

УДК 618.36:612.63.031.3:577.121.7]578.825.12

DOI: 10.12737/article_5a9f265a108f03.54183370

ВЛИЯНИЕ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ НА ПРЕОБРАЗОВАНИЕ ПРОГЕСТЕРОНА В МЕТАБОЛИТ 5 α -ПРЕГНАН-3,20-ДИОН В ПЛАЦЕНТЕ РАННИХ СРОКОВ БЕРЕМЕННОСТИ

И.В.Довжикова, И.А.Андриевская, К.К.Петрова, **М.Т.Луценко**

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

РЕЗЮМЕ

Цель – изучение активности преобразования прогестерона и 5 α -прегнан-3,20-диона в плаценте при обострении цитомегаловирусной инфекции (ЦМВИ) в первом триместре беременности. Материал исследования – 50 ворсинчатых хорионов, взятых при проведении медицинских аборт на сроке 8-10 недель от женщин с обострением хронической ЦМВИ во время беременности. Контрольная группа – 35 ворсинчатых хорионов беременных на том же сроке гестации с хронической ЦМВИ в латентной стадии. Результаты обследования беременных женщин анализировали с позиции активности ЦМВИ иммуноферментным методом по уровню антител IgM и титра антител IgG в парных сыворотках в динамике через 10 дней. Содержание прогестерона определяли на спектрофотометре Stat Fax-2100. Активность дегидрогеназ 4-прегнен-3,20-диона и 5 α -прегнан-3,20-диона оценивали гистохимическим методом. Количественная оценка продуктов реакции на срезах проводилась под микроскопом Meiji Techno, связанным с программно-аппаратным комплексом SCION Corporation. Установлено, что содержание прогестерона в ворсинчатых хорионах женщин с реактивацией ЦМВИ во время беременности было снижено до 21,5 \pm 2,73 нмоль/л в сравнении с контрольной группой (53,4 \pm 3,70 нмоль/л, $p < 0,001$). Нарушение интенсивности преобразования прогестерона в плаценте подтверждалось уменьшением активности ферментов – дегидрогеназы 4-прегнен-20,3-диона до 15,9 \pm 0,47 усл. ед. (в контрольной группе 28,6 \pm 0,58 усл. ед., $p < 0,001$) и дегидрогеназы 5 α -прегнан-3,20-диона до 16,2 \pm 1,11 усл. ед. (в контрольной группе 25,0 \pm 1,91 усл. ед., $p < 0,001$). Уменьшение интенсивности преобразования прогестерона в его метаболит 5 α -дигидропрогестерон (5 α -прегнан-3,20-дион) в плаценте при обострении ЦМВИ может негативно сказаться на формировании и функционировании нервной системы плода.

Ключевые слова: цитомегаловирусная инфекция, ворсинчатый хорион, беременность, прогестерон, 5 α -дигидропрогестерон, аллопрегненолон.

SUMMARY

EFFECT OF CYTOMEGALOVIRUS INFECTION ON PROGESTERONE CONVERSION INTO A METABOLITE 5 α -PREGNAN-3,20-DIONE IN THE PLACENTA IN EARLY PREGNANCY

I.V.Dovzhikova, I.A.Andrievskaya, K.K. Petrova, **M.T.Lutsenko**

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

The aim was to study the activity of progesterone and 5 α -pregnan-3,20-dione conversion in the placenta at the exacerbation of cytomegalovirus infection (CMVI) during the first trimester of pregnancy. The study material included 50 villous chorions taken during medical abortions in the period of 8-10 weeks from women with exacerbation of chronic CMVI during pregnancy. The control group had 35 villous chorions of pregnant women of the same gestation period with chronic CMVI in the latent stage. Diagnosis of CMVI was performed taking into account the activity of CMVI with the immune-enzyme method by the level of antibodies of IgM and antibody titers of IgG in the paired serums in dynamics in 10 days. The progesterone content was determined at the “Stat Fax-2100” spectrophotometer. The activity of 4-pregnene-3,20-dione dehydrogenase and 5 α -pregnane-3,20-dione dehydrogenase was assessed by the histochemical method. Quantitative evaluation of the reaction products was carried out on sections under the microscope “Meiji Techno” connected to the software-hardware complex “SCION Corporation”. It was found out that progesterone content in villous chorions of women with reactivation of CMVI during pregnancy was reduced to 21.5 \pm 2.73 nmol/L in comparison with the control group (53.4 \pm 3.70 nmol/L, $p < 0.001$). The disturbance of progesterone inversion intensiveness in placenta was proved by the decrease of enzyme activity: of 4-pregnene-3,20-dione dehydrogenase till 15.9 \pm 0.47 standard units (in control it was 28.6 \pm 0.58 standard units, $p < 0.001$) and of 5 α -pregnan-3,20-dione till 16.2 \pm 1.11 standard units (in control it was 25.0 \pm 1.91 standard units, $p < 0.001$). Reduction in the intensity of progesterone conversion into 5 α -dihydroprogesterone (5 α -pregnan-3,20-dione) in the placenta with the exacerbation of CMVI can negatively affect the formation and functioning of the fetal nervous system.

Key words: cytomegalovirus infection, villous chorion, pregnancy, progesterone, 5 α -dihydroprogesterone, allopregnenolone.

Цитомегаловирус (ЦМВ) – один из самых распространенных вирусов, которые могут сохраняться в организме пожизненно в латентном состоянии.

Реактивация инфекции, вызываемой данным вирусом, чаще всего протекает под влиянием ряда факторов, к числу которых относится и беременность [2]. Установлено, что в период беременности цитомегаловирусная инфекция (ЦМВИ) становится причиной патологии плода и новорожденного [10, 11]. При этом отмечаются поражения центральной нервной системы (ЦНС). Механизм такого воздействия ЦМВИ точно не установлен.

Важнейшим метаболитом прогестерона, участвующим в обмене и биохимических процессах головного мозга беременной женщины и развитии нервной системы плода, является аллопрегненолон (5-прегнан-3 α -ол,20-он). Он синтезируется исключительно из прогестерона через образование 5 α -дигидропрогестерона (5 α -ДГП). В период гестации 5 α -ДГП синтезируется в трофобласте плаценты [5, 6]. Прогестерон и его метаболиты: 5 α -ДГП (5 α -прегнан-3,20-дион) и 5 α -прегнан-3 α -ол,20-он играют важную роль в защите клеток ЦНС и нервных волокон, под их постоянным воздействием формируется головной мозг развивающегося плода [3, 12, 16]. Целый ряд авторов указывает на неблагоприятное воздействие от снижения уровней данных веществ на ЦНС, в том числе и в период беременности [3, 5], причина же такого снижения остаётся неясной. Поэтому мы считаем целесообразным проанализировать, каким образом обострение ЦМВИ повлияет на прогестерон и процесс его преобразования в метаболиты в плаценте.

Цель данной работы – изучить активность преобразования прогестерона и 5 α -прегнан-3,20-диона в плаценте при реактивации ЦМВИ в первом триместре беременности.

Материалы и методы исследования

Для достижения поставленной цели с учетом принципа рандомизации сформирован и исследован материал двух групп. В первую вошли 50 ворсинчатых хорионов, взятых при проведении медицинских аборт на сроке 8-10 недель от женщин с диагнозом обострение хронической ЦМВИ, во вторую (контрольная группа) – 35 ворсинчатых хорионов беременных с хронической ЦМВИ в латентной стадии. Пациентки первой и второй групп были сопоставимы по возрасту, сроку гестации, отсутствию хронической соматической патологии и имели неосложненный акушерско-гинекологический анамнез.

Исследования проведены в соответствии с кодексом этических принципов Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации с поправками 2013 г. и правилами клинической практики в РФ, утвержденными приказом Минздрава РФ №200н от 1 апреля 2016 года.

Диагноз обострения хронической ЦМВИ устанавливался на основании данных лабораторной диагностики. Использовались сочетание прямых (выявление ДНК ЦМВ) и непрямых методов исследования (наличие IgM к ЦМВ или увеличение титра типоспецифических антител IgG в динамике, индекса avidности

более 50%).

При серологическом исследовании периферической крови беременной определяли типоспецифические антитела, индекс avidности методами ИФА на спектрофотометре Stat Fax-2100 (США) с использованием тест-систем «Вектор-Бест» (Новосибирск). ДНК ЦМВ в биологическом материале (периферическая кровь, соскоб буккального эпителия, содержимое цервикального канала) обнаруживали методом ПЦР на аппарате ДТ-96 с использованием сертифицированных наборов «ДНК-технология» (Москва). Содержание прогестерона определяли на спектрофотометре Stat Fax-2100 с помощью набора «Алкор Био» (Санкт-Петербург). Для анализа метаболизма прогестерона были проведены гистохимические реакции на выявление фермента, конвертирующего прогестерон, по прописи З.Лойда и соавт. [1]. Субстратом для его выявления стал 4-прегнен-3,20-дион (SIGMA, Германия). Активность дегидрогеназы 5 α -прегнан-3,20-диона (относится к группе 3 α -гидроксистероиддегидрогеназ) определяли на криостатных срезах свежемороженой нефиксированной ткани гистохимическим методом по прописи З.Лойда и соавт. [1]. Полученные данные анализировали с помощью программы Scion (США) на цифровом микроскопе MEIJI (Япония).

В оценке результатов исследования использован программный пакет Statistica 10.0. Результаты представлены в виде средней величины и стандартной ошибки средней ($M \pm m$). Предварительно была проведена проверка нормальности распределения по критериям асимметрии, эксцесса, Колмогорова-Смирнова. Сравнение показателей с нормальным распределением выполнено с помощью t-критерия Стьюдента для параметрических данных. Отличия считались достоверными при доверительном уровне 95%.

Результаты исследования и их обсуждение

В гомогенате ворсинчатых хорионов 8-10 недель беременности контрольной группы концентрация прогестерона составляла $53,4 \pm 3,70$ нмоль/л. Содержание гормона в ворсинчатых хорионах женщин с обострением ЦМВИ во время беременности было значительно меньше – $21,5 \pm 2,73$ нмоль/л, чем концентрация гормона при физиологической беременности ($p < 0,001$). Изменение численных значений концентрации прогестерона указывает на то, что при обострении ЦМВИ существенно уменьшалось содержание субстрата для дальнейшего превращения гормона. Для подтверждения этого была проведена гистохимическая реакция на выявление 4-прегнен-20,3-диона (прогестерона). Продукт реакции хорошо определялся в синцитиотрофобласте и цитотрофобласте хориальных ворсин контрольной группы (рис. 1). Цитофотометрически его содержание составило $28,6 \pm 0,58$ усл. ед. В ворсинчатом хорионе от женщин, перенесших обострение ЦМВИ (рис. 2) отмечалось статистически значимо уменьшение интенсивности реакции до $15,9 \pm 0,47$ усл. ед. ($p < 0,001$). В ворсинчатых хорионах основной группы отмечалось снижение количества продукта ги-

стохимической реакции и на 5 α -прегнан-3,20-дион до 16,2 \pm 1,11 усл. ед. по сравнению с показателями контрольной группы (25,0 \pm 1,91 усл. ед.; $p < 0,001$), отражающей уменьшение интенсивности преобразования прогестерона в его метаболит 5 α -прегнан-3,20-дион (5 α -ДГП), предшественник аллопрегненолона (рис. 3,

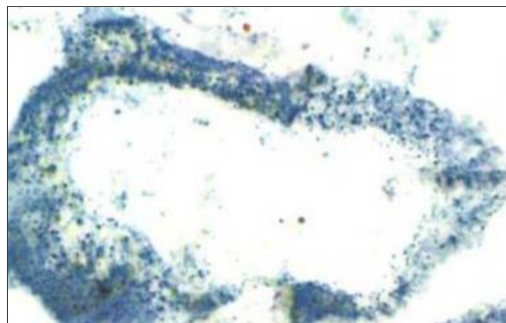


Рис. 1. Синцитиотрофобласт ворсинчатого хориона 10 недель беременности (контрольная группа). Интенсивная гистохимическая реакция на дегидрогеназу 4-прегнен-20,3-диона (средние значения 28,6 \pm 0,18 усл. ед.). Увеличение: 15 \times 40.

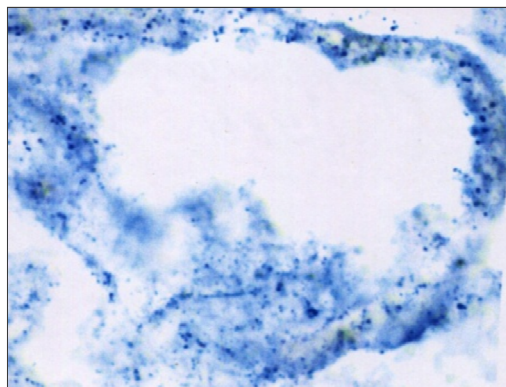


Рис. 3. Синцитиотрофобласт ворсинчатого хориона 10 недель беременности (контрольная группа). Интенсивная гистохимическая реакция на дегидрогеназу 5-прегнан-3 α -ол,20-она (средние значения 25,0 \pm 1,91 усл. ед.). Увеличение: 15 \times 40.

На сегодняшний день накоплено достаточно данных, свидетельствующих, что снижение прогестерона, 5 α -ДГП, аллопрегненолона во время беременности ведет к нарушению нейрогенеза с задержкой психомоторного и умственного развития, а иногда и к развитию серьезных неврологических патологий [8, 9, 13-15]. Происходит это поскольку данные гормоны играют фундаментальную роль в процессе миелинизации нервных волокон, пролиферации и дифференцировке нервных клеток, что крайне важно в формировании и функционировании ЦНС в целом. Прогестерон и его метаболиты увеличивает количество олигодендроцитов, экспрессирующего основной белок миелина и необходимые ферменты, а также стимулируют рост дендритов, соматогенез, спиногенез, увеличение конуса роста аксона в незрелых нейронах [3, 4, 7].

Кроме этого установлено, что недостаток уровней нейроактивных гестагенов лишает плод основного эндогенного нейропротекторного механизма и увеличи-

4). Выявленные факты свидетельствовали об уменьшении содержания продуктов, образующихся в результате ферментативной реакции, то есть интенсивность преобразования прогестерона в необходимые метаболиты была снижена.

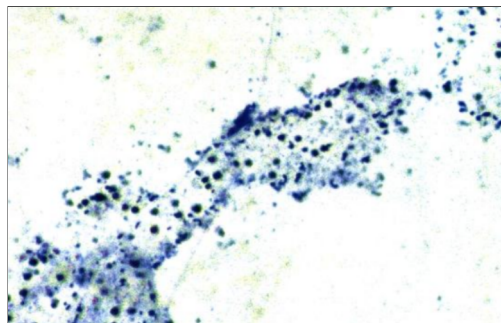


Рис. 2. Синцитиотрофобласт ворсинчатого хориона 10 недель беременности женщины с обострением ЦМВИ. Гистохимическая реакция на дегидрогеназу 4-прегнен-20,3-диона ослаблена (средние значения 15,9 \pm 0,17 усл. ед.). Увеличение: 15 \times 40.

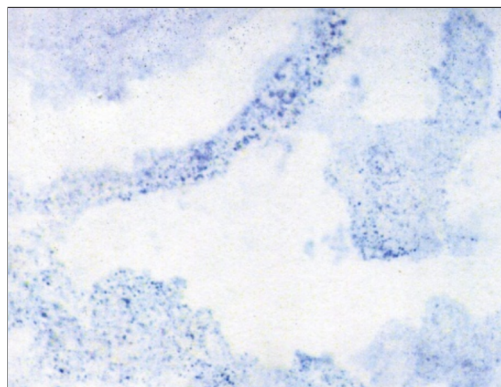


Рис. 4. Синцитиотрофобласт ворсинчатого хориона 10 недель беременности женщины с обострением ЦМВИ. Гистохимическая реакция на дегидрогеназу 5-прегнан-3 α -ол,20-она ослаблена (средние значения 16,2 \pm 1,11 усл. ед.). Увеличение: 15 \times 40.

вают риск повреждения мозга [15]. Это приводит к увеличению апоптотической гибели нейронов и глиальных клеток и снижению процессов нормального формирования нервной системы [5, 13]. Мы считаем, что данное обстоятельство могло послужить причиной нарушения формирования нервной системы плода.

Таким образом, обострение ЦМВИ в гестационный период действует как повреждающий фактор на метаболизм прогестерона, приводя к снижению содержания гормона и его важнейших для формирования нервной системы метаболитов: 5 α -ДГП и 5 α -прегнан-3 α -ол,20-она. Это, в свою очередь, может задерживать развитие и дифференцировку клеток предшественников олигодендроцитов, что ведет к нарушению процесса миелинизации нервного волокна, повреждению белого вещества головного мозга и развитию неблагоприятных неврологических последствий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лойда З., Госсрау Р., Шиблер Т. Гистохимия фер-

ментов. Лабораторные методы: пер. с англ. М.: Мир, 1982. 272 с.

2. Луценко М.Т., Андриевская И.А., Довжикова И.В., Соловьева А.С. Фетоплацентарная система при обострении герпес-вирусной инфекции во время беременности. Новосибирск-Благовещенск, 2010. 245 с.

3. Ходжаева З.С., Стеньяева Н.Н., Силаев К.А., Мунинова К.Т., Хритинин Д.Ф. Нейробиологические эффекты прогестерона и его метаболитов в акушерской практике // Акушерство и гинекология. 2016. №5. С.25–32.

4. Baulieu E., Schumacher M. Progesterone as a neuroactive neurosteroid, with special reference to the effect of progesterone on myelination // *Steroids*. 2000. Vol. 65, № 10-11. P. 605–612.

5. Brunton P.J., Russell J.A., Hirst J.J. Allopregnanolone in the brain: protecting pregnancy and birth outcomes // *Prog. Neurobiol.* 2014. Vol.113. P.106–136. doi: 10.1016/j.pneurobio.2013.08.005

6. Dombroski R.A., Casey M.L., MacDonald P.C. 5-Alpha-dihydroprogesterone formation in human placenta from 5alpha-pregnan-3beta/alpha-ol-20-ones and 5-pregnan-3beta-yl-20-one sulfate // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1997. Vol.63, №1-3. P.155–163.

7. Ghomari A.M., Ibanez C., El-Etr M., Leclerc P., Eychenne B., O'Malley B.W., Baulieu E.E., Schumacher M. Progesterone and its metabolites increase myelin basic protein expression in organotypic slice cultures of rat cerebellum // *J. Neurochem.* 2003. Vol.86, №4. P.848–859.

8. Kelleher M.A., Palliser H.K., Walker D.W., Hirst J.J. Sex-dependent effect of a low neurosteroid environment and intrauterine growth restriction on foetal guinea pig brain development // *J. Endocrinol.* 2011. Vol.208, №3. P.301–309. doi: 10.1677/JOE-10-0248

9. Nicol M.B., Hirst J.J., Walker D.W. Effect of finasteride on behavioural arousal and somatosensory evoked potentials in fetal sheep // *Neurosci. Lett.* 2001. Vol.306, Iss.1-2. P.13–16.

10. Ornoy A., Diav-Citrin O. Fetal effects of primary and secondary cytomegalovirus infection in pregnancy // *Reprod. Toxicol.* 2006. Vol.21, №4. P.399–409.

11. Pereira L., Tabata T., Petitt M., Fang-Hoover J. Congenital cytomegalovirus infection undermines early development and functions of the human placenta // *Placenta*. 2017. Vol.59, Suppl.1. P.8–16. doi: 10.1016/j.placenta.2017.04.020

12. Schumacher M., Mattern C., Ghomari A., Oudinet J.P., Liere P., Labombarda F., Sitruk-Ware R., De Nicola A.F., Guennoun R. Revisiting the roles of progesterone and allopregnanolone in the nervous system: resurgence of the progesterone receptors // *Prog. Neurobiol.* 2014. Vol.113. P.6–39. doi: 10.1016/j.pneurobio.2013.09.004

13. Yawno T., Hirst J.J., Castillo-Melendez M., Walker D.W. Role of neurosteroids in regulating cell death and proliferation in the late gestation fetal brain // *Neuroscience*. 2009. Vol.163, №3. P.838–847. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.07.009

14. Yawno T., Yan E.B., Hirst J.J., Walker D.W. Neuroactive steroids induce changes in fetal sheep behavior

during normoxic and asphyxic states // *Stress*. 2011. Vol.14, №1. P.13–22. doi: 10.3109/10253890.2010.504789

15. Yawno T., Yan E.B., Walker D.W., Hirst J.J. Inhibition of neurosteroid synthesis increases asphyxia-induced brain injury in the late gestation fetal sheep // *Neuroscience*. 2007. Vol.146, №4. P.1726–1733.

16. Zhang Z., Yang R., Cai W., Bai Y., Sokabe M., Chen L. Treatment with progesterone after focal cerebral ischemia suppresses proliferation of progenitor cells but enhances survival of newborn neurons in adult male mice // *Neuropharmacology*. 2010. Vol.58, №6. P.930–939. doi: 10.1016/j.neuropharm.2010.01.002

REFERENCES

1. Lojda Z., Gossrau R., Schiebler T. Enzyme histochemistry: a laboratory manual. Moscow: Mir; 1982 (in Russian).

2. Lutsenko M.T., Andrievskaya I.A., Dovzhikova I.V., Solov'eva A.S. Fetoplacental system in exacerbation of herpesvirus infection during pregnancy. Novosibirsk-Blagoveshensk; 2010 (in Russian).

3. Khodzhaeva Z.S., Stenyayeva N.N., Silaev K.A., Muninova K.T., Khritinin D.F. Neurobiological effects of progesterone and its metabolites in obstetric practice. *Akusherstvo i ginekologiya* 2016; 5:25–32 (in Russian).

4. Baulieu E., Schumacher M. Progesterone as a neuroactive neurosteroid, with special reference to the effect of progesterone on myelination. *Steroids* 2000; 65(10-11): 605–612.

5. Brunton P.J., Russell J.A., Hirst J.J. Allopregnanolone in the brain: protecting pregnancy and birth outcomes. *Prog. Neurobiol.* 2014; 113:106–136. doi: 10.1016/j.pneurobio.2013.08.005

6. Dombroski R.A., Casey M.L., MacDonald P.C. 5-Alpha-dihydroprogesterone formation in human placenta from 5alpha-pregnan-3beta/alpha-ol-20-ones and 5-pregnan-3beta-yl-20-one sulfate. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1997; 63(1-3):155–163.

7. Ghomari A.M., Ibanez C., El-Etr M., Leclerc P., Eychenne B., O'Malley B.W., Baulieu E.E., Schumacher M. Progesterone and its metabolites increase myelin basic protein expression in organotypic slice cultures of rat cerebellum. *J. Neurochem.* 2003; 86(4):848–859.

8. Kelleher M.A., Palliser H.K., Walker D.W., Hirst J.J. Sex-dependent effect of a low neurosteroid environment and intrauterine growth restriction on foetal guinea pig brain development. *J. Endocrinol.* 2011; 208(3):301–309. doi: 10.1677/JOE-10-0248

9. Nicol M.B., Hirst J.J., Walker D.W. Effect of finasteride on behavioural arousal and somatosensory evoked potentials in fetal sheep. *Neurosci. Lett.* 2001; 306(1-2):13–16.

10. Ornoy A., Diav-Citrin O. Fetal effects of primary and secondary cytomegalovirus infection in pregnancy. *Reprod. Toxicol.* 2006; 21(4):399–409.

11. Pereira L., Tabata T., Petitt M., Fang-Hoover J. Congenital cytomegalovirus infection undermines early development and functions of the human placenta. *Placenta*. 2017; 59(1):S8-S16. doi: 10.1016/j.placenta.2017.04.020

12. Schumacher M., Mattern C., Ghoumari A., Oudinet J.P., Liere P., Labombarda F., Sitruk-Ware R., De Nicola A.F., Guennoun R. Revisiting the roles of progesterone and allopregnanolone in the nervous system: resurgence of the progesterone receptors. *Prog. Neurobiol.* 2014; 113:6–39. doi: 10.1016/j.pneurobio.2013.09.004

13. Yawno T., Hirst J.J., Castillo-Melendez M., Walker D.W. Role of neurosteroids in regulating cell death and proliferation in the late gestation fetal brain. *Neuroscience* 2009; 163(3):838–847. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.07.009

14. Yawno T., Yan E.B., Hirst J.J., Walker D.W. Neuroactive steroids induce changes in fetal sheep behavior

during normoxic and asphyxic states. *Stress* 2011; 14(1):13–22. doi: 10.3109/10253890.2010.504789

15. Yawno T., Yan E.B., Walker D.W., Hirst J.J. Inhibition of neurosteroid synthesis increases asphyxia-induced brain injury in the late gestation fetal sheep. *Neuroscience* 2007; 146(4):1726–1733.

16. Zhang Z., Yang R., Cai W., Bai Y., Sokabe M., Chen L. Treatment with progesterone after focal cerebral ischemia suppresses proliferation of progenitor cells but enhances survival of newborn neurons in adult male mice. *Neuropharmacology.* 2010; 58(6):930–939. doi: 10.1016/j.neuropharm.2010.01.002

Поступила 12.02.2018

Контактная информация

Инна Викторовна Довжикова,

доктор биологических наук,

ведущий научный сотрудник лаборатории механизмов

этиопатогенеза и восстановительных процессов дыхательной системы

при неспецифических заболеваниях легких,

Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания,

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

E-mail: dov_kova100@rambler.ru

Correspondence should be addressed to

Inna V. Dovzhikova,

PhD, DSc, Leading staff scientist 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: dov_kova100@rambler.ru