

УДК 577.115(611-018.74:618.38)616-053.31]578.825.12

DOI: 10.12737/article_5b97620157ca74.16586266

ПРОЦЕССЫ ПЕРОКСИДАЦИИ ЛИПИДОВ В ЭНДОТЕЛИИ АРТЕРИИ ПУПОВИНЫ ПРИ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ**Н.Н.Дорофиевко, Н.А.Ишутина, И.А.Андриевская***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 – изучение процессов пероксидации липидов и их влияния на структуру эндотелия артерии пуповины новорожденных от матерей, перенесших обострение цитомегаловирусной (ЦМВ) инфекции в третьем триместре беременности. Объект исследования – 45 образцов пуповины, взятых при родах от женщин, перенесших обострение ЦМВ инфекции в третьем триместре беременности (основная группа), и 25 образцов пуповины от практически здоровых женщин (контрольная группа). Клинический диагноз первичной ЦМВ инфекции устанавливали по наличию в периферической крови антител IgM к ЦМВ, низкоавидных IgG (индекс авидности <50%), а также ДНК ЦМВ, выявляемой методом полимеразной цепной реакции в крови или моче; обострение хронической ЦМВ инфекции – по наличию IgM к ЦМВ, высокоавидных IgG (индекс авидности >65%), а также ДНК ЦМВ в соскобах с буккального эпителия. Перекиси липидов в эндотелии артерии пуповины выявляли по методу Винклера-Шульце. Морфологическое исследование пуповины проводили гистохимическими методами. Результаты гистохимического исследования свидетельствуют о том, что обострение ЦМВ инфекции в третьем триместре беременности ассоциировано с окислительным стрессом, обуславливающим истощение защитных систем и окислительного потенциала, что приводит к развитию значительной окислительной деструкции эндотелия артерии пуповины новорожденных. Выявленные морфогистохимические изменения в тканях пуповины при ЦМВ инфекции могут отражаться на функциональном состоянии данного органа и являться морфологическим субстратом для возникновения его дисфункции, главным образом, основой для нарушения фетоплацентарного кровообращения, обуславливающего развития гипоксии.

Ключевые слова: пероксидация липидов, эндотелий пуповины, цитомегаловирусная инфекция, новорожденные.

SUMMARY**THE PROCESSES OF LIPID PEROXIDATION IN THE ENDOTHELIUM OF THE ARTERIES OF THE UMBILICAL CORD IN CYTOMEGALOVIRUS INFECTION****N.N.Dorofienko, N.A.Ishutina, I.A.Andrievskaya**

The purpose of the work is to study the processes of peroxidation of lipids and their influence on the structure of the endothelium of the umbilical artery of newborns from mothers who had experienced exacerbation of cytomegalovirus (CMV) infection in the third trimester of pregnancy. For the object of the study there were taken 45 umbilical cord samples during childbirth from women who had acute CMV infection in the third trimester of pregnancy (main group), and 25 umbilical cord samples from healthy women (control group). Clinical diagnosis of primary CMV infection was established by the presence of IgM antibodies to CMV and low-avid IgG in the peripheral blood (avidity index <50%), as well as CMV DNA detected by polymerase chain reaction in blood or urine; exacerbation of chronic CMV infection by the presence of IgM to CMV, high-avid IgG (avidity index >65%), and CMV DNA in scrapes taken from buccal epithelium. Lipid peroxides in the endothelium of the umbilical artery were detected by the Winkler-Schulze method. Morphological examination of the umbilical cord was performed by histochemical methods. The results of histochemical studies indicate that the exacerbation of CMV infection in the third trimester of pregnancy is associated with oxidative stress that causes the depletion of the protective systems and oxidant potential, which leads to the development of significant oxidative destruction of the endothelium of the umbilical cord artery of newborns. The revealed morphohistochemical changes in umbilical cord tissues in CMV infection can affect the functional state of this organ and be a morphological substrate for the appearance of its dysfunction, mainly the basis for the violation of fetoplacental blood circulation causing the development of hypoxia.

Key words: peroxidation of lipids, the endothelium of the umbilical cord, cytomegalovirus infection, newborn.

Одной из главных проблем современного акушерства является снижение перинатальной заболеваемости и смертности. В 75% случаев причинами перинатальной смертности служат гипоксия плода, асфиксия новорожденного и внутричерепная травма гипоксического генеза, обусловленные патологией пуповины [4, 13, 14].

В основном исследователи уделяют внимание состоянию плода и плаценты, нарушение функции пуповины обычно рассматривают только в связи с тугим

обвитием вокруг шеи плода и образованием истинного узла [13]. Пуповина представляет собой орган, который играет динамическую роль в процессах взаимодействия двух организмов – матери и плода, а различные нарушения функции пуповины могут быть причиной серьезных патологических процессов у плода и новорожденных детей [7].

Изучение окислительного стресса в фетоплацентарной системе (плацента, периферическая кровь матери и кровь пуповины) широко представлено в материалах исследований [1, 6], в том числе и данные, полученные нами ранее [2, 3]. Показано, что первичная цитомегаловирусная (ЦМВ) инфекция способствует окислительному стрессу в эндотелиальных клетках и снижает биодоступность оксида азота (II) [12]. Обострение ЦМВ инфекции ассоциировано с высокой экспрессией фермента 5-липоксигеназы в эндотелиальных клетках пуповины, что сопровождается повышенным биосинтезом провоспалительного лейкотриена B_4 , который способствует локальному воспалению в сосудистой сети [8]. Следует указать о том, что в регуляции окислительного стресса, апоптоза и пролиферации клеток в эндотелиоцитах пупочной вены человека участвует эндотелин-1, который опосредует окислительный стресс через эндотелин В рецептор/НАДФН-оксидазы зависимых путей [9].

Цель исследования – изучение процессов перекисидации липидов и их влияния на структуру эндотелия артерии пуповины новорожденных от матерей, перенесших обострение ЦМВ инфекции в третьем триместре беременности.

Материалы и методы исследования

Исследование проведено на базе лаборатории механизмов этиопатогенеза и восстановительных процессов дыхательной системы при неспецифических заболеваниях легких ДНЦ ФПД совместно с ГАУЗ АО «Благовещенская городская клиническая больница».

Объектом для исследования послужили 45 образцов пуповин, взятых при родах от женщин, перенесших в обострение ЦМВ инфекции в третьем триместре беременности – основная группа. Контрольную группу составили 25 образцов пуповины от практически здоровых женщин. Средний возраст рожениц основной группы составил $24,5 \pm 0,5$ года и значительно не отличался от контрольной группы – $23,6 \pm 0,3$ года ($p > 0,05$).

Критериями включения в исследование явились: обострение ЦМВ инфекции в третьем триместре беременности; острая респираторно-вирусная инфекция, сопровождающаяся ринофарингитом; стойкая клиническая ремиссия герпес-вирусной инфекции.

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

Клинический диагноз первичной ЦМВ инфекции устанавливали по наличию в периферической крови антител (иммуноглобулин, Ig) класса М к ЦМВ, низко-

авидных IgG (индекс авидности $< 50\%$), а также ДНК ЦМВ, выявляемой методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в крови или моче; обострение хронической ЦМВ инфекции – по наличию IgM к ЦМВ, высокоавидных IgG (индекс авидности $> 65\%$), а также ДНК ЦМВ в соскобах с буккального эпителия.

Определение типоспецифических антител (Ig) классов М и G, индекса авидности антител класса G осуществляли методом иммуноферментного анализа на микропланшетном ридере Stat Fax 2100 (США) с использованием стандартных тест-систем ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск). Выявление ДНК ЦМВ проводили методами ПЦР на аппарате ДТ-96 с использованием наборов НПО «ДНК-технология» (Москва).

Гистохимические исследования выполняли на срезах пуповины, приготовленных на замораживающем микротоме. Перекиси липидов в эндотелии артерии пуповины выявляли по методу Винклера-Шульце с использованием в качестве субстрата *p*-амино-N,N-диметилфенилендиамин на парафиновый срез после фиксации 4% раствором параформальдегида на фосфатном буфере (рН 7,4) [5]. Полученные данные анализировали с помощью программы Scion (США) на цифровом микроскопе MEIJI (Япония).

Для изготовления полутонких срезов пуповину фиксировали на холоде в 2,5% глютаральдегиде на 0,1 М какодилатном буфере, заливали в аралдит и эпон 812. Полутонкие срезы толщиной до 1 мкм готовили на ультрамикротоме LKB-8800 (Швеция) и окрашивали толудиновым синим.

Статистический анализ и обработка данных проводился с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.0. Определение достоверности различий средних значений сравниваемых параметров между разными выборками ($M \pm m$) проводилось с использованием непарного *t*-критерия Стьюдента (*p*).

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. На проведение исследования от каждой женщины было получено информационное согласие.

Результаты исследования и их обсуждение

Перекисное окисление липидов и окислительный стресс играют ключевую роль в дисфункции эндотелиальных клеток и являются одним из патогенных факторов развития сосудистых заболеваний в период беременности [11].

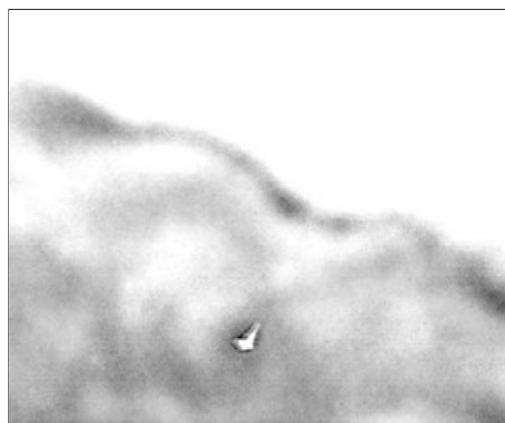
Ранее мы установили, что в условиях ЦМВ инфекции отмечаются признаки системной активации окислительного стресса в крови пуповины новорожденных детей [3]. Очевидно, в данных условиях будет наблюдаться активация перекисидации липидов и в эндотелии сосудов пуповины, что подтверждалось гистохимическими исследованиями. Была выявлена высокоактивная реакция на перекиси липидов в эндотелии артерии

пуповины новорожденного при обострении ЦМВ инфекции у матери (рис. 1а). Средние значения цитофотометрических показателей составили $89,30 \pm 1,40$ усл. ед. ($p < 0,001$), что значимо выше, чем в контроле – $12,7 \pm 0,80$ усл. ед. (рис. 1б).

Накопление перекисей липидов, образующихся при окислении арахидоновой кислоты в эндотелии артерии пуповины, приводит к увеличению проницаемости клеток эндотелия, их повреждению и апоптозу [10].

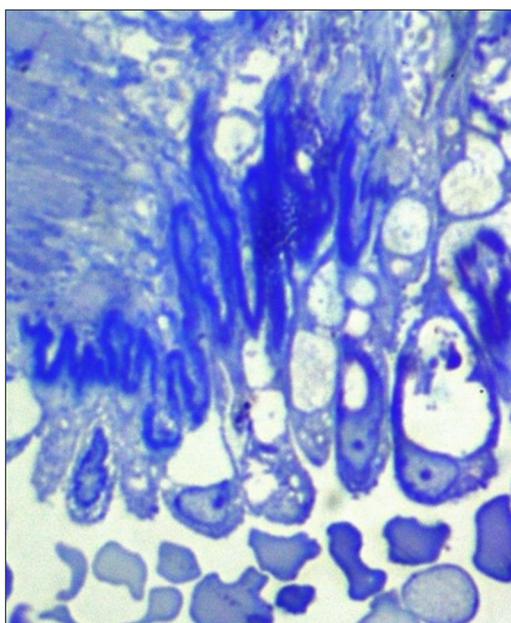


А

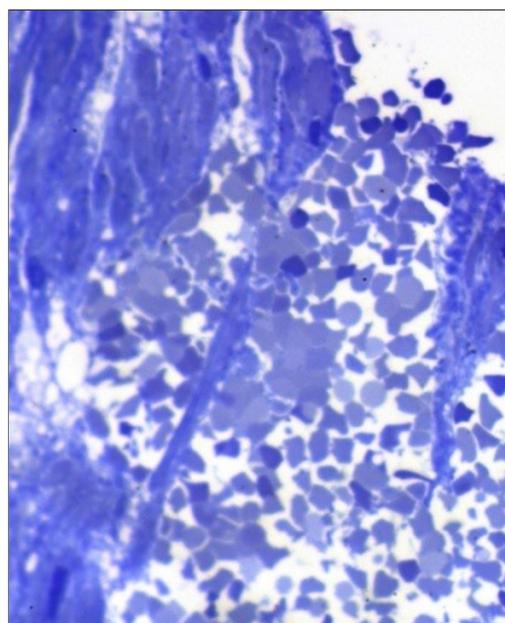


Б

Рис. 1. Эндотелий артерии пуповины новорожденного. Реакция на перекиси липидов по Винклеру-Шульце. Увеличение: 15×40 . А – основная группа. Б – контрольная группа.



А



Б

Рис. 2. Артерия пуповины. Обострение ЦМВ инфекции в третьем триместре беременности. Полутонкий срез. Окраска толуидиновым синим. А – деструктивные изменения клеток эндотелия; увеличение: 15×90 . Б – инфильтрация и отек подэндотелиального слоя; увеличение: 15×40 .

Морфологически это проявлялось в деструкции цитоплазмы и ядер клеток эндотелия, что приводило к нарушению взаимоотношения клеток с базальной мембраной и десквамации эндотелиоцитов в просвет сосудов (рис. 2а). Местами отмечался отек подэндотелиального слоя и инфильтрация лейкоцитами, что поддерживало воспалительную реакцию (рис. 2б).

Заключение

Результаты проведенного исследования свидетельствуют, что обострение ЦМВ инфекции в третьем триместре беременности ассоциировано с окислительным

стрессом, обуславливающим истощение защитных систем и окислительного потенциала, что приводит к развитию значительной окислительной деструкции эндотелия артерии пуповины новорожденных. Выявленные морфогистохимические изменения в тканях пуповины при ЦМВ инфекции могут отражаться на функциональном состоянии данного органа и являться морфологическим субстратом для возникновения нарушений его функций, главным образом, основой для нарушения фетоплацентарного кровообращения, приводящего к развитию гипоксии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арутюнян А.В., Шестопапов А.В., Акуева М., Шестопапова М.А., Буштырева И.О. Роль кислорода и его метаболитов в развитии плаценты // Журнал акушерства и женских болезней. 2008. Т.57, №4. С.115–121.
2. Дорофиевко Н.Н., Андриевская И.А., Ишутина Н.А. Провоспалительные цитокины и состояние эндотелия сосудов пуповины при цитомегаловирусной инфекции // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). 2015. Т.132, №1. С.58–61.
3. Ишутина Н.А., Дорофиевко Н.Н. Взаимосвязь изменений состава ω -6 полиненасыщенных жирных кислот и свободно-радикальных процессов в мембране эритроцитов крови пуповины новорожденных при цитомегаловирусной инфекции // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2016. Т.1, №3-2(109). С.29–32.
4. Коган Я.Э. Патология пуповины и ее роль в перинатальных осложнениях // Практическая медицина. 2016. №1(93). С.22–25.
5. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. М.: Мир, 1969. 646 с.
6. Прокопенко В.М., Павлова Н.Г. Роль про- и антиоксидантной систем в развитии дисфункции плаценты человека // Физиология человека. 2017. Т.43, №6. С.115–123.
7. Прохоров В.Н., Прохорова О.В., Медведева С.Ю. Морфология пуповины человека при некоторых патологических состояниях беременных // Уральский медицинский журнал. 2014. №4(118). С.30–33.
8. Benard M., Straat K., Omarsdottir S., Leghmari K., Bertrand J., Davrinche C., Duga-Neulat I., Söderberg-Nauclér C., Rahbar A., Casper C. Human cytomegalovirus infection induces leukotriene B4 and 5-lipoxygenase expression in human placenta and umbilical vein endothelial cells // *Placenta*. 2014. Vol.35, №6. P.345–350. doi: 10.1016/j
9. Dong F., Zhang X., Wold L.E., Ren Q., Zhang Z., Ren J. Endothelin-1 enhances oxidative stress, cell proliferation and reduces apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: role of ETB receptor, NADPH oxidase and caveolin-1 // *Br. J. Pharmacol.* 2005. Vol.145, №3. P.323–333. doi: 10.1038/sj.bjp.0706193
10. Fang W.T., Li H.J., Zhou L.S. Protective effects of prostaglandin E1 on human umbilical vein endothelial cell injury induced by hydrogen peroxide // *Acta Pharmacol. Sin.* 2010. Vol.31, №4. P.485–492. doi: 10.1038/aps.2010.23
11. Gupta S., Agarwal A., Sharma R.K. The role of placental oxidative stress and lipid peroxidation in preeclampsia // *Obstet. Gynecol. Surv.* 2005. Vol.60, №12. P.807–816. doi: 10.1097/01.ogx.0000193879.79268.59
12. Leskov I.L., Whitsett J., Vasquez-Vivar J., Stokes K.Y. NAD(P)H oxidase and eNOS play differential roles in cytomegalovirus infection-induced microvascular dysfunction // *Free Radic. Biol. Med.* 2011. Vol.51, №12. P.2300–2308. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.03
13. Westover T., Gurman E.R., Shen-Schwarz S. Pre-

natal diagnosis of an unusual nuchal cord complication in monoamniotic twins // *Obstet. Gynecol.* 1994. Vol.84, №4(Pt.2). P.689–691.

14. Westover T., Sengupta S., Shen-Schwarz S. Further complications in the stuck twin syndrome: decubiti ulcerations and iatrogenic exsanguination // *Am. J. Perinatol.* 1995. Vol.12, №6. P.401–413.

REFERENCES

1. Arutjunyan A.V., Shestopalov A.V., Akueva M., Shestopalova M.A., Bushtyryova I.O. The role of oxygen and its metabolites in placenta development. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney* 2008; 57(4):115–121 (in Russian).
2. Dorofienko N.N., Andrievskaya I.A., Ishutina N.A. Proinflammatory cytokines and endothelial umbilical vessels in cytomegalovirus infection. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Irkursk)* 2015; 132(10):58–61 (in Russian).
3. Ishutina N.A., Dorofienko N.N. Correlation of changes of ω -6 polyunsaturated fatty acids and free radical processes in erythrocyte membranes of umbilical cord of newborns with cytomegalovirus infection. *Acta Biomedica Scientifica* 2016; 3(Pt.2):29–32 (in Russian).
4. Kogan Ya.E. Umbilical cord pathology and its role in perinatal complications. *Prakticheskaya meditsina* 2016; 1:22–25 (in Russian).
5. Lilli P. Pathohistological technique and practical histochemistry. Moscow: Mir; 1969 (in Russian).
6. Prokopenko V.M., Pavlova N.G. The role of pro- and antioxidant system in the dysfunction of human placenta development. *Fiziologiya cheloveka* 2017; 43(6):115–123 (in Russian). doi: 10.7868/S0131164617060091
7. Prokhorov V.N., Prokhorova O.V., Medvedeva S.Y. The morphology of human umbilical cord tissues in some pregnant morbid conditions. *Ural'skiy meditsinskiy zhurnal* 2014; 4:30–33.
8. Benard M., Straat K., Omarsdottir S., Leghmari K., Bertrand J., Davrinche C., Duga-Neulat I., Söderberg-Nauclér C., Rahbar A., Casper C. Human cytomegalovirus infection induces leukotriene B4 and 5-lipoxygenase expression in human placenta and umbilical vein endothelial cells. *Placenta* 2014; 35(6):345–350. doi: 10.1016/j
9. Dong F., Zhang X., Wold L.E., Ren Q., Zhang Z., Ren J. Endothelin-1 enhances oxidative stress, cell proliferation and reduces apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: role of ETB receptor, NADPH oxidase and caveolin-1. *Br. J. Pharmacol.* 2005; 145(3):323–333. doi: 10.1038/sj.bjp.0706193
10. Fang W.T., Li H.J., Zhou L.S. Protective effects of prostaglandin E1 on human umbilical vein endothelial cell injury induced by hydrogen peroxide. *Acta Pharmacol. Sin.* 2010; 31(4):485–492. doi: 10.1038/aps.2010.23
11. Gupta S., Agarwal A., Sharma R.K. The role of placental oxidative stress and lipid peroxidation in preeclampsia. *Obstet. Gynecol. Surv.* 2005; 60(12):807–816. doi: 10.1097/01.ogx.0000193879.79268.59
12. Leskov I.L., Whitsett J., Vasquez-Vivar J., Stokes K.Y. NAD(P)H oxidase and eNOS play differential roles

in cytomegalovirus infection-induced microvascular dysfunction. *Free Radic. Biol. Med.* 2011; 51(12):2300–2308. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.039

13. Westover T., Gurman E.R., Shen-Schwarz S. Prenatal diagnosis of an unusual nuchal cord complication in monoamniotic twins. *Obstet. Gynecol.* 1994; 84(4

Pt.2):689–691.

14. Westover T., Sengupta S., Shen-Schwarz S. Further complications in the stuck twin syndrome: decubiti ulcerations and iatrogenic exsanguination. *Am. J. Perinatol.* 1995; 12(6):401–413.

Поступила 01.06.2018

Контактная информация

Николай Николаевич Дорофиевко,

кандидат медицинских наук,

старший 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: dorofienko-nn@mail.ru

Correspondence should be addressed to

Nikolay N. Dorofienko,

MD, PhD, Senior Staff Scientist of Laboratory of Etiopathogenesis of Mechanisms and Recovery

Processes of the Respiratory System at Nonspecific Lung Diseases,

Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration,

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

E-mail: dorofienko-nn@mail.ru