

Статистический анализ показал, что выживаемость всех опытных групп *D. magna* не снижается по сравнению с контролем независимо от сроков облучения. Наши результаты согласуются с данными литературы. Так, в работе [5] показано, что облучение личинок насекомых *Drosophila melanogaster* не влияло на дальнейшее развитие животных и выживаемость куколок.

Возможно, цитотоксический эффект протонного облучения *D. magna* проявится в изменении других, более чувствительных показателей, таких как плодовитость раков или отразится на жизнеспособности последующих поколений, что требует дальнейших исследований.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Савина Н. Б., Ускалова Д. В., Сарапульцева Е. И. Использование МТТ-теста для изучения отдалённых эффектов острого г-облучения у ракообразных *Daphnia magna* //Радиация и риск (Бюллетень Национального радиационно-эпидемиологического регистра). – 2018. – Т. 27. – №. 1. – С. 86–93.
2. Даренская Н. Г. Реакция кроветворной системы //Радиационная медицина. – 2004. – №. 4. – С. 295–307.
3. Гладилина И. А., Монзуль Г. Д., Нечушкин М. И., Курносов А. А. Роль лучевой терапии в программе комплексного лечения больных раком молочной железы //Опухоли женской репродуктивной системы. – 2005. – № 1. – С. 31–35.
4. Говорун Р. Д., Деперас-Каминьска М., Зайцева Е. М., Красавин Е. А., Мицын Г. В., Молоканов А. Г. Исследование хромосомных нарушений в клетках человека после облучения терапевтическим пучком протонов фазotronа Объединенного института ядерных исследований // Письма в ЭЧАЯ. – 2006. – Т. 3. – №. 1. – С. 92–101.
5. Nakajima K. et al. Fruit Fly, *Drosophila melanogaster*, as an In Vivo Tool to Study the Biological Effects of Proton Irradiation //Radiation research. – 2020. – Т. 194. – №. 2. – С. 143–152.

## ДЕЙСТВИЕ ОБЩЕЙ КРИОТЕРАПИИ НА СОСТОЯНИЕ БЕЛКОВОГО КОМПОНЕНТА ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН КЛЕТОК КРОВИ

### THE EFFECT OF CRYOTHERAPY ON THE STATE OF PEPTIDE COMPONENT OF PLASMATIC MEMBRANE OF BLOOD CELLS

**Н. В. Герасимович<sup>1,2</sup>, И. В. Пухтеева<sup>1,2</sup>,  
А. В. Ваканова<sup>1,2</sup>, М. Л. Левин<sup>1,2</sup>, Л. А. Малькевич<sup>3</sup>**  
**N. Gerasimovich<sup>1,2</sup>, I. Puhteeva<sup>1,2</sup>, A. Vakanova<sup>1,2</sup>, M. Levin<sup>1,2</sup>, L. Malkevich<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Белорусский государственный университет, БГУ г. Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>Учреждение образования «Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова» Белорусского государственного университета, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ, г. Минск, Республика Беларусь  
giv@iseu.by

<sup>3</sup>Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь

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

*<sup>2</sup>International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, ISEI BSU Minsk, Republic of Belarus*

*<sup>3</sup>Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus*

В работе установлено, что после проведения курса общей криотерапии степень тушения триптофановой флуоресценции пиреном снижается в плазматических мембранах лимфоцитов и тромбоцитов приблизительно на 35% и 50%, соответственно, по отношению к этим показателям в контрольной группе. Ранее было показано, что основной мишенью криовоздействия на клетки крови является липидный компонент биомембран. В частности, наблюдается переход липидов в более «жидкое» состояние, что, в свою очередь, в определенной степени оказывает влияние на структуру и функцию белков, а также липид-белковые взаимодействия. При кратковременном воздействии ультразвуковых температур на организм происходит общесистемное изменение функционирования стрессреализующих и адаптационных механизмов. Механизм адаптации к сверхнизким температурам связан с изменением физико-химического состояния биологических мембран клеток организма.

The paper found that after a course of general cryotherapy, the degree of extinguishing tryptophan fluorescence with pyrene decreases in the plasma membranes of lymphocytes and platelets by approximately 35% and 50%, respectively, in relation to these indicators in the control group. Previously, it was shown that the main target of cryotherapy on blood cells is the lipid component of biomembranes. In particular, there is a transition of lipids to a more «liquid» state, which,

in turn, to a certain extent affects the structure and function of proteins, as well as lipid-protein interactions. With short-term exposure to ultra-low temperatures on the body, a system-wide change in the functioning of stress-realizing and adaptive mechanisms occurs. The mechanism of adaptation to ultra-low temperatures is associated with a change in the physicochemical state of the biological membranes of the cells of the body.

**Ключевые слова:** лимфоциты периферической крови, эритроциты, тромбоциты, плазматическая мембрана, пирен, триптофановая флуоресценция.

**Keywords:** lymphocytes of peripheral blood, erythrocytes, platelets, plasmatic membrane, pyrene, tryptophan fluorescence.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2022-1-259-262>

Изучение механизмов индивидуальной устойчивости организма к неблагоприятному действию различных экологических факторов имеет большое социальное и медицинское значение.

В последнее время в связи с ухудшением экологической обстановки особый интерес представляет исследование реакций клеток на изменение параметров среды, в которой они находятся. Многие клетки реагируют на изменение условий среды включением внутренних адаптационных механизмов, которые еще до конца не исследованы. Причем указанные механизмы характеризуются выраженной функциональной специфичностью и, соответственно, клетки могут адекватно реагировать на разнообразные стимулы, включая изменение температуры.

Адаптивные реакции клеток носят как кратковременный, так и долговременный характер. В первом случае адаптация обеспечивается преимущественно мембранными механизмами, во втором – процессами биосинтеза, происходящими в клеточном ядре. В итоге устанавливаются новые режимы интеграции систем клеток, обеспечивающие необходимый уровень адаптации всего организма к новым экологическим условиям.

На сегодняшний день особую актуальность приобретает поиск молекулярных маркеров адаптационного воздействия на организм различных экологических факторов. Нерешенными также остаются вопросы, связанные с раскрытием механизмов их действия на состояние клеток крови организма.

Установлено, что использование метода криотерапии способствует повышению уровня работоспособности и адаптационных возможностей спортсменов и в целом организма любого человека. Эти проблемы на сегодняшний день являются актуальными и требуют дальнейшей более детальной разработки [1].

Анализируя значение различных структурных единиц мембран, определяющих ее функциональную активность, следует отметить их тесную взаимосвязь и взаимовлияние. Белки, находящиеся внутри мембраны, называют интегральными. Они погружены в гидрофобный липидный бислой своими гидрофобными белковыми участками, поэтому их нельзя удалить без разрушения самого липидного бислоя. В связи с этим интегральные белки можно отделить от липидов с большим трудом, применяя ионные и не ионные детергенты и органические растворители. Эти белки могут собираться в агрегаты или пронизывать мембрану и таким образом образовывать поры и каналы [2].

Таким образом, согласно современным представлениям биологические мембранные являются асимметричными и полифункциональными клеточными структурами. В основе многих биохимических процессов и функций, опосредованных ими, лежат сложные липид-белковые взаимодействия.

В связи с вышеизложенным, цель работы заключалась в анализе влияния криотерапии на состояние белкового компонента мембран различных клеток крови.

Объектом данного исследования являлись лимфоциты, эритроциты и тромбоциты периферической крови доноров, подвергшихся воздействию криотерапии. Сеансы общей криотерапии проводились в криоустановке «КриоСпейс» (ФРГ) на базе Республиканского центра спортивной медицины (г. Минск).

Продолжительность процедур общей криотерапии составила 10 сеансов. Пациенты сначала 30 секунд находились в первой камере, температура в которой составляла -60 °C. Затем переходили во вторую камеру с температурой -110 °C. Время пребывания в этой камере составило 3 минуты.

Заборы крови осуществляли сразу после окончания курса общей криотерапии. Для исследования кровь отбирали у добровольцев в пластиковые пробирки по 10 мл (в качестве антикоагуланта использовали гепарин в конечной концентрации 5 ЕД/мл крови).

Хорошим объектом для изучения изменений структуры и функции клеточных мембран являются такие клетки крови, как эритроциты. Для получения эритроцитарной пасты крови центрифугируют при 3000 об/мин в течение 7 мин. Осадок эритроцитов промывают переосаждением в изотоническом растворе NaCl (0,155 M), операцию повторяют 5 раз. Для выделения мембран эритроцитов проводят лизис клеток, используя 0,005 M калий-фосфатный буфер (pH 7.4). Далее эритроцитарные мембранные осаждают центрифугированием при 11 000 об/мин в течение 30 мин при 4°C, в последствии с помощью флуоресцентных зондов исследуют их структуру.

Выделение лимфоцитов периферической крови проводили, как описано в работе [3]. Для выделения лимфоцитов после забора крови пробирку с материалом отставали в течении 30-40 мин. при T=37 °C для оседания эритроцитов. В центрифужную пробирку объемом 10 мл вносили 2 мл смеси фиколл-верографина. С помощью пастеровской пипетки аккуратно, избегая перемешивания, насыпали плазму крови на градиент. Центрифугировали при 400g в течение 30 минут при температуре 20 °C для оседания эритроцитов. Затем по всей площади сечения пробирки, на границе раздела фаз собирали слой клеток (лимфоциты), перенося их в чистую центрифужную

пробирку. Собранныю фракцию клеток разбавляли приблизительно в 2 мл PBS (рН 7,4) и тщательно ресуспензировали мягким пипетированием. Центрифугировали при 400г в течение 10 минут. Надосадочную жидкость сливали, клетки ресуспензировали в 2 мл PBS. Отмывка клеток проводилась трижды. По окончании отмычки к осадку добавляли 1 мл PBS (рН 7,4) с последующим ресуспензированием. Подсчитывали клетки, разводили из расчета 10<sup>6</sup> кл/мл буфера PBS. Число жизнеспособных клеток, определенное по тесту с трипановым синим (0,2 % раствор красителя) составляло в контроле не менее 96 %.

Выделение тромбоцитов периферической крови осуществляли методом центрифугирования как в работе [4].

После получения соответствующей клеточной массы проводили загрузку зондом и регистрировали спектры флуоресценции.

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

Пирен – гидрофобный флуоресцентный зонд, способный встраиваться преимущественно в неполярные области между жирокислотными цепями фосфолипидов бислоя мембран.

В данном работе проведен анализ эффективности тушения пиреном триптофановой флуоресценции белков плазматических мембран клеток крови.

Внедрение зонда осуществляли, как описано в работе [5] путем прединкубации его спиртового раствора (4 ммоль/л) с клетками (1·10<sup>6</sup> 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, РБ).

Степень тушения пиреном триптофановой флуоресценции в плазматических мембранах клеток оценивали по формуле:

$$\tau = 1 - \frac{I_{330}^{286} (+\text{пирен})}{I_{330}^{286} (-\text{пирен})} \cdot 100\%,$$

где  $I_{330}^{286}$  + пирен – интенсивность флуоресценции белка после добавления зонда,  $\lambda_{\text{воз}} = 286$  нм;

$I_{330}^{286}$  - пирен – интенсивность флуоресценции белка в отсутствии зонда.

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

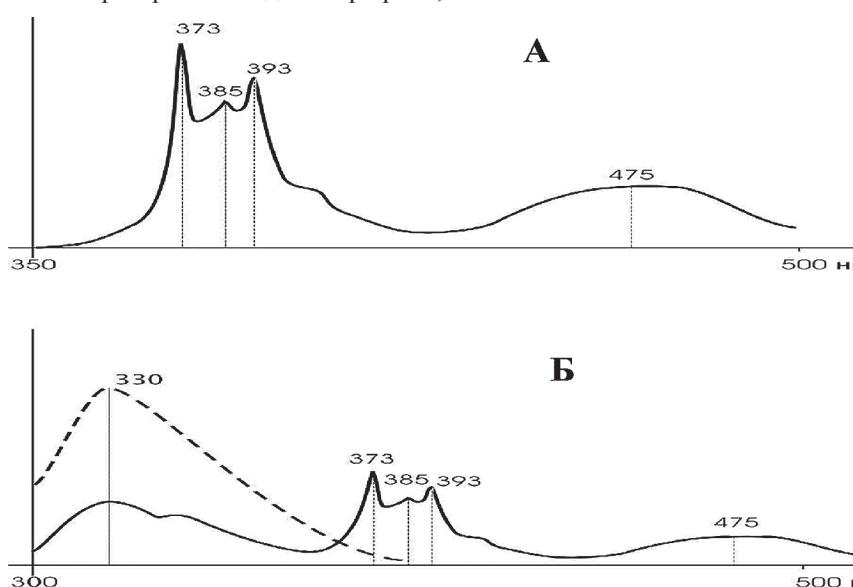


Рисунок 1 – Спектр флуоресценции пирена при  $\lambda_{\text{ext}} = 337$  нм (А) и  $\lambda_{\text{ext}} = 286$  нм (Б)

Современные представления о биологических мембранах, строящиеся на основе полученного к настоящему времени большого фактического материала, указывают на многообразие форм их функциональной специализации как в пределах одной клетки, так и в клетках различных тканей. Несмотря на это, основными органическими компонентами всех клеточных мембран являются белки, липиды, углеводы. Поскольку остатки углеводов всегда связаны либо с белками (гликопротеиды) либо с липидами (гликолипиды), то можно считать, что мембра на построена из белков (содержащих гликопротеиды) и липидов (в состав которых входят гликолипиды) [2, 3].

Удобным объектом для изучения изменений структурно-функциональных особенностей клеточных мембран являются клетки крови, такие как эритроциты. Об эритроцитах человека известно гораздо больше, чем о любой другой мемbrane эукариотической клетки. Поэтому легко судить о тех или иных изменениях на примере эритроцитов [3]. Культура лимфоцитов человека представляет собой простую и вместе с тем уникальную по своим свойствам модель для биологических исследований. К числу основных достоинств лимфоцитов можно отнести простоту и доступность получения исходного материала и вместе с тем высокую концентрацию клеточной популяции: в 1 мл крови содержится (1-3) · 10<sup>6</sup> лимфоцитов.

Исследование показателей, характеризующих состояние белкового компонента плазматических мембран клеток крови, позволило установить некоторые различия в состоянии белков плазмалеммы тромбоцитов по отношению к аналогичным показателям для лимфоцитов и эритроцитов периферической крови в контроле (таблица).

*Таблица – Влияние общей криотерапии на показатели эффективности тушения пиреном триптофановой флуоресценции плазматических мембран клеток периферической крови*

Тип клеток	Степень тушения белковой флуоресценции до воздействия курса общей криотерапии, %	Степень тушения белковой флуоресценции после воздействия курса общей криотерапии, %
Лимфоциты	$38,59 \pm 4,28$	$25,37 \pm 3,54^*$
Эритроциты	$53,44 \pm 5,30$	$44,33 \pm 6,8$
Тромбоциты	$28,09 \pm 3,80$	$15,32 \pm 2,45^*$

\* - результаты статистически значимы при  $p \leq 0,05$

Как видно из результатов, приведенных в таблице, эффективность тушения белковой триптофановой флуоресценции пиреном в плазматических мембранах тромбоцитов до воздействия криопроцедур в 2-2,5 раза ниже, чем аналогичный показатель для лимфоцитов и эритроцитов. Установленный факт подтверждает данные о различиях в структурном состоянии плазматических мембран клеток в зависимости от выполняемых ими функций [2].

Далее было исследовано воздействие общей криотерапии на состояние белкового компонента плазматических мембран различных клеток крови. Как видно из результатов, представленные в таблице в ходе исследования было установлено, что после воздействия степень тушения триптофановой флуоресценции пиреном снижается в лимфоцитах и тромбоцитах приблизительно на 35 и 50%, соответственно, по отношению к этим показателям в контрольной группе.

Можно предположить, этот эффект обусловлен изменением белок-липидных взаимодействий в плазматических мембранах указанных клеток. Необходимо отметить, что ранее при исследовании микровязкости липидного компонента плазматических мембран лимфоцитов периферической крови было отмечено достоверное снижение после криотерапии этого показателя в области аннулярных липидов более чем в 2,5 раза по сравнению с его исходной величиной.

Таким образом, можно утверждать, что криотерапевтическое воздействие вызывает в организме процесс автокоррекции, при котором выявляются и удаляются отклонения от физиологической нормы. Применение криотерапии в различных областях показало, что эта методика оказывает на организм не специфическое стимулирующее действие.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Баранов, А.Ю. Лечение холодом. Криомедицина./ А. Ю. Баранов, В. Н. Кидалов– Санкт-Петербург. – 2002. – С. 291.
2. Геннис, Р. Биомембранные. Молекулярная структура и функции биологических мембран / Р. Геннис. – М.: Мир, 1997 – 624с.
3. Лимфоциты: Методы: Пер. с англ. / Под ред. Дж. Клауса. – М.: Мир, 1990. – 400 с.
4. Самаль, А.Б. Агрегация тромбоцитов: методы изучения и механизмы / А.Б. Самаль, С.Н. Черенкевич, Н.Ф. Хмара– Мин: Вышэйшая школа, 1990. – 104 с.
5. Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М.: Наука, 1980. – 270 с.

#### МЕТОДИКА ИЗМЕРЕНИЙ МАССОВЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ АГИДОЛА-40, АЦЕТОФЕНОНА, ВУЛКАЦИТА, СУЛЬФЕНАМИДА Ц В ВОДНЫХ ВЫТЯЖКАХ ИЗ ТОВАРОВ ПОТРЕБЛЕНИЯ

#### MEASUREMENT METHOD OF AGIDOL-40, ACETOPHENONE, VULCACIT, SULPHENAMIDE C MASS CONCENTRATIONS IN WATER EXTRACTS FROM CONSUMER GOODS

**А. А. Кузовкова, М. С. Турко, Т. П. Крымская**  
**A. Kuzovkova, M. Turko, T. Krymskaya**

Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр гигиены»,  
г. Минск, Республика Беларусь  
zav\_lsi@rspch.by

*Republican unitary enterprise “Scientific practical centre of hygiene”*  
*Minsk, Republic of Belarus*