

**СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ  
ПРИ ЖЕЛЕЗОДЕФИЦИТНОМ ЭРИТРОПОЭЗЕ  
У ДЕВОЧЕК-ПОДРОСТКОВ И МОЛОДЫХ ЖЕНЩИН**

О. А. Пахмутова, Э. В. Каспаров, С. Ю. Терещенко

ГУ НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН, дир. – д. м. н.,

чл. – корр. В. Т. Манчук.

***Резюме.** Хорошо известным является феномен изменения морфологии эритроцитов при железодефицитных состояниях (ЖДС), однако, его молекулярные основы с точки зрения структуры эритроцитарной мембраны, изучены недостаточно. Нами установлено, что основным компонентом вовлечения эритроцитарных мембран в патогенез железодефицитного эритропоэза у девочек-подростков и молодых женщин является увеличение содержания мембранных протеинов (определенное по флюоресценции триптофанилов), которое выявляется уже на стадии латентного дефицита железа и достигает своего максимума при железодефицитной анемии (ЖДА). Значимые изменения в липидном бислое мембраны отсутствуют. Увеличение содержания белков в мембране эритроцита при ЖДА может являться молекулярной основой клеточного звена развития болезни.*

***Ключевые слова:** железодефицитное состояние, железодефицитная анемия, латентный дефицит железа, мембрана эритроцита.*

Важность изучения железодефицитных состояний обусловлена их высокой частотой среди населения, особенно девочек-подростков и женщин детородного возраста. По данным ВОЗ, примерно 50% женщин детородного возраста в западных странах в той или иной степени страдают дефицитом железа [5]. В России латентный дефицит железа в некоторых регионах достигает 50% [9]. По данным Минздрава России, за 2000 г. было отмечено более 1 млн. случаев анемии, среди которых около 80% приходится на ЖДА [9]. Известно, что каждая четвертая женщина детородного возраста, проживающая в средней

полосе России, страдает ЖДА [6], а скрытый дефицит железа обнаруживается в 13,5% случаев [1].

Согласно литературным данным, 85% детей раннего возраста и более 30% школьного страдают дефицитом железа [5, 10]. Дефицит железа, по Ю. Е. Малаховой, имеет место у  $\frac{1}{4}$  школьников. Латентный дефицит железа (ЛДЖ) превышает частоту ЖДА [7]. Частота дефицита железа у девочек-подростков составляет 9-40 %. Так, у девочек-подростков в США в 1994-1996 гг. она была равна 9-11%, в исследовании 1996 г (Brunner) – 16 %. В 72 % случаев у японских девочек пубертатного возраста установлен выраженный дефицит железа через 3 года после менархе, в 12 % из них в форме ЖДА [4]. В возрасте от 5 до 14 лет распространенность анемии в развитых странах составляет 5,9%, в развивающихся – 48,1%. Среди женщин от 15 до 59 лет в развитых странах – 10,3%, в развивающихся – 42,3%. Данные официальной статистики МЗ РФ свидетельствуют о неуклонном росте заболеваемости анемией детей и подростков, особенно в последние годы [8].

Медицинская и социальная значимость проблемы дефицита железа у девочек-подростков связана не только с высокой его распространенностью, но и с последствиями, тяжесть которых обусловлена снижением когнитивных функций [4].

Морфологические изменения эритроцитов при ЖДА хорошо известны. Данные изменения отражают состояние мембраны эритроцита, которое возникает при дефиците железа. Для детального изучения патогенеза ЖДА необходимо изучение молекулярной организации мембраны эритроцита, чему и посвящено наше исследование.

Таким образом, к настоящему времени недостаточно изучены, как сама молекулярная основа изменений в структуре мембраны эритроцита при дефиците железа и ЖДА, так и ее стадийный характер, в частности, особенности, характерные для стадии железодефицитного эритропоэза. Не оценена относительная степень вовлеченности белкового и липидного компонентов мембраны в патогенез ЖДА. Кроме того, остаются неизученными

мембранопатологические характеристики ЛДЖ, которые могут быть патогенетически связаны с формированием клинических проявлений сидеропенического синдрома.

### **Материалы и методы**

Для решения поставленных в настоящем исследовании задач за период с 2003 по 2007 гг. нами проведены клинические наблюдения и специальные биофизические исследования клеточных мембран у 285 девочек-подростков и молодых женщин в возрасте от 11 до 24 лет с различной степенью тяжести железодефицитного состояния. Молодые женщины не имели в анамнезе беременностей и родов. В качестве контроля обследовано 79 девочек-подростков и молодых женщин с функциональными заболеваниями пищеварительного тракта без нарушения обмена железа.

Диагноз и тяжесть течения ЖДС верифицировали в соответствии с рекомендациями Международной классификации заболеваний и протокола ведения больных ЖДА [11]. Учитывая стадийность развития дефицита железа, были выделены следующие группы и подгруппы:

I – контрольная группа лиц без лабораторных признаков нарушения обмена железа;

II – группа ЛДЖ; подразделена на две подгруппы:

А. с истощением тканевых запасов железа (2А);

Б. с железодефицитным эритропозом (2Б);

III – группа ЖДА.

Лабораторные критерии для отнесения обследованных девочек и женщин в соответствующие группы и подгруппы представлены в таблице 1.

Физико-химические характеристики биологических мембран исследованы нами методами флуоресцентной спектроскопии в соответствии с рекомендациями Ю.А. Владимирова и Г.Е. Добрецова [2]. Все исследования биофизических характеристик мембран методом флуоресцентной спектроскопии (флюорометрии) проведены на спектрофлюориметре «Hitachi MPF-4» (Япония). Используются зонды: пирен, 1-аланинонафталин-8-

сульфонат (АНС), нистатин. Мембраны эритроцитов выделены с помощью метода J.T. Dodge [12] с собственными модификациями.

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

Изучены следующие биофизические характеристики мембран:

- Собственная беззондовая флюоресценция триптофановых остатков мембранных белков (триптофанилов). Результат выражали в единицах флюоресценции (ЕФ);
- Степень погруженности мембранных протеинов в липиды по коэффициенту индуктивно-резонансного перехода в системе триптофанилы-пирен, 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). Для оценки силы связи между признаками использован коэффициент ранговой корреляции Спирмена ( $r_s$ ). 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

В результате анализа лабораторных параметров обмена железа группа контроля (1) составила 79 (27,7%) человек, группа с истощением запасов железа (2 А) – 83 (29,1%), с железодефицитным эритропозом (2 Б) – 38 (13,3%), с ЖДА (III) – 85 (29,8%).

Структурное состояние белков мембраны эритроцита отражали в наших исследованиях такие показатели, как интенсивность флюоресценции триптофановых остатков и индуктивно-резонансный переход в системе триптофанилы-пирен, прямо отражающий погруженность протеинов в липиды, а физико-химическое состояние области белок-липидного взаимодействия – параметры флюоресценции водорастворимого зонда АНС (Табл. 2).

Как следует из полученных нами данных, в группе ЖДА по сравнению с контрольной группой наблюдается статистически значимое повышение уровня флюоресценции триптофанилов ( $p=0,04$ ). Кроме того, отмечается повышение содержания протеинов, определенное по флюоресценции триптофанилов с нарастанием латентного дефицита железа, а именно в подгруппе обследованных с латентным железодефицитным эритропозом ( $p=0,01$ ). Наличие патогенетической связи дефицита железа с уровнем флюоресценции триптофанилов подтверждается статистически значимой обратной корреляционной зависимостью этого параметра с уровнем сывороточного железа ( $r=-0,21$ ,  $p<0,001$ ). Итак, для дефицитного эритропоза, как латентного (2Б), так и проявляющегося в виде ЖДА (III) характерно увеличенное содержание мембранных протеинов в мембране эритроцита, что, на наш взгляд, и является молекулярной основой видимых морфологических изменений эритроцита (анизотропии, микроцитоза, пойкилоцитоза) при этом заболевании.

Наиболее многообещающим для изучения пространственной организации сложнейшего комплекса белков и липидов в мембране представляется метод измерения расстояний между донором и акцептором электронной энергии в мембране. Расположение белковой глобулы в мембране может быть оценено по тушению белковой флюоресценции при добавлении в суспензию мембран

такого липидотропного зонда, как пирен (при этом пирен выступает как акцептор энергии). Снижение показателя, то есть низкая эффективность переноса энергии, будет свидетельствовать о более поверхностном расположении мембранных белков, иначе говоря, о снижении их погруженности в липидный бислой. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что погруженность белков в мембране эритроцита снижается с развитием железодефицитного состояния, при этом отмечается четкая тенденция к его снижению при латентном дефиците железа по сравнению с контрольной группой: в подгруппах с истощением запасов железа ( $p=0,1$ ) и железодефицитным эритропозом ( $p=0,07$ ).

Необходимо отметить, что изменение белковой флюоресценции может быть обусловлено, как конформационными перестройками белковых глобул, так и модификацией их липидного окружения. В этой связи особый интерес представляет изучение состояния области белок-липидного взаимодействия в мембране. Определенную информацию о таком взаимодействии могут нести параметры флюоресценции зонда АНС, локализующегося одновременно в липидах (в области полярных головок и глицериновых остатках) и белках мембраны. Особенностью АНС, как флюоресцирующего зонда является его крайне высокая чувствительность, но малая специфичность по отношению к структурным изменениям мембраны. Так параметры флюоресценции АНС очень чувствительно реагируют на изменения заряда поверхности мембраны, трансмембранный потенциал, связывание и транспорт ионов через мембрану, состояние липидов и белков в поверхностных слоях мембраны. Таким образом, АНС является “неспецифическим” зондом, позволяющим зарегистрировать наличие изменений в структуре мембраны в области белок-липидного взаимодействия [3].

Как следует из представленных в таблице 2 данных, нами не обнаружено статистически значимых изменений флюоресценции АНС в обследованных группах.

Следовательно, основным компонентом вовлечения эритроцитарных мембран в патогенез железодефицитного состояния у девочек-подростков и молодых женщин является увеличение содержания мембранных протеинов (триптофанилов), которое выявляется уже на стадии ЛДЖ и достигает своего максимума при развитии ЖДА. Одновременно отмечена тенденция к снижению погруженности протеинов в липидный бислой, более выраженная в стадию ЛДЖ. При этом нами не было зарегистрировано параллельного нарушения организации области белок-липидного взаимодействия.

Совокупность полученных данных может свидетельствовать о нарушении конформационной структуры белковых глобул, встроенных в мембрану эритроцитов, как основной причины повышения уровня флюоресценции их триптофановых остатках. При этом их более поверхностное расположение не связано с изменением липидного матрикса мембран, а в большей мере происходит за счет изменения свойств самих протеинов.

Причин изменения свойств мембранных белков при ЖДА может быть несколько: например, нарушение белковосинтетической функции клетки с ростом дефицита железа в организме, кроме того, повышение содержания интегральных белков в мембране эритроцита можно расценить как напряжение ионного обмена в клетке и рецепторной функции эритроцитарной мембраны, что может быть одним из механизмов адаптации организма к железодефицитному состоянию. Однако ведущим механизмом установленных изменений, на наш взгляд, является нарушение созревания эритроцита в результате нарушения синтеза гемоглобина, что подтверждается появлением увеличения флюоресценции триптофанилов именно на стадии железодефицитного эритропоэза и отсутствия этого феномена на стадии истощения запасов железа.

Другим важным выводом, следующим из полученных нами данных, является полученный факт нарушений в структуре мембраны эритроцита еще на стадии ЛДЖ без наличия признаков ЖДА. Нами установлено, что отличительными особенностями структурной организации мембран эритроцитов при ЛДЖ

являются снижение микровязкости как глубоких, так и поверхностных слоев липидного бислоя и увеличение трансмембранной проницаемости (табл. 2). Причем указанные мембранопатологические изменения в наибольшей степени выражены в период истощения запасов железа и уменьшаются в периоды железодефицитного эритропоэза и ЖДА.

Итак, представленные в настоящем сообщении данные физико-химического состояния мембран эритроцитов у девочек-подростков и молодых женщин с различной степенью железодефицитного состояния свидетельствуют о нарушении пространственной конфигурации и топографии протеинов со смещением взаиморасположения белков и липидов. Такие преобразования, несомненно, затрагивают важнейшие функции клеточной мембраны – механизмы рецепции и переработки информации, мембранного транспорта, межклеточной кооперации, что формирует клеточное звено развития болезни.

Таким образом, основным компонентом вовлечения эритроцитарных мембран в патогенез железодефицитного эритропоэза у девочек-подростков и молодых женщин является увеличение содержания мембранных протеинов (определенное по флюоресценции триптофанилов), которое выявляется уже на стадии ЛДЖ и достигает своего максимума при развитии ЖДА. Одновременно нами отмечена тенденция к снижению погруженности протеинов в липидный бислой, более выраженная в стадию ЛДЖ. Патогенетическое значение установленного факта заключается в возможной модификации функциональной активности мембранных белков эритроцита, в частности, рецепторной их составляющей, что, несомненно, приводит к изменению внутриклеточного метаболизма и межклеточного взаимодействия. Отсутствие значимых нарушений взаимодействия белков мембраны с липидным бислоем при железодефицитном состоянии у обследованных нами девочек-подростков и молодых женщин подтверждено в результате анализа флюоресценции водорастворимого зонда АНС. Данный факт может свидетельствовать о свойственном для дефицитного эритропоэза первичном характере

конформационных изменений эритроцитарных протеинов в отсутствие при этом состоянии значимых изменений в липидном бислое мембраны.

**STRUCTURAL ORGANIZATION OF THE ERYTHROCYTE MEMBRANES  
IN YOUNG GIRLS AND YOUNG WOMEN WITH IRON DEFICIENCY  
ERYTHROCYTOPOIESIS**

O. A. Pahmutova, E. V. Kasparov, S. Yu. Tereshenko

State institution SRI of Medical Problems of the Far North Region

The Structural organization of the erythrocyte membranes in young girls and young women with iron deficiency living in Krasnoyarsk has been studied. Method of fluorescent spectroscopy applied to investigate biophysical erythrocyte membrane characteristics revealed the disturbance of protein space configuration and topography with proteins and lipids shift. Such transformations touch upon the most important functions of cellular membranes – mechanisms of reception and convert of information, membrane transport, intracellular cooperation. All above mentioned form cellular link of the disease development.

**Литература**

1. Воробьев А. И. Руководство по гематологии. – М.:Ньюдиамед, 2005. – Вып. 3, Т. 3. – 416 с.
2. Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е. Флюоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. – М.: Наука, 1980. – 320 с.
3. Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеидов. – М.: Наука, 1989. – 277 с.
4. Казюкова Т. В., Левина Г. А., Самсыгина Г. А. и др. Показатели обеспеченности железом девочек-подростков с ювенильными маточными кровотечениями // Акушер. и гинекология. – 2004. – № 1. – С. 51-54.
5. Козинец Г. И., Левина А. А., Шмаров Д. А. и др. Железодефицит – реальная опасность // Рус. мед. журн. – 2003. – Т.11, № 8. – С. 464 – 467.

6. Лукина Е. А. Внутренняя броня. Железодефицитная анемия // *Consilium medicum*. – 2002. – Т. 3, № 3. – С. 11-15.

7. Римарчук Г. В., Васечкина Л. И., Абрамова И. Ю. и др. Аспекты нарушения состояния здоровья у девочек-подростков из региона с йодным дефицитом // *Гинекология*. – 2004. – № 3. – С. 154-156.

8. Тарасова И. С., Чернов В. М. Новые направления в диагностике, лечении и профилактике железодефицитных состояний // *Consil. medicum*. – 2004. – Т. 8, № 1. – С. 21-24.

9. Хабиб О. Н. Железодефицитная анемия: лечение и профилактика // *Consil. medicum*. – 2001. – Т. 2, № 7. – С. 21-24.

10. Хамадянов У. Р., Муслимова А. Р. Гинекологическая заболеваемость девочек и девушек-подростков в условиях крупного промышленного города // *Журн. акуш. и жен. болезней*. – 2001. – № 4. – С. 46–51.

11. Протокол ведения больных железодефицитной анемией // *Пробл. стандартиз. в здравоохранении*. – 2004. – №12. – С. 81 – 115.

12. Dodge J., Mitchell C., Hanahan D. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin - free shots of human erythrocytes // *Arch. Biochem. and Biophys.* – 1986. – Vol. 100, № 1. – P. 119-130.

Таблица 1

**Критерии выделения стадий дефицита железа, использованные в исследовании**

Стадии дефицита железа		Параметры обмена железа			
		Гемоглобин, г/л	Ферритин, мкг/л	Сывороточное железо, мкмоль/л	
1	Контрольная группа лиц без лабораторных признаков нарушения обмена железа	$\geq 120$	$\geq 38$	$\geq 12$	
2	Латентный дефицит железа	2А-с истощением тканевых запасов железа	$\geq 120$	$\downarrow < 38$	$\geq 12$
		2Б –с железодефицитным эритропозом	$\geq 120$ и $\downarrow$	$\downarrow \downarrow < 38$	$\downarrow < 12$
3	Железодефицитная анемия	$\downarrow < 120$	$\downarrow \downarrow < 38$	$\downarrow < 12$	

Таблица 2

**Показатели физико-химических свойств мембран эритроцитов у девочек подростков и молодых женщин при различной степени дефицита железа в организме**

Параметры молекулярной организации мембран эритроцитов	Показатели флуоресценции АНС в группах				
	I – контрольная, n=79	II – латентный дефицит железа n=83		III – анемия, n=85	P
		2А – истощение запасов железа,	2Б – железо-дефицитный эритропоэз,		
	0	1	2	3	
Флуоресценция триптофанилов, ЕФ	14,0 (11-19)	14,0 (11-17,5)	15,0 (12-20)	16,0 (12-22)	0-2=0,1 0-3=0,04 1-3=0,06
Погруженность белков в липидный бислой, ОЕ	0,111 (0,062-0,230)	0,076 (0,05-0,173)	0,087 (0,066-0,25)	0,09 (0,047-0,2)	0-1=0,1 1-2=0,07
Микровязкость поверхностных слоев мембран, ОЕ	0,275 (0,205-0,347)	0,285 (0,234-0,407)	0,318 (0,222-0,416)	0,25 (0,2–0,318)	1-3=0,03 2-3=0,03
Текучесть в глубоких слоях мембраны, ОЕ	0,769 (0,555-0,866)	0,641 (0,471-0,823)	0,693 (0,428-0,818)	0,72 (0,5-0,833)	0-1=0,1

Флюоресценция, АНС, ЕФ	60 (0-180)	60 (21,428-150)	90 (34,285-180)	75 (12- 150)	–
Проницаемость мембран, ОЕ	1,0 (0,666- 1,466)	1,266 (0,933-2,2)	1,033 (0,8-1,4)	1,066 (0,666- 1,8)	–
Кальций- связывающая способность мембран, ОЕ	28, 0 (13,333-59)	30,0 (17, 452-65)	29, 0 (11, 666-53)	35,0 (9,428- 58)	–