

Баранова Т.И.

ДИСБАЛАНС МИКРОЭЛЕМЕНТОВ КРОВИ КАК ПРИЧИНА ИЗМЕНЕНИЯ ФОСФОЛИПИДНОГО СОСТАВА МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ У ДЕТЕЙ С ЖЕЛЕЗОДЕФИЦИТНОЙ АНЕМИЕЙ

Читинская государственная медицинская академия, г. Чита

Резюме: Изучен фосфолипидный состав мембран эритроцитов у детей раннего возраста, здоровых и больных железодефицитной анемией, проживающих в селенодефицитном регионе. Установлено, что у детей с железодефицитной анемией выявляются изменения фосфолипидного состава мембран эритроцитов, характеризующиеся падением уровня фосфатидилхолина, фосфатидилсерина, и повышением доли сфингомиелина, фосфатидилэтанолamina и лизофосфолипидов. Уровень селена в крови детей с анемией определяет содержание лизофосфолипидов в эритроцитарных мембранах.

Ключевые слова: дети, анемия, селен, железо, фосфолипиды, эритроцит.

Baranova T.I.

THE IMBALANCE OF THE MICROELEMENTS IN THE BLOOD IS ONE OF THE REASONS FOR COMPOSITION CHANGES IN THE ERYTHROCYTE MEMBRANES IN CHILDREN WITH IRON DEFICIENCY ANEMIA

Summary: The phospholipid composition of erythrocyte membranes was studied in healthy infants and children with iron deficiency anemia from the region with selenium deficiency. The study revealed that these children with iron deficiency anemia had a reduced level of phosphatidylcholine, phosphatidylserine and the increased level of sphingomyelin, phosphatidylethanolamine and lysophospholipids. Decreased proportion of selenium in the blood of children with anemia affects the level of lysophospholipids in erythrocyte membranes.

Keywords: children, anemia, selenium, iron, phospholipids, erythrocyte.

Изменениям фосфолипидного состава мембран эритроцитов отводится большая роль в регуляции трансмембранного транспорта ионов, модификации активности интегральных и периферических белков мембраны. Общность строения плазматических мембран различных органов и тканей позволяет думать, что процессы, происходящие в эритроцитарной мембране, отражают изменения в мембранах других органов и тканей [2,3,10,12,13]. Доказано, что спектр фосфолипидов биологических мембран изменяется при различных патологических состояниях, в том числе, и при железодефицитной анемии [10,11,13]. При развитии анемии снижается количество гемоглобина и эритроцитов в единице объема крови, что приводит к нарастанию дефицита кислорода в тканях. В ответ на это, вероятно, происходит изменение соотношения липидов мембран, обеспечивающее наилучшую диффузию молекул окислителя из эритроцитов [5,12,14]. В то же время, недостаток селена в крови ведет к усилению перекисного окисления липидов – свободнорадикальному процессу, неконтролируемый рост которого грозит грубым и необратимым повреждением мембраны, то есть может привести к типовым процессам поражения клетки, лежащих в основе многих патологических состояний [3,4,13].

Цель работы. Изучить влияние уровня дефицита селена в крови и степени активности антиоксидантных ферментов эритроцитов на фосфолипидный состав мембран эритроцитов у детей раннего возраста, больных железодефицитной анемией.

Материалы и методы. Обследованы дети раннего возраста, проживающие в г. Чите и Александрово-Заводском районе Забайкальского края. Данный район относится к селенодефицитным, содержание микроэлемента в суточном пищевом рационе снижено до 30-60 мкг (при физиологической потребности 180-200 мкг), за счет его недостатка в почве и воде.

Первая группа детей с анемией – 75 человек (40 мальчиков и 35 девочек), проживающих в г. Чите. Средний возраст детей составил 18±6 месяцев. Анемия легкой степени была выявлена у 36, средней степени – у 39 детей. Вторая группа детей – 38 человек с анемией средней степени тяжести из сельской местности, сопоставимых по полу и возрасту.

У всех детей регистрировалась микроцитарная, гипохромная, регенераторная анемия. Содержание гемоглобина, количество эритроцитов и гематокритная величина в крови обследованных детей соответствовали степени тяжести анемии. Уровень железа сыворотки крови составлял в среднем $9,8 \pm 0,3$ ммоль/л, сывороточного ферритина 21 ± 7 мкг/л, что подтверждало железодефицитный характер анемии [1].

Первую контрольную группу составили 25 городских детей раннего возраста (12 мальчиков и 13 девочек). Вторую контрольную группу составили 19 детей (10 мальчиков и 9 девочек), проживающих в Александрово-Заводском районе Забайкальского края. Все дети не имели в анамнезе хронических заболеваний и не болели в течение трех месяцев, предшествующих забору крови.

В работе с обследуемыми лицами соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинкской Декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki (1964, 2000 - поправки) и Правилами клинической практики в Российской Федерации, утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266.

Уровень селена в крови изучали согласно методу определения массовой концентрации селена, ГОСТ 19413-89 и выражали в мкг/л. Метод определения основан на способности селена образовывать флуорисцирующий комплекс с 2,3-диаминонафталином. Интенсивность флуоресценции определяли с помощью флуориметра «Флуорат 03М». Эритроциты служили средой, где исследовались скорость каталазной, глутатионредуктазной и глутатионпероксидазной реакций и их устойчивость к перекисному гемолизу [6,8,9]. Содержание фосфолипидов в мембране эритроцита определяли при помощи двухмерной микротонкослойной хроматографии. Для определения количества каждой фракции применяли метод V. E. Vaskovsky et.al. (1975). Зоны, содержащие фосфолипиды, идентифицировали с помощью соответствующих стандартов фирмы «Sigma» (USA). Определялись следующие классы фосфолипидов: сфингомиелин (СМ), фосфатидилинозитол (ФИ), фосфатидилсерин (ФС), фосфатидилхолин (ФХ), лизофосфатидилхолин (ЛФХ), фосфатидилэтаноламин (ФЭА), лизофосфатидилэтаноламин (ЛФЭА).

Статистическая обработка осуществлялась с использованием программ Microsoft Office Excel 2007 (MicrosoftCorp., США) и Statistica 6.0 (StatSoftInc., США). Характер распределения данных оценивали графическим методом с использованием критерия Шапиро-Уилка. Описание признаков, имеющих нормальное распределение, представлено в виде $M \pm SD$, где M — среднее арифметическое, SD — стандартное отклонение. Для обработки данных с нормальным типом распределения использовали параметрические методы: t-тест для независимых группировок, парный t-тест. Различия считали значимыми при $p < 0,05$. Изучение статистических связей между показателями выборки проводили с помощью корреляционного анализа. Направление корреляционной связи оценивали при помощи коэффициента Пирсона (r). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Нами установлено, что у здоровых детей раннего возраста, проживающих в регионе с выраженным селенодефицитом (Александрово-Заводский район Забайкальского края) регистрируются низкие величины селена в крови по сравнению с детьми города Читы при одинаковой активности ферментов системы «глутатионпероксидаза-глутатионредуктаза» (табл.1).

Таблица 1

Некоторые биохимические показатели крови и эритроцитов здоровых детей раннего возраста, проживающих в г. Чите и в Александрово - Заводском районе Забайкальского края ($M \pm SD$)

Показатели	Городские дети (n=38)	Сельские дети (n=19)
Селен крови (мкг/л)	$85,3 \pm 1,2$	$66,3 \pm 3,4^*$
Активность каталазы (ммоль/с*мг белка)	$14,6 \pm 0,9$	$12,5 \pm 0,6$
Активность глутатионпероксидазы (мкмоль/мин*мг белка)	$192,1 \pm 6,4$	$182,9 \pm 5,2$
Активность глутатионредуктазы (мкмоль/мин*мг белка)	$290,6 \pm 6,9$	$284,2 \pm 8,9$

Перекисная резистентность эритроцитов (% гемолизированных клеток)	8,3± 0,6	10,5±0,7
---	----------	----------

Примечание: * – статистически значимые различия между группами

В условиях Забайкалья при железодефицитной анемии у детей на фоне типичных изменений показателей гемограммы наблюдается снижение содержания селена и активности антиоксидантных ферментов эритроцитов, приводящие к усилению их перекисного гемолиза. У детей из селенодефицитного региона его уровень в крови уменьшается ниже критического (50 мкг/л) (табл.2).

Таблица 2

Некоторые биохимические показатели крови и эритроцитов детей раннего возраста, больных железодефицитной анемией, проживающих в г. Чите и в Александрово-Заводском районе Забайкальского края (M±SD)

Показатели	Городские дети		Сельские дети
	Анемия легкой степени (n=36)	Анемия средней степени (n=39)	Анемия средней степени (n=38)
Селен крови (мкг/л)	62,2 ± 0,4	62,5 ± 0,6	24,4± 3,4*
Активность каталазы (ммоль/с*мг белка)	12,9 ±0,4	11,8 ±1,6	8,8 ±0,6
Активность глутатионпероксидазы (мкмоль/мин*мг белка)	68,6±8,3	61,1± 6,7	82,9± 4,9*
Активность глутатионредуктазы (мкмоль/мин*мг белка)	153,1± 6,8	147,1± 6,9	202,4± 9,8*
Перекисная резистентность эритроцитов (% гемолизированных клеток)	10,2± 0,6	10,1± 0,8	18,4 ± 1,8*

Примечание: * – статистически значимые различия между группами сельских и городских детей с анемией средней степени.

Статистически значимых различий в спектре фосфолипидов эритроцитарных мембран между группами здоровых детей зарегистрировано не было.

Таблица 3

Спектр фосфолипидов эритроцитарных мембран у детей с анемией, проживающих в г.Чите (M ± SD)

Содержание фосфолипидов (%)	Контроль (n =25)	Дети с анемией легкой степени (n=36)	Дети с анемией средней степени (n=39)
СМ	13,6±0,7	15,2±0,9	16,1±0,8*
ФХ	16,1±0,7	15,9±0,5	9,8±0,4* p<0,02
ФЭА	13,6±0,6	16,4±0,9*	13,5±0,6* p<0,001
ФС	23,8±1,3	19,7±1,1*	14,5 ±0,9* p<0,001
ФИ	13,9±0,3	10,3±0,7*	11,9±0,6
ЛФХ	10,4±1,7	17,3±0,9*	18,4±0,7*
ЛФЭА	8,6±0,7	14,8±0,4*	15,7±0,8*
Сумма ЛФХ и ЛФЭА	19,0±1,2	32,1±0,4	34,1± 0,7 p<0,02

Примечание: * – статистически значимые различия с контрольной группой

В профиле фосфолипидов эритроцитарных мембран городских детей с железодефицитной анемией, нами были выявлены следующие изменения (табл.3): содержание сфингомиелина (СМ) плавно возрастало, достигая уровня значимых различий у лиц с анемией средней степени тяжести ($p < 0,02$). Уровень фосфатидилхолина (ФХ) имел тенденцию к снижению в группе больных с анемией легкой степени и достигал значимых отличий от контроля на 19% ($p < 0,01$) у детей с анемией средней степени тяжести. При этом фракция его лизоформ увеличивается в обеих группах - в 1,7 раза ($p < 0,001$) у лиц с анемией легкой степени и в 1,8 раза ($p < 0,001$) у детей с анемией средней степени тяжести. Цифры фосфатидилэтаноламина (ФЭА) по сравнению с контролем увеличивались в 1,2 раза в группе детей с анемией легкой степени. При этом доля лизофосфатидилэтаноламина (ЛФЭА) повышалась в 1,7 раза ($p < 0,001$) у детей с анемией легкой степени и в 1,8 раза ($p < 0,001$) у детей с анемией средней степени тяжести по сравнению с контролем. Сумма лизоформ фосфолипидов была достоверно выше у детей с анемией средней степени тяжести, чем у больных анемией легкой степени ($p < 0,01$).

Уровень фосфатидилинозитола (ФИ) снижался в 1,3 раза ($p < 0,001$) в группе детей с анемией легкой степени и практически не отличается от контрольных значений у лиц с анемией средней степени тяжести. Цифры фосфатидилсерина (ФС) значимо уменьшались в большей степени при анемии средней степени тяжести.

В группе детей с анемией легкой степени корреляционные связи спектра фосфолипидов эритроцитарных мембран схожи с такими же у здоровых детей по силе и направлению (рис.1): активность каталазы прямо коррелирует с уровнем лизофосфатидилхолина ($r = 0,37$; $p < 0,02$).

У детей с анемией средней степени тяжести дополнительно отмечается обратная взаимосвязь между уровнем селена крови и содержанием лизофосфатидилхолина ($r = -0,42$; $p < 0,01$). Появляется прямая корреляционная связь между долей фосфатидилхолина и цифрами перекисной резистентности эритроцитов ($r = 0,39$; $p < 0,01$) (рис. 1).



Рис.1. Схема корреляционных взаимодействий между фракциями фосфолипидов и некоторыми показателями крови и эритроцитов детей с анемией.

При обследовании сельских детей с анемией нами были получены следующие результаты (табл.4): статистически значимо снижалось содержание следующих классов фосфолипидов: ФХ – в 1,8 раза ($p < 0,001$) и ФС – в 1,7 раза ($p < 0,001$) по сравнению с контролем.

Содержание СМ не изменялось у детей с анемией, тогда как цифры ФЭА по сравнению с контролем увеличивались в 1,2 раза, достигая при этом уровня значимых различий. Доля ЛФЭА и ЛФХ возрастала в 1,8 раза ($p < 0,001$ в обоих случаях) у детей с анемией. Уровень ФИ при этом практически не отличался от контрольных значений.

Таблица 4.

Спектр фосфолипидов эритроцитарных мембран у детей с анемией, проживающих в Александрово-Заводском районе Забайкальского края (M ± SD)

Содержание фосфолипидов (%)	Контроль (n =19)	Дети с анемией средней степени (n=39)
СМ	16,0±0,4	15,1±0,5*
ФХ	15,8±0,6	8,9±0,6*
ФЭА	11,4±0,3	13,9±0,6*
ФС	25,8±1,1	15,1 ±0,6*

ФИ	11,2±0,4	11,7±0,2
ЛФХ	10,8±1,1	19,3±0,6*
ЛФЭА	9,2±0,5	16,7±0,5*
Сумма ЛФХ и ЛФЭА	20,0±0,8	36,0±0,5*

Примечание: * – статистически значимые различия с контрольной группой

Следует подчеркнуть, что сумма лизоформ фосфолипидов (ЛФЭА и ЛФХ) у сельских детей с железодефицитной анемией, достоверно отличалась от таковой городских детей со сходной степенью анемии ($p < 0,02$), что подтверждалось значимо более высоким уровнем пероксидиндуцированного гемолиза в группе сельских детей.

Наибольшее количество корреляционных взаимодействий между исследуемыми параметрами регистрировалось в группе детей с железодефицитной анемией, проживающих в селенодефицитном регионе. Так, отмечается обратная зависимость между активностью глутатионпероксидазы и долями лизоформ фосфолипидов - ЛФХ и ЛФЭА ($r = -0,44$; $p < 0,001$ и $r = -0,46$; $p < 0,001$ соответственно), а также аналогичная по силе и направлению взаимосвязь между содержанием селена в крови и цифрами лизофосатидилхолина. Регистрируется прямая корреляционная связь между цифрами перекисной резистентности эритроцитов и долями лизофосатидилхолина и лизофосатидилэтаноламина ($r = 0,40$; $p < 0,01$ и $r = 0,36$, $p < 0,02$ соответственно).

Заключение. Таким образом, у детей с железодефицитной анемией выявлен ряд изменений в составе фосфолипидов эритроцитарных мембран. С увеличением количества лизоформ фосфолипидов в мембранах повышается текучесть последних, что способствует возрастанию скорости диффузии кислорода, при этом улучшается как оксигенация эритроцитов в легких, так и транспорт окислителя в ткани. В то же время, избыточное накопление молекул окислителя ведет к их токсическому влиянию на клетку, нарушая мембранный транспорт, модифицируя активность мембраносвязанных белков, что в конечном итоге, приводит к уменьшению устойчивости красных клеток крови к действию лизирующих факторов.

Данные изменения спектра фосфолипидов эритроцитарных мембран способствуют сокращению жизни красных клеток крови, усугубляя анемические состояния. Изучение этих показателей в клинической практике можно использовать в качестве дополнительных критериев оценки тяжести патологического состояния, а также оценки эффективности проводимого лечения.

Очевидно, одним из патогенетических механизмов развития железодефицитной анемии у детей в условиях дефицита селена является нарушение структурно-функциональных свойств мембран эритроцитов. Учитывая изменения фосфолипидного спектра эритроцитарных мембран, а также дисбаланс в системе "ПОЛ - антиоксиданты" при железодефицитной анемии, детям необходима мембраностабилизирующая терапия.

Литература:

1. Анемии: руководство / И.И. Дементьева, М.А. Чарная, Ю.А. Морозов. – М.: ГЭОТР – Медиа, 2013. – 304 с.
2. Владимиров Ю. А. Биологические мембраны. Строение, свойства, функции. [Электронный ресурс] / Ю. А. Владимиров. – Режим доступа: http://foroff.phys.msu.ru/phys/med/cell/Cell_01bi.pdf (03 марта 2014).
3. Влияние микроэлементов на состояние здоровья детей, находящихся на различных видах вскармливания / Е.И. Кондратьева [и др.] // Рос. вестн. перинатологии и педиатрии. – 2008. – Т.53, №2. - С.24-29.
4. Гоголева И.В. Селен. Итоги и перспективы применения в педиатрии [Электронный ресурс] / И.В. Гоголева, О.А. Громова – Режим доступа: <http://medi.ru/doc/j01090306.htm> (03 марта 2014).
5. Дисэлементоз у детей с дефицитом железа и пути его коррекции/ Н.В. Нагорная, Е.В. Бордюгова, А.В. Дубовая // Современная педиатрия. – 2012. – №1(41). – С. 41-48.
6. Исследование показателей липидного обмена и ПОЛ: Методические рекомендации ЦО-ЛИУВ, под ред. проф. Г. А. Яровой. – М., 1987.-24с.

7. Казюкова Т.В. Профилактика дефицита железа у детей раннего возраста // Педиатрия. – 2011. – №4(90). – С.112-119.
8. Королюк М.А. Метод определения активности каталазы /М.А. Королюк, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова, В.Е. Токарева // Лабор. Дело. – 1988. - №1. – С.16-19.
9. Медицинские лабораторные технологии и диагностика: Справочник /Под ред. А.И. Карпищенко. – СПб.: Интермедика, 1999. – С.22-23.
10. Метаболические аспекты патологии эритроцитарных мембран у детей, больных муковисцидозом / Т.И. Туркина [и др.] // Педиатрия. – 2010. – Т. 89, № 4. С. 36-40.
11. Микроэлементозы у детского населения мегаполиса: эпидемиологическая характеристика и возможности профилактики / Е.А.Вильмс, Д.В.Турчанинов, М.С. Турчанинова // Педиатрия.– 2011. – №1(90). – С.96-101.
12. Морозова В. Т. Эритроциты: структура, функции, клинико-диагностическое значения / В. Т. Морозова, С. А. Луговская, М. Е. Почтарь // Клин. лаб. д-ка. – 2007. – № 10. – С. 21–35.
13. Уровень селена в плазме крови и окислительное повреждение белков в мембранах эритроцитов у женщин при патологии беременности [Электронный ресурс] / Л.П. Касько [и др.] - Режим доступа: <http://knu.znate.ru/docs/index-490097.html>.
14. Baker R.D., Greer F.R. Committee on Nutrition American Academy of Pediatrics «Diagnosis and prevention of iron deficiency and iron-deficiency anemia in infants and young children (0-3 years of age)» // Pediatrics. 2010 Nov;126 (5): 1040-50.