УДК 611-018.51:616.-839-053.2

О.И. Зайцева, В.П. Терещенко, Е.И. Прахин, Л.С. Эверт, М.В. Макарова, Е.И. Нягашкина, С.В. Бороздун

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ У ДЕТЕЙ С СИНДРОМОМ ВЕГЕТАТИВНОЙ ДИСФУНКЦИИ

ГУ НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН (Красноярск)

Исследовали структурно-функциональное состояние мембран эритроцитов у детей с различными клиническими формами синдрома вегетативной дисфункции методами тонкослойной хроматографии и флуоресцентного зондирования с использованием зондов пирена и 1-анилино-нафталин-8-сульфонат. Показано, что у всех детей с синдромом вегетативной дисфункции наряду с универсальными признаками дестабилизации клеточных мембран (снижение общих фосфолипидов и относительное повышение холестерина, увеличение лизофосфатидилхолина и уменьшение фосфатидилэтаноламина) прослеживались изменения в содержании и соотношении отдельных классов нейтральных липидов и фосфолипидов, обусловленные клинической формой синдрома. Выявленные изменения в состоянии липидного бислоя мембран эритроцитов при формировании синдрома вегетативной дисфункции могут оказывать влияние на транспорт ионов, латеральную диффузию рецепторов, на ферментативную активность белков, приводя к изменению функциональных свойств клеток красной крови и, в конечном итоге, могут способствовать реализации патофизиологической симптоматики у этих детей.

Ключевые слова: *дети, синдром вегетативной дисфункции, эритроцит, липиды*

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF THE MEMBRANES OF THE ERYTHROCYTES IN THE CHILDREN WITH THE SYNDROME OF THE VEGETATIVE DYSFUNCTION

O.I. Zaitseva, V.P. Tereshchenko, E.I. Prakhin, L.S. Evert, M.V. Makarova, E.I. Nyagashkina, S.V. Borozdun

State Medical Research Institute for Northern Problems of Russian Academy of Medical Sciences, Krasnoyarsk

The structural and functional condition of the membranes of the erythrocytes of the children with the syndrome of the vegetative dysfunction by the methods of the thin-layer chromotography and fluorescent spectroscopy with the using of the probes of piren and 1-anilino-naphtalene -8-sylfonate was researched. It was shown that in all children with the syndrome of the vegetative dysfunction with the universal signs of the destabilization of the cell membranes (fall of the general phospholipids and increasing of the cholesterol, increasing of the lysophosphatidilcholine and falling phosphatydilethanolamine) the changes in the proportions of the some neutral lipids and phospholipids, given with the clinical form of the syndrome were observed. The discovered changes in the condition of the lipid two-layer of the membranes of the erythrocytes in the forming of the syndrome of the vegetative dysfunction can influence on the transport of the ions, lateral diffusion of the receptors, ferment activity of the proteins, changing the functional properties of the erythrocytes and, in the end, they can realize pathophysiological symptomatic of the children.

Key words: *children, syndrome of the vegetative dysfunction, erythrocyte, lipids*

К настоящему времени установлена ведущая роль биомембран в формировании различных заболеваний, в основе которых лежит дизавтономная регуляция функций [1, 3, 12]. Общность строения плазматических мембран различных органов и тканей позволяет думать, что процессы, происходящие в эритроцитарной мембране, могут отражать изменения в мембранах других органов и тканей, вследствие чего представляется возможным использовать клетки крови — эритроциты для изучения процессов, происходящих в организме в целом. Изменение пластичности мембран эритроцитов, обусловленное его липидной структурой, отражает общее повреждение биомембран организма [6, 9].

В связи с этим целью настоящего исследования явилось изучение структуры и свойств липидного бислоя мембран эритроцитов у детей с синдромом вегетативной дисфункции.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Нами обследовано 232 ребенка 7—15 лет (102 мальчика и 130 девочек), проживающих в г. Красноярске. Из них 199 детей с различными клиническими формами синдрома вегетативной дисфункции (СВД): 100 человек со смешанной формой СВД, 56 — с симпатикотонической формой СВД и 43 — с ваготонической формой СВД. Группу контроля составили 33 практически здоровых школьника.

Диагноз устанавливался на основании подробных анамнестических данных, антропометрии, совокупности клинических признаков, а также данных кардиоинтервалографии с клиноортостатической пробой. Синдром вегетативной дисфункции верифицирован по таблицам А.М. Вейна, адаптированным для детского возраста Н.А. Белоконь [5].

Изучение липидной структуры мембран эритроцитов проводили при помощи метода тонкослой-

ной хроматографии. Выделение мембран эритроцитов осуществляли по методу Доджа [14]. Экстракцию липидов проводили по методу, предложенному Н.В. Ростовцевым и Г.Е. Резником с некоторыми модификациями [8]. Для экстракции нейтральных липидов готовили смесь растворителей – гексан, диэтиловый эфир, ледяная уксусная кислота в соотношении 90 : 60 : 0,6. Для получения фракций фосфолипидов использовали элюэнтную смесь – хлороформ, метанол, дистиллированная вода в соотношении 65 : 25 : 4. Липидный экстракт наносили на силуфолевые пластинки фирмы «Cavaler». Для проявления пятен липидов пластины опрыскивали 5% раствором фосфорномолибденовой кислоты на этаноле. Хроматографию проявленных пятен проводили на денситометре «Хромоскан 200». Расчет количественного содержания липидов вели по площадям пиков пятен с определением процента каждого пятна липидов от общего числа нейтральных липидов и фосфолипидов. Определяли следующие фракции нейтральных липидов – общие фосфолипиды (ОФЛ), свободный холестерол (СХС), свободные жирные кислоты (СЖК), триглицериды (ТГ); фракции общих фосфолипидов – лизофосфатидилхолин (ЛФХ), сфингомиелин (СМ), фосфатидилсерин + фосфатидилинозитол (ФС + ФИ), фосфатидилхолин (ФХ), фосфатидилэтаноламин (ФЭА). Вычислялись интегральные коэффициенты: ОФЛ/СХС, СЖК/ТГ, ФЭА/ФХ и величина окисляемости липидов (ВОЛ), определяемая как отношение легкоокисляемых фосфолипидных фракций к трудноокисляемым (ФЭА + ФС + ФИ / ФХ + СМ).

Биофизические характеристики мембран эритроцитов изучали методом флуоресцентного зондирования на спектрофлюориметре MPF-4 марки «Hitachi», с определением текучести глубоких слоев мембран по флуоресценции зонда пирена и вязкости поверхностных структур по флуоресценции зонда 1-анилино-нафталин-8-сульфонат (АНС) по методу, предложенному Ю.А. Владимировым и Г.Е. Добрецовым [4]. Показатели оценивались в относительных единицах. Вычислялись показатели: текучесть поверхностных слоев мембран-1 / показатель вязкости поверхностных структур и коэффициент асимметрии текучести (КАТ), определяемый как отношение показателя текучести глубоких слоев мембран к показателю текучести поверхностных слоев мембран.

Цифровой материал обработан стандартным статистическим пакетом программ STATISTICA 5,5 [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ структурных липидов эритроцитарных мембран у детей с СВД в сопоставлении с детьми контрольной группы выявил как общие отличия, характерные в целом для всех детей с СВД, так и специфические, обусловленные клинической формой СВД. Результаты исследований представлены на рисунке 1. Характеристика спектра нейтральных липидов мембран эритроцитов у детей г. Красноярска с различными клиническими формами синдрома вегетативной дисфункции.

Для всех детей с СВД независимо от клинической формы характерным было в спектре нейтральных липидов статистически значимое снижение ОФЛ ($P < 0{,}001$) и увеличение содержания СХС ($P < 0{,}01$), за исключением детей с симпатикотонической формой СВД. Такое перераспределение в содержании основных структурных липидов сказывалось на статистически значимом понижении отношения ОФЛ/СХС у всех детей с СВД (со смешанной формой СВД 0,48±0,01 отн.ед, с ваготонической формой СВД 0,43±0,02 отн.ед, с симпатикотонической формой СВД 0,45 ± 0,02 отн. ед. против аналогичных показателей у детей контрольной группы 0,61 ± 0,01 отн. ед, $P < 0{,}001$). Эти данные

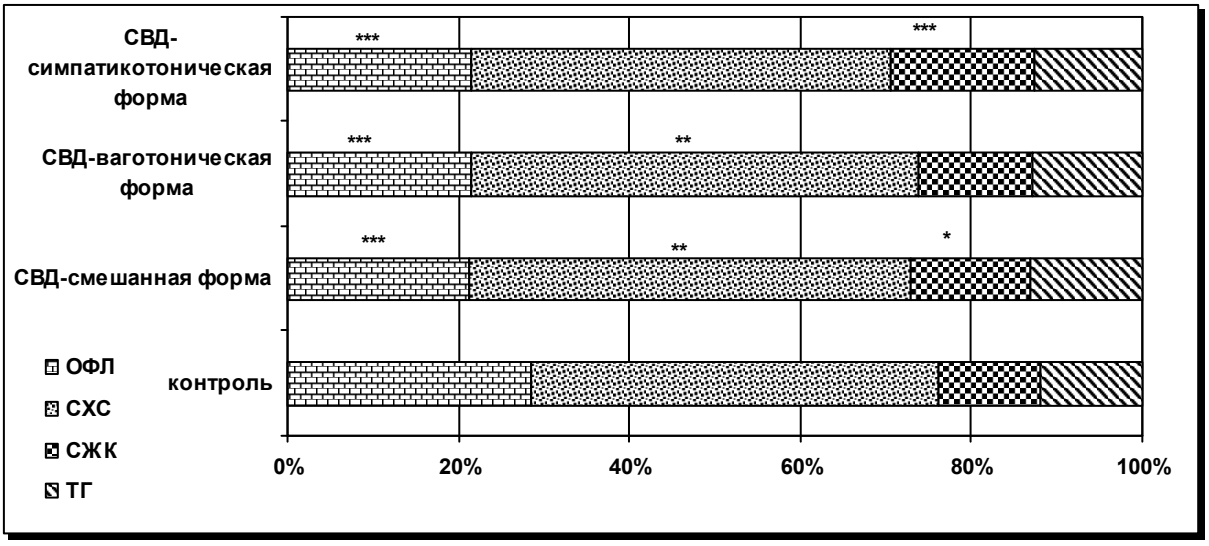

Рис. 1. Характеристика спектра нейтральных липидов мембран эритроцитов у детей г. Красноярска с различными клиническими формами синдрома вегетативной дисфункции. **Примечание:** статистическая значимость различий с контролем: * – $P < 0{,}05$, ** – $P < 0{,}01$; *** – $P < 0{,}001$.

свидетельствовали о существенном обеднении мембраны за счет снижения фракции суммарных фосфолипидов. Обогащение мембраны СХС носило, скорее всего, компенсаторный характер и было направлено на ее стабилизацию.

Для детей с симпатикотонической формой СВД характерны дестабилизационные изменения в структуре нейтральных липидов, сопровождавшиеся статистически значимым процентным увеличением содержания СЖК ($P < 0{,}001$) и, соответственно, соотношения СЖК/ТГ (1,62 ± 0,12 отн. ед. при 1,13 ± 0,07 отн. ед. у детей контрольной группы, $P < 0{,}01$), что говорило о превалировании фосфолиполиза и являлось проявлением адренергического эффекта на уровне клеточных мембран. У школьников со смешанной формой СВД регистрировалось статистически значимое процентное увеличение СЖК ($P < 0{,}05$).

Характеристика спектра фосфолипидов мембран эритроцитов у детей г. Красноярска с различными клиническими формами синдрома вегетативной дисфункции представлена рисунком 2.

В спектре мембранных фосфолипидов у школьников с СВД независимо от клинической формы наблюдалось статистически значимое увеличение мембранолитической фракции ЛФХ ($P < 0{,}001$) в сопоставлении с контролем, что косвенно указывало на активацию фосфолипазы А2 и процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ). Определявшая перегруппировка в структуре холинсодержащих фракций в сторону снижения функционально активного фосфолипида ФЭА ($P < 0{,}001$) и увеличения суммарной фракции ФИ + ФС ($P < 0{,}05$; $P < 0{,}01$) носила дизрегуляторный характер и, судя по данным литературы, могла запускать различные дестабилизирующие процессы [10, 11], а также обуславливала, вероятно, уменьшение суммарного количества фосфолипидов. Характерным для детей с ваготонической формой СВД был значительный рост суммарной легкоокисляемой фракции ФИ + ФС. Накопление же в мембране фосфолипида ФС являлось фактором, способным запускать аллергические реакции [13]. Данный признак может служить доказательством проявления активности парасимпатического отдела ВНС на уровне целого организма. Перераспределение в содержании структурных липидов обуславливало статистически значимое понижение индекса ФЭА/ФХ у всех детей с СВД независимо от клинической формы (у детей со смешанной формой СВД 0,99 ± 0,04 отн. ед., с ваготонической формой СВД 1,06 ± 0,09 отн. ед., с симпатикотонической формой СВД 0,91 ± 0,05 отн. ед., при 1,36 ± 0,06 отн. ед. у детей контрольной группы, $P < 0{,}001$) указывало на увеличение содержания мембраностабилизирующей фракции ФХ, достигавшей статистически значимого уровня в группе детей с симпатикотонической формой СВД ($P < 0{,}01$). У последних наблюдалось статистически значимое снижение величины индекса ВОЛ (0,86 ± 0,06 отн. ед. при 1,05 ± 0,03 отн. ед. у детей контрольной группы, $P < 0{,}05$).

Эти структурные преобразования, наиболее выраженные у детей с симпатикотонической формой СВД, носили, по всей видимости, компенсаторный характер. В группе детей со смешанной формой СВД и с ваготонической формой СВД компенсаторные механизмы стабилизационного характера не были выраженными. Структурные изменения в мембранах эритроцитов у детей со смешанной формой СВД занимали промежуточное положение между детьми с симпатикотонической формой СВД и ваготонической формой СВД по анализируемым показателям.

Известно, что структурные липиды мембран (преимущественно фосфолипиды и холестерин)

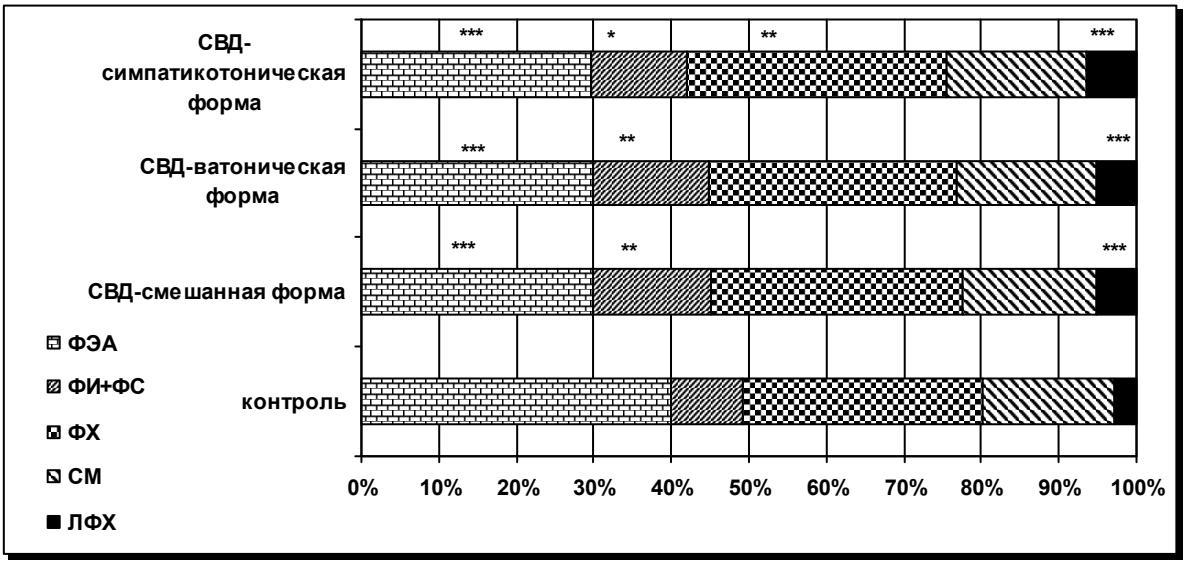

Рис. 2. Характеристика фосфолипидного спектра мембран эритроцитов у детей г. Красноярска с различными клиническими формами синдрома вегетативной дисфункции. **Примечание:** см. рис. 1.

Таблица 1

Биофизическая характеристика липидного бислоя мембран эритроцитов у детей г. Красноярска с различными клиническими формами синдрома вегетативной дисфункции, M ± m

Анализируемые показатели	Дети контрольной группы	Дети с СВД			*P* (между группами)
		смешанная форма	ваготоническая форма	симпатико-тоническая форма	
	n = 53 [1]	n = 100 [2]	n = 43 [3]	n = 56 [4]	
Текучесть поверхностных слоев мембраны (анизотропия АНС), отн. ед.	3,82 ± 0,08	3,48 ± 0,09	3,73 ± 0,14	3,11 ± 0,09	$P_{1-2} < 0,05$ $P_{1-4} < 0,001$
Текучесть глубоких слоев мембраны (эксимеризация пирена), отн. ед.	0,38 ± 0,01	0,36 ± 0,01	0,38 ± 0,01	0,31 ± 0,01	$P_{1-4} < 0,001$
КАТ, отн. ед.	10,55 ± 0,42	10,28 ± 0,41	10,21 ± 0,61	10,35 ± 0,41	

определяют текучесть их глубинных слоев. При этом текучесть глубинных слоев мембраны зависит от содержания ненасыщенных жирных кислот в фосфолипидах, концентрации двухвалентных неорганических катионов [2]. Результаты исследований представлены в таблице 1.

Параметры связывания зонда АНС с мембраной эритроцитов у детей со смешанной формой СВД и с симпатикотонической формой СВД статистически значимо отличались от средних величин данного показателя у детей контрольной группы ($P < 0,05$; $P < 0,01$), что указывало на дезорганизацию поверхностных слоев мембраны, являющихся зоной адсорбции флуоресцентного зонда АНС. Флуоресцентное зондирование эритроцитарной мембраны липотропным зондом пирен, диффундирующим в гидрофобном компартменте мембраны, выявило статистически значимое снижение средних значений показателя эксимеризации пирена в группе детей с симпатикотонической формой СВД ($P < 0,01$). Вероятно, снижение текучести глубоких слоев мембраны эритроцитов может быть следствием интенсификации процессов ПОЛ. Изменения величины КАТ у детей с СВД в сопоставлении с контролем не имели статистически значимых различий. При этом у детей с симпатикотонической формой СВД регистрировались положительные корреляционные связи между показателем текучести глубоких слоев мембраны и величиной соотношения СЖК/ТГ ($r = 0,27$, $P < 0,05$, для n = 56). В группе детей с ваготонической формой СВД установлены положительные корреляционные связи между КАТ и трудноокисляемым фосфолипидом СМ ($r = 0,30$, $P < 0,05$, для n = 43).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, у детей с синдромом вегетативной дисфункции независимо от его клинической формы обнаружены общие закономерности структурных преобразований в клеточных мембранах, сопровождавшиеся процентным перераспределением содержания основных структурных липидов: обеднение мембраны за счет снижения общих фосфолипидов и относительное повышение свободного холестерола, увеличение мембранолитической фракции ЛФХ и снижение ФЭА.

Наряду с универсальными признаками дестабилизации клеточных мембран у детей с СВД четко прослеживались изменения в содержании и соотношении отдельных классов нейтральных липидов и фосфолипидов, обусловленные клинической формой синдрома. Эти отклонения, по всей видимости, имели конституциональный характер, и в ряде случаев характеризовались адаптивной направленностью. Выявленные изменения в состоянии липидного бислоя мембран эритроцитов при формировании синдрома вегетативной дисфункции могут оказывать влияние на транспорт ионов, латеральную диффузию рецепторов, на ферментативную активность белков, приводя к изменению функциональных свойств клеток красной крови и, в конечном итоге, могут способствовать реализации патофизиологической симптоматики у этих детей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вегетативные расстройства: клиника, диагностика, лечение / Под ред. А.М. Вейна. — М.: МИА, 2000. — 746 с.

2. Векшин Н.Л. Об использовании пирена в качестве люминесцентного индикатора вязкости модельных и биологических мембран / Н.Л. Векшин // Биол. науки. — 1987. — № 11. — С. 59—66.

3. Вельтищев Ю.Е. Проблемы мембранной патологии в педиатрии / Ю.Е. Вельтищев. — М.: Медицина, 1984. — 186 с.

4. Владимиров Ю.А. Флюоресцентные зонды в исследовании биологических мембран / Ю.А. Владимиров, Г.Е. Добрецов. — М.: Медицина, 1980. — 320 с.

5. Методы изучения вегетативной нервной системы у детей и подростков: Методические рекомендации МЗ СССР / Под ред. А.М. Вейна, Н.А. Белоконь. — М., 1987. — 25 с.

6. Новицкий В.В. Физиология и патофизиология эритроцита / В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева, Е.А. Степовая. — Томск: Изд-во Томского университета. — 2004. — 202 с.

7. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. — М.: Медиа Сфера. — 2002. — 305 с.

8. Ростовцев В.Н. Количественное определение липидных фракций плазмы крови / В.Н. Ростовцев, Г.Е. Резник // Лаб. дело. — 1982. — № 4. — С. 218—221.

9. Рязанцева Н.В. Взгляд на закономерности изменений молекулярной организации мембраны и функциональных свойств эритроцитов при невротических расстройствах / Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий // Рос. физиолог. журнал им. И.М. Сеченова. — 2003. — № 2. — С. 129—138.

10. Рязанцева Н.В. Изменения липидной фазы мембраны эритроцитов при параноидной шизофрении / Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий, М.М. Кублинская // Бюл. экспер. биол. и медицины. — 2002. — № 1. — С. 98—101.

11. Рязанцева Н.В. Невротические расстройства: клинико-биохимические параллели / Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий // Клин. лаб. диагностика. — 2003. — № 5. — С. 5—8.

12. Сависько А.А. Липидный спектр плазмы крови и мембран эритроцитов у детей с различными типами нейроциркуляторной дистонии: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Рн/Д., 1994. — 22 с.

13. Фосфолипидный состав эритроцитов при неврологических заболеваниях у детей; влияние сопутствующей патологии / Е.М. Васильева, М.И. Баканов, Г.Ф. Гордеева и др. // Медицинский научный и учебно-методический журнал. — 2001. — № 2. — С. 92—109.

14. Dodge I.N. The preparation and hemical characteristics of hemoglobin — free shosts of human erythrocyts / I.N. Dodge, C. Mitchell, D. Hanahan / / Arch. Biochem. and Biophis. — 1963. — Vol. 100, N 1. — P. 119—130.