

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИСПЫТАНИЯ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

УДК 577.125.53:618.36:578.825.12

Н.А. Ишутина

РОЛЬ НАРУШЕНИЙ СОСТАВА ФОСФОЛИПИДОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ В ПЕРИОД ГЕСТАЦИИ

ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания», Благовещенск, Россия

Исследовали фосфолипиды и фосфолипазу A_2 у беременных с цитомегаловирусной инфекцией. Обострение заболевания сопровождается деструктивными явлениями, в основе которых лежит активация фосфолипазы A_2 и модификация фосфолипидной матрицы: уменьшение фосфатидилэтаноламина, фосфатидилхолина (в среднем на 16–17 %, $p < 0,001$), повышение лизофосфатидилхолина (более 51 %, $p < 0,001$). Данные изменения могут явиться фактором нарушения деформируемости клеток, гемолиза эритроцитов, увеличения микровязкости крови и быть причиной развития внутриутробной гипоксии плода.

Ключевые слова: фосфолипиды, фосфолипаза A_2 , беременность, цитомегаловирусная инфекция

ROLE OF COMPOSITIONAL DISORDERS IN PHOSPHOLIPIDS IN THE PATHOGENESIS OF CYTOMEGALOVIRUS INFECTION IN THE GESTATION PERIOD

N.A. Ishutina

Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, Blagoveshchensk, Russia

We studied the composition of phospholipids and phospholipase A_2 in 96 pregnant women with cytomegalovirus infection (titer of IgG antibodies to cytomegalovirus 1 : 1600). It was found that the aggravation of CMV infection in pregnant women is accompanied with membrane-destructive phenomena, which are based on the activation of phospholipase A_2 and the modification of the phospholipid matrix exhibits decrease of phosphatidylethanolamine (I trimester – by 24 %, II trimester – by 16 %, III trimester – by 9 % ($p < 0,001$)); phosphatidylcholine (I trimester – by 14 %, II trimester – by 16 %, III trimester – 23 % ($p < 0,001$)); phosphatidylserine (I trimester – by 46 % ($p < 0,001$), II trimester – by 33 % ($p < 0,01$), III trimester – by 101 % ($p < 0,001$)). Increasing the concentration of sphingomyelin (I trimester – by 16 %, II and III trimesters – by 9 %; $p < 0,001$), lysophosphatidylcholine (I trimester – by 71 %, II trimester – 59 %, III trimester – by 51 % ($p < 0,001$)) compared with healthy women. Identified changes may be the significant factor in violation of the deformability of cells, red blood cell hemolysis, increased microviscosity blood, and therefore is the cause of fetal hypoxia.

Key words: phospholipids, phospholipase A_2 , pregnancy, cytomegalovirus infection

В настоящее время не вызывает сомнения тот факт, что перекисное окисление липидов (ПОЛ) вносит весомый вклад в патогенез вирусной инфекции во время беременности [3, 7]. Интенсификация процессов пероксидации липидов сопровождается значительным изменением состава и степени окисленности мембранных фосфолипидов и жирных кислот [2, 6, 7], что способствует снижению активности фосфолипидзависимых энзиматических систем, а в конечном итоге приводит к нарушению целостности липидного бислоя клеточных мембран [8]. В условиях активного течения ПОЛ наиболее резко уменьшается количество фосфолипидов, имеющих в своем составе полиненасыщенные жирные кислоты – фосфотидилэтаноламин (Pe), фосфотидилинозитол (Pi) [1]. Избирательная делипидизация мембран вызывает рост отношения холестерина/фосфолипиды, изменения физико-химических свойств мембран и увеличение их микровязкости [8]. В связи с вышеизложенным целью данного исследования явилось изучение роли нарушений состава фосфолипидов мембраны эритро-

цитов в патогенезе цитомегаловирусной инфекции (ЦМВИ) в период гестации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служили мембрана эритроцитов 96 беременных с обострением хронической ЦМВИ (титр антител IgG к цитомегаловирусу (ЦМВ) 1 : 1600) в разные сроки гестации, составивших основную группу. В качестве контрольной группы обследовано 90 практически здоровых женщин на тех же сроках гестации.

Определяли количественный состав фосфолипидов, результаты выражали в процентах от общей суммы. Липиды экстрагировали по методу Folcha [10]. Готовые экстракты разделяли на индивидуальные фракции фосфолипидов на пластинках с тонким слоем силикагеля (Woelm, Германия). Двухмерную тонкослойную хроматографию и идентификацию индивидуальных фракций фосфолипидов осуществляли по методу Кирхнера [4]. Количественное определение фракций проводилось спектрофотометрически.

Содержание фосфолипазы A_2 в периферической крови беременных с ЦМВИ определяли методом ИФА с помощью реактивов фирмы «Cayman chemical» (США).

У женщин симптоматически ЦМВИ проявлялась в виде 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, выявление ДНК ЦМВ – методами ПЦР.

Все исследования были проведены с учетом требований Хельсинкской декларации Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками от 2008 г. и правилами клинической практики в РФ, утвержденными приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 226.

Все расчеты проводились с использованием программного обеспечения Statistica 6.0. Проверку нормальности распределения проводили по критерию Колмогорова – Смирнова. Анализируемые в статье

данные имели нормальное распределение, поэтому проводился расчет средней арифметической (M) и ошибки средней арифметической (m). Проверку гипотезы о статистической значимости различных двух выборок проводили с помощью t -критерия Стьюдента и считали значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При анализе результатов исследования было установлено нарушение количественного состава фосфолипидов у женщин с обострением ЦМВИ (табл. 1).

Так, в мембране эритроцитов женщин основной группы концентрация Pe в I триместре снижалась на 24 % ($p < 0,001$), на 16 % – во II триместре ($p < 0,001$) и на 9 % – в III триместре ($p < 0,001$), по сравнению с аналогичным показателем контрольной группы (табл. 1).

Выявленное снижение доли легкоокисляемого ненасыщенного Pe у женщин основной группы явилось следствием активации процессов ПОЛ.

Аналогичная динамика изменений наблюдалась и для другого структурного фосфолипида – фосфатидилхолина (Pc). Его концентрация уменьшалась в мембране эритроцитов беременных основной группы в I триместре на 14 % ($p < 0,001$), во II триместре – на

Таблица 1
Состав фосфолипидов мембраны эритроцитов и содержание фосфолипазы A_2 плазмы периферической крови у беременных с ЦМВИ ($M \pm m$)

Показатель	Группа		
	I триместр	II триместр	III триместр
Фосфатидилэтаноламин (Pe), %			
Контрольная	21,10 \pm 1,0	20,60 \pm 0,60	23,40 \pm 0,60
Основная	18,22 \pm 0,76; $p < 0,001$	17,39 \pm 0,51; $p < 0,001$	21,39 \pm 0,21; $p < 0,001$
Фосфатидилхолин (Pc), %			
Контрольная ($n = 32$)	30,90 \pm 0,80	32,20 \pm 1,30	33,10 \pm 0,80
Основная ($n = 30$)	26,57 \pm 0,32; $p < 0,001$	27,15 \pm 0,44; $p < 0,001$	25,58 \pm 0,26; $p < 0,001$
Сфингомиелин (Sph), %			
Контрольная ($n = 32$)	20,20 \pm 0,80	20,60 \pm 0,60	22,50 \pm 0,50
Основная ($n = 30$)	23,47 \pm 0,36; $p < 0,001$	22,53 \pm 0,32; $p < 0,01$	24,63 \pm 0,19; $p < 0,001$
Лизофосфатидилхолин (Lpc), %			
Контрольная ($n = 32$)	4,0 \pm 0,70	5,30 \pm 0,60	7,20 \pm 1,20
Основная ($n = 30$)	6,85 \pm 0,47; $p < 0,001$	8,44 \pm 0,25; $p < 0,001$	10,89 \pm 0,12; $p < 0,001$
Фосфатидилинозитол (Pi), %			
Контрольная ($n = 32$)	12,80 \pm 0,50	12,30 \pm 0,40	9,80 \pm 0,30
Основная ($n = 30$)	11,29 \pm 0,44; $p < 0,05$	11,47 \pm 0,35	8,71 \pm 0,11; $p < 0,01$
Фосфатидилсерин (Ps), %			
Контрольная ($n = 32$)	7,80 \pm 0,65	9,60 \pm 0,80	4,0 \pm 0,20
Основная ($n = 30$)	11,39 \pm 0,31; $p < 0,001$	12,78 \pm 0,55; $p < 0,01$	8,05 \pm 0,37; $p < 0,001$
Фосфолипаза A_2, нг/мл			
Контрольная ($n = 32$)	0,29 \pm 0,07	0,38 \pm 0,06	0,45 \pm 0,08
Основная ($n = 30$)	0,46 \pm 0,08; $p < 0,001$	0,51 \pm 0,05; $p < 0,001$	0,72 \pm 0,06; $p < 0,001$

Примечание. p – уровень значимости различий между показателями контрольной группы.

16 % ($p < 0,001$) и в III триместре – на 23 % ($p < 0,001$), по сравнению с показателем контрольной группы (табл. 1).

Причины изменения содержания Рс разнообразны и могут быть обусловлены нарушением его синтеза *de novo*, расходом в энергетических процессах и антиокислительных функциях [9]. Влияние на уровень Рс также может оказывать активность эндогенных фосфолипаз. Обеднение эритроцитов Рс, формирующим внешнюю оболочку липидного матрикса клетки, свидетельствует о дезинтеграции мембранных структур, завершающихся их деструкцией.

В ранее опубликованной работе [3] мы показали, что процессы ПОЛ в условиях ЦМВИ при беременности находятся на достаточно высоком уровне. Если активность ПОЛ превышает физиологические потребности, то под влиянием «окислительного стресса» развивается мембранная патология. При сильных и стрессовых реакциях, когда активируется ПОЛ с фосфорилированием, индуцируется аутокаталитическая деструкция мембран и хроматина. Основными повреждающими факторами становятся неэстерифицированные жирные кислоты, которые накапливаются вследствие избыточного гидролиза фосфолипидов, а также лизофосфолипиды и продукты ПОЛ. В мембранах повышается содержание фосфолипидов с насыщенными жирными кислотами, жидкость мембран уменьшается [9].

Одним из механизмов регуляции фосфолипидного состава, а значит, целостности структуры биологических мембран, является активация липолитических ферментов, главным образом, фосфолипазы A_2 . Изучение активности данного фермента у женщин основной группы показало увеличение содержания фосфолипазы A_2 на протяжении всего периода гестации (табл. 1). Под влиянием фосфолипазы A_2 образуются довольно токсичные жирные кислоты (арахидоновая кислота) и еще более агрессивные лизоформы. Накопление лизофосфатидилхолина (Лрс) в мембране эритроцитов приводит к заметным нарушениям формы клетки и стабильности мембран вплоть до гемолиза эритроцитов [9]. Доказательством данного суждения служило выявленное повышение содержания Лрс в мембране эритроцитов женщин основной группы в I триместре на 71 % ($p < 0,001$), во II триместре – на 59 % ($p < 0,001$) и в III триместре – на 51 % ($p < 0,001$), по сравнению с аналогичным показателем контрольной группы (табл. 1). Увеличение содержания Лрс, обладающего мембранотоксическим действием, способствует разрыхлению гидрофобной области липидного слоя мембраны эритроцитов.

К выявленным изменениям состава фосфолипидов у беременных с ЦМВИ относится повышение процентного содержания сфингомиелина (Sph) в I триместре на 16 % ($p < 0,001$), во II и в III триместрах – на 9 % ($p < 0,001$), по сравнению с контролем (табл. 1).

При определении минорных фракций фосфолипидов обращала на себя внимание выявленная тенденция к увеличению содержания Рi на протяжении всего периода гестации, по сравнению с аналогичным показателем контрольной группы (табл. 1). Согласно

литературным данным, снижение содержания Рi в структуре мембран может происходить вследствие его большего расходования в качестве предшественника вторичного мессенджера внутриклеточных процессов – диацилглицерола [1], а также деградации в результате усиления ПОЛ полиненасыщенных жирных кислот, которыми богат данный фосфолипид [5].

Изучая содержание фосфатидилсерина (Ps) в мембране эритроцитов женщин основной группы, мы выявили повышение концентрации данного фосфолипида в I триместре на 46 % ($p < 0,001$), во II триместре – на 33 % ($p < 0,01$) и в III триместре – на 101 % ($p < 0,001$), по сравнению с аналогичным показателем контрольной группы (табл. 1).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, на основании полученных данных можно сделать вывод о том, что обострение хронической ЦМВИ в период беременности сопровождается активацией процессов ПОЛ, увеличением содержания фосфолипазы A_2 , изменением состава фосфолипидных компонентов и их структурной организацией и проявляется снижением содержания Рс, Рс, Рi при увеличении концентрации Лрс, Sph, Ps. Выявленные изменения в мембране эритроцитов могут явиться существенным фактором нарушения деформируемости клеток, гемолиза эритроцитов, увеличения вязкости крови, а следовательно, могут быть причиной развития внутриутробной гипоксии плода. Нарушение фосфолипидного состава мембраны эритроцитов у беременных вносит определенный вклад в патогенез ЦМВИ.

ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Болдырев А.А., Кяйвярайнен Е.И., Илюха В.А. Биомембранология. – Петрозаводск: Изд-во КарНЦ РАН, 2006. – 226 с.
Boldyrev AA, Kyajvyaryajnen EI, Ilyukha VA (2006). Biomembranology [Biomembranologija], 226.
2. Ишутина Н.А. Антиокислительная активность олеиновой кислоты у беременных с герпес-вирусной инфекцией // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2013. – № 1. – С. 25–28.
Ishutina NA (2013). Antioxidant activity of oleic acid in pregnant women with herpes virus infection [Antioxislitel'naja aktivnost' oleinovoj kisloty u beremennyh s herpes-virusnoj infekciej]. *Bjull. VSNC SO RAMN*, 1, 25–28.
3. Ишутина Н.А., Дорофиев Н.Н. Пероксидация липидов при беременности, осложненной цитомегаловирусной инфекцией // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2014. – № 54. – С. 66–69.
Ishutina NA, Dorofienko NN (2014). Lipid peroxidation at the pregnancy complicated by cytomegalovirus infection [Peroksidatsiya lipidov pri beremennosti, oslozhennoy tsitomegalovirusnoy infektsiej]. *Bjulleten' fiziologii i patologii dyhaniya*, 54, 66–69.
4. Тонкослойная хроматография / пер с англ. Ю. Кирхнер. – М.: Мир, 1981. – С. 52–115.
Kirkhner Y (transl.) (1981). Thin layer chromatography [Tonkoslojnaja hromatografija], 52–115.

5. Коновалова Т.Т., Смирнова И.П. Роль липидов в структурно-функциональной организации клеточных мембран при атеросклерозе и их коррекция у больных ишемической болезнью сердца // Сибирский медицинский журнал (Томск). – 2005. – Т. 55, № 6. – С. 8–14.

Konovallava TT, Smirnova IP (2005). The role of lipids in the structural and functional organization of cell membranes at atherosclerosis and their correction in patients with coronary heart disease [Rol' lipidov v strukturno-funkcional'noj organizacii kletochnyh membran pri ateroskleroze i ih korrekciya u bol'nyh ishemicheskoy bolezniyu serdca]. *Sibirskij medicinskij zhurnal (Tomsk)*, 55 (6), 8-14.

6. Литвицкий П.Ф. Патогенные и адаптивные изменения в сердце при его регионарной ишемии и последующем возобновлении коронарного кровотока // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2002. – № 2. – С. 2–12.

Litvitskiy PF (2002). Pathogenic and adaptive changes in heart at the regional ischemia and further resumption of coronary blood flow [Patogennyye i adaptivnyye izmeneniya v serdce pri ego regional'noy ishemii i posledujushhem vozobnovlenii koronarnogo krovotoka]. *Patologicheskaja fiziologiya i jeksperimental'naja terapiya*, 2, 2-12.

7. Луценко М.Т., Довжикова И.В., Соловьева А.С., Андриевская И.А., Ишутина Н.А. Фетоплацентарная система при герпесной инфекции. – Благовещенск, 2003. – 200 с.

Lutsenko MT, Dovzhikova IV, Solovyova AS, Andrievskaya IA, Ishutina NA (2003). Fetoplacental system at herpes infection [Fetoplacentalnaja sistema pri herpesnoj infekcii], 200.

8. Реброва Т.Ю., Кондратьева Д.С., Афанасьев С.А. Особенности фосфолипидного состава мембран эритроцитов в условиях постинфарктного кардиосклероза // Сибирский медицинский журнал (Томск). – 2011. – Т. 26, № 1-1. – С. 131–133.

Rebrova TY, Kondratyeva DS, Afanasyev SA (2011). Features of phospholipid composition of erythrocyte membranes at postinfarction cardiosclerosis [Osobennosti fosfolipidnogo sostava membran jeritrocitov v uslovijah postinfarktnogo kardioskleroza]. *Sibirskij medicinskij zhurnal (Tomsk)*, 26 (1-1), 131-133.

9. Туркина Т.И., Семькин С.Ю., Капустина Т.Ю. Мартыновский Д.В., Мutowин Г.Р. Метаболические аспекты патологии эритроцитарных мембран у детей, больных муковисцидозом // Педиатрия. – 2010. – Т. 89, № 4. – С. 36–39.

Turkina TI, Semykin SY, Kapustina TY, Martynovskiy DV, Mutovin GR (2010). Metabolic aspects of pathology of erythrocyte membranes in children with cystic fibrosis [Metabolicheskie aspekty patologii jeritrocitarnyh membran u detej, bol'nyh mukoviscidozom]. *Pediatrics*, 89 (4), 36-39.

10. Folch J, Lees M, Sloane GH (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animals tissues. *Biology Chemistry*, 226, 497-509.

Сведения об авторах Information about the authors

Ишутина Наталия Александровна – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания (675000, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22; тел.: 8 (4162) 77-28-16 (рабочий); e-mail: ishutina-na@mail.ru)

Ishutina Nataliya Alexandrovna – Doctor of Biological Sciences, Leading Research Officer of the Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration (675000, Blagoveshchensk, ul. Kalinina, 22; tel.: +7 (4162) 77-28-16; e-mail: ishutina-na@mail.ru)