УДК 611-018.824:616-053.2(-17)

АДАПТАЦИОННО-ПРИСПОСОБИТЕЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ МЕМБРАНОСВЯЗАННОЙ ВОДЫ У ДЕТЕЙ НА СЕВЕРЕ

Колодяжная Т.А., Зайцева О.И.

ФГБУ «НИИ медицинских проблем Севера Сибирского отделения РАМН», Красноярск, e-mail: impn@impn.ru

Проведено изучение липидной фосфолипидной структуры эритроцитарных мембран и их физико-химических свойств, среди которых определение уровня мембраносвязанной воды. Обследованы практически здоровые дети коренного и пришлого населения в возрасте от 8 до 12 лет, проживающие в Эвенкии и в г. Красноярске. С помощью корреляционного анализа было установлено, что повышение гидратированности фосфолипидов является адаптивно-приспособительным признаком.

Ключевые слова: Север, эритроцитарные мембраны, дети школьного возраста, структуросвязанная мембранная вода

ADAPTIVE MECHANISMS OF MEMBRANE-BOUND WATER IN CHILDREN IN THE NORTH

Kolodyazhnaya T.A., Zaitseva O.I.

Federal State Institution Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, Krasnoyarsk, e-mail: impn@impn.ru

The study of lipid phospholipid structure of erythrocyte membranes and their physical-chemical properties, including the determination of the level of membrane-bound water. Practically healthy children are examined of native and alien population at the age of 8 to 12 years old living in the Evenkia and Krasnoyarsk city. With the help of the correlation analysis it was established that the increase in hydration of phospholipids is adaptive feature.

Keywords: North, erythrocyte membranes, school-aged children, structure-bound membrane water

Состояние адаптированности достигается за счет морфофункциональных и биохимических перестроек как на организменном [10], так и на клеточно-молекулярном уровнях [1, 7]. Сложнейшие процессы развития ребенка в экстремальных условиях Севера осуществляются на фоне действия неблагоприятных экологических факторов, которые обусловливают специфическую перестройку их обменных процессов, лежащих в основе адаптивных реакций [3]. Исследованиями, проведенными на Севере [5], показано, что состав мембранных липидов у детей, как коренного, так и пришлого населения может быть подвержен значительным колебаниям, и зависит от целостности и функциональной активности липидной и фосфолипидной матрицы биомембран. Такой фактор, как структурированная вода к настоящему времени, хотя и считается известным, но является малоизученным.

В данный момент доказано, что вода является не только растворителем и средой в клетке, в которой протекают все биохимические превращения, но, находясь в связанном с биомембраной состоянии она непосредственно участвует в метаболических и энергетических процессах [1]. Благодаря слабым связям и способности воды постоянно образовывать кластеры (водное окружение) вокруг белков и липидов она обеспечивает тонкую регуляцию в биомембранах, что может быть пусковым механизмом в реализации основных эффектов внешнего воздействия. [1].

Работы, проведенные биофизиками, показали влияние электромагнитного излучения на воду, причем, как на чистую и ее растворы, так и структурированную в составе модельных биомембран (фосфатидилхолиновых липосом). Было экспериментально доказано, что структурированная вода является первичным звеном реагирования на электромагнитные возмущения [9, 6, 4]. В этой связи изучение влияния экстремальных факторов Севера (наличие низких температур, нарушение фотопериодизма, колебания геомагнитного и электрического полей) на взаимодействия структурированной воды с фосфолипидами биомембран является актуальным. До настоящего времени структурированная вода оценивалась только по количественному показателю и не изучалась во взаимосвязи со структурными фосфолипидами.

Поэтому целью нашей работы явилось изучение взаимодействия структруированной воды с основными стуртурными компонентами эритроцитарных мембран и их влиянием на физико-химические свойства.

Материалы и методы исследования

Обследованы 106 практически здоровых детей в возрасте от 8 до 12 лет, проживающие на севере и в г. Красноярске. В Эвенкии (пос. Тура): дети пришлого населения − 39 человек и коренного населения − 32 человека. Группой сравнения явились школьники аналогичного возраста г. Красноярска (35 человек). Клиническое обследование детей осуществлялось педиатрами Института медицинских проблем Севера.

В мембранах эритроцитов определяли липидный спектр методом тонкослойной хроматографии [8], физико-химические свойства – методом измерения флюоресценции спектров взаимодействия биомембран с зондами [2]. Данные измерения производились на спектрофлуориметре MPF – 4 марки «Хитачи» (Япония). Исследование физико-химических свойств мембран эритроцитов проводилось по 5 тестам. 1. Определение уровня триптофановых групп белков в липидном слое мембран по калибровочной кривой с использованием стандартного раствора триптофана (длина волны испускания 334 нм и длин волны возбуждения 284 нм) [2]. 2. Оценка текучести жирнокислотных остатков углеводородов мембранных фосфолипидов по эксимеризации пирена (длина волны испускания 350 нм, возбуждения – 340 нм) рассчитывалась по соотношению эксимеры/мономеры [2]. 3. Определение степени подвижности поверхностных белково-липидных структур мембран эритроцитов по характеристики обратной величины анизотропии мембран с встроенным зондом 1-анилино-нафталин-8 сульфонат (АНС) (длина волны испускания 400 нм, возбуждения – 360 нм) [2]. 4. Определение степени подвижности молекул триптофанилов мембран эритроцитов по характеристики обратной величины анизотропии триптофановых групп белков мембран [2]. Он рассчитывался по коэффициенту 1/ показатель анизотропии триптофановых групп белков (длина волны испускания 400 нм, возбуждения – 360 нм). 5. Определение количества структурированной воды (степени гидратированности мембран) проводилось с помощью флуоресцентного зонда 4-диметиламинохалкона (ДМХ) и рассчитывался по коэффициенту (1/фл. ДМХ). Применялся коэффициент асимметрии текучестей (КАТ), определяемый по отношению показателя текучестей поверхностных слоев мембран (1/анизотропии зонда АНС) к показателю текучести жирнокислотных остатков углеводородов мембранных фосфолипидов.

Математическую обработку полученных результатов проводили с использованием статистического пакета прикладных программ BIOSTAT, ver. 6.0. (StatSoft Inc. США). Все полученные результаты проверялись на нормальность распределения с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Для количественных признаков использовался непараметрический U-критерий Манн-Уитни при сравнении двух несвязанных выборок. Изменения считаются статистически значимыми при уровне значимости $P< 0,05$. Анализ зависимости признаков проводится с помощью расчета и оценки значимости непараметрического коэффициента корреляции по Спирмену. При значении $P< 0,05$ регрессионная модель адекватно описывает взаимосвязь признаков. Результаты исследования количественных параметров в группах сравнения представлены в виде Me – медиана, (Min-max).

Результаты исследования и их обсуждение

Сравнительный анализ липидного и фосфолипидного спектра эритроцитарных мембран выявил различия у детей пришлого населения как с детьми эвенков, так и с детьми г. Красноярска (табл. 1), характризовавшиеся снижением общих фосфолипидов (ОФЛ) ($p=0,0024$; $p<0,001$), фосфатидилхолина (ФХ) ($p=0,0024$; $p<0,001$) и интегрального коэффициента ЛФХ/ФХ ($p=0,0072$; $p=0,0002$). Дополнительными отличиями в структуре мембранных липидов в сравнении с детьми г. Красноярска было снижение уровня холестерина (ХС) ($p=0,0003$). В спектре фосфолипидов отмечалось уменьшение содержания фосфатидилэтаноламин (ФЭА) ($p=0,0011$), легкоокисляемых фракций фосфатидилсерина и фосфатидилинозитола (ФС+ФИ) ($p=0,0011$) и повышение содержания сфингомиелина (СМ) ($p=0,0003$). В сравнении с детьми эвенков в составе фосфолипидов было выявлено снижение уровня лизофосфатидилхолина (ЛФХ) ($p=0,0010$). Выявленные различия в содержании структурных липидов у детей пришлого населения в сравнении детьми эвенков и с детьми г. Красноярска отражались на физико-химических свойствах их биомембран (табл. 2).

У детей пришлого населения в сравнении детьми эвенков обнаружено увеличение подвижности молекул триптофанилов ($p=0,0465$), что, по нашему мнению, является адаптационно-приспособительным признаком белковой компоненты мембраны эритроцитов и свидетельствует об их ферментативной активации. Более выраженные различия в биофизических свойств мембран эритроцитов у детей пришлого населения Эвенкии выявлены при сравнении их с группой детей г. Краснояска, заключавшиеся в снижении уровня интегральных белков (триптофановые группы белков) ($p < 0,001$), степени флуоресценции зонда АНС ($p < 0,001$), текучести углеводородного слоя фосфолипидов ($p=0,0631$) и повышении степени гидратированности мембран ($p < 0,001$), подвижности поверхностного белок-липидного слоя эритроцитарных мембран ($p=0,0080$) и показателя асимметрии текучестей ($p < 0,001$).

Проведенный нами корреляционный анализ выявил обратную взаимосвязь между показателями структурированной воды и общим количеством фосфолипидов у детей коренного населения ($r=-0,2845$, $p=0,0409$). Это свидетельствует об умеренном «разрыхлении» разупорядочивании липосом фосфолипидов в их водном

Таблица 1

Показатели липидного обмена эритроцитарных мембран у детей от 8 до 12 лет различных регионов (Me 25‰ –75‰)

Показатели	Дети эвенков n=32	Дети пришлого населения n=39	Красноярск n=35
Общие фосфолипиды, ммоль/л	1,8075 (1,7145-1,9730)	1,7010 (1,6310-1,8910) P_{2-3} =0,0244	2,0740 (1,8510-2,2620) P_{3-4}<0,001
Холестерин,ммоль/л	3,3210 (3,1025-3,9780)	3,2650 (3,0330-3,5350)	4,3190 (3,2230-4,7850) P_{3-4}=0,0003
ОФЛ/ХС, отн.ед.	0,5288 (0,4589-0,5880)	0,5297 (0,5019-0,5790)	0,5183 (0,4736-0,5867)
Свободные жирные кислоты, ммоль/л	0,7945 (0,5855-1,2640)	0,8120 (0,5100-1,2080)	0,3400 (0,1740-1,5170)
Фосфатидилхолин, ммоль/л	0,8665 (0,8010-1,0110)	0,8010 (0,7740-0,8670) P_{2-3} =0,0244	0,9990 (0,8660-1,2080) P_{3-4}<0,001
ФЭА, ммоль/л	0,4620 (0,4205-0,5320)	0,4380 (0,387-0,521)	0,5350 (0,4690-0,5990) P=0,0011
ФС+ФИ, ммоль/л	0,1325 (0,1095-0,1520)	0,1540 (0,097-0,1480)	0,1650 (0,1240-0,4040) P=0,0011
СМ, ммоль/л	0,2265 (0,1960-0,2680)	0,2290 (0,1740-0,2740)	0,1500 (0,0980-0,2250) P_{3-4} =0,0003
ЛФХ, моль/л	0,0420 (0,0330-0,0600)	0,0350 (0,0260-0,0440) P_{2-3} =0,0010	0,0390 (0,0090-0,0870)
ЛФХ/ФХ, отн.ед	0,0474 (0,0384-0,0640)	0,0416 (0,0345-0,0520) P2-3 =0,0722	0,0275 (0,0098-0,0848)

Таблица 2

Показатели физико-химических свойств эритроцитарных мембран у детей от 8 до 12 лет различных регионов (Me 25‰–75‰)

Показатели	Дети эвенков n=32	Дети пришлого населения n=39	Дети г. Красноярска n=35
Триптофаовые, группы белков, мг/%	0,2700 (0,2400-0,3200)	0,2800 (0,2600-0,3000)	0,3650 0,3300-0,4000) P_{3-4} < 0,001
Текучесть, отн.ед.	0,5065 (0,4090-0,5630)	0,4210 (0,3680-0,5970)	0,5330 (0,4510-0,6010) P_{3-4} =0,0631
Флуоресценция АНС, ед.фл.	33,0000 (30,5000-36,0000)	33,0000 (31,0000-37,0000)	40,2000 (36,3000-57,0000) P_{3-4} < 0,001
Гидратировон-ность, отн.ед (1/фл.ДМХ)	0,0200 (0,0174-0,0220)	0,0208 (0,0182-0,0230)	0,0130 (0,0108-0,0160) P_{3-4} < 0,001
Подвижность, молекул триптофанилов, отн.ед	2,1622 (2,0576-2,3530)	2,3040 (2,1459-2,4330) P_{2-3} =0,0465	1,8624 (1,6207-2,1739) P_{3-4} < 0,001
Подвижность поверх-ностного слоя, отн.ед.	2,1622 (2,0576-2,3530)	2,3923 (2,2173-2,6810)	2,1693 (1,9569-2,4272) P_{3-4} =0,0080
Асимметрия, текуче-стей, отн.ед.	4,9294 (4,1429-6,200)	6,2229 (4,1322-6,7220) P_{2-3} = 0,0173	4,2044 (3,6820-5,1723) P_{3-4} < 0,001

окружении. У детей пришлого населения была выявлена аналогичная обратная корреляционная взаимосвязь повышенной гидратированности эритроцитарных мембран с общим количеством фосфолипидов (ОФЛ) и прямая − с холестерином (СХС) (ОФЛ/СХС) (r= − 0,3782, p=0,0359), что, не смотря на слабо выраженную степень скоррелированности, подтверждало данные литературы, по которым структурированная вода участвовала в переносе холестерина через мембрану [1]. Наличие прямых корреляционных взаимосвязей мембранного холестерина с общим количеством фосфолипидов как у детей коренного населения (r= 0,3880, p=0,0045), так и у пришлого (r= 0,5974, p=0,0004) свидетельствует о восстановительных свойствах мембранного холестерина по отношению к фосфолипидам и подчеркивает значимость его для поддержания стабильности структуры эритроцитарных мембран, особенно у детей пришлого населения. Следовательно, и сама мембраносвязанная вода способствует стабилизации структуры эритроцитарных мембран на Севере. Наряду с косвенным признаком, указывающим на стабилизирующие свойства структурированной воды у детей коренного населения выявлено и прямое доказательство этого свойства воды в виде обратной корреляционной взаимосвязи между показателями повышенной гидратированности эритроцитарных мембран и содержанием в них лизофосфатидилхолина (r= − 0,3341, p= 0,0155). Следует подчеркнуть, что подобная взаимосвязь выявлена так же и у детей средних широт (r= −0,5851, p= 0,0003), но отсутствовала у детей пришлого населения Эвенкии. Вместе с этим, с помощью корреляционного анализа обнаружена взаимосвязь структурированной воды с показателем флуоресценции зонда АНС, которая свидетельствует об её участии в формировании электроотрицательно заряженных молекул поверхностной зоны эритроцитарных мембран. Данное свойство структурированной воды было характерным только для детей коренного населения Эвенкии (r= −0,4647, p=0,0004) и детей г. Красноярска (r=−0,5719, p=0,0004). Прямая корреляционная взаимосвязь между показателями флуоресценции зонда АНС и содержанием ЛФХ аналогично с предыдущей также была свойственна для детей эвенков (r= 0,3100, p=0,0253) и детей г. Красноярска (r= 0,6694, p<0,001). Это отражает тот факт, что ЛФХ способствует формированию положительных зарядов на поверхностных участках эритроцитарных мембран, что согласуется с данными литературы [2]. На этом основании мы подтверждаем данные литературы, что структурированная вода участвует в регуляции липидного обмена биомембран.

Заключение

Таким образом, наши исследования показали, что повышение содержания структурированной воды в эритроцитарных мембранах у всех детей школьного возраста является адаптивно-приспособительным механизмом к экстремальным условиям Севера. Повышение оводненности гидрофильно-гидрофобных зон фосфолипидов способствует уменьшению доли самих фосфолипидов и является адаптивным приспособлением, не связанным с деструктивными процессами. Это позволяет воде соединенной с фосфолипидами осуществлять регуляцию липидов в условиях повышения относительной подвижности в гидрофильной зоне фосфолипидов (повышение асимметрии текучестей). У детей пришлого населения факт регуляции структурированной водой липидного обмена не выявлен, что свидетельствует о начальном этапе адаптации к экстремальным условиям.

Список литературы

1. Болдырев А.А, Кяйвяряйнен Е.И., Илюха В.А. Биомембранология: учеб. Пособие. – Петрозаводск: Изд-во Кар НЦ РАН. – 2006. – 226 с.

2. Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеидов. – М.: Наука. – 1989. – 277 с.

3. Зайцева О.И., Петрова И.А., Эверт Л.С., Колодяжная Т.А., Деревцова С.Н. Варианты реактивности мембран эритроцитов и их роль в прогнозе адаптации у детей мигрантов с Севера // Вестник новых медицинских технологий. – 2013. – Т. 20, № 2. – С. 69-72.

4. Крыницкая А.Ю., Суханов П.П, Седельников Ю.Е. Влияние КВЧ-излучения низкой интенсивности на структурно-динамическое состояние модельных биомембран [электронный ресурс] // Журнал радиоэлектроники. – 2011.– № 4: сайт. – http://jre.cplire.ru/jre/apr11/6/abstract.html (дата обращения 19.04.2011).

5. Манчук В.Т., Надточий Л.А. Состояние и формирование здоровья малочисленных народов Севера и Сибири. – Красноярск.: ООО «Версо», 2008. – 179 с.

6. Нестерюк П. Г. Измерительно-вычислительный комплекс и методы исследований физико-химических параметров воды после воздействия физических полей: Автореф. ... дисс. канд. техн. наук. – Барнаул, 2012. – 20 с.

7. Панин Л.Е. Гомеостаз – системные представления // Молекулярные механизмы регуляции функции клетки: матер. междунар. симп. – Тюмень, 2005. – С. 91-94.

8. Ростовцев В.Н, Резник. Г.Е. Количественное определение липидных фракций плазмы крови // Лабораторное дело. – 1982. − № 4.– С. 26-29.

9 Трухан Э.М. Воздействие слабых магнитных полей на биологическую активность водной фазы // Компьютерные исследования и моделирование. – 2009.– Т. 1, № 1. – С. 101-108.

10. Moskalenko O.L., Pulikov A.S. qPovozrastny dynamics of physical development and adaptation opportunities of young men of Siberia // В сборнике: Applied and Fundamental Studies Proceedings of the 2nd International Academic Conference. Publishing House «Science and Innovation Center», and the International Journal of Advanced Studies. – 2013. – С. 107-112.