

Роль линолевой кислоты в окислительном повреждении гемоглобина при цитомегаловирусной инфекции в период беременности

Андриевская И.А., Ишутина Н.А.

Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания (ДНЦ ФПД)
Россия, 675000, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22

РЕЗЮМЕ

Цель – оценить влияние линолевой кислоты на окислительное повреждение гемоглобина в эритроцитах крови беременных при цитомегаловирусной (ЦМВ) инфекции в первом триместре.

Материалы и методы. В исследование включены 55 ЦМВ-серопозитивных беременных на сроке 8–11 нед в возрасте ($24,7 \pm 0,18$) года: 20 с обострением цитомегаловирусной инфекции и 35 с латентным течением заболевания. Группу контроля составили 20 ЦМВ-серонегативных беременных, сопоставимые по возрасту и сроку беременности с группой беременных с ЦМВ инфекцией. Исследовали содержание линолевой кислоты, супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы и метгемоглобина в эритроцитах крови спектрофотометрическим методом. Глутатион в эритроцитах крови определяли гистохимическим методом, общее количество гемоглобина – на автоматическом гематологическом анализаторе, пероксид водорода в сыворотке крови – иммуноферментным методом.

Результаты. При цитомегаловирусной инфекции отмечается повышение показателей экзогенного пероксида водорода и линолевой кислоты в эритроцитах крови беременных. Они в период обострения заболевания в первом триместре беременности вызывают окислительную модификацию и снижение уровня не только супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы и глутатиона, участвующих в процессах редокс-регуляции тиол-дисульфидного обмена эритроцитов, но и гемоглобина с образованием высокого количества метгемоглобина, способствуя снижению кислородного метаболизма и развитию гемической гипоксии. При латентном течении заболевания окислительное повреждение гемоглобина в эритроцитах крови беременных нивелируется увеличением активности редокс-ферментов, что поддерживает кислородный гомеостаз на необходимом для развития беременности уровне.

Ключевые слова: беременность, цитомегаловирусная инфекция, гемоглобин, линолевая кислота, окислительный стресс.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

Соответствие принципам этики. Все беременные подписали информированное согласие на участие в исследовании. Исследование одобрено локальным этическим комитетом при ДНЦ ФПД (протокол № 130 от 05.06.2018).

Для цитирования: Андриевская И.А., Ишутина Н.А. Роль линолевой кислоты в окислительном повреждении гемоглобина при цитомегаловирусной инфекции в период беременности. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (3): 15–20. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-3-15-20>.

УДК 616.155.194-022.913:547.395.4:[616.9:578.825.12]:618.2
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-3-15-20>

The role of linoleic acid in oxidative damage of hemoglobin due to cytomegalovirus infection during pregnancy

Andrievskaya I.A., Ishutina N.A.

Far Eastern Scientific Center of Respiratory Physiology and Pathology
22, Kalinina Str., Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation

ABSTRACT

The goal is to study the mechanisms of linoleic acid-dependent oxidative damage to hemoglobin in blood erythrocytes of pregnant women with cytomegalovirus (CMV) infection during the first trimester.

Materials and methods. The study included 55 CMV-seropositive pregnant women at 8–11 weeks pregnant, aged $24,7 \pm 0,18$ years. 20 women had exacerbated cytomegalovirus infection and in 35 women a latent course of the disease was observed. The control group consisted of 20 CMV-seronegative pregnant women, comparable in age and gestational age with the group of pregnant women with cytomegalovirus infection. The levels of linoleic acid, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and methemoglobin in the blood were studied by the spectrophotometry. Glutathione was determined by histochemical methods, the total amount of hemoglobin was measured using the automatic hematological analyzer, and hydrogen peroxide level was calculated by enzyme immunoassay.

Results. In cytomegalovirus infection, an increase in the indices of exogenous hydrogen peroxide and linoleic acid in blood erythrocytes of pregnant women is observed. During the period of acute disease in the first trimester of pregnancy it causes oxidative modification and a decrease in the level of not only superoxide dismutase, glutathione peroxidase and glutathione, the processes involved in the redox regulation of thiol-disulfide exchange of erythrocytes, but also hemoglobin with formation of large amount of methemoglobin, which contributes to reduction of oxygen metabolism and development of hemic hypoxia. In the latent course of the disease, the oxidative damage to hemoglobin in the erythrocytes of pregnant women is mitigated by the increase in the activity of redox enzymes, which maintains oxygen homeostasis at the level necessary for the development of pregnancy.

Key words: pregnancy, cytomegalovirus infection, hemoglobin, linoleic acid, oxidative stress.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The authors state that there is no funding for the study.

Conformity with the principles of ethics. All pregnant women signed informed consent to participate in the study. The study was approved by the local Ethics Committee at the Far Eastern Scientific Center of Respiratory Physiology and Pathology (Protocol No. 130 of 05.06.2018).

For citation: Andrievskaya I.A., Ishutina N.A. The role of linoleic acid in oxidative damage of hemoglobin due to cytomegalovirus infection during pregnancy. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (3): 15–20. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-3-15-20>.

ВВЕДЕНИЕ

Окислительный стресс вирусной этиологии приводит к развитию анемии и сопутствующей ей гемической гипоксии, пролонгирующей осложнения беременности ранних сроков [1, 2], что связывают с повышением циркуляции лег-

ко окисляемых свободных полиненасыщенных жирных кислот [3]. Линолевая кислота является триггерным компонентом в процессах липопероксидации, действуя как самостоятельно, так и в сочетании с реактивными формами кислорода [4]. Доказано, что ее введение *in vivo* в эксперименте усиливает окислительное повреждение и

гемолиз эритроцитов [5]. Также показано опосредованное участие линолевой кислоты в модуляции окислительно-восстановительных реакций и редокс-потенциала в эритроцитах при окислении белков гема [5]. Последнее сопряжено с развитием анемии, что критично для беременности в ранние сроки на фоне обострения цитомегаловирусной (ЦМВ) инфекции. Несмотря на представленные доводы, необходимы дополнительные исследования, раскрывающие роль линолевой кислоты в окислительном повреждении эритроцитов и гемоглобина в крови беременных при ЦМВ инфекции.

Цель – оценить влияние линолевой кислоты на окислительное повреждение гемоглобина в эритроцитах крови беременных при ЦМВ инфекции в первом триместре.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены 55 ЦМВ-серопозитивных беременных на сроке 8–11 нед в возрасте ($24,7 \pm 0,18$) года: 20 с обострением ЦМВ инфекции (подгруппа 1) и 35 с латентным течением заболевания (подгруппа 2). Группу контроля составили 20 ЦМВ-серонегативных беременных, сопоставимые по возрасту ($25,2 \pm 0,38$) года и сроку беременности с группой беременных с ЦМВ инфекцией.

В работе с обследуемыми лицами соблюдались этические принципы Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных исследований с участием человека» с поправками 2013 г. и правилам клинической практики в РФ, утвержденными приказом Министерства РФ № 200н от 1 апреля 2016 г.

У всех беременных для диагностики ЦМВ инфекции выполнялись молекулярно-биологические (выявление ДНК методом полимеразной цепной реакции в крови, моче, буккальном эпителии и слизистой шейки матки (ООО «НПО ДНК-технология», г. Москва)) и иммуноферментные исследования (типоспецифические антитела (иммуноглобулины, Ig) класса M и G в сыворотке крови, индекс avidности) (ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск).

Метилловые эфиры жирных кислот в эритроцитах крови получали методом кислого метанолиза [6]. Определение эфиров жирных кислот проводили на газовом хроматографе «Кристалл-2000м» (г. Йошкар-Ола) и капиллярной колонке HP-FFAP. Содержание жирных кислот выражалось в процентах от общей суммы площади пиков жирных кислот.

Активность глутатионпероксидазы в эритроцитах крови оценивали спектрофотометрическим методом с использованием наборов реагентов SENTINEL DIAGNOSTICS (Италия), супероксиддисмутазы – RANDOX Laboratories Ltd. (Англия). Метгемоглобин определяли по М.С. Кушаковскому [7], глутатион – гистохимическим методом по М.Т. Луценко [8], с последующей цитофотометрической обработкой в программе Scion (США). Расчет относительной плотности продуктов реакции проводили в условных единицах (усл. ед.) на один эритроцит с учетом количества окрашенных гранул. Количество гемоглобина в крови определяли на гематологическом автоматическом анализаторе Medonik (Швеция), пероксида водорода (H_2O_2) в сыворотке крови – иммуноферментным методом с использованием наборов Bender MedSystems (Австрия).

Все вычисления и статистический анализ выполняли с помощью программы IBM SPSS Statistics 18.0 (Statistical Package for the Social Sciences, США). Полученные результаты оценивали методами статистического описания и проверки статистических гипотез. Проверка на соответствие нормальному закону распределения проводили при помощи критерия Колмогорова – Смирнова. Во всех группах распределение было нормальным, поэтому достоверность различий между группами определялось с помощью параметрического *t*-критерия Стьюдента. Значения выражали как среднее арифметическое $M \pm$ ошибка среднего арифметического m . Во всех случаях $p < 0,05$ считали статистически значимым.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В подгруппе 1 основной группы беременных с обострением ЦМВ инфекции в первом триместре беременности содержание экзогенного H_2O_2 и линолевой кислоты в эритроцитах крови было значительно выше по сравнению с контрольной группой (таблица). Антиокислительная активность супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы, а также содержание глутатиона в эритроцитах крови беременных данной подгруппы значимо снижались по сравнению с контрольной группой, что свидетельствовало о нарушении процессов редокс-регулируемого тиол-дисульфидного обмена. В условиях формируемого окислительного стресса в эритроцитах крови беременных подгруппы 1 выявлялось снижение общего количества гемоглобина и увеличение уровня метгемоглобина по сравнению с контрольной группой, что вызывает нарушение метаболизма кислорода.

Таблица
Table

Показатели линолевой кислоты, редокс-ферментов, глутатиона, гемоглобина и его окисленного деривата в крови беременных основной и контрольной группы, $M \pm m$			
Levels of linoleic acid, redox enzymes, glutathione, hemoglobin and its oxidized derivative in blood of pregnant women in treatment and control groups, $M \pm m$			
Показатель Indicator	Основная группа Treatment group		Контрольная группа, $n = 20$ Control group, $n = 20$
	подгруппа 1, $n = 20$ subgroup 1, $n = 20$	подгруппа 2, $n = 35$ subgroup 2, $n = 35$	
Линолевая кислота, % Linoleic acid, %	$5,77 \pm 0,09$ $p < 0,001$	$5,12 \pm 0,08$ $p = 0,009$	$4,81 \pm 0,08$
Супероксиддисмутаза, ЕД/г Нб Superoxide dismutase, U/g Hb	$231 \pm 1,83$ $p < 0,001$	$356,3 \pm 3,12$ $p = 0,046$	$347 \pm 3,18$
Глутатионпероксидаза, ЕД/г Нб Glutathione peroxidase, U/g Hb	$7,32 \pm 0,08$ $p < 0,001$	$13,37 \pm 0,13$ $p = 0,001$	$12,42 \pm 0,22$
Глутатион, усл. ед. Glutathione, units	$20,0 \pm 0,52$ $p < 0,001$	$52,6 \pm 1,31$ $p = 0,017$	$57,0 \pm 1,18$
H_2O_2 , мкмоль/мл H_2O_2 , μmol/ml	$29,4 \pm 0,87$ $p < 0,001$	$17,89 \pm 0,56$ $p < 0,001$	$15,10 \pm 0,28$
Гемоглобин, г/л Hemoglobin, g/l	$123 \pm 2,70$ $p < 0,001$	$130,0 \pm 2,04$ $p = 0,056$	$132 \pm 0,92$
Метгемоглобин, % Methemoglobin, %	$1,3 \pm 0,06$ $p < 0,001$	$0,7 \pm 0,03$ $p = 0,077$	$0,62 \pm 0,03$

Примечание. Достоверность различий по сравнению с контрольной группой – p .
Note. Statistically significant differences compared with the control group – p .

В подгруппе 2 основной группы беременных с латентным течением заболевания в первом триместре беременности содержание экзогенного H_2O_2 и линолевой кислоты в эритроцитах крови было повышенным по сравнению с контрольной группой (см. таблицу). Однако активность редокс-ферментов супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы увеличивалась, содержание глутатиона в эритроцитах крови беременных подгруппы 2 оставалось сниженным по сравнению с контрольной группой. Интенсификация процессов редокс-регуляции в эритроцитах крови в данной подгруппе беременных, по-видимому, приводила к снижению уровня внутриэритроцитарного H_2O_2 , что нивелировало окислительную модификацию гемоглобина и повышало его восстановительную способность. Поэтому в показателях общего количества гемоглобина и метгемоглобина в эритроцитах крови статистически значимых различий по сравнению с контрольной группой не выявлено.

ОБСУЖДЕНИЕ

Присутствие в крови высокого количества линолевой кислоты может вызывать окислительное повреждение эритроцитов и гемоглобина, что тесно связано с гемической анемией, которая в

сочетании с ЦМВ инфекцией приводит к развитию осложнений беременности.

В ходе проведенного исследования установлено, что ЦМВ инфекция сочетается с повышением уровня экзогенного H_2O_2 и линолевой кислоты в эритроцитах крови беременных в первом триместре беременности. Повышение содержания линолевой кислоты в эритроцитах крови беременных с ЦМВ инфекцией можно объяснить следующим. Линолевая кислота по сравнению с другими полиненасыщенными жирными кислотами активно накапливается в клеточных фосфолипидах, вытесняя арахидоновую кислоту [9], что делает ее более доступной для действия H_2O_2 . Однако линолевая кислота может быть дополнительно метаболизирована оксигеназами [10], что приводит к усилению синтеза липопродуктов, поддерживающих окислительные процессы и образование H_2O_2 в эритроцитах.

Вместе с тем избыток H_2O_2 также может приводить к существенной модификации тиолов белков, таких как глутатионпероксидаза [11] и супероксиддисмутаза [12, 13], включая образование дисульфидов с низкомолекулярным тиолом глутатионом, что изменяет редокс-ответ эритроцитов [14]. Доказательством явилось снижение активности супероксиддисмутазы и глутатион-

пероксидазы в эритроцитах крови беременных с обострением ЦМВ инфекции в первом триместре беременности, что, по-видимому, приводит к накоплению внутриклеточного H_2O_2 , вызывающего уменьшение уровня восстановленного глутатиона и накоплению окисленной его формы. Формируемое при этом снижение редокс-потенциала эритроцитов усиливает окислительную модификацию гемоглобина [15], изменяет его способность к восстановлению [16, 17], о чем свидетельствует повышение уровня метгемоглобина в крови беременных с обострением ЦМВ инфекции в первом триместре беременности. При латентном течении ЦМВ инфекции в первом триместре беременности активность редокс-ферментов повышается, что свидетельствует о компенсаторном ответе редокс-системы эритроцитов крови беременных.

Следовательно, высокие количества линолевой кислоты могут напрямую или опосредованно через образование H_2O_2 ограничивать редокс-цикл гемоглобина, способствуя образованию метгемоглобина [18], что приводит к нарушению кислородного метаболизма и развитию гемической гипоксии, осложняющей как течение основного заболевания, так и беременности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ЦМВ инфекция в первом триместре беременности сопровождается повышением уровня экзогенного H_2O_2 и линолевой кислоты в эритроцитах крови беременных, что вызывает формирование разнонаправленного ответа основных компонентов редокс-системы в период обострения и при латентном течении заболевания. При обострении инфекции снижение редокс-потенциала эритроцитов крови ассоциировано с окислительной модификацией гемоглобина, вызывающей нарушение метаболизма кислорода и развитие гемической гипоксии, осложняющей течение беременности. При латентном течении заболевания дисбаланс элементов окислительно-восстановительной системы эритроцитов крови компенсируется повышением активности редокс-ферментов, что нивелирует окисление гемоглобина, обеспечивая адекватную доставку кислорода в эмбриотрофобластическую зону.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Шестопалов А.В., Арутюнян А.В., Акуева М., Шестопалова М.А., Буштырева И.О. Окислительный стресс в патологии плацентации. *Журнал акушерства и женских болезней*. 2009; LVIII (1): 93–100. [Shestopalov A.V., Arutyunyan A.V., Akueva M., Shestopalova M.A., Bushyryeva I.O. Oxidative stress in the placentation pathology. *Zhurnal akusberstva i zheniskib boleznej*. 2009; LVIII (1): 93–100 (in Russ.)].
2. Луценко М.Т., Андриевская И.А., Ишутина Н.А., МIRONENKO А.Г. Механизмы формирования гипоксии в период беременности и нарушение кровоснабжения плода при цитомегаловирусной инфекции. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2015; 70 (1): 106–112. [Lutsenko M.T., Andrievskaya I.A., Ishutina N.A., Mironenko A.G. Mechanisms of hypoxia development during pregnancy and impairment of fetus blood supply in cytomegalovirus infection. *Vestnik Rossijskoj akademii meditsinskib nauk*. 2015; 70 (1): 106–112 (in Russ.)].
3. Титов В.Н., Лисицин Д.М. Жирные кислоты. Физическая химия, биология и медицина. Москва; Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2006: 670. [Titov V.N., Lisitsin D.M. Fatty acids. Physical chemistry, biology and medicine. Moscow; Tver': ООО «Izdatel'stvo «Triada», 2006: 670 (in Russ.)].
4. Rao Y., Lokesh B.R. Modulatory effects of α -linolenic acid on generation of reactive oxygen species in elaidic acid enriched peritoneal macrophages in rats. *Indian J. Exp. Biol.* 2014; 52: 860–869. DOI: 10.1079/bjn19970062.
5. Yuan T., Fan W.-B., Cong Y., Xu H.-D., Li Ch.-J., Meng J., Bao N.-R., Zhao J.-N. Linoleic acid induces red blood cells and hemoglobin damage via oxidative mechanism. *Int. J. Clin. Exp. Patbol.* 2015; 8 (5): 5044–5052.
6. Carren J.P., Dubacy J.P.-J. Adaptation of a micro-seale method to the micro-seale for fatty acid methyl trau-estenif: cation of biological lipid extracts. *Chromatogra-phy*. 1978; 151: 384–390.
7. Кушаковский М.С. Клинические формы повреждения гемоглобина. Лен. отделение: Медицина, 1968: 324. [Kushakovskij M.S. Clinical forms of hemoglobin impairment. Len. otdelenie: Meditsina Publ., 1968: 324 (in Russ.)].
8. Луценко М.Т., Андриевская И.А. Способ определения глутатиона в эритроцитах периферической крови. Пат. 2526832, Рос. Федерация. [Lutsenko M.T., Andrievskaya I.A. Method of determining glutathione in peripheral blood erythrocytes. Pat. 2526832, RF (in Russ.)].
9. Wang L., Lim E.J., Toborek M., Hennig B. The role of fatty acids and caveolin-1 in tnf- α -induced endothelial cell activation. *Metabolism*. 2008; 57 (10): 1328–1339. DOI: 10.1016/j.metabol.2008.01.036.
10. Elinder F., Liin S.I. Actions and mechanisms of polyunsaturated fatty acids on voltage-gated ion channels. *Front. Physiol.* 2017; 8: 43. DOI: 10.3389/fphys.2017.00043.
11. Sato K., Akaike T., Kohno M., Ando M., Maeda H. Hydroxyl radical production by H_2O_2 plus Cu,Zn-superoxide dismutase reflects the activity of free copper released from the oxidatively damaged enzyme. *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 25371–25377.
12. Uchida K., Kawakishi S. Identification of oxidized histidine generated at the active site of Cu,Zn-superoxide dismutase exposed to H_2O_2 . Selective generation of

- 2-охо-histidine at the histidine 118. *J. Biol. Chem.* 1994; 269(4): 2405–2410.
13. Tiwari A., Hayward L.J. Familial amyotrophic lateral sclerosis mutants of copper/zinc superoxide dismutase are susceptible to disulfide reduction. *J. Biol. Chem.* 2003; 278(8): 5984–5992. DOI: 10.1074/jbc.m210419200.
 14. Cho C.-S., Lee S., Lee G.T., Woo H.A., Choi E.-J., Rhee S.G. Irreversible inactivation of glutathione peroxidase 1 and reversible inactivation of peroxiredoxin II by H₂O₂ in red blood cells. *Antioxidants & Redox Signaling.* 2010; 12(11): 1235–1246. DOI: 10.1089/ars.2009.2701.
 15. Pimenova T., Pereira C.P., Gehrig P., Buehler P.W., Schaer D.J., Zenobi R. Quantitative mass spectrometry defines an oxidative hotspot in hemoglobin that is specifically protected by haptoglobin. *Journal of Proteome Research.* 2010; 9 (8): 4061–4070. DOI: 10.1021/pr100252e.
 16. Bonaventura C., Henkens R., Alayash A.I., Banerjee S., Crumbliss A.L. Molecular controls of the oxygenation and redox reactions of hemoglobin. *Antioxidants & Redox Signaling.* 2013; 18 (17): 2298–2313. DOI: 10.1089/ars.2012.4947.
 17. Meng F., Alayash A.I. Determination of extinction coefficients of human hemoglobin in various redox states. *Anal. Biochem.* 2017; 521: 11–19. DOI: 10.1016/j.ab.2017.01.002.
 18. Nagababu E., Rifkind J.M. Reaction of hydrogen peroxide with ferrylhemoglobin: superoxide production and heme degradation. *Biochemistry.* 2000; 39 (40): 12503–12511. DOI: 10.1021/bi992170y.

Сведения об авторах

Андриевская Ирина Анатольевна, д-р биол. наук, профессор РАН, зав. лабораторией механизмов этиопатогенеза и восстановительных процессов дыхательной системы при неспецифических заболеваниях легких, ДНЦ ФПД, г. Благовещенск.

Ишутина Наталия Александровна, д-р биол. наук, вед. науч. сотрудник, лаборатория механизмов этиопатогенеза и восстановительных процессов дыхательной системы при неспецифических заболеваниях легких, ДНЦ ФПД, г. Благовещенск.

(✉) **Андриевская Ирина Анатольевна**, e-mail: irina-andrievskaja@rambler.ru.

Authors information

Andrievskaya Irina A., DBSc, Head of the Laboratory for Mechanisms of Etiopathogenesis and Recovery of the Respiratory System in Non-Specific Lung Diseases, Far Eastern Scientific Center of Respiratory Physiology and Pathology, Blagoveshchensk, Russian Federation.

Ishutina Nataliya A., DBSc, Leading Scientist, Laboratory for Mechanisms of Etiopathogenesis and Recovery of the Respiratory System in Non-Specific Lung Diseases, Far Eastern Scientific Center of Respiratory Physiology and Pathology, Blagoveshchensk, Russian Federation.

(✉) **Andrievskaya Irina A.**, e-mail: irina-andrievskaja@rambler.ru.

Поступила в редакцию 08.06.2018
Подписана в печать 27.03.2019

Received 08.06.2018
Accepted 27.03.2019