

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

УДК 546.173-128.5:577.3]:612.1(043.3)

**СТАРОДУБЦЕВА
Мария Николаевна**

**БИОФИЗИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ
ПЕРОКСИНИТРИТА В КЛЕТКАХ КРОВИ**

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
доктора биологических наук

по специальности 03.01.02 – биофизика

Минск, 2016

Работа выполнена в Учреждении образования «Гомельский государственный медицинский университет»

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

Официальные оппоненты: **Вересов Валерий Гаврилович**,
доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биофизики и инженерии клетки ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»

Титовец Эрнест Петрович,
доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник ГУ «Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии»

Шадыро Олег Иосифович,
доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой радиационной химии и химико-фармацевтических технологий химического факультета Белорусского государственного университета

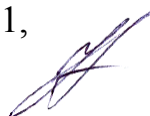
Оппонирующая организация: УО «Гродненский государственный университет имени Янки Купалы»

Защита состоится 27 июня 2016 года в 10-00 на заседании Совета по защите диссертаций Д 01.37.01 в ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси» по адресу: 220072, г. Минск, ул. Академическая, д. 27. Телефон ученого секретаря 332-16-04; факс 284-23-29; e-mail: pshybytko@ibp.org.by

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»

Автореферат разослан 26 мая 2016 года

Ученый секретарь
Совета по защите диссертаций Д 01.37.01,
кандидат биологических наук



Н. Л. Пшибытко

ВВЕДЕНИЕ

Ключевая роль активных форм кислорода (АФК) и азота (АФА) в возникновении и развитии многих болезней человека и животных является общепризнанной в медицине и биологии. К заболеваниям, связанным с перепроизводством в организме АФК/АФА и занимающим лидирующие позиции в списке болезней современного человека, относят инсульт, инфаркт, диабет, онкологические заболевания, воспалительные заболевания суставов и пищеварительного тракта, нейродегенеративные заболевания и др. [Pacher, 2007; Менщикова, 2008]. С другой стороны, процессы с участием АФК/АФА являются жизненно важными для организма, а поддержание им определенного уровня АФК/АФА является одним из основных условий его нормальной жизнедеятельности: АФК/АФА участвуют в проведении различного рода сигналов в клетках, индуцируют процессы их программируемой гибели, регулируют транспорт кислорода, формирование адаптационной защиты от агрессивных факторов внешней среды и т. д. [Ванин, 1998; Владимиров, 2004; Зинчук, 2001; Szabo, 2007; Афанасьев, 2011]. Химическим соединением, синтезируемым в клетках и тканях организма, проявляющим характерные для АФА/АФК свойства и объединяющим эти важнейшие классы биологически активных соединений, является перокси- или пероксонитрит (пероксинитрит-анион или оксопероксонитрат-анион, ONOO^- /перокси- или пероксоазотистая кислота, HOONO) [Carreras, 1994; Pryor, 1995; Radi, 2013]. Пероксинитрит – один из сильнейших окислительных агентов, процессы образования которого, как и его реакции с биологически важными молекулами, включают участие свободных радикалов. В ранних научных публикациях пероксинитриту приписывали, в основном, токсическое для организма действие. Но в последние годы все чаще стали указывать и на полезную роль пероксинитрита как участника клеточных процессов [Pacher, 2007; Ascenzi, 2010]. Несмотря на множество публикаций, посвящённых исследованиям пероксинитрит-связанных процессов в клетках, многие закономерности и механизмы его действия остаются ещё неясными. Не выявлены важные для биофизики клеток, включая клетки крови, основные закономерности переключения в клетке механизмов регуляторного и токсического действия пероксинитрита (зависимости от концентрации пероксинитрита, типов клеток и тканей, факторов окружающей среды). Не определены основные механизмы пероксинитрит-индуцированных изменений структуры и свойств клеток и тканей, включая их физико-механические свойства, хотя эти знания крайне важны для разработки новых подходов к профилактике и терапии многих заболеваний человека.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с научными программами (проектами), темами. Работа выполнена в рамках научно-исследовательских программ и тем: ГКПНИ «Современные технологии в медицине»: «Изучение молекулярно-генетических механизмов в патогенезе соматических и инфекционных заболеваний и прогнозирование их течения. Разработка новых методов диагностики и реабилитационных технологий» (№ ГР 20064268, 2006-2010 гг.); ГПНИ «Фундаментальная и прикладная медицина и фармация»: «Молекулярно-генетические механизмы формирования предрасположенности и особенностей течения заболеваний желудочно-кишечного тракта, репродуктивной, сердечно-сосудистой и кроветворной систем» (№ ГР 20112832, 2011-2013 гг.); «Изучение патогенетических механизмов формирования онкологической, сердечно-сосудистой и инфекционной патологии на основании молекулярно-генетических, биохимических и иммунологических исследований» (№ ГР 20143166, 2014-2015 гг.); темы кафедры медицинской и биологической физики УО «Гомельский государственный медицинский университет»: «Изучение механизмов действия физических и химических факторов на белки и форменные элементы крови» (№ ГР 20002101, 2000-2009 гг.); тем БРФФИ: «Наноиндентирование биомембран как метод анализа клеточной патологии» (№ ГР 20072777, 2007-2009 гг.); «Пероксинитрит как регулятор функций нейтрофилов» (№ ГР 20092211, 2009-2011 гг.); «Микромеханические характеристики раковых клеток» (№ ГР 20143168, 2014-2016 гг.); проектов, финансируемых Физиологическим обществом Великобритании (грант молодым ученым, 2004-2006 гг.) и Королевским обществом Великобритании («Function of aquaporin 1` in *Xenopus laevis* oocytes: action of oxidizing agents», 2006 г.).

Работа соответствует приоритетным направлениям фундаментальных и прикладных научных исследований Республики Беларусь: 3.10. «Молекулярная биология, биофизика регуляторных процессов и протеомика»; 4.5. «Новые технологии профилактики, диагностики, лечения и реабилитации»; 4.8. «Биофизические и генно-инженерные методы диагностики и лечения заболеваний человека»; 7.7. «Методы и оборудование зондовой, туннельной и атомно-силовой микроскопии» из перечня приоритетных направлений фундаментальных и прикладных научных исследований Республики Беларусь на 2006–2010 годы, утвержденного Постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 17.05.2005 № 512; 2.2. «Биологически активные синтетические и природные соединения, биополимеры, биорегуляторы, аминокислоты и их производные, наноструктурированные белки, нуклеиновые кислоты и их компоненты»; 3.1. «Биохимия, биофизика и физиология растительной, животной и микробной клетки, её надмолекулярных структур, биологических макромолекул и низкомолекулярных биорегуляторов, в том числе ферментов и гормонов»;

3.11. «Метаболомика живых систем, идентификация метаболических маркеров заболеваний растений, человека и животных, метаболическая инженерия»; 4.2. «Новые технологии профилактики, диагностики, лечения и реабилитации сердечно-сосудистых, онкологических и других социально значимых заболеваний»; 12.4. «Нанотехнологии для медицинских и биологических приложений» из перечня приоритетных направлений фундаментальных и прикладных научных исследований Республики Беларусь на 2011-2015 гг., утвержденного Постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 19.04.2010 № 585.

Цель и задачи исследования. Целью исследования являлось установление основных биофизических закономерностей и механизмов пероксинитрит-индуцированных изменений структуры и свойств клеток крови на уровне клеточных элементов и клетки в целом, а также выявление факторов, определяющих регуляторное и токсическое действие пероксинитрита в клетках.

Для достижения поставленной цели сформулированы и решены следующие задачи:

1) с помощью люминесцентных методов выявить основные механизмы синтеза АФК/АФА клетками крови в ответ на действие пероксинитрита и нитрующих соединений системы $\text{NO}_2^-/\text{H}_2\text{O}_2$ с участием гемсодержащих белков;

2) с помощью электрофизиологических, радиоизотопных методов и метода осмотического лизиса установить основные закономерности влияния пероксинитрита на транспорт ионов и молекул воды через мембраны клеток;

3) с помощью методов световой, электронной и атомно-силовой микроскопии (АСМ) изучить влияние пероксинитрита на морфологию клеток, структуру их поверхностного слоя, включая структуру кортикального цитоскелета;

4) с помощью методов АСМ и реологии изучить влияние пероксинитрита на физико-механические (упругие, адгезионные, фрикционные и реологические), включая термомеханические, свойства клеток;

5) с помощью биофизических методов исследовать влияние пероксинитрита на физико-химические (мембранный потенциал, концентрацию ионов водорода и молекул АТФ в цитозоле) параметры клеток;

б) выявить основные пути и закономерности гибели клеток крови, запускаемой пероксинитритом;

7) определить концентрацию нитрит-/нитрат-ионов в плазме крови людей с патологией сосудистой системы и высоким онкологическим риском, выявить связь концентрации нитрит-/нитрат-ионов с параметрами состояния липидного обмена и иммунной системы и оценить роль АФА в развитии этих заболеваний;

8) усовершенствовать и адаптировать метод АСМ для исследований структурных и физико-механических свойств поверхностного слоя клеток;

9) изучить методом АСМ структурные и физико-механические свойства поверхностного слоя клеток при патологиях (онкологической патологии, сахарном диабете второго типа и старении);

10) разработать теоретико-экспериментальные основы АСМ-диагностики клеточных патологий, включая пероксинитрит-связанные патологии.

Научная новизна. Впервые проведен комплексный анализ биофизических, включая механические, и физико-химических свойств и функций пероксинитрит-модифицированных клеток (эритроцитов, нейтрофилов, лимфоцитов и др.) и установлена роль пероксинитрита в регулировании свойств и функций клеток. Впервые проанализирован качественный и количественный состав АФК/АФА, синтезируемых нейтрофилами при их активации пероксинитритом, и установлена возможность целенаправленного изменения состава АФК/АФА с использованием катионов металлов и соединений, влияющих на концентрацию пероксинитрита и активность синтезирующих АФК/АФА ферментов. Определены закономерности и механизмы пероксинитрит-индуцированных изменений водно-ионного гомеостаза клеток, динамики кортикального цитоскелета, реологических и физико-химических параметров клеток. Выявлен запуск пероксинитритом программы нетоза в нейтрофилах. Предложен метод оценки и определена вероятность нахождения организма в состояниях с низкой или с высокой концентрациями нитрит-/нитрат-ионов (NO_x) в плазме крови, связанными с двумя состояниями иммунной системы/эндотелия, при преходящих нарушениях мозгового кровообращения, ишемической болезни сердца и повышении в плазме крови концентрации онкомаркеров. Впервые проведено изучение структуры и физико-механических свойств поверхностного слоя клеток с помощью различных методов АСМ в широком диапазоне концентраций пероксинитрита (1 мкМ – 3 мМ) и температур испытаний (20-90 °С) при разных способах подготовки клеток к исследованию и показано, что структурно-релаксационное состояние этого слоя, определяющее характер его механического поведения, при физиологических температурах (35-42 °С) подобно состоянию синтетических высокомолекулярных аморфных веществ при температуре ниже их температуры структурного стеклования («мягкое стекло»). Разработаны теоретико-экспериментальные основы нового направления клеточной диагностики ряда заболеваний организма (метаболических, онкологических и воспалительных) на базе физико-механического образа поверхности клеток, определяемого набором АСМ-параметров.

Положения, выносимые на защиту:

1. Нитрующие пероксидные соединения и системы с участием гем-содержащих белков (пероксинитрит, $\text{NO}_2^-/\text{H}_2\text{O}_2$ /гем-содержащий белок, пероксинитрит/гем-содержащий белок) являются участниками и регуляторами синтеза АФК/АФА клетками крови. В нейтрофилах пероксинитрит выполняет функции сигнальной молекулы и инициирует длительный (до 30-40 мин) многостадийный синтез АФК/АФА с участием различных АФК/АФА-синтезирующих ферментативных систем. Качественный и количественный состав синтезируемых клетками АФК/АФА зависит от концентрации пероксинитрита и свойств среды. В эритроцитах цельной крови

синтез АФК/АФА инициируется пероксинитритом и реагентами $\text{NO}_2^-/\text{H}_2\text{O}_2$ в миллимолярных концентрациях и протекает с участием гемоглобина.

2. Пероксинитрит влияет на водно-ионный гомеостаз клеток, вызывая зависимое от его концентрации изменение как пассивного потока ионов через плазматическую мембрану с участием ионных обменников и каналов, так и потока воды через аквапорины и дефекты мембраны. Пероксинитрит изменяет основные физико-химические параметры клеток крови (концентрацию катионов водорода и молекул АТФ в цитозоле, величину трансмембранного потенциала) и инициирует различные механизмы гибели клеток, включая апоптоз, некроз, нетоз и эриптоз, в зависимости от его концентрации, типа клеток и свойств среды.

3. Пероксинитрит вызывает реорганизацию структуры цитоскелета и мембраны, приводящую к изменению физико-механических (упругих, реологических, адгезионных, фрикционных) свойств клеток и связанных с ними функций клеток (контактное взаимодействие, экзоцитоз и др.). В цитоскелете эритроцитов пероксинитрит вызывает перераспределение локальной плотности актин-спектриновой сети, что приводит к изменению механических свойств клетки, включая изменение степени неоднородности распределения их значений на микро- и наноуровнях. В лейкоцитах пероксинитрит влияет на структуру и динамику актиновых элементов цитоскелета, являясь регулятором сборки/разборки или инициатором разрушения этих структур в зависимости от его концентрации.

4. Поверхностный слой клеток, несущей основой которого является состоящий из полимерных биомолекул цитоскелет, при физиологических температурах (35-42 °С) находится в структурно-релаксационном состоянии, подобном стеклообразному состоянию синтетических высокомолекулярных аморфных веществ. Механизмы действия пероксинитрита на физико-механические свойства поверхностного слоя клеток аналогичны, в основном, механизмам действия на синтетические высокомолекулярные аморфные вещества химических соединений, вызывающих деструкцию и межмолекулярную сшивку макромолекул и, соответственно, изменяющих их структурную организацию и сегментальную подвижность.

5. Новое направление диагностики патологий организма на клеточном уровне, основанное на концепции физико-механического образа поверхности клеток, получаемого с помощью методов АСМ. Новая методика анализа пространственной структуры кортикального цитоскелета клеток, основанная на оценке фрактальной размерности и визуализации карт латеральных сил, полученных при АСМ-сканировании клеток. Новый способ оценки состояния поверхностного слоя клеток на основе анализа статистических параметров карт латеральных сил, полученных при АСМ-сканировании поверхности клеток при разных температурах испытаний.

Личный вклад соискателя учёной степени. Постановка научных задач, выполнение основных экспериментов, анализ полученных данных и основные теоретические обобщения выполнены лично соискателем. Ряд экспериментальных исследований выполнен совместно с доктором А. Таттерсолл (Университет г. Оксфорда, Великобритания); к.м.н. Е. В. Воропаевым, к.м.н. Н. В. Галиновской, д.м.н. В. Н. Беляковским, к.б.н. Т. Г. Кузнецовой, д.м.н. В. М. Мицурой, к.б.н. В. А. Игнатенко, И. А. Никитиной, Т. Н. Божок, Е. В. Сериковой, Д. Р. Петренёвым, И. Е. Стародубцевым (УО «Гомельский государственный медицинский университет»); к.б.н. Г. Н. Семенковой, к.б.н. Е. И. Коваленко (Белорусский государственный университет); к.т.н. С. О. Абетковской, к.ф.-м.н. Е. С. Дрозд, к.б.н. Е. Э. Константиновой, к.т.н. Т. А. Кузнецовой, Н. С. Кужель, Г. Б. Мельниковой (ГНУ «Институт тепло- и массообмена им. А. В. Лыкова НАН Беларуси»); д.м.н. В. Б. Смычком (ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования») при решающем вкладе автора. В НИЛ УО «Гомельский государственный медицинский университет» выполнены работы по определению биохимических показателей крови человека. Автор выражает искреннюю благодарность всем коллегам за реализованную возможность совместных исследований и творческое сотрудничество.

Автор признателен профессорам J. C. Ellory (Университет г. Оксфорда, Великобритания), д.х.н. Р. И. Жданову (Институт общей патологии и патофизиологии РАМН, г. Москва, Россия), академику НАН Беларуси, д.т.н. С. А. Чижикю (ГНУ «Институт тепло- и массообмена им. А. В. Лыкова НАН Беларуси»), д.м.н. А. И. Грицуку и д.х.н. Н. И. Егоренкову (УО «Гомельский государственный медицинский университет») за плодотворное обсуждение экспериментальных данных и теоретических положений, высказанные в ходе обсуждения критические замечания, пожелания и стимулирующие идеи.

Автор особо благодарен научному консультанту академику НАН Беларуси, профессору, д.б.н. С. Н. Черенкевичу за многолетнюю, начиная со студенческой скамьи и кандидатской диссертации, систематическую помощь при выполнении научных исследований.

Апробация диссертации и информация об использовании её результатов. Основные результаты работы обсуждены на: 4-11 съездах Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков (Минск, 2000-2014 гг.), конференциях «Dresden Chemiluminescence Days» (Дрезден, ФРГ, 2000 и 2003 гг.), FEBS форумах для молодых ученых (Стамбул, Турция, 2002 г.; Брюссель, Бельгия, 2003 г.), FEBS конгрессах (Стамбул, Турция, 2002 г.; Брюссель, Бельгия, 2003 г.; Стамбул, Турция, 2006 г.; Афины, Греция, 2008 г.), семинаре Физиологического общества Великобритании (Будапешт, Венгрия, 2003 г.), Объединенном конгрессе Британского фармакологического общества и Физиологического общества Великобритании (Манчестер, Великобритания, 2003 г.), республиканских научно-практических кон-

ференциях «Актуальные проблемы медицины» и итоговых сессиях Гомельского государственного медицинского университета (Гомель, 2005, 2007-2010, 2012-2015 гг.), международной конференции «Проблемы интеграции функций в физиологии и медицине» (Минск, 2004 г.), 4 международной конференции по пероксинитриду и активным формам азота (Констанц, ФРГ, 2004 г.), 15 и 16 съездах Европейской ассоциации исследователей красных клеток (Муртен, Швейцария, 2005 г.; Оксфорд, Великобритания, 2007 г.), международной конференции «Активные формы кислорода, азота и хлора в регуляции функций в норме и патологии» (Гродно, 2006 г.), международной конференции «Лекарственные средства и биологически активные соединения» (Гродно, 2007 г.), международных научно-технических конференциях «Полимерные композиты и трибология (Поликомтриб)» (Гомель, 2007, 2009, 2011, 2013 и 2015 гг.), 1 и 2 всероссийских школах-семинарах «Современные достижения бионаноскопии» (Москва, 2007 и 2008 гг.), 7-11 международных конференциях «Методологические аспекты сканирующей зондовой микроскопии» (Минск, 2006, 2008, 2010, 2012, 2014 гг.), международной научной конференции «Теория оболочек и мембран в механике и биологии: от макро- до наноразмерных структур» (Минск, 2013 г.), международной научной конференции «Свободные радикалы в химии и жизни» (Минск, 2015 г.).

По результатам научных исследований получено 4 патента Республики Беларусь на изобретения. Результаты исследований внедрены (10 актов о внедрении результатов) в ряде научных, учебных и производственных организаций Беларуси (в частности, в Гродненском филиале «Научно-исследовательский центр проблем ресурсосбережения» ГНУ «Институт тепло- и массообмена имени А. В. Лыкова НАН Беларуси, ОДО «Микротестмашины», УО «Гомельский государственный медицинский университет», УО «Белорусский государственный медицинский университет»).

Опубликование результатов диссертации. По теме диссертации опубликованы: 1 монография (13,5 авт. л.), 2 главы в коллективных монографиях (2,5 авт. л.), 28 статей в рецензируемых научных журналах (17,5 авт. л.), 38 статей в сборниках материалов конференций, 24 тезиса докладов научных конференций, описания 4 патентов Республики Беларусь, 1 инструкция Министерства здравоохранения Республики Беларусь по применению, другие публикации – 5; без соавторства – 10 научных работ (1 монография).

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, общей характеристики работы, 7 глав, в том числе 5 экспериментальных, заключения, библиографического списка, 15 приложений (16 стр.). Объем диссертации составляет 335 стр., в том числе 86 стр. содержат 115 рис. и 21 табл. Библиографический список (46 стр.) включает 457 использованных источников и 103 публикации соискателя.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В первой главе работы выполнен анализ опубликованных научных данных о химических свойствах пероксинитрита, его молекулярных мишенях в клетках, механизмах его участия в клеточных сигнальных путях и запуске программ гибели клеток, а также его роли в развитии патологий организма. Рассмотрена роль цитоскелета в формировании физико-механических свойств клеток и их оценка с помощью методов АСМ. Обоснован выбор направления исследования и изложена общая концепция работы.

Объекты и методы исследования

Объекты исследования. Цельную донорскую венозную кровь (стабилизированную цитратом натрия, гепарином), эритроцитарную массу получали из УЗ «Гомельская станция переливания крови» и ГУ «РНПЦ гематологии и трансфузиологии». Кровь пациентов с различными заболеваниями получали из ГУЗ «Гомельский областной эндокринологический диспансер», ГУЗ «Гомельская городская клиническая больница № 3», ГУЗ «Гомельская областная инфекционная клиническая больница», ГУЗ «Гомельский областной клинический госпиталь инвалидов Отечественной войны», Лаборатории физиологии, анатомии и генетики Университета г. Оксфорда (Великобритания). Кровь для оценки концентрации онкомаркеров и метаболитов NO получали из ГУЗ «Добрушская центральная районная больница». *Нейтрофилы* выделяли из крови доноров и крови половозрелых белых беспородных крыс путем центрифугирования в градиенте плотности фиколл-урографина [Коваленко, 2007], *мононуклеарные клетки* из крови доноров – путём центрифугирования в градиенте плотности фиколл-гипака [Воуц, 1968], *эритроциты* из эритроцитарной массы или крови доноров, из крови половозрелых белых беспородных крыс – путем центрифугирования и последующей отмывки и ресуспендирования в буферно-солевом растворе. *Тимоциты* выделяли из тимуса половозрелых белых беспородных крыс. В работе использованы культуры первичных *фибробластов* кожи человека, *мезенхимальных стволовых клеток* жировой ткани человека и *клеток асцитной карциномы Эрлиха* мыши (УО «Гомельский государственный медицинский университет»); культуры *эпителиальных клеток карциномы гортани* (HEp-2c) (ГУ «РНПЦ эпидемиологии и микробиологии»); культуры *эпителиальных клеток карциномы лёгкого* (A549) человека (ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси», ГНУ «Институт радиобиологии НАН Беларуси»). *Ооциты* лягушки были предоставлены доктором Н. Staines (Университет Св. Георга, Лондон, Великобритания).

Методы исследования. Пероксинитрит получали в реакции NaNO_2 и H_2O_2 в кислых водных растворах с последующим быстрым их защелачиванием [Robinson и Beckman, 2005]. Концентрированный раствор перокси-

нитрита добавляли к суспензиям клеток или к цельной крови при постоянном перемешивании (0,3 мкМ – 3 мМ, 1 с – 3 ч). Хемилюминесцентный анализ выполняли с помощью включающего биохемилюминометр БХЛ-1 компьютеризированного измерительного комплекса (БГУ, Беларусь). Апоптоз, некроз и экзоцитоз изучали с помощью наборов флуоресцентных красителей на проточном цитофлуориметре Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, США) согласно методикам, предложенным производителями наборов красителей. С помощью спектрофлуориметра Varian Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (Agilent Technologies, Австралия) был изучен синтез АФК/АФА в клетках с использованием флуоресцентного красителя DCFH₂-DA и измерена величина внутриэритроцитарного рН с использованием флуоресцентного красителя BCECF-AM. Потоки катионов K⁺ и Na⁺, а также анионов SO₄²⁻ через мембраны эритроцитов были измерены радиоизотопным методом с помощью изотопов ⁸⁶Rb⁺, ²²Na⁺ и ³⁵SO₄²⁻ соответственно. Ионный ток через мембраны эритроцитов регистрировали в конфигурации целой клетки «patch-clamp» (пэтч-кламп) методом с помощью Axopatch 200A усилителя и анализировали с использованием программы обработки данных pCLAMP (Версия 8, Axon Instruments Inc., США) [Staines, 2006]. Оценку содержания в мембранах эритроцитов аквапоринов и 3-нитротирозина проводили методом вестерн-блоттинга. Мембранный потенциал эритроцитов оценивали с помощью измерения трансмембранного градиента концентрации H⁺ [Masey, 1978]. Оценку величины внутриклеточной концентрации молекул АТФ проводили хемилюминесцентным методом. С помощью спектрофотометра СФ-46 (Россия) оценивали степень окисления гемоглобина и процент гемолиза в суспензии эритроцитов. Окисление триптофановых остатков белков мембран эритроцитов изучали флуоресцентным методом [Di Mascio, 2000]. Вязкость крови и суспензии лейкоцитов измеряли вискозиметром ВК-4 (Россия). Световую микроскопию клеток выполняли на микроскопе Nikon Eclipse E200 (Япония) с использованием камеры и программного обеспечения Chromosome-01/MorphoTest (НИУ «Институт ядерных проблем» БГУ, Беларусь). Электронную микроскопию клеток выполняли на растровых электронных микроскопах VEGA-L-НП (TESCAN, Чехия) и CamScan (Oxford Instruments, Великобритания). Данные световой микроскопии обрабатывали с помощью программы ImageJ 1.39 (НИН, США). АСМ клеток с использованием зондов (MikroMash, Эстония) в контактном и полуконтактном (прерывистом) режимах сканирования проводили на атомно-силовом микроскопе НТ-206 (ОДО «Микротестмашины», Беларусь). Обработка АСМ-данных проведена с использованием программы «SurfaceExplorer» (ОДО «Микротестмашины», Беларусь). Подготовку клеток к микроскопическим исследованиям проводили по разработанным нами методикам [Стародубцева, 2007-2013]. Изучение температурных зависимостей АСМ-параметров кле-

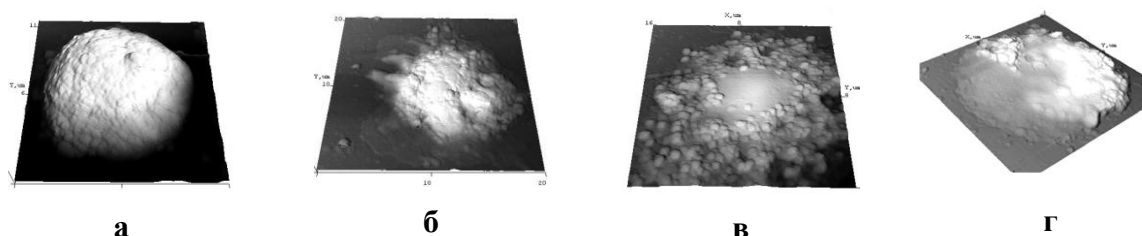
ток проводили в диапазоне температур от 20 до 90 °С, используя термоплатформу ТТ-01 (ОДО «Микротестмашины», Беларусь). Проницаемость мембран ооцитов лягушки для молекул воды была оценена по изменению объема клеток в гипотонических растворах с помощью конфокального микроскопа Nikon TE 2000-E (Япония). Определение нитрит-/нитрат-ионов в плазме крови проводили модифицированным колориметрическим методом с использованием реактива Грисса. Определение концентрации онкомаркеров в плазме крови проводили с помощью коммерческих наборов Вектор-Бест (Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Активность супероксиддисмутазы (СОД) в плазме крови определяли по модифицированной методике [Сирота, 2000]. Определение концентрации цитокинов и С-реактивного белка в плазме крови осуществляли по стандартным методикам с помощью иммуноферментного анализатора АИФ М/340 (Россия). Концентрацию глюкозы в крови определяли с помощью стационарного биохимического анализатора BIOSEN-5030 (ФРГ). Статистический анализ опытных данных проводили с помощью программ Microsoft Office Excel 2003-2007, Statistica (версии 6 и 7), OriginPro 8 SRO. Оценивали нормальность распределения признака методами Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Вилк. При нормальном распределении признака данные анализа представляли в виде среднего значения и границ 95 % доверительного интервала (ДИ), сравнение выборочных характеристик проводили с использованием t-критерия Стьюдента и критерия Фишера. Для распределений, не подчиняющихся закону распределения Гаусса, результаты анализа представляли в виде медианы, границ интерквартильного интервала, максимального и минимального значения; сравнение выборочных характеристик проводили с использованием критерия Вилкоксона. При анализе мультимодальных распределений признака проводили аппроксимацию кривой распределения функцией, представляющей собой сумму нескольких функций Гаусса.

Пероксинитрит-индуцированные изменения структурных и физико-механических свойств клеток

Влияние пероксинитрита на структурные свойства клеток. *Пероксинитрит-индуцированное изменение морфологии и структуры цитоскелета эритроцитов.* При введении пероксинитрита (>300 мкМ) в цельную кровь *in vitro* наблюдается явно выраженный пойкилоцитоз эритроцитов. Превалирующей пероксинитрит-индуцированной трансформацией эритроцитов является переход «дискоцит→эхиноцит». По данным АСМ пероксинитрит вызывает как локальные сгущения, так и локальные разрежения спектрин-актиновой сети, то есть способствует увеличению её структурной неоднородности. С увеличением концентрации пероксинит-

рита имеет место общее сгущение сети цитоскелета эритроцитов (уменьшение размеров её ячеек), подтверждаемое количественно изменением значения фрактальной размерности карт латеральных сил участков поверхности эритроцитов, обработанных пероксинитритом.

Пероксинитрит-индуцированное изменение морфологии нейтрофилов и тимоцитов. В результате анализа формы и структуры активированных пероксинитритом (1-200 мкМ), а затем адгезированных к стеклянной пластине нейтрофилов выделено 4 основных подтипа клеток (рисунок 1), которые различаются геометрическими параметрами (средним диаметром D , средней высотой h , отношением D/h), архитектоникой (размерами гранул) и фрактальной размерностью (D_F) карт латеральных сил клеточной поверхности и характеризуют стадии активации клеток пероксинитритом.



подтип 1 (а, 11,1 мкм × 11,1 мкм), подтип 2 (б, 19,6 мкм × 19,6 мкм),
подтип 3 (в, 16,2 мкм × 16,2 мкм), подтип 4 (г, 16,0 мкм × 16,0 мкм)

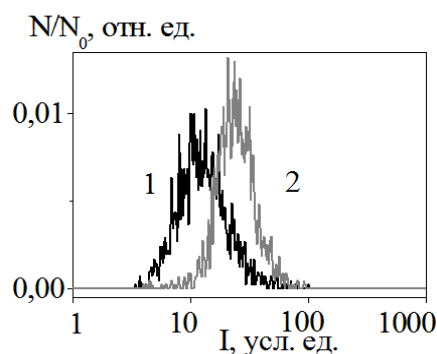
Рисунок 1. – Типичные АСМ-изображения активированных пероксинитритом, а затем адгезированных к стеклянной пластине и фиксированных глутаровым альдегидом (1 %) нейтрофилов человека

Клетки с $D/h < 6,5$ и мелкими (≈ 200 нм) гранулами отнесены к подтипу 1, с $D/h = 6,5 - (16-18)$ и гранулами размером ≈ 200 нм и ≈ 600 нм – к подтипу 2, с $D/h > 18$ и крупными гранулами (≈ 900 нм) – к подтипу 3. Четвертый подтип клеток с $D/h \approx 15$ характеризуется неоднородным распределением структур на поверхности – наблюдается скопление гранул на одном или нескольких участках, в то время как остальная часть поверхности клетки является практически гладкой.

Пероксинитрит (30-300 мкМ) вызывает концентрационнозависимое уменьшение объема, площади поверхности, среднего диаметра и средней высоты тимоцитов, адгезированных к стеклянной пластине.

Пероксинитрит-индуцированный экзоцитоз внутриклеточных гранул, реорганизация структуры актинового цитоскелета и адгезия клеток. Выявлено, что пероксинитрит в области концентраций от 0,5 до 200-250 мкМ стимулирует, а при более высоких концентрациях подавляет экзоцитоз внутриклеточных гранул нейтрофилов. На рисунке 2 представлены данные цитофлуориметрического анализа появления в плазматической

мембране фагоцитов CD-антигенов (CD11b/CD18) после обработки периферической крови крысы пероксинитритом.



I – интенсивность флуоресценции, **N** и **N₀** – число клеток с интенсивностью **I** и общее число клеток соответственно. Нейтрофилы (1 млн клеток на мл) были проинкубированы в течение 10 мин (37 °С) в отсутствие (1) и в присутствии (2) пероксинитрита (75 мкМ), затем «помечены» моноклональными антителами, специфичными к CR3(CD11b/CD18)/CR4

Рисунок 2. – Цитофлуориметрический анализ экспрессии поверхностных маркеров CR3(CD11b/CD18)/CR4 в нейтрофилах периферической крови крыс

Активируя экзоцитоз внутриклеточных гранул, пероксинитрит способствует адгезии нейтрофилов к субстрату и реализации основной функции нейтрофилов по уничтожению чужеродных объектов. Зависимости параметра D/h как для нейтрофилов, так и для тимоцитов от концентрации пероксинитрита (1-600 мкМ) имеют вид кривой с максимумом при ≈ 100 мкМ. Показано, что в случае наличия катионов Mn^{2+} (100 мкМ) в суспензии нейтрофилов до введения пероксинитрита (1-600 мкМ) пероксинитрит-индуцированная адгезия нейтрофилов к стеклянным пластинам не проявляется, а экзоцитоз их внутриклеточных гранул не стимулируется. Этот факт свидетельствует о том, что катионы Mn^{2+} являются деактиваторами экзогенного пероксинитрита. На основе данных световой микроскопии и АСМ установлено, что в концентрациях выше 100 мкМ пероксинитрит ингибирует формирование ламеллоподий и филоподий в лейкоцитах. Так, в концентрациях 100-300 мкМ пероксинитрит почти полностью подавляет процесс образования филоподий в нейтрофилах и тимоцитах и существенно нарушает структуру филоподий, образующихся в этих условиях. При концентрациях ниже 50-100 мкМ пероксинитрит может активировать сборку структур ламеллоподий и филоподий (например, увеличивать длину и число филоподий, приходящихся на один тимоцит). Опыты с агентами, модифицирующими структуру цитоскелета (колхицином и цитохалазином), свидетельствуют о том, что мишенью действия пероксинитрита в концентрациях 1-200 мкМ в лейкоцитах яв-

ляются именно актиновые элементы цитоскелета (микрофиламенты), а не микротрубочки. При этом характер действия пероксинитрита аналогичен характеру действия цитохалазина – оба реагента разрушают структуры актиновых элементов цитоскелета, способствуя эффективному слиянию внутриклеточных гранул с плазматической мембраной. Совместное действие цитохалазина и пероксинитрита имеет катастрофические последствия для клеток, запуская программы их разрушения.

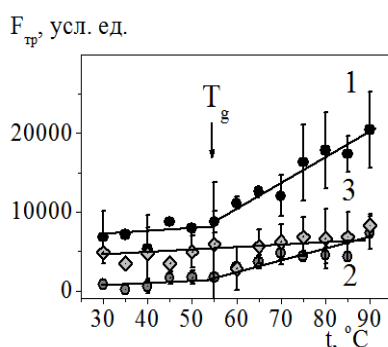
Пероксинитрит-индуцированное изменение физико-механических свойств клеток. Установлено, что вязкость крови после её обработки пероксинитритом изменяется, а характер изменения зависит от концентрации пероксинитрита. Вязкость свежей гепаринизированной крови увеличивается при концентрациях пероксинитрита 10-100 мкМ, затем с увеличением концентрации пероксинитрита она уменьшается и снова увеличивается в области концентраций > 1 мМ. Две концентрационные области пероксинитрит-индуцированного увеличения вязкости крови связаны, в основном, с концентрационнозависимым изменением реологических свойств лейкоцитов и эритроцитов соответственно.

С помощью АСМ в прерывистом режиме сканирования выявлены изменения на картах распределения локальных физико-механических свойств (появление наномасштабных областей с резко отличающимися параметрами упругих свойств) поверхностного слоя эритроцитов после обработки клеток в суспензии пероксинитритом в концентрации 200-300 мкМ. Средние размеры наблюдаемых доменов – порядка 100 нанометров. Так как границы раздела областей липидов с различным составом, физико-химическими и механическими свойствами являются дефектными областями липидного бислоя, то через них могут легко проникать ионы и нейтральные молекулы как внутрь, так и наружу клетки.

Методом статической силовой спектроскопии установлено изменение жёсткости (локального модуля упругости, E) поверхности эритроцитов (как дискоцитов, так и эхиноцитов) после обработки цельной крови пероксинитритом в больших концентрациях (2,5 мМ). Распределение значений E для дискоцитов после обработки крови пероксинитритом является бимодальным: значение первой моды находится в пределах ДИ для среднего значения E контрольных дискоцитов (унимодальное распределение), а вторая мода в 1,6 раз превышает контрольные значения E . Для пероксинитрит-индуцированных эхиноцитов значения E в 1,2-1,3 раза больше значений, характерных для контрольных дискоцитов. При этом статистически достоверных различий в значениях E в областях вершук и оснований выпучиваний кренированных форм эритроцитов не выявлено.

Установлено, что пероксинитрит изменяет не только параметры сил трения скольжения ($F_{тр}$) на нано- и микроуровнях между острием АСМ-зонда и поверхностью клетки, оцениваемые по данным АСМ, для частично

дегидратированных (высушенных) препаратов клеток в области температур 20-90 °С, но и характер их температурной зависимости. Для исследованных нефиксированных или слабо фиксированных клеток с увеличением температуры испытаний наблюдается существенный рост значений $F_{тр}$ при переходе через область температур (температура T_g , рисунок 3), связанную с началом тепловой денатурации белков. Для обработанных пероксинитритом (например, 30 мкМ) лейкоцитов (timoцитов) зависимость $F_{тр}$ от температуры испытаний становится слабо выраженной (рисунок 3). При повышении концентрации пероксинитрита (300 мкМ) зависимость $F_{тр}$ от температуры испытаний для поверхностного слоя тимоцитов практически исчезает (рисунок 3), а разброс значений вокруг их среднего значения ($\sigma_{тр}$) значительно увеличивается. Зависимость параметров $F_{тр}$ тимоцитов от концентрации пероксинитрита обусловлена, в основном, пероксинитрит-индуцированным изменением структуры и свойств актинового кортикального цитоскелета. Для тимоцитов при стимуляции процессов сборки структур актинового цитоскелета (1-100 мкМ пероксинитрита) зависимость $F_{тр}$ от температуры существенно ослабевает. При больших концентрациях пероксинитрита (100-300 мкМ), структура актинового цитоскелета становится неоднородной, что приводит к значительному уширению распределения значений $F_{тр}$ для микромасштабных участков поверхности клеток.



1 – контроль, 2 – 30 мкМ пероксинитрита, 3 – 300 мкМ пероксинитрита.

Размеры области сканирования – 3 мкм × 3 мкм (256 пикселей × 256 пикселей).

Данные представлены в виде средних значений и границ 95 % ДИ (n=2-7)

Рисунок 3. – Температурные зависимости средних значений сил трения ($F_{тр}$) для участков поверхности тимоцитов крысы

Для эритроцитов с увеличением концентрации пероксинитрита (250 мкМ – 1 мМ) наблюдается уменьшение крутизны температурных зависимостей параметров сил трения ($F_{тр}$ и $\sigma_{тр}$). При этом значение величины T_g уменьшается и оказывается ниже верхней границы физиологических температур (поверхностный слой клетки начинает проявлять вязкоупругие свойства), что может приводить к нарушению сигнальных функций цитоскелета и функций транспортных белков эритроцитов.

Пероксинитрит-индуцированное изменение физико-химических свойств клеток

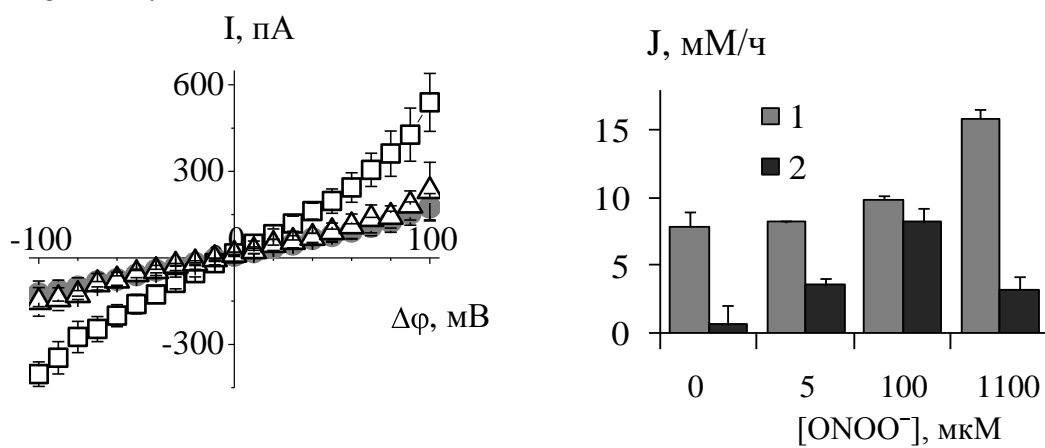
Пероксинитрит концентрационнозависимо изменяет параметры ионных токов через плазматическую мембрану эритроцитов, что приводит к изменению их мембранного потенциала. С увеличением концентрации пероксинитрита мембранный потенциал в областях 1-250 мкМ и 1-2 мМ увеличивается, а в области 250 мкМ – 1 мМ уменьшается. В области концентраций 50-500 мкМ пероксинитрит вызывает деполяризацию мембран эритроцитов, а в области 500 мкМ – 1 мМ – их гиперполяризацию.

В работе установлено, что пероксинитрит в концентрациях 10-60 мкМ вызывает существенное закисление цитозоля эритроцитов (уменьшение величины рН на 0,2-1,0 единиц). Пероксинитрит в концентрациях выше 250-300 мкМ вызывает также значительное рН-зависимое истощение эритроцитов по АТФ и практически полное окисление внутриклеточного гемоглобина.

Методом «пэтч-кламп» в конфигурации целой клетки выявлено, что после обработки клеток пероксинитритом величина ионного тока увеличивается в обоих направлениях – как внутрь, так и наружу клетки (рисунок 4). После 10 мин инкубации эритроцитов в среде с пероксинитритом (80 мкМ) проводимость мембраны возрастает в 3,0-3,5 раза, потенциал смены направления тока изменяется с $(-7,0 \pm 1,5)$ мВ до $(-4,3 \pm 0,9)$ мВ. В опытах с радиоактивными изотопами ($^{86}\text{Rb}^+$ и $^{22}\text{Na}^+$) показано, что пероксинитрит (1 мкМ – 1,2 мМ) вызывает увеличение пассивного потока ионов K^+ и Na^+ через мембраны эритроцитов. Выявлено, что введенные в суспензию эритроцитов до введения пероксинитрита ионы Co^{2+} и Ni^{2+} (100 мкМ) существенно не изменяют величины пероксинитрит-индуцированного пассивного потока катионов K^+ , а ионы Zn^{2+} в такой же концентрации предотвращают пероксинитрит-индуцированный поток катионов в эритроцитах. Пероксинитрит оказывает влияние на транспорт анионов через мембрану клеток с участием анионных обменников (например, АЕ1 – анионный обменник типа 1 эритроцитов). Так, пероксинитрит в концентрации 1 мМ уменьшает поток анионов (на примере радиоизотопа $^{35}\text{SO}_4^{2-}$) через АЕ1 в 2 раза (Hct 20 %, рН 6,5). Пассивный поток ионов K^+ через эритроцитарные мембраны разделяют на Cl^- -зависимый и Cl^- -независимый потоки. Cl^- -зависимый поток катионов K^+ в эритроцитах связан с активностью K^+/Cl^- -котранспортера типа 1 (КСС1). Установлено, что вклад этих потоков в общий ответ транспортной системы эритроцитов на действие пероксинитрита зависит от концентрации и времени, прошедшего после его введения в клеточную суспензию. Так, в малых и умеренных концентрациях пероксинитрит активирует КСС1 (максимум при 100 мкМ). При концентрациях пероксинитрита, превышающих 500 мкМ, наблюдается усиление Cl^- -независимого потока катионов K^+ , в то время как активность КСС1 и, соответственно, Cl^- -зависимый поток катионов K^+ , уменьшаются (рисунок 5).

Механизмами активации КСС1 пероксинитритом в концентрациях 1-200 мкМ могут быть: (1) непосредственное модифицирование пероксинитритом структуры КСС1 белка [Mallozzi, 1999], (2) регулирование активности КСС1 пероксинитрит-индуцированными изменениями концентрации катионов H^+ в цитозоле клеток, (3) регулирование активности КСС1 пероксинитрит-индуцированными перестройками структуры мембран.

С использованием ингибитора АТФ-зависимых K^+ -каналов (толбуамида) показано, что АТФ-зависимые K^+ -каналы могут вносить определённый вклад в Cl^- -независимый поток катионов K^+ в эритроцитах в условиях вызванного пероксинитритом значительного истощения эритроцитов по АТФ.



Круги – контроль, квадраты – клетки после обработки пероксинитритом (80 мкМ, 10 мин), треугольники – клетки после обработки деактивированным пероксинитритом. Данные представлены в виде средних значений и границ 95 % ДИ, n=3-8

Рисунок 4. – Влияние пероксинитрита на ионный ток через мембрану эритроцитов (пэтч-кламп метод в конфигурации целой клетки)

Данные представлены в виде средних значений и верхних границ 95 % ДИ, n=4

Рисунок 5. – Влияние пероксинитрита на Cl^- -независимый (1) и Cl^- -зависимый (2) пассивные потоки катионов калия (J) через мембрану эритроцитов у пациентов с серповидно-клеточной анемией

Пероксинитрит изменяет проницаемость мембраны клеток для молекул воды. Мембраны эритроцитов богаты аквапоринами (AQP). Для оценки влияния пероксинитрита на функционирование аквапоринов AQP1 были проведены исследования в модельной клеточной системе – в ооцитах лягушки, в которых с помощью методов генной инженерии вызывали экспрессию AQP1. Обработка экспрессирующих AQP1 ооцитов пероксинитритом при концентрации 1 мМ уменьшает проницаемость их мембран для молекул воды в 3,5-4 раза, т.е. до уровня, характерного для контрольных

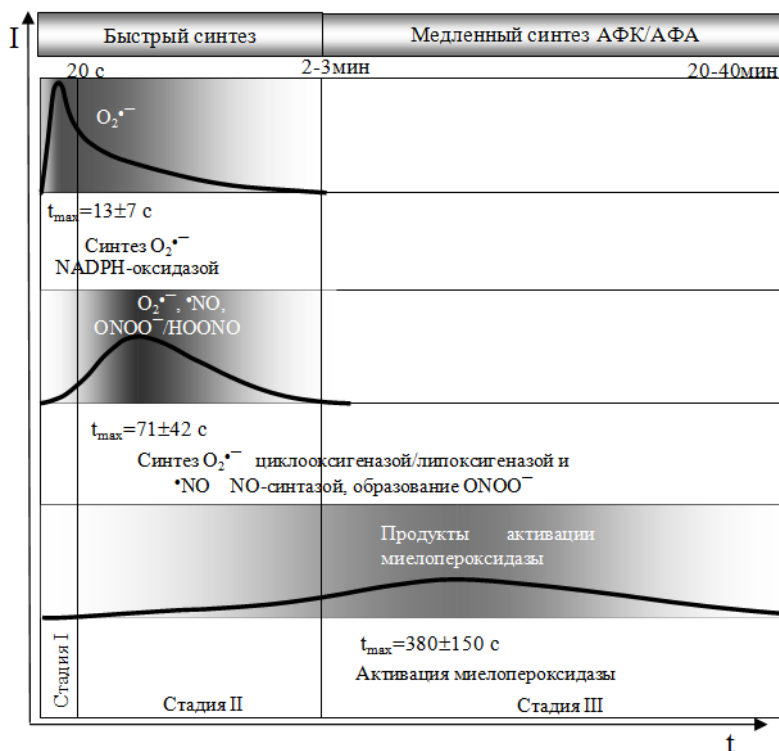
ооцитов. Этот эффект может быть обусловлен прямой реакцией пероксинитрита с SH-группой остатка cys186 молекулы белка, находящегося в узком месте водной поры. Несмотря на то, что пероксинитрит замедляет поток воды через аквапорины, он вызывает увеличение потока молекул воды через дефекты структуры липидного бислоя, белков-транспортеров других молекул и ионов. Проницаемость мембраны обычных ооцитов лягушки для молекул воды после обработки клеток пероксинитритом в концентрации 3 мМ увеличивается примерно в 1,5 раза.

Обработка эритроцитов пероксинитритом или реагентами $\text{NO}_2^-/\text{H}_2\text{O}_2$ изменяет устойчивость клеток к осмотическому шоку в гипотонических солевых растворах. Трансмембранная разность осмотического давления, необходимая для достижения 50 % гемолиза в суспензии эритроцитов ($\Delta\pi_{50\%}$), уменьшается с $3,10 \pm 0,01$ до $2,52 \pm 0,02$ ат (или $314,1 \pm 1,0$ до $255,3 \pm 2,0$ кПа) при 50 мкМ пероксинитрита (5 мМ натрий-фосфатный буфер, $n=3$, $p < 0,001$). Наблюдается также уменьшение крутизны концентрационной кривой гемолиза для эритроцитов после их обработки пероксинитритом, что свидетельствует о замедлении кооперативных процессов, участвующих в трансформации системы «нативный эритроцит → гемолизованный эритроцит». Механизмами уменьшения пероксинитритом кооперативности гемолиза могут быть: (1) уменьшение числа нативных АQR вследствие окислительного модифицирования структуры белка пероксинитритом, (2) замедление диффузии АQR вследствие увеличения вязкости липидного бислоя или числа межмолекулярных сшивок в мембране и цитоскелете эритроцитов.

В результате реорганизации структуры мембраны, а также возникновения ионного дисбаланса, вызванных действием пероксинитрита, происходит уменьшение объема клеток. Например, пероксинитрит в концентрации 300 мкМ – 1 мМ вызывает уменьшение объема эритроцитов примерно на 10-15 %, что способствует трансформации сфероцитов в суспензии эритроцитов в клетки, подобные дискоцитам-нормоцитам. В случае тимоцитов пероксинитрит в концентрации 100-300 мкМ вызывает уменьшение их объема почти в 2 раза.

Пероксинитрит-зависимые процессы функционирования клеток в норме

Пероксинитрит-индуцированный синтез АФК/АФА в клетках. С помощью методов хемилюминесценции (люминол-, люцигенин-зависимой и спонтанной) и люминесценции (с использованием флуоресцентного красителя) выявлено, что пероксинитрит инициирует зависимый от его концентрации многостадийный синтез АФК/АФА нейтрофилами в нейтральных и щелочных средах (рисунок 6).

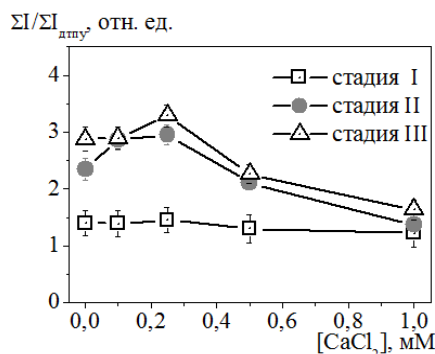


На рисунке представлены зависимости скорости синтеза АФК/АФА от времени

Рисунок 6. – Схема пероксинитрит-индуцированного синтеза АФК/АФА нейтрофилами (по данным хемилюминесцентного анализа)

В области концентраций пероксинитрита (1-200 мкМ) выделены две основные стадии синтеза АФК/АФА пероксинитрит-активированными клетками: стадия быстрого синтеза (большая скорость синтеза), реализующаяся в течение 2-3 мин, и следующая за ней (от 2-3 до 20-40 мин) стадия медленного синтеза (малая скорость синтеза). На основе результатов анализа данных хемилюминесценции с использованием ингибиторов различных систем синтеза АФК/АФА в клетках и сред с различным значением pH показано, что на стадии быстрого синтеза, в основном, происходит активация NADPH-оксидазы, NO-синтазы, циклооксигеназы и липооксигеназы нейтрофилов. Основными синтезируемыми формами АФК/АФА в этот промежуток времени являются: супероксидный анион-радикал, монооксид азота и продукт их взаимодействия – пероксинитрит. На стадии медленного синтеза пероксинитрит-активированные нейтрофилы синтезируют, в основном, АФК/АФА при участии миелопероксидазы с её активацией пероксидом водорода, нитрит-ионами и/или пероксинитритом. Выявлено, что анальгезирующие лекарственные препараты (метамизол натрия и диклофенак) непосредственно взаимодействуют с пероксинитритом (уменьшая концентрацию пероксинитрита) или с АФК/АФА, что приводит к значительному снижению концентрации АФК/АФА, синтезируемых нейтрофилами в ответ на действие пероксинитрита. Установлено также уча-

стие в механизмах пероксинитрит-индуцированного синтеза АФК/АФА нейтрофилами Ca^{2+} -зависимых K^+ -каналов и $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -котранспортеров и стимулирующее действие на синтез окисляющего SH-группы, но не проникающего внутрь клетки, агента рСМВ.



Интегральная интенсивность свечения суспензии клеток без (ΣI) и в присутствии ($\Sigma I_{\text{дтпу}}$) диэтилтриаминопентауксусной кислоты (500 мкМ) рассчитана для временных промежутков 0-1 мин (1), 1-2 мин (2), 2-6 мин (3). 900 тысяч клеток на мл (рН 7,4), 45 нМ люминола, 160 мкМ пероксинитрита

Рисунок 7. – Влияние катионов кальция на интегральную интенсивность люминол-зависимой хемилюминесценции пероксинитрит-активированных нейтрофилов

Установлены основные закономерности влияния катионов металлов на пероксинитрит-индуцированный синтез АФК/АФА нейтрофилами. Показано, что катионы Mn^{2+} (100 мкМ) могут рассматриваться как эффективные деактиваторы пероксинитрита или активных интермедиатов его реакций с другими молекулами в клеточных системах, что приводит к подавлению развития респираторного взрыва в нейтрофилах при активации клеток пероксинитритом. Катионы металлов (Mg^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} и Zn^{2+} в концентрации 100 мкМ) по степени влияния на пероксинитрит-индуцированный синтез АФК/АФА нейтрофилами располагаются в ряд: Mg^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} (для стадий быстрого синтеза АФК/АФА – увеличение, а для стадии медленного синтеза – уменьшение). Установлено, что при уменьшении концентрации катионов Ca^{2+} ниже 1 мМ имеет место увеличение пероксинитрит-индуцированного производства АФК/АФА клетками с максимальным эффектом при концентрации около 250 мкМ (рисунок 7). С учетом полученных другими исследователями данных об аналогичных эффектах для ионов Mg^{2+} и Zn^{2+} это открывает возможность для разработки методов регуляции катионами металлов пероксинитрит-индуцированного синтеза АФК/АФА нейтрофилами.

Обнаружено, что совместное действие на нейтрофилы соединений, являющихся лигандами их поверхностных рецепторов (FPR1 или FCGR),

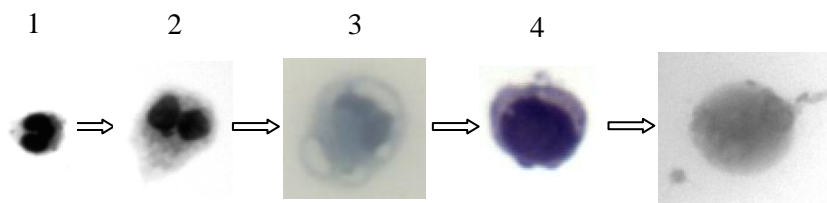
и пероксинитрита ведет к респираторному взрыву, во время которого скорость синтеза АФК/АФА многократно превосходит скорость синтеза АФК/АФА, индуцированного только одним из этих факторов. При этом нейтрофилы, в основном, остаются в активированном состоянии (в состоянии задержанного апоптоза), что способствует продолжению их участия в воспалительном процессе даже при большой концентрации пероксинитрита в среде.

Хемилюминесцентными и флуоресцентными методами выявлено, что эритроциты в ответ на действие пероксинитрита или реагентов $\text{NO}_2^-/\text{H}_2\text{O}_2$ в миллимолярных концентрациях в нейтральных средах синтезируют АФК, в основном, при участии гемоглобина в течение длительного промежутка времени (до 10-20 мин).

Определено, что производство АФК/АФА клетками крови в ответ на действие пероксинитрита на цельную кровь зависит от типа клеток, концентрации пероксинитрита и промежутка времени, прошедшего после начала реакции клеток с пероксинитритом. Максимальный выход АФК/АФА при стимуляции клеток пероксинитритом (1-200 мкМ) уменьшается в ряду клеток: нейтрофилы > лимфоциты > эритроциты. В случае малых концентраций пероксинитрита эритроциты являются «ловушками» пероксинитрита и других АФК/АФА.

Пероксинитрит-индуцированные пути гибели клеток. В работе установлено, что пероксинитрит может запускать различные программы гибели нейтрофилов: апоптоз, некроз и нетоз. Выявлено, что относительное содержание апоптотических клеток в суспензии нейтрофилов уменьшается при концентрациях пероксинитрита 1-100 мкМ. При этом происходит активация клеток. Показано, что пероксинитрит вызывает апоптоз нейтрофилов в концентрациях выше 100 мкМ и некроз при концентрациях 500 мкМ и выше. Установлено, что пероксинитрит может запускать нетоз – программу активной гибели нейтрофилов, в процессе которой они выбрасывают в окружающую среду обширную сеть из хроматина и цитозольных белков – нейтрофильные внеклеточные ловушки (НВЛ). На рисунке 8 представлена схема структурной трансформации пероксинитрит-активированных нейтрофилов, включающая четыре выделенных в работе подтипа структуры нейтрофилов и согласующаяся с классическими представлениями о нетозе [Brinkmann и Zychlinsky, 2007].

При контакте с поверхностью твердого тела пероксинитрит-активированные нейтрофилы распластаются по ней, их шарообразная форма превращается в куполообразную (подтип 1). Активированное состояние нейтрофила характеризуется наличием хорошо выраженных структур актинового цитоскелета или гранулированностью поверхности (подтипы 2 и 3). Разрыв ядерных мембран присущ состоянию нейтрофила перед выбросом НВЛ (подтип 4) и лизисом клетки.



Световая микроскопия, окраска по Романовскому, $\times 1000$.

1-4 – подтипы нейтрофилов

Рисунок 8. – Схема структурной трансформации активированных нейтрофилов по механизму нетоза

В работе выявлено, что пероксинитрит вызывает истощение эритроцитов по АТФ и увеличение активности катионных каналов, реорганизацию структуры цитоскелета и плазматической мембраны, а также уменьшение объема клеток и их кренирование. В опытах по обработке цельной крови человека пероксинитритом нами зафиксировано увеличение относительного количества эритроцитов с фосфатидилсеринем на внешней стороне плазматической мембраны (в 1,8 раз). Эти факты свидетельствуют, что пероксинитрит может вызывать эриптоз, механизмы которого включают нарушение водно-ионного гомеостаза, структуры мембраны и цитоскелета, объема и формы клеток.

Пероксинитрит-связанные патологические процессы в организме

Концентрация нитрит- и нитрат-ионов в плазме крови жителей Гомельской области при увеличении концентрации онкомаркеров и нарушениях кровообращения. Одним из методов оценки производства NO и его метаболитов, включая пероксинитрит, в тканях организма является измерение концентрации их конечных свободных метаболитов – нитрит-/нитрат-ионов (NO_x). В работе проведен анализ распределения концентрации NO_x в плазме крови на примере крови мужчин, проживающих в Добрушском районе Гомельской области, при различных концентрациях онкомаркеров: простат-специфического антигена (ПСА), ракового антигена 19-9 (СА 19-9), раково-эмбрионального антигена (РЭА) и альфа-фетопротеина (АФП). Исследования проведены с использованием образцов плазмы крови мужчин старше 40 лет, проходивших профилактическое медицинское обследование. Контрольными являлись образцы плазмы крови, в которых не выявлено превышения пороговой концентрации онкомаркеров (209 человек). Опытными являлись образцы плазмы крови (283 человека) с превышающей пороговую концентрацию одного или двух/трех из онкомаркеров (СА 19-9, ПСА, РЭА, АФП). Установлено присутствие в исследуемых выборках двух основных групп с отличающейся примерно в 2 раза концентрацией NO_x : группы с низким (группа 1) и группы с высоким (группа 2) значениями концентрации NO_x , что обусловлено двумя основными состояниями иммунной системы и эндотелия человека: состоянием относитель-

ного покоя и активным состоянием. В контрольной выборке группа с низким значением NO_x (группа 1) составила 90 % ($[\text{NO}_x]=22,7\pm 7,6$ мкМ), группа с высоким значением NO_x (группа 2) составила 10 % ($[\text{NO}_x]=45,2\pm 7,7$ мкМ). При превышении рекомендуемого значения концентрации одного из онкомаркеров (ПСА или РЭА) в крови этих мужчин доля группы 2 увеличилась до 40 %. При одновременном превышении концентрации двух и более онкомаркеров доля группы 2 возросла до 60-70 %. В работе также проанализирована концентрация NO_x в плазме крови пациентов (мужчин и женщин) с диагнозами «ишемическая болезнь сердца» (ИБС, 63 человека) и «преходящие нарушения мозгового кровообращения» (ПНМК, 51 человек), находившихся на стационарном лечении в учреждениях здравоохранения г. Гомеля. Установлено, что в случае ИБС и ПНМК доля группы пациентов с высокой концентрацией NO_x в плазме крови (группы 2) составляет 25-45 % и 35-40 % соответственно.

В ходе исследования установлено, что переход организма человека из состояния с низкой концентрацией NO_x в состояние с высокой концентрацией NO_x (переход из группы 1 в группу 2) сопровождается повышением уровня производства пероксинитрита, что подтверждает выявленная отрицательная нелинейная корреляция ($R^2=0,77$) между концентрацией NO_x и активностью СОД в плазме крови. Переход организма из состояния с низкой концентрацией NO_x в состояние с высокой концентрацией NO_x сопровождается изменениями в регуляции свертываемости крови и липидного обмена (изменяются концентрации липопротеинов высокой, низкой и очень низкой плотности, коэффициент атерогенности и активированное частичное тромбопластиновое время) и, соответственно, влияет на риск развития атеросклероза. При этом не выявлено связи состояния организма с высокой концентрацией NO_x в плазме крови и приемом в терапевтических дозах нитрат-содержащих лекарственных препаратов, хотя их прием изменяет риск развития атеросклероза для людей с высокой концентрацией NO_x в плазме крови (в группе 2). Проведенный анализ динамики концентрации NO_x , маркеров воспаления (интерлейкинов: ИЛ-6 и ИЛ-8, С-реактивного белка) и активности СОД в плазме крови пациентов с ПНМК показал его эффективность в уточнении диагноза и прогноза заболевания. При снижении активности СОД в плазме крови после острого нарушения мозгового кровообращения, вызванного ишемией ткани мозга, организм в течение 10 суток переходит, как правило, в состояние с повышенной концентрацией NO_x и маркеров воспаления (ИЛ-6 и С-реактивного белка), что существенно увеличивает риск развития инфаркта мозга.

Структурные и физико-механические свойства опухолевых клеток. С помощью АСМ-методов проведена комплексная оценка структурных и физико-механических свойств поверхностного слоя раковых клеток (эпителиальных клеток карциномы лёгкого А549 и карциномы гортани НЕр-2с), первичных фибробластов кожи и мезенхимальных ство-

ловых клеток жировой ткани человека. По данным литературы клетки линии A549 характеризуются высокой степенью нитрования актина, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и альдолазы А даже в отсутствие стимулирующего клетки фактора, а клетки HEp-2c – нарушением механизмов регулирования динамики цитоскелета [Aulak, 2004; Pfindt, 2011]. Полученные методами АСМ значения микромеханических параметров (E , F_a , $F_{тр}$ и D_F карт латеральных сил) поверхностного слоя и морфологические черты клеток исследованных клеток указывают на существенное различие в структурном состоянии их кортикального цитоскелета. В интервале температур испытаний 20-40 °С значения вышеуказанных микромеханических параметров у раковых клеток ниже, чем у фибробластов и мезенхимальных стволовых клеток.

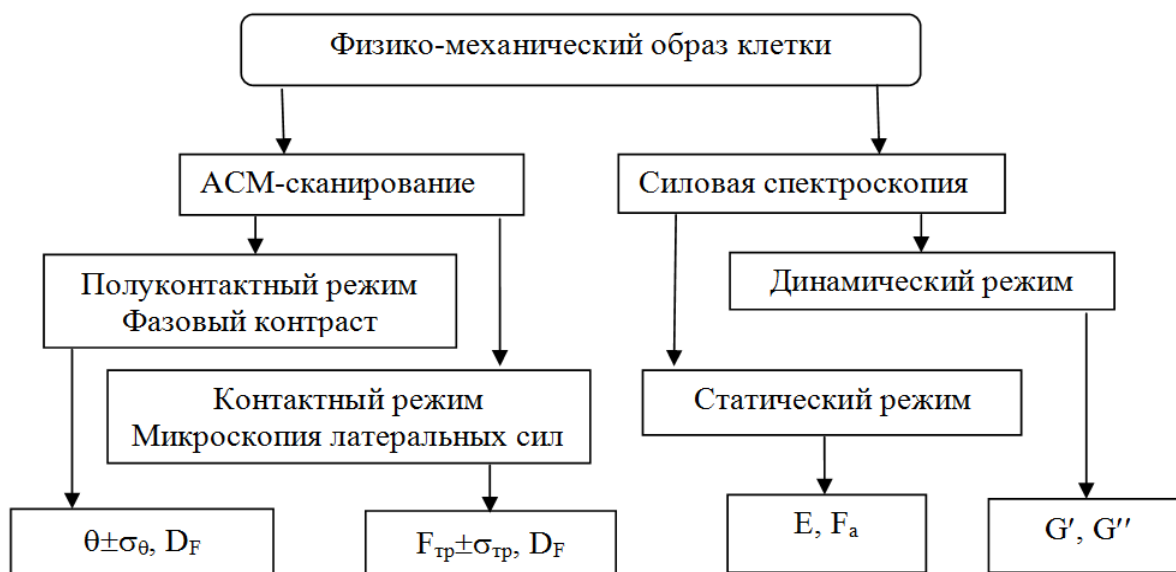
Структурные и физико-механические свойства эритроцитов пациентов с сахарным диабетом второго типа и при старении эритроцитов *in vitro*. Пероксинитрит – один из основных участников развития осложнений сахарного диабета, в том числе и ангиопатий. В работе с помощью АСМ-методов изучены морфология, структура цитоскелета и локальные физико-механические свойства эритроцитов пациентов с диагнозом «сахарный диабет второго типа» (15 человек, средний возраст $58,3 \pm 7,4$ лет) и здоровых доноров без диагноза «сахарный диабет второго типа»: добровольцев старше 50 лет (6 человек, средний возраст $61,0 \pm 6,6$ лет) и добровольцев младше 25 лет (3 человека). Экспериментально выявлено, что для пациентов с сахарным диабетом в сравнении со здоровыми донорами характерны: пойкилоцитоз и анизоцитоз эритроцитов, пространственная реорганизация их цитоскелета в виде разрежения и сгущения актин-спектриновой сети и значимые изменения их локальных физико-механических свойств. Полученные результаты указывают также на значительную неоднородность популяции эритроцитов у этих пациентов, наличие в ней старых, молодых и незрелых форм клеток, что может способствовать развитию осложнений сахарного диабета, например, ангиопатии.

Пероксинитрит как наиболее активный NO метаболит играет важную роль в изменении свойств эритроцитов при их старении *in vitro*. В работе проанализированы изменения морфологии, АСМ-параметров и устойчивости эритроцитов к осмотическому стрессу при хранении концентрированной эритроцитарной суспензии в течение 7 недель при 4 °С. В течение уже первых 3 недель хранения выявлены значительные изменения структуры цитоскелета эритроцитов, сопровождающиеся изменением морфологии клеток и предшествующие существенным изменениям их осмотической резистентности. Характер изменений физико-механических свойств эритроцитов при их старении *in vitro* подобен характеру изменений этих свойств, имеющему место при обработке эритроцитарной суспензии пероксинитритом.

АСМ-методология анализа структурных и физико-механических свойств поверхностного слоя клеток и диагностики клеточной патологии

Пероксинитрит изменяет многие свойства клеток, включая их структурные и физико-механические свойства. Современным методом исследования этих свойств как для поверхности клеток в целом, так и для её участков на микро- и наноуровнях является АСМ. Выпуск атомно-силовых микроскопов освоен в Республике Беларусь. Совершенствование и адаптация АСМ-методик к условиям исследования структурных и физико-механических свойств клеток и тканей – актуальная для биофизики проблема. Полученные нами при АСМ-исследовании клеток, включая пероксинитрит-модифицированные, результаты с учетом результатов других исследователей позволяют создать новое в диагностике клеточной патологии и, соответственно, в медицинской диагностике направление на основе концепции физико-механического образа поверхности клеток (рисунок 9).

Поверхностный слой клетки, свойства которого можно исследовать с помощью АСМ-методов, является слоистым композитным материалом, состоящим в клетках крови из трех основных слоев: гликокаликса, плазматической мембраны и кортикальной части цитоскелета. В работе обоснована возможность характеристики физико-механических свойств поверхностного слоя клеток с использованием параметров сил трения, средние значения которых ($F_{тр}$) на микромасштабных участках поверхности клетки рассчитываются как полуразность средних значений латеральных сил, возникающих при взаимодействии острия АСМ-зонда и клеточной поверхности при прямом и обратном сканировании исследуемых участков. На основе полученных экспериментальных данных для контрольных клеток, а также для клеток, структура которых модифицирована химическими агентами (пероксинитрит, глутаровый альдегид и др.) или нагревом, в том числе до температуры денатурации белков, установлено, что структурно-релаксационный переход в области температур 40-60 °С, фиксируемый по температурным зависимостям $F_{тр}$ (температура T_g , рисунок 3), является физическим переходом в кортикальном цитоскелете, соответствующим процессу денатурации его белков. Сравнительный анализ АСМ-данных для клеток и синтетических высокомолекулярных линейных и сетчатых аморфных веществ (например, поливинилбутираля) показал, что структурно-релаксационное состояние, определяющее характер механического поведения поверхностного слоя клеток, при физиологических температурах подобно состоянию синтетических высокомолекулярных веществ ниже их температуры структурного стеклования («мягкое стекло»). При этом область «расстекловывания» биополимеров (белков цитоскелета) соответствует области их тепловой денатурации.



θ – разность фаз колебаний зонда в полуконтактном режиме сканирования, $F_{тр}$ – сила трения между острием АСМ-зонда и образцом в контактном режиме сканирования, E – модуль упругости (модуль Юнга), F_a – сила адгезии, G' – динамический модуль упругости при сдвиге, G'' – динамический модуль потерь при сдвиге, D_F – фрактальная размерность

Рисунок 9. – Схема создания физико-механического образа поверхности клетки с помощью АСМ-методов

Показано, что получаемые с помощью АСМ характеристики поверхностного слоя частично дегидратированных клеток (в мазке), несут информацию о структурном состоянии их кортикального цитоскелета до их дегидратации (в живой клетке), что позволяет, изучая изменения этих параметров, выявлять протекание деструктивных процессов в структуре цитоскелета, активацию сборки его структур или образование между элементами структуры цитоскелета дополнительных связей. В работе введены и использованы АСМ-параметры: отношение диаметра к высоте (D/h) для целых клеток при изучении процесса их адгезии к твердой поверхности и для структурных элементов поверхности при изучении процесса пероксинитрит-индуцированного экзоцитоза; фрактальная размерность (D_F) карт латеральных сил для оценки распределения структурных и физико-механических свойств поверхности клетки и её поверхностного слоя в норме и при патологии.

Определен набор получаемых в контактном режиме АСМ характеристик клеток ($F_{тр}$, $\sigma_{тр}$, T_g , D_F , E , F_a) для установления патологических изменений в клетках (например, в эритроцитах при заболеваниях верхних дыхательных путей, циррозе печени, сахарном диабете второго типа и их старении *in vitro*), включая пероксинитрит-индуцированные изменения структурных и физико-механических свойств поверхностного слоя клеток и различия этих свойств у раковых и нераковых клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Выявлены закономерности и механизмы процессов синтеза АФК/АФА клетками крови, модифицированными пероксинитритом и другими низкомолекулярными нитрующими пероксисоединениями (NO/O_2^- и $\text{NO}_2^-/\text{H}_2\text{O}_2$ с участием гемсодержащих белков). Показано, что пероксинитрит активирует многостадийный синтез АФК/АФА нейтрофилами в течение длительного времени внутри и снаружи клеток, связанный с активацией участвующих в синтезе АФК/АФА ферментов: кратковременное (до 2-3 мин) увеличение концентрации АФК/АФА обусловлено активацией NADPH-оксидазы, NO-синтазы, циклооксигеназы и липооксигеназы; длительное (до 20-40 мин) увеличение концентрации АФК/АФА связано с активацией миелопероксидазы. Качественный и количественный состав синтезируемых нейтрофилами АФК/АФА в ответ на действие пероксинитрита зависит от концентрации пероксинитрита (0,5 мкМ – 1,2 мМ), состава среды (рН среды; концентрации катионов металлов, таких как Mn^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} ; ингибиторов систем транспорта ионов) и присутствия соединений, избирательно ингибирующих синтезирующие АФК/АФА ферменты или перехватывающих АФК/АФА. Выявлено, что катионы Mn^{2+} , метамизол и диклофенак натрия непосредственно взаимодействуют с пероксинитритом или с АФК/АФА, синтезируемыми в клетках, что приводит к значительному снижению концентрации АФК/АФА, синтезируемых нейтрофилами в ответ на действие пероксинитрита. Выявлен эффект взаимного усиления синтеза АФК/АФА нейтрофилами при их взаимодействии с пероксинитритом и лигандами (хемотаксический агент – фМЛФ и латексные частицы) к их поверхностным рецепторам (FPR1 и FCGR). Установлено, что эритроциты синтезируют АФК/АФА в значительных количествах в реакциях гемоглобина с пероксинитритом или реагентами $\text{NO}_2^-/\text{H}_2\text{O}_2$ в течение длительного промежутка времени (до 10-20 мин). Установлено различие типов клеток крови (нейтрофилы, лимфоциты, эритроциты) по их способности к пероксинитрит-индуцируемому синтезу АФК/АФА. При миллимолярных концентрациях пероксинитрита основными клетками крови, производящими АФК/АФА, являются эритроциты [1, 2, 5, 32-34, 47, 53, 57, 64, 70, 71, 74-76, 79, 80, 86, 99, 100].

2. Определены закономерности изменения структуры поверхностного слоя, включая особенности его отклика на локальные механические воздействия, и морфологии клеток, модифицированных пероксинитритом. Показано, что пероксинитрит влияет на степень структурной неоднородности мембраны и подмембранного цитоскелета. С изменением

концентрации пероксинитрита изменяется фрактальная размерность карт распределения значений физико-механических свойств (карт латеральных сил) участков клеточной поверхности, а также параметры структурно-релаксационного перехода в поверхностном слое клеток (стеклования/расстекловывания биомолекул – денатурации белков). В эритроцитах пероксинитрит (250 мкМ – 1 мМ) вызывает увеличение степени неоднородности структуры их поверхностного слоя, уширение температурной области и сдвиг в область более низких температур начала этого структурно-релаксационного перехода. При концентрациях пероксинитрита (300 мкМ – 2,5 мМ) основным морфологическим признаком изменения формы эритроцитов является кренирование. В лейкоцитах (нейтрофилах и лимфоцитах/тимоцитах) пероксинитрит влияет на структуру и динамику актиновых элементов цитоскелета, определяющих адгезию и миграцию клеток, экзоцитоз и фагоцитоз. Пероксинитрит в концентрациях ниже 100 мкМ инициирует сборку актиновых цитоскелетных структур (ламеллоподий и филоподий), а выше 100 мкМ способствует их дезорганизации. Пероксинитрит в концентрациях от 1 до 200-250 мкМ инициирует, а в области больших концентраций (выше 250-300 мкМ) подавляет экзоцитоз внутриклеточных гранул нейтрофилов. Иницированный пероксинитритом экзоцитоз является многоэтапным процессом: сначала с плазматической мембраной взаимодействуют мелкие гранулы нейтрофилов (секреторные пузырьки, специфические и желатиназные гранулы), а затем – более крупные (азурофильные) гранулы. Пероксинитрит способствует фагоцитозу нейтрофилами мелких частиц (например, латексных частиц) и адгезии клеток (нейтрофилов и тимоцитов) к поверхности твердого тела (например, к стеклянным пластинам) с максимальным эффектом при 100 мкМ. В концентрациях ниже 100 мкМ пероксинитрит уменьшает, а выше 100 мкМ увеличивает степень неоднородности структуры поверхностного слоя тимоцитов [1-3, 7-12, 15, 20-22, 24, 25, 27, 28, 36, 39, 42, 46-56, 58-60, 83-87, 101, 102].

3. Выявлены пути и закономерности изменения водно-ионного гомеостаза клеток, модифицированных пероксинитритом. Показано, что пероксинитрит влияет на транспорт ионов (катионов натрия и калия, сульфат-аниона) и молекул воды через клеточные мембраны. Пероксинитрит в зависимости от концентрации и типа молекулярной системы пассивного транспорта ионов или молекул активирует или ингибирует транспортные системы клеток. В эритроцитах в концентрациях 1-200 мкМ пероксинитрит увеличивает поток пассивного транспорта катионов калия и натрия через мембраны в обоих направлениях (внутри клетки и наружу) и активирует работу K^+/Cl^- -котранспортера (KCC1), а при больших концентрациях замедляет транспорт катионов через KCC1, анионов через анионный обменник (AE1) и молекул воды через аквапорины, но

увеличивает Cl^- -независимый поток катионов калия через каналы и дефекты мембраны и суммарный поток воды из эритроцитов. Пероксинитрит-индуцированный Cl^- -независимый поток катионов калия через мембраны эритроцитов уменьшается при наличии в среде катионов цинка и ингибитора АТФ-зависимых K^+ -каналов (толбутамида) [1, 6, 14, 15, 18, 35, 37, 38, 40, 43, 76-78, 81, 82, 84].

4. Определены закономерности изменения физико-механических и физико-химических свойств клеток, модифицированных пероксинитритом. Установлено, что пероксинитрит изменяет не только значения, но и характер зависимости физико-механических свойств клеток от температуры испытаний и осмотического давления. Пероксинитрит в концентрациях 10-100 мкМ вызывает увеличение вязкости крови, обусловленное изменением физико-механических свойств лейкоцитов при их активации, а в концентрациях выше 1 мМ – обусловленное изменением физико-механических свойств эритроцитов. Пероксинитрит уменьшает устойчивость эритроцитов к изменению температуры и к изменению осмотического давления. Пероксинитрит и реагенты $\text{NO}_2^-/\text{H}_2\text{O}_2$ уменьшают осмотическую устойчивость эритроцитов (структурную устойчивость эритроцитарной системы в гипотонических солевых растворах): уменьшают критическое значение трансмембранной разности осмотического давления (соответствующее значению для 50 % гемолиза), при которой происходит существенное увеличение проницаемости клеточных мембран для ионов и молекул воды, и расширяют область трансмембранной разности осмотического давления для переходного состояния эритроцитарной системы. Пероксинитрит изменяет степень неоднородности карт локальных физико-механических параметров поверхности клетки на нано- и микроуровнях. Для эритроцитов пероксинитрит (250 мкМ – 1 мМ) увеличивает силы трения (между острием АСМ-зонда и поверхностью клеток) и степень неоднородности их распределения на участках поверхности клеток. Для тимоцитов после обработки клеток пероксинитритом в малых концентрациях (например, 30 мкМ) силы трения и степень неоднородности их распределения уменьшаются, а в больших концентрациях (например, 300 мкМ) они практически не зависят от температуры, а их распределение становится существенно неоднородным. В эритроцитах пероксинитрит в концентрациях 1-500 мкМ вызывает деполяризацию мембран, при 500 мкМ – 1 мМ – их гиперполяризацию. С увеличением концентрации пероксинитрита мембранный потенциал эритроцитов увеличивается в областях 1-250 мкМ и 1-2 мМ и уменьшается в области 250 мкМ – 1 мМ. Пероксинитрит в концентрациях 10-60 мкМ приводит к существенному закислению цитозоля эритроцитов ($\Delta\text{pH}=0,2-1,0$), а в концентрациях выше 250-300 мкМ вызывает значительное рН-зависимое истощение эритроцитов по АТФ и практически полное окисление внутриклеточного гемоглобина [1, 3, 4, 6, 7, 9-11, 14, 15, 23, 28, 41, 59, 60, 72-79, 89].

5. Выявлены пероксинитрит-индуцированные пути гибели клеток. Установлено, что пероксинитрит в зависимости от концентрации и типа клеток запускает различные программы их гибели. В нейтрофилах пероксинитрит запускает апоптоз, некроз и характерную для нейтрофилов программу гибели – нетоз (в концентрациях, стимулирующих респираторный взрыв, 1-200 мкМ). В эритроцитах пероксинитрит запускает эриптоз, механизмы которого включают нарушение ионного и водного гомеостаза клетки, структуры мембраны и цитоскелета, объема и формы эритроцитов [1, 2, 15, 21, 47, 86].

6. Экспериментально подтверждено, что организм человека может находиться в двух состояниях, существенно различающихся (почти в два раза) скоростью синтеза NO (оцениваемого по концентрации нитрит- и нитрат-ионов в плазме крови) и соответствующих состоянию относительного покоя и активированного состояния клеток иммунной системы и эндотелия. Активированное состояние клеток иммунной системы и эндотелия характеризуется высоким уровнем производства пероксинитрита, о чём свидетельствует большая концентрация нитрит- и нитрат-ионов и низкий уровень активности фермента СОД в плазме крови. При изучении выборок жителей Гомельской области (мужчин и женщин) установлено, что вероятность нахождения клеток иммунной системы и эндотелия человека в активированном состоянии в сравнении с контрольной популяцией (10 %) увеличивается при ишемической болезни сердца (до 25-45 %), преходящих нарушениях мозгового кровообращения (до 35-40 %) и с увеличением в плазме крови концентрации онкомаркеров: одного онкомаркера (ПСА или РЭА) до 40 % и двух онкомаркеров (ПСА, РЭА, СА-19-9, АФП) до 60-70 %. Переход клеток иммунной системы и эндотелия человека в активированное состояние сопровождается изменениями в регуляции свертываемости крови и липидного обмена и изменениями в метаболизме ПСА. Совместное определение концентрации нитрит- и нитрат-ионов и маркеров воспаления в плазме крови пациентов с преходящими нарушениями мозгового кровообращения позволяет улучшить диагностику и прогноз заболевания [29, 31, 63, 67, 93, 103].

7. Выявлены изменения структурных и физико-механических свойств клеток при пероксинитрит-связанных патологиях организма (например, при онкологической патологии, сахарном диабете второго типа и старении). Установлено различие физико-механических свойств раковых эпителиальных клеток линий А549 и Нер-2с, мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани и первичных фибробластов кожи человека. Раковые и нераковые клетки различаются средними локальными модулями упругости, силами адгезии, силами трения и значениями фрактальной размерности карт латеральных сил. Для пациентов с сахарным диабетом второго типа характерен полиморфизм эритроцитов (пойкилоцитоз и анизоцитоз) и

существенная неоднородность карт физико-механических свойств поверхностного слоя эритроцитов (например, латеральных сил и модуля упругости). При хранении эритроцитарной массы (старении клеток *in vitro*) уже в течение трех недель наблюдаются существенные изменения параметров структурных и физико-механических свойств поверхностного слоя клеток, предшествующих изменениям их устойчивости к осмотическому стрессу [1, 3, 16, 26, 30, 44, 62, 65, 66, 68, 69, 92].

8. На основе результатов АСМ-анализа описаны структуры и определены количественные параметры пероксинитрит-кренированных форм эритроцитов, а также форм нейтрофилов незадолго до их гибели путем нетоза. Предложена структурная классификация (четыре основных подтипа) и схема структурной трансформации активированных пероксинитритом нейтрофилов при их взаимодействии с поверхностью; определены классификационные АСМ-параметры, характеризующие форму, структуру и степень активации нейтрофилов (отношение диаметра адгезированной клетки к её высоте; средние размеры и распределение гранул нейтрофилов на поверхности клеток, фрактальная размерность карт латеральных сил). Показана возможность использования методов подготовки клеток, включающих высушивание без и с предварительной химической фиксацией клеточных структур, для изучения их геометрических и физико-механических свойств с помощью АСМ. Экспериментально показано, что при АСМ-исследованиях клеток в широком интервале температур основное влияние на значения АСМ-параметров и на их температурные изменения оказывают свойства поверхностного слоя клетки, обусловленные структурно-релаксационным состоянием входящих в его состав биополимеров (в основном, белков кортикального цитоскелета). Полученные температурные зависимости физико-механических свойств поверхности клеток обосновывают гипотезу о том, что структурно-релаксационное состояние, определяющее характер механического поведения поверхностного слоя клетки, при физиологических температурах подобно состоянию синтетических высокомолекулярных аморфных веществ, находящихся ниже их температуры структурного стеклования [1, 2, 3, 8, 15, 19, 20, 23, 25, 28, 39, 42, 45-47, 54, 55, 58-62, 83-91, 101].

9. Разработаны новые биофизические методы исследования: АСМ-методика исследования структуры подмембранного цитоскелета эритроцитов, позволяющая визуализировать и количественно оценить эту структуру с помощью фрактальной размерности карт латеральных сил (сил трения – боковых отклонений зонда-индентора атомно-силового микроскопа в процессе сканирования поверхности в контактном режиме) [94]; АСМ-методика оценки температур релаксационных переходов вещества, включая полимеры в составе поверхностного слоя клеток, с помощью термокарт латеральных сил [96]; способы подготовки нано- и микрораз-

мерных частиц для их исследования с помощью силовой спектроскопии [95]; способ определения патологии клеток, основанный на сравнительном анализе температурных зависимостей параметров латеральных сил, получаемых при прямом и обратном направлениях АСМ-сканирования тестируемых и эталонных (контрольных) клеток [97]. Разработаны теоретико-экспериментальные основы нового направления клеточной диагностики патологий организма с использованием физико-механического образа поверхности клетки, определяемого набором АСМ-параметров (геометрических, упругих, адгезионных, фрикционных и др.) [11, 13, 17, 26, 28, 30, 62, 97, 98].

Рекомендации по практическому использованию результатов

Полученные научные результаты могут быть использованы для дальнейшего развития механики, физики, химии и физиологии клеток, уточнения роли АФК/АФА в функционировании живых организмов; для разработки новых мультифункциональных моделей АСМ-приборов для диагностики патологий организма на клеточном уровне; в учебном процессе вузов медико-биологического профиля.

Результаты работы являются теоретической базой для разработки новых методов терапии, основанных на регулировании активности клеток иммунной системы человека пероксинитритом, являющимся одновременно и продуктом, синтезируемым активированными клетками, и регулирующим их свойства фактором. Показано, что качественный и количественный состав синтезируемых пероксинитрит-активированными нейтрофилами АФК/АФА, как динамическая характеристика популяции клеток, может быть целенаправленно изменен с помощью применения агентов, деактивирующих пероксинитрит, превращающих его в неактивные по отношению к биомолекулам соединения, а также ингибирующих активность АФК/АФА синтезирующих ферментов или ионов металлов.

Предложен и обоснован новый подход к улучшению прогностической значимости диагностики ряда заболеваний (онкологической патологии и ишемической патологии сердца и мозга), основанный на совместном анализе содержания нитрит-/нитрат-ионов (как конечных метаболитов NO и пероксинитрита) и других биохимических маркеров патологического процесса (онкомаркеров или маркеров воспаления) в плазме крови человека [103].

Предложен новый метод диагностики заболеваний организма на клеточном уровне и повышения эффективности терапевтических мероприятий, основанный на концепции полученного методами АСМ физико-механического образа клеточной поверхности, включающего набор её физико-механических характеристик ($F_{тр}$, $\sigma_{тр}$, T_g , D_F , E , F_a) [94-97].

Результаты исследования будут способствовать более широкому освоению в научных лабораториях и клиниках АСМ – нового перспективного метода анализа свойств клеток и тканей на микро- и наномасштабном уровнях, расширению производства приборов этого класса. Разработано «Руководство по использованию атомно-силовой микроскопии в медико-биологических исследованиях» как приложение к руководству пользователя для выпускаемого ОДО «Микротестмашины» (Беларусь) атомно-силового микроскопа НТ-206, которое внедрено в научных лабораториях Гродненского филиала «Научно-исследовательский центр проблем ресурсосбережения» ГНУ «Институт тепло- и массообмена имени А. В. Лыкова НАН Беларуси» и УО «Гомельский государственный медицинский университет». Результаты исследований включены в материалы учебных курсов «Медицинская и биологическая физика» и «Биологическая химия» УО «Гомельский государственный медицинский университет» и «Белорусский государственный медицинский университет». Получено 4 патента Республики Беларусь на изобретения и 10 актов о внедрении результатов. Министерством здравоохранения Республики Беларусь утверждена инструкция по применению № 153-1115 «Метод оценки риска инфаркта мозга» (2015 г.).

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ

Монография

1. Стародубцева, М. Н. Пероксинитрит в патологии и физиологии клеток крови / М.Н. Стародубцева. – М. : Книжный дом «ЛИБРОКОМ», 2011. – 200 с.

Главы в коллективных монографиях

2. Effects of peroxynitrite on morphology and functions of neutrophils // Handbook of free radicals: formation, types and effects / M. N. Starodubtseva, A. I. Kavalenka, D. R. Petrenyov, S. N. Cherenkevich ; ed. : D. Kozyrev, V. Slutsky. – Hauppauge, New York : Nova Science Publishers Inc, 2010. – P. 478-503.

3. Study of the mechanical properties of single cells as biocomposites by atomic force microscopy // Microscopy: science, technology, applications and education : in 3 vol. / M. Starodubseva, S. Chizhik, N. Yegorenkov, I. Nikitina, E. Drozd ; ed. : A. O. Mendez-Vilas, J. Diaz. – Badajoz, Spain : Formatex Research Center, 2010. – Vol. 1. – P. 740-747.

Статьи в рецензируемых научных журналах

4. Стародубцева, М. Н. Повреждения эритроцитов, инициированные взаимодействием нитрит-ионов с гемоглобином / М. Н. Стародубцева, В. А. Игнатенко, С. Н. Черенкевич // Биофизика. – 1999. – Т. 44, № 6. – С. 1068-1072.

5. Стародубцева, М. Н. Механизмы реакций гемоглобина с пероксинитритом в водно-солевом растворе / М. Н. Стародубцева, С. Н. Черенкевич // Весці Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед.-біял. навук. – 2003. – № 2. – С. 86-89.

6. Стародубцева, М. Н. Структурная устойчивость эритроцитов к осмотическому шоку при окислительном стрессе / М. Н. Стародубцева, С. Н. Черенкевич, Т. Н. Божок // Доклады НАН Беларуси. – 2006. – Т. 50, № 1. – С. 62-65.

7. Стародубцева, М. Н. Пероксинитрит-индуцированные структурные перестройки в эритроцитарных мембранах / М. Н. Стародубцева, Т. Г. Кузнецова, Т. А. Кузнецова // Весці Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2006. – № 3. – С. 90-93.

8. Кузнецова, Т. Г. Трансформация эритроцитов при действии активных форм азота / Т. Г. Кузнецова, М. Н. Стародубцева, С. А. Чижик // Морфол. ведомости. – 2006. – № 3-4. – С. 33-35.

9. Стародубцева, М. Н. Механические свойства эритроцитарных мембран при действии пероксинитрита / М. Н. Стародубцева, Т. Г. Кузнецова, С. Н. Черенкевич // Бюл. exper. биол. и мед. – 2007. – Т. 143, № 2. – С. 227-230.

10. Atomic force microscopic observation of peroxynitrite-induced erythrocyte cytoskeleton reorganization / M. N. Starodubtseva, T. G. Kuznetsova, S. A. Chizhik, N. I. Yegorenkov // *Micron*. – 2007. – Vol. 38, № 8. – P. 782-786.

11. Atomic force microscopy probing of cell elasticity // T. G. Kuznetsova, M. N. Starodubtseva, N. I. Yegorenkov, S. A. Chizhik, R. I. Zhdanov // *Micron*. – 2007. – Vol. 38, № 8. – P. 824-833.

12. 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. – № 3. – С. 111-116.

13. Кузнецова, Т. Г. Методологические проблемы изучения наномеханических свойств живых клеток / Т. Г. Кузнецова, М. Н. Стародубцева, Н. И. Егоренков // *Проблемы здоровья и экологии*. – 2007. – № 3. – С. 103-111.

14. Стародубцева, М. Н. K^+ - Cl^- котранспорт через мембраны модифицированных пероксинитритом эритроцитов / М. Н. Стародубцева, Дж. К. Эллори, Н. И. Егоренков // *Вестн. Гродзен. дзярж. ун-та імя Я. Купалы*. Сер. 2. – 2007. – № 1. – С. 91-96.

15. Structural and functional changes in membrane and membrane skeleton of red blood cells induced by peroxynitrite / M. N. Starodubtseva, A. L. Tattersall, T. G. Kuznetsova, N. I. Yegorenkov, J. C. Ellory // *Bioelectrochemistry*. – 2008. – Vol. 73. – P. 155-162.

16. Структурно-механические свойства мембран эритроцитов у больных сахарным диабетом 2-ого типа / М. Н. Стародубцева, Т. Г. Кузнецова, Н. И. Егоренков, С. Н. Черенкевич // *Бюл. exper. биол. мед.* – 2008. – Т. 145, № 1. – С. 106-110.

17. Кузнецова, Т. Г. АСМ-эластография – новый метод биомедицинских исследований / Т. Г. Кузнецова, М. Н. Стародубцева // *Проблемы здоровья и экологии*. – 2008. – № 1. – С. 146-153.

18. Стародубцева, М. Н. Механизмы регулирования структурно-функциональных свойств аквапоринов / М. Н. Стародубцева, С. Н. Черенкевич // *Изв. Гом. гос. ун-та им. Ф. Скорины*. Сер. биол. наук. – 2008. – №4. – С. 163-169.

19. Стародубцева, М. Н. Способы подготовки эритроцитов для исследования методами атомно-силовой микроскопии / М. Н. Стародубцева, Т. Г. Кузнецова, Н. И. Егоренков // *Вестн. Фонда фундам. исследований*. – 2008. – № 3. – С. 42-51.

20. Стародубцева, М. Н. Структурная динамика активированных пероксинитритом нейтрофилов / М. Н. Стародубцева, Е. И. Коваленко, С. Н. Черенкевич // *Доклады НАН Беларуси*. – 2009. – Т. 53, № 1. – С. 85-89.

21. Стародубцева, М. Н. Индуцированный пероксинитритом апоптоз эритроцитов / М. Н. Стародубцева // *Проблемы здоровья и экологии*. – 2009. – № 1. – С. 117-122.

22. Никитина, И. А. Пероксинитрит-индуцированные изменения формы и структуры поверхности тимоцитов / И. А. Никитина, М. Н. Стародубцева, А. И. Грицук // Журнал ГрГМУ. – 2009. – № 2. – С. 142-144.

23. Стародубцева, М. Н. Термомеханические свойства мембран эритроцитов при окислительном стрессе / М. Н. Стародубцева // Журнал ГрГМУ. – 2009. – № 2. – С. 66-67.

24. Пероксинитрит регулирует экзоцитоз гранул нейтрофилов / М. Н. Стародубцева, Е. И. Коваленко, Н. И. Егоренков, Д. Р. Петренев, С. Н. Черенкевич // Биол. мембраны. – 2010. – Т. 27, № 6. – С. 459-470.

25. Стародубцева, М. Н. Анализ релаксационных состояний полимеров и биополимеров на основе карт латеральных сил, получаемых методом атомно-силовой микроскопии / М. Н. Стародубцева, Н. И. Егоренков // Вестн. Фонда фундам. исследований. – 2010. – № 4. – С. 51-57.

26. Starodubtseva, M. N. Mechanical properties of cells and ageing / M. N. Starodubtseva // Ageing Res. Rev. – 2011. – Vol. 10, № 1. – P. 16-25.

27. 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 геронтол. – 2011. – Т. 24. № 2. – С. 227-233.

28. 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.

29. Распределение концентрации нитрит- и нитрат-ионов в крови жителей Гомельской области в зависимости от концентрации онкомаркеров (простат-специфического антигена, ракового антигена 19-9, раково-эмбрионального антигена и альфа-фетопротеина) / М. Н. Стародубцева, Е. В. Воропаев, Д. Р. Петренёв, В. Н. Беляковский, Е. А. Липская, Т. Ф. Конюшенко // Проблемы здоровья и экологии. – 2014. – №4. – С. 102-107.

30. АСМ-диагностика патологии эритроцитов на основе физико-механического образа клеточной поверхности / М. Н. Стародубцева, Е. В. Воропаев, Д. Р. Петренёв, В. М. Мицура, Н. И. Егоренков // Проблемы здоровья и экологии. – 2015. – № 2. – С. 99-104.

31. Nitric oxide and interleukin-6 production in patients with transient cerebral microcirculatory disturbances / M. N. Starodubtseva, N. V. Halinouskaya, N. M. Halubykh, E. V. Voropaev, V. B. Smychek // Am. J. Clin. Neurol. Neurosurg. – 2015. – Vol. 1, № 2. – P. 86-91.

Статьи в сборниках научных трудов и материалах научных конференций

32. Starodubtseva, M. N. Chemiluminescence analysis of interaction between hemoglobin and sodium nitrite and hydrogen peroxide / M. N. Starodubtseva, S. N. Cherenkevich, G. N. Semenkova // Chemiluminescence at the turn of the millennium: an indispensable tool in modern chemistry, biochemistry and medicine / ed.: S. Albrecht, Th. Zimmermann, H. Brandl. – Dresden : Schweda-Werbedruck GmbH, Druckerei and Verlag, 2001. – P. 76-81.

33. Starodubtseva, M. N. Chemiluminescence of acidified sodium nitrite and hydrogen peroxide solution / M. N. Starodubtseva, S. N. Cherenkevich, G. N. Semenkova // Chemiluminescence at the turn of the millennium: an indispensable tool in modern chemistry, biochemistry and medicine / ed.: S. Albrecht, Th. Zimmermann, H. Brandl. – Dresden : Schweda-Werbedruck GmbH, Druckerei and Verlag, 2001. – P. 71-75.

34. Стародубцева, М. Н. Роль гемоглобина в окислительном стрессе эритроцитов, вызванном пероксиазотистой кислотой / М. Н. Стародубцева, С. Н. Черенкевич // Пурины и монооксид азота (регуляторная функция в организме) : сб. науч. ст. / под ред. В. Н. Гурина, В. А. Кульчицкого, А. Г. Чумака. – Минск : Технопринт, 2003. – С. 136-141.

35. Стародубцева, М. Н. Регуляция транспортных процессов в эритроцитах активными формами азота и кислорода / М. Н. Стародубцева, Т. Н. Божок // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : материалы междунар. науч. конф. и 6-го съезда Белорус. общ. об-ния фотобиол. и биофиз., Минск, 6-8 окт. 2004 г. : в 2 ч. / редкол. : И. Д. Вологовский [и др.]. – Минск, 2004. – Ч. 1. – С. 272-274.

36. Стародубцева, М. Н. Анализ пероксинитрит-индуцированных изменений структуры мембраны эритроцита методом атомно-силовой микроскопии / М. Н. Стародубцева, Т. Г. Кузнецова, Т. А. Кузнецова // Актуальные проблемы медицины : материалы респ. науч.-практ. конф. и 15-ой научной сессии Гомел. гос. мед. ун-та, Гомель, 18-20 мая, 2005 г. : сб. науч. ст. : в 6 т. / Гомел. гос. мед. ун-т ; редкол. : С. В. Жаворонок [и др.]. – Гомель, 2005. – Т. 6. – С. 6-8.

37. Стародубцева, М. Н. Возможные пути изменения проницаемости эритроцитарных мембран для иона калия при действии пероксинитрита / М. Н. Стародубцева, Дж. К. Эллори // Актуальные вопросы теоретической и практической медицины : материалы респ. науч.-практ. конф., посвящ. 15-летию образования Гомел. гос. мед. ун-та, Гомель, 1-2 дек. 2005 г. : в 4 т. / Гомел. гос. мед. ун-т ; редкол. : С. В. Жаворонок [и др.]. – Гомель, 2005. – Т. 2. – С. 98-100.

38. Пассивный транспорт катионов через мембраны эритроцитов человека, подвергшихся действию пероксинитрита / М. Н. Стародубцева, А. Таттерсолл, Дж. К. Эллори, С. Н. Черенкевич // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : материалы междунар. науч. конф. и 7-го съезда Белорус. общ. об-ния фотобиол. и

биофиз., Минск, 21-23 июня 2006 г. : в 2 т. / редкол. : И. Д. Волотовский [и др.]. – Минск : Право и экономика, 2006. – Т. 1. – С. 310-312.

39. Механизмы пойкилоцитоза при воздействии активных форм азота / Т. Г. Кузнецова М. Н. Стародубцева, Т. А. Кузнецова, С. О. Абетковская, О. М. Мойсейкова // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : материалы междунар. науч. конф. и 7-ой съезда Белорус. общ. об-ния фотобиол. и биофиз., Минск, 21-23 июня 2006 г. : в 2 т. / редкол. : И. Д. Волотовский [и др.]. – Минск : Право и экономика, 2006. – Т. 1. – С. 265-267.

40. Стародубцева, М. Н. Регулирование K^+ - Cl^- транспорта эритроцитов человека пероксинитритом / М. Н. Стародубцева, Дж. К. Эллори // Активные формы кислорода, азота и хлора в регуляции функций в норме и при патологии : материалы междунар. конф., Гродно, 28-29 сент. 2006 г. : в 2 ч. / под ред. И. И. Степура, И. Б. Заводника. – Гродно, 2006. – Ч. 2. – С. 121-125.

41. Кузнецова, Т. Г. Определение механических свойств клеточных поверхностей / Т. Г. Кузнецова, М. Н. Стародубцева, Н. И. Егоренков // Методологические аспекты сканирующей зондовой микроскопии : материалы VII Междунар. семинара, Минск, 1-3 нояб. 2006 г. / Ин-т тепло-массообмена им. А. В. Лыкова НАН Беларуси ; редкол. : А. И. Свириденко [и др.]. – Минск, 2006. – С. 153-157.

42. Стародубцева, М. Н. АСМ исследование эритроцитов, кренированных активными формами азота / М. Н. Стародубцева, Т. Г. Кузнецова, Н. И. Егоренков // Методологические аспекты сканирующей зондовой микроскопии : материалы VII Междунар. семинара, Минск, 1-3 нояб. 2006 г. / Ин-т тепло-массообмена им. А. В. Лыкова НАН Беларуси ; редкол. : А. И. Свириденко [и др.]. – Минск, 2006. – С. 148-152.

43. Стародубцева, М. Н. Влияние пероксинитрита на аквапорин-опосредованный транспорт воды / М. Н. Стародубцева // Актуальные проблемы медицины : материалы Респ. науч.-практ. конф. и 16-й итоговой сессии Гомел. гос. мед. ун-та, Гомель, 2007 г. : в 4 т. / редкол. : С. В. Жаворонок [и др.] – Гомель : ГомГМУ, 2007. – Т. 4. – С. 40-42.

44. Стародубцева, М. Н. Изучение мембран эритроцитов у больных сахарным диабетом второго типа методами атомно-силовой микроскопии / М. Н. Стародубцева, Т. Г. Кузнецова // Лекарственные средства и биологически активные соединения : материалы междунар. науч. конф., посвящ. 40-летию НПЦ «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», Гродно, 11-12 окт. 2007 г. / Ин-т фармакологии и биохимии НАН Беларуси ; редкол. : П. С. Пронько [и др.]. – Гродно, 2007. – С. 155-157.

45. Стародубцева, М. Н. Методологические особенности атомно-силовой микроскопии эритроцитов человека / М. Н. Стародубцева,

Т. Г. Кузнецова, Н. И. Егоренков // Медико-социальная экология личности : состояние и перспективы : материалы VI Междунар. конф., Минск, 4-5 апр. 2008 г. : в 2 ч. / редкол. : В. А. Прокашева [и др.]. – Минск : Изд. Центр БГУ, 2008. – Ч. 1. – С. 203-205.

46. Стародубцева, М. Н. Фрактальный анализ структуры поверхности нейтрофилов, взаимодействующих со стеклянной подложкой / М. Н. Стародубцева // Актуальные проблемы медицины : материалы Респ. науч.-практ. конф. и 17-й итоговой науч. сессии Гомел. гос. мед. ун-та, Гомель, 21-22 февр. 2008 г. : в 4 т. / Гомел. гос. мед. ун-т ; редкол. : А. Н. Лычиков [и др.]. – Гомель : ГомГМУ, 2008. – Т. 4. – С. 34-37.

47. Стародубцева, М. Н. Активация нейтрофилов пероксинитритом / М. Н. Стародубцева, Е. И. Коваленко, С. Н. Черенкевич // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : материалы междунар. науч. конф. и 8-го съезда Белорус. общ. об-ния фотобиол. и биофиз., Минск, 25-27 июня 2008 г. : в 2 ч. / редкол. : И. Д. Вологовский [и др.]. – Минск : Изд. Центр БГУ, 2008. – Ч. 1. – С. 274-276.

48. 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. и 8-го съезда Белорус. общ. об-ния фотобиол. и биофиз., Минск, 25-27 июня 2008 г. : в 2 ч. / редкол. : И. Д. Вологовский [и др.] – Минск : Изд. Центр БГУ, 2008. – Ч. 1. – С. 245-247.

49. Стародубцева, М. Н. Микроскопия латеральных сил клеточных структур / М. Н. Стародубцева, Н. И. Егоренков // Методологические аспекты сканирующей зондовой микроскопии : материалы VIII Междунар. семинара, Минск, 8-10 окт. 2008 г. / редкол. : А. И. Свириденко [и др.]. – Минск : Ин-т тепло-массообмена им. А. В. Лыкова НАН Беларуси, 2008. – С. 102-107.

50. Никитина, И. А. Использование атомно-силовой микроскопии для изучения тимоцитов крысы / И. А. Никитина, М. Н. Стародубцева, А. И. Грицук // Методологические аспекты сканирующей зондовой микроскопии : материалы VII Междунар. семинара, Минск, 8-10 окт. 2008 г. / редкол. : А. И. Свириденко [и др.]. – Минск : Ин-т тепло-массообмена им. А. В. Лыкова НАН Беларуси, 2008. – С. 108-113.

51. Стародубцева, М. Н. Влияние пероксинитрита, цитохалазинов и колхицина на функциональную активность цитоскелета нейтрофилов / М. Н. Стародубцева, Е. И. Коваленко, Н. И. Егоренков // Актуальные проблемы медицины : материалы Респ. науч.-практ. конф. и 18-й итоговой науч. сессии Гомел. гос. мед. ун-та, Гомель, 26-27 февр. 2009 г. : в 4 т. / Го-

мел. гос. мед. ун-т ; редкол. : А. Н. Лызиков [и др.]. – Гомель : ГомГМУ, 2009. – Т. 4. – С. 54-57.

52. 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 февр. 2009 г. : в 4 т. / Гомел. гос. мед. ун-т ; редкол. : А. Н. Лызиков [и др.]. – Гомель : ГомГМУ, 2009. – Т. 3. – С. 129-132.

53. Стародубцева, М. Н. Совместное действие пероксинитрита и частиц латекса на нейтрофилы / М. Н. Стародубцева, Е. И. Коваленко // Актуальные проблемы медицины : материалы Респ. науч.-практ. конф. и 19-й 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 : ГомГМУ, 2010. – Т. 4. – С. 88-91.

54. Пероксинитрит-индуцированный экзоцитоз внутриклеточных гранул нейтрофилов / М. Н. Стародубцева, Е. И. Коваленко, Н. И. Егоренков, Д. Р. Петренев, С. Н. Черенкевич // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : материалы Междунар. науч. конф. и 9-го съезда Белорус. общ. об-ния фотобиол. и биофиз., Минск, 23-25 июня 2010 г. : в 2 ч. / редкол. : И. Д. Волотовский [и др.] – Минск : Изд. Центр БГУ, 2010. – Ч. 2. – С. 133-135.

55. Стародубцева, М. Н. АСМ-анализ влияния химически активных агентов на релаксационное состояние полимеров, включая биополимеры / М. Н. Стародубцева, Н. И. Егоренков // 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 : Беларус. навука, 2010. – С. 40-45.

56. 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 : Беларус. навука, 2010. – С. 101-105.

57. Стародубцева, М. Н. Влияние ненаркотических анальгетиков на пероксинитрит-зависимые процессы в клетках крови / М. Н. Стародубцева // Актуальные проблемы медицины : материалы Респ. науч.-практ. конф. и 21-й итоговой науч. сессии 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 : ГомГМУ, 2012. – Т. 4. – С. 91-94.

58. Стародубцева, М. Н. Оценка функционального состояния лейкоцитов с помощью микроскопии латеральных сил / М. Н. Стародубцева, Н. И. Егоренков, И. А. Никитина // Актуальные проблемы медицины : ма-

териалы Респ. науч.-практ. конф. и 21-й итоговой науч. сессии 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 : ГомГМУ, 2012. – Т. 4. – С. 94-97.

59. Стародубцева, М. Н. Использование микроскопии латеральных сил для оценки структурных и механических свойств клеток крови / М. Н. Стародубцева / Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : материалы Междунар. науч. конф. и 10-го съезда Белорус. общ. об-ния фотобиол. и биофиз., Минск, 19-21 июня 2012 г. : в 2 ч. / редкол. : И. Д. Волотовский [и др.]. – Минск : Изд. центр БГУ, 2012. – Ч. 1. – С. 212-214.

60. 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. / НАН Беларуси, Ин-т тепло- и массообмена им. А. В. Лыкова ; редкол. : С. А. Чижик [и др.]. – Минск : Беларус. навука, 2012. – С. 197-200.

61. Стародубцева, М. Н. Адгезионно-фрикционные свойства полимеров и биологических клеток как полимерных композитов / М. Н. Стародубцева, Н. И. Егоренков // Теория оболочек и мембран в механике и биологии: от макро- до наноразмерных структур : материалы Междунар. науч. конф., Минск, 16-20 сент. 2013 г. / Белорус. гос. ун-т ; под ред. Г. И. Михасёва, Х. Альтенбаха. – Минск : Изд. центр БГУ, 2013. – С. 151-153.

62. Стародубцева, М. Н. Микромеханические характеристики поверхности дегидратированных клеток как маркеры клеточной нормы и патологии. / М. Н. Стародубцева, С. Н. Черенкевич // Теория оболочек и мембран в механике и биологии: от макро- до наноразмерных структур : материалы междунар. науч. конф., Минск, 16-20 сент. 2013 г. / Белорус. гос. ун-т ; под ред. Г. И. Михасёва, Х. Альтенбаха. – Минск : Изд. центр БГУ, 2013. – С. 154-156.

63. Концентрация NO метаболитов в сыворотке крови с повышенными уровнями онкомаркеров / М. Н. Стародубцева, Т. Ф. Конюшенко, Д. Р. Петренёв, Е. В. Воропаев // Актуальные проблемы медицины : материалы Респ. науч.-практ. конф. и 22-й итоговой науч. сессии Гомел. гос. мед. ун-та, Гомель, 14-15 нояб. 2013 г. : в 4 т. / Гомел. гос. мед. ун-т ; редкол. : А. Н. Лызиков [и др.]. – Гомель : ГомГМУ, 2014. – Т. 4. – С. 123-126.

64. Стародубцева, М. Н. Синтез активных форм кислорода и азота пероксинитрит-стимулированными нейтрофилами / М. Н. Стародубцева, Е. И. Коваленко, С. Н. Черенкевич // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : материалы междунар. науч. конф. и 11-го съезда Белорус. общ. об-ния фотобиол. и биофиз., Минск, 17-

20 июня 2014 г. : в 2 ч. / редкол. : И. Д. Волотовский [и др.]. – Минск : Изд. центр БГУ, 2014. – Ч. 2. – С. 248-250.

65. Стародубцева, М. Н. АСМ-анализ структурно-механических свойств фибробластов и эпителиальных клеток рака легкого человека A549 / М. Н. Стародубцева, Н. И. Егоренков, Е. С. Дрозд // Методологические аспекты сканирующей зондовой микроскопии : материалы XI Междунар. конф., Минск, 21-24 окт. 2014 г. / НАН Беларуси, Ин-т тепло- и массообмена им. А. В. Лыкова ; редкол. : С. А. Чижик [и др.]. – Минск : Беларус. навука, 2014. – С. 150-154.

66. Стародубцев, И. Е. Оценка фрактальной размерности АСМ-изображений методом подсчета кубов / И. Е. Стародубцев, М. Н. Стародубцева // Методологические аспекты сканирующей зондовой микроскопии : материалы XI Междунар. конф., Минск, 21-24 окт. 2014 г. / НАН Беларуси, Ин-т тепло- и массообмена им. А. В. Лыкова ; редкол. : С. А. Чижик [и др.]. – Минск : Беларус. навука, 2014. – С. 146-149.

67. Концентрация нитрит- и нитрат-ионов в плазме крови больных с ишемической болезнью сердца / М. Н. Стародубцева, Е. В. Серикова, Е. А. Липская, Е. В. Воропаев // Актуальные проблемы медицины : материалы Респ. науч.-практ. конф. и 23-й итоговой науч. сессии Гомел. гос. мед. ун-та, Гомель, 13-14 нояб. 2014 г. : в 4 т. / Гомел. гос. мед. ун-т ; редкол. : А. Н. Лызиков [и др.]. – Гомель : ГомГМУ, 2014. – Т. 4. – С. 74-77.

68. Стародубцева, М. Н. Изменение механических свойств эритроцитов при хранении крови / М. Н. Стародубцева, Д. Р. Петренев, Н. И. Егоренков // Актуальные проблемы медицины : материалы Респ. науч.-практ. конф. и 23-й итоговой науч. сессии Гомел. гос. мед. ун-та, Гомель, 13-14 нояб. 2014 г. : в 4 т. / Гомел. гос. мед. ун-т ; редкол. : А. Н. Лызиков [и др.]. – Гомель : ГомГМУ, 2014. – Т. 4. – С. 71-74.

69. Микромеханические характеристики опухолевых клеток человека [Электронный ресурс] / М. Н. Стародубцева, Н. И. Егоренков, Е. Э. Константинова, Н. С. Кужель, И. Е. Стародубцев, Г. Б. Мельникова, Д. Р. Петренев // Актуальные проблемы медицины : материалы Респ. науч.-практ. конф. с междун. участием, посвященной 25-летию основания УО «Гомел. гос. мед. ун-т», Гомель, 5-6 нояб. 2015 г. / Гомел. гос. мед. ун-т ; редкол. : А. Н. Лызиков [и др.]. – Гомель : ГомГМУ, 2015. – С. 942-945. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).

Тезисы докладов научных конференций, симпозиумов, съездов

70. Starodubtseva, M. N. Chemiluminescence analysis of interaction between hemoglobin and sodium nitrite and hydrogen peroxide / M. N. Starodubt-

seva, S. N. Cherenkevich, G. N. Semenкова // Clin. Lab. – 2000. – Vol. 46, № 7-8. – P. 401.

71. Starodubtseva, M. N. Chemiluminescence in sodium nitrite and hydrogen peroxide reaction: the role of hydrogen oxoperoxonitrate / M. N. Starodubtseva, S. N. Cherenkevich, G. N. Semenкова // Clin. Lab. – 2000. – Vol. 46, № 7-8. – P. 421.

72. Стародубцева, М. Н. Пероксинитрит как регулятор устойчивости эритроцитов к осмотическому гемолизу / М. Н. Стародубцева // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : материалы Междунар. науч. конф. и 5-го съезда Белорус. общ. об-ния фотобиолог. и биофизик., Минск, 22-24 окт. 2002 г. / редкол. : И. Д. Волоотовский [и др.]. – Минск : Тонпик, 2002. – С. Т-94.

73. Starodubtseva, M. N. The catastrophe of erythrocyte membrane state / M. N. Starodubtseva // FEBS Forum for young scientists : abstracts of conf., Istanbul, 18-20 October 2002. – Istanbul, Turkey, 2002. – P. 105.

74. Starodubtseva, M. N. The influence of peroxy-nitrous acid on human erythrocyte properties / M. N. Starodubtseva, S. N. Cherenkevich, G. N. Semenкова // Receptors and cell signaling in oxidative stress : abstracts of Physiological society spring workshop, Budapest, Hungary, 3-5 April 2003. – Budapest, 2003. – P. 61.

75. Starodubtseva, M. N. The peroxy-nitrous acid can serve as a modulator of functions and properties of erythrocytes / M. N. Starodubtseva, S. N. Cherenkevich // FEBS Forum for young scientists : abstracts of conf., Brussels, 1-3 July 2003. – Brussels, Belgium, 2003. – P. 139.

76. Starodubtseva, M. N. Disbalance of redox and volume regulation systems at peroxy-nitrous acid action on erythrocytes / M. N. Starodubtseva, S. N. Cherenkevich // Special FEBS Meeting on signal transduction : Final programme and abstracts of conf., Brussels, 3-8 July 2003. – Brussels, Belgium, 2003. – P. 61.

77. Starodubtseva, M. N. Water transport system characteristics of erythrocytes at oxidative stress / M. N. Starodubtseva, S. N. Cherenkevich // Joint Meeting British Pharmacological Society and The Physiological Society : abstracts of conf., Manchester, UK, 9-12 September 2003 / University of Manchester. – Manchester, 2003. – P. 116P-117P.

78. Starodubtseva, M. N. The cusp-catastrophe model of erythrocytes systems in salt-solutions / M. N. Starodubtseva, S. N. Cherenkevich // IV Symposium on medical physics and II International symposium on medical physics : abstracts of conf., Ustron, Poland, 13-15 November 2003. – Ustron, 2003. – С. 102.

79. Starodubtseva, M. N. Luminol-dependent chemiluminescence and osmotic stability of erythrocytes treated by peroxyxynitrite / M. N. Starodubtseva, S. N. Cherenkevich, G. N. Semenкова // Clin. Lab. – 2003. – Vol. 49, № 9+10. – P. 549.

80. Starodubtseva, M. N. Reactive species in $\text{NaNO}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$ + erythrocyte system [Electronic resource] / M. N. Starodubtseva, S. N. Cherenkevich // 4th International conference on peroxyxynitrite and reactive nitrogen species in biology and medicine : abstracts of conf., Konstanz, 27-31 July 2004. – 2004. – P. 113. – Mode of access : <http://www.uni-konstanz.de/pn04> – Date of access : 15.09.2006.

81. Starodubtseva, M. N. Peroxyxynitrite-induced passive K^+ transport in human red blood cells: concentration and time dynamics / M. N. Starodubtseva, C. J. Ellory // European association for red cell research 15th Meeting : abstracts of conf., Murten, Switzerland, 21-25 April, 2005. – Murten, 2005. – P. 94.

82. Starodubtseva, M. N. Multi-stage response of K^+ transport system to peroxyxynitrite action in human red blood cells / M. N. Starodubtseva, C. J. Ellory // J. Physiol. – 2005. – Vol. 567P. – P. PC173. – Mode of access : www.physoc.org – Date of access : 30.05.2015.

83. Peroxyxynitrite induces red blood cell membrane reorganization / M. N. Starodubtseva, T. G. Kuznetsova, J. C. Ellory, T. A. Kuznetsova, S. O. Abetkovskaya // The FEBS Journal. – 2006. – Vol. 273, Suppl. 1. – P. 52.

84. Structural and functional changes in membrane and cytoskeleton of red blood cells induced by peroxyxynitrite / M. Starodubtseva, A. Tattersall, T. Kuznetsova, C. Ellory // EARCR Oxford 2007: European association for red cell research : abstracts of 16th Meeting, Oxford, 16-19 March, 2007 / University of Oxford. – Oxford, 2007. – P. PC26.

85. АСМ-анализ структуры и свойств клеток крови как биологических композитов / М. Н. Стародубцева, Т. Г. Кузнецова, Е. Н. Коваленко, Н. И. Егоренков // Полимерные композиты и трибология («Поликомтриб-2007») : материалы Междунар. науч.-практ. конф., Гомель, 16-19 июля 2007 г. / ИММС НАН Беларуси ; редкол. : В. Н. Адери́ха [и др.]. – Гомель, 2007. – С. 83.

86. Structural and functional responses of neutrophils to peroxyxynitrite / M. Starodubtseva, A. Kavalenka, N. Yegorenkov, S. Cherenkevich // The FEBS Journal. – 2008. – Vol. 275, Suppl. 1. – P. 358.

87. Анализ структуры поверхности тимоцитов крысы при окислительном стрессе при помощи атомно-силовой микроскопии [Электронный ресурс] / И. А. Никитина, М. Н. Стародубцева, Т. Г. Кузнецова, Н. И. Егоренков // Современные достижения бионаноскопии : материалы 2-й Междунар. конф., Москва, 17-19 июня, 2008 г. / Физич. фак-т МГУ им.

М. В. Ломоносова. – М., 2008. – С. 40. – Режим доступа : <http://www.nanoscopy.org/conf/> – Дата доступа : 29.03.2015.

88. Способы анализа эритроцитов при помощи атомно-силовой микроскопии [Электронный ресурс] / Т. Г. Кузнецова, М. Н. Стародубцева, Е. И. Коваленко, Н. И. Егоренков // Современные достижения бионаноскопии : материалы 2-й Междунар. конф., Москва, 17-19 июня, 2008 г. / Физич. фак-т МГУ им. М. В. Ломоносова. – М., 2008. – С. 31-32. – Режим доступа : <http://www.nanoscopy.org/conf/> – Дата доступа : 29.03.2015.

89. Стародубцева, М. Н. Термомеханика поверхности пероксинитрит-модифицированных клеток / М. Н. Стародубцева, Н. И. Егоренков // Полимерные композиты и трибология («Поликомтриб-2009») : материалы Междунар. науч.-техн. конф., посвящ. 50-летию Ин-та механики металлополимерных систем им. В. А. Белого НАН Беларуси, Гомель, 22-25 июня 2009 г. / ИММС НАН Беларуси ; редкол. : В. Н. Адери́ха [и др.]. – Гомель, 2009. – С. 82.

90. Егоренков, Н. И. Термоэластография нанонеоднородных поверхностей / Н. И. Егоренков, М. Н. Стародубцева // Полимерные композиты и трибология («Поликомтриб-2011») : материалы Междунар. науч.-техн. конф. Гомель, 27-30 июня 2011 г. / ИММС НАН Беларуси ; редкол.: В. Н. Адери́ха [и др.]. – Гомель, 2011. – С. 94.

91. Егоренков, Н. И. Анализ вклада цитоскелета в структурно-механическую неоднородность поверхностного слоя клеток, оцененную по параметрам сил трения между острием АСМ-зонда и поверхностью клетки / Н. И. Егоренков, М. Н. Стародубцева // Полимерные композиты и трибология («Поликомтриб-2013») : материалы Междунар. науч.-техн. конф. Гомель, 24-27 июня 2013 г. / ИММС НАН Беларуси; редкол. : В. Н. Адери́ха [и др.]. – Гомель, 2013. – С. 98.

92. АСМ-оценка физико-механических свойств фибробластов и стволовых клеток человека, обработанных глутаровым альдегидом / Н. И. Егоренков, М. Н. Стародубцева, И. Е. Стародубцев, Д. Р. Петренев, Г. Б. Мельникова, Н. С. Кужель, Е. Э. Константинова // Полимерные композиты и трибология («Поликомтриб-2015») : материалы Междунар. науч.-техн. конф. Гомель, 23-26 июня 2015 г. / ИММС НАН Беларуси; редкол. : В. Н. Адери́ха [и др.]. – Гомель, 2015. – С. 263.

93. Концентрация NO метаболитов в крови человека при преходящих нарушениях мозгового кровообращения / М. Н. Стародубцева, Н. В. Галиновская, Е. А. Липская, Е. В. Воропаев // Свободные радикалы в химии и жизни : материалы Междунар. конф. Минск, 25-26 июня 2015 г. / БГУ; редкол. : О. И. Шадыро [и др.]. – Минск, 2015. – С. 35-36.

Патенты на изобретения

94. Кузнецова, Т. Г. Способ исследования цитоскелета нативных эритроцитов: пат. 12868 Респ. Беларусь, МПК G 01N 13/10 (2009) / Т. Г. Кузнецова, М. Н. Стародубцева, Н. И. Егоренков ; дата публ. 28.02.2010.

95. Стародубцева, М. Н. Способ фиксации микро- и наноразмерной частицы для исследования посредством силовой микроскопии : пат. 16482 Респ. Беларусь, МПК (2006.01) G 01N 1/36 / М. Н. Стародубцева, Н. И. Егоренков, Е. В. Воропаев; дата публ. 30.10.2012.

96. Способ определения температуры структурно-релаксационного перехода вещества : пат. 18895 Респ. Беларусь, МПК G 01N 13/00 (2006.01) / М. Н. Стародубцева, Н. И. Егоренков, А. А. Суслов, С. А. Чижик ; дата публ. 28.02.2015.

97. 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

98. 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 «Микротестмашины» ; под ред. А. А. Суслова. – Гомель, 2013. – Режим доступа: <http://microtm.com/download/manual-bio-20131029.doc>. – Дата доступа: 20.10.2015.

99. Стародубцева, М. Н. Двойственная роль пероксинитрита в организме / М. Н. Стародубцева // Проблемы здоровья и экологии. – 2004. – № 1. – С. 35-41.

100. Стародубцева, М. Н. Окислительный взрыв в эритроцитах под воздействием системы « $\text{NaNO}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$ » / М. Н. Стародубцева, С. Н. Черенкевич // Проблемы здоровья и экологии. – 2005. – № 4. – С. 94-99.

101. Особенности пойкилоцитоза, вызванного действием активных форм азота / М. Н. Стародубцева, Т. Г. Кузнецова, Т. А. Кузнецова, Дж. К. Эллори, С. Н. Черенкевич, С. О. Абетковская // Проблемы здоровья и экологии. – 2006. – № 6. – С. 117-122.

102. Реорганизация актинового цитоскелета лейкоцитов в условиях окислительного стресса / М. Н. Стародубцева, И. А. Никитина, Н. И. Егоренков, Е. И. Коваленко, А. И. Грицук // Вестн. гематол. – 2010. – Т. 6, № 2. – С. 107-111.

Инструктивно-нормативные документы

103. Метод оценки риска инфаркта мозга : инструкция по применению : утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 11.12.2015 / М. Н. Ста-

родубцева, Н. В. Галиновская, Е. В. Воропаев, О. А. Иванцов, Д. Р. Петренев, Е. А. Липская - Гомель : Гомел. гос. мед. ун-т., 2016. – 22 с.

РЭЗЮМЕ

Старадубцава Марыя Мікалаеўна

Біяфізічныя механізмы дзеяння пероксінітрыту ў клетках крыві

Ключавыя словы: пероксінітрыт, пероксаазоцістая кіслата, актыўныя формы кіслароду і азоту (АФК/АФА), біяфізіка клеткі, фізіка-механічныя ўласцівасці, атамна-сілавая мікраскапія (АСМ).

Мэта даследавання: устанаўленне асноўных біяфізічных заканамернасцей і механізмаў пероксінітрыт-індуцыраваных змяненняў структуры і ўласцівасцей клетак на ўзроўні элементаў клеткі і клеткі ў цэлым, а таксама выяўленне фактараў, вызначаючых рэгулюючае і таксічнае дзеянне пероксінітрыту ў клетках.

Метады даследавання: комплекс фізіка-механічных (у тым ліку АСМ), біяфізічных і біяхімічных метадаў аналізу.

Атрыманыя вынікі і іх навізна.

Эксперыментальна абгрунтавана роля пероксінітрыту як прыроднага рэгулятара функцый клетак. Выяўлены заканамернасці сінтэзу АФК/АФА клеткамі крыві, абумоўленага пероксінітрытам і іншымі нітруючымі злучэннямі. Выяўлены заканамернасці і механізмы пероксінітрыт-індуцыраваных змяненняў іоннага гомеастазу клетак, дынамікі цыташкілета, рэалагічных і фізіка-хімічных параметраў клетак; заканамернасці пероксінітрыт-індуцыраваных шляхоў гібелі клетак. Ацэнена імавернасць знаходжання арганізма чалавека ў станах з нізкай або з высокай канцэнтрацыямі нітрыт-/нітрат-іонаў (NO_x) у плазме крыві пры парушэннях мікрацыркуляцыі крыві і павышэнні ў плазме крыві канцэнтрацыі аднаго або некалькіх онкамаркераў. Метадамі АСМ вызначаны асноўныя фізіка-механічныя параметры паверхневага слоя клетак, у тым ліку мадыфікаваных пероксінітрытам, і паказана, што структурна-рэлаксацыйны стан, які вызначае характар механічных паводзін паверхневага слоя клеткі, пры фізіялагічных тэмпературах падобны шклопадобнаму стану сінтэтычных высакамалекулярных аморфных рэчываў. Распрацаваны тэарэтыка-эксперыментальныя асновы клетачнай дыягностыкі паталогіі арганізма на базе фізіка-механічнага вобраза паверхні клетак, вызначанага наборам АСМ-параметраў.

Рэкамендацыі па выкарыстанні. Атрыманыя вынікі з'яўляюцца тэарэтычнай базай для распрацоўкі новых метадаў карэкцыі імунітэту чалавека праз рэгуляванне пероксінітрытам актыўнасці клетак імуннай сістэмы; для павелічэння прагнастычнай значнасці дыягностыкі анкалагічнай і сасудзістай паталогій пры аналізе дынамікі колькасці NO_x ў плазме крыві, для АСМ-дыягностыкі шэрага захворванняў на клетачным узроўні; для ўдасканалвання і клінічнага асваення АСМ. Атрыманыя рэзультаты выкарыстоўваюцца ў шэрагу навуковых, вучэбных і вытворчых арганізацый Беларусі.

Вобласці выкарыстання: біяфізіка, біяхімія, медыцына, фармакалогія, адукацыя.

РЕЗЮМЕ

Стародубцева Марія Николаевна

Биофизические механизмы действия пероксинитрита в клетках крови

Ключевые слова: пероксинитрит, пероксоазотистая кислота, активные формы кислорода и азота (АФК/АФА), биофизика клетки, физико-механические свойства клеток, атомно-силовая микроскопия (АСМ).

Цель работы: установление основных биофизических закономерностей и механизмов пероксинитрит-индуцированных изменений структуры и свойств клеток крови на уровне клеточных элементов и клетки в целом, а также выявление факторов, определяющих регуляторное и токсическое действие пероксинитрита в клетках.

Методы исследования: комплекс физико-механических (включая АСМ), биофизических и биохимических методов анализа.

Полученные результаты и их новизна. Экспериментально обоснована роль пероксинитрита как природного регулятора функций клеток. Установлены закономерности синтеза АФК/АФА клетками крови, вызванного пероксинитритом и другими нитрующими соединениями. Определены закономерности и механизмы пероксинитрит-индуцированных изменений ионного гомеостаза клеток, динамики цитоскелета, реологических и физико-химических параметров клеток; закономерности пероксинитрит-индуцированных путей гибели клеток. Оценена вероятность нахождения организма человека в состояниях с низкой или с высокой концентрациями нитрит-/нитрат-ионов (NO_x) в плазме крови при нарушениях микроциркуляции крови и повышении в плазме крови концентрации одного или нескольких онкомаркеров. Методами АСМ определены основные физико-механические параметры поверхностного слоя клеток, в том числе модифицированных пероксинитритом, и показано, что структурно-релаксационное состояние, определяющее характер механического поведения поверхностного слоя клетки, при физиологических температурах подобно стеклообразному состоянию синтетических высокомолекулярных аморфных веществ. Разработаны теоретико-экспериментальные основы клеточной диагностики патологии организма на базе физико-механического образа поверхности клеток, определяемого набором АСМ-параметров.

Рекомендации по использованию. Полученные результаты являются теоретической базой для разработки новых методов коррекции иммунитета человека посредством регулирования пероксинитритом активности клеток иммунной системы; для увеличения прогностической значимости диагностики онкологической и сосудистой патологий при анализе динамики содержания NO_x в плазме крови, для АСМ-диагностики ряда заболеваний на клеточном уровне; для совершенствования и клинического освоения АСМ. Полученные результаты используются в ряде научных, учебных и производственных организаций Беларуси.

Области применения: биофизика, биохимия, медицина, фармакология, образование.

SUMMARY

Starodubtseva Maria Nikolaevna

Biophysical mechanisms of the effects of peroxynitrite in blood cells

Keywords: peroxynitrite, peroxynitrous acid, reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS), cell biophysics, physical-mechanical properties of cells, atomic force microscopy (AFM).

Aim of the study: to establish the basic biophysical regularities and mechanisms of peroxynitrite-induced changes in the structure and properties of cells at the level of cell elements as well as the whole cell, and reveal the factors that specify the regulatory and toxic effects of peroxynitrite in cells.

Methods of research: complex of physical-mechanical (including AFM), biophysical and biochemical methods of analysis.

Results and their novelty. The role of peroxynitrite as a natural regulator of cell functions has been experimentally substantiated. Regularities of blood cell ROS/RNS synthesis induced by peroxynitrite and other nitrating compounds were established. Patterns and mechanisms of peroxynitrite-induced changes in cell ionic homeostasis, cytoskeleton behavior, and cell rheological and physical-chemical parameters as well as peroxynitrite-induced pathways of cell death were revealed. Probability of finding of the human organism in a state either with low or with high concentrations of nitrite/nitrate ions (NO_x) in blood plasma was estimated in cases of blood microcirculatory disturbances and high plasma concentration of one or some tumor markers. For cells, including peroxynitrite-modified cells, the basic physical-mechanical parameters of their surface layers were determined using AFM methods. Experimental evidence that the structure-relaxation state determining the mechanical behavior of the cell surface layer (in the physiological temperature range) was similar to a glassy state of synthetic high-molecular amorphous substances was provided. The theoretic-experimental grounds of the diagnostics of organism pathology at the cellular level by using the cell surface physical-mechanical image based on the set of AFM parameters were developed.

Recommendations for application. The results of the work are the theoretical basis for the development of new methods of human immunity correction based on immune cell activity regulation with peroxynitrite; for improving the predictive value of the oncological and vascular pathologies diagnostics based on the analysis of blood plasma NO_x concentration dynamics; for the AFM-based diagnostics of a number of human diseases at the cellular level; for the upgrading and clinic mastering of AFM. The obtained results are used in research, education and production processes of a number of Belarusian organizations.

Fields of application: biophysics, biochemistry, medicine, pharmacology, education.



Научное издание

Стародубцева Мария Николаевна

**БИОФИЗИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ
ПЕРОКСИНИТРИТА В КЛЕТКАХ КРОВИ**

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

по специальности 03.01.02 – биофизика

Подписано в печать 23.05.2016.

Формат 60×84¹/₁₆. Бумага офсетная 80 г/м². Гарнитура «Таймс».
Усл. печ. л. 2,79. Уч.-изд. л. 3,50. Тираж 100 экз. Заказ № 185.

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.