

Н.А. Ишутина, Н.Н. Дорофиев

ВЗАИМОСВЯЗЬ ИЗМЕНЕНИЙ СОСТАВА ω -6 ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ И СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В МЕМБРАНЕ ЭРИТРОЦИТОВ КРОВИ ПУПОВИНЫ НОВОРОЖДЕННЫХ ПРИ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

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

Исследована взаимосвязь изменений ω -6 жирных кислот и свободнорадикальных процессов в крови пуповины новорожденных с цитомегаловирусной инфекцией. Установлено, что обострение инфекции у матери способствует активации перекисного окисления липидов в крови пуповины, выражающейся увеличением концентрации ТБК-активных продуктов, фосфолипазы A_2 (более чем в 2 раза; $p < 0,001$), и сопряжено с выработкой большого количества линолевой (на 56 %; $p < 0,001$) и арахидоновой (на 34 %; $p < 0,001$) кислот, что может явиться неблагоприятным фактором гестационного процесса.

Ключевые слова: ω -6 линолевая и арахидоновая кислоты, перекисное окисление липидов, кровь пуповины, цитомегаловирусная инфекция

CORRELATION OF CHANGES OF ω -6 POLYUNSATURATED FATTY ACIDS AND FREE RADICAL PROCESSES IN ERYTHROCYTE MEMBRANES OF UMBILICAL CORD OF NEWBORNS WITH CYTOMEGALOVIRUS INFECTION

N.A. Ishutina, N.N. Dorofienko

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

To examine the correlation of changes of ω -6 polyunsaturated fatty acids and free-radical processes in the blood of the umbilical cord of newborns to mothers with cytomegalovirus infection, the content of ω -6 polyunsaturated arachidonic, linoleic fatty acids, the concentration of the products of reacting with thiobarbituric acid and activity of phospholipase A_2 in the membrane of red blood cells of the umbilical cord were studied. The material for the study was the umbilical cord blood of 40 newborns from mothers who had cytomegalovirus infection in the III trimester (titer of IgG antibodies to cytomegalovirus 1 : 1600) – the main group. The control group consisted of 40 infants from healthy women. It was found that the aggravation of chronic cytomegalovirus infection in mothers (titer of IgG antibodies to cytomegalovirus 1 : 1600) contributes to the activation of lipid peroxidation (the repression of antioxidant protection) in the cord blood of newborns, increasing the concentration of TBA-active products on the background of the high activity of phospholipase A_2 (more than 2-fold; $p < 0.001$) and is associated with the generation of large amounts of precursors of pro-inflammatory eicosanoids acids ω -6 family: linoleic (56 %; $p < 0.001$) and arachidonic (34 %; $p < 0.001$). Increase in TBA-active products has a close relation to the content of arachidonic acid in umbilical cord blood of newborns from mothers with cytomegalovirus infection, the correlation coefficient r was 0.78 ($p < 0.001$). The revealed changes in the membrane of red blood cells from the umbilical cord of newborns from mothers with cytomegalovirus infection may become the adverse gestation factor.

Key words: ω -6 linoleic and arachidonic acids, lipid peroxidation, umbilical cord blood, cytomegalovirus infection

Для каждого возрастного периода характерны свои особенности обмена липидов. Эти особенности обусловлены изменением функциональной значимости липидов в онтогенезе. Во внутриутробном периоде основными источниками энергии для плода, наряду с углеводами, являются липиды, поступающие трансплацентарно из крови матери. Поэтому во внутриутробном периоде липиды расходуются на энергетические нужды и используются как пластический материал, включаясь в растущие ткани [9].

Полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) ω -6 семейства – линолевая и арахидоновая – являются незаменимыми жирными кислотами. Они во многом определяют нормальный рост и развитие организма, функциональное состояние сосудистой и нервной систем, кожи и слизистых оболочек, стимулируют процессы неспецифического иммунитета, способствуют удалению бактерий из легких, необходимы для синтеза простагландинов, построения клеточных мембран, миелина [9]. Роль ПНЖК особенно велика во внутриутробном периоде и на ранних этапах развития ребенка, когда производные

эйкозаноидов – нейротрансмиттеры – осуществляют важнейшую функцию в качестве стимуляторов нейро- и синаптогенеза, а также миграции нейронов, оказывая влияние на развитие головного мозга и зрительного анализатора [2]. Арахидоновая кислота является ключевым представителем ПНЖК и основным субстратом синтеза эйкозаноидов. Ее метаболиты выполняют важные регуляторные функции, поскольку в условиях здоровья наиболее значимым является поддержание тонуса мускулатуры, сохранения целостности сосудов, предотвращения кровотоков при травмах [12]. Чрезмерное же накопление арахидоновой кислоты в организме обеспечивает воспалительный процесс [15].

В последнее время появляется все больше исследований о том, что ПНЖК играют важную роль в процессах перекисного окисления липидов (ПОЛ) и антиоксидантной защите (АОЗ) организма. Роль ПНЖК в процессах ПОЛ связывается с их функцией как субстратов свободнорадикального окисления [8]. В связи с вышеизложенным целью настоящего исследования явилось – изучение взаимосвязи процессов

ПОЛ и содержания кислот ω -6 семейства (линолевой и арахидоновой) в крови пуповины новорожденных от матерей, перенесших в III триместре гестации реактивацию хронической цитомегаловирусной инфекции (ЦМВИ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа была выполнена в соответствии с принципами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (2008 г.) и одобрена комитетом по биомедицинской этике при ФГБНУ «ДНЦ ФПД» 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.

Материалом для исследования явилась кровь пуповины от 40 новорожденных, рожденных от матерей, перенесших ЦМВИ в III триместре (титр антител IgG к цитомегаловирусу (ЦМВ) 1 : 11600), – основная группа. В группу контроля вошли 40 новорожденных от практически здоровых рожениц. Симптоматически ЦМВИ у матери 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 на спектрофотометре «Stat-Fax-2100» с использованием тест-систем ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск). Выявление ДНК ЦМВ методами ПЦР выполняли на аппарате ДТ-96 с использованием наборов НПО «ДНК-технология» (Москва).

В мембране эритроцитов крови пуповины методом газожидкостной хроматографии изучали содержание линолевой и арахидоновой ω -6 ПНЖК. Липиды экстрагировали по Фолчу [14]. Метилирование жирных кислот осуществляли по методу Carren [13]. Обсчет и идентификацию пиков выполняли с помощью программно-аппаратного комплекса Хроматэк Аналитик 2.5 по временам удерживания с использованием стандартов фирмы «Supelco» (USA). Количественный расчет хроматограмм проводили методом внутренней нормализации путем определения площадей пиков анализируемых компонентов и их доли (в относительных %) в общей сумме площадей пиков метилированных продуктов высших жирных кислот.

Оценку активности реакций ПОЛ в мембране эритроцитов крови пуповины проводили по уровню ТБК-активных продуктов (ТБК-АП) с применением тиобарбитуровой кислоты (ТБК) по методу В.Б. Гаврилова с соавт. [3].

Статистическая обработка и анализ данных осуществлялись с использованием стандартного пакета прикладных программ Statistica 6.1 (StatSoft Inc., США). Анализируемые в работе количественные данные имели нормальное распределение, поэтому рассчитывалась значимость различий значений по Стьюденту (вычисление средней арифметической

(M), средней ошибки (m)). Для оценки тесноты связи признаков применяли корреляционный анализ с расчетом коэффициента корреляции Пирсона (r). Во всех процедурах статистического анализа критический уровень значимости нулевой статистической гипотезы p принимался равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований было установлено (табл. 1), что обострение ЦМВИ у матери сопровождается активацией процессов ПОЛ и накоплением продуктов перекисидации у новорожденных, о чем свидетельствовал рост концентрации ТБК-АП в мембране эритроцитов крови пуповины более чем в 2 раза ($p < 0,001$), в сравнении с аналогичным показателем контрольной группы, что согласуется с результатами исследований, опубликованными нами ранее [4, 6].

Таблица 1
Содержание ТБК-АП, кислот ω -6 семейства в мембране эритроцитов, фосфолипазы A_2 в сыворотке крови пуповины новорожденных от матерей с ЦМВИ ($M \pm m$)

Показатель	Группа	
	контрольная	основная
ТБК-АП, ммоль/л	11,40 $\pm$ 0,45	24,20 $\pm$ 0,60; $p < 0,001$
Фосфолипаза A_2 , нг/мл	0,20 $\pm$ 0,02	0,42 $\pm$ 0,02; $p < 0,001$
Линолевая кислота, %	4,30 $\pm$ 0,25	5,60 $\pm$ 0,28; $p < 0,001$
Арахидоновая кислота, %	6,72 $\pm$ 0,22	7,50 $\pm$ 0,26; $p < 0,001$

Примечание. p – значимость различий с контрольной группой.

Одной из систем защиты в организме человека является α -токоферол, нейтрализующий токсические продукты, которые образуются в процессе ПОЛ. Основным местом фиксации в клетке α -токоферола являются биологические мембраны. Находясь в липидной фазе биологических мембран, он взаимодействует с токсическими радикалами, предохраняя неповрежденные фосфолипиды, в частности жирные кислоты, от перекисидации. В связи с этим α -токоферол способен оказывать регулирующее влияние на жирно-кислотный состав фосфолипидов, обладая мембраностабилизирующими свойствами [1]. У новорожденных с ЦМВИ нарушалась АОЗ, обусловленная низким уровнем не только α -токоферола, но и биологического антиоксиданта – олеиновой кислоты [5, 6]. Следовательно, несостоятельность АОЗ у новорожденных от матерей с ЦМВИ может привести к существенному нарушению системности ингибирования и усилению липидной перекисидации [10].

Особое значение среди ферментов, участвующих в липидном обмене, занимает фосфолипаза A_2 . За счет роста активности этого фермента происходит снижение уровня ненасыщенных жирных кислот в условиях повышенного образования фосфолипидов. Биохимические исследования показали, что на фоне увеличения в крови пуповины новорожденных основной группы конечных продуктов ПОЛ и снижения

плазменных систем АОЗ отмечался выраженный рост активности фосфолипазы A_2 более чем в 2 раза ($p < 0,001$), по сравнению с аналогичным показателем контрольной группы (табл. 1).

Линолевая кислота является основным предшественником синтеза арахидоновой кислоты в организме человека, поэтому от содержания данной кислоты зависит не только выработка самого арахидоната, но и синтез эйкозаноидов. При изучении количественного содержания линолевой кислоты в крови пуповины новорожденных основной группы нами было выявлено повышение концентрации данной кислоты на 56 % ($p < 0,001$), по сравнению с контролем (табл. 1).

Следует отметить, что арахидоновая кислота, наряду с лизосоединениями, является продуктом гидролиза фосфолипидов. Под действием фосфолипазы A_2 арахидоновая кислота отщепляется от глицерофосфолипида и используется для синтеза эйкозаноидов, которые в свою очередь имеют существенное значение в становлении и регуляции функций всего организма, способствуют нормальному развитию и адаптации человека к неблагоприятным факторам окружающей среды, обеспечению иммунологической защиты [15]. Концентрация арахидоновой кислоты в крови пуповины новорожденных основной группы определялась выше аналогичного показателя в контрольной группе на 34 % ($p < 0,001$) (табл. 1). Избыточное накопление арахидоновой кислоты сопровождается образованием гидроперекисей и провоспалительных ω -6 эйкозаноидов (лейкотриенов, тромбоксанов), которые, запуская порочный круг, усиливают микроциркуляторные расстройства в тканях, гипоксию и метаболические нарушения [1]. Следовательно, в результате увеличения активности фосфолипазы A_2 от молекулы фосфолипидов отщепляется арахидоновая кислота, которая является субстратом свободнорадикальных процессов, и в условиях сниженной АОЗ образуются довольно токсичные конечные продукты ПОЛ – ТБК-АП (в частности малоновый диальдегид), способствующий тканевому воспалению.

При анализе взаимосвязи соотношения концентрации арахидоновой кислоты в крови пуповины новорожденных основной группы с соотношением концентрации ТБК-АП отмечалась прямая связь между данными показателями ($r = 0,78$; $p < 0,001$).

Ранее нами было показано негативное влияние арахидоновой кислоты на эндотелий сосудов пуповины: избыточное содержание арахидоновой кислоты является сильным повреждающим фактором для эндотелия сосудов, поскольку происходит формирование перекисей жирных кислот, повреждающих стенку кровеносных сосудов [7, 11]. Выявленные изменения могут явиться причиной нарушений эластических свойств сосудов, застойных явлений и тромбоза сосудов, а следовательно, нарушений кровотока между матерью и плодом, что в дальнейшем может служить фактором развития внутриутробной гипоксии.

Следовательно, увеличение концентрации линолевой и арахидоновой кислот ω -6 семейства в крови пуповины новорожденных от матерей с ЦМВИ сопря-

жено с активацией процессов ПОЛ и может явиться неблагоприятным фактором гестационного процесса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате проведенного исследования установлено, что обострение хронической ЦМВИ у матери (титр антител IgG к ЦМВ 1 : 1600) способствует активации процессов ПОЛ на фоне подавления АОЗ в крови пуповины их новорожденных, выражающейся увеличением концентрации ТБК-АП на фоне высокой активности фосфолипазы A_2 , и сопряжено с выработкой большого количества предшественников провоспалительных эйкозаноидов: линолевой и арахидоновой ω -6 ПНЖК, – что может явиться неблагоприятным фактором гестационного процесса.

ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Биленко М.В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов (молекулярные механизмы, пути предупреждения и лечение). – М.: Медицина, 1989. – 386 с.

Bilenko MV (1989). Ischemic and reperfusion organ damages (molecular mechanisms, prevention and treatment) [Ishemicheskie i reperfuzionnye povrezhdeniya organov (molekulyarnye mekhanizmy, puti preduprezhdeniya i lechenie)], 386.

2. Боровик Т.Э., Грибакин С.Г., Семёнова Н.Н. Длинноцепочечные полиненасыщенные жирные кислоты и их роль в детском питании. Обзор литературы // Вопросы современной педиатрии. – 2012. – Т. 11, № 4. – С. 21–28.

Borovik TE, Gribakin SG, Semyonova NN (2012). Long-chain polyunsaturated fatty acids and their role in infant food. Literature review [Dlinnotsepochechnye polinenasyshchennye zhirnye kisloty i ikh rol' v detskom pitanii. Obzor literatury]. *Voprosy sovremennoy pediatrii*, 11 (4), 21-28.

3. Гаврилов В.Г., Гаврилова А.Р., Мажуль Л.М. Анализ методов определения продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови по тесту с тиобарбитуровой кислотой // Вопросы медицинской химии. – 1987. – № 1. – С. 118–121.

Gavrilov VG, Gavrilova AR, Mazhul LM (1987). Analysis methods for the determination of lipid peroxidation products in blood serum by the test with thiobarbituric acid [Analiz metodov opredeleniya produktov perekisnogo okisleniya lipidov v syvorotke krovi po testu s tiobarbiturovoy kislotoy]. *Voprosy meditsinskoj khimii*, (1), 118-121.

4. Ишутина Н.А. Липидный состав пуповинной крови от матерей с патологическим течением беременности // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2008. – Вып. 30. – С. 56–58.

Ishutina NA (2008). The lipid composition of umbilical cord blood from mothers with abnormal pregnancy [Lipidnyy sostav pupovinnoy krovi ot materey s patologicheskim techeniem beremennosti]. *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniya*, (30), 56-58.

5. Ишутина Н.А. Антиокислительная активность олеиновой кислоты у беременных с герпес-вирусной

инфекцией // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2013. – № 1. – С. 25–28.

Ishutina NA (2013). Antioxidant activity of oleic acid in pregnant women with herpes [Antioxislitel'naya aktivnost' oleinoy kisloty u beremennykh s herpes-virusnoy infektsiei]. *Byulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo centra*, (1), 25–28.

6. Ишутина Н.А., Дорофиев Н.Н. Интенсивность процессов ПОЛ и состояние антиоксидантной системы в крови пуповины новорожденных от матерей с ЦМВИ // Успехи современного естествознания. – 2014. – № 9. – С. 11–13.

Ishutina NA, Dorofienko NN (2014). The intensity of lipid peroxidation and antioxidant system of the umbilical cord blood of newborns from mothers with cytomegalovirus infection. [Intensivnost' protsessov POL i sostoyanie antioksidantnoy sistemy v krovi pupoviny novorozhdennykh s tsitegomegalovirusnoy infektsiei]. *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya*, (9), 11–13.

7. Ишутина Н.А., Дорофиев Н.Н. Роль арахидоновой кислоты в повреждении эндотелия сосудов пуповины при цитомегаловирусной инфекции // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2014. – Вып. 52. – С. 78–82.

Ishutina NA, Dorofienko NN (2014). The role of arachidonic acid in the damaging of vascular endothelium of the umbilical cord in cytomegalovirus infection [Rol' arakhidonovoy kisloty v povrezhdenii endoteliya sosudov pupiviny pri tsitegomegalovirusnoy infektsii]. *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniya*, (52), 78–82.

8. Конь И.Я., Шилина Н.М., Вольфсон С.Б. Омега-3 ПНЖК в профилактике и лечении болезней детей и взрослых // Лечащий врач. – 2006. – № 4. – С. 55–59.

Kon IY, Shilina NM, Wolfson SB (2006). Omega-3 polyunsaturated fatty acids in the prevention and treatment of diseases of children and adults [Omega-3 polinenasyshennyye zhirnye kisloty v profilaktike i lechenii bolezney detey i vzroslykh]. *Lechaschiy vrach*, (4), 55–59.

9. Масловская А.А. Особенности липидного обмена у детей // Журнал Гродненского государственного медицинского университета – 2010. – № 2. – С. 12–15.

Maslovskaya AA (2010). Features of lipid metabolism in children [Osobennosti lipidnogo obmena u detey]. *Zhurnal Grodnenskogo Gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*, (2), 12–15.

10. Луценко М.Т., Андриевская И.А., Ишутина Н.А. Морфофункциональная характеристика мембран

эритроцитов у беременных, перенесших обострение герпес-вирусной инфекции // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2012. – Т. 154, № 7. – С. 126–129.

Lutsenko MT, Andrievskaya IA, Ishutina NA (2012). Morphofunctional characteristics of erythrocyte membranes in pregnant women who had an exacerbation of herpes [Morfofunktsional'naya kharakteristika membran eritritsitov u beremennykh s obostreniem herpes-virusnoy infektsii]. *Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*, 154 (7), 126–129.

11. Способ оценки влияния герпес-вирусной инфекции на проникновение повышенного количества арахидоновой кислоты в пуповинную кровь новорожденных: Пат. 2485521 Рос. Федерация / Луценко М.Т., Ишутина Н.А.; опубл. 20.06.2013.

Lutsenko MT, Ishutina NA (2013). A method of evaluating the influence of herpesvirus infection on the penetration of increased amounts of arachidonic acid in neonatal cord blood: Patent N 2485521 of Russian Federation [Sposob otsenki vliyaniya herpes-virusnoy infektsii na proniknovenie povyshennogo kolichestva arakhidonovoy kisloty v pupovinnuyu krov' novorozhdennykh]; published 20.06.2013.

12. Титов В.Н. Диагностическое значение определения содержания фосфолипазы A₂ в липопротеинах плазмы крови и функциональные связи с С-реактивным белком // Клиническая лабораторная диагностика. – 2010. – № 8. – С. 3–16.

Titov VN (2010). Diagnostic value of determination of phospholipase A₂ in the blood plasma lipoproteins and functional connection with the C-reactive protein [Diagnosticheskoe znachenie sodержaniya fosfolipazy A₂ v lipoproteinakh plasmy krovi i funktsional'nye svyazi s C-reaktivnym belkom]. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*, (8), 3–16.

13. Carren JP, Dubacy JP-J (1978). Adaptation of a micro-seale method to the micro-seale for fatty acid methyl trausestenif: cation of biological lipid extracts. *Chromatography*, (151), 384–390.

14. 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.

15. Elias SL, Innis SM (2001). Infant plasma trans, n-6 and n-3 fatty acid and conjugated linolic are related to maternal plasma fatty acid, length of gestation and birth weight and length. *Clinical Nutrition*, (73), 807–814.

Сведения об авторах Information about the authors

Ишутина Наталья Александровна – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» (675000, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22; тел.: 8 (4162) 77-28-16; e-mail: ishutina-na@mail.ru)

Ishutina Natalya Aleksandrovna – Doctor of Biological Sciences, Leading Research Officer of Far East Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration (675000, Blagoveshchensk, Kalinin str., 22; tel.: +7 (4162) 77-28-16; e-mail: ishutina-na@mail.ru)

Дорофиев Николай Николаевич – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» (e-mail: dorofienko-nn@mail.ru)

Dorofienko Nikolay Nikolaevich – Candidate of Medical Sciences, Senior Research Officer of Far East Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration (e-mail: dorofienko-nn@mail.ru)