

УДК 618.3-06:616.155:577.352.366]578.825.12

**РОЛЬ СВОБОДНО-РАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В НАРУШЕНИИ СТРУКТУРЫ
МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БЕРЕМЕННЫХ
С ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ****Н.А.Ишутина, Н.Н.Дорофиев***Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания,
675000, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22***РЕЗЮМЕ**

Цель работы – изучение роли свободно-радикальных процессов в нарушении структурных липидов мембраны эритроцитов периферической крови беременных, перенесших в III триместре гестации реактивацию цитомегаловирусной инфекции с титром антител IgG к цитомегаловирусу 1:1600. Исследование проведено в периферической крови 45 беременных с обострением цитомегаловирусной инфекции (титр антител IgG к цитомегаловирусу 1:1600) в III триместре гестации – основная группа. Группу сравнения составили 45 женщин с физиологическим течением беременности. Результаты проведенного исследования позволяют сделать заключение о том, что обострение цитомегаловирусной инфекции в период гестации ассоциируется с активацией процессов перекисного окисления липидов на фоне несостоятельности антиоксидантной защиты, что приводит: к увеличению содержания липолитического фермента фосфолипазы A2 (на 60%, $p < 0,001$), способствующего гидролизу фосфатидилхолина (уменьшение концентрации на 23%, $p < 0,001$) с образованием токсических продуктов арахидоновой кислоты и лизофосфатидилхолина (на 51% выше нормы, $p < 0,001$), повреждающих мембрану эритроцитов; дезинтеграции липидов в бислое, изменяющей вязкостные свойства и способность к деформации мембран, что в дальнейшем может быть причиной возникновения гипоксии. В комплексную терапию беременных с цитомегаловирусной инфекцией необходимо включать, препараты, содержащие ω -3 полиненасыщенные жирные кислоты, что будет способствовать понижению агрегации тромбоцитов и снижению вязкости крови, подавлению тромбообразования и, тем самым, предотвращать развитие осложнений гестационного периода.

Ключевые слова: цитомегаловирусная инфекция, беременность, мембрана эритроцитов, перекисное окисление липидов, фосфолипиды, жирные кислоты.

SUMMARY**THE ROLE OF FREE RADICAL PROCESSES
IN THE DISRUPTION OF THE STRUCTURE OF
ERYTHROCYTE MEMBRANES OF PERIPHERAL
BLOOD IN PREGNANT WOMEN WITH
CYTOMEGALOVIRUS INFECTION****N.A.Ishutina, N.N.Dorofienko***Far Eastern Scientific Center of Physiology and
Pathology of Respiration, 22 Kalinina Str.,
Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation*

The aim was to study the role of free radical processes in the destruction of structural lipids of the membrane of red blood cells of the peripheral blood of pregnant women who had in the III trimester of gestation the reactivation of cytomegalovirus infection with the titer of antibodies to cytomegalovirus IgG 1:1600. The peripheral blood of 45 pregnant women with exacerbation of cytomegalovirus infection (titer of IgG antibodies to cytomegalovirus was 1:1600) in the III trimester of gestation (the main group) was studied. The comparison group consisted of 45 women with physiological pregnancy. The results of this study suggested that the aggravation of cytomegalovirus infection during gestation is associated with activation of lipid peroxidation against the insolvency of antioxidant defense, which results in the increase of the lipolytic enzyme phospholipase A2 (by 60%, $p < 0.001$) and promotion of phosphatidylcholine hydrolysis (decrease in the concentration by 23%, $p < 0.001$) with the formation of toxic products of arachidonic acid and lysophosphatidylcholine (by 51% above normal, $p < 0.001$) which damage the membrane of red blood cells; disintegration of the lipid bilayer which changes viscosity properties and the ability to deform the membrane, which can then be the cause of hypoxia. The complex therapy of pregnant women with cytomegalovirus infection should include drugs with ω -3 polyunsaturated fatty acids, which will contribute to the reduction of platelet aggregation and blood viscosity reduction, suppression of thrombus formation and thus to the prevention of the development of complications of gestational period.

Key words: cytomegalovirus infection, pregnancy, the membrane of red blood cells, lipid peroxidation, phospholipids, fatty acids.

В последние годы внимание исследователей вновь обращено к роли нарушения процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в развитии акушерской патологии. Активация процессов ПОЛ на фоне антиоксидантной недостаточности является пусковым механизмом возникновения многих заболеваний во время беременности.

Дисбаланс про- и антиоксидантных систем плаценты стимулирует выброс в кровоток матери гидроперекисей липидов. Реактивные продукты ПОЛ, обладающие высокой токсичностью, повреждают эндотелий сосудов [8], в том числе и пуповины [3], разрушая его мембраны, и тем самым, нарушают синтез простаглицлина, вазодилятатора и ингибитора агрегации тромбоцитов [8].

Образование гидроперекисей, обусловленное агрессивным влиянием свободных радикалов на поли-

ненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) фосфолипидов, не зависит от причины, вызывающей увеличение концентрации активных форм кислорода (АФК). Запускается каскад реакций ПОЛ с накоплением широкого спектра его токсических метаболитов, напряжением механизмов антиоксидантной защиты (АОЗ) и развития окислительного стресса [8].

Продукты ПОЛ, являясь медиаторами стресса, неспецифическим патогенетическим звеном в развитии заболеваний, выступают одним из наиболее ранних регуляторных механизмов патогенетических процессов, чем обусловлена актуальность изучения данного механизма при вирусной инфекции в период беременности. В связи с вышеизложенным, целью настоящего исследования явилось изучение роли свободно-радикальных процессов в нарушении структурных липидов мембраны эритроцитов периферической крови беременных, перенесших в III триместре гестации реактивацию цитомегаловирусной инфекции (ЦМВИ) с титром антител IgG к цитомегаловирусу (ЦМВ) 1:1600.

Материалы и методы исследования

Проведено обследование 45 беременных женщин в III триместре гестации, в возрасте 21-38 лет с установленным диагнозом хронической ЦМВИ, составивших основную группу исследования. Клинический диагноз – обострение ЦМВИ – устанавливался при комплексном исследовании периферической крови на наличие IgM или четырехкратного и более нарастания титра антител IgG в парных сыворотках в динамике через 10 дней, индекса авидности более 65%, а также ДНК ЦМВ. Контрольную группу составили 45 женщин с физиологически протекающей беременностью, сопоставимых по сроку и возрасту основной группе.

Работа была выполнена в соответствии с принципами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (2008 г.) и одобрена комитетом по биомедицинской этике при ДНЦ ФПД в соответствии с принципами конвенции о биомедицине и правах человека, а также общепризнанными нормами международного права. У всех пациенток было получено информированное согласие на использование данных обследования в научных целях и согласие этического комитета на проведение исследования.

Верификация ЦМВ, определение типоспецифических антител, индекса авидности осуществлялись методами иммуноферментного анализа (ИФА) на спектрофотометре Stat Fax 2100 с использованием тест-систем ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск), выявление ДНК ЦМВ методами ПЦР проводилось на детектирующем амплификаторе ДТ-96 с использованием наборов НПО «ДНК-технология» (Москва).

Содержание фосфолипазы A_2 определяли в плазме периферической крови пациенток методом ИФА с помощью наборов реактивов фирмы «Sigma chemical» (США). Концентрацию фосфатидилхолина и его лизоформу в мембране эритроцитов исследовали методом тонкослойной хроматографии [7]. Липиды экстрагиро-

вали по Фолчу [13]. Концентрацию арахидоновой и линолевой жирных кислот в мембране эритроцитов определяли методом газожидкостной хроматографии на хроматографе Кристалл 2000М (Россия). Анализ и идентификацию пиков выполняли с помощью программно-аппаратного комплекса «Хроматэк Аналитик 2,5» по временам удерживания с использованием стандартов фирмы «Supelco» (США). Количественный расчет хроматограмм проводили методом внутренней нормализации путем определения площадей пиков анализируемых компонентов и их доли (в относительных %) в общей сумме площадей пиков метилированных продуктов высших жирных кислот.

Статистическая обработка и анализ данных осуществлялась с использованием стандартного пакета прикладных программ Statistica 6.1. Анализируемые в работе количественные данные имели нормальное распределение, поэтому рассчитывалась достоверность различий значений по Стьюденту – вычисление средней арифметической (M), средней ошибки (m). Во всех процедурах статистического анализа критический уровень значимости нулевой статистической гипотезы p принимался равным 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

Проведенные нами ранее исследования показали, что у беременных с ЦМВИ наблюдалась активация процессов ПОЛ, о чем свидетельствовал достаточно высокий уровень продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой [6]. Что касается полученных нами данных о показателях АОЗ, то можно с большой долей вероятности утверждать, что эта метаболическая система при вирусной инфекции у беременных находится в депрессивном состоянии, что подтверждалось низким уровнем α -токоферола [6].

Активация процессов ПОЛ сопряжена с увеличением активности липолитического фермента фосфолипазы A_2 , который вызывает модификацию липидов и стимулирует развитие воспаления [11].

Действительно, у беременных с ЦМВИ в периферической крови содержание фосфолипазы A_2 было повышено на 60% ($p < 0,001$), по сравнению с аналогичным показателем контрольной группы (таб.).

Фосфолипаза A_2 гидролизует фосфатидилхолин на поверхности липопротеидов низкой плотности с образованием довольно токсичной арахидоновой кислоты и еще более агрессивного лизофосфатидилхолина [11]. Действительно, в мембране эритроцитов женщин основной группы концентрация фосфатидилхолина снижалась на 23% ($p < 0,001$), по сравнению с аналогичным показателем контрольной группы (таб.).

Следует отметить, что антигены ЦМВ способствуют усиленному выбросу цитокинов провоспалительного действия в периферическую кровь беременных – фактора некроза опухолей α , интерлейкина-1, интерферона γ [4, 5] – которые, в свою очередь, также инициируют высвобождение арахидоновой кислоты из клеточных мембран с последующим ее метаболизмом [8]. В условиях ЦМВИ эта реакция

трансформируется в патологическую. Подтверждением данного факта явилось увеличение концентрации арахидоновой кислоты и лизофосфатидилхолина на 51% ($p < 0,001$) в мембране эритроцитов перифериче-

ской крови женщин основной группы, по сравнению с аналогичными показателями контрольной группы (табл.).

Таблица

Содержание фосфолипазы A_2 в плазме и некоторые показатели липидного состава мембраны эритроцитов периферической крови у беременных III триместра с ЦМВИ ($M \pm m$)

Показатели	Контрольная группа	Основная группа	p
Фосфолипаза A_2 , нг/мл	0,45±0,08	0,72±0,06	<0,001
Фосфатидилэтаноламин, %	33,10±0,80	25,58±0,26	<0,001
Лизофосфатидилхолин, %	7,20±1,20	10,90±0,12	<0,001
Арахидоновая кислота, %	3,81±0,41	5,74±0,28	<0,001
Линолевая кислота, %	5,31±0,18	7,63±0,20	<0,001

Реакции ПОЛ являются свободно-радикальными и постоянно происходят в организме. Наиболее подвержены действию АФК жирные кислоты, содержащие изолированные двойные связи, расположенные через CH_2 -группу. Именно от этой CH_2 -группы свободный радикал (инициатор окисления) легко отнимает электрон, превращая липид, содержащий эту кислоту, в свободный радикал. Этот радикал образуется в акте одноэлектронного окисления при отрыве гидроксильным радикалом атома водорода от молекулы ненасыщенной жирной кислоты. Наименьшую энергию надо затратить при отрыве водородного атома от углерода, находящегося в α -положении по отношению к двойной связи. Олеиновая, линолевая, линоленовая и арахидоновая жирные кислоты содержат, соответственно, 1, 2, 3 и 4 таких α -углеродных атома. Этим объясняется увеличение реакционной способности ненасыщенных жирных кислот с увеличением числа двойных связей [12]. Выявленное нами менее выраженное увеличение концентрации линолевой кислоты (по сравнению с арахидоновой) в мембране эритроцитов женщин основной группы, подтверждало данный факт (табл.).

Очевидно, что установленные изменения состава липидов явились следствием низкой устойчивости эритроцитов периферической крови к действию повреждающих факторов (конечные продукты ПОЛ, лизофосфолипиды), запускающих каскад мембранодеструктивных процессов. В результате эритроциты утрачивают эластичность, теряют способность к изменению формы, необходимой для прохождения по микрососудам, что приводит к усиленному их разрушению в сосудистом русле, создавая тем самым условия для развития гипоксии.

Структурные липиды мембран (преимущественно фосфолипиды и холестерин) определяют текучесть их глубинных слоев. При этом текучесть мембраны зависит от содержания ненасыщенных жирных кислот в фосфолипадах, концентрации двухвалентных катионов [2]. Поэтому, учитывая важную роль структурных свойств мембран клеток в определении их функционального статуса, было проведено флюоресцентное зондирование эритроцитов. Степень эксимеризации неполярного зонда пирена, диффундирующего в гид-

рофобном компартменте мембраны, характеризует подвижность углеводных цепей липидов, что позволяет использовать данный параметр для исследования вязкостных свойств липидной мембраны [2]. Поэтому нарушение липидного состава мембраны эритроцитов явились причиной снижения текучести и увеличения микровязкостных свойств клеток в условиях ЦМВИ. Данный факт подтверждался достоверно низкими значениями флюоресценции липотропного зонда пирен в липидном бислое [9, 10].

В настоящее время в литературе описаны результаты исследований, подтверждающие применение препаратов, содержащих в своем составе ω -3 ПНЖК, для профилактики лечения осложнений беременности, при которых развивается выраженный дисбаланс в системе ПОЛ-АОЗ [1]. Установлено, что ω -3 ПНЖК обладают гиполлипидемическим эффектом, оказывают гипокоагуляционное, антиагрегантное, противовоспалительное и иммуномодулирующее действие [15], обладают антиапоптотическим и антиоксидантным действием [14], которые могут быть осуществлены только при условии их достаточного суточного потребления в составе пищи и со специальными препаратами.

Заключение

Таким образом, результаты проведенного исследования позволяют сделать заключение о том, что обострение ЦМВИ период гестации ассоциируется с активацией процессов ПОЛ на фоне несостоятельности АОЗ, что приводит к увеличению активности липолитического фермента фосфолипазы A_2 , способствующего гидролизу фосфатидилхолина с образованием токсических продуктов арахидоновой кислоты и лизофосфатидилхолина, повреждающих мембрану эритроцитов; дезинтеграции липидов в бислое, изменяющей вязкостные свойства и способность к деформации мембран, что в дальнейшем может быть причиной возникновения гипоксии. В комплексную терапию беременных с ЦМВИ необходимо включать препараты, содержащие ω -3 ПНЖК, что будет способствовать понижению агрегации тромбоцитов и снижению вязкости крови, подавлению тромбообразования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бегова С.В., Османова З.М., Омаров Н. С-М. Процессы перекисного окисления липидов и система антиоксидантной защиты сыворотки крови у многорожавших женщин с гестозом в сочетании с железодефицитной анемией // *Вопр. гин., акуш. и перинатол.* 2007. Т.6, №3. С.23–27.
2. Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов. М.: Наука, 1989. 277 с.
3. Дорофиев Н.Н. Ультраструктурные изменения эндотелиального слоя сосудов пуповины при цитомегаловирусной инфекции // *Бюл. физиол. и патол. дыхания.* 2013. Вып.50. С.93–95.
4. Дорофиев Н.Н., Андриевская И.А., Ишутина Н.А. Провоспалительные цитокины и состояние эндотелия сосудов пуповины при цитомегаловирусной инфекции // *Сиб. мед. журнал (Иркутск).* 2015. Т.132, №1. С.58–61.
5. Ишутина Н.А. Влияние серотонина и цитокинов на жирно-кислотный состав периферической крови беременных с герпес-вирусной инфекцией // *Сиб. мед. журнал (Иркутск).* 2013. Т.117, №2. С.50–52.
6. Ишутина Н.А., Дорофиев Н.Н. Пероксидация липидов при беременности, осложненной цитомегаловирусной инфекцией // *Бюл. физиол. и патол. дыхания.* 2014. Вып.54. С.66–69.
7. Кирхнер Ю. Тонкослойная хроматография: пер. с англ. М.: Мир, 1981. Т.1. 616 с.
8. Леваков С.А., Габитова Н.А. Роль свободно-радикального окисления и несостоятельной антиоксидантной защиты в патогенезе преэклампсии // *Лечение и профилактика.* 2015. №3(15). С.50–55.
9. Пат. 2513456 РФ. Способ диагностики стабильности эритроцитов у беременных при обострении цито-мегаловирусной инфекции / М.Т.Луценко, И.А.Андриевская, Н.А.Ишутина; опубл. 20.04.2014.
10. Пат. 2537119 РФ. Способ оценки нарушения микровязкости мембран эритроцитов периферической крови беременных на III триместре гестации при обострении цитомегаловирусной инфекции / М.Т.Луценко, И.А.Андриевская, Н.А.Ишутина, О.Л.Кутепова; опубл. 27.12.2014.
11. Петраков А.В., Нилова Т.В., Звенигородская Л.А. Перекисное окисление липидов и активность фосфолипазы А₂ в сыворотке крови больных неалкогольной жировой болезнью печени // *Доктор.Ру. Гастроэнтерология.* 2015. №2(103). С.26.
12. Шепелев А.П., Шестопалов А.В., Ставиский И.М. Перекисное окисление липидов в норме и патологии. Ростов-на-Дону: РГМУ, 2012. 46 с.
13. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animals tissues // *J. Biol. Chem.* 1957. Vol.226. P.497–509.
14. Docosahexaenoic acid (DHA) blunts liver injury by conversion to protective lipid mediators: protectin D1 and 17S-hydroxy-DHA / A.Gonzales-Periz [et al.] // *FASEB J.*

2006. Vol.20, №14. P.2537–2539.

15. Heemskerk J.W., Vossen R.C., van Dam-Mieras M.C. Polyunsaturated fatty acids and function of platelets and endothelial cells // *Curr. Opin. Lipidol.* 1996. Vol.7, №1. P.24–29.

REFERENCES

1. Begova S.V., Osmanova Z.M., Omarov N.S-M. Lipid peroxidation processes and the system of antioxidant defense of blood serum in multiparous women with gestosis combined with iron-deficiency anemia. *Voprosy ginekologii, akusherstva i perinatologii* 2007; 6(3):23–27 (in russian).
2. Dobretsov G.E. Fluorescent probes in the study of cell, membranes and lipoproteins. Moscow: Nauka; 1989 (in russian).
3. Dorofienko N.N. Ultrastructural changes of endothelial layer of umbilical cord vessels at cytomegalovirus infection. *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniâ – Bulletin physiology and pathology of respiration* 2013; (50):93–95 (in russian).
4. Dorofienko N.N., Andrievskaya I.A., Ishutina N.A. Proinflammatory cytokines and endothelial umbilical vessels in cytomegalovirus infection. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Irkutsk)* 2015; 132(1):58–61 (in russian).
5. Ishutina N.A. Influence of the serotonin and cytokines on fat-acid composition of the peripheric blood in pregnant women with the herpes-virus infection contamination. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Irkutsk)* 2013; 117(2): 50–52 (in russian).
6. Ishutina N.A., Dorofienko N.N. Lipid peroxidation in pregnancy complicated by cytomegalovirus infection. *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniâ – Bulletin physiology and pathology of respiration* 2014; (54):66–69 (in russian).
7. Kirchner J. Thin-layer chromatography. Moscow: Mir; 1981 (in russian).
8. Levakov S.A., Gabitova N.A. The role of free-radical oxidation and failure of anti-oxidant defense in pathogenesis under preeclampsia. *Lechenie i profilaktika* 2015; (3):50–55 (in russian).
9. Lutsenko M.T., Andrievskaya I.A., Ishutina N.A. Patent 2513456 RU. A method of diagnosing the stability of red blood cells of pregnant women during exacerbation of cytomegalovirus infection; published 20.04.2014 (in russian).
10. Lutsenko M.T., Andrievskaya I.A., Ishutina N.A., Kutepova O.L. Patent 2537119 RU. A method for evaluating violations microviscosity erythrocyte membranes of peripheral blood of pregnant women at 3rd trimester of gestation during exacerbation of cytomegalovirus infection; published 27.12.2014 (in russian).
11. Petrakov A.V., Nilova T.V., Zvenigorogskaya L.A. Lipid peroxidation and phospholipase A₂ activity in the serum of patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Doktor.Ru. Gastroenterologiya* 2015; (2):26 (in russian).
12. Shepelev A.P., Shestopalov A.V., Staviskiy I.M. Lipid peroxidation in norm and pathology. Rostov-na-Donu: RGMU; 2012 (in russian).

13. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animals tissues. *J. Biol. Chem.* 1957; 226:497–509.

14. González-Pérez A., Planagumà A., Gronert K., Miquel R., López-Parra M., Titos E., Horrillo R., Ferré N., Deulofeu R., Arroyo V., Rodés J., Clària J. Docosa-hexaenoic acid (DHA) blunts liver injury by conversion to

protective lipid mediators: protectin D1 and 17S-hydroxy-DHA. *FASEB J.* 2006; 20(14): 2537–2539.

15. Heemskerk J.W., Vossen R.C., van Dam-Mieras M.C. Polyunsaturated fatty acids and function of platelets and endothelial cells. *Curr. Opin. Lipidol.* 1996; 7(1):24–29.

Поступила 29.01.2016

Контактная информация

Наталья Александровна Ишутина,

доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории механизмов этиопатогенеза и восстановительных процессов дыхательной системы при НЗЛ,

Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания,

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

E-mail: ishutina-na@mail.ru

Correspondence should be addressed to

Natalia A. Ishutina,

PhD, DSc, Leading staff scientist of Laboratory of Mechanisms of Etiopathogenesis and Recovery

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

Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration,

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

E-mail: ishutina-na@mail.ru