

Я.Х. Даваа, М.В. Шубина, О.И. Зайцева, С.Ю. Терещенко

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ НОВОРОЖДЕННЫХ ПРИ АНЕМИИ БЕРЕМЕННЫХ

УДК 612.111:616.1-053.31

Для изучения особенностей молекулярной организации мембран эритроцитов пуповинной крови новорожденных методом флуоресцентного зондирования исследованы эритроциты пуповинной крови 37 новорожденных от матерей с при железодефицитной анемией (ЖДА) (основная группа) и 34 новорожденных от матерей с нормальным уровнем гемоглобина (контрольная группа). Выявлено, что характерным для состояния мембран эритроцитов у новорожденных при железодефицитной анемии беременной является преобразование ее белковой составляющей и снижение кальций-аккумулирующей функции. Авторы предполагают, что конформация белковой компоненты мембраны эритроцита может быть связана с изменениями, вызванными дефицитным эритропозом плода при анемии беременных, что затрагивает важнейшие функции мембраны эритроцита.

Ключевые слова: новорожденные, анемия беременных, клеточная мембрана, эритроцит.

In order to study the molecular organization of erythrocyte membranes of umbilical cord blood of newborns by the method of fluorescence sensing erythrocytes of umbilical cord blood of 37 newborns from mothers with iron deficiency anemia (IDA) (main group) and 34 newborns from mothers with normal hemoglobin (control group) were investigated. It was revealed that for the state of erythrocyte membranes in neonates at the iron deficiency anemia in pregnant women the transformation of its protein component and a decrease in calcium-accumulating function is characteristic. The authors assume that the conformation of the protein component of erythrocyte membrane may be due to changes caused by deficient erythropoiesis of fetus at the anemia in pregnant women, which affects the major functions of erythrocyte membrane.

Keywords: newborns, anemia during pregnancy, cell membrane, erythrocyte.

Клинические исследования показывают, что выраженная железодефицитная анемия (ЖДА) во время беременности может приводить к преждевременным родам, привычному невынашиванию, снижению массы тела новорожденного и даже к смерти плода при тяжелой форме анемии, особенно если она проявилась в первой половине беременности [6]. Патогенетически это обусловлено многими факторами. Так, известно, что при анемии беременных нарушается образование гемоглобина вследствие недостатка сывороточного железа и возникают трофические расстройства в тканях материнского организма. Так как железо принимает участие в росте мышечной массы, нервов, синтезе коллагена, метаболизме порфирина и в тканевом дыхании, то ЖДА беременных вызывает прогрессирующую гемическую гипоксию с последующим развитием вторичных метаболических расстройств в системе «мать-плод» [4]. При такой ситуации в материнском организме эритроцит плода несет колоссальную функциональную нагрузку и характеризуется увеличением мощности метаболизма и риском дестабилизации [8]. Наряду с много-

численными нарушениями в сложных механизмах роста и развития неминуемо возникает состояние железодефицитного эритропоза у плода, а в дальнейшем и у новорожденного [5].

Указанные патофизиологические механизмы не могут не затрагивать чрезвычайно функционально активную мембрану эритроцита. Так, молекулярной основой измененных форм эритроцитов (пойкилоцитов, анизоцитов и микроцитов) у новорожденных с ЖДА может являться нарушение взаимодействия липидной и белковой частей мембраны, а короткоживущие формы эритроцитов образуются вследствие нарушения электролитного баланса красных кровяных телец и изменения структуры мембранного белка – спектрина. Нарушение структуры эритроцитарной мембраны при анемии у девочек-подростков и молодых женщин отчетливо показаны в исследованиях О.А. Пахмутовой [2]. Автором показано наличие выраженных изменений в структуре и функции плазматических мембран, характерных для железодефицитных состояний. Для дефицитного эритропоза, как латентного, так и проявляющегося в виде ЖДА, характерно увеличенное содержание мембранных протеинов в мембране эритроцита и их более поверхностное расположение, что, по-видимому, и является молекулярной основой видимых морфологических изменений эритроцита при этом заболевании. Однако к настоящему времени молекулярная организация мембран эритроцитов пуповинной крови новорожденных от матерей с ЖДА

изучена крайне недостаточно, что и послужило поводом для проведения настоящего исследования.

Материалы и методы исследования. Исследованы биофизические характеристики мембран эритроцитов пуповинной крови 71 новорожденного тувинской национальности методами флуоресцентной спектроскопии в соответствии с рекомендациями Ю.А. Владимировой и Г.Е. Добрецова на спектрофлуориметре «Hitachi MPF-4» (Япония) [1].

Все исследования биофизических характеристик мембран методом флуоресцентной спектроскопии (флуориметрии) проведены на спектрофлуориметре «Hitachi MPF-4» (Япония). Использованы зонды: пирен, 1-аланинонафталин-8-сульфонат (АНС), нистатин. Мембраны эритроцитов выделены с помощью метода J.T. Dodge [7].

Для исследования мембран эритроцитов использовали по 300 мкл суспензии в круглых кварцевых кюветах с длиной оптического пути 5 мм.

Исследованы следующие биофизические характеристики мембран:

- Собственная беззондовая флуоресценция NADH мембран эритроцитов. Результат выражали в единицах флуоресценции (ЕФ).

- Собственная беззондовая флуоресценция триптофановых остатков мембранных белков (триптофанилов). Результат выражали в единицах флуоресценции (ЕФ).

- Степень погруженности мембранных протеинов в липиды по коэффициенту индуктивно-резонансного пере-

НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН: ДАВАА Яна Хуразаноловна – аспирант, ШУБИНА Маргарита Викторовна – аспирант, ЗАЙЦЕВА Ольга Исаевна – д.м.н., вед.н.с., ТЕРЕЩЕНКО Сергей Юрьевич – д.м.н., проф., руководитель клинического отделения соматического и психического здоровья детей, legise@mail.ru.

хода в системе триптофанилы-пирен. Результат выражали в относительных единицах (ОЕ).

- Микровязкость поверхностных мембранных структур (вращательной диффузии) проводили по параметрам поляризации (коэффициенту анизотропии) флюоресценции зонда АНС (ОЕ).

- Текучесть глубоких областей липидного бислоя мембран определяли по отношению флюоресценции эксимеры/мономеры пирена (ОЕ).

- Характеристика молекулярной организации мембран и конформация белковых глобул в области белок-липидного взаимодействия исследована по параметру интенсивности флюоресценции зонда АНС после связывания с поверхностными структурами мембраны (ОЕ).

- Проницаемость эритроцитарных мембран по нистатину (ОЕ).

- Кальций-связывающая способность мембран (ОЕ).

Статистическую значимость различий при сравнении двух несвязанных выборок анализировали с помощью критерия Манна-Уитни (U). Результаты исследования количественных параметров в группах сравнения представлены в виде медианы и интерквартильного интервала Me (LQ-UQ), где Me – медиана, LQ – 25% процентиль, UQ – 75% процентиль.

Результаты и обсуждение. Для выяснения уровня стабильности и характера структурных изменений в мембранах эритроцитов новорожденных были изучены показатели структурно-функционального состояния мембран эритроцитов пуповинной крови с наличием анемии у беременных, которая встречалась среди обследованных нами беременных у 37 женщин (52%). Изменение изученных параметров флюоресцентного зондирования мембран представлено в таблице.

Нами установлено, что в группе новорожденных при анемии беременных отмечается более поверхностное расположение белковых молекул по отношению к липидному бислою (рис. 1).

Мы полагаем, что найденное изменение топографии белков в эритроцитарных мембранах в виде их всплывания к поверхности мембраны является характерным для железодефицитного состояния, что базируется на сравнении результатов наших исследований с данными других авторов. Так, было показано [2], что у молодых женщин погруженность белков в мембране эритроцита снижается уже при латентном дефиците железа.

Аналогичные изменения выявляются у девочек-подростков при железодефицитных состояниях и нарастают при постепенном развитии дефицита железа. Мы расцениваем это обстоятельство как отражение нарастания деструктивных процессов в мембране эритроцита с развитием железодефицитного состояния. Обнаружение такой закономерности у новорожденных от матерей с анемией позволяет расценить показатель трансмембранной дислокации мембранных белков как информативный признак риска развития железодефицитных состояний в постнатальный период.

Структура поверхностно расположенных областей мембран оценивалась нами также по флюоресценции отрицательно заряженного зонда АНС, располагающегося в зоне белок-липидных взаимодействий поверхности мембраны. При рассмотрении флюоресценции зонда АНС в расчете на уровень флюоресценции белковых групп в мембранах эритроцитов новорожденных установлено, что в группе новорожденных от матерей с анемией поверхностная структура мембран также претерпевает преобразование, стабилизируясь на наиболее высоких величинах: 0,78 (0,69-0,95) ОЕ против 0,69 (0,57-0,89) ОЕ в контроле, $p=0,069$, что отражает возможные преоб-

Параметры структурно-функционального состояния мембран эритроцитов пуповинной крови новорожденных от матерей с анемией беременных

Параметр	Новорожденные без анемии N=34	От беременных с анемией N=37	P
Флуоресценция NADH ₂ , ЕФ	8,0 (6,7-11,0)	7,0 (6,1-9,0)	0,119
Флуоресценция триптофанилов, ЕФ	16,5 (12,0-22,0)	14,8 (11,0-20,4)	0,250
Погруженность белков в липидный бислой, ОЕ	0,275 (0,154-0,428)	0,167 (0,057-0,333)	0,024
Текучесть в глубоких слоях мембраны, ОЕ	0,588 (0,493-0,711)	0,591 (0,531-0,652)	0,917
Текучесть в зоне белок-липидных контактов, ОЕ	0,387 (0,333-0,456)	0,385 (0,320-0,460)	0,617
Текучесть поверхностных слоев мембран, ОЕ	2,05 (1,70-2,22)	2,041 (1,86-2,44)	0,302
Флуоресценция ДМХ (F, $\lambda=498$ нм)	51,0 (39,0-64,1)	56,0 (42,6-67,0)	0,300
Флуоресценция ДМХ (F, $\lambda=538$ нм), ЕФ	30,5 (25,9-39,5)	35,0 (27,2-45,0)	0,149
Флуоресценция ДМХ (F, $\lambda=542$ нм), ЕФ	26,6 (22,8-35,5)	30,0 (25,0-40,4)	0,150
Отношение флуоресценции ДМХ $\lambda=498$ нм/ $\lambda=542$ нм, ОЕ	1,77 (1,62-2,05)	1,73 (1,58-1,98)	0,482
Флюоресценция АНС, ЕФ	11,0 (9,7-13,9)	12,3 (10,0-16,5)	0,454
Флуоресценция АНС/флуоресценция триптофанилов, ОЕ	0,69 (0,57-0,89)	0,78 (0,69-0,95)	0,069
Показатель дестабилизации мембран, ОЕ	27,8 (19,1-36,8)	28,6 (23,6-39,0)	0,440
Проницаемость мембран, ОЕ	0,23 (0,20-0,28)	0,23 (0,21-0,29)	0,617
Кальций-связывающая способность мембран, ОЕ	2,08 (1,38-3,17)	1,50 (0,96-2,40)	0,056

разования поверхностного заряда мембраны в период стабилизации метаболических и биофизических свойств мембран, наступающих в ходе адаптации к гипоксии. Это согласуется с данными литературы [2] о повышении флюоресценции АНС в мембранах эритроцитов детей с ане-

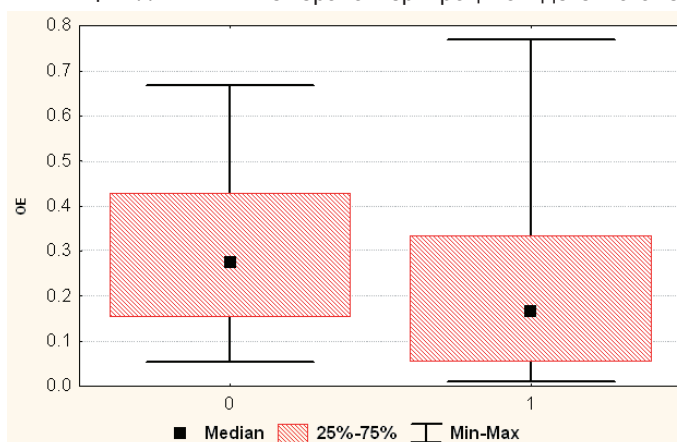


Рис. 1. Степень погруженности белков в липидный бислой в мембранах новорожденных при анемии беременных: 0 – новорожденные от беременных без анемии, 1 – от беременных с анемией; $p=0,024$

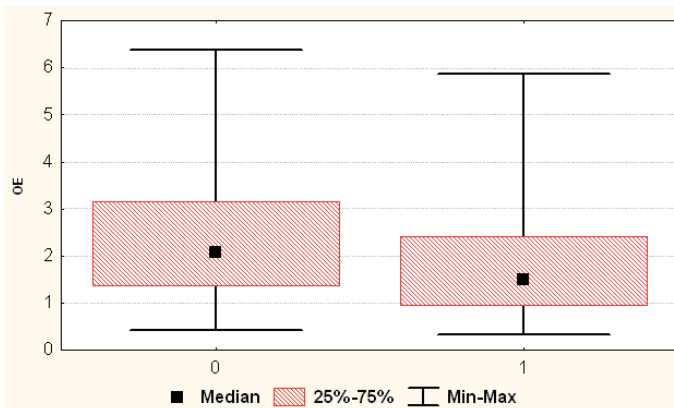


Рис.2. Кальций-связывающая способность мембран эритроцитов у новорожденных при анемии беременных. 0 – новорожденные от беременных без анемии, 1 – от беременных с анемией; $p_{0-1}=0,056$

мией и свидетельствует о выраженных изменениях в области белок-липидного взаимодействия. Такие результаты флюоресценции АНС дополняют вышеизложенные данные о развитии деструктивных процессов в мембране эритроцита у детей, матери которых страдали анемией беременных.

Учитывая важность кальций-фосфорного гомеостаза растущего ребенка, весьма существенным моментом является исследование кальций-связывающей способности мембран. Обеспеченность растущего организма ребенка кальцием зависит в первую очередь от уровня его поступления в клетку, и в этом процессе клеточные мембраны играют регулируемую роль.

Кальций-связывающая способность мембран эритроцитов у новорожденных при анемии беременных существенно уменьшалась (рис. 2), что согласуется с данными других авторов, обнаруживших подобную тенденцию к снижению кальций-связывающей способности мембран эритроцитов у взрослых женщин с железодефицитной анемией [2].

Снижение данного показателя отражает уровень активности транспортных механизмов мембран и возможностей клеток к усвоению минеральных веществ, что в свою очередь отражается на метаболизме белков и липидов мембран. Можно полагать, учитывая важность кальциевой регуляции работы многих белков-ферментов, что обнаруженные дефекты функционирования мембран стоят в непосредственной связи со снижением уровня устойчивости клеток крови против внешних воздействий на организм беременной и новорожденного при анемии беременных.

В прогностическом плане снижение кальций-связывающей способности мембран эритроцитов у новорожденных при анемии беременных является неблагоприятным фактором, повышающим риск развития ряда заболеваний в дальнейшем, так как быстрый рост новорожденного предъявляет серьезные требования к достаточному поступлению кальция в клетку в связи с активным построением новых тканей. Таким образом, снижение кальций-связывающей способности эритроцитарных мембран может рассматриваться как прогностический маркер риска замедления формирования костно-суставной системы ребенка, вследствие нарушений внутриутробного развития плода. Это согласуется с данными литературы, указывающими на то, что недостаток кальция в организме беременной или антагонисты кальция, принимаемые беременной, заметно замедляют рост плода [3]. Вышеизложенное определяет актуальность изучения мембраноассоциированных причин нарушений костного метаболизма плода и новорожденного и прогноза этих процессов в постнатальном периоде по анализу активности кальций-связывающей способности мембран на модели мембраны эритроцита.

Заключение. Таким образом, характерным для состояния мембран эритроцитов у новорожденных при железодефицитной анемии беременных является преобразование главным образом, белковой составляющей мембран эритроцитов. Это выразилось в нарушении пространственной конфигурации и топографии белков мембраны со смещением расположения белков в наружные слои мембраны, выраженной тенденцией к увеличению содержания триптофановых групп белков, снижением кальций-связывающей способности мембран, а следовательно, активности кальций-транспортных белков мембран. Конформация белковой компоненты мембраны эритроцита может быть связана с преобразованиями, вызванными дефицитом железосодержащих ферментов,

что затрагивает важнейшие функции клеточной мембраны и эритроцита в целом. Можно полагать, что дефицит железа у матери и недостаточное депонирование его в антенатальном периоде у плода способствуют развитию у новорожденных детей дефицитного эритропоэза, затруднений гемоглобинообразования, появлению хронической гипоксии и дисбалансу в системе эритрона, что проявляется вышеуказанными нарушениями физико-химических параметров эритроцитарных мембран и метаболизма клеточных структур.

Литература

1. Владимиров Ю.А. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран / Ю.А. Владимиров, Г.Е. Добрецов. – М.: Наука, 1980. – 320 с.
2. Владимиров Ю.А. Fluorescent probes in the study of biological membranes / Y.A. Vladimirov, G.E. Dobretsov. – М.: Nauka, 1980. – 320 p.
3. Пахмутова О.А. Клинические проявления и структурно-функциональная организация мембран эритроцитов при латентном дефиците железа у девочек-подростков и молодых женщин: автореф. дис. ... канд. мед. наук / О.А. Пахмутова. – Красноярск, 2008. – С. 24.
4. Pakhmutova O.A. Clinical and structural - functional organization of erythrocyte membranes at latent iron deficiency among adolescent girls and young women: abstract. dis. ... cand. med. science / O.A.Pakhmutova. - Krasnoyarsk, 2008. - P. 24.
5. Преображенский Д.В. Consilium Medicum. Женское здоровье / Д.В. Преображенский, И.Д. Вышинская // Consilium Medicum. –2008. – Т. 10, № 6. – С. 12-16.
6. Preobraghenskiy D.V. Consilium Medicum. Women's Health / D.V. Preobraghenskiy, I.D. Vyshinskaya // Consilium Medicum. –2008. - V. 10, № 6. - P. 12-16.
7. Allen L. H. Anemia and iron deficiency: effects on pregnancy outcome / L.H. Allen // Am J Clin Nutr. – 2000. – Vol. 71, № 5 Suppl. – P. 1280S-1284S.
8. Allen L. H. Biological mechanisms that might underlie iron's effects on fetal growth and preterm birth / L.H. Allen // J Nutr. – 2001. – Vol. 131, № 2S-2. – P. 581S-589S.
9. Maternal and fetal outcome after severe anemia in pregnancy in rural Ghana / D. Geelhoed [et al] // Acta Obstet Gynecol Scand. – 2006. – Vol. 85, № 1. – P. 49-55.
10. The preparation and hemical characteristics of hemoglobin - free ghosts of human erythrocyts / J.T. Dodge, C. Mitchell, D. Hanahan // Arch. Biochem. and Biophys. – 1980. – Vol. 100, № 1. – P. 119-130.
11. Status of vitamin A, vitamin B2, iron and an-oxidantive activity in anemic pregnant women in China / F. Yang [et al] // Wei Sheng Yan Jiu. – 2006. – Vol. 35, № 3. – P. 320-322.