

УДК 618.38(577.125.8+616.155-007.1):616-053.31]578.825.12

**ИЗМЕНЕНИЯ СОСТАВА ФОСФОЛИПИДОВ И МИКРОВЯЗКОСТЬ МЕМБРАНЫ
ЭРИТРОЦИТОВ КРОВИ ПУПОВИНЫ НОВОРОЖДЕННЫХ ОТ МАТЕРЕЙ
С ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ****Н.А.Ишутина, Н.Н.Дорофиев***Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания,
675000, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22***РЕЗЮМЕ**

Цель работы – изучение особенностей состава фосфолипидов во взаимосвязи с изменением микровязкости мембраны эритроцитов в крови пуповины новорожденных от матерей с цитомегаловирусной инфекцией. Исследование проведено в крови пуповины 45 новорожденных от матерей, перенесших в различные сроки гестации обострение цитомегаловирусной инфекции (титр антител IgG к цитомегаловирусу 1:1600) – основная группа. Группу сравнения составили 45 новорожденных от матерей с физиологическим течением беременности. На основании полученных данных сделано заключение, что при цитомегаловирусной инфекции у матери, в крови пуповины новорожденных отмечается активация процессов перекисного окисления липидов и изменения в содержании в мембране эритроцитов как структурных: фосфатидилэтаноламина, фосфатидилхолина (снижение концентрации на 21 и 23%, соответственно, $p<0,001$), так и минорных (снижение концентрации фосфатидилинозитола на 25%, $p<0,001$) фосфолипидов. С увеличением количества конечных продуктов перекисного окисления липидов и нарушением состава фосфолипидов в мембране повышается микровязкость ($p<0,001$), что способствует снижению скорости диффузии кислорода и ухудшению оксигенации эритроцитов. В то же время, избыточное накопление лизоформ (повышение содержания лизофосфатидилхолина более чем в 2 раза, $p<0,001$) фосфолипидов ведет к токсическому влиянию на клетку, нарушая мембранный транспорт, модифицируя активность мембраносвязанных белков, что в конечном итоге приводит к уменьшению устойчивости эритроцитов к действию лизирующих факторов. Данные изменения спектра фосфолипидов в мембране эритроцитов способствуют сокращению жизни красных клеток крови и могут явиться причиной возникновения гипоксии. Изучение данных показателей в клинической практике можно использовать в качестве дополнительных критериев оценки тяжести патологического состояния, а также оценки эффективности проводимого лечения.

Ключевые слова: цитомегаловирусная инфекция, мембрана эритроцитов, кровь пуповины, фосфолипиды, микровязкость.

SUMMARY**THE CHANGE OF PHOSPHOLIPIDS
COMPOSITION AND ERYTHROCYTES****MEMBRANE MICROVISCOSITY IN
UMBILICAL CORD BLOOD OF NEWBORNS
FROM MOTHERS WITH
CYTOMEGALOVIRUS INFECTION****N.A.Ishutina, N.N.Dorofienko***Far Eastern Scientific Center of Physiology and
Pathology of Respiration, 22 Kalinina Str.,
Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation*

The aim was to study the features of the phospholipids composition in relation with the change of erythrocytes membrane microviscosity in the umbilical cord blood of newborns from mothers with cytomegalovirus infection. The umbilical cord blood was investigated in 45 newborns from mothers who had an exacerbation of cytomegalovirus infection (titer of IgG antibodies to cytomegalovirus is 1:1600) at different periods of gestation (the main group). The comparison group consisted of 45 newborns from mothers with physiological pregnancy. It was concluded that if there was a cytomegalovirus infection in the mother, in the umbilical cord blood of newborns there was an activation of lipid peroxidation and changes in the contents in the membrane of red blood cells of both structural phospholipids: phosphatidylethanolamine, phosphatidylcholine (the reduction of concentration by 21 and 23%, respectively, $p<0.001$) and minor phospholipids (phosphatidylinositol concentration reduction by 25%, $p<0.001$). With the increasing number of end-products of lipid peroxidation and the disturbance of phospholipid composition in the membrane, microviscosity increased ($p<0.001$), which reduced the rate of diffusion of oxygen and worsened the oxygenation of red blood cells. At the same time, the excessive accumulation of phospholipids lysoforms (the increase of the content of lysophosphatidylcholine more than 2 times, $p<0.001$) leads to toxic effects on the cell, disrupting membrane transportation, modifying the activity of membrane proteins, which eventually leads to reduced stability of red blood cells to the action of lysing factors. These spectral changes in the erythrocyte membrane phospholipids help reduce the life of red blood cells and may cause hypoxia. The study of these indicators can be used in clinical practice as additional criteria for evaluating the severity of a pathological condition, as well as assessing the effectiveness of the treatment.

Key words: cytomegalovirus infection, the membrane of red blood cells, umbilical cord blood, phospholipids, microviscosity.

В настоящее время установлено, что цитомегалови-

русная инфекция (ЦМВИ) имеет большое значение в акушерской и гинекологической практике, а также в педиатрии [10, 14]. У беременных ЦМВИ приводит к спонтанному прерыванию беременности, развитию хронической плацентарной недостаточности, внутриутробной гипоксии и задержки внутриутробного роста плода, преждевременным родам [1, 9].

Реализация внутриутробной инфекции у новорожденного во многом зависит от его иммунитета, который определяется состоянием здоровья матери [12]. Носительство хронической инфекции у матери во время беременности способствует длительной внутриутробной антигенной стимуляции иммунной системы плода и приводит к нарушениям формирования адекватного иммунного ответа новорожденного [3, 16].

Немаловажное значение в процессе реализации инфекционного процесса играют инициация свободнорадикального окисления и протективная роль системы антиоксидантной защиты. Практически при любой патологии и любом неблагоприятном (стрессовом) воздействии на организм активируются процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ), что приводит к накоплению токсических веществ, которые относят к эндотоксинам [5].

Основным субстратом ПОЛ служат ненасыщенные жирные кислоты – компоненты глицерофосфолипидов биомембран [6]. На сегодняшний день не вызывает сомнений тот факт, что при многих патологических состояниях изменения начинаются с ультраструктурного повреждения на уровне клеточных мембран, одна из ведущих ролей в формировании и организации которых принадлежит липидам, в том числе, фосфолипидам [15, 18, 21].

Естественно, что дисбаланс в обмене липидов, если таковой выявляется, будет одним из звеньев патогенеза регистрируемых нарушений и потребует своевременной и адекватной коррекции [18, 21]. Исследование данных параметров указывает на их существенную роль в развитии осложнений беременности, патологии плода и новорожденного [11, 16, 19]. Несмотря на наличие работ, затрагивающих метаболизм фосфолипидов, установить выраженность изменения их представительности в мембране эритроцитов у новорожденных при ЦМВИ по литературным источникам не предоставляется возможным.

Цель исследования – изучить особенности состава фосфолипидов и микровязкость мембраны эритроцитов крови пуповины новорожденных от матерей, перенесших в период гестации обострение ЦМВИ (титр антител Ig класса G к ЦМВ 1:1600).

Материалы и методы исследования

Объектом для исследования послужили 45 образцов крови пуповины, полученных при родах от женщин, перенесших в различные периоды гестации ЦМВИ – основная группа. Контрольную группу составили образцы крови пуповины от практически здоровых женщин (n=45).

Изучение фосфолипидов мембраны эритроцитов

крови пуповины новорожденных осуществляли методом тонкослойной хроматографии [8]. Липиды экстрагировали по Фолчу [20].

Измерение микровязкости (величина, обратная текучести) мембраны эритроцитов проводили методом латеральной диффузии гидрофобного флуоресцентного зонда пирена [4]. Определение микровязкости основано на образовании эксимеров (активных димеров) пирена в липидном окружении. Флуоресценцию пирена измеряли на спектрофлуориметре 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. Коэффициент эксимеризации находится в обратной зависимости от микровязкости.

У беременных ЦМВИ проявлялась в виде симптомов острого респираторного заболевания, сопровождающегося ринофарингитом. Клинический диагноз – обострение 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. Верификация ЦМВ, определение типоспецифических антител, индекса avidности осуществлялись методами ИФА на спектрофотометре Stat Fax-2100 с использованием тест-систем ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск), выявление ДНК ЦМВ методами ПЦР проводилось на аппарате ДТ-96 с использованием наборов НПО «ДНК-технология» (Москва).

Все исследования были проведены в соответствии с принципами конвенции о биомедицине и правах человека, а также общепризнанными нормами международного права и одобрены комитетом по биомедицинской этике при ДНЦ ФПД У всех пациентов было получено информированное согласие на использование данных обследования в научных целях.

Статистическая обработка и анализ данных осуществлялась с использованием стандартного пакета прикладных программ Statistica 6.1 Stat-Soft Inc, США. Анализируемые в работе количественные данные имели нормальное распределение, поэтому рассчитывалась достоверность различий значений по Стьюденту – вычисление средней арифметической (M), средней ошибки (m). Во всех процедурах статистического анализа критический уровень значимости нулевой статистической гипотезы (p) принимался равным 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

Исследования, проведенные нами ранее [7], показали, что при обострении ЦМВИ у матери, в крови пуповины новорожденных процессы ПОЛ находились на достаточно высоком уровне. Усиление процессов перекисидации в крови пуповины новорожденных от ма-

терей с ЦМВИ не могло не отразиться на содержании и соотношении фосфолипидов, входящих в состав липидного слоя эритроцитарной мембраны.

Так, в мембране эритроцитов новорожденных основной группы отмечалось достоверное снижение со-

держания фосфатидилэтаноламина на 21% ($p < 0,001$) и фосфатидилхолина на 23% ($p < 0,001$), по сравнению с аналогичными показателями контрольной группы (табл.).

Таблица

Фосфолипидный состав и микровязкость липидного бислоя мембраны эритроцитов крови пуповины новорожденных от матерей с ЦМВИ ($M \pm m$)

Показатели	Контрольная группа	Основная группа	p
Фосфатидилэтаноламин, %	22,41 $\pm$ 0,14	17,65 $\pm$ 0,10	<0,001
Фосфатидилхолин, %	26,10 $\pm$ 0,22	20,34 $\pm$ 0,16	<0,001
Сфингомиелин, %	19,41 $\pm$ 0,09	23,93 $\pm$ 0,15	<0,001
Лизофосфатидилхолин, %	6,70 $\pm$ 0,10	13,80 $\pm$ 0,12	<0,001
Фосфатидилинозитол, %	14,01 $\pm$ 0,12	10,46 $\pm$ 0,10	<0,001
Фосфатидилсерин, %	11,37 $\pm$ 0,11	13,82 $\pm$ 0,12	<0,001
Ез/Ем, отн. ед.	0,76 $\pm$ 0,04	0,48 $\pm$ 0,02	<0,001

Одновременно в мембране эритроцитов крови пуповины новорожденных основной группы определялось повышение концентрации сфингомиелина на 21% ($p < 0,001$), по сравнению с контролем (табл.). Как известно, сфингомиелин не подвергается действию фосфолипаз и, возможно, замещает фосфатидилхолин, что в какой-то мере направлено на сохранение структурной целостности эритроцитарной мембраны.

Так же в основной группе новорожденных был повышен более чем в 2 раза ($p < 0,001$) показатель фракции лизофосфатидилхолина, который тесно связан с активацией фосфолипазы A_2 [13]. Наши предыдущие исследования показали, что для новорожденных с ЦМВИ характерен высокий уровень содержания фосфолипазы A_2 [7]. Под влиянием данного фермента образуются довольно токсичные жирные кислоты (арахидоновая кислота) и еще более агрессивные лизоформы. Накопление лизофосфатидилхолина в мембране эритроцитов приводит к заметным нарушениям формы клетки и стабильности мембран вплоть до гемолиза эритроцитов [17].

Уровень фосфатидилинозитола в пуповинной крови новорожденных основной группы снижался на 25% ($p < 0,001$) при одновременном увеличении на 22% ($p < 0,001$) концентрации фосфатидисерина (табл.).

Очевидно, что установленные изменения состава фосфолипидов явились следствием низкой устойчивости эритроцитов крови пуповины к действию повреждающих факторов (конечные продукты ПОЛ, лизофосфолипиды), запускающих каскад мембранодеструктивных процессов. 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.

Известно, что структурные липиды мембран (преимущественно фосфолипиды и холестерин) опреде-

ляют текучесть их глубинных слоев. При этом текучесть мембраны зависит от содержания ненасыщенных жирных кислот в фосфолипидах, концентрации двухвалентных катионов [2]. Поэтому, учитывая важную роль структурных свойств мембран клеток в определении их функционального статуса, было проведено флюоресцентное зондирование эритроцитов. Степень эксимеризации неполярного зонда пирена, диффундирующего в гидрофобном компартменте мембраны, характеризует подвижность углеводных цепей липидов, что позволяет использовать данный параметр для исследования вязкостных свойств липидной мембраны [4]. Поэтому нарушение фосфолипидного состава мембраны эритроцитов явились причиной снижения текучести и увеличения микровязкостных свойств клеток в условиях ЦМВИ. Данный факт подтверждался достоверно низкими значениями флюоресценции липотропного зонда пирен в липидном бислое (табл.).

Заключение

Таким образом, на основании полученных данных можно сделать вывод, что при ЦМВИ у матери, в крови пуповины новорожденных отмечается активация процессов ПОЛ и изменения в содержании в мембране эритроцитов как структурных (фосфатидилэтаноламин, фосфатидилхолин), так и минорных (фосфатидилинозитол) фосфолипидов. С увеличением количества конечных продуктов ПОЛ и нарушением состава фосфолипидов в мембране повышается микровязкость, что способствует снижению скорости диффузии кислорода и ухудшению оксигенации эритроцитов. В то же время, избыточное накопление лизоформ фосфолипидов ведет к токсическому влиянию на клетку, нарушая мембранный транспорт, модифицируя активность мембраносвязанных белков, что, в конечном итоге, приводит к уменьшению устойчивости эритроцитов к действию лизирующих факторов.

Данные изменения спектра фосфолипидов в мем-

бране эритроцитов способствуют сокращению жизни красных клеток крови и могут явиться причиной возникновения гипоксии. Изучение данных показателей в клинической практике можно использовать в качестве дополнительных критериев оценки тяжести патологического состояния, а также оценки эффективности проводимого лечения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Плацентарная недостаточность / Т.С.Быстрицкая, М.Т.Луценко, Д.С.Лысяк, В.П.Колосов. Благовещенск, 2010. 135 с.
2. Векшин Н.Л. Об использовании пирена в качестве люминесцентного индикатора вязкости модельных и биологических мембран // Биол. науки. 1987. №11. С.59–66.
3. Володин Н.Н., Дегтярева М.В. Иммунология перинатального периода // Педиатрия. 2001. №4. С.4–8.
4. Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов. М.: Наука, 1989. 277 с.
5. Збаражский Ю.В. Синдром эндогенного токсикоза у новорожденных с бактериальным менингитом // Український журнал екстремальної медицини ім. Г.О.Можаєва. 2012. Т.13, №4. С.64–67.
6. Иванова О.Ю., Газазян М.Г., Пономарева Н.А. Состояние вазорегулирующей функции эндотелия при физиологическом и осложненном течении беременности // Курский научно-практ. вестник «Человек и его здоровье». 2010. №4. С.67–72.
7. Ишутина Н.А., Дорофиев Н.Н. Интенсивность процессов перекисного окисления липидов и состояние антиоксидантной системы в крови пуповины новорожденных от матерей с цитомегаловирусной инфекцией // Успехи соврем. естествознания. 2014. №9. С.11–13.
8. Кирхнер Ю. Тонкослойная хроматография: пер. с. англ. М.: Мир, 1981. Т.1. 616 с.
9. Кузьмин В.И. Цитомегаловирусная инфекция у беременных и новорожденных // Леч. врач. 2001. №10. С.55–58.
10. Мельникова С.Е., Троик Е.Б. Цитомегаловирусная инфекция и беременность // Детская медицина Северо-Запада. 2012. Т.3, №3. С.63–67.
11. Нарушение содержания липидов в мембране красных клеток крови у пациенток с различной тяжестью течения гестоза / Т.И.Мирошниченко, А.А.Конопля, И.Н.Медведева, Н.А.Быстрова // Фундаментальные исследования. 2012. №12. С.78–81.
12. Новикова О.Н., Ушакова Г.А., Вавин Г.В. Состояние здоровья и медиаторы иммунного ответа у новорожденных при внутриутробном инфицировании // Сиб. мед. журн. (Иркутск). 2013. Т.28, №2. С.59–63.
13. Проказова Н.В., Звездина Н.Д., Каратаева А.А. Влияние лизофосфатидилхолина на передачу трансмембранного сигнала внутрь клетки // Биохимия. 1998. Т.63, №1. С.38–46.
14. Смирнова А.И., Россикина Е.В., Дюпина Н.С. Роль цитомегаловирусной инфекции в акушерской патологии и неонатологии // Вятский мед. вестник. 2010. №4. С.41–47.
15. Изменение проницаемости мембран эритроцитов у новорожденных, перенесших внутриутробную гипоксию / В.В. Софронов, Н.О. Туаева, Т.Е. Анисимова, Т.А.Сибгатуллин, Е.А.Мишагина, Г.К.Зиятдинова, А.В.Анисимов, С.А.Любин // Казанский мед. журн. 2010. Т.91, №1. С.62–65.
16. Сухих Т.В., Ванько Л.В., Кулаков В.И. Иммуни-тет и генитальный герпес. Н. Новгород: НГМА, 1997. 224 с.
17. Метаболические аспекты патологии эритроцитарных мембран у детей, больных муковисцидозом / Т.И.Туркина, С.Ю.Семькин, Т.Ю.Капустина, Д.В.Мар-тыновский, Г.Р.Мутовин // Педиатрия. 2010. Т.89, №4. С.36–39.
18. Шишкина Л.Н., Шевченко О.Г. Липиды эритроцитов крови и их функциональная активность // Успехи соврем. биологии. 2010. Т.130, №6. С.587–602.
19. Шишко Г.А., Сапотцкий А.В. Параметры интенсивной терапии и структурно-функциональное состояние мембран эритроцитов у недоношенных новорожденных с различными оценками по шкале Апгар // Репродукт. здоровье Беларуси. 2009. №4(4). С.85–93.
20. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animals tissues // J. Biol. Chem. 1957. Vol.226. P.497–509.
21. Ye X. Lysophospholipid signaling in the function and pathology of the reproductive system // Hum. Reprod. Update. 2008. Vol.14, №5. P.519–536.

REFERENCES

1. Bystritskaya T.S., Lutsenko M.T., Lysyak D.S., Kolosov V.P. Placental insufficiency. Blagoveshchensk; 2010 (in russian).
2. Vekshin N.L. *Biologicheskie nauki* 1987; 11:59–66 (in russian).
3. Volodin N.N., Degtyareva M.V. *Pediatrica* 2001; 4:4–8 (in russian).
4. Dobretsov G.E. Fluorescent probes in the study of cell, membranes and lipoproteins. Moscow: Nauka; 1989 (in russian).
5. Zbarazhskiy Yu.V. *Ukrainskiy zhurnal ekstremalnoy meditsiny imeni G.O.Mozhaeva* 2012; 4:64–67 (in russian).
6. Ivanova O.Yu., Gazazyan M.G., Ponomareva N.A. *Kurskiy nauchno-prakticheskiy vestnik «Chelovek i ego zdorov'e»* 2010; 4: 67-72 (in russian).
7. Ishutina N.A., Dorofienko N.N. *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya* 2014; 9:11–13 (in russian).
8. Kirchner J. Thin-layer chromatography. Moscow: Mir; 1981 (in russian).
9. Kuz'min V.I. *Lechaschiy vrach* 2001; 10: 55-58 (in russian).
10. Melnikova S.E., Troik E.B. *Detskaya meditsina Severo-Zapada* 2012; 3(3):63–67 (in russian).
11. Miroshnichenko T.I., Konoplya A.A., Medvedeva I.N., Bystrova N.A. *Fundamentalnye issledovaniya* 2012;

12:78–81 (in russian).

12. Novikova O.N., Ushakova G.A., Vavin G.V. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Irkutsk)* 2013; 28(2):59–63 (in russian).

13. Prokazova N.V., Zvezdina N.D., Karataeva A.A. *Biokhimiya* 1998; 63(1):38–46 (in russian).

14. Smirnova A.I., Rossikhina E.V., Dyupina N.S. *Vyatskiy meditsinskiy vestnik* 2010; 4:41–47 (in russian).

15. Sofronov V.V., Tuaeve N.O., Anisimova T.E., Sibgatulin T.A., Mishagina E.A., Ziyatdinova G.K., Anisimov A.V., Lyubin S.A. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal* 2010; 91(1):62–65 (in russian).

16. Sukhikh T.V., Van'ko L.V., Kulakov V.I. Immunity and genital herpes. Nizhniy Novgorod: NGMA; 1997 (in

russian).

17. Turkina T.I., Semykin S.Yu., Kapustina T.Yu., Martynovskiy D.V., Mutovin G.R. *Pediatrics* 2010; 89(4):36–39 (in russian).

18. Shishkina L.N., Shevchenko O.G. *Uspekhi sovremennoy biologii* 2010; 130(6):587–602 (in russian).

19. Shishko G.A., Sapotskiy A.V. *Reproduktivnoe zdorov'e Belarusi* 2009; 4:85–93 (in russian).

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

21. Ye X. Lysophospholipid signaling in the function and pathology of the reproductive system. *Hum. Reprod. Update* 2008; 14(5):519–536.

Поступила 23.06.2015

Контактная информация

Наталья Александровна Ишутина,

доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник 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: ishutina-na@mail.ru

Correspondence should be addressed to

Natalia A. Ishutina,

PhD, 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