

УДК 612.111.3.[(618.36:578.825.12)616-036.12/.65]

**ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ СТАТУС ЭРИТРОЦИТОВ КРОВИ БЕРЕМЕННЫХ ПРИ РЕЦИДИВЕ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ**

М.Т.Луценко, И.А.Андриевская, О.Л.Кутепова

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

Целью исследования явилось изучение морфофункциональных изменений при созревании эритроцитов периферической крови у беременных при обострении хронической цитомегаловирусной инфекции (ЦМВИ). Изучены особенности энергетического обмена эритроцитов крови беременных с рецидивом ЦМВИ на 20-22 неделе гестации. Разработана модель, позволяющая оценить степень зрелости и характер биосинтетической активности эритроцитов крови беременных по распределению метиленового синего в мембране клеток. Выявлена зависимость характера окраски эритроцитов: базофильная/оксифильная от степени зрелости клеток и интенсивности окислительно-восстановительных процессов. В мазках крови беременных с рецидивом ЦМВИ отмечен рост числа эритроцитов ( $p < 0,05$ ), окрашенных метиленовым синим, что свидетельствует о снижении активности системы НАДФН/дисульфид редуктазы. При биохимическом исследовании эритроцитов крови беременных данной группы установлено подавление активности энергообразующих процессов, что проявлялось в гидролизе значительной части как общего ( $p < 0,05$ ), так и связанного с гемоглобином АТФ ( $p < 0,05$ ). На этом фоне наблюдалось изменение состояния процессов окислительного фосфорилирования, что способствовало нарушению баланса фосфатов в клетке и проявлялось ростом показателей общего ( $p < 0,05$ ) и неорганического внутриэритроцитарного фосфора ( $p < 0,05$ ). Выявленные изменения в энергетическом обеспечении эритроцитов при рецидиве ЦМВИ могут являться причиной возникновения нарушений реологии крови беременных и ее кислородтранспортных свойств.

*Ключевые слова:* цитомегаловирусная инфекция, беременность, эритроциты, АТФ.

**SUMMARY****ENERGETIC STATUS OF ERYTHROCYTES IN THE BLOOD OF PREGNANT WOMEN UNDER THE RELAPSE OF CYTOMEGALOVIRUS INFECTION**

M.T.Lutsenko, I.A.Andrievskaya, 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 aim of the research is to study morphofunctional changes at maturation of erythrocytes of the peripheral blood in pregnant women at the exacerbation

of chronic cytomegalovirus infection (CMVI). The features of energetic exchange of blood erythrocytes of pregnant women with the relapse of CMVI at the 20-22 weeks of gestation were studied. The model which allows to estimate the degree of maturation and the character of biosynthetic activity of blood erythrocytes of pregnant women by the distribution of methylene blue in the membrane of cells was developed. The dependence of the character of erythrocytes painting was revealed: basophil/oxyphilous one depending on the cells maturation and intensiveness of oxidation-reduction processes. In the blood smear of pregnant women under the relapse of CMVI there was a growth of erythrocytes number ( $p < 0,05$ ) painted methylene blue, which proves the decrease of the activity of NADPH/disulphide reductase system. While conducting a biochemical study of blood erythrocytes in pregnant women of this group the suppression of the activity of energy-forming processes was found out, which was revealed in the hydrolysis of the significant part of the total ( $p < 0,05$ ) and bound to hemoglobin ATP ( $p < 0,05$ ). Against this background there was the change of the state of oxidative phosphorylation processes, which contributed to the disturbance of phosphates in the cell and was revealed through the growth of indices of the total ( $p < 0,05$ ) and nonorganic intra-erythrocyte phosphorus ( $p < 0,05$ ). The revealed changes in the energetic provision of erythrocytes under CMVI relapse can be the reason for the development of disturbances of blood rheology of pregnant women and its oxygen-transport properties.

*Key words:* cytomegalovirus infection, pregnancy, erythrocytes, ATP.

Последний этап созревания ретикулоцита в эритроцит продолжается 2-4 дня. В этот период происходят существенные изменения в обмене веществ: прекращается синтетическая функция белка, фосфолипидов и гема в ретикулоцитах. Резко снижается содержание нуклеиновых кислот и АТФ [12]. Способность к дыханию почти полностью утрачивается. Подавляется активность цитохромоксидазы и нарушается работа цикла трикарбоновых кислот, хотя даже в зрелых клетках отмечается активность изоцитратдегидрогеназы и малатдегидрогеназы. Активность ферментов гликолиза, а также содержание АТФ и никотинамидных коферментов значительно снижается [11]. В эритроцитах сохраняется способность к гликолизу и утилизация небольшого количества глюкозы в пентозном цикле.

Большое значение для поддержания жизнедеятельности эритроцита приобретает биосинтез АТФ, а также соединений, обладающих высокой восстанавливающей способностью – НАДН и НАДФН. Важно знать, что

зрелый эритроцит для выполнения своей основной функции (транспорта газов) не совершает затраты энергии. Все остальные процессы функциональной деятельности эритроцита выполняются благодаря сохранению обмена веществ и энергии на должном уровне [2, 3, 7]. Для выполнения этих задач эритроциту необходима энергия, поставляемая за счет гликолиза, при котором из одной молекулы глюкозы вырабатываются две молекулы АТФ, а также в этом процессе участвует пентозный цикл. Зрелый эритроцит может за счет рибозо-5-фосфата и аденина формировать АМФ, которая через АДФ превращается в АТФ. Имеются сведения об изменениях морфологии эритроидных клеток при гликолитических энзимопатиях, которые носят преимущественно генетический характер [8, 9]. Однако мало что известно о влиянии вирусных инфекций, в том числе, вызванных цитомегаловирусом (ЦМВ), на ферментные системы гликолитического цикла и выработку макроэргических соединений в эритроцитах крови беременных.

Целью нашего исследования явилось изучение вопроса биосинтетической активности и энергетического обеспечения эритроцитов крови беременных при рецидиве цитомегаловирусной инфекции (ЦМВИ) на сроке гестации 20-22 недели.

#### Материалы и методы исследования

Работа была выполнена в соответствии с принципами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (2008 г.) и одобрена комитетом по биомедицинской этике при ФГБУ «ДНЦ ФПД» СО РАМН в соответствии с принципами конвенции о биомедицине и правах человека, а также общепризнанными нормами международного права. От всех здоровых и больных лиц было получено информированное согласие. На сроке гестации 20-22 недели было обследовано 60 серопозитивных к ЦМВ беременных (основная группа) с титром антител IgG 1:1600 (n=30) и 1:800 (n=30), а так же 60 серонегативных беременных (контрольная группа). У беременных на сроке гестации 20-22 недели симптоматически ЦМВИ проявлялась в виде ОРВИ, которая сопровождалась ринофарингитом. Клинический диагноз обострения 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 avidности более 65%, а также ДНК ЦМВ.

Верификацию ЦМВ, определение типоспецифических антител, индекса avidности осуществляли методами иммуноферментного анализа на спектрофотометре «StatFax 2100» (США) с использованием тест-систем ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск). Выявление ДНК ЦМВ выполнялось методом полимеразной цепной реакции на аппарате ДТ-96 с использованием наборов НПО «ДНК-технология» (Москва). Морфофункциональное состояние эритроцитов оценивалось с помощью окраски клеток 0,1% раствором метиленового синего [6], содержание АТФ, общего и неорганического фосфора – по прописи

И.С.Лугановой, М.Н.Блиновой [5]. Подсчет эритроцитов на мазках крови, окрашенных метиленовым синим, проводили с помощью цифрового микроскопа МТ (Meiji Techno, Япония), связанного с программно-аппаратным комплексом Scion Corporation. Общее число эритроцитов и содержание гемоглобина определяли на гематологическом анализаторе Medonic M (Швейцария).

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

#### Результаты исследования и их обсуждение

В настоящее время недостаточно полно освещен вопрос перестройки ретикулоцита в зрелый эритроцит. Универсальной моделью оценки морфологической зрелости эритроцита можно считать окраску клеток метиленовым синим.

В незрелом эритроците биосинтетические процессы, протекающие с участием системы НАДФН/дисульфид редуктазы, преимущественно направлены на образование базофильной белковой субстанции, что отчетливо выявляется на рисунке 1.

По мере созревания эритроцита усиливался синтез гемоглобина, что проявляется в увеличении количества клеток, имеющих оксифильную окраску (рис. 2).

Зрелый эритроцит, как показано на рисунке 3, полностью оксифилен.

Следовательно, эритроидные клетки до окончательного созревания проходят сложный путь своего развития. В ретикулоцитах, которые сохраняют в своем составе эндоплазматический ретикулум и митохондрии, осуществляется полный гликолитический цикл, который приводит к образованию 36 молекул АТФ. Однако уже через 2-4 дня эти функции начинают исчезать, и для зрелого эритроцита остается укороченный гликолитический цикл без реакций трикарбоновых кислот, что снижает образование АТФ и никотинамидных коферментов (НАДН, НАДФН).

Следует отметить, что АТФ является аллостерическим эффектором многих энергозависимых биосинтетических процессов, в том числе, синтеза гема. Для образования одной субъединицы гема на стадии преобразования пиримидина необходимо 2 молекулы АТФ.

Истощение внутриклеточного пула АТФ тормозит синтез геминовой группы в эритроидных предшественниках, что снижает насыщение гемоглобином клеток. Кроме того, дефицит внутриэритроцитарного АТФ в эритроцитах крови беременных, формируемый при рецидиве герпес-вирусной инфекции (ГВИ), сопровождается дестабилизацией мембраны и преждевременным гемолизом клеток [1]. Также показано непосредственное влияние экспериментальной ГВИ и ЦМВИ на гемопоэтические клетки [4, 9, 10], что изменяет гемопоэз и функциональную активность эритро-

идных клеток.

Подтверждением вышеизложенного явилось увеличение числа эритроцитов в мазках крови беременных с рецидивом ЦМВИ на сроке 20-22 недели гестации, окрашенных метиленовым синим (рис. 4). При этом максимальное число окрашенных эритроцитов выявлялось при титре антител IgG 1:1600 (рис. 4а) и составило  $12,0 \pm 0,9\%$  (в контрольной группе –

$3,0 \pm 0,08\%$ ;  $p < 0,05$ ). При титре антител IgG 1:800 (рис. 4б) показатели были на уровне  $7,6 \pm 0,5\%$  ( $p < 0,05$ ). Данный факт свидетельствовал об ингибирующем действии ЦМВИ на активность окислительно-восстановительных процессов, протекающих в эритроцитах беременных, в том числе, системы НАДФН/дисульфид редуктазы, участвующей в восстановлении окисленного гемоглобина.

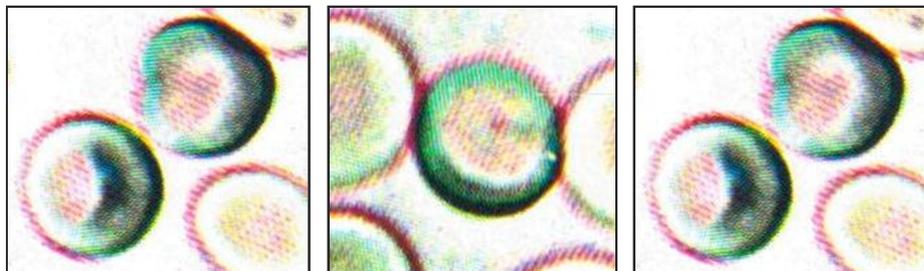


Рис. 1. Ретикулоциты периферической крови беременной (контрольная группа). В клетках высокая активность биосинтетических процессов. Преобладает базофилия клеток. Окраска 0,1% раствором метиленового синего. Увеличение:  $15 \times 100$ .

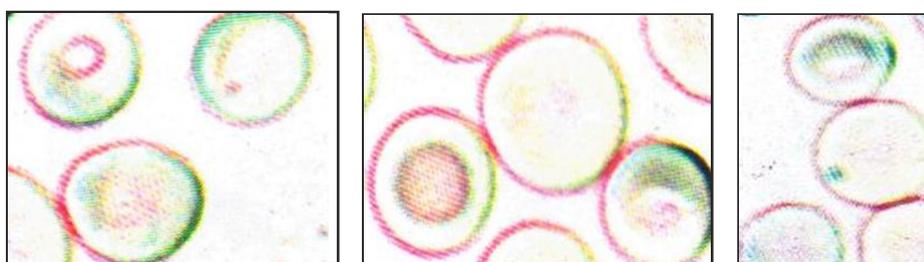


Рис. 2. Эритроциты периферической крови беременной (контрольная группа). В клетках высокая активность гемоглобинообразовательных процессов. Преобладает оксифилия. Окраска 0,1% раствором метиленового синего. Увеличение:  $15 \times 100$ .

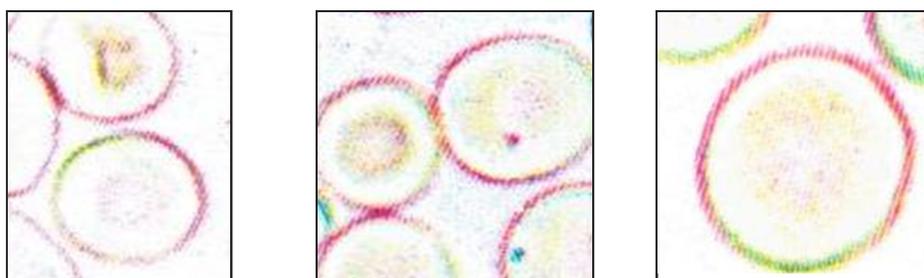
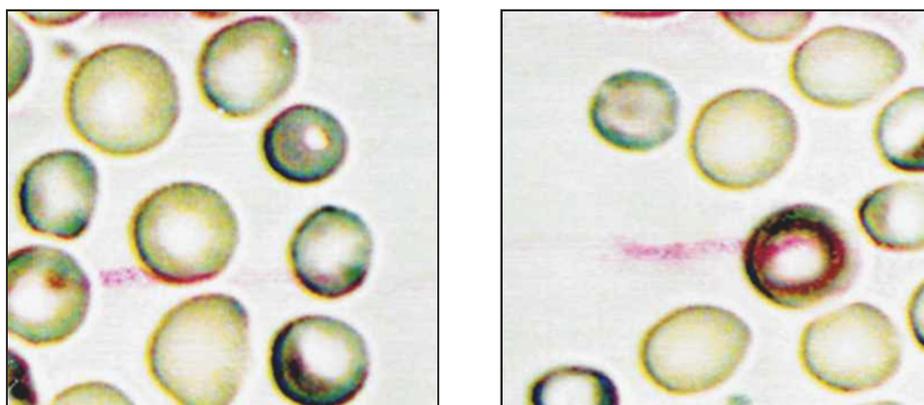


Рис. 3. Эритроциты крови беременной (контрольная группа). В клетках доминирует оксифильная реакция на гемоглобин. Окраска 0,1% раствором метиленового синего. Увеличение:  $15 \times 100$ .



а

б

Рис. 4. Эритроциты крови беременной с рецидивом ЦМВИ на 22 неделе гестации. Количество эритроцитов, окрашенных метиленовым синим, увеличено: а – титр антител IgG к ЦМВ 1:1600; б – титр антител IgG к ЦМВ 1:800. Окраска 0,1% раствором метиленового синего. Увеличение:  $10 \times 100$ .

Одновременно при биохимическом исследовании эритроцитов крови беременных с ЦМВИ определялось подавление активности энергообразующих процессов, что проявлялось в гидролизе значительной части как общего ( $p < 0,05$ ), так и связанного с гемоглобином ( $p < 0,05$ ) АТФ, с максимальным проявлением при титре антител IgG 1:1600 (табл.). На этом фоне выявлялось изменение состояния процессов окислительного фос-

форилирования, что способствовало нарушению баланса фосфатов в клетке и проявлялось ростом показателей общего ( $p < 0,05$ ) и неорганического внутриэритроцитарного ( $p < 0,05$ ) фосфора, наиболее выраженных при высоком уровне антителообразования.

Таким образом, реактивация ЦМВ в организме беременной на сроке 20-22 недели гестации способствует

инактивации ферментных систем гликолитического цикла и системы НАДФН/дисульфид редуктазы, участвующей в восстановлении окисленного гемоглобина, истощению внутриэритроцитарного пула АТФ, что является причиной возникновения нарушений реологии крови, ее кислородтранспортных и микроциркуляторных свойств.

**Таблица**  
**Показатели энергетического обмена в эритроцитах крови беременных с рецидивом ЦМВИ на 20-22 неделе гестации (M±m)**

Титр антител IgG к ЦМВ	Основная группа	Контрольная группа
Общий АТФ, мкмоль/мл		
1:1600	0,65±0,05*	1,07±0,03
1:800	0,77±0,03*	
АТФ, связанный с гемоглобином, мкмоль/мл		
1:1600	4,32±0,05*	5,8±0,03
1:800	4,73±0,03*	
Общий фосфор, мкмоль/мл		
1:1600	0,151±0,03*	0,137±0,02
1:800	0,138±0,04*	
Неорганический фосфор, мкмоль/мл		
1:1600	0,096±0,05*	0,077±0,05
1:800	0,088±0,03*	

*Примечание:* \* – достоверность различий по отношению к контрольной группе при  $p < 0,05$ .

**ЛИТЕРАТУРА**

- 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.
- Андриевская И.А. Характер окислительно-восстановительных процессов в эритроцитро рожениц и новорожденных при герпес-вирусной инфекции // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2008. Вып.28. С.33–35.
- Руководство по гематологии: в 3-х т. / под ред. А.И.Воробьева. М.: Ньюдиамед, 2007. 1275 с.
- Влияние экспериментальной герпетической инфекции на кроветворение / М.Р.Карпова [и др.] // Бюл. эксп. биол. мед. 1999. Т.127, приложение 1. С.79–81.
- 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.
- Пат. 2499260 RU Способ оценки индуцирующего действия цитомегаловирусной инфекции на содержание метгемоглобина в эритроцитах периферической крови беременных на третьем триместре гестации /

М.Т.Луценко, И.А.Андриевская, О.Л.Кутепова; опубл. 14.08.2012.

- Луценко М.Т., Надточий Е.В. Морфофункциональные изменения в эритроцитах периферической крови при гипоксии у больных с бронхиальной астмой // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2009. Вып.31. С.12–15.
- Arya R., Lauton D.N., Bellingham A.J. Hereditary red cell enzymopathies // Blood Rev. 1995. Vol.9, №3. P. 165-175.
- Beutler E. The molecular biology of G6PD variants and other red cell enzyme defect // Annu. Rev. Med. 1992. Vol.43. P.47–59.
- Natural killer cells are required for extramedullary hematopoiesis following murine cytomegalovirus infection / S.Jordan [et al.] // Cell Host & Microbe. 2013. Vol.13, №5. P.535–545
- van Wijk R., van Solinge W.W. The energy-less red blood cell is lost: erythrocyte enzyme abnormalities of glycolysis // Blood. 2005. Vol.106, №13. P.4034–4042.
- Yoshikawa H., Minakami S. Regulation of glycolysis in human red cell // Folia Haematol. 1968. Vol.89, №4. P.357–375.

**REFERENCES**

- Andrievskaya I.A. *Bülleten' fiziologii i patologii dyhaniyâ* 2007; 24:57–60.
- Andrievskaya I.A. *Bülleten' fiziologii i patologii dyhaniyâ* 2008; 28:33–35.
- Vorob'ev A.I., editor. *Rukovodstvo po gematologii* [Manual on Hematology]. Moscow: N'yudiamed; 2007.
- Karпова M.R., Zvereva I.F., Kudelina O.V., Novitskiy V.V. *Byullleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny* 1999; 127(Suppl.1):79–81.
- Luganova I.S., Blinova M.N. *Laboratornoe delo* 1975; 11:625–654.
- Lutsenko M.T., Andrievskaya I.A., Kutepova O.L. *Patent 2499260 RU. Sposob otsenki indutsiryuyushchego deystviya tsitomegalovirusnoy infektsii na sodержание metgemoglobina v eritrotsitakh perifericheskoy krovi beremennykh na tret'em trimestre gestatsii* (Patent 2499260 RU. The method of estimation of induces action of cytomegalovirus infection on methemoglobin content in erythrocytes in peripheral blood of pregnant women in the third trimester of gestation); published 14.08.2012.
- Lutsenko M.T., Nadtochiy E.V. *Bülleten' fiziologii i patologii dyhaniyâ* 2009; 31:12–15.
- Arya R., Lauton D.N., Bellingham A.J. Hereditary red cell enzymopathies. *Blood Rev.* 1995; 9(3):165–175.
- Beutler E. The molecular biology of G6PD variants and other red cell enzyme defect. *Annu. Rev. Med.* 1992; 43:47–59.
- Jordan S., Ruzsics Z., Mitrović M., Baranek T., Arapović J., Krmpotić A., Vivier E., Dalod M., Jonjić S., Dölken L., Koszinowski U.H. Natural killer cells are required for extramedullary hematopoiesis following murine cytomegalovirus infection. *Cell Host & Microbe* 2013; 13(5):535–545
- van Wijk R., van Solinge W.W. The energy-less red blood cell is lost: erythrocyte enzyme abnormalities of gly-

colysis. *Blood* 2005; 106(13):4034–4042.

12. Yoshikawa H., Minakami S. Regulation of gly-

colysis in human red cell. *Folia Haematol.* 1968; 89(4):

357–375.

*Поступила 16.12.2013*

*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 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*