

Н.А. Ишутина, Н.Н. Дорофиев

ЛИПИДНЫЙ СПЕКТР И СОСТОЯНИЕ ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ ПУПОВИНЫ У НОВОРОЖДЕННЫХ ОТ МАТЕРЕЙ С ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания СО РАМН (Благовещенск)

Изучен липидный спектр и состояние эндотелия артерии пуповины новорожденных. Установлено, что цитомегаловирусная инфекция матери ассоциируется с дисбалансом липидов в крови пуповины (увеличение концентрации насыщенных жирных кислот, триглицеридов на 21 % и холестерина липопротеидов высокой плотности на 46 % при снижении общего холестерина и холестерина липопротеидов низкой плотности более чем на 30 %) и с нарушениями строения эндотелия (апоптоз ядер клеток, отек, разволокнение и дистрофические изменения гладкомышечных клеток).

Ключевые слова: цитомегаловирусная инфекция, липиды, кровь пуповины, эндотелий артерии пуповины

LIPID PROFILE AND STATE OF ENDOTHELIUM UMBILICAL CORD VESSELS IN NEWBORNS FROM MOTHERS WITH CYTOMEGALOVIRUS INFECTION

N.A. Ishutina, N.N. Dorofienko

Far Eastern Scientific Center of Physiology and Respiratory Pathology SB RAMS, Blagoveshchensk

Lipid profile and state of endothelium of umbilical cord artery of 45 newborns were studied. It was determined that cytomegalovirus infection of mother is associated with disbalance of lipids in umbilical cord blood (21 % increase of concentration of saturated fatty acids and triglycerides and 46 % increase of HDL cholesterol at more than 30 % decrease of total cholesterol and LDL cholesterol) and with disorders in endothelium dysmorphology (apoptosis of cell nuclei, edema, dissociation and dystrophic changes of smooth muscle cells).

Key words: cytomegalovirus infection, lipids, umbilical cord blood, endothelium of umbilical artery

При анализе состояния экстраэмбриональных образований при физиологической и патологической беременности, а также после родоразрешения исследователи должное внимание уделяют амниотической жидкости и плаценте, но недостаточно исследуют пуповину [9]. Это происходит вопреки той важнейшей роли, которую играет пуповина как провизорный орган, являющийся составной частью фетоплацентарного круга кровообращения и обеспечивающий жизнедеятельность плода на протяжении всей беременности [2]. Анализ научной литературы показал, что исследования в области изучения пуповины ограничены и в основном нацелены на выяснение аномалий развития некоторых особенностей воспалительных реакций при инфекционной патологии последа [1, 9].

Эндотелий играет значительную роль в процессах воспаления, активно взаимодействуя с иммунокомпетентными клетками и обеспечивая их миграцию в очаге воспаления; функциональное состояние эндотелия влияет на проницаемость сосудов [10]. Одними из факторов, нарушающих функции эндотелиальных клеток, являются химически модифицированные липопротеиды низкой (ЛПНП) и очень низкой плотности (ЛПОНП), в особенности их окисленные формы. Поглощение ЛПНП и ЛПОНП и их окисленных форм эндотелиальными клетками приводит к их активации, а затем к образованию «пенистых клеток» (foam cells) с последующей полной утратой функций и гибелью [14, 15].

В связи с этим целью исследования явилось изучение липидного спектра крови пуповины и состояние эндотелия артерии пупочного канатика у

новорожденных от матерей, перенесших в разные периоды гестации цитомегаловирусную инфекцию (ЦМВИ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом для исследования послужили 45 образцов пуповин и сыворотки крови пуповины, полученных при родах от женщин, перенесших в различные периоды гестации ЦМВИ – они составили основную группу. Контрольную группу составили образцы пуповины и сыворотка крови пуповины от практически здоровых женщин. У беременных симптоматически ЦМВИ проявлялась в виде острого респираторного заболевания, сопровождающегося ринофарингитом. Клинический диагноз – обострение ЦМВИ – устанавливался при комплексном исследовании периферической крови на наличие IgM или четырехкратного и более нарастания титра антител IgG в парных сыворотках в динамике через 10 дней, индекса avidности более 65 %, а также ДНК ЦМВ. Верификация ЦМВ, определение типоспецифических антител, индекса avidности осуществлялись методами ИФА на спектрофотометре «Stat-Fax-2100» с использованием тест-систем ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск), выявление ДНК ЦМВ – методами ПЦР на аппарате ДТ-96 с использованием наборов НПО «ДНК-технология» (Москва).

Проведена комплексная оценка состава липидов крови пуповины от матерей, перенесших ЦМВИ в разные сроки гестации (титр антител IgG к цитомегаловирусу (ЦМВ) 1 : 1600). Изучение липидного спектра включало определение общего холестерина (ОХС) и триацилглицеролов с помощью коммерческих

наборов «НовохоЛ» ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск), холестерина липопротеидов высокой плотности (ХС-ЛПВП) – посредством коммерческих наборов «ЛПВП-холестерин-ново» ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск), холестерина липопротеидов низкой плотности (ХС-ЛПНП) – расчетным методом по формуле: $ХС-ЛПНП = ОХС - (ХС-ЛПВП + \text{триглицериды}) / 2$. Концентрацию миристиновой, пентадекановой и стеариновой жирных кислот изучали методом газожидкостной хроматографии на хроматографе «Кристалл 2000М» (Россия).

Материал для исследования пуповины брали с участков, прилежащих к пупочной области новорожденного и плаценте, а также к средней части канатика. Для электронной микроскопии образцы пуповины фиксировали в глютаральдегиде. Постфиксацию проводили в забуференном растворе четырехокиси осмия. Полутонкие срезы окрашивали талудиновым синим, изучали под световым микроскопом. Ультратонкие срезы контрастировали водным раствором уранилацетата и цитратом свинца. Исследование и фотографирование ультратонких срезов проводили на электронном микроскопе «TESLA BS-540» (Чехия).

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

Все расчеты проводили с использованием программного обеспечения Statistica 6.0. Проверку нормальности распределения проводили по критерию Колмогорова – Смирнова, гипотезы о статистической значимости различий двух выборок – с помощью t-критерия Стьюдента. Показатели считали значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характер течения беременности и родов оказывает влияние на уровень липидов и липопротеидов в пуповинной крови новорожденных, что было подтверждено различными авторами, в том числе и исследованиями, проведенными нами ранее [5, 13].

Анализ средних значений показателей липидного спектра сыворотки крови пуповины новорожденных показал повышение содержания триацилглицеролов на 21 % в основной группе ($p < 0,001$), по сравнению с контрольной (табл. 1).

Среднее содержание насыщенных миристиновой, пентадекановой и стеариновой жирных кислот в крови пуповины новорожденных основной группы также было выше показателя контрольной группы, соответственно, на 31 %, 108 % и 47 % ($p < 0,001$) (табл. 1).

Возможно, основные показатели липидного спектра сыворотки крови пуповины у новорожденных повышены за счет увеличения активности триглицеридлипазы, осуществляющей липолиз в тканях [6].

При анализе фракций ХС-ЛПВП и ХС-ЛПНП в сыворотке крови пуповины новорожденных основной группы выявлено уменьшение уровня ХС-ЛПНП на

37 % при увеличении концентрации ХС-ЛПВП на 46 %, по сравнению с контролем (табл. 1). ХС-ЛПНП является основной транспортной формой холестерина для нужд клетки, тогда как ХС-ЛПВП обеспечивает обратный транспорт холестерина, забирая его от перегруженных клеток тканей и перенося его в печень, откуда он выводится из организма в виде желчных кислот [3].

При определении концентрации ОХС в сыворотке крови пуповины обнаружено, что у новорожденных от матерей с ЦМВИ имело место достоверное его снижение на 36 % ($p < 0,001$), по сравнению с контролем (табл. 1).

Таблица 1
Состав липидов крови пуповины новорожденных от матерей с ЦМВИ ($M \pm m$)

Показатель	Контрольная группа (n = 45)	Основная группа (n = 45)
Триацилглицеролы, ммоль/л	1,68 ± 0,07	2,04 ± 0,05*
Миристиновая кислота, %	1,10 ± 0,05	1,76 ± 0,06*
Пентадекановая кислота, %	0,26 ± 0,04	0,54 ± 0,04*
Стеариновая кислота, %	11,0 ± 0,90	16,2 ± 0,20*
ХС-ЛПНП, ммоль/л	0,59 ± 0,06	0,37 ± 0,04*
ХС-ЛПВП, ммоль/л	1,30 ± 0,08	1,90 ± 0,06*
ОХС, ммоль/л	0,72 ± 0,03	0,46 ± 0,03*

Примечание: * – различия по отношению к контролю статистически значимы при $p < 0,05$.

В связи с тем, что развивающаяся дислипидемия способствует повреждению эндотелия сосудов [11], нами было изучено строение эндотелия артерии пуповины на морфологическом уровне при беременности, осложненной ЦМВИ.

При исследовании эндотелия артерии пуповины от матерей с ЦМВИ в очагах поражения ЦМВ выявлялись клетки больших размеров с крупными внутриядерными включениями, ограниченными от ядерной мембраны бледным ободком и напоминающим «совиный глаз» (рис. 1а).

Помимо этого, прослеживалось вступление клеток в апоптозное состояние (рис. 1б). Эти изменения сопровождалась мелкоглыбчатым распадом ядер клеток, окруженных мембраной, сморщиванием органелл, разрушением внутренних мембран набухших митохондрий, плазмоллиз цитоплазмы и фрагментацией клеточного содержимого на отдельные апоптотические тельца, ограниченные плазматической мембраной. В ультраструктуре других клеток отмечалось появление пикнотических ядер, ядер с кариорексисом и криолизисом, резко выраженным микроплазматозом [4].

В сосудах пуповины часто наблюдался отек, разволокнение и дистрофические изменения гладкомышечных клеток. В эндотелиальном монослое отмечалось увеличение разнородности и снижение упорядоченности расположения клеток в пласте, что обуславливало низкую степень связанности эндотелиоцитов между собой. Обнаруживалась инфильтрация подэндотелиального и внутреннего слоев мышечной

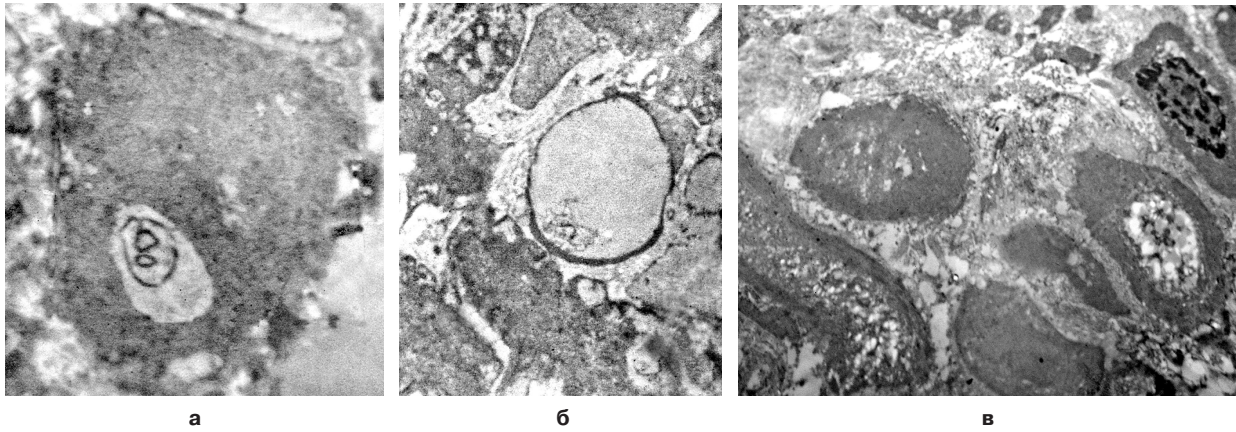


Рис. 1. Интима сосудов пуповины плода от рожениц, перенесших ЦМВИ (титр антител IgG к ЦМВ 1 : 1600): **а** – клетка с внутриядерным вирусоподобным включением; **б** – формирование фигуры, характерной для апоптоза; **в** – образование межклеточных полостей, отсутствие контактов между эндотелиоцитами и утолщенной базальной мембраной. Электронная микроскопия. Ув. ×7000.

оболочки сосудов. Данные изменения способствовали увеличению проницаемости сосудистой стенки и возникновению воспаления сосудов пуповины (рис. 1в).

В большинстве исследований наблюдался отек и разрыхление студенистого вещества. Предполагается, что эти изменения обусловлены нарушением водно-электролитного обмена в тканевой жидкости у матерей в результате развития при инфекционно-воспалительном заболевании симптомов гестоза беременных, который приводит к гидрофильным изменениям вартонова студня пуповины [8].

В.М. Черток с соавт. (2009) показали, что некоторые эндотелиоциты находятся в состоянии структурно-функциональной адаптации к действию вируса, а другие претерпевают дистрофические изменения. К последним относятся клетки, находящиеся в состоянии апоптоза. В процессе их программируемой гибели цитоплазма приобретает пузырчатый вид, в ней сокращается число органелл, происходит деструкция ядра, а на поверхности образуются выпячивая цитоплазмы сложной формы [12].

Наличие осложнений при нарушении состава и количества липопротеинов объясняется очень важной функцией липидов в организме, особенностями их воздействия на стенки сосудов и характера их усвоения клетками. Дислипидемия влечет за собой внедрение макрофагов в подэндотелиальный слой сосудистой стенки, что снижает устойчивость эндотелия, приводит к его повреждению и, соответственно, к нарушению функций. При дисфункции эндотелия, как известно, нарушается синтез оксида азота (блокада NOS-синтазы): через систему цитокинов оксид азота уменьшает действие факторов роста, из-за чего в мембранах гладких мышц сосудов образуется избыток белка конксина-43. Это приводит к замыканию межклеточных щелей (конексонов) и к нарушению межклеточного общения между гладкими мышцами. Кроме того, оксид азота является антиоксидантом, уменьшая окисление ЛПНП [7]. В механизмах тромбообразования и повреждения эндотелия сосудов имеет значение аутоиммунные реакции к фосфолипидам. Одним из показателей повреждения эндотелия, по

мнению З.А. Лупинской с соавт. [7], могут являться антитела к кардиолипину, относящиеся к семейству антифосфолипидных антител, которые взаимодействуют с фосфолипидами эндотелиальных клеток кровеносных сосудов, что приводит к повреждению этих клеток и развитию воспалительных реакций с образованием тромбов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенные нами исследования показали, что ЦМВИ матери ассоциируется с дисбалансом липидного спектра сыворотки крови пуповины и с нарушениями эндотелия сосудов артерии пуповины. При этом наблюдается увеличение концентрации насыщенных кислот: миристиновой, пентадекановой, стеариновой жирных кислот, триглицеридов и ХС-ЛПВП, – при одновременном уменьшении концентрации ОХС и ХС-ЛПНП в сыворотке крови пуповины. В эндотелии сосудов пуповины выявляются характерные для ЦМВ клетки, а также клетки, ядра которых вступили в апоптотное состояние, наблюдается отек, разволокнение и дистрофические изменения гладкомышечных клеток, инфильтрация подэндотелиального и внутреннего слоев мышечной оболочки сосудов. Выявленные изменения в эндотелии сосудов при ЦМВИ могут способствовать дисциркуляторным расстройствам в сосудах пуповины и инициировать развитие спазма артерий, затруднению венозного тока крови, тромбозу, что в условиях дисбаланса липидов может явиться причиной возникновения гипоксии и задержки внутриутробного роста плода.

ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Автандилов Г.Г. Основы количественной патологической анатомии. – М.: Медицина. – 2002. – 240 с.
Avtandilov G.G. Fundamentals of quantitative pathological anatomy. – Moscow: Meditsina, 2002. – 240 p. (in Russian)
2. Глуховец Б.И., Глуховец Н.Г. Патология последа. – СПб.: ГРААЛЬ, 2002. – 448 с.

Glukhovets B.I., Glukhovets N.G. Pathology of the secundines. – Saint-Petersburg: GRAAL, 2002. – 448 p. (in Russian)

3. Долгов В.В., Селиванова А.В. Биохимические исследования в клинко-диагностических лабораториях ЛПУ первичного звена здравоохранения. – СПб., 2007. – 152 с.

Dolgov V.V., Selivanova A.V. Biochemical researches in clinical diagnostic laboratories of primary health care medical facility. – Saint-Petersburg, 2007. – 152 p. (in Russian)

4. Дорофиенко Н.Н. Особенности строения эндотелиоцитов интимы сосудов пуповины при цитомегаловирусной инфекции // Бюл. физиол. и патол. дыхания. – 2014. – № 52. – С. 72–77.

Dorofienko N.N. Features of the structure of endothelial cells of the intima of umbilical vessels at cytomegalovirus infection // Bjul. fiziol. i patol. dyhanija. – 2014. – N 52. – P. 72–77. (in Russian)

5. Ишутина Н.А. Липидный состав пуповинной крови от матерей с патологическим течением беременности // Бюл. физиол. и патол. дыхания. – 2008. – № 30. – С. 56–58.

Ishutina N.A. Lipid composition of umbilical blood from mothers with abnormal pregnancy // Bjul. fiziol. i patol. dyhanija. – 2008. – N 30. – P. 56–58. (in Russian)

6. Ледяйкина Л.В., Власов А.П., Балыкова Л.А., Герасименко А.В. и др. Изменение гомеостаза при гипоксически-ишемических поражениях центральной нервной системы у новорожденных // Дет. больница. – 2012. – № 3. – С. 40–42.

Ledyaykina L.V., Vlasov A.P., Balykova L.A., Gerasimenko A.V. et al. Change of homeostasis during hypoxic-ischemic lesions of central nervous system in newborns // Det. bol'nica. – 2012. – N 3. – P. 40–42. (in Russian)

7. Лупинская З.А., Зарифьян А.Г., Гурович Т.Ц., Шлейфер С.Г. Эндотелий. Функция и дисфункция. – Бишкек, 2008. – 373 с.

Lupinskaya Z.A., Zarifjan A.G., Gurovitch T.Z., Shleifer S.G. Endothelium. Function and dysfunction. – Bishkek, 2008. – 373 p. (in Russian)

8. Луценко М.Т., Пирогов А.Б., Гориков И.Н., Довжикова И.В. и др. Фетоплацентарная система при ОРВИ. – Благовещенск, 2000 – 168 с.

Lutsenko M.T., Pirogov A.B., Gorikov I.N., Dovzhikova I.V. et al. Fetoplacental system at acute

respiratory viral infection. – Blagoveshchensk, 2000 – 168 p. (in Russian)

9. Радзинский В.Е., Милованов А.П. Экстраэмбриональные и околоплодные структуры при нормальной и осложненной беременности. – М.: Медицинское информационное агентство, 2004. – 393 с.

Radzinskiy V.E., Milovanov A.P. Amniotic and adnexal structures at normal and complicated pregnancy. – Moscow: Medicinskoe informacionnoe agentstvo, 2004. – 393 p. (in Russian)

10. Соколов Д.И., Лесничия М.В., Миравшвили М.И., Львова Т.Ю. и др. Оценка интенсивности поглощения липидов сыворотки крови беременных эндотелиальными клетками // Журнал акуш. и жен. болезней. – 2009. – Т. LVIII (2). – С. 57–64.

Sokolov D.I., Lesnichiya M.V., Mirashvili M.I., Lvova T.Y. et al. Assessment of the intensity of the absorption of serum lipid pregnant endothelial cells // Zhurnal akush. i zhen. boleznej. – 2009. – Vol. LVIII (2). – P. 57–64. (in Russian)

11. Сухих Г.Т., Вихляева Е.М., Ванько Л.В., Ходжаева З.С. Эндотелиальная дисфункция в генезе перинатальной патологии // Акуш и гин. – 2008. – № 5. – С. 3–7.

Sukhikh G.T., Vikhlayeva E.M., Vanko L.V., Khodzhaeva Z.S. Endothelial dysfunction in the genesis of perinatal pathology // Akush i gin. – 2008. – N 5. – P. 3–7. (in Russian)

12. Черток В.М., Коцюба А.Е., Бабич Е.В. Ультраструктура интимы артерий мягкой оболочки головного мозга человека при артериальной гипертензии // Морфология. – 2009. – Т. 136, № 5. – С. 50–54.

Chertok V.M., Katsyuba A.E., Babich E.V. Ultrastructure of intima of the arteries of cranial pia mater at arterial hypertension // Morfologija. – 2009. – Vol. 136 (5) – P. 50–54. (in Russian)

13. Чхаидзе И.Г. Липидный спектр пуповинной крови новорожденных // Педиатрия. – 1988. – № 2. – С. 108.

Chkhaidze I.G. Umbilical blood lipids in newborns // Pediatrija. – 1988. – N 2. – P. 108. (in Russian)

14. Goligorsky M.S. Endothelial cell dysfunction: can't live with it, how to live without it // Am. J. Physiol. Renal. Physiol. – 2005. – Vol. 288. – P. F871–F880.

15. Simionescu M. Endothelial cell response to hyperlipemia: Activation-dysfunction-injury, the protective role simvastatin // Vasc. Pharm. – 2002. – Vol. 38, № 5. – P. 275–282.

Сведения об авторах

Ишутина Наталья Александровна – доктор биологических наук, старший научный сотрудник Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания СО РАМН (675000, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22; e-mail: ishutina-na@mail.ru)

Дорофиенко Николай Николаевич – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания СО РАМН (e-mail: dorofienko-nn@mail.ru)

Information about the authors

Ishutina Natalia Aleksandrovna – Doctor of Biological Sciences, Senior Research Officer of the Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration SB RAMS (Kalinina str., 22, Blagoveshchensk, 675000; e-mail: ishutina-na@mail.ru)

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