

УДК: 577.322. 577.043

**Изучение влияния низкочастотной вибрации на активность  
глутатионпероксидазы эритроцитов  
О.И.Доценко, В.О.Ткаченко**

*Донецкий национальный университет (Донецк, Украина)  
dots\_don@ukr.net*

Изучено влияние низкочастотной вибрации (8–32 Гц) интенсивности 75–105 Дб на активность глутатионпероксидазы эритроцитов. Показана зависимость снижения активности фермента от интенсивности и длительности действия вибрации. Обсуждается механизм влияния низкочастотных механических колебаний на активность кислородзависимых реакций в клетке и внеклеточной среде.

**Ключевые слова:** *низкочастотная вибрация, глутатионпероксидаза, активные формы кислорода.*

**Вивчення впливу низькочастотної вібрації на активність  
глутатіонпероксидази еритроцитів  
О.І.Доценко, В.О.Ткаченко**

Вивчений вплив низькочастотної вібрації (8–32 Гц) інтенсивності 75–105 Дб на активність глутатіонпероксидази еритроцитів. Показана залежність зниження активності ферменту від інтенсивності й тривалості дії вібрації. Обговорюється механізм впливу низькочастотних механічних коливань на активність кисневозалежних реакцій у клітині й позаклітинному середовищі.

**Ключові слова:** *низькочастотна вібрація, глутатіонпероксидаза, активні форми кисню.*

**The study of influence of low-frequency vibration on the activity of  
erythrocytes glutathione peroxidase  
O.I.Dotsenko, V.O.Tkachenko**

The influence of the low-frequency vibration (8–32 Hz) of intensity 75–105 Db on erythrocytes glutathione peroxidase activity was studied. It has been shown that decrease in enzymes activity depends on intensity and duration of vibration action. The mechanism of low-frequency mechanical fluctuations influence on the activity of oxygen-dependent reactions in a cell and extracellular environment is discussed.

**Key words:** *low-frequency vibration, glutathione peroxidase, active forms of oxygen.*

**Введение**

Вибрация относится к факторам, обладающим высокой биологической активностью. Выраженность ответных реакций обуславливается главным образом силой энергетического воздействия и биомеханическими свойствами человеческого тела как сложной колебательной системы.

Вибрационная патология стоит на втором месте (после пылевых) среди профессиональных заболеваний. Однако действие вибрации на изолированные клетки и ткани до сих пор еще не является предметом специальных исследований, хотя каждому исследователю должно быть ясно, что механизм биологического действия вибрации, как и других видов механических колебаний, не может быть разгадан до тех пор, пока не будет изучено ее действие на клетки (Романов, 1991). Оправданием этому может быть лишь настоятельная потребность выяснить степень реальной опасности развития патологических процессов организма, подвергавшегося вибрации. Именно на выявлении синдромов и клиники вибрационной болезни концентрировалось до настоящего времени внимание исследователей.

Организм существует благодаря тесной связи и согласованности деятельности его органов и систем. Известно, что эта согласованность обуславливается многочисленными колебательными процессами, протекающими на разных уровнях иерархии жизненных систем организма (начиная с окислительно-восстановительных процессов в клетке и кончая колебательными взаимодействиями между различными органами). В живом организме тесно переплетены колебания различных типов, например, механические и электрические, и возбуждение одного типа колебаний может вызывать возбуждение других (например, механические движения обусловлены процессом распространения

нервного импульса). Резонно предположить, что и внешнее резонансное воздействие одного типа (например, механическое) способно привести к раскачке колебаний другого типа (электрических).

На настоящий момент накоплен огромный экспериментальный материал по воздействию полей различной интенсивности на животных и человека. При этом интерес исследователей почти целиком сосредоточен на воздействии только электромагнитных полей, влиянием же механических колебаний (вибраций, акустических колебаний, микрофлуктуаций давления) на функционирование живых организмов чаще всего пренебрегают (Хабарова, 2002).

В связи с вышесказанным, в настоящее время существует острая необходимость изучения действия механических колебаний на биологически значимые объекты на молекулярном уровне. Видное место среди биокатализаторов – объектов вибрационного воздействия принадлежит олигомерному ферменту глутатионпероксидазе в связи с ее широким распространением (эритроциты, печень человека, ткани и т.д.) и ключевой ролью в антиоксидантном ферментном комплексе (каталаза, супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза), выполняющем детоксицирующую функцию по отношению к пероксиду водорода и органическим гидроперекисям (Кулинский, Колесниченко, 1993). Глутатионпероксидаза защищает эритроциты от образования метгемоглобина, преждевременного старения и гемолиза.

В данной работе на модельных системах изучено влияние низкочастотной вибрации на активность внутриклеточного фермента эритроцитов – глутатионпероксидазы (ГПО, КФ 1.11.1.9).

### **Материалы и методы**

В экспериментах использовали свежую кровь доноров, примерно одной возрастной группы и одного пола. Эритроциты осаждали центрифугированием. Затем эритроциты 4-кратно отмывали от плазмы Na-фосфатным буфером (0,015 М, рН 7,4), содержащим 0,15 моль NaCl. После центрифугирования удаляли надосадочную жидкость и белый опалесцирующий слой лейкоцитов, располагающийся над осадком эритроцитов. Полученная паста эритроцитов использовалась для приготовления суспензии с содержанием гемоглобина  $0,62 \pm 0,06$  мг/мл. Эту суспензию подвергали действию низкочастотной вибрации с частотами 8, 16, 20, 24, 28 и 32 Гц, амплитудами  $0,5 \pm 0,04$  и  $0,9 \pm 0,08$  мм в течение 3-х часов. Вибрацию совершали при помощи вибростенда, разработанного на кафедре биофизики ДонНУ, который состоял из генератора низкочастотных сигналов синусоидальной формы, усилителя и вибратора, совершающего колебания в вертикальной плоскости с заданной частотой и амплитудой. Экспериментальную кювету, заполненную суспензией эритроцитов, вертикально закрепляли на подвижной части вибратора (в этом случае механические колебания передаются в экспериментальную кювету с незначительными потерями мощности).

Активность ГПО эритроцитов определяли до начала эксперимента и затем каждые 15 мин в процессе вибрационного воздействия. Общую активность ГПО находили по скорости окисления восстановленного глутатиона (GSH) в присутствии перекиси водорода. Количество GSH после остановки реакции определяли фотометрически (412 нм), используя цветную реакцию с реактивом Эллмана (Разыграев, Арутюнян, 2006). Активность фермента выражали в мкмоль окисленного GSH за минуту на 1 мг гемоглобина. В качестве контроля использовали среднее значение активности фермента, определенное до начала эксперимента.

Содержание гемоглобина в эритроцитарной пасте определяли гемиглобинцианидным унифицированным методом с использованием стандартных наборов.

Все эксперименты выполнялись в трех повторностях. При построении зависимостей, приводимых ниже, использовались усредненные данные. Статистический анализ полученных результатов проводили в программе Statistica. Достоверность различий между среднegrupповыми показателями оценивали с помощью непараметрического рангового критерия Уилкоксона.

### **Результаты и обсуждение**

Полученные экспериментальные данные подтвердили наше предположение о том, что активность глутатионпероксидазы эритроцитов может снижаться под действием низкочастотной вибрации. Однако из полученных экспериментальных зависимостей (рис. 1, А–Е) видно, что характер изменения активности ГПО существенно зависит от частоты и амплитуды вибрации. Так, вибрация с частотой 8 Гц и амплитудой  $0,5 \pm 0,04$  мм приводила к инактивации фермента только после 2-часового воздействия (рис. 1, А). В течение же первых 30 мин эксперимента активность фермента в 1,2–1,4 раза превышала контроль и затем длительное время удерживалась на уровне контроля. Вибрация с частотой 8 Гц и амплитудой 0,8 мм вызывала инактивацию фермента уже после 15-минутного воздействия, и затем наблюдалась тенденция к снижению активности в течение всего

експеримента. В среднем, снижение активности при вибрации с параметрами 8 Гц,  $0,8 \pm 0,08$  мм составило  $50,6 \pm 16,7$  %.

С увеличением частоты вибрации характер изменения активности ГПО несколько менялся. В большей степени активность фермента снижалась при вибрации с амплитудой  $0,5 \pm 0,04$  мм. Так, при вибрации с параметрами 16 Гц, 0,5 мм в течение первых 45 мин эксперимента активность ГПО в 1,2 раза превышала контроль, и затем наблюдалось постепенное снижение активности фермента (рис. 1, Б). Увеличение амплитуды приводило к еще большему увеличению активности фермента в начале эксперимента (в 1,4–1,5 раза активность превышала контроль в течение первых 90 мин) и, затем, к резкому снижению (рис. 1, Б, зависимость 2). В конце эксперимента падение активности фермента составило  $37,6 \pm 7,6$  % и  $29,1 \pm 9,1$  % (амплитуды 0,5 и 0,8 мм).

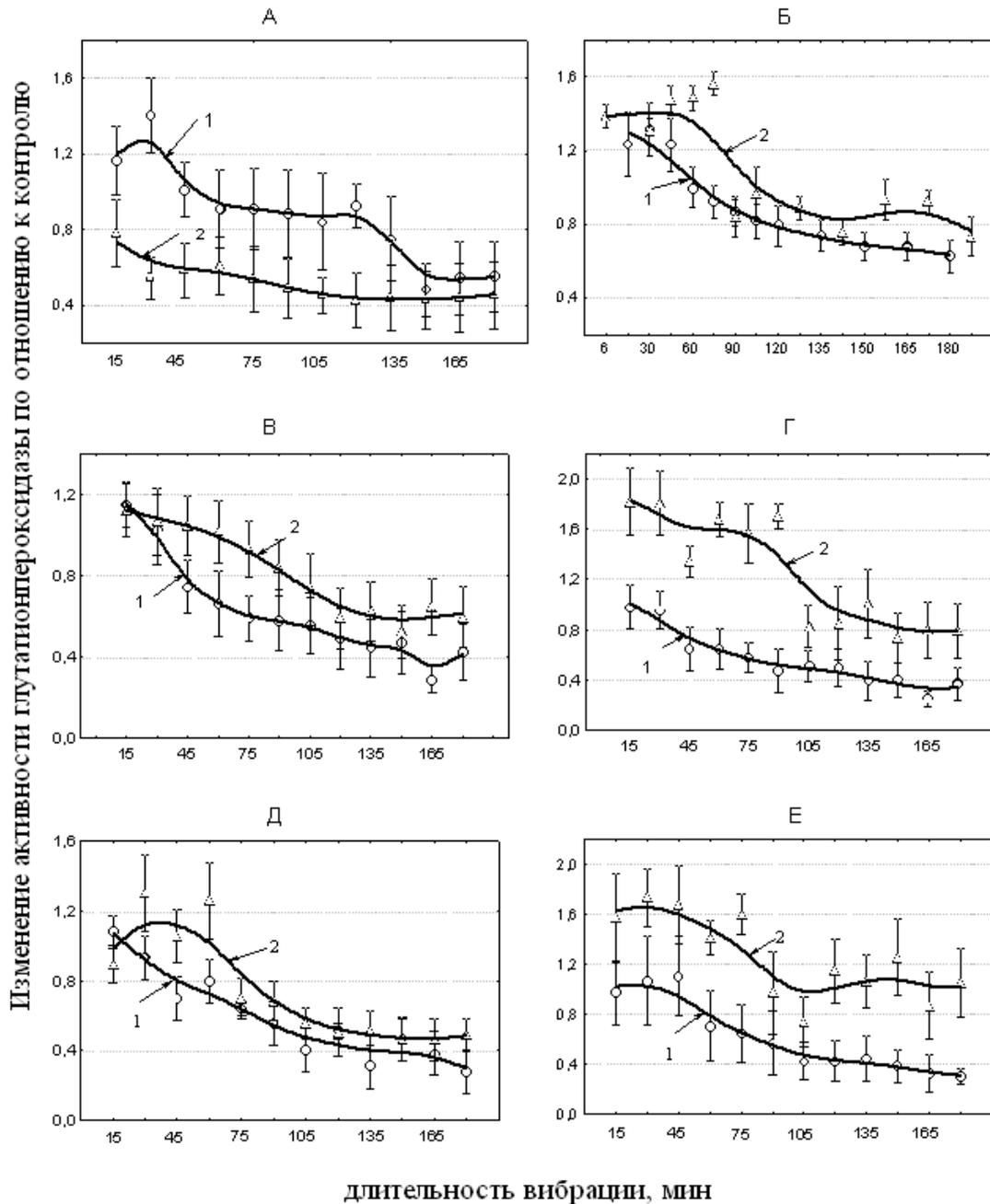


Рис. 1. Изменение активности ГПО относительно контроля в процессе низкочастотной вибрации. Параметры вибрации: А – 8 Гц, Б – 16 Гц, В – 20 Гц, Г – 24 Гц, Д – 28 Гц, Е – 32 Гц. Зависимость 1 – вибрация с амплитудой  $0,5 \pm 0,04$  мм, 2 – вибрация с амплитудой  $0,8 \pm 0,08$  мм

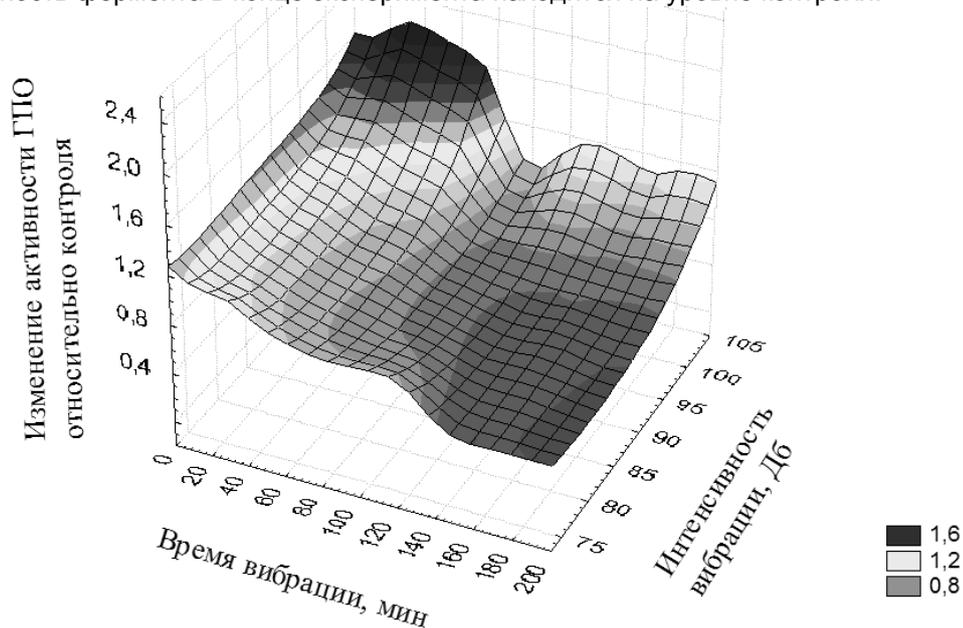
Подобные зависимости изменения активности ГПО в процессе вибрации получены для частот 20, 24 и 28 Гц (рис. 1, В–Д). При вибрации суспензии эритроцитов с частотой 32 Гц, 0,5 мм характер изменения активности фермента такой же, как и при других частотах, в то время как вибрация с амплитудой 0,8 мм вообще не приводила к падению активности ГПО. В течение первых 90 мин эксперимента активность фермента была намного выше, чем при других частотах (в 1,6–1,8 раза превышает контроль), а затем активность фермента снижалась до уровня контроля.

В случае вибрации с амплитудой  $0,5 \pm 0,04$  мм степень инактивации ГПО повышалась с увеличением частоты вибрации. Легко заметить (рис. 1, А–Е, зависимости 1), что наибольшее снижение активности фермента происходило на частотах 24–32 Гц. Увеличение частоты вибрации вызывало сокращение временного интервала, в течение которого активность ГПО выше или на уровне контроля. Вибрация с большей амплитудой ( $0,8 \pm 0,08$  мм) дает нам обратный характер зависимости степени инактивации фермента от частоты вибрации (рис. 1, А–Е, зависимости 2). Наибольшее падение активности наблюдалось при вибрации с частотой 8 Гц. С увеличением частоты вибрации на экспериментальных зависимостях четко виден участок, длительностью 75–90 мин, на котором активность фермента превышала контроль (в 1,2–1,6 раза). Далее фиксировалось снижение активности фермента (рис. 1, Б–Д, зависимость 2). При вибрации с частотой 32 Гц, как уже отмечалось выше, снижение активности фермента ниже уровня контроля не происходило.

На рис. 2 показана зависимость изменения активности ГПО от интенсивности вибрации в Дб. За интенсивность вибрации принимали логарифмический уровень виброускорения

$$L_a \left( L_a = 20 \lg \left( \frac{a}{0,0003} \right) \right),$$

где 0,0003 – условное опорное виброускорение, от которого ведется отсчет децибел,  $a = (2\pi f)^2 A$ , м/с<sup>2</sup> (виброускорение)). Видно (рис. 2), что наибольшее падение активности ГПО происходит при величинах уровня виброускорения 73–90 Дб. С увеличением уровня виброускорения расширяется область, в которой активность фермента выше контроля. В области виброускорений 97–105 Дб активность фермента в конце эксперимента находится на уровне контроля.



**Рис. 2. Изменение активности ГПО относительно контроля в зависимости от двух факторов – интенсивности и длительности вибрации**

Увеличение активности ферментов антиоксидантной защиты всегда связано с ростом концентрации субстратов для этих ферментов, а именно повышением уровня активных форм кислорода. Таким образом, полученные в работе данные свидетельствуют о том, что под действием низкочастотной вибрации изменяется либо активность кислородзависимых реакций в клетке, либо в аэробных условиях образуются активные формы кислорода (АФК) непосредственно в среде инкубирования. Не исключается возможность инициации обоих вышеназванных процессов. Известно,

что АФК в достаточно низких концентрациях могут оказывать многостороннее регуляторное действие на биосистемы, и в последнее время АФК рассматриваются как новая система внутриклеточных и межклеточных мессенджеров (Поцелуева и др., 1998). Накопление активных форм кислорода –  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  может приводить к инактивации ферментов антиоксидантной защиты, в том числе и ГПО.

Рассмотрим возможность реализации названных выше механизмов генерирования АФК под действием низкочастотной вибрации.

Буферный раствор, в котором распределены клетки, насыщен воздухом, что обеспечивает концентрацию  $O_2$  в нем  $\sim 10^{-4}$  М. В работе (Андреев, 1999) показано, что при концентрации  $O_2$  в растворе выше некоторого критического значения даже при комнатных температурах система закономерно испытывает своеобразный «фазовый переход», в результате чего вода расслаивается на «связанную» и «свободную» фазы. Соотношение «связанной» и «свободной» воды в растворах, насыщенных кислородом, является динамичной величиной, чувствительной к температурным, механическим и другим воздействиям. Авторы (Rai, Singh, 1995) методом рентгеновской дифракции показали, что магнитная экспозиция жидкой воды (0,3 Т) приводит к формированию структуры полиморфного льда при комнатной температуре. В работах (Степанян и др., 1999; Аюпян, Айрапетян, 2005) исследовано влияние механических колебаний в диапазоне частот 3–5000 Гц при значениях интенсивностей 75–90 Дб на дистиллированную воду и установлено значительное снижение удельной электропроводности воды в области от 4 до 10 Гц, что также связывают с изменением структурных характеристик среды. В ряде исследований показано, что относительно слабые физические воздействия, в том числе и механические колебания (Тарадина, Доценко, 2007; Стыркас, Никишина, 2007), могут инициировать процессы образования АФК при непосредственном участии кислорода: восстановление кислорода с образованием супероксид-аниона ( $O_2 + \text{электрон} \rightarrow O_2^{\cdot-}$ ), затем в результате дисмутации ( $O_2^{\cdot-} \rightarrow O_2 + O_2^{2-}$ ) – пероксид-аниона, возможно, за счет существующих микропримесей (возможно,  $Fe^{2+}$ ), а также в результате взаимодействия с гидроксил-радикалом и/или путем присоединения сольватированных электронов.

Для того чтобы показать возможность генерирования АФК при действии механических колебаний непосредственно в водной среде, буферный раствор подвергался вибрации с частотой 24 Гц, амплитудой  $0,5 \pm 0,04$  мм в течение 2-х часов. Затем в этот раствор были внесены эритроциты. Активность ГПО определялась в течение 3-х часов, однако суспензия уже не подвергалась вибрации. Результаты исследования показаны на рис. 3. Видно, что активность фермента в течение 60 мин воздействия значительно превышает уровень контроля, затем постепенно снижается и устанавливается на уровне контроля. В данном случае ГПО эритроцитов работает как тест-система, позволяющая обнаружить и нейтрализовать избыточное количество перекиси водорода, образующееся в водной среде под действием низкочастотной вибрации.

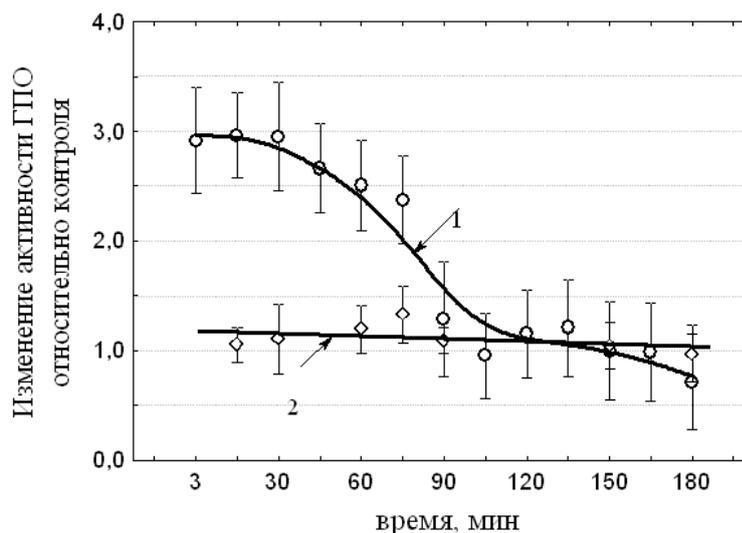


Рис. 3. Изменение активности ГПО эритроцитов относительно контрольного уровня. 1 – изменение активности фермента в буферном растворе, предварительно подвергнувшись вибрации с частотой 24 Гц, амплитудой  $0,5 \pm 0,04$  мм в течение 2-х часов. 2 – изменение активности фермента в буферном растворе, не подвергнувшись вибрации

Полученные нами экспериментальные данные согласуются с обнаруженными в работах В.И.Лобышева и др. (Лобышев и др., 1994) феноменами собственной люминесценции воды и длительными, порядка нескольких часов, временами релаксации структурной перестройки воды после внешнего воздействия, в том числе постоянными и переменными магнитными полями, что позволяет рассматривать воду как неравновесную самоорганизующуюся систему. Такая система после внешнего возмущения может обладать запасом свободной энергии, и релаксация системы после внешнего возбуждения может быть сопряжена с индукцией химических реакций образования АФК (Поцелуева и др., 1998).

Каким же образом может изменяться активность кислородзависимых реакций в клетке под действием низкочастотной вибрации? Ниже, с учетом литературных данных, кратко будет изложена наша точка зрения по данному вопросу.

Характерным свойством поверхностей белков клетки является то, что они сильно заряжены и заряды расположены достаточно упорядоченно. Заряды обеспечивают как карбонильные (-), так и аминогруппы (+) боковых остатков и концевых аминокислот. Такая поверхность обеспечивает эффективную структуризацию воды. Ее диполи адсорбируются на заполняющие цитоплазму заряженные гидрофильные поверхности макромолекул, обеспечивая адсорбцию еще большего количества диполей, благодаря чему возникают слои организованной воды (Линг, 2008). Представление о том, что в клетке, в отличие от простого раствора, большая водная фракция находится в организованном состоянии, становится общепринятым. К нему пришли все известные ученые, которые исследовали воду в живых системах (Pollack, 2001; Vogler, 1998; Watterson, 1991). Цитоплазма клетки напоминает гель по многим характеристикам: структурированность воды, устойчивость к замерзанию, способность исключать молекулы различных веществ и, наконец, физическая консистенция. Известно, что общим знаменателем гелевой активности является явление фазового перехода. Предположив, что фазовый переход – это главный мотор в реализации клеточных функций, можно утверждать, что фактором, определяющим направленность реакции клетки на внешние воздействия, являются фазовые золь-гель переходы коллоидных структур клетки (Pollack, 2001). Другие факторы, оказывающие параметрическое влияние на золь-гель переходы (кальций цитозоля, циклические нуклеотиды, АФК), также могут резко повышать чувствительность клетки к внешним физическим воздействиям (Загускин, 2005). Генерация АФК при внешнем воздействии и усиление энергетического и пластического обмена при энергозависимом связывании кальция и уменьшении его концентрации в цитозоле поддерживают переход геля в золь (разжижение цитоплазмы). АФК способны нарушать водородные и другие химические связи в коллоидных мицеллах. Увеличение концентрации кальция в цитозоле при его вхождении в клетку или высвобождении из внутриклеточных депо способствует переходу золя в гель (желатинизации). Перемена в состоянии внутриклеточной воды при внешних воздействиях может в значительной степени влиять на активность ферментов и скорость протекания внутриклеточных реакций (Watterson, 1991).

Таким образом, участие воды в образовании единого водно-липидно-белкового комплекса клетки и сенсорная способность реагировать на слабые, в том числе и механические, воздействия предопределяют ее функцию преобразования слабых внешних сигналов в изменение состояния и активности внутриклеточных ферментов.

#### Список литературы

- Акопян С.Н., Айрапетян Г.С. Исследование удельной электропроводности воды при воздействии постоянного магнитного поля, электромагнитного поля и низкочастотных механических колебаний // Биофизика. – 2005. – Т.50, №2. – С. 265–270.
- Андреев Е.А. О некоторых особенностях теплофизических свойств воды и ее поведения в живых организмах // Біофізичний вісник. – 1999. – Вип.3. – С. 112–117.
- Загускин С.Л. Внутриклеточные механизмы лазерной терапии // МИС–РТ. – 2005. – №36. (<http://ikar.udm.ru/sb36-3.htm>)
- Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Структура, свойства, биологическая роль и регуляция глутатионпероксидазы // Успехи современной биологии. – 1993. – Т.113, №1. – С. 107–122.
- Линг Г. Физическая теория живой клетки: незамеченная революция. – СПб.: Наука, 2008. – 376с.
- Лобышев В.И., Рыжиков Б.Д., Шухлинская Р.Э. и др. Собственная люминесценция воды в сильно разбавленных растворах дипептидов // Биофизика. – 1994. – Т.39, №4. – С. 565–570.
- Поцелуева М.М., Пустовидко А.В., Евтодиенко Ю.В. и др. Образование реактивных форм кислорода в водных растворах под действием электромагнитного излучения КВЧ-диапазона // ДАН. – 1998. – Т.359, №3. – С. 415–418.

- Разыграев А.В., Арутюнян А.В. Определение глутатионпероксидазной активности в сыворотке крови человека с использованием пероксида водорода и 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной кислоты) // Клинич. лаб. диагностика. – 2006. – №6. – С.13–16.
- Романов С.Н. Биологическое действие вибрации и звука. Парадоксы и проблемы XX века. – Л.: Наука, 1991. – 190с.
- Степанян Р.С., Айрапетян Г.С., Аракелян А.Г., Айрапетян С.Н. Влияние механических колебаний на электропроводность воды // Биофизика. – 1999. – Т.44, №2. – С. 197–202.
- Стыркас А.Д., Никишина Н.Г. Механохимические процессы в воде // Химия высоких энергий. – 2007. – Т.41, №6. – С. 452–458.
- Тарадина Г.В., Доценко О.И. Исследование влияния низкочастотной вибрации на инактивацию растворов фермента каталазы // Проблемы экологии и охраны природы техногенного региона. – Донецк, 2007. – Вып.7. – С. 255–261.
- Хабарова О.В. Биоэффективные частоты и их связь с собственными частотами живых организмов // Биомедицинские технологии и радиоэлектроника. – 2002. – №5. – С. 56–66.
- Pollack G.H. Cells, gels, and the engines of life. – Seattle, WA, USA: Ebner & Sons, 2001. – 305p.
- Rai S., Singh U.P. X-ray determination of magnetically treated liquid water structures // Electro-Magnetobiol. – 1995. – Vol.14, №1. – P. 23–30.
- Vogler E.A. Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces // Adv. Colloid and Interface Sci. – 1998. – Vol.74. – P. 69–117.
- Watterson J.G. The role of water in cell function // Биофизика. – 1991. – Т.36, №1. – С. 5–30.

---

**Представлено: В.М.Білобровим / Presented by: V.M.Bilobrov**

**Рекомендовано до друку: Є.Е.Перським / Recommended for publishing by: Ye.E.Persky**

*Подано до редакції / Received: 16.09.2009.*

© О.І.Доценко, В.О.Ткаченко, 2010  
© O.I.Dotsenko, V.O.Tkachenko, 2010