Климкович Н.Н.¹, Зубрицкая Г.П.², Слобожанина Е.И.², Венская Е.И.², Кутько А.Г.²,
Скоробогатова А.С.², Лукьяненко Л.М.², Хазанова Л.А.³, Козарезова А.М.¹

¹ Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Беларусь

² Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси,
Минск, Беларусь

³ Республиканская детская больница медицинской реабилитации, а. г. Острошицкий Городок,
Беларусь

Klimkovich N.¹, Zubritskaya G.², Slobozhanina E.², Venskaya E.², Kutko A.², Skarabahatava A.²,
Lukyanenko L.², Khazanova L.³, Kozarezova A.¹

¹ Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Belarus

² Institute of Biophysics and Cell Engineering of National Academy of Science of the Republic
of Belarus, Minsk, Belarus

³ Republican Children's Hospital of Medical Rehabilitation, agrotown Ostroshitsky Gorodok, Belarus

Инициация эриптоза и общая антиоксидантная активность плазмы крови у детей с дефицитом железа

Initiation of Eryptosis and Total Antioxidant Activity
of Blood Plasma in Children with Iron Deficiency

Резюме

Проведено исследование активности процессов эриптоза, общей антиоксидантной активности и концентрации лактоферрина в плазме крови у детей с ЖДА до и после лечения. У пациентов с ЖДА после приема ферропрепаратов увеличивается процент клеток с повышенным содержанием свободного кальция в популяции эритроцитов, что указывает на активацию процессов эриптоза. При дефиците железа возрастает содержание лактоферрина в плазме крови с максимальным значением у детей в возрасте 0–3 месяцев. Снижение общей антиоксидантной активности плазмы крови детей с ЖДА на фоне ферротерапии обусловлено усилением оксидантного стресса, что в дальнейшем необходимо учитывать при применении протоколов ферротерапии и обосновании назначения антиоксидантов при ЖДА.

Ключевые слова: дефицит железа, эриптоз, общая антиоксидантная активность, лактоферрин, дети.

Abstract

The investigation of the activity of eryptosis, total antioxidant activity and lactoferrin concentration in the blood plasma of children with IDA before and after treatment was made. In children with IDA, after taking iron supplements, the percentage of erythrocytes with a high level of free calcium increases, which indicates the activation of eryptosis processes. While iron deficiency lactoferrin concentration in plasma raised with a maximum in a group of children 0–3-month-old. A decrease in the total antioxidant activity of blood plasma in children with IDA during treatment with iron drugs is due to an increase in oxidative stress. In the future, this must be taken into account when using ferro treatment protocols and justifying the use of antioxidants in IDA.

Keywords: iron deficiency, eryptosis, total antioxidant activity, lactoferrin, children.

Продолжительность жизни эритроцитов составляет от трех до четырех месяцев, но еще до наступления физиологического старения они могут подвергаться воздействиям, запускающим запрограммированную гибель эритроцитов – эриптоз. Так как эритроциты характеризуются отсутствием ядра и митохондрий, они лишены и некоторых ключевых событий апоптоза, таких как деполяризация митохондрий и конденсация хроматина ядра. В то же время эритроциты проявляют другие признаки апоптоза, например, сморщивание клетки, везикуляцию и перераспределение липидов в мембране, которое приводит к экспонированию фосфатидилсерина на ее поверхности. Известно, что повышенный эриптоз наблюдается при ряде соматических, инфекционных и наследственных заболеваний. Эритроциты, находящиеся на стадии эриптоза, могут адгезироваться к эндотелию сосудов и таким образом влиять на гемодинамику в микроциркуляторном русле [1]. Усиление эриптоза наблюдается при таких широко распространенных заболеваниях, как сахарный диабет, почечная недостаточность, метаболический синдром [2, 3]. Повышенная чувствительность эритроцитов к факторам, вызывающим эриптоз (осмотический и окислительный стресс, энергетическое истощение), может быть связана с генетическими нарушениями синтеза гемоглобина или эритроцитарных ферментов, с наследственными мембранопатиями [4]. Особое внимание исследователи уделяют изучению эриптоза при железодефицитных состояниях [5]. Однако сведения об изменении содержания свободных ионов кальция в цитозоле эритроцитов как основном показателе активности процессов эриптоза при анемиях носят противоречивый характер.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение связи процессов эриптоза в эритроцитах детей при железодефицитной анемии (ЖДА) с окислительно-восстановительными процессами и уровнем лактоферрина (ЛФ) в плазме крови.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В настоящее исследование включены данные 34 пациентов с ЖДА (10 пациентов в возрасте 0–3 месяцев и 24 пациента в возрасте от 3 до 16 лет). В качестве контроля использованы образцы периферической крови 14 практически здоровых детей (медиана возраста 12,4 года). Образцы крови детей получены из ГУ «Республиканская детская больница медицинской реабилитации» и ГУ «Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя». Забор периферической крови для исследования осуществлялся после подписания родителями пациента формы информированного согласия на участие в исследовании. Гемограмма и биохимический анализ крови выполнялись по стандартной методике в клинико-диагностических лабораториях баз выполнения исследования. ЖДА верифицировалась при наличии анемии любой степени тяжести по данным гемограммы и при снижении содержания ферритина. Измерение общей антиоксидантной активности (ОАА) плазмы крови проводили с помощью коммерческого набора Antioxidant assay kit (Cayman, США) согласно протоколу производителя. Перед исследованием плазму крови разводили в буфере для анализа антиоксидантов в соотношениях 1 к 20. Принцип анализа заключается в формировании

феррил-миоглобин радикала из метмиоглобина и пероксида водорода, который окисляет АБТС (2,2-азино-бис 3-этилбензотиазолин-6-сульфоная кислота), с образованием радикала АБТС⁺ – растворимого хромогена, окрашенного в зеленый цвет. Его содержание определяли спектрофотометрически при длине волны 405 нм (D_{405}) на универсальном анализаторе VICTOR2™ (Perkin Elmer, США). Антиоксиданты подавляют продукцию радикала АБТС⁺ концентрационно-зависимым образом, и интенсивность окраски пропорционально снижается. Численное значение концентрации антиоксидантов в исследуемых образцах плазмы выражали по тролокс-эквиваленту антиоксидантной активности (ТЭАА), используя калибровочную кривую. Изучение процессов эритроптоза проводили по определению содержания свободных ионов кальция в эритроцитах, используя флуоресцентный зонд Fluo-4 AM, по модифицированному методу [6]. Измерения проводили на проточном цитометре CytoFLEX (Beckman Coulter, USA). Концентрацию эндогенного ЛФ в плазме крови определяли методом иммуноферментного анализа с помощью коммерческих тест-систем для количественного определения ЛФ человека в биологических жидкостях (Elabscience), используя универсальный анализатор VICTOR2™. В статистическом анализе результаты измерений количественных переменных исследования представлены медианой и размахом медианы, категориальных переменных – количеством и процентами от численности группы. Парные сравнения групп проводились с поправкой на множественные сравнения. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Одной из основных характеристик суицидальной гибели эритроцитов является увеличение внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} , которое происходит как на ранних, так и на поздних этапах апоптоза. Кальциевые ионофоры вызывают апоптотические изменения клетки, а именно уменьшение ее объема, что непосредственно приводит к развитию гибели клетки [7]. Действие ионов Ca^{2+} проявляется на уровне целой клетки, влияет на состояние липидного бислоя клеточной мембраны, на активность ферментных систем. Увеличение внутриклеточного содержания ионов Ca^{2+} может привести к угнетению активности флипазы и случайному перераспределению фосфолипидов в мембранах. В крови кальций может находиться в двух основных состояниях: связанном с белками плазмы и свободном. Именно свободный кальций принимает активное участие в реализации клеточных функций. Так, уровень свободного внутриклеточного кальция служит показателем, характеризующим инициацию эритроптоза. В нашем исследовании обнаружено статистически значимое увеличение содержания свободных ионов кальция в $19,0 \pm 2,9\%$ клеток в популяции эритроцитов детей с ЖДА после лечения ферропрепаратами по сравнению с данным параметром до лечения ($3,71 \pm 0,5\%$), $p < 0,01$. Также установлено, что процент таких клеток в популяции эритроцитов детей в возрасте 0–3 месяцев выше, чем в группе детей в возрасте 3–16 лет перед лечением ЖДА ($9,8 \pm 1,2\%$ и $3,71 \pm 0,5\%$ соответственно, $p < 0,01$).

В результате исследования концентрации ЛФ в сыворотке крови обследованных детей установлено повышение данного показателя в группе детей с дефицитом железа ($1202,6$ ($630 \dots 1840$) нг/мл) по отношению к контролю ($602,4$ ($520 \dots 700$) нг/мл), $p = 0,03$. ЛФ представляет

собой белок, близкий по молекулярной массе, трехмерной структуре и железосвязывающим свойствам к трансферрину (ТФ). ЛФ на 59% гомологичен ТФ и является промежуточным звеном для передачи железа в клетки. Поэтому повышение концентрации ЛФ в плазме крови при ЖДА может быть объяснено высокой потребностью в данном биоэлементе и готовностью организма его принимать. При этом отмечалась вариабельность концентрации ЛФ в группах детей в зависимости от возраста. Максимально высокое содержание ЛФ в плазме крови установлено у пациентов в возрасте 0–3 месяцев и составило 1340 (1100...1620) нг/мл, что на 15,8% выше по сравнению с группой ЖДА в возрасте 3–16 лет (1175,8 (630...1520) нг/мл). Повышенное содержание ЛФ в крови новорожденных и детей грудного возраста по сравнению с группой детей старше года, возможно, связано с высокой активностью его железотранспортной функции. В молекуле ЛФ определены два активных центра связывания ионов Fe^{3+} , и ЛФ может существовать в виде ненасыщенной и насыщенной форм. В течение первых трех месяцев жизни превалирует высокоактивная насыщенная железотранспортная форма ЛФ, которая рассматривается как один из важных физиологических механизмов адаптационного процесса гемопоэтической системы у новорожденных и грудных детей [8].

При анализе концентрации ЛФ в плазме крови детей с ЖДА в возрасте 3–16 лет после лечения установлено повышение данного показателя (1424,6 (1160...2000) нг/мл) по сравнению с соответствующими значениями до начала терапии. Увеличение концентрации ЛФ в плазме крови детей с ЖДА на фоне ферротерапии можно объяснить его железосвязывающей функцией. При дотации железа в организм в виде лекарственных препаратов появляется необходимость в повышении количества ЛФ как промежуточного звена доставки железа в клетки. Также есть описание такой функции ЛФ, как участие в межклеточной кооперации фагоцитоза и процессе защиты клеточных мембран от самопероксидации [9].

Также выявлена прямая корреляционная связь между числом эритроцитов с повышенным содержанием свободных ионов кальция и концентрацией эндогенного ЛФ в плазме крови у детей 3–16 лет с ЖДА после лечения ($R_s=0,57$; $p<0,05$). Данные по содержанию свободного внутриклеточного кальция имели разнонаправленный характер. Так, у 3 пациентов группы с ЖДА после проведенной ферротерапии число клеток в популяции эритроцитов с высоким внутриклеточным уровнем свободного кальция снижалось от 5,5% до 0,5%. У 8 пациентов группы с ЖДА после аналогичного лечения наблюдалось колебание числа клеток в популяции эритроцитов с высоким содержанием свободного внутриклеточного кальция от 1,9–5% до 22–75%. Таким образом, обнаружено, что у детей группы с ЖДА присутствовали клетки с повышенным содержанием свободного кальция, и процент таких клеток в популяции эритроцитов пациентов с ЖДА после ферротерапии был значительно выше, чем до лечения. Выявлена прямая связь между числом клеток с повышенным уровнем свободных ионов кальция в цитозоле и уровнем эндогенного ЛФ в группе детей с ЖДА в возрасте 3–16 лет после лечения.

Поскольку прием препаратов железа приводит к усилению оксидантного стресса, увеличение содержания ЛФ в плазме крови при

ферротерапии может быть связано и с его участием в процессах антиоксидантной защиты организма. Традиционно об антиоксидантном статусе организма человека судят по содержанию в плазме или в сыворотке крови продуктов перекисного окисления липидов (малоновый диальдегид, дикетоны, диеновые конъюгаты и основания Шиффа), низкомолекулярных антиоксидантов (α -токоферол, ретинол, глутатион, витамин С) и активности ферментов антиоксидантного комплекса (глутатион-пероксидаза, супероксиддисмутаза, каталаза, церулоплазмин). Однако этот способ слишком трудоемкий, дорогостоящий, продолжительный по времени выполнения и поэтому мало пригоден для массового лабораторного скрининга ОАА биологических жидкостей, основанного на модельной системе «метмиоглобин- H_2O_2 -АБТС-тролокс», в которой метмиоглобин генерирует в реакции с H_2O_2 феррилмиоглобин и активные радикалы $HO^\cdot$ и $HO_2^\cdot$, окисляющие хромогенный субстрат АБТС с образованием катион-радикала $ABTS^{\cdot+}$. Присутствие антиоксидантов сильно снижает скорость окисления АБТС. В качестве ингибитора-калибратора использован тролокс. В нашем исследовании методом ТЭАА обнаружено статистически значимое ($p=0,03$) снижение ОАА плазмы крови примерно на 20% у детей с ЖДА после ферротерапии по сравнению с аналогичными данными до лечения (рис. 1А). Это согласуется с имеющимися литературными данными об усилении оксидантного стресса на фоне приема препаратов железа. Также нами обнаружено, что в эритроцитах детей с ЖДА на фоне лечения наблюдалось статистически значимое уменьшение активности гемсодержащего фермента каталазы (примерно на 30–35%, $p=0,02$) по сравнению с аналогичным показателем до лечения (рис. 1В).

Рис. 1. Общая антиоксидантная активность плазмы крови, выраженная в тролокс-эквивалентной антиоксидантной активности (А), и активность каталазы (В) детей с ЖДА до и после лечения

Fig. 1. Total antioxidant activity of blood plasma in trolox equivalent of antioxidant activity (A) and catalase activity (B) in children with IDA before and after treatment

У детей с анемией в возрасте 0–3 месяцев установлено незначительное увеличение ОАА плазмы крови по сравнению с группой детей с ЖДА до лечения ($0,71 \pm 0,05$ и $0,56 \pm 0,02$ соответственно, $p=0,042$). Возможно, это связано с повышенным содержанием концентрации ЛФ в плазме крови детей от 0 до 3 месяцев. Однако мы не выявили корреляционной зависимости между значениями уровня содержания ЛФ и концентрацией ОАА в плазме крови детей с ЖДА как до лечения, так и после ферротерапии.

Таким образом, увеличение процента клеток с повышенным содержанием свободного кальция в популяции эритроцитов пациентов с ЖДА после приема ферропрепаратов указывает на активацию процессов эритроптоза, что, возможно, связано с увеличением оксидантного стресса. При этом ответ антиоксидантной системы плазмы крови у детей с ЖДА на фоне ферротерапии проявляется уменьшением ее ОАА, что, видимо, обусловлено усилением расходования биоантиоксидантов в условиях развития оксидантного стресса. Полученные нами результаты согласуются с литературными данными о том, что прием препаратов железа у детей с целью устранения железодефицитного состояния приводит к усилению оксидантного стресса, что в дальнейшем необходимо учитывать при применении протоколов ферротерапии и обосновании назначения антиоксидантов при ЖДА. При этом показатель ОАА плазмы крови при дефиците железа у детей может использоваться в качестве одного из критериев оценки функционального состояния антиоксидантной системы организма и эффективности применения антиоксидантов при терапии.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Kuypers F.A. (2007) Membrane lipid alterations in hemoglobinopathies. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*, pp. 68–73.
2. Calderón-Salinas J.V., Muñoz-Reyes E.G., Guerrero-Romero J.F. (2011) Eryptosis and oxidative damage in type 2 diabetic mellitus patients with chronic kidney disease. *Mol Cell Biochem.*, vol. 357 (1–2), pp. 171–9. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11010-011-0887-1>.
3. Lang F., Gulbins E., Lang P.A. (2010) Ceramide in suicidal death of erythrocytes. *Cell. Physiol. Biochem.*, vol. 26 (1), pp. 21–28. Available at: <https://doi.org/10.1159/000315102>.
4. Browning J.A., Robinson H.C., Ellory J.C., Gibson J.S. (2007) Deoxygenation-induced non-electrolyte pathway in red cells from sickle cell patients. *Cell. Physiol. Biochem.*, vol. 19 (1), pp. 165–174. Available at: <https://doi.org/10.1159/000099204>.
5. Kempe D.S., Lang Ph.A., Duranton Ch. (2006) Enhanced programmed cell death of iron-deficient erythrocytes. *FASEB J.*, vol. 20 (2), pp. 368–70. Available at: <https://doi.org/10.1096/fj.05-4872fje>.
6. Kaestner L., Steffen P., Nguyen D.B. (2012) Lysophosphatidic acid induced red blood cell aggregation in vitro. *Bioelectrochemistry*, vol. 87, pp. 89–95. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2011.08.004>.
7. Belevich E., Kostin D., Slobozhanina E. (2014) Eryptosis is the programmed death of red blood cells. Successes of modern biology. *Uspekhi Sovremennoy Biologii*, vol. 134 (2), pp. 149–157.
8. Djukareva-Bezdeneshnykh S. (2008) Maintenance the basic haemopoetic components of infants at feeding by breast milk. *Perinatalogiya i pediatria*, no 3, pp. 108–11.
9. Kuznetsov I., Potievskaya V., Kachanov I., Kuraleva O. (2017) Laktoferrin's role in biological circles of the person. *Sovremennye problemi nauki i obrazovaniya*, no 3. Available at: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=26522>.

Подана/Submitted: 12.10.2021

Принята/Accepted: 05.11.2021

Контакты/Contacts: det.hematology@mail.ru, slobozhanina@ibp.org.by