таблица). При титре антител к ВПГ-1 1 : 1 600 количество

антител к PS статистически достоверно не изменялось и составило $(2,64 \pm 0,05)$ Ед/мл. Титр антител к ВПГ-1 1 : 6 400 сопровождался ростом антител к PS до $(4,70 \pm 0,08)$ Ед/мл. Такие же высокие показатели антител к PS определялись при титре антител к ВПГ-1 1 : 12 800 — $(5,60 \pm 0,06)$ Ед/мл (контроль — $(2,50 \pm 0,07)$ Ед/мл).

Содержание в гомогенате плаценты антител к фосфатидилсерину и аннексина V при различных титрах антител к ВПГ-1 у беременных в третьем триместре ($M \pm m$)

Титр антител к ВПГ-1	Аннексин V, Ед/мл	Антитела к фосфатидилсерину, нг/мл
1 : 1 600	$25,30 \pm 0,31$ ($p > 0,5$)	$2,64 \pm 0,05$ ($p > 0,5$)
1 : 6 400	$48,60 \pm 0,60$ ($p < 0,001$)	$4,70 \pm 0,08$ ($p < 0,01$)
1 : 12 800	$63,70 \pm 0,80$ ($p < 0,001$)	$5,60 \pm 0,06$ ($p < 0,01$)
Контроль	$25,78 \pm 0,92$	$2,50 \pm 0,07$

Примечание. p — достоверность различия по сравнению с контролем.

Параллельно проведенное гистохимическое исследование интенсивности реакции на АТФ-азу в плаценте показало снижение активности на стандартную единицу площади в синцитиотрофобласте с $(4,50 \pm 0,03)$ усл. ед. (контроль) до $(2,10 \pm 0,04)$ усл. ед. (обострение герпесной инфекции; титр антител к ВПГ-1 1 : 12 800) (рис. 1, 2).



Рис. 1. Синцитиотрофобласт ворсинки плаценты роженицы, перенесшей обострение герпес-вирусной инфекции (титр антител 1 : 12 800). Активность реакции на АТФ-азу резко снижается. Реакция по Падикюла—Херману. Ув. 90×40

Такие данные позволяют предполагать, что уменьшение активности АТФ-азы снижает активность фосфолипидной транслоказы, что приводит к нарушению асиммет-

рии липидных компонентов и сопровождается перемещением фосфатидилсерина с внутренней поверхности мембраны синцитиотрофобласта на наружную. Вероятно, при условии нарастания содержания аннексина V усиливается его контакт с фосфатидилсеринем. При титре антител к ВПГ-1 1 : 1 600 количество аннексина V в гомогенате плаценты достоверно не изменялось и составило $(25,30 \pm 0,31)$ пг/мл. Повышение титра антител к ВПГ-1 до 1 : 6 400 сопровождалось увеличением количества аннексина V в гомогенате плаценты до $(48,60 \pm 0,60)$ пг/мл, а при титре антител к ВПГ-1 1 : 12 800 его содержание находилось на уровне $(63,70 \pm 0,80)$ пг/мл (контроль — $25,78 \pm 0,92$) (см. таблицу).

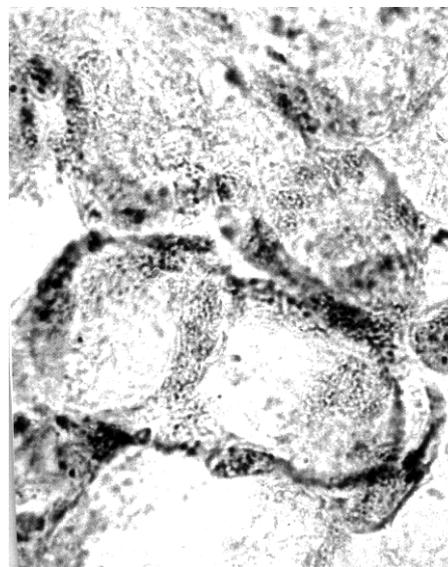


Рис. 2. Синцитиотрофобласт ворсинки плаценты роженицы, не болевшей во время беременности. Интенсивность реакции на АТФ-азу высокая. Реакция по Падикюла—Херману. Ув. 90×40

Исследуя срезы плаценты после реакции ISEL, обнаружили, что на 2 тыс. ядер в ворсинках плаценты рожениц, перенесших герпес-вирусную инфекцию, $(4,50 \pm 0,20)\%$ (контроль — $(1,50 \pm 0,20)\%$; $p < 0,001$) находились в состоянии апоптоза (рис. 3).

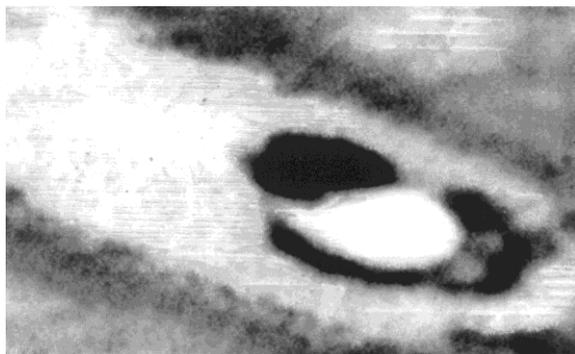


Рис. 3. Синцитиотрофобласт ворсинки плаценты роженицы, перенесшей обострение герпес-вирусной инфекции (титр антител 1 : 12 800). В синцитиотрофобласте насчитывается свыше 4% ядер в состоянии апоптоза. Ув. 90 × 40

Таким образом, при вспышке герпес-вирусной инфекции, вероятно, усиливается контакт фосфатидилсерина в синцитиотрофобласте с нарастающим при этом содержанием аннексина V, что и приводит к увеличению преждевременно вступающих в апоптоз ядер фетоплацентарного барьера. Одновременно отмечается и снижение АТФ-азы, что влияет на начало процесса перемещения фосфатидилсерина из внутреннего слоя на наружный липидный слой мембраны. Создаются условия инициации апоптоза в ядрах синцитиотрофобласта.

Выводы

1. При нарастании титра антител к вирусу простого герпеса отмечается увеличение в гомогенате плаценты антител к фосфатидилсерину.

2. В гомогенате плаценты по мере нарастания агрессивности герпес-вирусной инфекции увеличивается содержание аннексина V.

3. Гистохимическими методами отмечено, что по мере нарастания титра антител к вирусу герпеса в синцитиотрофобласте снижается активность АТФ-азы.

4. Подавление активности АТФ-азы и повышение содержания в гомогенате плаценты аннексина V приводит к увеличению до $(4,50 \pm 0,20)\%$ количества ядер синцитиотрофобласта, вступающих в апоптоз.

Литература

1. Погорелов В.М., Козинец Г.И. Морфология апоптоза при нормальном и злокачественном гемопоэзе // Гематология и трансфузиология. 1995. Т. 43, № 5. С. 21—24.
2. Скулачев В.П. Феноптоз: запрограммированная смерть организма // Биохимия. 1999. Т. 64, Вып. 12. С. 1679—1688.
3. Скулачев В.П. Кислород в живой клетке: добро и зло // Сорос. образов. журн. 1996. № 3. С. 4—16.
4. Alareon-Segovia D., Debze M. Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid syndrome in systemic lupus erythematosus. A perspective analysis of 500 consecutive patients // Medicine. 1987. V. 68. P. 353—365.
5. Amoux D., Boutiere B., Sanmarco M. Antiphospholipid antibodies: clinical significance and biological diagnosis // Ann. Biol. Clin. (Paris). 2000. V. 58, № 5. P. 557—574.
6. Kaburaki I., Kuwana M., Yamamoto M. Clinical significance of antiannexin V antibodies in patients with systemic lupus erythematosus // Am. J. Hematol. 1997. V. 534, № 3. P. 209—213.
7. Reutelingsperger C., van Heerde W. Annexin V, the regulator of phosphatidylserine — catalyzed inflammation and coagulation during apoptosis // Cell Mol. Life Sci. 1997. V. 53. P. 527—532.

Поступила в редакцию 09.02.2009 г.

Утверждена к печати 22.12.2009 г.

Сведения об авторах

М.Т. Луценко, академик РАН, советник при дирекции Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания СО РАН (г. Благовещенск).

И.А. Андриевская, канд. мед. наук, научный сотрудник Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания СО РАН (г. Благовещенск).

Для корреспонденции

Андриевская И.А., e-mail: tatiana.1383@list.ru