

УДК 577.115.3:618.48-013.68-018.52-06:578.825.11

## ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ НА МИКРОВАЗКОСТЬ МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТОВ ПУПОВИННОЙ КРОВИ ПРИ ГЕРПЕТИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ

Ишутина Н.А.

*Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания СО РАМН, г. Благовещенск*

### РЕЗЮМЕ

Методом газожидкостной хроматографии изучен состав полиненасыщенных жирных кислот мембраны эритроцитов, выделенной из пуповинной крови новорожденных от матерей, перенесших в период гестации обострение герпетической инфекции, и его влияние на микровязкость мембраны. Обнаружены существенные нарушения обмена данных соединений в пуповинной крови новорожденных с обострением герпетической инфекции (титр антител IgG к вирусу простого герпеса 1-го типа 1 : 12 800), которые проявляются дефицитом эссенциальных  $\omega$ -3-кислот при одновременном увеличении предшественника провоспалительных эйкозаноидов  $\omega$ -6-арахидоновой кислоты, способствующее увеличению относительной микровязкости мембраны эритроцитов, что будет являться одной из возможных причин развития гипоксии.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** пуповинная кровь, эритроциты, герпетическая инфекция, полиненасыщенные жирные кислоты, микровязкость мембраны.

### Введение

Длинноцепочечные (эйкозановые) полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) семейства  $\omega$ -6 и  $\omega$ -3, являющиеся предшественниками обширного класса биологически активных соединений (простагландинов, лейкотриенов, тромбоксанов) и участвующие в регуляции различных фаз воспалительного ответа [7, 11], входят в состав фосфолипидов клеточных мембран и в значительной мере определяют их структурные и функциональные свойства [8]. Соотношение основных липидных фракций, степень насыщенности жирных кислот, входящих в их состав, определяют такое понятие, как «текучесть» (величина, обратная микровязкости) липидного бислоя мембраны, влияют на упорядоченность липидных молекул, а также характер липид-липидных и белок-липидных взаимодействий [1]. В связи с этим представляется целесообразным изучение влияния возможных изменений спектра жирных кислот на микровязкость мембраны эритроцитов при герпетической инфекции (ГИ) у новорожденных, у матерей которых имело место тяжелое хроническое течение данного заболевания и нередко приводило к инвалидизации детей. В доступной литературе

имеются единичные исследования по данному вопросу, которые ограничены описанием изменений содержания жирных кислот в пуповинной крови [9], в них отсутствуют данные о влиянии подобных нарушений на микровязкостные свойства мембраны эритроцитов.

Цель исследования – изучить состав ПНЖК и показатели микровязкости мембраны эритроцитов в пуповинной крови новорожденных от матерей, перенесших в различные сроки гестации обострение ГИ (титр антител IgG к вирусу простого герпеса 1-го типа (ВПГ-1) 1 : 12 800).

### Материал и методы

Исследования проведены на базе научной лаборатории «Механизмы этиопатогенеза и восстановительных процессов дыхательной системы при неспецифических заболеваниях легких» совместно с отделением акушерской патологии беременности клиники ФГБУ «ДНЦ ФПД» СО РАМН и городским родильным домом г. Благовещенска.

Для выполнения поставленной цели были обследованы 64 новорожденных. Основную группу составили 32 ребенка, родившихся от матерей, перенесших во время гестации обострение ГИ с титром антител IgG к ВПГ-1 1 : 12 800. В контрольную группу были

✉ *Ишутина Наталья Александровна*, тел. 8-914-554-97-64, e-mail: ishutina-na@mail.ru

включены 32 младенца от практически здоровых матерей.

В мембране эритроцитов пуповинной крови новорожденных исследовали  $\omega$ -3-эйкозапентановую (ЭПК),  $\omega$ -3-докозагексаеновую (ДГК),  $\omega$ -6-арахидоновую (АК) ПНЖК. Липиды экстрагировали по методу Фолча [12]. Жирные кислоты после метилирования [10] определяли методом газожидкостной хроматографии на хроматографе «Кристалл 2000 м» (Россия) с пламенно-ионизационным детектором. Обсчет и идентификацию пиков выполняли с помощью программно-аппаратного комплекса «Хроматэк Аналитик 2,5» по временам удерживания с использованием стандартов фирмы Supelco (США). Количественный расчет хроматограмм выполняли методом внутренней нормализации путем определения площадей пиков анализируемых компонентов и их доли (%) в общей сумме площадей пиков метилированных продуктов высших жирных кислот.

Измерение микровязкости мембраны эритроцитов проводили методом латеральной диффузии гидрофобного флуоресцентного зонда пирена [2]. 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. Для определения микровязкости зоны липид-белковых контактов длина волны возбуждения составляла 286 нм, длина волны мономеров 395 нм, длина волны эксимеров 470 нм. Оценка микровязкости основывается на вычислении коэффициента эксимеризации пирена, который равен отношению интенсивности флуоресценции эксимеров к интенсивности флуоресценции мономеров ( $K_{\text{экс}} = F_{470}/F_{395}$ ). Коэффициент эксимеризации находится в обратной зависимости от микровязкости.

Титр антител к ВПГ-1 определяли в парных сыворотках по динамике антител IgG с помощью стандартных тест-систем ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск) на микропланшетном ридере Stat-Fax 2100 (США). Все исследования были проведены с учетом требований Хельсинкской декларации Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и Правилами клинической практики в Российской Федерации, утвержденными приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 226. Все участники исследований подписали протоколы добровольного информированного согласия.

Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью автоматизированной системы диспансеризации (правообладатель ДНЦ ФПД СО РАМН, 2005 г., версия 2.5). Проверку нормальности распределения проводили по критерию Колмогорова–Смирнова. Анализируемые в статье данные имели нормальное распределение, поэтому проводился расчет среднего арифметического  $M$  и ошибки среднего арифметического  $m$ . Проверку гипотезы о статистической значимости различных двух выборок проводили с помощью  $t$ -критерия Стьюдента и считали значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Состав жирных кислот мембраны эритроцитов пуповинной крови новорожденных от практически здоровых матерей характеризовался преобладанием среди ПНЖК АК семейства  $\omega$ -6 и высоким уровнем ДГК семейства  $\omega$ -3. У новорожденных от матерей с ГИ (титр антител IgG к ВПГ-1 1 : 12 800) наблюдалось резкое снижение в мембране эритроцитов пуповинной крови уровня ЭПК и ДГК (на 34 и 28% соответственно) по сравнению с контролем в сочетании с существенным ростом концентрации АК (на 30%) (таблица).

**Состав полиненасыщенных жирных кислот и микровязкость мембраны эритроцитов в пуповинной крови новорожденных при герпетической инфекции ( $M \pm m$ )**

Показатель	Контроль	Основная группа
ЭПК, %	1,24 $\pm$ 0,15	0,82 $\pm$ 0,12; $p < 0,05$
АК, %	5,60 $\pm$ 0,35	7,30 $\pm$ 0,38; $p < 0,01$
ДГК, %	5,25 $\pm$ 0,40	3,80 $\pm$ 0,39; $p < 0,05$
$K_{\text{экс}}$ липидный бислой, отн. ед.	0,76 $\pm$ 0,04	0,54 $\pm$ 0,02; $p < 0,001$
$K_{\text{экс}}$ зона липид-белковых контактов, отн. ед.	1,13 $\pm$ 0,03	0,80 $\pm$ 0,02; $p < 0,001$

Примечание.  $p$  – уровень статистической значимости различий между показателями в сравнении с контрольной группой.

Выявленные изменения уровня ПНЖК в мембране эритроцитов пуповинной крови при ГИ приводили к изменению ряда показателей, которые характеризуют состояние мембран. Так, при ГИ в мембране эритроцитов пуповинной крови уменьшался показатель эксимеризации пирена как в липидном бислое, так и в зоне липид-белковых контактов на 29% по сравнению с контролем (таблица). Изменение данных показателей указывает на нарушение физико-химических характеристик мембраны и позволяет предположить снижение ее жидкостности (повышение микровязкости), пластичности и текучести вследствие снижения степени ненасыщенности  $\omega$ -3 ПНЖК, входящих в состав мембраны.

Анализ состава ПНЖК в пуповинной крови новорожденных от матерей с ГИ по отношению к контрольным значениям показал нарушение соотношения  $\omega$ -6 и  $\omega$ -3 эссенциальных кислот. Полученные резуль-

таты, а также данные литературы свидетельствуют о том, что при данной патологии происходит повышение концентрации провоспалительного предшественника эйкозаноидов – АК и снижение уровня провоспалительных кислот семейства  $\omega$ -3 (ЭПК, ДГК) [9]. Эту динамику изменений можно объяснить тем, что при ГИ активизируются процессы перекисного окисления липидов [6] и активные формы кислорода, образующиеся в ходе свободнорадикальных реакций, атакуя мембрану, разрушают ненасыщенные жирные кислоты с наибольшим числом двойных связей, тем самым способствуя элиминации их из мембран. Помимо этого снижение содержания  $\omega$ -3 ЭПК и ДГК в пуповинной крови при ГИ может быть результатом уменьшенного их поступления из периферической крови матери на фоне снижения содержания липидпереносящего белка и следствием нарушения обмена данных соединений в тканях плаценты [4, 5, 13].

Усиление процессов липопероксидации приводит к образованию и накоплению высокотоксичных соединений и изменению в составе ПНЖК и в конечном счете к дестабилизации клеточных мембран и субклеточных структур [3]. Доказательством данного суждения явилось снижение коэффициента эксимеризации пирена, диффундирующего в гидрофобном компартменте мембраны, характеризующего подвижность углеводородных цепей. В результате повышается микровязкость, эритроциты утрачивают свою эластичность, теряют способность к изменению формы, необходимой для прохождения по микрососудам, что приводит к усиленному их разрушению в сосудистом русле, создавая тем самым условия для развития гипоксии.

## Заключение

Таким образом, в результате проведенных клинико-биохимических исследований можно заключить, что при обострении ГИ в период гестации в пуповинной крови новорожденных наблюдалось нарушение соотношения  $\omega$ -6 и  $\omega$ -3 ПНЖК в сторону увеличения провоспалительного предшественника эйкозаноидов АК при дефиците эссенциальных  $\omega$ -3 ЭПК и ДГК, способствующее увеличению микровязкости мембраны эритроцитов. Повышение микровязкости эритроцитарной мембраны сопровождается нарушением функционирования их транспортных и ферментных систем и изменением метаболического состояния клетки в целом.

Стойкие нарушения структурно-метаболического статуса и функциональной активности эритроцитов, активация процессов перекисного окисления липидов, возникающие при обострении ГИ, способствуют проявлению тканевой гипоксии, могут явиться причиной развития гемолитической анемии и нарушения окислительно-восстановительных процессов в организме новорожденного ребенка.

## Литература

1. *Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е.* Флюоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М.: Наука, 1980. 320 с.
2. *Добрецов Г.Е.* Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов. М.: Наука, 1989. С. 191–206.
3. *Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньшикова Е.Б.* Окислительный стресс: Биохимический и патофизиологический аспекты. М.: МАИК. Наука/Интерпериодика, 2001. 343 с.
4. *Ишутина Н.А.* Взаимосвязь изменения  $\omega$ -3 и  $\omega$ -6 полиненасыщенных жирных кислот при беременности, осложненной герпес-вирусной инфекцией // *Фундам. исследования.* 2010. № 10. С.55–62.
5. *Ишутина Н.А.*  $\omega$ -3 ПНЖК в гомогенате плацент женщин, перенесших во время гестации обострение герпес-вирусной инфекции // *Бюл. ФПД СО РАМН.* 2011. Вып. 42. С. 64–66.
6. *Ишутина Н.А.* Перекисное окисление липидов и микровязкость мембран эритроцитов у женщин с обострением герпес-вирусной инфекции // *Дальневосточ. мед. журн.* 2012. № 1. С. 59–61
7. *Кольман Я., Рем К.* Наглядная биохимия: пер. с нем. М.: Мир, 2000. 469 с.
8. *Комарова О.Н., Шилина Н.М., Погосий Н.Н. и др.* Изучение лейкотриенов 4-й и 5-й серии в патогенезе бронхиальной астмы у детей // *Педиатрия.* 2006. № 5. С. 35–42.
9. *Сандуляк Т.В.* Липидный статус и нутритивное обеспечение психомоторного развития детей раннего возраста с перинатальной патологией ЦНС, 2005 [Электронный ресурс]. URL: <http://www.xxivek-zdorov.narod.ru/OptPrim.html> (дата обращения 15.03.2013).
10. *Carren J.P., Dubacy J.P.-J.* Adaptation of a micro-seale metod to the micro-seale for fatty acid methyl trauestenif: cation of biological lipid extracts // *Chromatography.* 1978. № 151. P. 384–390.
11. *Funk C.D.* Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology // *Science.* 2001. Vol. 294, № 5548. P. 1871–1875.
12. *Folch J., Lees M., Sloane G.H.* A simple metod for the isolation and purification of total lipids from animals tissues // *Biology Chemistry.* 1957. № 26. P. 497–509.
13. *Lutsenko M.T., Andrievskaja I.A., Ishutina N.A.* Lipid Transport through the Fetoplacental Barrier by the Fatty Acid-Binding Proteins in Pregnant Women with Herpes Virus Infection in third Trimester // *International Journal of Bio-Medicine.* 2012. Vol. 2, № 4. P. 298–301.

Поступила в редакцию 21.03.2013 г.

Утверждена к печати 10.04.2013 г.

**Ишутина Наталья Александровна** (✉) – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник лаборатории «Механизмы этиопатогенеза и восстановительных процессов дыхательной системы при неспецифических заболеваниях легких» Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания СО РАМН (г. Благовещенск).

✉ Ишутина Наталья Александровна, тел. 8-914-554-9764, e-mail: ishutina-na@mail.ru

## INFLUENCE OF COMPOSITION OF POLYUNSATURATED FATTY ACIDS ON MICROVISCOSITY OF THE MEMBRANE OF ERYTHROCYTES OF THE NAVEL OF THE BLOOD AT HERPES INFECTION CONTAMINATIONS

Isutina N.A.

Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration of Siberian Branch RAMS, Blagoveshchensk, Russian Federation

### ABSTRACT

The method of gas-liquid chromatography investigates composition of polyunsaturated fatty acids of membrane of erythrocytes, discharged of navel bloods neonatal from mothers who have transferred in the season gestation exacerbation herpes of an infection contamination and his influence on microviscosity of membrane. Essential infringements of data exchange of bonds in navel bloods neonatal with an exacerbation herpes infection contaminations (antiserum capacity IgG to virus of simple herpes of 1 type 1 : 12 800) which show deficiency essential  $\omega$ -3 acids at simultaneous augmentation of the precursor proinflammatory eicosanoid  $\omega$ -6 arachidonic acids, promoting augmentation of relative microviscosity of membrane of erythrocytes that will be one of probable causes of development of hypoxia are found.

**KEY WORDS:** navel of blood, erythrocytes, herpes an infection contamination, polyunsaturated fatty acids, microviscosity of membrane.

*Bulletin of Siberian Medicine*, 2013, vol. 12, no. 3, pp. 37–40

### References

- Vladimirov Yu.A., Dobrezov G.E. *Fluorescent probes in research of biological membranes*. Moscow, Science Publ., 1980. 320 p. (in Russian).
- Dobrezov G.E. *Fluorescent probes in research of cells, membranes and lipoprotein*. Moscow, Science Publ., 1989. 206 p. (in Russian).
- Zenkov N.K., Lankin V.Z., Menshikov E.B. *Oxidizing stress: Biochemical and pathology aspects*, Moscow MAIK. Science/Interperiodika Publ., 2001. 343 p. (in Russian).
- Ishutina N.A. *The Fundamental Researches*, 2010, no. 10, pp. 55–62 (in Russian).
- Ishutina N.A. *Bulletin physiology and pathology of respiration*, 2011, no. 42, pp. 64–66 (in Russian).
- Ishutina N.A. *Far Eastern Medical Journal*, 2012, no. 1, pp. 59–61 (in Russian).
- Kolman Ya, Rem K. *Visual Biological Chemistry*. Translation from German, Moscow, World Publ., 2000. 469 c. (in Russian).
- Komarova O.N., Shilina N.M., Pogomiy N.B. *Pediatric*, 2006, no. 5, pp. 35–42 (in Russian).
- Sandulyak T.V. The lipide status and nutritive maintenance of psychomotor development of children of early age with перинатальной pathology the central nervous system. URL: // www.xxivek-zdorov.narod.ru/OptPrim.html (Accessed: 15 March 2013) (in Russian).
- Carren J.P., Dubacy J.P.-J. Adaptation of a micro-seale metod to the micro-seale for fatty acid methyl trauestenif: cation of biological lipid extracts. *Chromatography*, 1978, no. 151, pp. 384–390.
- Funk C.D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*, 2001, vol. 294, no. 5548, pp. 1871–875.
- Folch J., Lees M., Sloane G.H. A simple metod for the isolation and purification of total lipids from animals tissues. *Biology Chemistry*, 1957, no. 26, pp. 497–509.
- Lutsenko M.T., Andrievskaja I.A., Ishutina N.A. Lipid Transport through the Fetoplacental Barrier by the Fatty Acid-Binding Proteins in Pregnant Women with Herpes Virus Infection in third Trimester. *International Journal of Bio-Medicine*, 2012, vol. 2, no. 4, pp. 298–301.

Ishutina Nataliya A. (✉), Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration of Siberian Branch RAMS, Blagoveshchensk, Russian Federation.

✉ Ishutina Nataliya A., Ph. +7-914-554-97-64; e-mail: ishutina-na@mail.ru