

УДК 578.825.12(577.125.4+547.295.8):618.36:616.15-018.5]616-053.31

DOI: 10.36604/1998-5029-2019-73-49-53

ВЛИЯНИЕ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ НА СОДЕРЖАНИЕ МИРИСТИНОВОЙ КИСЛОТЫ И СФИНГОМИЕЛИНА В КРОВИ ПУПОВИНЫ НОВОРОЖДЕННЫХ

Н.А.Ишутина, Н.Н.Дорофиенко, И.А.Андреевская

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

РЕЗЮМЕ. Цель. Оценить характер влияния цитомегаловирусной инфекции (ЦМВИ) на содержание миристиновой кислоты и сфингомиелина в мембранах эритроцитов крови пуповины новорожденных. **Материалы и методы.** Обследованы 25 новорожденных от матерей с обострением хронической ЦМВИ в третьем триместре гестации (основная группа), контрольную группу составили 20 новорожденных от практически здоровых матерей. Клинический диагноз (обострение хронической ЦМВИ) устанавливали при комплексном исследовании периферической крови на наличие ДНК цитомегаловируса, IgM или четырехкратного и более нарастания титра антител IgG в парных сыворотках в динамике через 10 дней, а также индекса авидности (более 65%). Верификацию цитомегаловируса, определение типоспецифических антител, индекса авидности осуществляли методами ИФА, выявление ДНК цитомегаловируса – методами ПЦР. Материалом для исследования явились мембранны эритроцитов крови пуповины. Липиды из крови пуповины экстрагировали по методу Folch. Содержание миристиновой кислоты в мембранах эритроцитов крови пуповины у новорожденных определяли методом газожидкостной хроматографии, концентрацию сфингомиелина – методом тонкослойной хроматографии. Измерение микровязкости мембран эритроцитов осуществляли методом латеральной диффузии гидрофобного флуоресцентного зонда пирена. **Результаты.** Установлено, что обострение хронической ЦМВИ у женщин в третьем триместре беременности (титр антител иммуноглобулина G к цитомегаловирусу 1:1600) ассоциировано с увеличением содержания в мембранах эритроцитов крови пуповины их новорожденных детей миристиновой кислоты по сравнению с контрольной группой на 32% (1,64±0,007 и 1,24±0,008%, соответственно, $p<0,001$) и сфингомиелина на 25% (24,20±0,12 и 19,40±0,09%, соответственно, $p<0,001$), что приводит к повышению микровязкости мембран эритроцитов – снижение коэффициента эксимеризации пирена до 0,48±0,004 отн. ед. (в контрольной группе 0,76±0,005 отн. ед. $p<0,001$). **Заключение.** Увеличение содержания миристиновой кислоты и сфингомиелина в мембранах эритроцитов крови пуповины при нарастании у матери титра антител иммуноглобулина класса G к цитомегаловирусу 1:1600 приводит к повышению микровязкости липидного бислоя мембран эритроцитов и может быть одним из факторов, способствующих формированию гипоксии новорожденного ребенка.

Ключевые слова: новорожденные дети, цитомегаловирусная инфекция, миристиновая кислота, сфингомиelin, микровязкость, мембранны эритроцитов.

EFFECT OF CYTOMEGALOVIRUS INFECTION ON THE CONTENT OF MYRISTIC ACID AND SPHINGOMYELIN IN THE BLOOD OF THE UMBILICAL CORD OF NEWBORNS

N.A.Ishutina, N.N.Dorofienko, I.A.Andrievskaya

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

Контактная информация

Наталья Александровна Ишутина, д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории механизмов этиопатогенеза и восстановительных процессов дыхательной системы при неспецифических заболеваниях легких, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания», 675000, Россия, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22. E-mail: ishutina-na@mail.ru

Correspondence should be addressed to

Natalia A. Ishutina, PhD, D.Sc. (Biol.), 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

Для цитирования:

Ишутина Н.А., Дорофиенко Н.Н., Андреевская И.А. Влияние цитомегаловирусной инфекции на содержание миристиновой кислоты и сфингомиелина в крови пуповины новорожденных // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2019. Вып.73. С.49–53. DOI: 10.36604/1998-5029-2019-73-49-53

For citation:

Ishutina N.A., Dorofienko N.N., Andrievskaya I.V. Effect of cytomegalovirus infection on the content of myristic acid and sphingomyelin in the blood of the umbilical cord of newborns. *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniâ* = Bulletin Physiology and Pathology of Respiration 2019; 73:49–53 (in Russian). DOI: 10.36604/1998-5029-2019-73-49-53

SUMMARY. Aim. To assess the effect of cytomegalovirus infection (CMVI) on the content of myristic acid and sphingomyelin in the membrane of blood red blood cells of the umbilical cord of newborns. **Materials and methods.** There were examined 25 newborns from mothers with exacerbation of chronic CMVI in the third trimester of gestation (the main group); the control group consisted of 20 newborns from healthy mothers. Clinical diagnosis (exacerbation of chronic CMVI) was established in a comprehensive study of peripheral blood for the presence of cytomegalovirus DNA, IgM or four times or more increase in the titer of IgG antibodies in paired sera in dynamics after 10 days, as well as the avidity index (more than 65%). Verification of cytomegalovirus, determination of type-specific antibodies, and avidity index were carried out by ELISA methods; detection of cytomegalovirus DNA was done by PCR methods. The material for the study was the umbilical cord blood erythrocyte membrane. Lipids from umbilical cord blood were extracted by Folch method. The content of myristic acid in the erythrocyte membrane of the umbilical cord in newborns was determined by gas-liquid chromatography; the concentration of sphingomyelin was found by thin-layer chromatography. Microviscosity of erythrocyte membranes was measured by lateral diffusion of pyrene hydrophobic fluorescent probe. **Results.** It is established that the exacerbation of chronic CMVI in women in the third trimester of pregnancy (the antibody titer of IgG to cytomegalovirus 1:1600) was associated with the increased content of the myristic acid in the erythrocyte membrane in the umbilical cord blood of their newborns compared to the control group by 32% (from 1.64 ± 0.007 vs. 1.24 ± 0.008 , respectively, $p < 0.001$) and sphingomyelin by 25% (24.20 ± 0.12 vs. 19.40 ± 0.09 , respectively, $p < 0.001$), which leads to an increase of microviscosity of erythrocyte membranes – the reduction of eximerization pyrene coefficient to 0.48 ± 0.004 rel. units (in the control group it was 0.76 ± 0.005 rel. units, $p < 0.001$). **Conclusion.** The increase in the content of myristic acid and sphingomyelin in the erythrocyte membrane of the umbilical cord during growth in the mother of the titer of antibodies of immunoglobulin class G to cytomegalovirus 1:1600 increases the microviscosity of the lipid bilayer of the erythrocyte membrane and may be one of the factors contributing to the formation of hypoxia of the newborn child.

Key words: newborn babies, cytomegalovirus infection, myristic acid, sphingomyelin, microviscosity, erythrocyte membrane.

Основными структурными компонентами клеток наряду с белками являются фосфолипиды и входящие в их состав жирные кислоты, которые обеспечивают целостность морфологической структуры эритроцита и прочно удерживаются эритроцитарной мембраной. Однако, даже незначительные структурные перераспределения, приводящие к асимметрии мембранных фосфолипидов клетками, в значительной степени могут оказаться на нарушении функций биомембран, их проницаемости, пластичности, вязкоэластических свойствах, что влечет за собой снижение стабильности мембран клеток крови и тканей [3, 8].

Текущесть или микровязкость является интегральным показателем, зависящим от нескольких компонентов: ненасыщенности липидов, содержания холестерина в мембране, фосфолипидного состава и количества белка, введенного в мембрану [1, 2]. Важное значение в изменении структурно-функциональных свойств мембраны эритроцитов придают увеличению количества сфингомиелина и насыщенных жирных кислот. Чрезмерное накопление миристиновой кислоты приводит к уплотнению липидного бислоя мембран эритроцитов, что отражается на функциональных свойствах мембраны, а именно, относительной микровязкости [4, 7].

В результате увеличения микровязкости мембран, 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 [9].

Цель исследования – оценить характер влияния цитомегаловирусной (ЦМВ) инфекции на содержание

миристиновой кислоты и сфингомиелина в мембранах эритроцитов крови пуповины новорожденных.

Материалы и методы исследования

Обследованы 25 новорожденных от матерей с обострением хронической ЦМВ инфекции в третьем триместре гестации (основная группа), контрольную группу составили 20 новорожденных от практически здоровых матерей. Симптоматически ЦМВ инфекция у матерей проявлялась в виде острого респираторного заболевания, сопровождающегося ринофарингитом. Клинический диагноз (обострение хронической ЦМВ инфекции) устанавливали при комплексном исследовании периферической крови на наличие ДНК ЦМВ, IgM или четырехкратного и более нарастания титра антител IgG в парных сыворотках в динамике через 10 дней, а также индекса avidности (более 65%). Верификация ЦМВ, определение типоспецифических антител, индекса avidности осуществлялись методами иммуноферментного анализа на спектрофотометре Stat-Fax 2100 с использованием тест-систем ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск), выявление ДНК ЦМВ – методами ПЦР на аппарате ДТ-96 с использованием наборов НПО «ДНК-технология» (Москва).

Содержание миристиновой кислоты в мембранах эритроцитов крови пуповины у новорожденных определяли методом газожидкостной хроматографии, концентрацию сфингомиелина – методом тонкослойной хроматографии по Кирхнеру [5]. Кровь забирали из вены пуповины новорожденных в пробирку с 0,5 мл антикоагуланта.

Липиды из крови пуповины экстрагировали по методу J.Folch [12] смесью хлороформ–метанол (2:1). По-

лученный экстракт упаривали в токе воздуха досуха. К экстракту липидов добавляли порциями 5 мл ацетона и оставляли на ночь при температуре 3-5°C. Полученный осадок центрифугировали и проводили метилирование жирных кислот [11]. Полученный метиловый эфир миристиновой кислоты анализировали на газовом хроматографе Кристалл 2000м (Россия) с пламенно-ионизационным детектором. Обсчет 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.

Измерение микровязкости мембран эритроцитов проводили методом латеральной диффузии гидрофобного флуоресцентного зонда пирена [1]. Определение микровязкости основано на образовании эксимеров (активных димеров) пирена в липидном окружении. Флуоресценцию пирена измеряли на спектрофлюориметре Hitachi (Япония). Для определения микровязкости липидного бислоя находили интенсивность флуоресценции или свечение пирена при длине волны

возбуждения 334 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 флуоресценции эксимеров к интенсивности флуоресценции мономеров ($F_{\text{Э}}/F_{\text{М}}$, отн. ед.). Коэффициент эксимеризации находится в обратной зависимости от микровязкости.

Исследования проведены в соответствии с кодексом этических принципов Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации с поправками 2013 года и Правилами клинической практики в Российской Федерации, утвержденными приказом Минздрава РФ №200н от 1 апреля 2016 года; добровольного информированного согласия на участие в исследовании.

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

Результаты исследования и их обсуждение

В результате исследования были получены данные, представленные в таблице.

Таблица

Показатели миристиновой кислоты, сфингомиелина и вязкостных свойств мембран эритроцитов крови пуповины новорожденных при обострении ЦМВ инфекцией в третьем триместре беременности

Показатели	Контрольная группа	Основная группа	p
Миристиновая кислота, %	1,24±0,008	1,64±0,007	<0,001
Сфингомиелин, %	19,40±0,09	24,20±0,12	<0,001
F _Э /F _М , отн. ед.	0,76±0,005	0,48±0,004	<0,001

Установлено, что у новорожденных основной группы отмечалось повышение содержания миристиновой кислоты в мембранах эритроцитов крови пуповины на 32% ($p < 0,001$) относительно значений в контрольной группе. Одновременно регистрировалось повышение содержания сфингомиелина в мембранах эритроцитов крови пуповины новорожденных основной группы на 25% ($p < 0,001$) по сравнению с контрольной группой (табл.).

Важным следствием изменения содержания в крови пуповины миристиновой кислоты и сфингомиелина при ЦМВ инфекции является изменение вязкостных свойств мембран, повышенной трансформации клеток и их усиленного разрушения [3, 9]. Выявленное статистически значимое повышение содержание фракции сфингомиелина и миристиновой кислоты указывало на повышение жесткости мембран эритроцитов у новорожденных основной группы. Сфингомиелин – самый насыщенный фосфолипид, повышение содержания которого придает мембранам значительную жесткость

[6]. Действительно, увеличение содержания миристиновой кислоты и сфингомиелина наблюдалось на фоне увеличения микровязкости липидного бислоя (снижение коэффициента эксимеризации пирена) (табл.). Повышение микровязкости мембран эритроцитов способствует снижению скорости диффузии кислорода и ухудшению оксигенации кислорода. В результате эритроциты утрачивают эластичность, теряют способность к изменению формы, необходимой для прохождения по микрососудам, что приводит к их усиленному разрушению в сосудистом русле, создавая тем самым условия для развития гипоксии [9, 10].

Таким образом, увеличение содержания миристиновой кислоты и сфингомиелина в мембранах эритроцитов крови пуповины при нарастании у матери титра антител IgG к ЦМВ 1:1600 приводит к повышению микровязкости липидного бислоя мембран эритроцитов и может быть одним из факторов, способствующих формированию гипоксии новорожденного ребенка.

ЛИТЕРАТУРА

1. Добретсов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов. М.: Наука, 1989. 277 с.
2. Ишутина Н.А. Влияние состава полиненасыщенных жирных кислот на микровязкость мембраны эритроцитов пуповинной крови при герпетической инфекции // Бюллетень сибирской медицины. 2013. Т12, №3. С.37–40. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2013-3-37-40>
3. Ишутина Н.А. Роль нарушений состава фосфолипидов в патогенезе цитомегаловирусной инфекции в период гестации // *Acta Biomedica Scientifica*. 2015. №3(103). С.52–55.
4. Ишутина Н.А., Дорофиенко Н.Н. Некоторые механизмы нарушений структуры мембран эритроцитов у рожениц при цитомегаловирусной инфекции // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). 2015. Т.134, №3. С.45–48.
5. Кирхнер Ю. Тонкослойная хроматография: в 2-х т. М.: Мир, 1981. Т.1. С.52–115.
6. Крепс Е.П. Липиды клеточных мембран. Эволюция липидов мозга. Адаптационная функция липидов. Л.: Наука, 1981; 340 с.
7. Лескова Г.Ф., Мичунская А.Б., Кобозева Л.П., Клименко Е.Д. Особенности воздействия перфторана на структурно-метаболические нарушения в печени при экспериментальном атеросклерозе // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2003. Т.136, №10. С.386–389.
8. Луценко М.Т., Андриевская И.А., Ишутина Н.А. Кислородтранспортная функция крови у беременных, перенесших обострение герпес-вирусной инфекции // Вестник Российской Академии медицинских наук. 2012. № 6. С. 66–72.
9. Луценко М.Т., Андриевская И.А., Ишутина Н.А., Мироненко А.Г. Механизмы формирования гипоксии в период беременности и нарушение кровоснабжения плода при цитомегаловирусной инфекции // Вестник Российской Академии Медицинских Наук. 2015. Т.70, №1. С.106–112. doi: 10.15690/vramn.v70i1.1239
10. Перепелица С.В., Сергунова В.А., Гудкова О.Е. Состояние мембранных эритроцитов недоношенных новорожденных в раннем неонатальном периоде // Общая реаниматология. 2014. Т.10, №6. С.46–54. <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2014-6-46-54>
11. Carreau J.P., Dubacq J.P. Adaptation of a macro-scale method to the micro-scale for fatty acid methyl transesterification of biological lipid extracts // *J. Chromatography* 1978. Vol.151, №3. P.384–390. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)88356-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)88356-9)
12. Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues // *J. Biol. Chem.* 1957. Vol.226, №1. P.497–509.

REFERENCES

1. Dobretsov G.E. Fluorescent probes in the study of cell, membranes and lipoproteins. Moscow: Nauka; 1989 (in Russian).
2. Ishutina N.A. Influence of composition of polyunsaturated fatty acids on microviscosity of the membrane of erythrocytes of the navel of the blood at herpes infection contaminations. *Bulletin of Siberian Medicine* 2013; 12(3):37–40 (in Russian). <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2013-3-37-40>
3. Ishutina N.A. Role of compositional disorders in phospholipids in the pathogenesis of cytomegalovirus infection in the gestation period. *Acta biomedica scientifica* 2015; 3: 52–55 (in Russian).
4. Ishutina N.A., Dorofienko N.N. Some mechanisms of violations of structure of erythrocyte membranes in obstetric patients with cytomegalovirus infection. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Irkutsk)* 2015; 134(4):46–48 (in Russian).
5. Kirchner J.G. Thin-layer chromatography. Moscow: Mir; 1981. Vol.1 (in Russian).
6. Kreps E.P. Cell membrane lipids. Evolution of brain lipids. Adaptive role of lipids. Leningrad: Nauka; 1981 (in Russian).
7. Leskova G.F., Michunskaya A.B., Kobozeva L.P., Klimenko E.D. Influence of perftoran on structural and metabolic disturbances in the liver during experimental atherosclerosis. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2003; 136(4): 340–343.
8. Lutsenko M.T., Andrievskaya I.A., Ishutina N.A. Oxygen-transport function of blood at pregnant, transferred the aggravation of the herpesvirus infection. *Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk* 2012; (6):66–72 (in Russian).
9. Lutsenko M.T., Andrievskaya I.A., Ishutina N.A., Mironenko A.G. Mechanisms of hypoxia development during pregnancy and the disorder of fetus blood supply at cytomegalovirus infection. *Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk* 2015; 70(1):106–112 (in Russian). doi: 10.15690/vramn.v70i1.1239
10. Perekopetsa S.A., Sergunova V.A., Gudkova O.E. The red blood cell membrane of preterm infants in the early neonatal period. *General Reanimatology* 2014; 10(6):46–54 (in Russian). <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2014-6-46-54>
11. Carreau J.P., Dubacq J.P. Adaptation of a macro-scale method to the micro-scale for fatty acid methyl transesterification of biological lipid extracts. *J. Chromatography* 1978; 151(3):384–390. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)88356-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)88356-9)

12. Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 1957; 226(1):497–509.

Информация об авторах:

Наталья Александровна Ишутина, д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории механизмов этиопатогенеза и восстановительных процессов дыхательной системы при неспецифических заболеваниях легких, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания»; e-mail: ishutina-na@mail.ru

Николай Николаевич Дорофienко, канд. мед. наук, старший научный сотрудник лаборатории механизмов этиопатогенеза и восстановительных процессов дыхательной системы при неспецифических заболеваниях легких, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания»; e-mail: dorofienko-nn@mail.ru

Ирина Анатольевна Андриевская, д-р биол. наук, профессор РАН, зав. лабораторией механизмов этиопатогенеза и восстановительных процессов дыхательной системы при неспецифических заболеваниях легких, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания»; e-mail: irina-andrievskaja@rambler.ru

Author information:

Natalia A. Ishutina, PhD, D.Sc. (Biol.), 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; e-mail: ishutina-na@mail.ru

Nikolay N. Dorofienko, MD, PhD (Med.), Senior 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; e-mail: dorofienko-nn@mail.ru

Irina A. Andrievskaya, PhD, D.Sc. (Biol.), Professor RAS, Head 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; e-mail: irina-andrievskaja@rambler.ru

Поступила 08.07.2019

Принята к печати 15.08.2019

Received July 08, 2019

Accepted August 15, 2019
