

М.Т. Луценко, И.А. Андриевская, Н.А. Ишутина, А.Г. Мироненко

Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания, Благовещенск, Российская Федерация

Механизмы формирования гипоксии в период беременности и нарушение кровоснабжения плода при цитомегаловирусной инфекции

Цель исследования: изучить механизмы формирования гипоксии при беременности, ассоциированной с цитомегаловирусной инфекцией (ЦМВИ). **Методы:** обследованы 30 рожениц с рецидивом ЦМВИ на сроке 25–28 нед беременности и их новорожденные. Цитохром С, Hsp-70, p53, Bcl-2 и каспазу-3 в гомогенате плаценты определяли серологическими методами, морфологию эритроцитов изучали с помощью цитофотометрии, белки мембран эритроцитов — методом диск-электрофореза, ТБК-активные продукты — по методу В.Б. Гаврилова, активность супероксиддисмутазы — спектрофотометрическим методом, 2,3-дифосфоглицериновой кислоты (2,3-ДФГ) — по методу И.С. Луганова, микровязкость мембран эритроцитов — флуориметрическим методом, оксигемоглобин и метгемоглобин — по методу Эвелина и Мэллой, деформабельность эритроцитов — по методу М.Т. Луценко. **Результаты:** в эритроцитах крови ЦМВ-серопозитивных рожениц выявлено снижение содержания белков цитоскелета: α - и β -спектрина — в 1,14, анкирина — в 1,62 и белка полосы 4.1 — в 1,29 раза, увеличение антигенсвязывающего гликофорина — в 1,87 раза, ТБК-активных продуктов и показателей микровязкости — в 1,37 раза, снижение активности супероксиддисмутазы — в 1,35, индекса деформабельности — в 9,5, 2,3-ДФГ — в 1,22 и оксигемоглобина — в 1,06 раза. В гомогенате плаценты выявлено снижение Bcl-2 в 1,5 и Hsp-70 в 2,5 раза, увеличение p53 — в 6,1, цитохрома С — в 1,76 и каспазы-3 — в 3,86 раза. В эритроцитах крови пуповины отмечено увеличение 2,3-ДФГ в 1,3 и снижение оксигемоглобина в 1,06 раза. **Заключение:** полученные данные свидетельствуют о том, что рецидив ЦМВИ на сроке 25–28 нед беременности вызывает нарушение морфофункционального состояния эритроцитов крови матери и их способности к оксигенации, строения фетоплацентарного барьера, уменьшение кислородной обеспеченности крови плода и развитие внутриутробной гипоксии.

Ключевые слова: цитомегаловирус, беременность, гипоксия.
(Вестник РАМН. 2015; 1: 106–112)

106

Обоснование

Инфекционные заболевания, вызываемые герпесвирусами, являются одними из наиболее распространенных и обуславливают развитие чрезвычайно широкого спектра клинических проявлений. Это определяет не только медицинскую, но и огромную социальную зна-

чимось проблемы. По данным глобального клинико-эпидемиологического обследования IHMF (International Herpes Management Forum), в котором нет информации по России (по причине отсутствия у нас систематического учета заболеваемости цитомегаловирусной инфекцией), один из наименее изученных вопросов, связанных с цитомегаловирусом (ЦМВ), — это оценка реальной

M.T. Lutsenko, I.A. Andrievskaya, N.A. Ishutina, A.G. Mironenko

Far-Eastern Scientific Centre of Physiology and Pathology of Respiration, Blagoveshchensk, Russian Federation

Mechanisms of Hypoxia Development During Pregnancy and the Disorder of Fetus Blood Supply at Cytomegalovirus Infection

Objective: Our aim was to study the mechanisms of hypoxia development at pregnancy associated with cytomegalovirus infection (CMVI). **Methods:** 30 parturient women with CMVI relapse at the 25–28 weeks of pregnancy and their newborns were examined. Cytochrome C, Hsp-70, p53, Bcl-2 and caspase-3 in placenta homogenate were found out with serologic methods, the morphology of erythrocytes with cytophotometry, erythrocytes membrane proteins with disc-electrophoresis method, TBA-active products with V.B. Gavrilov's method, superoxide dismutase activity with spectrophotometry, 2,3-diphosphoglyceric acid (2.3 DPG) with I.S. Lukanov's method, erythrocytes membrane microviscosity with fluorimetric method, oxyhemoglobin and methemoglobin with Evelyn and Malloy' method, and erythrocytes deformability with M.T. Lutsenko's method. **Results:** In blood erythrocytes of CMV-seropositive parturient women there was the decrease of cytoskeleton proteins: α - and β -spectrine was 1.14 times less, ankyrin was 1.62 times less, band 4.1 protein was 1.29 times less; there was 1.87 times increase of antigen-binding glycoporphin, 1.37 times growth of TBA-active products and 1.35 times drop of superoxide dismutase activity; the deformability index was 9.5 times less, 2.3 DPG was 1.22 times less and oxyhemoglobin was 1.06 times less. In placenta homogenate Bcl-2 was 1.5 times less, Hsp-70 was 2.5 times more, p53 was 6.1 times more, cytochrome C was 1.76 times more, caspase-3 was 3.86 times more. In umbilical cord blood erythrocytes 2.3 DPG was 1.3 times more and oxyhemoglobin was 1.06 times less. **Conclusion:** The obtained data proves that CMVI relapse at 25–28 weeks of pregnancy causes the disorder of morphofunctional state of mother's blood erythrocytes and their ability to oxygenation, the development of fetoplacental barrier, the decrease of fetus oxygen blood supply and the development of intrauterine hypoxia.

Key words: cytomegalovirus, pregnancy, hypoxia.

(Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk — Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2015; 1: 106–112)

распространенности инфекции. Так, по неполным данным сероэпидемиологических исследований, антитела к ЦМВ присутствуют у 50–95% женщин детородного возраста. При этом риск внутриутробного инфицирования при первичной форме цитомегаловирусной инфекции (ЦМВИ) во время беременности достигает 30–50%, при реактивации инфекции — 2–5%. У 5–18% инфицированных детей отмечается манифестная врожденная ЦМВИ, характеризующаяся тяжелым течением и проявляющаяся пневмонией, гепатитом, панкреатитом, инфекционным мононуклеозом, малыми мозговыми дисфункциями и другими психоневрологическими изменениями [1]. Серологические маркеры ЦМВИ, перенесенной внутриутробно и постнатально, могут быть выявлены у 40–60% детей первых 5 лет жизни. Кроме того, внутриутробное инфицирование плода ЦМВ создает предпосылки для развития иммунологической толерантности к этому возбудителю с формированием длительной его персистенции и реактивации в постнатальном периоде.

Значимость проблемы определена и тем, что реактивации ЦМВИ во время беременности способствует изменение характера нейроэндокринных и иммунных реакций в организме женщины, которые сопровождаются формированием новых порочных кругов в цепи причинно-следственных отношений, усугубляющих течение как основного заболевания, так и патологий, преопределяющих скрытое неблагополучие развивающегося плода.

В условиях вирусной инфекции в организме беременных возникают неспецифические метаболические расстройства в виде активации процессов перекисидации липидов с накоплением свободно-радикальных продуктов, повреждающих мембрану эритроцита [2], что приводит к перераспределению электронов на мембране, вызывает конформационные изменения белков цитоскелета, гемоглобина и метаболических ферментов, изменяет диффузионные свойства мембраны. В результате происходит нарушение функциональных особенностей эритроцитов как резервуара для переноса молекул кислорода и углекислого газа в фетоплацентарной системе, что ведет к возникновению гипоксического состояния, которое осложняет течение беременности и внутриутробного развития плода. В связи с вышеизложенным изучение вопросов патогенеза гипоксии при ЦМВ-ассоциированной беременности весьма актуально, поскольку имеет важное социальное значение.

Методы

Дизайн исследования

В ретроспективное исследование были включены 55 рожениц на сроке гестации 37–38 нед и их 55 новорожденных.

Критерии соответствия

Критерии включения в основную группу рожениц: лабораторно подтвержденный молекулярно-биологическими и серологическими методами исследования рецидив ЦМВИ на сроке 25–28 нед беременности, наличие в периферической крови рожениц 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 сут; 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 буккального эпителия и слизистой оболочки шейки матки.

Условия проведения

Исследование выполнено в лаборатории механизмов этиопатогенеза и восстановительных процессов дыхательной системы при неспецифических заболеваниях легких и акушерском отделении патологии беременности при ДНЦ ФПД, Городской клинической больницы г. Благовещенска. Обследованы 55 рожениц и их 55 новорожденных, из которых 30 ЦМВ-серопозитивных рожениц на сроке 37–38 нед с рецидивом ЦМВИ на сроке 25–28 нед беременности и титром антител IgG к ЦМВ на момент исследования 1:1600 (основная группа) и 25 ЦМВ-серонегативных рожениц на тех же сроках беременности (контрольная группа). Новорожденные от матерей основной и контрольной групп вошли в соответствующие группы.

Продолжительность исследования

Работу проводили в период 2013–2014 гг.

Исходы исследования

В качестве основного оцениваемого результата рассматривали механизмы формирования гипоксии среди рожениц с рецидивом ЦМВИ на сроке 25–28 нед беременности и титром антител IgG к ЦМВ на момент исследования 1:1600. Дополнительно изучали особенности морфофункционального состояния плаценты и процессов оксигенации эритроцитов крови сосудов пуповины новорожденных исследуемых групп.

Методы регистрации исходов

У обследуемых рожениц взятие крови проводили из локтевой вены, у новорожденных — из вены пуповины в стандартные вакуумные пробирки с коагулянтом в количестве 5 мл для получения образцов эритроцитов. Кровь для исследования кислотно-основного состояния получали у рожениц из локтевой вены, у новорожденных — из вены пуповины непосредственно перед проведением анализа в стандартные шприцы по 0,25 мл. 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 сут.

Мембраны эритроцитов получали путем моделирования гипосмотического шока по принципу G. Dodge с последующим осаждением при центрифугировании со скоростью 4000 g при температуре +4 °C в течение 10 мин.

Для получения гомогената плодovou часть плаценты (ворсинчатый хорион) срезали скальпелем небольшими пластинками площадью до 2–3 см и толщиной 1 мм. Кусочки ткани помещали в химические стаканы, содержащие 200 мл физиологического раствора, отмывали от клеток крови, перемешивали на магнитной мешалке

в течение 15 мин и подсушивали на фильтровальной бумаге. Затем ткань растирали пестиком в фарфоровой ступке и гомогенизировали до однородной массы. К полученному гомогенату добавляли физиологический раствор в объеме, равном изначальной массе ткани (1 мл физиологического раствора на 1 г). Гомогенат замораживали при -20°C в течение суток. Затем его размораживали и центрифугировали при 1500 g при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ в течение 15 мин. Надосадочную жидкость разливали мелкими аликвотами и хранили при -20°C до проведения иммуноферментного анализа.

Исследование белкового спектра мембран эритроцитов проводили с помощью вертикального одномерного диск-электрофореза в градиентном (7,5–10%) полиакриламидном геле в присутствии 0,1% раствора додецилсульфата натрия по модифицированной методике U. Laemmli [3]. Полипептидные зоны окрашивали в 0,1% растворе Кумасси R-250, 50% растворе спирта и 7% растворе уксусной кислоты. Идентификацию электрофореграмм проводили при длине волны 590–600 нм с помощью установки BioDocAnalyze (Германия). Концентрацию 2,3-дифосфоглицериновой кислоты (2,3-ДФГ) определяли по прописи И.А. Виноградовой, С.Ю. Багрянцевой, Г.В. Девиз [4]. Уровень оксигемоглобина и метгемоглобина оценивали по прописи Эвелина и Мэллой [5]. Содержание термостабильного и термолабильного гемоглобина измеряли по методу Н.А. Дидковского и соавт. [6]. Оценку активности супероксиддисмутазы проводили с использованием наборов RANDOX Laboratories Ltd. (Англия). Исследование кислотно-щелочного равновесия и газов крови проводили на портативном анализаторе IRMA Tru Point (США).

Липиды экстрагировали по методу Фолча [7]. 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 Ю. Кирхнера [8]. Измерение вязкости мембран эритроцитов проводили методом латеральной диффузии гидрофобного флуоресцентного зонда пирена на спектрофотометре Hitachi (Япония). Для определения вязкости липидного бислоя находили интенсивность флуоресценции пирена при длине волны возбуждения 334 нм. Длина волны мономеров — 395 нм, длина волны эксимеров — 470 нм. Для определения вязкости зоны белок-липидных контактов длина волны возбуждения была 286 нм, длина волны мономеров — 395 нм, длина волны эксимеров — 470 нм. Оценка вязкости 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 вязкости. ТБК-активные продукты (малоновый диальдегид) определяли общепринятым методом с применением тиобарбитуровой кислоты (ТБК) по методу В.Б. Гаврилова, А.Р. Гаврилова, Л.М. Мажуль [9].

Деформальность эритроцитов изучали путем математического анализа, разработанного М.Т. Луценко (патент № 2407452, Бюлл. «Изобретений и полезных моделей», 2012, № 28) [10]. Расчет индекса деформации эритроцитов (ID) производили по формуле [10]:

$$ID = \frac{NS}{NV},$$

где N — число исследуемых эритроцитов, S — среднее значение площади одного эритроцита в мкм^2 , V — средний объем эритроцитов в мкм^3 .

Средний объем (V) эритроцитов рассчитывали по формуле:

$$V = Nm(Dcp)^3 \times (1 + 3k^2),$$

где N — число исследуемых эритроцитов, m — стандартное отклонение, Dcp — средний диаметр эритроцита, k — коэффициент вариации диаметра эритроцитов.

Коэффициент вариации (k) диаметра эритроцитов рассчитывали по формуле:

$$k = \frac{m}{Dcp}.$$

В развернутом виде формула расчета ID выглядит следующим образом:

$$ID = \frac{NS}{Nm(Dcp)^3 \times (1 + 3k^2)}.$$

Все необходимые параметры для расчета ID — Dcp , S и m — были получены автоматически путем обработки мазка периферической крови на фотометрической установке Mekos (Россия).

Для морфологических исследований плацентарный материал фиксировали на холоде в 2,5% глутаральдегиде на 0,1 М кокадилатном буфере при pH 7,4 в течение 1 ч. Далее его отмывали в соответствующем буфере с добавлением сахарозы. Последующую фиксацию проводили в 2% растворе четырехоксида осмия в течение 20–30 мин. После дегидратации в серии спиртов и ацетона образцы заливали в смесь смол аралдит и эпон-812. Полутонкие срезы толщиной 1 мкм готовили на ультрамикротоме LKB-8800 (Швеция) и окрашивали толуидиновым синим. Гистохимические методы проводили на парафиновых и криостатных срезах после фиксации 4% раствором параформальдегида на фосфатном буфере (pH 7,4). Морфологическую детекцию апоптоза проводили на парафиновых срезах плаценты по метке концов фрагментов ДНК по ISEL-методу.

Готовые препараты подвергались цитофотометрическому анализу на цитофотометрической компьютерной установке Mekos (Россия).

Этическая экспертиза

Обследование проводили 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 общепринятыми нормами международного права. Все женщины подписали письменное информированное согласие.

Статистический анализ

Статистический анализ и обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ STATISTICA v. 6.0 (StatSoft Inc., США). Для определения достоверности различий использовали непарный параметрический критерий Стьюдента. Для определения достоверности различий в случае негауссовых распределений — непараметрические критерии Колмогорова–Смирнова

Таблица 1. Состав белков мембран эритроцитов периферической крови рожениц с рецидивом цитомегаловирусной инфекции на сроке 25–28 нед беременности

Белковые фракции, %	Основная группа	Контрольная группа
α-Спектрин	6,90±0,05*	7,89±0,08
β-Спектрин	7,67±0,07*	8,74±0,09
Анкирин	3,10±0,05**	5,01±0,07
Полоса 3	15,25±0,18**	17,34±0,23
Полоса 4.1	3,40±0,07*	4,38±0,08
Полоса 4.2	7,97±0,03	7,25±0,12
Полоса 4.5	11,69±0,12	11,34±0,05
Полоса 4.9	8,23±0,04**	10,19±0,05
Актин	9,59±0,06*	8,14±0,04
Полоса 6	8,13±0,09	8,42±0,07
Полоса 7	8,34±0,07**	6,42±0,04
Гликофорин	9,73±0,09**	5,20±0,05

Примечание. * — достоверность различий по отношению к контролю при $p < 0,05$; ** — достоверность различий по отношению к контролю при $p < 0,01$.

Таблица 2. Содержание эритроцитов различных форм в периферической крови рожениц с рецидивом цитомегаловирусной инфекции на сроке 25–28 нед беременности

Тип эритроцитов и морфометрические показатели	Основная группа	Контрольная группа
Дискоциты, %	63,60±2,52*	92,50±3,10
Эхиноциты, %	6,20±0,87*	1,50±0,06
Мишеневидные, %	22,00±2,21*	1,00±0,03
Дегенеративные формы, %	8,20±0,92*	5,00±0,75

Примечание. * — достоверность различий по отношению к контролю при $p < 0,01$.

и Манна–Уитни. Критический уровень значимости был принят за 5% (0,05). Данные представлены как среднее арифметическое (M) ± стандартная ошибка среднего арифметического (m).

Результаты

Участники исследования

В основную группу вошли 30 ЦМВ-серопозитивных рожениц на сроке беременности 37–38 нед с рецидивом ЦМВИ на сроке беременности 25–28 нед и титром антител IgG к ЦМВ на момент исследования 1:1600. Контрольную группу составили 25 ЦМВ-серонегативных рожениц. Новорожденные от матерей основной и контрольной групп отнесены к соответствующим группам.

Средний возраст рожениц основной группы составил 24,6±0,4 года и значимо не отличался от контрольной группы — 23,7±0,3 года ($p > 0,05$).

Основные результаты исследования

В ходе исследования выявлено нарушение белкового состава мембран эритроцитов периферической крови у рожениц основной группы по сравнению с женщинами контрольной группы (табл. 1), выраженное в статистически достоверном изменении количественного содержания основных мембранных белков и белков цитоскелета, а именно: в снижении концентраций α- и β-спектрина ($p < 0,05$), анкирина ($p < 0,01$), белков полос 3 и 4.1 ($p < 0,01$ и $p < 0,05$, соответственно) при одновременном нарастании гликофорина ($p < 0,01$).

При исследовании мазков периферической крови рожениц основной группы выявлено снижение процентного содержания дискоцитов ($p < 0,01$) при увеличении числа эхиноцитов ($p < 0,01$) и дегенеративных форм ($p < 0,01$) (табл. 2).

Увеличение числа видоизмененных форм эритроцитов в периферической крови рожениц основной группы было связано с нарушением вязкостных свойств мембраны — ее относительной микровязкости, которая определялась низкими показателями флуоресценции липотропного зонда пирен, составившими 0,60±0,05 (контрольная группа — 0,82±0,09, $p < 0,01$), а в зоне липид-белковых контактов — 0,86±0,08 (контрольная группа — 1,13±0,04, $p < 0,01$).

Критерием роста активности мембранодестабилизирующих процессов в эритроцитах периферической крови рожениц основной группы можно считать индукцию процессов перекисидации липидов при подавлении механизмов внутриклеточной противорадикальной защиты, что проявлялось в увеличении содержания конечных продуктов дегградации жирных кислот — ТБК-активных продуктов (малонового диальдегида) до 28,15±0,97 ммоль/л (контрольная группа — 20,55±0,31 ммоль/л, $p < 0,01$) и уменьшении внутриэритроцитарной супероксиддисмутазы до 230,37±2,51 Ед/г Hb (контрольная группа — 311,54±4,12 Ед/г Hb, $p < 0,01$).

Выявляемое усиление процессов липопероксидации и конечных их продуктов в эритроцитах рожениц данной группы приводило к нарушению компактности липидного бислоя мембран, выраженного в снижении содержания фосфатидилэтаноламина до 21,80±1,80% (контрольная группа — 23,40±1,70%, $p < 0,01$) и фосфатидилхолина до 27,60±1,3% (контрольная группа — 33,1±2,2%, $p < 0,01$), тогда как уровень фосфатидилсерина, лизофосфатидилхолина и сфингомиелина увеличивался до 11,00±0,90% (контрольная группа — 4,00±0,20%, $p < 0,01$), 9,90±0,58% (контрольная группа — 6,20±1,20%, $p < 0,01$) и 25,30±1,30% (контрольная группа — 22,50±1,20%, $p < 0,01$), соответственно.

Следует обратить внимание и на то, что в эритроцитах периферической крови рожениц основной группы имели

Таблица 3. Показатели 2,3-ДФГ, оксигемоглобина и pO_2 в венозной крови рожениц с рецидивом цитомегаловирусной инфекции на сроке 25–28 нед беременности

Показатели	Основная группа	Контрольная группа
Общий 2,3-ДФГ, мкмоль/мл	7,05±0,07*	5,77±0,14
Оксигемоглобин, %	90,20±0,47*	95,30±0,27
pO_2 , мм рт.ст.	27,60±0,70*	41,60±0,90

Примечание. * — достоверность различий по отношению к контролю при $p < 0,01$.

место нарушения и в гемоглобиновой системе. Было выявлено увеличение содержания термолабильного гемоглобина до 25,86±0,78% (контрольная группа — 7,6±0,5%, $p < 0,001$) и общего 2,3-ДФГ ($p < 0,01$), что уменьшало кислородсвязывающую способность гемоглобина, формирование оксигенированной его формы ($p < 0,01$) и насыщенность крови кислородом ($p < 0,01$) (табл. 3).

Помимо нарушения формирования оксигемоглобина, эритроциты периферической крови рожениц основной группы теряют свою эластичность, что приводит к снижению их деформирующей способности и свободного проникновения в микроциркуляторное русло тканей, формируя тем самым тканевую гипоксию [11–13].

При обработке мазков крови рожениц основной группы выявлено уменьшение средней площади (S) 80 сканированных эритроцитов (N) до 46,78±1,67 $\mu\text{м}^2$ (контрольная группа — 78,05±2,14 $\mu\text{м}^2$, $p < 0,01$) и среднего диаметра (D_{cp}) до 6,77±0,11 $\mu\text{м}$ (контрольная группа — 8,77±0,15 $\mu\text{м}^2$, $p < 0,01$). Полученное при автоматическом сканировании эритроцитов стандартное отклонение (m) составило 3,70.

Исходя из этого, площадь объекта обсчитанных эритроцитов данной группы рожениц составила:

$$NS = 3742,4 \text{ мкм}^2.$$

Коэффициент вариации диаметра эритроцитов был равен:

$$k = \frac{m}{D_{cp}} = 0,55.$$

Объем сканированных эритроцитов соответствовал:

$$V = Nm(D_{cp})^3 \times (1 + 3k^2) = 176096,8 \text{ мкм}^3.$$

Таким образом,

$$ID = \frac{3742,4}{176096,8}.$$

Средние показатели ID в основной группе рожениц составили 0,02±0,008 усл.ед. (контрольная группа — 0,19±0,03 усл.ед., $p < 0,001$).

Исследования показывают, что у рожениц контрольной группы индекс деформации эритроцитов достоверно выше ($p < 0,001$), чем у рожениц основной группы. К тому же число дегенеративных форм эритроцитов у них в 2 раза меньше, а мишеневидные эритроциты практически отсутствуют (см. табл. 2).

При изучении морфоструктуры плаценты в основной группе выявлено увеличение толщины хориального эпителия и краевого расположения сосудов, что приводило к нарушению кислороднообменных процессов, осуществляемых между кровью матери и плода. Среднее расстояние от ближайших сосудов до базальной мембраны синцитиотрофобласта в основной группе составило 3,1±0,2 $\mu\text{м}$ ($p < 0,01$), в ворсинках плацент контрольной группы — 1,3±0,15 $\mu\text{м}$.

В дополнение к морфологическим исследованиям плацент основной и контрольной группы проведены серологические исследования их тканевых гомогенатов, отражающие характер структурно-метаболических изменений большинства субклеточных структур фетоплацентарного барьера. В первую очередь, это касается цитохрома С, содержание которого в гомогенате плацент основной группы увеличивалось до 18,8±0,8 $\mu\text{г/мл}$ (контрольная группа — 10,7±0,4 $\mu\text{г/мл}$, $p < 0,01$), что изменяло характер тканевого дыхания и утилизацию кислорода. Кроме того, имело место снижение содержания свободной фракции белка Hsp 70 до 22,30±0,90 нг/мл (контрольная группа — 56,10±0,60 нг/мл , $p < 0,01$), что указывало на высокую степень выраженности протеолитических процессов, повышающих вероятность появления конгломератов денатурированных белков цитозоля с Hsp-70, уменьшающих концентрацию его свободной формы. На уровне информационной системы плаценты наблюдали изменение протеолитической активности ядер. Выявлено снижение содержания в гомогенатах плацент основной группы противоапоптотического белка Bcl-2 до 28,14±0,78 $\mu\text{г/мл}$ (контрольная группа — 42,5±0,3 $\mu\text{г/мл}$, $p < 0,01$). При этом содержание апоптогенного белка p53 в гомогенате таких плацент увеличивалось до 4,52±0,16 Ед/мл (контрольная группа — 0,74±0,03 Ед/мл , $p < 0,01$), что приводило к инициации каспазного комплекса, в т.ч. и каспазы-3, рост показателей которой составил 103,7±3,9 нг/мл (контрольная группа — 26,7±1,5 нг/мл , $p < 0,01$). Результатом выявленных изменений активности апоптогенных и противоапоптотических факторов в плаценте основной группы явилось увеличение числа ядер в состоянии апоптоза до 5,0±0,03% (контрольная группа — 1,5±0,06%, $p < 0,01$).

Эти данные показывают, что структурно-метаболические нарушения клеточных структур плаценты, определяемые в основной группе, в сочетании с недостаточной насыщенностью крови матери кислородом уменьшают количество транспортируемого кислорода в кровь плода. Снижение уровня оксигемоглобина до 88,2±0,42% (контрольная группа — 93,0±0,61%, $p < 0,01$) было обнаружено в крови сосудов пуповины новорожденных от матерей основной группы. При этом показатели общего 2,3-ДФГ в эритроцитах крови сосудов пуповины также были повышены до 6,51±0,10 $\mu\text{моль/мл}$ (контрольная группа — 5,0±0,12 $\mu\text{моль/мл}$, $p < 0,05$), что изменяло кислородсвязывающую способность гемоглобина А, количество которого при рождении снижено по сравнению с фетальным гемоглобином.

Обсуждение

Вполне очевидно, что определяющее значение в процессах формирования гипоксии и нарушении кровоснабжения плода при ЦМВ-ассоциированной беременности с рецидивом на сроке 25–28 нед имеет нарушение биофизического состояния структур, участвующих в процессах кислородного обмена и представленных в морфофункци-

ональной системе «мать—плод» эритроцитами и фетоплацентарным барьером.

Структурно-функциональные нарушения эритроцитов крови рожениц при данной патологии связаны с изменениями конформации и диффузионных свойств липид-белкового комплекса [14], выраженных уменьшением содержания основных белков цитоскелета (спектрина, анкирина, белка полосы 4.1), увеличением концентраций ТБК-активных продуктов, лизоформ фосфолипидов, снижением противокислительной активности супероксиддисмутазы, повышением микровязкости, снижением индекса деформальности клеток, и обусловлены влиянием ЦМВ на мембрану, опосредуемое через специфические гликопротеиновые рецепторы. Для эритроидных клеток такой рецептор — белок гликофорин. Его показатели в мембранах эритроцитов рожениц с рецидивом ЦМВИ на сроке 25–28 нед достоверно увеличивались, что свидетельствовало о повышенной экспрессии вируса. Это подтверждают данные о том, что наружная мембрана ЦМВ содержит белки группы gCI, gCII и gCIII, которые взаимодействуют с рецепторами на поверхности клеточной мембраны. Также показано влияние вирусного белка Gp64 на рецепторы клеточной мембраны, в т.ч. и эритроцитарного гликофорина. Слияние данного белка с наружной мембраной эритроцита приводит к изменению рН в кислую сторону, что изменяет конформационную структуру мембраны, образуя в ней поры, через которые проникают белки тегумента возбудителя, нарушающие метаболические процессы, связанные с обменом кислорода [15]. В результате в эритроцитах периферической крови рожениц с рецидивом ЦМВИ на сроке 25–28 нед беременности увеличивается концентрация термолabileного гемоглобина с измененными нативными свойствами и 2,3-ДФГ, что нарушает связь гемоглобина с кислородом и снижает насыщение крови кислородом.

Формирующийся при этом недостаток кислородного метаболизма в зоне маточно-плацентарных контактов усиливает выраженность патологических внутриклеточных обменных процессов в плаценте (увеличение содержания плацентарного цитохрома С, белка р53, каспазы-3 при снижении уровня белка Hsp 70 и Bcl-2), что усиливает апоптотические изменения ядер синцитиотрофобласта. Нарушение метаболизма ядер вызывает развитие локаль-

ного воспалительного процесса в плаценте, что приводит к нарушению перфузии ворсин, проницаемости фетоплацентарного барьера и его метаболической дисфункции [16]. Возможно, такие расстройства могут быть причиной развития микроциркуляторных расстройств в маточно-плацентарной зоне, а также более глубоких повреждений жизнеобеспечивающих систем плода, которые вызывают целый ряд взаимообусловленных патологических процессов, вызывающих структурно-функциональные нарушения циркулирующих в крови эритроцитов, снижение насыщения их кислородом, обусловленное высоким уровнем 2,3-ДФГ, что приводит к внутриутробной гипоксии плода.

Заключение

Рецидив ЦМВИ на сроке 25–28 нед беременности оказывает повреждающее действие на структуру и ферментативные свойства эритроцитов периферической крови матери. Снижается эластичность мембран эритроцитов вследствие нарушения липид-белковых взаимодействий, что приводит к изменению их деформальности и повышенной трансформации. Нарушение связи гемоглобина с 2,3-ДФГ влечет за собой снижение насыщения кислородом периферической крови и формирование гипоксии. Одновременно в силу токсического действия внедряющегося в синцитиотрофобласт ЦМВ в цитозоле снижается содержание белка Hsp70, происходит повреждение митохондрий, что приводит к увеличению концентрации цитохрома С, снижению содержания противоапоптотического белка Bcl-2, повышению концентраций белка р53, каспазы-3, и тем самым обуславливает появление большого числа ядер синцитиотрофобласта в состоянии апоптоза. Данные факторы нарушают характер кислородного обмена между кровью матери и плода, в результате чего возникает угроза формирования внутриутробной гипоксии плода.

Конфликт интересов

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие финансовой поддержки / конфликта интересов, о которых необходимо сообщить.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кицак В.Я. Вирусные инфекции беременных: патология плода и новорожденных. *Кольцово*. 2004. 84 с.
2. Курманалиева З.Б., Атыханов А.О., Керимова Н.Р. ПОЛ и система антиоксидантной защиты в плазме крови у женщин с невынашиванием беременности и на фоне герпетической инфекции. *Вестник Кыргызско-Российского Славянского университета*. 2007; 7(9): 88–91.
3. Маурер Г. Диск-электрофорез. М. 1971. 154 с.
4. Виноградова И.А., Багрянцева С.Ю., Девиз Г.В. Метод одновременного определения 2,3-ДФГ и АТФ в эритроцитах. *Лабораторное дело*. 1980; 7: 424–426.
5. Биохимические методы исследования: справочник. Под ред. А.А. Покровского. М.: Медицина. 1969. 337 с.
6. Дидковский Н.А., Филиппова А.В., Идельсон Л.И. Методы диагностики гемолитических анемий, обусловленных нестабильными патологическими гемоглобинами. *Лабораторное дело*. 1971; 3: 154–159.
7. Folch J., Lees M., Sloane G.H. A method for the isolation and purification of total lipids from animals tissues. *J. Biol. Chem.* 1957; 226: 497–509.
8. Кирхер Ю. Тонкослойная хроматография. Пер. с англ. М.: Мир. 1981. С. 52–115.
9. 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: 118–121.
10. Луценко М.Т. Способ оценки нарушения деформируемости эритроцитов в периферической крови беременных при обострении в третьем триместре гестации герпесвирусной инфекции. Патент РФ № 2407452.
11. Катюхин А.Н. Реологические свойства эритроцитов. Современные методы исследования. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 1995; 81 (6): 122–189.
12. Зверко В.Л., Ракуть В.С., Зинчук В.В. Патогенетическое значение деформируемости эритроцитов в механизмах развития гестоза. *Медицинские новости*. 1999; 7: 51–52.
13. Зинчук В.В. Методика измерения деформируемости эритроцитов. *Здравоохранение Белоруссии*. 1989; 12: 97–98.
14. Ишутина Н.А., Дорофиевко Н.Н., Андриевская И.А., Довжикова И.В. Изменения микровязкости мембран эри-

- троцитов крови у беременных, инфицированных вирусом герпеса. *Бюллетень физиологии и патологии дыхания*. 2006; 23: 16–17.
15. Zhaofel L., Blissard G.W. Vaculovirus Gp64 D: sulfide bonds: the intermolecular disulfide bond of Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus Gp64 is not essential for membrane fusion and virion budding. *J. Virol.* 2010; 84 (17): 8584–8595.
16. Луценко М.Т., Андриевская И.А., Довжикова И.В., Соловьева А.С. Фетоплацентарная система при обострении герпес-вирусной инфекции во время беременности. *Новосибирск*. 2010. 245 с.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Луценко Михаил Тимофеевич, доктор медицинских наук, профессор, руководитель лаборатории механизмов этиопатогенеза и восстановительных процессов при неспецифических заболеваниях легких ДНЦ ФПД

Адрес: 675000, Благовещенск, ул. Калинина, д. 22, **тел.:** +7 (4162) 77-28-15, **e-mail:** lucenkomt@mail.ru

Андриевская Ирина Анатольевна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории механизмов этиопатогенеза и восстановительных процессов при неспецифических заболеваниях легких ДНЦ ФПД

Адрес: 675000, Благовещенск, ул. Калинина, д. 22, **тел.:** +7 (4162) 77-28-16, **e-mail:** irina-andrievskaja@rambler.ru

Ишутина Наталья Александровна, доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории механизмов этиопатогенеза и восстановительных процессов при неспецифических заболеваниях легких ДНЦ ФПД

Адрес: 675000, Благовещенск, ул. Калинина, д. 22, **тел.:** +7 (4162) 77-28-16, **e-mail:** ishutina-na@mail.ru

Мироненко Артём Григорьевич, аспирант лаборатории механизмов этиопатогенеза и восстановительных процессов при неспецифических заболеваниях легких ДНЦ ФПД

Адрес: 675000, Благовещенск, ул. Калинина, д. 22, **тел.:** +7 (4162) 77-28-16, **e-mail:** miron-mag@mail.ru