

РОЛЬ ЭСТРАДИОЛА В ПОДДЕРЖАНИИ ФЕТОПЛАЦЕНТАРНОЙ СИСТЕМЫ

М.Т.Луценко, И.А.Андриевская, И.В.Довжикова

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания», 675000, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22

РЕЗЮМЕ

Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, 22 Kalinina Str., Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation

Цель исследования – определить роль нарушений образования гормонов эстриолового ряда (андростендиона, эстрадиола) в развитии гормональной дисфункции фетоплацентарной системы. Исследовано 39 плацент от женщин с обострением цитомегаловирусной (ЦМВ) инфекции на третьем триместре беременности и титром антител IgG к ЦМВ 1:1600 и 30 плацент от женщин с латентной ЦМВ инфекцией и титром – 1:400. Активность андростендиондегидрогеназы определяли гистохимическим методом на криостатных срезах свежемороженых тканей плацент по методу Лойда. Оценка интенсивности гистохимической реакции осуществлялась цитофотометрическим методом по программе Scion. Определение эстрадиола в гомогенате плаценты осуществлялось иммуноферментным методом. Подсчет количества ядер синцитиотрофобласта плаценты в состоянии апоптоза – цитофотометрическим методом на парафиновых срезах, окрашенных по ISEL-методу. По результатам исследования, обострение ЦМВ инфекции на третьем триместре беременности приводит к снижению в плаценте интенсивности гистохимической реакции на андростендиондегидрогеназу до $32,1 \pm 2,88$ пикселей/мкм² (при латентном течении заболевания – $54,2 \pm 4,31$ пикселей/мкм², $p < 0,001$), в гомогенате плаценты – к уменьшению показателей эстрадиола до $18443,2 \pm 117,53$ пмоль/л (при латентном течении заболевания – $28977,7 \pm 158,13$ пмоль/л, $p < 0,001$), на парафиновых срезах плацент в синцитиотрофобласте – увеличением числа ядер в состоянии апоптоза до $5,0 \pm 0,03\%$ (при латентном течении заболевания – $1,2 \pm 0,001\%$, $p < 0,001$) и вакуолеобразованием, что приводит к деструктивным нарушениям цитоплазмы синцитиотрофобласта. Полученные результаты свидетельствуют о том, что обострение ЦМВ инфекции на третьем триместре беременности вызывает снижение образования гормонов эстриолового ряда, что сопровождается нарушением морфоструктуры и обменных процессов в клеточных элементах плаценты.

Ключевые слова: фетоплацентарная система, цитомегаловирус, беременность, гормоны эстриолового ряда, апоптоз.

The aim of the study is to define the role of abnormalities in the formation of estriol hormones in the development of hormonal dysfunction of fetoplacental system. There were examined 39 placentas from women with exacerbation of chronic cytomegalovirus infection at the third trimester of pregnancy and IgG antibody titer 1:1600 and 30 placentas from women with latent CMV infection and titer 1:400. The activity of androstenedione dehydrogenase was found out with histochemical method on cryostat sections of freshly frozen tissues of placentas by Lloyd's method. The assessment of intensiveness of histochemical reaction was done with cytophotometric method by Scion program. Estradiol in homogenate of placenta was measured with immune-enzyme method. The quantity of nuclei of placenta syncytiotrophoblast in the state of apoptosis was done with cytophotometric method on paraffin sections stained by ISEL method. By the results of the study the exacerbation of CMV infection at the third trimester of pregnancy leads to the decrease of intensiveness of histochemical reaction in placentas to androstenedione dehydrogenase till 32.1 ± 2.88 pixel/mcm² (at the latent course it is 54.2 ± 4.31 pixel/mcm², $p < 0.001$), and in homogenate of placenta to the decrease of estradiol till 18443.2 ± 117.53 pmole/l (at the latent course of the disease it is 28977.7 ± 158.13 pmole/l, $p < 0.001$), on paraffin sections in syncytiotrophoblast by the increase of nuclei number in the state of apoptosis till $5.0 \pm 0.03\%$ (at latent course of the disease it is $1.2 \pm 0.001\%$, $p < 0.001$) and vacuole formation, which leads to destructive damages of syncytiotrophoblast cytoplasm. The obtained results prove that the exacerbation of CMV infection at the third trimester of pregnancy causes the decrease of estriol hormones formation, which is accompanied by the damage of morphostructure and exchange processes in cell elements of placenta.

Key words: fetoplacental system, cytomegalovirus, pregnancy, estriol hormones, apoptosis.

В настоящее время большое внимание исследователей уделяется изучению деятельности фетоплацентарного барьера в период гестации, поскольку от его состояния зависит жизнеспособность развивающегося плода [1, 2, 4, 5]. Особое внимание привлекают повреждения, возникающие вследствие обострения ЦМВ инфекции на третьем триместре беременности, что приводит к гормональной дисфункции плаценты. В норме в синцитиотрофобласте из холестерина синте-

SUMMARY

THE ROLE OF ESTRADIOL IN THE SUSTENTATION OF FETOPLACENTAL SYSTEM

M.T.Lutsenko, I.A.Andrievskaya, I.V.Dovzhikova

зируются андрогены: дегидроэпиандростерон и андростендион. Основное количество андростендиона превращается в эстрон и далее в 17β -эстрадиол [15]. Снижение содержания андростендиона приводит к нарушению формирования эстрогена и основного гормона эстриолового ряда – эстрадиола, который крайне необходим для нормального развития органов плода и обменных процессов, протекающих в них: экспрессия липопротеидов низкой плотности, трансплацентарное окисление кортизола [9], а также эстрадиола способствует развитию легких плода, почек, печени, костной ткани [10, 13]. Поэтому, учитывая цитотоксическое действие ЦМВ на ткани и органы плода, перспективным является изучение образования эстрадиола из предшественника – андростендиона в плаценте на третьем триместре беременности, что позволит дать оценку адаптивных возможностей фетоплацентарного комплекса.

Цель исследования – определить роль нарушений образования гормонов эстриолового ряда (андростендиона, эстрадиола) в развитии гормональной дисфункции фетоплацентарной системы.

Материалы и методы исследования

Исследовано 39 плацент от женщин с обострением цитомегаловирусной (ЦМВ) инфекции на третьем триместре беременности (28-30 недель) и титром антител IgG к ЦМВ 1:1600 (основная группа) и 30 плацент от женщин с латентной ЦМВ инфекцией и титром – 1:400 (группа сравнения). Средний возраст в основной группе составил $24,3 \pm 0,4$ года и значительно не отличался от группы сравнения – $23,2 \pm 0,3$ года ($p > 0,05$).

Критериями включения в исследование явились обострение ЦМВ инфекции на сроке 28-30 недель беременности с клиническими признаками острой респираторной вирусной инфекции, стойкая клиническая ремиссия герпесвирусной инфекции.

Критерии исключения из исследования – первичная ЦМВ инфекция, обострение других воспалительных заболеваний экстрагенитальной патологии, наличие инфекций, передающихся половым путем.

Клинический диагноз – первичная ЦМВ инфекция – устанавливали по наличию в крови антител (иммуноглобулин, Ig) класса М к ЦМВ, низкоавидных IgG (индекс авидности $< 65\%$), а также ДНК ЦМВ, выявляемой методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в крови или моче; обострение хронической ЦМВ инфекции – по наличию в IgM к ЦМВ, высокоавидных IgG (индекс авидности $> 65\%$), а также ДНК ЦМВ в соскобе с буккального эпителия и содержимом цервикального канала.

Исследования проводили с учетом требований Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (Этические принципы проведения научных исследований с участием человека, 2008 г.) и Правил клинической практики в Российской Федерации, утвержденных приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 №266.

У обследуемых взятие крови для ПЦР проводили в стандартные вакуумные пробирки с коагулянтом в ко-

личестве 5 мл. Для серологических исследований использовали кровь, не содержащую антикоагулянты. Выделение мононуклеарных клеток крови проводили с использованием раствора фиколл-урографина плотностью 1,077 г/мл (НПО «ДНК-технология», Россия). Серологические исследования выполняли в парных сыворотках с интервалом 10-14 суток. Утренняя порция мочи для ПЦР-анализа собиралась в стерильный контейнер объемом 60 мл. Забор буккального эпителия и содержимого цервикального канала производили стерильным тупфером в стандартные пластиковые пробирки с физиологическим раствором объемом 0,5 мл.

Определение типоспецифических антител и авидности IgG осуществляли методами иммуноферментного анализа (ИФА) на спектрофотометре Stat Fax 2100 (США) с использованием тест-систем ЗАО «Вектор-Бест» (Россия). Содержание эстрадиола в гомогенате плаценты определяли с использованием набора DRG (США). ДНК ЦМВ выявляли методом ПЦР на аппарате ДТ-96 с использованием наборов НПО «ДНК-технология» (Россия).

Для морфологических исследований материал фиксировали в 10%-м нейтральном формалине, обезвоживали в спиртах и заливали в парафин по общепринятой методике. Морфологическая оценка апоптоза проводилась на парафиновых срезах плаценты по метке концов фрагментов ДНК *in situ* and labeling (ISEL-метод) [6].

Активность андростендиондегидрогеназы определяли гистохимическим методом на криостатных срезах свежемороженой ткани плаценты [3]. Метод основан на восстановлении соли тетразолия в формазан электронами, акцептируемыми от субстрата через кофермент НАДФ. Субстратом служит 2мМ раствор андростендиона (Sigma, США). Для его приготовления 6 мг 4-андростен-3,17-диона растворяют в 10 мл N,N-диметилформамида. Инкубационный раствор готовится на основе 0,1М фосфатного буфера pH 7,2-7,4 с добавлением нитросинего тетразолия (ICN Biomedicals, США) в конечной концентрации 5мМоль НАДФ (AppliChem, Германия) – 1 мМоль.

Состав инкубационной среды: 0,1 М фосфатный буфер pH 7,2-7,4 – 1мл; нитросиний тетразолий – 1 мг; НАДФ – 1 мг; 2мМ раствор андростендиона – 0,1 мл.

Криостатные срезы свежеприготовленных тканей плаценты помещали в инкубационный раствор на 30 мин. при 37°C. После этого срезы промывали дистиллированной водой и фиксировали в 10% нейтральном формалине, затем снова промывали дистиллированной водой, слегка подсушивали и заключали в глицерин-желатин. Контрольные срезы инкубировали в среде, содержащей вместо субстрата адекватное количество фосфатного буфера. Полученные гистологические препараты изучали цитометрическим методом с помощью программы Scion (США) на цифровом микроскопе MEII (Япония).

Статистический анализ и обработка данных проводится с использованием пакета прикладных программ Statistica v. 6.0 (StatSoft Inc., США). Для определения достоверности различий использовали непарный пара-

метрический критерий Стьюдента ($M \pm m$).

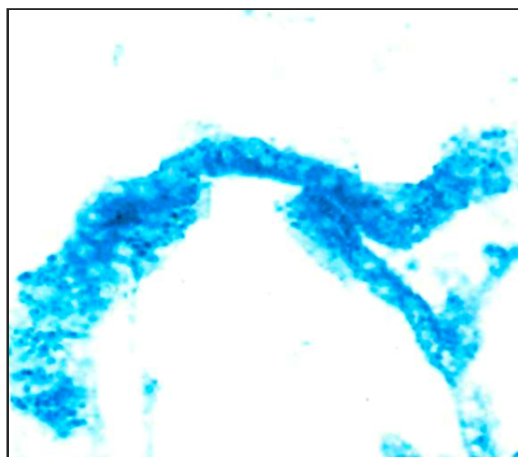
Результаты исследования

На рисунке 1 представлена гистохимическая реакция на андростендиондегидрогеназу в синцитиотрофобласте ворсинок плацент от женщин основной группы и группы сравнения, результаты которой согласуются со степенью выраженности ЦМВ инфекции во время беременности. При обострении ЦМВ инфекции на сроке 28-30 недель беременности (основная группа) снижение цитофотометрических показателей продуктов реакции на андростендиондегидрогеназу (рис. 1б) происходило до $32,1 \pm 2,88$ пикселей/ мкм^2 ($p < 0,001$) по сравнению с латентным течением заболевания (группа сравнения), в которой средние значения цитофотометрических показателей были выше в 1,7 раза и составили $54,2 \pm 4,31$ пикселей/ мкм^2 (рис. 1а).

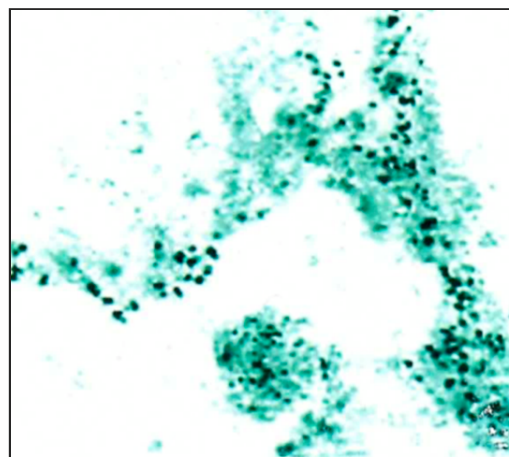
При серологическом исследовании гомогената тех же плацент было выявлено однонаправленное изменение содержания эстрадиола, которое выражалось в

снижении его показателей в основной группе до $18443,2 \pm 117,53$ пмоль/л ($p < 0,001$), что в 1,57 раза ниже, чем в группе сравнения. Показатели эстрадиола в данной группе составили $28977,7 \pm 158,13$ пмоль/л.

При дальнейшем электронно-микроскопическом исследовании плацент от женщин основной группы были выявлены существенные изменения структуры цитоплазмы синцитиотрофобласта в виде обширных вакуолеобразных участков, которые часто соприкасались с ядром, способствуя их деформации, усиливающей конденсацию хроматина (рис. 2). Наряду с этим наблюдалось увеличение числа ядер синцитиотрофобласта ворсинок плаценты в состоянии апоптоза. Их количество увеличивалось в соответствии со степенью выраженности ЦМВ инфекции во время беременности. При обострении ЦМВ инфекции на сроке 28-30 недель беременности (основная группа) количество ядер в состоянии апоптоза составило $5,0 \pm 0,03\%$, что в 4,17 раза выше ($p < 0,001$), чем при латентном течении заболевания (группа сравнения) – $1,2 \pm 0,001\%$ (рис. 3).



а



б

Рис. 1. Синцитиотрофобласт ворсинки плаценты. Гистохимическая реакция на андростендиондегидрогеназу по Лойда в группе сравнения (а) и основной группе (б). Увеличение: 40×10 .



Рис. 2. Синцитиотрофобласт ворсинки плаценты. Обострение хронической ЦМВ инфекции на сроке 28 недель беременности. Вакуолизация цитоплазмы. Электронная микроскопия. Увеличение: 12000.

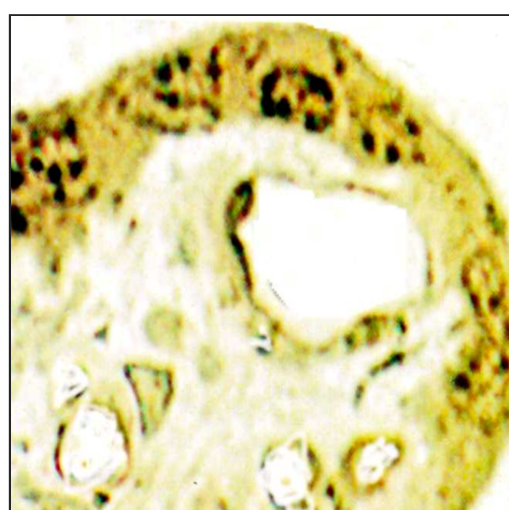


Рис. 3. Синцитиотрофобласт ворсинки плаценты. Обострение хронической ЦМВ инфекции на сроке 28 недель беременности. Увеличение количества ядер в состоянии апоптоза. ISEL-метод. Увеличение: 10×100 .

Обсуждение результатов исследования

Своевременное формирование эстрадиола из андростендиона способствует закреплению зародыша в слизистой оболочке матки, поскольку данный гормон оказывает стимулирующее влияние на рост трофобластических клеток и формирование ворсинок [8]. Особенно велико его воздействие на рост эндотелиальных клеток при формировании кровеносных сосудов в ворсинках [7, 11, 14]. Его действие через ядерные факторы оказывает регулирующее влияние на размножение клеток, а также вовлечение их в процессы апоптоза и ремоделирования тканей [12]. Эстрадиол играет принципиальную роль в формировании межклеточного матрикса, а также способствует нормальному течению ферментативных процессов в цитоплазме синцитиотрофобласта. Не исключается роль ЦМВ инфекции в нарушении образования эстрадиола в плаценте из андростендиона. Цитодеструктивное действие ЦМВ на ткани плаценты часто приводит к нарушению гормонаобразующих процессов [5], что также подтверждается выполненным исследованием. Было установлено снижение активности реакции на андростендиондегидрогеназу и содержания эстрадиола в плаценте при обострении хронической ЦМВ инфекции на третьем триместре беременности. Такие нарушения в эстрогеновом метаболизме становятся причиной морфологической дизадаптации плаценты и ее тканей на субклеточном уровне, выражающейся в деструкции цитоплазмы, усилении апоптотического изменения ядер, ослабляющего белоксинтетическую функцию синцитиотрофобласта. Все это, как известно, изменяет транспортную функцию плацентарного барьера, что является причиной плацентарной недостаточности, имеющей неблагоприятные последствия для плода и новорожденного.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гусева Л.Н., Рогова Л.А., Егорова Н.Ю., Балашова Т.Б. Цитомегаловирусная инфекция (ЦМВИ): классификация и варианты течения // *Детские инфекции*. 2003. №1. С.57–61.
2. Жибурт Е.Б., Серебрянская Е.Б., Каткова И.Е. О механизмах активации цитомегаловирусной инфекции // *Терапевтический архив*. 1997. Т.69, №11. С.40–41.
3. Лойда З., Госсрау Р., Шиблер Т. Гистохимия ферментов. Лабораторные методы: пер. с англ. М.: Мир, 1982. 272 с.
4. Луценко М.Т., Пирогов А.Б., Гориков И.Н., Довжикова И.В., Соловьева А.С. Фетоплацентарная система при ОРВИ. Благовещенск, 2000. 168 с.
5. Луценко М.Т., Андриевская И.А. Состояние фетоплацентарного барьера при герпес-вирусной инфекции у беременных // *Сибирский научный медицинский журнал*. 2008. Т.28, №5. С.142–147.
6. Погорелов В.М., Козинец Г.И. Морфология апоптоза при нормальном и злокачественном гемопоэзе // *Гематология и трансфузиология*. 1995. Т.40, №5. С.17–25.
7. Chobotova K., Spyropoulou I., Carver J., Manek S.,

Heath J.K., Gullick W.J., Barlow D.H., Sargent I.L., Mardon H.J. Heparin-binding epidermal growth factor and its receptor ErbB4 mediate implantation of the human blastocyst // *Mech. Dev.* 2002. Vol.119, №2. P.137–144.

8. Cronier L., Guibourdenche J., Niger C., Malasine A. Oestradiol stimulates morphological and functional differentiation of human villous cytotrophoblast // *Placenta*. 1999. Vol.20, Iss.8. P.669–676.

9. Pepe G.J., Albrecht E.D. Central integrative role of oestrogen in the regulation of placental steroidogenic maturation and the development of the fetal pituitary-adrenocortical axis in the baboon // *Hum. Reprod. Update*. 1998. Vol.4, №4. P.406–419.

10. Rahman S.A., Hingorani V., Laumas K.R. Biosynthesis of oestrogens and their inter-conversion in human placenta from normal and toxemic pregnancies // *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*. 1975. Vol.4, №4. P.333–341.

11. Reynolds L.P., Redmer D.A. Angiogenesis in the Placenta // *Biol. Reprod.* 2001. Vol.64, №4. P.1033–1040.

12. Rider V., Carlone D.L., Foster R.T. Oestrogen and progesterone control basic fibroblast growth factor mRNA in the rat uterus // *J. Endocrinol.* 1997. Vol.154, №1. P.75–84.

13. Rosenthal M.D., Albrecht E.D., Pepe G.J. Estrogen modulates developmentally regulated gene expression in the fetal baboon liver // *Endocrine*. 2004. Vol.23, №2–3. P.219–228.

14. Rubanyi G.M., Johns A., Kauser K. Effect of estrogen on endothelial function and angiogenesis // *Vascul. Pharmacol.* 2002. Vol.38, №2. P.89–98.

15. Strauss J.F., Martinez F., Kiriakidou M. Placental steroid hormone synthesis: unique features and unanswered questions // *Biol. Reprod.* 1996. Vol.54, №2. P.303–311.

REFERENCES

1. Guseva L.N., Rogova L.A., Egorova N.Yu., Balashova T.B. Cytomegalovirus infection: classification and variants of clinical course. *Detskie infektsii* 2003; 1:57–61 (in Russian).
2. Zhiburt E.B., Serebryanskaya E.B., Katkova I.E. On the mechanisms of activation of cytomegalovirus infection. *Terapevticheskiy arkhiv* 1997; 69(11):40–41 (in Russian).
3. Lojda Z., Gossrau R., Schiebler T. Enzyme histochemistry: a laboratory manual. Moscow: Mir; 1982 (in Russian).
4. Lutsenko M.T., Pirogov A.B., Gorikov I.N., Dovzhikova I.V., Solov'eva A.S. Fetoplacental system in ARVD. *Blagoveshchensk*; 2000 (in Russian).
5. Lutsenko M.T., Andrievskaya I.A. The State of Fetoplacental Barrier at Herpes Viral Infection in Pregnant Women. *Sibirskiy nauchniy meditsinskiy zhurnal* 2008; 28(5):142–147 (in Russian).
6. Pogorelov V.M., Kozinets G.I. The morphology of apoptosis in normal and malignant hematopoiesis. *Gematologiya i transfuziologiya* 1995; 40(5):17–25 (in Russian).
7. Chobotova K., Spyropoulou I., Carver J., Manek S., Heath J.K., Gullick W.J., Barlow D.H., Sargent I.L., Mardon H.J. Heparin-binding epidermal growth factor and its receptor ErbB4 mediate implantation of the human blasto-

cyst. *Mech. Dev.* 2002; 119(2):137–144.

8. Cronier L., Guibourdenche J., Niger C., Malasine A. Oestradiol stimulates morphological and functional differentiation of human villous cytotrophoblast. *Placenta* 1999; 20(8):669–676.

9. Pepe G.J., Albrecht E.D. Central integrative role of oestrogen in the regulation of placental steroidogenic maturation and the development of the fetal pituitary-adrenocortical axis in the baboon. *Hum. Reprod. Update* 1998; 4(4):406–419.

10. Rahman S.A., Hingorani V., Laumas K. R. Biosynthesis of oestrogens and their inter-conversion in human placentae from normal and toxemic pregnancies. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 1975; 4(4):333–341.

11. Reynolds L.P., Redmer D.A. Angiogenesis in the

Placenta. *Biol. Reprod.* 2001; 64 (4):1033–1040.

12. Rider V., Carlone D.L., Foster R.T. Oestrogen and progesterone control basic fibroblast growth factor mRNA in the rat uterus. *J. Endocrinol.* 1997; 154(1):75–84.

13. Rosenthal M.D., Albrecht E.D., Pepe G.J. Estrogen modulates developmentally regulated gene expression in the fetal baboon liver. *Endocrine* 2004; 23(2-3):219–228.

14. Rubanyi G.M., Johns A., Kauser K. Effect of estrogen on endothelial function and angiogenesis. *Vascul. Pharmacol.* 2002; 38(2):89–98.

15. Strauss J.F., Martinez F., Kiriakidou M. Placental steroid hormone synthesis: unique features and unanswered questions. *Biol. Reprod.* 1996; 54(2):303–311.

Поступила 20.07.2016

Контактная информация

Михаил Тимофеевич Луценко,

академик РАН, доктор медицинских наук, профессор,

руководитель лаборатории механизмов этиопатогенеза и

восстановительных процессов дыхательной системы при НЗЛ,

Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания,

675000, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22.

E-mail: lucenkomt@mail.ru

Correspondence should be addressed to

Mikhail T. Lutsenko,

MD, PhD, DSc, Professor, Academician of RAS,

Head of Laboratory of Mechanisms of Etiopathogenesis and Recovery

Processes of the Respiratory System at Non-Specific Lung Diseases,

Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration,

22 Kalinina Str., Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation.

E-mail: lucenkomt@mail.ru