

УДК 577.352.33:577.359:504.055

## КОМБИНИРОВАННОЕ ДЕЙСТВИЕ ДЕКСАМЕТАЗОНА И ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА НА СТРУКТУРНОЕ СОСТОЯНИЕ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН ТИМОЦИТОВ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

И. В. ПУХТЕЕВА<sup>1)</sup>, Н. В. ГЕРАСИМОВИЧ<sup>1)</sup>, М. Д. ГИЛЬ<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Международный государственный экологический институт им. А. Д. Сахарова,  
Белорусский государственный университет,  
ул. Долгобродская, 23/1, 220070, г. Минск, Беларусь

Исследуются структурные изменения плазматических мембран клеток иммунной системы при комбинированном действии дексаметазона и перекиси водорода. С помощью флуоресцентного зонда пирена (Sigma) проводилось изучение липидной фазы мембран, а для рассмотрения влияния глюкокортикоидов на клетки тимуса к суспензии клеток добавляли синтетический аналог глюкокортикоидных гормонов дексаметазон в различных концентрациях. Окислительный стресс моделировали путем инкубации суспензии тимоцитов с пероксидом водорода. Установлено, что дексаметазон, взаимодействуя с мембранами тимоцитов, вызывает изменение физико-химических характеристик плазматических мембран клеток тимуса. Наиболее выраженные изменения наблюдались в области аннулярных липидов, микровязкость в этой области увеличивалась в 1,5–2 раза в зависимости от времени инкубации и концентрации дексаметазона. Экзогенное воздействие перекиси водорода на клетки тимуса приводит к таким изменениям в структурном состоянии плазматических мембран тимоцитов, как увеличение полярности в 1,3 раза, микровязкости в области аннулярных липидов в 2 раза и липидного бислоя в 1,7 раза, а также повышение

### Образец цитирования:

Пухтеева ИВ, Герасимович НВ, Гиль МД. Комбинированное действие дексаметазона и перекиси водорода на структурное состояние плазматических мембран тимоцитов экспериментальных животных. *Журнал Белорусского государственного университета. Экология.* 2024;4:74–84.  
<https://doi.org/10.46646/2521-683X/2024-4-74-84>

### For citation:

Puhteeva IV, Gerasimovich NV, Gil MD. The combined effect of dexamethasone and hydrogen peroxide on the structural state of the plasma membranes of thymocytes of experimental animals. *Journal of the Belarusian State University. Ecology.* 2024;4:74–84. Russian.  
<https://doi.org/10.46646/2521-683X/2024-4-74-84>

### Авторы:

**Ирина Викторовна Пухтеева** – старший преподаватель кафедры экологической медицины и радиобиологии.

**Наталья Васильевна Герасимович** – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры экологической медицины и радиобиологии.

**Маргарита Дмитриевна Гиль** – магистрант факультета экологической медицины.

### Authors:

**Irina V. Puhteeva**, senior lecturer at the department of environmental medicine and radiobiology.

[puhteeva@mail.ru](mailto:puhteeva@mail.ru)

**Natalya V. Gerasimovich**, PhD (biology), docent; associate professor at the department of environmental medicine and radiobiology.

[nygerasimovich@mail.ru](mailto:nygerasimovich@mail.ru)

**Margarita D. Gil**, master's student, faculty of environmental medicine.

[margopear@mail.ru](mailto:margopear@mail.ru)

степени тушения белковой флуоресценции в 2 раза. Эти результаты свидетельствуют об активации процессов перекисного окисления липидов, вызванных воздействием пероксида водорода на клетки, что указывает на его влияние на изменение структурного состояния плазматических мембран тимоцитов. Необходимо отметить, что уменьшение показателей микровязкости липидного бислоя в данных опытах наблюдалось вследствие мембранопосредованного действия перекиси водорода, поскольку данное вещество активирует процессы перекисного окисления липидов. Таким образом, комбинированное действие перекиси водорода и дексаметазона приводит к следующим изменениям: увеличение полярности аннулярных липидов и микровязкости аннулярного липида, уменьшение микровязкости липидного бислоя, а также снижение степени тушения белковой флуоресценции. Минимальные и максимальные концентрации данных веществ имеют различный эффект на указанные параметры, что может быть обусловлено сложным взаимодействием между перекисью водорода и дексаметазона.

**Ключевые слова:** дексаметазон; окислительный стресс; плазматическая мембрана; тимоциты; пирен.

## THE COMBINED EFFECT OF DEXAMETHASONE AND HYDROGEN PEROXIDE ON THE STRUCTURAL STATE OF THE PLASMA MEMBRANES OF THYMOCYTES OF EXPERIMENTAL ANIMALS

*I. V. PUHTEEVA<sup>a</sup>, N. V. GERASIMOVICH<sup>a</sup>, M. D. GIL<sup>a</sup>*

*<sup>a</sup>International Sakharov Environmental Institute, Belarusian State University,  
23/1 Daŭhabrodskaja Street, Minsk 220070, Belarus  
Corresponding author: I. V. Puhteeva (puhteeva@mail.ru)*

The aim of the work is to study structural changes in the plasma membranes of cells of the immune system under the combined action of dexamethasone and hydrogen peroxide. Using a pyrene fluorescent probe (Sigma), the lipid phase of membranes was studied. To study the effect of glucocorticoids on thymocytes, a synthetic analogue of the glucocorticoid dexamethasone was added to the cell suspension in various concentrations. Oxidative stress was simulated by incubation of a suspension of thymocytes with hydrogen peroxide. The work found that glucocorticoids, interacting with thymocyte membranes, cause a change in the physicochemical characteristics of the plasma membranes of thymus cells. The most pronounced changes were observed in the area of annular lipids, the microviscosity in this area increased by 1.5–2 times depending on the incubation time and dexamethasone concentration. The exogenous effect of hydrogen peroxide on thymocytes leads to changes in the structural state of thymocyte plasma membranes, such as a 1.3-fold increase in polarity, a 2-fold increase in microviscosity in the area of annular lipids and a 1.7-fold increase in the lipid bilayer, as well as a 2-fold increase in the degree of protein fluorescence quenching. These results indicate the activation of lipid peroxidation processes caused by the effect of hydrogen peroxide on cells, which indicates the effect of hydrogen peroxide on changes in the structural state of thymocyte plasma membranes. It should be noted that a decrease in the microviscosity of the lipid bilayer in these experiments was observed as a result of the membrane-mediated action of hydrogen peroxide, since this substance activates the processes of lipid peroxidation. Thus, the combined action of hydrogen peroxide and dexamethasone leads to such changes as: an increase in the polarity of annular lipids and the microviscosity of annular lipids, a decrease in the microviscosity of the lipid bilayer, as well as a decrease in the degree of attenuation of protein fluorescence. The minimum and maximum concentrations of these substances have a different effect on these parameters, which may be due to the complex interaction between hydrogen peroxide and dexamethasone.

**Keywords:** dexamethasone; oxidative stress; plasmatic membrane; thymocytes; pyrene.

### Введение

Глюкокортикоиды – это группа гормонов надпочечников, которые образуются из холестерина и высвобождаются в стрессовой ситуации. При высвобождении они связываются с кортикостероидсвязывающим глобулином (КСГ), что делает их доступными для использования на системном или тканевом уровне. Их функция осуществляется путем внутриклеточного связывания с глюкокортикоидным рецептором (ГР) NR3C1. Это так называемый классический механизм передачи сигнала посредством глюкокортикоидов, который включает транскрипционную регуляцию. Таким образом, многие важные действия ГР заключаются в модуляции транскрипции генов посредством ряда различных и взаимодополняющих механизмов. Гены-мишени включают большинство таких медиаторов воспаления, как хемокины, цитокины, факторы роста и их рецепторы [1].

В настоящее время установлены относительно быстрые эффекты глюкокортикоидов, которые реализуются через мембранные рецепторы и не связаны с геномной регуляцией действия стероидов [2]. Хотя название «глюкокортикоиды» происходит от их влияния на уровень глюкозы в плазме крови, они также

участвуют в катаболическом метаболизме, воспалительном и иммунном ответе и других физиологических функциях.

Основными глюкокортикоидами, участвующими в реакции на стресс, являются кортизол, кортизон и кортикостерон. Их концентрация позволяет классифицировать виды животных как кортизол-доминантные (большинство млекопитающих) или кортикостерон-доминантные (например, крысы, мыши, птицы или рептилии) [3].

Глюкокортикоиды влияют на широкий спектр метаболических, противовоспалительных, иммуносупрессивных и когнитивных сигнальных процессов, играя важную роль в гомеостазе и сохранении нормальной функции органов. Синтез регулируется гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой (ГПА) осью, основным глюкокортикоидом которой у человека является кортизол. Синтетические глюкокортикоиды – важные фармакологические агенты, которые усиливают противовоспалительные и иммуносупрессивные свойства эндогенного кортизола. Гомеостатическая активность кортизола нарушается при приеме синтетических глюкокортикоидов, поэтому существует интерес к разработке вариантов лечения, которые минимизируют нарушение оси ГПА, сохраняя при этом фармакологические эффекты. Исследования свидетельствуют, что оптимизация времени введения препарата может достичь этой цели [4].

Окислительный стресс возникает, когда баланс между образованием активных форм кислорода (АФК) и детоксикацией способствует увеличению его уровней, что приводит к нарушению клеточной функции. АФК вызывают повреждение клеточных макромолекул, вызывая перекисное окисление липидов, изменения нуклеиновых кислот и белков [5]. Окислительная дегградация липидов дает малоновой диальдегид и 4-гидроксиноненаль, а также изопростаны из ненасыщенных жирных кислот. Повреждение белка может произойти в результате окисления тиолов, карбонилирования, окисления боковой цепи, фрагментации, разворачивания и неправильного сворачивания, что приводит к потере активности. 8-гидроксидезокси-гуанозин является показателем повреждения ДНК [6]. Чтобы поддерживать правильную передачу сигналов в клетках, вполне вероятно, что ряд ферментов, поглощающих радикалы, поддерживают пороговый уровень АФК внутри клетки. Однако, когда уровень АФК превышает этот порог, увеличение его производства может привести к избыточным сигналам в клетку, а также к прямому повреждению ключевых компонентов сигнальных путей. АФК могут необратимо повреждать важные макромолекулы. Связанный с мембраной белковый тиол и небелковый тиол являются основными цитозольными низкомолекулярными сульфгидрильными соединениями, которые действуют как клеточный восстановитель и защитный реагент от многочисленных токсичных веществ, включая большинство неорганических загрязнителей, через группу  $-SH$ . Следовательно, тиол часто является первой линией защиты от окислительного стресса. Было обнаружено, что флавоноиды играют важную роль в неферментативной защите от окислительного стресса, особенно в случае рака. Они широко встречаются в чае, фруктах, красном вине, овощах и какао. Флавоноиды, включая флавоны, флаваноны, флавонолы и изофлавоны, представляют собой полифенольные соединения, которые широко распространены в пищевых продуктах и напитках и обладают широким спектром биологической активности, антиоксидантная активность которых широко изучена [5]. Определено понятие антиоксиданта, а также рассмотрены существующие классификационные критерии: первичные антиоксиданты в основном являются прерывателями цепей, способными удалять радикалы путем донорства водорода; вторичные антиоксиданты – это тушители синглетного кислорода, разлагатели пероксидов, хелаторы металлов, ингибиторы окислительных ферментов или поглотители УФ-излучения [6]. Таким образом, окислительный стресс вызывает необратимые повреждения клеточных макромолекул, что приводит к инициации таких заболеваний, как атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, заболевания печени, диабет, а также к инициации канцерогенеза. Антиоксиданты подавляют выработку активных форм кислорода и удаление свободных радикалов [5].

Термин «окислительный стресс» используется для обозначения «чрезмерного» образования активных форм кислорода в клетке. Такое повышение концентрации может быть вызвано активацией систем генераций активных форм кислорода (АФК) или снижением активности антиоксидантной системы. В литературе описано множество заболеваний, при которых окислительный стресс наблюдается на начальных стадиях или имеет место в течение всего периода протекания заболевания. Важнейшими АФК считаются супероксидный радикал, синглетный кислород, гидроксильный и пероксидный радикалы, перекись водорода, пероксидный ион, гипохлорит ион [7].

К генерации перекиси водорода в клетке способны митохондрии, микросомы, пероксисомы и цитоплазматические ферменты. В последнее время в литературе появилось много данных о митохондриальных ферментах, способных генерировать АФК. Однако основную роль в этом процессе в митохондриях отводят ферментам дыхательной цепи. Генерация перекиси водорода чувствительна к состоянию дыхательной цепи. Если в митохондриях присутствуют субстраты окисления, кислород и аденозиндифосфат (АДФ), дыхание активируется, так как электрохимический градиент постоянно тратится на

образование АТФ. При этом генерация перекиси не происходит. Когда АДФ исчерпывается, дыхание замедляется, уровень восстановленности никотинамидадениндинуклеотида увеличивается и происходит генерация  $H_2O_2$  [8]. В работе акцентируется внимание на исследовании структурных изменений плазматических мембран клеток иммунной системы при комбинированном действии дексаметазона и перекиси водорода.

### Материалы и методы исследования

Объектом исследования выступали тимоциты крыс. Выделение тимоцитов проводили по методу, как описано в работе [9]. С помощью флуоресцентного зонда пирена (Sigma) проводили исследование липидной фазы мембран. В данном случае анализировалась степень эксимеризации пирена, эффективность тушения пиреном триптофановой флуоресценции, полярность окружения зонда в приобластном липиде и липидном бислое мембран. Внедрение зонда осуществляли, как описано в работе [10], путем преинкубации его спиртового раствора с суспензией клеток ( $10^6$  кл/мл), находящихся в фосфатном буфере (рН 7,4). Конечная концентрация зонда в среде инкубации составляла 4 мкМ/л. Регистрацию спектров флуоресценции осуществляли на спектрофлуориметре СМ 2203 при длинах волн возбуждения 337 и 286 нм (рис. 1).

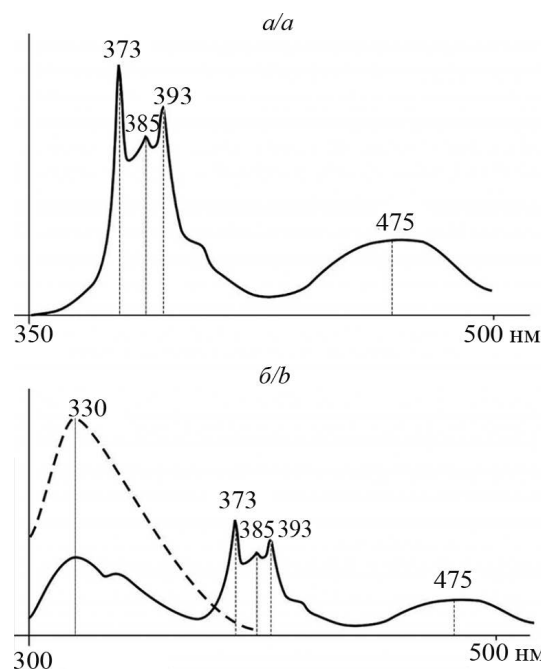


Рис. 1. Спектр флуоресценции пирена при  $\lambda_{\text{воз}}=337$  нм (а) и  $\lambda_{\text{воз}}=286$  нм (б); 373, 385, 393 нм – максимум вибрационных пиков мономерной эмиссии пирена; 475 нм – максимум вибрационных пиков эксимерной эмиссии пирена; 330 нм – максимум собственной триптофановой флуоресценции (до - - - и после — тушения)

Fig. 1. The fluorescence spectrum of pyrene at  $\lambda_{\text{ext}}=337$  nm (a) and  $\lambda_{\text{ext}}=286$  nm (b); 373, 385, 393 nm is the maximum vibrational peaks of the monomeric emission of pyrene; 475 nm is the maximum of vibrational peaks of the excimer emission of pyrene; 330 nm is the maximum of intrinsic tryptophan fluorescence (before - - - and after — intrinsic)

Показатели полярности и микровязкости общего липидного бислоя рассчитывали при длине волны возбуждения 337 нм по следующим формулам [10]:

- полярность общего липидного бислоя при  $\lambda_{\text{воз}}=337$  нм  $I_{385} / I_{373}$ ;
- микровязкость общего липидного бислоя при  $\lambda_{\text{воз}}=337$  нм  $I_{475} / I_{373}$ ;

Вышеуказанные показатели для области аннулярных липидов рассчитаны по следующим формулам [10]:

- полярность аннулярного липида при  $\lambda_{\text{воз}}=286$  нм  $I_{385} / I_{373}$ ;
- микровязкость аннулярного липида при  $\lambda_{\text{воз}}=286$  нм  $I_{475} / I_{373}$ .

Степень тушения белковой (триптофановой) флуоресценции пиреном рассчитывали следующим образом:

$$\text{Степень тушения} = 1 - \frac{I_{330}^{286} (+ \text{ пирен})}{I_{330}^{286} (- \text{ пирен})}$$

Для исследования влияния глюкокортикоидов на клетки тимуса к суспензии клеток добавляли синтетический аналог глюкокортикоидных гормонов дексаметазон в концентрациях 0,5, 1 и 2 мкМ. Время инкубации суспензии клеток с раствором глюкокортикоида составляло 0, 15, 30, 60 мин, процедура проводилась

при 37 °С. Через указанные промежутки времени производили оценку выживаемости клеток тимуса, а также состояние плазматических мембран клеток.

Окислительный стресс моделировали следующим образом: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> добавляли к суспензии тимоцитов в концентрациях 5 нМ и 5 мкМ. Определение процента погибших клеток, а также регистрация изменений структурного состояния плазматических мембран проводились через каждые 15 мин в течение часа инкубации.

Для моделирования комбинированного действия препаратов осуществляли следующие операции: клетки предварительно инкубировали с дексаметазоном в течение 30 мин, затем добавляли перекись водорода в концентрациях и инкубировали в течение 30 мин. В конце производили отмывку суспензии клеток от действующих веществ и оценивали состояние плазматических мембран.

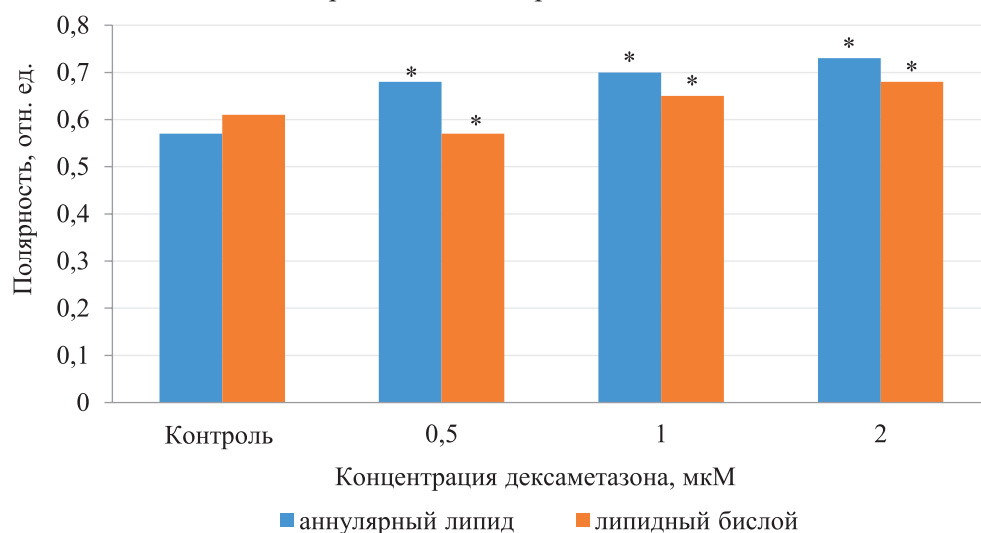
**Методы оценки.** Результаты экспериментов выражали в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего, а достоверность различий в группах оценивали по *t*-критерию Стьюдента. При этом различия считали достоверными при  $p \leq 0,05$ .

### Результаты исследования и их обсуждение

В работе проанализировано влияние синтетического аналога глюкокортикоидных гормонов дексаметазона на состояние липидного компонента мембран тимоцитов крыс. Для того оценивались такие показатели, как микровязкость, полярность и степень тушения белковой флуоресценции.

Как следует из представленных данных, полярность аннулярных липидов увеличивалась при всех тестируемых концентрациях дексаметазона, при этом наблюдалась тенденция к увеличению данного показателя в зависимости от концентрации дексаметазона в среде инкубации. При самой низкой концентрации (0,5 мкМ) полярность аннулярных липидов увеличилась на 19 % по сравнению с контролем. При увеличении концентрации вдвое данная величина возрастала на 22 %. Когда концентрация дексаметазона в среде инкубации составила 2 мкМ, полярность аннулярного липида увеличилась на 28 % по сравнению с контролем (рис. 2).

Изменения полярности липидного бислоя носили иной характер. При концентрации дексаметазона 0,5 мкмоль/л этот показатель незначительно снижался (на 7 % от контрольной величины). При концентрации вещества 1 мкМ величина полярности липидного бислоя увеличилась на 7 %, а при 2 мкМ увеличение данного показателя достигло 11 % по сравнению с контролем.



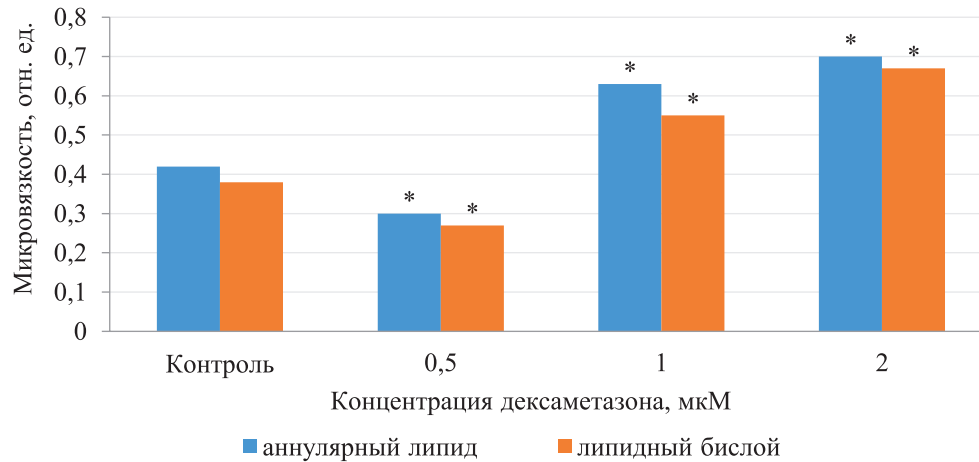
\*Отличия от контроля достоверны,  $p \leq 0,05$ .

Рис. 2. Изменение полярности плазматических мембран тимоцитов при действии дексаметазона

Fig. 2. Change in the polarity of thymocyte plasma membranes under the action of the dexamethasone

На рис. 3 показана динамика изменения микровязкости аннулярного липида при действии дексаметазона. В контроле данный показатель составлял  $0,42 \pm 0,05$  отн. ед. При действии дексаметазона в концентрации 0,5 мкМ микровязкость снизилась на 29 % от контрольной величины. В случае воздействия дексаметазона в концентрации 1 мкМ/л обнаружено увеличение показателя в 1,5 раза, а при действии дексаметазона в концентрации 2 мкМ – на 66 %.

Характер изменения показателя микровязкости липидного бислоя был примерно таким же: при действии дексаметазона в концентрации 0,5 мкМ/л обнаружено снижение на 29 %, при действии концентрации 1 мкМ/л – увеличение на 44 %, при концентрации дексаметазона 2 мкМ/л – увеличение на 76 %.

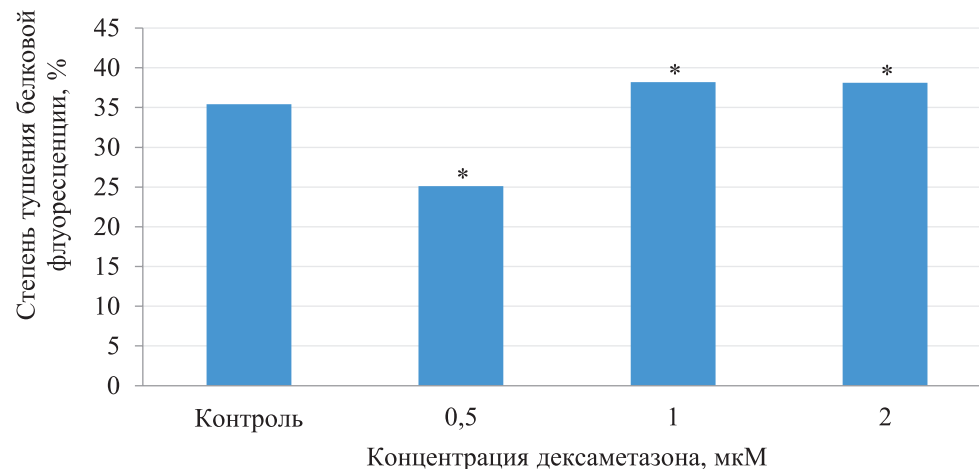


\*Отличия от контроля достоверны,  $p \leq 0,05$ .

Рис. 3. Изменение микровязкости плазматических мембран тимоцитов при действии дексаметазона

Fig. 3. Changes in the microviscosity of thymocyte plasma membranes under the action of the dexamethasone

Степень тушения белковой флуоресценции, которая представлена на рис. 4, изменялась незначительно в зависимости от концентрации дексаметазона в отличие от показателей микровязкости и полярности мембраны.



\*Отличия от контроля достоверны,  $p \leq 0,05$ .

Рис. 4. Изменение степени тушения белковой флуоресценции плазматических мембран тимоцитов при действии дексаметазона

Fig. 4. Changes in the degree of quenching of protein fluorescence of thymocyte plasma membranes under the action of the dexamethasone

Данные, которые получены при действии дексаметазона в концентрации 1 мкМ и 2 мкМ, указывают на то, что степень тушения триптофановой флуоресценции пиреном увеличилась незначительно, примерно на 8 %. При действии самой низкой концентрации дексаметазона степень тушения белковой флуоресценции снизилась на 29 % по отношению к контрольным значениям. Следующая серия экспериментов была направлена на изучение влияния оксидативного стресса на тимоциты.

Изучение влияния минимальной концентрации  $H_2O_2$  (5·нМ) на изменение структурного состояния плазматических мембран тимоцитов показало, что через 30 мин после начала инкубации происходит увеличение показателей микровязкости не более чем на 10 % по отношению к контролю (табл.1). Показатели полярности в этом случае были выше контрольных значений в 1,3 раза. Степень тушения белковой флуоресценции увеличилась на 17 %. Анализ данных показателей в случае действия перекиси водорода в концентрации 5 мкМ свидетельствует, что наиболее существенные изменения регистрируются для показателей микровязкости. Этот показатель в области аннулярных липидов увеличился в 2 раза по отношению к контролю, а в области липидного бислоя – в 1,7 раза. Значения показателей полярности возросли на 25 %, а степень тушения белковой флуоресценции была выше в 2 раза по отношению к контролю.

Таблица 1

Влияние различных концентраций перекиси водорода на физико-химические характеристики структурного состояния плазматических мембран тимоцитов крыс

Table 1

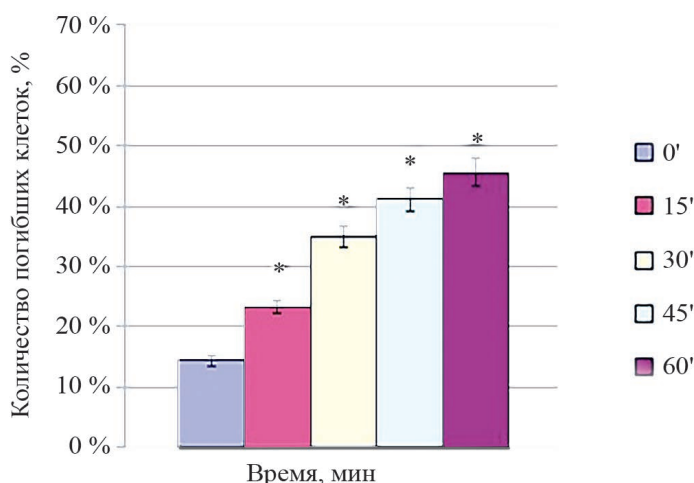
Effect of different concentrations of hydrogen peroxide on the physicochemical characteristics of the structural state of plasma membranes of rat thymocytes

Условия	Полярность		Микровязкость		Степень тушения белковой флуоресценции, %
	аннулярного липида	липидного бислоя	аннулярного липида	липидного бислоя	
Контроль	0,59 ± 0,03	0,62 ± 0,04	0,28 ± 0,03	0,37 ± 0,02	37 ± 1,6
5 нМ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 30 мин	0,72 ± 0,03*	0,70 ± 0,02	0,42 ± 0,02*	0,50 ± 0,04*	40 ± 1,7*
5 мкМ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 30 мин	0,80 ± 0,03*	0,78 ± 0,03*	0,51 ± 0,02*	0,65 ± 0,03*	62 ± 2*

\*Отличия от контроля достоверны при  $p \leq 0,05$ .

Данные результаты доказывают тот факт, что при воздействии экзогенной перекиси водорода на клетки тимуса происходит активация процессов перекисного окисления липидов, в результате чего изменяются показатели в области липидного бислоя и аннулярных липидов [11].

На рис. 5 представлена временная зависимость числа погибших тимоцитов крыс при добавлении к ним минимальной концентрации перекиси водорода, то есть оценена цитотоксичность данного вещества.



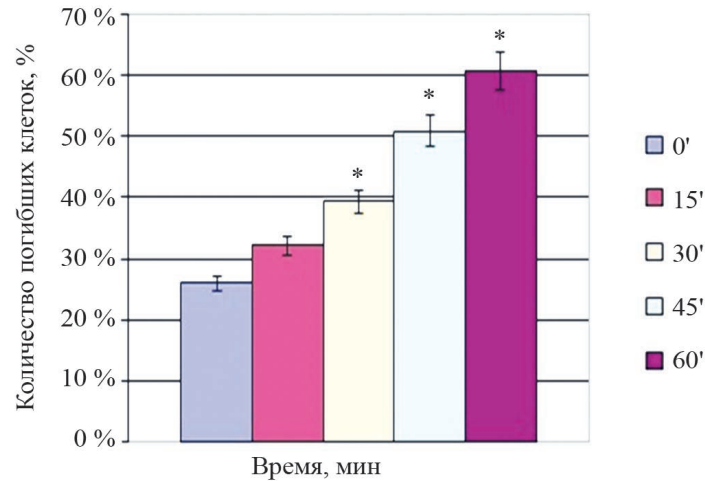
\*Отличия от контроля достоверны,  $p \leq 0,05$ .

Рис. 5. Временная зависимость числа погибших клеток тимуса, обработанных перекисью водорода в конечной концентрации 5 нМ

Fig. 5. Time dependence the number of dead thymic cells treated with hydrogen peroxide at a final concentration of 5 nM

В данном случае замечено увеличение числа погибших клеток: если в начальный момент времени оно составляло 14 %, то после часа инкубации оно было почти в четыре раза больше. Более выраженный эффект воздействия перекиси водорода на тимоциты наблюдался при использовании максимальной концентрации данного агента, что представлено на рис. 6. При этом наблюдается стойкое увеличение количества окрашенных тимоцитов. Если непосредственно после внесения перекиси водорода зарегистрировано значение 26 %, то через 30 мин инкубации оно составляло 40 %, а при 60 – более 60 %.

Наибольший интерес представляют результаты, полученные при комбинированном действии дексаметазона (предварительная инкубация в течение 30 мин) и перекиси водорода (инкубация в течение 30 мин) в максимальных концентрациях ( $10^{-6}$  и  $5 \cdot 10^{-6}$  моль/л соответственно). Так, при непосредственном добавлении данных экзогенных веществ было зарегистрировано около 25 % погибших клеток, а через 30 мин инкубации их было обнаружено около 40 %. Таким образом, данные эксперименты подтверждают, что сочетанное действие максимальных концентраций оказывает наиболее губительное действие на тимоциты крыс.



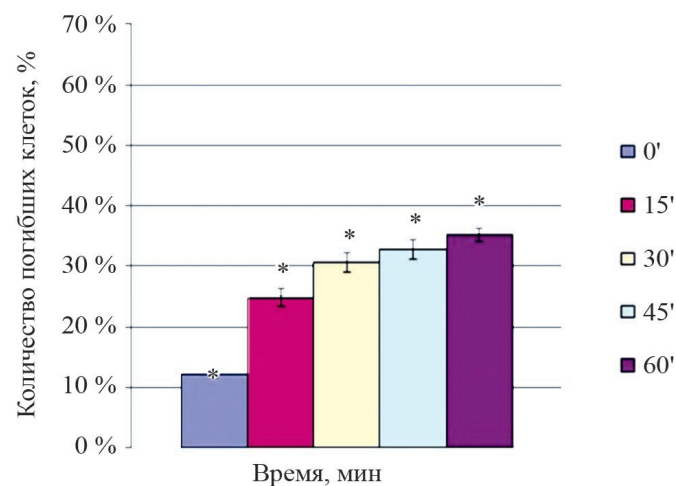
\*Отличия от контроля достоверны,  $p \leq 0,05$ .

Рис. 6. Динамика временной зависимости количества погибших клеток при их инкубации с перекисью водорода в конечной концентрации 5 мкМ

Fig. 6. Dynamics of time dependence of the number of dead cells during their incubation with hydrogen peroxide at a final concentration of 5 µM

В случае использования минимальных концентраций данных экзогенных агентов число погибших клеток не превышало 35 % в течение всего времени инкубации. В данном эксперименте было отмечено значительное увеличение процента погибших клеток уже через 15 мин инкубации. Однако после получаса инкубации количество мертвых клеток увеличивалось на 2–3 % в течение каждых 15 мин последующей инкубации, что можно объяснить включением адаптационных механизмов.

При сочетанном воздействии максимальной концентрации дексаметазона и минимальной концентрации перекиси водорода установлено, что происходит увеличение числа погибших клеток с течением времени. Так, при непосредственном внесении веществ в среду инкубации было зарегистрировано около 15 % погибших тимоцитов, а при 30 мин инкубации их количество составляло уже 35 %. Далее наблюдалось постепенное увеличение процента погибших, а после часа инкубации было обнаружено более 40 % окрашенных клеток. Результаты по изучению сочетанного действия минимальной концентрации дексаметазона и максимальной концентрации перекиси водорода представлены на рис. 7.



\*Отличия от контроля достоверны,  $p \leq 0,05$ .

Рис. 7. Сочетанное влияние минимальной концентрации дексаметазона и максимальной концентрации перекиси водорода на число погибших клеток тимуса с течением времени

Fig. 7. Combined effect of minimum dexamethasone concentration and maximum hydrogen peroxide concentration of the number of dead thymus cells over time



В данном случае также наблюдается увеличение количества погибших тимоцитов, но в меньшей степени. Так, максимальное число мертвых клеток было зарегистрировано после часа инкубации с данными агентами – 37 %. Необходимо отметить, что значительное увеличение количества погибших клеток наблюдалось лишь в течении 30 мин после начала инкубации. Далее данный показатель увеличивался на 1–2 % каждые 15 мин, что также можно объяснить включением антиоксидантных и адаптационных механизмов.

Далее проводилась серия экспериментов, направленная на изучение сочетанного влияния данных экзогенных агентов на физико-химические характеристики структурного состояния мембран тимоцитов с прединкубацией дексаметазоном в течении 30 мин. Результаты данного исследования приведены в табл. 2.

Таблица 2

**Комбинированное влияние различных концентраций дексаметазона и перекиси водорода на физико-химические характеристики структурного состояния плазматических мембран тимоцитов крыс (прединкубация дексаметазоном в течение 30 мин)**

Table 2

**Combined effect of different concentrations of dexamethasone and hydrogen peroxide on the physicochemical characteristics of the structural state of plasma membranes of rat thymocytes (preincubation with dexamethasone for 30 minutes)**

Условия	Полярность		Микровязкость		Степень тушения белковой флуоресценции, %
	аннулярного липида	липидного бислоя	аннулярного липида	липидного бислоя	
Контроль	0,59 ± 0,03	0,62 ± 0,04	0,28 ± 0,03	0,37 ± 0,02	37 ± 1,6
1нМ дексаметазона и 5 нМ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 30 мин	0,63 ± 0,03	0,69 ± 0,04	0,35 ± 0,04	0,40 ± 0,03	38 ± 1,8
1мкМ дексаметазона и 5 мкМ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 30 мин	0,84 ± 0,02*	0,78 ± 0,03*	0,67 ± 0,03*	0,73 ± 0,03	63 ± 2
1нМ дексаметазона и 5 мкМ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 30 мин	0,77 ± 0,03*	0,75 ± 0,02*	0,52 ± 0,03*	0,49 ± 0,03*	40 ± 1,5
1мкМ дексаметазона и 5 нМ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 30 мин	0,81 ± 0,03*	0,76 ± 0,02*	0,56 ± 0,03*	0,66 ± 0,03*	52 ± 1,8*

\*Отличия от контроля достоверны,  $p \leq 0,05$ .

Исследование структурного состояния мембран клеток тимуса после предварительного внесения максимальной концентрации дексаметазона и последующего добавления такого же количества перекиси водорода вызывало значительное изменение всех анализируемых показателей. Так, микровязкость липидной фазы мембран увеличилась при этом почти в 3 раза по отношению к контролю, а полярность – на 23,5 %. При использовании минимальной концентрации дексаметазона для предварительной обработки клеток и последующее взаимодействие с экзогенной H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в концентрации 5 нМ было зарегистрировано увеличение всех показателей не более чем на 10 % по отношению к контролю.

Таким образом, можно предположить, что высокие дозы дексаметазона вызывают модификацию регуляторных механизмов в обработанных клетках и затем при добавлении перекиси водорода происходит усиление степени повреждающего воздействия данного агента на клетки. Тогда как, комбинированное действие дексаметазона и перекиси водорода в малых дозах существенно модифицируют структурное состояние мембран клеток, что, по-видимому, является первым этапом реализации механизмов действия данных экзогенных агентов через системы гомеостаза внутриклеточного кальция.

Затем проводилась серия экспериментов по изучению структурного состояния мембран тимоцитов при действии дексаметазона на фоне оксидативного стресса, вызванного прединкубацией суспензии клеток перекисью водорода в течении 30 мин. Полученные результаты отображены в табл. 3.

Как следует из табл. 3, минимальная концентрация синтетического аналога глюкокортикоидных гормонов после прединкубации минимальной концентрацией перекиси водорода вызывал изменение всех тестируемых нами показателей в мембранах тимоцитов контрольных животных. Полярность аннулярных липидов возросла почти на 40 %, а липидного бислоя – только на 25 %. Показатели микровязкости аннулярного липида увеличивались примерно на 50 %, а микровязкость липидного бислоя уменьшилась на 27 % по сравнению с контролем.

Таблица 3

**Влияние различных концентраций дексаметазона на физико-химические характеристики структурного состояния плазматических мембран тимоцитов крыс (прединкубация с перекисью водорода в течение 30 мин)**

Table 3

**Effect of different concentrations of dexamethasone on the physicochemical characteristics of the structural state of plasma membranes of rat thymocytes (preincubation with hydrogen peroxide for 30 minutes)**

Условия	Полярность		Микровязкость		Степень тушения белковой флуоресценции, %
	аннулярного липида	липидного бислоя	аннулярного липида	липидного бислоя	
Контроль	0,59 ± 0,03	0,62 ± 0,04	0,28 ± 0,03	0,37 ± 0,02	37 ± 1,6
5 нМ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> и 1нМ дексаметазона, 30 мин	0,82 ± 0,02*	0,77 ± 0,03*	0,42 ± 0,03*	0,27 ± 0,02*	18 ± 2*
5 мкМ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> и 1мкМ дексаметазона, 30 мин	0,83 ± 0,02*	0,76 ± 0,02*	0,35 ± 0,03	0,22 ± 0,02*	25 ± 2*
5 мкМ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> и 1нМ дексаметазона, 30 мин	0,83 ± 0,03*	0,75 ± 0,02*	0,48 ± 0,03*	0,25 ± 0,03*	22 ± 2*
5 нМ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> и 1мкМ дексаметазона, 30 мин	0,87 ± 0,02*	0,76 ± 0,03*	0,41 ± 0,03*	0,23 ± 0,03*	24 ± 2*

\*Отличия от контроля достоверны,  $p \leq 0,05$ .

Влияние максимальных концентраций данных агентов на клетки тимуса экспериментальных животных имело наиболее выраженный эффект в отношении показателя микровязкости липидного бислоя в сравнении с контрольными значениями. Данный результат меньше контрольных значений на 40 %, а показатель микровязкости в области аннулярных липидов увеличился на 25 %. Степень тушения белковой флуоресценции в тимоцитах после инкубации с перекисью водорода и дексаметазоном уменьшилась на 50 %.

При изучении влияния минимальной концентрации дексаметазона после получасовой инкубации с максимальной концентрацией перекиси водорода было отмечено увеличение результатов микровязкости мембран в области аннулярных липидов, зарегистрировано увеличение показателя на 10 %, а в области липидного бислоя уменьшение на 40 %. Показатель полярности в области липидного бислоя изменился незначительно. Степень тушения белковой флуоресценции составляла 22 %.

Далее проводилось исследование изменений физико-химических характеристик структурного состояния мембран тимоцитов при действии дексаметазона в максимальной концентрации на фоне прединкубации минимальной концентрацией перекиси водорода. Как следует из табл. 3, при этом отмечалось достоверное увеличение показателей, характеризующих полярность. Так, в области аннулярных липидов данный показатель увеличился на 47 %, а в области липидного бислоя на 22 %, микровязкость в области липидного бислоя уменьшилась почти на 40 %, а в области аннулярного липида увеличилась более чем на 45 %. Отмечено изменение степени тушения белковой флуоресценции, она уменьшилась на 35 %.

Подводя итог данной серии экспериментов, необходимо отметить, что уменьшение показателей микровязкости липидного бислоя в данных опытах наблюдалось вследствие мембраноопосредованного действия перекиси водорода, поскольку данное вещество активирует процессы перекисного окисления липидов [4].

Установлено, что дексаметазон, взаимодействуя с мембранами тимоцитов, вызывает изменение их физико-химических характеристик: показателей полярности и микровязкости липидов плазматических мембран. Наиболее выраженные изменения наблюдались в области аннулярных липидов, микровязкость в этой области увеличивалась в 1,5–2 раза в зависимости от времени инкубации и концентрации дексаметазона.

Экзогенное воздействие перекиси водорода на клетки тимуса приводит к таким изменениям в структурном состоянии плазматических мембран тимоцитов, как увеличение полярности в 1,3 раза, микровязкости в области аннулярных липидов в 2 раза и липидного бислоя в 1,7 раза, а также увеличение степени тушения белковой флуоресценции в 2 раза. Эти результаты свидетельствуют об активации процессов перекисного окисления липидов, вызванных воздействием перекиси водорода на клетки, что говорит о его влиянии на изменение структурного состояния плазматических мембран тимоцитов.

## Заклучение

Из проведенного исследования можно сделать вывод, что комбинированное действие перекиси водорода и дексаметазона способно вызывать изменение физико-химических параметров плазматических мембран тимоцитов крыс: увеличение полярности аннулярных липидов и микровязкости аннулярного липида, уменьшение микровязкости липидного бислоя, снижение степени тушения белковой флуоресценции. Минимальные и максимальные концентрации данных веществ имеют различный эффект на указанные параметры, что может определять сложное взаимодействие между перекисью водорода и дексаметазоном в данном случае. Таким образом, в результате проведенных экспериментов доказано, что комбинированное действие перекиси водорода и дексаметазона способно вызывать модификацию физико-химических параметров плазматических мембран тимоцитов крыс, что может изменять состояние мембраносвязанных белков, а также белок-липидных взаимодействий.

## Библиографические ссылки

1. Adcock I, Mumby S Glucocorticoids. *Handbook of experimental pharmacology*. 2017;(237):171–196.
2. Jeffrey G Tasker, Shi Di, Renato Malcher-Lopes Minireview: rapid glucocorticoid signaling via membrane-associated receptors. *Endocrinology*. 2006; 147(12):5549–5556.
3. Botía M, Escribano D. General Characteristics and Measurement of the Main Glucocorticoids. *Scholarly Community Encyclopedia*. 2019 [Internet, cited 16 October 2024]. URL: <https://encyclopedia.pub/entry/40654>.
4. Scherholz ML, Schlesinger N, Androulakis IP. Chronopharmacology of glucocorticoids. *Advanced drug delivery reviews*. 2019;2(21):245–261.
5. Almokhtar AA, Elsayed AS, Azab AE, Quwaydir FA. Oxidative stress and antioxidant mechanisms in human body. *Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering*. 2019;6(1):34–37.
6. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European journal of medicinal chemistry*. 2015;5(97):55–74.
7. Матусевич АК, Карузин КА. Оксидативный стресс и его роль в формировании дизадаптации и патологии. *Биорадикалы и антиоксиданты*. 2015;2:5–29.
8. Жигулина ВВ. Биохимический ответ организма на стресс (обзор литературы). *Верхневолжский медицинский журнал*. 2014;4:25–30.
9. Клаус Дж. *Лимфоциты (методы)*. Москва: Мир; 1990. 256 с.
10. Добрецов ГЕ, Владимиров ЮА. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. Москва: Наука, 1980. 320 с.
11. Хлопова АЕ, Щербаклова ИВ. Условия применения t-критерия Стьюдента в медицине. *Бюллетень медицинских Интернет-конференций*. 2014;4(11):1276–1278.

## References

1. Adcock I, Mumby S Glucocorticoids. *Handbook of experimental pharmacology*. 2017;(237):171–196.
2. Jeffrey G Tasker, Shi Di, Renato Malcher-Lopes Minireview: rapid glucocorticoid signaling via membrane-associated receptors. *Endocrinology*. 2006; 147(12):5549–5556.
3. Botía M, Escribano D. General Characteristics and Measurement of the Main Glucocorticoids. *Scholarly Community Encyclopedia*. 2019 [Internet, cited 16 October 2024]. Available from: <https://encyclopedia.pub/entry/40654>.
4. Scherholz ML, Schlesinger N, Androulakis IP. Chronopharmacology of glucocorticoids. *Advanced drug delivery reviews*. 2019;2(21):245–261.
5. Almokhtar AA, Elsayed AS, Azab AE, Quwaydir FA. Oxidative stress and antioxidant mechanisms in human body. *Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering*. 2019;6(1):34–37.
6. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European journal of medicinal chemistry*. 2015;5(97):55–74.
7. Matusevich AK, Karuzin KA. *Oksydativnyy stress i ego rol v formirovanii dizadaptacii i patologii* [Oxidative stress and its role in the formation of dysadaptation and pathology]. *Bioradicals and antioxidants*. 2015;2:5–29. Russian
8. Zhigulina VV. *Biokhimiicheskiy otvet organizma na stress (obzor literatury)* [Biochemical Response of the Body to Stress (Literature Review)]. *Verkhnevolzhskiy medicinskiy journal*. 2014;2:25–30. Russian.
9. Claus J. *Lymphocytometry: methods* [Lymphocytes. Methods]. Moscow: Mir; 1990. 256 p. Russian.
10. Dobretsov GE, Vladimirov YuA. *Fluorescentnye zondy v issledovanii biologicheskikh membran* [Fluorescent probes in the study of biological membranes]. Moscow: Nauka; 1980. 320 p. Russian.
11. Chlopova AE, Shcherbakova IV. *Usloviy primeneniya t-kriteriya Studenta v medicine* [Conditions for the application of the Student's t-test in medicine]. *Bulletin of Medical Internet Conferences*. 2014;4(11):1276–1278. Russian.

Статья поступила в редколлегию 02.08.2024.  
Received by editorial board 02.08.2024.