

ХАРАКТЕРИСТИКА ОКСИГЕНАЦИИ ГЕМОГЛОБИНА В ЭРИТРОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БЕРЕМЕННЫХ ПРИ ОБОСТРЕНИИ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ В ПЕРИОД ГЕСТАЦИИ

О.Л.Кутепова

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

РЕЗЮМЕ

В работе представлены данные, отражающие состояние процессов оксигенации гемоглобина и причины их нарушения в эритроцитах периферической крови 50 беременных с хронической цитомегаловирусной инфекцией (ЦМВИ) в стадии обострения на сроке гестации 20-22 недели (основная группа). Контрольную группу составили 20 здоровых беременных на тех же сроках гестации. При биохимическом исследовании эритроцитов периферической крови беременных основной группы выявлено изменение кислородсвязывающих свойств гемоглобина, что проявлялось в уменьшении концентрации оксигемоглобина до $95,20 \pm 0,45\%$ ($p < 0,05$) при титре антител IgG к ЦМВ 1:800 и до $90,15 \pm 0,35\%$ ($p < 0,001$) при титре антител IgG к ЦМВ 1:1600 в сравнении с контрольной группой ($98,00 \pm 0,65\%$). Данный факт явился следствием повышенного уровня аллостерического регулятора сродства гемоглобина к кислороду 2,3-дифосфоглицерата в основной группе до $5,96 \pm 0,4$ мкмоль/мл ($p < 0,01$) при титре антител IgG к ЦМВ 1:800 и до $6,7 \pm 0,07$ мкмоль/мл ($p < 0,001$) при титре антител IgG к ЦМВ 1:1600 (в контроле – $4,90 \pm 0,15$ мкмоль/мл). В периферической крови беременных основной группы также отмечалось накопление неорганических анионов, снижающих pH крови до $7,32 \pm 0,03$ ($p < 0,05$) при титре антител IgG к ЦМВ 1:800 и до $7,25 \pm 0,02$ ($p < 0,01$) при титре антител IgG к ЦМВ 1:1600 (в контроле – $7,40 \pm 0,07$), что повышало вероятность образования комплекса гема с 2,3-дифосфоглицератом и снижало связывание гемоглобина с кислородом. На этом фоне выявлялся рост показателей метгемоглобина до $0,90 \pm 0,03\%$ ($p < 0,05$) при титре антител IgG к ЦМВ 1:800 и до $1,50 \pm 0,04\%$ ($p < 0,001$) при титре антител IgG к ЦМВ 1:1600 (в контроле – $0,60 \pm 0,015\%$) и снижение антиоксидантной функции глутатионпероксидазы до $9,60 \pm 0,13$ Ед/гHb ($p < 0,01$) при титре антител IgG к ЦМВ 1:800 и до $6,50 \pm 0,15$ Ед/гHb ($p < 0,001$) при титре антител IgG к ЦМВ 1:1600 (в контроле – $15,70 \pm 0,17$ Ед/гHb). Полученные результаты указывают на важную роль активной ЦМВИ в развитии нарушений процессов оксигенации гемоглобина и механизмов их регуляции в эритроцитах периферической крови беременных, что создавало угрозу формирования гемической гипоксии, снижая, тем самым, передачу кислорода в кровь плода.

Ключевые слова: оксигемоглобин, 2,3-дифосфоглицерат, цитомегаловирус, гестация.

SUMMARY

THE CHARACTERISTIC OF HEMOGLOBIN OXYGENATION IN ERYTHROCYTES OF PERIPHERAL BLOOD OF PREGNANT WOMEN AT CYTOMEGALOVIRUS INFECTION EXACERBATION DURING GESTATION

O.L.Kutepova

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

The work presents the data which reflect the state of processes of hemoglobin oxygenation and the reasons of their damage in erythrocytes of the peripheral blood of 50 pregnant women with the exacerbation of chronic cytomegalovirus infection (CMVI) at 20-22 weeks of gestation (the main group). The control group consisted of 20 healthy pregnant women at the same stages of gestation. Under biochemical research of erythrocytes of the peripheral blood of pregnant women of the main group oxygen-binding hemoglobin properties were found to be changed, which was revealed through the decrease of oxyhemoglobin concentration till $95.20 \pm 0.45\%$ ($p < 0.05$) at antibody titer of IgG to CMV 1:800 and till $90.15 \pm 0.35\%$ ($p < 0.001$) at antibody titer of IgG to CMV 1:1600 in comparison with the control group ($98.00 \pm 0.65\%$). This fact was the result of the increased level of allosteric regulator of hemoglobin sensitivity to oxygen of 2,3-diphosphoglycerate in the main group till 5.96 ± 0.4 mkmole/ml ($p < 0.01$) at antibody titer of IgG to CMV 1:800 and till 6.7 ± 0.07 mkmole/ml ($p < 0.001$) at antibody titer of IgG to CMV 1:1600 (in the control group it was 4.90 ± 0.15 mkmole/ml). In the peripheral blood of pregnant women of the main group there was also an accumulation of non-organic anions decreasing pH of the blood till 7.32 ± 0.03 ($p < 0.05$) at antibody titer of IgG CMV 1:800 and till 7.25 ± 0.02 ($p < 0.01$) at antibody titer of IgG to CMV 1:1600 (in the control it was 7.40 ± 0.07), which increased the probability of the formation of heme complex with 2,3-diphosphoglycerate and worsened the binding of hemoglobin with oxygen. Against this background there was the growth of methemoglobin till $0.90 \pm 0.03\%$ ($p < 0.05$) at antibody titer of IgG to CMV 1:800 and till $1.50 \pm 0.04\%$ ($p < 0.001$) at antibody titer of IgG to CMV 1:1600 (in the control group it was $0.60 \pm 0.015\%$) and the decrease of an antioxidant function of glutathione peroxidase till 9.60 ± 0.13 Un/rHb ($p < 0.01$) at antibody titer of IgG to CMV 1:800 and till 6.50 ± 0.15 Un/rHb ($p < 0.001$) at an-

tibody titer of IgG to CMV 1:1600 (in the control group it was 15.70 ± 0.17 Un/rHb). The obtained data show an important role of active CMVI in the development of disturbances of hemoglobin oxygenation processes and mechanisms of their regulation in erythrocytes of the peripheral blood of pregnant women, which could result in the formation of hemic hypoxia decreasing the transportation of oxygen into the fetus blood.

Key words: oxyhemoglobin, 2,3-diphosphoglycerate, cytomegalovirus, gestation period.

Сродство гемоглобина к кислороду определяет диффузию кислорода из альвеолярного воздуха в кровь, а затем на уровне капиллярной крови [3, 11]. Свойство гемоглобина обратимо связывать кислород является частным случаем общей закономерности взаимодействия протеинов с лигандами [9]. Субъединицы гемоглобина внутри тетрамера при переходе от сильного (R) до слабого (T) взаимодействия Fe^{2+} -гема с гистидином, обуславливают кооперативные свойства, описываемые S-образной кривой деоксигенации. Такая ее форма обеспечивает процессы транспорта кислорода кровью, максимально облегчая оксигенацию при относительно низких pO_2 , и деоксигенацию при высоких pO_2 , улучшая доставку требуемых количеств кислорода в ткани при сравнительно малых величинах кровотока [5, 12].

Механизм кооперативности основан на стереохимической перестройке контактов субъединиц на мобильной аллостерической поверхности в зависимости от степени оксигенации. Аллостерические регуляторы – 2,3-дифосфоглицерат (2,3-ДФГ), Cl^- , H^+ , связываясь с молекулой гемоглобина в T-состоянии и облегчая, соответственно, высвобождение кислорода, проявляют свои эффекты в субэквивалентных количествах, то есть намного меньших, чем гемоглобина [8]. Так, частой причиной снижения влияния 2,3-ДФГ на сродство гемоглобина к кислороду является повышение уровня неорганических анионов, уменьшающих вне- и внутриклеточную pH [10]. По-видимому, они конкурируют с органическими фосфатами за центры связывания в молекуле гемоглобина, способствуя изменению сродства гемоглобина к кислороду. Другим фактором, вызывающим изменение кислородсвязывающих свойств гемоглобина через увеличение мембранной проницаемости, усиливающей сдвиг прооксидантно-антиоксидантного состояния эритроцитов, является вирус герпеса [1, 2].

В связи с этим, особый интерес представляет изучение взаимодействия 2,3-ДФГ с гемической группой дезоксигемоглобина и его влияния на процессы оксигенации при действии на организм беременной таких факторов, как антигены цитомегаловируса (ЦМВ), обладающего более выраженным цитотоксическим и цитодеструктивным действием по сравнению с вирусом простого герпеса.

Целью исследования явилось изучение процессов оксигенации гемоглобина и механизмов регуляции сродства к кислороду в эритроцитах периферической крови беременных на сроке гестации 20–22 недели с

хронической цитомегаловирусной инфекцией (ЦМВИ) в стадии обострения.

Материалы и методы исследования

Обследовано 50 беременных на сроке гестации 20–22 недели в возрасте 18–25 лет с хронической ЦМВИ в стадии обострения (основная группа), и 20 беременных на тех же сроках гестации без патологии (контрольная группа). Симптоматически ЦМВИ проявлялась в виде острого респираторного заболевания, сопровождающегося ринофарингитом. Клинический диагноз – обострение ЦМВИ – устанавливали 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. Исследования проводились с учетом требований Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных 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, индекса авидности осуществлялись методами ИФА на спектрофотометре Stat-Fax 2100 (США) с использованием тест-систем ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск), выявление ДНК ЦМВ методом полимеразной цепной реакции проводили на аппарате ДТ-96 с использованием наборов НПО «ДНК-технология» (Москва). Содержание 2,3-ДФГ и АТФ в эритроцитах определяли по методу И.С.Лугановой, М.Н.Блиновой [7]. Содержание оксигемоглобина оценивали по прописи Эвелина и Мэллой [4]. Кислотно-щелочное равновесие и газы крови определяли на биохимическом анализаторе IRMA TruPoint (США). Определение метгемоглобина выполнялось спектрофотометрическим методом по М.С.Кушаковскому [6]. Содержание глутатионпероксидазы определяли реагентами «Sentinel Diagnostics» (Италия).

Все расчеты производились с использованием программного пакета Statistica 6.0. Проверку нормальности распределения проводили по критерию Колмогорова-Смирнова. Проверку гипотезы о статистической значимости различий двух выборок проводили с помощью t-критерия Стьюдента. Показатели считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Анализ полученных результатов исследования показал, что у беременных основной группы наблюдались изменения кислородсвязывающих свойств гемоглобина, которые проявлялись в уменьшении концентрации оксигемоглобина в эритроцитах периферической крови до $95,20 \pm 0,45\%$ ($p < 0,05$) при титре антител IgG к ЦМВ 1:800, и до $90,15 \pm 0,35\%$ ($p < 0,001$) – при титре антител IgG к ЦМВ 1:1600 (в контроле $98,00 \pm 0,65\%$).

Нарушение кислородсвязывающих свойств гемоглобина можно объяснить увеличением концентрации

внутриэритроцитарного 2,3-ДФГ, эффект которого на облегченное высвобождение кислорода реализуется только при субэквивалентных количествах, то есть, когда его количество меньше, чем гемоглобина. Более того, 2,3-ДФГ имеет большее сродство к дезоксигемоглобину, чем кислород, что позволяет предполагать его конкурентное за соответствующие участки на молекулах гемоглобина при изменении условий внутренней среды эритроидной клетки.

Следовательно, наблюдаемый прогрессивный рост показателей 2,3-ДФГ, который при титре антител IgG к ЦМВ 1:800 составил $5,96 \pm 0,4$ мкмоль/мл ($p < 0,01$), и при титре антител IgG к ЦМВ 1:1600 – $6,7 \pm 0,07$ мкмоль/мл ($p < 0,001$), при контрольных значениях $4,90 \pm 0,15$ мкмоль/мл, лимитировал возможность полноценного присоединения кислорода к гемоглобину, что способствовало лишь частичной его оксигенации.

На изменение гем-глобиновых связей, а, следовательно, и увеличение взаимодействия гема с 2,3-ДФГ, указывало снижение рН крови беременных, которое при титре антител IgG к ЦМВ 1:800 составило $7,32 \pm 0,03$ ($p < 0,05$), а при титре антител IgG к ЦМВ 1:1600 достоверно снижалось до $7,25 \pm 0,02$ ($p < 0,01$), при контроле $7,40 \pm 0,07$.

Следует упомянуть и об участии системы глутатиона в модификации свойств гемоглобина через реакции ферментативного восстановления трипептида. Одной из таких является глутатионпероксидаза, которая нейтрализует пероксид водорода, образующийся при восстановлении окисленного глутатиона и метгемоглобина. Снижение ее активности усиливает окислительный стресс в эритроидной клетке, что также изменяет конформационное состояние гемоглобина. Доказательством вышеизложенного явилось выявляемое снижение концентрации внутриэритроцитарной глутатионпероксидазы до $9,60 \pm 0,13$ Ед/гНб ($p < 0,01$) при титре антител IgG к ЦМВ 1:800, и до $6,50 \pm 0,15$ Ед/гНб ($p < 0,001$) при титре антител IgG к ЦМВ 1:1600 (в контроле $15,70 \pm 0,17$ Ед/гНб), что приводило к накоплению внутриклеточного пероксида водорода, вызывающего денатурацию белковой субъединицы гемоглобина с образованием метгемоглобина. Его уровень в эритроцитах периферической крови беременных основной группы достоверно увеличивался до $0,90 \pm 0,03\%$ ($p < 0,05$) при титре антител IgG к ЦМВ 1:800, и до $1,50 \pm 0,04\%$ ($p < 0,001$) при титре антител IgG к ЦМВ 1:1600 (в контроле $0,60 \pm 0,015\%$).

Таким образом, на основании полученных результатов исследования можно заключить, что хроническая ЦМВИ в стадии обострения становится патогенетически значимым фактором, влияющим на характер процессов оксигенации гемоглобина и насыщение периферической крови беременных кислородом. Выявляемое нарушение механизмов регуляции сродства гемоглобина к кислороду, которое определялось по накоплению в эритроидных клетках таких аллостерических модуляторов как 2,3-ДФГ, а также неорганических анионов и пероксида водорода, сопровождалось прогрессивным образованием метгемоглобина. Наблюдаемое при этом уменьшение

кислородтранспортных свойств гемоглобина эритроцитов периферической крови беременных создавало угрозу формирования гемической гипоксии, снижая, тем самым, передачу кислорода в кровь плода.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андриевская И.А. Оценка дыхательной активности крови матерей и новорожденных в условиях герпес-вирусной инфекции // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2007. Вып. 24. С.63–65.
2. Андриевская И.А., Луценко М.Т. Диагностика резистентности мембран эритроцитов к окислительному стрессу у беременных с герпесной патологией // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2009. Вып.33. С.21–24.
3. Борисюк М.В. Особенности регуляции кислород-связывающих свойств крови в процессе ее циркуляции // Успехи физиол. наук. 1984. Т.15, №2. С.3–26.
4. Биохимические методы исследования в клинике: справочник / под ред. А.А.Покровского. М.: Медицина, 1969. 652 с.
5. Галенко-Ярошевский П.А., Гацура В.В. Экспериментальные аспекты оптимизации фармакотерапии острой ишемии миокарда. М.: Медицина, 2000. 383 с.
6. Кушаковский М.С. Клинические формы повреждения гемоглобина. Л.: Медицина, 1968. 324 с.
7. Луганова И.С., Блинова М.Н. Определение 2,3-ДФГ неэнзиматическим методом и содержания АТФ в эритроцитах больных хроническим лимфолейкозом // Лаб. дело. 1975. №11. С.625–654.
8. Сторожок С.А., Санников А.Г., Захаров Ю.М. Молекулярная структура мембран эритроцитов и их механические свойства. Тюмень, 1997. 140 с.
9. Hsia C.C.W. Mechanisms of disease: Respiratory function of hemoglobin // N. Engl. J. Med. 1998. Vol.338, №4. P.239–247.
10. Oxygen affinity of hemoglobin and red cell acid base status / M.Rorth, P.Astrup (eds.). Copenhagen: Munksgaard, New York: Academic Press, 1972. 832 p.
11. Samaja M. Blood gas transport at high altitude // Respiration. 1997. Vol.64, №6. P.422–428.
12. Oxygen transport in blood at high altitude: role of the hemoglobin-oxygen affinity and impact of the phenomena related to hemoglobin allosterism and red cell function / M.Samaja [et al.] // Eur. J. Appl. Physiol. 2003. Vol.90, №3-4. P.351–359.

REFERENCES

1. Andrievskaya I.A. *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniya* 2007; 24:63–65.
2. Andrievskaya I.A., Lutsenko M.T. *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniya* 2009; 33:21–24.
3. Borisyuk M.V. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk* 1984; 15(2):3–26.
4. Pokrovskiy A.A., editor. *Biokhimicheskie metody issledovaniya v klinike* [Biochemical research methods in clinic]. Moscow: Meditsina; 1969.
5. Galenko-Yaroshevskiy P.A., Gatsura V.V. *Ekspierimental'nye aspekty optimizatsii farmakoterapii ostroy ishemii miokarda* [The experimental optimization aspects of pharmacotherapy of acute myocardial ischemia]. Mos-

cow: Meditsina; 2000.

6. Kushakovskiy M.S. *Klinicheskie formy povrezhdeniya gemoglobina* [Clinical forms of hemoglobin damage]. Leningrad: Meditsina; 1968.

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

8. Storozhok S.A., Sannikov A.G., Zakharov Yu.M. *Molekulyarnaya struktura membran eritrotsitov i ikh mekhanicheskie svoystva* [The molecular structure of membranes of erythrocytes and their mechanical properties]. Tyumen'; 1997.

9. Hsia C.C.W. Mechanisms of disease: Respiratory

function of hemoglobin. *N. Engl. J. Med.* 1998; 338(4):239–247.

10. Rorth M., Astrup P., editors. Oxygen affinity of hemoglobin and red cell acid base status. Copenhagen: Munksgaard; New York: Academic Press; 1972.

11. Samaja M. Blood gas transport at high altitude. *Respiration* 1997; 64(6):422–428.

12. Samaja M., Crespi T., Guazzi M., Vandegriff K.D. Oxygen transport in blood at high altitude: role of the hemoglobin-oxygen affinity and impact of the phenomena related to hemoglobin allosterism and red cell function // *Eur. J. Appl. Physiol.* 2003; 90(3–4):351–359.

Поступила 17.07.2013

Контактная информация

Ольга Леонидовна Кутепова,

аспирант 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: helga1509_84@mail.ru

Correspondence should be addressed to

Ol'ga L. Kuteпова,

MD, Postgraduate student 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 SB RAMS,

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

E-mail: helga1509_84@mail.ru