

1. Пероральное введение коллоидного раствора Se крысам с индуцированным аллоксановым диабетом приводит к снижению уровня глюкозы и гликированного гемоглобина по сравнению с показателями нелеченных животных.

2. Пероральное введение коллоидного раствора Se у крыс с индуцированным аллоксановым диабетом способствует уменьшению степени повреждения островкового аппарата поджелудочной железы, что выражается в увеличении клеточности и размеров площади панкреатических островков.

3. Использование наночастиц Se в качестве перспективного противодиабетического средства требует дальнейших исследований.

Список литературы:

1. Патент РФ № 2013125897/14, 04.06.2013. Способ моделирования аллоксанового диабета // Патент России №2534411. 2014. Бюл. № 33. / Данилова И.Г., Гетте И.Ф., Булавинцева Т.С.

2. Колокольцев В.Н. Получение водного коллоидного раствора селена путем механического диспергирования / В.Н.Колокольцев, Г.Э. Фолманис, М.А. Федотов // Физика и химия обработки металлов. - 2019. - №2. - С. 70-76

3. Кузьмин П.Г. Наночастицы, полученные при лазерной абляции селеновой мишени в воде, и их биодоступность / П.Г.Кузьмин, Г.А. Шафеев, В.В.Воронов и др. // Квантовая электроника. - 2012. - Т. 42, № 11. - С. 1042–1044

4. Kim J. Association between Serum Selenium Level and the Presence of Diabetes Mellitus: A Meta-Analysis of Observational Studies Clinical Diabetes & Therapeutics Diabetes / J. Kim, H.S.Chung, M.K.Choi, Y.K. Roh, H.J. Yoo // Metabolism Journal. – 2019. - №43. – P. 447-460

5. Santi C. Celebrating two centuries of research in selenium chemistry: state of the art and new prospective / C. Santi, L. Bagnoli // Molecules. - 2017. - №12. - P.2124-2128

6. Zhou J. Selenium and diabetes-evidence from animal studies / J. Zhou, K. Huang, X.G. Lei // Free Radical Biology and Medicine. – 2013. - №65. – P.1548-1556.

УДК 577.334; 577.3' 32/. '36; 616.15

¹Тамашевский А.В., ¹Гармаза Ю.М., ²Пасюков В.В., ²Федуро Н.А.,

²Рыженкова Н.В., ¹Слобожанина Е.И.

РЕДОКС-СОСТОЯНИЕ КЛЕТОК ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ В-ЛИМФОЦИТАРНЫМ ЛЕЙКОЗОМ ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ НА НИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

¹ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»

²Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий
Минск, Беларусь

**¹Tamashevski A.V., ¹Harmaza Y.M., ²Pasiukov V.V., ²Feduro N.A.,
²Ryzhenkova N.V., ¹Slobozhanina E.I.**

**CELLULAR REDOX STATE OF PATIENTS WITH CHRONIC
B-LYMPHOCYTIC LEUKEMIA AFTER EXPOSURE TO DRUGS**

¹Institute of Biophysics and Cell Engineering of National Academy of Sciences

²Republican Scientific and Practical Center for Transfusiology and Medical
Biotechnologies
Minsk, Belarus

E-mail: tayzoe@mail.ru

Аннотация. Выполнена оценка редокс-состояния клеток пациентов с хроническим В-лимфоцитарным лейкозом (В-ХЛЛ) после воздействия на них лекарственных средств (флударабела, винкристина, дексаметазона и иматиниба) в терапевтических концентрациях, а также определена их чувствительность к данным лекарственным средствам. Полученные результаты свидетельствуют о снижении чувствительности клеток пациентов с В-ХЛЛ, прошедших полный курс химиотерапии, к исследуемым лекарственным средствам, по сравнению с клетками пациентов, не прошедших химиотерапию. Установлено изменение редокс-статуса в клетках пациентов с В-ХЛЛ, не прошедших химиотерапию, после воздействия исследуемых лекарственных средств, по сравнению с группой пациентов после химиотерапии.

Annotation. The redox state of cells of patients with chronic b-lymphocytic leukemia (B-CLL) was evaluated after exposure to drugs (fludarabel, vincristine, dexamethasone and imatinib) in therapeutic concentrations, and their sensitivity to these drugs was determined. The results indicate a decrease in the sensitivity of cells of B-CLL patients after a full course of chemotherapy to investigated drugs, compared with cells of patients before treatment. A change in the redox status in cells of B-CLL patients before treatment was established after exposure to drugs, compared with the group of patients after chemotherapy.

Ключевые слова: хронический В-лимфоцитарный лейкоз, активные формы кислорода, жизнеспособность, лекарственная резистентность, противоопухолевые препараты.

Key words: chronic b-lymphocytic leukemia, reactive oxygen species, viability, drug resistance, antitumor drugs.

Введение

Ранее было показано [1], что существует связь между содержанием свободнорадикальных соединений на начальном этапе активации *in vitro* (не более 1 ч) лимфоцитов, выделенных из периферической крови пациентов с В-ХЛЛ, противоопухолевыми препаратами и степенью их метаболической активности на конечном этапе альтерации (через 44 ч). В силу того, что В-ХЛЛ

– это неоднородное заболевание с разнообразной клинической картиной, а молекулярные механизмы метаболизма в опухолевой клетке исследуемых лекарственных средств различны, то получение единичного клеточного ответа спустя определенный промежуток времени о степени образования свободнорадикальных соединений, к сожалению, не может служить адекватной оценкой вклада этого процесса в реализацию программы апоптоза по внутреннему митохондриальному пути.

Цель исследования – оценить способность лимфоцитов пациентов с В-ХЛЛ к образованию свободнорадикальных соединений после краткосрочного (через 2–3 ч) и долгосрочного (спустя 18–20 ч) воздействия химиопрепаратов в терапевтических концентрациях и жизнеспособность этих клеток для выяснения вопроса о степени взаимосвязи между содержанием внутриклеточных свободнорадикальных соединений *in vitro* и количеством погибших клеток после воздействия лекарственных средств различной природы.

Материалы и методы исследования

В работе использована периферическая кровь пациентов с диагнозом В-ХЛЛ (n=25), предоставленная УЗ «Минская областная клиническая больница».

Выделение периферических мононуклеарных клеток (ПМНК) крови проводили в градиенте концентраций Histopaque-1077. После выделения ПМНК помещали в коммерческую полную питательную среду RPMI-1640 и инкубировали в 24-х луночных планшетах в увлажненной атмосфере с 5%-ным содержанием CO₂ при температуре 37°C в течение 2–3 ч, 18–20 ч и 44 ч с противоопухолевыми препаратами. В качестве лекарственных средств использовали химиопрепараты четырех различных классов в терапевтических концентрациях: нуклеозидный аналог – флударабел (Flu, 5 мкг/мл); винка-алкалоид – винкристин (Vincr, 0,25 мкг/мл); ингибитор протеинтирозинкиназы – иматиниб (Imat, 5 мкг/мл), а также синтетический глюкокортикостероид – дексаметазон (Dex, 5 мкг/мл).

Процентное содержание CD5⁺ лимфоцитов среди CD19⁺ клеток в суммарной популяции ПМНК пациентов с ХЛЛ определяли по степени связывания с FITC-конъюгированными моноклональными антителами (МкАТ) CD5 (клон BL1a) и фикоэритрин-конъюгированными МкАТ CD19 (клон J3-119). Неспецифическое связывание контролировали с помощью IgG2a и IgG1, соответственно.

Оценку уровня активных форм кислорода (АФК) в лейкозных лимфоцитах проводили с помощью флуоресцентного зонда 5-хлорометил-2,'7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетат (CM-H₂DCFDA).

Чувствительность ПМНК к лекарственным средствам определяли с помощью 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ теста). Он позволяет проводить оценку метаболической (дегидрогеназной) активности митохондрий, степень которой коррелирует с жизнеспособностью клеток.

Все флуориметрические измерения проводили на проточном цитофлуориметре FACSCantoII (BectonDickenson) в FITC-Н и PE-Н каналах, спектрофотометрические – на планшетном ридере Wallac 1420 VICTOR2 (PerkinElmer).

Результаты экспериментов анализировали методом вариационной статистики с использованием непараметрических критериев Манна-Уитни и Уилкоксона в зависимости от характера распределения. Корреляционные зависимости оценивали с применением критерия Спирмена (r_s) в программе STATISTICA 8.0. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Известно, что CD5⁺ позитивные В клетки (CD19⁺) составляют отдельную В-клеточную субпопуляцию. При рождении большинство В-лимфоцитов коэкспрессируют CD5, а молодые взрослые CD5⁺ В-клетки составляют примерно одну пятую часть нормальных клеток периферической крови. Таким образом, этот факт определил подход, при котором пациенты с В-ХЛЛ считаются в стадии фенотипической ремиссии: процентное содержание CD19⁺CD5⁺ клеток в крови не должно превышать 25% [2].

Для определения процентного содержания CD5⁺ лимфоцитов среди CD19⁺ клеток в суммарной популяции периферических мононуклеаров пациентов с В-ХЛЛ было выполнено иммунофенотипирование лимфоцитов всех отобранных пациентов. Полученные результаты позволили разделить всех пациентов с В-ХЛЛ на две группы. В первую группу (n=5) вошли пациенты, среднее содержание CD19⁺CD5⁺ клеток у которых составило $3,1 \pm 2,5$. Эти пациенты прошли полный курс химиотерапии и находились в стадии ремиссии. Вторую группу (n=20) составили пациенты, среднее содержание CD19⁺CD5⁺ клеток у которых составило $82,1 \pm 16,3$. У этих пациентов был диагностирован В-ХЛЛ и их лечение не проводилось. Таким образом, полученные результаты по содержанию свободнорадикальных соединений до и после воздействия лекарственных средств, а также данные о чувствительности пациентов с В-ХЛЛ к воздействию исследуемых химиопрепаратов также будут разделены на 2 группы согласно процентному содержанию в них CD19⁺CD5⁺ клеток.

В таблице 1 представлены результаты измерения интенсивности флуоресценции CM-DCF в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ после воздействия исследуемых лекарственных средств в терапевтических концентрациях.

Установлено, что Flu, Vincr и Imat через 2-3 ч не влияли на редокс-статус лимфоцитов пациентов I группы по сравнению с контрольными клетками. Dex в среднем на 10–15% приводил к статистически достоверному снижению интенсивности флуоресценции CM-DCF по сравнению с контролем, что указывает на смещение окислительно-восстановительного баланса в сторону “восстановителей” (антиоксидантов).

Через 18-20 ч интенсивность флуоресценции CM-DCF в лимфоцитах пациентов I-ой группы после воздействия Flu статистически достоверно возросла в среднем на 10–20% по сравнению с контрольными клетками, в то

же время воздействие Vincr, Dex и Imat не оказывало статистически значимого влияния на редокс-статус клеток по сравнению с контролем без химиопрепаратов. Полученные результаты указывают на накопление АФК в клетках пациентов с В-ХЛЛ I-ой группы после воздействия Flu в течение 18-20 ч.

Таблица 1

Интенсивность флуоресценции CM-DCF в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ
после воздействия лекарственных средств *in vitro*

		Интенсивность флуоресценции CM-DCF, %				
		Контроль	Flu	Vinc	Dex	Imat
I группа	2-3 ч	100	100±8	98±17	87±8*	105±10
	18-20 ч	100	117±12*	106±14	95±12	106±11
II группа	2-3 ч	100	106±11	108±7	131±13*	159±19*
	18-20 ч	100	96±9	117±12*	119±11*	111±6*

Величина интенсивности флуоресценции CM-DCF в лимфоцитах, в среде инкубации которых отсутствовали лекарственные средства, принята за 100% (контроль);

** – различия по сравнению с контролем достоверны ($p < 0,05$)*

В свою очередь во II группе пациентов с В-ХЛЛ обнаружено статистически достоверное накопление продукции АФК в среднем до 10–45% по сравнению с контрольными клеткам при их краткосрочной инкубации с Dex и Imat, а для Vincr и Flu установлена тенденция к росту интенсивности флуоресценции CM-DCF (таблица 1). Это свидетельствует о накоплении свободнорадикальных соединений в клетках пациентов с В-ХЛЛ II группы, что приводит к смещению окислительно-восстановительного баланса в сторону “окислителей”. Дальнейшее увеличение времени инкубации клеток II группы пациентов при В-ХЛЛ (до 18-20 ч) с Dex, Vincr и Imat сопровождалось также накоплением внутриклеточных АФК. Однако долгосрочная инкубация с Flu приводила к восстановлению редокс-статуса лейкоцитарных лимфоцитов до значений, характерных для контрольных клеток.

Данные по индивидуальной чувствительности опухолевых клеток к лекарственным средствам представлены в таблице 2.

Установлено, что в I группе пациентов с В-ХЛЛ чувствительность клеток к Flu, Dex и Imat находилась на достаточно низком уровне. Воздействие Vincr и Imat в течение 44 ч приводило к статистически достоверному снижению жизнеспособности клеток I-ой группы пациентов при В-ХЛЛ в среднем на 10–15% по сравнению с контролем.

При воздействии исследуемых противоопухолевых средств на клетки пациентов II-ой группы в течение 44 ч наблюдалось статистически достоверное

увеличение их чувствительности, что соответствовало снижению жизнеспособности клеток по сравнению с контролем (таблица 2).

Таблица 2

Метаболическая активность клеток пациентов с В-ХЛЛ через 44 ч после воздействия лекарственных средств *in vitro*

	Количество жизнеспособных клеток после инкубации с лекарственными средствами, %				
	Контроль	Flu	Vinc	Dex	Imat
I группа	100	95,3±5,6	88,0±10,6*	94,0±9,4	90,0±8,5*
II группа	100	51,5±15,3*	43,0±20,5*	65,2±20,6*	67,0±10,9*

Величина средней оптической плотности лейкоцитарных клеток с МТТ в отсутствие лекарственных средств принята за 100% (контроль);

* – различия по сравнению с контролем достоверны ($p < 0,05$)

Таким образом, клетки пациентов с В-ХЛЛ в стадии ремиссии (I группа) обладают низкой чувствительностью к исследуемым лекарственным средствам в терапевтических концентрациях по сравнению с лейкоцитарными клетками II группы. Причем для Flu и Vincr чувствительность клеток II группы по сравнению с клетками I группы увеличена в среднем на 45%, а для Dex и Imat в среднем на 25–30%.

Проведенный корреляционный анализ выявил статистически значимую обратную зависимость (r_s от -0,36 до -0,45) между степенью образования свободнорадикальных соединений в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ в течение 2-3 ч после воздействия исследуемых лекарственных средств ($n=25$) и процентом погибших клеток спустя 44 ч экспозиции с ними *in vitro*. Таким образом, гибели лимфоцитов при В-ХЛЛ после краткосрочного воздействия (2-3 ч) исследуемых лекарственных средств независимо от их природы предшествует период, когда в них происходит образование свободнорадикальных соединений.

Выводы

Выполнена оценка редокс-состояния клеток пациентов с В-ХЛЛ после воздействия на них лекарственных средств в терапевтических концентрациях, а также определена их чувствительность к данным химиопрепаратам. Полученные результаты свидетельствуют о снижении чувствительности клеток пациентов с В-ХЛЛ, прошедших полный курс химиотерапии, к исследуемым лекарственным средствам, по сравнению с клетками пациентов, не прошедших химиотерапию. Установлено изменение редокс-статуса в клетках пациентов с В-ХЛЛ, не прошедших химиотерапию, после воздействия Flu, Vincr, Dex и Imat по сравнению с группой пациентов после химиотерапии.

Список литературы:

1. Окислительный стресс в лимфоцитах при хроническом лимфоцитарном лейкозе, индуцированный противоопухолевыми препаратами / А.В. Тамашевский [и др.] // Известия НАН Беларуси. Сер. биол. наук. – 2010. – №3. – С. 62–66

2. A Frame of Reference for Minimal Residual Disease Analysis in Chronic Lymphocytic Leukemia / R. Gupta [et al.] // Am. J. Clin. Pathol. – 2004. – Vol. 121. – P. 368–372

УДК 543.554; 577.121.7

Тарасов А.В., Казаков Я.Е.
**АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ КАК КРИТЕРИЙ СОСТОЯНИЯ
ЗДОРОВЬЯ ЧЕЛОВЕКА**

Уральский государственный экономический университет
Екатеринбург, Российская Федерация

Tarasov A.V., Kazakov Ya.E.
ANTIOXIDANT ACTIVITY AS A CRITERION OF HUMAN HEALTH

Ural State University of Economics
Yekaterinburg, Russian Federation

E-mail: tarasov_a.v@bk.ru

Аннотация. В статье представлены результаты измерений антиоксидантной активности (АОА) кожи студентов и АОА сыворотки крови здоровых добровольцев и пациентов с различными заболеваниями. В результате исследования предложена диаграмма значений АОА сыворотки крови для оценки состояния здоровья человека, которая, в перспективе, может использоваться в скрининговых медицинских осмотрах.

Annotation. The article presents the results of measurements of the antioxidant activity (AOA) of the skin of students and AOA of the blood serum of healthy volunteers and patients with various diseases. As the result of the study, the blood serum AOA chart was proposed for assessing human health, which, in the future, can be used in screening medical examinations.

Ключевые слова: антиоксидантная активность, окислительный стресс, сыворотка крови, кожа, потенциометрия.

Keywords: antioxidant activity, oxidative stress, blood serum, skin, potentiometry.

Введение

В настоящее время антиоксидантная активность (АОА) рассматривается как один из видов биологической активности (рис. 1) и используется для характеристики новых синтезируемых соединений, лекарственного растительного сырья, фармацевтических препаратов, косметических средств, пищевых продуктов, биологических жидкостей и тканей. Существует два основных подхода к определению АОА: количественное определение отдельных антиоксидантов или оценка их интегрального (суммарного)