

РЕСПУБЛИКАНСКОЕ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЕ  
УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ  
«ИНСТИТУТ БИОХИМИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ  
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»

УДК: [612.112.94:577.121]:[614.876:546.17]043.3

**НИКИТИНА**  
**Ирина Александровна**

**Структурно-метаболические  
изменения тимоцитов крыс,  
вызванные ионизирующим излучением  
и активными формами азота**

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

по специальностям 03.01.04 – биохимия  
и 03.01.02 – биофизика

Гродно 2017

Работа выполнена в Учреждении образования «Гомельский государственный медицинский университет»

Научные руководители: **Грицук Александр Иванович**, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой биологической химии УО «Гомельский государственный медицинский университет»

**Стародубцева Мария Николаевна**, доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры медицинской и биологической физики УО «Гомельский государственный медицинский университет»

Официальные оппоненты: **Титовец Эрнст Петрович**, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник ГУ «Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии»

**Мартинович Григорий Григорьевич** доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры биофизики физического факультета Белорусского государственного университета

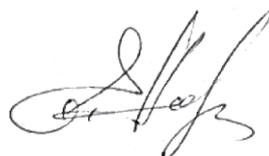
Оппонирующая организация: УО «Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова» Белорусского государственного университета

Защита состоится 23 июня 2017 года в 11-00 на заседании Совета по защите диссертаций Д 01.30.01 при Республиканском научно-исследовательском унитарном предприятии «Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси» по адресу: 230030, г. Гродно, бульвар Ленинского комсомола, 50; e-mail: office@bioch.bas-net.by, тел./факс: 8 (0152) 43-41-21.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Республиканского научно-исследовательского унитарного предприятия «Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси»

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » мая 2017 г.

Ученый секретарь  
Совета по защите диссертаций  
Д 01.30.01, кандидат биологических наук



Е.Е. Нарута

## **КРАТКОЕ ВВЕДЕНИЕ (АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ ДИССЕРТАЦИИ)**

В соответствии с Национальной стратегией устойчивого развития одним из важнейших направлений государственной политики Республики Беларусь в период до 2020 года является повышение экологической безопасности, обеспечивающее улучшение состояния здоровья и благосостояния населения. Вместе с тем, активное распространение в современном мире ядерных технологий, а также широкое использование методов медицинской рентгено- и радиоизотопной диагностики, лучевой терапии онкологических и др. заболеваний неизбежно повышает риск радиотехногенной нагрузки на популяцию человека и биоту [Нейфах, 2014; Spencer, 2015]. Радиационное и химическое загрязнение окружающей среды, повышение техногенного фона в связи с широким распространением источников электромагнитного излучения и другие неблагоприятные факторы оказывают влияние на состояние иммунной системы человека [Орадовская, 2007; Ярилин, 2010] посредством изменения редокс-гомеостаза тканей с последующим развитием окислительного стресса [Черенкевич, 2008; Гребенюк, 2012; Venditti, 2013]. Активные формы кислорода (АФК) и активные формы азота (АФА), включая пероксинитрит, как базовую структуру для этих двух классов соединений, вызывают разнообразные ответы клеток иммунной системы, в том числе, ведущие к их перерождению и гибели через апоптоз или некроз [Guidarelli, et al., 2006; Pacher et al., 2007].

Согласно свободнорадикальной гипотезе, предложенной Д. Харманом и Н. М. Эмануэлем, старение и формирование возрастной патологии связано с избыточным производством в тканях АФК и снижением эффективности механизмов регуляции редокс-баланса. В развитии окислительного стресса митохондрии (Мх) играют основную и, вместе с тем, двоякую роль: с одной стороны, они являются мощными источниками образования в клетках АФК и АФА [Beltran, et al., 2000; Холоденко, и др., 2007], а с другой – главными мишенями их действия [Venditti et al, 2013]. При этом формируется порочный круг – возрастная гиперпродукция АФК в Мх повышает риск мутагенеза митохондриальной ДНК с последующим повреждением системы тканевого дыхания (ТД) и окислительного фосфорилирования (ОФ), усилением образования АФК и прогрессирующим усугублением возрастных деструктивных процессов [Venditti et al, 2013].

Важную роль в функционировании клеточного звена иммунной системы играют морфологические особенности иммунокомпетентных клеток и их способность к быстрой перестройке мембранных структур и цитоскелета, обуславливающих топологию поверхности клетки [Fenteany, et al., 2004; Филатов, и др., 2008]. Энергозатратные процессы реорганизации и стабилизации структур цитоскелета [Buttgereit, et al., 1995] оказывают непосредственное влияние на энергообразование в клетке [Кулик, и др., 2006; Загускин, и др., 2007; Лю, и др., 2008]. Установление механизмов связи функцио-

нальной активности Мх и цитоскелета в процессе старения и/или под влиянием окислительного стресса позволит найти новые способы метаболической иммунокоррекции и сохранения здоровья людей всех возрастных категорий при нахождении в условиях экологического неблагополучия, а также новые методы и средства диагностики клеточной патологии.

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

**Связь работы с крупными научными программами (проектами), темами.** Представленные в диссертационной работе научные исследования выполнялись в рамках ГПОФИ «Радиация и экосистемы» (№ ГР 20062908, 2006–2010 гг.) и грантов БРФФИ «Наноиндектирование биомембран как метод анализа клеточной патологии» (Б07-043), (№ ГР 20072777, 2007–2009 гг.), «Пероксинитрит как регулятор функции нейтрофилов» (Б09-020), (№ ГР 20092211, 2009–2011 гг.).

Работа соответствует перечням приоритетных направлений фундаментальных и прикладных исследований Республики Беларусь 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) и на 2016–2020 гг. (п. 3. Биологические системы и технологии).

**Цель и задачи исследования.** Цель исследования – установить закономерности воздействия  $\gamma$ -излучения и активных форм азота на аэробный энергетический метаболизм тимоцитов, топоологию их поверхности, а также на структурно-функциональное состояние плазматической мембраны и кортикального цитоскелета.

Для реализации поставленной цели решались следующие задачи:

1. Оценить состояние аэробного энергетического метаболизма ткани тимуса интактных крыс и проанализировать его изменения в различные сроки после общего острого внешнего воздействия  $\gamma$ -излучения в дозе 0,5 Гр и 1,0 Гр.

2. С помощью методов атомно-силовой микроскопии (АСМ) изучить морфологические и структурно-механические особенности поверхности интактных изолированных тимоцитов крыс в норме и после воздействия на животных общего острого внешнего  $\gamma$ -излучения, а также поверхности изолированных тимоцитов, при воздействии пероксинитрита в широком диапазоне концентраций *in vitro*.

3. Оценить параметры тканевого дыхания, морфологические и структурно-механические характеристики поверхности интактных и преинкубированных в присутствии пероксинитрита изолированных тимоцитов крыс разного возраста.

4. Методами полярографии и АСМ определить уровень удельного потока кислорода в интактных и обработанных *in vitro* пероксинитритом тимоцитах животных разного возраста.

*Объекты исследования* – фрагменты ткани тимуса и суспензия изолированных тимоцитов интактных и подвергнутых воздействию внешнего  $\gamma$ -излучения крыс, суспензия изолированных тимоцитов крыс разного возраста до и после обработки пероксинитритом. *Предмет исследования* – параметры аэробного энергетического метаболизма ткани тимуса и тимоцитов, скорость индуцированного ПОЛ мембран, а также морфологические параметры тимоцитов и структурно-механические показатели микромасштабных участков их поверхности.

**Научная новизна.** В работе впервые представлена развернутая характеристика состояния ТД и ОФ ткани тимуса и изолированных тимоцитов до и после воздействия  $\gamma$ -излучения в дозе 0,5 Гр и 1 Гр животных ювенильного, молодого и старческого возраста, а также тимоцитов, подвергнутых воздействию пероксинитрита *in vitro* в широком диапазоне концентрации. С помощью АСМ дана комплексная оценка топологических и структурно-механических особенностей поверхности адгезированных к стеклянной поверхности тимоцитов, а также характеристика их кортикального цитоскелета. Введены новые параметры состояния клеток, оцениваемые с помощью АСМ: индекс площади (отношение площади свободной клеточной поверхности к площади контакта клетки с подложкой) и индекс объема (отношение объема клетки к общей площади ее поверхности), характеризующие степень развитости поверхности клетки в трехмерном пространстве. Обнаружено сходство изменений основных морфологических и структурно-механических параметров тимоцитов при остром общем  $\gamma$ -облучении в дозе 1 Гр и при их обработке *in vitro* пероксинитритом в концентрации 100–300 мкМ. Выявлены основные тенденции изменения с возрастом соотношений митохондриального и немитохондриального потребления кислорода тимоцитами животных ювенильного, молодого и старческого возраста. Предложен новый морфофункциональный параметр состояния клетки – удельное потребление кислорода – и обоснована целесообразность его применения в исследовательской практике.

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

1. Ткань тимуса интактных крыс характеризуется интенсивным тканевым дыханием, составляющим 6,6 (5,61–8,02) нмоль  $O_2$  в минуту на 1 мг белка, и отличается высокой активностью II комплекса дыхательной цепи. На 3-и и 10-е сутки после острого  $\gamma$ -облучения в дозе 0,5 Гр и 1 Гр в ткани тимуса резко снижается дыхательная активность на эндогенных и экзогенных субстратах, восстанавливающаяся к 30-м и 60-м суткам.

2. Радиационно-индуцированные изменения динамики дыхательной активности ткани тимуса на 3-и и 10-е сутки после воздействия на живот-

ных острого общего  $\gamma$ -излучения в дозе 1 Гр количественно сопряжены с изменением морфологии тимоцитов, включая структуры их актинового цитоскелета. Изменения морфологических параметров тимоцитов на 3-и сутки после воздействия на животных общего внешнего  $\gamma$ -излучения в дозе 1 Гр и после воздействия пероксинитрита (100–300 мкМ) характеризуются общими закономерностями.

3. Интактные тимоциты животных ювенильного и молодого возраста обладают более высоким уровнем митохондриального дыхания по сравнению с тимоцитами старых животных. Тимоциты интактных крыс при переходе от ювенильного к молодому возрасту сохраняют морфологические и структурно-механические свойства клеточной поверхности и стабильный уровень тканевого дыхания при снижении активности первого комплекса дыхательной цепи митохондрий и увеличении – второго. Экзогенное воздействие пероксинитрита на изолированные тимоциты ювенильных и молодых крыс вызывает зависимые от возраста животного изменения дыхательной активности, морфологических и структурно-механических свойств, как целой клетки, так и участков ее поверхности.

4. Комплексное использование методов полярографии и атомно-силовой микроскопии позволяет оценить интегральную морфофункциональную характеристику клетки – удельный поток кислорода в расчете на единицу поверхности клеточной мембраны. У тимоцитов крыс ювенильного и молодого возраста он составляет 8,1–8,8 аттомоль мин<sup>-1</sup> мкм<sup>-2</sup>.

**Личный вклад соискателя ученой степени.** Экспериментальный материал для диссертационной работы получен автором самостоятельно. Автор непосредственно планировал эксперимент, отработывал методики и проводил все исследования, осуществлял качественный и количественный анализ полученных данных и их статистическую обработку. Экспериментальные исследования на растровом электронном микроскопе выполнены совместно с сотрудниками института механики металлополимерных систем им. В. А. Белого НАН Беларуси. Научные руководители помогали в постановке целей и задач исследования, участвовали в обсуждении и анализе результатов, а также содействовали подготовке к публикации научных работ.

**Апробация результатов диссертации и информация об использовании ее результатов.** Основные положения диссертации и полученные результаты были представлены и обсуждены на следующих конференциях, съездах и семинарах: республиканских научно-практических конференциях «Актуальные проблемы медицины» и 17, 18, 19, 21 и 22-й итоговых научных сессиях Гомельского государственного медицинского университета (Гомель, Беларусь, 2008, 2009, 2010, 2012 и 2013 гг.); республиканских научно-практических конференциях «Актуальные проблемы медицины», посвященных 20- и 25-летию Гомельского государственного медицинского

университета (Гомель, Беларусь, 2011 и 2015 гг.); I, II и IV всероссийских школах-семинарах по бионаноскопии (Москва, Россия, 2007, 2008 и 2010 гг.); VIII, IX и X съездах Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков (Минск, Беларусь, 2008, 2010 и 2012 гг.); VIII, IX, X и XI международных конференциях «Методологические аспекты сканирующей зондовой микроскопии» (Минск, Беларусь, 2008, 2010, 2012 и 2014 гг.); XVI международной научно-практической конференции «Экология человека в постчернобыльский период» (Минск, Беларусь, 2008 г.); международной конференции молодых ученых «Молодежь в науке – 2009» (Минск, Беларусь, 2009 г.); научно-практической конференции «Фундаментальные и прикладные аспекты физиологии» (Гродно, Беларусь, 2009 г.); международной научно-практической конференции «Чернобыльские чтения – 2010» (Гомель, Беларусь, 2010 г.); международной конференции «Медико-биологические проблемы действия радиации» (Москва, Россия, 2012 г.); международной конференции «Радиация, экология и техносфера» (Гомель, Беларусь, 2013 г.); 3-м российском конгрессе с международным участием «Молекулярные основы клинической медицины – возможное и реальное» (СПб., Россия, 2015 г.); международной конференции «Свободные радикалы в химии и жизни» (Минск, Беларусь, 2015 г.); международной научно-практической конференции «Полимерные композиты и трибология» (Гомель, Беларусь, 2015 г.).

По результатам научных исследований получен патент Республики Беларусь на изобретение. Полученные результаты внедрены (6 актов о внедрении результатов) в производственной организации ОДО «Микротест-машины» (Республика Беларусь), Научно-исследовательском центре проблем ресурсосбережения ИТМО НАН Беларуси, Белорусском государственном медицинском университете и в Гомельском государственном медицинском университете (на кафедрах биологической химии и патологической физиологии).

**Опубликование результатов диссертации.** По теме диссертации опубликовано 39 печатных работ, из которых 1 глава в коллективной монографии, 7 статей в рецензируемых научных журналах, 19 статей в сборниках конференций, 10 тезисов докладов, 1 патент Республики Беларусь и другие публикации – 1. Без соавторства опубликовано 4 научные работы. Общее количество опубликованных страниц – 4,9 авт. л.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, общей характеристики работы, 5 глав (включая аналитический обзор литературы, описание методов исследования, изложение результатов собственных исследований и их обсуждение), заключения, библиографического списка, состоящего из 118 русскоязычных работ и 185 англоязычных работ и 8 приложений. Диссертация изложена на русском языке на 180 страницах текста, содержит 33 таблицы и 30 рисунков.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В первой главе выполнен обзор и анализ современных научных данных об энергетическом метаболизме тимоцитов, патогенетических механизмах действия ионизирующего излучения (ИИ), АФК и АФА на тимоциты, а также роли Мх в этих процессах. Обоснован выбор направления и общей концепции работы.

### Объект и методы исследования

Исследования проводились на белых беспородных крысах самцах. В исследованиях возрастных особенностей тимоцитов использовали животных трех возрастных групп (3-месячные – ювенильный возраст, 8-месячные – молодой возраст и 24-месячные – старческий возраст). Условия развития окислительного стресса, вызванного действием ИИ, создавали путем однократного общего воздействия  $\gamma$ -излучения в дозе 0,5 Гр и 1 Гр на установке «ИГУР-1» с источником  $^{137}\text{Cs}$ , мощность дозы 0,92 Гр/мин. Состояние клеток тимуса оценивали на 3, 10, 30 и 60-е сутки после облучения, что отражает стадии восстановления лимфопозза после воздействия ИИ [Ярилин, 2010]. Изолированные тимоциты инкубировали в присутствии пероксинитрита в концентрации 30, 50, 100, 120 и 300 мкМ, который синтезировали по методу [Robinson, 2005].

Полярографические исследования проводили закрытым платиновым электродом Кларка на установке Record 4 (ИТЭБ РАН, Пущино, РФ). Скорость поглощения кислорода тканевыми препаратами и клетками рассчитывали с помощью программы Record 4 (ИТЭБ РАН, Пущино, РФ) и выражали в нмоль  $\text{O}_2$  в минуту на 1 мг белка исследуемой ткани (нмоль  $\text{O}_2 \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ ) или нмоль  $\text{O}_2$  в 1 минуту на  $10^7$  клеток (нмоль  $\text{O}_2 \cdot \text{мин}^{-1} \cdot 10^7$  клеток). Тимоциты предварительно химически пермеабилizировали с помощью 0,005% раствора дигитонина в течение 3 минут [Gnaiger, 2008]. Скорость поглощения кислорода определяли на эндогенных ( $V_{\text{энд}}$ ) и экзогенных субстратах ( $V_{\text{глу}}$  – глутамат натрия и  $V_{\text{як}}$  – сукцинат натрия), в присутствии разобщителя ( $V_{\text{днф}}$  – 2,4-динитрофенол) и ингибиторов ( $V_{\text{ам}}$  – амитал натрия и  $V_{\text{мал}}$  – малонат натрия) дыхательной цепи (ДЦ). Рассчитывали коэффициенты стимулирующего действия (СД) для каждого субстрата ( $\text{СД}_{\text{як}}$  и  $\text{СД}_{\text{глу}}$ ) и разобщителя ( $\text{СД}_{\text{днф}}$ ). СД рассчитывали как отношение скорости потребления кислорода при использовании субстрата или разобщителя к скорости потребления кислорода на эндогенных субстратах. На основании данных ингибиторного анализа рассчитывали показатели  $\text{АРД} = V_{\text{ам}}/V_{\text{энд}}$  и  $\text{МРД} = V_{\text{мал}}/V_{\text{ам}}$ .

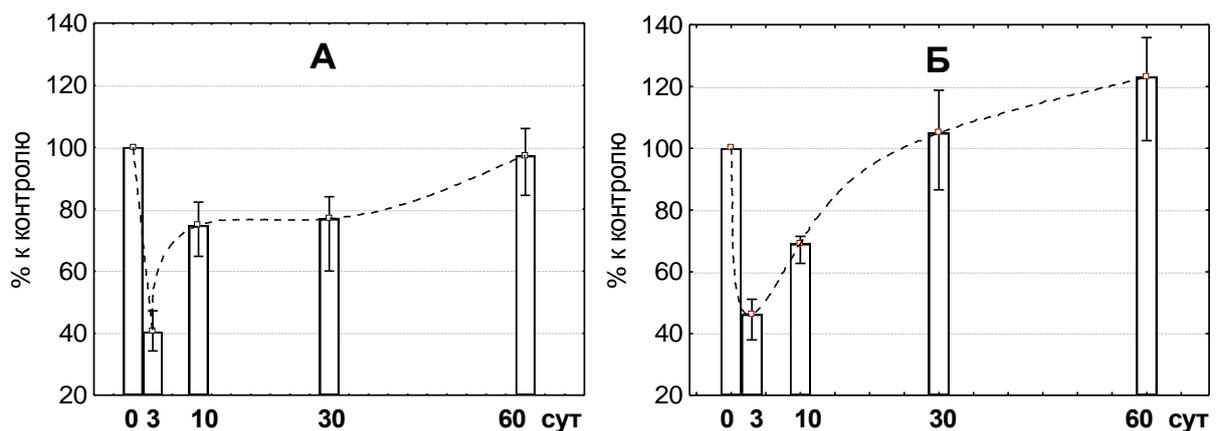
Световую микроскопию осуществляли при помощи микроскопа Nikon E-100 и программы «Морфотест» (MorphoTest). АСМ проводили на атомно-силовом микроскопе НТ-206 («Микротестмашины», Республика Беларусь). Анализ АСМ-данных осуществляли с помощью программы

SurfaceXplorer («Микротестмашины», Республика Беларусь) и программы обработки изображений ImageJ. Растровую электронную микроскопию (РЭМ) клеток проводили на растровом электронном микроскопе VEGA-L-HP (TESCAN, Чехия).

### Основные результаты и их обсуждение

**Влияние ионизирующего излучения на состояние аэробного энергетического метаболизма тимуса.** Ткань тимуса характеризуется относительно высоким значением  $V_{\text{энд}} = 6,6$  (5,61–8,02) нмоль  $\text{O}_2 \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ , что обусловлено интенсивными процессами оксигенации и кровоснабжения тимуса, а также активно протекающими в нем зависимыми от кислорода процессами пролиферации и дифференцировки клеток иммунной системы [Гевондян, 2005]. Ингибиторный анализ митохондриального окисления ткани тимуса показал, что амитал натрия практически не изменяет дыхательную активность, тогда как добавка малоната натрия уменьшает её почти на 30%, что отражает значительный вклад в энергетику тимуса II комплекса ДЦ.

На 3-и и 10-е сутки после воздействия на животных острого внешнего  $\gamma$ -излучения в дозе 0,5 Гр и 1 Гр в ткани тимуса резко снижается  $V_{\text{энд}}$  вследствие радиационно-индуцированных повреждений комплексов ДЦ, а также систем транспорта и метаболизма субстратов и кислорода. На 3-и сутки после  $\gamma$ -облучения развивается острая стресс-реакция, и значение параметра  $V_{\text{энд}}$  уменьшается более чем в два раза (рисунок 1). К 10 суткам  $V_{\text{энд}}$  остается достоверно ниже контрольных значений, при этом увеличивается активность II комплекса ДЦ при стабильном значении показателя  $\text{СД}_{\text{як}}$ .

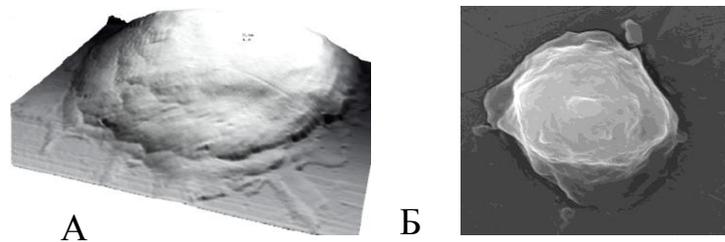


**Рисунок 1. – Динамика  $V_{\text{энд}}$  ткани тимуса в разные сроки после острого облучения животных в дозе 0,5 Гр (А) и 1 Гр (Б)**

На 30-е и 60-е сутки после радиационного воздействия значение  $V_{\text{энд}}$  ткани тимуса зависит от дозы облучения животных. При облучении в дозе 1 Гр значение  $V_{\text{энд}}$  приближается к контрольным показателям на 30-е сутки, а на 60-е – даже превышает их. При дозе облучения 0,5 Гр восстановление

происходит медленнее. Вероятно, это объясняется не только увеличением количества и активности ферментов, участвующих в постлучевой репарации ткани тимуса, но и стимуляцией перекисных процессов. О повышении интенсивности перекисных процессов косвенно свидетельствует увеличение степени разобщения в системе ТД и ОФ. Таким образом, нормализация уровня  $V_{\text{энд}}$  на 30–60 сутки сопровождается неполным восстановлением системы ТД ткани тимуса облученных животных.

**Влияние пероксинитрита и ионизирующего излучения на морфологию тимоцитов и состояние их актинового цитоскелета.** По данным РЭМ и АСМ тимоцит интактного животного, адгезированный к стеклянной пластинке и фиксированный раствором 1 % глутарового альдегида, имеет округлую форму с редко встречающимися выраженными структурными элементами на их поверхности (рисунок 2).



Изображение получено с помощью:

А – АСМ (7 мкм × 7 мкм); Б – РЭМ (9 мкм × 9 мкм)

**Рисунок 2. – Типичные изображения интактных тимоцитов крысы**

У большинства тимоцитов в области контакта с подложкой хорошо различимы ламеллоподии – тонкие листоподобные выпячивания, каркасом которых служат трехмерные сети филаментов. С увеличением времени адгезирования в этой же зоне появляются единичные пальцеобразные структуры – филоподии. Их длина зависит от времени адгезирования клеток, достигая локального максимума к 60 мин. Средний диаметр тимоцитов, оцененный РЭМ, АСМ и световой микроскопией, составляет  $6,91 \pm 0,12$  мкм. Используя данные АСМ-анализа, впервые были рассчитаны индексы площади ( $I_s$ ) и объема ( $I_v$ ) тимоцитов (таблица 1).

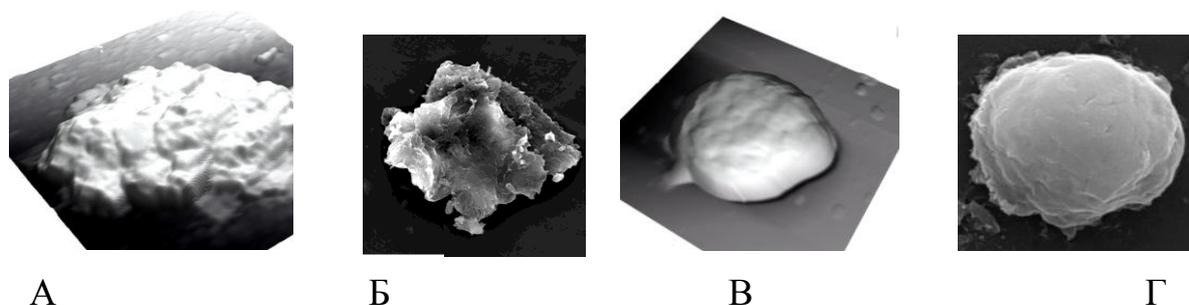
Таблица 1. – Морфологические характеристики контрольных и обработанных пероксинитритом тимоцитов крысы

Параметры	Контроль	30 мкМ	50 мкМ	100 мкМ	300 мкМ
$I_s$ , отн.ед.	<u>1,81</u> (1,65-1,94)	<u>1,45*</u> (1,39-1,56)	<u>1,88</u> (1,21-2,93)	<u>1,27*</u> (1,16-1,42)	<u>1,66*</u> (1,44-1,66)
$I_v$ , мкм	<u>0,63</u> (0,62-0,68)	<u>0,70</u> (0,61-0,75)	<u>0,41*</u> (0,40-0,43)	<u>0,42*</u> (0,35-0,49)	<u>0,61</u> (0,56-0,65)

Примечание – Над чертой – медиана, под чертой – (нижний квартиль - верхний квартиль); \* – Различия статистически значимы в сравнении с соответствующим параметром в контроле, критерий Манна-Уитни ( $p < 0,05$ );  $n = 7-13$ ; режим сканирования «топография»

Обработка изолированных тимоцитов пероксинитритом *in vitro* вызывает зависимое от концентрации изменение размеров и формы клеток за счет уменьшения высоты, диаметра, объема и площади поверхности. Это отражается на уменьшении индексов площади и объема, что, вероятно, приводит к изменению интенсивности обменных потоков через плазматическую мембрану и степени адгезии клеток.

Облучение животных в дозе 1 Гр изменяет не только дыхательную активность ткани тимуса, но и морфологию тимоцитов (рисунок 3). Так, на 3-и сутки, на фоне снижения значения  $V_{\text{энд}}$  и деэнергетизации ткани тимуса, в 4 раза уменьшается объем клеток, в 3 раза – их высота и на 30% – общая площадь поверхности, а также снижаются показатели индексов площади и объема (таблица 2). Наблюдаемые изменения морфологии тимоцитов у облученных в дозе 1 Гр животных (на 3-и сутки после воздействия) сходны с теми, которые возникают при действии пероксинитрита (100–300 мкМ) на изолированные тимоциты *in vitro*.



**Изображения тимоцитов на 3-и сутки после облучения:**  
А – АСМ (8,5 мкм × 8,5 мкм), Б – РЭМ (9 мкм × 9 мкм).

**Изображения тимоцитов на 10-е сутки после облучения:**  
В – АСМ (10 мкм × 10 мкм); Г – РЭМ (8 мкм × 8 мкм)

**Рисунок 3. – Изображения тимоцитов крысы на 3-и и 10-е сутки после воздействия на животных острого  $\gamma$ -излучения в дозе 1 Гр**

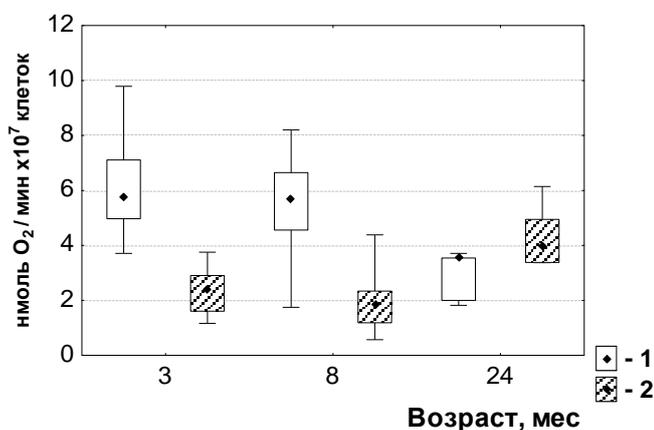
Таблица 2. – Морфологические характеристики тимоцитов контрольных и облученных животных

Параметры	Контроль	3-и сутки после облучения	10-е сутки после облучения
$I_s$ , отн. ед.	<u>1,59</u> (1,38-1,81)	<u>1,12*</u> (1,10-1,22)	<u>1,51</u> (1,29-1,64)
$I_v$ , мкм	<u>0,62</u> (0,57-0,64)	<u>0,20**</u> (0,16-0,25)	<u>0,64<sup>++</sup></u> (0,43-0,68)

Примечание – Над чертой – медиана, под чертой – (нижний квартиль - верхний квартиль); \*, \*\* – различия статистически значимы в сравнении с контролем, критерий Манна-Уитни (\* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$ ); +, ++ – различия статистически значимы в разные сроки после облучения, критерий Манна-Уитни (+  $p < 0,05$ , ++  $p < 0,001$ );  $n=8-20$ ; режим сканирования «топография»

При частичном восстановлении ТД на 10-е сутки после радиационного воздействия наблюдается увеличение (до контрольных значений) высоты клеток над подложкой, площади их общей поверхности, а также индексов площади и объема. При этом клеточная поверхность сглаживается за счет уменьшения количества различных структурных элементов, а объем клетки остается ниже контрольных значений.

**Возрастные особенности энергетического метаболизма и топологии поверхности тимоцитов крыс при воздействии пероксинитрита.** Не выявлено возрастных изменений общей скорости потребления кислорода тимоцитами ювенильных, молодых и старых крыс. Однако у тимоцитов ювенильных и молодых крыс митохондриальное дыхание составляет более 70% от общего потребления кислорода, тогда как для старых крыс – возрастает доля азидрезистентного, преимущественно перекисного, дыхания за счет падения ниже 50% его митохондриальной составляющей (рисунок 4).

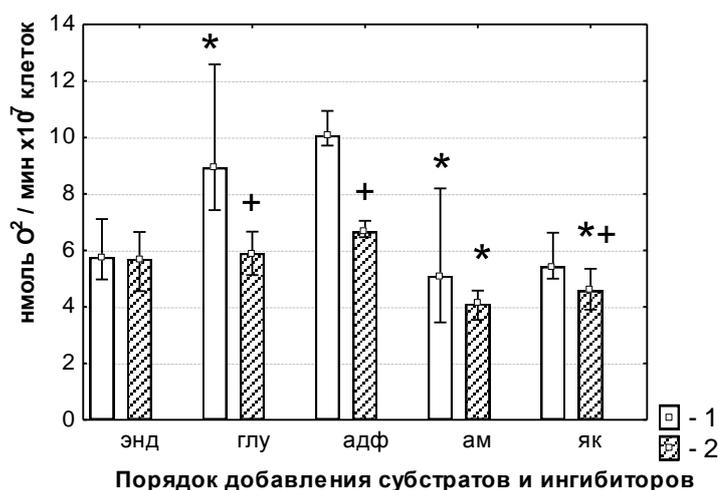


1 – на эндогенных субстратах (ANOVA Краскела-Уоллиса –  $p < 0,05$ );  
 2 – при ингибировании ДЦ Мх (ANOVA Краскела-Уоллиса –  $p < 0,05$ );  
 данные приведены в формате:  $\blacklozenge$  – медиана,  $\square$  – нижний и верхний квартиль,  
 $\perp$  – минимум и максимум

**Рисунок 4. – Скорость потребления кислорода тимоцитами животных разного возраста**

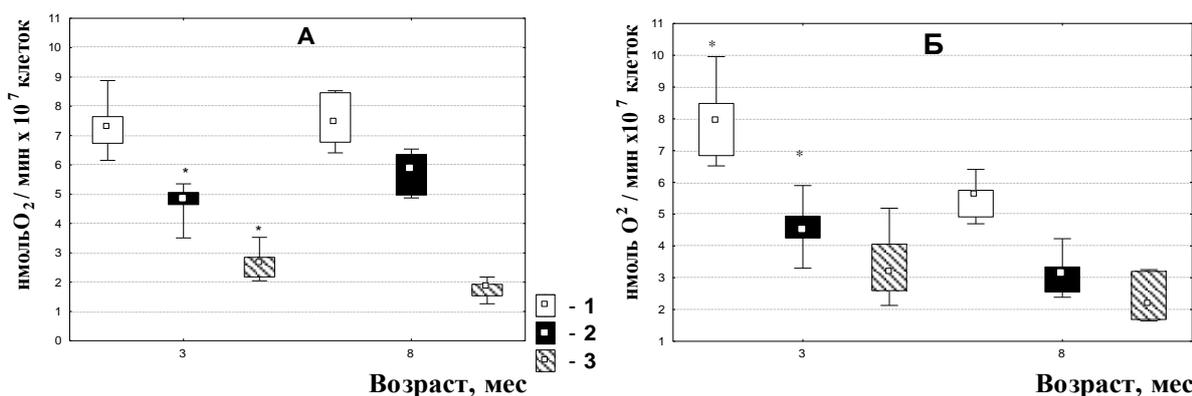
Более полный сравнительный анализ параметров ТД с использованием субстратов и ингибиторов выявил его возрастные особенности для тимоцитов молодых и ювенильных крыс (рисунок 5). Глутамат натрия (субстрат I комплекса) стимулирует дыхательную активность тимоцитов ювенильных крыс на 35% и практически не оказывает действие на тимоциты молодых животных (рисунок 6). В то же время, активность сукцинатдегидрогеназы была выше в тимоцитах молодых животных, что указывает на связанное с возрастом снижение дыхательной активности I комплекса ДЦ Мх и увеличение дыхательной активности II комплекса. Возрастные структурно-функциональные особенности тимоцитов более выражены при воздействии пероксинитрита. Так, пероксинитрит в концентрации 30 мкМ практически

не изменяет скорость общего потребления кислорода ( $7,3\text{--}7,5$  нмоль  $\text{O}_2 \cdot \text{мин}^{-1} \cdot 10^{-7}$  клеток), но оказывает существенное влияние на скорость дыхания  $\text{Mx}$  (рисунок 6А) и стимулирующее действие субстратов и АДФ. Значение параметра  $V_{\text{энд}}$  тимоцитов ювенильных крыс уменьшается почти на 17%, коэффициенты  $\text{СД}_{\text{глу}}$  возрастают на 40%,  $\text{СД}_{\text{як}}$  на 29% и  $\text{СД}_{\text{адф}}$  на 21%. Система ТД тимоцитов молодых крыс характеризуется стабильным уровнем  $V_{\text{энд}}$  и менее активно реагирует на добавки субстратов и АДФ.



1 – ювенильные, 2 – молодые; скорость поглощения кислорода на эндогенных субстратах (энд), в присутствии глутамата натрия (глу), аденозиндифосфата (АДФ), амитала натрия (ам), сукцината натрия (як); данные приведены в формате: □ – медиана,  $\top$  – нижний и верхний квартиль; различия статистически значимы: \* – в сравнении с контролем (критерий Вилкоксона), + – в сравнении с другой возрастной группой (критерий Манна – Уитни)

Рисунок 5. – Параметры ТД тимоцитов крыс разных возрастных групп в присутствии субстратов и ингибиторов

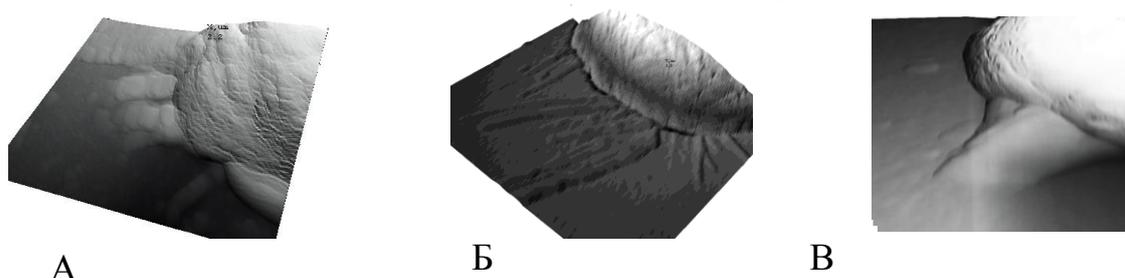


1 – общее потребление кислорода; 2 –  $\text{Mx}$  дыхание; 3 – азидрезистентное дыхание; условные обозначения формата данных аналогичны использованным на рисунке 4; \* – различия между возрастными группами статистически значимы, критерий Манна-Уитни (\* $p < 0,05$ );

Рисунок 6. – Уровень потребления кислорода тимоцитами животных в зависимости от возраста и концентрации пероксинитрита: 30 (А) и 120 (Б) мкМ

Обработка тимоцитов пероксинитритом (120 мкМ) вызывает более выраженное снижение дыхательной активности тимоцитов молодых крыс (на 46%) в сравнении со снижением дыхательной активности тимоцитов ювенильных крыс (на 20%) (рисунок 6 Б).

Тимоциты молодых и ювенильных крыс имеют количественно сравнимые параметры морфологии и структурно-механических свойств поверхности. Однако с возрастом способность тимоцитов к формированию филоподий уменьшается. Преинкубация тимоцитов молодых крыс с пероксинитритом (30–120 мкМ) подавляет образование филоподий вплоть до их полного исчезновения. У тимоцитов ювенильных крыс пероксинитрит (30 мкМ) стимулирует образование филоподий (средняя длина увеличивается в 2 раза:  $l=3,8$ ;  $3,4-5,2$  мкм). При концентрации пероксинитрита 120 мкМ имеет место изменение структуры филоподий: они укорачиваются и становятся шире, нарушается четкость растущего конца (рисунок 7). Стимулирующее действие пероксинитрита (30 мкМ) на цитоскелет тимоцитов ювенильных крыс на фоне снижения уровня их митохондриального дыхания можно объяснить активацией процессов анаэробного гликолиза, интенсивность которого с возрастом уменьшается [Ernest, 1978].



А – интактный (5,0 × 5,0 мкм); Б – 30 мкМ (5,5 × 6,0 мкм); В – 120 мкМ (3,5 × 3,5 мкм)

**Рисунок 7. – АСМ-изображения филоподий интактных и обработанных пероксинитритом тимоцитов крыс ювенильного возраста**

Воздействие пероксинитрита в концентрации 30–120 мкМ уменьшает диаметр, площадь контакта с подложкой и увеличивает индекс площади тимоцитов молодых крыс, но не изменяет эти параметры у ювенильных животных. При этом, если у молодых крыс снижаются объем и общая площадь поверхности тимоцитов на 40% и 30% соответственно, то у ювенильных – эти параметры не изменяются.

Результаты анализа «АСМ–карт латеральных сил» микромасштабных участков поверхности контрольных и обработанных пероксинитритом тимоцитов выявили связанные с возрастом животных различия пероксинитрит-индуцированных изменений структурно-механических свойств поверхности клеток, обусловленные различием состояний их цитоскелета. Распределение значений механических свойств поверхностного слоя обработанных пероксинитритом в концентрации 30 мкМ тимоцитов ювенильных крыс указывает на наличие развитого цитоскелета, формирующего поверхность клетки, о

чем свидетельствует изменение АСМ-параметров – увеличение числа локальных максимумов и тенденция к увеличению фрактальной размерности. В тимоцитах молодых крыс пероксинитрит (30 мкМ) стимулирует появление на их поверхности небольших и многочисленных рифов и впадин. Распределение значений структурно-механических свойств в поверхностном слое становится резко неоднородным, имеется тенденция к формированию областей с разным характером структурно-механических свойств (число локальных максимумов, размах высот в пределах 95% вариации и параметр шероховатости увеличиваются, а фрактальная размерность уменьшается). Таким образом, если на начальных этапах возрастной инволюции тимуса не наблюдается различий морфологических характеристик тимоцитов при относительно стабильной работе ДЦ, дисфункция которой проявляется значительно позже, то при обработке клеток пероксинитритом становятся явными различия между тимоцитами ювенильных и молодых крыс в системе митохондриального дыхания, морфологических и структурно-механических свойств как целой клетки, так и участков ее поверхности.

**Характеристика удельных потоков кислорода в клетках тимуса крыс 3- и 8-месячного возраста.** Удельный поток кислорода представляет собой количество его молекул, проходящих через 1 мкм<sup>2</sup> клеточной поверхности за 1 мин. В тимоцитах интактных крыс разного возраста удельный поток практически идентичен: 8,1 (7,3–10,7) аттомоль мин<sup>-1</sup> мкм<sup>-2</sup> у молодых крыс и 8,8 (6,9–9,8) аттомоль мин<sup>-1</sup> мкм<sup>-2</sup> у ювенильных. Причем более 70% этого потока используется в ДЦ Мх.

Введение в инкубационную среду 30 мкМ пероксинитрита не изменяет величину общего удельного потока кислорода и его распределение между митохондриальной 6,3 (5,41–7,95) аттомоль мин<sup>-1</sup> мкм<sup>-2</sup> и немитохондриальной 2,9 (1,75–3,45) аттомоль мин<sup>-1</sup> мкм<sup>-2</sup> компонентами в тимоцитах ювенильных крыс. Аналогичное воздействие у молодых крыс приводит к росту до 13,7 (12,5–15,6) аттомоль мин<sup>-1</sup> мкм<sup>-2</sup> общего удельного потока кислорода, в основном, за счет 60%-го увеличения митохондриальной составляющей, что, вероятно, обусловлено активацией в тимоцитах энергозатратных процессов, сопровождающихся изменением морфологических и структурно-механических характеристик мембраны и подмембранных структур. Следует отметить, что действие пероксинитрита в концентрации 30 мкМ на тимоциты ювенильных крыс инициирует в них сборку цитоскелета без усиления процессов ТД, что можно объяснить преобладанием в тимоцитах крыс этой возрастной группы анаэробного энергообмена. С данным положением согласуется и факт активации энергозатратных процессов во время адгезирования тимоцитов ювенильных крыс в условиях ингибирования ДЦ азидом натрия. Пероксинитрит в концентрации 120 мкМ не изменяет общий удельный поток кислорода в тимоцитах обеих групп, но способствует его перераспределению в пользу немитохондриального потребления, доля которого увеличивается примерно на 10%.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

### Основные научные результаты диссертации

1. Выявлено, что ткань тимуса интактных крыс характеризуются высокой активностью II комплекса дыхательной цепи митохондрий на фоне интенсивного аэробного энергетического метаболизма, интегральным показателем которого является скорость дыхания на эндогенных субстратах, равная 6,6 (5,6–8,0) нмоль  $O_2 \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ . По данным АСМ и РЭМ диаметр тимоцитов крыс составляет 6,8 (5,9–6,8) мкм, высота – 2,7 (2,5–2,7) мкм, объем – 59,8 (49,5–67,3) мкм<sup>3</sup>. В области контакта тимоцитов с подложкой формируются филоподии, достигающие длины 1,8 (1,2–2,2) мкм [2–4, 6, 8–11, 13, 18, 26, 28, 29, 35].

2. Установлено резкое снижение дыхательной активности ткани тимуса в присутствии эндогенных и экзогенных (глутамат натрия и сукцинат натрия) субстратов, а также увеличение относительной роли II комплекса дыхательной цепи на 3-и и 10-е сутки после общего  $\gamma$ -облучения в дозе 0,5 Гр и 1 Гр. В отдаленные сроки (на 30-е и 60-е сутки после воздействия) происходит постепенная нормализация дыхательной активности ткани тимуса. Более быстрое восстановление эндогенного дыхания в тимусе животных, облученных в дозе 1 Гр, сопровождается разобщением тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования, а также снижением стимулирующего действия глутамата [5, 6, 13].

3. Выявлено дозозависимое влияние пероксинитрита на морфологические параметры тимоцитов (уменьшаются индексы площади и объема), а также на морфологические и структурно-механические свойства их клеточной поверхности. Установлено, что пероксинитрит в концентрации 100–300 мкМ вызывает у изолированных тимоцитов уменьшение более чем на 50% объема и на 30% площади их поверхности, а также увеличение степени неоднородности клеточной поверхности (параметры шероховатости и перепада высот увеличиваются в 2 раза, количество выступающих элементов на 1 мкм<sup>2</sup> клеточной поверхности – в 1,8 раз). При этом локальные значения механических свойств поверхностного слоя тимоцитов пространственно перераспределяются (в режиме «карт латеральных сил» увеличиваются: шероховатость в 2 раза, число пиков и перепад высот в 1,5 раза) [2–4, 9, 10, 12, 14, 18, 22, 26, 30, 32].

4. Показано, что изменения морфологических параметров тимоцитов на 3-и сутки после острого облучения в дозе 1 Гр сходны с изменениями, вызванными действием пероксинитрита (100 мкМ): в 2–3 раза уменьшается высота, в 2–4 раза – объем, в 1,5 раза – площадь свободной клеточной поверхности, в 1,5–3 раза – индекс объема и в 1,5 раза – индекс площади, практически не образуются филоподии. На 10 сутки у облученных животных происходит восстановление морфологических параметров тимоцитов до контрольных значений [16, 19, 27, 33, 34].

5. Тимоциты крыс ювенильного, молодого и старческого возрастов не отличаются по скорости общего потребления кислорода. В то же время доля митохондриального дыхания с возрастом снижается с 70% (в ювенильном и молодом возрасте) до 50% (в старческом возрасте). Между интактными тимоцитами ювенильных и молодых животных не выявлены различия в системе тканевого дыхания, морфологических и структурно-механических параметрах. Преинкубация тимоцитов в присутствии пероксинитрита (30 мкМ и 120 мкМ) выявляет различия изучаемых параметров состояния тимоцитов у животных разных возрастных групп. Пероксинитрит увеличивает вклад II комплекса в работу дыхательной цепи тимоцитов обеих возрастных групп, но у ювенильных животных активность I комплекса в этих условиях сохраняется на уровне контрольных значений, а у молодых – уменьшается. В тимоцитах ювенильных крыс пероксинитрит в концентрации 30 мкМ инициирует процессы сборки цитоскелета, способствуя увеличению числа филоподий и сглаживанию поверхности клеток. В этих же условиях в тимоцитах молодых крыс подавляется образование новых структур актинового цитоскелета, формируются нано- и микромасштабные области с разными механическими свойствами, увеличивается степень неоднородности структурно-механических свойств поверхностного слоя [1, 7, 8, 15, 17, 20, 21, 23, 25, 31, 36, 37].

6. Определен общий удельный поток кислорода в тимоцитах интактных крыс ювенильного и молодого возраста, равный 8,1 (6,9–9,8) – 8,8 (7,3–10,7) аттомоль мин<sup>-1</sup> мкм<sup>-2</sup>. Преинкубация клеток в присутствии пероксинитрита (30 мкМ) не приводит к изменению величины общего удельного потока кислорода в тимоцитах ювенильных крыс и увеличивает его в клетках молодых животных. Воздействие пероксинитрита в концентрации 120 мкМ не влияет на величину общего удельного потока кислорода в тимоцитах ювенильных и молодых крыс, но способствует его перераспределению в пользу немитохондриального потребления, доля которого увеличивается примерно на 10% [24, 25, 37].

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

Полученные результаты могут рассматриваться как теоретическая основа для разработки новых методов коррекции иммунной системы с учетом ее возрастных особенностей. Разработаны и предложены информативные АСМ-критерии оценки свойств клеток в медико-биологических исследованиях.

Полученные результаты внедрены в учебные, научные и производственные организации Беларуси. Результаты исследований внедрены в учебный процесс в Белорусском государственном университете и Гомельском государственном медицинском университете. На кафедре медицинской и биологической физики Белорусского государственного уни-

верситета результаты используются при проведении лабораторного практикума «Оптическая микроскопия. Основы электронной и зондовой микроскопии» (акт внедрения от 10.09.2014 г.). На кафедре патологической физиологии Гомельского государственного медицинского университета полученные материалы используются при проведении практических занятий по разделам «Иммунодефицитные состояния» и «Патогенные факторы окружающей среды» (акт внедрения от 04.03.2011 г.). На кафедре биологической химии Гомельского государственного медицинского университета, выполненный анализ состояния митохондрий при окислительном стрессе используется при проведении практических занятий по разделам «Биологическое окисление. Центральные пути метаболизма» (акт внедрения от 21.09.2009 г.) и в курсе лекций по разделу «Биологическое окисление» (акт внедрения от 07.02.2011 г.).

Разработанные и апробированные в ходе выполнения диссертационной работы методические подходы изложены в приложении к руководству пользователя для атомно-силового микроскопа NT-206 (ОДО «Микротестмашины») «Применение атомно-силового микроскопа в медико-биологических исследованиях» (акт внедрения от 20.06.2013 г.), внедрены в Гродненском филиале «Научно-исследовательского центра проблем ресурсосбережения» ГНУ «Институт тепло- и массообмена имени А. В. Лыкова НАН Беларуси» и защищены патентом на изобретение Республики Беларусь № 20077 «Способ определения патологии биологических клеток» [38]. Полученные результаты способствуют расширению использования в клинической практике и медико-биологических исследованиях перспективных методов атомно-силовой микроскопии, позволяющей выполнять анализ структур поверхности клеток и тканей на микро- и наномасштабных уровнях.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ

### Глава в коллективной монографии

1. Study of the mechanical properties of single cells as biocomposites by atomic force microscopy / M. Starodubtseva, S. Chizhik, N. Yegorenkov, I. Nikitina, E. Drozd // *Microscopy: science, technology, applications and education* : [in 3 vol.] / ed.: A. Mendez-Vilas, J. Alvarez. – Badajoz, 2010. – Vol. 1. – P. 470–477.

### Статьи в рецензируемых научных журналах

2. Анализ особенностей поверхностных структур лимфоцитов человека с помощью атомно-силовой микроскопии / И. А. Никитина, М. Н. Стародубцева, Т. Г. Кузнецова, Н. И. Егоренков // *Проблемы здоровья и экологии*. – 2007. – Т. 3, № 13. – С. 111–116.

3. Никитина, И. А. Пероксинитрит-индуцированные изменения формы и структуры поверхности тимоцитов / И. А. Никитина, М. Н. Стародубцева, А. И. Грицук // *Журн. Гродн. гос. мед. ун-та*. – 2009. – Т. 2, № 26. – С. 142–144.

4. Реорганизация актинового цитоскелета лейкоцитов, изученная с помощью атомно-силовой микроскопии / М. Н. Стародубцева, И. А. Никитина, Н. И. Егоренков, Е. И. Коваленко, А. И. Грицук // *Вестн. гематологии*. – 2010. – Т. 6, № 2. – С. 107–111.

5. Никитина, И. А. Влияние острого ионизирующего облучения на тканевое дыхание тимуса / И. А. Никитина, А. И. Грицук // *Медико-биол. пробл. жизнедеятельности*. – 2010. – Т. 1, № 3. – С. 50–55.

6. Никитина, И. А. Особенности тканевого дыхания тимуса крыс в различные сроки после воздействия гамма-излучения / И. А. Никитина // *Пробл. здоровья и экологии*. – 2011. – № 1 (27). – С. 102–106.

7. Никитина, И. А. Поверхностная архитектура и состояние цитоскелета тимоцитов крыс разного возраста при действии пероксинитрита / И. А. Никитина, М. Н. Стародубцева, А. И. Грицук // *Успехи геронтологии*. – 2011. – Т. 24, № 2. – С. 227–233.

8. Starodubtseva, M. N. Thermo-mechanical properties of the cell surface assessed by atomic force microscopy / M. N. Starodubtseva, N. I. Yegorenkov, I. A. Nikitina // *Micron*. – 2012. – Vol. 43, № 12. – P. 1232–1238.

### Статьи в сборниках научных трудов и материалах научных конференций

9. Никитина, И. А. Использование атомно-силовой микроскопии для изучения тимоцитов крысы / И. А. Никитина, М. Н. Стародубцева, А. И. Грицук // *Методологические аспекты сканирующей зондовой микро-*

скопии (БелСЗМ – VIII) : материалы VIII Междунар. семинара, Минск, 8–10 окт. 2008 г. / Ин-т тепло- и массообмена им. А. В. Лыкова НАН Беларуси ; редкол.: А. И. Свириденко [и др.]. – Минск, 2008. – С. 108–113.

10. Никитина, И. А. Пероксинитрит-индуцированные структурные изменения поверхности тимоцитов крысы / И. А. Никитина, М. Н. Стародубцева, А. И. Грицук // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : материалы Междунар. науч. конф. : VIII съезда Белорус. обществ. об-ния фотобиологов и биофизиков, Минск, 25–27 июня 2008 г. : в 2 ч. / Белорус. гос. ун-т, физ. фак., Ин-т биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси ; редкол.: И. Д. Волотовский (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2008. – Ч. 1. – С. 245–247.

11. Характеристики поверхности малых лимфоцитов человека, изученные методами атомно-силовой микроскопии / И. А. Никитина, М. Н. Стародубцева, А. Н. Никитин, А. И. Грицук // Актуальные проблемы медицины : материалы Респ. науч.-практ. конф. и 17-й итоговой науч. сессии Гомел. гос. мед. ун-та, Гомель, 28–29 апр., 2008 г. : в 4 т. / Гомел. гос. мед. ун-т. ; редкол.: А. Н. Лызиков [и др.]. – Гомель, 2008. – Т. 3. – С. 68–72.

12. Никитина, И. А. Влияние окислительного стресса на процесс образования филоподий в тимоцитах / И. А. Никитина, М. Н. Стародубцева, А. И. Грицук // Актуальные проблемы медицины : материалы Респ. науч.-практ. конф. и 18-й итоговой науч. сессии Гомел. гос. мед. ун-та, Гомель, 26–27 фев. 2009 г. : в 4 т. / Гомел. гос. мед. ун-т. ; редкол.: А. Н. Лызиков [и др.]. – Гомель, 2009. – Т. 3. – С. 129–132.

13. Никитина, И. А. Характеристика митохондриального дыхания тимуса интактных крыс и его изменение после воздействия ионизирующего облучения / И. А. Никитина, А. И. Грицук // Экологическая антропология : ежегодник / Ин-т истории Нац. акад. Беларуси, Отд. антропологии и экологии ; редкол.: Л. И. Тегако (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2009. – С. 288–291.

14. Никитина, И. А. Перекисное окисление липидов в мембранах тимоцитов в условиях окислительного стресса, вызванного действием пероксинитрита и ионизирующим излучением / И. А. Никитина // Актуальные проблемы медицины : материалы Респ. науч.-практ. конф. и 19-ой итоговой науч. сессии Гомел. гос. мед. ун-та, Гомель, 23–24 февр. 2010 г. : в 4 т. / Гомел. гос. мед. ун-т. ; редкол.: А. Н. Лызиков [и др.]. – Гомель, 2010. – Т. 3. – С. 133–136.

15. Никитина, И. А. Влияние окислительного стресса на дыхательную активность и структуру тимоцитов крыс разного возраста / И. А. Никитина, М. Н. Стародубцева, А. И. Грицук // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : материалы междунар. науч. конф. : IX съезда Белорус. обществ. об-ния фотобиологов и биофизиков, Минск, 23–25 июня 2010 г. : в 2 ч. / Нац. акад. наук Беларуси [и др.] ; редкол.: И. Д. Волотовский (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2010. – Ч. 2. – С. 245–247.

16. Никитина, И. А. Изменение аэробного метаболизма и поверхности тимоцитов, вызванные ионизирующим излучением / И. А. Никитина, М. Н. Стародубцева, А. И. Грицук // Инфекционные осложнения при иммунодепрессиях : материалы всероссийской науч.-практ. конф., Санкт-Петербург, 11–12 февр. 2010 г. / Вестн. гематологии ; редкол.: К. М. Абдулкадыров [и др.]. – Санкт-Петербург, 2010. – Т. 6, № 1. – С. 52–53.

17. Никитина, И. А. АСМ-исследование тимоцитов животных разного возраста в условиях окислительного стресса / И. А. Никитина, М. Н. Стародубцева // Методологические аспекты сканирующей зондовой микроскопии : материалы IX Междунар. конф., Минск, 12–15 окт. 2010 г. / НАН Беларуси, Ин-т тепло- и массообмена им. А. В. Лыкова ; редкол. : С. А. Чижик [и др.]. – Минск, 2010. – С. 101–105.

18. Никитина, И. А. Количественная оценка клеточной поверхности в АСМ-анализе / И. А. Никитина, А. Н. Никитин, А. И. Грицук // Актуальные проблемы медицины : материалы Респ. науч.-практ. конф., посвящ. 20-летию Гомел. гос. мед. ун-та, Гомель, 24–25 февр. 2011 г. : в 4 т. / Гомел. гос. мед. ун-т ; редкол.: А. Н. Лызиков [и др.]. – Гомель, 2011. – Т. 3. – С. 99–102.

19. Никитина, И. А. Изменение топологии тимоцитов и показателей энергетического обмена тимуса в ближайшие сроки после облучения / И. А. Никитина, А. И. Грицук // Актуальные вопросы гематологии : материалы науч.-практ. конф. с междунар. участием, Гомель, 15–16 сент. 2011 г. / Проблемы здоровья и экологии : [прил. 2] ; редкол.: А. Н. Лызиков (гл. ред.) [и др.]. – Гомель, 2011. – № 2 (28). – С. 71–74.

20. Никитина, И. А. Потребление кислорода тимоцитами крыс разного возраста в условиях ингибирования цитохромоксидазы / И. А. Никитина, А. И. Грицук // Актуальные проблемы медицины : материалы Респ. науч.-практ. конф. и 21-й итоговой сес. Гомел. гос. мед. ун-та, Гомель, 16–17 февр. 2012 г. : в 4 т. / Гомел. гос. мед. ун-т ; редкол.: А. Н. Лызиков [и др.]. – Гомель, 2012. – Т. 3. – С. 103–105.

21. Никитина, И. А. Влияние пероксинитрита на уровень азидрезистентного дыхания в тимоцитах крыс разного возраста / И. А. Никитина, М. Н. Стародубцева, А. И. Грицук // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : материалы Междунар. науч. конф. : X съезда Белорус. обществ. объединения фотобиологов и биофизиков, Минск, 19–21 июня 2012 г. : в 2 ч. / М-во образования Респ. Беларусь [и др.] ; редкол.: И. Д. Вологовский [и др.]. – Минск, 2012. – Ч. 1. – С. 188–190.

22. Стародубцева, М. Н. Оценка функционального состояния лейкоцитов с помощью микроскопии латеральных сил / М. Н. Стародубцева, Н. И. Егоренков, И. А. Никитина // Актуальные проблемы медицины : материалы Респ. науч.-практ. конф. и 21-й итоговой сес. Гомел. гос. мед. ун-та, Гомель, 16–17 февр. 2012 г. : в 4 т. / Гомел. гос. мед. ун-т ; редкол.: А. Н. Лызиков [и др.]. – Гомель, 2012. – Т. 4. – С. 94–97.

23. Стародубцева М. Н. Фрикционные свойства поверхностного слоя биологических клеток, оцененные с помощью микроскопии латеральных сил / М. Н. Стародубцева, Н. И. Егоренков, И. А. Никитина // Методологические аспекты сканирующей зондовой микроскопии : материалы X Междунар. конф., Минск, 13–16 нояб. 2012 г. / Ин-т тепло- и массообмена им. А. В. Лыкова НАН Беларуси ; редкол. : С. А. Чижик [и др.]. – Минск, 2012. – С. 197–200.

24. Никитина, И. А. Изменение удельного потребления кислорода клеткой в условиях окислительного стресса / И. А. Никитина, А. И. Грицук // Радиация, экология и техносфера : материалы междунар. науч. конф., Гомель, 26–27 сент. 2013 г. / НАН. Беларуси, Ин-т радиобиологии ; редкол.: А. Д. Наумов [и др.]. – Минск, 2013. – С. 117–118.

25. Никитина, И. А. Поглощение кислорода клетками тимуса крыс разного возраста / И. А. Никитина, М. Н. Стародубцева, А. И. Грицук // Актуальные проблемы медицины : материалы Респ. науч.-практ. конф. и 22-й итоговой сес. Гомел. гос. мед. ун-та, Гомель, 14–15 ноябр. 2013 г. : в 4 т. / Гомел. гос. мед. ун-т ; редкол.: А. Н. Лызыкков [и др.]. – Гомель, 2014. – Т. 3. – С. 162–165.

26. Никитина, И. А. Количественные АСМ-параметры состояния клетки / И. А. Никитина, М. Н. Стародубцева, А. И. Грицук // Методологические аспекты сканирующей зондовой микроскопии: материалы XI Междунар. науч.-практ. конф., Минск, 21–24 окт. 2014 г. / Ин-т тепло- и массообмена им. А. В. Лыкова НАН Беларуси ; редкол. : С. А. Чижик [и др.]. – Минск, 2014. – С. 142–145.

27. Грицук А. И. Дыхательная активность тимоцитов и морфология их поверхности в условиях окислительного стресса:  $\gamma$ -облучение и пероксинитрит / А. И. Грицук, И. А. Никитина // Мультидисциплинарные аспекты молекулярной медицины : материалы 3-го рос. конгр. с межд. участием «Молекулярные основы клинической медицины – возможное и реальное», Санкт-Петербург, 26–29 мая 2015 г. / СПбГЭУ ; редкол.: И. А. Максимцева [и др.]. – Санкт-Петербург, 2015. – С. 65–67.

### **Тезисы докладов научных конференций**

28. Использование атомно-силовой микроскопии для изучения структур поверхностных слоев лимфоцитов человека / И. А. Никитина, М. Н. Стародубцева, Т. Г. Кузнецова, Н. И. Егоренков // Современные достижения бионаноскопии : Первая междунар. конф., Москва, 11–17 июля, 2007 г. : тез. докл. / Физ. фак. МГУ им. М. В. Ломоносова. – Москва, 2007. – С. 54.

29. Анализ структуры поверхности тимоцитов крысы при окислительном стрессе при помощи атомно-силовой микроскопии / И. А. Никитина, М. Н. Стародубцева, А. Н. Никитин, А. И. Грицук // Современные достижения бионаноскопии : Вторая междунар. конф., Москва, 17–19 июня, 2008 г. : тез. докл. / Физ. фак. МГУ им. М. В. Ломоносова. – Москва, 2008. – С. 41.

30. Никитина, И. А. Эндогенное дыхание тимоцитов крыс разного возраста при окислительном стрессе / И. А. Никитина // Санкт-Петербургские научные чтения-2009 : III междунар. молодеж. мед. конгр., Санкт-Петербург, 2–4 дек. 2009 г. : тез. докл. / Северо-Запад. отд-ние РАМН, Санкт-Петерб. гос. мед. ун-т им. акад. И. П. Павлова. – Санкт-Петербург, 2009. – С. 27.

31. Никитина, И. А. Изменения морфологических характеристик тимоцитов при воздействии пероксинитрита / И. А. Никитина // V Междунар. пироговская научн. медицинская конф. студ. и молод. ученых, Москва, 18 марта. 2010 г. : тез. докл. / Вестн. Рос. гос. мед. ун-т; редкол.: Н. Н. Володин (гл. ред.) [и др.]. – Москва, 2010. – № 2 – С. 523.

32. Никитина, И. А. АСМ-исследование клеток тимуса при остром воздействии ионизирующего облучения / И. А. Никитина, М. Н. Стародубцева, А. И. Грицук // Современные достижения бионаноскопии : Четвертая междунар. конф., Москва, 15–18 июня 2010 г. : тез. докл. / Физ. фак. МГУ им. М. В. Ломоносова. – Москва, 2010. – С. 52.

33. Никитина, И. А. Воздействие ионизирующего излучения на ткани тимуса / И. А. Никитина, А. И. Грицук // Радиобиология, радиэкология, радиационная безопасность : VI съезд по радиационным исследованиям, Москва, 25–28 окт. 2010 г. : в 2 т.: тез. докл. / Рос. акад. наук [и др.]. – Москва, 2010. – Т. 1. – С. 93.

34. Тканевое дыхание миокарда, печени и тимуса белых крыс после внешнего облучения в дозе 1 Гр / С. М. Сергеенко, А. Н. Коваль, Р. Р. Жадейко, И. А. Никитина, А. И. Грицук // Актуальные проблемы токсикологии и радиобиологии : Рос. науч. конф. с международным участием, Санкт-Петербург, 19–20 мая 2011 г. : тез. докл. / Воен.-мед. акад. им. С. М. Кирова [и др.]. – Санкт-Петербург, 2011. – С. 141.

35. Никитина, И. А. Влияние активных форм азота на структурно-функциональные особенности тимоцитов / И. А. Никитина, А. И. Грицук // Медико-биологические проблемы действия радиации : междунар. конф., Москва, 10–11 апр. 2012 г. : тез. докл. / Рос. акад. наук [и др.]. – Москва, 2012. – С. 66.

36. Никитина, И. А. Влияние окислительного стресса на состояние цитоскелета и потребление кислорода тимоцитами крыс разного возраста / А. И. Грицук, И. А. Никитина // Радиобиология, радиэкология, радиационная безопасность : VII съезд по радиационным исследованиям, Москва, 21–24 окт. 2014 г. : тез. докл. / Рос. акад. наук [и др.]. – Москва, 2014. – С. 28.

37. Никитина, И. А. Изменение морфологии тимоцитов под действием окислительного стресса, вызванного факторами разной природы / И. А. Никитина, М. Н. Стародубцева, А. И. Грицук // Свободные радикалы в химии и жизни : междунар. конф., Минск, 25–26 июля, 2015 г. : тез. докл. / Белорус. гос. ун-т; редкол.: О. И. Шадыро [и др.]. – Минск, 2015. – С. 115–117.

### **Патент на изобретение**

38. Способ определения патологии биологических клеток : пат. 20077 Респ. Беларусь, МПК А 61В 5/0 (2006.01) / М. Н. Стародубцева, Н. И. Егоренков, А. А. Суслов, А. И. Грицук, И. А. Никитина; дата публ. 30.04.2016.

### **Иные публикации**

39. Применение атомно-силового микроскопа в медико-биологических исследованиях [Электронный ресурс] / М. Н. Стародубцева, Е. С. Дрозд, И. А. Никитина, Н. И. Егоренков // Приложение к руководству пользователя для атомно-силового микроскопа NT-206 / ОДО «Микротест-машины» ; под ред. А. А. Сулова. – Гомель, 2013. – Режим доступа: <http://microtm.com/download/manual-bio-20131029.doc>. – Дата доступа: 20.10.2015.

## РЕЗЮМЕ

**Никитина Ирина Александровна**

### **Структурно-метаболические изменения тимоцитов крыс, вызванные ионизирующим излучением и активными формами азота**

**Ключевые слова:** тимоциты, тканевое дыхание,  $\gamma$ -излучение, пероксинитрит, атомно-силовая микроскопия (АСМ), клеточная морфология, поверхность клеток, структурно-механические свойства клеток.

**Цель работы:** установить закономерности воздействия  $\gamma$ -излучения и активных форм азота на аэробный энергетический метаболизм тимоцитов, топологию их поверхности, а также на структурно-функциональное состояние плазматической мембраны и кортикального цитоскелета.

**Методы исследования:** полярография, атомно-силовая микроскопия, световая и растровая электронная микроскопия, методы статистической обработки данных.

**Полученные результаты и их новизна.** Ткань тимуса интактных крыс отличается интенсивным тканевым дыханием и высокой активностью II комплекса дыхательной цепи митохондрий. Дыхательная активность тимуса на 3-и и 10-е сутки после общего облучения в дозе 0,5 Гр и 1 Гр резко снижается и частично восстанавливается на 30-е и 60-е сутки. Динамика изменений дыхательной активности тимоцитов количественно сопряжена с изменением их морфологии, топологии и структурно-механических свойств их поверхности. Методами АСМ выявлены закономерности радиационно-индуцированных и пероксинитрит-индуцированных изменений морфологических параметров целых тимоцитов и структур их клеточной поверхности, свидетельствующие о наличии общих механизмов ответа клеток на эти стимулы. Возрастная инволюция тимуса крыс сопряжена с увеличением в тимоцитах активности азидрезистентного дыхания. Преинкубация тимоцитов ювенильных и молодых крыс в присутствии пероксинитрита позволила выявить различия систем их тканевого дыхания, морфологических и структурно-механических параметров. Предложен новый количественный информативный параметр состояния клетки – поглощение кислорода на единицу площади ее поверхности – удельный поток кислорода.

**Рекомендации по использованию.** Предложены информативные АСМ-критерии оценки состояния клеток в медико-биологических исследованиях. Полученные результаты будут полезны при разработке теоретической основы новых методов коррекции иммунной системы организма в условиях производства активных форм азота в повышенных количествах и воздействия ионизирующего излучения. Полученные результаты внедрены в учебные, научные и производственные организации Беларуси.

**Области применения:** биохимия, биофизика, радиобиология, иммунология.

## РЭЗЮМЕ

**Нікіціна Ірына Аляксандраўна**

**Структурна-метабалічныя змены тымацытаў пацукоў, выкліканыя іанізуючым выпраменьваннем і актыўнымі формамі азоту**

**Ключавыя словы:** тымацыты, тканкавае дыханне,  $\gamma$ -выпраменьванне, пероксінітрыт, атамна-сілавая мікраскапія (АСМ), клеткавая марфалогія, паверхня клетак, структурна-механічныя ўласцівасці клетак.

**Мэта працы:** ўсталяваць заканамернасці ўплыву  $\gamma$ -выпраменьвання і актыўных формаў азоту на аэробны энергетычны метабалізм тымацытаў, тапалогію іх паверхні, а таксама на структурна-функцыянальны стан плазматычнай мембраны і картыкальнага цыташкілета.

**Метады даследавання:** паляраграфія, атамна-сілавая, светлавая і растравая электронная мікраскапія, метады статыстычнай апрацоўкі дадзенных.

**Атрыманыя вынікі і іх навізна.** Тканка тымусу інтактных пацукоў адрозніваецца інтэнсіўным тканкавым дыханнем і высокай актыўнасцю II комплексу дыхальнага ланцуга мітахондрый. Дыхальная актыўнасць тымусу на 3 і 10 суткі пасля агульнага апраменьвання ў дозе 0,5 Гр і 1 Гр рэзка зніжаецца і часткова аднаўляецца на 30 і 60 суткі. Дынаміка змяненняў дыхальнай актыўнасці тымацытаў колькасна спалучана са змяненнем іх марфалогіі, тапалогіі паверхні і структурна-механічных уласцівасцяў. Метадамі АСМ выяўлены заканамернасці радыяцыйна-індуцыраваных і пероксінітрыт-індуцыраваных змяненняў марфалагічных параметраў цэлых тымацытаў і структур іх клетачнай паверхні, якія сведчаць аб наяўнасці агульных механізмаў адказу клетак на гэтыя стымулы. Узроставае інвалюцыя тымусу пацукоў спалучана з павелічэннем у тымацытах актыўнасці азідрэзістэнтнага дыхання. Прэінкубацыя тымацытаў ювенільных і маладых пацукоў у прысутнасці пероксінітрыу дазволіла выявіць адрозненне сістэм іх тканкавага дыхання, марфалагічных і структурна-механічных параметраў. Прапанаваны новы колькасны інфарматыўны параметр стану клеткі – паглыннанне кіслароду на адзінку плошчы яе паверхні – удзельны паток кіслароду.

**Рэкамендацыі па выкарыстанні.** Прапанаваныя інфарматыўныя АСМ-крытэрыі ацэнкі стану клетак будуць запатрабаваны для распрацоўкі тэарэтычнай асновы новых метадаў карэкцыі імуннай сістэмы арганізма ва ўмовах напрацоўкі актыўных форм азоту ў высокай колькасці і ўздзеяння іанізуючага выпраменьвання. Атрыманыя вынікі ўкаранёны ў навучальныя, навуковыя і вытворчыя арганізацыі Беларусі.

**Вобласці выкарыстання:** біяхімія, біяфізіка, радыебіялогія, імуналогія.

## SUMMARY

**Nikitsina Iryna Aliaksandrauna**

### **Structural and metabolic changes in rats` thymocytes induced by ionizing radiation and reactive nitrogen species**

**Keywords:** thymocyte, tissue respiration, gamma-radiation, peroxy-nitrite, oxidative stress, atomic force microscopy, cell morphology, cell surface, structural-mechanical properties of cells.

**Objective:** To establish a pattern of the action of gamma-radiation and peroxy-nitrite on aerobic energy metabolism in thymocytes, on their surface topology, on a structural-functional state of the plasma membrane and the cortical cytoskeleton.

**Methods:** polarography, atomic force microscopy (AFM), scanning electron microscopy, light microscopy, statistical analysis.

**The results and their novelty:** Tissue of the thymus from intact rats show an intense respiration and high activity of mitochondrial respiratory chain complex II. Respiratory activity of the thymus drops sharply on days 3 and 10 after total irradiation in the dose of 0.5 Gy and 1 Gy, and then it is partly recovered on days 30 and 60. Dynamics of the changes in the respiratory activity of thymocytes is quantitatively related to the changes in their morphology, surface topology, and surface structural-mechanical properties. Patterns of changes in the morphological parameters of the thymocytes and the structures of their cell surface induced by ionizing radiation or peroxy-nitrite were revealed using AFM methods. The obtained results suggest the presence of common mechanisms of the cell response to both stimuli. Age-dependent involution of the thymus in rats is associated with an increase in the relative activity of azid-resistant respiration in thymocytes. Preincubation of thymocytes from juvenile and young rats with peroxy-nitrite made possible the detection of the differences in their tissue respiration systems, their morphological and structural-mechanical parameters. A new quantitative-informative parameter of the cell state was proposed; it is oxygen uptake per unit area of the surface.

**Recommendations for use.** Information-rich AFM criteria of the cell state assessment in biomedical research were proposed. The obtained results will be useful for the development of the theoretical base for new methods of the organism immune system correction under the condition of reactive nitrogen species overproduction and ionizing radiation action. The results are used in some educational, scientific and industrial organizations of Belarus.

**Area of applications:** biochemistry, biophysics, radiation biology, immunology.



Научное издание

**Никитина** Ирина Александровна

**СТРУКТУРНО-МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ТИМОЦИТОВ КРЫС,  
ВЫЗВАННЫЕ ИОНИЗИРУЮЩИМ ИЗЛУЧЕНИЕМ  
И АКТИВНЫМИ ФОРМАМИ АЗОТА**

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

по специальностям 03.01.04 – биохимия  
и 03.01.02 – биофизика

Подписано в печать 15.05.2017.

Формат 60×84<sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Бумага офсетная 80 г/м<sup>2</sup>. Гарнитура «Гаймс».  
Усл. печ. л. 1,63. Уч.-изд. л. 1,78. Тираж 100 экз. Заказ № 263.

Издатель и полиграфическое исполнение:  
учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет».  
Свидетельство о государственной регистрации издателя,  
изготовителя, распространителя печатных изданий № 1/46 от 03.10.2013.  
Ул. Ланге, 5, 246000, Гомель.