

УДК 612.127.2:618.3]578.825.12

**ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ КАРБОНАГГИДРАЗЫ И ЕЕ ВЛИЯНИЯ НА ПРОЦЕССЫ ОКСИГЕНАЦИИ ЭРИТРОЦИТОВ КРОВИ БЕРЕМЕННЫХ ПРИ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ****М.Т.Луценко, И.А.Андриевская***Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания,  
675000, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22***РЕЗЮМЕ**

Цель исследования – разработка гистохимического метода оценки активности карбоангидразы в эритроцитах крови с целью прогнозирования развития гемической гипоксии у беременных при рецидиве цитомегаловирусной инфекции (ЦМВИ) в сроке 8-9 недель. Обследовано 40 женщин, в том числе 25 ЦМВ-серопозитивных беременных с рецидивом ЦМВИ в сроке 8-9 недель, и 15 серонегативных беременных на тех же сроках гестации. Верификация ЦМВ, определение типоспецифических антител класса IgM и IgG, индекса avidности проводились методом иммуноферментного анализа, выявление ДНК ЦМВ – методом ПЦР, карбоангидраза в эритроцитах крови – по методу Курата (в модификации М.Т.Луценко, И.А.Андриевской), содержание оксигемоглобина – по методу Эвелина и Мэллой. В результате выявлено уменьшение числа эритроцитов крови беременных при рецидиве ЦМВИ в сроке 8-9 недель до  $65,0 \pm 2,2\%$  (в контроле –  $85,0 \pm 3,2\%$ ,  $p < 0,001$ ), имеющих реакцию на карбоангидразу на уровне  $0,015 \pm 0,002$  усл. ед. (в контроле –  $0,059 \pm 0,004$  усл. ед.,  $p < 0,001$ ), и снижение содержания оксигемоглобина до  $93,0 \pm 1,5\%$  (в контроле –  $99,0 \pm 1,0\%$ ,  $p < 0,001$ ). Таким образом, развитие гемической гипоксии у беременных при рецидиве ЦМВИ в сроке 8-9 недель способствует угнетению активности карбоангидразы в эритроцитах, что приводит к аккумуляции карбаминных комплексов, снижению сродства гемоглобина к кислороду и образованию оксигемоглобина.

*Ключевые слова:* цитомегаловирусная инфекция, гемическая гипоксия, беременность, эритроциты, карбоангидраза, гемоглобин.

**SUMMARY****THE ESTIMATION OF CARBONIC ANHYDRASE AND ITS INFLUENCE ON THE PROCESSES OF OXYGENATION OF BLOOD ERYTHROCYTES OF PREGNANT WOMEN AT CYTOMEGALOVIRUS INFECTION****M.T.Lutsenko, I.A.Andrievskaya***Far Eastern Scientific Center of Physiology and  
Pathology of Respiration, 22 Kalinina Str.,  
Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation*

The aim of the research is to develop histochemical method of estimation of carbonic anhydrase in blood erythrocytes to predict the development of hemic hypoxia in pregnant women under the relapse of cytomegalovirus infection (CMVI) at the 8-9<sup>th</sup> weeks. 40

women were examined, including 25 women with CMV-seropositive pregnant women with the relapse of CMVI at the 8-9<sup>th</sup> weeks and 15 seronegative pregnant women at the same gestation stage. CMV verification, the identification of type-specific antibodies of IgM and IgG, of avidity index was done by the method of immune-enzyme analysis, of CMV DNA by PCR method, of carbonic anhydrase in blood erythrocytes by Kurate method (in the modification of M.T.Lutsenko, I.A.Andrievskaya), of oxyhemoglobin concentration by the method of Malloy-Evelyn. As a result there was found the decrease of the number of blood erythrocytes in pregnant women under the relapse of CMVI at the 8-9<sup>th</sup> weeks till  $65.0 \pm 2.2\%$  (in the control it was  $85.0 \pm 3.2\%$ ,  $p < 0.001$ ), who had a response to carbonic anhydrase at the level of  $0.015 \pm 0.002$  arb. units (in the control it was  $0.059 \pm 0.004$  arb. units,  $p < 0.001$ ), and the decrease of oxyhemoglobin concentration till  $93.0 \pm 1.5\%$  (in the control it was  $99.0 \pm 1.0\%$ ,  $p < 0.001$ ). Thus, the development of hemic hypoxia of pregnant women under the relapse of CMVI at the 8-9<sup>th</sup> weeks is conditioned by the suppression of carbonic anhydrase activity in erythrocytes, which leads to the accumulation of aminoform complexes, the decrease of hemoglobin oxygen affinity and the formation of oxyhemoglobin.

*Key words:* cytomegalovirus infection, hemic hypoxia, pregnancy, erythrocytes, carbonic anhydrase, hemoglobin.

Одним из ферментов, принимающим непосредственное участие в связывании и выведении из организма углекислого газа, образующегося в процессе тканевого дыхания, является карбоангидраза [3, 6]. Фермент обеспечивает поддержание концентрации  $\text{CO}_2$  в тканях на физиологическом уровне, регулирует постоянство концентрации анионов крови, влияет на транспорт кислорода к тканям, формирует тип обмена веществ. Участвуя во многих физиологических процессах, карбоангидраза обеспечивает оптимальное состояние внутренней среды организма. В норме активность карбоангидразы крови довольно постоянна, но при некоторых патологических состояниях, таких как анемия, заболевания легких и беременность, может изменяться, что нарушает процесс оксигенации эритроцитов.

Для определения активности карбоангидразы в настоящее время применяют радиологические, иммуноэлектрофоретические, колориметрические и титриметрические методы. Определение производят в цельной крови, взятой с гепарином, или в гемолизованных эритроцитах. Для клинических целей используют колориметрические методы определения

активности карбоангидразы (например, модификации метода Бринкмана), основанные на установлении времени, необходимого для сдвига рН инкубационной смеси с 9,0 до 6,3 в результате гидратации  $\text{CO}_2$  [1].

В настоящей работе рассматривается возможность применения гистохимического метода, что позволит повысить точность функциональной и количественной оценки продуктов реакции на карбоангидразу в нативных эритроцитах, а, следовательно, своевременно на доклиническом уровне определять угрозу формирования гемической гипоксии у беременных при рецидиве цитомегаловирусной инфекции (ЦМВИ).

#### Материалы и методы исследования

Обследовано 40 беременных, в том числе 25 серопозитивных с рецидивом ЦМВИ (титр антител IgG 1:1600) в сроке 8-9 недель (основная группа) и 15 ЦМВ-серонегативных беременных на тех же сроках гестации (контрольная группа).

Критерии включения в основную группу: лабораторно подтвержденный молекулярно-биологическими и серологическими методами исследования рецидив ЦМВИ в сроке 8-9 недель, наличие в периферической крови беременных на момент исследования титра антител класса IgG к ЦМВ 1:1600, стойкая клиническая ремиссия герпесвирусной инфекции. К критериям исключения относили первичную ЦМВИ, обострение других воспалительных заболеваний экстрагенитальной патологии и инфекций, передающихся половым путем.

Рецидив ЦМВИ устанавливали на основании результатов комплексного исследования периферической крови: при наличии антител класса IgM или четырехкратного и более нарастания титра антител класса IgG к ЦМВ в парных сыворотках в динамике через 10 суток, при индексе avidности антител класса IgG к ЦМВ более 65%, а также в случае выявления ДНК ЦМВ методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в крови, моче, в соскобах с букального эпителия или слизистой оболочки шейки матки.

Исследования выполнены в лаборатории механизмов этиопатогенеза и восстановительных процессов дыхательной системы при неспецифических заболеваниях легких и акушерском отделении патологии беременности при ДНЦ ФПД, Городской клинической больнице г. Благовещенска с учетом требований Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki, 2008) и Правил клинической практики в Российской Федерации, утвержденных приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. №266. Работа одобрена комитетом по биомедицинской этике при ДНЦ ФПД (решение №88 от 12.01.2015 г.) в соответствии с принципами конвенции о биомедицине и правах человека, а также общепризнанными нормами международного права. Все женщины подписали письменное информированное согласие.

У обследуемых беременных взятие крови проводили из локтевой вены в стандартные вакуумные про-

бирки с коагулянтом в количестве 5 мл для получения образцов мононуклеарных клеток. Для серологических исследований использовали кровь, не содержащую антикоагулянты. Выделение мононуклеарных клеток крови для ПЦР проводилось с использованием раствора фиколл-урографина плотностью 1,077 г/мл (ООО «НПО ДНК-технология», Россия). Серологические исследования проводили в парных сыворотках с интервалом 10-14 суток.

Верификация ЦМВ, определение типоспецифических антител, индекса avidности осуществляли методами ИФА на спектрофотометре Stat Fax 2100 (США) с использованием тест-систем ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск), ДНК ЦМВ выявляли методами ПЦР на аппарате ДТ-96 с использованием наборов НПО «ДНК-технология» (Россия).

Карбоангидразу в эритроцитах периферической крови выявляли гистохимическим методом [4]. Суть метода заключалась в инкубации при комнатной температуре в течение 15-20 мин. 1 мл эритроцитарной массы с 2 мл свежеприготовленного и профильтрованного раствора субстрата, состоящего из 5 мл 8%  $\text{NaHCO}_3$  и 1 мл 10%  $\text{CoCl}_2$ , с последующим центрифугированием при 1500 г в течение 1-2 мин. Супернатант удаляли декантацией. Эритроциты отмывали два раза бикарбонатным буфером (рН 7,2-7,4) с последующим центрифугированием при 1500 г в течение 1-2 мин. К отмывым и открученным эритроцитам добавляли 1 мл 2% раствора сульфида аммония или натрия. Инкубировали в течение 2 мин. Эритроциты отмывали два раза бикарбонатным буфером (рН 7,2-7,4) с последующим центрифугированием при 1500 г в течение 1-2 мин. После чего готовили монослойный мазок на центрифуге Diff Spin-2 (США). Полученные мазки высушивали и изучали при иммерсии под цифровым микроскопом МТ (Япония), который связан с программно-аппаратным комплексом SCION Corporation (США), позволяющим выделять на изображении с мазка каждую клетку в отдельности, и после выделения клетки определять ее площадь с выявленным продуктом реакции на карбоангидразу.

Статистический анализ и обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.0. Для определения достоверности различий использовали непарный параметрический критерий Стьюдента. Данные представлены как среднее арифметическое (M)  $\pm$  стандартная ошибка среднего (m). Определялись: чувствительность, специфичность и точность метода оценки активности карбоангидразы в эритроцитах крови.

#### Результаты исследования и их обсуждение

Как известно,  $\text{CO}_2$  способен соединяться с атомом железа гемоглобина с образованием карбаминовых комплексов, изменяя его свойства и реакцию с кислородом. Очень высокое сродство  $\text{CO}_2$  к гемоглобину (в 200 раз выше, чем у кислорода) блокирует один или более атомов железа в молекуле гема, изменяя при этом сродство гемоглобина к кислороду.

Образование карбаминных комплексов в эритроците в норме приводит, во-первых, к значительному высвобождению ионов водорода; во-вторых, в ходе образования карбаминного гемоглобина снижается сродство гемоглобина к кислороду. Эффект сходен с действием низкого рН, которое потенцирует высвобождение кислорода из оксигемоглобина при высокой концентрации  $\text{CO}_2$  (эффект Бора) [2, 5, 7, 8].

С другой стороны, связывание кислорода гемоглобином снижает сродство его аминогрупп к  $\text{CO}_2$  (эффект Холдена).

При угнетении активности карбоангидразы в эритроцитах происходит аккумуляция  $\text{CO}_2$  вследствие не-

достаточности процессов гидратации, что инициирует образование карбаминных комплексов, лимитирующих присоединение кислорода к гемоглобину и образование его оксигенированной формы.

Доказательством (рис. А) явилось уменьшение числа эритроцитов крови беременных с рецидивом ЦМВИ в сроке 8-9 недель до  $65,0 \pm 2,2\%$  ( $p < 0,001$ ), имеющих реакцию на карбоангидразу в пределах значений  $0,015 \pm 0,002$  усл. ед. ( $p < 0,001$ ). В контрольной группе  $85,0 \pm 3,2\%$  эритроцитов крови беременных имели интенсивную реакцию на карбоангидразу, что составило  $0,059 \pm 0,004$  усл. ед. (рис. Б).

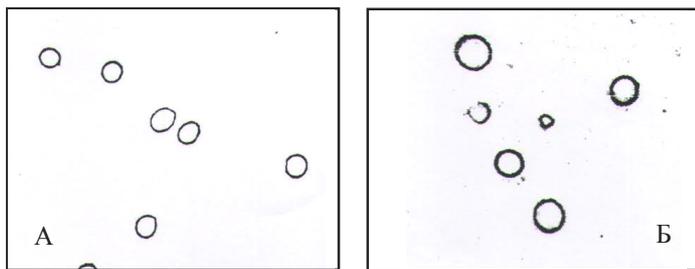


Рис. Гистохимическая реакция на карбоангидразу в эритроцитах периферической крови беременных при сроке 8-9 недель. А – основная группа, интенсивность реакции снижена ( $0,015 \pm 0,002$  усл. ед.); Б – контрольная группа, интенсивная реакция на карбоангидразу ( $0,059 \pm 0,004$  усл. ед.). Окраска по методу Курата (в модификации М.Т.Луценко, И.А.Андриевской). Увеличение:  $10 \times 100$ .

Исследование уровня оксигемоглобина в эритроцитах крови беременных с рецидивом ЦМВИ в сроке 8-9 недель показало снижение его количества до  $93,0 \pm 1,5\%$  ( $p < 0,001$ ) при контроле  $99,0 \pm 1,0\%$ .

При проведении анализа эффективности гистохимического метода оценки активности карбоангидразы эритроцитов крови беременных при рецидиве ЦМВИ в сроке 8-9 недель с целью прогнозирования гемической гипоксии получили чувствительность – 90,9%, специфичность – 75% и точность метода – 88%, что говорило о хорошей клинической значимости данного метода.

Полученные данные позволяют предположить, что карбоангидраза, как один из аллостерических факторов, принимает непосредственное участие в метаболизме кислорода, регулируя через процессы гидратации  $\text{CO}_2$  сродство гемоглобина к кислороду и образование оксигемоглобина.

Развитию гемической гипоксии у беременных при рецидиве ЦМВИ в сроке 8-9 недель способствует угнетение активности карбоангидразы в эритроцитах, что приводит к аккумуляции карбаминных комплексов, снижению сродства гемоглобина к кислороду и образованию оксигемоглобина.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Андриевская И.А. Характер дыхательной активности крови у беременных с герпес-вирусной инфекцией // *Фундаментальные аспекты оценки фетоплацентарной недостаточности при вирусных заболеваниях во время беременности* / под ред. М.Т.Луценко. Благовещенск: АМГУ, 2008. С.54–72.
2. Плацентарная недостаточность / Т.С.Быстрицкая, М.Т.Луценко, Д.С.Лысяк, В.П.Колосов. Благовещенск, 2010. 135 с.
3. Клиническая оценка лабораторных тестов / под ред. Н.У.Тиц; пер. с англ. М.: Медицина, 1986. 480 с.

4. Патент 2537180 RU. Способ оценки ингибирующего действия цитомегаловирусной инфекции на активность карбоангидразы в эритроцитах периферической крови беременных / М.Т.Луценко, И.А.Андриевская; заявл. 31.10.2014; опубл. 27.12.2014. Бюл. №36.
5. Руководство по гематологии: в 3-х т. / под ред. А.И.Воробьева. М.: Ньюдиамед, 2007. 1275 с.
6. Физиология человека / под ред. В.М.Покровского, Г.М.Коротько. М.: Медицина, 2007. 656 с.
7. The production of carbon monoxide from hemoglobin in vivo / R.F.Coburn [et al.]. // *J. Clin. Invest.* 1967. Vol.46, №3. P.346–356.
8. Carbon monoxide production associated with ineffective erythropoiesis / P.White. [et al.]. // *J. Clin. Invest.* 1967. Vol.46, №12. P.1986–1998.

**REFERENCES**

1. Andrievska I.A. The nature of the respiratory activity of the blood of pregnant women with herpes viral infection. In: Lutsenko M.T., editor. *Fundamental aspects of the assessment of fetoplacental insufficiency in viral diseases during pregnancy*. Blagoveshchensk; 2008: 54–72 (in russian).
2. Bystritskaya T.S., Lutsenko M.T., Lysyak D.S., Kolosov V.P. Placental insufficiency. Blagoveshchensk; 2010 (in russian).
3. Tietz N.U. *Clinical guide to laboratory tests*. Moscow; 1986 (in russian).
4. Patent 2537180 RU. Lutsenko M.T., Andrievska I.A. The method to evaluate the inhibitory effect of CMV infection on the activity of carbonic anhydrase in red blood cells in peripheral blood of pregnant women; published 27.12.2014 (in russian).
5. Vorob'ev A.I., editor. *Manual on Hematology*. Moscow: N'yudiamed; 2007 (in russian).
6. Pokrovskiy V.M., Korot'ko G.M., editors. *Human*

physiology. Moscow: Meditsina; 2007 (in russian).

7. Coburn R.F., Williams W.J., White P., Kahn S.B. The production of carbon monoxide from hemoglobin in vivo. *J. Clin. Invest.* 1967; 46(3):346–356.

8. White P., Coburn R.F., Williams W.J., Goldwein M.I., Rother M.L., Shafer B.C. Carbon monoxide production associated with ineffective erythropoiesis. *J. Clin. Invest.* 1967; 46(12):1986–1998.

*Поступила 03.04.2015*

*Контактная информация*

*Михаил Тимофеевич Луценко,*

*доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, руководитель 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: Lucenkomt@mail.ru*

*Correspondence should be addressed to*

*Mikhail T. Lutsenko,*

*MD, PhD, Professor, Academician of 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,*

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

*E-mail: Lucenkomt@mail.ru*