

ЭКСПРЕССИЯ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ NO-СИНТАЗЫ В ПЛАЦЕНТАХ ЖЕНЩИН С КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ (COVID-19)

Гришкина А.А.¹, Чистякова Г.Н.¹, Ремизова И.И.¹, Бычкова С.В.¹, Мальгина Г.Б.¹

ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества» Минздрава России, Екатеринбург, e-mail: xumukyc.ru@mail.ru

Несмотря на официальное окончание пандемии коронавирусной инфекции и появлением новых штаммов, заболеваемость населения остается высокой. В связи с тропностью вируса к ангиотензин-превращающему ферменту 2, который расположен в том числе на эндотелии капилляров и в плаценте, влияние патогена на течение беременности и родов представляет интерес не только для акушеров-гинекологов и неонатологов, но и для патологов, которые занимаются изучением плацент. Целью исследования явилась оценка экспрессии эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) в плацентах от женщин с коронавирусной инфекцией. Исследование проводилось на 48 женщинах с COVID-19 (основная группа) и 38 условно здоровых женщинах (группа сравнения). Материалы и методы: проведено морфологическое и иммуногистохимическое исследование образцов плацентарной ткани. Микроскопию проводили с учетом цитоплазматической экспрессии рецепторов eNOS в трофобласте, эндотелии капилляров и децидуальной ткани. Просмотр и фотографирование микропрепаратов осуществляли при оптимальном увеличении на микроскопе Leica DM2500 (Germany) с использованием цифровой фотокамеры Leica DFC295 (Germany). Морфометрические измерения площади сосудов и интенсивности экспрессии рецепторов выполняли при использовании программы ImageJ. Было установлено, что у женщин с COVID-19 наблюдалось повышение экспрессии эндотелиальной NO-синтазы в плацентах, что может свидетельствовать о противовирусной активности или активации компенсаторных процессов. Исследование подчеркивает важность изучения эндотелиальной дисфункции, обусловленной коронавирусной инфекцией, и ее влияния на беременность и роды.

Ключевые слова: COVID-19, коронавирус, беременность, плацента, эндотелиальная дисфункция.

EXPRESSION OF ENDOTHELIAL NO SYNTHASE IN THE PLACENTAS OF WOMEN WITH CORONAVIRUS INFECTION (COVID 19)

Grishkina A.A.¹, Chistyakova G.N.¹, Remizova I.I.¹, Bychkova S.V.¹, Malgina G.B.¹

¹Federal State Budgetary Institution "Urals Scientific Research Institute for Maternal and Child Care" of Ministry of Healthcare of Russian Federation, Yekaterinburg, e-mail: xumukyc.ru@mail.ru

Despite the official end of the coronavirus infection pandemic due to the emergence of new strains, the incidence of the disease remains high. Due to the virus's tropism for angiotensin-converting enzyme 2, which is located in the endothelium of capillaries and in the placenta, the pathogen's impact on the course of pregnancy and childbirth is of interest not only to obstetricians-gynecologists and neonatologists but also to pathologists who study the placenta. The aim of the study was to assess the expression of endothelial NO synthase (eNOS) in placentas from women with coronavirus infection. The study was conducted on 48 women with COVID-19 (main group) and 38 conditionally healthy women (comparison group). Materials and methods: morphological and immunohistochemical examination of placental tissue samples was carried out. Microscopy was performed taking into account the cytoplasmic expression of eNOS receptors in trophoblasts, capillary endothelium, and decidual tissue. Microscopic examination and photographing of microslides were carried out at optimal magnification on a Leica DM2500 microscope (Germany) using a Leica DFC295 digital camera (Germany). Morphometric measurements of vessel area and receptor expression intensity were performed using ImageJ software. We found that women with COVID-19 showed an increase in endothelial NO synthase expression in the placenta, which may indicate antiviral activity or activation of compensatory processes. The study emphasizes the importance of studying endothelial dysfunction caused by coronavirus infection and its impact on pregnancy and childbirth.

Keywords: COVID 19, coronavirus, pregnancy, placenta, endothelial dysfunction.

Коронавирусная инфекция (COVID-19), вызванная вирусом SARS-CoV-2, до сих пор оказывает серьезное влияние на показатели заболеваемости и смертности в мире, более того,

растет количество людей с постковидным синдромом. На сегодняшний день появляется все больше данных, подтверждающих, что эндотелиальная дисфункция является ключевым механизмом патогенеза COVID-19, что подтверждается гистологическими исследованиями [1-3]. Эндотелий в норме обеспечивает динамическое взаимодействие между циркулирующей кровью и различными тканями/органами и тем самым поддерживает тканевой гомеостаз. Физиологические функции эндотелия включают регуляцию сосудистого тонуса, тканевого гемостаза, целостности барьера, воспаления, окислительного стресса, сосудистой проницаемости, а также структурной и функциональной целостности [4]. Системное воспаление, эндотелиальная дисфункция и нарушения метаболизма оксида азота (NO), которые активируют коагуляцию и образование тромбина, часто приводят к тромбозам у пациентов с тяжелым течением COVID-19 [5]. Неадекватное и избыточное высвобождение провоспалительных цитокинов, в том числе NO, при инфекции может вызывать увеличение концентрации свободных радикалов, повреждающих эндотелий, однако повышение активности эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) и увеличение синтеза оксида азота способствует защите макроорганизма благодаря противовирусному действию [6; 7]. Согласно исследованиям некоторых авторов, экспрессия NO-синтазы повышается во время беременности, играя важную роль в адаптации организма к периоду гестации, и возрастает при некоторых патологических состояниях, таких как диабет у матери, вызывая различные микрососудистые нарушения в системе «мать - плацента – плод» [8].

Тем не менее пока недостаточно работ, которые посвящены изучению эндотелиальной дисфункции в плацентах при коронавирусной инфекции и ее влияния на течение беременности и развитие плода.

Цель исследования: оценить экспрессию эндотелиальной NO-синтазы в плацентах женщин с коронавирусной инфекцией.

Материалы и методы исследования. Проведено морфологическое и иммуногистохимическое исследование образцов плацентарной ткани у 48 женщин с коронавирусной инфекцией (основная группа) и 38 условно здоровых женщин (группа сравнения), родоразрешенных на базе ФГБУ «НИИ ОММ» Минздрава России в 2019-2023 годах, средний возраст в группах составил $29,59 \pm 5,68$ и $27,28 \pm 6,85$ года соответственно.

Родоразрешение женщин основной группы проводили на фоне текущей коронавирусной инфекции: легкой степени у 24 женщин (50%), средней тяжести у 14 (29,2%) и тяжелой у 10 (20,8%); в сроке доношенной беременности ($38,40 \pm 1,72$ и $37,74 \pm 2,6$ недели в первой и второй группах). Оперативным путем были родоразрешены 23 пациентки (47,9%) первой группы и 24 (63,15%) второй. Показаниями к оперативному родоразрешению явились:

наличие рубца на матке, первичная слабость родовой деятельности, необходимость исключения потужного периода в связи с миопией высокой степени.

Критерии исключения: наличие иммунодефицитных состояний, тяжелая соматическая патология. Все женщины подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании, одобренное локальным этическим комитетом, и открытую публикацию его результатов. Обследование пациенток на клиническом этапе проводили по единой схеме согласно «Методическим рекомендациям организации оказания медицинской помощи беременным, роженицам, родильницам и новорожденным при новой коронавирусной инфекции COVID-19». Полученные плаценты подвергали комплексному морфологическому и иммуногистохимическому исследованию. Фрагменты пуповины, экстраплацентарных оболочек и ткани плаценты с плодовой и материнской поверхности фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине не более 24 часов, проводили по четырем спиртам восходящей концентрации, заключали в парафин, делали срезы толщиной 4 мкм и окрашивали гематоксилином и эозином. Для ИГХ-исследования использовали двухэтапный стрептавидин-биотин-пероксидазный метод с демаскировкой антигена с использованием иммуногистостейнера закрытого типа Bond-maX (Leica, Германия). Проявление реакции осуществлялось системой визуализации Dako Cytomation (Дания). Для визуализации первичных антител использовали безбиотиновую систему детекции Super Sensitive Polymer-HRP Detection System (Biogenex США), подтверждением реакции служило коричневое окрашивание цитоплазмы клеток. В образцах толщиной 4,0 мкм, помещенных на предметное стекло с адгезивным покрытием, определяли экспрессию eNOS с использованием поликлональных мышинных антител (GeneTex, США). Микроскопию проводили с учетом выраженности рецепторов eNOS в трофобласте, эндотелии капилляров и децидуальной ткани. Просмотр и фотографирование микропрепаратов осуществляли при увеличении $\times 200$ на микроскопе Leica DM2500 (Germany) с использованием цифровой фотокамеры Leica DFC295 (Germany). Морфометрические измерения площади сосудов и интенсивности экспрессии рецепторов выполняли при использовании программы ImageJ (Java based), находящейся в свободном доступе на <https://imagej.net/download.html>.

Анализ интенсивности экспрессии рецепторов на поверхности клеток проводили с учетом средней интенсивности окраски и процента площади окрашенных клеток по отношению к стандартной площади образца. Все анализируемые фотографии были сделаны при одинаковых настройках камеры, далее изображения переводились в 8-битный формат, где конкретным величинам серого диапазона соответствуют определенные значения красного, зеленого и синего цветов, что позволяло проводить оценку интенсивности и площади коричневого окрашивания (положительная иммуногистохимическая реакция) на основе

оценки красного и зеленого спектра с высокой точностью, исключая подсчет артефактов окрашивания. Данные получали в виде безразмерной величины, отражающей интенсивность окрашивания по шкале от 0 до 255 для интенсивности, и процента площади «окрашенных» пикселей по отношению к площади изображения.

При статистической обработке данных использовали пакет прикладных программ Statistica for Windows 7.0, Excel. Оценку соответствия выборки нормальному распределению проводили с использованием критерия Колмогорова - Смирнова. При нормальном распределении данные представляли в виде средней величины (M) и стандартного отклонения (SD). Качественные признаки представляли в виде абсолютного и относительного значений (%). Определение статистически значимых различий количественных признаков в независимых группах осуществляли с использованием процедуры однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с помощью непараметрического критерия Краскела - Уоллиса (Kruskal - Wallis). Для показателей, характеризующих качественные признаки, для проверки статистических гипотез использовали критерий хи-квадрат. Уровень статистической значимости (p) принимали равным или менее 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

Течение настоящей беременности осложнилось развитием гестационного сахарного диабета у женщин основной группы в 12,5% (6) и в 5,26% (2) случаев в группе сравнения, гестационная артериальная гипертензия и преэклампсия в группах регистрировались примерно с одинаковой частотой: 8,33% и 7,89%, 4,17% и 7,89% соответственно. При анализе течения беременности и родов у женщин группы сравнения достоверно чаще наблюдали преждевременное излитие околоплодных вод в 19 случаях (50,0%) по сравнению с 10 (20,8%) в первой группе.

Анализ гематологических и биохимических показателей накануне родоразрешения выявил, что у женщин основной группы отмечалось достоверное повышение гематокрита $34,60 \pm 6,66$ мм/час по сравнению с $30,00 \pm 3,98$ мм/час и гемоглобина в общем анализе крови $114,05 \pm 20,67$ г/л по сравнению с $108,38 \pm 11,74$ г/л во второй группе ($p < 0,05$ во всех случаях), что, с одной стороны, может свидетельствовать о гемоконцентрации и увеличении риска тромбоза. С другой стороны, в этой же группе женщин наблюдалось повышение тромбинового времени до $19,71 \pm 3,98$ сек. по сравнению с $16,03 \pm 2,05$ сек. в группе сравнения и уменьшение концентрации фибриногена $4,17 \pm 0,72$ г/л против $4,95 \pm 0,62$ г/л ($p < 0,05$), что свидетельствует о гипокоагуляции. Дискоординация работы свертывающей и противосвертывающей систем в плацентах может привести к развитию материнской сосудистой мальперфузии (maternal vascular malperfusion (MVM)) и, как следствие, формированию участков тромбоза и инфарктов в межворсинковом пространстве. У женщин первой группы регистрировалось повышение

концентрации АЛТ практически в два раза по сравнению с показателями группы сравнения ($26,40 \pm 10,34$ Ед/л против $14,55 \pm 6,91$ Ед/л, $p < 0,05$), что может наблюдаться при инфекционных заболеваниях.

При анализе макроскопических характеристик плацент от женщин с коронавирусной инфекцией обращает на себя внимание уменьшение их размера по сравнению с плацентами от здоровых женщин: максимальный размер плацентарного диска в первой группе $7,906 \pm 3,0417$ против $20,474 \pm 3,2940$ см в группе сравнения ($p < 0,05$), однако средняя масса плацент в группах не отличалась и составила $516,32 \pm 140,434$ и $578,44 \pm 142,718$ г соответственно.

При микроскопической оценке тканевых образцов у женщин с коронавирусной инфекцией в плацентах достоверно чаще встречались признаки материнской сосудистой мальперфузии. Они включали в себя инфаркты, тромбоз межворсинкового пространства, крупные гематомы, обширные многочисленные зоны фибриноидной агглютинации ворсин, нарушение созревания ворсин (табл. 1).

Таблица 1

Морфологические особенности плацент у женщин исследуемых групп

Признаки	1 группа, N=48		2 группа, N=38	
	Абс.	%	Абс.	%
Краевое прикрепление пуповины	8	16,67	7	18,42
Парацентральное прикрепление пуповины	37	77,08	23	60,53
Центральное прикрепление пуповины	2	4,17	0	0,00
Инфаркты в ткани	40	83,33*	23	60,53
Гематомы	2	4,17	2	5,26
Наличие ободка	12	25,00	16	42,11
Неравномерное кровенаполнение ткани	40	83,33	37	97,37
Незрелость ворсин хориона	14	29,17	11	28,95
Тромбоз межворсинкового пространства	6	12,50	5	13,16

* $p < 0,05$ – статистически значимые различия между группами.

Зачастую в плацентах от заболевших женщин встречались ворсины с выраженными дистрофическими изменениями синцитиотрофобласта, облитерацией и тромбозом сосудов. Аналогичные результаты получены зарубежными авторами, которые описали обширные

участки отложений фибрина субхориально и инфаркты плаценты в межворсинковом пространстве, агглютинацию ворсинок, сужение межворсинковых пространств, увеличение количества синцитиальных узлов как проявления материнской сосудистой мальперфузии и наличие тромботической васкулопатии плода и кровоизлияний в пуповине как признаков плодовой сосудистой мальперфузии [9; 10]. Согласно полученным данным Т. Menter и соавторов, в плацентах отмечалась микроваскулопатия, которая проявляется материнской сосудистой мальперфузией и, в меньшей степени, плодовой сосудистой мальперфузией, которые являются частой находкой в плаценте у женщин с коронавирусной инфекцией [10]. Также в исследованиях как частая находка отмечается децидуальная артериопатия и иные признаки материнской мальперфузии, отражающие нарушения оксигенации в межворсинковом пространстве, связанные с неблагоприятными перинатальными исходами [11].

Выраженность экспрессии NO-синтазы оценивалась как в клетках трофобласта, так и в децидуальных клетках (табл. 2).

Таблица 2

Экспрессия эндотелиальной NO-синтазы в трофобласте и децидуальной ткани плацент

Показатель**	1 группа, N =48, M±SD	2 группа, N =38, M±SD
Экспрессия в трофобласте, интенсивность	38,57±13,62*	10,18±7,71
Экспрессия в трофобласте, площадь	15,13±5,34*	3,99±3,02
Экспрессия в децидуальных клетках, интенсивность	30,98±26,83*	13,80±14,38
Экспрессия в децидуальных клетках, площадь	12,15±10,52*	5,41±5,64

* $p < 0,0001$ – статистически значимые различия между группами.

** Безразмерные величины, отражающие интенсивность цвета по шкале от 0 до 255.

Обнаружено значительное повышение как интенсивности, так и площади экспрессии eNOS в децидуальных клетках (рис. 1) и трофобласте (рис. 2) плацент женщин основной группы, что согласуется с данными S. Otçu с соавторами, которые выявили повышение экспрессии данного маркера в клетках Гофбауэра, эндотелиальных клетках и трофобласте в плацентах женщин с коронавирусной инфекцией [12].

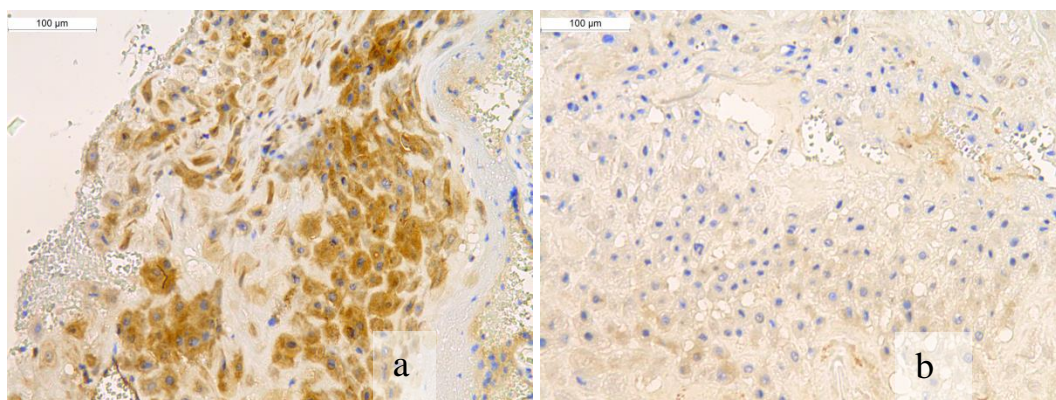


Рис. 1. Повышение экспрессии eNOS в децидуальных клетках плацент: от женщин с коронавирусной инфекцией (a) по сравнению с плацентами условно здоровых женщин (b).

Иммуногистохимическая реакция с антителами к eNOS; увеличение X 200

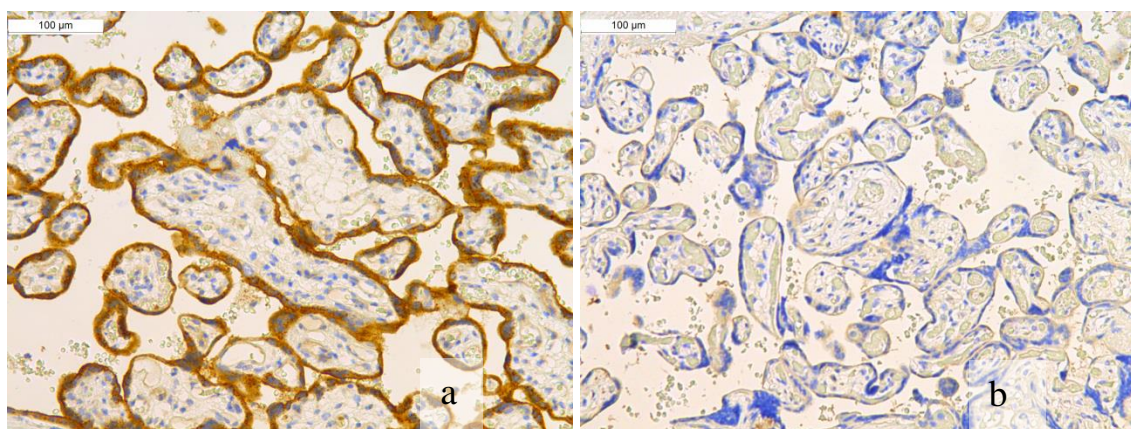


Рис. 2. Повышение экспрессии eNOS в клетках трофобласта в плацентах от женщин с коронавирусной инфекцией (a) по сравнению с плацентами условно здоровых женщин (b).

Иммуногистохимическая реакция с антителами к eNOS; увеличение X 200

Повышение экспрессии eNOS связано с регуляцией гемостаза, развитием тромбозов межворсинкового пространства у женщин с коронавирусной инфекцией, так как агрегация тромбоцитов и лейкоцитов в межворсинковых пространствах зависит от количества NO, вырабатываемого синцитиотрофобластом. Подобные морфологические изменения также могут возникать как компенсаторный механизм в ответ на развитие гипоксии в плаценте, поскольку оксид азота принимает участие в передаче сигналов сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), фактора роста фибробластов (FGF) и ангиопоэтина-1, следовательно, он играет ключевую роль в ангиогенезе во время беременности [13]. Экспрессия NO и VEGF взаимосвязаны, поскольку NO и гипоксия увеличивают экспрессию гена VEGF за счет усиления активности HIF-1 α и гем-оксигеназы 1 (HO-1), в то время как VEGF стимулирует выработку NO посредством активации нескольких сигнальных путей, включая Akt/ПКВ,

Ca(2+)/кальмодулин, протеинкиназу C, сфингозин-1-фосфат (S1P), а также активацию HIF-1 α и NO-1, в зависимости от скорости продукции NO [14].

Заключение

В плацентах женщин с коронавирусной инфекцией часто наблюдаются признаки материнской сосудистой мальперфузии, включающие уменьшение размера плаценты, задержку созревания ворсин хориона, и инфаркты, что способствует формированию синдрома задержки развития плода. Значительное повышение экспрессии NO-синтазы как в трофобласте, так и в децидуальных клетках плацент, вероятно, связано с противовирусной активностью оксида азота и служит вариантом естественной защиты, а также является компенсаторным механизмом, препятствующим нарушению тока крови в межворсинковом пространстве, в том числе путем уменьшения окислительного стресса.

Список литературы

1. Ambrosino P., Calcaterra I.L., Mosella M., Formisano R., D'Anna S.E. Bachetti T., Marcuccio G., Galloway B., Mancini F.P., Papa A., Motta A., Di Minno M.N.D., Maniscalco M. Endothelial Dysfunction in COVID-19: A Unifying Mechanism and a Potential Therapeutic Target // *Biomedicines*. 2022. Vol. 10. Is. 4. P. 812. DOI: 10.3390/biomedicines10040812.
2. Lowenstein C.J., Solomon S.D. Severe COVID-19 is a microvascular disease // *Circulation*. 2020. Vol. 142. Is. 17. P. 1609-1611. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.050354.
3. Flaumenhaft R., Enjyoji K., Schmaier A.A. Vasculopathy in COVID-19 // *Blood*. 2022. Vol. 140. Is. 3. P. 222-235. DOI: 10.1182/blood.2021012250.
4. Xu S.W., Ilyas I., Weng J.P. Endothelial dysfunction in COVID-19: an overview of evidence, biomarkers, mechanisms and potential therapies // *Acta Pharmacol Sin*. 2023. Vol. 44. Is. 4. P. 695-709.
5. Dinicolantonio J.J., McCarty M. Thrombotic complications of COVID-19 may reflect an upregulation of endothelial tissue factor expression that is contingent on activation of endosomal NADPH oxidase // *Open Hear*. 2020. Vol. 7. P. 1337. DOI: 10.1136/openhrt-2020-001337.
6. Akerström S., Mousavi-Jazi M., Klingström J., Leijon M., Lundkvist A., Mirazimi A. Nitric oxide inhibits the replication cycle of severe acute respiratory syndrome coronavirus // *J. Virol*. 2005. Vol. 79. Is. 3. P. 1966-1969. DOI: 10.1128/JVI.79.3.1966-1969.2005.
7. Guimarães L.M.F., Rossini C.V.T., Lameu C. Implications of SARS-Cov-2 infection on eNOS and iNOS activity: Consequences for the respiratory and vascular systems // *Nitric Oxide*. 2021. Vol. 111-112. P. 64-71. DOI: 10.1016/j.niox.2021.04.003.

8. Rossmannith W.G., Hoffmeister U., Wolfahrt S., Kleine B., McLean M., Jacobs R.A., Grossman AB. Expression and functional analysis of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in human placenta // *Mol Hum Reprod*. 1999. Vol.5. Is. 5. P. 487-494. DOI: 10.1093/molehr/5.5.487.
9. Jak B., Zanirati G., Rodrigues F.V.F., Grahl M., Krimberg F., Pinzetta G., Borém L., Savi D., Machado D.C., Da Costa J.C., Marinowic D.R. Case Report: Placental Maternal Vascular Malperfusion Affecting Late Fetal Development and Multiorgan Infection Caused by SARS-CoV-2 in Patient With PAI-1 4G/5G Polymorphism // *Frontiers in Medicine*. 2021. Vol. 17. Is. 8. P. 60. DOI: 10.3389/fmed.2021.624166.
10. Menter T., Mertz K., D, Jiang S., Chen H., Monod C., Tzankov A., Waldvogel S., Schulzke S. M., Hösli I., Bruder E. Placental Pathology Findings during and after SARS-CoV-2 Infection: Features of Villitis and Malperfusion // *Pathobiology*. 2021. Vol. 88. Is. 1. P. 69-77. DOI: 10.1159/000511324.
11. Elisheva D., Shanes M.D., Leena B., Mithal M.D., Otero S., Azad H. A., Miller E. S., Goldstein J. A. Placental Pathology in COVID-19 // *American Journal of Clinical Pathology*. 2020. Vol. 154. Is. 1. P. 23-32. DOI: 10.1093/ajcp/aqaa089.
12. Otçu S., Ozgokce Ç. Evaluation of FAS and eNOS expression in COVID-19 placenta: histopathological and immunohistochemical study // *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2023. Vol. 27. Is. 4. P. 1681-1688. DOI: 10.26355/eurrev_202302_31411.
13. Chen D.B., Zheng J. Regulation of placental angiogenesis // *Microcirculation*. 2014. Vol. 21. Is. 1. P. 15-25. DOI: 10.1111/micc.12093.
14. Tanimoto T., Jin Z.G., Berk B.C. Transactivation of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor Flk-1/KDR is involved in sphingosine 1-phosphate-stimulated phosphorylation of Akt and endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) // *J. Biol. Chem*. 2002. Vol. 277. Is. 45. P. 42997-43001. DOI: 10.1074/jbc.M204764200.