

ДАЛЬНЕВОСТОЧНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ФИЗИОЛОГИИ
И ПАТОЛОГИИ ДЫХАНИЯ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РАМН

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

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ
НАРУШЕНИЯ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ФУНКЦИИ
ПЛАЦЕНТЫ ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ, ОСЛОЖНЕННОЙ
ГЕРПЕС-ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ**

Владивосток
Дальнаука
2012

УДК 618.36-06:616.523

ББК 57.1

Л82

Луценко М.Т., Андриевская И.А., Довжикова И.В., Ишутина Н.А.
Морфофункциональные закономерности нарушения дыхательной функции плаценты при беременности, осложненной герпес-вирусной инфекцией. – Владивосток: Дальнаука, 2012. – 143 с.

В монографии изложены современные представления о повреждающем действии герпес-вирусной инфекции на организм беременной в период гестации. Представлены результаты комплексного морфофункционального исследования нарушений под действием герпес-вирусной инфекции синтеза плацентарных гормонов и липидного обмена, а также снижения при этом дыхательной функции плаценты. Изучены механизмы повреждения фетоплацентарного барьера при обострении герпес-вирусной инфекции в третьем триместре гестации.

Монография предназначена для научных работников, а также врачей акушеров-гинекологов.

Ил. 23, табл. 17, библи. 111.

Научный редактор Ю.М. Перельман, д-р мед. наук, профессор.

Рецензенты: В.П. Колосов, член-корреспондент РАМН, д-р мед. наук, профессор; А.С. Соловьева, д-р мед. наук, профессор.

Утверждено к печати решением Ученого совета Федерального государственного бюджетного учреждения «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук (№6 от 29 июня 2012 г.)

ISBN 978-5-8044-1291-4

© Луценко М.Т., Андриевская И.А., Довжикова И.В., Ишутина Н.А.

© Дальнаука, 2012

The monograph deals with the modern conception about damaging action of a herpes-virus infection on an organism of the women during the period of gestation. Results of complex morphofunctional researches of placental hormones synthesis and lipid metabolism disturbances and also decrease in respiratory function of a placenta in exacerbation of a herpes-virus infection are presented. Fetoplacental barrier damage mechanisms in exacerbation of a herpes-virus infection in the third trimester gestation are investigated.

The monograph are intended for science officers and obstetricians.

Ill. 23, tab. 17, bibl. 111.

The scientific editor J.M. Perelman, PhD, MD, professor.

The reviewer: V.P. Kolosov, PhD, MD, professor, corresponding member of Russian Academy of Medical Science; A.S.Solovyova, PhD, MD.

СОДЕРЖАНИЕ

Список используемых сокращений.....	5
Введение.....	6
Синтез холестерина в плаценте беременных, перенесших во время гестации герпес-вирусную инфекцию и его влияние на гормональный фон беременной	10
Механизмы и закономерности развития нарушений кислородтранспортной функции периферической крови рожениц и крови пуповины при обострении герпес-вирусной инфекции.....	29
Закономерности липидного обмена у беременных, перенесших обострение герпес-вирусной инфекции в период гестации	45
Морфофункциональные закономерности нарушения дыхательной функции плаценты при беременности, осложненной герпес-вирусной инфекцией	51
Нарушения газотранспортной функции плаценты, влияющие на состояние плода и новорожденного.....	62
Методы исследования, разработанные авторами для изучения дыхательной функции плаценты.....	74
Заключение	130
Литературные источники	133

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АТФ	– аденозинтрифосфорная кислота
АЦ	– аденилатциклаза
ВПГ-1	– вирус простого герпеса 1 типа
ГВИ	– герпес-вирусная инфекция
ГП	– глутатионпероксидаза
ГР	– глутатионредуктаза
Г-6-ФДГ	– глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа
ДГК	– докозогексаеновая кислота
2,3-ДФГ	– 2,3-дифосфоглицериновая кислота
Е2	– 17 β -эстрадиол
ЖК	– жирная кислота
ИФА	– иммуноферментный анализ
ЛПВП	– липопротеиды высокой плотности
ЛПНП	– липопротеиды низкой плотности
МДА	– малоновый диальдегид
НАДФ	– никотин амидадениндинуклеотидфосфат
ПНЖК	– полиненасыщенные кислоты
СОД	– супероксиддисмутаза
ФР	– физиологический раствор
цГМФ	– циклический гуанозинмонофосфат
цАМФ	– циклический аденозинмонофосфат
Bcl-2	– антиапоптозные факторы семейства Bcl-2
BE	– буферные основания крови
Hb	– гемоглобин
HbO ₂	– оксигемоглобин
HCO ₃ -act	– истинные бикарбонаты крови
HCO ₃ -std	– стандартные бикарбонаты крови
Hps-70	– белок теплового шока 70
IL-1, 2, 4, 8	– интерлейкины 1, 2, 4, 8
INF γ	– интерферон γ
IgG	– иммуноглобулины класса G
IgM	– иммуноглобулин класса M
NK	– натуральные киллеры
NO	– оксид азота
metHb	– метгемоглобин
O ₂ Sat	– сатурация гемоглобина кислородом
P	– фосфор
pO ₂	– парциальное напряжение кислорода
pCO ₂	– парциальное напряжение углекислого газа
tCO ₂	– общий бикарбонат крови
TNF α	– фактор некроза опухоли α

ВВЕДЕНИЕ

К числу важнейших патологических проявлений вируса герпеса в период беременности относится нарушение дыхательной функции центральных и периферических звеньев морфофункциональной системы «мать – плацента – плод», патогенез которой, несмотря на нарастающий интерес исследователей к данной проблеме, до настоящего времени остается неясным. Выраженные функциональные перестройки в организме беременной, а также дистантное влияние персистирующей инфекции напрямую воздействуют на компоненты системы эритрона и плацентарного комплекса, отвечающих за транспорт газов между матерью и плодом, что сопровождается формированием новых порочных кругов в цепи причинно-следственных отношений, как усугубляющих течение основного заболевания, так и предопределяющих скрытое неблагополучие развивающегося плода.

Угроза развития тяжелых анемических состояний плода при хронической герпесной инфекции у матери возрастает в период рецидива и связана в первую очередь с высокой чувствительностью плаценты к токсическому действию вируса. При этом определяющую роль в механизмах вовлечения плаценты в патологический процесс при вирусных инфекциях играют структурно-функциональные перестройки ее мембранного и особенно ядерного аппарата. Изменение ядерной активности, а в отдельных случаях ингибирование процессов транскрипции, вызванных различными сигнальными системами (вирусы, интерлейкины, биогенные амины, глюкокортикоиды, цАМФ, протеинкиназы, эндонуклеазы и др.), приводят к подавлению синтетических и энергетических функций плаценты, нарушая газообмен между матерью и плодом.

В крови плода в условиях инфицирования накапливаются кислые продукты обмена, которые при избыточном количестве нарушают ферментативные процессы в клетках, вызывая резкое угнетение их функций.

Вышеуказанные факторы позволяют предположить, что герпесвирусная инфекция стимулирует появление ранних форм тканевой гипоксии в результате прямого токсического воздействия вирусного

агента и влияния продуктов свободнорадикального происхождения на дыхательную и кровеносную системы фетоплацентарного комплекса, активность ферментативных реакций, ответственных за скорость анаэробных энергоемких процессов, особенно важных для плода в критические периоды его антенатального развития.

Необходимо также подчеркнуть, что при изучении механизмов развития анемии у беременных с герпесной патологией возможна оценка качественного состояния периферического звена эритрона, поскольку изменения структуры мембран и метаболизма эритроцитов периферической крови, как правило, предшествуют структурным изменениям тканей плаценты. Особый интерес в данном направлении приобретает изучение молекулярной организации и патохимических особенностей мембран эритроцитов, так как мембрана и цитоскелет не только являются составными частями эритроцита и структурами, необходимыми для поддержания уникальной формы клеток красной крови, но и принимают непосредственное участие в их метаболизме. Нарушения в структуре и свойствах взаимосвязанных компонентов эритроцита (мембраны, цитоскелета, гемоглобина, гликолитических ферментов и др.) отражаются на общем метаболическом состоянии клетки, ее способности выполнять перенос газов. Поэтому исследование молекулярной структуры эритроцитов периферической крови, являющихся, по мнению многих авторов, универсальной моделью в оценке интенсивности и объема мембранодестабилизирующих процессов – важный аспект в изучении данной проблемы. Следует отметить, что общность крови с широким кругом тканей, производных мезенхимы, позволяет, изучая структурно-функциональные особенности мембран эритроцитов матери и плода, вскрыть закономерности, характерные для клеточных мембран различных органов и тканей, главным образом плаценты, в условиях герпесной патологии и без нее.

Можно предположить, что изменения липидного и белкового компонентов мембран эритроцитов, происходящие под воздействием вируса герпеса, могут приводить к структурной дезорганизации плазматической мембраны, нарушению ее проницаемости для ионов,

что в дальнейшем сопровождается изменением формы эритроцитов, их деформацией, вызывая преждевременный гемолиз клетки. Вместе с тем возникающие на фоне изменений структурно-метаболического статуса эритроцитов у беременных с вирусной патологией нарушения функциональных свойств клеток красной крови лежат в основе сложного процесса изменения микрореологических характеристик крови, что неизбежно влияет на качество снабжения кислородом органов и тканей, усугубляет гипоксию, осложняя течение основного заболевания во время беременности.

Стойкие нарушения в эритроцитной массе и тканях плаценты при герпесе требуют дифференцированных подходов и патогенетически обоснованных методов коррекции состояния всех звеньев морфофункционального комплекса «мать – плацента – плод». В то же время имеющиеся сведения о качественных изменениях плазматических мембран периферического звена эритроцита (эритроцита) и симпласта хориона у беременных с герпесной патологией фрагментарны, что затрудняет объяснение механизмов развития анемии и не позволяет разработать эффективные, патогенетически обоснованные способы предупреждения и коррекции гипоксических состояний. А это важно, так как нарушения механизмов трансплацентарного газообмена могут приводить к ограничению резервных возможностей эритроцита плода и развитию анемических состояний у новорожденных.

Большой интерес в изучении фетоплацентарной недостаточности при герпес-вирусной инфекции представляет характер обмена холестерина в плаценте беременной, поскольку этот стероид является основой формирования главных плацентарных гормонов беременности. Такой подход к изучению общих закономерностей и механизмов нарушений структурно-метаболического статуса и функционального состояния плацентарного комплекса, а также системы эритроцита матери и плода позволит разобраться в патогенезе нарушений дыхательной активности фетоплацентарного комплекса в условиях герпесной патологии и в норме.

Коллективом авторов этой монографии в течение последних 5 лет (2008-2012 гг.) решались следующие задачи:

1. Изучение морфофункционального состояния фетоплацентарного барьера плаценты у беременных, перенесших вспышку герпес-вирусной инфекции во время гестации, с учетом степени агрессивности инфекции по регистрации титра антител.

2. Особый раздел работы – оценка этапов синтеза холестерина на гистохимическом уровне (ферментативный анализ): прегненолон – мевалоновая кислота; сквален; дигидрохолестерин; холестерол, а также роли жирных кислот в формировании недостаточности фетоплацентарного барьера герпес-вирусной инфекции. Получены данные, подтверждающие, что конформационные изменения молекулы холестерина являются причиной нарушения процесса синтеза плацентарных гормонов.

3. Получены данные, отражающие коррелятивные связи между энергетическими процессами эритроцитов матери и плода на различных этапах беременности как в норме, так и при обострении герпес-вирусной инфекции. Подобного рода исследования позволяют конкретно раскрыть причины формирования анемии при неблагоприятно протекающей беременности.

В ходе выполнения исследований определены:

– структура на электронно-микроскопическом уровне каркаса эритроцита – спектрина;

– коррелятивные показатели формы эритроцита и содержание гемоглобина в зависимости от содержания гликофорина, белка полосы-3, анкирина и спектрина;

– взаимозависимость белков стромы от ферментативной активности эритроцитов – глутатионпероксидазы, супероксиддисмутазы, эритропоэтина;

– механизмы насыщения гемоглобина эритроцитов кислородом в условиях токсического воздействия продуктов перекисного окисления, накапливающихся в эритроцитах в результате обострения в организме беременных герпес-вирусной инфекции.

СИНТЕЗ ХОЛЕСТЕРИНА В ПЛАЦЕНТЕ БЕРЕМЕННЫХ, ПЕРЕНЕСШИХ ВО ВРЕМЯ ГЕСТАЦИИ ГЕРПЕС-ВИРУСНУЮ ИНФЕКЦИЮ И ЕГО ВЛИЯНИЕ НА ГОРМОНАЛЬНЫЙ ФОН

При обострении герпес-вирусной инфекции во время беременности резко изменяется метаболизм холестерина:

1. Содержание холестерина в плаценте и периферической крови на различных этапах беременности уменьшается.

2. Снижается интенсивность биосинтеза холестерина в плаценте (уменьшается активность ферментов – мевалонатдегидрогеназы, сквалендегидрогеназы и 7 α -дегидрохолестерин-дегидрогеназы).

3. Нарушается активность энзимов, участвующих в гормонообразовании: 3 β , 17 β -, 11 β (II)-, 3 α -гидроксистероид-дегидрогеназ.

4. Снижается концентрация половых стероидных гормонов (прогестерона, дегидроэпиандростерона, эстриола, эстрадиола) в периферической крови беременной и в плаценте.

5. В плаценте и в периферической крови увеличивается количество кортизола.

6. Нарушается адекватность регуляторных механизмов ферментативных реакций, участвующих в обмене холестерина в плаценте (активность вторичных мессенджеров – гуанилатциклазы и аденилатциклазы, NO-синтазы, поставщиков кофермента НАДФ, а также источников свободных радикалов).

При таком нарушении метаболических процессов у беременной складываются неблагоприятные условия для нормального функционирования фетоплацентарного барьера.

Содержание холестерина у беременных при обострении герпес-вирусной инфекции

Количество холестерина в периферической крови женщин контрольной группы увеличивалось по мере нарастания срока беременности с $5,61 \pm 0,11$ ммоль/л в первом триместре до $6,78 \pm 0,13$ ммоль/л во втором и $7,79 \pm 0,12$ ммоль/л – в третьем. Это физиологически целесообразно, так как необходимость в холестерине и продуктах его ме-

таболизма растет с течением гравидарного периода. Обострение герпес-вирусной инфекции оказывало влияние на содержание холестерина в периферической крови, достоверно снижая его концентрацию. Наиболее значительные изменения были отмечены при титре антител класса IgG к вирусу простого герпеса 1:12800. Так, в первом триместре количество данного стероида понизилось на 11% по сравнению с контрольной группой, во втором – на 14% и в третьем – на 19%.

Содержание холестерина определяли непосредственно в самом органе, в котором происходит основной процесс стероидогенеза во время беременности. При обострении герпес-вирусной инфекции наблюдалось достоверное снижение количества холестерина в гомогенате ворсинчатых хорионов в первом триместре беременности. Обнаружена зависимость выявленных нарушений от активности инфекционного процесса. Так, при титре антител класса IgG к вирусу простого герпеса 1:3200 количество стероида в гомогенате ворсинчатых хорионов при 9-10-недельном сроке развития уменьшилось на 38% по сравнению с контролем, в котором оно составляло $3,14 \pm 0,091$ ммоль/л, при титре антител 1:6400 – уже более чем на 50%. В гомогенате зрелых плацент при титре антител класса IgG к вирусу простого герпеса 1:3200 количество стероида уменьшилось на 25% по сравнению с контрольной группой ($2,65 \pm 0,113$ ммоль/л), тогда как при титре 1:12800 концентрация холестерина снижалась уже более чем на 60%.

Снижение количества холестерина при беременности, осложненной обострением герпес-вирусной инфекции, вызвано, по нашему мнению, нарушением процесса его синтеза. Исследования последних лет свидетельствуют, что пониженный уровень холестерина в период гестации приводит к преждевременным родам, а также к малому весу новорожденного (M.Muenke, 2004; R.Mac Dougall, 2007). Было обнаружено, что снижение количества холестерина не связано с его переходом в ЛПВП, так как их содержание в периферической крови при осложненной герпесом беременности практически не отличалось от показателей контрольной группы.

Наиболее выраженные изменения содержания ЛПНП, которые считаются ответственными за поступление холестерина в ткани, были

отмечены при вспышке вирусной инфекции в третьем триместре гестации, сопровождающейся титром антител класса IgG к вирусу простого герпеса 1:12800 – на 15% до $3,39 \pm 0,03$ ммоль/л (контрольная группа – $4,01 \pm 0,06$ ммоль/л). В первом триместре количество липопротеидов данного вида при том же титре антител статистически достоверно уменьшилось до $2,85 \pm 0,08$ ммоль/л (контрольная группа – $3,09 \pm 0,02$ ммоль/л), во втором – до $3,30 \pm 0,09$ ммоль/л (контрольная группа – $3,85 \pm 0,07$ ммоль/л). Снижение их количества будет сказываться на нормальном росте и развитии плода, так как они не будут способны в достаточной мере обеспечивать транспорт холестерина.

Изменение содержания гормонов при герпес-вирусной инфекции во время беременности

Исследование содержания прогестерона в периферической крови беременных показало достоверное его снижение по сравнению с показателями контрольной группы (при титре антител класса IgG к вирусу простого герпеса 1:12800) в первом триместре на 23% (в контрольной группе – $181,3 \pm 15,71$ нмоль/л), во втором – на 25% (в контрольной группе – $212,7 \pm 9,02$ нмоль/л). Опаснее всего при данном титре антител (по нашим данным) ситуация сложилась в третьем триместре беременности – $133,1 \pm 12,75$ нмоль/л (в контрольной группе – $254,9 \pm 13,11$ нмоль/л). Произведено исследование количества прогестерона в плаценте (гомогенат) при обострении герпеса. При сроке гестации 5-6 недель содержание прогестерона при титре антител класса IgG к вирусу простого герпеса 1:12800 в гомогенате ворсинчатого хориона достоверно сократилось до $23,4 \pm 5,71$ нмоль/л (в контрольной группе – $152,2 \pm 38,92$ нмоль/л), при сроке 7-8 недель – до $32,9 \pm 4,11$ нмоль/л (в контрольной группе – $160,0 \pm 21,13$ нмоль/л) и при сроке 9-10 недель – $48,3 \pm 4,33$ нмоль/л, более чем в 3 раза по сопоставлению с показателями контрольной группы $171,2 \pm 22,16$ нмоль/л, что создавало большую опасность для беременности. Данная тенденция сохранялась при оценке количества гормона в гомогенате зрелой плаценты, взятой при родах в срок от матерей, перенесших обострение герпес-вирусной инфекции во время беременности, где

также было установлено достоверное снижение прогестерона при титре антител класса IgG 1:12800 на 25% в центральной зоне и на 20% – в периферической зоне этого органа (в контрольной группе – $240,5 \pm 9,05$ нмоль/л и $176,6 \pm 5,66$ нмоль/л соответственно). То есть более серьезное воздействие герпес-вирусной инфекции на концентрацию данного гормона сказалось в центральной области плаценты.

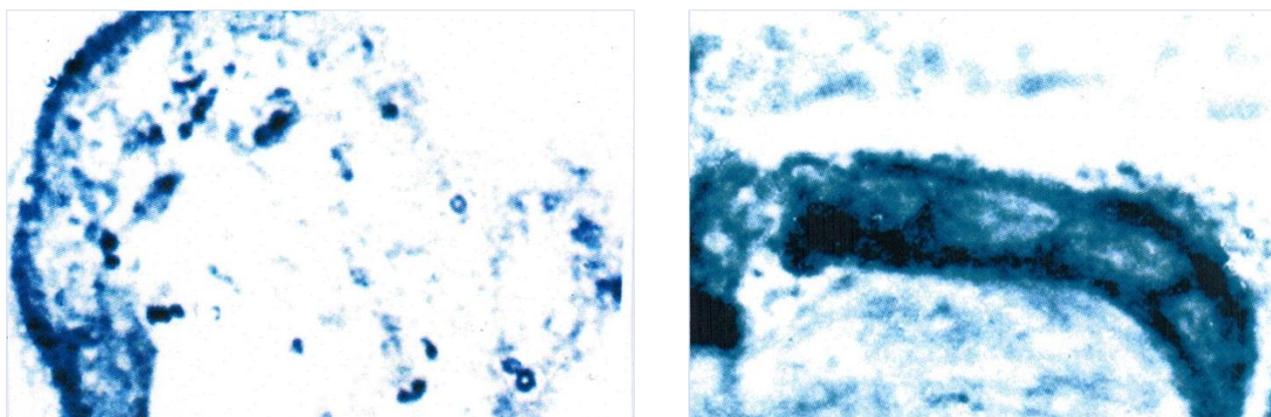
Вследствие того, что уровень гормона недостаточен для поддержания функции плаценты, обеспечения гомеостаза эндометрия и миометрия, а также иммунной толерантности организма беременной, уменьшение количества стероидного гормона во время осложненной герпесом беременности значительно увеличивает риск ее прерывания и создает предпосылки для развития фетоплацентарной недостаточности (Ю.Э.Доброхотова, 2008; О.А.Пустотина, 2006; K.G.Nygren et al., 1973; M.Wiener, 1971).

Рассмотрим причины нарушения прогестеронового содержания. Прогестероногенез из холестерина идет при действии плацентарного фермента 3β -гидроксистероиддегидро-геназы (A.H.Payne, D.V.Hales, 2004). Мы проанализировали ее активность в плаценте женщин, перенесших обострение герпес-вирусной инфекции во время беременности, и обнаружили убедительные, подтвержденные цитофотометрической оценкой свидетельства низкой интенсивности работы данного энзима по сравнению с контрольной группой как в ворсинчатых хорионах первого триместра развития (цитофотометрическая оценка – $1,97 \pm 0,078$ усл. ед. на сроке 9-10 недель при титре антител класса IgG к вирусу простого герпеса (контроль – $4,90 \pm 0,091$ усл. ед.)), так и в зрелой плаценте ($2,56 \pm 0,067$ усл.ед. при контроле – $7,23 \pm 0,098$ усл. ед.). Снижение активности стероидогенеза в плаценте становилось причиной уменьшения количества прогестерона при осложненной герпесом беременности.

Следующим моментом, приводящим к низкому содержанию прогестерона, стало нарушение регуляторных процессов. Считается, что образование прогестерона в плаценте регулируется белковыми гормонами, действующими через цАМФ. Ферментом, отвечающим за образование этого нуклеотида, является аденилатциклаза. Гистохи-

мическая картина позволила прийти к выводу, что присутствие вирусной инфекции уменьшало интенсивность работы АЦ в ворсинах зрелой плаценты до $3,10 \pm 0,25$ усл. ед. (при титре антител класса IgG к вирусу простого герпеса 1:12800; цитофотометрическая оценка в контрольной группе – $6,59 \pm 0,21$ усл. ед.). Это становилось причиной низкого содержания в цитоплазме цАМФ, что, по нашему мнению, являлось фактором, влияющим на снижение процесса стероидогенеза. Кроме того, данное нарушение могло иметь и другие негативные последствия, так как цАМФ выступает в качестве основного проводника взаимодействия структурно-функциональной системы живых клеток с внешней средой.

В прогестероновом метаболизме задействована и 3α -гидроксистероиддегидрогеназа. При обострении герпес-вирусной инфекции цитофотометрически интенсивность работы 3α -гидроксистероиддегидрогеназы падала на 9-10 неделе гестации при титре антител класса IgG к вирусу простого герпеса 1:12800 до $1,97 \pm 0,089$ усл.ед. (рис. 1). Цитофотометрическая оценка в контрольной группе составляла $4,01 \pm 0,676$ усл.ед. Мы связываем это со снижением концентрации субстрата при осложненной беременности.



а

б

Рис. 1. Синцитиотрофобласт ворсинок плаценты, гистохимическая реакция на 3β -гидроксистероиддегидрогеназу I типа: а – роженица, перенесшая в III триместре обострение ГВИ, активность реакции резко снижена по сравнению с контрольной группой (б). Реакция по З. Лойду. Ув. – 15x90.

Выявленный факт, наряду с данными, полученными нами ранее, еще раз показал, что при обострении герпес-вирусной инфекции во время гестации происходит снижение активности стероидогенеза, синтеза эстрогенов в фетоплацентарной системе, в качестве обязательного промежуточного соединения подразумевается образование дегидроэпиандростерона.

Во время обострения герпес-вирусной инфекции отмечалось достоверное снижение содержания 3α -гидроксистероид-дегидрогеназы в периферической крови беременной по сравнению с показателями контрольной группы (рис. 2). При регистрации титра антител класса IgG 1:12800 в первом триместре гестации его количество снизилось на 38% (в контрольной группе – $12,2 \pm 0,82$ мкмоль/л), во втором и третьем триместрах – на 40% (в контрольной группе – $13,3 \pm 0,87$ мкмоль/л и $8,9 \pm 0,98$ мкмоль/л соответственно).

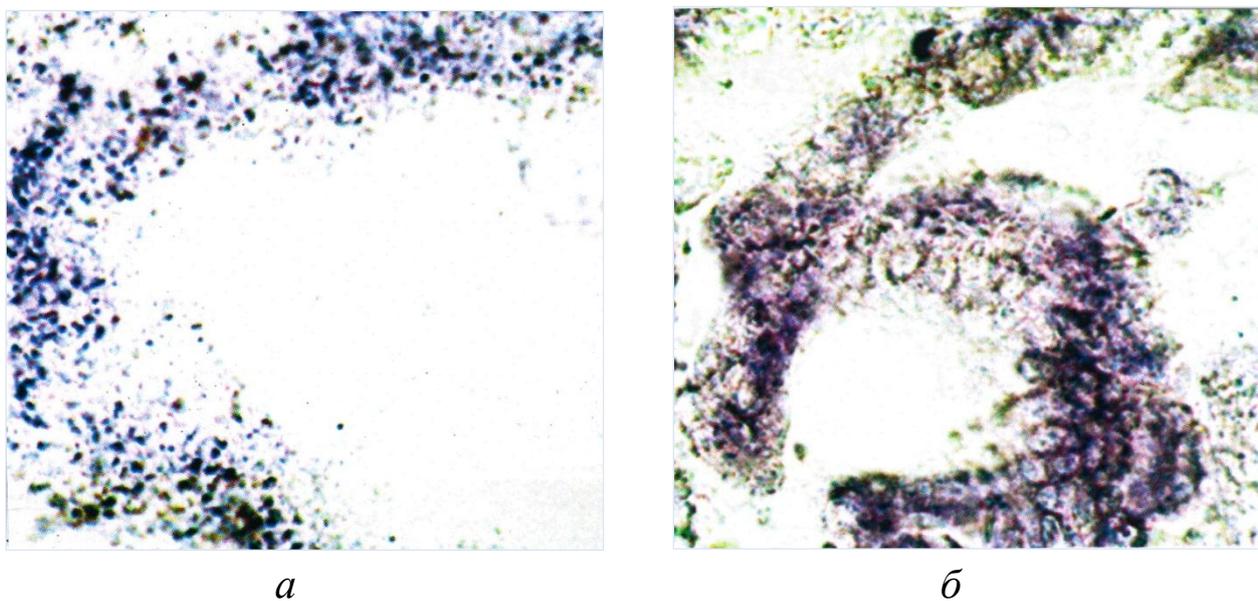


Рис. 2. Синцитиотрофобласт ворсинок плаценты, реакция на 3α -гидроксистероиддегидрогеназу по 3. Лойду: а – родильница, перенесшая в третьем триместре ГВИ с титром антител 1:12800, реакция резко ослаблена по сравнению с контролем (б). Ув. – 15×40 .

Мы проанализировали содержание дегидроэпиандростерона в плацентарном гомогенате. При обострении ГВИ во время беременности количество этого соединения уменьшалось. При титре антител

класса IgG к вирусу простого герпеса 1:12800 содержание дегидроэпиандростерона снизилось в 2 раза как в случае, когда обострение вирусного процесса происходило в первом триместре беременности, так и в последующие периоды внутриутробного развития. Концентрация дегидроэпиандростерона уменьшалась до $1,01 \pm 0,072$ мкмоль/л – на сроке 6-8 недель беременности (в контроле – $2,09 \pm 0,091$ мкмоль/л); до $1,17 \pm 0,021$ мкмоль/л – на сроке 9-10 недель (в контроле – $2,25 \pm 0,066$ мкмоль/л); до $0,70 \pm 0,020$ мкмоль/л – в зрелой плаценте, взятой при родах в срок (в контроле – $1,40 \pm 0,033$ мкмоль/л).

Низкий уровень дегидроэпиандростерона приводил к нарушению процесса гормонообразования, что было доказано при изучении гистохимической реакции на выявление фермента, участвующего в преобразовании данного гормона в плаценте и ворсинчатых хорионах. На данной стадии действует дегидроэпиандростерондегидрогеназа – она относится к группе 3β -гидроксистероиддегидрогеназ.

Активность гистохимической реакции на дегидроэпиандростерондегидрогеназу в синцитио- и цитотрофобласте хориальных и плацентарных ворсинок в таких случаях снижена, что было доказано при цитофотометрическом измерении (рис. 3).

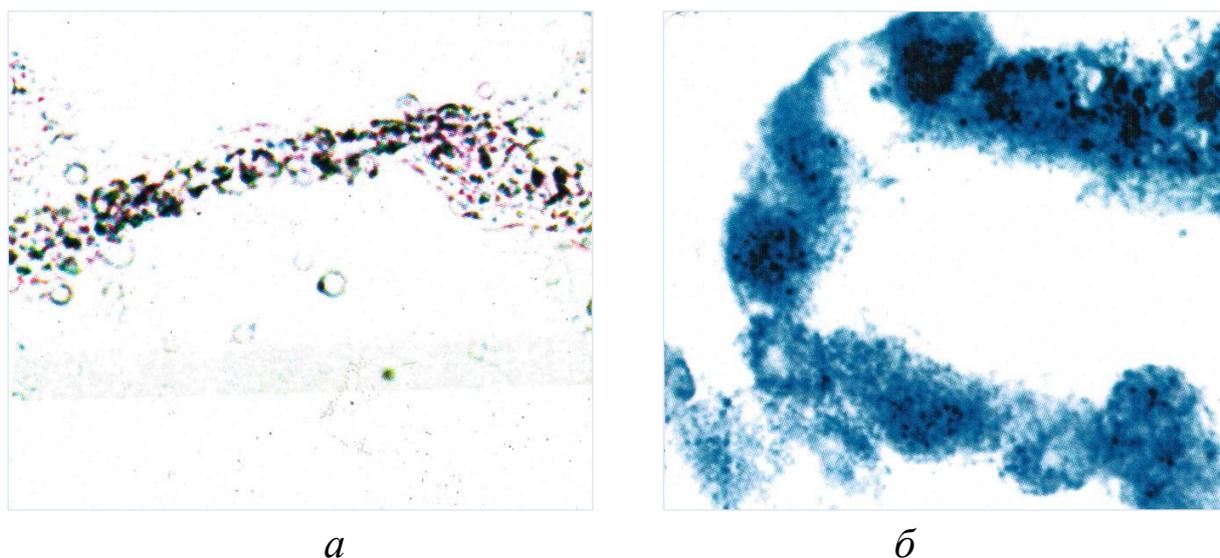


Рис. 3. Синцитиотрофобласт ворсинок плаценты, реакция на дегидроэпиандростерондегидрогеназу по З. Лойду: а – роженица, перенесшая в третьем триместре ГВИ с титром антител 1:12800, реакция ослаблена по сравнению с контролем (б). Ув. – 15x40.

Например, при сроке 9-10 недель – снижение до $2,29 \pm 0,367$ усл.ед. (цитофотометрический показатель в контрольной группе – $4,29 \pm 0,358$ усл.ед.). Подавление интенсивности данной реакции свидетельствовало о нарушении биосинтеза эстрогенов из дегидроэпиандростерона. Изменение же уровня эстрогенов считается одним из факторов развития плацентарной недостаточности.

Мы проанализировали содержание эстриола – основного эстрогена фетоплацентарного комплекса. Его количество значительно уменьшалось при обострении герпес-вирусной инфекции. Следует отметить, что, как и в случае с прогестероном, наблюдалась прямая зависимость от степени активности герпес-вирусной инфекции, и при титре антител к вирусу простого герпеса класса IgG 1:12800 определялось наиболее резкое падение содержания гормона, особенно существенное в первом триместре – на 32% (в контрольной группе – $37,6 \pm 4,31$ нмоль/л). Во втором и третьем триместрах изменения были не столь серьезными: показатели снизились на 14% по сравнению с контрольной группой, в которой они составляли $48,6 \pm 1,91$ нмоль/л и $53,9 \pm 3,30$ нмоль/л соответственно.

При обострении герпес-вирусной инфекции во время беременности содержание женских половых гормонов в гомогенате ворсинчатого хориона и зрелых плацент беременности резко изменялось. Так, например, при сроке гестации 5-6 недель (при титре антител класса IgG к вирусу простого герпеса 1:12800) концентрация эстриола уменьшилась до $3,9 \pm 0,91$ нмоль/л (в контрольной группе – $31,2 \pm 0,95$ нмоль/л). На 7-8 и 9-10-недельной стадиях развития количество гормона снизилось до $14,6 \pm 1,19$ и $20,9 \pm 2,12$ нмоль/л (в контрольной группе – $52,3 \pm 1,15$ и $69,1 \pm 3,48$ нмоль/л соответственно).

В гомогенате центральной зоны плаценты содержание эстриола (при титре антител класса IgG к вирусу простого герпеса 1:12800) уменьшилось на 30% (в контрольной группе – $251,1 \pm 9,02$ нмоль/л), в периферической зоне – на 17% (в контрольной группе – $198,6 \pm 7,89$ нмоль/л). Таким образом, наиболее сильное влияние герпес-вирусной инфекции на данный гормон отмечалось в центральной зоне плаценты. Выявленный факт свидетельствовал, что вспышка герпес-

вирусной инфекции в самом начале гестации приводит к серьезным последствиям, так как недостаток синтеза эстриола вызывает угрозу прерывания беременности в первой половине и угрозу преждевременных родов – во второй (K.G.Nygren et al., 1973; W.E.Easterling, 1970).

Обострение герпес-вирусной инфекции повлияло на содержание другого эстрогена – эстрадиола – точно таким же образом, что и на остальные половые гормоны. Его количество уменьшалось как в периферической крови матери, так и в гомогенате плаценты. В первом триместре при титре антител к вирусу простого герпеса класса G 1:12800 произошло его снижение в периферической крови матери приблизительно на 5%, во втором триместре – на 16%, в третьем – на 40% по сравнению с контрольной группой, в которой оно составляло $29065,1 \pm 147,29$ пмоль/л, $29789,2 \pm 167,43$ пмоль/л, $31958,5 \pm 185,13$ пмоль/л соответственно. Данному факту, на наш взгляд, можно дать следующее объяснение. Принимая во внимание то обстоятельство, что на начальных этапах беременности лишь малая часть эстрогенов синтезируется плацентой, а бóльшая – организмом матери (в яичниках), можно прийти к заключению: вспышка ГВИ затрагивала процесс стероидогенеза в основном в провизорном органе и на содержании эстрадиола в периферической крови женщины это отразилось в меньшей степени. К такому же выводу позволяет прийти и значительное снижение количества E2 в гомогенате ворсинчатых хорионов, полученных в первом триместре гестации. На 5-6-недельной стадии развития концентрация гормона сократилась до $11145,3 \pm 231,01$ пмоль/л (в контрольной группе – $21811,0 \pm 129,54$ пмоль/л), на 7-8 и 9-10-недельных стадиях – до $13415,8 \pm 148,33$ пмоль/л и $15567,2 \pm 106,67$ пмоль/л соответственно (в контрольной группе – $24181,3 \pm 134,45$ пмоль/л и $26002,2 \pm 102,37$ пмоль/л соответственно).

Снижение количества эстрадиола, кроме всего прочего, ведет и к неполноценной продукции прогестерона (В.В.Сидельникова, 2002). То есть на секреции прогестерона, по все видимости, отразилось не только уменьшение количества его предшественника – холестерина, но еще и нарушение контроля со стороны женских половых гормо-

нов. Установлено, что понижение уровня эстрадиола определяется при угрозе прерывания беременности и нарушении состояния плода.

Падение концентрации гормона могло свидетельствовать о нарушении синтетических процессов в данном органе. Для получения доказательства этого было решено рассмотреть ферментативную активность биосинтеза эстрогенов. Для ее оценки мы проанализировали работу 17β -гидроксистероид-дегидрогеназы. В наших исследованиях выявлено снижение интенсивности работы данного фермента при осложненной беременности, что было доказано при цитофотометрическом измерении (рис. 4). Например, при титре антител к вирусу простого герпеса класса G 1:12800 на сроке 9-10 недель – снижение до $2,29 \pm 0,367$ усл.ед. (цитофотометрическая оценка в контрольной группе – $4,29 \pm 0,358$ усл.ед.).

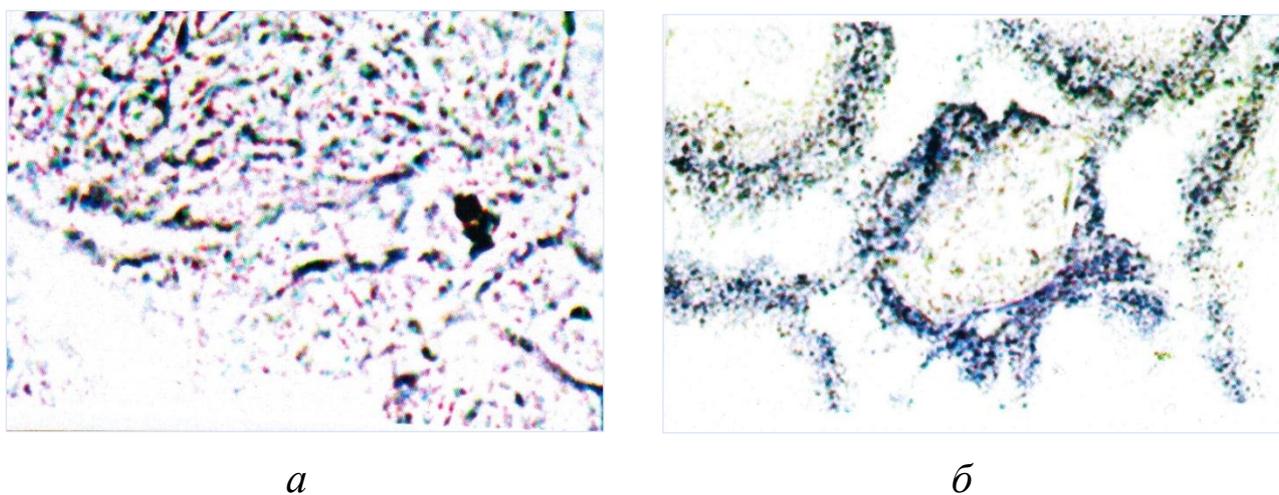


Рис. 4. Синцитиотрофобласт ворсинок плаценты, гистохимическая реакция на 17β -гидроксистероиддегидрогеназу I типа по З.Лойду: а – роженица, перенесшая в третьем триместре ГВИ, реакция резко ослаблена по сравнению с контролем (б). Ув. – 10×40 .

Основным фактором нарушения эстрогеновой продукции является выявленное нами снижение количества их предшественников: первоначального – холестерина и непосредственного – дегидроэпиандростерона. Кроме того, к уменьшению интенсивности работы фермента, отвечающего за синтез женских половых стероидных гормо-

нов, привели, по нашему мнению, изменения в процессе регуляции. Важным аспектом для биосинтеза эстрогенов является достаточная концентрация обязательного кофактора – НАДФ/НАД (А.К. Agarwal et al., 2005), которая обеспечивается за счет пентозофосфатного пути и фермента НАДФ⁺-зависимой малатдегидрогеназы.

Работу пентозофосфатного шунта принято оценивать по активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. Проведенное нами изучение интенсивности работы вышеназванного энзима показало, что при обострении герпес-вирусной инфекции активность фермента снижалась в зрелой плаценте до $2,50 \pm 0,04$ усл.ед. (цитофотометрическая оценка в контрольной группе – $4,8 \pm 0,06$ усл.ед.). Инактивируется активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы повышенным количеством свободных радикалов (Д.В. Господарьев и др., 2005). Нами отмечено, что при обострении герпес-вирусной инфекции в плаценте наблюдается повышение активности NO-синтазы, а также увеличение содержания перекисей жирных кислот. Мы считаем, что выявленные факты стали одной из причин угнетения работы глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы.

Другим поставщиком необходимого кофермента является малатдегидрогеназа. В плаценте при обострении герпес-вирусной инфекции было выявлено цитофотометрически доказанное уменьшение активности этого энзима до $1,1 \pm 0,03$ усл.ед. (при титре антител к вирусу простого герпеса класса G 1:12800) по сравнению с контрольной группой, в которой цитофотометрическая оценка составляла $2,6 \pm 0,08$ усл.ед. Полученные данные свидетельствовали о падении концентрации одного из важнейших кофакторов – НАДФ⁺, что, по нашему мнению, нашло отражение в биосинтезе стероидных гормонов, активность которого в наших исследованиях снижалась.

Вспышка герпес-вирусной инфекции во время гестации привела к значительным изменениям содержания гормона фетоплацентарного комплекса – кортизола. Его количество возросло как в периферической крови матери, так и в гомогенате плаценты. В сыворотке женщин наибольший рост гормона был отмечен в первую половину беременности, причем выявлялась четкая зависимость нарушений от

выраженности герпес-вирусного процесса, наиболее резкое увеличение концентрации произошло при регистрации титра антител к вирусу простого герпеса 1:12800. Количество гормона в первом триместре возросло до $756,8 \pm 38,67$ нмоль/л, во втором – до $976,4 \pm 45,56$ нмоль/л, в третьем – до $1154,8 \pm 48,87$ нмоль/л (в контрольной группе – $454,2 \pm 29,33$ нмоль/л, $542,3 \pm 51,12$ нмоль/л, $868,0 \pm 42,90$ нмоль/л соответственно).

При изучении гомогенатов плаценты была отмечена еще более серьезная ситуация. Содержание кортизола при обострении герпес-вирусной инфекции в гомогенате ворсинчатых хорионов выросло более чем в два раза (при титре антител класса IgG к вирусу простого герпеса 1:12800 в 6-8 недель беременности – $439,6 \pm 19,80$ нмоль/л, контрольная группа – $154,8 \pm 10,67$ нмоль/л; в 9-10 недель – $468,7 \pm 13,75$ нмоль/л, контрольная группа – $161,7 \pm 11,85$ нмоль/л), в гомогенате зрелых плацент – более чем в полтора раза (при том же титре антител 1:12800 – $639,2 \pm 12,70$ нмоль/л по сравнению с контрольной группой – $395,3 \pm 15,12$ нмоль/л). То есть первый триместр беременности оказался самым уязвимым к действию герпеса.

Высокие значения показателей содержания гормона предполагают увеличение его продукции, что в свою очередь подразумевает смещение расхода прекурсоров стероидогенеза (M.M.Wirth et al., 2006). В ситуации, когда при обострении герпес-вирусной инфекции было выявлено уменьшение количества гормонообразовательной базы – холестерина, вышеупомянутое перераспределение становится опасным для беременности.

Особенное опасение внушает увеличение концентрации кортизола непосредственно в самой плаценте. В последние годы целым рядом зарубежных ученых установлено, что повышенное количество кортизола, проникающего через плаценту, способно вызвать развитие патологий, которые могут проявиться в детском и подростковом возрасте (B.T.Alexander, 2006; M.Dodic et al., 1999; K.M.Moritz et al., 2002). Было доказано, что воздействие высокой концентрации глюкокортикоидов во время беременности может замедлять рост и развитие плода, перенастраивать состояние функциональной системы гиппо-

камп – гипоталамус – гипофиз – надпочечники. Для объяснения развития таких нарушений были выдвинуты потенциальные механизмы так называемого программирования плода.

Основным барьером для проникновения большого количества кортизола к плоду является фермент 11 β -гидроксистероиддегидрогеназы II типа в плаценте (P.J.Burton et al., 1999; M.Dodic et al., 1999; 2002; L.Myatt, 2006; K.M.Moritz et al., 2002; K.Yang, 1997). При физиологическом течении гестации этот фермент превращает 95% кортизола в неактивный кортизон, предохраняя плод от воздействия высоких концентраций кортикостероидов.

В плацентах и ворсинчатых хорионах женщин, перенесших обострение герпес-вирусной инфекции, наблюдалось снижение активности 11 β -гидроксистероиддегидрогеназы II типа по сравнению с контрольной группой. Так, при регистрации титра антител к вирусу простого герпеса класса G 1:12800 цитофотометрический показатель уменьшился до $1,88 \pm 0,095$ усл.ед. на сроке 9-10 недель (цитофотометрическая оценка в контрольной группе – $4,51 \pm 0,077$ усл.ед.) и до $3,18 \pm 0,046$ усл.ед. – в зрелой плаценте (контрольная группа – $6,79 \pm 0,051$ усл.ед.).

Следовательно, в плаценте необходимо изучение активности данного фермента, особенно в тех случаях, когда гестация сопровождалась увеличением содержания кортизола в крови матери. Такое исследование позволит предсказать, подвергнется ли новорожденный во время внутриутробного развития влиянию большого количества глюкокортикоидов, и спрогнозировать развитие патологий в будущей жизни.

Рассмотрим причины нарушения работы фермента, инактивирующего кортизол. В регуляции деятельности 11 β -гидроксистероиддегидрогеназы II типа участвует оксид азота (K.Sun, K.Yang, 1997). Мы оценили интенсивность работы NO-синтазы и обнаружили резкое увеличение ее активности (до $6,4 \pm 0,07$ усл.ед.) при обострении герпес-вирусной инфекции во время беременности по сравнению с контрольной группой (цитофотометрическая оценка – $2,9 \pm 0,08$ усл.ед.).

Такая высокая концентрация NO будет приводить к ингибированию активности 11 β -гидроксистероиддегидрогеназы II типа и, следовательно, к повышению количества активных глюкокортикоидов.

Следующим фактором, участвующим в регуляции работы 11 β -гидроксистероиддегидрогеназы II типа, является цГМФ. Была произведена оценка работы энзима, катализирующего его образование – гуанилатциклазы. В ворсинчатых хорионах и плацентах, полученных от беременных с обострением герпес-вирусной инфекции, выявлена высокая активность фермента, ответственного за накопление данного вторичного мессенджера в клетках (при титре антител к вирусу простого герпеса класса G 1:12800 цитофотометрическая оценка составила $4,9 \pm 0,09$ усл.ед. (контрольная группа – $1,8 \pm 0,04$ усл. ед.)). Наши результаты позволяли прийти к выводу, что увеличение интенсивности продукции цГМФ ингибировало активность 11 β -гидроксистероиддегидрогеназы II типа, тем самым повышая количество кортизола.

В плаценте образование кортизола из неактивной кето-формы предшественника катализируется 11 β -гидроксистероиддегидрогеназой I типа. Было обнаружено цитофотометрически доказанное увеличение активности 11 β -гидроксистероиддегидрогеназы I типа по сравнению с контрольной группой. Например, при регистрации титра антител к вирусу простого герпеса класса G 1:12800 интенсивность гистохимической реакции повысилась до $4,99 \pm 0,101$ усл.ед. на сроке 9-10 недель (контрольная группа – $3,02 \pm 0,098$ усл.ед.) и до $6,68 \pm 0,057$ усл.ед. – в зрелой плаценте, взятой при родах в срок (контрольная группа – $5,21 \pm 0,089$ усл.ед.). Усиление работы данного фермента в плаценте и стало, по нашему мнению, еще одной причиной повышения продукции стероидного гормона.

Итак, мы получили доказательства снижения интенсивности образования половых стероидных гормонов при обострении герпес-вирусной инфекции во время беременности. Об этом свидетельствовало как уменьшение количества самих гормонов в плазме периферической крови и гомогенате плаценты, так и подавление активности фер-

ментов, отвечающих за их образование. Основным фактором вышеупомянутого патологического явления оказывается, на наш взгляд, снижение количества холестерина во время беременности, осложненной обострением герпес-вирусной инфекции. Предстояло выявить причины этого, для чего мы проанализировали процесс синтеза холестерина при беременности, протекающей на фоне обострения герпес-вирусной инфекции.

Синтез холестерина при герпес-вирусной инфекции во время беременности

Первым этапом холестериногенеза, на который мы обратили внимание, стало образование мевалоната. Была произведена оценка активности превращений мевалоната по разработанному нами методу определения гистохимического маркера преобразований этого соединения – мевалонатдегидрогеназы. Обнаруженная четкая локализация фермента в хориальном синцитиотрофобласте и цитотрофобласте доказывала наличие данной стадии синтеза холестерина в плаценте. Цитофотометрически его содержание в контрольной группе на сроке беременности 4-5 недель составило $2,23 \pm 0,006$ усл.ед. Отмечалось возрастание интенсивности окраски синцитио- и цитотрофобласта по мере увеличения срока гестации – на 6-7-недельной стадии развития до $2,36 \pm 0,009$ усл.ед.; на 8-9-недельной стадии – до $2,45 \pm 0,030$ усл.ед. В зрелой плаценте, взятой при родах в срок, она возросла до $4,67 \pm 0,07$ усл.ед. Присутствие этой стадии холестериногенеза в данном органе было доказано практически всеми исследователями, занимающимися данной проблемой на биохимическом уровне.

При обострении герпес-вирусной инфекции обнаружено снижение количества продукта гистохимической реакции, что указывало на низкую активность преобразований мевалоновой кислоты. Цитофотометрический показатель на сроке 9-10 недель беременности уменьшился до $0,73 \pm 0,001$ усл.ед. (контрольная группа – $2,45 \pm 0,030$ усл.ед.); в зрелой плаценте (39-40 недель при титре антител к вирусу герпеса 1:12800) интенсивность реакции уменьшилась до $2,34 \pm 0,07$

усл.ед. (контрольная группа – $4,67 \pm 0,07$ усл.ед.). Данный факт свидетельствовал, что влияние инфекционного процесса сказывалось уже на самых ранних этапах синтеза холестерина.

Следующий этап холестериногенеза – образование сквалена. С помощью разработанного нами метода (на основе прописи Лойда с соавт.) определения активности превращений сквалена по гистохимической реакции на сквалендегидрогеназу, позволяющего оценить интенсивность синтеза холестерина на данной стадии, было установлено следующее. Продукт гистохимической реакции выявлялся в синцитиотрофобласте и цитотрофобласте ворсин хориона. На 4-5 неделях беременности реакция на сквалендегидрогеназу в трофобласте хориальных ворсинок контрольной группы расценивалась как слабая – $1,19 \pm 0,002$ усл.ед. На сроке 6-7 недель развития цитофотометрический показатель возрос до $2,15 \pm 0,007$ усл.ед.; к 8-9 неделе развития – до $2,31 \pm 0,003$ усл.ед. Интенсивность гистохимической реакции повышалась по мере увеличения срока гестации, и в зрелой плаценте, взятой при родах в срок, она составила $3,81 \pm 0,015$ усл.ед.

Таким образом, стадия образования сквалена в синцитиотрофобласте плаценты в наших исследованиях выявлена совершенно точно, это совпадает с данными других ученых, несмотря на то, что, по их мнению, синтез холестерина в ней идет не до конца (G.Telegdy, J.W.Weeks, 1970). При обострении ГВИ во время беременности были отмечены доказанные цитофотометрически изменения, зависящие от степени выраженности инфекционного процесса, которую мы определяли по величине титра антител к вирусу простого герпеса. При регистрации повышения титров антител к вирусу простого герпеса до 1:12800 цитофотометрическая оценка интенсивности гистохимической реакции на сквалендегидрогеназу на ранних сроках беременности снизилась до $0,94 \pm 0,004$ усл.ед. на сроке 9-10 недель (контрольная группа – $2,31 \pm 0,003$ усл.ед.), а в зрелой плаценте – до $2,07 \pm 0,013$ усл.ед. (контрольная группа – $3,81 \pm 0,015$ усл.ед.). Объясняется данное явление, по нашему мнению, падением содержания прекурсоров для образования сквалена, а следовательно, и холестерина.

Последний этап холестериногенеза – превращение сквалена в ланостерин, который уже имеет в своем составе тетрациклическое ядро, и непосредственно в сам холестерин. Примечательно, что до сих пор не выявлен окончательный путь реакций преобразования ланостерина в холестерин и не идентифицированы ферменты, в нем участвующие. В различных источниках либо представлено несколько версий данного этапа, либо просто указывается общая схема. Наиболее вероятным считается путь через 7α -дегидрохолестерин. Проводилось изучение дегидрогеназы 7α -дегидрохолестерина аналогичным способом. Фермент выявлялся в ворсинчатых хорионах контрольной группы, начиная с конца первого месяца беременности, в синцитиотрофобласте и цитотрофобласте ворсин. Энзиматическая активность гистохимической реакции на этом сроке цитофотометрически оценивалась в $1,88\pm 0,011$ усл.ед. По мере прогрессирования беременности интенсивность обмена 7α -дегидрохолестерина немного повышалась: до $2,02\pm 0,006$ усл.ед. при 6-7-недельной стадии развития и до $2,26\pm 0,004$ усл.ед. – при 8-9 неделях гестации, а в зрелой плаценте при родах в срок составила $4,89\pm 0,013$ усл.ед. Цитофотометрическая оценка в ворсинчатых хорионах и плацентах женщин, перенесших обострение герпеса, показала уменьшение интенсивности гистохимической реакции на 7α -дегидрохолестериндегидрогеназу до $0,93\pm 0,013$ усл.ед. на сроке 9-10 недель беременности (контрольная группа – $1,88\pm 0,011$ усл. ед.), в зрелой плаценте (рис. 5) – до $2,67\pm 0,007$ усл.ед. (контрольная группа – $4,89\pm 0,013$ усл.ед). Как и во всех предыдущих случаях, падение интенсивности находилось в прямой зависимости от титра антител к вирусу простого герпеса. Данный факт свидетельствовал, что интенсивность превращений 7α -дегидрохолестерина при осложненной герпесом беременности уменьшалась.

Главной причиной выявленного нарушения стало истощение пула субстрата для 7α -дегидрохолестерина. К такому выводу мы пришли при изучении активности превращений мевалоната и сквалена. Основой для этого заключения стало то, что параметром, влияющим на течение любого синтетического процесса, является наличие

достаточного содержания исходных продуктов. Снижение же интенсивности преобразования вышеназванных соединений свидетельствует, что таких продуктов стало меньше.

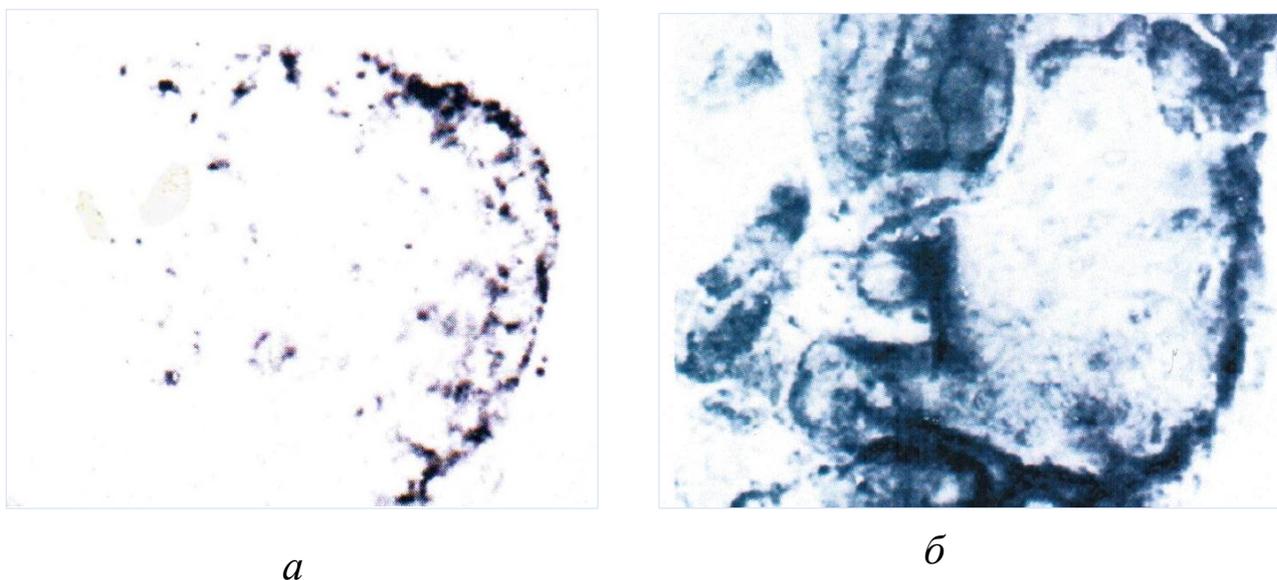


Рис. 5. Синцитиотрофобласт ворсинок плаценты роженицы, перенесшей в III триместре ГВИ (а). Гистохимическая реакция на 7α -дегидрохолестериндегидрогеназу. Интенсивность реакции снижалась ($2,67\pm 0,007$ усл.ед.) по сравнению с контролем (б) – ($4,89\pm 0,013$ усл.ед.). Реакция по З. Лойду. Увеличение – 10×40 .

Резюмируя, можно сказать, что нами получены результаты, свидетельствующие о присутствии в плаценте с самых ранних сроков гестации системы преобразования предшественников холестерина. Мы обнаружили соединения, участвующие в трех основных этапах его формирования – мевалонат, сквален, 7α -дегидрохолестерин. Активация герпес-вирусной инфекции в гравидарный период приводила к снижению синтеза холестерина. Результаты, свидетельствующие о нарушении интенсивности превращений исследуемых прекурсоров стероида, позволяют сделать вывод, что эти этапы способны изменяться под воздействием герпеса во время гестации, тем самым представляя собой «уязвимые участки» холестериногенеза.

Из вышесказанного следует логичный вывод, что падение активности преобразования соединений, участвующих в биосинтезе хо-

лестерина, указывает на снижение интенсивности процесса образования данного стероида, следствием чего будет уменьшение его концентрации при обострении герпес-вирусной инфекции во время беременности.

Выводы

При обострении герпес-вирусной инфекции во время беременности в периферической крови и гомогенате плаценты снижается содержание холестерина.

На гистохимическом уровне выявлено, что при беременности, осложненной обострением герпес-вирусной инфекции, отмечается нарушение биосинтеза холестерина в плаценте, это подтверждается снижением активности ферментов – мевалонатдегидрогеназы, сквалендегидрогеназы и 7 α -дегидрохолестериндегидрогеназы.

Герпес-вирусная инфекция в период обострения подавляет в плаценте активность ферментов стероидогенеза – 3 β -, 17 β -, 11 β (II)-, 3 α -гидроксистероиддегидрогеназ.

Обострение герпес-вирусной инфекции в гестационный период приводит к уменьшению в периферической крови и гомогенате плаценты концентрации эстриола, эстрадиола, прогестерона и дегидроэпиандростерона, увеличению количества кортизола и понижению соотношения дегидроэпиандростерон/кортизол.

Обострение герпес-вирусной инфекции вызывает нарушение регуляции образования холестерина и стероидных гормонов. Было выявлено снижение активности АТФазы, отвечающей за энергетическое обеспечение; активности аденилатциклазы, контролирующей биосинтез прогестерона и эстрогенов; активности поставщиков необходимого для биосинтеза кофактора НАДФ; повышение интенсивности гуанилатциклазы и NO-синтазы, ингибирующих превращение кортизола, увеличение активности источников свободных радикалов.

МЕХАНИЗМЫ И ЗАКОНОМЕРНОСТИ РАЗВИТИЯ НАРУШЕНИЙ КИСЛОРОДТРАНСПОРТНОЙ ФУНКЦИИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ РОЖЕНИЦ И КРОВИ ПУПОВИНЫ ПРИ ОБОСТРЕНИИ ГЕРПЕС-ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Изменения дыхательной функции крови обусловлены, как правило, нарушением процессов оксигенации организма женщины, сопутствующим беременности и достигающим максимального развития во второй ее половине. Основным проявлением этих изменений является формирование признаков метаболической дисфункции эритрона, обусловленных нарушением кислотно-щелочного гомеостаза и газового состава крови. Из данных таблицы 1 видно, что средние значения ВЕ (кислые продукты) в группе практически здоровых рожениц превышали цифры, характерные для небеременных женщин ($-2,8 \pm 0,85$, в группе сравнения – $0,98 \pm 0,6$ ммоль/л).

Таблица 1

Динамика показателей кислотно-щелочного равновесия артериальной крови беременных в норме и при различной степени выраженности герпесной инфекции

Группы	pH	pCO ₂ , мм рт. ст.	BE, ммоль/л	HCO ₃ -act, ммоль/л	HCO ₃ -std, ммоль/л	tCO ₂ , ммоль/л
Роженицы с титром антител к ВПГ-1: 1:12800	7,29±0,01 p<0,001	33,8±0,47 p<0,001	-8,0±0,85 p<0,001	20,1±0,91 p<0,001	19,7±0,35 p<0,001	21,2±0,53 p<0,001
	1:3200	7,34±0,01 P<0,05	39,7±1,18 p<0,001	-4,4±0,23 p<0,001	22,3±0,25 p<0,001	21,4±0,51 p<0,001
Практически здоровые роженицы	7,4±0,07	42,16±0,9	-2,8±0,85 p<0,001	25,8±0,56 p<0,01	23,0±0,87 p<0,01	26,4±0,54 p<0,01
Небеременные женщины	7,4±0,05	44,0±0,82	-0,98±0,6	27,6±0,25	25,1±0,18	28,7±0,78

Величина pCO₂, наоборот, несколько снижалась ($42,16 \pm 0,9$; в группе сравнения – $44,0 \pm 0,82$ мм рт.ст.), свидетельствуя о появлении признаков гипокапнии вследствие компенсаторной гипервентиляции

легких за счет усиления выведения CO_2 . В результате в крови здоровых рожениц наблюдалось некоторое снижение содержания истинных ($\text{HCO}_3\text{-act}$) ($25,8 \pm 0,56$; в группе сравнения – $27,6 \pm 0,25$ ммоль/л) и стандартных ($\text{HCO}_3\text{-std}$) бикарбонатов в плазме крови ($23,0 \pm 0,87$; в группе сравнения – $25,1 \pm 0,18$ ммоль/л), а также общего CO_2 ($26,4 \pm 0,54$; в группе сравнения – $28,7 \pm 0,78$ ммоль/л). Сдвига рН крови в сторону кислой реакции не отмечено ($7,4 \pm 0,07$; в группе сравнения – $7,4 \pm 0,05$).

На основании полученных результатов можно заключить, что у женщин в родах развивалось состояние компенсированного ацидоза, которое, вероятно, было связано с особенностями обменных процессов матери и плода. В ответ на изменение кислотно-щелочного состояния наступала первичная стадия компенсаторной реакции – усиление выведения кислых продуктов в форме углекислого газа в результате гипервентиляции и, как следствие, – появление признаков гипоксии. Затем, по мере нарастания ацидоза, происходило количественное снижение буферных оснований. Следует заметить, что обнаруженные в артериальной крови здоровых рожениц признаки незначительного ацидотического сдвига быстро выравнивались, и организм женщины мало страдал от изменений в метаболизме.

С другой стороны, осложнение беременности герпес-вирусной инфекцией способствовало срыву сформировавшихся адаптивных механизмов компенсации и развитию метаболического дисбаланса. Данный факт подтверждался статистически достоверным повышением уровня кислых продуктов обмена в артериальной крови рожениц с высоким титром антител к ВПГ-1 1:12800 ($-8,0 \pm 0,85$; в контрольной группе – $-2,8 \pm 0,85$ ммоль/л), который сочетался со смещением рН в сторону кислой реакции ($7,29 \pm 0,01$; в контрольной группе – $7,4 \pm 0,07$). Кроме того, установлено значительное уменьшение pCO_2 ($33,8 \pm 0,47$; в контрольной группе – $42,16 \pm 0,9$ мм рт.ст.) и уровня буферных оснований ($\text{HCO}_3\text{-std}$: $19,7 \pm 0,35$, в контрольной группе – $23,0 \pm 0,87$ ммоль/л; $\text{HCO}_3\text{-act}$: $20,1 \pm 0,91$, в контрольной группе – $25,8 \pm 0,56$ ммоль/л). Сниженными оказались и показатели общего CO_2 ($21,2 \pm 0,53$, в контрольной группе – $26,4 \pm 0,54$ мм рт.ст.).

У рожениц с низким уровнем титра антител к ВПГ-1 1:3200 характер изменений кислотно-щелочного равновесия крови был менее выражен. Содержание кислых продуктов обмена в крови снижалось ($-4,4 \pm 0,23$ ммоль/л). Наблюдались более высокие показатели pCO_2 ($39,7 \pm 1,18$ мм рт.ст.) при менее значительном смещении pH крови ($7,34 \pm 0,01$). Уровень буферных оснований и общего CO_2 также заметно увеличивался (HCO_3^- -act – $22,3 \pm 0,2$ ммоль/л; HCO_3^- -std – $21,4 \pm 0,51$ ммоль/л; tCO_2 – $24,3 \pm 0,4$ ммоль/л).

Следовательно, вирус герпеса и его персистенция в организме женщины – фактор, потенцирующий формирование декомпенсированных метаболических состояний, которые при нарушении плацентарного кровообращения способствовали перестройке обменных процессов у плода. Вместе с тем реакция плода при физиологической беременности на окислительный стресс, вызванный родовой деятельностью, существенно отличается от таковой после рождения (табл. 2).

Таблица 2

Динамика показателей кислотно-щелочного равновесия фетальной крови при перенесенной во время беременности герпес-вирусной инфекции

Группы	pH	pCO_2 , мм рт.ст.	BE, ммоль/л	HCO_3^- -act, ммоль/л	HCO_3^- - std, ммоль/л	tCO_2 , ммоль/л
Новорожденные от матерей с титром антител к ВПГ-1: 1:12800	$7,19 \pm 0,01$ $p < 0,001$	$53,2 \pm 1,0$ $p < 0,001$	$-10,0 \pm 0,5$ $p < 0,001$	$21,3 \pm 0,11$ $p < 0,001$	$20,5 \pm 0,44$ $p < 0,001$	$22,4 \pm 0,33$ $p < 0,001$
	1:3200	$7,25 \pm 0,02$ $p < 0,05$	$46,24 \pm 0,7$ $p < 0,05$	$-6,7 \pm 0,31$ $p < 0,001$	$23,2 \pm 0,33$ $p < 0,001$	$22,3 \pm 0,31$ $p < 0,001$
Практически здоровые новорожденные	$7,36 \pm 0,02$	$45,53 \pm 0,6$	$-4,3 \pm 0,24$ $p < 0,001$	$26,1 \pm 0,46$	$23,0 \pm 0,7$ $p < 0,05$	$27,0 \pm 0,71$
Группа сравнения	$7,4 \pm 0,05$	$44,0 \pm 0,8$	$-0,98 \pm 0,6$	$27,6 \pm 0,25$	$25,1 \pm 0,18$	$28,7 \pm 0,78$

Выявленные в ходе исследования признаки развивающегося ацидоза (ВЕ: $-4,3 \pm 0,24$, в группе сравнения – $-0,98 \pm 0,6$ ммоль/л; рН: $7,36 \pm 0,02$, в группе сравнения – $7,4 \pm 0,05$) провоцировали появление повышенных значений $p\text{CO}_2$ ($45,53 \pm 0,6$, в группе сравнения – $44,0 \pm 0,8$ мм рт.ст.). При этом буферная емкость фетальной крови несколько снижалась ($\text{HCO}_3\text{-act}$: $26,1 \pm 0,46$, в группе сравнения – $27,6 \pm 0,25$ ммоль/л; $\text{HCO}_3\text{-std}$: $23,0 \pm 0,7$, в группе сравнения – $25,1 \pm 0,18$ ммоль/л; общий CO_2 : $27,0 \pm 0,71$, в группе сравнения – $28,7 \pm 0,78$ ммоль/л). Такое состояние кислотно-щелочного гомеостаза у плода при физиологическом течении беременности является не патологическим состоянием, а, скорее всего, физиологическим условием своеобразной внутриутробной жизнедеятельности, которая определялась характером окислительно-восстановительных процессов, протекающих в анаэробных условиях.

Что касается герпес-вирусной инфекции, то повышение ее активности во время беременности сопровождалось нарушением обменных процессов в организме плода. При высоком уровне титра антител к ВПГ-1 1:12800 во время беременности в крови пуповины отмечалось достоверное накопление кислых продуктов ($-10,0 \pm 0,5$, в контрольной группе – $-4,3 \pm 0,24$ ммоль/л), что приводило к нарушению почечной секреции H^+ и потере HCO_3^- плазмы ($\text{HCO}_3\text{-act}$: $21,3 \pm 0,11$, в контрольной группе – $26,1 \pm 0,46$ ммоль/л; $\text{HCO}_3\text{-std}$: $20,5 \pm 0,44$, в контрольной группе – $23,0 \pm 0,87$ ммоль/л), а также снижению общего CO_2 ($22,4 \pm 0,33$, в контрольной группе – $27,0 \pm 0,71$ ммоль/л). При этом значения $p\text{CO}_2$ статистически достоверно повышались ($53,2 \pm 1,0$, в контрольной группе – $45,53 \pm 0,6$ мм рт.ст.), что способствовало развитию гиперкапнии и, как следствие, накоплению ионов водорода и снижению рН крови ($7,19 \pm 0,01$, в контрольной группе – $7,36 \pm 0,02$).

В группе новорожденных от матерей с низким уровнем титра антител к ВПГ-1 1:3200 признаки ацидотического сдвига оставались, хотя и менее выраженные. Отмечалось снижение величин ВЕ ($-6,7 \pm 0,31$ ммоль/л) и $p\text{CO}_2$ ($46,24 \pm 0,7$ мм рт.ст.) при увеличении показателей рН ($7,25 \pm 0,02$). Значения стандартных и истинных бикарбо-

натов, а также общего CO_2 соответственно, повышались ($23,2 \pm 0,33$; $22,3 \pm 0,31$ и $24,9 \pm 0,12$ ммоль/л).

Проведенное комплексное исследование кислотно-щелочного равновесия крови плода и матери в физиологических условиях и при герпесной патологии показало наличие тесной связи и взаимного влияния их обменных процессов. Функциональное состояние организма беременной по отношению к организму плода явилось основным фактором, оказывающим глубокое воздействие на его ключевые, жизнеобеспечивающие системы, в первую очередь на систему, обеспечивающую поддержание гомеостаза. Изменение физиологических условий течения беременности (обострение герпесной инфекции с тяжелым по агрессивности течением) способствовало срыву компенсаторных механизмов адаптации и развитию декомпенсированных метаболических состояний у матери и плода. И чем выраженнее были изменения в кислотно-щелочном гомеостазе беременной, тем отчетливее проявлялись признаки метаболического и дыхательного дисбаланса у плода.

При сравнительном анализе газового состава и свойств крови женщины с физиологической беременностью и в условиях герпесной инфекции получены следующие результаты. У рожениц с физиологической беременностью не было выявлено достоверных отклонений в показателях pO_2 ($39,22 \pm 0,5$ мм рт.ст., в группе сравнения – $40,21 \pm 0,8$ мм рт.ст.) и p50 ($29,1 \pm 0,9$ мм рт.ст., в группе сравнения – $30,7 \pm 0,8$ мм рт.ст.). Значения оксигемоглобина ($95,3 \pm 0,17$, в группе сравнения – $97,8 \pm 0,37\%$) и метгемоглобина ($0,81 \pm 0,12$, в группе сравнения – $0,78 \pm 0,11\%$) также отличались незначительно от группы небеременных женщин. При этом отмечено снижение уровня гемоглобина ($115 \pm 2,15$ г/л, в группе сравнения – $120 \pm 1,3$ г/л), явившееся следствием формирующейся во время беременности относительной гипоксии в ответ на скрытый железодефицит (табл. 3). Вместе с тем наличие высоких титров антител к ВПГ-1 1:12800 во время беременности приводило к статистически достоверному снижению pO_2 ($27,63 \pm 0,7$ мм рт.ст., в контрольной группе – $39,22 \pm 0,5$ мм рт.ст.) и степени сатура-

ции гемоглобина кислородом (p50) ($25,1 \pm 0,5$ мм рт.ст., в контрольной группе – $30,7 \pm 0,8$ мм рт.ст.) в крови рожениц. В результате возникал дефицит кислорода, который усугублялся уменьшением выявляемого количества общего гемоглобина ($98 \pm 1,73$ г/л, в контрольной группе – $115 \pm 2,15$ г/л) и его оксигенированной формы ($90,2 \pm 0,47\%$, в контрольной группе – $97,8 \pm 0,37\%$). Наблюдаемый рост показателей метгемоглобина ($1,11 \pm 0,11\%$, в контрольной группе – $0,81 \pm 0,12\%$) также снижал кислородтранспортные свойства крови рожениц с герпесной инфекцией.

Таблица 3

**Динамика показателей газотранспортной функции крови
в зависимости от титров антител к ВПГ-1**

Группы	pO ₂ , мм рт.ст.	p50, мм рт.ст.	Hb, г/л	HbO ₂ , %	metHb, %
Роженицы с титром антител к ВПГ-1: 1:12800	$27,63 \pm 0,7$ p<0,001	$25,1 \pm 0,5$ p<0,001	$98 \pm 1,73$ p<0,001	$90,2 \pm 0,47$ p<0,001	$1,11 \pm 0,11$ p<0,001
1:3200	$29,98 \pm 0,4$ p<0,001	$27,1 \pm 0,3$ p<0,001	$109 \pm 1,35$ p<0,001	$93,3 \pm 0,44$ p<0,001	$0,98 \pm 0,13$ p<0,001
Роженицы практически здоровые	$39,22 \pm 0,5$	$29,1 \pm 0,9$	$115 \pm 2,15$ p<0,05	$95,3 \pm 0,27$	$0,81 \pm 0,12$
Небеременные женщины	$40,21 \pm 0,8$	$30,7 \pm 0,8$	$120 \pm 1,3$	$97,8 \pm 0,37$	$0,78 \pm 0,11$

У рожениц с низкими значениями титра антител к ВПГ 1:3200 отмечены менее выраженные нарушения кислородтранспортных свойств крови, которые выражались в росте pO₂ ($29,98 \pm 0,4$ мм рт.ст.) и p50 ($27,1 \pm 0,3$ мм рт.ст.). Более высокими оказались концентрации общего гемоглобина ($109 \pm 1,35$ г/л), а также оксигемоглобина ($93,3 \pm 0,44\%$) крови при сниженных значениях метгемоглобина ($0,98 \pm 0,13\%$).

Можно предположить, что выявленное изменение газотранспортных свойств гемоглобина обусловлено функционированием процессов его синтеза. При анализе состава фракций гемоглобина эрит-

роцитов практически здоровых рожениц достоверных отклонений от группы небеременных женщин выявлено не было (HbA: $90,83 \pm 0,97$, в группе сравнения – $92,1 \pm 0,7\%$; HbA₂: $5,93 \pm 0,54$, в группе сравнения – $5,1 \pm 0,3\%$; HbF: $3,24 \pm 0,28$, в группе сравнения – $2,8 \pm 0,5\%$) (табл. 4).

Таблица 4

Содержание отдельных фракций гемоглобина и его термостабильных форм в крови рожениц в зависимости от титров антител к ВПГ-1

Группы	Фракции Hb, %			Термо-стабильный, %	Термо-лабильный, %
	A	A ₂	F		
Роженицы с титром антител к ВПГ-1: 1:12800	$87,43 \pm 0,3$ $p < 0,01$	$8,15 \pm 0,15$ $p < 0,001$	$4,42 \pm 0,16$ $p < 0,05$	$74,14 \pm 0,96$ $p < 0,001$	$25,86 \pm 0,7$ $p < 0,001$
1:3200	$89,15 \pm 0,4$	$7,14 \pm 0,51$ $p < 0,01$	$3,71 \pm 0,21$	$79,84 \pm 2,19$ $p < 0,05$	$20,16 \pm 0,3$ $p < 0,001$
Роженицы практически здоровые	$90,83 \pm 0,9$	$5,93 \pm 0,54$	$3,24 \pm 0,28$	$87,21 \pm 0,42$ $p < 0,05$	$12,78 \pm 0,2$ $p < 0,05$
Небеременные женщины	$92,1 \pm 0,7$	$5,1 \pm 0,3$	$2,8 \pm 0,5$	$92,4 \pm 0,3$	$7,6 \pm 0,1$

Вместе с тем установленное повышение кислых продуктов обмена в крови рожениц способствовало изменению функциональных свойств гемоглобина, что выразилось в снижении уровня термостабильного ($87,21 \pm 0,42$, в группе сравнения – $92,4 \pm 0,3\%$) и увеличении его термолабильной формы ($12,78 \pm 0,2$, в группе сравнения – $7,6 \pm 0,1\%$).

С другой стороны, сопутствующее беременности обострение герпесной инфекции (титр антител к ВПГ-1 1:12800) способствовало изменению соотношения основных фракций гемоглобина, которое проявлялось снижением содержания HbA ($87,43 \pm 0,3$) при одновременном повышении HbA₂ ($8,15 \pm 0,15$) и HbF ($4,42 \pm 0,16$). Наряду с этим выявлялось достоверное повышение показателей нестабильных его форм ($25,86 \pm 0,7\%$) по сравнению со стабильными, содержание которых резко уменьшалось ($74,14 \pm 0,96\%$).

При снижении уровня титра антител к ВПГ-1 во время беременности до 1:3200 выраженность структурных и функциональных изменений молекулы гемоглобина снижалась. Значения HbA достоверно не отличались от группы практически здоровых рожениц ($89,15 \pm 0,4\%$). Показатели HbA₂ снижались ($7,14 \pm 0,51\%$), а HbF соответствовали группе здоровых рожениц ($3,71 \pm 0,21\%$). Повышалось содержание термостабильного ($79,84 \pm 2,19\%$) при снижении концентрации термолабильного гемоглобина ($20,16 \pm 0,3\%$).

Установленное изменение структурно-функциональных свойств гемоглобина явилось причиной развития кислородной недостаточности организма женщины с герпесной патологией, что, несомненно, отражалось на кислородном гомеостазе плода. В ходе исследования газового состава крови пуповины практически здоровых новорожденных отмечено уменьшение показателей pO₂ ($36,13 \pm 0,98$, в группе сравнения – $40,21 \pm 0,8$ мм рт.ст.) и p50 ($21,3 \pm 0,4$, в группе сравнения – $30,7 \pm 0,8$ мм рт.ст.) (табл. 5).

Таблица 5

Динамика показателей газотранспортной функции фетальной крови новорожденных при различной степени выраженности герпесной инфекции во время беременности

Группы новорожденных	pO ₂ , мм рт.ст.	p50, мм рт.ст.	hb, г/л	hbO ₂ , %	metHb, %
Новорожденные от матерей с титром антител к ВПГ-1: 1:12800	$18,57 \pm 0,3$ p<0,001	$18,1 \pm 0,6$ p<0,001	$145 \pm 2,2$ p<0,001	$88,5 \pm 0,3$ p<0,01	$1,2 \pm 0,12$ p<0,01
	$26,14 \pm 0,8$ p<0,001	$20,4 \pm 0,9$ p<0,001	$156 \pm 1,3$ p<0,001	$94,3 \pm 0,4$ p<0,05	$1,01 \pm 0,16$ p<0,05
Практически здоровые новорожденные	$36,13 \pm 0,9$ p<0,05	$21,3 \pm 0,4$ p<0,001	$167 \pm 3,6$ p<0,001	$96,0 \pm 0,9$	$0,9 \pm 0,2$ p<0,001
Группа сравнения	$40,21 \pm 0,8$	$30,7 \pm 0,8$	$120 \pm 1,3$	$98,8 \pm 0,2$	$0,78 \pm 0,1$

При этом обращает на себя внимание тот факт, что при снижении степени сатурации гемоглобина кислородом на фоне повышен-

ных значений общего содержания гемоглобина ($167 \pm 1,6$, в группе сравнения – $120 \pm 0,9$ г/л) наблюдалась более низкая концентрация оксигемоглобина ($96,0 \pm 0,9$, в группе сравнения – $98,8 \pm 0,2\%$) при повышении содержания метгемоглобина ($0,9 \pm 0,2$, в группе сравнения – $0,78 \pm 0,1\%$).

Установленные изменения можно считать физиологически обоснованными, так как родовая деятельность приводила к изменению оксигенации крови в межворсинчатых пространствах, что, в свою очередь, являлось одной из вероятных причин того, что снабжение плода кислородом в этот период снижалось. При этом компенсация кислородной недостаточности обеспечивалась целым рядом адаптивных процессов у плода, один из которых – фетализация крови. Увеличение уровня фетального гемоглобина с повышенным сродством к кислороду способствует более легкому трансплацентарному переходу кислорода от матери к плоду, а также благоприятствует насыщению крови кислородом у новорожденных в условиях еще несовершенного внешнего дыхания. Это подтверждалось выявляемым ростом показателей фетального гемоглобина ($56,71 \pm 0,64$, в группе сравнения – $2,9 \pm 0,5\%$) по сравнению с гемоглобином A ($32,57 \pm 0,35$, в группе сравнения – $92 \pm 0,7\%$) и A₂ ($10,72 \pm 0,3$, в группе сравнения – $2,9 \pm 0,5\%$) (табл. 6).

Необходимо заметить, что в связи с изменением соотношения представленных форм гемоглобинов (преобладанием фетального над гемоглобином A) соответственно изменялись его физико-химические свойства. Так, в крови сосудов пуповины у практически здоровых новорожденных обнаружено снижение содержания термостабильного гемоглобина ($78,52 \pm 0,66$, в группе сравнения – $92,4 \pm 0,3\%$) и повышение доли термолабильного ($21,47 \pm 0,23$, в группе сравнения – $7,6 \pm 0,1\%$). Однако выявленные изменения в структуре и свойствах плодового гемоглобина следует считать не патологическим состоянием, а своеобразным физиологическим условием его жизнедеятельности, которое адаптировано к пониженному кислородному режиму в анаэробных условиях развития.

Таблица 6

Содержание отдельных фракций гемоглобина и его термостабильных форм в пуповинной крови новорожденных в норме и при различной степени выраженности герпесной патологии

Группы беременных	Фракции Hb, %			Термостабильный, %	Термолabileный, %
	Л	A ₂	F		
Новорожденные от матерей с титром антител к ВПГ-1: 1:12800	16,81±0,82 p<0,001	13,06±0,54 p<0,001	70,13±0,95 p<0,001	64,93±1,41 p<0,001	35,06±0,84 p<0,001
	1:3200	26,98±0,72 p<0,001	11,85±0,29 p<0,05	61,17±0,41 p<0,001	73,15±0,53 p<0,001
Практически здоровые новорожденные	32,57±0,35 p<0,001	10,72±0,28 p<0,001	56,71±0,64 p<0,001	78,52±0,66 p<0,001	21,47±0,23 p<0,001
Группа сравнения	92±0,7	5,1±0,3	2,9±0,5	92,4±0,3	7,6±0,1

Изучение кислородного обмена в фетальной крови новорожденных от матерей, перенесших обострение герпесной инфекции во время беременности, показало, что по мере нарастания агрессивности инфекции степень выраженности нарушений в оксигенации тканей и систем органов заметно увеличивалась. Так, наличие высокого уровня титров антител к ВПГ-1 1:12800 во время беременности и установленное снижение кислородной емкости крови матери приводило к статистически достоверному падению показателей рO₂ (18,57±0,33, в контрольной группе – 36,13±0,9 мм рт.ст.) и р50 (18,1±0,6, в контрольной группе – 21,3±0,4 мм рт.ст.) в крови сосудов пуповины, коррелирующее с низкими показателями общего гемоглобина (145±2,2, в контрольной группе – 167±1,6 г/л). Одновременно в крови пуповины новорожденных от матерей с высокоактивной герпесной инфекцией выявлялось снижение концентрации оксигемоглобина (88,5±0,3, в контроле 96,0±0,9%). Патологически высокими оказались показатели метгемоглобина (1,2±0,12, в контроле 0,9±0,2%).

Обнаруженное снижение кислородтранспортных свойств фетальной крови новорожденных от матерей с герпесной инфекцией – следствие незрелости системы гемопоэза. В результате в крови пуповины отмечался статистически достоверный рост показателей фетального гемоглобина ($70,13 \pm 0,95$, в контрольной группе – $56,71 \pm 0,64\%$) при одновременном снижении гемоглобина A ($16,81 \pm 0,82$, в контроле – $32,57 \pm 0,35\%$) и A₂ ($13,06 \pm 0,54$, в контрольной группе – $10,72 \pm 0,28\%$). Такое изменение в соотношении фракций гемоглобина коррелировало с показателями, отражающими свойства последнего, т.е. его стабильностью, которая резко снижалась ($64,93 \pm 1,41$, в контрольной группе – $78,52 \pm 0,66\%$). Уровень термолabileного гемоглобина, наоборот, значительно увеличивался ($35,06 \pm 0,84$, в контрольной группе – $21,47 \pm 0,23\%$).

Низкий титр антител к ВПГ-1 1:3200 во время беременности способствовал снижению выраженности нарушений в кислородном обмене плода. Было отмечено повышение рО₂ ($26,14 \pm 0,79$ мм рт.ст.) и р50 ($20,4 \pm 0,9$ мм рт.ст.). В результате несколько улучшались показатели оксигенации крови пуповины: увеличилась концентрация общего гемоглобина ($156 \pm 1,3$ г/л) и его деривата оксигемоглобина ($94,3 \pm 0,4\%$), при снижении содержания метгемоглобина ($1,01 \pm 0,16\%$). Одновременно определялось увеличение концентрации гемоглобина A ($26,98 \pm 0,72\%$), при снижении значений A₂ ($11,85 \pm 0,29\%$) и гемоглобина F ($61,17 \pm 0,41\%$). Количество термостабильного гемоглобина увеличивалось ($73,15 \pm 0,53\%$), а термолabileного, наоборот, снижалось ($26,84 \pm 0,43\%$), что улучшало его кислородтранспортные свойства.

Таким образом, для внутриутробной жизнедеятельности плода и поддержания у него нормального кислородного режима характерно наличие высокого уровня фетального гемоглобина. При этом наблюдаемый статистически достоверный рост в 1,25 раза концентрации последнего в крови пуповины новорожденных от матерей с агрессивной герпесной инфекцией свидетельствовал о незрелости эритрона плода и механизмов адаптации, что приводило к развитию гипоксии.

Оценивая компенсаторные возможности эритрона матери и плода, регулирующие кислородный гомеостаз в физиологических условиях и при герпесной патологии, следует указать на разнонаправленность ответной реакции синтеза 2,3-ДФГ, являющегося регулятором сродства гемоглобина к кислороду (табл. 7). Так, если у практически здоровых женщин в родах эффект повышенной отдачи кислорода гемоглобином регулировался компенсаторным увеличением содержания общего ($5,77 \pm 0,14$ мкмоль/мл, в группе сравнения – $4,7 \pm 0,11$ мкмоль/мл) и связанного 2,3-ДФГ ($5,01 \pm 0,25$ мкмоль/мл, в группе сравнения – $4,54 \pm 0,12$ мкмоль/мл) при неизменной концентрации водородных ионов, то у рожениц с титром антител к ВПГ-1 1:12800 данный механизм не реализовался.

Таблица 7

Динамика показателей общего и связанного с гемоглобином 2,3-ДФГ у женщин в родах в зависимости от титров антител к ВПГ-1

Группы	2,3-ДФГ, мкмоль/мл	Эффективная 2,3-ДФГ, мкмоль/мл
Роженицы с титром антител к ВПГ-1: 1: 12800	$7,05 \pm 0,07$ $p < 0,001$	$6,82 \pm 0,01$ $p < 0,001$
	$6,36 \pm 0,09$ $p < 0,05$	$6,061 \pm 0,16$ $p < 0,01$
Практически здоровые роженицы	$5,77 \pm 0,14$ $p < 0,01$	$5,01 \pm 0,25$ $p < 0,05$
Небеременные женщины	$4,7 \pm 0,11$	$4,54 \pm 0,12$

Одновременно со значительным увеличением уровня внутриэритроцитарного 2,3-ДФГ ($7,05 \pm 0,07$ мкмоль/мл, в контрольной группе – $5,77 \pm 0,14$ мкмоль/мл) и его «эффективной» фракции ($6,82 \pm 0,01$ мкмоль/мл, в контрольной группе – $5,01 \pm 0,25$ мкмоль/мл) снижалась концентрация водородных ионов и CO_2 . При этом дополнительный эффект 2,3-ДФГ на сродство гемоглобина к кислороду был полностью нивелирован уменьшением данных величин в артериальной крови. В результате сродство гемоглобина к кислороду не снижалось, и организм женщины испытывал кислородную недостаточность.

При снижении активности герпесной инфекции во время беременности (титр антител к ВПГ-1 1:3200) уровень выявляемого общего ($6,36 \pm 0,09$ мкмоль/мл) и связанного 2,3-ДФГ с гемоглобином ($6,061 \pm 0,16$ мкмоль/мл) при одновременном увеличении рН и CO_2 также снижался, но признаки кислородной недостаточности все же имели место.

Рассматривая вопрос адаптации организма плода к сниженному кислородному режиму в период физиологических родов, необходимо заметить, что причиной повышенного сродства гемоглобина к кислороду является более низкая по сравнению с гемоглобином А способность фетального гемоглобина взаимодействовать с 2,3-ДФГ. Такая особенность регуляции кислородтранспортной функции гемоглобина благоприятствует трансплацентарному переходу кислорода от матери к плоду, а также способствует насыщению крови кислородом в условиях еще несовершенной функции их внешнего дыхания. По результатам исследования пуповинной крови у вполне здоровых новорожденных, при некотором смещении рН крови в сторону кислой реакции и незначительном увеличении pCO_2 , отмечалась активизация синтеза 2,3-ДФГ, которая проявлялась в увеличении метаболита в эритроцитах ($5,1 \pm 0,21$, в группе сравнения – $4,7 \pm 0,11$ мкмоль/л) (табл. 8).

Таблица 8

Динамика показателей 2,3-ДФГ в фетальной крови новорожденных при различной степени выраженности герпесной патологии во время беременности

Группы	2,3-ДФГ, мкмоль/мл	Эффективная 2,3-ДФГ, мкмоль/мл
Новорожденные от матерей с титром антител к ВПГ-1: 1:12800 1:3200	$6,43 \pm 0,19$ $p < 0,001$	$4,57 \pm 0,097$ $p < 0,01$
	$5,26 \pm 0,12$	$3,59 \pm 0,079$
Практически здоровые новорожденные	$5,1 \pm 0,21$ $p < 0,05$	$3,83 \pm 0,097$ $p < 0,05$
Группа сравнения	$4,7 \pm 0,11$	$4,54 \pm 0,12$

Обращает на себя внимание и тот факт, что количество непосредственно связанной с гемоглобином фракции 2,3-ДФГ у новорож-

денных данной группы значительно ниже, чем в группе сравнения ($3,83 \pm 0,097$ и $4,54 \pm 0,12$ мкмоль/л соответственно). Такое уменьшение «эффективной» фракции 2,3-ДФГ коррелировало с высокими показателями фетального гемоглобина и подтверждало существующее мнение о снижении его способности взаимодействовать с метаболитом.

В отличие от практически здоровых новорожденных у детей, чьи матери перенесли во время беременности обострение герпесной инфекции (титр антител к ВПГ-1 1:12800), наблюдалось возрастание концентрации как общей ($6,43 \pm 0,19$ мкмоль/мл, в контрольной группе – $5,1 \pm 0,21$ мкмоль/мл), так и связанной с гемоглобином 2,3-ДФГ ($4,57 \pm 0,097$ мкмоль/мл, в контрольной группе – $3,83 \pm 0,097$ мкмоль/мл). Следует заметить, что с повышением содержания внутриэритроцитарного 2,3-ДФГ увеличивалась и разница между общим содержанием и «эффективной» его формой в сторону преобладания первого, что в еще большей степени повышало сродство гемоглобина к кислороду. В таких условиях следовало бы ожидать улучшения оксигенации тканей и органов, но этого не происходило в силу появляющихся стойких нарушений в кислотно-щелочном гомеостазе (смещение рН и гиперкапния). В результате отмечалось изменение соотношения окси-дезоксистерuktur гемоглобина, что усиливало риск развития гипоксии у плода.

Снижение проявлений герпесной инфекции у женщины во время беременности (титр антител к ВПГ-1 1:3200) сопровождалось снижением концентрации в крови сосудов пуповины общей ($5,26 \pm 0,12$ мкмоль/мл) и «эффективной» фракции 2,3-ДФГ ($5,1 \pm 0,21$ мкмоль/мл).

Представленные в данном разделе результаты исследования позволяют говорить о ведущей роли герпес-вирусной инфекции в инициации патологических механизмов регуляции обменных процессов фетоплацентарной системы в целом. Системный анализ важнейших функций крови, как у матери, так и у плода способствует пониманию их тесной физиологической связи. Высокие адаптивные механизмы компенсации гипоксического состояния у практически здоровых рожениц благоприятно сказывались на процессах газообмена

плода. Вместе с тем срыв адаптивных возможностей основных жизнеобеспечивающих систем организма женщины, перенесшей во время беременности обострение герпесной инфекции с тяжелым по агрессивности течением, оказывал глубокое воздействие на гомеостаз плода. Установленная метаболическая и дыхательная недостаточность эритрона плода при герпесной патологии явилась патогенным фактором развития хронической внутриутробной гипоксии, которая негативно сказывалась на состоянии новорожденного и изменяла качество его адаптивных реакций при переходе к постнатальному периоду жизни.

Выводы

Герпес-вирусная инфекция у беременных сопровождается развитием метаболического ацидоза со смещением рН крови, что приводит к изменению газового состава крови: снижению pO_2 и степени сатурации гемоглобина кислородом, развитию гипокапнии.

Герпес-вирусная инфекция у беременных и сопутствующий ей окислительный стресс способствуют изменению характера синтеза гемоглобина в сторону образования патологически нестойких форм, нарушению его кислородтранспортной функции (уменьшение оксигемоглобина и повышение метгемоглобина), а также активности регулирующих средств гемоглобина к кислороду систем (нивелирование ответа высоких показателей 2,3-ДФГ снижением рН и pCO_2).

Во время беременности, осложненной герпес-вирусной инфекцией, происходит снижение энергетического статуса эритроцитов рожениц, при котором отмечается уменьшение скорости гликолитических процессов, увеличение гидролиза АТФ, активизация реакций дефосфорилирования, приводящих к накоплению неорганического фосфора.

Обострение герпес-вирусной инфекции во время беременности с тяжелым по агрессивности течением сопровождается развитием у плода метаболического ацидоза с признаками гиперкапнии, что способствует снижению pO_2 и степени сатурации гемоглобина кислородом.

Герпес-вирусная инфекция и персистенция ее в организме новорожденного способствуют фетализации крови (усиление синтеза фетального гемоглобина), нарушению конформационной стабильности молекулы гемоглобина (повышение уровня термолабильного и уменьшение термостабильного гемоглобинов).

Герпес-вирусная инфекция и сопутствующий ей окислительный стресс способствуют нарушению кислородтранспортной функции фетального гемоглобина крови новорожденных (уменьшение уровня оксигемоглобина и повышение метгемоглобина), а также активности регулирующих средств гемоглобина к кислороду систем (нивелирование ответа высоких показателей 2,3-ДФГ снижением рН, ростом рСО₂ и уровня фетального гемоглобина).

Нарушение метаболической и кислородной стабильности эритрона беременных с герпес-вирусной инфекцией при изменении структурной целостности фетоплацентарного барьера приводит к развитию хронической внутриутробной гипоксии у плода и новорожденных.

ЗАКОНОМЕРНОСТИ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА У БЕРЕМЕННЫХ, ПЕРЕНЕСШИХ ОБОСТРЕНИЕ ГЕРПЕС- ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ В ПЕРИОД ГЕСТАЦИИ

При неосложненном течении беременности спектр жирных кислот в организме матери относительно стабилен. При анализе количественного содержания жирных кислот выявлено, что у практически здоровых беременных женщин среди жирных кислот преобладают: пальмитиновая (C16:0), стеариновая (C18:0), олеиновая (C18:1 ω 9), линолевая (C18:2 ω 6), арахидоновая (C20:4 ω 6) и докозагексаеновая (C22:6 ω 3).

Модификация состава жирных кислот липидов эритроцитов у беременных с герпес-вирусной инфекцией проявлялась увеличением доли отдельных насыщенных – C_{14:0}-миристиновой, C_{16:0}-пальмитиновой и C_{18:0}-стеариновой жирных кислот, снижением содержания моноеновых – C_{16:1}-пальмолеиновой и C_{18:1}-олеиновой жирных кислот, ω -3 полиненасыщенных – C_{18:3} линоленовой, эйкозопентаеновой, докозогексаеновой жирных кислот.

Так, при обострении беременности в I триместре (титр антител к ВПГ 1:12800) содержание миристиновой кислоты составляло 2,48 \pm 0,11%, (контроль – 1,66 \pm 0,15%), пальмитиновой – 24,5 \pm 1,15% (контроль – 20,8 \pm 1,2%), стеариновой – 10,3 \pm 0,93% (контроль – 9,86 \pm 1,10%), к концу срока гестации содержание этих насыщенных жирных кислот при высоком титре антител также было повышено и составляло соответственно 2,61 \pm 0,10%, 28,0 \pm 1,12%, 14,40 \pm 0,81% (контроль – 1,72 \pm 0,13%, 24,3 \pm 1,0%, 9,32 \pm 0,54%) (табл. 9).

Содержание ненасыщенных жирных кислот липидов эритроцитов у беременных с герпесом представляло противоположную картину. При обострении герпеса в I триместре (титр антител к ВПГ 1:12800) содержание пальмолеиновой ненасыщенной кислоты снижалось до 2,86 \pm 0,19% (контроль – 3,52 \pm 0,16%), олеиновой – до 17,13 \pm 0,94% (контроль – 18,32 \pm 1,26%). Аналогичная картина изменения ненасыщенных жирных кислот наблюдалась и к концу III триместра (табл. 9).

Состав насыщенных и ненасыщенных жирных кислот липидов эритроцитов у беременных с герпес-вирусной инфекцией (% от суммы)

Жирные кислоты	I триместр		II триместр		III триместр	
	контроль	ГВИ	контроль	ГВИ	контроль	ГВИ
Миристиновая C _{14:0}	1,66±0,15	2,48±0,11 p<0,001	1,81±0,19	2,93±0,21 p<0,001	1,72±0,13	2,61±0,10 p<0,001
Пальмитиновая C _{16:0}	20,8±1,2	24,5±1,15 p<0,05	22,0±1,10	26,6±1,12 p<0,01	24,3±1,0	28,0±1,12 p<0,001
Пальмолеиновая C _{16:1}	3,52±0,16	2,86±0,19 p<0,05	3,71±0,24	3,14±0,18	2,93±0,22	2,34±0,16 p<0,05
Стеариновая C _{18:0}	9,86±1,10	10,3±0,93	10,21±0,90	12,88±0,70 p<0,05	9,32±0,54	14,4±0,81 p<0,001
Олеиновая C _{18:1}	18,32±1,26	17,13±0,94	18,70±1,10	15,10±1,13 p<0,05	19,83±0,98	18,10±1,12

При изучении ω -3 и ω -6 ПНЖК также выявлено изменение состава данных кислот. Если обострение герпес-вирусной инфекции (титр антител к ВПГ 1:12800) наблюдалась в I триместре, то содержание линоленовой ω -3 ПНЖК в мембранах липидов эритроцитов составляло 0,13±0,04%, тогда как в группе женщин без герпеса этот показатель составил 0,22±0,02% (p<0,05); во II триместре содержание данной кислоты при обострении ГВИ также достоверно снижалось и составляло 0,12±0,02%, в контрольной группе – 0,28±0,03% (p<0,01); в III триместре при высокоактивной ГВИ содержание линоленовой кислоты в липидах мембран эритроцитов было снижено до 0,18±0,02%, контроль – 0,31±0,05% (p<0,05). Содержание эйкозопентаеновой кислоты (ЭПК) при обострении ГВИ в I триместре (титр антител к ВПГ 1:12800) составляло 1,10±0,05%, контроль – 1,19±0,08%; во II триместре – 0,96±0,06%, контроль – 1,17±0,07% (p<0,05); в III триместре при активации ГВИ содержание ЭПК снижалось до 1,01±0,04%, контроль – 1,24±0,04% (p<0,05), (табл. 10).

Аналогичная картина – для докозогексаеновой кислоты (ДГК). Если активация ГВИ наблюдалась в I триместре, то количество ДГК в мембранах липидов эритроцитов составляло 6,10±0,18% (группа контроля – 8,54±0,27% (p<0,001)); во II триместре количество ДГК снижалось до 6,74±0,21% (контрольная группа – 7,92±0,18% (p<0,001)); к

концу периода гестации количество данной кислоты было также ниже показателя группы контроля и составляло $6,02 \pm 0,21\%$, контрольная группа – $8,31 \pm 0,20\%$ ($p < 0,05$) (табл. 10). ЭПК и ДГК относятся к числу незаменимых ЖК, так как их синтез из предшественника – линоленовой кислоты – ограничен незначительным количеством ферментов, катализирующих процессы элонгации и переноса атомов водорода, а также высокой скоростью окислительных процессов (С.В.Павлович, 1998).

Таблица 10

Состав ω -3 и ω -6 полиненасыщенных жирных кислот липидов эритроцитов у беременных с герпес-вирусной инфекцией (% от суммы)

Жирные кислоты	I триместр		II триместр		III триместр	
	контроль	ГВИ	контроль	ГВИ	контроль	ГВИ
ω -3 Линоленовая C _{18:3}	$0,22 \pm 0,02$	$0,13 \pm 0,04$ $p < 0,05$	$0,28 \pm 0,03$	$0,12 \pm 0,02$ $p < 0,01$	$0,31 \pm 0,05$	$0,18 \pm 0,02$ $p < 0,05$
Эйкозапентаеновая C _{20:5}	$1,19 \pm 0,08$	$1,10 \pm 0,05$	$1,17 \pm 0,07$	$0,96 \pm 0,06$ $p < 0,05$	$1,24 \pm 0,08$	$1,01 \pm 0,04$ $p < 0,05$
Докозагексаеновая C _{22:6}	$8,54 \pm 0,27$	$6,10 \pm 0,18$ $p < 0,001$	$7,92 \pm 0,18$	$6,74 \pm 0,21$ $p < 0,001$	$8,31 \pm 0,29$	$6,02 \pm 0,21$ $p < 0,001$
ω -6 Линолевая C _{18:2}	$4,81 \pm 0,16$	$5,43 \pm 0,22$ $p < 0,001$	$4,60 \pm 0,22$	$5,91 \pm 0,34$ $p < 0,01$	$5,31 \pm 0,18$	$6,12 \pm 0,24$ $p < 0,05$
Арахидоновая C _{20:4}	$2,94 \pm 0,10$	$3,26 \pm 0,12$ $P < 0,05$	$4,0 \pm 0,86$	$4,59 \pm 0,72$	$3,81 \pm 0,41$	$5,12 \pm 0,61$ $p < 0,05$

Выявленное в исследовании снижение ω -3 ЭПК и ДГК у беременных с ГВИ по сравнению с контролем может свидетельствовать о возможном угнетении активности Na^+ , K^+ -АТФазы, рецепторов к инсулину и транспортных систем, поступления в клетку глюкозы, гиперчувствительности гладкомышечных клеток к действию вазоконстрикторов и резистентности к вазодилаторам (Т.П.Новгородцева, А.В.Вязова, Н.В.Жукова, 2006).

При изучении ω -6 ПНЖК была выявлена противоположная картина изменения состава линолевой и арахидоновой ЖК. Содержание данных кислот увеличивалось на протяжении всей беременности. При высоком титре антител к ВПГ в I триместре содержание линолевой кислоты липидов эритроцитов у беременных составляло

5,43±0,22%, тогда как в группе контроля аналогичный показатель – 4,81±0,16% ($p<0,001$); во II триместре содержание линолевой кислоты увеличивалось до 5,91±0,34%, контроль – 4,60±0,22% ($p<0,05$), а к концу III триместра данный показатель возрастал до 6,12±0,24%, контроль – 5,31±0,18% ($p<0,05$). Избыток линолевой кислоты стимулирует процессы перекисного окисления липидов и может быть причиной деструкции мембран клеток.

Содержание арахидоновой кислоты в липидах мембран эритроцитов при беременности, осложненной ГВИ, также имело тенденцию к увеличению. При активации вируса герпеса в I триместре количество арахидоновой кислоты липидов мембран эритроцитов составляло 3,26±0,12%, контроль – 2,94±0,10% ($p<0,05$); во II триместре увеличивалось до 4,59±0,72%, контрольная группа – 4,0±0,86%; в III триместре, при титре антител к ВПГ 1:12800, данный показатель возрастал до 5,12±0,61%, контроль – 3,81±0,41% ($p<0,05$).

Арахидоновая кислота является мощным субстратом окисления и обладает выраженным провоспалительным свойством. Из нее образуются лейкотриены 4-й серии, принадлежащие к наиболее активным медиаторам воспаления (С.В.Павлович, 1998). Повышение содержания ω -6 ПНЖК обеспечивает воспалительный компонент, оказывает влияние на агрегацию тромбоцитов, функционирование иммунной системы. Встраиваясь в фосфолипиды мембран, ПНЖК во многом определяют специфическую функцию клеток. Чем больше двойных связей содержат жирные кислоты фосфолипидов и, следовательно, чем выше текучесть мембран, тем выше активность всех встроенных в мембрану рецепторов, транспортных и сигнальных систем (S.L.Elias, S.M.Innis, 2001).

При изучении эйкозеновых жирных кислот ряда C_{20} было выявлено изменение их содержания при беременности, осложненной герпес-вирусной инфекции на протяжении всего периода гестации. Если активация вируса простого герпеса наблюдалась в I триместре, то содержание арахидоновой кислоты ($C_{20:0}$) составляло 0,59±0,08%, контроль – 0,42±0,03%; во II триместре при обострении герпес-вирусной инфекции содержание данной кислоты увеличивалось до 0,57±0,07%,

контрольная группа – $0,36 \pm 0,04\%$; к концу III триместра содержание арахидиновой кислоты практически не отличалось от показателя группы контроля (табл. 11).

Таблица 11

Показатели содержания эйкозаноидов липидов эритроцитов у беременных с герпес-вирусной инфекцией

Жирные кислоты	I триместр		II триместр		III триместр	
	контроль	ГВИ	контроль	ГВИ	контроль	ГВИ
Арахидиновая C _{20:0}	$0,42 \pm 0,03$	$0,59 \pm 0,08$ p<0,01	$0,36 \pm 0,04$	$0,57 \pm 0,05$ p<0,01	$0,48 \pm 0,09$	$0,52 \pm 0,06$
Цис-эйкозеновая C _{20:1}	$0,13 \pm 0,04$	$0,28 \pm 0,03$ p<0,01	$0,15 \pm 0,06$	$0,34 \pm 0,06$ p<0,05	$0,12 \pm 0,05$	$0,39 \pm 0,07$ p<0,01
Эйкозандиеновая C _{20:2}	$0,18 \pm 0,04$	$0,36 \pm 0,03$ p<0,001	$0,19 \pm 0,08$	$0,41 \pm 0,07$ p<0,05	$0,22 \pm 0,06$	$0,31 \pm 0,05$
Эйкозотриеновая C _{20:3}	$0,62 \pm 0,09$	$0,89 \pm 0,06$ p<0,05	$0,77 \pm 0,05$	$0,91 \pm 0,04$ p<0,05	$0,70 \pm 0,05$	$0,87 \pm 0,03$ p<0,01

Аналогичная картина изменения наблюдалась и для цис-эйкозеновой кислоты (C_{20:1}): если в I триместре при обострении вируса герпеса ее содержание в липидах мембран эритроцитов у беременных увеличивалось до $0,28 \pm 0,03\%$, группа контроля – $0,13 \pm 0,04\%$ (p<0,01), то во II триместре данный показатель составлял $0,34 \pm 0,06\%$, контроль – $0,15 \pm 0,06\%$ (p<0,01), а к концу III триместра содержание цис-эйкозеновой кислоты увеличилось до $0,39 \pm 0,07\%$ (p<0,01).

Содержание эйкозандиеновой (C_{20:2}) жирной кислоты липидов эритроцитов при высоком титре антител к вирусу простого герпеса у женщин в период I триместра гестации составляло $0,36 \pm 0,03\%$, контрольная группа – $0,18 \pm 0,04\%$, во II триместре данный показатель также был выше аналогичного в группе контроля и составлял соответственно $0,41 \pm 0,07\%$ и $0,19 \pm 0,08\%$, а в III триместре при обострении герпеса у беременных женщин содержание данной эйкозеновой жирной кислоты имело тенденцию к увеличению (табл. 11).

Содержание эйкозотриеновой (C_{20:3}) жирной кислоты липидов эритроцитарных мембран у беременных при активации вируса простого герпеса было повышено на протяжении всего периода гестации

и составляло соответственно: в I триместре $0,89 \pm 0,06\%$, контроль – $0,62 \pm 0,09\%$; во II триместре – $0,91 \pm 0,04\%$, контроль – $0,77 \pm 0,05\%$; в III триместре $0,87 \pm 0,03\%$, контроль – $0,70 \pm 0,05\%$ (табл. 11). В целом у беременных женщин, инфицированных вирусом простого герпеса, в мембранах эритроцитов происходило изменение содержания эйкозеновых жирных кислот в сторону увеличения их процентного содержания, что может свидетельствовать о высоком уровне инфекционного процесса.

Выводы

Обострение герпес-вирусной инфекции в период беременности сопровождается изменением жирнокислотного состава липидов эритроцитов, что проявляется в увеличении относительного содержания отдельных насыщенных и снижении ненасыщенных жирных кислот, свидетельствующем об активации процессов липидной перекиссации, вызывающих дефицит эссенциальных жирных кислот и нарушение образования биорегуляторов на этапе эйкозаноидов в условиях герпесной интоксикации.

Активация вируса простого герпеса в период гестации приводит к изменению баланса полиненасыщенных жирных кислот; увеличивается содержание ω -6 линолевой, арахидоновой жирных кислот, из которых синтезируются эйкозаноиды, способствующие развитию воспалительного процесса, уменьшается содержание ω -3 линоленовой, эйкозопентаеновой, докозогексаеновой жирных кислот, с противоположным по воздействию эффектом.

При высоком титре антител к вирусу простого герпеса в мембранах эритроцитов беременных женщин образуется избыточное количество эйкозеновых кислот ряда $C_{20:0}$, $C_{20:1}$, $C_{20:2}$, $C_{20:3}$, что может свидетельствовать о высоком уровне инфекционного процесса.

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ НАРУШЕНИЯ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ФУНКЦИИ ПЛАЦЕНТЫ ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ, ОСЛОЖНЕННОЙ ГЕРПЕС- ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

При обострении герпес-вирусной инфекции во время беременности резко изменяется метаболизм многих тканевых систем. В несколько раз по сравнению с нормой:

- увеличивается выработка серотонина;
- подавляется синтез плацентарных гормонов (эстрадиол, эстроген, прогестерон, ДЭАС);
- увеличивается количество кортизола в крови;
- методом проточной цитофлюориметрии отмечается увеличение выработки НК-лимфоцитов;
- одновременно в периферической крови нарастает содержание $TNF\alpha$ и МДА (перекись жирных кислот);
- увеличивается количество циркулирующих иммунных комплексов.

При таком нарушении метаболических процессов у беременной складываются неблагоприятные условия для нормального функционирования фетоплацентарного барьера. Цитотрофобласт ворсинок плаценты подвергается атаке со стороны нескольких сильно повреждающих факторов периферической крови: $TNF\alpha$, НК-лимфоцитов, перекисей жирных кислот (АФК).

Мембрана цитотрофобласта ворсинок плаценты вступает в контакт с НК-лимфоцитами, что нами установлено методом люминесцентной микроскопии. Следует отметить, что в самом цитозоле синцитиотрофобласта при высоком уровне титра антител к герпесу (1:12800) инициируется выработка моноаминов.

Обмен серотонина в периферической крови и гомогенате плаценты беременных при обострении ГВИ

Нами одновременно проведены исследования в периферической крови и гомогенате плаценты у беременных с обострением герпес-

вирусной инфекции, отражающие обмен серотонина на различных этапах гестации (табл. 12). Отмечено, что, наряду с увеличением серотонина в периферической крови, при герпес-вирусной инфекции его количество нарастает и в гомогенате плаценты.

Таблица 12

Содержание серотонина и активность МАО в периферической крови матери и пуповинной крови у их новорожденных при герпесе

Показатели	Серотонин, мкмоль/л	МАО, мкмоль/л	5-ГИАА, мкмоль/л
10-12 недель: обострение	1,16±0,01***	45,36±3,1**	42,32±9,61***
контроль	0,42±0,03	59,31±6,61	64,56±11,32
14-24 недель: обострение	1,20±0,04***	22,45±4,3***	67,41±7,45***
контроль	0,47±0,09	64,29±1,8	87,81±6,23
28-36 недель: обострение	1,37±0,05***	19,16±1,4***	71,29±7,48***
контроль	0,53±0,12	70,59±3,6	95,78±8,63
В родах: ХГВИ	1,65±0,02***	58,06±2,93***	
контроль	0,86±0,07	124,88±1,95	
Пуповинная кровь: ХГВИ	1,94±0,07***	64,74±1,06***	
контроль	1,08±0,03	132,73±3,65	

Примечание: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ – статистически достоверные различия по сравнению с контролем.

На 5-6-й неделе в гомогенате плаценты контрольных исследований количество серотонина было не более 0,2 мкмоль/л, а 39-40-й неделе – 0,5 мкмоль/л. При вспышке герпес-вирусной инфекции в III триместре беременности (титр антител – 1:12800) количество серотонина в гомогенате плаценты увеличивалось до 1,25 мкмоль/л. Очень важно подчеркнуть, что серотонин в сложившихся условиях проникает через фетоплацентарный барьер и в большом количестве регистрируется в пуповинной крови.

При титре антител к вирусу герпеса 1:12800 в крови матери во время родов в пуповинной крови количество серотонина определяет-

ся до $1,94 \pm 0,07$ мкмоль/л (контроль – $1,08$ мкмоль/л). Следовательно, уже во время беременности серотонин в большом количестве проникал через синцитиотрофобласт в пуповинную кровь, хотя в гомогенате плаценты его было даже несколько меньше – $1,3$ мкмоль/л.

Таким образом, при вспышке герпес-вирусной инфекции во время беременности появляется несколько факторов, сильно влияющих на состояние фетоплацентарного барьера плаценты. Основные индукторы влияния на фетоплацентарный барьер ворсинок плаценты – биогенноактивные вещества (серотонин, см. табл. 12), выраженная антигенная перегрузка и выработка иммунокомпетентными клетками TNF α , а также увеличение выработки NK-лимфоцитов. Все эти факторы напрямую влияют на синцитиотрофобласт.

Количество TNF α в гомогенате плаценты при титре антител к вирусу герпеса 1:1600 составило $21,1 \pm 0,08$ пг/мл; при титре антител 1:6400 – $84,3 \pm 0,3$ пг/мл; при титре антител к вирусу герпеса 1:12800 – $89,98 \pm 0,34$ пг/мл, контроль – $11,6 \pm 0,09$ пг/мл ($p < 0,001$). При складывающейся ситуации в гомогенате плаценты резко нарастало содержание каспазы-3: при титре антител к вирусу герпеса 1:1600 – $26,7 \pm 0,08$ нг/мл; 1:6400 – $79,5 \pm 0,4$ нг/мл; при титре 1:12800 – $103,7 \pm 0,8$ нг/мл, контроль – $19,0 \pm 0,8$ нг/мл ($p < 0,001$).

Под влиянием биогенных аминов усиливаются патологические клеточные процессы в тканях, нарушается гомеостатическое равновесие организма. Имеются данные о тормозном влиянии серотонина на формирование иммунной реакции (А.Ю.Вальков, А.С.Ходосевич, 2000; Л.Девойно, 1983).

Исследования у беременных с обострением ГВИ в период гестации показывают, что активизация вируса в нейронах стимулирует продукцию серотонина и выброс его в периферическую кровь. Содержание его в плазме крови увеличивается в несколько раз по сравнению со здоровыми беременными, и последствие остается вплоть до родов. Активность же фермента-разрушителя этого биогенноактивного вещества (моноаминоксидазы) достоверно снижается и составляет от $47,40 \pm 0,31$ мкмоль/л (I триместр) до $23,0 \pm 7,0$ (контроль – $64,29 \pm 1,80$ мкмоль/л) во II и III триместрах.

Обмен нитросоединений в плаценте беременных при герпес-вирусной инфекции

Морфофункциональное состояние фетоплацентарного барьера изучалось современными иммуноферментативными методами, отражающими его метаболическую полноценность. Особое внимание было уделено влиянию повреждающих факторов, возникающих при ГВИ, на состояние ядер синцитиотрофобласта и метаболические процессы, которые приводят ядерные элементы в апоптоз.

Нами установлено, что по мере нарастания титра антител в крови и гомогенате плаценты к вирусу герпеса в гомогенате плаценты возрастает содержание нитросоединений NO_2^- и NO_3^- . При титре антител к вирусу герпеса 1:1600 количество NO_2^- в гомогенате определялось как $38,8 \pm 1,1$ мкмоль/л; при титре 1:6400 – $92,1 \pm 1,2$ мкмоль/л; при титре 1:12800 – $105,7 \pm 1,5$ мкмоль/л (контроль – $25,6 \pm 0,1$ мкмоль/л).

Несколько ниже в гомогенате плаценты определяется NO_3^- : титр 1:1600 – $25,5 \pm 0,9$ мкмоль/л; 1:6400 – $62,2 \pm 1,3$ мкмоль/л; при титре антител к вирусу герпеса 1:12800 – $89,8 \pm 0,8$ мкмоль/л, контроль – $20,31 \pm 0,09$ мкмоль/л (рис. 6).

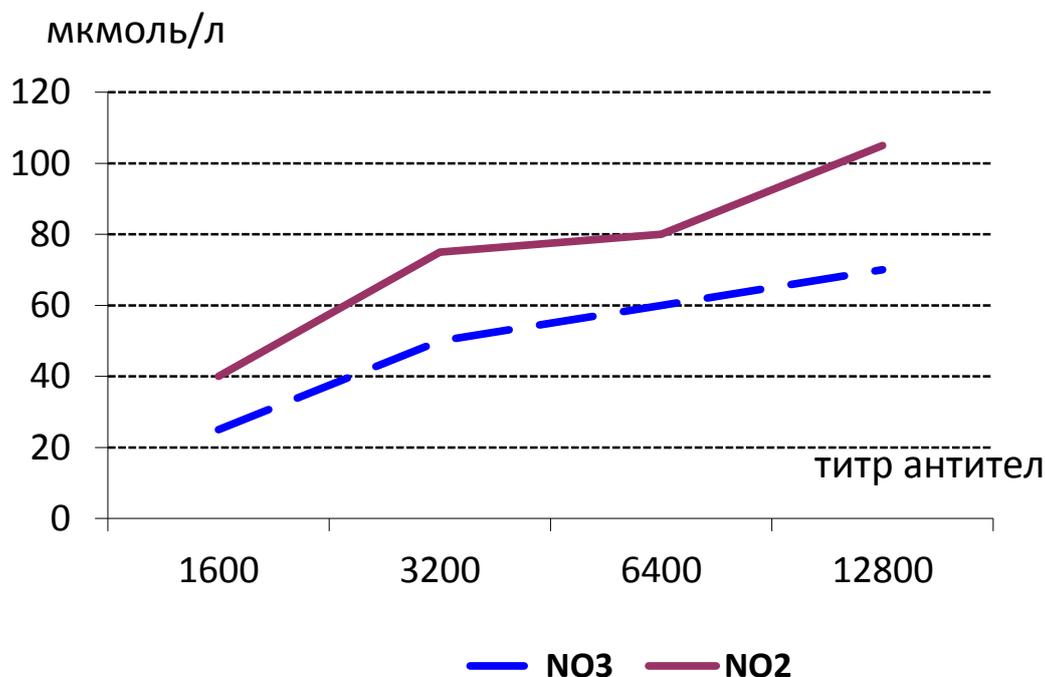


Рис. 6. Активность NO_2^- и NO_3^- в гомогенате плаценты от рожениц, перенесших в III триместре беременности ГВИ различной степени агрессивности

Поскольку последними исследованиями доказано, что NO_2^- в организме становится базой для формирования NO , следует ожидать при таком уровне NO_2^- в плаценте высокого уровня активности NO -синтазы (рис. 7: а – умеренная активность NOS_i у практически здоровой беременной, б – высокая интенсивность реакции на NOS_i у роженицы, перенесшей в III триместре ГВИ с титром 1:12800).

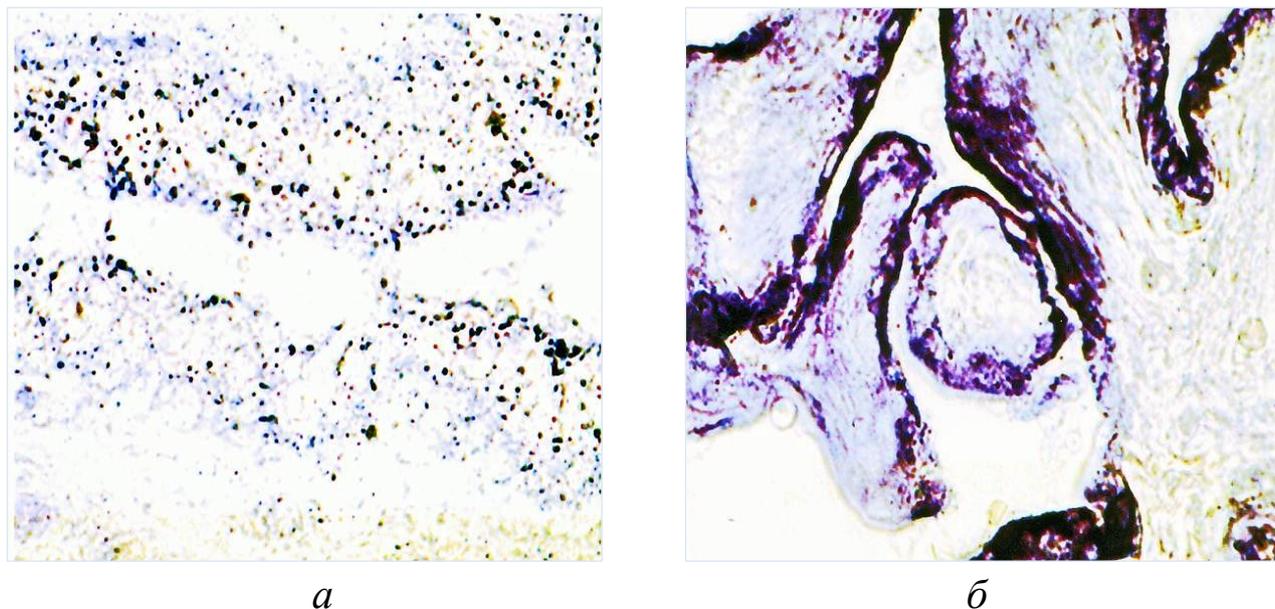


Рис. 7. Синцитиотрофопласт ворсинок плаценты. Реакция по Э.Коржевскому. Увеличение – 10х40.

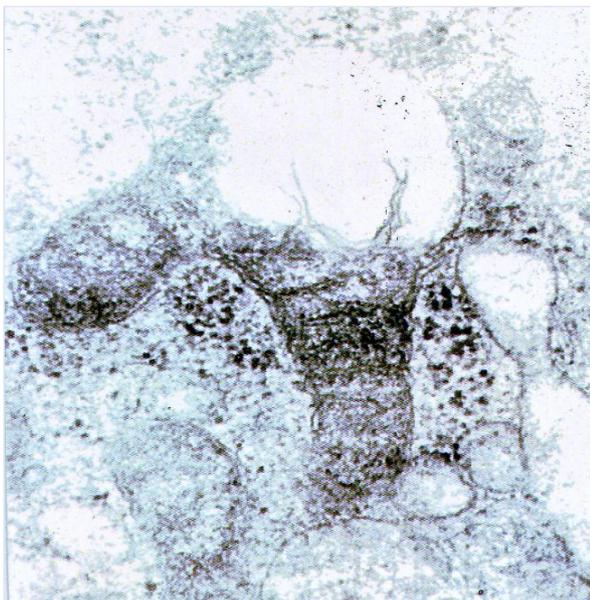
Таким образом, герпес-вирусная инфекция создает условия повышения уровня нитросоединений в плаценте, вызывая угрозу повреждения фетоплацентарного барьера.

Состояние митохондриального аппарата синцитиотрофобласта и роль цитохрома С в развитии апоптоза

При появлении в гомогенате плаценты большого количества повреждающих, токсически действующих на клеточные структуры нитросоединений мы обнаружили выраженные изменения в синцитиотрофобласте. Отмечается деструкция митохондрий (рис. 8-а), а в цитозоле синцитиотрофобласта повышается концентрация цитохрома С.

Спектрофотометрически (Stat-Fax-2100, USA) в гомогенате плаценты по мере нарастания титра антител к вирусу герпеса увеличива-

ется содержание цитохрома С: при титре антител к вирусу герпеса 1:6400 определяется $13,9 \pm 0,06$ пг/мл цитохрома С, а при титре 1:12800 – $18,8 \pm 0,08$ пг/мл (контроль – $10,7 \pm 0,04$ пг/мл). Установлено, что при уровне цитохрома С в гомогенате плаценты в пределах $13,9 \pm 0,06$ пг/мл, в симпласте насчитывается $1,5 \pm 0,002\%$ ядер в состоянии апоптоза. При увеличении содержания цитохрома С до $18,8 \pm 0,08$ пг/мл количество ядер в состоянии апоптоза возрастает до $3,0 \pm 0,03\%$, контроль – $0-1,0 \pm 0,002\%$ (рис. 8-б).



а



б

Рис. 8. Синцитиотрофобласт ворсинки плаценты родильницы, перенесшей в III триместре ГВИ (титр – 1:12800): а – деструктивные изменения митохондрий синцитиотрофобласта (ув. $\times 40000$); б – увеличивается до $3,0 \pm 0,03\%$ количество ядер в состоянии апоптоза (ISEL-метод определения апоптоза, ув. 10×90).

Одновременно оценивалась динамика содержания в этих же гомогенатах белка Bcl-2, являющегося антиапоптозным фактором в клетках. До определенного уровня концентрации антител к вирусу герпеса (1:1600) содержание белка Bcl-2 нарастало и составило $9,24 \pm 0,09$ пг/мл, контроль – $3,80 \pm 0,02$ пг/мл. Максимума оно достигало при титре антител к вирусу герпеса 1:6400 – $42,5 \pm 0,6$ пг/мл, а затем по мере нарастания концентрации антигена герпеса до 1:12800 содержание начинало резко снижаться до $28,14 \pm 0,70$ пг/мл (табл. 13).

Таблица 13

Динамика изменений содержания каспазы-3 и белка Vcl-2 в гомогенате плаценты в III триместре после вспышки ГВИ различной интенсивности

Белки и ферменты синцитиотрофобласта ворсинок	Контроль	Титр антител к вирусу герпеса в III триместре		
		1:1600	1:6400	1:12800
Каспаза-3, нг/мл	19,0±0,09	26,7±0,05*	79,5±0,4*	103,7±0,8*
Белок Vcl-2, пг/мл	3,8±0,02	9,24±0,09*	42,5±0,3*	28,14±0,79*

Примечание: $p < 0,001$ – достоверные различия по сравнению с контролем.

Антиапоптозная функция синцитиотрофобласта начинала снижаться, что и проявлялось в увеличении числа ядер в фетоплацентарном барьере в состоянии апоптоза до $4,00 \pm 0,02\%$ (контроль – $0-1,0 \pm 0,01\%$). Если на начальном этапе развития герпесной инфекции защитные свойства могут противостоять вступлению ядер в апоптоз – белок Vcl-2 увеличивается почти в 11 раз по сравнению с контролем, то при тяжелой форме ГВИ (титр антител – 1:12800) синтез Vcl-2 подавляется (рис. 9 а, б) и создается благоприятная почва для преждевременного формирования апоптоза ядер в синцитиотрофобласте.

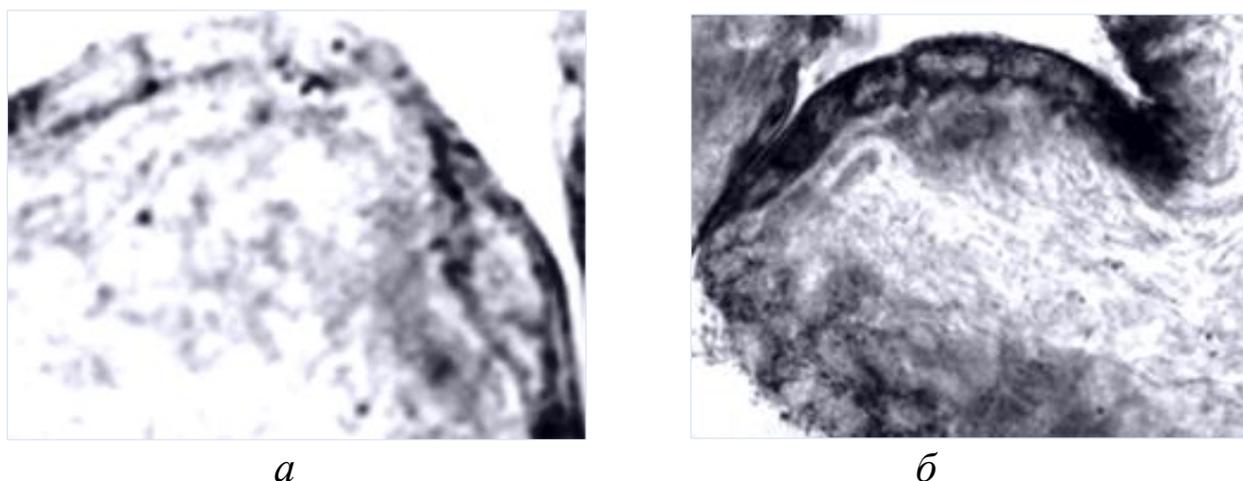


Рис. 9. Синцитиотрофобласт ворсинок плаценты, иммуногистохимическая реакция на выявление белка VCL-2: а – роженица перенесла в период беременности обострение ГВИ с титром антител 1:12800, активность VCL-2 резко снижается в сравнении с контролем (б). Увеличение – 10×40 .

Состояние цитозоля синцитиотрофобласта ворсинок плаценты при ГВИ. Характеристика белка Hsp70. Роль каспазы-3

При активизации герпесной инфекции в периферической крови беременных увеличивается количество НК-лимфоцитов, несущих на своей поверхности антиген HLA DK. Количество НК-лимфоцитов увеличивается по мере нарастания агрессивности ГВИ (табл. 14).

Таблица 14

Содержание НК и HLA DK в периферической крови беременных при герпес-вирусной инфекции (проточная цитофотометрия) (M±m)

Титр антител к герпесу	НК (нормальные киллеры)	HLA DK-антигены CD16
1:1600	11,5±0,5 (p<0,01)	5,80±0,08 (p<0,001)
1:6400	12,8±0,3 (p<0,001)	8,10±0,09 (p<0,001)
1:12800	16,8±0,7 (p<0,001)	8,4±0,4 (p<0,001)
Контроль	10,0±0,1	45,00±0,60

Примечание: p<0,001 – статистически достоверные различия по сравнению с контролем.

Изучая материал под электронным микроскопом, мы находили участки тесного контакта зернистых лимфоцитов, расположенных со стороны лакуны, с поверхностью синцитиотрофобласта. Эти лимфоциты имеют уплотненное ядро и измененную цитоплазму, заполненную зернистостью (рис. 10 а, б).

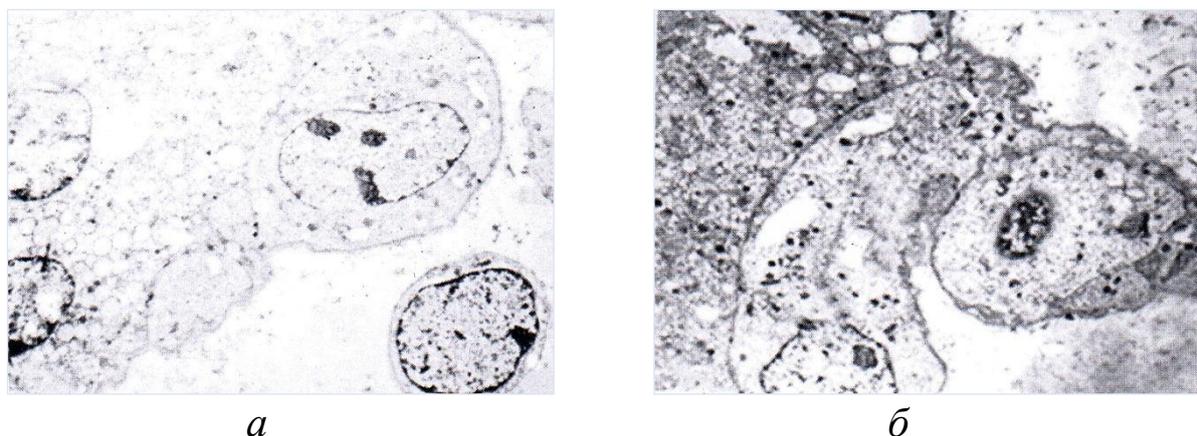


Рис. 10. Синцитиотрофобласт ворсинок плаценты, вступивший в контакт с НК-лимфоцитами при обострении ГВИ: а – лимфоцит увеличивается в объеме, в его цитоплазме выражена зернистость и вакуоли; б – в цитоплазме клеток трофобласта появляются вакуоли и зернистость. Электронная микроскопия. Увеличение x 8000.

Спектрофотометрически у этих пациенток обнаружено резкое снижение в гомогенате плаценты процентного содержания белка теплового шока Hsp70 и нарастание каспазы-3 (табл. 15).

Таблица 15

Содержание белка Hsp70 и каспазы-3 в гомогенате плаценты рожениц, перенесших в III триместре герпес-вирусную инфекцию, (M±m)

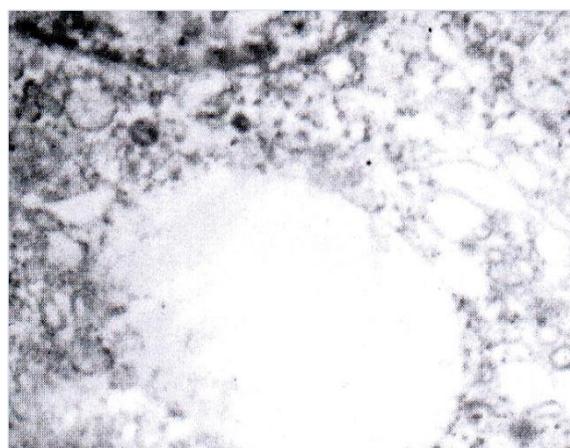
Титр антител к вирусу герпеса	Содержание в гомогенате плаценты белка Hsp70, в нг/мл	Содержание в гомогенате плаценты каспазы-3, в нг/мл
1:1600	34,7±1,9; p<0,001	26,7±1,8; p<0,01
1:6400	30,4±2,4; p<0,01	79,5±3,4; p<0,001
1:12800	22,3±2,9; p<0,01	103,7±3,9; p<0,001
Контроль	56,2,6±2,6	19,0±1,8

Примечание: p<0,001, p<0,01 – статистически достоверные различия по сравнению с контролем.

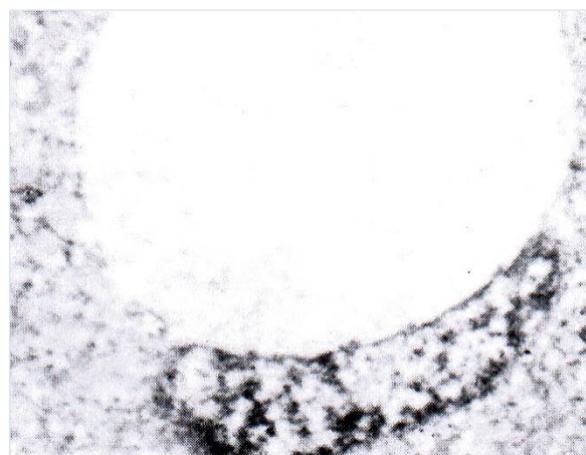
Подробное исследование синцитиотрофобласта с помощью электронной микроскопии показывает, что при высоком титре антител к вирусу герпеса (1:12800) и при снижении в гомогенате плаценты белка теплового шока Hsp70 нарушается структура цитозоля фетоплацентарного барьера. Цитозоль в зоне контакта с ядрами синцитиотрофобласта начинает терять компактность (рис. 11). Отмечается много случаев, когда цитозоль в зоне контакта с ядром синцитиотрофобласта исчезает и образуются крупные светлые вакуоли (рис. 11 б), которые сдавливают ядро и уплотняют хроматин, что можно рассматривать как начальные признаки апоптоза. Используя ISEL-метод, отмечаем увеличение числа ядер синцитиотрофобласта (рис. 11), находящихся в состоянии апоптоза до 4,00±0,08% (контроль – 1,00±0,02%).

Таким образом, обострение герпес-вирусной инфекции во время беременности провоцирует выработку большого количества TNFα и НК-лимфоцитов. Отмечаются случаи тесного контакта НК-лимфоцитов с синцитиотрофобластом, при котором не исключена передача в цитозоль TNFα либо попадание антигена вируса герпеса

напрямую. В результате этого в синцитиотрофобласте подавляется выработка Hsp70, что вызывает нарушения контроля над нормальным синтезом белка цитозоля. Появляются разреженные участки цитозоля и большие вакуоли, вступающие в контакт с ядрами синцитиотрофобласта. На фоне увеличения выработки каспазы-3 (табл. 15) это приводит к изменениям в ядерном хроматине – его уплотнению и преждевременной гибели ядра. В результате при высоком титре антител к вирусу герпеса увеличивается количество ядер синцитиотрофобласта в состоянии апоптоза (рис. 11 з).



а



б



в



г

Рис. 11. Морфологические изменения в цитозоле синцитиотрофобласта ворсинок плаценты у беременной, перенесшей в III триместре ГВИ: а – разрежение цитозоля; б – формирование крупной вакуоли, сдавливающей ядро; в – многочисленные вакуоли в цитозоле синцитиотрофобласта; г – ядро синцитиотрофобласта в состоянии апоптоза. ISEL-метод. Увеличение 10x90.

Выводы

При беременности, осложненной герпес-вирусной инфекцией, активизируется ряд процессов, агрессивно действующих на фетоплацентарный барьер ворсинок плаценты:

- повышается выработка серотонина и отмечается проникновение его в цитозоль синцитиотрофобласта, а также в кровь пуповины;
- увеличивается продукция НК-лимфоцитов, атакующих поверхность синцитиотрофобласта;
- в периферической крови беременных увеличивается содержание количество $\text{TNF}\alpha$, который обнаруживается в большом количестве и в гомогенате плаценты.

В гомогенате плаценты, особенно в синцитиотрофобласте, отмечается нарастание количества нитросоединений – NO_2^- и NO_3^- ; в синцитиотрофобласте усиливается активность NOS_i , что свидетельствует об увеличении повреждающих факторов, действующих на плаценту во время беременности, осложненной герпес-вирусной инфекцией.

Внедрение в синцитиотрофобласт возбудителя инфекции и появление в цитозоле большого количества нитросоединений вызывает повреждение многих митохондрий, что приводит к нарастанию содержания в гомогенате плаценты количества цитохрома C, выступающего как проапоптозный фактор ядер синцитиотрофобласта. В гомогенате плаценты резко нарастает количество каспазы-3, являющейся маркером деструктивного процесса ДНК ядер синцитиотрофобласта.

На фоне действия сильно выраженных повреждающих факторов снижается противоапоптозное действие белка Bcl-2 и белка Hsp70, что приводит к выраженным деструктивным изменениям и в цитозоле синцитиотрофобласта.

Оценивая действие ГВИ на фетоплацентарный барьер, можно с уверенностью утверждать, что он в сложившихся условиях становится открытым для проникновения в кровь пуповины плода как непосредственно возбудителя инфекции, так и ряда повреждающих факторов: циркулирующих иммунных комплексов, интерлейкинов ($\text{TNF}\alpha$), серотонина и других агрессивно действующих на органы плода компонентов.

НАРУШЕНИЯ ГАЗОТРАНСПОРТНОЙ ФУНКЦИИ ПЛАЦЕНТЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА СОСТОЯНИЕ ПЛОДА И НОВОРОЖДЕННОГО

К моменту рождения у детей от матерей с герпесной инфекцией во время беременности, особенно при тяжелом ее течении, в условиях сниженной кислородной обеспеченности фетальной крови формируются признаки неэффективного эритропоэза, который проявляется в диспропорции между скоростью продукции морфофункционально зрелых эритроидных клеток и их разрушением в кровеносном русле. В результате в крови сосудов пуповины новорожденных от матерей с герпесной инфекцией во время беременности совместно с неонатальными эритроцитами, которые сохраняют черты фетальных эритроидных клеток, характеризующиеся физиологическим макроцитозом, сокращенной продолжительностью жизни, повышенной осмотической нестойкостью и сниженной деформированностью (Н.А.Торубарова, И.В.Кошель, Г.В.Яцык, 1993), появляется большое число функционально незрелых эритроидных клеток. Последнее, по-видимому, определяло морфологическую изменчивость фетальных эритроцитов, которая обнаруживалась при цитофотометрическом исследовании мазков крови сосудов пуповины новорожденных от матерей с герпесной инфекцией во время беременности с максимальным ее проявлением при тяжелой форме заболевания (титр антител IgG к ВПГ-1 1:12800). Было установлено статистически достоверное снижение доли морфологически зрелых дискоцитов. При этом число трансформированных форм (эхиноциты, мишеневидные эритроциты) достоверно повышалось. Количество каплевидных форм эритроцитов в крови сосудов пуповины таких новорожденных статистически достоверно не изменялось. Содержание дегенеративных эритроидных форм достоверно увеличивалось.

Такое повышение трансформируемости фетальных эритроцитов приводило к возможному нарушению гемодинамики в микроциркуляции, которое обеспечивалось уменьшением площади обмена между видоизмененной поверхностью клеток красной крови и сосудистой

стенкой капилляров в ворсинке плаценты, что ограничивало поступление кислорода в кровь плода, усиливая тем самым проявления гипоксии и повреждение жизненно важных органов.

Вместе с тем выявленная гетерогенность морфологических форм в популяции фетальных эритроцитов явилась следствием снижения их деформируемости, обусловленного непосредственным воздействием мембранодестабилизирующих факторов, экзогенно поступающих в плодовый кровоток из материнской крови (антигены ВПГ-1, АФК) либо эндогенно продуцируемых иммуномодулирующих цитокинов (TNF α), что приводит к инициации пероксидации липидов и протеолиза, нарушающих конформационную структуру фосфолипидных (Л.Г.Афони́на, Х.Р.Зукалова, В.В.Бакова, 1989; Н.Р.Бородюк, 1999; J.M.Gutteridge, 1986, 1995) и белковых компонентов мембран (Н.Л.Аряев, 1984; А.Б.Бородин, 1989; Т.П.Молчанова, 1989; М.В.Самолов, А.Г.Наумов, 2000). Более того, повышенная окисляемость липидных и белковых структур мембран фетальных эритроцитов может быть обусловлена специфичностью их соотношения, которое определяется условиями функционирования клеток красной крови в пониженном кислородном режиме, а также незрелостью компенсаторных механизмов противорадикальной защиты (В.Г.Леонова, 1987). Данный факт подтверждался установленным в ходе исследования перераспределением соотношения белковых фракций в мембранах эритроцитов крови сосудов пуповины новорожденных от матерей с герпесной инфекцией во время беременности, с максимальным проявлением при тяжелой форме заболевания (титр антител IgG к ВПГ-1 1:12800). Было выявлено усиление окисляемости высокомолекулярных белковых фракций, превышающее таковое у матерей и выраженное в достоверном снижении относительного содержания α -спектрина, β -спектрина, анкирина и белка полосы 4.1 в мембранах фетальных эритроцитов. Возможно, такое снижение каркасных белков послужило причиной изменения эластических свойств мембраны фетальных эритроцитов, обусловившей в крови сосудов пуповины новорожденных от матерей с герпесной инфекцией высокого уровня трансформированных (эхиноциты, каплевидные эритроциты) и деге-

неративных клеточных форм, наиболее выраженного при тяжелом течении заболевания. Вместе с тем статистически значимых изменений в показателях белков полос 4.2, 4.5 и 4.9, а также белка полосы 6 и актина выявлено не было. При этом в мембранах фетальных эритроцитов новорожденных увеличивалась доля белка полосы 7.

Необходимо отдельно отметить изменение процентного содержания в мембранах фетальных эритроцитов интегральных белков, играющих основную роль в газовом и энергетическом обмене клеток (белок полосы 3) и участвующих в иммунных реакциях организма плода (гликофорин). Было установлено прогрессирующее снижение в мембранах фетальных эритроцитов среднестатистических показателей белка полосы 3 при значительном увеличении фракции гликофорина, более выраженное, чем у матерей, и усиливающееся при тяжелом течении герпесной инфекции во время беременности (титр антител IgG к ВПГ-1 1:12800).

Полученные результаты позволяют заключить, что для фетальных эритроцитов, функционирующих в условиях повышенной антигенной нагрузки ВПГ-1 и сниженном кислородном режиме, характерно выраженное изменение свойств мембран, обусловленное нарушением возможной взаимосвязи между белками α , β -спектрином, анкирином, белком полосы 4.1, образующими периферическую цитоскелетную сеть; снижением активности белка полосы 3 и, как следствие, – нарушением течения газообменных и энергетических процессов в клетке; появлением высокой антигенной специфичности мембраны, которая определяется ростом содержания гликофорина, что также способствует изменению барьерных свойств и усилению гемолитических процессов, сокращающих объем эритроцитарной массы.

В связи с этим можно предположить, что в фетальных эритроцитах новорожденных от матерей с герпесной инфекцией усиливались процессы диссоциации и перестройки белковых компонентов мембран, которые приводили к снижению площади белок-липидных контактов. Вполне естественно в такой ситуации ожидать повышения окисляемости фосфолипидных молекул под действием фосфолипазы,

инициирующего нарушение асимметрии фосфолипидного бислоя мембран фетальных эритроцитов и, как следствие – их вязкостно-эластических свойств. Также можно предположить, что динамические свойства мембран фетальных эритроцитов определяются составом фосфолипидных молекул, количественное соотношение которых зависит от характера липидного обмена в организме матери и эффективности поступления через фетоплацентарный барьер липидных компонентов в кровотоки плода. Данное утверждение не противоречит имеющимся сведениям о влиянии липидного обмена матери на липидный обмен плода (И.Г.Чхаидзе, 1988; М.Т.Луценко, 2009; О.В.Скачкова, 2009).

В ходе исследования показано, что мембрана фетальных эритроцитов новорожденных от матерей с герпесной инфекцией во время беременности характеризовалась более выраженным, чем у матерей, нарушением соотношения нейтральных и кислых фосфолипидов. Было выявлено прогрессирующее, особенно при тяжелом течении герпесной инфекции во время беременности (титр антител IgG к ВПГ-1 1:12800), снижение уровня в мембранах фетальных эритроцитов фосфатидилэтаноламина и фосфатидилхолина. Последнее, как правило, является субстратом для перекисного окисления липидов и при усилении его действия приводит к повышению уровня лизофосфатидилхолина, вызывающего разрыхление и дестабилизацию поверхностного слоя мембраны эритроцитов. Кроме того, определялось увеличение доли фосфатидилсерина, что соотносилось с высоким уровнем гликофорина и повышало вероятность участия фетальных эритроцитов в иммунных реакциях в период высокой антигенной нагрузки с последующим их разрушением. Наряду с этим отмечалось увеличение уровня сфингомиелина и снижение показателей фосфатидилинозитола, что также указывало на изменение вязкостных свойств мембран фетальных эритроцитов.

Следовательно, для мембран эритроцитов пуповинной крови новорожденных от матерей с герпесной инфекцией во время беременности характерны деструктивные изменения липидного матрикса, которые сопровождаются более выраженным, чем у матерей, уменьше-

нием уровня легкоокисляемых (фосфатидилэтаноламина, фосфатидилхолина, фосфатидилинозитола) при увеличении кислых (фосфатидилсерина, лизофосфатидилхолина) фракций, что приводит к изменению вязкостных свойств и оказывает влияние на степень эксимеризации пирена. Было установлено снижение параметров флюоресценции липотропного зонда пирена. Наряду с этим выявлялось уменьшение гидрофобного объема зоны белок-липидных контактов, о чем свидетельствовали низкие показатели флюоресценции.

Суммируя полученные результаты, можно заключить, что антигенная нагрузка ВПГ-1 на эритроцит плода оказывает выраженное воздействие на свойства (деформируемость, проницаемость) мембран эритроцитов и их морфологические характеристики (трансформация дискоцитов), нарушая тем самым газообменную функцию посредством необратимого окисления и агрегации гемоглобина продуктами пероксидации липидов (Н.Б.Черняк, 1976) с последующим его глыбчатым распределением в примембранном пространстве (Д.В.Шпорова, 1980; Т.П.Молчанова, 1987; Н.В.Рязанцева, В.В.Новицкий, Е.А.Степовая и др., 2004). Также следует отметить более быстрое окисление фетального гемоглобина в метгемоглобин и меньшую устойчивость глобиновых цепей к лизису перекисью водорода (В.Г.Леонова, 1987).

В ходе исследования фетальной крови новорожденных от матерей с герпесной инфекцией во время беременности определялось достоверное снижение общего гемоглобина с максимальным проявлением при тяжелом течении заболевания (титр антител IgG к ВПГ-1 1:12800). Одной из причин этого может служить задержка смены типов гемоглобина (фетальный гемопоэз) и прогрессирующее повышение соотношения HbF/HbA в фетальных эритроцитах, соотносящееся со степенью тяжести герпесной инфекции во время беременности, что объясняет их уязвимость к окисляющим агентам. Вместе с тем в фетальных эритроцитах выявлялось увеличение уровня гемоглобина A₂. Таким образом, можно полагать, что у новорожденных от матерей с герпесной инфекцией во время беременности сохраняется фетальный тип эритропоэза, который адаптирован к низкому рО₂ и является

свидетельством внутриутробной гипоксии. Более того, фетальный эритропоэз и гиперпродукция фетального гемоглобина у новорожденных при герпесной инфекции у матери во время беременности может усиливать неустойчивость гемоглобина по отношению к повреждающим факторам, выражающуюся в уменьшении уровня его термостабильных форм, особенно при тяжелом течении заболевания (титр антител IgG к ВПГ-1 1:12800). При этом уровень термолабильного гемоглобина достоверно возрастал, нарушая тем самым газообменную функцию, что усугубляло гипоксию и увеличивало период адаптации к внеутробной жизни.

Данный факт подтверждался прогрессирующим в зависимости от тяжести герпесной инфекции во время беременности снижением в крови сосудов пуповины новорожденных степени сатурации гемоглобина кислородом и, как следствие, – количества его оксигенированной формы. Кроме того, на изменение кислородного режима пуповинной крови новорожденных от матерей с герпесной инфекцией во время беременности указывало прогрессирующее повышение уровня метгемоглобина, с максимальными значениями при тяжелом течении заболевания (титр антител IgG к ВПГ-1 1:12800).

Полученные результаты позволяют заключить, что диагностируемое уменьшение свободного кислорода в пуповинной крови новорожденных при герпесной инфекции во время беременности, вызванное гипоксией у матери, при более высоком сродстве фетального гемоглобина к кислороду приводит к развитию внутриутробной гипоксии и, как следствие, к метаболической дизадаптации. Данное утверждение согласуется с показателями кислотно-щелочного равновесия и газового состава венозной крови сосудов пуповины новорожденных от матерей с герпесной инфекцией во время беременности. Было установлено прогрессирующее, особенно при тяжелом течении герпесной инфекции во время беременности (титр антител IgG к ВПГ-1 1:12800), увеличение дефицита оснований (BE), которое сопровождалось снижением pH венозной крови сосудов пуповины и свидетельствовало о развитии метаболического ацидоза. На формирование ацидотического сдвига указывало накопление в пуповинной крови новорожденных лактата. Наблюдаемое при этом уменьшение

буферной емкости сопровождалось снижением уровня общих, истинных и стандартных бикарбонатов в венозной крови сосудов пуповины новорожденных. Наряду с этим отмечались признаки гиперкапнии (повышение $p\text{CO}_2$), что, по-видимому, связано с нарушением выведения углекислоты.

Следовательно, состояние метаболического статуса венозной крови сосудов пуповины у новорожденных носит смешанный респираторно-метаболический характер, усиливающийся при тяжелом течении герпесной инфекции во время беременности (титр антител IgG к ВПГ-1 1:12800), что снижает адаптивные возможности организма к гипоксии.

Вместе с тем следует отметить, что фетальные эритроциты в отличие от материнских обладают неодинаковыми возможностями для выполнения кислородтранспортной функции. Это обеспечивается различными функциональными свойствами фетального гемоглобина и гемоглобина А, а также их отношением к действию рН и 2,3-ДФГ, регулирующих сродство к кислороду. Отмечена низкая способность фетального гемоглобина взаимодействовать с 2,3-ДФГ – до 40%, что повышает его сродство к кислороду, обеспечивая оксигенацию тканей плода в анаэробных условиях (Л.И.Иржак, 1979; В.В.Алатырцев, Ю.А.Юрков, Л.Г.Афоница и др., 1987). Таким образом, эффективность кислородтранспортной функции фетальной крови будет определяться не количеством синтезируемого 2,3-ДФГ, а функциональными свойствами фетального гемоглобина и состоянием внутриклеточной среды.

Подтверждением этого может служить однонаправленный рост показателей внутриэритроцитарного общего и не связанного с гемоглобином 2,3-ДФГ, который соотносился с высоким уровнем фетального гемоглобина и соответствовал степени тяжести герпесной инфекции во время беременности, с максимальным проявлением при тяжелой форме (титр антител IgG к ВПГ-1 1:12800). Не исключено, что в такой ситуации сохранялось повышенное сродство фетального гемоглобина к кислороду, которое в условиях сниженного кислородного режима приводило к развитию гипоксии. Безусловно, что по-

добного рода изменения кислородной обеспеченности фетальной крови сопровождались нарушениями внутриклеточного метаболизма, проявлявшимися в дисрегуляции процессов гликолиза и связанных с ним пентозофосфатного и глутатионредуктазного циклов.

Вместе с тем следует отметить, что метаболизм фетальных эритроцитов характеризуется более высоким уровнем активности ферментов гликолиза (за исключением фосфофруктокиназы) и пентозофосфатного цикла, что приводит к увеличению АТФ и глутатиона (И.Я.Ашкинази, 1979). Отмеченные сдвиги могут быть объяснены увеличенной скоростью энергообменных процессов в эритроэне плода, поставляющих продукты метаболизма для его роста и развития. Наряду с этим показана неустойчивость синтеза фетального глутатиона, что усиливает действие прооксидантных факторов на мембрану эритроцитов, снижая тем самым каталитическую активность ферментных энергообразующих систем (И.Я.Ашкинази, 1979).

Подтверждением сказанного явилось прогрессирующее угнетение в эритроцитах крови сосудов пуповины новорожденных не только глюкозо-6-фосфатдегидрогеназной, но и глутатионредуктазной активности, которое определялось степенью тяжести герпесной инфекции во время беременности, с максимальным проявлением в случаях тяжелого течения заболевания (титр антител IgG к ВПГ-1 1:12800) и более выраженным, чем у матерей. Возможно, это следствие недостаточности действия систем, регулирующих утилизацию пероксидов, образующихся в ходе гликолиза, главным образом глутатиона. В результате возникал дефицит энергопродукции, который проявлялся в пуповинной крови новорожденных в снижении уровня как общего, так и связанного с гемоглобином АТФ, соответствующему степени тяжести герпесной инфекции во время беременности. Вместе с тем в пуповинной крови новорожденных выявлялось нарушение баланса фосфатов, выражающееся в однонаправленном увеличении уровней общего и неорганического фосфора, с максимальным повышением в случаях тяжелого течения герпесной инфекции во время беременности (титр антител IgG к ВПГ-1 1:12800).

Основной причиной установленной метаболической дисфункции фетальных эритроцитов новорожденных является онтогенетически более низкий уровень адаптивных возможностей противорадикальной защиты клетки (С.Щ.Бурмистров, Е.Е.Дубинина, Е.В.Арутюнян, 1997; И.И.Евсюкова, Т.В.Савельева и др., 1996; Л.В.Забродина, О.А.Серебренникова и др., 1992; Ф.Х.Камилов, Э.Н.Ахмадеева, А.Г.Крюкова и др., 1999; А.Б.Бычкова, В.Е.Радзинский, 2006; И.С.Сидорова, В.А.Барсель, А.Б.Эдокова и др., 2001), которые при усилении проокислительного действия на мембрану повреждающих факторов (антигены ВПГ-1, иммуномодулирующие цитокины (TNF α), недостаток кислорода) способствуют инициации процессов липопероксидации. Образующийся при этом МДА, связываясь с белками и липидами мембран эритроидных клеток, повышает вязкость мембран, снижает активность мембраносвязанных гликолитических ферментов, деформируемость клеток, способствуя их разрушению (J.Axelrod, F.Hirita, 1995; Л.В.Курашвили, В.Г.Васильков, 2003). Наряду с этим показано, что усиление процессов липопероксидации обусловлено высоким уровнем метгемоглобина, который образуется преимущественно при окислении фетального гемоглобина и обладает повышенной каталазной активностью, определяющей неуправляемый рост пероксидов (Л.Г.Леонова, 1987).

При оценке активности противорадикальной защиты в пуповинной крови новорожденных от матерей с герпесной инфекцией во время беременности установлено достоверное снижение активности внутриэритроцитарных супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы, с максимальным выражением при тяжелом течении герпесной инфекции (титр антител IgG к ВПГ-1 1:12800), что способствовало накоплению АФК (супероксидрадикалы, гидроперекиси), инициирующих процессы липопероксидации.

В результате в пуповинной крови новорожденных определялся прогрессирующий, в соответствии с тяжестью герпесной инфекции во время беременности, рост показателей МДА (конечного продукта деградации жирных кислот). Наряду с этим в пуповинной крови новорожденных от матерей с герпесной инфекцией во время беремен-

ности выявлялось закономерное снижение α -токоферола, обусловленное вероятным истощением всех звеньев антиоксидантной системы. Последнее становится угрожающим фактором, вызывающим морфофункциональную перестройку эритроидных клеток (J.M.Gutterige, 1995; Н.Р.Бородюк, 1999), что приводит к нарушению микроциркуляторной гемодинамики и, как следствие, гипоксическому повреждению жизнеобеспечивающих систем, главным образом центральной нервной системы, характеризующему состояние напряженности и адекватности адаптационных процессов в раннем постнатальном периоде. При этом создаются предпосылки для высокой заболеваемости новорожденных, а в перспективе – детей раннего возраста (R.Almini, T.J.Levy, D.H.Han et al., 2000; K.Thorngren-Jerneek, C.Ailing, A.Herbst et al., 2004).

Таким образом можно заключить, что в патогенезе развития внутриутробной гипоксии плода при обострении герпесной инфекции лежит структурная перестройка клеточных мембран морфофункционального комплекса «мать – плацента – плод», которая подчиняется общим патофизиологическим законам цепной реакции и определяется начальным воздействием мембранодеструктивных факторов (антигены ВПГ-1, серотонин, иммуномодулирующие цитокины (TNF α , IL-1, INF γ)) на эритроциты матери, включая механизмы эритропоэтической компенсации (рис. 12).

Результатом такого взаимообусловленного влияния является структурно-метаболическая и функциональная недостаточность эритрона матери, пораженной ВПГ-1, которая при несостоятельности механизмов компенсации приводит к развитию гипоксии. Безусловно, что в условиях низкой кислородной обеспеченности лакунарной крови нарушаются обменные процессы в тканях плаценты, следствием чего является гиперэкспрессия в синцитиотрофобласте ворсин свободнорадикальных продуктов (гидроперекиси жирных кислот, пероксиды, NO-продукты), изменяющих проницаемость гидрофобного барьера и способствующих проникновению в толщу фетоплацентарного комплекса антигенов ВПГ-1.

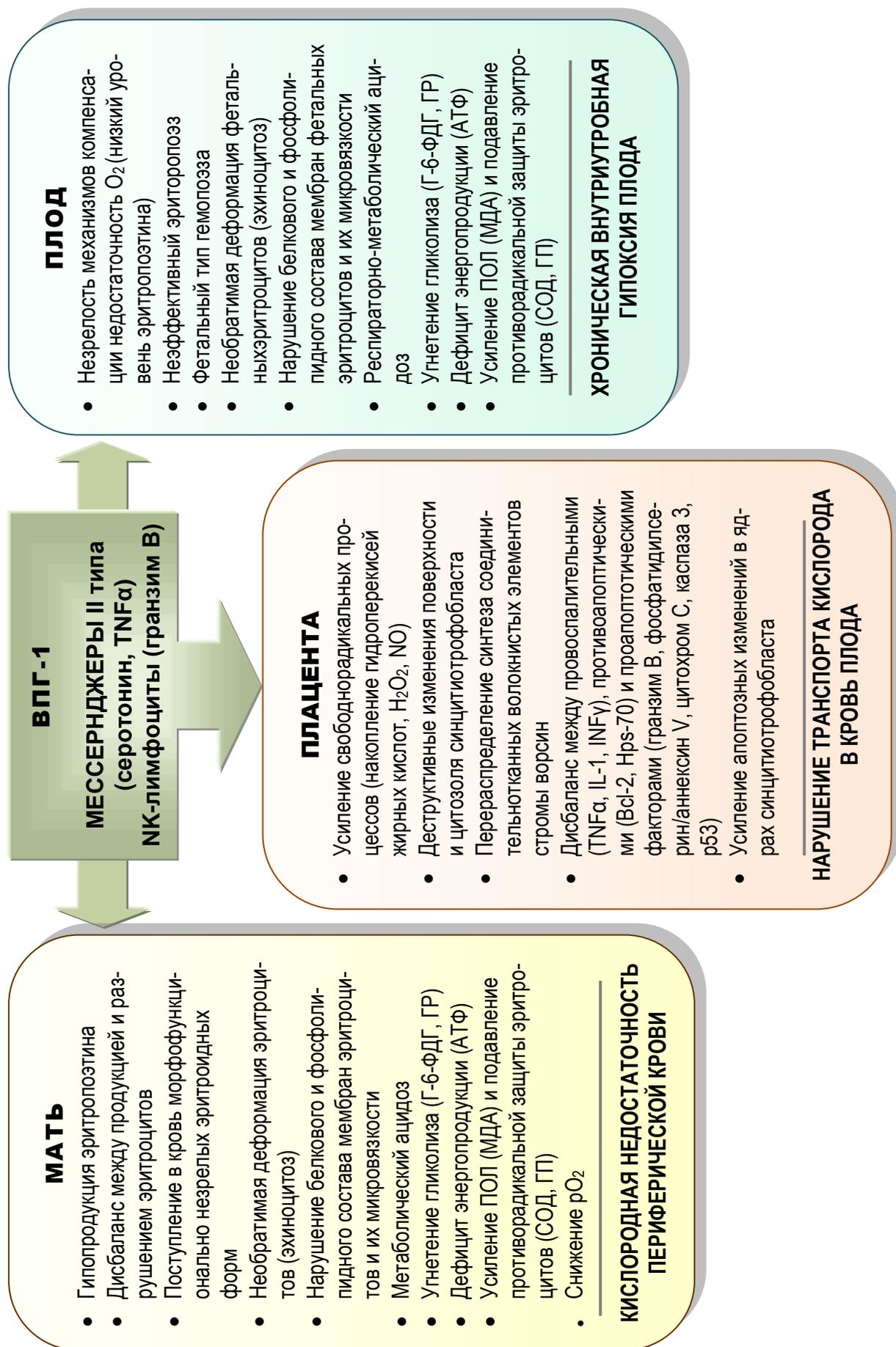


Рис. 12. Механизмы развития внутриутробной гипоксии при герпесной инфекции во время беременности.

Такого рода воздействия приводят к деструкции не только поверхности ворсин синцитиотрофобласта (высокий уровень антител к фосфатидилсерину, аннексину V), но и его цитозоля (уменьшение свободной формы Hps-70), вызывая нарушение метаболизма и появление дисбаланса между провоспалительными (гиперсекреция TNF α) и противовоспалительными, а также проапоптотическими (Bcl-2) и апоптотическими (каспаза 3, p53, цитохром C) факторами с последующим апоптотическим изменением ядер, что является критерием морфофункциональной несостоятельности, ограничивающей газообменную функцию плаценты в целом. При этом не исключается возможность поступления в кровь плода патогенных факторов (антигены ВПГ-1, TNF α , АФК), что при сниженном кислородном режиме инициирует повреждение мембран фетальных эритроцитов, способствуя их структурно-функциональной перестройке, выраженность которой будет определяться адаптационными возможностями организма и зависеть от тяжести герпесной инфекции во время беременности.

По этой причине изменение структурных свойств фетальных эритроцитов может служить диагностическим критерием клинического и функционального состояния новорожденных, а изучение механизма формирования повреждений в мембране эритроцита – важным для понимания развития дефектов других тканей и органов. Закономерное следствие указанных процессов – формирование ранних форм внутриутробной гипоксии плода, в которой первостепенная роль принадлежит структурной перестройке биоструктур, включающих периферическое звено эритрона матери и ткани плаценты.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ, РАЗРАБОТАННЫЕ АВТОРАМИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ФУНКЦИИ ПЛАЦЕНТЫ

Метод выявления вируса герпеса в периферической крови беременных

На сегодняшний день нет легкодоступных способов выявления герпесных телец в организме беременной женщины. Лабораторная диагностика герпес-вирусов в биологическом материале зачастую трудоемка, требует комплексного подхода и определяется:

1. Взятием отпечатков, соскобов с органов: слизистая уретры, стенки влагалища, канал шейки матки.

2. Взятием биопсийного материала из органов (слизистая матки, влагалище), после чего материал заливается в парафин и изучается на гистологических срезах (О.Б.Карпова, Н.Ф.Авророва, 1988; А.В.Цинзерлинг, 1993; А.В.Цинзерлинг и соавт., 1993).

3. Иммуноферментным анализом на наличие типоспецифических антител и антигенов вируса (В.А.Исаков, 2004).

Данные методы не предоставляют возможности количественно определять герпесные тельца в периферической крови в зависимости от степени выраженности заболевания.

Предложенный нами метод позволяет значительно сократить время для обнаружения в легкодоступной среде – периферической крови – герпесных телец и наблюдать этапы их формирования, обусловленные сближением друг с другом лейкоцитов в силу повышения зарядности ганглиозидов на их мембранах.

Метод осуществляется следующим образом:

1. В период обострения заболевания в периферической крови беременных иммуноферментным анализом на спектрофотометре «Stat-Fax-2100» (USA) определяли титр антител IgG к вирусу простого герпеса.

2. Проводили приготовление мазка из взвеси лейкоцитов. В стерильную пробирку, обработанную гепарином, из вены беременной

набирается 2 мл крови. После оседания форменных элементов путем центрифугирования при 1500 об/мин лейкоцитарная пленка осторожно отсасывается пипеткой и в объеме 2 капель помещается в пробирку, где находится 0,5 мл сыворотки крови этой же пациентки ($t=37^{\circ}\text{C}$). Полученная в результате центрифугирования цельной крови взвесь встряхивается и нагревается в термостате в течение 15 мин при температуре 37°C . После этого к 0,5 мл этой взвеси добавляется 0,5 мл 0,5% раствора нейтрального красного, приготовленного на физиологическом растворе при рН 7,4. Смесь должна постоять 5 мин в термостате при температуре 37°C , после чего ее встряхивают, осторожно наносят каплю на предметное стекло и на центрифуге «Stat Spin» (USA) делают мазок (время центрифугирования – 4 сек). На этом мазке, после того как он подсохнет, производится подсчет герпесных телец на 100 лейкоцитов.

3. После приготовления мазка выявляли герпесные тельца на различных этапах формирования от сближения лейкоцитов друг к другу (рис. 13 а, б) до плотного укомплектования их (рис. 13 в) и образования вокруг них общей оболочки (рис. 13 г).

В результате проведенных исследований установлено, что количество герпесных телец по мере увеличения титра антител IgG к вирусу простого герпеса нарастает и составляет при титре 1:3200 – $1,0\pm 0,06\%$; при титре 1:6400 – $2,0\pm 0,03\%$; при титре 1:12800 – $5,0\pm 0,30\%$ и выше.

Предлагаемый метод прошел клиническую апробацию на базе акушерского отделения патологии беременных ФГБУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. С помощью предложенного метода проведено выявление герпесных телец в периферической крови 60 беременных с обострением герпес-вирусной инфекции из 75 обследованных.

Предлагаемый метод может быть эффективно использован для диагностики герпес-вирусной инфекции у беременных в 80% случаев.

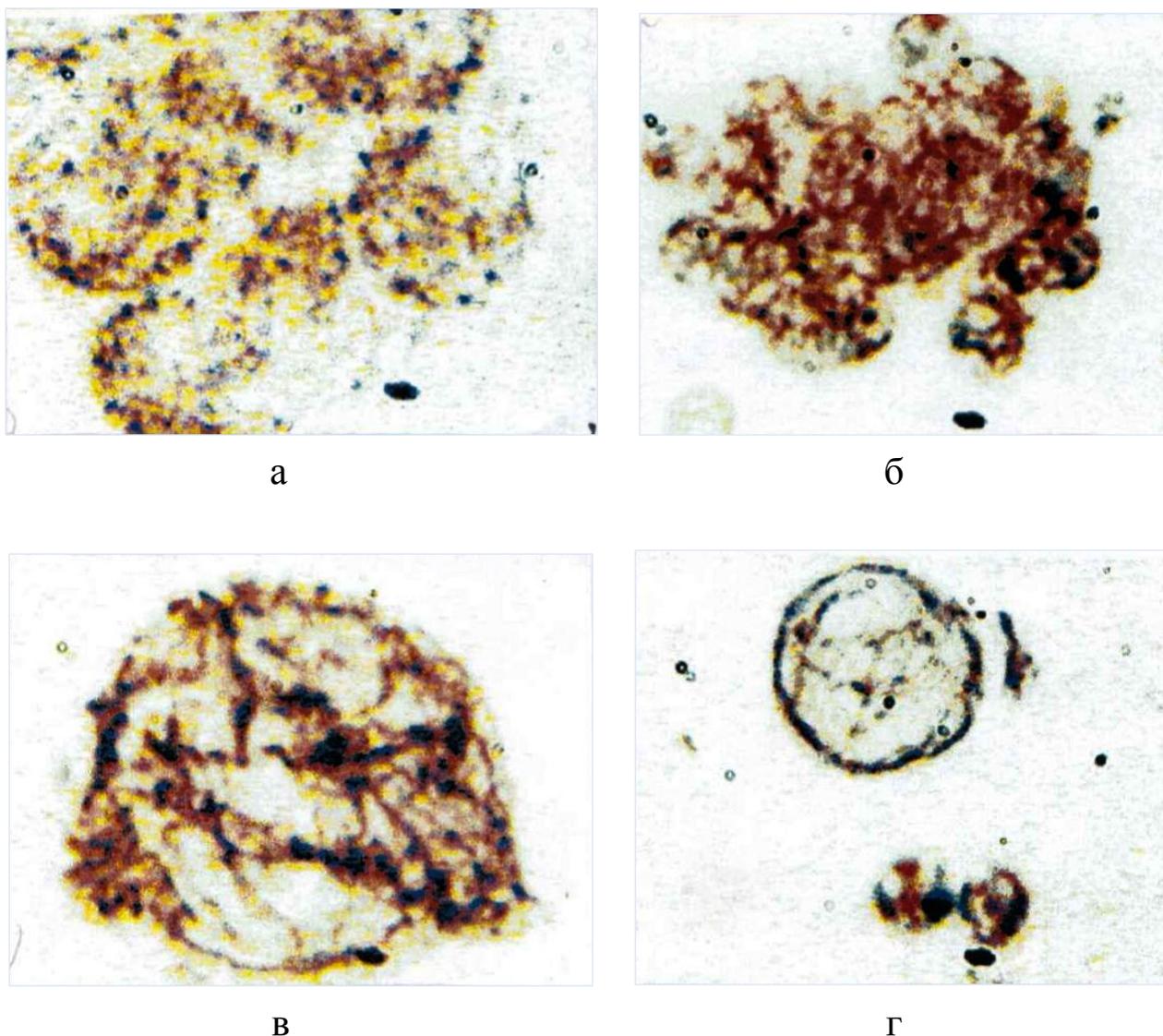


Рис. 13. Периферическая кровь беременной на 24 неделе гестации (титр антител к вирусу простого герпеса 1:12800). а – сближение лейкоцитов друг с другом (окраска 0,5% раствором нейтрального красного). Комбинированная окраска: на фоне 0,5% нейтрального красного выполнена гистохимическая реакция на выявление ганглиозидов; б, в, г – последовательные стадии образования герпесных телец.

Метод защищен патентом №2330286, зарегистрированным в Государственном реестре изобретений РФ 27.06.2008 г. (авторы: М.Т.Луценко, А.С.Соловьева).

Метод определения устойчивости мембран эритроцитов в периферической крови беременных при герпес-вирусной инфекции

Нарушение структуры цитоскелета мембран эритроцитов влечет за собой изменение их устойчивости, вследствие увеличения процентного содержания дегенеративных форм.

Нами предложен метод, позволяющий определить повреждающее действие токсинов вируса герпеса на цитоскелет мембраны эритроцитов периферической крови, что, в свою очередь, влечет за собой нарушение их целостности и снижение общего числа дискоцитов, выполняющих в ответственный период жизнедеятельности организма беременной процессы, направленные на газообмен.

Цель достигается тем, что в период обострения герпес-вирусной инфекции у беременной забирается кровь из вены, в которой определяется титр антител к вирусу простого герпеса, состав белков цитоскелета мембран эритроцитов методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле, и на монослойном мазке, приготовленном на центрифуге, производится автоматический подсчет процентного состава морфологических форм эритроцитов.

Аналогов, позволяющих оценить состояние эритроцитов в периферической крови беременных при герпес-вирусной инфекции в зависимости от спектра белков цитоскелета мембран эритроцитов, не обнаружено.

Предлагаемый способ содержит следующие приемы:

1. В мембранах эритроцитов периферической крови беременных методом диск-электрофореза в ступенчатом градиентном полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия определяют содержание белков цитоскелета: α -спектрин, β -спектрин и белок полосы 4.1.

2. Титр антител IgG к вирусу простого герпеса определяется иммуноферментным методом на спектрофотометре «Stat-Fax-2100» (USA).

3. В монослойном мазке периферической крови, полученном на центрифуге «Stat Spin» (USA), с помощью цитфотометрической установки «Mekos» производят расчет формулы морфологического состава эритроцитов (на 1000 в каждом отдельно взятом случае) (Регистрационное удостоверение МЗ РФ 29/10010198/1282-01).

В результате проведенных исследований установлено, что при обострении герпес-вирусной инфекции во время беременности (титр антител IgG к вирусу простого герпеса 1:12800) токсины возбудителя разрушающе действуют на цитоскелет мембран эритроцитов, снижая содержание белков спектринового «узлового комплекса»: α -спектрина до $6,8 \pm 0,02\%$ (контроль – $8,2 \pm 0,07\%$); β -спектрина до $7,1 \pm 0,08\%$ (контроль – $8,84 \pm 0,07\%$) и белка полосы 4.1 до $3,2 \pm 0,05\%$ (контроль – $5,19 \pm 0,02\%$). При морфологическом анализе мазков периферической крови этих же беременных выявлено уменьшение числа дискоцитов до $84,5 \pm 3,1\%$ (контроль – $93,1 \pm 2,9\%$) и увеличение дегенеративных форм до $15,5 \pm 0,095\%$ (контроль – $7,0 \pm 0,4\%$).

Таким образом, метод диагностики устойчивости мембран эритроцитов периферической крови беременных при обострении герпес-вирусной инфекции характеризуется тем, что у беременных при обострении герпес-вирусной инфекции в мембранах эритроцитов методом диск-электрофореза в ступенчатом градиентном полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия определяют содержание α -спектрина, β -спектрина и белка полосы-4.1, и при уменьшении значения α -спектрина до $6,8 \pm 0,02\%$, β -спектрина до $7,1 \pm 0,08\%$ и белка полосы 4.1 до $3,2 \pm 0,05\%$ диагностируют неустойчивость мембран эритроцитов, приводящую к увеличению числа дегенеративных форм эритроцитов.

Метод защищен патентом №2367953, зарегистрированным в Государственном реестре изобретений РФ 20.09.2009 г.

**Метод определения уплотненных белково-липидных участков
в мембранах эритроцитов различной степени зрелости
с помощью компьютерной программы Bio Vision**

Эритроциты периферической крови, исчерпывая свое жизненно активное состояние, начинают приобретать различные переходные формы. Дiskoциты могут принимать форму эхиноцитов, мишенеобразную, форму дегенератов и других переходных форм.

Клеточная мембрана, в том числе и мембрана эритроцитов, по своему строению представляет белково-липидную мозаику, в которой в среднем 50% от общей массы мембраны приходится на белки. Между белковыми молекулами и липидами в клеточной мембране устанавливается тесное взаимодействие. Полипептидные цепи мембран свертываются в трехмерные структуры, подчиняясь термодинамическим законам, которые управляют функциональной трехмерной конформацией белков. Свертывание линейного полимера аминокислот в крупную трехмерную структуру сопряжено с затратой энергии, в результате чего происходит размещение гидрофобных групп в гидрофильной среде.

Липиды и белковые молекулы мембран изучаются разными методами: гель-электрофорезом, тонкослойной хроматографией и т.д. Однако получить визуальное представление о конформационном состоянии белково-липидного комплекса биофизически, т.е. в условиях, когда мембрана частично или полностью теряет свое морфофункционально активное состояние и эти участки уплотняются, до настоящего времени не удавалось.

Недостатки известных способов:

1. Исследование морфологических форм эритроцитов проводится на мазках, окрашенных по общепринятым методам, чаще азур-эозином, либо с помощью растровой микроскопии.

2. Во всех ранее известных случаях изучения различных морфологических форм эритроцитов не удавалось выделить в мембранах участки биофизической плотности и классифицировать их по этому принципу.

Цель исследования – разделение эритроцитов здоровых лиц, не имевших никаких заболеваний в течение 6 предыдущих месяцев, с помощью компьютерной программы «Mekos» на группы по морфологическому принципу: дискоциты, эхиноциты, мишеневидные, дегенеративные формы. Каждую группу при помощи установки «Mekos» выделяют в виде галереи. С помощью компьютерной программы «Bio Vision» в мембранах отдельных эритроцитов, составляющих ту или иную галерею, выделяют участки высокой конденсации белково-липидных комплексов по биофизико-морфологическому принципу.

Для определения уплотненных белково-липидных участков в мембранах эритроцитов различной степени зрелости разделяют эритроциты здоровых лиц, не имевших никаких заболеваний в течение 6 предыдущих месяцев, по морфологическому принципу: дискоциты, эхиноциты, мишеневидные, дегенеративные формы. Выделяют каждую группу в виде галереи. Выделяют с помощью компьютерной программы «Bio Vision» участки высокой конденсации белково-липидных комплексов в мембранах отдельных эритроцитов, входящих в свою галерею. Определяют их площадь и процент отношения к площади всей мембраны. При этом в мембранах дискоцитов уплотненные участки составляют $1,403 \pm 0,004\%$; в эхиноцитах – $2,826 \pm 0,03\%$; в мишеневидных эритроцитах – $4,476 \pm 0,008\%$ и в мембранах дегенеративных форм – $14,852 \pm 0,82\%$. Использование способа позволяет дать оценку уплотнения мембраны в зависимости от структурных изменений эритроцитов, различить дискоциты от эхиноцитов, мишеневидных и дегенеративных форм.

Предлагаемый способ содержит следующие приемы:

- у пациента после прокола кожи безымянного пальца забирается кровь;
- капля свежей крови помещается на стекла «Stat Spin» (Product Number SL72), которые размещаются в центрифуге «Diff Spin Slide Spinner» модели M700-10 (США);
- мазок готовится в течение 3 сек. после запуска центрифуги, что дает возможность получить на стекле монослой эритроцитов.

Неокрашенные мазки помещаются под микроскопом на установке аппаратно-программного определения фотоморфометрических параметров клеток «Мекос» (регистрационное удостоверение МЗ РФ 29/10010198/128-01). С помощью этой установки автоматически (из 1500 клеток) составляется таблица процентного содержания морфологически различных видов эритроцитов: дискоцитов, эхиноцитов, мишеневидных и дегенеративных форм.

Было обследовано 30 здоровых женщин, не имевших заболеваний на протяжении 6 предыдущих месяцев. Получены средние показатели содержания морфологических форм эритроцитов у здоровых женщин: дискоциты – $87,0 \pm 1,1\%$, эхиноциты – $2,5 \pm 0,06\%$, мишеневидные – $1,6 \pm 0,1\%$, дегенеративные формы – $7,2 \pm 0,09\%$. Установка «Мекос» позволяет после определения процентного содержания различных форм эритроцитов сгруппировать их в виде галереи: дискоциты (рис. 14 а), эхиноциты (рис. 14 б), мишеневидные (рис. 14 в), дегенеративные формы (рис. 14 г).

Из каждой галереи выбирается по 50 отдельных эритроцитов. Выделенные из галереи эритроциты подвергаются компьютерному биофизическому анализу с помощью компьютерной программы «Bio Vision» с целью определения площади уплотненных участков и процента, приходящегося на этот участок: дискоциты (рис. 15 а), эхиноциты (рис. 15 б), мишеневидные (рис. 15 в), дегенеративные формы (рис. 15 г). Выделяются фазы по ранжам (пиксель на дюйм).

Предварительно стандартизуется будущее изображение: ширина рисунка – 10 см, разрешающая способность – 300 пикселей на дюйм при постоянном увеличении $\times 40$. Исследование во всех случаях проводилось при ранже 120. В мембранах дискоцитов здоровых лиц уплотненные участки единичны и занимают площадь $10,351 \pm 0,15$ усл. ед., что составляет $1,403 \pm 0,004\%$ от площади всей мембраны. В эхиноцитах площадь – $19,252 \pm 0,2$ усл. ед., процент – $2,826 \pm 0,03\%$; в мишеневидных площадь уплотненных белково-липидных комплексов составляет $31,959 \pm 0,3$ усл. ед., процент – $4,476 \pm 0,008\%$. В дегенеративных эритроцитах уплотненные участки составляют площадь $91,965 \pm 1,1$ усл. ед., процент – $14,852 \pm 0,82\%$ (рис. 16).

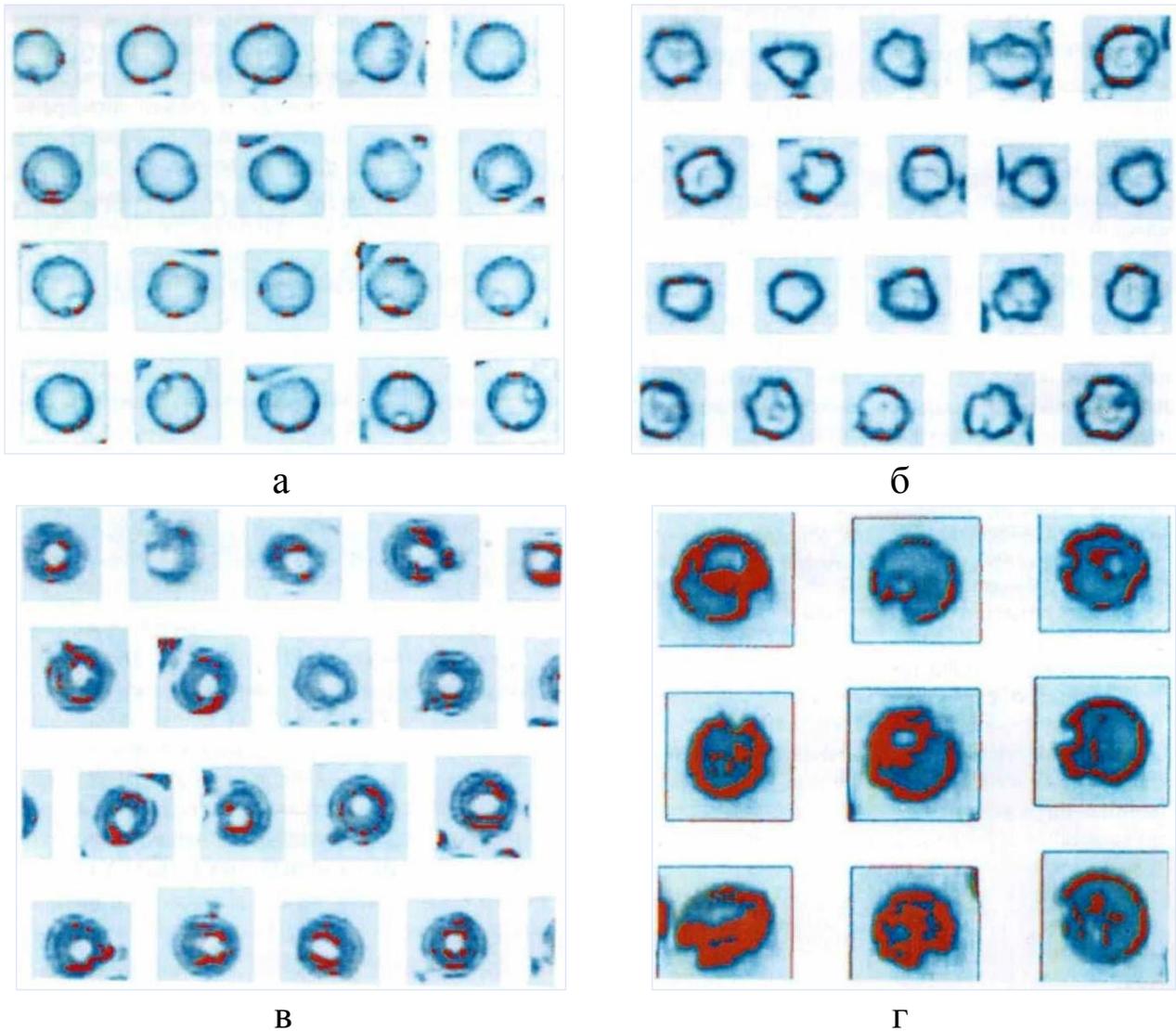


Рис. 14. Галерея изображений дискоцитов (а), эхиноцитов (б), мишеневидных (в) и дегенеративных форм (г) эритроцитов крови здоровых людей

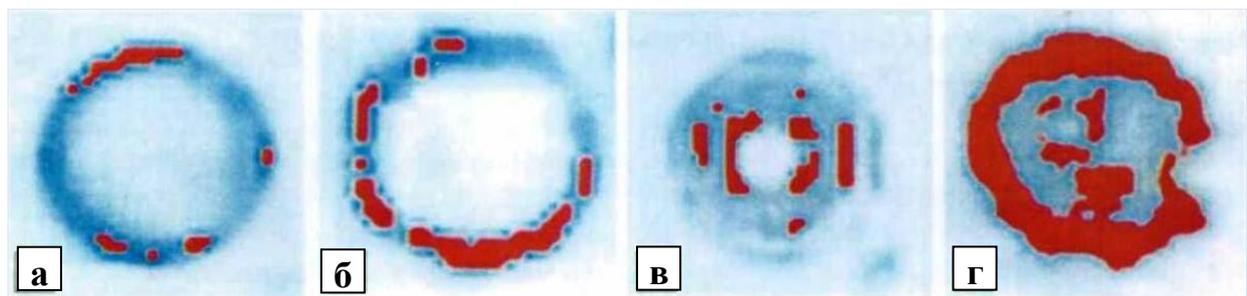


Рис. 15. Уплотненные белково-липидные участки мембранных дискоцитов (а), эхиноцитов (б), мишеневидных (в) и дегенеративных форм (г) эритроцитов периферической крови здоровых людей. Ранж – 120. Стандартное окно программы Bio Vision: ширина – 10 см, разрешение – 300 пикселей/дюйм. Ув. 40.

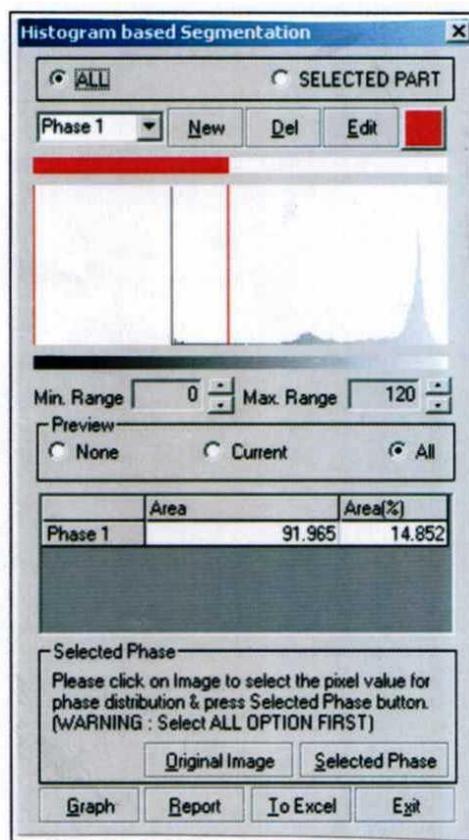


Рис. 16. Площадь уплотненных участков мембран эритроцитов.

Таким образом, предлагаемый способ позволяет с использованием морфобиофизического компьютерного анализа дать оценку степени уплотнения «старения» мембраны в зависимости от структурных изменений эритроцита, различать дискоциты от эхиноцитов, мишеневидных и дегенеративных форм.

Метод защищен патентом №2390020, зарегистрированным в Государственном реестре изобретений РФ 20.05.2010 г. (авторы: М.Т.Луценко, И.А.Андриевская).

Метод прогнозирования устойчивости спектрин-актинового комплекса мембран эритроцитов периферической крови беременных в зависимости от агрессивности ГВИ

Спектрин-актиновый комплекс выступает в мембранах эритроцитов как структурный цитоскелетный компонент, удерживающий их в состоянии упругости, придавая клетке дисковидную форму. В случае выпадения из этого комплекса актинового звена мембрана эрит-

роцитов теряет свою устойчивость и может переходить в функционально неполноценную форму, выступая уже как эхиноцит, мишеневидный или дегенеративный эритроцит.

Используя диск-электрофорезную методику оценки процентного содержания в мембранах эритроцитов актина под влиянием увеличивающегося титра антител к вирусу герпеса, можно оценить, что агрессивное действие герпеса на мембраны эритроцитов в периферической крови может привести к снижению процентного содержания актина и повышению количества неполноценных эритроцитов: эхиноцитов, мишеневидных и дегенеративных форм.

Актин относится к 5 фракции белков мембран эритроцитов. В мембранах эритроцитов вместе со спектрином актин составляет основу цитоскелета (P.Agre et al., 1983; Н.А.Алексеев, 1998; А.И.Воробьев, 2007). При неблагоприятных условиях воздействия на мембраны эритроцитов происходит фосфорилирование актина, что оказывает отрицательный эффект на устойчивость цитоскелета мембран эритроцитов (P.Boivin, 1988; S.Walsh et al., 1981).

У пожилых лиц в мембранах эритроцитов отмечается снижение количества актина, что приводит к дестабилизации цитоскелета эритроцитов (А.В.Курята, В.С.Нездвецкий, 1999). При диабете 2 типа расшатывается связь спектрин-актинового комплекса, приводя к появлению эритроцитов различной степени зрелости (M.N.Starodubtseva et al., 2008). Однако в известных литературных источниках нет сведений, касающихся нарушения актин-спектринового комплекса при развитии у беременной герпес-вирусной инфекции.

В отличие от описанных прототипов в данном методе проводится подробный анализ динамики изменений содержания актина в мембранах эритроцитов в зависимости от агрессивности герпес-вирусной инфекции, развивающейся во время беременности.

Цель исследования заключалась в определении содержания актина в мембранах эритроцитов периферической крови беременных в зависимости от агрессивности ГВИ. Цель достигается тем, что оценка изменения содержания актина в мембранах эритроцитов проводится с одновременным определением титра антител к вирусу герпеса.

Материалом для исследования послужила кровь, полученная у 15 беременных с обострением ГВИ в III триместре. Контролем служила кровь от 15 беременных, не болевших во время гестации.

С помощью диск-электрофореза в ступенчатом градиентном полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия были выявлены следующие фракции: α -спектрин, β -спектрин, протеин полосы-3, протеин полосы-4.1, полосы-4.2, полосы-4.9, анкирин, гликофорин. Одновременно определяли титр антител к вирусу герпеса иммуноферментным методом на спектрофотометре «Stat-Fax-2100» (USA).

Было установлено, что по мере нарастания титра антител к вирусу простого герпеса в мембранах эритроцитов периферической крови беременных увеличивается содержание актина (табл. 16).

Таблица 16

Содержание актина в мембранах эритроцитов у беременных при обострении герпес-вирусной инфекции ($M \pm m$)

Титр антител к вирусу герпеса	Содержание актина в мембранах эритроцитов (%)
1:1600	9,89 \pm 0,30 (p>0,05)
1:6400	10,20 \pm 0,50 (p>0,05)
1:12800	11,30 \pm 0,60 (p<0,01)
контроль	10,0 \pm 0,3

Примечание: p – достоверность по сравнению с контрольной группой.

Полученные данные позволяют считать, что при нарастании титра антител IgG к вирусу простого герпеса в периферической крови беременной до 1:12800 нарушается связь спектрина с актином в мембранах эритроцитов периферической крови беременных, что приводит к повышению числа дегенеративных форм эритроцитов.

Метод защищен патентом №2410696, зарегистрированным в Государственном реестре изобретений РФ 27.01.2011 г. (авторы: М.Т.Луценко, И.А.Андриевская).

Метод прогнозирования развития гипоксии у беременных в третьем триместре гестации, перенесших обострение герпес-вирусной инфекции

Сродство гемоглобина к кислороду изменяется при условии, если 2,3-ДФГ по-разному взаимодействует с двумя формами гемоглобина (оксигенированной и диоксигенированной). Лиганд, который уменьшает сродство гемоглобина к кислороду, должен присоединяться к деоксигемоглобину (I.Wyman, 1948; Н.А.Федоров, 1976). Константы равновесия для присоединения первых 3 молекул кислорода уменьшаются в присутствии 2,3-ДФГ (M.Rorth, 1972; M.Rorth, P.Astrup, 1972). Считают, что 2,3-ДФГ увеличивает константу скорости отщепления кислорода и уменьшает константу скорости его присоединения к гемоглобину (Ch.Baner, 1969). Неспецифический эффект 2,3-ДФГ на сродство гемоглобина к кислороду в случае увеличения 2,3-ДФГ выше физиологического уровня (5 мкмоль/мл) в интактных эритроцитах приводит к уменьшению присоединения кислорода к гемоглобину и увеличивает константу скорости отщепления кислорода, связанного с гемоглобином. На эти процессы могут влиять многие факторы: уменьшение внутриэритроцитарного рН, накопление большого количества электроотрицательных ионов или продуктов метаболизма, изменяющих электростатическое равновесие в гемоглобиновой системе (M.Rorth, P.Astrup, 1972; M.Perutz, L.Mazzarella, 1963).

Таким образом, если коэффициент включения 2,3-ДФГ будет увеличен, то гемоглобин не сможет присоединять кислород, и концентрация оксигемоглобина в эритроцитах будет снижаться.

В качестве прототипа использованы данные, полученные И.А.Андриевской (2008), в которых отмечается, что при нарастании титра антител IgG к вирусу простого герпеса во время гестации снижается содержание в крови оксигемоглобина. Однако автор не указывает причину, приводящую к снижению содержания оксигемоглобина при нарастании в крови беременной титра антител IgG к вирусу про-

стого герпеса. В настоящем исследовании приводятся данные, указывающие, что причиной гипоксии является увеличение в крови 2,3-ДФГ, который блокирует гемоглобин для связывания с кислородом.

Целью исследования явилось изучение характера нарушений оксигенации гемоглобина в эритроцитах периферической крови беременных после обострения герпес-вирусной инфекции в третьем триместре гестации, приводящего к избыточному включению в гемоглобин 2,3-ДФГ и снижающего формирование оксигемоглобина (HbO₂).

Предлагаемый способ содержит следующие приемы:

1. Исследовали периферическую кровь у 20 беременных, перенесших в третьем триместре обострение ГВИ и 20 беременных, не болевших в течение всего периода гестации (контроль).

2. Содержание оксигемоглобина в эритроцитах периферической крови беременных определяли на спектрофотометре «Stat-Fax-2100x» (USA) по М.С.Кушаковскому (1968).

3. Титр антител к вирусу герпеса определяли иммуноферментным методом на спектрофотометре «Stat-Fax-2100x» (USA).

4. Содержание 2,3-ДФГ в эритроцитах периферической крови беременных определяли на спектрофотометре «Stat-Fax-1900+» (USA) по методу И.Л.Виноградовой и соавт. (1980).

5. Анализ содержания 2,3-ДФГ и оксигемоглобина при титре антител IgG к вирусу простого герпеса в крови беременных проводился статистическим методом дискриминантного анализа.

Исследования показали, что при обострении ГВИ у беременных в третьем триместре гестации увеличивалась концентрация в эритроцитах периферической крови 2,3-ДФГ. При титре антител IgG к вирусу простого герпеса 1:12800 концентрация 2,3-ДФГ увеличивалась до $6,81 \pm 0,15$ мкмоль/мл (контроль – $4,9 \pm 0,02$ мкмоль/мл). Одновременно у этих же беременных в эритроцитах периферической крови снижалось содержание оксигемоглобина до $95,87 \pm 2,6\%$ (контроль – $99,5 \pm 2,0\%$).

С помощью дискриминантного анализа получено уравнение:

$$D = +17,072 \times 2,3\text{-ДФГ} + (-0,041 \times \text{HbO}_2),$$

где D – дискриминантная функция, граничное значение которой составляет 97,09. При D выше граничного значения 97,09 диагностируют угрозу формирования гипоксии у беременных.

Метод защищен патентом №2415438, зарегистрированным в Государственном реестре изобретений РФ 27.03.2011 г. (авторы: М.Т.Луценко, И.А.Андреевская).

Метод определения оксигенации гемоглобина эритроцитов крови пуповины новорожденных, родившихся от матерей, перенесших в третьем триместре герпес-вирусную инфекцию

Обеспечение кислородом формирующегося плода, особенно на последних этапах гестации, приобретает огромное значение. Прежде всего, это зависит от состояния насыщенности кислородом эритроцитов лакунарной крови плаценты. Эритроциты матери могут потерять нормальный уровень связывания кислорода гемоглобином, к этому может привести действие герпесной инфекции, особенно, если она обостряется у беременной в третьем триместре гестации. Механизм этого патологического процесса заключается в увеличении в эритроцитах матери содержания 2,3-ДФГ, который, связываясь прочно с гемоглобином, делает его недоступным в достаточном количестве для связывания с кислородом. Суть разработанного метода состоит в том, что по определению количества 2,3-ДФГ в эритроцитах крови пуповины новорожденных от матерей, перенесших обострение герпес-вирусной инфекции в период гестации можно судить об эффективности оксигенации гемоглобина.

Цель исследования – изучить характер нарушения оксигенации гемоглобина в эритроцитах пуповинной крови новорожденных, родившихся от матерей, перенесших обострение герпес-вирусной инфекции в период гестации.

Предлагаемый способ содержит следующие приемы:

1. Исследовали пуповинную кровь 20 новорожденных от матерей, перенесших в третьем триместре обострение герпес-вирусной инфекции и 20 новорожденных, чьи матери не болели в течение всего периода гестации (контроль).

2. Содержание оксигемоглобина в эритроцитах периферической крови беременных определяли на спектрофотометре «Stat-Fax-2100x» (USA) по М.С.Кушаковскому (1968).

3. Титр антител к вирусу герпеса определяли иммуноферментным методом на спектрофотометре «Stat-Fax-2100x» (USA).

4. Содержание 2,3-ДФГ в эритроцитах пуповинной крови новорожденных определяли на спектрофотометре «Stat-Fax-1900+» (USA) по методу И.Л.Виноградовой, С.Ю.Багрянцевой и Г.В.Дервиз (1980).

5. Анализ содержания 2,3-ДФГ и оксигемоглобина при титре антител IgG к вирусу простого герпеса 1:12800 обрабатывался статистическим методом дискриминантного анализа.

Исследования показали, что при обострении ГВИ у беременных в третьем триместре в эритроцитах артериальной крови пуповины увеличивается концентрация 2,3-ДФГ до $7,12 \pm 0,2$ мкмоль/мл (контроль – $4,5 \pm 0,15$ мкмоль/мл). Одновременно в эритроцитах артериальной крови пуповины снижалось содержание оксигемоглобина (HbO₂) до $94,2 \pm 1,6\%$ (контроль – $99,4 \pm 2,1\%$).

С помощью дискриминантного анализа получено уравнение:

$$D = -1,858 \times \text{HbO}_2 + (+13,097 \times 2,3\text{ДФГ}),$$

где D – дискриминантная функция, граничное значение которой составляет -105,82. При D выше граничного значения -105,82 диагностируют угрозу сниженности насыщения эритроцитов артериальной крови пуповины новорожденных, родившихся от матерей, перенесших в третьем триместре обострение герпес-вирусной инфекции.

Метод защищен патентом №2415428, зарегистрированным в Государственном реестре изобретений РФ 27.03.2011 г. (авторы: Луценко М.Т., Андриевская И.А.).

Метод оценки эритропоэтической функции у беременных, перенесших в третьем триместре герпес-вирусную инфекцию

Эритропоэтин – мощный регулятор эритропоэза. Основным местом выработки эритропоэтина являются почки, а также макрофаги-моноциты, которые располагаются в костном мозге, участвуя в образовании эритроидных островков. Благодаря центральному расположению макрофагов-моноцитов, вырабатываемые ими гуморальные регуляторы эритропоэза могут оказывать прямое влияние на окружающие эритроидные клетки (Н.А.Алексеев, 1998).

Интенсивность действия эритропоэтина, по мнению большинства авторов, связана с появлением у полицитемических животных или лиц, проживающих в высокогорных областях, особого ингибитора эритропоэза (Т.Krzymowski, Н.Krzymowski, 1969; Т.Krzymowski, 1968; 1971; 1972).

В последнее время были получены факты в экспериментальных условиях на мышах (М.Р.Карпова и соавт., 1999), свидетельствующие о том, что внутрибрюшинное введение животным штамма Л2 ВПГ1 типа, полученного в НИИ вирусологии РАМН, приводит к значительному снижению через 30 дней числа эритрокариоцитов в костном мозге, взятом из бедра животных, с $4,82 \cdot 10^6 \pm 0,19$ до $2,57 \cdot 10^6 \pm 0,35$.

Сведений, касающихся изучения активности эритропоэтина у беременных женщин, перенесших герпес-вирусную инфекцию, в литературе не имеется.

Предлагаемый способ содержит следующие приемы:

1. Исследовали периферическую кровь беременных после родов у 20 беременных, перенесших в третьем триместре обострение герпес-вирусной инфекции и 20 беременных, не болевших в течение всего периода гестации (контроль).

2. Активность эритропоэтина в периферической крови здоровых беременных и беременных, перенесших в третьем триместре вспышку герпес-вирусной инфекции, определяли стандартным методом с использованием реагентов «Sentinel diagnostics» (Италия) на спектрофотометре «Stat-Fax-2100» (США).

3. Титр антител IgG к вирусу простого герпеса определяли иммуноферментным методом на спектрофотометре «Stat-Fax-2100» (США).

Исследования показали, что по мере нарастания титра антител к вирусу простого герпеса в периферической крови беременных в третьем триместре снижается активность эритропоэтина. При титре антител IgG к вирусу простого герпеса 1:3200 концентрация эритропоэтина в периферической крови беременных была $20,03 \pm 0,690$ мЕд/мл (контроль – $31,34 \pm 1,01$ мЕд/мл; $p < 0,001$). При нарастании титра антител IgG к вирусу простого герпеса до 1:6400 концентрация эритропоэтина снижалась до $16,71 \pm 1,33$ мЕд/мл (контроль – $31,34 \pm 1,01$ мЕд/мл; $p < 0,001$). При увеличении титра антител к вирусу герпеса в периферической крови до 1:12800 концентрации эритропоэтина в крови беременных снижалась до $5,827 \pm 0,470$ мЕд/мл (контроль – $31,34 \pm 1,01$ мЕд/мл; $p < 0,001$).

На основании результатов проведенных исследований предложен метод оценки эритропоэтической функции у беременных, перенесших в третьем триместре герпес-вирусную инфекцию.

Способ заключается в определении концентрации эритропоэтина методом иммуноферментного анализа в периферической крови беременных и позволяет прогнозировать в зависимости от степени агрессивности герпес-вирусной инфекции угрозу формирования гемопоэтической анемии.

Метод определения деформируемости эритроцитов в периферической крови беременных при обострении в третьем триместре гестации герпес-вирусной инфекции

Целью исследования явилось изучения нарушения деформируемости эритроцитов под влиянием герпес-вирусной инфекции у беременных в третьем триместре гестации, создающей угрозу насыщению тканей организма кислородом.

Деформируемость эритроцитов обеспечивает поток крови на уровне микроциркуляторного русла и, тем самым, формирует насы-

щение тканей кислородом (А.М.Чернух, 1984; В.В.Зинчук, 1989; Л.Н.Катюхин, 1995; В.А.Зверко и соавт., 1999).

Особенно существенные изменения формы эритроцитов наблюдаются в микроциркуляторном русле, некоторые капилляры которого имеют диаметр около 2 мкм и менее. Прижизненная микроскопия показала, что эритроциты, движущиеся в капиллярах, подвергаются значительным деформациям, приобретая при этом разнообразные формы (А.М.Чернух, 1984).

Благоприятное отношение площади поверхности к объему эритроцита создает оптимальные условия для обеспечения оксигенации тканей разветвленной сетью мелких капилляров. Улучшение вязкостно-эластических свойств эритроцитов благоприятствует транспорту кислорода через эритроцитарную мембрану за счет увеличения его переноса, а их нарушение коррелирует с ухудшением оксигенации тканей, и как следствие, приводит к тканевой гипоксии (Y.Kikuchi et al., 1994). Нормальная деформируемость эритроцитов является важным фактором поддержания необходимой перфузии в микроциркуляторном русле, особенно при низких градиентах артериального давления, а ухудшение этого свойства эритроцитов ведет к более выраженным нарушениям показателей гемодинамики (G.K.Driessen et al, 1980).

Расчет состояния деформируемости эритроцитов в больших объемах крови проводить до настоящего времени крайне трудно.

Одним из методов изучения деформируемости является закрепление эритроцита в поле зрения микроскопа и при различных вариантах действия на него сдвигового напряжения: вытягивание мембраны в микропипетку или растяжения эритроцита, закрепленного на несилеконированном стекле (S.D.Zakharow, A.V.Ivanov, 2005). Этот метод позволяет решать вопросы деформируемости в объеме единичных эритроцитов.

Предлагается метод пропускания эритроцитарной суспензии сквозь искусственный капилляр малого диаметра или продавливание заданного объема суспензии через микропористый фильтр. Этот ме-

тод относится к косвенным методам. Регистрируемым параметром, определяющим деформируемость эритроцитов, в данном случае является «скорость фильтрации» или «время полуфильтрации». Этот метод не позволяет оценивать, каково общее состояние исследуемого количества эритроцитов и как это повлияет в конечном итоге на процессы транспортных свойств эритроцитарной массы, и не дает возможности предполагать о функциональных недостатках эритроцитов крови в кровяном русле.

Более совершенным методом оценки деформации единичных эритроцитов является метод лазерной дифрактометрии эритроцитов, благодаря которому можно дать оценку геометрических и физических параметров биологических объектов (Г.М.Франк, 1955; E.Ponder, 1971; Г.Р.Иваницкий, А.С.Куниский, 1981; С.С.Бессмельцев, Ю.Л.Кападзе, 1991; С.С.Бессмельцев и соавт., 2000).

Метод лазерной дифрактометрии – трудоемкий и его применение для большого объема измерений вызывает затруднения.

Поскольку индекс деформирования эритроцитов (ID) зависит от площади поверхности эритроцита и его объема, то для массовых изменений состояния деформируемости эритроцитов удобен математический метод расчета, при котором ID будет измеряться следующим образом:

$$ID = \frac{NS}{Nm \times (D_{\text{ср}})^3 \times (1 + 3k^2)}$$

где N – количество исследуемых эритроцитов;

S – среднее значение площади в мкм^2 одного эритроцита;

m – стандартное отклонение;

$D_{\text{ср}}$ – средний диаметр эритроцитов;

k – коэффициент вариации диаметра эритроцитов.

Показатель k можно вычислить по формуле:

$$k = \frac{m}{D_{\text{ср}}}$$

Все перечисленные параметры можно получить, прибегнув к обработке мазка крови на автоматизированной фотометрической установке «Mekos» (регистрационное удостоверение МЗ РФ 29/100101198/1282-01). По программе «Mekos» происходит сканирование эритроцитов, и выдаются необходимые параметры. Автоматически аппарат выдает следующие параметры: средний диаметр сканированных эритроцитов ($D_{ср}$), стандартное отклонение (m), площадь поверхности исследованных эритроцитов.

Таким образом, с помощью математических расчетов можно определить индекс деформируемости эритроцитов на отобранном аппарате количестве эритроцитов, которые им регистрируются. Одновременно можно проверить достоверность этих результатов, так как аппарат выдает формулу морфологического состояния эритроцитов. При низком ID большая доля эритроцитов приходится на эхиноциты, мишеневидные и дегенеративные формы, что увеличивает в исследованном объеме эритроцитов количество клеток с ригидной клеточной мембраной, т.е. с низкой деформируемостью.

При обострении в период беременности герпес-вирусной инфекции отмечается снижение деформируемости эритроцитов периферической крови.

Предлагаемый способ содержит следующие приемы:

1. Исследовали периферическую кровь 50 беременных, перенесших ГВИ в третьем триместре гестации с титром антител IgG к вирусу простого герпеса 1:12800. Контролем послужили исследования деформируемости эритроцитов периферической крови 20 беременных, не болевших в течение всего периода гестации.

2. Титр антител IgG к вирусу простого герпеса определяли иммуноферментным методом на спектрофотометре «Stat Fax-2100» (США).

3. Эритрограмма периферической крови обследуемых беременных, определение среднего диаметра и количество эритроцитов, а также площадь поверхности эритроцитов исследовали с помощью автоматизированной фотометрической установки «Mekos» (регистрационное удостоверение МЗ РФ 29/100101198/1282-01).

4. Подсчет проводился на монослойном мазке периферической крови, приготовленном с помощью центрифуги «Stat Spin» (модель M701-22) (США).

5. Применялись предметные стекла специального назначения для работы на центрифуге «Stat Spin» 1x3 дюйма, номер SL72. Время приготовления мазка на центрифуге – 3 сек.

6. Индекс деформируемости эритроцитов (ID) рассчитывался по формуле:

$$ID = \frac{NS}{Nm \times (D_{\text{ср}})^3 \times (1 + 3k^2)}$$

Проведенные исследования показали, что при обострении в третьем триместре гестации герпес-вирусной инфекции (титр антител IgG к вирусу простого герпеса 1:12800) происходит снижение процентного содержания дискоцитов в периферической крови беременной до 50,0% (контроль – 86,2%), при одновременном нарастании процентного содержания мишеневидных эритроцитов до 25,0% (контроль – 3,4%) и дегенеративных форм эритроцитов до 20,8% (контроль – 10,3%). Средняя площадь эритроцитов в периферической крови беременных, перенесших обострение ГВИ, снижалась до 46,78 мкм² (контроль – 78,05 мкм²), а средний диаметр эритроцитов ($D_{\text{ср}}$) составил 6,77 мкм (контроль – 8,77 мкм).

Расчитаем объем сканированных эритроцитов в периферической крови беременных, перенесших обострение герпес-вирусной инфекции (N=80; m=3,7; $D_{\text{ср}} = 6,77$; S=46,78):

$$k = \frac{m}{D_{\text{ср}}} = \frac{3,7}{6,77} = 0,56$$

$$ID = \frac{80 \times 46,78}{80 \times 3,7 \times 6,77^3 \times (1 + 3 \times 0,56^2)} = 0,02 \text{ усл. ед.}$$

Индекс деформируемости эритроцитов в периферической крови беременных, перенесших обострение ГВИ равен 0,02 усл. ед.

Рассчитывая аналогичным путем индекс деформируемости эритроцитов у беременных, не болевших в течение гестации ($N=137$; $m=4,74$; $D_{cp}=8,77$; $S=78,05$), получаем значения равные $0,19$ усл.ед.

Таким образом, используя предлагаемую формулу для определения деформируемости эритроцитов и цитофотометрическую установку «Мекос», мы решаем чрезвычайно важную в клинических условиях задачу оценки полноценности насыщения тканей организма кислородом.

Метод оценки повреждающего действия герпес-вирусной инфекции на развитие апоптоза в ядрах синцитиотрофобласта ворсинок плаценты у беременных

При обострении герпес-вирусной инфекции вирусные тельца проникают в синцитиотрофобласт ворсинок плаценты, вызывая тяжелые метаболические повреждения. Однако в доступной литературе отсутствуют данные, отражающие этапы формирования апоптоза в ядрах синцитиотрофобласта ворсинок плаценты при герпес-вирусной инфекции. Недостатком существующих в настоящее время методов оценки повреждения ворсинок плаценты при герпес-вирусной инфекции, является отсутствие методов учета числа ядер синцитиотрофобласта ворсинок, подвергающихся апоптозу. В предлагаемом способе степень повреждения ядер синцитиотрофобласта ворсинок плаценты беременной рассматривается в зависимости от степени тяжести герпесной инфекции.

Предлагаемый способ содержит следующие приемы:

Исследовались плаценты, полученные после родов у 20 беременных, перенесших обострение герпес-вирусной инфекции в третьем триместре с титром антител IgG к вирусу простого герпеса 1:6400 и у 20 беременных, перенесших вспышку ГВИ в третьем триместре с титром антител IgG к вирусу простого герпеса 1:12800.

Морфологическая классификация апоптоза проводилась на парафиновых срезах плаценты по метке повреждающихся концов фрагментов ДНК *in situ* (ISEL-метод). Срезы после дегидратации в ди-

стиллированной воде в течение 30 мин инкубируют в 3% растворе перекиси водорода и отмывают 0,15 М забуференным солевым раствором (PBS) (0,15 М NaCl на 0,1 М фосфатном буфере pH 7,5). Затем срезы инкубируют в смеси 0,3 М NaCl и 30 мМ цитрата натрия (pH 7,0; 80°C, 20 мин) и отмывают в 0,15 М PBS. После чего срезы инкубируют в растворе проназы при комнатной температуре в течение 30 мин (Calbiochem; 1 мг/мл на 0,15 М PBS). Отмывают в 0,15 М PBS и буфером А (50 мМ трис-гидрохлорид, 5 мМ хлорид магния, 10 мМ (β-меркаптоэтанол и 0,005% раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА) (pH 7,5).

Последовательно инкубируют (18°C, 2 часа) в смеси из 4 нуклеотидов (0,01 мМ dATF, dCTF, dGTF; "Promega Madison WI", 0,001 мМ biotin-II-dUTP, "Sigma") и ДНК полимеразе-1 E coli (20 ед/мл; "Promega"), приготовленной на буфере А. Затем отмывают буфером А, а вслед за ним 0,5 М PBS (0,5 М NaCl на 0,1 М фосфатном буфере pH 7,5). Окончательно срезы инкубируют с конъюгатом пероксидазы (Vectastam Elite ABC Kit-Vector, Burliname, CA) разведенным 1:25 0,5 М PBS, в который введены 1% БСА (бычьего сывороточного альбумина) и 0,5% твин-20 и в течение 10 мин окрашивают 0,04% раствором ДАБ (3,3-диаминобензидин тетрагидрохлорид) на 0,05 М трис - буфере pH 7,5 и перекиси водорода в конечной концентрации 0,015% из 30% раствора. Промывают дистиллированной водой, обезвоживают и заключают в бальзам.

Метод обладает высокой чувствительностью даже для клеток, которые только начинают запрограммированную гибель. С помощью этого метода можно увидеть конденсацию хроматина, плотно прилегающего к ядерной оболочке. Титр антител IgG к вирусу простого герпеса определяли методом иммуноферментного анализа на спектрофотометре «Stat-Fax-2100» (USA). Подсчет ядер, находившихся в состоянии апоптоза, проводили на 100 концевых ворсинок плаценты в каждом отдельно взятом случае. В подсчет на 100 ворсинок отбиралось 2000 ядер.

Подсчет показал, что при титре антител IgG к вирусу простого герпеса 1:6400 число ядер, находящихся в состоянии апоптоза насчитывалось 0-1%, а при титре антител IgG к вирусу простого герпеса 1:12800 – 2,3%.

Метод защищен патентом №2370772, зарегистрированным в Государственном реестре изобретений РФ 20.10.2009 г. (авторы: М.Т.Луценко, И.А.Андриевская).

Метод компьютерной оценки динамики процесса апоптоза в ядрах синцитиотрофобласта ворсин плаценты у родильниц, перенесших вспышку герпес-вирусной инфекции

Целью настоящего исследования явилось изучение процесса развития апоптоза с помощью компьютерной программы Bio Vision, дающей возможность разделять ядра в состоянии апоптоза на участки (фазы) различной яркости, измеренные в пикселях. В качестве объекта изучения выбраны ядра синцитиотрофобласта ворсин плаценты, полученной у женщин, перенесших во время беременности вспышку герпес-вирусной инфекции, поскольку известно, что эта инфекция приводит к появлению в синцитиотрофобласте до 2% ядер в состоянии апоптоза.

Исследовали плаценту 50 женщин, перенесших вспышку герпес-вирусной инфекции в III триместре, с антителами к вирусу герпеса второго типа. Контролем служила плацента 20 женщин, которые за период беременности не переносили никаких заболеваний. Все женщины с начала беременности до поступления в родильное отделение находились под контролем (ежемесячное плановое углубленное обследование) в клинике. Возраст женщин колебался от 20 до 25 лет.

Материал получали из центральной части плаценты, фиксировали в 10% забуференном формалине в течение 12-24 ч. После заливки в парафин изготавливали серийные срезы толщиной 4-5 мкм с помощью стеклянных ножей LKB 2078 Histo Knife Maker (LKB-Produkter, Bromma, Швеция). Срезы помещали на стекла фирмы Shandon (США), которые подогревали слегка на термостойке при 30°C и

придавливали на стекле. С помощью Flammable Dako Pen NS2002 (Dako, Дания) окантовывали участок, помещая на него срез, который депарафинировали. Апоптоз исследовали ISEL-методом (In Situ End Labeling) с помощью реагентов фирмы «Oncor» (Франция). Метод основан на использовании экзогенного фермента – терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы (ТДТ), который может инкорпорировать меченые нуклеотиды в места разрывов цепи ДНК, вызванные эндонуклеазами, осуществляющими процесс апоптоза.

Морфологическую классификацию апоптоза проводили на парафиновых срезах по метке концов фрагментов ДНК *in situ*. Срезы после регидратации в дистиллированной воде в течение 30 мин инкубировали в 3% растворе перекиси водорода и отмывали 0,15 М фосфатно-солевым буфером (PBS) (0,15 М NaCl на 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,5). Затем срезы инкубировали в смеси 0,3 М NaCl и 30 мМ цитрата натрия (pH 7,0; 80°C; 20 мин) и отмывали 0,15 М PBS. После этого срезы инкубировали в растворе проназы (1 мг/мл на 0,15 М PBS; Calbiochem, США) при комнатной температуре в течение 30 мин.

Отмывали 0,15 М PBS и буфером А (50 мМ трис-гидрохлорид, 5 мМ хлорид магния, 10 мМ β-меркаптоэтанол и 0,005% раствор бычьего сывороточного альбумина, БСА, pH 7,5). Последовательно инкубировали (18°C; 2 ч) в смеси из 4 нуклеотидов: 0,01 мМ dATP, dCTP, dGTP (Promega, США), 0,001 мМ biotin-II-dUTP (Sigma, США) и ДНК-полимеразе-1 *E. coli* (20 ед/мл; Promega, США), приготовленной на буфере А. Затем отмывали буфером Л, а вслед за ним – 0,5 М PBS (0,5 М NaCl на 0,1 М фосфатном буфере pH 7,5). Окончательно срезы инкубировали с конъюгатом пероксидазы (Vectastam Elite ABC Kit-Vector, Burlingame, США), разведенным 1:25 0,5 М PBS, в который введены 1% БСА и 0,5% твин-20, и в течение 10 мин. окрашивали 0,04% раствором 3,3-диаминобензидин тетрагидрохлорида на 0,05 М трис-буфере, pH 7,5 и перекиси водорода в конечной концентрации 0,015%. Промывали дистиллированной водой и заключали. Изготовленные срезы анализировали под микроскопом «Opton» (Германия). Участки препарата, содержащие ядра с признаками апоптоза, фото-

графировали при общем увеличении микроскопа 400 на пленке Kodak-200 Color-Plus (США).

На пленку одновременно снимали после проведенной реакции препараты плаценты, полученной от женщин, перенесших герпес-вирусную инфекцию, и практически здоровых (контрольная группа). После проявления пленку сканировали с помощью сканера и вносили изображение в компьютер. Компьютер сопряжен с камерой Pixera – model PVC 100C (США), позволяющей работать с программой Bio Vision. В программе Bio Vision (version 2, West Medica GmbH, Австрия) выбранные кадры (плацента женщин контрольной группы и группы рожениц, перенесших ГВИ) калибровали по размерам (10 см × 300 пикселей/дюйм) и вводили в программу сканирования (Bio Vision). После этого производили калибровку по ранжированию объекта.

В настоящем исследовании были взяты в расчет следующие фазы плотности: 60→120→180→240 в пикселях, позволяющие определять участки различной плотности. Помимо того можно, используя программу Excel, произвести расчет относительного содержания вещества различной плотности в ядрах, подвергающихся апоптозу. Наконец, исследуемый материал можно представить в виде рисунка, на котором находящееся в состоянии апоптоза ядро в цветном изображении состоит из участков хроматина с различной плотностью конденсации. В плаценте у каждой роженицы (как перенесших герпесную инфекцию, так и в контрольной группе) изучали по 100 ворсин, отбирая 2000 ядер.

Исследования показали, что при ГВИ в III триместре (титр антител IgG к вирусу простого герпеса 1:12800) до 2-4% ядер синцитиотрофобласта ворсинок проявляют отчетливые признаки апоптоза (в контроле – 1-1,5%). Однако процесс вовлечения ядерного материала в апоптоз происходит не одномоментно, а с различной скоростью и интенсивностью конденсации хроматина. В некоторых ядрах этот процесс при обычной световой микроскопии практически не улавливается.

Используя современные методы биоинформатики, с помощью компьютерной программы Bio Vision можно проследить этапы раз-

вертывания процесса конденсации хроматина в ядрах, вступающих в апоптоз. В участке ворсины при использовании ISEL-метода в синцитиотрофобласте было обнаружено только 3 ядра, дающих отчетливую реакцию на апоптоз (рис. 17). При использовании компьютерной программы Bio Vision в этом участке были найдены еще 2 ядра (рис. 18 а, в, г), в которых происходят процессы конденсации хроматина, не улавливаемые при исследованиях методом световой микроскопии при об. 100, ок. 15. В данном случае была использована фаза в 30 пикселей.



Рис. 17. Ворсинка плаценты, обработанная по методу ISEL. В поле зрения видны только 3 ядра, дающих реакцию на апоптоз.

При построении гистограммы за единицу монохромного изображения взята фаза в 60 пикселей, которая отражает наиболее конденсированные участки хроматина. Если ядро А (рис. 18 а) полностью представлено фазой 60 пикселей, то на ядре Б₁ (рис. 18) можно проследить последовательно этапы вхождения ядра в апоптоз. Здесь виден удельный вес (в %) и плотность фаз конденсации ядерного материала (Б₁), после проведения иммуногистохимической реакции на апоптоз.

Почти половина материала (42,9%) этого ядра резко конденсирована. Это вполне соответствует данным литературы, указывающим, что начальные этапы апоптоза включают в себя конденсацию ДНК с молекулярной массой, кратной молекулярной массе ДНК в нуклеосомных частицах – 180-200 пар нуклеотидов. Остальные участки, по данным нашего исследования, некоторое время находятся в состоянии менее выраженной конденсации: 2-я фаза – 31%; 3-я фаза – 23,9% и, наконец, 4-я фаза – 22% (рис. 18). Этот процесс можно видеть на полихромном изображении этого ядра после компьютерной обработки в

диапазоне от 60 до 240 пикселей (рис. 19, Б₁, Б₂, Б₃, Б₄). Площадь, занимаемая каждой фазой, автоматически обрабатывается в программе Bio Vision, и можно продемонстрировать её графически (рис. 20 а, б).

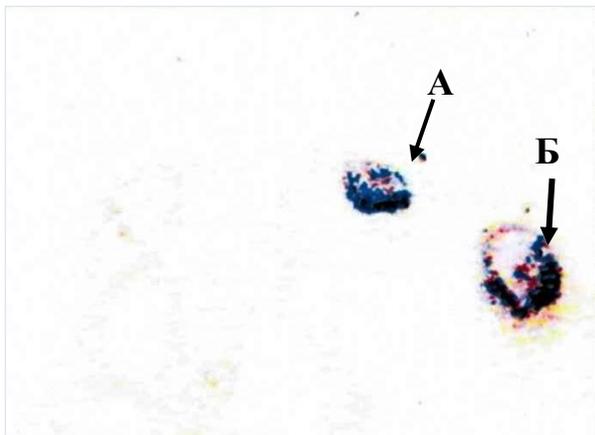


Рис. 18 Терминальная ворсина плаценты родильницы, перенесшей герпес-вирусную инфекцию. А, Б – реакция на апоптоз в ядрах ворсин. ISEL-метод. Об. 90, ок.10.

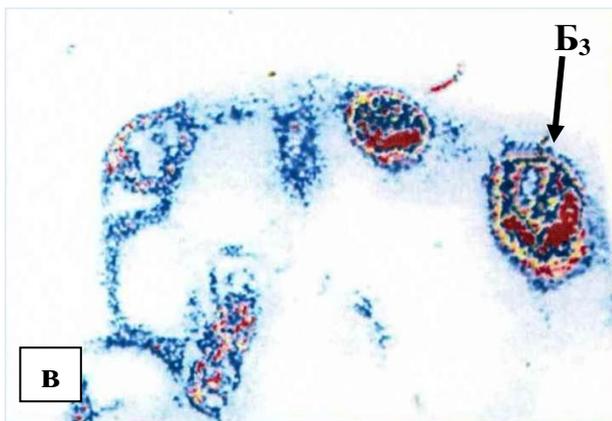
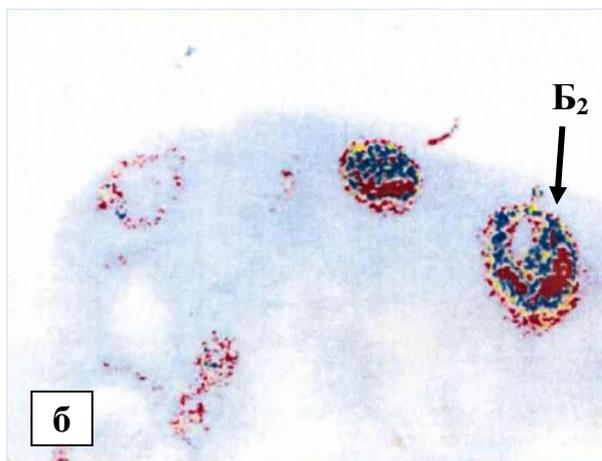
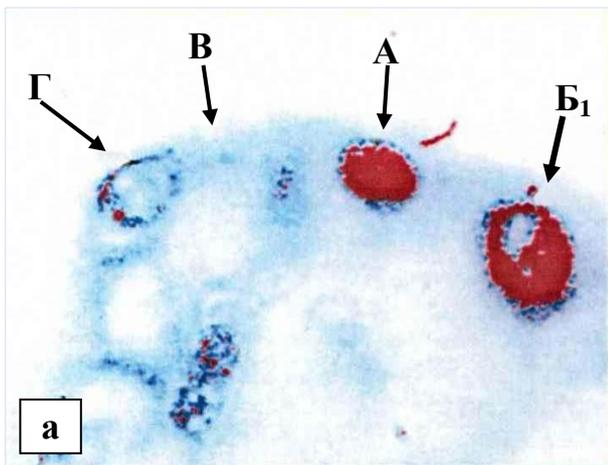


Рис. 19. Ядро синцитиотрофобласта терминальной ворсины плаценты родильницы, перенесшей ГВИ: а-г – ядра синцитиотрофобласта; Б₁ – в фазе I (60 пикселей); Б₂ – в фазе II (120 пикселей); Б₃ – в фазе III (180 пикселей); Б₄ – в фазе IV (240 пикселей). Компьютерная обработка проведена с помощью программы Bio Vision. Об. 90, ок. 10.

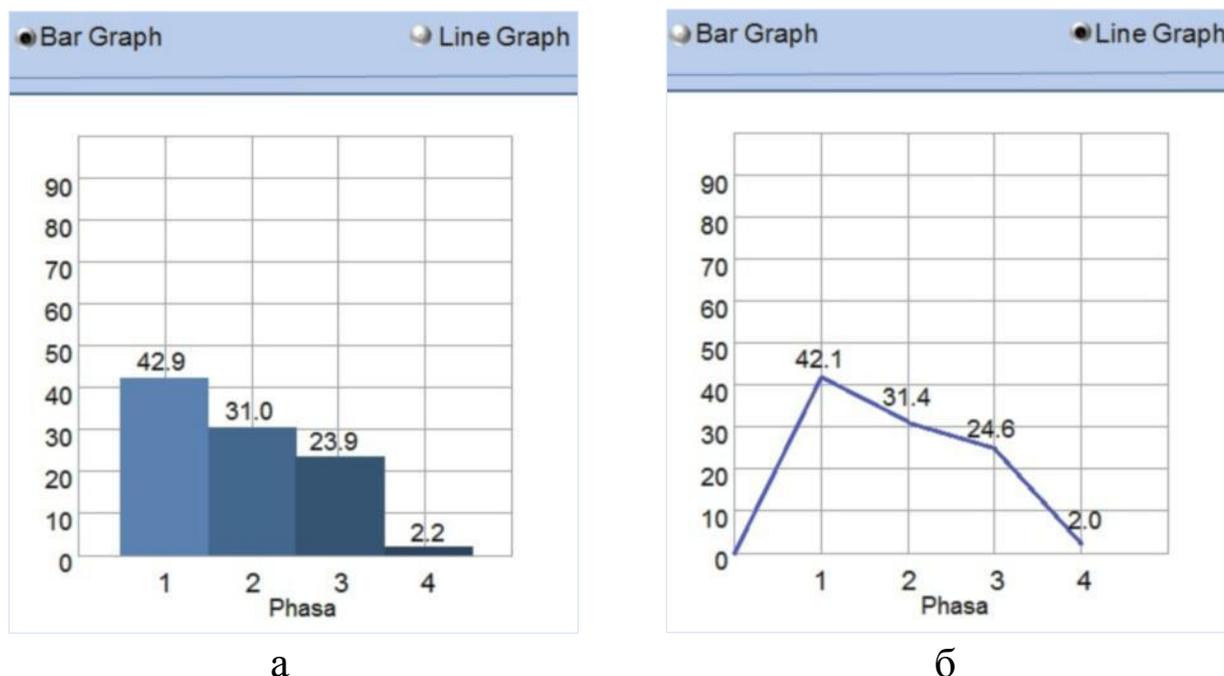


Рис. 20. Графическое (а) и линейное (б) отражение содержания фаз в ядре Б синцитиотрофобласта. По оси абсцисс – оттенки яркости (фазы); по оси ординат – плотность (в пикселях от 0 до 90).

Таким образом, с помощью современных методов биоинформатики можно проследить за морфологическими изменениями, протекающими в ядрах, вовлеченных в процесс апоптоза. Компьютерная программа Bio Vision позволяет после выполнения специфической для процесса апоптоза реакции ISEL подвергнуть выделению в ядре, находящемся на той или иной стадии апоптоза, фазы яркости, соответствующие плотности хроматина от 0 до 255 пикселей. В последующем эти показатели легко обрабатываются в программе Excel с выделением площади, занимаемой фазой, и расчетом удельного веса в процентах по отношению к другим фазам. Предложенный способ позволяет обнаружить начальные этапы уплотнения хроматина в ядрах при развитии апоптоза, что недоступно при исследовании объекта с помощью стандартной световой микроскопии.

Метод описан в статье: Луценко М.Т. Компьютерная оценка динамики процесса апоптоза в ядрах синцитиотрофобласта ворсин плаценты у родильниц, перенесших вспышку герпес-вирусной инфекции // Морфология. – 2008. – Т. 134, №6. – С. 79-82.

Метод диагностики вступления ядер синцитиотрофобласта ворсинок плаценты в апоптоз путем определения в гомогенате плаценты содержания цитохрома с у беременных, перенесших в третьем триместре герпес-вирусную инфекцию

Вирусная инфекция является агрессивным фактором для тканевого метаболизма и может привести к запуску в клетках патологически действующих механизмов, которые заканчиваются преждевременной гибелью их ядерного компонента – апоптозом. При высоком титре антител к вирусу простого герпеса (1:12800) и проникновении в синцитиотрофобласт беременной возбудителя инфекции, происходит повреждение митохондрий.

Повреждение митохондрий приводит к выбросу в цитоплазму синцитиотрофобласта большого количества цитохрома С, который запускает каскад каспазных реакций протеолитически действующих на ДНК ядер, что и заканчивается их преждевременной гибелью (апоптозом).

Исследуя одновременно степень агрессивности герпес-вирусной инфекции, электронно-микроскопическое исследование строения синцитиотрофобласта, а также содержание цитохрома С методом ИФА, мы разработали метод, позволяющий определять, что при высоком титре антител к вирусу простого герпеса во время беременности повреждаются митохондрии в синцитиотрофобласте, увеличивается содержание цитохрома С, что приводит к преждевременной гибели в нем ядерного материала.

Изобретение относится к области медицины и может быть использовано для оценки повреждающего действия герпес-вирусной инфекции на формирование апоптоза в ядрах симпласта ворсинок плаценты путем установления в гомогенате плаценты содержания цитохрома С при различных титрах антител к вирусу герпеса. В доступной литературе мы обнаружили высказывания, что повреждение наружной мембраны митохондрий приводит к нарушению энергетического процесса в межмембранном пространстве митохондрий, приводящее к появлению активных форм кислорода (АФК), ведущих к образованию

пор во внутренней мембране митохондрий и выбросу в цитозоль клетки цитохрома С. Цитохром С, накапливающийся в большом количестве в цитозоле, принимает участие в формировании апоптосом, инициирующих процесс цикла формирования каспаз от 8-9 до каспазы 3, являющейся причиной начала процесса апоптоза в ядрах.

Предлагаемый способ содержит следующие приемы.

1. Исследовались плаценты после родов у 20 беременных, перенесших обострение герпес-вирусной инфекции в третьем триместре с титром антител IgG к вирусу простого герпеса 1:6400 (герпесная инфекция средней тяжести), и у 20 беременных, перенесших вспышку герпесной инфекции в третьем триместре с титром антител IgG к вирусу простого герпеса 1:12800 (герпесная инфекция тяжелой формы).

Морфологическая классификация апоптоза проводилась на парафиновых срезах плаценты по метке, повреждающихся концов фрагментов ДНК *in situ* end-labeling (ISEL-метод). Срезы после дегидратации в дистиллированной воде в течение 30 минут инкубируют в 3% растворе перекиси водорода и отмывают 0,15 М забуференным солевым раствором (PBS) (0,15 М NaCl на 0,1 М фосфатном буфере pH 7,5). Затем срезы инкубируют в смеси 0,3 М NaCl 30 мМ цитрата натрия (pH 7,0; 80° С; 20 мин) и отмывают в 0,15 М PBS. После чего срезы инкубируют в растворе проназы при комнатной температуре в течение 30 мин (Calbiochem; 1 мг/мл на 0,15 М PBS). Отмывают в 0,15 М PBS и буфером А (50 мМ Трис-гидрохлорид, 5 мМ хлорид магния, 10 мМ β-меркаптоэтанол и 0,005% раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА), pH 7,5). Последовательно инкубируют (18°С, 2 ч) в смеси из 4 нуклеотидов (0,01 мМ dATF, dCTF, dGTF; «Promega Madison WI», 0,001 мМ biotin-II-dUTP, «Sigma») и ДНК полимеразе-1 *E. coli* (20 ед/мл; «Promega»), приготовленной на буфере А. Затем отмывают буфером А, а вслед за ним 0,5 М PBS (0,5 М NaCl на 0,1 М фосфатном буфере pH 7,5). Окончательно срезы инкубируют с конъюгатом пероксидазы (Vectastam Elite ABC Kit-Vector, Burlinam, CA), разведенным 1:25 0,5 М PBS, в который введены 1% БСА (бычьего сывороточного альбумина) и 0,5% твин-20, и в течение

10 мин окрашивают 0,04% раствором ДАБ (3,3-диаминобензидин тетрагидрохлорид) на 0,05 М трис-буфере рН 7,5 и перекиси водорода в конечной концентрации 0,015% на 30% раствора. Промывают дистиллированной водой, обезвоживают и заключают в бальзам.

Метод обладает высокой чувствительностью даже для ядер, которые только начинают запрограммированную гибель. С помощью этого метода можно увидеть конденсацию хроматина, плотно прилегающего к ядерной оболочке. Титр антител к вирусу герпеса определялся методом иммуноферментного анализа на спектрофотометре «Stat-Fax2100» (USA). Подсчет ядер, находившихся в состоянии апоптоза, проводился на 100 концевых ворсинках плаценты в каждом отдельно взятом случае. В подсчет на 100 ворсинок отбиралось 2000 ядер. Подсчет показал, что при легкой степени тяжести герпес-вирусной инфекции число ядер, находящихся в состоянии апоптоза, насчитывалось от $1,5 \pm 0,002\%$ (титр антител – 1:6400), а при тяжелой форме – $3,0 \pm 0,03\%$ (титр антител – 1:12800).

2. Для оценки содержания цитохрома С готовили гомогенат из тех же плацент. Поверхность плаценты, полученной в течение 10-15 минут после родов, отмывали большим количеством физиологического раствора (ФР). Плодовая часть плаценты (ворсинчатый хорион) срезалась скальпелем небольшими пластинками площадью до 2-3 см, причем толщина срезаемого слоя не превышала 1 мм. Кусочки ткани помещались в химические стаканы, содержащие 200 мл ФР, отмывались от клеток крови и перемешивались на магнитной мешалке в течение 15 минут. Для получения экстрактов, отмываемые кусочки плаценты слегка подсушивали на фильтровальной бумаге и взвешивали. Затем ткань растирали пестиком в фарфоровой ступке и гомогенизировали до однородной кремообразной массы. К полученному гомогенату добавляли ФР в объеме, равном изначальной массе ткани (на 1 г – 1 мл ФР). Взвесь помещали в пластиковые пробирки Falcon и подвергали замораживанию при -20°C в течение суток. Затем гомогенат размораживали и ультрацентрифугировали при 4000 об/мин при температуре $+4^{\circ}\text{C}$. Надосадочную жидкость разливали мелкими аликво-

тами и хранили при -20°C до проведения ИФА. Размноженный супернатант использовали для количественного определения цитохрома С иммуноферментным методом на ридере «Stat-Fax2100» (USA) с использованием наборов «Bender Medsystems» (Austria).

Исследования показали, что по мере нарастания титра антител IgG к вирусу простого герпеса в гомогенате плаценты нарастает содержание цитохрома С: при титре антител 1:6400 определяется $13,9 \pm 0,06$ пг/мл. При титре антител 1:12800 – $18,8 \pm 0,08$ пг/мл (контроль – $10,7 \pm 0,04$ пг/мл). При подсчете числа ядер симпласта ворсинок плаценты, находившихся в состоянии апоптоза, установлено, если количество цитохрома С в гомогенате определяется в пределах $13,9 \pm 0,06$ пг/мл, в симпласте содержится $1,5 \pm 0,002\%$ ядер в состоянии апоптоза. При увеличении содержания цитохрома С до $18,8 \pm 0,08$ пг/мл количество ядер в состоянии апоптоза увеличивается до $3,0 \pm 0,03\%$ (контроль – $0-1,0 \pm 0,002\%$).

Метод защищен патентом №2370768, зарегистрированным в Государственном реестре изобретений РФ 20.10.2009 г. (авторы: Луценко М.Т., Андриевская И.А.).

Метод определения активности белка Hsp-70 в синцитиотрофобласте при беременности, осложненной ГВИ

Белок теплового шока Hsp-70 является одним из важнейших составных элементов цитозоля клеточных образований организма животных. Белок теплового шока поддерживает конформационную устойчивость цитозоля, обеспечивая его функциональное благополучие при нормально функционирующих клетках. Нарушение содержания белка Hsp-70 или изменение его конформационной устойчивости возникает повышение активности протеолитических ферментов (каспазы) и преждевременная гибель ядер (апоптоз).

Белок теплового шока Hsp-70 принимает участие в процессах репарации и элиминации неправильно свернутых или денатурированных белков. Воздействие неблагоприятных факторов приводит к повышению экспрессии белков Hsp-70 и удерживает цитозоль от по-

вреждения, предотвращая агрегацию частично денатурированных белков. Белки теплового шока принимают участие в регуляции апоптоза.

Строение белков теплового шока Hsp-70 может изменяться при воздействии на клетку интерлейкина 1 α или TNF α . Однако в литературе отсутствуют данные влияния вирусных воздействий на структуру и содержание в цитоплазме белков теплового шока.

Целью исследования явилось изучение содержания белка теплового шока Hsp-70 в гомогенате плаценты при поражении организма беременной в третьем триместре вирусом простого герпеса в зависимости от титра антител.

Предлагаемый способ содержит следующие приемы:

Исследовали плаценты, полученные после родов от 20 женщин на сроке 38-40 недель. Контролем служили плаценты от 20 женщин, не болевших во время гестации.

Плацента отмывалась физраствором (ФР), слегка подсушилась на фильтровальной бумаге, взвешивались. Затем ее растирали и к полученному гомогенату добавляли ФР в объеме, равном изначальному весу ткани (на 1 г – 1 мл ФР). Гомогенат замораживали при -20 $^{\circ}$ C в течение суток. Затем его размораживали и центрифугировали при 4000 об/мин при температуре +4 $^{\circ}$ C. Надосадочную жидкость разливали мелкими аликвотами и хранили при -20 $^{\circ}$ C до проведения ИФА.

В гомогенате плаценты определяли Hsp-70, используя наборы Hsp-70 ELISA Kit (USA). Верификация ВПГ-1 проводилась по динамике титров антител IgG в периферической крови с помощью стандартных тест-систем фирмы ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск). Анализ проводили на микропланшетном ридере «Stat-Fax-2100» (USA). Статистическая обработка материала данных проводилась с использованием t-критерия Стьюдента.

Количество белка теплового шока Hsp-70 значительно снижалось по мере нарастания титра антител IgG к вирусу простого герпеса (табл. 17). Если в контроле количество Hsp-70 составило 56,1 \pm 2,6 нг/мл, то при обострении герпес-вирусной инфекции во время бере-

менности его содержание при титре антител 1:1600 снижалось до $34,7 \pm 1,9$ нг/мл ($p < 0,001$), при титре 1:6400 – до $30,4 \pm 2,4$ нг/мл ($p < 0,001$) и при титре антител 1:12800 количество его уменьшалось до $22,3 \pm 2,9$ нг/мл ($p < 0,001$).

Таблица 17

Содержание белка Hsp-70 в гомогенате плаценты рожениц, перенесших в третьем триместре герпес-вирусную инфекцию ($M \pm m$)

Титр антител к вирусу герпеса	Содержание в гомогенате плаценты белка Hsp-70 (в нг/мл)
1:1600	$34,7 \pm 1,9$; $p < 0,001$
1:6400	$30,4 \pm 2,4$; $p < 0,001$
1:12800	$22,3 \pm 2,9$; $p < 0,001$
Контроль	$56,1 \pm 2,6$

Примечание: p – достоверность по сравнению с контрольной группой.

Таким образом, обострение герпес-вирусной инфекции во время беременности приводит к резкому снижению в гомогенате плаценты белков теплового шока Hsp-70 по мере нарастания титра антител к вирусу герпеса.

Метод защищен патентом №2410697, зарегистрированным в Государственном реестре изобретений РФ 27.01.2011 г.

Метод определения микровязкости мембран эритроцитов путем определения олеиновой кислоты у беременных, перенесших в третьем триместре гестации обострение ГВИ

Олеиновая кислота рассматривается в настоящее время как сильный эндогенный антиоксидант с наиболее высокой константой скорости реакции. В связи с этим, при изменении содержания олеиновой кислоты в мембранах эритроцитов при наличии в организме вирусных воспалительных процессов, это может тяжело отразиться на устойчивости мембран эритроцитов, приводя в конечном итоге к повышению их микровязкости.

Прототипом избран способ выявления нарушения микровязкости мембран эритроцитов в крови у онкологических больных.

В известных работах предполагают, что микровязкость зависит от белков, включенных в мембрану эритроцитов, или как это следует из выводов И.А.Горошинской и соавт. (1999), конкретный фактор, влияющий на изменение микровязкости, вовсе не исследован. Авторы ссылаются на то, что это явление наступает при онкологическом состоянии пациента: рак желудка, мочевого пузыря, яичников, не исследовав причинного компонента, влияющего на микровязкость.

С нашей точки зрения вышеприведенные данные имеют следующие недостатки:

- микровязкость мембран эритроцитов зависит не только от белкового состава, но также и от липидов, которые в мембране образуют липид-белковые комплексы;
- нет сведений о детализации, какая из жирных кислот оказывает влияние на микровязкость мембран эритроцитов;
- нет сведений, влияет ли на этот процесс обострение в организме герпес-вирусной инфекции.

Измерение микровязкости мембран эритроцитов проводили методом латеральной диффузии гидрофобного флюоресцентного зонда пирена. Определение микровязкости основано на образовании эксимеров (активных димеров) пирена в липидном окружении. Флюоресценцию пирена измеряли спектрофлюорометрически на спектрофлюориметре «Hitachi» (Япония).

Для определения микровязкости липидного бислоя находили интенсивность флюоресценции или свечение пирена при длине волны возбуждения 334 нм, длина волны мономеров - 395 нм, длина волны эксимеров - 470 нм. Для определения микровязкости зоны липид-белковых контактов длина волны возбуждения - 286 нм, длина волны мономеров - 395 нм, длина волны эксимеров - 470 нм. Оценка микровязкости основывается на вычислении коэффициента эксимеризации пирена ($K_{\text{экс}}=F_{470}/F_{395}$), который равен отношению интенсивности флюоресценции эксимеров к интенсивности флюоресценции мономеров. Коэффициент эксимеризации находится в обратной зависимости от микровязкости и обозначается как $F_{\text{э}}/F_{\text{м}}$.

Одновременно с помощью хроматографа «Кристалл 2000м», ЗАО СКВ «Хроматэк» (Россия) определяли содержание жирных кислот - в нашем случае олеиновую кислоту в мембранах эритроцитов.

Липиды экстрагировали по методу Фолча, метилирование жирных кислот осуществляли по методу J.Carren.

Компьютерным методом определяли процентное содержание олеиновой кислоты у здоровых беременных и беременных, перенесших обострение герпес-вирусной инфекции (титр антител IgG к вирусу простого герпеса 1:12800) на третьем триместре гестации.

Титр антител к вирусу простого герпеса определяли иммуноферментным методом на спектрофотометре «Stat-Fax-2100», (USA).

При изучении изменения микровязкости мембран эритроцитов исследовали процентное содержание в мембранах эритроцитов олеиновой кислоты, которая как эндогенный антиоксидант в норме поддерживает текучесть мембранного бислоя. Однако, при обострении у беременных в третьем триместре герпес-вирусной инфекции процентное содержание олеиновой кислоты в мембранах эритроцитов, выявленных методом газовой хроматографии, значительно снижалось до $16,52 \pm 0,14\%$ (контроль – $19,86 \pm 0,21\%$; $p < 0,001$).

На этом фоне изменялась и микровязкость мембран эритроцитов. Коэффициент эксимеризации пирена, определяющий микровязкость составил в липидном бислое $0,60 \pm 0,005 F_{\text{Э}}/F_{\text{М}}$ (контроль – $0,82 \pm 0,003 F_{\text{Э}}/F_{\text{М}}$; $p < 0,001$), а в белок-липидном бислое – $0,79 \pm 0,04 F_{\text{Э}}/F_{\text{М}}$ (контроль – $1,0 \pm 0,004 F_{\text{Э}}/F_{\text{М}}$; $p < 0,001$).

Таким образом, влияние герпеса (титр антител к вирусу герпеса 1:12800 в третьем триместре гестации) приводит к снижению процентного содержания в мембранах эритроцитов олеиновой кислоты, служащей эндогенным антиоксидантом и повышающей микровязкость мембран эритроцитов. Снижение олеиновой кислоты как антиоксиданта в мембранах эритроцитов грозит их разрушением в периферической крови.

Предлагаемый способ оценки микровязкости мембран эритроцитов, включающий вычисление коэффициента эксимеризации пирена,

отличается тем, что у беременных, перенесших обострение герпес-вирусной инфекции в третьем триместре гестации, дополнительно определяют содержание в мембранах эритроцитов эндогенного антиоксиданта – олеиновой кислоты и определяют, что при титре антител к вирусу герпеса 1:12800 наблюдается снижение содержания олеиновой кислоты до $16,52 \pm 0,14\%$ (контроль – $19,86 \pm 0,21\%$; $p < 0,001$), что приводит к повышению микровязкости мембран эритроцитов и коэффициент эксимеризации пирена снижается до $0,60 \pm 0,005 F_{\text{Э}}/F_{\text{М}}$ (контроль – $0,82 \pm 0,003 F_{\text{Э}}/F_{\text{М}}$); а в белок-липидное бислое мембран до $0,79 \pm 0,004 F_{\text{Э}}/F_{\text{М}}$ (контроль – $1,0 \pm 0,004 F_{\text{Э}}/F_{\text{М}}$, $p < 0,001$), что грозит разрушением эритроцитов периферической крови.

Метод защищен патентом №2467334, зарегистрированным в Государственном реестре изобретений РФ 20.11.2012 г.

Метод определения угнетающего действия ГВИ на содержание олеиновой кислоты (эндогенный антиоксидант) в периферической крови беременных

Свободнорадикальное окисление в организме регулируется антиоксидантной системой. Антиоксидантами являются все вещества, которые предотвращают формирование эндогенных патогенов, препятствуют перекисному окислению липидов и снижают количество высокотоксичных продуктов. Основными антиоксидантами являются α -токоферол, витамин С, β -каротин

В последние годы возрос интерес к изучению олеиновой ненасыщенной жирной кислоты как основного эндогенного, биологического антиоксиданта. Уникальность физико-химических свойств олеиновой моноеновой жирной кислоты состоит в том, что активные формы кислорода (АФК) окисляют ее с наиболее высокой константой скорости реакции. По данным некоторых авторов (В.Н.Титов, 1973), АФК в первую очередь окисляют олеиновую кислоту, во вторую – арахидоновую, в третью – линолевую ненасыщенные жирные кислоты. Только после завершения окисления олеиновой кислоты, оставшийся окислитель реагирует с арахидоновой кислотой и образует ди-

еновые конъюгаты. Сопоставляя константы окисления, авторы отмечают, что действие «традиционных» антиоксидантов, захватчиков АФК, по сравнению с действием олеиновой жирной кислоты является незначительным.

Однако в работах В.Н.Титова и соавт. (2004) исследования проводились *in vitro* с добавлением в среду АФК, которые окисляли олеиновую кислоту, а результат исчислялся образованием малонового диальдегида во время процесса перекисного окисления липидов.

Настоящее исследование принципиально отличается следующим:

- исследование проводилось в сыворотке крови, то есть, показатели получены на материале *in vivo*;
- все процессы регистрировались в одном и том же заборе крови;
- иницилирующим компонентом являлся не искусственно введенный АФК, а активизированный антиген вируса герпеса во время обострения этой инфекции в период беременности;
- оценка участия олеиновой кислоты как эндогенного оксиданта регистрировалась в количественном измерении (в процентах) по мере ее убывания при нарастании титра антител к вирусу герпеса;
- измерения содержания олеиновой кислоты выполнялись не методом титрования (как это представлено в прототипе), а исчислением ее в процентах методом газовой хроматографии.

Цель предложенного метода – показать, как меняется содержание олеиновой кислоты в периферической крови беременных при обострении герпес-вирусной инфекции в зависимости от ее титра в третьем триместре гестации. Снижение содержания олеиновой кислоты, как эндогенного антиоксиданта грозит формированием у беременной фетоплацентарной недостаточности.

Предлагаемый способ содержит следующие приемы:

1. У 20 беременных с обострением герпес-вирусной инфекции в третьем триместре гестации и 20 беременных, не болевших на протяжении всего периода беременности, забирали из локтевой вены периферическую кровь, центрифугировали после стандартного добавления в пробирку гепарина.

2. Предварительно в пробе иммуноферментным методом определяли титр антител к вирусу герпеса на спектрофотометре «Stat-Fax-2100» (USA).

3. Из сыворотки периферической крови экстрагировали липиды по методу Фолча. Эритроциты подвергались высушиванию, заливались раствором Фолча и при комнатной температуре содержались 12 часов. После этого экстракт из эритроцитов фильтровали на вакуумном роторе. После центрифугирования к экстракту добавляли ацетон и осадок подвергали метилированию. Полученные метилированные эфиры анализировали на газовом хроматографе «Кристалл 2000М» (Россия) с пламенно-ионизационным детектором. В работе использовали капиллярную колонку CP 7420 (100×0,25 мм) Varian USA. Обсчет и идентификацию пиков выполняли с помощью программно-аппаратного комплекса «Хроматэк Аналитик» 2,5 по времени удерживания с использованием стандартов фирмы «Supelco» (USA). Количественный расчет хроматограмм проводили методом внутренней нормализации путем определения площадей пиков анализируемых компонентов и их доли (в относительных %) к общей сумме пиков метилированных продуктов жирных кислот по методу Фолча. Метилирование жирных кислот осуществляли по методу Carren.

Исследования показали, что при обострении в третьем триместре гестации герпес-вирусной инфекции отмечается снижение содержания олеиновой кислоты в периферической крови беременной. При титре антител IgG к вирусу простого герпеса 1:3200 содержание олеиновой кислоты снижается до $18,37 \pm 0,18\%$, при титре антител IgG к вирусу простого герпеса 1:6400 – $17,25 \pm 0,16\%$, а при титре 1:12800 процентное содержание олеиновой кислоты снижается до $16,52 \pm 0,14\%$ (контроль – $19,86 \pm 0,21$; $p < 0,001$). Полученные данные свидетельствуют, что обострение герпес-вирусной инфекции приводит к снижению содержания олеиновой кислоты в организме беременной.

Таким образом, способ определения содержания олеиновой кислоты (эндогенный антиоксидант) в периферической крови беремен-

ных, перенесших в третьем триместре обострение герпес-вирусной инфекции, включает определение методом газовой хроматографии снижения содержания олеиновой кислоты (эндогенного антиоксиданта) в периферической крови беременных при титре антител к вирусу герпеса 1:3200 до $18,37 \pm 0,18\%$; при титре антител к вирусу герпеса 1:6400 – до $17,25 \pm 0,16\%$, а при титре антител 1:12800 – до $16,52 \pm 0,14\%$ (контроль – $19,86 \pm 0,21\%$; $p < 0,001$), что влияет на снижение антиокислительного процесса у беременных, перенесших обострение герпес-вирусной инфекции и грозит формированием фетоплацентарной недостаточности.

Метод определения активности аргининдегидрогеназы на уровень гистамина в крови беременных, перенесших в третьем триместре гестации обострение герпес-вирусной инфекции с титром антител герпеса 1:12800

Аргининдегидрогеназа инициирует отделение от гепарин-аргининового комплекса большого количества гистамина. Гистамин в организме человека образуется во многих органах из гистидина под влиянием гистидиндекарбоксилазы (рис. 21). Это экзогенный гистамин.

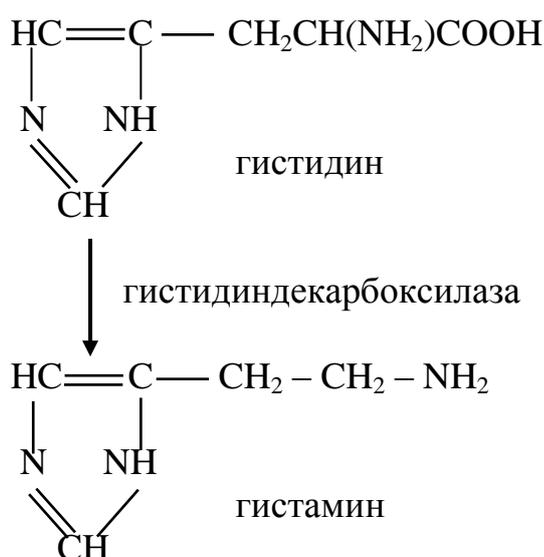


Рис. 21. Схема синтеза гистамина.

Однако большая часть гистамина синтезируется в клетках организма путем декарбоксилирования гистидина тканевой гистидиндекарбоксилазой. Почти все органы человека содержат гистамин. Гистамин в тканях находится в неактивном состоянии в виде лабильных комплексов с белками, гепарином и сернокислыми полисахаридами. В таком случае в клетке образуется белково-гепариновый ком-

плекс, в котором гепарин и белок, в основном аргинин, образуют прочную основу. Гистамин через аргинин связан в этом комплексе не достаточно прочно.

Таким образом, схема построения связи с белково-полисахаридным комплексом можно представить следующим образом: основа этого комплекса состоит из белково-гепариновой структуры, в которой гепарин и белок связаны между собой ионными связями (в силу взаимодействия аминокрупп аргинина с карбоксильными и сульфатными группами гепарина). С этим комплексом через аргинин и взаимодействует гистамин (рис. 22). При воздействии различных физиологических стимулов через ферментативные системы (аргининдегидрагеназа) связь гистамина с аргинином разрывается, и гистамин легко освобождается в клетке.

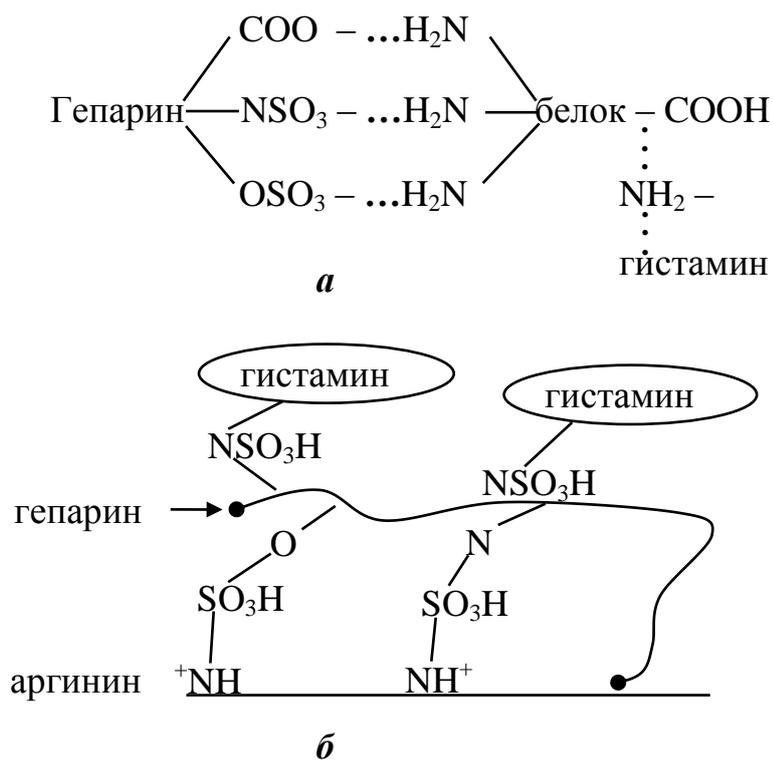


Рис. 22. Схема, отражающая этапы формирования белково-полисахаридного комплекса с гистамином.

Прототипом предложенного метода послужили исследования В.В.Виноградова и Н.Ф.Воробьевой (1973). Авторы исследования полагают, что в тучных клетках, богатых гистамином, последний тесно

связан с белковой основой, состоящей из плотно взаимодействующих аминокрупп аргинина с карбоксильными и сульфатными группами гепарина. Гистамин в этом комплексе легко удаляется при токсическом воздействии на структуру.

В приведенном прототипе не указан характер токсического влияния вирусов на прочность связи гистамина при активизации аргининдегидрогеназы. Не были разработаны гистохимические методы, позволяющие определять активность аргининдегидрогеназы. Не применялись компьютерные цитофотометрические методы оценки активности аргининдегидрогеназы.

Методика наших исследований принципиально отличается от методов, приведенных в ранее опубликованных работах, и позволяет гистохимически оценить происходящие процессы.

1. Объектом исследования является синцитиотрофобласт ворсинок плаценты.

2. Разработана методика выявления гистохимическим методом аргининдегидрогеназы.

3. Предложен новый компьютерный цитофотометрический метод оценки аргининдегидрогеназы.

4. Одновременно изучается активность аргининдегидрогеназы и уровень нарастания гистамина в крови беременной, который может становиться отрицательным фактором, действующим на фетоплацентарную систему.

В литературе нет описания, отражающего влияние токсических продуктов вирусной инфекции (в частности герпес-вирусной) на процесс инициации активности аргининдегидрогеназы, приводящей к повышенному освобождению гистамина в цитозоль клеток и в частности в синцитиотрофобласт ворсинок плаценты.

Предлагаемый способ содержит следующие приемы.

1. Исследовали синцитиотрофобласт ворсинок плаценты 25 беременных, перенесших в третьем триместре гестации обострение герпес-вирусной инфекции, на предмет выявления гистохимическим

методом активности аргининдегидрогеназы. Контролем служили плаценты от 10 беременных, не болевших на протяжении всего периода гестации. Исследование выполнялось в следующем порядке:

- а) 0,1 М фосфатный буфер pH 7,6;
- б) L- аргинин «Союз реактив» 25 мг/мл фосфатного буфера;
- в) Нитросиний тетразолий (фирма «ICN») 1 мг/мл фосфатного буфера (5 мМоль);
- г) НАДФ (фирма «Serva») 1 мг/мл фосфатного буфера (5 мМоль).

2. Инкубация проводилась при 37°C в течение 30 мин.

3. Срезы споласкивались в дистиллированной воде и заключались в глицерин-желатину.

4. Контрольные срезы инкубировались в среде, содержащей вместо аргинина L буферный фосфатный раствор pH 7,6.

Прототипом подобного типа реакций на выявление дегидрогеназ нами использована рекомендация, предложенная З.Лойдом (1962).

5. После изготовления срезы просматривались под электрофотомикроскопом «Opton» (Германия). Участки срезов, как контрольных, так и опытных препаратов, фотографировались на одну пленку «Kodak color» (USA). После проявления пленки сфотографированные участки вносились в компьютер и цитофотометрировались на установке «Mekos» (Регистрационное удостоверение МЗ РФ 29/10010198/1282-01).

6. Цитофотометрирование производилось при одном и том же зонде - 0,1 мм x 0,1 мм. В расчет было взято по 100 участков в каждом случае.

7. Титр антител к вирусу герпеса определяли иммуноферментным методом на спектрофотометре «Stat-Fax-2100» (USA).

8. Гистамин определялся по Л.Я. Прошиной на флюориметре «Hitachi» (Япония).

9. Исследования показали, что при обострении герпес-вирусной инфекции в третьем триместре гестации в синцитиотрофобласте вор-

синок плаценты при титре антител IgG к вирусу простого герпеса 1:12800 возрастает реакция на аргининдегидрогеназу до $48,7 \pm 2,9$ усл. ед. (в контроле – $15,2 \pm 1,8$ усл. ед., при $p < 0,001$) (рис. 23). При этом в периферической крови беременной увеличивается содержание гистамина до $1,44 \pm 0,09$ мкмоль/л (контроль – $0,612 \pm 0,01$ мкмоль/л, при $p < 0,001$).

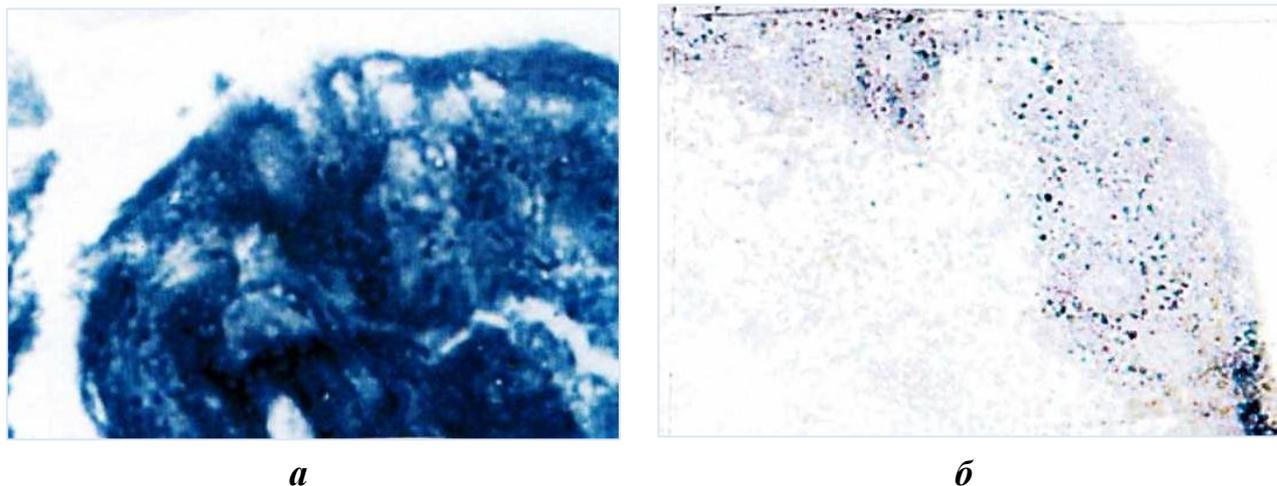


Рис. 23. Реакция на аргининдегидрогеназу в синцитиотрофобласте ворсинок плаценты на 10 неделе гестации: а – до и в течение беременности женщина не болела, реакция интенсивная; б – женщина перенесла обострение ГВИ с титром антител 1:6400, реакция резко снижена. Увеличение 10×40 .

Таким образом, с помощью вновь разработанного гистохимического метода выявления аргининдегидрогеназы установлено, что обострение герпес-вирусной инфекции в третьем триместре гестации приводит к активизации в синцитиотрофобласте аргининдегидрогеназы, что, в свою очередь, приводит к увеличению в организме беременной гистамина, избыточное количество которого отрицательно влияет на метаболические процессы и отрицательно действует на состояние фетоплацентарной системы.

Метод защищен патентом №2454670, зарегистрированным в Государственном реестре изобретений РФ 27.06.2012 г.

Метод оценки проницаемости мембраны синцитио-трофобласта ворсинок плаценты методом метахромазии у рожениц, перенесших в третьем триместре обострение герпес-вирусной инфекции

Метахромазию можно определить как окрашивание белков ткани, при котором спектр поглощения образующего комплекса ткань-краситель существенно отличается от спектра, как исходного красителя, так и прочих тканевых комплексов. В результате такого окрашивания появляются выраженные цветовые контрасты.

Метахромазия возникает вследствие образования полимеров красителей. Согласно мнению многих авторов, мономерная форма красителя имеет синий цвет, димеры и тримеры приобретают фиолетовый цвет, переходящий в полимерах в ярко-красный. Согласно данным Михаэлиса при поглощении красителей (азур I, толуидиновый синий), появляется три полосы поглощения красителей: полоса- α (мономерная - синего цвета), полоса- β (димерная - фиолетового цвета) и полоса- γ (полимерная - красного цвета). Возникновение метахроматической окраски связано с агрегацией молекул красителя под влиянием межмолекулярных сил субстрата. Наиболее интенсивное окрашивание бывает при расстоянии между отрицательными зарядами субстрата меньше 5\AA . Если расстояние между COOH^- группами составляет $10,3\text{-}10,5\text{\AA}$ субстрат не дает метахроматической окраски и только после сближения этих групп до 5\AA начинает появляться метахромазия.

Таким образом, отсутствие метахромазии можно объяснить тем, что в структуре отрицательно заряженные белки либо экранированы, либо находятся на расстоянии $10,0\text{\AA}$ и более.

В качестве прототипа мы использовали данные, изложенные в работе Б.Альберта и соавт. (1994). Авторы считают, что наружные мембраны животных клеток формируют в мембранах поры, которые могут быть малы и обеспечивают транспорт ионов. Ионные каналы обеспечивают перенос веществ, приблизительно 10^6 ионов в секунду. Поры, по мнению авторов, вероятно очень узкие и через них в норме

могут проходить только те вещества, которые имеют подходящий размер и заряд.

Однако авторы не приводят данных, которые бы освещали изменение диаметра этих пор, особенно при патологических ситуациях, возникающих в организме. Нет также и работ, свидетельствующих, что диаметр пор может расширяться под действием токсических инфекционных продуктов и это явление можно регистрировать путем метахроматического окрашивания белков, формирующих стенку этих пор. Нами установлено, что герпес-вирусная инфекция изменяет диаметр пор, и тогда метахроматической окраски при диаметре пор 10,3-10,5Å мы не наблюдаем.

В литературе описание применения метода метахроматического окрашивания мембран тканевых структур не имеется. Хотя этот метод может помочь оценить, находится ли мембрана в функционально благоприятных условиях, то есть ее проницаемость не нарушена, или при слабом окрашивании (γ -окрашивании в синий цвет) – ослаблено, следовательно, должны быть факторы, нарушающие расстояние между СООН- группами и мембрана становится проницаемой для крупнодисперсных молекул.

Особое значение это приобретает в оценке состояния мембран синцитиотрофобласта ворсинок плаценты, которая в норме не должна пропускать крупнодисперсные структуры.

В известной нам литературе аналогов не обнаружено, тем более, что метахромазия выявляется на фоне герпес-вирусной инфекции в плаценте – явление, которое в литературе не освещалось.

Предлагаемый способ содержит следующие приемы:

1. Исследовали плаценту 20 женщин, перенесших в третьем триместре герпес-вирусную инфекцию. Контролем служила плацента от 15 женщин, не болевших на всем протяжении гестации герпес-вирусной инфекцией.

2. Кусочки плаценты фиксировали в 10% спирт-формалине и заливали в парафин. Срезы, изготовленные на микротоме толщиной 3-4

мкм, обезпарафинировали и окрашивали в 0,01% растворе азура I при pH=4,0 в течение 30 мин при комнатной температуре. После окраски срезы споласкивали в дистиллированной воде и заключали в глицерин-желатину.

3. Срезы изучали под микроскопом «Opton» (Германия), фотографировали на пленку «Kodak» (USA). Изображение вносилось с пленки с помощью сканера в компьютер, и после изучения подвергалось цитофотометрированию.

4. Параллельно все операции проводились идентично и на срезах плаценты от здоровых рожениц.

5. Титр антител к вирусу герпеса определяли иммуноферментным методом на спектрофотометре «Stat-Fax-2100» (USA).

6. Цитофотометрическая обработка осуществлялась на цитофотометре «Mekos» (Москва).

В результате исследования метакроматического окрашивания мембран синцитиотрофобласта ворсинок плаценты у беременных, перенесших в третьем триместре обострение герпес-вирусной инфекции (титр антител IgG к вирусу простого герпеса 1:12800), установлено, что при окраске срезов плаценты 0,01% раствором азура I при pH=4,0, обнаруживается ослабление γ -метакроматической окраски мембран до $29,2 \pm 1,2$ усл. ед. (контроль – $40,8 \pm 1,8$ усл. ед.). Следовательно, обострение герпес-вирусной инфекции дезинтегрирует взаиморасположенные между COOH группами белков в мембране синцитиотрофобласта ворсинок плаценты и увеличивает расстояние между ними более чем на 5 \AA , что делает ее более проницаемой для крупнодисперсных структур, к числу которых можно отнести и возбудитель герпес-вирусной инфекции.

Таким образом, проницаемость мембраны синцитиотрофобласта ворсинок плаценты возможно определять методом метакромазии на срезах плаценты путем окрашивания в 0,01% растворе азура I при pH 4,0. Снижение γ -метакромазии в мембранах синцитиотрофобласта до $29,2 \pm 1,2$ усл. ед. свидетельствует о том, что расстояние между реакти-

рующими на окраску группами белковых молекул увеличивается более чем на 5Å, что делает мембрану синцитиотрофобласта более проницаемой для крупнодисперсных структур, в том числе и вирусов герпеса.

Метод защищен патентом №2463604, зарегистрированным в Государственном реестре изобретений РФ 10.10.2012 г.

Метод оценки индуцирующего действия герпес-вирусной инфекции на активность формирования дегидроэпиандростеронсульфата и эстрадиола

Формирование дегидроэпиандростеронсульфата (ДЭАС) начинается в плаценте из холестерина, который превращается в прегненолон и не может превращаться в 17-окисленные производные в связи с невозможностью образования в ней предшественников эстрогенов - андрогенов и андростендиола. Этот процесс решается при участии формирующихся органов плода: надпочечники и печень. Прегненолон, поступая в надпочечники плода, трансформируется в прегненолонсульфат, а затем в дегидроэпиандростеронсульфат и 16α-гидроксиэпиандростеронсульфат, из которых и формируется эстрадиол (Н.И.Цирельников, 1980).

Однако этот процесс у беременной, перенесшей обострение герпес-вирусной инфекции, резко подавляется в связи с тем, что возбудитель герпес-вирусной инфекции, проникая в кровь плода, повреждает структуру надпочечников и печень (Т.С.Быстрицкая, 2009; Т.С.Быстрицкая, М.Т.Луценко, 2010). В связи с этим задерживается формирование в плаценте эстриола, что грозит прерыванием беременности (И.А.Андриевская, 2004; Э.Р.Баграмян, 1984; Н.В.Кобозева, Ю.Л.Гуркин, 1986; М.Т.Луценко, 2008; О.Н.Савченко, Н.А.Степанова, 1979). Необходимо сформировать прогноз, позволяющий определить, при каком уровне недостаточности дегидроэпиандростеронсульфата и эстрадиола формируется угроза прерывания беременности.

Предложенный метод осуществляется следующим образом.

1. Исследовали периферическую кровь 20 беременных, перенесших в третьем триместре обострение герпес-вирусной инфекции, и 20 беременных, не болевших в течение всего периода гестации (контроль).

2. Верификацию ВПГ проводили по динамике титров антител IgG в периферической крови с помощью стандартных тест-систем фирмы ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск) с помощью спектрофотометра «Stat-Fax-2100» (USA). «Вектор-Бест» (Новосибирск) с помощью спектрофотометра «Stat-Fax-2100» (USA).

3. Содержание эстрадиола и дегидроэпиандростеронсульфата определяли с помощью иммуноферментного анализа с реагентами ЗАО «НВО Иммунотех» (Москва) - для эстрадиола и ЗАО «Алкор Био» (Санкт-Петербург) - для дегидроэпиандростеронсульфата. Исследования выполнялись на спектрофотометре «Stat-Fax-2100» (USA).

4. Статистическая обработка материала проводилась с использованием t-критерия Стьюдента.

Из всей совокупности плацентарных гормональных показателей были выбраны те, которые являются предшественниками синтеза эстриола – эстрадиол и дегидроэпиандростеронсульфат. Исследования показали, что при обострении в третьем триместре гестации у беременной герпес-вирусной инфекции (титр антител IgG к вирусу простого герпеса 1:12800) отмечается снижение в периферической крови содержания эстрадиола до $1493,0 \pm 29,0$ пмоль/л (контроль – $1780,0 \pm 31,5$ пмоль/л) и дегидроэпиандростеронсульфата – до $6,96 \pm 0,8$ нмоль/л (контроль – $8,98 \pm 0,3$ нмоль/л), что создает угрозу формирования фетоплацентарной недостаточности.

Таким образом, метод оценки индуцирующего действия герпес-вирусной инфекции на активность формирования дегидроэпиандростеронсульфата и эстрадиола – предшественников эстриола характеризуется тем, что при обострении у беременной в третьем триместре гестации герпес-вирусной инфекции с титром антител 1:12800 подав-

ляется содержание дегидроэпиандростеронсульфата до $6,96 \pm 0,8$ нмоль/л при контроле $8,98 \pm 0,3$ нмоль/л, а количество эстрадиола снижается до $1493,0 \pm 29,0$ пмоль/л при контроле $1780,0 \pm 31,5$ пмоль/л, что создает угрозу формирования фетоплацентарной недостаточности у беременных.

Метод защищен патентом №2452395, зарегистрированным в Государственном реестре изобретений РФ 10.06.2012 г.

Метод определения в плаценте белка p 53 при беременности, осложненной герпес-вирусной инфекцией

Метод заключается в прогнозировании устойчивости плаценты во время беременности к увеличивающемуся содержанию белка p53 при обострении в третьем триместре герпес-вирусной инфекции.

Программа смерти клеток запускается «суицидными» генами и реализуется через внутриклеточные белки p53 (Ю.И.Баранцев, 1997; Л.А.Плеханов, 2006). При введении гена p53 в трансформированные клетки происходит блокировка деления в фазе клеточного цикла G₁ и через некоторое время клетка подвергается апоптозу (M.S.Greenbatt, 1996; И.В.Князькин, В.Н.Цыган, 2007).

В случае поступления информации о повреждении ДНК ген p53 запускает реакцию, приводящую к остановке роста. Происходит быстрое накопление белка p53 с последующей индукцией регуляторных механизмов, блокирующих клеточный цикл. Ген p53 играет, таким образом, ключевую роль в процессе вступления в клеточный цикл с поврежденной и нерепаративной ДНК. Белки p53 активизируются при повреждении ДНК и являются транскрипционными факторами, регулирующими общую цепь генов, многие из которых участвуют в апоптозном пути (M.Levrevo et al., 2000; E. Balint, K.H.Vousden, 2001). Отмечено, что в культуральных условиях при проникновении цитомегаловируса в фибробласты человека p53 увеличивается в количестве в 10-20 раз уже через 6 часов (P.Maganda et al., 1994; E.Speir et al., 1994).

В отличие от описанных прототипов, где приводятся в основном факты, полученные в экспериментальных условиях (влияние цитомегаловируса на фибробласты человека в условиях культуры) или при онкологических процессах, наши исследования касаются влияния вируса простого герпеса (G₂) в прижизненных условиях и во время беременности, раскрывая изменение синтеза белка p53 в плаценте при обострении у беременной герпес-вирусной инфекции.

Нами исследовались плаценты, взятые после родов у 20 женщин, перенесших в третьем триместре вспышку герпес-вирусной инфекции, и у 20 женщин, не болевших в течение всего периода гестации (контроль).

Для оценки содержания белка p53 в плаценте готовили гомогенат плаценты, взятой через 10-15 мин после родов. Для этого плацента отмывалась физраствором. Кусочки плаценты помещались для просушивания на фильтровальную бумагу, взвешивались. Затем их растирали в ступке и к полученному гомогенату добавляли физраствор в объеме, равном изначальному весу ткани (на 1 г – 1 мл физраствора). Затем его размораживали и центрифугировали со скоростью 4000 об/мин при температуре +4°C. Надосадочную жидкость разливали мелкими аликвотами и хранили при -20°C до проведения дальнейшего анализа. В размороженном супернатанте на ридере «Stat-Fax-2100» (USA) с помощью набора «Bender Med Systems» (Austria) определяли содержание белка p53. Титр антител к вирусу простого герпеса (1:1600; 1:6400; 1:12800) определяли на ридере «Stat-Fax-2100» (USA).

Исследования показали, что содержание белка p53 в гомогенате плаценты у беременных, перенесших герпес-вирусную инфекцию, значительно увеличивалось по мере нарастания агрессивности инфекции. Содержание белка p53 в гомогенате плаценты при титре антител IgG к вирусу простого герпеса 1:1600 увеличивается до 0,94±0,12 Е/мл; при титре антител IgG к вирусу простого герпеса 1:6400 – до 4,04±0,30 Е/мл; при титре антител IgG к вирусу простого герпеса 1:12800 – до 4,52±0,16 Е/мл (контроль – 0,74±0,03 Е/мл).

Полученные данные позволяют считать, что обострение герпес-вирусной инфекции во время беременности способствует нарастанию в плаценте синтеза белка p53, что становится угрозой повреждения морфофункциональной целостности синцитиотрофобласта плаценты.

Таким образом, метод оценки повреждающего действия белка p53 на плаценту при обострении герпес-вирусной инфекции во время беременности, включает приготовление гомогената плаценты, определение методом ИФА содержания белка p53 и титра антител IgG к вирусу простого герпеса, и при титре антител 1:12800 и содержании белка p53 $4,52 \pm 0,03$ Е/мл судят об увеличении риска повреждений морфофункционального состояния синцитиотрофобласта.

Метод защищен патентом №2390781, зарегистрированным в Государственном реестре изобретения РФ 27.05.2010 г.

Метод определения нитросоединений в плаценте беременной при герпес-вирусной инфекции

Известно, что вирусные и бактериальные эндотоксины усиливают синтез NO_2 и, соответственно, секрецию NO. Выделяемый NO быстро проникает в клетки, где может ингибировать жизненно важные группы ферментов: Н-электронтранспортирующие, ферменты цикла Кребса и синтеза ДНК. В этих условиях энергопродукция и деление клеток становятся невозможными, что ведет к их преждевременной гибели.

Оксид азота, накапливаясь в клетке в большом количестве, может вызвать повреждение ДНК. Таким образом, нитросоединения вызывают цитотоксический эффект при эндотоксическом шоке, инфекционных повреждениях. Не менее важным оказывается вопрос, почему такие простые молекулы как NO_2 обладают широким спектром токсического действия.

Установлено, что NO_2 может превращаться в NO. Свободнорадикальные продукты NO и NO_2 обладают способностью повреждать

белки и ненасыщенные жирные кислоты, уменьшать активность большинства ферментных систем, нарушать целостность клеточных и субклеточных структур, разобщать окислительное фосфорилирование, ингибировать транспорт электронов по дыхательной цепи митохондрий, снижать уровень АТФ в крови и тканях (Я.И.Ажипа и соавт., 1990; Н.В.Волкова, 1980; В.П.Реутов, 1988; В.П.Реутов, Л.Н.Каюшин, 1994; В.П.Реутов и соавт., 2007; И.С.Северина, 1995; С.Ј.Punjabі et at., 1995). Эти же авторы доказывают, что NO_2 в организме становится базой для формирования NO . Поэтому следует ожидать, что при нарастании содержания в ткани NO_2 усиливается выработка NO и появляется опасность усиления токсического действия NO на эти ткани.

В отличие от описанных прототипов, в настоящем исследовании подтверждается гистохимически, что при герпес-вирусной инфекции, обостряющейся при беременности, резко нарастает содержание нитросоединений (NO_2) в плаценте.

Исследовались плаценты после родов у 20 женщин, перенесших в третьем триместре вспышку герпес-вирусной инфекции, и 20 женщин, не болевших в течение всего периода гестации (контроль). Для оценки содержания NO_2 в плаценте готовили гомогенат плаценты, взятой через 10-15 мин после родов. Плацента отмывалась физраствором. Кусочки плаценты помещались для просушивания на фильтровальную бумагу взвешивались. Затем их растирали в ступке и к полученному гомогенату добавляли физраствор в объеме, равном изначальному весу ткани (на 1 г – 1 мл физраствора). Затем его размораживали и центрифугировали при 4000 об/мин при температуре $+4^\circ\text{C}$. Надосадочную жидкость разливали мелкими аликвотами и хранили при -20°C до проведения последующего анализа.

После размораживания в супернатанте определяли содержание NO_2 на ридере «Stat-Fax-2100» (USA) с использованием набора «Nitric Oxide Assay Kit» (USA). Титр антител IgG к вирусу простого герпеса (1: 1600; 1:6400; 1:12800) определяли на ридере «Stat-Fax-2100»

(USA) с помощью стандартных наборов ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск).

Полученные данные показали, что содержание NO_2 в гомогенате плаценты у женщин, перенесших в третьем триместре герпес-вирусную инфекцию, значительно нарастает по мере агрессивности инфекции. Содержание NO_2 в гомогенате плаценты при титре антител IgG к вирусу простого герпеса 1:1600 увеличивается до $38,8 \pm 1,1$ мкмоль/л; при титре 1:6400 – до $92,1 \pm 1,2$ мкмоль/л, а при титре 1:12800 – до $105,7 \pm 1,5$ мкмоль/л (контроль - $25,6 \pm 0,1$ мкмоль/л).

Таким образом, предложен метод оценки содержания нитросоединений в плаценте у беременных при обострении герпес-вирусной инфекции, характеризующийся тем, что иммуноферментным методом у беременных в крови определяют титр антител антител IgG к вирусу простого герпеса и согласно агрессивности инфекции оценивают уровень содержания NO_2^- в плаценте, а, именно, при титре 1:1600 содержание NO_2^- увеличивается до $38,8 \pm 1,1$ мкмоль/л, при титре 1:6400 – до $92,1 \pm 1,2$ мкмоль/л, а при титре 1:12800 – до $105,7 \pm 1,5$ мкмоль/л.

Метод защищен патентом №2405156, зарегистрированным в Государственном реестре изобретений РФ 26.05.2009 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итоги исследовательской работы по изучению закономерностей нарушения дыхательной функции плаценты при беременности, осложненной герпес-вирусной инфекцией, можно сделать следующие выводы.

1. Герпес-вирусная инфекция – опасное осложнение течения беременности на всех этапах гестации. Особенно опасны обострения этой инфекции в первой половине I триместра и в III триместре гестации. В первые недели беременности, на 7-10 неделях гестации, вирусный процесс подавляет синтез плацентарных гормонов, снижая формирование эстриолов, и на фоне подавления иммунозащитных реакций препятствует нормальному контакту зародыша с поверхностью синцитиотрофобласта. Ввиду недостаточного образования эмбриотрофа на первых этапах имплантации формируется синдром «замершей беременности».

Причиной столь тяжелого осложнения является снижение активности синтеза холестерина, так как замедляются процессы образования в хорионе мевалоновой кислоты, сквалена и дегидрохолестерола – основных предшественников холестерина, идущего на построение стероидных гормонов.

2. Наряду с нарушением синтеза холестерина и образования плацентарных гормонов у беременной отмечается нарушение липидного обмена. Вместе с общим снижением содержания липидов к концу беременности отмечаются тяжелые нарушения липидного обмена в мембранах эритроцитов и синцитиотрофобласте ворсинок плаценты.

Отмечается резкое повышение микровязкости мембран эритроцитов в периферической крови беременных. Это приводит к нарушению устойчивости мембран, что подтверждается снижением процентного содержания дискоцитов (70-75%) и увеличением количества эхиноцитов (3-5%), мишеневидных и дегенеративных форм (10-12%).

3. При исследовании газотранспортной функции периферической крови беременных, перенесших в период гестации обострение ГВИ, отмечается развитие метаболического ацидоза, что приводит к

изменению газового состава крови: снижению pO_2 и степени сатурации гемоглобина кислородом, развитию гипоксии. Нарушается синтез гемоглобина в эритроцитах периферической крови беременных в сторону образования патологически нестойких его форм: снижается образование оксигемоглобина и увеличивается содержание метгемоглобина. Нарушается содержание 2,3-ДФГ в сторону его повышения, что приводит к снижению рН и pCO_2 . В эритроцитах снижается содержание АТФ, что отражается на скорости гликолитических процессов, приводящих к накоплению неорганического фосфора. Отмечается подавление активности основных ферментов пентозофосфатного цикла эритроцитов: глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и НАДФН₂, которые, в свою очередь, решают судьбу активности глутатионредуктазы в восстановлении глутатиона. Подавляется активность ферментов антиокислительного цикла, представленных супероксиддисмутазой и глутатионпероксидазой. Это способствует снижению метаболической активности антиокислительных процессов.

4. Нарушения газотранспортной и иммунозащитной функций периферической крови беременных, перенесших обострение ГВИ, отрицательно влияют на морфофункциональное состояние фетоплацентарного комплекса ворсинок плаценты. В периферической крови беременных отмечается повышенное содержание серотонина и TNF_{α} , что приводит к инициации мембранодестабилизирующих процессов в синцитиотрофобласте. Свободнорадикальные продукты (гидроперекиси) повышают активность мембраноассоциированной NO-синтазы, способствуя выбросу больших количеств цитотоксического оксида азота (NO), разрушающе действующего на фетоплацентарный комплекс. NO и перекисное окисление, сопряженно взаимодействуя друг с другом, приводят к образованию токсического продукта $ONOO^-$, который запускает дополнительные патологические процессы повреждения мембран фетоплацентарных клеток.

В наружной мембране синцитиотрофобласта при высокой агрессивности герпес-вирусной инфекции резко усиливается реакция на перекиси жирных кислот. Мембрана становится легко доступной для

проникновения во внутрь синцитиотрофобласта вирусов герпеса, что приводит к каскаду патологических процессов: разрушаются митохондрии, выделяется в цитозоль большое количество цитохрома С, подавляется активность белка Bcl-2 и, наоборот, усиливается реакция агрессивно влияющего на ДНК ядер синцитиотрофобласта белка p53. Повышается активность каспазы-3, что в конечном счете приводит к повышению до 5% ядер синцитиотрофобласта в состоянии апоптоза.

Нарушения наружной мембраны синцитиотрофобласта ворсинок плаценты при обострении ГВИ в III триместре гестации создают условия проникновения через внутреннюю мембрану фетоплацентарного комплекса вируса герпеса, повреждения эритроцитов плода и нарушения насыщения кислородом гемоглобина эритроцитов плода.

5. Герпес-вирусная инфекция высокой агрессивности (титр антител 1:12800) повреждает фетоплацентарный барьер и приводит к нарушению дыхательной функции плода. В пуповинной крови новорожденных от матерей, перенесших ГВИ на поздних сроках гестации, отмечается снижение в эритроцитах активности глутатионпероксидазы и супероксиддисмутазы, формирование повышенной окисляемости фетального гемоглобина и пероксидация клеточных структур. Это приводит к понижению в крови новорожденного жизнеспособности эритроцитов и увеличению содержания их дегенеративных форм.

В эритроцитах плода увеличивается содержание 2,3-ДФГ, что препятствует насыщению гемоглобина кислородом. Доказательством этого является уменьшение в крови пуповины при высокой агрессивности ГВИ степени сатурации гемоглобина кислородом (O_2Sat) до $27,30 \pm 0,70\%$ (контроль – $42,70 \pm 1,21\%$) и уровня оксигемоглобина до $88,50 \pm 0,34\%$ (контроль – $93,00 \pm 0,51$).

Таким образом, обострение герпес-вирусной инфекции в III триместре беременности приводит к грубым морфофункциональным изменениям в фетоплацентарном барьере ворсинок плаценты и создает условия для нарушений структуры эритроцитов и процессов насыщения их гемоглобина кислородом, т.е. достоверно нарушается дыхательная функция плаценты.

ЛИТЕРАТУРНЫЕ ИСТОЧНИКИ

1. *Ажипа Я.И., Реутов В.П., Каюшин Л.П.* Экологические и медико-биологические аспекты проблемы загрязнения окружающей среды нитратами и нитритами // Физиология человека. 1990. № 16 (3). С. 131-135.
2. 2,3-дифосфоглицерат в эритроцитах и гемоглобин F у новорожденных детей с перинатальными поражениями ЦНС / В.В.Алатырцев, Ю.А.Юрков, Л.Г.Афоница [и др.] // Вопросы охраны материнства и детства. 1987. № 1. С. 31-35.
3. *Андриевская И.А.* Гормональные и микробицидные изменения у беременных с герпес-вирусной инфекцией // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2004. Вып. 15. С. 41-45.
4. *Андриевская И.А.* Оценка дыхательной активности крови у матерей и новорожденных в условиях герпес-вирусной инфекции // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2007. Вып. 24. С. 63-66.
5. *Андриевская И.А.* Состояние свободнорадикальных процессов у беременных с различной степенью выраженности герпес-вирусной инфекции // Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов: Материалы III Всерос. науч.-практ. конф. (Новосибирск, 7-9 ноября 2007 г.). Сибирский консилиум. 2007. №7 (62). С. 23.
6. *Андриевская И.А., Ишутина Н.А.* Основные аспекты формирования железодефицитного эритропоэза у новорожденных с герпес-вирусной инфекцией // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2008. Вып. 28. С. 22-24.
7. *Андриевская И.А.* Характер окислительно-восстановительных процессов в эритроне рожениц и новорожденных при герпес-вирусной инфекции // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2008. Вып. 28. С. 33-35.
8. *Андриевская И.А.* Характер дыхательной активности крови у беременных с герпес-вирусной инфекцией // Фундаментальные аспекты оценки фетоплацентарной недостаточности при вирусных заболеваниях во время беременности. Благовещенск: Изд-во АмГУ, 2008. С. 54-72.
9. *Андриевская И.А.* Дыхательная функция крови у беременных с герпес-вирусной инфекцией // Бюллетень СО РАМН. 2008. №.3 (131). С. 53-62.
10. *Андриевская И.А.* Состояние процессов гемоглобинообразования в фетальной крови новорожденных при герпес-вирусной инфекции // VI Сибирский физиологический съезд: тез. докладов (Барнаул, 25-27 июня 2008 г.). Барнаул: Принтэкспресс, 2008. Т.1. С. 110.

-
11. Андреевская И.А., Ишутина Н.А. Диагностика степени повреждаемости мембран эритроцитов у женщин, перенесших во время беременности обострение герпес-вирусной инфекции // Информатика и системы управления. 2008. №2 (16). С. 111-112.
 12. Андреевская И.А. Кислотоустойчивость мембран эритроцитов у рожениц с тяжелым течением герпес-вирусной инфекции во время беременности // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2009. Вып. 31. С. 58-60.
 13. Андреевская И.А., Болелова СМ. Особенности кислородного метаболизма у рожениц, перенесших во время беременности герпес-вирусную инфекцию // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2009. Вып. 31. С. 62-64.
 14. Андреевская И.А., Луценко М.Т. Диагностика резистентности мембран эритроцитов к окислительному стрессу у беременных с герпесной патологией // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2009. Вып. 33. С. 21-24.
 15. Андреевская И.А. Показатели эритропоэтической функции у рожениц при поражении вирусом герпеса // Якутский медицинский журнал. 2009. №3 (27). С. 15-16.
 16. Аряев Н.Л. Клинико-патогенетическое значение изменения структуры и функции биомембран при заболеваниях легких у детей: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М., 1984. 32 с.
 17. Афонина Л.Г., Зукалова Х.Р., Бакова В.В. Особенности процесса перекисного окисления липидов в эритроцитах новорожденных при нефропатии у матерей // Вопросы охраны материнства и детства. 1989. №6. С. 36-40.
 18. Ашкинази И.Я. Разрушение эритроцитов // Физиология системы крови. Физиология эритропоэза. Сер. «Руководство по физиологии». Л.: Наука, 1979. С. 274-319.
 19. Бородин А.Б. Клиническое значение нарушения функции мембран эритроцитов при бронхолегочных заболеваниях детей: автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 1989. 25 с.
 20. Бородюк Н.Р. Адаптация и гуморальная регуляция. М.: Медика. 2003. 152с.
 21. Бурмистров С.Щ., Дубинина Е.Е., Арутюнян Е.В. Перекисное окисление липидов, белков и активность антиоксидантной системы сыворотки крови новорожденных и взрослых // Акушерство и гинекология. 1997. №6. С. 36-40.

-
22. *Бычкова А.Б., Радзинский В.Е.* Интранатальное состояние плода с задержкой внутриутробного развития // Трудный пациент. 2006. №3. С. 32-40.
 23. *Вальков А.Ю., Ходасевич Л.С.* Медиаторы воспаления в патогенезе инфекционно-токсического шока менингококковой этиологии // Архив патологии. 2000. Т. 62, №2. С. 53-57.
 24. *Волкова Н.В.* Влияние нитритов и нитратов натрия на синтез ДНК, митотическую активность и ядерно-цитоплазматические отношения клеток печени крыс и их потомства // Гигиеническое нормирование факторов экологической среды человека: тр. Ленинградского сан.-гигиен. ин-та. Л., 1980. С. 130-138.
 25. *Девойно Л.В., Ильюченко Р.Ю.* Моноаминэргические системы в регуляции иммунных реакций. Новосибирск, 1983. 156 с.
 26. *Доброхотова Ю.Э., Озерова Р.И., Мандрыкина Ж.А., Рора Л.С.* Некоторые аспекты этиологии и патогенеза эмбриональных потерь в I триместре гестации // Рос. вестник акушера-гинеколога. 2008. № 5. С.15-18.
 27. Свободнорадикальное окисление у доношенных новорожденных детей с различной патологией / И.И.Евсюкова, Т.В.Савельева, Л.В.Аратюнян [и др.] // Педиатрия. 1996. №1. С. 13-16.
 28. Состояние перекисного окисления липидов и антиокислительной системы у новорожденных / Л.В.Забродина, О.А.Серебренникова, Е.Б.Гапонова [и др.] // Педиатрия. 1992. №2. С. 34-37.
 29. *Иржак Л.И.* Газотранспортная функция эритроцитов в онтогенезе // Физиология системы крови. Физиология эритропоэза. Сер. «Руководство по физиологии». Л.: Наука, 1979. С. 233-235.
 30. *Квиткина И.Г., Веревкина Е.В., Быстрицкая Т.С., Андриевская И.А.* Значение газотранспортной функции эритроцитов в патогенезе хронической плацентарной недостаточности // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2009. Вып. 31. С. 50-53.
 31. Свободнорадикальное окисление и механизмы клеточной адаптации у новорожденных / Ф.Х.Камилов, Э.Н.Ахмадеева, А.Г.Крюкова [и др.] // Здравоохранение Башкортостана. 1999. №3. С. 94-98.
 32. *Коржевский Д.Э., Отеллин В.А., Старорусская А.Н., Павлова Н.Г.* Локализация антиапоптозного белка BCL-2 в плаценте человека // Морфология. 2007. Т. 132, №6. С. 75-76.
 33. *Курашвили Л.В., Васильков В.Г.* Липидный обмен при неосложненных состояниях. Пенза, 2003. 198 с.

-
34. *Леонова В.Г.* Анализ эритроцитарных популяций в онтогенезе человека. Новосибирск: Наука, 1987. 241 с.
 35. *Луценко М.Т., Андриевская И.А.* Способ прогнозирования устойчивости мембран эритроцитов при обострении герпес-вирусной инфекции у беременных // Информатика и системы управления. 2009. №1 (19). С. 27-30.
 36. *Луценко М.Т., Андриевская И.А.* Способ диагностики резистентности мембран эритроцитов к окислительному стрессу у беременных с герпесной патологией: пособие для врачей. Благовещенск, 2009. 12 с.
 37. *Луценко М.Т., Андриевская И.А.* Дифференциальная диагностика устойчивости мембран эритроцитов периферической крови у беременных с герпес-вирусной инфекцией // Информатика и системы управления. 2009. № 4. С.71-74.
 38. *Луценко М.Т., Андриевская И.А.* Способ прогнозирования устойчивости мембран эритроцитов периферической крови при обострении герпес-вирусной инфекции у беременных: пат. 2344423 РФ, №2007118009/15; заявл. 14.05.2007; опубл. 20.01.2009, Бюл. №2.
 39. *Луценко М.Т., Андриевская И.А.* Способ диагностики устойчивости мембран эритроцитов в периферической крови беременных при герпес-вирусной инфекции: пат. 2367953 РФ, №2008115783; заявл. 21.04.2008; опубл. 20.09.2009, Бюл. №26.
 40. *Луценко М.Т., Андриевская И.А.* Способ определения уплотненных белково-липидных участков в мембранах эритроцитов различной степени зрелости с помощью компьютерной программы Bio Vision: пат. 2390020 РФ, №2008144153 от 06.11.2008; опубл. 20.05.2010, Бюл. №14.
 41. *Луценко М.Т., Андриевская И.А.* Способ прогнозирования устойчивости мембран эритроцитов периферической крови при обострении герпес-вирусной инфекции у беременных: пат. 2409321 РФ, №2009108783; заявлено 10.03.2009; опубл. 20.01.2011, Бюл. №2.
 42. *Луценко М.Т., Андриевская И.А.* Способ определения оксигенации гемоглобина эритроцитов пуповинной крови новорожденных, родившихся от матерей, перенесших в третьем триместре герпес-вирусную инфекцию: пат. 2415428 РФ, №2009131246; заявлено 17.08.2009; опубл. 27.03.2011, Бюл. №9.
 43. *Луценко М.Т., Андриевская И.А.* Способ прогнозирования развития гипоксии у беременных в третьем триместре гестации, перенесших вспышку герпес-вирусной инфекции: пат. 2415438 РФ, №2009131247; заявлено 17.08.2009; опубл. 27.03.2011, Бюл. №9.

-
44. *Луценко М.Т., Андриевская И.А.* Способ оценки антиокислительной функции липидов мембран эритроцитов в периферической крови беременных при обострении герпес-вирусной инфекции: пат. 2430369 РФ, №2009124858/15; заявлено 29.06.2009; опубл. 27.09.2011, Бюл. №27.
 45. *Луценко М.Т., Андриевская И.А.* Способ прогнозирования насыщения периферической крови беременных кислородом в зависимости от показателей глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в эритроцитах при различной степени агрессивности герпес-вирусной инфекции и содержания TNFα в периферической крови: пат. 2402780 РФ, №2009100601 от 11.01.2009; опубл. 27.10.2010, Бюл. №30.
 46. *Луценко М.Т., Андриевская И.А.* Способ диагностики дыхательной функции эритроцитов беременных путем определения активности глутатионредуктазы в эритроцитах периферической крови при обострении герпес-вирусной инфекции: пат. 2402276 РФ, №2009121858 от 08.06.2009; опубл. 27.10.2010, Бюл. №30.
 47. *Луценко М.Т., Андриевская И.А.* Способ определения изменений активности глутатионпероксидазы в эритроцитах периферической крови беременных при вспышке герпес-вирусной инфекции: пат. 2405149 РФ, №2009121857 от 08.06.2009; опубл. 27.11.2010, Бюл. №33.
 48. *Луценко М.Т., Андриевская И.А.* Способ прогнозирования активности гликофорина мембран эритроцитов в периферической крови беременных при обострении герпес-вирусной инфекции и содержания перекисей жирных кислот в периферической крови: пат. 2405154 РФ, №2009100603 от 11.01.2009; опубл. 27.11.2010, Бюл. №33.
 49. *Луценко М.Т., Андриевская И.Л., Болелова С.М.* Способ прогнозирования угрозы снижения насыщения эритроцитов кислородом у беременной с бронхиальной астмой: пат. 2415437 РФ, №2009131248; заявлено 17.08.2009; опубл. 27.03.2011, Бюл. №9.
 50. *Луценко М.Т., Андриевская И.А., Ишутина Н.А.* Изменение микровязкости мембран эритроцитов периферической крови при обострении герпес-вирусной инфекции у беременных // Информатика и системы управления. 2010. №2 (24). С. 98-100.
 51. *Луценко М.Т., Андриевская И.А., Ишутина Н.А.* Способ оценки структурно-функционального состояния мембран эритроцитов периферической крови у беременных при обострении герпес-вирусной инфекции // Патент РФ №2389021, 10.05.2010.

-
52. *Молчанова Т.П.* Основы молекулярной организации белков мембраны эритроцитов и их дефекты, приводящие к гемолитическим анемиям // Гематология и трансфузиология. 1989. Т. 32, №7. С. 32-41.
 53. *Молчанова Т.П.* Функциональное значение протеолиза в эритроидных клетках при гемоглобинопатиях // Гематология и трансфузиология. 1987. №3. С. 33-38.
 54. *Науменко Е.В., Попова Н.К.* Серотонин и мелатонин в регуляции эндокринной системы. Новосибирск, 1975. 215 с.
 55. Особенности состава жирных кислот и уровень оксипинонов у пациентов с метаболическим синдромом / Т.П.Новгородцева, Ю.К.Караман, Н.В.Жукова [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. 2010. №10. С. 22-25.
 56. *Обут Т.А., Овсякова М.В., Черкасова О.П.* Соотношение содержания 11-дегидрокортикостерона и кортикостерона при однократном и многократно повторяющихся стрессорных воздействиях, влияние введения дегидроэпиандростерон-сульфата // Бюл. экспериментальной биологии и медицины. 2004. Т. 138, №8. С. 158-161.
 57. *Павлович С.В.* Патогенетическое обоснование применения ω -3 полиненасыщенных жирных кислот при осложненном течении беременности // Акушерство и гинекология. 1998. №1. С. 48-52.
 58. *Панасенко О., Ким М., Гусев Н.* Структура и свойства малых белков теплового шока // Успехи биологической химии. 2003. Т.43. С. 59-98.
 59. *Погорелов В.М., Козинец Г.И.* Морфология апоптоза при нормальном и злокачественном гемопоэзе // Гематология и трансфузиология. 1995. Т. 43, №5. С. 21-24.
 60. *Протопопова Н.В., Колесникова Л.И., Ильин В.П.* Метаболизм и гемодинамика у беременных с артериальной гипертензией. Новосибирск: Наука, 2000. С. 146.
 61. Пустотина О.А. Плацентарная недостаточность и угроза прерывания беременности – обоснование применения препаратов прогестерона // Рос. вестник акушера-гинеколога. 2006. №2. С.51-54.
 62. Ультраструктура эритроцитов в норме и при патологии: морфологические феномены, клинические аспекты / Н.В.Рязанцева, В.В.Новицкий, Е.А.Степанова [и др.] // Морфология. 2004. Т.126, №5. С. 48-51.
 63. *Самолов М.В., Наумов А.Г.* Морфофункциональная характеристика эритроцитов, как критерий тяжести эндогенной интоксикации // Рос. мед. журнал. 2000. №1. С. 31-35.

-
64. *Сидельникова В.В.* Неполноценная лютеиновая фаза – тактика ведения пациенток с привычной потерей беременности // *Consillium medicum* (Гинекология). 2002. Т.4, №4. URL: <http://www.consilium-medicum.com/magazines/special/gynaecology/article/7491> (дата обращения 29.09.09).
 65. Выраженность процессов перекисного окисления липидов и состояние механизмов антиоксидантной защиты / И.С.Сидорова, В.А.Барсель, А.Б.Эдокова [и др.] // *Проблемы репродукции*. 2001. №5. С. 25-32.
 66. *Скачкова О.В.* Диагностика и профилактика метаболических нарушений у новорожденных девочек, родившихся от матерей с дисфункцией гипоталамуса: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Челябинск, 2009. 20 с.
 67. *Соловьева А.С., Луценко М.Т.* Характеристика местного иммунитета на поверхности небных миндалин у беременных с герпес-вирусной инфекцией // *Дальневосточный медицинский журнал*. 2007. №3. С. 22-24.
 68. *Торубарова Н.А, Кошель И.В., Яцык Г.В.* Кроветворение плода и новорожденного. М.: Медицина, 1993. 208 с.
 69. *Черняк Н.Б.* Биохимия эритроцитов // *Нормальное кровотоечение и его регуляция*. М., 1976. С. 159-189.
 70. *Чхаидзе И.Г.* Липидный спектр пуповинной крови новорожденных // *Педиатрия*. 1988. №2. С. 108.
 71. *Шпорова Д.В.* Ультраструктурные изменения эритроцитов при имплантации искусственного сердца // *Бюл. экспериментальной биологии и медицины*. 1980. Т. 89, №4. С. 406-408.
 72. *Agarwal A.K., Auchus R.J.* Minireview: Cellular Redox State Regulates Hydroxysteroid Dehydrogenase Activity and Intracellular Hormone Potency // *Endocrinology*. 2005. Vol. 146, №6. P. 2531-2538.
 73. *Alexander B.T.* Fetal programming of hypertension // *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative C. Physiol.* 2006. Vol. 290, №1. P. R1-R10.
 74. BDNF protect against spatial memory deficit following neonatal hypoxia-ichemia / R.Almini, T.J.Levy, D.H.Han [et al.] // *Experimental neurology*. 2000. Vol. 166. P. 99-114.
 75. *Alsopp T.E.* The protooncogene BCL-2 selectively rescue neurotrophic – factor – dependent neurons from apoptosis // *Cell*. 1995. Vol. 73, №2. P. 295-307.
 76. *Axelrod J., Hirita F.* Lipids and the transduction of biological signals through membranes // *Progr. Psychoneuroendocrinol.* Amsterdam, 1995. P. 1-12.
 77. *Benjamin I., R. Mc. Millan* Stress (Heat Shock) Proteins: Molecular Chaperones in Cardiovascular Biology and Disease. *Circulation research*. 1998. Vol. 83. P. 117-132.

-
78. *Burton P.J., Waddell B.J.* 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase in the rat placenta: developmental changes and the effects of altered glucocorticoid exposure // *Journal of Endocrinology*. 1994. Vol. 143, Is. 3. P. 505-513.
79. *Burton P.J., Waddell B.J.* Dual Function of 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase in Placenta: Modulating Placental Glucocorticoid Passage and Local Steroid Action // *Biology of Reproduction*. 1999. Vol. 60, №2. P. 234-240.
80. *Dodic M., Peers A., Coghlan J.P., Wintour M.* Can excess glucocorticoid in utero, predispose to cardiovascular and metabolic diseases in middle age? // *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 1999. №10. P. 86-91.
81. Programming effects of short prenatal exposure to cortisol / *M.Dodic* [et al.] // *The FASEB Journal*. 2002. Vol. 16, №9. P. 1017-1026.
82. *Easterling W.E., Talbert L.M.* Estriol excretion in normal and complicated pregnancies // *Am. J. Obstet. Gynec.* 1970. Vol. 107, №3. P. 417-422.
83. Adverse birth outcome among mothers with low serum cholesterol / *R.J.Edison* [et al.] // *Pediatrics*. 2007. Vol. 120, №4. P.723-733.
84. *Ehrnsperger M., Hauke L.* The dynamics of Hsp25 quaternary. Structure and function of different oligomeric species // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274. Is. 21. P. 14867-14874.
85. *Elias S.L., Innis S.M.* Infant plasma trans, n-6 and n-3 fatty acid and conjugated linoleic are related to maternal plasma fatty acid, length of gestation and birth weight and length // *American Journal Clinical Nutrition*. 2008. Vol. 87, №4. P. 887-895.
86. *Gordon S., Muenke M.* Cholesterol Drugs Tied to Birth Defects. URL: http://www.laleva.org/eng/2004/04/statins_scam_cholesterol_drugs_tied_to_birth_defects.html (дата обращения 23.03.09)
87. *Gutterige J.M., Westermarck T., Halliwell B.* Free radicals, aging and degenerative diseases. N.Y., 1986. P. 99-139.
88. *Gutterige J.M.* Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage // *Clin. Chem.* 1995. Vol. 12. P. 1819-1828.
89. *Glick B.C.* Can Hsp70 proteins Act as Force-Generating Motors // *Cell*. 1995. Vol. 80. P. 11-14.
90. *Господарьов Д.В., Байляк М.М., Луцзяк В.І.* Вількорадикальна інактивація in vitro глюкозо-6-фосфатдегідрогенази дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* // *Укр. біохім. ж.* 2005. Т. 77, №1. С.58-64.
91. *Hechter O., Grossman A., Chatterton R.T.Jr.* Relationship of dehydroepiandrosterone and cortisol in disease // *Med. Hypothes.* 1997. Vol. 49, №1. P. 85-91.
92. *Hengarthner M.O.* The biochemistry of apoptosis // *Nature*. 2000. Vol. 407. P. 770-776.

-
93. *Ho H., Okamoto K., Nakayma H.* Phosphorylation – induced change of the oligomerization state of α,β -crystallin // *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272. P. 29934-29941.
 94. *Landry I., Chretien P., Lambert H., Hickey E.* Heat shock resistance conferred by expression of the human Hsp27 gene in rodent cells // *The Journ. of Cell Biology.* The Rockefeller University Press. 1989. Vol. 109. 715 p.
 95. *Lee G.J.* Assaying proteins for molecular chaperone activity // *Journal Biol. Chem.* 1995. Vol. 270. P. 10432-10438.
 96. *Lee G.J., Garrett J.* Method for the expression of proteins in vitro translation systems with co-expression of folding helper proteins // *J. Biol. Chem.* 1995. Vol. 270. P. 1042-1048.
 97. *Mac Dougall R.* Low Maternal Cholesterol Tied to Premature Birth. URL: <http://www.nih.gov/news/pr/oct2007/nhgri-01.htm>.
 98. Maternal glucocorticoid treatment programs alterations in the Renin-Angiotensin system of the Ovine Fetal Kidney / *K.M.Moritz* [et al.] // *Endocrinology.* 2002. Vol. 43, №11. P.445 5-4463.
 99. *Myatt L.* Placental adaptive responses and fetal programming // *J. Physiol.* 2006. Vol. 572, №1. P. 25-30.
 100. *Nygren K.G., Johansson E.D.B., Wide L.* Evaluation of the prognosis of threatened abortion from the peripheral plasma levels of progesterone, estradiol and human chorionic gonadotropin // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1973. Vol. 116. P. 916-922.
 101. Plasma dehydroepiandrosterone-to-cortisol ratios as an indicator of stress in gynecologic patients / *H.Ozasa, M.Kita, T.Inoue* [et al.] // *Gynecol. Oncol.* 1990. Vol. 37, №2. P. 178-182.
 102. *Payne A.H., Hales D.B.* Overview of steroidogenic Enzymes in the Pathway from Cholesterol to Active Steroid Hormones // *Endocr. Rev.* 2004. Vol. 25, №6. P. 947-970.
 103. *Rluck R.M., Bossy-Wetzel E., Green D.K.* The release of cytochrome C from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis // *Science.* 1997. Vol. 275. P. 1132-1136.
 104. *Roger J., Frappier H., Walden D.B.* Translation of Some Maize Small Heat Shock Proteins is initiated from internal in-frame AUGs. // *Genetics Society America.* 1998. Vol. 148. P. 471-478.
 105. *Sun K., Yang K., Challis J.R.G.* Differential Regulation of 11β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 and 2 by Nitric Oxide in Cultured Human Placental Trophoblastic and Chorionic Cell Preparation // *Endocrinology.* 1997. Vol. 138, №11. P. 4912-4920.

-
106. *Nakashima T., Tanaka R., Yoshinori Yamashita.* Azanorosin and a novel derivative inhibit the anti-apoptotic functions regulated by Bcl-2 // *Biochem. and Biophys. Research Communication.* 2008. Vol. 377. Is. 4. P. 1085-1090.
 107. Acetate and cholesterol metabolism in human feta-placental unit it mid gestation. I. Synthesis of cholesterol / G.Telegdy [et al.] // *Acta Endocrinologica.* 1970. Vol. 63, №1. P.91-104.
 108. S 100 protein in serum as a prognostic marker for cerebral injury in term newborn infants witch hypoxic ischemic encephalopathy / K.Thorngren-Jerneek, C.Alling, A.Herbst [et. al.] // *Pediatr. Res.* 2004. Vol. 55, №3. P. 4006-4012.
 109. *Wiener M., Friedlander R.L.* Abnormal progesterone synthesis in placenta tissue from a spontaneous abortion // *Am. J. Obstet. Gynec.* 1971. Vol. 11, №7. P. 513-527.
 110. *Wirth M.M., Meier E.A., Fredrickson B.L., Schultheiss O.C.* Relationship between salivary cortisol and progesterone levels in humans // *Biol. Psychol.* 2006. Vol. 74, №1. P. 104-107.
 111. *Yang K.* Placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: barrier to maternal glucocorticoids // *Reviews of Reproduction.* 1997. Vol. 2. P. 129-132.

Луценко Михаил Тимофеевич,

академик РАМН, д-р мед. наук, профессор, руководитель лаборатории механизмов этиопатогенеза и восстановительных процессов дыхательной системы при неспецифических заболеваниях легких ФГБУ «ДНЦ ФПД» СО РАМН.

Андриевская Ирина Анатольевна,

д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории механизмов этиопатогенеза и восстановительных процессов дыхательной системы при неспецифических заболеваниях легких ФГБУ «ДНЦ ФПД» СО РАМН.

Довжикова Инна Викторовна,

д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории механизмов этиопатогенеза и восстановительных процессов дыхательной системы при неспецифических заболеваниях легких ФГБУ «ДНЦ ФПД» СО РАМН.

Ишутина Наталия Александровна

канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории механизмов этиопатогенеза и восстановительных процессов дыхательной системы при неспецифических заболеваниях легких ФГБУ «ДНЦ ФПД» СО РАМН.

**Морфофункциональные закономерности нарушения
дыхательной функции плаценты при беременности,
осложненной герпес-вирусной инфекцией**

Монография

Изд-во «Дальнаука». 690041, г. Владивосток, ул. Радио, 77.
отпечатано в типографии «Фабрика рекламы»,
г. Благовещенск, пер Волошина, оф. 5., тел (4162) 377-570, 25-26-80
Формат 64×84/16. Усл. печ. л. 6,13. Тираж 100.
Подписано к печати 20.11.2012.