

блокирует размножение бактериальных клеток, и, тем самым, снижает воздействие бактериальных токсинов на организм. Кроме того, высокобелковая диета, прописанная пациентам, также может служить причиной повышения гемоглобина. Беря во внимание важность функционирования эритроцитов, мы считаем, что, повышение гемоглобина благотворно влияет на здоровье пациента (исключение составляет пациент 13, у которого была диагностирована ЖДА).

Список литературы:

1. Клиническая фармакология: учеб. пособие/ под ред. Н.В . Изможеровой. – Екб.: Издат-во УГМУ, 2018. – 92 с.
2. Лекарственные препараты в России: справочник/ под ред. Е. А. Толмачевой, С. М. Инджикян. – Изд. 25-е. – М.: Видаль Рус, 2019 – 1198 с.
3. Литусов Н.В. Микобактерии туберкулеза: иллюстрированное пособие./ Литусов Н.В. – Екб.: Изд-во ГБОУ ВПО УГМУ, 2015 – 52с .
4. Шугаева С.Н. Первичный туберкулез: пособие для врачей./ Шугаева С.Н., Кочкин А.В – Иркутск: РИО ИГИУВа, 2010 – 54 с.
5. Министерство здравоохранения РФ [Электронный ресурс] – 2020. – URL: <https://minzdrav.gov.ru/news/2020/03/24/13577-rossiya-demonstriruet-odin-iz-samyh-znachitelnyh-tempov-snizheniya-zabolevaemosti-i-smernosti-ot-tuberkuleza-v-mire> (Дата обращения: 28.03. 2021).

УДК 577.336

Ходыш Ю.В., Тамашевский А.В., Гармаза Ю.М.

**ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧНОСТИ
НАНОСТРУКТУРИРОВАННОГО ОКСИДА ЦИНКА ПРИ
ВОЗДЕЙСТВИИ НА ПЕРИФЕРИЧЕСКИЕ ЛИМФОЦИТЫ ЧЕЛОВЕКА**

ГУ "Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий", Министерство здравоохранения РБ,
Минск, Республика Беларусь

Khodysh Y.V., Tamashevski A.V., Harmaza Y.M.

**DETECTION OF THE CYTOTOXICITY OF NANOSTRUCTURED
ZINC OXIDE UNDER ACTION ON HUMAN PERIPHERAL
LYMPHOCYTES**

Republican Scientific and Practical Center for Transfusiology and Medical
Biotechnology, Ministry of Health of the Republic of Belarus,
Minsk, the Republic of Belarus

e-mail: tayzoe@mail.ru

Аннотация. С помощью оценки двух маркеров потенциальной цитотоксичности наноматериалов (свободнорадикальных и апоптотических

процессов) проведен сравнительный анализ воздействия различных форм наноструктурированного оксида цинка (наностержней и сферических наночастиц) на периферические лимфоциты человека.

Annotation. Using two markers of potential cytotoxicity of nanomaterials (the free radical and apoptotic processes), a comparative analysis of the action of nanostructured zinc oxide in different forms (nanorods and spherical nanoparticles) on human peripheral lymphocytes was carried out.

Ключевые слова: наностержни и наночастицы оксида цинка, лимфоциты человека, апоптотические и свободнорадикальные процессы

Key words: zinc oxide nanorods and nanoparticles, human lymphocytes, apoptotic and free-radical processes

Введение

За последнее десятилетие нанотехнологии стали интересны как для науки, так и для промышленности. Они позволяют получать частицы и материалы, размер которых не превышает 100 нм в каждом измерении, что приводит к проявлению новых специфических свойств. К таким материалам относятся, например, наночастицы серебра и золота, а также наночастицы оксидов металлов – например, оксида цинка. Наноразмерные частицы сравнимы с молекулами естественного происхождения и биомолекулами, при этом они значительно меньше, чем клетки организма человека. Уменьшение размера частиц до такого уровня увеличивает активную площадь поверхности наноматериала, что непосредственно приводит к улучшению их химических, электрических, магнитных, структурных или морфологических свойств. По этой причине наноматериалы часто приобретают свойства, отличные от своих микроаналогов и находят применение во многих высокотехнологичных областях жизнедеятельности человека [4].

В зависимости от способа проникновения (через систему дыхания, желудочно-кишечный тракт, инъекции или кожу) наночастицы способны распространяться по всему организму и перемещаться в различные органы/ткани, где могут вызывать побочные эффекты [4]. При проведении токсикологических исследований важно имитировать взаимодействие между наночастицами и клеточными системами *in vitro*. Для того, чтобы соотнести различные негативные реакции организма человека с типом наночастиц, необходимо выяснить, способны ли они адсорбироваться на поверхности клеток или могут проникать внутрь.

Известно, что цитотоксичность наноструктурированных оксидов металлов может также существенно зависеть от их физико-химических свойств. Более того, было показано, что их цитотоксичность значительно варьируется в зависимости от размера и формы частиц [5]. Поэтому понимание взаимосвязи между биологической цитотоксичностью и физико-химическими свойствами наноструктурированных оксидов металлов представляется актуальным для

возможности объективной оценки потенциальных рисков, связанных с их воздействием.

Цель исследования – проведение сравнительного анализа токсического воздействия двух форм наноструктурированного оксида цинка (наностержней и сферических наночастиц) на периферические лимфоциты человека *in vitro*. В качестве подходов оценки потенциальной цитотоксичности наноматериалов были выбраны – накопление свободнорадикальных продуктов и запуск процессов апоптоза в клетках.

Материалы и методы исследования

В работе использована периферическая кровь условно здоровых доноров в консерванте “гепарин”, полученная из РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий МЗ РБ.

Периферические мононуклеарные клетки крови выделяли в градиенте плотности гистопак-1077 путем центрифугирования 300g в течение 30 мин.

В качестве источника наноструктурированного оксида цинка были использованы наностержни (НС ZnO) и наночастицы (НЧ ZnO) оксида цинка, предоставленные Институтом атомной физики и спектроскопии Латвийского Университета (г. Рига, Латвия). Порошок НЧ ZnO и НС ZnO растворяли в деионизированной воде до конечной концентрации 1 мг/мл.

Клетки, находящиеся в питательной среде RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 2 mM L-глутамин, инкубировали с растворами наноструктурированного ZnO в концентрациях 10; 50, 100 мкг/мл в 24-х луночных планшетах в увлажненной атмосфере с 5%-ным содержанием CO₂ при температуре 37°C в течение 20 ч.

Свободнорадикальные процессы оценивали методом проточной цитофлуориметрии с применением флуоресцентного зонда 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетата (H₂DCF-DA).

Определение жизнеспособности лимфоцитов проводили с помощью аннексин-V /7-амино-актиномицин D (7-AAD). Жизнеспособными считали клетки, неокрашенные аннексином-V и 7-AAD.

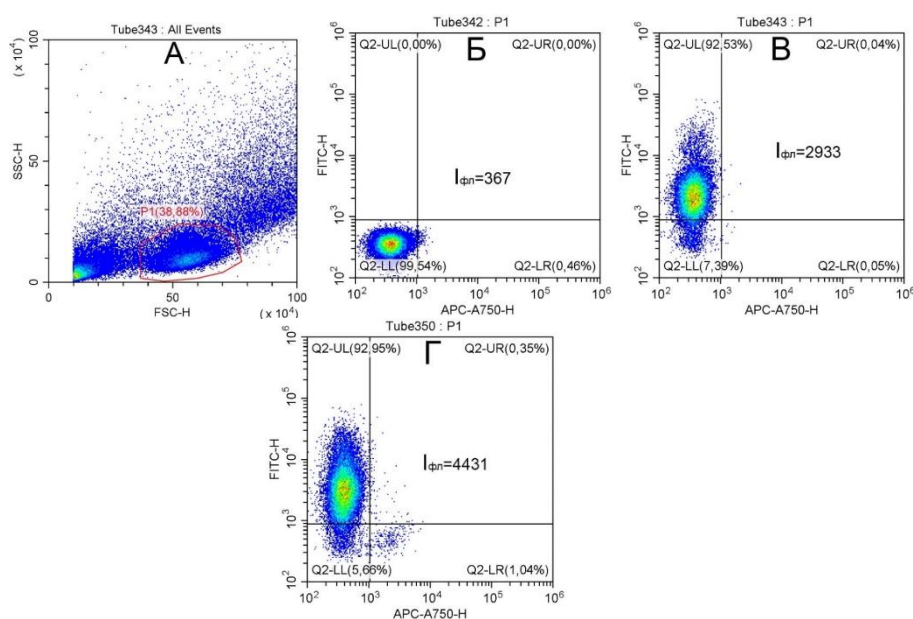
Цитофлуориметрический анализ проводили на цитофлуориметре CytoFLEX (Beckman Coulter). Результаты экспериментов анализировали методом вариационной статистики с использованием непараметрических критериев Уилкоксона в программе STATISTICA 8.0. В работе представлены средние значения 5 независимых экспериментов в виде $x_{cp} \pm s_x$, где x_{cp} – среднее значение, s_x – стандартное отклонение.

Результаты исследования и их обсуждение.

Для определения продукции свободных радикалов широко используют флуоресцентный зонд H₂DCF-DA. Нефлуоресцирующий H₂DCF-DA проникает в клетки путем пассивной диффузии, после чего его ацетатные группы расщепляются внутриклеточными эстеразами и образуется H₂DCF [3**Ошибка! Источник ссылки не найден.**]. Окисление последнего с помощью активных форм кислорода (АФК) превращает эту молекулу в флуоресцирующий 2',7'-

дихлорофлуоресцеин (DCF). H₂DCF-DA может эффективно обнаруживать пероксиды только в том случае, если они разлагаются на радикалы, например, ионами переходных металлов [3].

На репрезентативной диаграмме (рис. 1) представлены экспериментальные результаты с проточного цитофлуориметра. В регион лимфоцитов по результатам измерения попали 38,9% клеток (рис. 1А), средняя интенсивность которых составила 367 усл. ед (рис. 1Б). В контрольных лимфоцитах (интактные клетки без воздействий) интенсивность флуоресценции DCF в среднем составила 2933 усл. ед (рис. 1В). После воздействия НЧ ZnO в концентрации 100 мкг/мл наблюдается увеличение интенсивности флуоресценции DCF до 4431 усл. ед (рис. 1Г), что свидетельствует о накоплении АФК в клетках.



А – репрезентативная диаграмма распределения периферических мононуклеаров доноров по показателям прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния (P1 - “регион лимфоцитов”);

Б – распределение собственной флуоресценции клеток, попавших в “регион лимфоцитов”;

В – распределение интенсивности флуоресценции DCF в интактных лимфоцитах доноров (по оси абсцисс – интенсивность флуоресценции DCF в усл. ед.);

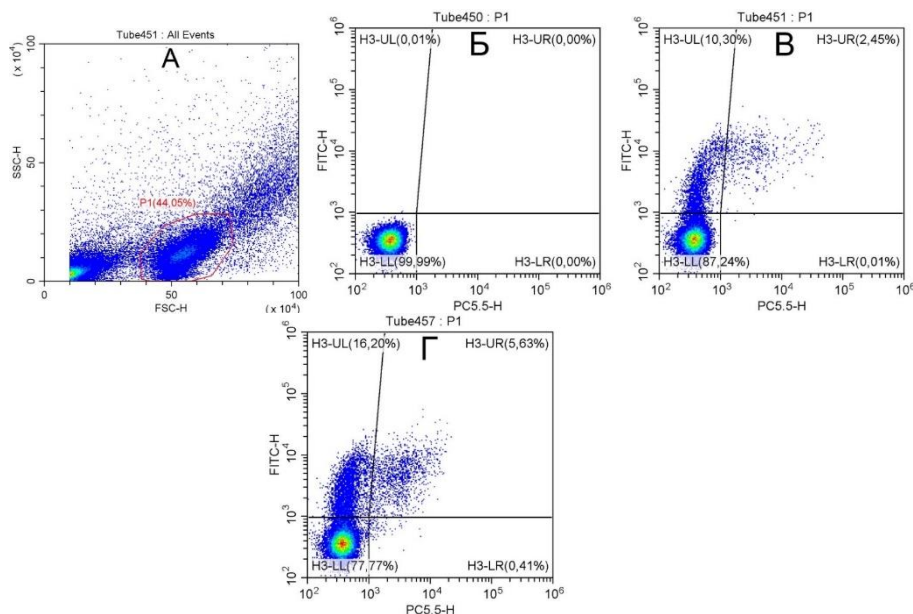
Г – распределение интенсивности флуоресценции DCF в лимфоцитах доноров после воздействия НЧ оксида цинка в концентрации 100 мкг/мл.

Рис.1. Репрезентативная диаграмма оценки интенсивности флуоресценции DCF в лимфоцитах периферической крови доноров методом проточной цитофлуориметрии

Нами установлено, что после обработки лимфоцитов доноров НЧ ZnO в течение 20 ч происходит увеличение содержания в них АФК в среднем на 15–60% по сравнению с интактными клетками. При этом присутствие в среде инкубации лимфоцитов НС ZnO в течение 20 ч сопровождалось ростом интенсивности флуоресценции DCF в среднем на 15–40% по сравнению с контролем. Таким образом, результаты исследования редокс-статуса лимфоцитов после воздействия НС и НЧ ZnO выявили, что одним из возможных механизмов цитотоксичного воздействия данных наноструктур может являться смещение окислительно-восстановительного баланса. В большей степени этот эффект выражен именно для НЧ ZnO. Ранее нами была изучена морфология данных НС и НЧ методом сканирующей электронной микроскопии, который продемонстрировал, что геометрические размеры НЧ составляли в среднем 30–100 нм, а диаметр НС колебался в диапазоне от 70 до 150 нм, причем их длина не превышала 500 нм [2]. Таким образом, по всей вероятности, НС не способны проходить внутрь клетки, а взаимодействуют с рецепторами на ее поверхности.

Известно, что тест на основе аннексина V является наиболее часто используемым для обнаружения и количественной оценки апоптотических клеток *in vitro* [1]. Запуск процессов программируемой клеточной гибели (апоптоза) в клетках сопровождается перераспределением фосфатидилсерина (ФС) из внутреннего на внешний монослой плазматической мембраны. ФС служит в качестве маркера для макрофагов при утилизации таких клеток. Принцип данного теста основан на высоком сродстве аннексина-V, конъюгированного с флуоресцентным красителем, к ФС, что позволяет ему связываться с апоптотическими клетками и идентифицировать их в дальнейшем с помощью флуоресцентных подходов (в нашем случае методом проточной цитофлуориметрии).

На репрезентативной диаграмме (рис. 2) представлены данные о флуоресценции аннексина V и 7-AAD в лимфоцитах человека. В регион лимфоцитов попали 44,1% клеток (рис. 2А), из них 87,2% оказались жизнеспособными (рис. 2В). В ранней фазе апоптоза находились 10,3% клеток (клетки, связанные только с аннексином V), остальные 2,5% клеток – в поздней фазе апоптоза (связались с аннексином V и оказались проницаемыми для 7-AAD). В фазе некроза находились лишь 0,01% клеток (рис.2В).



A – репрезентативная диаграмма распределения периферических мононуклеаров доноров по показателям прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния (P1 - “регион лимфоцитов”);

B – распределение собственной флуоресценции клеток, попавших в “регион лимфоцитов”;

V – распределение интенсивности флуоресценции аннексин V и 7-AAD в интактных лимфоцитах доноров (по оси абсцисс – интенсивность флуоресценции 7-AAD в усл.ед., по оси ординат – интенсивность флуоресценции аннексин V в усл.ед.);

Г – распределение интенсивности флуоресценции аннексин V и 7-AAD в лимфоцитах доноров после воздействия НЧ оксида цинка в концентрации 100 мкг/мл.

Рис. 2. Репрезентативные диаграммы цитофлуориметрического анализа лимфоцитов периферической крови доноров на связывание с аннексин V и 7-AAD

После воздействия НЧ ZnO в концентрации 100 мкг/мл на лимфоциты доноров наблюдается снижение количества жизнеспособных клеток до 77,8% (рис. 2Г). Остальные 16,2% клеток находятся в ранней апоптотической фазе; 5,6% клеток – в поздней апоптотической фазе и 0,4% лимфоцитов – в фазе некроза.

Статистическая обработка полученных данных о воздействии НС и НЧ ZnO в различных концентрациях на лимфоциты человека *in vitro* дала следующие итоговые результаты. При инкубации лимфоцитов с НЧ ZnO в течение 20 ч в концентрациях 10, 50 и 100 мкг/мл процент жизнеспособных клеток в среднем составил соответственно 95–99%, 88–92% и 82–89% по сравнению с контролем. При воздействии НС ZnO в концентрациях 10–100 мкг/мл в течение 20 ч процент жизнеспособных клеток составил в среднем

соответственно 97–99%, 95–98% и 90–95% по сравнению с интактными лимфоцитами.

Выводы

Проведенный сравнительный анализ воздействия различных форм наноструктурированного оксида цинка (наностержней и наночастиц) на жизнеспособность лимфоцитов человека *in vitro* выявил большую цитотоксичность у сферической формы наноразмерного ZnO. НС ZnO, вероятнее всего, не проникают внутрь клетки, а взаимодействуют с ее мембраной. А одним из возможных механизмов цитотоксичного воздействия данных наноструктур может являться смещение окислительно-восстановительного баланса в лимфоцитах человека, т.к. в них выявлено НС/НЧ-индуцированное накопление АФК.

Благодарности. Работа поддержана грантом БРФФИ Б17-128 (2017-2019 гг.) и Программой ЕС Горизонт 2020, грант № 778157 (2018-2021 гг.).

Список литературы:

1. Влияние внутриклеточного уровня ионов цинка на перераспределение фосфатидилсерина в мембранах и жизнеспособность эритроцитов человека / Ю.М. Гармаза [и др.] // Новости медико-биологических наук. – 2011. – Т.3, № 1. – С. 90-95.
2. Гармаза Ю.М. Мембранные эффекты воздействия наностержней и наночастиц оксида цинка на лимфоциты человека / Ю.М. Гармаза, А.В. Тамашевский, Е.И. Слобожанина // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2019. – Т. 63, № 1. – С. 72-78.
3. Eruslanov E. Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow cytometry / E. Eruslanov, S. Kusmartsev // Methods Mol. Biol. – 2010. – Vol. 594. – P.57-72.
4. Occupational exposure limits for manufactured nanomaterials, a systematic review / R. Mihalache [et al.] // Nanotoxicology. – 2017. Vol. 11. P. 7-19.
5. Biological reactivity of zinc oxide nanoparticles with mammalian test systems: an overview / S.R. Saptarshi [et. al] // Nanomedicine (Lond.). – 2015. – Vol. 10, No. 13. – P. 2075-2092.

УДК 616-001:796.012.412.52

Цупиков Ю.В., Кульчик Е.Э., Ранкович Е.В.
АНАЛИЗ ТРАВМ, ПОЛУЧЕННЫХ ПРИ БЕГЕ В 2015-2017 ГГ.

Кафедры анатомии человека
Гомельский государственный медицинский университет
Гомель, Республика Беларусь

Tsupikov Y.V., Kulchik E.E., Rankovich E.V.
ANALYSIS OF INJURIES SUSTAINED DURING RUNNING