

Т.А. Колодяжная, О.И. Зайцева, В.Т. Манчук, Г.Н. Казакова

## МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЖИРОРАСТВОРИМЫХ ВИТАМИНОВ (РЕТИНОЛА И АЛЬФА-ТОКОФЕРОЛА) С ПАРАМЕТРАМИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ЭРИТРОЦИТАРНЫХ МЕМБРАН У ДЕТЕЙ ЭВЕНКИИ

УДК 577.161:611-018.51:576.8.094.7  
(571.512)

У здоровых детей коренного и пришлого населения Эвенкии от 1 года до 3 лет проведено исследование структурно-функциональных свойств мембран эритроцитов с определением липидного спектра, уровня жирорастворимых витаминов (ретинола и альфа-токоферола). Установлены физико-химические параметры эритроцитарных мембран: показатели подвижностей молекул в поверхностной и в углеводородной областях, уровень структурированной воды и степень оптической лабильности. Методом парных корреляционных взаимосвязей выявлено, что жирорастворимые витамины (ретинол и альфа-токоферол) проявляют неоднозначные функциональные свойства по отношению к молекулярной структуре эритроцитарных мембран у детей различной этнической принадлежности.

**Ключевые слова:** Эвенкия, дети, эритроцитарные мембраны, жирорастворимые витамины.

In healthy children of the indigenous and non-indigenous population of Evenkia from 1 to 3 years the structural and functional properties of erythrocyte membranes with definition of lipid profile, levels of lipo-soluble vitamins (retinol and alpha-tocopherol) were studied. Physical and chemical properties of erythrocyte membranes: indices of mobility of molecules in the surface and in the hydrocarbon regions, the level of structured water and the degree of optical lability were established. By the method of pair correlation relationships it was found that liposoluble vitamins (retinol and alpha-tocopherol) displayed ambiguous functional properties to the molecular structure of erythrocyte membranes in children of different ethnicity.

**Keywords:** Evenkia, children, erythrocytic membranes, liposoluble vitamins.

**Введение.** Неблагоприятные экологические условия Азиатского Севера способствуют значительному росту различных отклонений в состоянии здоровья детей некоренного населения до 3 лет [5], что может отражаться на структурно-функциональных свойствах их биомембран, первичного звена адаптационных изменений [1]. В этих экстремальных условиях повышенной роли липидного обмена в энергообеспечении организма ребенка особенно важными являются жирорастворимые витамины (ретинолы и токоферолы) [7]. Они являются неотъемлемой частью антиоксидантной системы неферментативной природы. От них во многом зависит целостность структуры биомембран и их функциональная активность [2, 10]. Являясь структурными компонентами биомембран, ретинолы и токоферолы функционально дополняют друг друга и находятся в тесной взаимосвязи. Причем она настолько сильна, что витамин «А» в отсутствие токоферола окисляется и быстро разрушается [10]. Известно, что ретинол в биомембранах связан с поверхностно

локализованными фосфолипидами и с белково-липидными комплексами. Соответственно, они оказывают влияние на их метаболизм [10].

Токоферолы локализируются в гидрофобных участках фосфолипидов, поддерживают необходимую плотность их упаковки, ограничивая доступ кислорода к ацильным цепям. Следует подчеркнуть, что вышеперечисленные функции токоферол способен выполнять только в биологически активном состоянии. Это состояние обеспечивается наличием в системе аскорбиновой кислоты, которая поддерживает его стационарный уровень, предотвращая образование токсического токоферилхинона [10].

Реальные метаболические проявления жирорастворимых витаминов (токоферолов и ретинолов) в структуре биомембран невозможно определить без учета состояния их структуры и функции. Изучение липидной структуры мембран эритроцитов их биофизических свойств, включая определение уровней внутримембранных жирорастворимых витаминов (альфа-токоферола и ретинола) и структурированной мембраносвязанной воды, позволит выявить их антиокислительные или проокислительные свойства. Отсутствие подобных исследований определили актуальность данного изучения проблемы. Универсальной моделью для изучения состояния клеточных мембран является эритроцит [6].

**Цель исследования:** изучить молекулярные взаимодействия ретинола и альфа-токоферола с параметрами липидного обмена и физико-химического состояния эритроцитарных мембран у детей от 1 года до 3 лет различной этнической принадлежности, проживающих в Эвенкии.

**Материалы и методы исследования.** Были обследованы практически здоровые дети коренного (18 чел.) и пришлого (18 чел.) населения в возрасте от 1 года до 3 лет, проживающие в Эвенкии в пос. Тура. Всего обследовано 36 здоровых детей. Исследование проводилось на базе детских садов поселка.

В мембранах эритроцитов определяли: липидный спектр методом тонкослойной хроматографии [9], уровень жирорастворимых витаминов альфа-токоферола и ретинола – флуориметрическим методом [11], физико-химические свойства – методом измерения флуоресценции спектров взаимодействия биомембран с зондами [3]. Данные измерения производились на спектрофлуориметре MPF – 4 фирмы «Хитахи» (Япония) в кварцевой ультрамикроскопической ячейке 0,1 x 0,1 см при ширине щели монохроматоров возбуждения и испускания 8 нм.

Исследованы следующие параметры физико-химического состояния эритроцитарных мембран: степень флуоресценции связанного с поверхностным слоем мембран отрица-

НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН: КОЛОДЯЖНАЯ Татьяна Александровна – к.б.н., вед.н.с., ЗАЙЦЕВА Ольга Исаевна – д.м.н., вед.н.с., МАНЧУК Валерий Тимофеевич – д.м.н., проф., засл. деятель науки РФ, член-корр. РАМН, директор, КАЗАКОВА Галина Николаевна – к.м.н., доцент Красноярского ГМИ, врач аллерголог-иммунолог.

тельно заряженного зонда АНС (1-анилинонафталин-8-сульфонат) [3], характеризующего суммарный заряд поверхностного слоя эритроцитарных мембран; показатели, отражающие микровязкостные свойства эритроцитарных мембран глубокого (текучесть гидрофобного слоя эритроцитарных мембран по отношению ксимеры/мономеров пирена) и поверхностного (подвижность зоны белок-липидного взаимодействия по обратной величине анизотропии зонда 1-анилинонафталин-8 сульфат) слоев эритроцитарных мембран. Наряду с этим была дана оценка степени оптической лабильности [12] и асимметрии текучести эритроцитарных мембран. С помощью флуоресцентного зонда 4-диметиламинохалкона (ДМХ) выявлена степень гидратированности мембран эритроцитов [3] по обратной величине флуоресценции зонда.

Математическую обработку полученных результатов проводили с использованием стандартного пакета статистических программ STATISTICA, ver. 6.0 [8]. Для обеспечения единства методологии применяли непараметрические методы. Достоверность различий между группами при сравнении двух несвязанных выборок устанавливали с использованием непараметрического критерия Манн-Уитни (M – W). Результаты исследования количественных параметров в группах сравнения представлены в виде Me – медиана, 25-75% – процентиля. Изменения считались статистически значимыми при уровне значимости  $P < 0,05$ . Анализ зависимости признаков проводился с помощью расчета и оценки значимости непараметрического коэффициента ранговой корреляции Спирмена.

**Результаты и обсуждение.** Результаты исследований показали, что в содержании альфа-токоферола у детей возрастной группы от 1 года до 3 лет существенных этнических различий не обнаружено, тогда как концентрация ретинола у детей эвенков была ниже по сравнению с детьми пришлового населения на 26,5 % ( $p=0,0088$ ) (таблица). Вместе с тем показатели липидов и фосфолипидов в структуре эритроцитарных мембран не имели выраженных этнических различий, за исключением незначительного повышения свободных жирных кислот (СЖК) в группе детей эвенков ( $p=0,0818$ ) и статистически значимого увеличения (на 12,3%) степени упорядоченности гидрофобной зоны фосфолипидных молекул (понижение показателя текучести) эритроцитарных мембран

( $p=0,0465$ ). Это способствовало изменению молекулярных взаимоотношений поверхностного и внутреннего слоев эритроцитарных мембран у детей эвенков. У них установлено повышение показателя степени асимметрии текучести поверхностного и глубокого слоя эритроцитарных мембран на 22,7% ( $p=0,0209$ ) по сравнению с детьми пришлового населения. Такое состояние плазматических мембран эритроцитов свидетельствует о более выраженных конформационных процессах в поверхностном белок-липидном слое плазмолеммы эритроцитов по отношению к гидрофобному слою их фосфолипидов. Данные трансформации, по нашему мнению, связаны с витамином «А», который способствует образованию положительных зарядов на белок-липидной поверхности эритроцитарных мембран. Об этом свидетельствует умеренная прямая корреляционная взаимосвязь между ретинолом и показателем степени связывания отрицательно заряженного зонда АНС ( $r=0,506$ ,  $p=0,0455$ ). Этот зонд имеет свойства связываться с положительно заряженными молекулами только в поверхностной области биомембран и отражает их количественное содержание в этой области.

Вместе с этим у ретинолов в эритроцитарных мембранах детей эвенков обнаружены антиокислительные функции. Об этом свидетельствует умеренная прямая корреляционная взаимосвязь вышеназванного витамина с общим количеством фосфолипидов ( $r=0,496$   $p=0,0598$ ). Тот факт, что рети-

нолы проявляют антиокислительные свойства по отношению к фосфолипидам, доказывает биологическую активность не только метаболитов ретинола, но и альфа-токоферола, который способствует их сохранению, находясь в биологически активном состоянии (восстановленном) [10]. О сохраняющих свойствах альфа-токоферола, но уже по отношению к ненасыщенным фосфолипидам эритроцитарных мембран, свидетельствует прямая корреляционная взаимосвязь витамина Е с показателем степени текучести углеводородного слоя их фосфолипидов ( $r=0,552$ ,  $p=0,0267$ ).

У детей пришлового населения Эвенкии корреляционные взаимосвязи жирорастворимых витаминов с показателями функциональных свойств эритроцитарных мембран свидетельствуют о совершенно иных метаболических проявлениях этих витаминов. У них практически отсутствуют взаимосвязи, указывающие на антиокислительные функции изучаемых витаминов. Вместе с тем установлена достаточно тесная прямая взаимосвязь уровня содержания мембранного альфа-токоферола с показателем оптической лабильности ( $r=0,712$ ,  $p=0,0020$ ). Данный показатель характеризует соотношение степеней поляризации и фоновой деполяризации биомембраны [12]. Корреляционная взаимосвязь в этом случае может отражать влияние уровня витамина «Е» на смещение баланса потенциалов и, следовательно, на работу ацетилхолиновых рецепторов, которые одно-

**Показатели содержания ретинола, альфа-токоферола, биохимических и физико-химических параметров у здоровых детей населения Эвенкии (Me 2575‰)**

Анализируемый показатель	Этническая принадлежность		Степень достоверности различий
	эвенки n=18	русские n=18	
Ретинол, мкмоль/л	0,4300 (0,4000-0,5400)	0,5849 (0,4900-0,6900)	$p=0,0087$
Альфа-токоферол, мкмоль/л	7,1300 (5,8400-9,8000)	8,4250 (5,7550-10,010)	—
СЖК, ммоль/л	0,832 (0,493-1,115)	0,582 (0,427-0,897)	$p=0,0818$
Текучесть глубокого слоя мембран, отн.ед.	0,371 (0,318-0,390)	0,423 (0,359-0,488)	$p=0,0465$
Подвижность поверхностного сл. (1/Анизотр АНС), отн. ед.	2,375 (2,130-2,488)	2,220 (2,045-2,421)	—
Степень асимметрии текучести, отн.ед.	6,444 (5,943-7,030)	4,980 (4,115-6,338)	$p=0,0209$
Флуоресценция АНС, ед. фл.	30,850 (29,000-33,850)	32,000 (30,600- 34,300)	—
Уровень структурированной воды (498) (1/Фл. ДМХ), отн.ед.	0,020 (0,018-0,023)	0,0214 (0,019-0,024)	—
Оптическая лабильность, (P/Dp), отн.ед.	7,190 (6,545-7,475)	7,060 (6,460-7,410)	—

временно являются и ионными каналами, регулирующими проницаемость мембраны для ионов натрия и калия [2]. В этой связи прослеживается и прямая корреляционная взаимосвязь показателя коэффициента оптической лабильности с уровнем мембраносвязанной структурированной воды (обратная величина флуоресценции ДМХ) ( $r=0,508$ ,  $p=0,0314$ ). Известно, что перенос ионов осуществляется в растворенном в воде состоянии [2].

**Заключение.** Употребление в пищу детьми коренного населения уже с раннего возраста продуктов животного происхождения, содержащих высокий уровень жирорастворимых витаминов ретинолов и токоферолов, выработало адаптивные приспособления, особенно по отношению к ретинолу. Известно, что этот витамин в его жирорастворимой форме, являясь высоконенасыщенным соединением, при даже слабо выраженной несбалансированности в антиокислительной системе может стать прооксидантом [10]. Поэтому полученное нами значительное снижение уровня ретинола в структуре эритроцитарных мембран расценивается как адаптивная активация клеточного метаболизма, влекущая за собой усиление расхода этого витамина у детей эвенков.

Выявленные антиокислительные свойства витаминов «А» и «Е» в структуре эритроцитарных мембран доказывают, что эти витамины и их метаболиты у детей эвенков находятся в биологически активном состоянии. Его достаточно для поддержания антиоксидантной системы красной клетки крови.

У детей пришлового населения повышенный уровень ретинола в структуре плазмолеммы эритроцитов не обеспечивает его достаточной биологической активности. У альфа-токоферола при отсутствии выраженных антиокислительных признаков по отношению к мембранным фосфолипидам и ретинолу выявлена связь, доказывающая о его сохраняющей функции по отношению к интегральным белкам, обеспечивающим калийнатриевый обмен. Отсутствие выраженных признаков, отражающих антиокислительную функцию жирорастворимых витаминов у детей пришлового населения, свидетельствует о несбалансированности не только вышеназванных витаминов (ретинола и токоферола), но и белков, жиров и других сопутствующих компонентов, обеспечивающих метаболические преобразования этих витаминов, благодаря чему они получают новые

гидрофильные свойства [4]. По нашему мнению, это может быть достигнуто только при употреблении натуральной, адаптированной к условиям Севера пищи или биологически активной добавки, максимально приближенной к пище (рыбий жир северных пород рыб, морские водоросли и т.п.).

Таким образом, изучение взаимосвязей жирорастворимых витаминов (ретинола и альфа-токоферола) эритроцитарных мембран с их липидной структурой и физико-химическими характеристиками повышает информативность физиологической значимости и обеспеченности данными витаминами детского организма. Эффективность процессов функционирования плазмолеммы эритроцитов обусловлена не столько количеством этих витаминов в структуре мембран, сколько их качественными характеристиками, то есть биологической активностью, что определено сложными взаимоотношениями, которые формируют физиологический уровень оптимальной организации поддержания прооксидантно-антиоксидантного равновесия организма ребенка.

## Литература

- Бичкаева Ф.А. Физиологические особенности липидного, углеводного и белкового обмена у жителей южных районов Архангельской области / Ф. А. Бичкаева, Е. Р. Бойко, О. С. Власова, Л. П. Жилина // Экология человека. – 2006. – №3. – С. 7-11.
- Bichkaeva F.A. Physiological characteristics of lipid, carbohydrate and protein metabolism in inhabitants of the southern district of the Arkhangelsk Region / F.A. Bichkaeva, E.R. Boyko, O. S. Vlasova, L.P. Zhilina / Human Ecology. – 2006. – № 3. – P.7-11.
- Болдырев А.А. Биомембранология: учебное пособие / А.А. Болдырев, Е.И. Кяйвяряйнен, В.А. Илюха. – Петрозаводск: Изд-во КарНЦ РАН. – 2006. – 226 с.
- Boldyrev A.A. Biomembranology: textbook / A.A. Boldyrev, E.I. Kaivaryaynen, V.A. Elyuha. – Petrozavodsk: Pub. House Kar SC RAS. – 2006. – 226 p.
- Владимиров Ю.А. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран / Ю.А. Владимиров, Г.Е. Добрецов. – М.: Наука, 1980. – 320 с.
- Vladimirov Ju.A. Fluorescent probes in the study of biological membranes / Ju.A. Vladimirov, G.E. Dobretsov. – M.: Nauka. – 1980. – 320 p.
- Капралов А.А. Физико-химические свойства и биологическая роль альфа-токоферолсвязывающих белков / А.А. Капралов, Г.В. Петрова, Г.В. Донченко // Усп. совр. биологии. – 1993. – Т.113, вып.3. – С.313-326.
- Kapralov A.A. Physico-chemical properties and biological role of alpha-tocopherol binding proteins / A.A. Kapralov, G.V. Petrova, G.V. Donchenko // Usp. sovr. biol. – 1993. – V. 113. – Ed. 3. – p. 313-326.
- Манчук В.Т. Состояние и формирование здоровья малочисленных народов Севера и Сибири / В.Т. Манчук, Л.А. Надточий. – Красноярск, 2008. – 179 с.
- Manchuk V.T. State and the formation of the health of small in numbers people of the North and Siberia / V.T. Manchuk, L.A. Nadtochiy. – Krasnoyarsk, 2008. – 179 p.
- Новицкий В.В. Физиология и патофизиология эритроцита / В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева, Е. А. Степовая. – Томск: изд-во Том. ун-та, 2004. – 202 с.
- Novitskiy V.V. Physiology and pathophysiology of the erythrocyte / V. V. Novitskiy, N. V. Ryazantseva, E.A. Stepovaya. – Tomsk: Pub. Tom. University. – 2004. – 202 p.
- Прахин Е.И. Медико-социальные аспекты роста и развития детей на Севере / Е.И. Прахин // Материалы Итоговой научной конференции НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН за 2002 год. Вып 2. «Вопросы сохранения и развития здоровья населения Севера и Сибири» 1-2 октября 2003, Красноярск. – С. 118-122.
- Prakhin E. I. Medical and social aspects of child growth and development in the North / E. I. Prakhin // Materials of the Final Scientific Conference Medical Research Institute for Northern Problems of Medical Sciences. – 2002. Vol. 2 "Issues of preservation and development of public health of the North and Siberia" October 1-2, 2003, Krasnoyarsk. – p. 118-122.
- Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ «STATISTICA» / О. Ю. Реброва. – М.: Медиа Сфера, 2002. – 305 с.
- Rebrova O. Ju. Statistical analysis of medical data. Note the application package «STATISTICA» / O. Ju. Rebrova. – M.: Media Sphere. – 2002. – 305 p.
- Ростовцев В.Н. Количественное определение липидных фракций плазмы крови / В.Н. Ростовцев, Г.Е. Резник // Лабораторное дело. – 1982. – № 4. – С. 26-29.
- Rostovtsev V.N. Quantitative determination of lipid fractions of blood plasma / V.N. Rostovtsev, G. E. Reznik // Lab. delo. – 1982. – № 4. – P. 26-29.
- Спиричев В.Б. Биологическая роль жирорастворимых витаминов (обзор литературы) / В.Б. Спиричев, И.Я. Конь // ВИНТИ. Итоги науки и техники. Серия физиология человека и животных. – 1989. – Т. 37. – 223 с.
- Spirichev V.B. Biological role of fat-soluble vitamins (review) / V.B. Spirichev, I.Y. Kon // VINITI. The Results of science and technology. A series on human and animal physiology. – 1989. – T. 37. – 223 p.
- Черняускене Р.Ч. Одновременное флуориметрическое определение концентрации витаминов «Е» и «А» в сыворотке крови / Р.Ч. Черняускене, З.З. Варнеквичене, П.С. Грибаускас // Лабораторное дело. – 1984. – № 6. – С. 362-365.
- Chernyauksene R. Ch. Simultaneous fluorimetric determination of the concentration of vitamin "E" and "A" in the blood serum / R.Ch. Chernyauksene, Z.Z. Varnekavichene, P.S. Grybauskas / Lab. delo. – 1984. – № 6. – 362-365 p.
- Якубова Р.Р. Способ оценки дестабилизации мембран эритроцитов / Р.Р. Якубова, А.В. Мурын // Лабораторное дело. – 1990. – № 5. – С. 26-29.
- Yakubova R.R. The method for evaluating the destabilization of membranes of the erythrocytes / R.R. Yakubova, A.V. Murin / Lab. delo. – 1990. – № 5. – p. 26-29.