

При подсчете показателей выживаемости с помощью программы TIBCO Statistica методом Kaplan-Meier можно отметить, что результаты при раке поджелудочной железы неудовлетворительные, что соответствует литературным данным [1].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Камарли, З. П. Анализ выживаемости больных раком поджелудочной железы по стадиям и месту жительства в Кыргызстане // «Вестник КРСУ», 2017. – Т. 17. – № 7. – С. 134 – 136.
2. Котельников, А. Г. Клинические рекомендации по диагностике и лечению злокачественных опухолей поджелудочной железы / А. Г. Котельников, Ю. И. Патютко, А. А. Тряпкин // общероссийский союз общественных объединений «Ассоциация онкологов России» – Москва, 2014. – 44 с.
3. Михайлов, И. В. Результаты хирургического лечения рака поджелудочной железы / И. В. Михайлов, В. М. Бондаренко, В. А. Кудряшов, Т. И. Пригожая, Н. Н. Подгорный, Г. М. Шимановский, В. И. Старинчик, С. В. Новак, А. В. Атаманенко, С. В. Довидович, О. В. Кравченко, Т. Н. Нестерович, С. Л. Ачинович / Журнал «Проблемы здоровья и экологии», 2014. – № 1 (39). – С. 46 – 51.

## АНАЛИЗ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ МЕМБРАН ЛИМФОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ ANALYSIS OF THE PHYSICAL AND CHEMICAL STATE OF LYMPHOCYTE MEMBRANES IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

**А. С. Ивашкевич<sup>1</sup>, И. В. Пухтеева<sup>1</sup>, Л. А. Малькевич<sup>2</sup>, Н. В. Герасимович<sup>1</sup>**  
**A. Ivashkevich<sup>1</sup>, I. Puhteeva<sup>1</sup>, L. Malkevich<sup>2</sup>, N. Gerasimovich<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ,  
г. Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,  
г. Минск, Республика Беларусь  
nvgerasimovich@mail.ru

<sup>1</sup>Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus

<sup>2</sup>Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

В работе проведен анализ физико-химического состояния мембран лимфоцитов больных ревматоидным артритом. Обнаружено, что у пациентов с ревматоидным артритом не наблюдается достоверных изменений показателей полярности различных областей мембраны. В то же время обнаружено, что микровязкость аннулярного липида плазматической мембраны лимфоцитов у больных ревматоидным артритом снижается в 2,5 раза по отношению к контрольным значениям у здоровых пациентов, а показатель микровязкости в области общего липидного бислоя увеличился на 25% по отношению к контрольным значениям. Величина степени тушения триптофановой флуоресценции пиреном у пациентов с ревматоидным артритом снижается на 35% по отношению к контролю.

This work reviewed and analyzed the physical and chemical state of the lymphocyte membranes of patients with rheumatoid arthritis. It was found that patients with rheumatoid arthritis did not show significant changes in the polarity of different areas of the membrane. At the same time discovered that annular lipid microviscosity of the plasma membrane of lymphocytes in patients with rheumatoid arthritis is reduced 2.5 times compared to control values in healthy patients, and the increased microviscosity in the General area of lipid bilayer was increased this by 25% in relation to control values. The value of the degree of quenching of tryptophan fluorescence by pyrene in patients with rheumatoid arthritis was reduced by 35% in relation to the control.

**Ключевые слова:** ревматоидный артрит, лимфоциты периферической крови, плазматическая мембрана, пирен, свободный ионизированный цитоплазматический кальций, Fura-2/AM.

**Keywords:** rheumatoid arthritis, lymphocytes of peripheral blood, plasmatic membrane, pyrene, cytoplasmic calcium, Fura-2/AM.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2020-2-63-66>

Ревматоидный артрит (далее—РА) — это заболевание, находящееся в фокусе внимания ревматологов всего мира в течение десятилетий. Это связано с большим медицинским и социальным значением этой болезни. Ее распространенность достигает 0,5–2% от общей численности населения в промышленно развитых странах [1].

У больных ревматоидным артритом наблюдается уменьшение продолжительности жизни по сравнению с общей популяцией на 3–7 лет [2]. Трудно переоценить колоссальный ущерб, наносимый этим заболеванием обществу за счет ранней инвалидизации пациентов, которая при отсутствии своевременно начатой активной терапии может наступать в первые 5 лет от дебюта болезни.

Патогенез заболевания весьма сложен и во многом недостаточно изучен. Несмотря на это, к настоящему времени хорошо известны некоторые ключевые моменты в развитии ревматоидного воспаления, которые определяют основные методы лечебного воздействия на него. Развитие хронического воспаления в данном случае связано с активацией и пролиферацией иммунокомпетентных клеток (макрофагов, Т- и В-лимфоцитов), что сопровождается выделением клеточных медиаторов — цитокинов, факторов роста, молекул адгезии, а также синтезом аутоантител (например, антицитруллиновых антител) и формированием иммунных комплексов (ревматоидные факторы). Эти процессы ведут к формированию новых капиллярных сосудов (ангиогенез) и разрастанию соединительной ткани в синовиальной оболочке, к активации циклооксигеназы-2 (ЦОГ-2) с повышением синтеза простагландинов и развитием воспалительной реакции, к выделению протеолитических ферментов, активации остеокластов, а в результате — к деструкции нормальных тканей суставов и возникновению деформаций [3].

Из патогенеза заболевания становится очевидным, что эффективно воздействовать на развитие заболевания можно на двух уровнях: подавляя избыточную активность иммунной системы и блокируя выработку медиаторов воспаления, в первую очередь простагландинов.

Изучение структуры и функции мембран в норме и при патологии существенно расширяет представления о механизмах возникновения и развития патологических процессов на уровне клетки и целого организма. Лимфоциты периферической крови представляют собой доступный объект для изучения процессов мембранной дисфункции так как они обладают высокой чувствительностью к действию апоптогенных и некрозогенных факторов, являются субстратом иммунного ответа. Также популяция лимфоцитов обладает динамичностью в связи с относительно непродолжительным пребыванием в кровеносной системе.

В связи с вышесказанным, целью данной работы являлось проведение анализа физико-химического состояния мембран лимфоцитов у больных с ревматоидным артритом.

Объектом исследования являлись лимфоциты периферической крови человека. Забор крови проводился как у здоровых доноров, так и людей с ревматоидным артритом.

В исследование была включена группа лиц из 15 человек (12 мужчин и 3 женщин) с диагнозом ревматоидный артрит в возрасте 30–45 лет. Условно контрольная группа состояла из 10 человек (5 мужчин и 5 женщин), в анамнезе которых не было сведений о заболевании ревматоидным артритом, а биохимический и общий анализы крови находились в пределах физиологической нормы.

Забор крови для исследований производили натощак после 12-часового голодания, в одно и то же время суток (утром), пункцией локтевой вены (самотеком). Лимфоциты выделяли согласно стандартной методике.

Исследование структурного состояния общей липидной фазы мембран осуществляли спектрофлуориметрически с использованием флуоресцентного зонда пирен (Sigma).

Пирен — гидрофобный флуоресцентный зонд, способный встраиваться преимущественно в неполярные области между жирнокислотными цепями фосфолипидов бислоя мембран. В возбужденном состоянии (после поглощения фотона) молекулы пирена сталкиваются с невозбужденными молекулами, объединяясь в долгоживущие ( $10^{-7}$  с) комплексы - эксимеры (димеры, состоящие из одной возбужденной и одной невозбужденной молекулы зонда), испускание квантов у которых смещено в более длинноволновую область по сравнению с мономером.

В работе проведен анализ степени эксимеризации пирена, эффективности тушения пиреном триптофановой флуоресценции, полярности окружения зонда в прибелковом липиде и липидном бислое мембран.

Внедрение зонда осуществляли, как описано в работе [4] путем прединкубации его спиртового раствора (4 ммоль/л) с клетками ( $1 \cdot 10^6$  кл/мл), находящимися в фосфатном буфере (рН 7,4). Конечная концентрация зонда в среде инкубации составляла 5 мкмоль/л. Регистрацию спектров флуоресценции осуществляли при длинах волн возбуждения 337 и 286 нм на спектрофлуориметре «СМ 2203» (СОЛАР, Республика Беларусь). Микровязкость липидного окружения пирена оценивали по отношению интенсивностей эксимерной и мономерной флуоресценции ( $J_2/J_1$ ) при  $\lambda_{эм.} = 475$  и 373 нм, соответственно. Микрополярность анализировали по отношению второго и первого вибрационных пиков ( $F_2/F_1$ ) в спектре флуоресценции мономеров с  $\lambda_{эм.} = 385$  и 373 нм при длинах волн возбуждения 337 и 286 нм, соответственно.

Все полученные результаты были обработаны статистически (Microsoft Excel 2016).

Как известно, важнейшая биологическая функция липидов — построение клеточных мембран. При образовании мембраны молекулы липидов ориентируются полярными группами («головками») наружу, а неполярными углеводородными концами («хвостами») внутрь. Образованный таким образом двойной слой определяет основное свойство мембран — их избирательную проницаемость. Изменения полярности липидного бислоя и аннулярного липида ведет к возможному нарушению их связывания, образованию «пробелов» в мембранах, а также к нарушению выполняемых функций. Показано, что структурное состояние липидного бислоя определяет процессы формирования мембран, гемолиз эритроцитов и разрушение плазматических мембран других клеток.

В первой серии экспериментов были проведены исследования показателей полярности аннулярного липида и липидного бислоя плазматических мембран лимфоцитов периферической крови. Как видно из данных, представленных на рисунке 1, у пациентов с ревматоидным артритом не было отмечено значимых различий показателей полярности плазматической мембраны лимфоцитов.

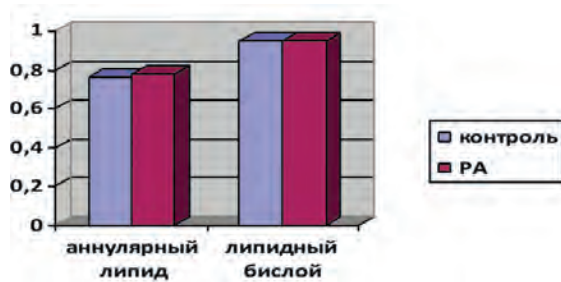


Рисунок 1 – Показатели полярности плазматической мембраны лимфоцитов периферической крови доноров контрольной группы и пациентов с ревматоидным артритом (РА)

Известно, что для нормального функционирования клетки необходим определенный уровень микровязкости липидного бислоя мембран, который поддерживается, прежде всего, путем направленного синтеза фосфолипидов с разным содержанием насыщенных и ненасыщенных жирных кислот, а также холестерина.

В связи с вышесказанным, во второй серии экспериментов были проанализированы показатели микровязкости различных областей плазматической мембраны лимфоцитов периферической крови (рис. 2).

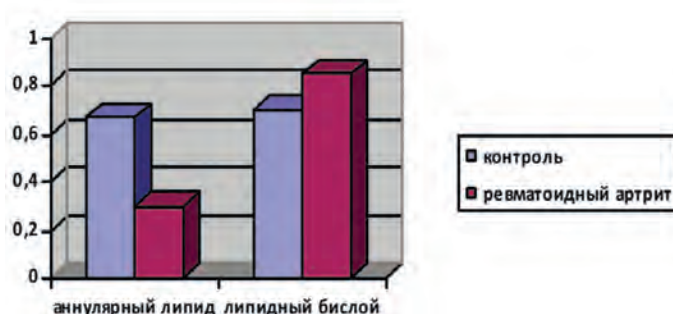


Рисунок 2 – Изменение на показателей микровязкости плазматической мембраны лимфоцитов периферической крови доноров при ревматоидном артрите (РА) по сравнению с контролем

В результате анализа данных экспериментов обнаружено, что микровязкость аннулярного липида плазматической мембраны лимфоцитов у больных с ревматоидным артритом снижается в 2,5 раза по отношению к контрольным значениям у здоровых пациентов.

Противоположный характер изменения был отмечен для показателей микровязкости в области общего липидного бислоя. У больных ревматоидным артритом установлено увеличение данного показателя на 25% по отношению к контрольным значениям.

Можно предположить, что установленное изменение динамического состояния мембран может повлечь за собой изменение активности мембраносвязанных ферментов, нарушить функционирование мембранных транспортных и сигнальных систем, рецепцию различных соединений, межклеточные и адгезивные взаимодействия мембран лимфоцитов. Дальнейшее изменение физико-химического состояния липидного матрикса обуславливает переход клетки на новый метаболический уровень и отражает дефектность иммунной системы у больных с ревматоидным артритом. Показано, что значительное повышение вязкости плазматической мембраны приводит к нарушению связей между клетками, развитию микроциркуляторной и иммунной дисфункции, что, в свою очередь, утяжеляет состояние больных с ревматоидным артритом.

Согласно данным, полученным в ходе исследования, можно предположить, что при системных заболеваниях, в частности, при ревматоидном артрите, происходят изменения структуры и свойств биологических мембран клеток крови организма. Общеизвестно, что основу целостности структурной и функциональной организации биологических мембран составляют белок-липидные взаимодействия. Можно предположить, что установленные изменения физико-химического состояния липидного компонента мембран лимфоцитов, а особенно показателей микровязкости, могут сказаться и на состоянии их белкового компонента, что должно отразиться на спектральной характеристике их триптофановых остатков. В связи с этим был проведен анализ степени тушения триптофановой флуоресценции пиреном у исследуемых групп пациентов (рис.3).

Как видно из рисунка 3, величина степени тушения триптофановой флуоресценции пиреном у пациентов с ревматоидным артритом снижается приблизительно на 35% по отношению к контролю.

Установленное изменение данного показателя может свидетельствовать о более плотной упаковке липидов, а также о более высокой степени контакта белков с липидами гидрофобной зоны в мембранах контрольных проб. В то же время наблюдаемое снижение степени тушения триптофановой флуоресценции пиреном в мембранах пациентов с ревматоидным артритом может быть связано как с процессами диссоциации или перестройками в молекулах белков, так и с погружением их в липидный бислой.

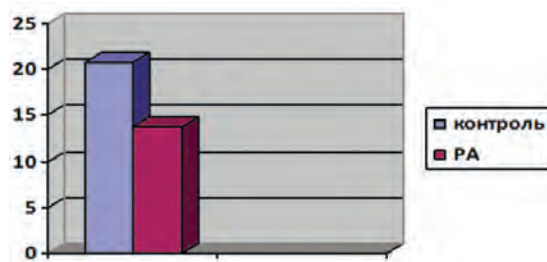


Рисунок 3 – Влияние ревматоидного артрита на показатели степени тушения белковой флуоресценции (в %) плазматической мембраны лимфоцитов периферической крови доноров

Согласно данным, полученным в ходе исследования, можно предположить, что при системных заболеваниях, в частности, при ревматоидном артрите, происходят изменения структуры и свойств биологических мембран клеток организма. При патологическом состоянии в мембранах лимфоцитов наблюдается нарушение микровязкости липидов на разной глубине липидного бислоя мембран, которое может сопровождаться модификацией структурно-функционального состояния мембранных белков. Данная реакция, по-видимому, имеет неспецифический характер, так как проявляется и при других заболеваниях (например ИБС, атеросклероз и т.д.). Установлено значительное снижение текучести плазматических мембран в зонах белок-липидных контактов, по сравнению с реакцией в липидном бислое. В ряде случаев степень выраженности изменений текучести плазматических мембран клеток крови была взаимосвязана с тяжестью течения заболевания. В отдельных работах было зафиксировано изменение поверхностного заряда плазматических мембран лимфоцитов с положительного на отрицательный, что свидетельствует об гиперполяризации мембран. Микровязкость (текучесть) мембраны сильно влияет на ее функционирование. При увеличении текучести мембрана становится более проницаемой для воды и других малых гидрофильных молекул, растет скорость латеральной диффузии интегральных белков, что может привести к значительному изменению скорости метаболизма клетки.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Клинические рекомендации. Ревматология/ под. ред. Е. Л. Насонова. – М.: ГЭОТАР - Медиа, 2006. – 288 с.
2. Насонов, Е. Л. Современные стандарты фармакотерапии ревматоидного артрита / Насонов Е. Л., Каратеев Д. Е., Чичасова Н. В., Чемерис Н. А. // Клиническая фармакология и терапия. – 2005. – Т. 14. – № 1. – С. 72–75.
3. Каратаев, Д.Е. О классификации ревматоидного артрита / Д.Е. Каратаев, Ю.А. Олюнин// Научно-практическая ревматология. – 2008. – №1. – С. 5-16.
4. Добрецов, Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран / Добрецов Г.Е., Владимиров Ю.А. М.: Наука. – 1980. – 320 с.

## СОЗДАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ КОНСТРУКЦИИ, СОДЕРЖАЩЕЙ ГЕН СУБЪЕДИНИЦЫ В ТЕРМОЛАБИЛЬНОГО АНАТОКСИНА *ESCHERICHIA COLI* ENGINEERING OF A GENETIC CONSTRUCTION CONTAINING SUBUNIT B OF THERMOLABILE *ESCHERICHIA COLI* ANATOXIN

**И. С. Казловский<sup>1</sup>, И. В. Бельская<sup>2</sup>, А. В. Соловьева<sup>3</sup>,  
А. И. Зинченко<sup>1</sup>, О. Н. Новикова<sup>3</sup>, Ю. Ломако<sup>3</sup>**

**I. Kazlouski<sup>1</sup>, I. Belskaya<sup>2</sup>, A. Soloveva<sup>3</sup>, A. Zinchenko<sup>1</sup>, O. Novikova<sup>3</sup>, Y. Lomako<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Институт микробиологии НАН Беларуси, г. Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>РПНЦ микробиологии и эпидемиологии, г. Минск, Республика Беларусь

<sup>3</sup>Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского, г. Минск, Республика Беларусь  
zinch@mbio.bas-net.by

<sup>1</sup>Institute of Microbiology, NAS, Minsk, Republic of Belarus

<sup>2</sup>The Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology,  
Minsk, Republic of Belarus

<sup>3</sup>Institute of Experimental Veterinary Medicine S.N. Vyshelesskogo, Minsk, Republic of Belarus

Получена генетическая конструкция pET42a-eLTb, основанная на коммерческом векторе pET42a(+), включающая в себя нуклеотидную последовательность гена eLTb, который кодирует субъединицу В термоллабильного анатоксина *Escherichia coli*. Полученная конструкция проверена на отсутствие мутаций