

УДК 577.161.3:616–053.2(-17)

**ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА ЖИРОРАСТВОРИМЫХ ВИТАМИНОВ
У ДЕТЕЙ КОРЕННОГО И ПРИШЛОГО НАСЕЛЕНИЯ СЕВЕРА****Колодяжная Т.А., Зайцева О.И.***ФГБУ «НИИ медицинских проблем Севера Сибирского отделения РАМН», Красноярск,
e-mail: impn@impn.ru*

Проведено сопоставление исследуемых показателей эритроцитарных мембран у практически здоровых детей коренного и пришлого населения Эвенкии школьного возраста (8-12 лет): уровня жирорастворимого витамина альфа-токоферола, фосфолипидной структуры, и физико-химических свойства, характеризующих функциональное состояние фосфолипидов и белков (определение текучести общего билипидного слоя, подвижности поверхностной белок-липидной структуры и параметров организма ребенка, отражающими длительное воздействие экстремальных условий Севера.

Ключевые слова: Север, эритроцитарные мембраны, альфа-токоферол, липидный обмен, физико-химические свойства, дети коренного и пришлого населения

**PECULIARITIES OF METABOLISM OF FAT-SOLUBLE VITAMINS IN CHILDREN
OF NATIVE AND ALIEN POPULATION OF THE NORTH****Kolodyazhnaya T.A., Zaitseva O.I.***Federal State Budget Institution Scientific Research Institute of Medical Problems of the North of
Siberian Department of the Russian Academy of Medical Sciences, Krasnoyarsk, e-mail: impn@impn.ru*

The comparison of the researched indices of erythrocyte membranes in healthy children of native and alien population of Evenkia of school age (8-12 years): fat-soluble vitamin levels of alpha-tocopherol, phospholipid structure and physico-chemical properties that characterize the functional state of phospholipids and proteins (the definition of total turnover bilipidnogo layer, the surface mobility of the protein-lipid structure and parameters of tryptophan fluorescence). It's found that alpha-tocopherol has different metabolic manifestations in relation to phospholipids and integral proteins, due to specific changes in the organism of a child, reflecting the prolonged exposure to extreme conditions of the North.

Keywords: North, erythrocyte membrane, alpha-tocopherol, lipid metabolism, physical and chemical properties, children of native and aliens populations

Ключевые позиции здоровья и патологии обусловлены системой адаптивных морфофункциональных и биохимических перестроек в организме [7] и в биомембранах, в частности в ответ на постоянно возникающие во внешней среде изменения [1]. В условиях Севера организм ребенка подвергается воздействию целого ряда экстремальных факторов среды, которые способствуют существенным перестройкам всех его физиологических систем, в том числе и антиоксидантной системы клеточных мембран [4]. Известно, что характерным и неотъемлемым свойством биомембран для суровых условий Севера является повышение липидного обмена, что в свою очередь способствует активации окислительных процессов в них [4]. Важной составляющей антиоксидантной системы клеточного звена организма ребенка является жирорастворимый витамин токоферол. В природе токоферол имеет много форм, но наиболее широко распространенной формой является альфа-токоферол (α -ТКФ), имеющий самую высокую антиоксидантную биологическую активность среди известных молекулярных формул токоферолов [1,8]. При изучении содержания α -ТКФ в крови у жителей Севера, в том числе и у

детского населения многие авторы отмечали его пониженный уровень [4,5]. При этом большинством исследователей данный факт оценивался однозначно, как недостаточное содержание данного витамина, требующее дополнительного введения его в организм ребенка [5]. Изученная нами по данному вопросу литература доказывает, что оценка потребности в α -ТКФ только по количественному признаку и по клиническому эффекту не может давать правильного ответа на вопрос о дополнительном введении в организм этого витамина (α -ТКФ). Это происходит в результате мультивалентного характера биохимических преобразований α -ТКФ в биомембранах, что выражается в существовании в естественных условиях «множества» метаболитов данного витамина [1,8], в том числе и прооксидантных. Накопление прооксидантных метаболитов α -ТКФ может происходить в результате нарушения баланса его сопутствующих участников (аскорбиновая кислота, ферментативные антиоксиданты, аминокислоты, микроэлементы и др.) [1,8]. На этом основании мы полагаем, что антиокислительные функции α -ТКФ не всегда связаны с его количественным содержанием в структуре биомембран. Они обусловлены качествен-

ными характеристиками, то есть биологической активностью [1]. Эта активность определена существованием в структуре биомембран двух основных форм α -ТКФ, различающихся по биохимическим свойствам и локализации: жирорастворимая, гидрофобная и «водорастворимая» гидрофильная [3,8].

Следует отметить, что наиболее изучено воздействие α -ТКФ на биологическую мембрану, находящегося в жирорастворимой форме. Данная форма витамина в биологически активном состоянии локализуется в области взаимодействия углеводородных «хвостов» легкоокисляемых фосфолипидов, в зоне её двойных связей. В этом случае действие α -ТКФ направлено на восстановление окисленных форм арахидоновой кислоты и сохранение легкоокисляемых фосфолипидов в функционально активном состоянии в структуре биомембран [1,8], что влияет на их текучесть [1].

Менее изучена так называемая гидрофильная форма α -ТКФ, с измененными биохимическими свойствами. В экспериментальной работе, проведенной А.А. Капраловым с соавт (1993) [3] было обнаружено, что многие биомембраны, в том числе и эритроцитарная имеют специфические белки липопротеидной природы, расположенные в их поверхностных областях, в которые поступают жирорастворимые формы α -ТКФ. Группой авторов было доказано, что в результате метаболических преобразований происходит изменение биохимических свойств α -ТКФ. Он становится «гидрофильным» и, следовательно, менее «опасным», так как накопление окисленных форм в большей степени свойственно жирорастворимому витамину α -ТКФ [6], что способствует снижению его биологической активности вплоть до смены «полярности» воздействия от антиоксидантной к прооксидантной.

Учитывая тот факт, что растущий организм ребенка в условиях Севера испытывает двойную окислительную нагрузку (физиологическую и экологическую), мы полагаем, что на Севере существует система морфофункциональных и биохимических перестроек в организме и в биомембранах, в частности. Они направлены на уменьшение уровня жирорастворимых «опасных» форм витамина α -ТКФ и образование «безопасных» его метаболитов. Для доказательства данной гипотезы необходимо выявление функциональной направленности (антиоксидантной или прооксидантной) альфа-токоферола, что будет возможным при изучении всех известных структурных компонентов биомембран,

биохимически и функционально связанных с α -ТКФ (фосфолипиды, интегральные белки и их биофизических характеристик). До настоящего времени α -ТКФ оценивался только по количественному показателю и не изучался во взаимосвязи со структурными фосфолипидами и интегральными белками. Поэтому целью нашей работы явилось изучение взаимодействия α -ТКФ с содержанием основных структурных компонентов эритроцитарных мембран и с их физико-химическими характеристиками.

Материалы и методы исследования

Исследованы практически здоровые дети в возрасте от 8 до 12 лет, проживающие на Севере, в Эвенкии (пос. Тура): дети пришлого населения – 31 человек и коренного населения – 52 человека. Всего исследовано 83 человека.

В мембранах эритроцитов определяли липидный спектр методом тонкослойной хроматографии [9], уровень жирорастворимого витамина альфа-токоферола по методу [10], физико-химические свойства – методом измерения флуоресценции спектров собственной флуоресценции и взаимодействия биомембран с зондами [2]. Данные измерения производились на спектрофлуориметре MPF – 4 марки «Хитачи» (Япония). Исследование физико-химических свойств мембран эритроцитов проводилось по 4 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 углеводов мембранных фосфолипидов по эксимеризации пирена (длина волны испускания 350 нм, возбуждения – 340 нм) рассчитывалась по соотношению эксимеры/мономер [2]. 3. Определение степени подвижности поверхностных белково-липидных структур мембран эритроцитов по характеристике обратной величины анизотропии мембран с встроенным зондом 1-анилинонафталин-8 сульфат (АНС) (длина волны испускания 400 нм., возбуждения – 360 нм.) [2]. 4. Определение показателя степени вращательной подвижности молекул триптофанилов ВПМТ мембран эритроцитов по характеристике обратной величины анизотропии триптофановых групп белков биомембран (1/ВПМТ) (длина волны испускания 400 нм., возбуждения – 360 нм) [2].

Применялся коэффициент асимметрии текучести (КАТ), определяемый по отношению показателя текучести поверхностных слоев мембран (1/анизотропии зонда АНС) к показателю текучести общего слоя 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 Ме – медиана, (Min-max).

Результаты исследования и их обсуждение

При анализе уровня жирорастворимого витамина альфа-токоферола в эритроцитарных мембранах (ЭМ) у детей, проживающих в Эвенкии не выявлено статистически значимых различий, связанных с этнической принадлежностью (табл. 1).

Таблица 1

Показатели липидного обмена и жирорастворимого витамина альфа-токоферола в эритроцитарных мембранах у детей коренного и пришлого населения Эвенкии от 8 до 12 лет (Ме 25 %-75 %)

Показатели	Дети эвенков n=52	Дети пришлого населения n=31	Степень достоверности p
1	2	3	4
Альфа-токоферол, мкмоль/л	8,8850 (6,4200-9,7600)	9,180 (7,420-11,260)	p=0,1282
Общие фосфолипиды, ммоль/л	1,8075 (1,7145-1,9730)	1,7010 (1,6310-1,8910)	p =0,0244
Фосфатидилхолин, ммоль/л	0,8665 (0,8010-1,0110)	0,8010 (0,7740-0,8670)	p =0,0244
Фосфатидилэтанол-амин, ммоль/л	0,4620 (0,4205-0,5320)	0,4380 (0,387-0,521)	p =0,3968
Фосфатидилсерин + фосфатидилинозитол, ммоль/л	0,1325 (0,1095-0,1520)	0,1540 (0,097-0,1480)	p =0,167795
Сфингомиелин, ммоль/л	0,2265 (0,1960-0,2680)	0,2290 (0,1740-0,2740)	p =0,689066
Лизофосфатидилхолин, моль/л	0,0420 (0,0330-0,0600)	0,0350 (0,0260-0,0440)	p =0,0010
ЛФХ/ФХ, отн.ед	0,0474 (0,0384-0,0640)	0,0416 (0,0345-0,0520)	p =0,0722

Учитывая локализацию и известные функциональные свойства липидрастворимого витамина α -ТКФ, для выявления особенностей его метаболизма у детей Севера мы провели сравнительный анализ липидного и фосфолипидного спектра ЭМ, их физикохимических свойств и выявили следующие этнические различия. У детей пришлого населения по сравнению с детьми эвенков было отмечено статистически значимое снижение общих фосфолипидов (ОФЛ) в структуре ЭМ ($p=0,0024$; $p<0,001$) за счет фракции фосфатидилхолина (ФХ) ($p=0,0024$) и его метаболита лизофосфатидилхолина (ЛФХ)

($p=0,0010$). Немногочисленные изменения в фосфолипидном составе ЭМ имело аналогичные трансформации в показателях физико-химических свойств. Они были выражены в повышении величины показателя вращательной подвижности молекул триптофанилов (ВПМТ) у детей пришлого населения Эвенкии ($p=0,0465$) и в показателе интегрального коэффициента асимметрии текучестей эритроцитарных мембран (КАТ) (подвижность поверхностного слоя ЭМ/текучесть общего слоя фосфолипидов) ($p=0,0173$) (табл.2), характеризующий функциональное состояние фосфолипидов.

Таблица 2

Показатели физико-химических свойств эритроцитарных мембран у детей коренного и пришлого населения Эвенкии от 8 до 12 лет (Me 25%-75%)

Показатели	Дети эвенков n=52	Дети пришлого населения n=31	Степень достоверности p по U тест M-W
1	2	3	4
Триптофановые, группы белков, мг/%	0,2700 (0,2400-0,3200)	0,2800 (0,2600-0,3000)	p= 0,8725
1	2	3	4
Текучесть, отн.ед.	0,5065 (0,4090-0,5630)	0,4210 (0,3680-0,5970)	p= 0,3022
Подвижность молекул триптофанилов, (ПМТ) отн.ед	2,1622 (2,0576-2,3530)	2,3040 (2,1459-2,4330)	p =0,0465
Подвижность поверхностного слоя, отн.ед.	2,1622 (2,0576-2,3530)	2,3923 (2,2173-2,6810)	p =0,7701
Коэффициент асимметрии, текучести, (КАТ), отн.ед.	4,9294 (4,1429-6,200)	6,2229 (4,1322-6,7220)	p= 0,0173

Снижение уровня содержания общих фосфолипидов за счет фракции фосфатидилхолина (ФХ) указывает на менее устойчивую структуру ЭМ у детей пришлого населения Эвенкии. Это, по нашему мнению, свидетельствует о неоднозначных потребностях в антиоксидантах, в том числе и в α -ТКФ. Однако, как было изложено выше, нами не выявлены этнические различия в содержании абсолютного количества этого витамина в их ЭМ. Произведя корреляционный анализ с участием липидрастворимого α -ТКФ и исследуемых показателей нами были получены неоднозначные молекулярные взаимосвязи, доказывающие, что этот витамин у детей коренного и пришлого населения имеет различные метаболические проявления по отношению к мембранным фосфолипидам и интегральным белкам (рис. 1). Так, у детей пришлого населения α -ТКФ в большей степени проявлял свои липидрастворимые качества. Это выразилось в наличии прямых корреляционных взаимосвязей с показателями, отражающими функциональное состояние липидной структуры, причем как гидрофильного (подвижности поверхностного слоя фосфолипидов в месте его контакта с белком) ($r=0,3909$, $p=0,0030$, так и гидрофобного отделов фосфолипидов (текучести) (ТЕК) ($r=0,4346$, $p=0,0146$), а так же их соотношения коэффициента асимметрии текучестей (КАТ) ($r=0,5293$, $p=0,0022$) (рис.1,а). Наличие прямой корреляционной взаимосвязи данного показателя у детей пришлого населения Эвенкии с интегральным коэффициентом, характеризующим работу фосфолипаз (ЛФХ/ФХ) [1] ($r=0,5282$, $p=0,0022$)

свидетельствует о том, что при усилении работы данного фермента (повышении величины интегрального коэффициента ЛФХ/ФХ) растет величина другого интегрального коэффициента, КАТ. Это свидетельствует об усилении степени липидного обмена, неотъемлемо связанного с повышением перекисного окисления липидов (ПОЛ). Поэтому повышение данного показателя (КАТ) у детей пришлого населения, являясь адаптивным свойством, при неблагоприятных условиях может быть признаком, отражающим дестабилизационные процессы в эритроцитарных мембранах.

На представленной схеме (рис. 1,а), характеризующей корреляционные взаимосвязи хорошо видно, что α -ТКФ опосредованно через показатель КАТ связан с работой фосфолипаз. В случае повышения в ЭМ липидрастворимого α -ТКФ у детей пришлого населения могут провоцироваться дестабилизационные процессы.

Совершенно иная картина молекулярных взаимодействий наблюдается у детей эвенков. Следует отметить, что в их ЭМ каких либо взаимосвязей α -ТКФ с показателями фосфолипидов, отражающих как их количественное, так и функциональное состояние, не выявлено. По нашему мнению это свидетельствует о метаболических преобразованиях в структуре ЭМ и в самом витамине (α -ТКФ), в результате которых данный витамин, по всей видимости, получил новые качества. На представленной схеме (рис.1,б) отчетливо видно, что модифицированная форма альфа-токоферола имела слабо выраженное прямое влияние на изменение показателя величины (ВПМТ) ($r=0,3834$,

$p=0,0060$) у детей эвенков. При этом необходимо отметить, что по нашему наблюдению выше названный показатель отражает чувствительность молекул интегральных белков на изменение внешних факторов [5]. Однако другие исследователи, имея дело с патологическими изменениями в клетках крови (лимфоцитов) интерпретировали данный факт (повышение подвижности гидрофобной части молекул триптофанилов) как дестабилизационный, характеризующий повышение окислительных процессов [2]. Учитывая выше изложенное сравнительное снижение данного показателя у детей эвенков, по всей видимости, свидетельствует о более устойчивой к внешним факторам садаптированной работе ферментов. Об этом же можно судить по другой корреляции показателя ВПМТ с показателем текучести, отражающим состояние общего билипидного слоя. Обратное направление данного молекулярного взаимодействия ($r=-0,4204$, $p=0,0015$) (рис.1,б) подтверждает, что повышение величины показателя ВПМТ может способствовать снижению степени текучести ЭМ, что является неблагоприятным признаком. В то же самое время выше названная взаимосвязь характеризует сравнительное снижение молекулярной подвижности в гидрофобной зоне триптофанилов ЭМ (ВПМТ) у детей эвенков как позитивное. В итоге на представленной схеме (1,б) видно, что наличие прямой корреляционной взаимосвязи α -ТКФ с показателем ВПМТ указывает на то, что повышение модифицированной формы данного витамина (α -ТКФ) в ЭМ может инициировать дестабилизационные изменения. Данный факт также имеет корреляционное подтверждение в виде выявленной прямой взаимосвязи величины показателя ВПМТ с уровнем легкоокисляемых фосфолипидов (ЛОФЛ) ($r=0,3049$, $p=0,0280$). Несмотря на отсутствие взаимосвязей с отдельными фракциями ЛОФЛ (ФЭА+ФС+ФИ) и слабую выраженность степени взаимодействия данная корреляция показывает, во-первых, качественные характеристики этих фосфолипидов (накопление окисленных форм), во-вторых, «виновника» в этом. На схеме (рис.1,б) предоставленный факт (изменение качественных характеристик ЛОФЛ) обуславливается, по всей вероятности так же α -ТКФ, но его модифицированная форма оказывает воздействие не на углеводородную гидрофобную зону ЛОФЛ мембран эритроцитов, а на гидрофильную область «головки» фосфолипидов. Подтверждением этому служит выявленная корреляционная взаимосвязь α -ТКФ, с ЛОФЛ через посредничество с показателем величины

ВПМТ, которая характеризует степень молекулярной подвижности в гидрофобной зоне интегральных белков ЭМ, в которой находятся гидрофильные «головки» их фосфолипидов, являющиеся активаторами работы ферментов или запускающими при неблагоприятных условиях дестабилизационные процессы [1].

Заключение

Проведенное нами комплексное исследование эритроцитарных мембран (ЭМ) у детей коренного и пришлого населения школьного возраста показало, что α -ТКФ имеет различные метаболические проявления по отношению к фосфолипидам и интегральным белкам у детей коренного и пришлого населения. Это, по всей вероятности, обусловлено специфическими стойкими перестройками гормонально-метаболических параметров организма ребенка, эвенков, отражающими воздействие экстремальных факторов Севера. У детей же пришлого населения мы имеем дело с метаболическими проявлениями α -ТКФ, характерными для средних широт, основное различие которых заключается в участии в ключевых антиокислительных процессах их ЭМ в большей степени жирорастворимой формы α -ТКФ. Этот витамин имеет взаимодействие с углеводородной зоной ЛОФЛ и, следовательно, влияет на их функциональные характеристики в виде подвижности как общего билипидного слоя (гидрофобного) так и поверхностного (гидрофильного). В целом α -ТКФ участвует в регуляции липидного обмена в виде воздействия на работу фосфолипаз, что сопоставимо с литературными данными [1]. Хотя эта взаимосвязь α -ТКФ с показателем, характеризующим работу фосфолипаз (ЛФХ/ФХ) выявлена опосредованно через показатель величины интегрального коэффициента КАТ она имеет одно и тоже прямое направление, которое свидетельствует, что повышение в эритроцитарных мембранах жирорастворимого α -ТКФ при неблагоприятных условиях может вызывать дестабилизационные процессы.

В ЭМ детей коренного населения наблюдается отсутствие молекулярных взаимодействий количественного показателя альфа-токоферола с фосфолипидами, причем, как с их количественным содержанием, так и функциональными характеристиками (физико-химическими свойствами) характеризующих функциональную активность углеводородной части фосфолипидов). Предоставленный факт свидетельствует о метаболических преобразованиях данного витамина, в результате которых большая часть α -ТКФ получила новые био-

химические свойства, изменившие его локализацию в ЭМ. Полученные новые качества позволило модифицированному α -ТКФ в структуре ЭМ у детей эвенков осуществлять более тонкую регуляцию на молекулярном уровне (гидрофобной зоны триптофанилов), что является как первичной реакцией фермента в ответ на воздействие рецепторов, так и пусковым дестабилизирующим механизмом в реализации основных эффектов внешнего воздействия.

Таким образом, выявлено, что в экстремальных условиях Севера у детей школьного возраста пришлого населения несбалансированный рост жирорастворимой формы альфа-токоферола в структуре эритроцитарных мембран может спровоцировать дестабилизационные процессы. У детей коренного населения модифицированная форма α -ТКФ также может способствовать дестабилизационным процессам, но они будут менее выражены, что обусловлено неоднозначной биохимической природой α -ТКФ.

Список литературы

1. Болдырев А.А., Кяйвярайнен 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. – 227 с.
3. Капралов, А.А., Петрова Г.В., Донченко Г.В. Физико-химические свойства и биологическая роль альфа-токоферолсвязывающих белков // Усп. совр. биологии. – 1993. – Т.113. – Вып. 3. – С. 313-326.
4. Манчук В. Т., Надточий Л.А. Состояние здоровья коренных и малочисленных народов Севера, Сибири и Дальнего Востока, особенности формирования патологии. – Красноярск.: 2012 – 338 с.
5. Панин Л.Е. Элементный состав волос у детей коренной национальности (долган), проживающих в регионе Таймырского Севера (Хатанга) Л.Е. Панин, Е.И. Прахин, С.Ю. Терешенко, В.П. Терешенко, Т.А. Колодяжная // Матер. 13 Междунар. конгресса по приполярной медицине (Новосибирск, 12-16 июня 2006 г.). – Новосибирск: ООО «РИЦ», 2006. – С.202 (abstr. 244).
6. Патент РФ № 2234088. Колодяжная Т.А., Терешенко В.П. Способ определения стабильности клеточных мембран эритроцитов // Заявка № 2002116193/15; заявл. 19.06.2002; опубл. 10.08.2004. Бюл. № 22.
7. Пуликов А.С., Москаленко О.Л., Зайцева О.И. Психо-эмоциональная характеристика молодого поколения с различным адаптационным потенциалом // Современные исследования социальных проблем (электронный научный журнал). – 2013. № 6 (26). – С. 21.
8. Спиричев, В.Б., Конь И.Я. Биологическая роль жирорастворимых витаминов (обзор литературы) // ВИНТИ. Итоги науки и техники. Серия физиология человека и животных. – 1989. – Т. 37. – 223 с.
9. Ростовцев В.Н., Резник Г.Е. Количественное определение липидных фракций плазмы крови // Лабораторное дело. – 1982. – № 4. – С. – 26-29.
10. Черняускене, Р.Ч., Варнекявичене З.З., Грибаускас П.С. Одновременное флуориметрическое определение концентрации витаминов Е и А в сыворотке крови // Лабораторное дело. – 1884. – № 6. – С. 362-365.