

районом по уровню общей заболеваемости для взрослого населения – Жабинковский район, а для детского населения – Дрогичинский и Ляховичский район. С самыми низкими показателями для детского населения является Ивановский район, а для взрослого – Столинский район. В ходе проведенного исследования было установлено, что у населения с низким медико-социальном уровне жизни и неблагоприятной экологической обстановкой наблюдается железодефицитная анемия.

Практическая значимость полученных исследований заключается в их необходимости для проведения социально-экологического мониторинга и выработки решений по улучшению диагностики, лечения и профилактики данного заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Воробьев, А. И. Руководство по гематологии: в 3 т. Т.3. ,3-е изд., перераб. и доп. / А.И. Воробьев. – М.: Ньюдиамед, 2005. – 416 с.
2. Госпитальная терапия: учебник / под ред. А.В. Гордиенко. – СПб.: СпецЛит, 2014. – 463 с.
3. Козарезова, Т. И. Болезни крови у детей: учеб. пособие / Т.И. Козарезова, Н.Н. Климкович. – Минск: Белорусская наука, 2001. – 383 с.
4. Кузник, Б. И. Клиническая гематология детского возраста / Б.И. Кузник, О.Г. Максимова. – Москва: ИЛ, 2011. – 316 с.
5. Коровина, Н. А. Железодефицитные анемии у детей / Н.А. Коровина, А.Л. Заплатников, И.Н. Захарова. – М.: Открытые системы, 1998. – 320 с.
6. Международная статистическая классификация болезней и проблем, связанных со здоровьем. Десятый пересмотр, т.1, ч.1.– С. 218-221. МКБ- 10. Всемирная организация здравоохранения, Женева, 1995.
7. Новицкий, В. В. Патолофизиология (в 2-х томах), 4-е изд., Т. 2. / В.В. Новицкий, Е.Д. Гольдберг, О.И. Урзава. – М.: ГЭОТАР - Медиа, 2009. – 640 с.

АНАЛИЗ ДЕЙСТВИЯ СВЕРХНИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР НА СОСТОЯНИЕ СИСТЕМ КАЛЬЦИЕВОГО ГОМЕОСТАЗА В КЛЕТКАХ КРОВИ ПРИ НАРУШЕНИИ ОБМЕННЫХ ПРОЦЕССОВ В ОРГАНИЗМЕ

ANALYSIS OF THE EFFECT OF ULTRA-LOW TEMPERATURES ON THE STATE OF CALCIUM HOMEOSTASIS SYSTEMS IN BLOOD CELLS IN DISTURBANCE OF EXCHANGE PROCESSES IN THE ORGANISM

Т. С. Семеенко¹, И. В. Пухтеева¹, Н. В. Герасимович¹, Л. А. Малькевич²
T. Semeenko¹, I. Puhteeva¹, N. Gerasimovich¹, L. Malkevich²

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

²Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск, Республика Беларусь
puhteeva@mail.ru

Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus
Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

В работе изучено влияние сверхнизких температур на состояние систем кальциевого гомеостаза в клетках крови при нарушении обменных процессов в организме. Было установлено, что при метаболических нарушениях в организме, происходят изменения текучести липидного компонента биологических мембран клеток организма. Метаболические отклонения в организме вызывают изменения гомеостаза ионов кальция в лимфоцитах периферической крови.

In the work was studied the influence of ultralow temperatures on the state of calcium homeostasis systems in blood cells in the event of metabolic disturbances in the body is studied. It was found that with metabolic disorders in the body, changes in the fluidity of the lipid component of the biological membranes of the body cells occur. Metabolic abnormalities in the body cause changes in the homeostasis of calcium ions in peripheral blood lymphocytes.

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

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

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2020-2-164-167>

Кальций – один из наиболее распространенных элементов живой материи. По относительному содержанию в организме млекопитающих он уступает лишь водороду, углероду, азоту, кислороду и натрию. Данный ион исключительно важен в биологических системах.

Ионы кальция участвуют в регуляции таких процессов как, например, мышечное сокращение, тромбообразование, выброс нейротрансмиттеров, образование микротрубочек, гормональные ответы, экзоцитоз, минерализация тканей, деление клеток, адгезия и рост клеток. При многих патологических состояниях было отмечено нарушение кальциевого гомеостаза.

Известно, что нарушения обмена веществ, патологии превращения, синтеза или расщепления белков, жиров, углеводов и других физиологически активных молекул выражаются широким спектром патологических состояний. [1].

Метаболические изменения могут являться следствием наследственных или приобретенных нарушений функций отдельных белков, мРНК, сигнальных путей и пр. Последствия этих нарушений могут быть замечены далеко не сразу [2].

Известно, что нарушения обмена веществ, патологии превращения, синтеза или расщепления белков, жиров, углеводов и других физиологически активных молекул выражаются широким спектром патологических состояний. Обычно о тех или иных метаболических изменениях говорят в широком смысле этого понятия, например, метаболический синдром, подагра, ожирение, диабет и пр. Однако, эти состояния являются совокупностью симптомов, за которыми лежат куда более сложные переплетения межмолекулярных взаимодействий на уровне отдельных клеток и их компонентов. В частности, отмечалось, что при многих системных заболеваниях, включая аутоиммунные, например, ревматоидный артрит, мембраны клеток изменяют свои физико-химические параметры [2].

Молекулярные механизмы составляют основу функционирования клетки, а их расстройства имеют следствием патологические состояния. Существенную роль при этом играет плазматическая мембрана клетки. В настоящее время заболевания сердечно-сосудистой системы, эндокринной и другой патологии могут рассматриваться как вариант мембранной патологии.

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. Одним из мощных факторов, повреждающих клеточные мембраны, является образование свободных радикалов, вызывающих в клетке неконтролируемые реакции.

Повышение или уменьшение концентрации ионов кальция в сыворотке и форменных элементах крови приводит к различным патологическим процессам. Биологические эффекты кальция реализуются с помощью следующих главных механизмов: взаимодействие с сократительными элементами, изменение проницаемости мембран для ионов, регуляция активности ферментов, реализация действия гормонов и цАМФ [3].

Модификация перераспределение ионов Ca^{2+} отмечается как важное звено патогенеза многих заболеваний. К таким заболеваниям относятся: сахарный диабет, ишемическая болезнь сердца (далее – ИБС), бронхиальная астма, артериальная гипертензия, заболевания опорно-двигательного аппарата [3].

В связи с этим целью данной работы является анализ действия сверхнизких температур на состояние систем кальциевого гомеостаза в клетках крови при нарушении обменных процессов в организме.

В исследование была включена группа лиц из 30 человек (11 мужчин и 19 женщин). Критериями включения в исследование лиц в качестве контрольной группы являлись отсутствие анамнестических данных об заболевании ревматоидным артритом, биохимический и общий анализы крови.

Объектом исследования являлись лимфоциты периферической крови человека.

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).

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 ($J_э/J_м$) 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.

Для измерения внутриклеточной концентрации ионов кальция [Ca^{2+}], использовали флуоресцентный зонд Fura-2/AM (Molecular Probes, SIGMA). Клетки отмывали в фосфатном буфере PBS (рН 7,4) и инкубировали с Fura-2 в течение 40 мин при $37^\circ C$, с последующей отмывкой в PBS (рН 7,4). Спектры флуоресценции записывали на флуориметре СМ 2203 (СОЛАР, Республика Беларусь). Измерение спектров флуоресценции ($\lambda_{эм.} = 510$ нм) проводили при $\lambda_{возб.} = 340$ и 380 нм. При этом анализировали параметры флуоресценции, когда практически все молекулы зонда находились в связанном и в свободном от кальция состоянии. Для этого использовали Triton-X100 (0,5% р-р) и избыток EGTA (10 ммоль/л) (рис. 1).

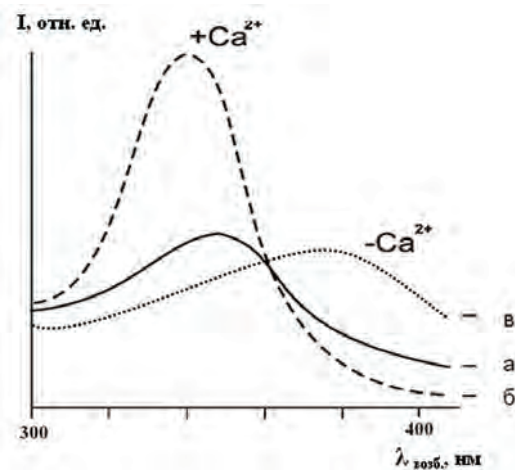


Рисунок 1 - Спектр флуоресценции Fura-2/AM [4]:
 а – спектр флуоресценции Fura-2/AM в среде инкубации клеток, содержащей 1 ммоль Ca^{2+} ;
 б – спектр флуоресценции Fura-2/AM после добавления Triton-X100;
 в – спектр флуоресценции Fura-2/AM после добавления EGTA

Анализ спектров флуоресценции для определения концентрации $[\text{Ca}^{2+}]_i$ проводили как описано в [5] по формуле:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = Kd \cdot \beta \cdot (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R).$$

Все полученные результаты были обработаны статистически (Microsoft Excel 2016). Значимость различий в группах оценивали по t-критерию Стьюдента при $p \leq 0,05$.

Важную роль в поддержании кальциевого гомеостаза в клетках играет плазматическая мембрана, в которой находятся системы, отвечающие за поступление ионов Ca^{2+} в клетку (при их недостатке в цитоплазме), а также за выведение данных ионов во внеклеточное пространство (при их избыточном накоплении в клетках) [6].

Предполагается, что в условиях *in vivo* изменения проницаемости мембранных компонентов невозбудимых клеток и, в частности, их митохондриальной мембраны могут принимать участие в быстром выходе излишка аккумулированного митохондриями кальция в цитозоль, а также участвовать в обмене низкомолекулярными протеинами между цитозолем и матриксом митохондрий. При этом увеличение неспецифической проницаемости внутренней мембраны митохондрий может играть важную роль как в физиологических, так и в патофизиологических условиях, в частности, в обеспечении быстрого выхода кальция из этих органелл и повышения концентрации ионов кальция в цитоплазме клеток [7].

По полученным спектрам флуоресценции зонда fura-2/AM были рассчитаны концентрации ионов цитозольного Ca^{2+} в лимфоцитах периферической крови доноров разного пола до и после криотерапии. Как видно из рисунка 2 как до криотерапии, так и после у мужчин после 35 лет наблюдалось значимое увеличение концентрации ионов кальция в цитоплазме лимфоцитов периферической крови приблизительно на 10-12%.

В то же время у мужчин в контрольной группе нами не было отмечено возрастных различий исследуемого показателя.

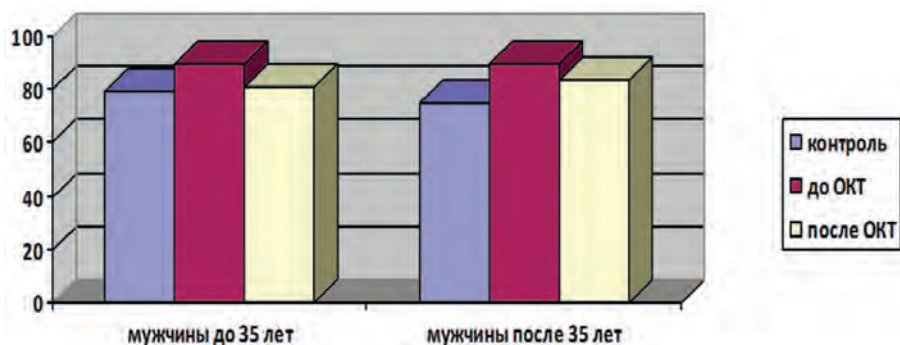


Рисунок 2 – Концентрация свободного ионизированного кальция в цитоплазме лимфоцитов периферической крови мужчин с метаболическими отклонениями после действия сверхнизких температур на состояние систем кальциевого гомеостаза в клетках крови (нмоль/л)

После действия сверхнизких температур на состояние систем кальциевого гомеостаза в клетках крови наблюдается тенденция к снижению уровня свободного внутриклеточного кальция по отношению к показателям, полученным при традиционном медикаментозном лечении. Однако, концентрация этого иона остается повышен-

ной по отношению к контрольным значениям (рис. 2). При этом зависимости изучаемого показателя от возраста отмечено не было.

При определении концентрации Ca^{2+} в лимфоцитах доноров-женщин контрольной группы у женщин после 35 лет было обнаружено увеличение данного показателя на 15%. Как видно из рисунка 3, в условиях до криотерапии и после в данной возрастной группе отмечался дополнительный рост содержания кальция в цитоплазме лимфоцитов приблизительно на 11%.

В то же время у женщин в возрасте до 35 лет до криотерапии отмечалось также увеличение концентрации ионов внутриклеточного кальция на 11%, а после криотерапии не было установлено изменения данного показателя.

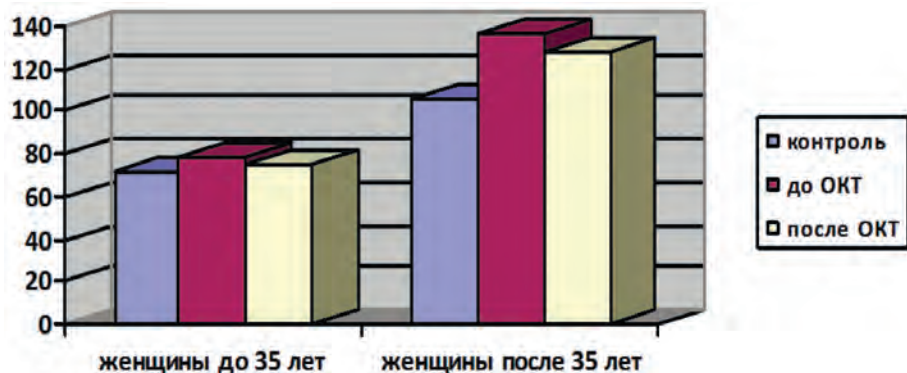


Рисунок 3 – Концентрация свободного ионизированного кальция в цитоплазме лимфоцитов периферической крови женщин с метаболическими отклонениями после действия сверхнизких температур на состояние систем кальциевого гомеостаза в клетках крови (нмоль/л)

Процедура общей криотерапии оказывала незначительный эффект: отмечено снижение концентрации ионов кальция в цитоплазме лимфоцитов по отношению к его значениям до лечения холодом, однако полученные значения превышают контрольные показатели на 15% (рис. 3).

Таким образом, проведенное исследование показало, что при измерении концентрации ионов кальция в цитоплазме лимфоцитов периферической крови до криотерапии и после у мужчин после 35 лет наблюдалось значимое увеличение показателя приблизительно на 10-12%. В то же время у мужчин в контрольной группе не было отмечено возрастных различий исследуемого показателя.

При определении концентрации Ca^{2+} в лимфоцитах доноров-женщин контрольной группы у женщин после 35 лет было обнаружено увеличение данного показателя на 15%. В условиях до криотерапии и после криотерапии в данной возрастной группе отмечался дополнительный рост содержания кальция в цитоплазме лимфоцитов на 10-12%.

Проведенные исследования показали, что общее состояние организма вызывает в клетках иммунной системы метаболические изменения, проявляющиеся в повышении уровня цитоплазматической концентрации ионов кальция. По мере увеличения возраста пациентов данный показатель увеличивается в большей степени.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дубинина, Е. Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клетки. Физиологические и клинико-биохимические аспекты. / Дубинина Е.Е. – СПб. : Изд-во «Медицинская пресса», 2006. – 400с.
2. Клинические рекомендации. Ревматология/ под. ред. Е. Л. Насонова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. – 288 с.
3. Manhas, N. Modelling the transition from simple to complex Ca^{2+} oscillations in pancreatic acinar cells / Manhas N., Sneyd J. Pardasani K.R. // J. Biosci. – 2014. – 39(3), June. – P. 463–484.
4. Добрецов, Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран / Добрецов Г.Е., Владимиров Ю.А. М.: Наука – 1980. – 320 с.
5. Gryniewicz, G. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties / G. Gryniewicz, M.Poenie, P.Y. Tsien // J. Biological chemistry. – 1985. – Vol. 260. – N. 6. – P. 3440-3450.
6. Авдонин, П. В. Рецепторы и внутриклеточный кальций / Авдонин П.В., Ткачук В.А. – Москва: Наука, 1994. – 228с.
7. Окопова, О. В. Высвобождение Ca^{2+} из митохондрий в условиях деполяризации митохондриальной мембраны / Окопова О.В., Сагач В.Ф. // Укр. біохім. журн. – 2005. – Т. 77. – № 5. – С. 62-89.