

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 576.311.347.6:576.311.32

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-2-156-168>

Поступила в редакцию 06.07.2018

Received 06.07.2018

**И. Б. Заводник¹, Р. И. Кравчук², Т. В. Ильич¹, Е. А. Лапшина¹, А. Г. Вейко¹,
Л. Б. Заводник¹, О. Б. Островская², М. Н. Курбат²**

¹Гродненский государственный университет имени Янки Купалы, Гродно, Республика Беларусь

²Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Республика Беларусь

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ МИТОХОНДРИЙ И КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ, ИНДУЦИРУЕМЫЕ ГИПОХЛОРНОЙ КИСЛОТОЙ

Аннотация. Гипохлорная кислота, HOCl, является одним из наиболее сильных биологических окислителей и важнейшим медиатором воспалительных повреждений клеток и тканей. В настоящей работе изучен характер изменения морфологии митохондрий клеток печени крыс, эритроцитов крыс и клеток линии В14 при окислительном воздействии HOCl *in vitro*.

Внесение HOCl (300 мкМ) в суспензию митохондрий вызывало изменения органелл, незначительно снижало среднюю суммарную длину и среднее количество крист в одной митохондрии без изменения длины одной кристы, уменьшало среднюю площадь сечения митохондрии и удлиняло профили митохондрий, увеличивая число измененных митохондрий и гетерогенность популяции. Кроме того, наблюдалась деполяризация митохондриальных мембран, скорость и степень которой определялись концентрацией HOCl. Воздействие HOCl (25–150 мкМ) в течение 60–180 с индуцировало лизис эритроцитов крыс, которому предшествовало изменение формы и размеров клеток. Рассчитанная нами константа диссоциации HOCl с эритроцитарной мембраной составила 140 ± 25 мкМ, кооперативность процесса взаимодействия (коэффициент Хилла) – 2,1. В клетках линии В14 воздействие HOCl (100 мкМ) вызывало потерю способности сорбироваться на субстрате, формировать ассоциаты и последующее сжатие клеток.

Таким образом, морфологические (и функциональные) перестройки митохондрий печени крыс вследствие воздействия HOCl могут служить одной из причин гибели клеток в очагах воспаления. На уровне целых клеток воздействие HOCl вызывает лизис эритроцитов и глубокие повреждения клеток линии В14.

Ключевые слова: митохондрии печени крыс, гипохлорная кислота, морфологические изменения, эритроциты, гемолиз, клетки линии В14

Для цитирования: Морфологические изменения митохондрий и клеток млекопитающих, индуцируемые гипохлорной кислотой / И. Б. Заводник [и др.] // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2019. – Т. 64, № 2. – С. 156–168. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-2-156-168>

**I. B. Zavodnik¹, R. I. Kravchuk², T. V. Ilyich¹, E. A. Lapshina¹, A. G. Vejko¹, L. B. Zavodnik¹,
O. B. Astrowskaja², M. N. Kurbat²**

¹Yanka Kupala State University of Grodno, Grodno, Republic of Belarus

²State Medical University of Grodno, Grodno, Republic of Belarus

MORPHOLOGICAL CHANGES OF MITOCHONDRIA AND MAMMALIAN CELLS, INDUCED BY HYPOCHLOROUS ACID

Abstract. Hypochlorous acid, HOCl, is one of the most powerful biological oxidants and the most important mediator of inflammatory damage of cells and tissues. The purpose of this study was to characterize the morphological features of HOCl – induced oxidative impairment in rat liver mitochondria *in vitro* and to compare the processes of HOCl-induced oxidation in mitochondria, erythrocytes and B14 cells.

HOCl addition (300 μ M) to mitochondrial suspension resulted in mitochondrial structural changes with a decrease in the mean total length of the crista and the average number of cristae in one mitochondria with no change in the length of one crista. There was shown a slight decrease in the average cross-sectional area of one mitochondria, mitochondrial profile elongation, an increase in the number of altered mitochondria and the heterogeneity of the population. Simultaneously we observed depolarization of the mitochondrial membrane, the rate and degree of which were determined by the concentration of HOCl. HOCl addition (25–150 μ M) induced lysis of erythrocytes for 60–180 s, which was preceded by a change in the shape and size of cells. The apparent dissociation constant for the HOCl – membrane complex was estimated to be $K_d = 140 \pm 25$ μ M, and the Hill coefficient was to be 2.1. The B14 cell exposure to HOCl (100 μ M) led to a loss of ability to sorb on the substrate, to form associates, and to subsequent shrinkage of cells.

Therefore, HOCl caused some morphological (and functional) changes in rat liver mitochondria, which may serve as one of the causes of cell death in inflammatory foci. At the level of the whole cells, the HOCl addition induced lysis of red blood cells and deep damage to B14 cells.

Keywords: rat liver mitochondria, hypochloric acid, morphological changes, erythrocytes, hemolysis, B14 cells

For citation: Zavodnik I. B., Kravchuk R. I., Ilyich T. V., Lapshina E. A., Vejko A. G., Zavodnik L. B., Astrowskaja O. B., Kurbat M. N. Morphological changes of mitochondria and mammalian cells, induced by hypochlorous acid. *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2019, vol. 64, no. 2, pp. 156–168 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-2-156-168>

Введение. Гипохлорная кислота (НОСІ) (в русскоязычной химической терминологии – хлорноватистая кислота – НСІО) синтезируется в реакции перекиси водорода и аниона Cl^- , катализируемой миелопероксидазой (МРО, КФ 1.11.1.7) нейтрофилов и моноцитов в условиях дыхательного взрыва. НОСІ путем диффузии проникает внутрь клеток, вызывая в них необратимую неферментативную химическую модификацию белков (путем образования долгоживущих хлораминов и хлортирозинов), нуклеиновых кислот, липидов [1, 2]. НОСІ принадлежит к широкому классу гипогалоидных кислот (НОХ, где Х – F, Cl, Br или I), образующихся при окислении галоген-ионов и обладающих высокой биологической активностью.

Гипохлорная кислота – один из наиболее сильных биологических окислителей и важнейший медиатор воспалительных повреждений клеток и тканей, а также основной бактерицидный агент [1]. В отличие от других окислителей она не является субстратом для ферментов антиоксидантной системы и в то же время способна взаимодействовать с многочисленными субклеточными структурами [3]. Инфильтрация моноцитов/макрофагов в ткани и повышенные экспрессия и, как следствие, секреция миелопероксидазы приводят к росту генерации НОСІ. Повышенная экспрессия миелопероксидазы и рост содержания 3-хлортирозина как биомаркера хлорирования гипохлорной кислотой показаны при ряде патологий [1]. Точные механизмы НОСІ-индуцированной клеточной гибели и адаптации к окислителю неизвестны. До 80 % генерируемого активированными нейтрофилами H_2O_2 используется для производства НОСІ, локальная концентрация которой в тканях при патологических состояниях может достигать 20–400 мкМ в течение часа [3–5]. Хлорирование и окисление белков НОСІ как результат активации миелопероксидазы является одной из основных причин атеросклеротических повреждений тканей. Недавно обнаружено выраженное возрастание активности миелопероксидазы и степени хлорирования белков (уровня 3-хлортирозина) при атеросклерозе и ревматоидном артрите [6]. При невысоких, физиологических, концентрациях НОСІ (активная форма хлора) наряду с активными формами кислорода и азота может выступать как сигнальная молекула, регулируя пролиферацию, рост, дифференциацию клеток, апоптоз.

Механизмы модификации клеток и клеточных структур гипохлорной кислотой и физиологические следствия этой модификации исследуются достаточно давно. Показано, что НОСІ (50–200 мкМ) индуцирует гибель макрофагов человека по некротическому механизму, вызывая формирование митохондриальных пор высокой проницаемости, падение митохондриального мембранного потенциала и нарушение кальциевого гомеостаза [7]. Ранее нами были рассмотрены некоторые закономерности повреждения митохондрий клеток печени и эритроцитов гипохлорной кислотой. В митохондриях печени крыс НОСІ в концентрации 50–300 мкМ вызывала выраженное нарушение редокс-баланса (окисляла сульфгидрильные группы митохондриальных белков, восстановленный глутатион) и дыхательной активности митохондрий (увеличивала скорость субстрат-зависимого дыхания (V_2), значительно снижала скорость потребления кислорода, сопряженного с фосфорилированием (V_3), нарушала сопряжение дыхания и фосфорилирования), существенно ингибировала один из ключевых ферментов цикла Кребса – α -кетоглутаратдегидрогеназу [8]. Нами показано, что в эритроцитах НОСІ *in vitro* индуцирует сложные изменения площади поверхности и микротекучести плазматической мембраны, морфологии (набухание, эхиноцитоз) и стабильности клеток, приводящие к лизису [9, 10]. Воздействие гипохлорной кислоты (100–1000 мкМ) на эритроциты приводит к быстрому окислению внутриэритроцитарного восстановленного глутатиона, не вызывая перекисного окисления липидов, к возрастанию осмотической хрупкости эритроцитов, формированию короткоживущих пор диаметром 0,7 нм в эритроцитарной

мембране [10]. Изучение механизмов и закономерностей взаимодействия клеток и клеточных органелл, в первую очередь митохондрий, с НОС1 позволит выяснить механизм воспалительных процессов. Лейкоцитарная инфильтрация и активация нейтрофилов в очагах воспаления в ткани печени, последующая гиперпродукция НОС1 представляют один из патобиохимических механизмов токсического поражения печени.

Цель настоящей работы – определить изменения морфологии (и функциональной активности) митохондрий клеток печени крыс, эритроцитов крыс и клеток линии В14 при окислительном воздействии гипохлорной кислоты *in vitro*.

Материалы и методы исследования. Методика. Реактивы. В работе использовали гипохлорит натрия (NaOCl, при pH 7,4 в растворе присутствуют в равновесии NaOCl и OCl⁻), сахарозу, трис(гидроксиметил)аминометан (Трис-HCl), этилендиаминтетраацетат (ЭДТА), аденозиндифосфат, трихлоруксусную кислоту (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, США, или Steinheim, Германия), флуоресцентный зонд сафранин О (Molecular Probes, Inc., США), остальные реактивы аналитической степени чистоты (POCH, Poland, Реахим, Россия). Растворы готовили, используя воду, очищенную системой Milli-Q.

Митохондрии изолировали методом дифференциального центрифугирования [11]. Печень извлекали на холоду (4 °С), осушали фильтровальной бумагой, взвешивали и гомогенизировали в гомогенизаторе (тефлон-стекло) (600 об/мин, 1 мин) в охлажденной среде выделения, содержащей 0,25 М сахарозы, 0,02 М Трис-HCl и 0,001 М ЭДТА, pH 7,2, при 4 °С. Ядерную фракцию удаляли путем центрифугирования при 600 g в течение 10 мин при 4 °С. Для осаждения митохондрий полученный супернатант центрифугировали при 8500 g в течение 10 мин при 4 °С, далее митохондриальный осадок дважды промывали в среде выделения при 4 °С и ресуспендировали (концентрация белка 40–50 мг/мл). Для выяснения механизмов окислительного повреждения *in vitro* митохондрии экспонировали НОС1 в среде с 0,15 М KCl, 0,02 М KН₂PO₄ (pH 7,5), не содержащей Трис-HCl и ЭДТА, с целью исключения взаимодействия последних с окислителем. Концентрацию белка определяли по методу Лоури с соавт. [12].

Электронная микроскопия. Митохондрии (5 мг белка/мл) инкубировали в присутствии окислителя, 300 мкМ гипохлорной кислоты (10 мин, 25 °С, pH 7,5), далее центрифугировали при 8000 об/мин в течение 10 мин при 4 °С. Митохондрии (осадок) фиксировали в двух порциях 1 %-ного раствора четырехокси осмия на 0,1 М буфере Миллонига [13], pH 7,4, при 4 °С в течение 1,5 ч. После дегидратации в спиртах восходящей концентрации и ацетоне образцы заключали в смесь эпона и аралдита. Ультратонкие срезы (35 нм) изготавливали на микротоме Leica EM VC7, контрастировали солями тяжелых металлов [14, 15] и анализировали с помощью электронного микроскопа JEM-1011 (Япония) при 5000–40 000-кратном увеличении и ускоряющем напряжении 80 кВт. Для получения снимков использовали цифровую камеру Olympus Mega View III (Olympus, Германия) и пакет программ для обработки изображений iTEM (Olympus, Германия).

Показатели оценивали при 20 000-кратном увеличении микроскопа на 10 тестируемых площадях (полях зрения). При данном увеличении анализировали 250–500 профилей митохондрий репрезентативных микрофотографий. На этих же тестируемых площадях подсчитывали количество измененных митохондрий и рассчитывали их содержание на 1000 органелл. При 40 000-кратном увеличении микроскопа анализировали состояние внутренней мембраны митохондрий, средние величины общей длины крист, среднюю длину и количество крист в одной органелле.

Митохондриальный мембранный потенциал регистрировали, используя потенциал-чувствительный флуоресцентный зонд сафранин О (8 мкМ) и спектрофлуориметр Perkin-Elmer LS55 (Великобритания) и регистрируя флуоресценцию зонда при λ_{ex} и λ_{em} 495 и 586 нм соответственно [15]. Митохондрии (0,3 мг белка/мл) суспензировали при 25 °С в среде с 0,05 М сахарозы, 0,125 М KCl, 2,5 мМ KН₂PO₄, 5 мМ MgSO₄ (pH 7,4). В качестве субстрата дыхания использовали сукцинат (5 мМ). Мембранный потенциал (мВ) определяли, используя калибровочный график, представляющий зависимость интенсивность зонда от величины мембранного потенциала митохондрий, который рассчитывали согласно уравнению Нернста: $\Delta\Psi = 60\log[K^+]_{out}/[K^+]_{in}$ (мВ), где

$[K^+]_{in}$ – внутримитохондриальная концентрация ионов K^+ (120 мМ), $[K^+]_{out}$ – концентрация ионов K^+ в среде, которую изменяли в диапазоне 0–20 мМ [15] в присутствии ионофора валиномицина (0,28 мкМ). Полную деполяризацию митохондриальной мембраны контролировали, внося протонифор FCCP (0,5 мкМ).

Эритроциты получали, центрифугируя гепаринизированную кровь крыс при 3000 об/мин для отделения плазмы. Эритроциты дважды промывали изотоническим раствором NaCl (145 мМ NaCl, 1,9 мМ NaH_2PO_4 , 8,1 мМ Na_2HPO_4 , pH 7,4, PBS). Лизис эритроцитов индуцировали гипохлорной кислотой, эритроциты (0,05 %-ный гематокрит в PBS) подвергали действию различных концентраций HOCl при 20 °С, скорость гемолиза регистрировали по изменению величины светорассеяния суспензии эритроцитов, измеряемой как оптическая плотность суспензии на длине волны 670 нм.

Клетки линии В14 китайского хомячка (коллекция клеточных линий Института биофизики, Университет в Лодзи, Польша) выращивали в монослое в сбалансированной солевой среде Хэнкса, содержащей 10 мМ глюкозы (HBSS–глюкоза), pH 7,4, и 10 %-ную сыворотку новорожденных телят, в увлажненной атмосфере воздуха, содержащей 5 % CO_2 , при 37 °С. Перед экспериментом экспоненциально растущие прикрепленные клетки помещали в свежую среду HBSS–глюкоза (объем пробы – 1 мл). Клетки экспонировали различным концентрациям гипохлорной кислоты в течение 10 мин при 37 °С. Морфологию клеток линии В14 оценивали с помощью светового микроскопа Nikon Eclipse E400 (Japan) при 500-кратном увеличении.

Для статистической обработки данных использовали программу Microsoft Excel 2013 и пакет прикладных программ Statistica 6.0. Для малых выборок распределение оценивали с помощью критерия Шапиро–Уилка, результаты представляли как среднее значение 5–6 измерений \pm SEM. Для анализа результатов, демонстрирующих ненормальное распределение (согласно тесту Шапиро–Уилка), использовали тест Колмогорова–Смирнова. Уровень значимости различий считали достоверным при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. *Электронно-микроскопический анализ изменений ультраструктуры митохондрий при окислительном повреждении гипохлорной кислотой.* Электронно-микроскопические исследования позволяют получать новую информацию о структурно-функциональных изменениях при повреждающих воздействиях, что позволяет расширить представления о механизме патологических процессов. Полученные в нашем эксперименте репрезентативные электронные микрофотографии изолированных митохондрий печени интактных крыс представлены на рис. 1. Чистота фракции митохондрий составляла 90–95 %, примеси микросомальной фракции и лизосомоподобных структур – 5–10 %. В работе проанализировано 250–500 профилей митохондрий, представленных на нескольких репрезентативных микрофотографиях; поскольку электронные фотографии представляют образцы, полученные от одного животного, нами указывалась величина ошибки, а не степень достоверности различий.

Профили митохондрий отличались различными размерами, преимущественно округлой формой, матриксом умеренной электронной плотности и отчетливыми, неупорядоченно расположенными кристами. При этом кристы были не расширены и несколько укорочены. Такие митохондрии считаются промежуточными, ультраструктура которых соответствует их оптимальному энергетическому и биосинтетическому состоянию. Среди основной популяции митохондрий встречались единичные органеллы с матриксом пониженной электронной плотности и редуцированными низкоэнергетическими кристами (квалифицированы как измененные митохондрии) (см. таблицу).

На рис. 2 представлены репрезентативные электронные микрофотографии изолированных митохондрий, подвергшихся действию гипохлорной кислоты (300 мкМ, 10 мин, 25 °С). Чистота фракции митохондрий составляла 85–90 %. При повреждающем воздействии гипохлорной кислоты возрастало число измененных митохондрий, которые имели просветленный матрикс, укороченные и редуцированные кристы. В ультраструктуре основной популяции митохондрий не выявлено существенных деструктивных изменений по сравнению с контрольными митохондриями (рис. 2).

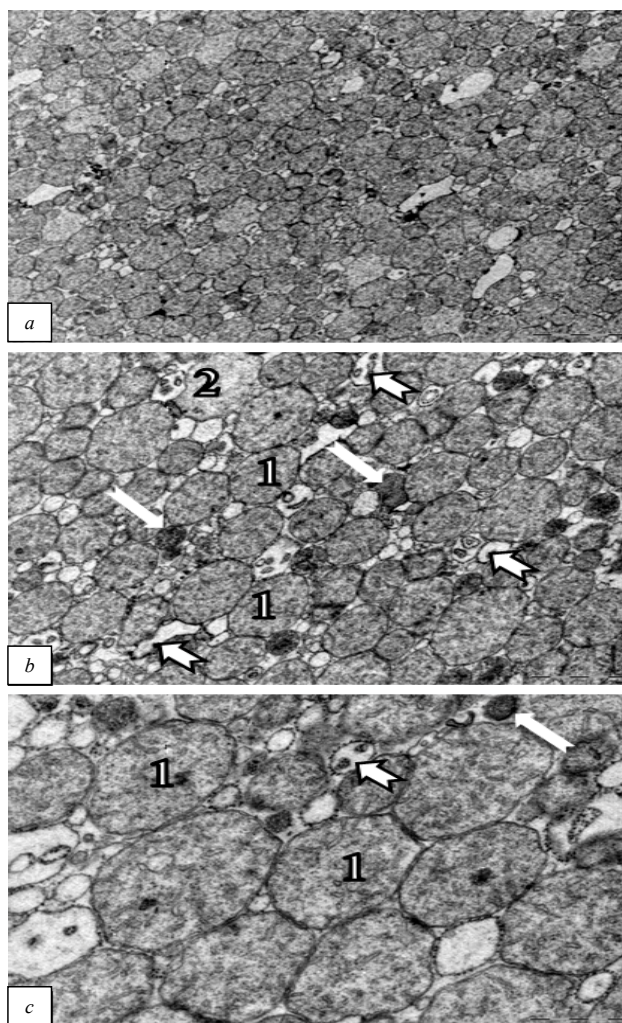


Рис. 1. Электронные микрофотографии митохондрий печени крыс (контроль): 1 – основная популяция митохондрий, отличающихся округлой формой, матриксом умеренной электронной плотности и укороченными, неупорядоченно расположенными кристами; 2 – измененная органелла, характеризующаяся электронно-светлым матриксом и редуцированными кристами; короткие стрелки – примеси микросомальной фракции, длинные стрелки – лизосомоподобные структуры ($a - \times 10\,000$, $b - \times 20\,000$, $c - \times 40\,000$; масштабный отрезок – 2,0; 1,0 и 0,5 мкм соответственно)

Fig. 1. Electron micrographs of rat liver mitochondria (control): 1 – the main population of mitochondria characterized by a rounded shape, a matrix of moderate electron density, and shortened, disordered cristae; 2 – modified organelle, characterized by an electron-bright matrix and reduced cristae; short arrows – microsomal impurities; long arrows – lysosome-like structures ($a - \times 10\,000$, $b - \times 20\,000$, $c - \times 40\,000$; scale length – 2.0; 1.0 and 0.5 microns respectively)

Морфометрические показатели, характеризующие структуру изолированных митохондрий печени крыс
Morphometric indicators characterizing the structure of isolated rat liver mitochondria

Морфометрический параметр	Контроль	НОС1
Измененные митохондрии, %	2,14	4,00
Средняя площадь сечения одной митохондрии, мкм ²	0,32	0,28
Средний периметр одной митохондрии, мкм	2,16	2,06
Соотношение сторон митохондрий	1,62	1,83
Фактор элонгации	1,63	1,83
Средняя относительная электронная плотность митохондрий,	127,51	117,84
Диаметр митохондрий:		
эквивалентного круга	0,61	0,57
макс.	0,79	0,79

Окончание таблицы

Морфометрический параметр	Контроль	НОС1
мин.	0,49	0,44
средн.	0,69	0,68
Сферичность	0,39	0,31
Фактор формы	0,79	0,77
Среднее к-во крист в одной митохондрии, шт.	4,20	3,60
Средняя длина одной кристы, мкм	0,119	0,114
Средняя суммарная длина крист в одной митохондрии, мкм	0,50	0,41

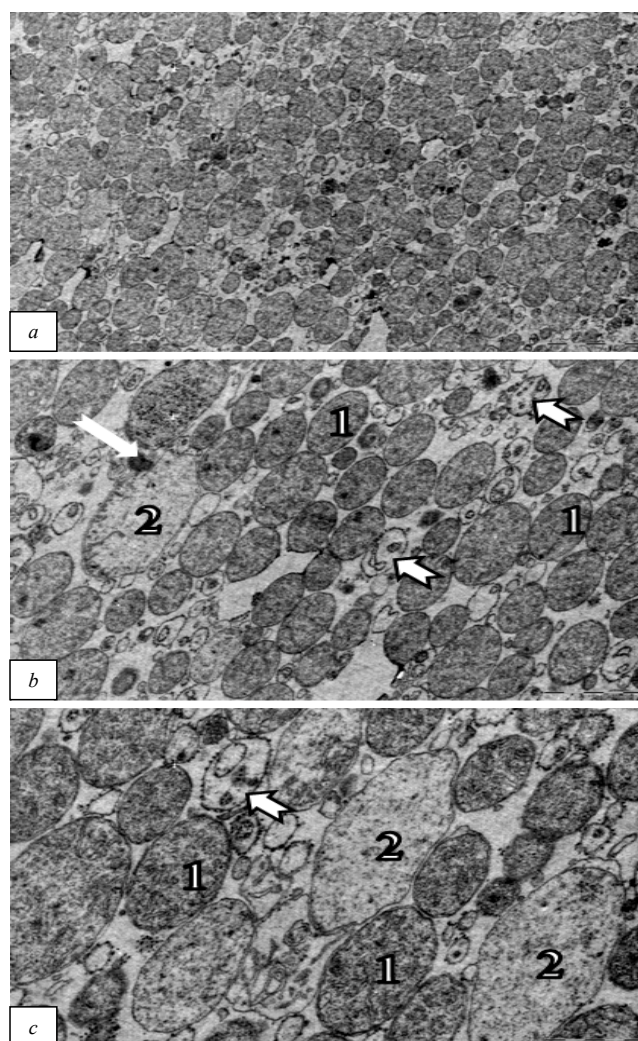


Рис. 2. Электронные микрофотографии митохондрий после воздействия гипохлорной кислоты (300 мкМ, 10 мин, 25 °С): 1 – основная популяция митохондрий, отличающихся овальной формой, матриком умеренной электронной плотности и укороченными, неупорядоченно расположенными кристами; 2 – измененные органеллы, характеризующиеся электронно-светлым матриком и редуцированными кристами; длинная стрелка – примеси микросомальной фракции, короткие стрелки – лизосомоподобные структуры (а – $\times 10\,000$, b – $\times 20\,000$, c – $\times 40\,000$; масштабный отрезок – 2,0; 1,0 и 0,5 мкм соответственно)

Fig. 2. Electron micrographs of mitochondria after exposure to hypochlorous acid (300 μM , 10 min, 250 °C): 1 – the main population of mitochondria, characterized by an oval shape, a matrix of moderate electron density and shortened, disordered cristae; 2 – modified organelles characterized by an electron-light matrix and reduced cristae; long arrow – microsomal fraction impurities; short arrows – lysosome-like structures (a – $\times 10\,000$, b – $\times 20\,000$, c – $\times 40\,000$; scale length – 2.0; 1.0 and 0.5 microns respectively)

В этой связи морфометрические измерения показали некоторое уменьшение (на 7,6 %) электронной плотности матрикса митохондрий (арифметическая средняя оценка всех оттенков серого цвета изучаемого объекта). Профили митохондрий отличались различными размерами, преимущественно овальной формой, матриксом умеренной электронной плотности и отчетливыми, неупорядоченно расположенными кристами. При этом кристы были не расширены и характеризовались различной длиной. Морфометрический анализ внутренней структуры изолированных митохондрий показал, что при воздействии гипохлорной кислотой на 18 % снижается средняя суммарная длина крист и на 14 % – среднее количество крист в одной митохондрии по сравнению с контролем. В то же время средняя длина одной кристы не изменяется (см. таблицу).

Визуально профили митохондрий были несколько уменьшены в размерах и удлинены. Эти наблюдения подтверждались морфометрическими измерениями (см. таблицу). Средняя площадь сечения одной митохондрии уменьшалась на 14 %, при этом появлялись отдельные митохондрии, увеличенные в размерах. Об удлинении профилей митохондрий свидетельствовало увеличение фактора элонгации на 12 % и фактора соотношения сторон (Aspect ratio) на 13 %, а также соотношение максимального и минимального диаметров структур. Таким образом, экспонирование гипохлорной кислоте (300 мкМ) индуцирует морфологические трансформации митохондрий: возрастание гетерогенности популяции митохондрий и числа измененных митохондрий, которые имели просветленный матрикс, укороченные и редуцированные кристы, средняя площадь сечения одной органеллы незначительно уменьшалась и удлинялся их профиль.

Морфологическим трансформациям митохондрий сопутствуют выраженные функциональные нарушения органелл, индуцируемые гипохлорной кислотой. При том же соотношении $[\text{HOCl}]/[\text{мг митохондриального белка}]$ наблюдалась протекающая во времени диссипация митохондриального мембранного потенциала, зависящая от концентрации окислителя (7–300 мкМ HOCl), что, вероятно, отражает повреждение митохондриальной мембраны (рис. 3). В то же время в митохондриях не выявлено формирования пор высокой проницаемости и сколько-нибудь

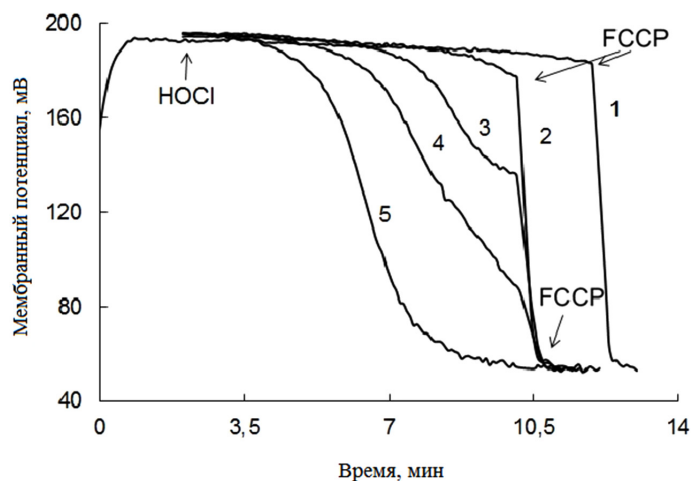


Рис. 3. Кинетические кривые деполяризации митохондриальной мембраны в присутствии различных концентраций гипохлорной кислоты (мкМ): 1 – 0 (контроль); 2 – 7; 3 – 30; 4 – 100; 5 – 300. Флуоресценцию сафранина O (8 мкМ) регистрировали при λ_{ex} и λ_{em} 495 и 586 нм соответственно в суспензии митохондрий (0,3 мг белка/мл) в среде с 0,05 М сахарозы, 0,01 М Трис-НСl, 0,125 М КСl, 2,5 мМ KH_2PO_4 , 5 мМ MgSO_4 (pH 7,4) при 25 °С. Стрелками указан момент внесения HOCl и FCCP (0,5 мкМ)

Fig. 3. Kinetic depolarization curves of the mitochondrial membrane in the presence of various concentrations of hypochlorous acid (μM): 1 – 0 (control); 2 – 7; 3 – 30; 4 – 100; 5 – 300. Safranin O fluorescence (8 μM) was recorded at λ_{ex} and λ_{em} 495 and 586 nm respectively in a suspension of mitochondria (0.3 mg protein/ml) in medium with 0.05 M sucrose, 0.01 M Tris-HCl, 0.125 M KCl, 2.5 mM KH_2PO_4 , 5 mM MgSO_4 (pH 7.4), 25 °C. The arrows indicate the moment of introduction of HOCl and FCCP (0.5 μM)

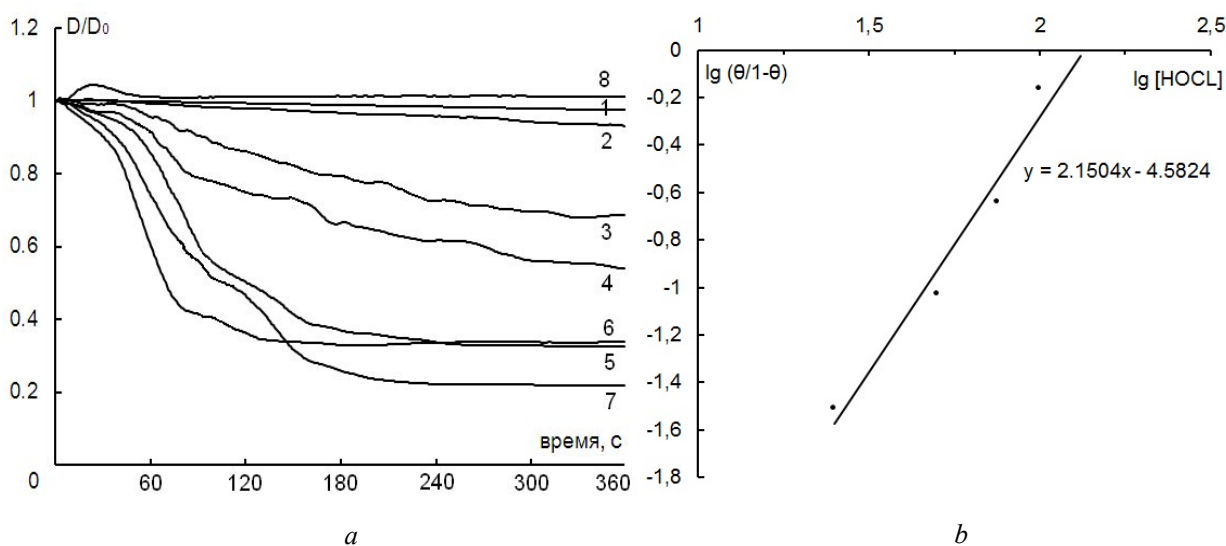


Рис. 4. Кинетические кривые изменения светорассеяния суспензии эритроцитов (0,05 %-ный гематокрит) при 20 °С, 145 мМ NaCl, 1,9 мМ NaH_2PO_4 , 8,1 мМ NaH_2PO_4 , pH 7,4 (PBS) при различных концентрациях HOCl (мкМ): 1 – контроль; 2 – 25; 3 – 50; 4 – 75; 5 – 100; 6 – 150; 7 – 200; 8 – 300 (a); график зависимости скорости гемолиза эритроцитов от концентрации гипохлорной кислоты (график Хилла) (b)

Fig. 4. Kinetic curves of changes in the light scattering of erythrocyte suspension (0.05 % hematocrit) at 20 °C, 145 mM NaCl, 1.9 mM NaH_2PO_4 , 8.1 mM NaH_2PO_4 , pH 7.4 (PBS) in the presence of various concentrations of HOCl (μM): 1 – control; 2 – 25; 3 – 50; 4 – 75; 5 – 100; 6 – 150; 7 – 200; 8 – 300 (a); plot of erythrocyte hemolysis rate versus hypochloric acid concentration (Hill's plot) (b)

значительного набухания митохондрий в присутствии HOCl [16], что согласуется с отсутствием значительных повреждений митохондрий, регистрируемых морфометрически (рис. 2).

Морфологические изменения эритроцитов и клеток линии В14. Морфометрические параметры – полезный инструмент для анализа структурных изменений, индуцируемых гипохлорной кислотой в клетках и клеточных органеллах. Воздействие HOCl в концентрации 25–300 мкМ на эритроциты крысы приводит к быстрому (60–180 с) лизису клеток, зависящему от дозы окислителя. На рис. 4, a представлены кинетические кривые изменения оптической плотности суспензии эритроцитов в присутствии различных концентраций окислителя. Как следует из кинетических кривых изменения светорассеяния суспензии эритроцитов, лизису предшествует изменение формы и размеров клеток. Гемолитический эффект зависит от соотношения $[\text{HOCl}]$ /число эритроцитов, интересным представляется факт отсутствия гемолиза при концентрации 300 мкМ. Вероятно, при этом происходит такая модификация мембран, которая препятствует их разрушению.

Основываясь на представлении о зависимости скорости HOCl-индуцируемого гемолиза от концентрации окислителя, с помощью кинетических кривых лизиса (рис. 4, b) нами представлена скорость гемолиза при различных концентрациях HOCl в соответствии с уравнением Хилла

$$\lg[Y/(1-Y)] = n\lg[\text{HOCl}] - \lg K_d,$$

где Y – доля эритроцитарных центров, взаимодействующих с HOCl, заполненных молекулами окислителя при соответствующей концентрации HOCl, n – коэффициент Хилла.

Нами рассчитаны параметры взаимодействия HOCl с эритроцитами: константа диссоциации взаимодействия HOCl с клеткой (сродство центров связывания к HOCl) – $K_d = 140 \pm 25$ мкМ; коэффициент Хилла – 2,1, характеризующий кооперативность процесса взаимодействия (число центров связывания).

Морфологические трансформации клеток линии В14 при воздействии окислителя регистрировали методом оптической микроскопии. Клетки линии В14 обладают характерной биполярной

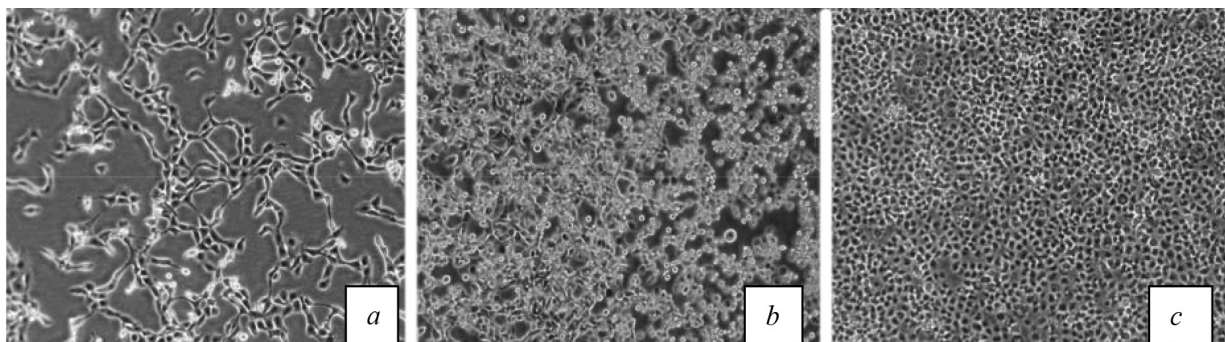


Рис. 5. Морфологические трансформации клеток линии В14 китайского хомячка при экспонировании различным концентрациям гипохлорной кислоты. Клетки обрабатывали окислительным агентом в течение 10 мин при 37 °С, HBSS – глюкоза, рН 7,4: *a* – контроль, *b* – 100 мкМ HOCl, *c* – 500 мкМ HOCl

Fig. 5. Morphological transformations of B14 Chinese hamster cell lines upon exposure to various concentrations of hypochlorous acid. Cells were treated with oxidizing agent for 10 min at 37 °C, HBSS – glucose, pH 7.4: *a* – control, *b* – 100 μM HOCl, *c* – 500 μM HOCl

формой, прикреплены к субстрату и образуют клеточные ассоциаты (рис. 5, *a*). Экспонирование клеток линии В14 гипохлорной кислоте приводит к выраженному нарушению их структуры (рис. 5, *b*, *c*): при концентрации окислителя 100 мкМ клетки теряют способность сорбироваться на субстрате и образовывать клеточные ассоциаты, приобретают сферическую форму и сжимаются. Степень повреждения усиливается при более высоких концентрациях окислителя (500 мкМ).

Таким образом, гипохлорная кислота (300 мкМ) индуцировала морфологические трансформации митохондрий: возростала гетерогенность популяции и увеличивалось число измененных органелл, отличающихся набухшим электронно-светлым матриксом и редуцированными кристами, при этом несколько снижались средняя суммарная длина крист и среднее количество крист в одной митохондрии по сравнению с контролем без изменения длины одной кристы, незначительно уменьшалась средняя площадь сечения одной митохондрии и удлинялись профили митохондрий (см. таблицу). Одновременно наблюдалась деполяризация митохондриальной мембраны, скорость и степень которой определяется концентрацией HOCl. Влияние окислителя на мембранный потенциал, связано, вероятно, с возрастанием протонной проницаемости внутренней митохондриальной мембраны в результате окислительного повреждения мембранных белков и отражает выраженное нарушение функциональной активности митохондрий.

Ранее нами показано, что HOCl в высоких концентрациях (200–300 мкМ) окисляет NADH в изолированных митохондриях клеток печени, но предотвращает индуцируемое ионами Ca²⁺ формирование митохондриальных пор высокой проницаемости [17]. В наших предыдущих экспериментах ультраструктурный и морфометрический анализ показал, что моделирование окислительного стресса с использованием другого окислительного агента, *терт*-бутилгидропероксида, вызывает существенные изменения и значительную гетерогенность митохондрий по размерам, при этом увеличивается число измененных митохондрий, обладающих электронно-светлым набухшим матриксом и редуцированными кристами, которые характеризуются пониженным биоэнергетическим и биосинтетическим потенциалом, уменьшаются среднее количество крист и суммарная длина крист в одной органелле [18]. В качестве одного из механизмов HOCl-зависимой цитотоксичности предполагают митохондриальные повреждения: HOCl-индуцируемые быстрые изменения белка Вах, формирование пор высокой проницаемости, нарушения кальциевого гомеостаза, истечение митохондриальных проапоптотических белков AIF и EndoG [7, 19]. Митохондриальные процессы могут быть связаны с эффектами продуктов гипохлорной кислоты, хлораминов. Так, хлорамин таурина, а не гипохлорная кислота, концентрируясь в митохондриях, является индуктором апоптоза, связанного повреждением

митохондрий, формированием пор высокой проницаемости, уменьшением мембранного потенциала, активацией каспазы-9 [20].

Развивающийся во времени НОСІ-индуцируемый лизис эритроцитов отражает взаимодействие окислителя с эритроцитарной мембраной, при этом с одним центром мембраны взаимодействуют две молекулы окислителя. Ранее в наших экспериментах активные формы хлора (гипохлорная кислота и хлорамины) в концентрации 50–200 мкМ ингибировали транспортные белки мембран эритроцитов человека: Na^+ -, K^+ - и Mg^{2+} -АТФ-азы, белки мультилекарственной резистентности за счет окисления сульфгидрильных групп мембранных белков [21]. Формирование пор в эритроцитарной мембране и нарушение пассивной ионной проницаемости являются причиной НОСІ-индуцируемого гемолиза [10].

Окислительные процессы, вызываемые гипохлорной кислотой, приводили к потере клетками линии В14 способности сорбироваться на субстрате, формировать ассоциаты и к последующему их сжатию, что можно рассматривать как подтверждение апоптотического механизма НОСІ-индуцируемой гибели клеток. Выраженные структурные и функциональные повреждения митохондриальных и плазматических мембран в клетках различных типов, обнаруженные нами, позволяют предположить, что мембранные структуры представляют, вероятно, важнейшие мишени действия гипохлорной кислоты.

Заключение. В настоящей работе с помощью морфометрических методов исследованы повреждения структуры митохондрий печени крыс, эритроцитов крыс и клеток линии В14, индуцируемые гипохлорной кислотой. Выяснение молекулярных механизмов и последствий действия гипохлорной кислоты на клетки млекопитающих, поиск мишеней представляют значительный интерес, учитывая роль последней в развитии воспаления. Гипохлорная кислота в концентрации, соответствующей ее локальной концентрации в тканях при патологии (30–300 мкМ), вызывает морфологические и функциональные повреждения митохондрий и клеток млекопитающих. Морфологические перестройки митохондрий печени крыс (возрастание гетерогенности популяции, просветленный матрикс, укорочение и редуцирование крист) соответствуют деполяризации митохондриальной мембраны, что отражает нарушение респираторной и синтетической функции органелл. На уровне целых клеток воздействие НОСІ вызывает лизис эритроцитов, которому предшествуют изменение формы и размеров клеток и глубокие повреждения клеток линии В14: клетки теряют способность сорбироваться на субстрате, образовывать клеточные ассоциаты, приобретают сферическую форму и сжимаются. Эффект НОСІ на клеточные процессы в различных типах клеток зависит от концентрации окислителя и длительности воздействия, митохондриальные и плазматические мембраны представляют, вероятно, важнейшие мишени действия гипохлорной кислоты. Таким образом, гипохлорная кислота индуцирует глубокие структурные и функциональные повреждения субклеточных органелл и клеток млекопитающих, что является одной из причин гибели клеток в очагах воспаления, развивающейся по некротическому или апоптотическому механизму.

Список использованных источников

1. Apoptotic pathways involved in U937 cells exposed to LDL oxidized by hypochlorous acid / S. Vicca [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2003. – Vol. 35, N 6. – P. 603–615. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(03\)00361-7](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(03)00361-7)
2. Chlorinative stress in age-related diseases: a literature review / M. Casciaro [et al.] // *Immun. Ageing.* – 2017. – Vol. 14, N 1. – P. 14–21. <https://doi.org/10.1186/s12979-017-0104-5>
3. Hypochlorous acid-mediated mitochondrial dysfunction and apoptosis in human hepatoma HepG2 and human fetal liver cells: role of mitochondrial permeability transition / M. Whiteman [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2005. – Vol. 38, N 12. – P. 1571–1584. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.02.030>
4. Neutrophils aggravate acute liver injury during obstructive cholestasis in bile duct-ligated mice / J. S. Gujral [et al.] // *Hepatology.* – 2003. – Vol. 38, N 2. – P. 355–363. <https://doi.org/10.1053/jhep.2003.50341>
5. Hypochlorous acid inhibits Ca^{2+} -ATPase from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum / T. G. Favero [et al.] // *J. Appl. Physiol.* – 1998. – Vol. 84, N 2. – P. 425–430. <https://doi.org/10.1152/jappl.1998.84.2.425>

6. Fernandes, R. M. Increased myeloperoxidase plasma levels in rheumatoid arthritis / R. M. Fernandes, N. P. da Silva, E. I. Sato // *Rheumatol. Int.* – 2011. – Vol. 32, N 6. – P. 1605–1609. <https://doi.org/10.1007/s00296-011-1810-5>
7. Yang, Y.-T. T. HOCl causes necrotic cell death in human monocyte derived macrophages through calcium dependent calpain activation / Y.-T. T. Yang, M. Whiteman, S. P. Gieseg // *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Res.* – 2012. – Vol. 1823, N 2. – P. 420–429. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.09.019>
8. Повреждение митохондрий печени крыс при интоксикации тетрахлорметаном. Эффекты мелатонина / Ю. З. Максимчик [и др.] // *Биол. мембраны.* – 2010. – Т. 27, № 3. – С. 262–271.
9. Hypochlorous acid damages erythrocyte membrane proteins and alters lipid bilayer structure and fluidity / I. B. Zavadnik [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2001. – Vol. 30, N 4. – P. 363–369. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(00\)00479-2](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(00)00479-2)
10. Hypochlorous acid-induced membrane pore formation in red blood cells / L. B. Zavadnik [et al.] // *Bioelectrochemistry.* – 2002. – Vol. 58, N 2. – P. 157–161. [https://doi.org/10.1016/s1567-5394\(02\)00151-2](https://doi.org/10.1016/s1567-5394(02)00151-2)
11. Johnson, D. Isolation of liver or kidney mitochondria / D. Johnson, H. A. Lardy // *Meth. Enzymol.* – 1967. – Vol. 10. – P. 94–96. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(67\)10018-9](https://doi.org/10.1016/0076-6879(67)10018-9)
12. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 193, N 1. – P. 265–275.
13. Millonig, G. A. Advantages of a phosphate buffer for osmium tetroxide solutions in fixation / G. A. Millonig // *J. Appl. Physics.* – 1961. – Vol. 32. – P. 1637–1643.
14. Reynolds, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy / E. S. Reynolds // *J. Cell. Biol.* – 1963. – Vol. 17, N 1. – P. 208–212. <https://doi.org/10.1083/jcb.17.1.208>
15. Watson, M. L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. II. Application of solutions containing lead and barium / M. L. Watson // *J. Cell Biol.* – 1958. – Vol. 4, N 6. – P. 727–730. <https://doi.org/10.1083/jcb.4.6.727>
16. Åkerman, K. E. O. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential / K. E. O. Åkerman, M. K. F. Wikström // *FEBS Lett.* – 1976. – Vol. 68, N 2. – P. 191–197. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(76\)80434-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(76)80434-6)
17. Calcium-induced mitochondrial permeability transitions: parameters of Ca²⁺ ion interactions with mitochondria and effects of oxidative agents / N. G. Golovach [et al.] // *J. Membr. Biol.* – 2017. – Vol. 250, N 2. – P. 225–236. <https://doi.org/10.1007/s00232-017-9953-2>
18. Ультраструктура митохондрий и содержание в них свободных аминокислот при моделировании *in vitro* окислительного стресса воздействием трет-бутилгидропероксида: протекторное действие флавоноидов клюквы / И. Б. Заводник [и др.] // *Лаб. диагностика. Вост. Европа.* – 2018. – № 1. – С. 112–124.
19. The pro-inflammatory oxidant hypochlorous acid induces Bax-dependent mitochondrial permeabilisation and cell death through AIF-/EndoG-dependent pathways / M. Whiteman [et al.] // *Cell. Signal.* – 2007. – Vol. 19, N 4. – P. 705–714. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2006.08.019>
20. Klamt, F. Taurine chloramine, an oxidant derived from neutrophils, induces apoptosis in human B lymphoma cells through mitochondrial damage / F. Klamt, E. Shacter // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280, N 22. – P. 21346–21352. <https://doi.org/10.1074/jbc.m501170200>
21. Hypochlorous acid inhibits glutathione S-conjugate export from human erythrocytes / M. Soszyński [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta. Biomembranes.* – 2002. – Vol. 1564, N 2. – P. 479–486. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(02\)00500-x](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(02)00500-x)

References

1. Vicca S., Massy Z. A., Hennequin C., Rihane D., Drüeke T. B., Lacour B. Apoptotic pathways involved in U937 cells exposed to LDL oxidized by hypochlorous acid. *Free Radical Biology and Medicine*, 2003, vol. 35, no. 6, pp. 603–615. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(03\)00361-7](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(03)00361-7)
2. Casciaro M., Di Salvo E., Pace E., Ventura-Spagnolo E., Navarra M., Gangemi S. Chlorinative stress in age-related diseases: a literature review. *Immunity and Ageing*, 2017, vol. 14, no. 1, pp. 14–21. <https://doi.org/10.1186/s12979-017-0104-5>
3. Whiteman M., Rose P., Siau J. L., Cheung N. S., Tan G. S., Halliwell B., Armstrong J. S. Hypochlorous acid-mediated mitochondrial dysfunction and apoptosis in human hepatoma HepG2 and human fetal liver cells: role of mitochondrial permeability transition. *Free Radical Biology and Medicine*, 2005, no. 38, no. 12, pp. 1571–1584. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.02.030>
4. Gujral J. S., Farhood A., Bajt M. L., Jaeschke H. Neutrophils aggravate acute liver injury during obstructive cholestasis in bile duct-ligated mice. *Hepatology*, 2003, vol. 38, no. 2, pp. 355–363. <https://doi.org/10.1053/jhep.2003.50341>
5. Favero T. G., Colter D., Hooper P. F., Abramson J. J. Hypochlorous acid inhibits Ca²⁺-ATPase from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Journal of Applied Physiology*, 1998, vol. 84, no. 2, pp. 425–430. <https://doi.org/10.1152/jappl.1998.84.2.425>
6. Fernandes R. M., da Silva N. P., Sato E. I. Increased myeloperoxidase plasma levels in rheumatoid arthritis. *Rheumatology International*, 2011, vol. 32, no. 6, pp. 1605–1609. <https://doi.org/10.1007/s00296-011-1810-5>
7. Yang Y.-T. T., Whiteman M., Gieseg S. P. HOCl causes necrotic cell death in human monocyte derived macrophages through calcium dependent calpain activation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research*, 2012, vol. 1823, no. 2, pp. 420–429. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.09.019>

8. Maksimchik Yu. Z., Dremza I. K., Lapshina E. A., Cheshchevik V. T., Sudnikovich E. Yu., Zabrodskaya S. V., Zavodnik I. B. Damage to rat liver mitochondria during carbon tetrachloride intoxication. Effects of melatonin. *Biologicheskie membrany = Biological membrane*, 2010, no. 27, pp. 262–271 (in Russian).
9. Zavodnik I. B., Lapshina E. A., Zavodnik L. B., Bartosz G., Soszynski M., Bryszewska M. Hypochlorous acid damages erythrocyte membrane proteins and alters lipid bilayer structure and fluidity. *Free Radical Biology and Medicine*, 2001, vol. 30, no. 4, pp. 363–369. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(00\)00479-2](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(00)00479-2)
10. Zavodnik L. B., Zavodnik I. B., Lapshyna E. A., Buko V. U., Bryszewska M. J. Hypochlorous acid-induced membrane pore formation in red blood cells. *Bioelectrochemistry*, 2002, vol. 58, no. 2, pp. 157–161. [https://doi.org/10.1016/s1567-5394\(02\)00151-2](https://doi.org/10.1016/s1567-5394(02)00151-2)
11. Johnson D., Lardy H. A. Isolation of liver or kidney mitochondria. *Methods in Enzymology*, 1967, no. 10, pp. 94–96. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(67\)10018-9](https://doi.org/10.1016/0076-6879(67)10018-9)
12. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 1951, vol. 193, no. 1, pp. 265–275.
13. Millonig G. A. Advantages of a phosphate buffer for osmium tetroxide solutions in fixation. *Journal of Applied Physics*, 1961, no. 32, pp. 1637–1643.
14. Reynolds E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, 1963, vol. 17, no. 1, pp. 208–212. <https://doi.org/10.1083/jcb.17.1.208>
15. Watson M. L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. II. Application of solutions containing lead and barium. *Journal of Cell Biology*, 1958, vol. 4, no. 6, pp. 727–730. <https://doi.org/10.1083/jcb.4.6.727>
16. Åkerman K. E. O., Wikström M. K. F. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. *FEBS Letters*, 1976, vol. 68, no. 2, pp. 191–197. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(76\)80434-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(76)80434-6)
17. Golovach N. G., Cheshchevik V. T., Lapshina E. A., Ilyich T. V., Zavodnik I. B. Calcium-induced mitochondrial permeability transitions: parameters of Ca²⁺ ion interactions with mitochondria and effects of oxidative agents. *Journal of Membrane Biology*, 2017, vol. 250, no. 2, pp. 225–236. <https://doi.org/10.1007/s00232-017-9953-2>
18. Zavodnik I. B., Kravchun R. I., Il'ich T. V., Glazev A. A., Lapshina E. A., Ostrovskaya O. B., Nefedov L. I., Klisa S. D., Kurbat M. N., Klimovich I. I. Mitochondrial ultrastructure and content of free amino acids in them during modeling of oxidative stress in vitro by the action of tert-butylhydroperoxide: protector action of flavonoids of cranberries. *Laboratornaya diagnostika. Vostochnaya Evropa = Laboratory diagnostics. Eastern Europe*, 2018, no. 1, pp. 112–124 (in Russian).
19. Whiteman M., Chu S. H., Siau J. L., Rose P., Sabapathy K., Schantz J. T., Cheung N. S., Spencer J. P., Armstrong J. S. The pro-inflammatory oxidant hypochlorous acid induces Bax-dependent mitochondrial permeabilisation and cell death through AIF-/EndoG-dependent pathways. *Cellular Signalling*, 2007, vol. 19, no. 4, pp. 705–714. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2006.08.019>
20. Klamt F., Shacter E. Taurine chloramine, an oxidant derived from neutrophils, induces apoptosis in human B lymphoma cells through mitochondrial damage. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, vol. 280, no. 22, pp. 21346–21352. <https://doi.org/10.1074/jbc.m501170200>
21. Soszyński M., Zavodnik I. B., Zavodnik L. B., Zylinska L., Bartosz G., Bryszewska M. Hypochlorous acid inhibits glutathione S-conjugate export from human erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 2002, vol. 1564, no. 2, pp. 479–486. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(02\)00500-x](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(02)00500-x)

Информация об авторах

Заводник Илья Борисович – д-р биол. наук, профессор, заведующий кафедрой. Гродненский государственный университет им. Янки Купалы (ул. Ожешко, 22, 230023, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: zavodnik_il@mail.ru

Кравчук Римма Ивановна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, г. Гродно, 230015, Республика Беларусь). E-mail: cnil@grsmu.by

Ильич Татьяна Викторовна – аспирант. Гродненский государственный университет им. Янки Купалы (ул. Ожешко, 22, 230023, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: Tatyana-luchic@yandex.ru

Лапшина Елена Алексеевна – канд. биол. наук, доцент. Гродненский государственный университет им. Янки Купалы (ул. Ожешко, 22, 230023, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: Lapshina_EA@grsu.by

Вейко Артем Геннадьевич – аспирант. Гродненский государственный университет им. Янки Купалы (ул. Ожешко, 22, 230023, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: Wei93@yandex.ru

Information about the authors

Ilya B. Zavodnik – D. Sc. (Biol.), Professor, Head of the Department. Yanka Kupala State University of Grodno (22, Ozheshko Str., 230023, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: zavodnik_il@mail.ru

Rimma I. Kravchuk – Ph. D. (Biol.), Senior researcher. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230015, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: cnil@grsmu.by

Tatsiana V. Ilyich – Postgraduate student. Yanka Kupala State University of Grodno (22, Ozheshko Str., 230023, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: Tatyana-luchic@yandex.ru

Elena A. Lapshina – Ph. D. (Biol.), Assistant Professor. Yanka Kupala State University of Grodno (22, Ozheshko Str., 230023, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: Lapshina_EA@grsu.by

Artem G. Veiko – Postgraduate student. Yanka Kupala State University of Grodno (22, Ozheshko Str., 230023, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: Wei93@yandex.ru

Заводник Лев Борисович – канд. мед. наук, доцент. Гродненский государственный университет им. Янки Купалы (ул. Ожешко, 22, 230023, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: Zavodnik_LB@grsu.by

Островская Оксана Борисовна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, г. Гродно, 230015, Республика Беларусь). E-mail: Astrowskaja@gmail.com

Курбат Михаил Николаевич – канд. мед. наук, доцент, заведующий лабораторией. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, г. Гродно, 230015, Республика Беларусь). E-mail: vwmisha@mail.ru

Lev B. Zavodnik – Ph. D. (Med.), Assistant Professor. Yanka Kupala State University of Grodno (22, Ozheshko Str., 230023, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: Zavodnik_LB@grsu.by

Oxana B. Astrowskaja – Ph. D. (Biol.), Senior researcher. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230015, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: Astrowskaja@gmail.com

Mihail N. Kurbat – Ph. D. (Med.), Assistant Professor, Head of the Laboratory. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230015, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: vwmisha@mail.ru