

УДК 612.172: 534.833.6

**СОСТОЯНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ
IN VITRO ПОД ДЕЙСТВИЕМ ИНФРАЗВУКА****Рослякова Е.М., Бисерова А.Г., Байжанова Н.С., Байболатова Л.М.,
Шайхынбекова Р.М.***Казахский Национальный Медицинский Университет им. С.Д. Асфендиярова, Алматы,
e-mail: fizi-57@mail.ru*

Проведено исследование влияние инфразвука различной частоты на состояние мембран эритроцитов при кратковременной экспозиции. Определяли резистентность эритроцитов: осмотическую, перекисную, при сахарозном сжатии и тепловой денатурации. Обнаружены частотно-зависимые изменения ряда свойств (в том числе осмотической резистентности) мембраны, проявляющихся в сдвигах проницаемости мембраны. В некоторых случаях проявлялись эффекты антигемолитического действия инфразвука, что может отражать скорее всего более глубокий характер изменений, сопровождающийся угнетением ферментативной активности или снижением проницаемости мембран. Выявляется четкая зависимость между изменением резистентности эритроцитов и частотой инфразвукового воздействия. В тоже время, сложный многофакторный характер причин, влияющих на проницаемость плазматической мембраны, требует сочетанного изучения нескольких лабораторных тестов для правильной оценки наблюдаемых сдвигов. Полученные данные могут помочь раскрыть механизмы влияния инфразвука на организм, что имеет определенную практическую значимость.

Ключевые слова: низкочастотные колебания, эритроциты, резистентность мембран эритроцитов**STATE OF BIOLOGICAL PROPERTIES OF MEMBRANES OF ERYTHROCYTES
UNDER INFLUENCE OF INFRASOUND****Roslyakova E.M., Biserova A.G., Baizhanova N.S., Baybolatova L.M.,
Shayhyzbekova R.M.***Kazahsky National Medical University S.D. Asfendiyarov, Almaty, e-mail: fizi-57@mail.ru*

The influence of different frequencies infrasounds on the state of erythrocyte membranes during short-term exposure had been investigated. Determined resistance of erythrocytes: osmotic, peroxide, at sucrose compression and thermal denaturation. Discovered frequency-dependent changes in the number of properties of membrane (including osmotic resistance) manifested in shifts of membrane permeability. In some cases, the effects of ultrasound's antihemolytic actions are manifested that might reflect most likely more profound changes, accompanied by inhibition of enzyme activity or a decrease of membrane permeability. It had been revealed a precise correlation between the change of resistance of red blood cells and the frequency of infrasound influence. At the same time, a complex multi-factorial character of reasons that influences on the permeability of the cell's membrane, requires the combined investigation of several laboratory tests for a correct evaluation of the observed changes. The obtained data can help reveal the mechanisms of the effect of infrasound on the body that has a certain practical significance.

Keywords: low-frequency vibrations, the red blood cells, resistance of erythrocyte membranes

В настоящее время все больше увеличивается удельный рост низкочастотных акустических колебаний (НАК), одним из которых является инфразвук (ИЗ) – диапазон неслышимых звуков. В связи с развитием промышленности и транспорта, особенно в крупных городах, инфразвук становится одним из важных производственных факторов, загрязняющих окружающую среду, тогда как применяемые меры борьбы с ним не всегда эффективны и многие люди значительное время находятся в акустическом поле той или иной интенсивности. В соответствии с современными представлениями, длительно действующий инфразвук с уровнем интенсивности от 90 до 110 дБ является сильным стрессорным фактором и способен вызвать срыв механизмов адаптации организма [1, 2, 6, 7], что приводит к ускоренным темпам старения организма

и укорочению биологического возраста населения [8, 9].

Анализ литературных данных свидетельствует о том, что ИЗ остается в разряде неблагоприятных антропогенных факторов, который изучается гигиенистами с точки зрения оценки вредности и гигиенического нормирования на производстве. Вместе с тем многочисленные клинико-диагностические центры широко применяют данный фактор в качестве физиотерапевтического воздействия для лечения органов пищеварения дыхания, сердечно-сосудистой, эндокринной систем и т.д.

Среди гипотез о путях воздействия ИЗ, существует предположение, что первично повреждаются клеточные мембраны [3, 4, 5, 10, 11]. Поэтому нам представляется актуальным рассмотрение вопроса влияния инфразвука на состояние мембран эритроцитов более полноценно.

Материалы и методы исследования

В экспериментах использовалась свежая цельная донорская кровь здоровых людей. Каждая проба крови делилась на 10 частей: 1 часть контрольная, другие подвергались кратковременному однократному воздействию ИЗ частотой от 1 до 17 Гц.

Осмотическую резистентность определяли в растворах хлористого натрия различной концентрации (0,9–0,35 г/100 мл и 4 М раствор), инкубируя кровь в течение 20 мин при 37 °С и центрифугируя 10 мин при 1000 g. Состояние мембран эритроцитов при сахарозном сжатии определялось инкубированием крови в течение 60 мин при 37 °С в изотоническом (0,3 М) и гипертоническом (0,4 М) растворах сахарозы. Гемолиз эритроцитов при тепловой денатурации проводился в растворах хлористого натрия различной концентрации и инкубированием крови при 50 °С в течение 30 мин. Осмотическую плотность регистрировали при длине волны 540 нм.

Переокисную резистентность эритроцитов определяли [4] разведением крови средой инкубации (СИ) 3 раза, инкубированием в течении 10 мин при 37 °С и по 100 мкл суспензии вносили в 2 мл среды инкубации. Интенсивность переокисного гемолиза эритроцитов (ПГЭ) определяли с использованием 3 % раствора H_2O_2 в контрольной пробе – СИ. Для получения полного гемолиза использовали 8 % раствор додецилсульфата натрия. Все пробы инкубировали в течении 2 часов при 37 °С, затем центрифугировали 10 мин при 1000 g. Оптическую плотность супернатанта измеряли при 540 нм и степень гемолиза (А) рассчитывали по формуле:

$$A = \varepsilon * 100 / \text{пг},$$

где ε – экстинция опытной пробы; ПГ – экстинция пробы при полном гемолизе

Полученные результаты обрабатывали статистически с использованием программы Microsoft Excel, с определением $M \pm m$, t-критерия Стьюдента и считали достоверными при $p < 0,05$ и $p < 0,01$.

Результаты исследования и их обсуждение

Осмотическую резистентность (ОРЭ) intactных и прогретых эритроцитов в проведенных экспериментах оценивали по величине осмотического гемолиза. При использовании уменьшающихся концентраций NaCl от 0,9 г/100 мл до 0,35 г/100 мл кривая гемолиза имеет различную форму, зависящую от частоты инфразвукового воздействия. При частоте ИЗ 5,7 и 9 Гц наблюдается значительное повышение гемолиза. При действии ИЗ 3, 11 и 13 Гц гемолиз увеличивается только в 0,5 г/100 мл NaCl. При частоте 1,15 и 17 Гц отмечается уменьшение гемолиза во всех концентрациях хлористого натрия. В связи с этим, для большей наглядности были использованы данные по гемолизу, вызванному только растворами хлористого натрия 0,35 г/100 мл и 0,5 г/100 мл, от максимального гемолиза, вызванного 0,1 г/100 мл $NaHCO_3$ (т.е. оцени-

валась максимальная и минимальная резистентность эритроцитов). Все, полученные результаты сравнивались в процентном отношении с контрольной пробой крови, не подвергающейся воздействию инфразвука, в которой гемолиз принят за 100 %.

На рис. 1 представлены результаты опыта по определению резистентности intactных и прогретых эритроцитов крови в растворах хлористого натрия концентрацией 0,35 г/100 мл и 0,5 г/100 мл при воздействии ИЗ различной частоты. Из рисунка видно (рис. 1, А), что инфразвук частотой 5,7,9 Гц повышает уровень гемолиза по сравнению с контрольной пробой крови как intactных, так и прогретых эритроцитов. Однако гемолиз прогретых эритроцитов больше (гемолиз увеличен на 2,7%, 17,7% и 20,1% при воздействии частотами 5,7,9 Гц соответственно), чем intactных (гемолиз увеличен на 2,7%, 11,2% при воздействии частотами 7 и 9 Гц соответственно). При частоте 15 Гц уровень гемолиза intactных эритроцитов равен гемолизу в контрольной пробе. При воздействии инфразвуком другими частотами наблюдается снижение уровня гемолиза, причем частоты 3 и 11 Гц дают резкое понижение гемолиза (на 62,4% и 70,5% соответственно) от контроля как при инкубации эритроцитов при $T = 50^\circ\text{C}$ в течение 30 мин., так и intactных.

В растворах хлористого натрия 0,5 г/100 мл (рис. 1, Б) только частоты 1, 15, 17 Гц дают снижение гемолиза, а при воздействии ИЗ другими частотами гемолиз возрастает, причем при тепловой денатурации значительно выше при 3, 11, 13 Гц.

Таким образом, результаты исследования осмотической резистентности эритроцитов показали, что ИЗ оказывает повреждающее действие, что проявляется разрушением эритроцитов и выходом гемоглобина в плазму крови.

В следующей серии экспериментов вызывали гиперосмотическое сжатие эритроцитов добавлением 0,3 М и 0,4 М сахарозы (рис. 2).

Молекула сахарозы не проникает через плазматическую мембрану, что приводит к гемолизу эритроцитов донорской крови *in vitro*.

При кратковременном однократном действии инфразвука на кровь было зарегистрировано повышение величины гемолиза эритроцитов как в среде инкубации, так и в растворах сахарозы при частоте 5, 7, 9 и 11 Гц. Частоты 13 и 15 Гц не дают видимых изменений, а частоты 1, 3 и 17 вызывают снижение величины гемолиза эритроцитов.

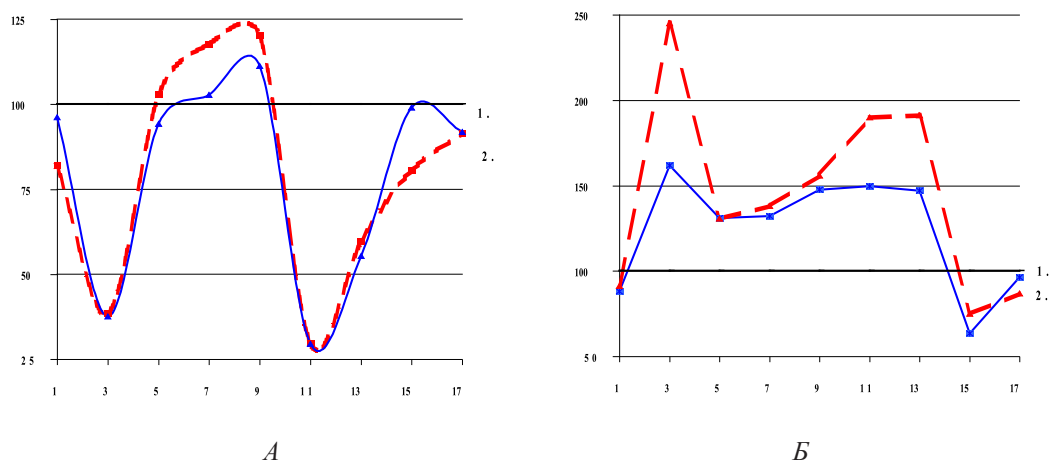


Рис. 1. Влияние инфразвука на осмотическую резистентность intactных (1) и прогретых (2) эритроцитов. По оси абсцисс: гемолиз, % (за 100% принят гемолиз в контрольной пробе крови); по оси ординат: частота ИЗ, Гц. А – гемолиз в 0,35% NaCl, Б – гемолиз в 0,5% NaCl

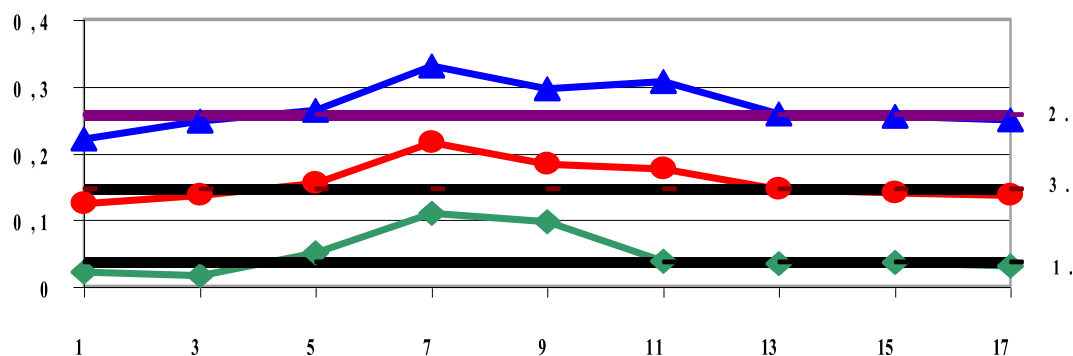


Рис. 2. Гиперосмотическое сжатие эритроцитов сахарозой при воздействии инфразвука. По оси ординат: величина гемолиза в относительных единицах, по оси абсцисс: частота ИЗ, Гц. 1) --- среда инкубации (контроль и опыт), 2) --- 0,3 М сахароза (контроль и опыт), 3) --- 0,4 М сахароза (контроль и опыт)

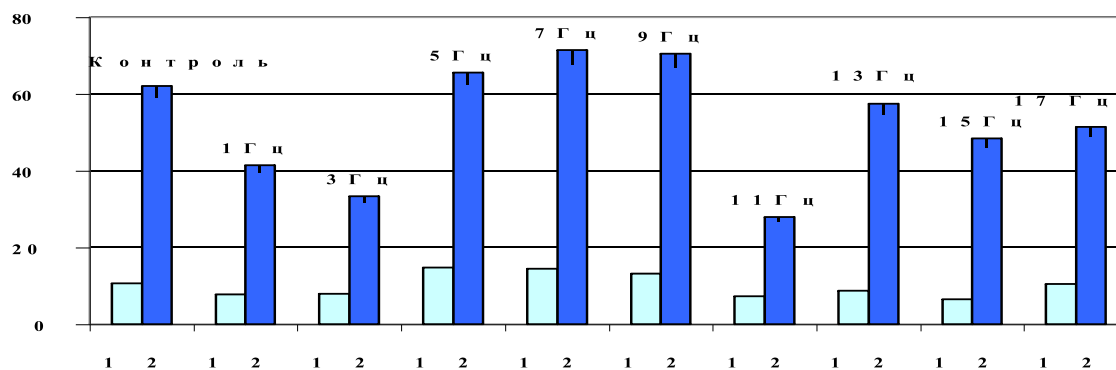


Рис. 3. Влияние инфразвука на ОРЭ при гиперосмотическом шоке (4М NaCl). По оси ординат: величина гемолиза в % от максимальной, вызванной 0,1 % раствором Na₂CO₃. 1 -- среда инкубации, 2 -- 4М NaCl

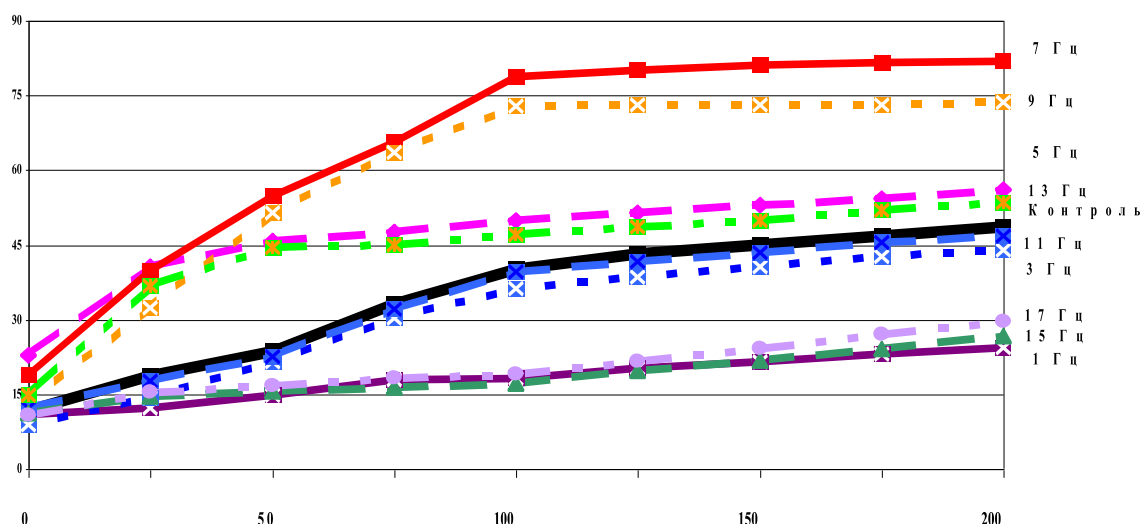


Рис. 4. Влияние инфразвука разной частоты на перекисную резистентность эритроцитов.
По оси абсцисс: H_2O_2 , мкл; по оси ординат : гемолиз, %

Гиперосмотический шок эритроцитов был моделирован 4 М раствором NaCl (рис. 3). В отличие от молекул сахарозы, молекула NaCl диссоциирует на ионы Na и Cl, которые могут проникать через плазматическую мембрану внутрь клетки [5]. Увеличение концентрации NaCl внутри эритроцитов ведет к набуханию, деформации и разрушению.

Как в среде инкубации, так и в 4М NaCl при частоте ИЗ 5, 7, 9 Гц зарегистрировано повышение величины гемолиза (на 8,1%, 14,9% и 13,4% соответственно), а при воздействии ИЗ другими частотами – снижение величины гемолиза, причем значительное при частотах 3 и 11 Гц (на 42,6% и 54,9% соответственно).

Данные по определению перекисной резистентности эритроцитов контрольных проб донорской крови и проб крови при воздействии инфразвуком различной частоты кратковременной экспозиции представлены на рис. 4. Из рисунка видно, что резкое возрастание уровня гемолиза отмечается в начальной части кривой (при низких и средних концентрациях перекиси водорода) при частоте ИЗ 7 и 9 Гц, при высоких концентрациях H_2O_2 наблюдается «плато» на уровне 78–82% от 100% гемолиза, вызванного 8% раствором додецилсульфата натрия. Инфразвук частотой 5 и 13 Гц вызывает подобный эффект, только на более низком уровне. Частоты 3 и 11 Гц снижают уровень гемолиза по сравнению с контрольной пробой (при этом кривая по-

вторяет контрольную). Следует обратить внимание, что частоты 1, 15 и 17 Гц практически полностью подавляют перекисный гемолиз эритроцитов при использовании низких концентраций перекиси водорода и значительно снижают при высоких концентрациях H_2O_2 , тогда как гемолиз эритроцитов в контрольной пробе донорской крови с увеличением концентрации H_2O_2 повышается на 40%.

Выводы

По современным представлениям основной мишенью любого повреждающего фактора является плазматическая мембрана. В наших экспериментах воздействие инфразвука различной частоты даже кратковременной экспозиции (15 минут) на донорскую кровь обнаружило частотно-зависимые изменения ряда свойств мембран эритроцитов (в том числе осмотической резистентности), проявляющихся в сдвигах проницаемости мембраны. В некоторых случаях проявлялись эффекты антигемолитического действия инфразвука, что может отражать скорее всего более глубокий характер изменений, сопровождающийся угнетением ферментативной активности или снижением проницаемости мембран.

Обобщая полученные данные, необходимо подчеркнуть, что выявляется четкая зависимость между изменением резистентности эритроцитов и частотой инфразвукowego воздействия. В тоже время, сложный многофакторный характер причин, влия-

ющих на проницаемость плазматической мембраны, требует сочетанного изучения нескольких лабораторных тестов для правильной оценки наблюдаемых сдвигов.

Тем не менее, полученные данные могут помочь раскрыть механизмы влияния инфразвука на организм, что имеет определенную практическую значимость.

Список литературы

1. Байжанова Н.С., Хасенова К.Х., Рослякова Е.М., Бисерова А.Г. Влияние экологических условий Приаралья на морфофункциональные показатели школьников старших классов // Международный журнал экспериментального образования. – 2014. – № 5 – С. 16–17.
2. Байжанова Н.С., Хасенова К.Х., Абишева З.С., Рысбаев О. Морфофункциональные показатели школьников старших классов в зависимости от удаленности проживания от Аральского моря. (Тезисы). Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов: Материалы Четвертой Всеросс. научно-практ. конференции. – Новосибирск, 2009. – С. 20–21.
3. Дадали В.А., Свидовый В.И. и др. Действие инфразвука и защитный эффект адаптогенов в эксперименте. // Гигиена и санитария – 1992. – № 1. – С. 40–43.
4. Дадали В.А., «Процессы перекисного окисления в организме и природные антиоксиданты». – Новосибирск, 1999. – С. 240–263.
5. Колмаков В.Н., Свидовый В.И., Шлейкин А.Г. Влияние низкочастотных акустических колебаний и некоторые компоненты мембраны эритроцитов *in vitro*. // Гиг. Труды – 1984. – № 10. – С. 48–49.
6. Рослякова Е.М., Байжанова Н.С., Бисерова А.Г., Хасенова К.Х., Абишева З.С. Студент в условиях экосистемы г. Алматы // Международный журнал экспериментального образования. – 2014. – № 5. – С. 17–18.
7. Рослякова Е.М., Хасенова К.Х., Бисерова А.Г., Игибаева А.С., Алипбекова А.С.. Изучение адаптационных возможностей у студентов // Здоровье семьи – XXI век. Материалы XVIII Международной научной конференции / Нетания, Израиль. – Пермь, 2014. – С. 139–143.
8. Рослякова Е.М., Хасенова К.Х., Бисерова А.Г. Сравнение некоторых показателей, характеризующих биологический возраст // Международный журнал экспериментального образования. – 2015. – № 5.
9. Рослякова Е.М., Соколов А.Д., Абишева З.С., Кожаниязова А.Н., Абдирова Т.О.. Изучение темпов старения отдельных систем органов у лиц пожилого возраста. // Здоровье семьи – XXI век. Материалы XVIII Международной научной конференции. Нетания, Израиль. – Пермь, 2014. – С. 143–146.
10. Рослякова Е.М., Соколов А.Д. Автоматия сердечной мышцы при действии инфразвука // Российский физиологический журнал им. Сеченова – 2004 – Т. 90, № 8. – С. 450–451.
11. Свидовый В.И. О механизме восприятия и действия инфразвука на организм экспериментальных животных и человека. // Гиг. и сан. – 1987. – № 3. – С. 88–89.