

**ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
"ИНСТИТУТ БИОФИЗИКИ И КЛЕТОЧНОЙ ИНЖЕНЕРИИ  
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ"**

УДК 577.352.3+616.132.2+616.001+617.583+616.517

**ЗУБРИЦКАЯ  
Галина Петровна**

**БИОФИЗИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КЛЕТОК КРОВИ И  
БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ КАК ПОКАЗАТЕЛИ  
ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ ЧЕЛОВЕКА**

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

по специальности 03.01.02 – биофизика

Минск, 2016

Работа выполнена в лаборатории медицинской биофизики ГНУ “Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси”

**Научный руководитель:** **Слобожанина Екатерина Ивановна**  
доктор биологических наук,  
член-корреспондент НАН Беларуси,  
профессор, заведующий лабораторией  
медицинской биофизики  
ГНУ “Институт биофизики и  
клеточной инженерии НАН Беларуси”

**Официальные оппоненты:** **Черенкевич Сергей Николаевич**  
доктор биологических наук,  
академик НАН Беларуси, профессор,  
заведующий кафедрой биофизики  
физического факультета  
Белорусского государственного  
университета

**Кужир Татьяна Дановна**  
доктор биологических наук,  
главный научный сотрудник  
лаборатории генетической  
безопасности  
ГНУ “Институт генетики и  
цитологии НАН Беларуси”

**Оппонирующая организация:** УО “Гродненский государственный  
университет им. Янки Купалы”

Защита состоится «30» сентября 2016 г. в 14.00 часов на заседании Совета по защите диссертаций Д 01.37.01 при ГНУ “Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси” по адресу: 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27. Телефон ученого секретаря 332-16-04; факс 284-23-59;  
E-mail: [pshybytko@ibp.org.by](mailto:pshybytko@ibp.org.by)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНУ “Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси”

Автореферат разослан «29» августа 2016 года

Ученый секретарь  
Совета по защите диссертаций,  
кандидат биологических наук



Пшибытко Н.Л.

## ВВЕДЕНИЕ

Любое заболевание, патологический процесс, а также ряд физиологических сдвигов в организме человека в той или иной степени отражаются как на количественных характеристиках, так и на физико-химических свойствах компонентов крови, а также цереброспинальной жидкости, мочи, слюны, слезной жидкости и других биологических жидкостей. Несмотря на технологический прорыв в области диагностики нарушений метаболических процессов, происходящих *in vivo* в организме, пока раскрыты не все возможности установления механизмов патогенеза различных заболеваний и выделения их общих и отличительных черт, выявления биомаркеров ряда заболеваний. Биомаркер – это измеряемый показатель (биохимический, генетический, реологический и другой), указывающий на большую вероятность наличия соответствующего заболевания и коррелирующий с его клиническими проявлениями [Мирошниченко, Птицина, 2009]. Для поиска новых маркеров оценки изменений функционального состояния организма человека все чаще используют постгеномные методы анализа, среди которых протеомные и метаболомные технологии занимают ведущие позиции и зачастую дополняют друг друга. Проведенные ранее в Институте биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси исследования в области люминесценции биосистем раскрыли новые возможности этого подхода для диагностики ряда заболеваний человека. Достоинствами флуоресцентных методов является простота и экономичность решения многих задач клинической диагностики с использованием небольшого количества биологического материала и времени для постановки диагноза. Несмотря на большое число работ по исследованию биофизических параметров клеток крови и биологических жидкостей при различных патологиях человека, до сих пор не определены многие люминесцентные маркеры, которые можно рассматривать как ранние диагностические, либо прогностические факторы и которые можно использовать в тест-системах для лабораторной диагностики, оптимизации схем лечения и прогноза течения заболевания.

### ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Связь работы с крупными научными программами (проектами) и темами.** Диссертационная работа выполнена в рамках ГППИ «Биоанализ и диагностика» по заданию «Разработка люминесцентного экспресс-метода дифференциальной диагностики хронических заболеваний суставов» (№ ГР 20041083, 2004-2005 гг.); ГКПНИ «Биологическая инженерия и биобезопасность» по заданию 18 «Исследование механизмов регуляции активности мембранных белков, ассоциированных с устойчивостью клеток к

действию ксенобиотиков» (№ ГР 20064750, 2006–2010 гг.); ОНТП «Здоровье женщины и ребенка – благополучие семьи и государства» № 02.05-1 «Разработать и внедрить программу пре- и постнатальной диагностики и профилактики патологии мочевыделительной системы, наследственно обусловленной и приобретенной в перинатальный период» (№ ГР 20082762, 2008–2010 гг.); ОНТП «Здоровье женщины и ребенка – благополучие семьи и государства» № 02.02 «Разработать и внедрить в практику новую патогенетически обоснованную технологию диагностики детского церебрального паралича у детей раннего возраста» (№ ГР 20110137, 2010–2012 гг.); а также по гранту БРФФИ Б11К–152 «Исследование мембрано-опосредованных механизмов токсичности пре-амилоидных агрегатов белков» (№ ГР 20122853, 2011–2013 гг.).

Тема работы соответствует перечням приоритетных направлений фундаментальных и прикладных исследований Республики Беларусь на 2006–2010 гг. (п. 3.10 – Молекулярная биология, биофизика регуляторных процессов и протеомика) и на 2011–2015 гг. (п. 3.1 – Биохимия, биофизика и физиология растительной, животной и микробной клетки, ее надмолекулярных структур, биологических макромолекул и низкомолекулярных биорегуляторов, в том числе ферментов и гормонов).

**Цель и задачи исследования.** Цель работы – установление биофизических критериев, отражающих нарушение физико-химического состояния компонентов клеток крови при заболеваниях различного генеза, а также выявление параметров собственной и зондовой флуоресценции биологических жидкостей, свидетельствующих о возникновении и развитии патологического процесса в организме человека.

Для достижения цели поставлены следующие задачи:

1. С использованием липофильных флуоресцентных зондов провести сравнительное исследование физического состояния липидов в мембранах эритроцитов детей с заболеваниями крови и другими патологиями.
2. Изучить уровень везикуляции эритроцитов в условиях метаболического истощения клеток в норме и при патологии.
3. Исследовать характеристики структурно-функционального состояния белков мембран эритроцитов у пациентов с различными заболеваниями.
4. Оценить транспорт глутатион-S-конъюгатов и активность глутатион-S-трансферазы в эритроцитах детей, страдающих заболеваниями крови.
5. Изучить влияние амилоидных фибрилл на физико-химические свойства липидного компонента в эритроцитарных мембранах и на состояние системы антиоксидантной защиты эритроцитов *in vitro*.

6. Изучить физическое состояние липидов мембран эритроцитов и активность антиоксидантной системы защиты крови у пациентов с сахарным диабетом II типа.

7. Изучить параметры собственной и зондовой люминесценции плазмы крови пациентов с псориазом, синовиальной жидкости пациентов с синовитами различного генеза, а также мочи новорожденных с перинатальной нефропатией и разработать лабораторные способы диагностики заболеваний.

Объекты исследования – компоненты периферической крови доноров и пациентов при патологии (эритроциты и изолированные из них мембраны, лимфоциты и плазма), синовиальная жидкость пациентов с синовитами, моча новорожденных в норме и при патологии. Образцы биологических жидкостей и клиническая характеристика пациентов были предоставлены: доцентом кафедры детской онкологии и гематологии БелМАПО, к.м.н. Климкович Н.Н. (пациенты с заболеваниями крови); доцентом кафедры кожных и венерических болезней БГМУ, к.м.н. Белугиной И.Н. (пациенты с псориазом); к.м.н., зав. лабораторией РНПЦ «Мать и дитя» Девялтовской М.Г. и к.м.н. Перковской А.Ф. (детский церебральный паралич (ДЦП) и новорожденные с внутриутробными инфекциями (ВУИ), нефропатиями соответственно); доцентом кафедры внутренних болезней БГМУ, к.м.н., Патеюк И.В. (пациенты с сахарным диабетом II типа); зам. директора по научной работе РНПЦ травматологии и ортопедии, д.б.н. Эйсмонт О.Л. (пациенты с синовитами).

Предмет исследования – структурно-функциональное состояние компонентов клеток крови и биологических жидкостей человека.

**Научная новизна.** Впервые установлено, что важным звеном в патогенезе анемического синдрома у детей, страдающих миелодиспластическим синдромом и апластическими анемиями, является усиление уровня везикуляции эритроцитов при их метаболическом истощении, повышение активности глутатион-S-трансферазы и активация мембраносвязанных белков-транспортёров семейства MRP вследствие нарушения структурно-функционального состояния мембранных белков и микровязкости липидов.

Впервые показано, что воздействие амилоидных фибрилл лизоцима на эритроциты человека *in vitro* вызывает изменение структурно-функционального состояния мембранных и внутриклеточных компонентов без стимулирования свободнорадикальных процессов в клетке. Возможность проявления аналогичных эффектов *in vivo* продемонстрировано на эритроцитах пациентов с сахарным диабетом II типа.

Впервые выявлены особенности флуоресценции синовиальной жидкости человека и мочи новорожденных, отражающие метаболические нарушения, что явилось основой разработки способа дифференциальной диагностики синовитов и способа доклинической диагностики нефропатии у новорожденных.

### **Положения диссертации, выносимые на защиту:**

1. Нарушение физико-химического состояния эритроцитов и лимфоцитов детей, страдающих предлейкозными и злокачественными заболеваниями крови носит неспецифический мембранотропный характер, проявляющийся в модификации структурно-функционального состояния мембранных белков и липидов. Усиление степени везикуляции эритроцитов при их метаболическом истощении у пациентов с миелодиспластическим синдромом и апластическими анемиями, повышение активности глутатион-S-трансферазы и белков-транспортёров ксенобиотиков являются важным звеном в патогенезе анемического синдрома.

2. Взаимодействие амилоидных фибрилл с эритроцитами человека *in vitro* приводит к модификации структурно-функционального состояния их мембран, к разнонаправленным ответам со стороны системы антиоксидантной защиты клеток и ингибированию процессов перекисного окисления липидов. Сходные изменения в активности антиоксидантных ферментов и микровязкости липидного бислоя мембран эритроцитов, происходящие у пациентов с сахарным диабетом II типа, объясняются повышением общей антиоксидантной активности плазмы крови.

3. Спектральные параметры собственной и зондовой флуоресценции синовиальной жидкости рекомендовано использовать для дифференциальной диагностики ревматоидного артрита и деформирующего остеоартроза. Анализ собственной люминесценции и положение максимумов спектров мочи новорожденных рекомендовано использовать для выявления патологии перинатальной нефропатии на стадии предболезни.

**Личный вклад соискателя.** Постановка цели и задач исследования, выбор методов исследования осуществлялись совместно с научным руководителем при решающем участии автора. Основные результаты исследования получены и проанализированы автором самостоятельно.

**Апробация результатов диссертации.** Результаты исследований были представлены на Международных научных конференциях «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем», (Минск, 2000, 2004, 2006, 2010, 2012); II международной научной конференции молодых ученых и студентов (Алматы, Казахстан, 2002); Российской научно-практической конференции «Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии» (Санкт-Петербург, Россия, 2002); Международной научной конференции «Reactive oxygen and nitrogen species, antioxidantes and human health» (Смоленск, Россия, 2003); 38<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting of the European Society for Clinical Investigation (Утрехт, Нидерланды 2004); III и IV съездах биофизиков России (Воронеж, Россия, 2004, Нижний Новгород, Россия, 2012); IV и VII съездах фотобиологов России (Саратов, Россия, 2005, Шепси, Россия,

2014); V, VI и X-ой международной научной конференции «Медико-социальная экология личности: состояние и перспективы» (Минск, 2007, 2012); VI съезде гематологов и трансфузиологов Республики Беларусь «Актуальные проблемы гематологии и трансфузиологии» (Минск, 2007); Всеукраинской научно-практической конференции «Актуальные вопросы диагностики и лечения заболеваний крови» (Киев, Украина, 2008); Международной конференции «Актуальные проблемы химии и биологии» (Пушино, Россия, 2012); Международной научно-практической конференции «Разработка и применение новых флуоресцентных материалов и методов» (Даугавпилс, Латвия, 2012); Республиканской научно-практической конференции «Метаболический синдром: междисциплинарные проблемы и их решения» (Ташкент, Узбекистан, 2013); III международной научно-практической конференции «Фундаментальные и прикладные проблемы стресса» (Витебск, 2013); 19-ом международном симпозиуме Европейского общества исследователей эритроцитов «ERCS-2013» (Фортейленд, Нидерланды, 2013).

**Опубликованность результатов диссертации.** По теме диссертации опубликовано 39 работ, в том числе глава в монографии и 12 статей в научных рецензируемых журналах, включенных в перечень изданий ВАК Республики Беларусь (8 авторских листов), 10 статей в сборниках материалов конференций, 14 тезисов докладов, 2 патента. Общий объем -12,95 авторских листов.

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения; общей характеристики работы; основной части, в которой представлены анализ литературы (глава 1), описание использованных методов и объектов (глава 2), основные результаты исследований (главы 3–5); заключение, библиографический список и приложения. Работа изложена на 172 страницах машинописного текста, включает 8 таблиц и 38 рисунков. Библиографический список состоит из 283 наименований использованных источников и 39 публикаций соискателя. Приложения – 9 приложений на 11 страницах.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

**Объекты и методы исследования.** В работе использованы: *кровь практически здоровых доноров* в консерванте «глюгидир», полученная из РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий (n=50); образцы крови (*1-1,5 мл*) практически здоровых *детей* (n=20), а также *детей, страдающих миелодиспластическими синдромами (МДС)* (n=8), *апластическими анемиями (АА)* (n=12), *острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ)* (n=6), *острым миелобластным лейкозом (ОМЛ)* (n=8), *неходжкинскими лимфомами (НХЛ)* (n=3), полученные из БелМАПО; *детским церебральным параличом (ДЦП)* (n=50), с *внутриутробными инфекциями новорожденных (ВУИ)* (n=30), полученные из РНПЦ «Мать и дитя»; образцы крови *пациентов с псориазом* (n=43), а также *пациентов с сахарным диабетом II типа (СД II типа)* (n=15),

полученные из БГМУ; синовиальная жидкость пациентов с ревматоидным артритом (РА) (n=10), посттравматическим синовитом (ПТС) (n=12) и деформирующим остеоартрозом (ДОА) (n=7), полученная из РНПЦ травматологии и ортопедии; моча новорожденных (n=30), полученная из РНПЦ «Мать и дитя». Эритроциты отделяли от плазмы путем центрифугирования крови (2000 g, 10 мин) и трижды отмывали в 155 мМ растворе NaCl. Изолированные эритроцитарные мембраны выделяли по методу Доджа [Dodge et al., 1963]. Амилоидные структуры получали из лизоцима куриного яйца по методу [Huang et. al., 2009]. Синовиальную жидкость и мочу предварительно центрифугировали (2000–3000g, 10 мин) для удаления нерастворимого материала и разводили в соотношении 1:9 в забуференном растворе NaCl pH 7,4. Активность ацетилхолинэстеразы (АХЭ) определяли по методу [Ellman et al., 1961]; NADH-метгемоглобинредуктазы – [Papandreou et. al., 1989]; глутатион-S-трансферазы – [Habig et al., 1974]. Кинетику транспорта конъюгатов 2,4-динитрофенил-S-глутатиона определяли по методу [Board et al., 1981]. Концентрацию восстановленного глутатиона (GSH) и содержание SH-групп в белках мембран эритроцитов определяли спектрофотометрическим [Ellman et. al., 1959] и спектрофлуориметрическим [Wu et. al., 1976] методами. Продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ) типа малонового диальдегида определяли по ТБК-тесту [Dahle et al., 1962]. Активность глутатионпероксидазы, супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы оценивали как в работах [Моин, 1986; Kostyuk et al., 1989; Королюк и др., 1988 соответственно]. Общую антиоксидантную активность (ОАА) плазмы крови оценивали с использованием “Antioxidant assay kit” по тролокс-эквивалент антиоксидантной активности (ТЭАА). Изменение микровязкости липидного бислоя мембран эритроцитов изучали с использованием липофильных флуоресцентных зондов: 6-додеканол-2-диметиламинонафтадена (лаурдана) [Parasassi et al., 1991], 1-(4-триметиламмоний фенил) – 6-фенил-1,3,5-гексатриена p-толуенсульфоната (ТМА-ДФГ) [Prendergast et al., 1981], пирена [Galla et. al., 1974]. Для изучения параметров зондовой флуоресценции синовиальной жидкости использовали 1-анилино-8-нафталинсульфонат (АНС) и N-фенил-1-нафтиламин (ФНА). Статистический анализ результатов проводили с использованием параметрического критерия Стьюдента и непараметрических критериев Манна-Уитни, Уилкоксона и Спирмена в программе STATISTICA 10.0.

### **Нарушение структурно-функционального состояния мембран эритроцитов и лимфоцитов у детей при патологии**

Интерес к изучению МДС связан с редкой встречаемостью и гетерогенной природой этих заболеваний, возникающих в результате мутации гемопоэтической стволовой клетки, и имеющих риск трансформации в острые



лейкозы [Bernasconi, 2008]. АА также считается крайне неблагоприятной патологией, которая характеризуется глубокой панцитопенией, проявляющейся преобладанием жирового костного мозга над кроветворным [Geyer et al, 2012]. Клинически МДС и АА преимущественно проявляются сокращением времени жизни эритроцитов и развитием глубоких анемий. Однако, до начала наших исследований, оставалось не ясным, изменяется ли структурно-функциональное состояние мембранных и внутриклеточных компонентов эритроцитов детей с МДС и АА. При выяснении этого вопроса в качестве групп сравнения нами исследованы эритроциты детей со злокачественными заболеваниями крови – ОМЛ, ОЛЛ, НХЛ и с неопухолевыми – ДЦП и ВУИ.

Известно, что для нормального функционирования клетки необходим определенный уровень микровязкости липидного бислоя мембран, который поддерживается, прежде всего, путем направленного синтеза фосфолипидов с разным содержанием насыщенных и ненасыщенных жирных кислот, холестерина. Для выявления отличий в микровязкости липидов в мембранах клеток крови детей при патологии нами использованы липофильные флуоресцентные зонды ТМА-ДФГ и лаурдан, параметры флуоресценции которых позволяют оценить физическое состояние фосфолипидов на разной глубине липидного бислоя эритроцитарных мембран. Результаты сравнительного исследования биофизических параметров, характеризующих изменение микровязкости липидного бислоя мембран эритроцитов детей при заболеваниях различного генеза, представлены в таблице 1.

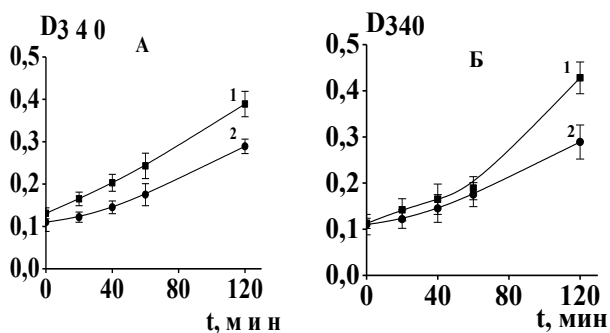
**Таблица 1 – Параметры флуоресценции липофильных зондов, встроенных в эритроцитарные мембраны детей, страдающих различными заболеваниями**

Группы обследованных детей		I <sub>фл.</sub> (ТМА-ДФГ), отн. ед. ( $\lambda_{\text{возб./рег.}}=365/428\text{нм}$ )	P, ТМА-ДФГ ( $\lambda_{\text{возб./рег.}}=365/428\text{нм}$ )	GP, лаурдан ( $\lambda_{\text{возб./рег.}}=340/440, 490\text{нм}$ )
Практически здоровые дети (контроль) (n=10)		0,61±0,01	0,380±0,001	0,320±0,003
МДС (n=8)		0,97±0,08*	0,350±0,004*	0,342±0,01
АА (n=8)		1,19±0,07*	0,360±0,003	0,320±0,003
ДЦП (n=15)		0,75±0,09	0,380±0,014	0,260±0,008*
ОМЛ (n=8)		1,10±0,07*	0,370±0,003	0,350±0,003*
Здоровые новорожденные (контроль) (n=12)		0,52±0,01	0,420±0,016	0,350±0,007
ВУИ	1-е сутки жизни (n=15)	0,84±0,09*	0,390±0,012*	0,285±0,020*
	11-е сутки жизни (n=15)	0,82±0,06*	0,404±0,016*	0,30±0,01*

\* – Достоверность различий анализируемого показателя по отношению к контролю  $P < 0,01$

Установлено, что в группах детей с МДС, АА, ОМЛ, а также у новорожденных с ВУИ интенсивность флуоресценции включенного в мембраны эритроцитов ТМА-ДФГ была повышена, а значение поляризации флуоресценции (Р) этого зонда – снижено по сравнению с группой практически здоровых детей. У детей с ДЦП данный показатель был близок к контролю, а значение генерализованной поляризации (GP) флуоресценции лаурдана были выше у детей, страдающих МДС и ОМЛ. В мембранах эритроцитов детей с ДЦП и ВУИ этот показатель был снижен, а у детей с АА – не отличался от группы здоровых детей. Нами выявлены нарушения микровязкости липидов в мембранах лимфоцитов детей и взрослых пациентов с заболеваниями крови по сравнению с контролем. При первичных МДС изменение микровязкости липидов в мембранах лимфоцитов наиболее выражено при варианте рефрактерная анемия с избытком бластов (РАЕВ) и хорошо выявляется при использовании пирена. Полученные результаты позволяют заключить, что выявленные изменения физического состояния липидного бислоя мембран эритроцитов у детей с патологиями различного генеза носят неспецифический характер.

Ранее было обнаружено, что в эритроцитах детей с АА и МДС активируется цитоплазматическая глутатион-S-трансфераза (ГТ), которая вовлечена в процессы детоксикации клеток от эндогенных и экзогенных ксенобиотиков [Слобожанина и др., 2005]. Нами показано, что активность ГТ в эритроцитах крови детей, страдающих ОЛЛ и ОМЛ, также в 1,8–2,5 раза выше, чем в эритроцитах практически здоровых детей, и более выражена в группе детей с ОМЛ. Известно, что глутатион-S-конъюгаты, образующиеся в результате катализируемой ГТ реакции, менее токсичны и экспортируются из клеток с помощью интегральных мембранных белков-транспортеров семейства MRP. Как видно из рисунка 1, у детей с АА и МДС наблюдается значительная активация экспорта глутатион-S-конъюгатов из эритроцитов. Корреляционный анализ выявил обратную связь между скоростью транспорта конъюгатов глутатиона из эритроцитов и коэффициентом эксимеризацией пирена, включенного в эритроцитарные мембраны детей с МДС и характеризующего текучесть липидного бислоя  $r = -0,5$ ;  $P < 0,05$ .



t- время инкубации при 37° С; D<sub>340</sub> – оптическая плотность супернатантов  
**Рисунок 1. – Кинетика выхода конъюгатов глутатиона из эритроцитов детей, страдающих АА (кривая 1, А) и МДС (кривая 1, Б), а также практически здоровых детей (кривые 2, А и Б)**

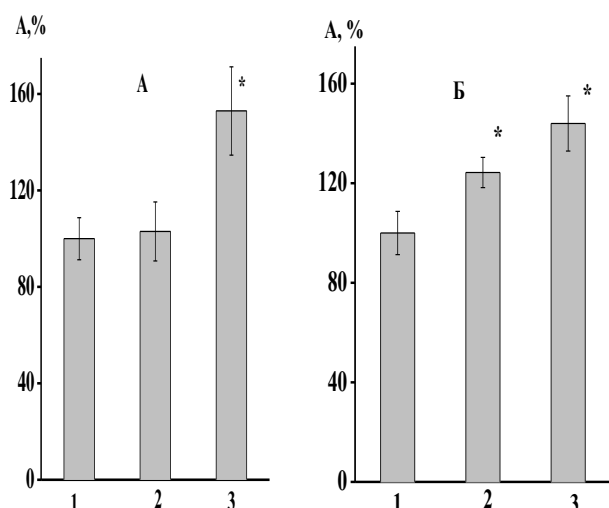
Полученные результаты свидетельствуют о повышении функциональной активности мембранных белков-транспортеров семейства MRP в эритроцитах детей, страдающих АА и МДС, что, вероятно, связано с нарушением физического состояния липидного бислоя клеточных мембран или повышенной скоростью образования конъюгатов.

Известно, что изменение активности мембраносвязанных белков также является следствием их структурной модификации, о которой можно судить по количеству сульфгидрильных групп. Проведенные измерения их уровня в белках мембран эритроцитов детей с АА и МДС, используя зонд N-(1-пирен)-малеимид, который при встраивании в цитоплазматическую мембрану взаимодействует именно с SH-группами, выявили снижение интенсивности флуоресценции зонда по сравнению с группой практически здоровых детей. Изменение уровня SH-групп (снижение на 20–40%) было обнаружено также спектрофотометрическим методом. Полученные данные свидетельствуют о том, что в мембранах эритроцитов крови детей, страдающих МДС и АА, происходит окисление белков, что, в свою очередь, может приводить к изменению степени везикуляции эритроцитов при метаболическом истощении клеток.

Сравнительное исследование кинетики везикуляции эритроцитов в условиях их метаболического истощения *in vitro*, определяемого по изменению активности АХЭ в супернатантах, полученных после центрифугирования эритроцитов трех групп обследованных детей, показало наличие различий в скорости отделения от мембран микровезикул. Как видно из рисунка 2, в группах детей с АА и МДС по сравнению с группой практически здоровых детей, усиливается степень везикуляции эритроцитов, особенно на стадии, которая считается "АТФ-зависимым процессом" [Черницкий и др., 1994] и начинается после 20 ч инкубации клеток в среде без глюкозы. При этом оценка концентрации метгемоглобина в эритроцитах детей с патологией в течение всего периода их инкубации в безглюкозной среде позволила зарегистрировать более высокий его уровень (до 10 %) уже на начальной стадии метаболического истощения клеток (до 20 ч) по сравнению с контрольной группой.

Таким образом, более интенсивное отделение части мембранного материала (везикуляция) при метаболическом истощении эритроцитов у детей, страдающих МДС и АА, скорее всего, связано не только с изменением физико-химического состояния мембранных липидов и белков, но и с уровнем окисления гемоглобина, что является важным звеном в патогенезе анемического синдрома.

Полученные результаты позволяют заключить, что параметры флуоресценции липофильных зондов, включенных в мембраны эритроцитов и лимфоцитов, а также показатели везикуляции эритроцитов могут быть использованы для разработки дополнительных способов диагностики заболеваний крови.



1 – практически здоровые дети (контроль); 2 – пациенты с АА; 3 – пациенты с МДС

За 100% принято среднее значение активности АХЭ в супернатантах, полученных после 26- и 40-часовой инкубации.

\*Р – Достоверность различий по сравнению с контролем  $P < 0,05$ .

**Рисунок 2. – Изменение активности АХЭ в супернатантах, полученных после осаждения 5% - ной суспензии эритроцитов, подвергшихся инкубации в безглюкозной среде в течение 26 ч (А) и 40 ч (Б) при 37°С**

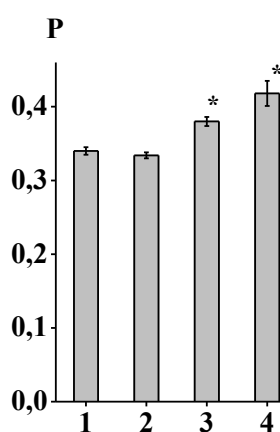
### **Влияние амилоидных фибрилл на структурно-функциональное состояние мембран эритроцитов человека**

Существует большая группа «конформационных» заболеваний – амилоидозы, которые характеризуются отложениями белка в виде нерастворимых фибрилл в разных органах и тканях, образующихся в результате наследственного или приобретенного нарушения сворачивания белков [Uversky, 2005]. Амилоидные отложения играют центральную роль в патогенезе таких заболеваний, как болезни Альцгеймера и Паркинсона, сахарный диабет II типа, прионные болезни, и др. [Duce et al., 2010]. Механизмы токсичного действия амилоидных фибрилл на клетки крови и их роль в развитии амилоидозов до сих пор мало исследованы. Нами на примере эритроцитов изучен ответ клеток крови на воздействие амилоидных фибрилл из лизоцима *in vitro*, а для изучения возможности проявления эффектов амилоидов *in vivo* исследованы физико-химические свойства компонентов крови пациентов с сахарным диабетом II типа. Показано, что у пациентов с данной патологией происходит накопление амилоидогенного пептида амилина в печени и в клетках поджелудочной железы.

Известно, что маркером структурного состояния мембран эритроцитов является мембраносвязанная АХЭ. Установлено, что в эритроцитах человека, подвергшихся воздействию *in vitro* амилоидных фибрилл, повышалась максимальная скорость реакции ( $V_{\text{макс}}$ ) мембраносвязанной АХЭ, при этом среднее значение константы Михаэлиса ( $K_M$ ) практически не изменялось. Активность другого мембраносвязанного фермента – NADH-метгемоглобинредуктазы, ответственного за восстановление метгемоглобина в оксигемоглобин, снижалась на 10–15% после воздействия на эритроциты амилоидных фибрилл *in vitro*. Полученные данные указывают на то, что взаимодействие амилоидных структур с клеточной мембраной приводит к модификации ее структурного состояния и, можно было предположить, что

такое взаимодействие может привести к развитию окислительных процессов в клетке. В литературе имеются данные об изменении уровня МДА в эритроцитах при болезни Альцгеймера [Герасимов и др., 2009], а также о влиянии  $\beta$ -амилоидного белка на процессы ПОЛ в липосомах, обогащенных полиненасыщенными жирными кислотами *in vitro* [Walter et al., 1997]. Нами установлено, что после 3-х часовой (37°C) инкубации эритроцитов с амилоидными структурами, уровень МДА в клетках снижался в среднем на 40 % по сравнению с интактными клетками и на 15% по сравнению с эритроцитами, проинкубированными с лизоцимом при тех же условиях. Наши результаты согласуются с литературными о снижении процессов ПОЛ в эритроцитах пациентов с болезнью Альцгеймера [Герасимов и др., 2009].

Результаты оценки с помощью липофильных флуоресцентных зондов состояния липидного бислоя мембран в эритроцитах, подвергшихся воздействию амилоидных структур *in vitro*, а также в эритроцитах пациентов с сахарным диабетом II типа указывает на изменение физико-химического состояния мембранных липидов. Как видно из рисунка 3, в обоих случаях происходит увеличение поляризации флуоресценции ТМА-ДФГ, встроенного в мембраны эритроцитов, что свидетельствует о снижении текучести липидного бислоя.

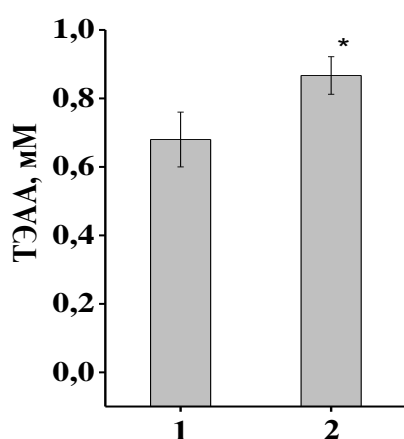


1 – интактные изолированные мембраны эритроцитов; 2 – изолированные мембраны, подвергшиеся воздействию лизоцима в течение 3 ч; 3 – изолированные мембраны, подвергшиеся воздействию амилоидных структур из лизоцима в течение 3 ч; 4 – изолированные мембраны эритроцитов пациентов с СД II типа. \* – различия по отношению к контролю достоверны  $P < 0,01$ .

**Рисунок 3. – Поляризация флуоресценции (P) ТМА-ДФГ, встроенного в мембраны эритроцитов, подвергшихся воздействию амилоидных фибрилл *in vitro* и эритроцитов пациентов с СД II типа**

Для поиска механизма, приводящего к ингибированию процессов ПОЛ, мы провели сравнительный анализ активности ферментов антиоксидантной системы (АОС) и уровня GSH в эритроцитах как *in vitro* при воздействии амилоидных структур, так и *in vivo* – в эритроцитах пациентов с СД II типа. Обнаружено, что уровень GSH в эритроцитах был увеличен в среднем на 50–60% в экспериментах *in vitro* и на 15–20% – у пациентов с СД II типа. Обнаруженные изменения активности ферментов АОС эритроцитов как *in vitro*, так и *in vivo* (эритроциты пациентов с СД II типа) имели разнонаправленный характер – при действии амилоидов на эритроциты *in vitro* наблюдалось повышение активности каталазы и снижение активности глутатионпероксидазы, а в эритроцитах пациентов с СД II типа активность глутатионпероксидазы повышалась, а каталазы – снижалась по сравнению с нормой.

Известно, что неферментативные антиоксиданты, такие как  $\alpha$ -токоферол, аскорбиновая кислота, билирубин и другие, формируют сеть антиоксидантов плазмы крови, изучение которых является необходимым при оценке антиоксидантного статуса организма человека *in vivo* [Lovasova, Sesztakova, 2009]. Методом ТЭАА нами обнаружено достоверное увеличение общей антиоксидантной активности плазмы крови пациентов, страдающих СД II типа, по сравнению с группой практически здоровых доноров (рисунок 4). Это согласуется с литературными данными о повышении активности пероксидазы, супероксиддисмутазы и каталазы в сыворотке крови пациентов с СД II типа [Ahmed et al., 2006].



1 – практически здоровые доноры (контроль); 2 – пациенты с СД II типа, \* – различия по сравнению с контролем достоверны  $P < 0,05$ .

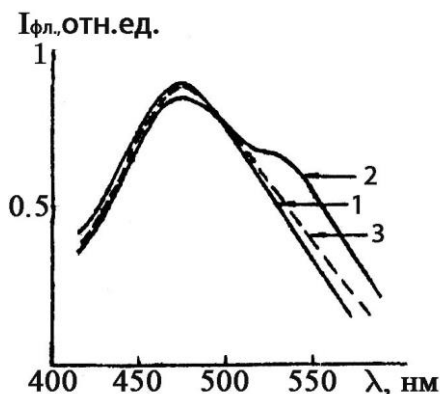
**Рисунок 4. – Общая антиоксидантная активность плазмы крови пациентов с СД II типа, выраженная в тролокс-эквиваленте антиоксидантной активности (ТЭАА)**

Таким образом, амилоидные структуры при взаимодействии с эритроцитами *in vitro* модифицируют структурно-функциональное состояние как липидной, так и белковой компоненты клеточных мембран на фоне активации антиоксидантных процессов, что подтверждается в экспериментах *in vivo* у пациентов с СД II типа.

#### **Флуоресцентное исследование биологических жидкостей при патологических состояниях человека**

Ранее показано, что спектральный анализ плазмы и сыворотки крови позволяет диагностировать онкогематологические заболевания [Черницкий, Слобожанина, 1989]. Нами исследованы характеристики как собственной, так и зондовой флуоресценции плазмы крови, а также синовиальной жидкости и мочи в норме и при патологии. Изучен люминесцентный параметр (К), определяемый как отношение величины интенсивности ультрафиолетовой (триптофановой) флуоресценции плазмы крови в ее максимуме ( $\lambda_{\text{пер.}}=350$  нм) к величине интенсивности флуоресценции восстановленных форм никотинамидных коферментов (при  $\lambda_{\text{пер.}}=470$  нм) у детей с МДС и АА, а также в группе практически здоровых детей и в группе взрослых пациентов с псориазом. Обнаружено, что К плазмы крови у детей с МДС и АА, а также у пациентов с псориазом имел значение, близкое к показателям для доноров – 0,5–0,9. При возбуждении флуоресценции плазмы крови пациентов с псориазом  $\lambda=365$  нм в спектре люминесценции

наблюдалось «плечо» при 530 нм, которое было более выражено у пациентов до лечения (рисунок 5). Из этого следует, что положение максимума и форма спектров люминесценции плазмы крови пациентов с псориазом в области 470–550 нм могут быть использованы для разработки лабораторного люминесцентного метода оценки эффективности лечения псориаза.



- 1- практически здоровый донор;  
2 – пациент с псориазом до лечения;  
3- пациент с псориазом в состоянии ремиссии

( $\lambda_{\text{возб.}}=365 \text{ нм}$ )

**Рисунок 5. – Типичные спектры люминесценции 5% -ной плазмы периферической крови пациентов обследованных групп**

С целью выявления биофизических параметров, отражающих патологию суставов, с помощью флуоресцентных зондов ФНА, АНС, ТМА-ДФГ и ПМ нами изучены особенности состояния компонентов синовиальной жидкости при таких патологиях как посттравматический синовит (ПТС), деформирующий остеоартроз (ДОА) и ревматоидный артрит (РА). Известно, что синовиальная жидкость представляет собой сложную биологическую среду, содержащую значительное количество белков, а также липиды и эфиры холестерина [Белоенко и др., 2006]. Как видно из таблицы 2, интенсивность флуоресценции ФНА, связанного в основном с липидными компонентами синовиальной жидкости, не различается в обследуемых группах пациентов. В то же время, интенсивность флуоресценции АНС, взаимодействующего как с белками, так и с липидами и зависящее от полярности окружения, достоверно отличалось в группе пациентов с РА от значений характерных для группы пациентов с ПТС. Как известно, количество липопротеинов низкой плотности в синовиальной жидкости пациентов с РА увеличивается [Dai et. al., 1999], но они находятся в окисленном состоянии и характеризуются увеличенным отрицательным зарядом [Dai et. al., 2000]. В результате этого может происходить снижение интенсивности флуоресценции связанного с компонентами синовиальной жидкости АНС, так как этот зонд имеет отрицательный заряд. Увеличение интенсивности флуоресценции ТМА-ДФГ в синовиальной жидкости пациентов с ДОА, можно объяснить повышением количества жирных кислот, прежде всего арахидоновой, в синовиальной жидкости пациентов с остеоартрозом [Plamb, Aspden, 2004]. Обнаружено снижение в среднем на 20–25% интенсивности флуоресценции ПМ, связанного с компонентами синовиальной жидкости, у пациентов с РА по сравнению с другими обследованными группами, что свидетельствует о снижении уровня SH-групп белков в синовиальной жидкости пациентов с РА.

**Таблица 2 – Интенсивность флуоресценции зондов ФНА, АНС, ПМ и ТМА-ДФГ, связанных с компонентами синовиальной жидкости пациентов**

Использованный зонд	Интенсивность флуоресценции зондов, отн. ед.		
	Посттравматический синовит (ПТС), (n=12)	Деформирующий остеоартроз (ДОА), (n=7)	Ревматоидный артрит (РА), (n=5)
ФНА ( $\lambda_{\text{возб./рег.}}=350/410$ нм)	133,13±37,90	117,5±43,8	139,0±25,0
АНС ( $\lambda_{\text{возб./рег.}}=375/470$ нм)	234,4±37,3	87,0±28,5*	61,8±28,5*
ПМ ( $\lambda_{\text{возб./рег.}}=342/396$ нм)	0,211±0,016	0,192±0,021	0,151±0,020**
ТМА-ДФГ ( $\lambda_{\text{возб./рег.}}=365/428$ нм)	0,99±0,05	1,23±0,06*	–

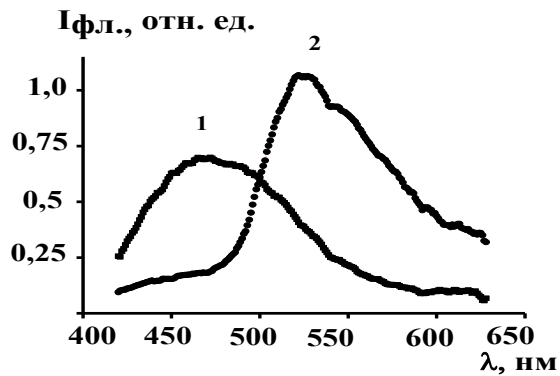
Достоверность различий анализируемого показателя между группами – \* $P < 0,05$ ;  
\*\* –  $P < 0,01$ .

Из полученных данных следует, что о патологии суставов можно судить по изменению значений интенсивности люминесценции флуоресцентных зондов, связанных с различными компонентами синовиальной жидкости (липидами и белками). На основании этого нами разработан способ дифференциальной диагностики травматического синовита и ревматического заболевания суставов (патент N 12197).

В связи с возросшим вниманием исследователей к проблеме почечной патологии у новорожденных, связанной с ростом нефроурологической заболеваемости у детей раннего возраста, склонностью указанных заболеваний к хроническому течению, в ряде случаев приводящему к инвалидности [Рагимова, 2007], возникла необходимость поиска чувствительных неинвазивных способов лабораторной диагностики таких состояний. Нами проанализированы спектры собственной люминесценции мочи 30 новорожденных в области длин волн 400–650 нм и установлено, что по наличию в моче спектра люминесценции с максимумом в области 520–540 нм, можно диагностировать перинатальную нефропатию на стадии предболезни (рисунок 6). На основании этих результатов разработан способ доклинической диагностики нефропатии у новорожденного (патент N 17616).

Полученные результаты позволяют заключить, что способы, созданные на основе анализа собственной и зондовой люминесценции биологических жидкостей человека, могут дополнить многокомпонентный клинический анализ и обеспечивать экспрессность и высокую достоверность диагностики ряда заболеваний.





- 1 – практически здоровый новорожденный  
 2 – новорожденный с перинатальной нефропатией  
 ( $\lambda_{\text{возб.}} = 375 \pm 10 \text{ нм}$ )

**Рисунок 6. – Типичные спектры люминесценция мочи новорожденных**

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

### Основные научные результаты диссертации

1. Показано, что в эритроцитах и лимфоцитах детей, страдающих предлейкозными (МДС и АА) и злокачественными заболеваниями крови (ОЛМ, ОМЛ) происходит нарушение микровязкости липидов на разной глубине липидного бислоя мембран, которое сопровождается модификацией структурно-функционального состояния мембранных белков и имеет неспецифический характер, так как проявляется и при других заболеваниях - ДЦП, ВУИ. [1, 5, 7, 8, 10, 13, 14, 19, 23, 29, 30].

2. Установлено, что в эритроцитах детей, страдающих АА и МДС, происходит повышение активности цитозольной глутатион-S-трансферазы, функциональной активности мембранных белков транспортеров, ответственных за экспорт ксенобиотиков из клеток, вследствие нарушения физического состояния липидного бислоя мембран клеток и/или повышенной скорости образования конъюгатов глутатиона из-за высокого уровня активности цитозольной глутатион-S-трансферазы [4, 17, 18, 28, 31].

3. Показано, что в эритроцитах детей с АА и МДС отделение части мембранного материала (везикуляции) при метаболическом истощении клеток *in vitro* происходит более интенсивно, чем в эритроцитах здоровых детей, что, по-видимому, связано как с нарушением физико-химического состояния мембранных белков и липидов, так и с уровнем окисления гемоглобина. Эти нарушения могут быть причиной сокращения продолжительности жизни эритроцитов у детей с АА и МДС и являться важным звеном в патогенезе анемического синдрома. [1, 3, 16, 20, 27].

4. Обнаружено, что амилоидные фибриллы лизоцима, взаимодействуя с эритроцитами человека *in vitro*, модифицируют структурное состояние их мембран, проявляющееся в увеличении микровязкости мембранных липидов, изменении активности мембраносвязанных ферментов, ингибировании процессов ПОЛ на фоне активации антиоксидантных процессов в клетке. Сходные разнонаправленные изменения активности ферментов антиоксидантной защиты и микровязкости липидов в мембранах эритроцитов обнаружены и у

пациентов с сахарным диабетом II типа, что можно объяснить повышением общей антиоксидантной активности плазмы крови [9, 11, 12, 21, 22, 32-36].

5. Выявлено, что интенсивность флуоресценции АНС, связанного с компонентами синовиальной жидкости пациентов с ревматоидным артритом и деформирующим остеоартрозом, достоверно отличается от таковой для группы пациентов с посттравматическими синовитами, и разработан способ дифференциальной диагностики травматического синовита и ревматического заболевания суставов. Параметры люминесценции плазмы крови больных псориазом в области 470–550 нм могут быть использованы для разработки методов оценки эффективности лечения при псориазе [2, 6, 15, 24, 25, 26, 37, 38].

6. Разработан неинвазивный экспресс-способ выявления патологии мочевой системы у новорожденных детей, заключающийся в анализе параметров собственной люминесценции мочи новорожденного. Обнаружение в спектре люминесценции мочи новорожденных максимума в области 520–540 нм свидетельствует о перинатальной нефропатии на стадии предболезни у новорожденных [37, 39].

### **Рекомендации по практическому использованию результатов**

1. Предложенный нами метод установления молекулярно-мембранных патогенетических механизмов при первичных МДС и АА у детей используется в лекционных материалах в циклах последипломного образования врачей на кафедре клинической гематологии и трансфузиологии БелМАПО (акт внедрения от 24.02.2005г.).

2. «Способ дифференциальной диагностики травматического синовита и ревматического заболевания суставов» (патент № 12197 от 6.05.2009г.) внедрен в практику ГУ «Республиканский научно-практический центр травматологии и ортопедии» (акт внедрения от 18.02.2010г.)

3. «Способ доклинической диагностики нефропатии у новорожденного» (патент № 17616 от 08.07.2013г.) и «Экспресс-способ выявления патологии мочевой системы у новорожденных детей» внедрены в практику педиатрического отделения для новорожденных в ГУ «РНПЦ «Мать и дитя», (акты внедрения от 30.12.2010г. и 30.03.2011г.).

4. Предложенные методы оценки действия амилоидов на эритроциты человека используются в лекционных и практических материалах на кафедре детской онкологии и гематологии БелМАПО (акты внедрения от 25.02.2013г. и 19.01.2015г.).

5. Разработка «Способы люминесцентного анализа биологических объектов» внедрена в учебный процесс УО «Белорусский государственный аграрный технический университет» (акт внедрения от 18.09.2015г.).

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Глава в монографии

1. Слобожанина, Е.И. Нарушение эритропоза и изменение физико-химических свойств мембран эритроцитов у пациентов с миелодиспластическими синдромами / Е.И. Слобожанина, Н.Н. Климкович, Г.П. Зубрицкая, Т.И. Козарезова // Морфологические основы патологии : ред. В.П. Волкова. – Новосибирск: СиБАК, 2015. – Гл. 7. – С. 136–157.

### Статьи в рецензируемых научных журналах

2. Изменение люминесцентных параметров плазмы крови и структурно-функционального состояния эритроцитов больных псориазом и экземой в процессе лечения / Г.П. Зубрицкая, И.Н. Белугина, Н.З. Яговдик, М.В. Качук, Е.И. Слобожанина // Здоровоохранение. – 2002. – № 1. – С. 13–15.

3. Процессы микровезикуляции эритроцитов у детей с миелодиспластическим синдромом и апластическими анемиями / Г.П. Зубрицкая, Л.М. Лукьяненко, Е.И. Слобожанина, Т.И. Козарезова, Н.Н. Климкович // Новости медико-биологических наук. – 2004. – № 1. – С. 143–146.

4. Активность глутатион-S-трансферазы и выход конъюгатов глутатиона из эритроцитов детей, больных апластическими анемиями и миелодиспластическим синдромом / Е.И. Слобожанина, Г.П. Зубрицкая, А.Н. Антонович, Н.М. Козлова, Т.И. Козарезова, Н.Н. Климкович, Г. Бартош // Известия НАН Беларуси, сер. мед. наук. – 2005. – № 1. – С. 59–63.

5. Изменение физического состояния липидов в мембранах эритроцитов детей, страдающих миелодиспластическими синдромами и приобретенными апластическими анемиями / Е.И. Слобожанина, Г.П. Зубрицкая, Н.М. Козлова, Н.Н. Климкович, Т.И. Козарезова // Известия НАН Беларуси, сер. мед. наук. – 2006. – №1. – С. 76–80.

6. Использование флуоресцентных зондов в исследовании компонентов синовиальной жидкости при патологии суставов / Е.И. Слобожанина, Е.Д. Белоенко, Н.М. Козлова, О.Л. Эйсмонт, А.Г. Кутько, Г.П. Зубрицкая // Известия НАН Беларуси, сер. мед. наук. – 2006. – № 4. – С. 10–14.

7. Биофизические параметры мембран эритроцитов и лимфоцитов детей, страдающих опухолевыми заболеваниями крови / Е.И. Слобожанина, Г.П. Зубрицкая, Н.М. Козлова, Т.И. Козарезова, Н.Н. Климкович // Известия НАН Беларуси, сер. мед. наук. – 2009. – № 4. – С. 5–10.

8. Изменение активности ферментов антиоксидантной системы защиты и физического состояния мембранных липидов в эритроцитах новорожденных

при патологических состояниях перинатального периода / Г.П.Зубрицкая, А.Г. Кутько, А.А. Криштафович, К.У. Вильчук, Е.И. Слобожанина // Известия НАН Беларуси, сер. мед. наук. – 2012. – № 1. – С. 9–13.

9. Влияние амилоидов на физико-химическое состояние липидного бислоя мембран эритроцитов / Л.М. Лукьяненко, Г.П. Зубрицкая, Е.И. Венская, А.С. Скоробогатова, А.Г. Кутько, Е.И. Слобожанина // Новости медико-биологических наук. – 2013. – Т.7, № 1. – С. 9–13.

10. Флуоресцентное зондирование мембран лимфоцитов при первичных миелодиспластических синдромах / Г.П. Зубрицкая, Н.Н. Климкович, Т.И. Козарезова, Е.И. Слобожанина // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. – 2014. – № 1. – С. 45–51.

11. Индуцированная амилоидами модификация мембран эритроцитов человека. Влияние антиоксидантов / Г.П. Зубрицкая, Л.М. Лукьяненко, Е.И. Венская, Е.И. Слобожанина // Доклады НАН Беларуси. – 2014. – № 4. – С. 78–81.

12. Интегральная оценка антиоксидантного статуса и физического состояния мембранных липидов эритроцитов периферической крови пациентов с метаболическим синдромом / Ю.М. Гармаза, Г.П. Зубрицкая, А.Г. Кутько, И.В. Патеюк, Н.П. Митьковская, Ю.И. Степанова, Е.И. Слобожанина // Известия НАН Беларуси, сер. мед. наук. – 2014. – Т. 4. – С. 90–96.

13. Биофизические параметры эритроцитов при неврологической патологии у детей раннего возраста / Г.П. Зубрицкая, М.Г. Девялтовская, А.Г. Кутько, Е.И. Слобожанина // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. – 2014. – № 2. – С. 62–68.

### **Статьи в сборниках материалов конференций**

14. Исследование физического состояния липидов в эритроцитарных мембранах детей, страдающих апластическими анемиями и миелодиспластическим синдромом / Г.П. Зубрицкая, Н.М. Козлова, Т.И. Козарезова, Н.Н. Климкович // Междунар. науч. конф. «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем», VI съезд Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков : сборник статей, Минск, 6–8 октября 2004 г. : в 2 ч. / Белорус. Гос. ун-т, Ин-т биоф. и клет. инжен. НАН Беларуси, Белорус. обществ. объедин. фотобиол. и биофиз. ; ред. : И.Д. Волотовский [и др.]. – Минск, 2004. – Ч. 2. – С. 154–156.

15. Исследование синовиальной жидкости с помощью флуоресцентных зондов / Н.М. Козлова, А.Г., Кутько, Г.П. Зубрицкая, О.Л. Эйсмонт, Е.Д. Белоенко, Е.И. Слобожанина // IV съезд фотобиологов России : материалы съезда, Саратов, 26–30 сентября, 2005 г. / Росс. об-во фотобиологов, Саратовский

Гос. Ун-т, РАН, Ин-т биохим. им. Баха, МГУ им. Ломоносова, Ин-т фонд. проблем биол. РАН, РГМУ, РФФИ. – Саратов, 2005. – С. 76–78.

16. Везикуляция эритроцитов и транспорт конъюгатов глутатиона из эритроцитов *in vitro* у детей, страдающих апластическими анемиями и миелодиспластическим синдромом / Г.П. Зубрицкая, Н.М. Козлова, Л.М. Лукьяненко, Т.И. Козарезова, Н.Н. Климкович // Междунар. науч. конф. «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем», VII съезд Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков: сборник статей, Минск, 21–23 июня 2006 г. : в 2 ч. / Белорус. Гос. ун-т, Ин-т биоф. и клет. инжен. НАН Беларуси, Белорус. обществ. объедин. фотобиол. и биофиз. ; ред. : И.Д. Волотовский [и др.]. – Минск, 2006. – Ч. 2. – С. 188–190.

17. Изменение активности глутатион-S-трансферазы в эритроцитах детей, страдающих опухолевыми заболеваниями крови / Г.П. Зубрицкая, Т.И. Козарезова., Н.Н. Климкович, Е.И. Слобожанина // Медико-социальная экология личности: состояние и перспективы : материалы V международной конференции, Минск, 6–7 апреля 2007 г. : в 2 ч. / Мин-во образ. Республики Беларусь, Белорус. Гос. ун-т ; ред. : В.А. Прокашева [и др.] – Минск, 2007. – Ч.1 – С. 116–118.

18. Биологические критерии реализации сигнала апоптоза при острых лейкозах и миелодиспластических синдромах у детей / Н.Н., Климкович, Г.П. Зубрицкая, Т.И. Козарезова, Н.М. Козлова, Е.И. Слобожанина. // Актуальные вопросы диагностики и лечения заболеваний крови : материалы Всеукраинской научно-практической конференции, Киев, Украина, 2–3 августа 2008 г. : / Новое в гематологии и трансфузиологии. – 2008. – С. 50–54.

19. Микровязкость липидов в мембранах лимфоцитов при неопластических болезнях крови / Г.П. Зубрицкая, А.Г. Кутько, Н.Н. Климкович, Т.И. Козарезова // Междунар. науч. конф. «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем», IX съезд Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков : сборник статей, Минск, 23–25 июня 2010 г. : в 2 ч. / Белорус. Гос. ун-т, Ин-т биоф. и клет. инжен. НАН Беларуси, Белорус. обществ. объедин. фотобиол. и биофиз. ; ред. : И.Д. Волотовский [и др.]. – Минск, 2010. – Ч. 2. – С. 219–221.

20. Изменение уровня SH-групп в белках эритроцитов детей, страдающих апластическими анемиями и миелодиспластическим синдромом / Г.П. Зубрицкая, Н.Н. Климкович, Т.И. Козарезова, Н.М. Козлова // Медико-социальная экология личности: состояние и перспективы : материалы X международной конференции, Минск, 6–7 апреля 2012 г. : / Мин-во образ. Республики Беларусь, Белорус. Гос. ун-т ; ред. : В.А. Прокашева [и др.]. – Минск, 2012. – С. 161–163.

21. Влияние амилоидных структур на везикуляцию эритроцитов человека /Л.М. Лукьяненко, Г.П. Зубрицкая, Е.И. Венская, Е.И. Слобожанина // Медико-социальная экология личности: состояние и перспективы : материалы X международной конференции, Минск, 6–7 апреля 2012 г. : / Мин-во образ. Республики Беларусь, Белорус. Гос. ун-т ; ред. : В.А. Прокашева [и др.]. – Минск, 2012. – С. 185–188.

22. Мембранные эффекты амилоидных протофибрилл / Г.П. Зубрицкая, Л.М. Лукьяненко, Е.И. Венская, Е.И. Слобожанина // Междунар. науч. конф. «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем», X съезд Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков: сборник статей, Минск, 19–21 июня 2012 г. : в 2 ч. / Белорус. Гос. ун-т, Ин-т биоф. и клет. инжен. НАН Беларуси, Белорус. обществ. объедин. фотобиол. и биофиз. ; ред. : И.Д. Волотовский [и др.]. – Минск, 2012. – Ч. 1. – С. 157–159.

23. Стресс-реакции мембран лимфоцитов при первичных миелодиспластических синдромах / Н.Н. Климович, Г.П. Зубрицкая, Т.И. Козарезова, Е.И. Слобожанина //Фундаментальные и прикладные проблемы стресса: материалы III международной научно-практической конференции, Витебск, 16–17 апреля 2013 г. / Мин-во образ. Республики Беларусь, УО Вит. Гос. ун-т им. Машерова ; ред. : А.П. Солодков [и др.]. – Витебск, 2013. – С. 22–24.

### **Тезисы докладов**

24. Спектрально-люминесцентные параметры плазмы крови больных псориазом / Г.П. Зубрицкая, И.Н. Белугина, Н.З. Яговдик, Е.И. Слобожанина // Междунар. науч. конф. «Молекулярно-клеточные основы функционирования биосистем», IV съезд Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков : сборник статей, Минск, 28–30 июня 2000 г. / Белорус. Гос. ун-т, Ин-т биоф. и клет. инжен. НАН Беларуси, Белорус. обществ. объедин. фотобиол. и биофиз. ; ред. : И.Д. Волотовский [и др.]. – Минск, 2000. – С. 251.

25. Изменение физико-химических параметров эритроцитов больных псориазом и экземой в процессе лечения / Г.П. Зубрицкая, Н.З. Яговдик, И.Н. Белугина, М.В. Качук, А.Г. Кутько, Е.И. Слобожанина // Междунар. науч. конф. «Молекулярно-клеточные основы функционирования биосистем», IV съезд Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков : сборник статей, Минск, 28–30 июня 2000 г. / Белорус. Гос. ун-т, Ин-т биоф. и клет. инжен. НАН Беларуси, Белорус. обществ. объедин. фотобиол. и биофиз. ; ред. : И.Д. Волотовский [и др.]. – Минск, 2000. – С. 252.

26. Зубрицкая, Г.П. Люминесцентные параметры плазмы крови у детей больных миелодиспластическим синдромом и апластическими анемиями / Г.П. Зубрицкая, Н.Н. Климкович // Актуальные вопросы современной биологии и биотехнологии : материалы II международной научн. конф. молодых ученых и студентов, Алматы, Казахстан, 24–26 апреля 2002 г. / Казах. национ. ун-т, биол. факультет ; ред. : Р.И. Берсимбаев [и др.]. – Алматы, 2002. – С. 122–123.

27. Изменение везикуляции эритроцитов при панмиелопатиях у детей / Г.П. Зубрицкая, Л.М. Лукьяненко, Т.И. Козарезова, Н.Н. Климкович, Е.И. Слобожанина // Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии : материалы Росс-кой науч.-практ. конф., С-Петербург, Россия, 18–20 июня 2002 г. / Мин-во здравоохранения Р Ф, Северо-Западное отд-ние РАМН, Российский научно-исследов. Ин-т гематол. и трансфуз. – С-Петербург, 2002. – С. 193.

28. The activity of glutathione-S-transferase and transport of glutathione conjugates in erythrocytes of children suffering from aplastic anemia and myelodysplastic syndrome / A. Antonovich, G. Zubritskaja, Kozlova, N. Klimkovich N., T. Kozarezova, E. Slobozhanina // Reactive oxygen and nitrogen species, antioxidantes and human health : abstracts of International conference, Smolensk, Russia, 22–25 September 2003 / Russian Foundation for Basic Research, Russian academy medical science, Russian academy of science. – Smolensk, 2003. – P. 93–94.

29. Изменение физического состояния липидов в мембранах эритроцитов детей, страдающих миелодиспластическим синдромом и приобретенными апластическими анемиями / Е.И. Слобожанина, Г.П. Зубрицкая, Т.И. Козарезова, Н.Н. Климкович, Н.Н. Козлова, А.Г. Кутько // III съезд биофизиков России: тезисы докладов, Воронеж, Россия, 24–29 июня 2004 г. / Росс. Акад. наук, секция физ-хим. биологии, Ин-т биофизики клетки РАН, Ин-т теор. и exper. биофизики РАН, Воронежский гос. ун-т, МГУ ; ред. : А.Б. Рубин. – Воронеж, 2004. – Т.2. – С. 577–578.

30. Luminescence study of lipid in erythrocyte membrane of children suffering from myelodysplastic syndrome and aplastic anemia / G. Zubritskaja, T. Kozarezova, N. Klimkovich, N. Kozlova, E. Slobozhanina // The 38th Annual scientific meeting of the european society for clinical investigation, Utrecht, Netherlands, 14–17 April 2004. – European Journal of Clinical Investigation. – Vol. 34. – P. 13–14.

31. Активность глутатионтрансферазы в эритроцитах при злокачественных заболеваниях кроветворной ткани у детей / Г.П. Зубрицкая, Н.Н. Климкович, Т.И. Козарезова, А.Н. Антонович, Е.И. Слобожанина // Актуальные проблемы гематологии и трансфузиологии: VI съезд гематологов и трансфузиологов Республики Беларусь : сб. научн. трудов, Минск, 24–25 мая 2007 г. / Мин-во здра-ния РБ, ГУ «Респуб. научно-практ. центр гематологии и трансфузиологии» ; ред. : А.И. Свирновский, М.П. Потапнев. – Минск, 2007. – С. 159.

32. Влияние амилоидных протофибрилл на эритроциты человека *in vitro* / Е.И. Слобожанина, Л.М. Лукьяненко, Г.П. Зубрицкая, Е.И. Венская // IV съезд Биофизиков России : материалы докладов, Нижний Новгород, Россия, 20–26 августа 2012 г. / РАН, Отделение биол. наук, Научн. совет РАН по биофизике, Мин-во обр. и науки РФ, Ин-т биофизики клетки РАН. – Нижний Новгород, 2012. – С. 30.

33. Monitoring of free radical processes in protein-lipid systems with a new squaring dye / O. Kutsenko, G. Gorbenko, T. Deligeorgiev, E. Slobozhanina, L. Lukyanenko, G. Zubritskaya // Development and application of new fluorescent materials and methods : abstracts of international conference, Daugavpils, Latvia, 12 September, 2012. – P. 26.

34. Взаимодействие фибриллярного лизоцима с гемоглобином и мембранными белками эритроцитов / О.К. Куценко, В.М. Трусова, Г.П. Горбенко, Г.П. Зубрицкая, Л.М. Лукьяненко, Е.И. Слобожанина // Актуальные проблемы химии и биологии : сборник тезисов : Пушкино, Россия, 2012 г. / Пушкинский научный центр РАН, Ин-т ПНЦ, Тюменский гос. ун-т – Пушкино, 2012. – С. 91.

35. Активность системы антиоксидантной защиты и изменение физико-химических свойств мембранных липидов в эритроцитах пациентов с метаболическим синдромом / Зубрицкая Г.П., Гармаза Ю.М., Козлова Н.М., Кутько А.Г., Лукьяненко Л.М., Патеюк И.В., Митьковская Н.П., Слобожанина Е.И. // Республиканская научно-практическая конференция «Метаболический синдром: междисциплинарные проблемы и их решения» : тезисы докладов, Ташкент, Узбекистан, 14 марта 2013 г. / Мин-во здравоохранения Республики Узбекистан, Ташкенский ин-т усовершенствования врачей. – Ташкент, 2013. – С. 13–14.

36. Amyloid fibrils influence on human erythrocytes membrane *in vitro* / L. Lukyanenko, G. Zubritskaya, A. Skarabahatova, E. Venskaya, G. Gorbenko, V. Trusova, O. Kutsenko, E. Slobozhanina // The 19th Meeting of the European Red Cell Society (ERCS) : abstracts, Forteiland, Ijmuiden, The Netherlands, 10–13 October 2013 / Forteiland, Ijmuiden, 2013. – P. 70.

37. Слобожанина, Е.И. Люминесценция биологических жидкостей и диагностика заболеваний / Е.И. Слобожанина, Г.П. Зубрицкая, А.Г. Кутько // VII съезд Российского фотобиологического общества: материалы съезда. Пос. Шепси, Россия, 14–20 сентября 2014 г. // Российское фотобиологическое общ-во, Московский гос. ун-т им. Ломоносова, РАН, РФФИ; ред.: И.И. Проскуряков, И.А. Найдов. – Пушкино, 2014. – С. 103



**Патенты на изобретение**

38. Способ дифференциальной диагностики травматического синовита и ревматического заболевания сустава: пат. № 12197 Респ. Беларусь МПК (2006) А 61 В 5/00 G 01 N 33/487/ Е.И. Слобожанина, Н.М. Козлова, Е.Д. Белоенко, Г.П. Зубрицкая, О.Л. Эйсмонт, П.Г. Скакун, Д.В. Букач, М.А. Герасименко; заявитель ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси». – № а 20060452; заявл. 15.05.06; опубл. 5.06.2009 // Афіцыйны бюл. /Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. – 2009. – № 4.

39. Способ доклинической диагностики нефропатии у новорожденного/ пат: № 17616 Респ. Беларусь, МПК G 01N 33/493 / Е.И. Слобожанина, Г.П. Зубрицкая, А.Ф. Перковская, К.У. Вильчук, А.А. Криштафович; заявитель ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси». – № а 20101729; заявл. 1.12.10; опубл. 8.07.2013 // Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. –2013. – № 5. – С. 130–131.

## РЭЗІЮМЭ

Зубрыцкая Галіна Пятроўна

**Біяфізічныя характарыстыкі клетак крыві і біялагічных вадкасцяў як паказчыкі паталагічных станаў чалавека**

**Ключавыя словы:** эрытрацыты, лімфацыты, сінавіяльная вадкасць, ліпідны біслой мембран, везікуляцыя, амілоідныя структуры, флуарэсцэнцыя.

**Мэта працы:** вызначэнне біяфізічных крытэрыяў, якія адлюстроўваюць парушэнне фізіка-хімічнага стану кампанентаў клетак крыві пры захворваннях рознага генезу, а таксама выяўленне параметраў ўласнай і зондавай флуарэсцэнцыі біялагічных вадкасцяў, якія сведчаць аб узнікненні і развіцці паталагічнага працэсу ў арганізме чалавека.

**Аб'екты даследавання:** плазма крыві, эрытрацыты і лімфацыты донараў і пацыентаў з рознымі захворваннямі, сінавіяльная вадкасць, мача нованароджаных.

**Метады даследавання:** уласная і зондавая флуарыметрыя, біяхімічныя метады.

**Атрыманыя вынікі і іх навізна:** упершыню ўстаноўлена, што важным звязом у патагенезе анемічнага сіндрому ў дзяцей, якія пакутуюць міеладыспластычным сіндромам і апластычнымі анеміямі, з'яўляецца ўзмацненне ўзроўню везікуляцыі эрытрацытаў пры іх метабалічным спусташэнні, павелічэнне актыўнасці глутатыёнтрансферазы і актывацыя мембраназвязаных бялкоў-транспарцёраў ксенабіётыкаў з прычыны парушэння структурна-функцыянальнага стану мембранных бялкоў і мікравязкасці ліпідаў. Паказана, што ўздзеянне амілоідных фібрыл лізацыма на эрытрацыты чалавека *in vitro* выклікае змену структурна-функцыянальнага стану мембранных і ўнутрыклеткавых кампанентаў без стымулявання свабоднарадыкальных працэсаў у клетцы. Магчымасці праявы *in vivo* аналагічных эфектаў прадэманстраваны на эрытрацытах пацыентаў з цукровым дыябетам II тыпу. Упершыню выяўлены параметры ўласнай і зондавай флуарэсцэнцыі сінавіяльнай вадкасці, адлюстроўваючыя метабалічныя парушэнні пры сінавітах, якія рэкамендаваны выкарыстоўваць для іх дыферэнцыяльнай дыягностыкі. Выяўлены асаблівасці люмінесцэнцыі мачы пры паталогіі і распрацаваны спосаб даклінічнай дыягностыкі нефрапатыі ў нованароджаных.

**Рэкамендацыі па выкарыстанні:** атрыманыя вынікі рэкамендавана выкарыстоўваць у профільных установах Міністэрства аховы здароўя РБ, а таксама ў навучальным працэсе ў ВНУ біялагічнага і медыцынскага профілю.

**Вобласць выкарыстання:** біяфізіка, біяхімія, гематалогія.

**РЕЗЮМЕ****Зубрицкая Галина Петровна****Биофизические характеристики клеток крови и биологических жидкостей как показатели патологических состояний человека**

**Ключевые слова:** эритроциты, лимфоциты, синовиальная жидкость, липидный бислой мембран, везикуляция, амилоидные структуры, флуоресценция.

**Цель работы:** установление биофизических критериев, отражающих нарушение физико-химического состояния компонентов клеток крови при заболеваниях различного генеза, а также выявление параметров собственной и зондовой флуоресценции биологических жидкостей, свидетельствующих о возникновении и развитии патологического процесса в организме человека.

**Объекты исследования:** плазма крови, эритроциты и лимфоциты доноров и пациентов с различными заболеваниями; синовиальная жидкость, моча новорожденных.

**Методы исследования:** собственная и зондовая флуориметрия, биохимические методы.

**Полученные результаты и их новизна:** впервые установлено, что важным звеном в патогенезе анемического синдрома у детей, страдающих миелодиспластическим синдромом и апластическими анемиями, является усиление уровня везикуляции эритроцитов при их метаболическом истощении, повышение активности глутатионтрансферазы и активация мембраносвязанных белков-транспортеров ксенобиотиков вследствие нарушения структурно-функционального состояния мембранных белков и микровязкости липидов. Показано, что воздействие амилоидных фибрилл лизоцима на эритроциты человека *in vitro* вызывает изменение структурно-функционального состояния мембранных и внутриклеточных компонентов без стимулирования свободнорадикальных процессов в клетке. Возможности проявления *in vivo* аналогичных эффектов продемонстрированы на эритроцитах пациентов с сахарным диабетом II типа. Впервые установлены параметры собственной и зондовой флуоресценции синовиальной жидкости, отражающие метаболические нарушения при синовитах, которые рекомендовано использовать для их дифференциальной диагностики. Выявлены особенности люминесценции мочи новорожденных при патологии и разработан способ доклинической диагностики нефропатии у новорожденных.

**Рекомендации по использованию:** полученные результаты рекомендовано использовать в профильных учреждениях Министерство здравоохранения РБ, а также в учебном процессе ВУЗов биологического и медицинского профиля.

**Область применения:** биофизика, биохимия, гематология.

**SUMMARY****Zubrytskaja Halina P.****Biophysical parameters of blood cells and biological fluids  
as indicators of human pathological states**

**Key words:** erythrocytes, lymphocytes, joint fluid, membrane's lipid bilayer, vesiculation, amyloid structures, fluorescent

**Objective:** to establish the biophysical criteria characterizing the disturbances of the physical and chemical state of the blood cell components during diseases of various genesis, as well as changes of parameters internal and external fluorescence of biological fluids which reflected formation and development pathological processes in human organism.

**Research object:** serum of human blood, erythrocytes, lymphocytes; synovial fluid, urine of newborns.

**Methods:** internal and external fluorescence, biochemical methods

**The obtained results and their novelty:** For the first time it was founded that one of the most important chain of pathogenesis of anemic syndrome of children with preleukemia and neoplastic diseases of blood is increasing of erythrocytes vesiculation level under their metabolic depletion, activation of glutathion transferase and membrane-bound protein-transporters due to changes in the physical state of membrane proteins and lipids. It was shown that influence of amyloid lysozyme fibrils on the human erythrocytes *in vitro* leads to changing of structural and functional state of membrane and intracellular components of cells without inducing free-radical processes. The possibility of manifestation such effects *in vivo* was shown on red blood cells of patients with diabetes mellitus. For the first time the internal and external fluorescence parameters of human biological fluids indicating the metabolic disorders under different pathologies which can be used for differential diagnosis of various diseases were revealed.

**Recommendations for application:** Retrieved results are recommended to use in specialized authorities Ministry of Health Republic of Belarus, and also in educational processes in biological and medical Universities.

**Application area:** biophysics, biochemistry, hematology.

---

Подписано в печать 26.08.2016 Формат 60x84<sub>1/16</sub> Бумага офсетная  
Гарнитура Roman Печать цифровая Усл.печ.л. 1,4 Уч.изд.л. 1,5  
Тираж 60 экз. Заказ № 2233  
ИООО «Право и экономика» 220072 Минск Сурганова 1, корп. 2  
Тел. 284 18 66, 8 029 684 18 66  
E-mail: [pravo-v@tut.by](mailto:pravo-v@tut.by); [pravo642@gmail.com](mailto:pravo642@gmail.com) Отпечатано на издательской системе  
KONICA MINOLTA в ИООО «Право и экономика»  
Свидетельство о государственной регистрации издателя,  
изготовителя, распространителя печатных изданий, выданное  
Министерством информации Республики Беларусь 17 февраля 2014 г.  
в качестве издателя печатных изданий за № 1/185