

УДК 612.111:356.33:612.017.2

ДИНАМИКА НЕКОТОРЫХ БИОФИЗИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ У ВОЕННОСЛУЖАЩИХ СРОЧНОЙ СЛУЖБЫ В ПРОЦЕССЕ АДАПТАЦИИ К ВОЕННОЙ СЛУЖБЕ

Максим О.В., Терещенко В.П., Зайцева О.И.

НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН, Красноярск

С помощью зондовой флуоресцентной спектроскопии мембран с использованием флуоресцентных зондов пирена и АНС оценивали биофизические параметры мембран эритроцитов в процессе адаптации военнослужащих срочной службы к условиям военной службы. Для оценки накопления в мембранах ионов кальция, ответственного за основные параметры функционирования мембранных структур, использовали флуоресцентный зонд ХТЦ. Выявлено изменение биофизических параметров и повышение содержания ионов кальция в мембранах эритроцитов в период острой адаптации к новым условиям среды.

Проблема хронического стресса является одной из актуальнейших, причем она особенно важна для отдельных профессиональных групп, труд которых сопряжен с воздействием комплекса стрессорных факторов. В частности, для военнослужащих, для которых повышенные физические нагрузки, новый коллектив, специфические условия профессиональной деятельности и строгая регламентация жизни создают условия для нарушения адаптационных процессов [4]. Состояние клеточной мембраны во многом определяет протекание физиологических и биохимических процессов, являясь исходным звеном в сложной цепи приспособительных модификаций на всех уровнях: субклеточном, клеточном, тканевом, системном [1,5,6]. Подвижность структурных компонентов клеточной мембраны необходима для осуществления ее физиологических функций. Биофизические параметры клеточной мембраны, такие как вязкость и текучесть, а также трансмембранный транспорт и активность мембраносвязанных ферментных систем определяются ее липидными компонентами [1,2,3,5]. Дезорганизация липидного бислоя мембраны может быть обусловлена внутриклеточным накоплением ионов кальция за счет прямого взаимодействия кальция с липидными молекулами, а также повышения активности кальций-зависимой фосфолипазы А2 или нарушения трансбислойной асимметрии фосфолипидов [3].

Стресс-реакция оказывает мобилизирующий эффект на организм путем увеличения концентрации ионов кальция в мембранах [6]. Кальций является «вторичным мессенджером», передающим внутрь клетки информацию о регуляторных сигналах. Выведение избытка кальция из клетки осуществляется посредством Са-АТФазы [5,6]. Внутриклеточное кумулирование ионов кальция приводит к увеличению микровязкости липидного матрикса мембран [5,6]. Избыток кальция при

затянувшейся стресс-реакции приводит к повреждающему действию на клеточную структуру, что может изменять действие гормонов и медиаторов [6].

Общая стратегия мембранной адаптации заключается в повышении ненасыщенности жирнокислотного состава мембранных фосфолипидов [1,2,3,5]. Однако накопление избыточно окисленных ненасыщенных фосфолипидов может приводить к образованию перекисных кластеров, между которыми образуются каналы ионной проводимости, что ведет к увеличению проницаемости и нарушению свойств мембраны [5]. Стрессовые гормоны прямо или опосредованно активируют липазы, фосфолипазы и увеличивают перекисное окисление липидов (ПОЛ), субстратом которого в мембране являются ненасыщенные жирные кислоты [1,5,6]. В частности, образуются лизофосфолипиды, которые за счет детергентных свойств снижают вязкость и повышают текучесть мембраны, увеличивая тем самым активность мембраносвязанных белков.

Параметры связывания флуоресцентных зондов пирена и АНС с мембраной эритроцита служат хорошим индикатором для оценки молекулярных перестроек в структуре мембраны. Неполярный зонд пирен диффундирует в гидрофобном компартменте мембраны, оценивая микровязкость липидной фазы [5]. Зонд АНС, напротив, обладает отрицательным зарядом и располагается в наиболее функционально активном поверхностном слое, который имеет отношение к рецепторной активности клетки и формированию ионных каналов [5]. Причем отмечено, что увеличение сродства мембраны эритроцита к зонду АНС (повышение анизотропии) сопровождается снижением степени эксимеризации пирена [5]. По данным литературы [5], проявления дизадаптации (в частности психической) способны повышать микровязкость мембран эритроци-

тов. Возрастание среднего значения анизотропии АНС свидетельствует об увеличении вязкости молекул в поверхностных слоях мембраны, что может негативно отражаться на функционировании мембраносвязанных рецепторов [5].

Целью исследования явилось изучение изменений биофизических свойств мембран эритроцитов у военнослужащих в период прохождения военной службы.

Материалы и методы. В исследовании принимали участие 165 военнослужащих срочной службы (мужчины в возрасте 18-25 лет, практически здоровые) в различные периоды адаптации к условиям службы: 1 группа - прибытие в часть, 2 - 1 месяц, 3 - 6 месяцев, 4 - 12 месяцев, 5 - 18 месяцев, 6 - 24 месяца военной службы. Исследовали суспензию мембран эритроцитов, выделенных из цельной венозной крови по методу J.T. Dodge. Исследование мембран проводили по методу Ю.А.Владимирова и Г.Е. Добрецова (1980) с помощью флуоресцентного зондирования на спектрофлуориметре MPF-4 «Hitachi». Определение текучести глубоких структур липидного бислоя проводили после добавления к 50 мкл суспензии мембран эритроцитов спиртового раствора пирена (5 мкл в концентрации 100 мкмоль/л). Измеряли спектры флуоресценции его эксимеров при длине волны флуоресценции – 400 нм, возбуждения 360 нм. Измерение микровязкости поверхностных слоев проводили по параметрам анизотропии флуоресцентного зонда 1 – анилинонафталин – 8 – сульфоната (АНС), который в концентрации 20 мкмоль/л водного раствора добавляли к 50 мкл суспензии мембран. Степень поляризации флуо-

ресценции характеризовали по величине анизотропии. Возможность связывания мембраной положительно заряженных ионов кальция исследовали с помощью водного раствора флуоресцентного зонда хлортетрациклина (ХТЦ) в концентрации 1 ммоль/л. Результаты выражали в относительных единицах.

Результаты и обсуждение. Нами выявлено, что текучесть глубоких слоев мембран эритроцитов увеличивалась в период острой адаптации к условиям военной службы (табл.1) с $0,474 \pm 0,023$ отн.ед. ($p < 0,001$) в 1 группе до $0,552 \pm 0,02$ отн.ед. ($p < 0,001$) во 2 группе. В остальных группах величина этого показателя снижалась (табл.1), причем минимальные значения наблюдались в 5 группе - $0,458 \pm 0,024$ отн.ед. ($p < 0,001$). Микровязкость поверхностных слоев также увеличивалась в период острой адаптации, причем наименьшие показатели зарегистрированы в 1 группе - $0,54 \pm 0,026$ отн.ед. ($p < 0,025$), а наибольшие - в 3 ($0,71 \pm 0,016$ отн.ед., $p < 0,001$). В дальнейшем величина этого показателя уменьшалась (табл.1). Нами рассчитывался (по отношению уровня анизотропии АНС к уровню эксимеризации пирена) показатель коэффициента асимметрии текучести. Он оказался равным единице во 2 группе – $1,089 \pm 0,077$ отн.ед. ($p < 0,005$), а максимальным - в 5 группе ($1,684 \pm 0,11$ ботн.ед., $p < 0,001$). Эти данные свидетельствуют о значительной модификации структуры мембран у военнослужащих в период острой адаптации (средние показатели текучести и микровязкости относительно равны) и стабилизации биофизических показателей в дальнейшем (табл.1).

Таблица 1. Показатели текучести поверхностных и глубоких слоев мембраны эритроцитов у военнослужащих срочной службы в зависимости от продолжительности службы

Группа	Текучесть *, отн.ед.	Микровязкость **, отн.ед.	КАТ***, отн.ед.
1(n=27)	$0,474 \pm 0,023^1$	$0,54 \pm 0,026^2$	$1,194 \pm 0,073^1$
2(n=30)	$0,552 \pm 0,02^1$	$0,563 \pm 0,0027^5$	$1,089 \pm 0,077^5$
3(n=28)	$0,502 \pm 0,022^1$	$0,71 \pm 0,016^1$	$1,488 \pm 0,073^1$
4(n=28)	$0,499 \pm 0,025^1$	$0,668 \pm 0,031^1$	$1,479 \pm 0,12^1$
5(n=33)	$0,458 \pm 0,024^1$	$0,689 \pm 0,017^1$	$1,684 \pm 0,116^1$
6(n=28)	$0,498 \pm 0,022^1$	$0,667 \pm 0,017^1$	$1,434 \pm 0,087^1$
Контроль (n=21)	$0,693 \pm 0,031$	$0,426 \pm 0,014$	$0,642 \pm 0,038$

Примечания: различия с контролем достоверны при ¹ $p < 0,001$,

² 0,025, ⁵ 0,005; * - текучесть глубоких слоев, ** - микровязкость поверхностных слоев, *** - коэффициент асимметрии текучести.

Отмечено, что у обследованных достоверно различаются показатели флуоресценции комплексов Са-ХТЦ в мембранах эритроцитов (начальная флуоресценция и пик флуоресценции), что подтверждает различное содержание в мембранах ионов кальция, ответственного за основные параметры клеточного реагирования. Скорость достижения пика флуоресценции комплексов Са-ХТЦ увеличивалась (табл.2) в исследуемых группах с $0,119 \pm 0,02$ отн.ед./мин.(nd) в 1 группе до $0,206 \pm 0,02$ отн.ед./мин ($p < 0,05$) в 6 группе, что подтверждает увеличение проницаемости мембран для ионов кальция в период адаптационных перестроек. Нами выявлено (табл.2), что показатели пика флуоресценции мембранных комплексов Са-ХТЦ имеют макси-

мальные значения во 2 - $16,97 \pm 1,88$ отн.ед. ($p < 0,01$) и в 4 группе - $16,45 \pm 1,26$ отн.ед. ($p < 0,05$). Это соответствует увеличению показателей начальной флуоресценции (табл.2) в этих группах ($12,63 \pm 0,74$ отн.ед. ($p < 0,001$) в 1 и $11,26 \pm 1,21$ отн.ед. (nd) – в 4 группе), что свидетельствует о повышении содержания ионов кальция в мембранах эритроцитов у данных индивидов. Таким образом, отмечено, что в период острой адаптации происходит накопление в мембранах эритроцитов ионов кальция (что согласуется с данными литературы) [5]. В дальнейшем кальциевый гомеостаз изменяется, наиболее вероятно, под воздействием вегетативных и гуморальных влияний в течение адаптационного процесса [1,5,6,7].

Таблица 2. Показатели флуоресценции комплексов Са-ХТЦ в мембранах эритроцитов у военнослужащих срочной службы в зависимости от продолжительности военной службы

Группа	Показатели флуоресценции Са-ХТЦ		
	НФ, отн.ед.	ПФ, отн.ед.	СДПФ, отн.ед./мин
1(n=27)	$11,37 \pm 0,75^4$	$15,11 \pm 1,17$	$0,119 \pm 0,02$
2(n=30)	$12,63 \pm 0,74^1$	$16,97 \pm 1,88^3$	$0,171 \pm 0,03$
3(n=28)	$9,78 \pm 0,85$	$13,62 \pm 1,07^4$	$0,164 \pm 0,02$
4(n=28)	$11,26 \pm 1,21$	$16,45 \pm 1,26^4$	$0,202 \pm 0,03$
5(n=33)	$8,33 \pm 0,49^4$	$15,93 \pm 1,61$	$0,251 \pm 0,04$
6(n=28)	$7,95 \pm 0,69^3$	$13,66 \pm 1,2$	$0,206 \pm 0,02^4$
Контроль (n=21)	$9,3 \pm 0,42$	$13,53 \pm 0,83$	$0,119 \pm 0,01$

Примечания: различия с контролем достоверны при ¹ $p < 0,001$,

³0,01, ⁴0,05; НФ – начальная флуоресценция, ПФ – пик флуоресценции, СДПФ – скорость достижения пика флуоресценции

Закключение. Выявлено, что в период острой адаптации у военнослужащих срочной службы наблюдаются максимальные изменения биофизических параметров мембран эритроцитов, что проявляется уменьшением коэффициента асимметрии текучести мембран и увеличением содержания мембраносвязанного кальция. Такие изменения, соответственно данным литературы [5,6], вызваны структурной модификацией мембран при остром адаптационном процессе. Увеличение содержания мембраносвязанного кальция в эритроцитах к концу первого года службы, вероятно, свидетельствует о включении других адаптационных регуляторных механизмов, в частности, вегетативных, оказывающих воздейст-

вие на метаболические процессы на уровне мембран.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Владимиров Ю.А. Роль нарушений свойств липидного слоя мембран в развитии патологического процесса//Патол. физиология и эксперим. терапия. 1989. №4. С.7-19.
2. Заводник И.Б., Лапшина Е.А., Брышевская М. Эффект свободных жирных кислот на состояние липидного и белкового компонента мембран//Биол. мембраны. 1995. №5.С.516-523.
3. Кешенов А.Н., Никусмячева Н.Г. Обмен липидов и липопротеидов и его нарушения. Ру-

ководство для врачей.- СПб: Питерком.- 1999.- 512 с.

4. Махнев М.В., Махнев А.В. Медико-социальные аспекты адаптации военнослужащих//Военно-медицинский журнал. 2000.№9.С.57-64.

5. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Степовая Е.А. Физиология и патофизиология эритроцита. – Томск: Изд. ТГУ, 2004.- 202 с.

6. Пшенникова М.Г. Феномен стресса: эмоциональный стресс и его роль в патологии//Патол. физиология и эксперим. терапия.№3.2000.С.20-26.

**THE DYNAMICS OF SOME BIOPHYSICAL PROPERTIES
OF ERYTHROCYTE CELLULAR MEMBRANES OF SHOULDERS**

Maksim O.V., Tereshchenko V.P., Zaitseva O.I.

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

By means of the probe fluorescent spectroscopy of erythrocyte membranes with the use of fluorescent probes piren and ANS we appreciated biophysical properties in erythrocyte membranes of shoulders during adaptational process to the military service. Pro evaluation of the calcium ions accumulathion in the erythrocyte membranes we used the probe chlortetracycline fluorescent spectroscopy. We have found the fluctuation of biophysical properties in erythrocyte membranes of shoulders during acute adaptational process to the new condithios of outdoor environment.