

А.К. Мартусевич, Л.К. Ковалева, Л.М. Козлова,
М.А. Феофилова, Е.С. Голыгина

КРИСТАЛЛОСКОПИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА АДАПТАЦИИ ОРГАНИЗМА К РАЗЛИЧ- НЫМ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИМ СТРЕССИ- РУЮЩИМ СИТУАЦИЯМ

DOI 10.25789/YMJ.2019.66.02

УДК 577.1:612.015.347

Проведена оценка модификации кристаллогенных свойств сыворотки крови человека в условиях психоэмоционального и физического напряжения. Физическую нагрузку моделировали проведением теста PWC170, в качестве психоэмоционального стресса использовали ситуацию сдачи курсового экзамена. Получение образцов крови у добровольцев осуществляли трехкратно: в спокойном состоянии (в межсессионный период), после выполнения физической нагрузки и после сдачи экзамена. Кристаллогенные свойства сыворотки крови изучали с применением ранее разработанного метода тезиокристаллоскопии, результат дегидратации оценивали с помощью системы полуколичественных параметров, а также путем спектрометрического исследования фаций. Установлено, что физическая и психоэмоциональная нагрузка способствует повышению кристаллогенной активности сыворотки крови здоровых испытуемых, причем более выражена эта тенденция для первого воздействия. Это подтверждается как результатами визуаметрической оценки кристаллограмм, так и данными их спектрометрического исследования.

Ключевые слова: биокристалломика, стрессирующие факторы, сыворотка крови.

The authors assessed modification of crystallogenic properties of human blood serum action under physical exertion and psychoemotional stress. Physical exertion was modeled with PWC170 test, and examination situation was a model of psychoemotional stress. This study was performed on healthy volunteers. We got blood specimens three times (without any physical and psychoemotional stresses; after physical exertion and after examination) in all volunteers. Crystallogenic properties of blood serum were tested with teziocrystalloscopic method. Results of own and initiated crystallization were estimated with special semiquantitative criteria and spectrometric analysis. It is stated that physical exertion and psychoemotional stress cause increasing of crystallogenic activity of human blood serum. This trend is more pronounced for the first impact. This is confirmed both by the results of the visual metric evaluation of crystallograms, and by the data of their spectrometric studies.

Keywords: biocrystalloemics, stress factors, blood serum.

Введение. Известно, что даже физиологические стрессоры способны вызвать существенные ответные реакции со стороны регуляторных (нейро-иммуно-гормональный контур) и эффекторных (кардиореспираторная надсистема) систем [7,9,10]. В то же время характер метаболических сдвигов, происходящих в организме при значимых физических нагрузках и психоэмоциональном стрессе, изучен недостаточно подробно [2, 3, 6].

Экзаменационный стресс для студентов – достаточно сильный психофизиологический раздражитель с социально-детерминированной значимостью и важностью результата, выводящий многие системы организма из состояния равновесия на длительное время, что сохраняется и после

ответа по билету [1, 3, 10]. В связи с этим данная ситуация является удобной моделью для оценки психоэмоционального воздействия в том числе и на тезиокристаллоскопическую картину сыворотки крови [5, 11, 12].

В настоящее время известен ряд стандартизированных тестов, позволяющих изучать физическую работоспособность индивида [2, 7, 8]. Одним из наиболее распространенных среди них является тест PWC 170, позволяющий с учетом возраста, пола и уровня физической тренированности человека оценивать функциональные резервы организма в целом и кардиореспираторной системы в частности [2]. Более того, проба Physical Working Capacity (PWC), разработанная в Каролинском университете в Стокгольме Шестрандом в 50-х гг. XX в., еще в 1968 г. рекомендована ВОЗ для определения физической работоспособности человека. Данный метод (от английского Physics Working Capacity – «физическая работоспособность») заключается в определении мощности стандартной нагрузки, при которой частота сердечных сокращений (ЧСС) достигает 170 ударов в минуту. Его стандартизованность и предопределила возможность его применения в качестве модели значимой индивидуализированной физической нагрузки.

Целью исследования служила

оценка модификации кристаллогенных свойств сыворотки крови человека в условиях психоэмоционального и физического стресса.

Материалы и методы исследования. Проведена оценка кристаллогенной и иницирующей активности сыворотки крови 35 практически здоровых студентов-добровольцев (возраст 18-20 лет) до и после действия стрессирующего фактора, в качестве которого выступали физическая нагрузка и психоэмоциональный стресс – сдача курсового экзамена. В качестве модели физической нагрузки использовали тест PWC 170 в варианте велоэргометрической пробы. Мощность первой и второй нагрузок рассчитывали по таблицам с учетом антропометрических данных, возраста и пола испытуемых [2].

Для оценки влияния стресс-факторов у всех испытуемых трехкратно производили получение образцов крови: в спокойном состоянии (в межсессионный период), после выполнения физической нагрузки и непосредственно после сдачи курсового экзамена. Сыворотку крови из цельной крови получали стандартным методом путем центрифугирования. Для изучения кристаллогенных и иницирующих свойств биологической жидкости pripravляли микропрепараты по методике тезиокристаллоскопии [4-6]. Ба-

МАРТУСЕВИЧ Андрей Кимович – д.б.н., зав. лаб. Университетской клиники Приволжского иссл. мед. ун-та (г. Нижний Новгород), cryst-mart@yandex.ru; **КОВАЛЕВА Лида Константиновна** – к.б.н., ассистент кафедры Кубанского ГМУ (г. Краснодар), mziil43@mail.ru; **КОЗЛОВА Любовь Михайловна** – врач нефролог Нижегородской обл. дет. клиник. б-цы, glassonion88@gmail.com; **ФЕОФИЛОВА Мария Андреевна** – ассистент кафедры Медицинского института ТулГУ, masha_feofilova@mail.ru; **ГОЛЫГИНА Елена Сергеевна** – лаб.-иссл. Университетской клиники ПИМУ, leno4kagolygina@gmail.com.

зисным веществом в тизиграфическом тесте служил 0,9%-ный раствор хлорида натрия. Описание результатов собственного и инициированного кристаллообразования биологического субстрата производили с использованием системы полуколичественных параметров [5, 6]. Основными визуаметрическими показателями, оцениваемыми в балльной шкале, служили кристаллизуемость (Кр; отражает количественную сторону кристаллизации – плотность кристаллических элементов в фации), индекс структурности (ИС; характеризует сложность структуропостроения), степень деструкции фации (СДФ; представляет собой индикатор качественной стороны процесса – правильности образования структур) и выраженность краевой зоны микропрепарата (Кз).

Данные визуальной морфометрии микропрепаратов высушенной сыворотки крови дополнялись спектрометрическим исследованием кристаллоскопических и тизиграфических фаций, выполняемым на микроспектрофотометре PowerWave XS (США) при длинах волн 300, 350 и 400 нм. Для нивелирования влияния характеристик стекла на результаты спектрометрического исследования биокристаллов введена поправка на оптическую плотность самого материала (для кристаллоскопии) или контрольного образца базисного вещества, нанесенного на то же стекло (для тизиграфического теста).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программы Statistica 6.0.

Результаты и обсуждение. На основании полученных результатов выполнен сравнительный анализ влияния физической нагрузки и психоэмоционального напряжения на кристаллогенные и инициирующие свойства сыворотки крови. В частности, установлено, что указанные физиологические стрессоры способствуют существенному преобразованию собственного кристаллообразования рассматриваемой биологической жидкости (рис. 1 и 2).

При этом важно подчеркнуть, что направленность сдвигов по всем основным оценочным показателям при обоих вариантах воздействия аналогична, что обусловлено универсальностью стресс-ответа организма на раздражитель, однако выраженность смещения значения параметров неодинакова. Так, при выполнении теста PWC 170 изменения кристаллоскопической картины сыворотки крови были более

отчетливыми и включали усложнение структурной организации кристаллических элементов (за счет преобладания дендритных кристаллических образований с минимальным количеством одиночных структур), увеличение их плотности в фации в сочетании с нарастанием степени их деструкции. Это проявилось в статистически значимом приросте уровня индекса структурности, кристаллизуемости и параметра СДФ соответственно ($p < 0,05$). Кроме того, после осуществления велоэргометрической пробы наблюдали существенное расширение краевой зоны микропрепарата, приводящее к увеличению показателя выраженности последней (Кз), причем в этом случае указанная зона фации была шире не только по сравнению с фациями сыворотки крови, полученными в состоянии покоя, но и в условиях экзаменационного стресса ($p < 0,05$). С учетом того, что краевая зона микропрепарата формируется белковыми макромолекулами, можно предположить нарастание концентрации протеинов в биологической жидкости, поступающих в кровь при интенсификации метаболизма в мышечной ткани.

Согласно полученным результатам, эмоциональная нагрузка вызывает формирование менее значительных сдвигов морфологии кристаллограмм сыворотки крови (рис. 1). В частности, в условиях экзаменационного стресса наблюдали умеренную, но статистически достоверную тенденцию к усложнению организации кристаллических структур (по индексу структурности фации; $p < 0,05$), однако она была менее существенной, чем при выполнении физической нагрузки. В отношении кристаллизуемости биологической среды – показателя, характеризующего количественную сторону кристаллогенеза, – увеличение уровня параметра зарегистрировано лишь на уровне тенденции ($p < 0,01$).

При эмоциональном стрессе, как и после выполнения теста PWC 170, отмечали значимое расширение краевой зоны микропрепарата дегидратированной сыворотки крови ($p < 0,05$), но в этом случае оно было менее выраженным, чем при физической нагрузке. По нашему мнению, это может быть обусловлено трансформациями белкового спектра биологической жидкости без существенного изменения уровня общего белка в сыворотке крови испытуемых в предэкзаменационный период.

Зафиксированные методом визуаметрического анализа кристаллоско-

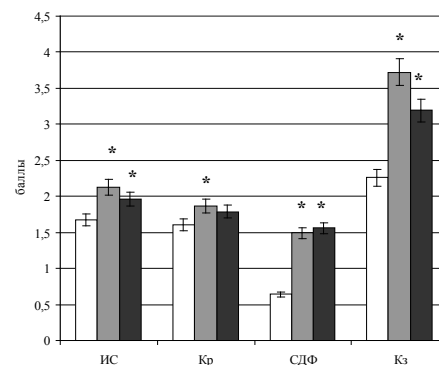


Рис. 1. Результаты визуаметрии кристаллограмм сыворотки крови здоровых людей при физической нагрузке и эмоциональном стрессе. На рис. 1 - 4 «*» – уровень статистической значимости различий по сравнению с показателем, характерным для состояния покоя $p < 0,05$. Условн. обозн.: □ - состояние покоя, ■ - физическая нагрузка, ■ - эмоциональный стресс

пических фаций сдвиги были верифицированы последующим их спектрометрическим исследованием при длинах волн 300, 350 и 400 нм (рис. 2). Установлено, что при обоих вариантах реализации стресса оптическая плотность кристаллограмм возрастает, причем в случае выполнения нагрузочного теста PWC 170 данная тенденция более отчетлива при всех использованных длинах волны, статистически значимо отличаясь как от уровня показателя, зарегистрированного в состоянии покоя, так и непосредственно перед сдачей экзамена ($p < 0,05$). Следует отметить, что повышение оптической плотности фаций в этих случаях обусловлено увеличением количества и усложнением кристаллических элементов, формирующих кристаллоскопическую картину биологической жидкости. Таким образом, спектрометрические данные позволяют подтвердить результаты визуаметрической оценки кристаллоскопических фаций в состоянии покоя и в условиях стресс-реакции.

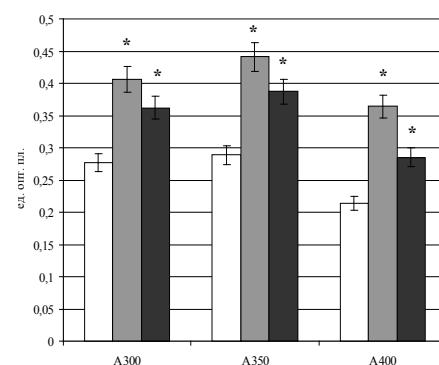


Рис. 2. Спектрометрия кристаллоскопических фаций сыворотки крови здоровых людей при физической нагрузке.

Также была проведена комплексная оценка инициирующих свойств сыворотки крови практически здоровых людей при реализации метаболического ответа на физическое напряжение и психоэмоциональный стресс. Выявлено, что, как и в отношении кристаллогенной активности биологического субстрата, в тизиграфическом тесте в условиях стресс-реакции наблюдали нарастание значений большинства визуаметрических параметров, однако степень выраженности данного тренда варьирует в зависимости от вида стрессирующего фактора (рис. 3). В частности, по уровню основного количественного показателя – тизиграфического коэффициента Q – непосредственно после физической нагрузки регистрировали нарастание инициаторного потенциала биосреды, о чем свидетельствовало значимое увеличение данного параметра ($p < 0,05$). Напротив, в предэкзамнационный период существенных сдвигов плотности кристаллических структур в тизиграмах сыворотки крови испытуемых людей не выявлено. Следует отметить, что значение рассматриваемого критерия после физического напряжения было выше, чем перед сдачей экзамена ($p < 0,05$). В то же время оба стрессирующих фактора способствовали усложнению формируемых кристаллических элементов в высушенных образцах биологической жидкости, на что указывало умеренное нарастание уровня кристалличности ($p < 0,05$ для обоих случаев). Аналогичная динамика имела место в отношении степени деструкции фазии – неспецифического маркера «правильности» кристаллообразования. По нашему мнению, характер изменения этих параметров отражает универсальный компонент метаболического стресс-ответа [6, 9].

Особенности формирования краевой зоны микропрепарата дегидрати-

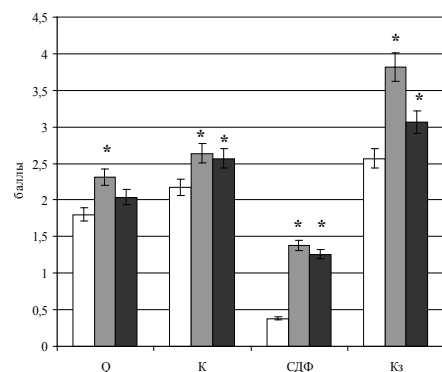


Рис. 3. Результаты визуаметрии тизиграмм сыворотки крови здоровых людей при физической нагрузке и эмоциональном стрессе.

рованной сыворотки крови при воздействии изучаемых стрессирующих факторов в целом аналогичны обнаруженным для основного тизиграфического коэффициента, но данный параметр статистически возрастает как после физической нагрузки, так и в предэкзамнационный период ($p < 0,05$). Это позволяет предполагать наличие перестроек протеома сыворотки крови при обоих исследуемых состояниях, причем при выполнении теста PWC 170 эти изменения выражены в большей степени ($p < 0,05$).

Приведенные сдвиги инициированного кристаллообразования сыворотки крови, как в случае кристаллоскопических фазий биологической жидкости, полностью подтверждаются результатами спектрометрического исследования (рис. 4). Так, при всех использованных длинах волны тизиграммы сыворотки крови демонстрируют более высокий уровень оптической плотности по сравнению с высушенными образцами биосреды, полученными от этих же людей в спокойном состоянии ($p < 0,05$). В то же время при длине волны 300 и 400 нм оптическая плотность фазий сыворотки крови испытуемых после физической нагрузки статистически значимо превышает таковую, характерную для предэкзамнационного периода ($p < 0,05$).

Заключение. В целом проведенное исследование продемонстрировало сопоставленность сдвигов кристаллогенных и инициирующих свойств сыворотки крови студентов при физической нагрузке и психоэмоциональном стрессе, однако выраженность модификации существенно варьирует. Это позволяет заключить, что тизео-кристаллоскопическая картина сыворотки крови человека является индикатором различных физиологических состояний, что находит отражение в изменениях морфологии высушенных

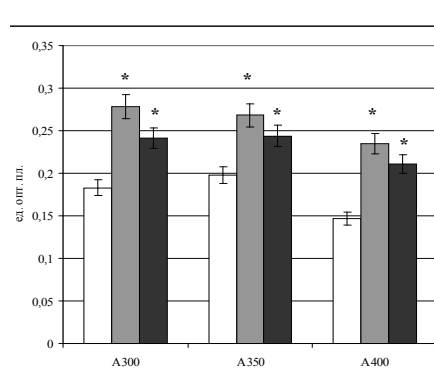


Рис. 4. Спектрометрия тизиграфических фазий сыворотки крови здоровых людей при физической нагрузке и эмоциональном стрессе.

микропрепаратов биожидкости, свидетельствующих о сдвигах качественно-количественного состава последней.

Литература

1. Дмитриева Т.Б. Социальный стресс и психическое здоровье / Т.Б. Дмитриева, А.И. Воложин. - М., 2001.
2. Дмитриева Т.Б. Social stress and mental health / Т.Б. Дмитриева, А.И. Воложин. - М., 2001.
3. Епифанов В.А. Лечебная физкультура и спортивная медицина / В.А. Епифанов. - М., 2007.
4. Epifanov V.A. Medical physical training and sport medicine / V.A. Epifanov. - М., 2007.
5. Жигулина В.В. Биохимический ответ на стресс (обзор литературы) / В.В. Жигулина // Тверской медицинский журнал. - 2015. - №1. - С. 10.
6. Zhigulina V.V. Biochemical response to stress (review) / V.V. Zhigulina // Tverskoi Meditsinskiy Zhurnal. - 2015. - №1. - С. 10.
7. Камакин Н.Ф. Современные подходы к кристаллоскопической идентификации состава биологических жидкостей / Н.Ф. Камакин, А.К. Мартусевич // Экология человека. - 2003. - №5. - С. 23-25.
8. Kamakin N.F. Modern methods of crystalloscopic identification of biological fluids composition / N.F. Kamakin, A.K. Martusevich // Ekologiya cheloveka. - 2003. - №5. - С. 23-25.
9. Мартусевич А.К. Биокристалломика в молекулярной медицине СПб / А.К. Мартусевич. - СПб; Тверь, 2011.
10. Martusevich A.K. Biocrystallochemistry in molecular medicine / A.K. Martusevich // Saint Petersburg - Tver. Triada, 2011.
11. Мартусевич А.К. Информативность исследования кристаллогенеза слюны спортсменов-лыжников в прогнозировании результативности их выступления / А.К. Мартусевич, Р.И. Сафарова // Вестник спортивной науки. - 2007. - № 4. - С. 27-32.
12. Martusevich A.K. Informativity of saliva crystallization study of skiers in forecasting the impact of their presentations / A.K. Martusevich., R.I. Safarova // Vestnik sportivnoi nauki. - 2007. - № 4. - С. 27-32.
13. Новые технологии оценки здоровья у практически здоровых людей / И.Б. Ушаков, О.И. Орлов, Р.М. Баевский [и др.] // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. - 2013. - №99 (3). - С. 313-319.
14. New technologies of health testing at healthy people / I.B. Ushakov, O.I. Orlov, R.M. Baevskii [et al.] // Rossiiskiy fiziologicheskii zhurnal imeni I.M. Sechenova. - 2013. - №99 (3). - С. 313-319.
15. Сорокин О.Г. Возможности и перспективы использования оценки адаптационного потенциала в практической медицине / О.Г. Сорокин, И.Б. Ушаков // Экология человека. - 2005. - №10. - С. 11-17.
16. Sorokin O.G. Possibilities and perspectives of the use of adaptive potential testing in practical medicine / O.G. Sorokin, I.B. Ushakov // Ekologiya cheloveka. - 2005. - №10. - С. 11-17.
17. Ушаков И.Б. Адаптационный потенциал человека / И.Б. Ушаков, О.Г. Сорокин // Вестник РАМН. - 2004. - №3. - С. 8-13.
18. Ushakov I.B. Human adaptation potential / I.B. Ushakov, O.G. Sorokin // Vestnik RAMN. - 2004. - №3. - С. 8-13.
19. Филаретова Л.П. Стресс в физиологических условиях / Л.П. Филаретова // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. - 2010. - №96 (9). - С. 924-935.
20. Filaretova L.P. Stress in physiological condi-

tions / L.P. Filaretova // Rossiiskiy fiziologicheskii zhurnal imeni I.M. Sechenova. – 2010. – №96 (9). – P. 924-935.

11. Shabalin V.N. Character of blood crys-

tallization as an integral index of organism homeostasis / V.N. Shabalin, S.N. Shatokhina, S.A. Yakovlev // Phys. Chem. Biol. Med. – 1995 - №2(1). – P. 6-9.

12. The informative-capacity phenomenon of drying drops / T.A. Yakhno, V.G. Yakhno, A.G. Sanin [et al.] // IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine. – 2004 - №24 (2). – P. 96-104.

Л.Б. Маснабиева

ОЦЕНКА ВКЛАДА ФАКТОРОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ И ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНА ИНТЕРЛЕЙКИНА-10 В ФОРМИРОВАНИЕ ЕГО СЫВОРОТОЧНЫХ УРОВНЕЙ

DOI 10.25789/YMJ.2019.66.03

УДК 575.167: 614.71

Проведено изучение вклада химической ингаляционной нагрузки и полиморфизмов гена интерлейкина-10 в формирование его сывороточных уровней у подростков. У школьников, проживающих в условиях различного уровня загрязнения воздушной среды, изучены полиморфные варианты -1082G/A, -592C/A, -819C/T гена *IL-10* и содержание его белкового продукта в крови. Установлено, что доминирующую роль в формировании сывороточного уровня *IL-10* у практически здоровых подростков играет загрязнение воздушной среды иммунотропными соединениями. Влияние полиморфизмов -592C/A, -819C/T гена *IL-10* на формирование его уровня проявляется в условиях высокой ингаляционной химической нагрузки.

Ключевые слова: полиморфизм гена, интерлейкин-10, подростки, загрязнение воздушной среды.

The contribution of chemical inhalation load and polymorphisms of the gene of interleukin-10 to the formation of its serum levels in adolescents was studied. The polymorphic variants -1082G / A, -592C / A, -819C / T of the *IL-10* gene and the content of its protein product in the blood were studied in schoolchildren, living under conditions of different levels of air pollution. It has been established that air pollution by immunotropic compounds plays the dominant role in the formation of the serum level of *IL-10* in healthy adolescents. The effect of the polymorphic loci 592C / A, -819C / T of the *IL-10* gene on the formation of its level is manifested in conditions of high inhalation chemical load.

Keywords: gene polymorphism, interleukin-10, adolescents, air pollution.

Введение. В настоящее время представлены убедительные данные о влиянии загрязнения воздушной среды на состояние здоровья населения, развитие патологии иммунной системы. При этом воздействие факторов внешней среды одинаковых по интенсивности и длительности в одних случаях приводит к развитию патологических процессов, в других – нет. Это обусловлено совокупностью ряда факторов, среди которых наиболее важными являются состояние организма в период воздействия и генетические особенности организма (предрасположенность или устойчивостью к развитию тех или иных заболеваний). Воздействие на организм неблагоприятных факторов окружающей среды в критические периоды его развития (становление и перестройки ряда систем в детском и подростковом возрасте) может вызвать развитие неадекватного ответа и стать причиной формирования патологии в дальнейшем.

В развитии компенсаторно-приспособительных реакций в ответ на воздействие внешних факторов иммунная система играет ключевую роль. В про-

цессе иммунного ответа происходит активация продукции про- и противовоспалительных цитокинов (интерлейкинов и интерферонов) [10]. Генетически обусловленное изменение уровня синтеза их белкового продукта может привести к снижению противоинфекционной защиты, развитию неадекватного воспалительного или аллергического процесса и обусловить возникновение патологии [2, 9, 13].

На основании вышеизложенного целью работы явилось изучение вклада полиморфизма гена интерлейкина-10 и химической ингаляционной нагрузки в формирование его сывороточных уровней у подростков.

Материалы и методы исследования. В соответствии с требованиями Комитета по биомедицинской этике обследование подростков проведено с письменного информированного согласия родителей (законных представителей). Проведено одномоментное обследование 650 школьников в возрасте $14,76 \pm 0,06$ лет, проживающих на территории Восточной Сибири в одинаковых климато-географических условиях, но при различных уровнях загрязнения атмосферного воздуха. На момент обследования подростки не имели обострения хронических заболеваний и острых респираторных инфекций. Обследованные школьники были разделены на группы в соот-

ветствии с персонифицированными индексами опасности (HI) нарушений иммунитета. При расчете HI была использована формула для оценки дозовой химической ингаляционной нагрузки [7], в которую были внесены персонифицированные данные школьников, информация о содержании химических соединений в атмосферном воздухе, воздухе жилых и учебных помещений [4]. Группу I составили 225 подростков с индивидуальными HI менее 2, группу II – 359 школьников с $2 \leq HI < 3$, группу III – 66 лиц с $HI \geq 3$.

Уровень интерлейкина-10 (*IL-10*) в сыровотке крови определяли методом иммуноферментного анализа в соответствии с инструкцией фирмы-производителя тест-системы («Вектор-Бест», Россия). Изучение полиморфных вариантов -1082G/A, -592C/A, -819C/T гена *IL-10* осуществляли методом ПЦР в режиме реального времени в соответствии с протоколом производителя наборов реагентов («Литех», Россия). Для генетических исследований использована ДНК, выделенная из лейкоцитов цельной крови реактивом «ДНК-экспресс» («Литех», Россия) модифицированным методом [1].

Оценку результатов проведенных исследований осуществляли в программе Statistica 6.0. Проверку на нормальность распределения количественных показателей в выборке

МАСНАБИЕВА Людмила Борисовна – д.б.н., с.н.с. ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований», masnavieva_ljuda@mail.ru.