

ОЦЕНКА РЕАКЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ИНКУБАЦИИ С МЕТАЛЛОДЕКСТРАНАМИ МЕТОДОМ ЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО МИКРОСПЕКТРАЛЬНОГО АНАЛИЗА

А. И. Выговская, Е. В. Воробей

(Учреждение образования «Могилевский государственный университет имени А. А. Кулешова»,
кафедра спортивных и медико-биологических дисциплин)

*Люминесцентный микроспектральный анализ позволяет получить целостную картину о взаимодействиях, происходящем в ядре и цитоплазме лимфоцитов периферической крови. В работе представлены результаты влияния металлодекстрановых препаратов спейсферрона и рондферрина на микроспектральные параметры лимфоцитов периферической крови в экспериментальном исследовании *in vitro*.*

Люминесцентный микроспектральный анализ лимфоцитов проводился на двухволновом микрофлуориметре-фотометре ДМФ-2 на базе люминесцентного микроскопа «Люмам», разработанном в Институте биофизики РАН. Все образцы крови исследованы при прижизненном окрашивании клеток акридин-оранжем, забуференным фосфатным буфером с $\text{pH}=7,2$ [2].

Окрашивание препаратов акридин-оранжем приводит к связыванию этого красителя с дезоксирибонуклеопротеином и появлению зеленой флуоресценции с пиком на длине волны 530 нм. Этот феномен обусловлен прочным связыванием красителя в форме мономеров с сайтами ДНК, обедненными гистонами, то есть, по существу, с сайтами с активной экспрессией генетического материала. В то же время связывание этого красителя с рибонуклеопротеином происходит в форме полимеров красителя с пиком флуоресценции на длине волны 640 нм.

Использование акридин-оранжа в исследовании фиксированных клеток позволяет оценить определенные структурно-функциональные свойства ДНК и РНК по интенсивности свечения на обеих длинах волн. Однако наибольший интерес представляет отношение интенсивности свечения на длинах волн 640 нм/530 нм, так как это отношение в целом характеризует отношение количества РНК к ДНК и отража-

ет синтетический потенциал клеток, то есть является интегральным показателем клеточной активности. Следует отметить, что для нейтрофильных гранулоцитов крови нормальный диапазон этого параметра выше, чем для мононуклеаров. Это связано с тем, что, как высокодифференцированные, клетки НГК, согласно классическим представлениям, содержат меньшее число активно экспрессируемого генетического материала, в достаточном количестве имеют накопленную мРНК, но главным отличием является более дифференцированный лизосомально-сегрегационный аппарат НГК, тогда как красное свечение цитоплазмы лимфоцитов в большей степени обусловлено именно РНК.

Однако люминесцентный микроспектральный анализ лимфоцитов имеет и свои недостатки. Прежде всего, это связано с невозможностью получения фенотипической информации и, таким образом, принадлежности лимфоцитов к той или иной субпопуляции.

Объектом исследования явились лимфоциты периферической крови. Для анализа использовались 50 клеток. Для отдельно взятой клетки оценивались:

- интенсивность зеленой флуоресценции на длине волны 530 нм;
- интенсивность красной флуоресценции на длине волны 640 нм;
- отношение интенсивности красного свечения к зеленому.

Результаты и их обсуждение. Кратковременная инкубация препарата с образцами крови в эксперименте с неорондексом показала, что микроспектральные параметры лимфоцитов крови статистически значимо не изменились. При продолжении инкубации образцов крови с декстраном только после длительного (180 мин) эксперимента зарегистрированы умеренное снижение функциональной активности клеточных ядер, ИКС и отношения ИКС/ИЗС [1].

Иная микрофлуориметрическая картина наблюдалась при инкубации образцов крови с обоими металлодекстранами.

По результатам исследования реакций лимфоцитов при проведении эксперимента со спейсферроном ИЗС с увеличением времени инкубации в значительной степени ослабевает, и, поскольку основным источником зеленой флуоресценции являются ядра клеток (прежде всего несвязанная с гистонами ДНК), следует думать о снижении в них синтетических процессов. Отмечается и рост ИКС, который также регистрируется уже после 60 мин инкубации и нарастает при продолжении эксперимента, что может указывать на сегрегацию препарата именно в этой части лимфоцитов и возможное дальнейшее накопление флуорохрома. Отношение параметров ИКС к ИЗС прогрессивно снижается, причем степень его снижения, в свою очередь, указывает на глубокую депрессию клеточного функционирования.

При инкубации с рондферрином также обнаружено снижение интенсивности зеленого свечения, однако, после продолжительного эксперимента ИЗС стала даже меньше, чем при инкубации со спейсферроном. При оценке красной флуоресценции после инкубации с рондферрином зарегистрирован ее рост, статистически значимо превышающий ИКС при инкубации со спейсферроном.

Это различие привлекает внимание, поскольку при тенденции к угнетению функционирования ядер лимфоцитов активация лизосомального аппарата лимфоцитов намного более выражена. Это свидетельствует об очень активной сегрегации и метаболизме препарата в лизосомальном аппарате лимфоцитов.

Следовательно, введение МД в образцы крови в отличие от «чистого» декстрана приводит к дисфункции лимфоцитов, основными чертами которой являются: снижение функциональной активности ядерных процессов и активация лизосомального аппарата. Сами по себе эти процессы требуют более детальных исследований.

Таким образом, наибольшие и однотипные изменения оба металлодекстрана вызывают в лизосомальном аппарате лимфоцитов, что проявляется увеличением интенсивности красного свечения, что может быть связано с интернализацией препаратов железа и включением их в дальнейший метаболизм [3; 4]. При использовании спейсферрона наблюдается снижение функциональной активности лимфоцитов при вероятной аккумуляции МД в лизосомальном аппарате, что может быть связано с противостоянием оксидативному стрессу, тогда как при введении рондферрина наблюдается функциональная активация лимфоцитов.

Литература

1. Выговская, А. И. Структурно-функциональные реакции лимфоцитов при исследовании металлодекстранов рондферрина и спейсферрона *in vitro* / А. И. Выговская // XI Съезд Белорусского общества физиологов, Минск, 21–22 сент. 2006 г. / БГУ, Ин-т. физиологии НАН Беларуси; ред. сов.: В. Н. Гурин [и др.]. – Минск, 2006. – С. 24.
2. Карнаухов, В. Н. Люминесцентный спектральный анализ клетки / В. Н. Карнаухов. – М.: Наука, 1978. – 209 с.
3. Chronic Iron Administration Increases Vascular Oxidative Stress and Accelerates Arterial Thrombosis / Sh. M. Day, Damon Duquaine BS; Lakshmi V. et al. // *Circulation*. – 2003. – Vol. 107. – P. 2601–2607.
4. Rooyackers, T. M. Ferric saccharate induces oxygen radical stress and endothelial dysfunction *in vivo* / T. M. Rooyackers, E. S. Stroes, M. P. Kooistra // *Eur. J. Clin. Invest.* – 2002. – Vol. 32. – P. 9–16.