

АКТИВНОСТЬ ГЕКСОКИНАЗЫ В СИНЦИТИОТРОФОБЛАСТЕ ПЛАЦЕНТЫ И ЭРИТРОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БЕРЕМЕННЫХ ТРЕТЬЕГО ТРИМЕСТРА С АКТИВНОЙ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ**М.Т.Луценко***Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания Сибирского отделения РАН,
675000, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22***РЕЗЮМЕ**

В работе представлены данные, отражающие состояние углеводного обмена, инициируемого гексокиназой фосфорилирования глюкозы, и причины его нарушения в плаценте и эритроцитах периферической крови женщин в третьем триместре гестации с активной цитомегаловирусной инфекцией. При гистохимическом исследовании 75 плацент женщин, перенесших рецидив цитомегаловирусной инфекции в третьем триместре гестации (основная группа), выявлено достоверное снижение интенсивности реакции на гексокиназу в сравнении с контрольной группой 30 серонегативных беременных ($79,8 \pm 1,9$ и $209,8 \pm 12,1$ усл. ед., $p < 0,001$). Одной из основных причин, вызывающих нарушение энергопродукции, можно считать антигеносредованную гиперсекрецию корой надпочечников кортизола и выброс его в больших количествах в периферическую кровь ($1467,47,4 \pm 8,23$ нмоль/л в основной группе и $730,41 \pm 9,04$ нмоль/л – в контрольной, $p < 0,001$), что определяло развитие процессов липопероксидации и образование свободно-радикальных продуктов, способствующих модификации мембранных и цитозольных белковых компонентов в плаценте. В периферической крови беременных основной группы отмечалось усиление процессов пероксидации липидов, вызывающих рост содержания малонового диальдегида до $1,65 \pm 0,09$ мкмоль/мл (контроль – $0,74 \pm 0,05$ мкмоль/мл, $p < 0,001$) и инактивирующих антиокислительные свойства супероксиддисмутазы (снижение до $243,85 \pm 7,71$ Ед/гНб, в контроле – $386,77 \pm 13,12$ Ед/гНб, $p < 0,001$) и олеиновой кислоты (снижение до $15,22 \pm 0,15\%$, в контроле – $20,51 \pm 0,21\%$, $p < 0,01$). На этом фоне в основной группе выявлялось уменьшение пула АТФ в эритроцитах до $0,46 \pm 0,015$ мкмоль/мл (контроль – $0,85 \pm 1,0$ мкмоль/мл, $p < 0,001$), что определяло снижение циркуляции дискоцитов и увеличение числа трансформированных и дегенеративных клеточных форм. Полученные результаты указывают на роль цитомегаловирусной инфекции в развитии окислительного стресса, нарушающего регуляцию гексокиназой АТФ-D-глюкоза-трансферазного процесса, что приводит к значительному снижению содержания АТФ в плаценте и эритроцитах периферической крови беременных.

Ключевые слова: цитомегаловирусная инфекция, гексокиназа, плацента, эритроциты.

SUMMARY**ACTIVITY OF HEXOKINASE IN****SYNCYTIOTROPHOBLAST OF PLACENTA AND ERYTHROCYTES OF THE PERIPHERAL BLOOD OF PREGNANT WOMEN IN THE THIRD TRIMESTER WITH ACTIVE CYTOMEGALOVIRUS INFECTION****M.T.Lutsenko***Far Eastern Scientific Center of Physiology and
Pathology of Respiration of Siberian Branch RAMS,
22 Kalinina Str., Blagoveshchensk, 675000,
Russian Federation*

The article shows the data which reflect the state of the carbohydrate metabolism initiated by hexokinase of glucose phosphorylation and the causes of its dysfunction in placenta and erythrocytes of the peripheral blood of women in the third trimester of gestation with active cytomegalovirus infection. After the histochemical study of 75 placentas of women who suffered the recurrence of cytomegalovirus infection in the third trimester of gestation (the main group), a reliable decrease of reaction intensiveness to hexokinase in comparison with the control group of 30 seronegative pregnant women (79.8 ± 1.9 and 209.8 ± 12.1 standard units, $p < 0.001$) was revealed. One of the main causes which leads to the breakage of energetic production can be antigen-mediate hypersecretion of cortisol by adrenal cortex and its output in big quantities into peripheral blood ($1467.47.4 \pm 8.23$ nmole/l in the main group and 730.41 ± 9.04 nmole/l in the control group, $p < 0.001$), which provoked the development of lipid peroxidation processes and the formation of free-radical products contributing to the modification of membrane and cytosolic protein components in placenta. In the peripheral blood of pregnant women from the main group there was an intensification of lipid peroxidation processes which cause the growth of malonic dialdehyde till 1.65 ± 0.09 mcmmole/ml (in the control group it was till 0.74 ± 0.05 mcmmole/ml, $p < 0.001$) and inactivating antioxidant properties of superoxide dismutase (the decrease till 243.85 ± 7.71 Units/gHb, in the control group it was till 386.77 ± 13.12 Units/gHb, $p < 0.001$) and oleic acid (the drop till $15.22 \pm 0.15\%$, in the control group it was till $20.51 \pm 0.21\%$, $p < 0.01$). At the same time in the main group there was the decrease of ATP pool in erythrocytes till 0.46 ± 0.015 mcmmole/ml (in the control group it was till 0.85 ± 1.0 mcmmole/ml, $p < 0.001$), which determined the drop of discocytes circulation and the increase of a number of transformed and degenerative cellular forms. The obtained results prove the role of cytomegalovirus infection in the development of oxidative stress which disturbs the regulation of hexokinase ATP-D-glucose-transferring enzyme process, which re-

sults in a significant drop of ATP in placenta and erythrocytes of the peripheral blood of pregnant women.

Key words: cytomegalovirus infection, hexokinase, placenta, erythrocytes.

Гексокиназа – фермент, катализирующий реакцию переноса фосфата с АТФ на D-глюкозу с образованием АДФ и глюкозо-6-фосфата, занимающую ключевую позицию в биосинтезе гликогена по пентозофосфатному пути.

Акцепторами фосфата в гексокиназной реакции являются D-глюкоза, D-фруктоза, D-манноза и D-глюкозамин. При выполнении этой реакции крайне необходимым является присутствие Mg^{2+} . Оптимальное значение pH для гликолиза с участием гексокиназы равно 7,6-8,2 [7]. Реакция, катализируемая гексокиназой, сопровождается уменьшением свободной энергии. Активность гексокиназы во многом зависит от возраста и физиологического состояния организма. Ингибирующим действием на активность гексокиназы обладают кортикостероиды и недостаток антиоксиданта – аскорбиновой кислоты. Недостаточность гексокиназы, локализуемой в эритроцитах, становится причиной проявления энзимопенической анемии, так как недостаточное фосфорилирование глюкозы лимитирует гликолиз и приводит к преждевременному гемолизу эритроцитов [8]. Следует отметить, что в более ранних наших работах показана роль герпетической инфекции в формировании и развитии окислительного стресса [4, 5] и связанного с ним нарушения энергетического обмена, обусловленного низкой активностью глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в тканях плаценты и эритроцитах беременных [1]. Однако начальный этап и механизмы его регуляции не были рассмотрены. Поэтому целью данной работы явилась оценка особенностей углеводного обмена, обусловленного гексокиназой фосфорилирования глюкозы в тканях плаценты и эритроцитах периферической крови беременных с активной цитомегаловирусной инфекцией, и причин, лимитирующих его скорость.

Материалы и методы исследования

На базе отделения акушерского патологии беременности клиники Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания Сибирского отделения РАМН было проведено обследование 75 серопозитивных по цитомегаловирусу (ЦМВ) женщин в третьем триместре беременности в возрасте от 18 до 35 лет (основная группа) и 30 серонегативных беременных (контрольная группа). Установление наличия активной цитомегаловирусной инфекции (ЦМВИ) проводилось при комплексном исследовании периферической крови на наличие IgM или четырехкратного и более нарастания титра антител IgG в парных сыворотках в динамике через 10 дней, определения индекса avidности антител IgG к ЦМВ (более 50%), а также наличия маркеров репликации ДНК ЦМВ. Одновременно проводилось исследование плацент от тех же групп женщин после родов.

Исследования проводились с учетом требований Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных

медицинских исследований с учетом человека» с поправками 2000 г. и Правилами клинической практики в Российской Федерации, утвержденными Приказом МЗ РФ №266 от 19.06.2003 г.

Верификация ЦМВ, определение типоспецифических антител IgM и IgG, индекса avidности антител IgG к ЦМВ осуществлялись сероиммунологическими методами на иммуноферментном анализаторе Stat-Fax 2100 (США) с использованием тест-систем ЗАО «Вектор Бест» (Новосибирск), выявление ДНК вируса осуществлялось молекулярно-биологическим методом (ПЦР) на аппарате ДТ-96 с использованием наборов НПО «ДНК-технология» (Москва). Активность супероксиддисмутазы определяли с помощью наборов реагентов «Sentinel diagnostics» (Италия) на спектрофотометре Stat-Fax 2100. Содержание АТФ в эритроцитах определяли по прописи И.С.Луганова и М.Н.Блинова [3]. Концентрацию кортизола в крови оценивали иммуноферментным методом с использованием реагентов ЗАО «АлкорБио» (Санкт-Петербург). Уровень малонового диальдегида устанавливали общепринятым методом с применением тиобарбитуровой кислоты по методу В.Б. Гаврилова и соавт. [2]. Содержание олеиновой кислоты определяли методом газовой хроматографии на аппарате Кристалл 2000м (Россия) [6]. Эритрограмма периферической крови беременных изучалась с помощью автоматизированной фотометрической установки Mekos (регистрационное удостоверение МЗ РФ 29100101198/1282-01). Гексокиназу определяли гистохимическим методом по T.Takeuchi [9] и подвергали компьютерному цитофотометрическому анализу.

Статистическую обработку данных осуществляли стандартными методами вариационной статистики с помощью «Автоматизированной системы диспансеризации» (правообладатель ФГБУ «ДНЦ ФПД» СО РАМН, 2005 г., версия 2.5). Показатели считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

При гистохимическом исследовании (рис. 1, 2) плацент от женщин с активной ЦМВИ в третьем триместре было установлено значительное снижение активности реакции на гексокиназу на всем протяжении синцитиотрофобласта, что выражалось в достоверном уменьшении средних значений ее относительного содержания в группе до $79,8 \pm 1,9$ усл. ед. (в контроле – $209,8 \pm 12,1$ усл. ед., $p < 0,001$).

Среди возможных причин, вызывающих нарушение активности гексокиназы в плаценте при ЦМВИ, можно выделить выявляемое в ходе исследования повышение внутрисосудистой циркуляции кортизола, в том числе, и в маточно-плацентарной зоне, что подтверждалось увеличением содержания гормона в периферической крови беременных основной группы до $1467,47 \pm 8,23$ нмоль/л (контроль – $730,41 \pm 9,04$ нмоль/л, $p < 0,001$). Причем действие кортизола, по-видимому, было направлено как на изменение проницаемости мембран через усиление проокислительных и окислительных процессов, так и на активность, либо синтез *de novo* ферментов.

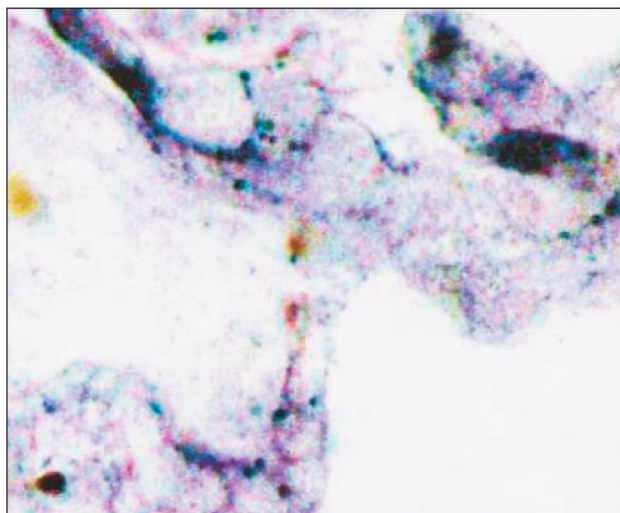


Рис. 1. Плацента женщин группы контроля. Интенсивная реакция на гексокиназу ($209,8 \pm 12,1$ усл. ед.). Увеличение: 100.

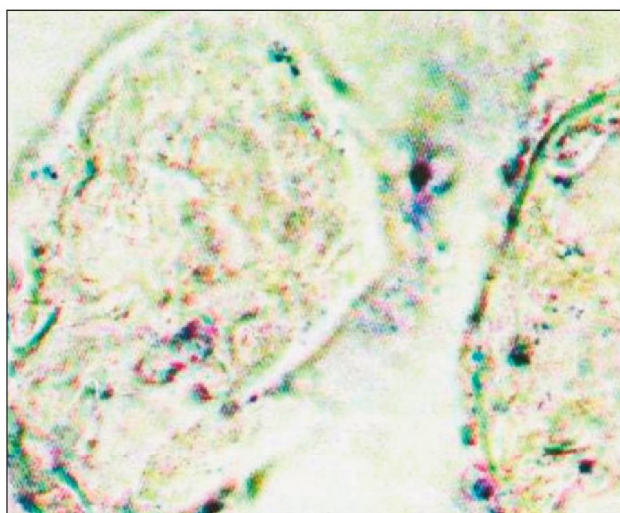


Рис. 2. Плацента женщин с активной ЦМВИ в третьем триместре гестации. Реакция на гексокиназу снижена ($79,8 \pm 1,9$ усл. ед.). Увеличение: 100.

Следовательно, вызванное кортизолом ингибирование гексокиназной активности в плаценте явилось следствием нарушения биохимической адаптации в ответ на антигенную нагрузку, вызванную активацией ЦМВИ, что приводило к формированию и развитию метаболических расстройств углеводного обмена и дефициту энергопродукции.

Необходимо отметить, что высокий уровень антигенной нагрузки при ЦМВИ и гиперсекреция кортизола действовали и на мембранный комплекс эритроцитов периферической крови беременных. В эритроцитах периферической крови беременных третьего триместра с активной ЦМВИ было обнаружено усиление процессов перекисидации липидов и образования активных форм кислорода, сопровождавшихся угнетением механизмов противорадикальной защиты (ферментной, неферментной), что проявлялось в росте содержания малонового диальдегида до $1,65 \pm 0,09$ мкмоль/мл (контроль – $0,74 \pm 0,05$ мкмоль/мл, $p < 0,001$) и низкой активности супероксиддисмутазы, показатели которой уменьшались до

$243,85 \pm 7,71$ Ед/гНв (контроль – $386,77 \pm 13,12$ Ед/гНв, $p < 0,001$). Также в мембранах эритроцитов отмечалось снижение содержания олеиновой кислоты до $15,22 \pm 0,15\%$ (контроль – $20,51 \pm 0,21\%$, $p < 0,01$), которая, как известно, является эндогенным антиоксидантом и захватчиком активных форм кислорода [6].

Установленное в ходе исследования снижение мощности антиоксидантной системы в эритроцитах периферической крови беременных третьего триместра с активной ЦМВИ на фоне нарушения мембранных электрон-транспортных цепей, усиления радикалообразования и роста активных форм кислорода, приводило к окислению ферментов гликолитического цикла и нарушению ресинтеза АТФ. Доказательством явилось уменьшение уровня общего АТФ в эритроцитах периферической крови беременных данной группы до $0,46 \pm 0,015$ мкмоль/мл (контроль – $0,85 \pm 1,0$ мкмоль/мл, $p < 0,001$).

Обнаруженный дефицит энергопродукции и, связанное с ним, нарушение процессов фосфорилирования мембранных белков цитоскелета эритроцитов в периферической крови беременных данной группы способствовали изменению формы клеток, их деформируемости. При цитотометрическом исследовании мазков крови беременных третьего триместра с активной ЦМВИ выявлено снижение количества циркулирующих эритроцитов в форме двояковогнутого диска (дискоциты) и увеличение процента трансформированных (эхиноциты, мишеневидные) и дегенеративных форм, что изменяло реологические свойства крови и приводило к микроциркуляторным расстройствам (табл.).

Таблица

Содержание эритроцитов различной формы в периферической крови беременных в основной и контрольной группах ($M \pm m$)

Вид эритроцитов, %	ЦМВИ	Контроль	p
Дискоциты	$62,20 \pm 1,70$	$87,00 \pm 2,10$	$< 0,001$
Эхиноциты	$6,60 \pm 0,08$	$3,55 \pm 0,05$	$< 0,001$
Мишеневидные	$16,55 \pm 0,12$	$4,45 \pm 0,09$	$< 0,001$
Дегенеративные	$14,65 \pm 0,90$	$5,00 \pm 0,35$	$< 0,001$

Таким образом, на основании полученных результатов исследования можно заключить, что ведущую роль в истощении пула АТФ, как в тканях плаценты, так и эритроцитах периферической крови беременных, занимает вызванная высоким уровнем антигенной нагрузки выработка проокислительных факторов, в нашем случае – гиперпродукция кортизола, который инициирует свободнорадикальные процессы на уровне мембранных компонентов, подавляя, тем самым, гексокиназную активность и образование АТФ. Формируемый при этом дефицит АТФ способствует повышенной трансформируемости и разрушению клеток красной крови, что снижает эффективность использования кислорода тканями плаценты и передачу

его в кровь плода.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андриевская И.А. Особенности обмена глюкозы по пентозофосфатному пути в эритроцитах матерей и новорожденных с герпесной патологией // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2007. Вып.24. С.57–60.

2. Гаврилов В.Г., Гаврилова А.Р., Мажуль Л.М. Анализ методов определения продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови по тесту с тиобарбитуровой кислотой // Вопр. мед. химии. 1987. №1. С.118–121.

3. Луганова И.С., Блинова М.Н. Определение 2,3-ДФГ и АТФ в эритроцитах больных хроническим лимфолейкозом // Лаб. дело. 1975. №11. С.625–654.

4. Пат. 2430369 RU. Способ оценки антиокислительной функции липидов мембран эритроцитов периферической крови беременных при обострении герпес-вирусной инфекции / М.Т.Луценко, И.А.Андриевская; опубл. 27.09.2011.

5. Пат. 2459207 RU. Способ прогнозирования устойчивости мембран эритроцитов при нарастании в них перекисей жирных кислот и обострении во время гестации герпес-вирусной инфекции / М.Т.Луценко, И.А.Андриевская; опубл. 20.08.2012.

6. Пат. 2467334 RU. Способ оценки микровязкости мембран эритроцитов путем вычисления коэффициента эксимеризации пирена Кэкс у беременных, перенесших обострение герпес-вирусной инфекции в третьем триместре гестации с учетом определения процентного содержания олеиновой кислоты в мембранах эритроцитов / М.Т.Луценко, Н.А.Ишутина; опубл. 20.11.2012.

7. Hexokinase: a compartmented enzyme / J.W.Anderson [et al.] // Am. J. Clin. Nutr. 1971. Vol.24, №6. P.642–650.

8. Schimke R.T., Grossbard L. Studies on isozymes of hexokinase in animal tissues // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1968. Vol.151, №1. P.332–350.

9. Takeuchi T. Histochemical demonstration of branching enzyme (amylo-1,4-1,6-transglucosidase) in animal tissues // J. Histochem. Cytochem. 1958. Vol.6, №3. P.208–216.

REFERENCES

1. Andrievskaya I.A. *Bulleten' fiziologii i patologii dy-*

haniya 2007; 24:57–60.

2. Gavrilov V.G., Gavrilova A.R., Mazhul' L.M. *Vo-prosy meditsinskoj khimii* 1987; 1:118–121.

3. Luganova I.S., Blinova M.N. *Laboratornoe delo* 1975; 11:625–654.

4. Lutsenko M.T., Andrievskaya I.A. *Patent 2430369 RU. Sposob otsenki antiokislitel'noy funktsii lipidov membran eritrotsitov perifericheskoy krovi beremennykh pri obostrenii herpes-virusnoy infektsii* (Patent 2430369 RU. The method of estimation of antioxidative function of erythrocytes membrane lipids of the peripheral blood of pregnant women at the acute form of herpesvirus infection); published 27.09.2011.

5. Lutsenko M.T., Andrievskaya I.A. *Patent 2459207 RU. Sposob prognozirovaniya ustoychivosti membran eritrotsitov pri narastanii v nikh perekisey zhirnykh kislot i obostrenii vo vremya gestatsii herpes-virusnoy infektsii* (Patent 2459207 RU. The method of prognostication of erythrocytes membranes at the growth of fatty acids peroxides in them and at the acute form of herpesvirus infection during gestation); published 20.08.2012.

6. Lutsenko M.T., Ishutina N.A. *Patent 2467334 RU. Sposob otsenki mikrovязкости membran eritrotsitov putem vychisleniya koeffitsienta eksimerizatsii pirena Keks u beremennykh, perenesshikh obostrenie herpes-virusnoy infektsii v tret'em trimestre gestatsii s uchetom opredeleniya protsentnogo sodержaniya oleinoy kisloty v membranakh eritrotsitov* (Patent 2467334 RU. The method of estimation of microviscosity of erythrocytes membranes through the calculation of pyrene excimerization coefficient (k) in pregnant women who suffered the acute form of herpesvirus infection in the third trimester of gestation considering the percentage of oleic acid quantity in erythrocytes membranes); published 20.11.2012.

7. Anderson J.W., Herman R.H., Tyrrell J.B., Cohn R.M. Hexokinase: a compartmented enzyme. *Am. J. Clin. Nutr.* 1971; 24(6):642–650.

8. Schimke R.T., Grossbard L. Studies on isozymes of hexokinase in animal tissues. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1968; 151(1):332–350.

9. Takeuchi T. Histochemical demonstration of branching enzyme (amylo-1,4-1,6-transglucosidase) in animal tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 1958; 6(3):208–216.

Поступила 11.04.2013

Контактная информация

Михаил Тимофеевич Луценко,

доктор медицинских наук, профессор, академик РАМН, руководитель лаборатории механизмов этиопатогенеза и восстановительных процессов дыхательной системы при НЗЛ,

Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания Сибирского отделения РАМН, 675000, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22.

E-mail: Lucenkomt@mail.ru

Correspondence should be addressed to

Mikhail T. Lutsenko,

MD, PhD, Professor, Academician RAMS, Head of Laboratory of Mechanisms of Etiopathogenesis and Recovery Processes of the Respiratory System at Non-Specific Pulmonary Lung Diseases, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration SB RAMS, 22 Kalinina Str., Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation.

E-mail: Lucenkomt@mail.ru