ОСОБЕННОСТИ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ МИЕЛОДИСПЛАСТИЧЕСКИХ СИНДРОМАХ У ДЕТЕЙ

Климкович Н.Н.[1], Зубрицкая Г.П.[2], Козарезова Т.И.[1], Слобожанина Е.И.[2]

[1] Белорусская медицинская академия последипломного образования
ул. П. Бровки, 3/3, г. Минск, 220013, Республика Беларусь; e-mail: det.hematology@mail.ru
[2] Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси
ул. Академическая, 27, г. Минск, 220072, Республика Беларусь; e-mail: slobozhanina@ibp.org.by
Поступила в редакцию: 16.07.20

Аннотация. При миелодиспластических синдромах (МДС) у детей выявлены нарушения физико-химического состояния липидов и белков эритроцитарных мембран. В эритроцитах детей с этим клоновым заболеванием наблюдается изменение параметров флуоресценции различных по локализации в мембране липофильных зондов, что указывает на модификацию липидов на разной глубине липидного бислоя. В эритроцитарных мембранах детей с МДС происходит нарушение структурного состояния белковых компонентов и окисление белков, что может являться важным звеном в патогенезе анемического синдрома. Данные об изменении физико-химических свойств клеточных мембран у пациентов с МДС могут быть использованы для создания методов дифференциальной диагностики и разработки биофизических тестов прогноза течения данного заболевания.
Ключевые слова: *миелодиспластические синдромы, мембраны эритроцитов, флуоресцентные зонды, окисление белков, дети.*

Интерес к изучению миелодиспластических синдромов (МДС) не угасает уже не одно десятилетие, что связано с редкостью и гетерогенной природой этих заболеваний. МДС представляют собой клоновые заболевания крови, возникающие в результате мутации гемопоэтической стволовой клетки. Это заболевание характеризуется неэффективным гемопоэзом, цитопенией в крови вследствие повышения апоптотической активности гемопоэтических предшественников и прогрессированием в острый лейкоз. Показатель заболеваемости МДС наиболее высокий среди лиц пожилого и старческого возраста, хотя этот диагноз встречается в любой возрастной группе, в том числе у молодых людей и детей [1]. В результате многолетних исследований происходило накопление как отдельных клинических случаев, так и международных программных наблюдений, позволивших достоверно обобщать и анализировать данные изучения различных аспектов МДС. Это обеспечило возможность выявления механизмов патогенеза и выделения общих и отличительных черт различных вариантов МДС. Согласно современным представлениям, МДС развивается в результате генетических дефектов на уровне стволовой клетки, следствием чего является формирование основного феномена МДС - наличия клеток одновременно в процессе апоптоза и в S фазе митоза, а также парадоксального сочетания цитопении в периферической крови с гиперклеточным костным мозгом. В развитии этого феномена решающее значение имеют процессы апоптоза. С течением времени в ответ на гибель созревающих клеток в костном мозге повышается пролиферативная активность ранних клеток-предшественниц и происходит селекция популяций со сниженной способностью к дифференцировке, в результате чего происходит трансформация в острый лейкоз.

Клинико-лабораторная манифестация, течение и прогноз МДС весьма разнородны. Однако наиболее характерным и частым проявлением этой патологии является анемический синдром с дисплазией красного ростка кроветворения. К механизмам развития анемии при МДС относится: эритропоэз, уменьшение периода жизни эритроцитов и их лизис, вытеснение нормального гемопоэза и замещение его патологическими опухолевыми клетками, нарушение метаболизма железа, низкая чувствительность эритропоэтиновых рецепторов к эндогенному эритропоэтину или недостаточная его продукция, супрессия эритроидных предшественников провоспалительными и апоптотическими цитокинами (TNF-α, IL-1, IFN-γ и другие), хронические кровотечения [2]. К настоящему времени имеется обширная информация об особенностях кариотипа и основных хромосомных аномалиях при различных вариантах МДС. Молекулярно - генетические, иммунологические и метаболические механизмы нарушения эритропоэза при МДС приводят к клинической и лабораторной манифестации анемии с признаками дизэритропоэза. Изменение морфологии эритроцитов при МДС характеризуется анизо- и пойкилоцитозом, встречается диморфизм клеточной популяции, эллиптоциты, макриоциты, а также ядросодержащие эритроидные предшественники в крови. При исследованиях морфологии эритроцитов у пациентов с МДС в 90% случаев обнаруживаются множественные изменения формы клеток. Например, овалоцитоз встречается у 75% пациентов с вариантами МДС, сопровождающимися делецией хромосомы 20. Нарушения структуры мембранных белков и липидов при МДС регистрируются примерно в 20 % случаев, среди белков – это дефицит белков полос 3, 4.1, 4.2 и 7 [3]. Оценка структуры и свойств мембран эритроцитов крови крайне важна как для определения состояния пациентов, так и для выбора тактики и контроля эффективности лечения их при МДС. Ключевая роль в регуляции всех процессов, происходящих в мембранах, принадлежит их текучести (микровязкости). Этот комплексный показатель отражает как структуру, так и диффузные аспекты

липидных составляющих мембран. Микровязкость мембран является интегральным показателем, зависящим от фосфолипидного состава, ненасыщенности липидов и содержания холестерина в мембранах. Длительное влияние аномальных продуктов метаболизма приводит к модификации липидного бислоя мембран клеток крови при различных патологиях, особенно при патофизиологических и клинических проявления опухолевого процесса [4, 5].

Целью настоящей работы являлось установление биофизических критериев, отражающих нарушение физико-химического состояния компонентов эритроцитарных мембран при МДС.

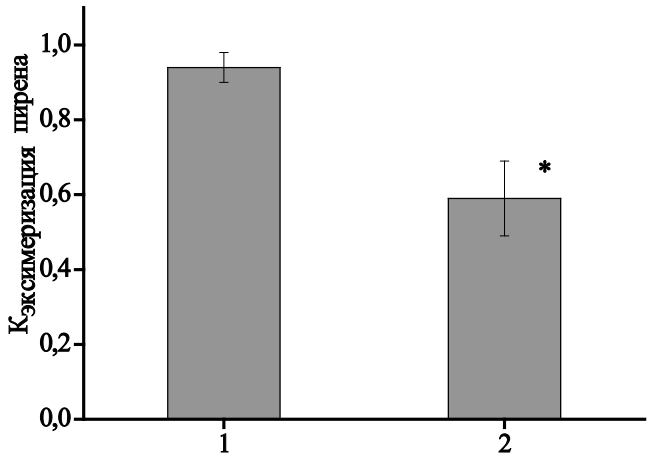
Объектом исследования служили образцы периферической крови (0,3-0,5 мл) детей с первичными МДС, которые находились под наблюдением в Республиканском научно-практическом центре детской онкологии, гематологии и иммунологии и практически здоровых детей в возрасте от 5 до 15 лет, которые составили контрольную группу. Мембраны эритроцитов изолировали по методу Доджа и сотр. ,

Исследования состояния мембран эритроцитов проводились при помощи флуоресцентных методов. Спектры флуоресценции триптофанового компонента мембранных препаратов регистрировали при возбуждении светом λ=297 нм (в этой области практически отсутствует поглощение тирозина). Измерение интенсивности флуоресценции белков производили при λ = 340-345 нм. Измерение параметров зондовой флуоресценции мембран эритроцитов проводили на спектрофлуориметре LSF-222 ("СОЛАР" Беларусь), спектрофотометрические измерения на спектрофотометре SPECORD M-40 (Германия). В работе были использованы следующие флуоресцентные зонды: пирен, 1,6-дифенил-1,3,5 гексатриен (ДФГ), 1-(4-триметиламмониум- 6-фенил-1,3,5–гексатриен (ТМА-ДФГ), 6-додеканол-2-диметиламинонафтален (лаурдан), N-(1-пирен) -малеимид (ПМ). Уровень SH-групп белков исследован с помощью двух независимых методов: флуоресцентного (с использованием зонда N-(1-пирен)-малеимида (ПМ)) и спектрофотометрического (с помощью реактива Эллмана).

В результате проведенных исследований установлено, что средние значения величин эксимеризации ($К_{экс}$) пирена (0,87±0,19 отн.ед.) в группе пациентов с МДС не имели статистически значимых различий с контрольными значениями (0,94±0,04 отн.ед.). При анализе изменения флуоресцентного показателя пирена, связанного с эритроцитарными мембранами, в зависимости от количества бластных клеток в костном мозге (КМ) при МДС оказалось, что значения $К_{экс}$ пирена, включенного в тени эритроцитов детей, зависели от количества бластных клеток и были снижены по сравнению с контролем при вариантах, сопровождающихся увеличением бластов КМ более 5% (0,59±0,16 отн.ед.) (рис. 1).

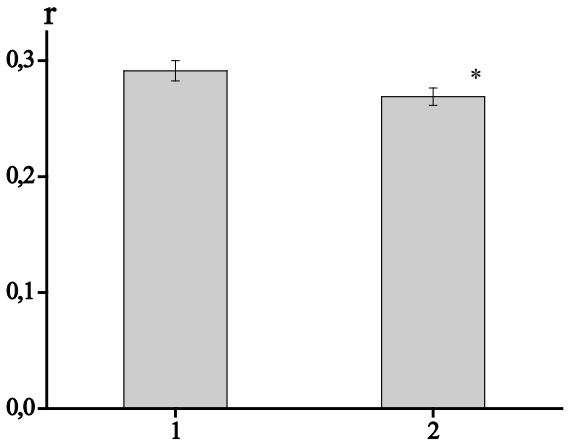
Известно, что эксимеризация пирена зависит от скорости латеральной диффузии зонда в гидрофобном компартменте липидного бислоя мембраны, и поэтому его изменение может говорить о подвижности жирнокислотных цепей. Значения $К_{экс}$ пирена находятся в обратной зависимости от микровязкости гидрофобной области липидного бислоя мембраны. Можно предположить, что этот факт объясняется более выраженными диспластическими изменениями в клетках эритроидной линии при наличии бластоза КМ.

Для выявления нарушений физико-химического состояния липидного бислоя эритроцитарных мембран у детей, страдающих вариантом МДС с избытком бластов, в КМ, были проведены исследования с другим флуоресцентным зондом – ТМА-ДФГ. Установлено, что средние значения анизотропии флуоресценции ТМА-ДФГ были снижены в мембранах эритроцитов детей, страдающих МДС, по сравнению с мембранами эритроцитов детей контрольной группы (рис. 2).



1-контроль (n=10),
2- МДС с количеством бластов более 5% (n=8)
* статистические различия анализируемого показателя по отношению к контролю $p < 0,05$

Рисунок 1. Средние значения коэффициента эксимеризации пирена, включенного в изолированные мембраны эритроцитов здоровых детей и пациентов с МДС



1-контроль (n=10),
2- МДС (n=8)

* статистические различия анализируемого показателя по отношению к контролю $p< 0,05$

Рисунок 2. Анизотропия флуоресценции ТМА-ДФГ, включенного в тени эритроцитов обследованных детей

Так как известно, что анизотропия флуоресценции ТМА-ДФГ отражает упаковку жирно-кислотных цепей мембранных липидов, то полученные данные свидетельствуют об изменении микровязкости липидного бислоя в мембранах эритроцитов. Это подтверждается выявлением увеличения интенсивности флуоресценции ТМА-ДФГ и ДФГ, включенных в мембраны эритроцитов детей, страдающих МДС, по сравнению с группой практически здоровых детей (табл. 1).

В экспериментах с ДФГ по исследованию микровязкости липидного бислоя мембран эритроцитов детей с МДС получены сходные результаты с флуоресцентном зондом ТМА-ДФГ. Обнаружено, что поляризация флуоресценции ДФГ была снижена в эритроцитарных мембранах детей при данном заболевании примерно на 30% по сравнению с практически здоровыми детьми.

Параллельно нами были проведены опыты по связыванию флуоресцентного зонда лаурдана с эритроцитами детей, страдавших МДС. Известно, что флуоресценция лаурдана используется для выявления изменений в упорядоченности фосфолипидов. Амфифильный флуоресцентный зонд лаурдан встраивается в мембрану в гидрофильно-гидрофобной области липидного бислоя, при этом остаток лауриновой кислоты располагается в области углеводородных цепочек жирных кислот фосфолипидов, а его флуоресцентный нафталиновый остаток находится на уровне полярных головок фосфолипидов [6, 7]. Установлено, что степень генерализованной поляризации флуоресценции (GP) лаурдана в мембранах эритроцитов детей с МДС увеличена по отношению к контролю.

Результаты исследований указывают на то, что в мембранах эритроцитов детей с МДС, происходит изменение микровязкости липидов. Зарегистрированные нами изменения параметров флуоресценции различных по локализации в мембране липофильных зондов дает основание думать о модификации липидов на разной глубине липидного бислоя.

Известно, что в состав клеток животного происхождения и биологических жидкостей входит целый ряд веществ, люминесцирующих как в видимой, так и в ультрафиолетовой области спектра. В качестве показателя, характеризующего структурное состояние белковых компонентов эритроцитарных мембран, была выбрана собственная и зондовая люминесценция. Установлено, что значение интенсивности флуоресценции белков эритроцитарных мембран в группе детей с МДС (2,48 ± 0,12 отн. ед.) было повышено по отношению к контролю (1,78 ± 0,04 отн. ед, $p=0,03$). Это позволяет заключить, что в мембранах эритроцитов детей с МДС независимо от варианта течения заболевания происходит модификация структурного состояния белковых компонентов, что может являться причиной диспластических изменений эритроцитов, выявляемых при морфологическом исследовании ПК и КМ. Это подтверждается следующими результатами исследования структурного состояния эритроцитарных мембран.

Таблица 1. Интенсивность флуоресценции липофильных зондов ДФГ и ТМА-ДФГ, включенных в изолированные мембраны эритроцитов обследованных детей

Обследованные группы детей (n- количество пациентов в группе)	Интенсивность флуоресценции ДФГ ($I_{фл.}$), отн.ед. ($\lambda_{возб./рег}$ 365/428)	Интенсивность флуоресценции ТМА-ДФГ ($I_{фл.}$), отн.ед. ($\lambda_{возб./рег}$ 365/428)
Контрольная группа, n=14	0,31±0,003	0,61±0,01
Дети с МДС, n=8	0,36±0,003	0,97±0,08*

* статистические различия анализируемого показателя по отношению к контролю $p< 0,01$

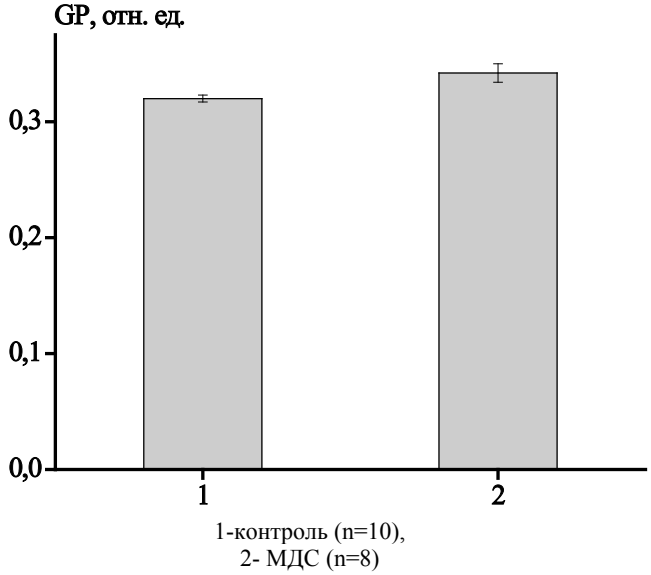
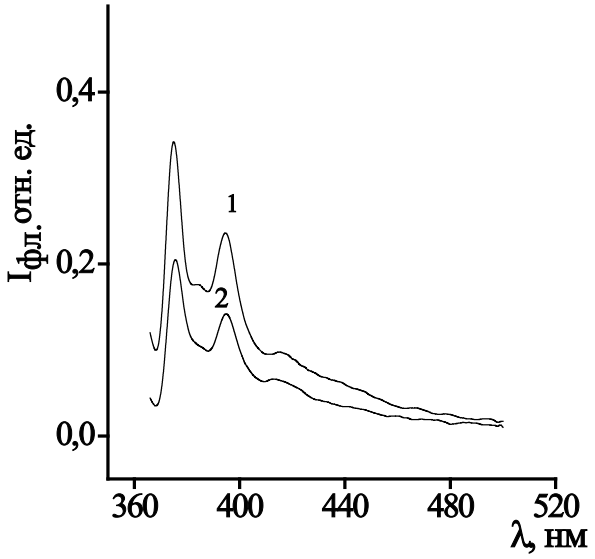


Рисунок 3. Генерализованная поляризация флуоресценции лаурдана (GP), встроенного в мембраны эритроцитов периферической крови обследованных детей ($\lambda_{возб.}$ = 340 нм, $\lambda_{рег.}$ = 440 нм и $\lambda_{рег.}$ = 490 нм)

Известно, что в патогенез многих заболеваний, в том числе и МДС, включаются активные формы кислорода (АФК), что может приводить к различным окислительным процессам, одним из которых является окисление белков [8]. Поскольку SH-группы белков модифицируются при взаимодействии с АФК, то, выявление окисления белков нами проведен по изменению уровня тиоловых групп в белках мембран эритроцитов детей при МДС. Из-за доступности белков к АФК может происходить модификация аминокислот, сшивание и деградация белков. Тиоловые группы в цистеиновых остатках являются одним из мест, которые имеют наибольшую вероятность модификации. Результаты проведенных исследований показали, что интенсивность флуоресценции ПМ, связанного с SH-группами белков, уменьшается в эритроцитах детей, страдающих МДС по сравнению с контрольными образцами (рис. 4). Аналогичные результаты по снижению SH-групп были получены при использовании спектрофотометрического метода. Обнаружено, что у детей с МДС общее количество SH- групп в эритроцитарных мембранах снижалось примерно на 20-40 % по сравнению с контрольной группой. Полученные данные свидетельствуют о том, что в эритроцитарных мембранах при МДС у детей происходит окисление белков, что может являться важным звеном в патогенезе анемического синдрома.



1-контроль (n=10),
2- МДС (n=8)

Рисунок 4. Спектры флуоресценции N-(1-пирен) малеимида, связанного с SH-группами белков эритроцитарных мембран обследованных групп детей ($\lambda_{возб.}$=342 нм)

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что в мембранах эритроцитов периферической крови детей с МДС происходит изменение микровязкости липидов на разной глубине липидного бислоя в зависимости от их локализации. Также в мембранах эритроцитов детей с МДС независимо от варианта течения заболевания обнаружено нарушение структурного состояния белковых компонентов, что может являться причиной диспластических изменений эритроцитов, выявляемых при морфологическом исследовании периферической крови и костного мозга. Данные об изменении физико-химических свойств мембран эритроцитов у пациентов с МДС могут быть использованы для создания методов дифференциальной диагностики или разработки биофизических тестов прогноза течения данного заболевания.

Список литературы / References:

1. Geyer M.B., Jacobson J.S. Epidemiology of Hematological Malignacies of children, Adolescents and Young Adults, In: Hematological Malignancies in Children, Adolescents and Young Adults, Ed. M.S. Cairo, Sh.L. Perkins. *Word Scientific Publishing*, 2012, pp.1-15.

2. Visconte V., Tiu R.V., Rogers H.J. Pathogenesis of myelodysplastic syndromes: an overview of molecular and non-molecular aspects of the disease. *Blood Res*, 2014, vol. 49 (4), pp. 216-227. DOI: 10.5045/br.2014.49.4.216.

3. Knight J., Czuchlewski D.R. Acquired elliptocytosis of myelodysplastic syndrome. *Blood*, 2013, vol. 121 (4), pp. 140-145. DOI: 10.1155/2017/3625946.

4. Боровская М.К. Структурно-функциональная характеристика мембраны эритроцита и её изменения при патологиях разного генеза. *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН,* 2010, 73(3), с.334-354 [Borovskaya M.K. Structural-functional characteristics of erythrocyte membrane and its changes in pathologies of diferent genesis. *Byulleten' VSNTS SO RAMN*, 2010, vol. 73, no. 3, pp. 334-354 (In Russ.)].

5. Слобожанина Е.И., Климкович Н.Н., Зубрицкая Г.П., Козарезова Т.И. *Нарушение эритропоэза и изменение физико-химических свойств мембран эритроцитов у пациентов с миелодиспластическими синдромами*, *Морфологические основы патологии*: ред. В.П. Волкова, Новосибирск: СиБАК, 2015, гл. 7, с. 136-157. [Slobozhanina E.I., Zubritskaya G.P., Klimkovich N.N., Kozarezova T.I. *Violation of erythropoiesis and a change in the physicochemical properties of erythrocyte membranes in patients with myelodysplastic syndromes, Morphological basis of pathology*: ed. V.P. Volkov, Novosibirsk: SibAK, 2015, ch. 7, pp. 136-157. (In Russ.)]

6. Zwolinska D., Grzeszczak W., Szczepanska M., Kilis-Pstrusinska K., Szprynger K. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in children on maintenance dialysis. *Pediatr. Nephrol*, 2006, vol. 21, pp. 705-710. DOI: 10.1007/s00467-006-0053-2.

7. Зубрицкая Г.П. *Биофизические характеристики клеток крови и биологических жидкостей как показатели патологических состояний человека. автореф. дисс. ... канд. биол. наук.* Минск, 2016, 26 с. [Zubritskaya G.P *Biophysical parameters of blood cells and biological fluids as indicators of human pathological states: Abstract PhD.* Minsk, 2016, 26 p. (In Russ.)]

8. Bertram J.S. The molecular biology of cancer. *Molecular aspects of medicine*, 2000, vol. 21, pp. 167-223. DOI: 10.1016/s0098-2997(00)00007-8.

FEATURES OF THE PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF ERYTHROCYTE MEMBRANES IN MYELODYSPLASTIC SYNDROMESCHILDREN

Klimkovich N.N.[1], Zubritskaya G.P.[2], Kozarezova T.I.[1], Slobozhanina E.I.[2]

[1] Belarussian Medical Academy of Postgraduate Education

Brovki str., 3/3, 220013, Minsk, Belarus; e-mail: *det.hematology@mail.ru*

[2] Institute of Biophysics and Cell Engineering of NAS of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

Akademicheskaya str., 27, 220072, Minsk, Belarus; e-mail: slobozhanina@ibp.org.by

Abstract. We found violations of the physical and chemical state of lipids and red cells membrane proteins in myelodysplastic syndromes (MDS) in children. In red blood cells of children with this clonal disease, there is a change in the fluorescence parameters of lipophilic probes of different localization in the membrane, which indicates a modification of lipids at different depths of the lipid bilayer. In the red cells membranes of children with MDS, there is a violation of the structural state of protein components and protein oxidation, which may be an important link in the pathogenesis of anemic syndrome. Data on changes in the physical and chemical properties of cell membranes in patients with MDS can be used to create methods for differential diagnosis and to develop biophysical tests to predict the course of this disease.

Key words*: myelodysplastic syndromes, red cells membranes, fluorescent probes, protein oxidation, children*