

**МОРФОДЕНСИТОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ ХРОМАТИНА
НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ КРОВИ ПРИ ИНКУБАЦИИ С
МЕТАЛЛОДЕКСТРАНОМ «СПЕЙСФЕРРОН» *IN VITRO***

А. И. Выговская

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

В работе проведен анализ возможных структурно-функциональных изменений интерфазного хроматина нейтрофильных гранулоцитов крови при экспериментальном исследовании влияния металлодекстрана спейсферрона in vitro.

При исследовании влияния металлодекстрана (МД) спейсферрона и рондферрина *in vitro* нами были

обнаружены отчетливые функциональные реакции нейтрофильных гранулоцитов крови (НГК), связанные с изменением активности как ядерного, так и лизосомального аппарата этих клеток, и изменения фагоцитарной активности [1-3]. Анализ структурно-функциональных реакций хроматина НГК как высокоспециализированных клеток (с уже реализованным запуском апоптотической программы) при введении МД *in vitro* с учетом изложенного представляет огромный интерес, и явился целью настоящего исследования.

Материалы и методы. Объект исследования – 40 образцов венозной крови здоровых добровольцев. Разработана оригинальная методика исследования: спейсферрон добавлялся в образцы крови *in vitro* (из расчета 10.0 мкл/мл образца) с последующей инкубацией в пластиковых трубах при 37°C и оценкой структурно-функциональных реакций хроматина через 60 и 180 мин от начала эксперимента. Структурно-функциональные реакции хроматина НГК оценивались с помощью метода компьютерной морфоденситометрии (МДМ) [4, 5]. Видеотехнология МДМ реализована на АПК «ДиаМорф» («ДиаМорф», Москва). Исследовались ядра НГК в стандартных мазках на предметных стеклах, обработанных РНКазой в растворе сахарозы и окрашенных галлоцианин-хромовыми квасцами. Интерфазный хроматин подразделялся на 4 компоненты, две из них относятся к конденсированному (гетеро-) хроматину; и две к неконденсированному (эу-) хроматину. Наиболее темная, гранулярная компонента гетерохроматина обозначена q1; более светлая перигранулярная компонента – q2; наиболее светлая компонента эухроматина – q4. Оценивались следующие параметры: QUOT – доля компоненты в ядре; OTN – отношение площади плотного хроматина к площади рыхлого, AREAN – площадь ядра; PERN – периметр ядра; IODN – интегральная оптическая плотность ядра; ODN – оптическая плотность ядра; STDODN – контрастность ядра.

Результаты. При исследовании популяции НГК регистрируются отчетливые изменения хроматина на уровне ядер в целом уже при кратковременном эксперименте. Обнаруживается тенденция к сокращению размеров ядер, которая при продолжении исследования характеризуется уменьшением площади (AREAN, $p=0.027$) и периметра (PERN, $p=0.037$). Изменяется и долевое участие различных компонент хроматина: отмечается четкий рост доли наименее активного гетерохроматина QUOT1, тогда как доля более активного гетерохроматина QUOT2 не изменяется. Представляет интерес тот факт, что с увеличением QUOT1 при кратковременном эксперименте обнаружен и достоверный рост доли наиболее активного эухроматина QUOT4 ($p=0.034$). Увеличение времени инкубации со спейсферроном приводит к некоторому снижению QUOT1, однако, этот параметр остается статистически значимо более высоким по сравнению с исходным значением. В то же время, доля эухроматина к концу эксперимента приходит к исходной, что указывает на кратковременный характер активации эухроматина, а отношение гетеро- к эухроматину неуклонно возрастает, что может свидетельствовать об усилении апоптотических процессов в ядрах НГК.

Обсуждение. Наблюдаемая биполярная активация как гетеро-, так и эухроматина отражает, вероятно, всего, активацию экспрессии генов, кодирующих запуск транскрипционного контроля генетически программируемой гибели, поскольку активация эухроматина при продолжении эксперимента сменяется достоверным сокращением ядер, сохранением увеличенной контрастности и ростом отношения гетеро- к эухроматину, что как раз и соответствует прогрессированию апоптотических процессов на уровне хроматина НГК. Это положение представляет определенный интерес, поскольку результаты проведенного исследования противоречат широко распространенному мнению о низкой активности генетического аппарата НГК и, напротив, свидетельствуют о достаточно высокой интенсивности эпигенетических процессов в ядрах [2, 5].

Следует еще раз обратить внимание на тот факт, что активация хроматина НГК является кратковременной (реализуется немедленно). Это следует учитывать: не исключено, что эти изменения могут быть зафиксированы и раньше, чем через 60 мин. Полученная МДМ картина свидетельствует о возможности прямых генотоксических эффектов в результате лизосомальной деградации спейсферрона с высвобождением катионов Fe^{2+} и особенно Co^{2+} (поскольку последний хорошо моделирует гипоксические состояния и запускает каскад транскрипционных процессов) [6–8].

Литература

1. Выговская, А. И. Функциональные реакции нейтрофильных гранулоцитов крови на введение металлодекстранов рондферрина и спейсферрона *in vitro*: внутриклеточный оксидативный стресс? // А. И. Выговская / XI Съезд Белорусского общества физиологов, – Минск, 21–22 сентября 2006 г. : тез. докл. – Минск, 2006. – С. 23.
2. Тепляков, А. И. Топография интерфазного хроматина нейтрофильных гранулоцитов крови при атеросклерозе: еще одно подтверждение активной экспрессии генов для завершения ими функциональной программы / А. И. Тепляков // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2004. – № 2. – С. 40–43.
3. Воробей, Е. В. Структурно-функциональные реакции и внутриклеточные взаимодействия нейтрофилов при инкубации с металлодекстрановым препаратом «Спейсферрон» *in vitro* / Е. В. Воробей, А. И. Выговская // Физическая культура, спорт, здоровый образ жизни в XXI веке : сб. науч. статей Междунар. науч.-практич. конф., 13–14 декаб. 2022 г. / [под ред. О. Л. Борисова, А. А. Антипенко]. – Могилев : МГУ имени А. А. Кулешова, 2023. – С. 54–59.

4. Ostapenko, V. A. Use of Computer TV morphodensitometry to study epigenetic changes in blood lymphocytes from children affected by low doses irradiation / V. A. Ostapenko, E. V. Prishchepova, S. M Ostapenko. Et al. // Stem Cells. – 1997. – V. 15. – P. 103–109.

5. Teplyakov, A. I. Chromatin image analysis provides new evidence of the relation of lymphocytes to cytokines and sCAM in the inflammatory nature of atherosclerosis / A. I. Teplyakov, A. V. Pryshepova, T. I. Chegerova // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 2001. – V. 947. – P. 377–381.

6. Guidebook to Cytokines and Their Receptors / Edit. by Nicola N. –Oxford: A Sambrook and Tooze Publication and Oxford University Press. – 1994. – 26 p.

7. Тепляков, А. И. Анализ про-и антиатерогенного действия экзогенного TGF- β : что установлено? / А. И. Тепляков // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2004. – № 2. – С. 95–98.

8. Detection by the comet assay of apoptosis induced in lymphoid cell lines after growth factor deprivation / M. Florent, T. Godard, J. J. Ballet et al. // Cell. Biol. Toxicol. – 1999. – V. 15. – P. 185–192.