

УДК 577.352

Е.И. ВЕНСКАЯ, Л.М. ЛУКЪЯНЕНКО, А.С. СКОРОБОГАТОВА,
Е.И. СЛОБОЖАНИНА

ЭФФЕКТЫ СОЧЕТАННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ АМИЛОИДОВ И ТРЕТ-БУТИЛГИДРОПЕРЕКИСИ НА ЛИМФОЦИТЫ ЧЕЛОВЕКА

Государственное научное учреждение «Институт биофизики и клеточной инженерии
Национальной академии наук Беларуси», Минск, Беларусь

Изучено влияние амилоидных фибрилл, полученных из лизоцима куриного яйца, на уровень АФК и генотоксический эффект в лимфоцитах человека, в том числе в условиях окислительного стресса, вызванного t-BHP. Обнаружено, что амилоидные фибриллы не оказывают влияния на процесс генерации АФК и генотоксичность в лимфоцитах человека, однако, при сочетанном воздействии амилоидных фибрилл и окислителей (t-BHP) токсические эффекты усиливаются. Так, мы наблюдали более выраженное изменение вязкости липидного бислоя лимфоцитов и увеличение генерации АФК в клетках при совместном воздействии на них амилоидных фибрилл и t-BHP, по сравнению с контрольными клетками и клетками, подвергшимися воздействию только амилоидов или только t-BHP.

Ключевые слова: лимфоциты человека, амилоиды, окислительный стресс, АФК, ДНК, вязкость мембранных липидов.

Введение. Существует ряд нейродегенеративных заболеваний (включая болезни Альцгеймера и Паркинсона), при которых наблюдается отложение амилоидных белков в различных органах и тканях. [2]. В литературе показано, что одним из звеньев развития патологических процессов, протекающих при амилоидозах, является генерация активных форм кислорода (АФК). Существует мнение, что АФК вносят вклад в формирование церебральной амилоидной ангиопатии, приводящей к дисфункции сосудов, внутримозговому кровоизлиянию, ишемическому инсульту у пожилых пациентов с болезнью Альцгеймера и без нее [5]. Кроме того, на культуре клеток нейробластомы человека показано, что добавление амилоидов на основе A β 42 либо амилина в среду для инкубации приводит к увеличению продукции АФК в клетках [10, 12, 17]. Однако, с другой стороны, было описано, что амилоиды A β 1–42 и A β 1–40 в наномолярных концентрациях снижают повреждение эпителиальных клеток хрусталика человека при окислительном стрессе [16]. При этом, в микромолярных концентрациях данные пептиды обладают цитотоксическими свойствами, вызывая активацию апоптоза, повреждение митохондрий и генерацию АФК [13]. Группой американских исследователей была выдвинута гипотеза, что β -амилоид играет даже своего рода защитную антиоксидантную функцию [14, 15]. Другими авторами выявленная положительная корреляция между уровнем β -амилоида и деменцией рассматривается как защитная компенсаторная реакция в ответ на развитие патологического процесса в организме человека [20].

Таким образом, в настоящее время не существует однозначного мнения о молекулярно – клеточных механизмах влияния амилоидов на различные клеточные системы организма человека и роли окислительного стресса в этих процессах. Ранее в нашей лаборатории было показано, что предварительная инкубация эритроцитов в присутствии амилоидных фибрилл и предгемолитических концентраций ацетата свинца, который, как известно, также инициирует генерацию АФК, вызывают ускорение степени везикуляции эритроцитов в безглюкозной среде и снижение осмотической резистентности клеток; изменение параметров активности мембраносвязанных ферментов, по сравнению с клетками, подвергшимися воздействию только амилоидов или ацетата свинца при тех же условиях [22]. Также было обнаружено, что при сочетанном воздействии на эритроциты человека ацетата свинца и амилоидных фибрилл *in vitro* происходит интенсификация процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в их мембранах, изменение параметров флуоресценции липофильных зондов по сравнению с клетками, обработанными отдельно амилоидными структурами или ацетатом свинца при тех же условиях. [18]. Таким образом, воздействие амилоидных фибрилл в сочетании с субгемолитическими концентрациями ацетата свинца усиливают изменения структурно-функционального состояния мембран эритроцитов человека, индуцированное только амилоидами.

Аналогичный эффект мы наблюдали и при изучении воздействия на эритроциты амилоидных фибрилл и ионов алюминия: при их сочетанном воздействии повреждающий эффект этих агентов только усиливается [19; 21]. Однако, как ведут себя клетки иммунной системы, одной из функций которых является устранение чужеродных и пораженных клеток собственного организма, пока известно мало. Цель данной работы – изучить влияние сочетанного действия амилоидных фибрилл, полученных из лизоцима, и трет-бутилгидроперекиси (t-BHP) на процессы, характеризующие функциональное состояние лимфоцитов человека: оценка их жизнеспособности, уровень АФК, изменение липидного бислоя их мембран и степень повреждения ДНК.

Материалы и методы. Лимфоциты выделяли из цельной крови доноров, полученной в РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий МЗ Республики Беларусь, в градиенте плотности гистопака при центрифугировании в течение 15 мин при 1500 об/мин. Количество лимфоцитов и их жизнеспособность оценивали в световом микроскопе с помощью красителя трипанового синего. Эксперименты проводили с суспензией лимфоцитов в концентрации 1×10^6 клеток в 1 мл. Амилоидные фибриллы получали из лизоцима куриного яйца в растворе соляной кислоты [1]. Процесс образования фибрилл контролировали спектрофлуориметрическим методом, используя специфический краситель тиофлавин Т [4]. Уровень АФК регистрировали флуоресцентным методом с помощью зонда 5-(6)-хлорметил-2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетата (CM-H₂DCFDA) [11] и методом люминолзависимой хемилюминесценции [7]. Изменение физико-химического состояния липидного бислоя мембран лимфоцитов изучали с помощью липофильных флуоресцентных зондов N,N,N-триметил-4-(6-фенил-1,3,5-гексатриен-1-ил) фениламмония p-толуолсульфоната (ТМА-ДФГ), 6-додеканоил-N,N-диметил-2-нафтиламина (лаурдана) и пирена. Измерение зондовой флуоресценции проводили на люминесцентном спектрофотометре CM2203 ("СОЛАР", Беларусь). Для выявления нарушений ДНК использовали метод «ДНК – комет» [9]. В качестве флуоресцентного красителя использовался этидиум бромид. Микроскопические исследования проводили на микроскопе Nikon Eclipse 50i (фильтр возбуждения 450–490 нм) цифровой цветной фотокамерой Nikon DS-Fi1. Обработку полученных изображений проводили с помощью программы CASP (версия 1.2.3b.2). Представлены средние значения для 6-9 независимых экспериментов.

Результаты и их обсуждение. Лимфоциты являются основными клетками иммунной системы, чутко реагируют на внешние агенты и уничтожают посторонние и пораженные клетки собственного организма. Концентрацию амилоидов в среде инкубации, а также время инкубации лимфоцитов подбирали, оценивая жизнеспособность клеток с помощью трипанового синего таким образом, чтобы количество живых клеток составляло не менее 95%. Для проведения эксперимента лимфоциты разделяли на следующие группы:

- 1) контрольные лимфоциты в натрий-фосфатном буфере (PBS-буфере), pH 7,4;
- 2) лимфоциты в PBS-буфере, pH 7,4, содержащем амилоидные фибриллы из лизоцима в конечной концентрации 20 мкг/мл;
- 3) лимфоциты в PBS-буфере, pH 7,4, содержащем 1 мМ t-BHP;
- 4) лимфоциты в PBS-буфере, pH 7,4, содержащем амилоидные фибриллы из лизоцима в конечной концентрации 20 мкг/мл и 1 мМ t-BHP.

В таблице 1 представлены данные оценки жизнеспособности лимфоцитов после инкубации в средах, содержащих амилоидные фибриллы из лизоцима и t-BHP.

Табл. 1. Оценка жизнеспособности лимфоцитов после инкубации в буферном растворе в различных условиях.

Условия инкубации лимфоцитов	Количество нежизнеспособных клеток на 1 млн.	Количество жизнеспособных клеток, %
Лимфоциты в PBS-буфере, pH 7,4 (контроль)	8000 ± 2000	99,0 – 99,4
Лимфоциты в PBS-буфере, pH 7,4, содержащем амилоидные фибриллы из лизоцима в конечной концентрации 20 мкг/мл	10000 ± 3000	98,7 – 99,2
Лимфоциты в PBS-буфере, pH 7,4, содержащем 1 мМ t-BHP	18000 ± 2000	98,0 – 98,4
Лимфоциты в PBS-буфере, pH 7,4, содержащем амилоидные фибриллы из лизоцима в конечной концентрации 20 мкг/мл и 1 мМ t-BHP	27000 ± 3000	97,0 – 97,6

Используя флуоресцентный зонд H₂DCF-DA, нами было показано, что сами амилоидные фибриллы, полученные из лизоцима куриного яйца, не приводят к увеличению уровня АФК в лимфоцитах (рисунок 1).

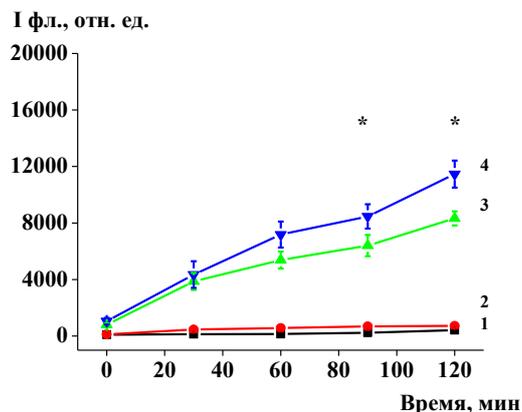


Рис. 1. Кинетика флуоресценции DCF в лимфоцитах, обработанных амилоидными фибриллами, полученными из лизоцима, и t-BHP в течение 120 мин.

1. – лимфоциты в PBS буфере, pH=7,4 (контроль);

2 – лимфоциты в PBS-буфере, pH 7,4, содержащем амилоидные фибриллы из лизоцима в конечной концентрации 20 мкг/мл;

3 – лимфоциты в PBS-буфере, pH 7,4, содержащем 1 мМ t-BHP;

4 – лимфоциты в PBS-буфере, pH 7,4, содержащем амилоидные фибриллы из лизоцима в конечной концентрации 20 мкг/мл и 1 мМ t-BHP

Эти данные подтвердились также и с помощью люминолзависимой хемилюминесценции. Показано, что суммарная интенсивность люминолзависимой хемилюминесценции в клетках, обработанных амилоидными фибриллами, практически не изменяется по сравнению со значениями, полученными в контрольных клетках. Принимая суммарную интенсивность люминолзависимой хемилюминесценции в контрольных клетках за 100%, мы обнаружили, что при воздействии на лимфоциты амилоидных фибрилл из лизоцима данный показатель находится на уровне $90,0 \pm 5,0$ %. Показано, что предварительная обработка лимфоцитов амилоидными фибриллами приводит к снижению содержания ТБК-продуктов в образцах в среднем на 20-25% (данные не приводятся). Полученные результаты указывают на то, что сами амилоидные фибриллы из лизоцима при краткосрочном воздействии на лимфоциты человека *in vitro* не вызывают генерацию АФК в клетках. Основываясь на литературных данных, мы предположили, что окислительный стресс, возникающий в организме по различным естественным причинам (негативное влияние окружающей среды, воспалительные процессы, вирусные инфекции), может являться триггером развития патологического процесса, связанного с отложением амилоидов [12, 17]. Для проверки этой гипотезы мы изучали воздействие амилоидных фибрилл, полученных из лизоцима куриного яйца, на лимфоциты в условиях окислительного стресса. В качестве индуктора окислительного стресса мы использовали t-BHP.

Известно, что зонд 2',7'-дихлордигидрофлуоресциндацетат свободно проникает через клеточные мембраны и гидролизуется в клетке эстеразами до неактивной формы, которая, в свою очередь, окисляется в присутствии внутриклеточных АФК и флуоресцирует. Измеряя кинетику флуоресценции данного зонда, можно судить об окислительном статусе живой клетки [11].

Эксперименты по изучению изменения уровня внутриклеточных АФК в лимфоцитах человека при воздействии на них амилоидных фибрилл и t-BHP проводили флуоресцентным методом с помощью зонда CM-H₂DCFDA (рисунок 1) и с помощью люминолзависимой хемилюминесценции (рисунок 2).

Было показано, что амилоидные фибриллы из лизоцима не приводят к увеличению образования АФК в клетках, но усиливают окислительный стресс клеток в присутствии t-BHP. Мы наблюдали эффект усиления негативного воздействия амилоидов на мембраны лимфоцитов человека. С помощью липофильных флуоресцентных зондов обнаружено, что при сочетанном влиянии амилоидных фибрилл и t-BHP происходит изменение микровязкости липидного бислоя мембран

лимфоцитов по сравнению с контрольными клетками и клетками, подвергшимися влиянию только амилоидных фибрилл или t-ВНР.

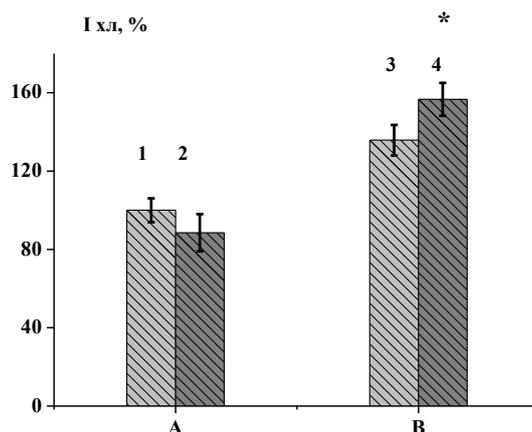


Рис. 2. Изменение люминолзависимой хемилюминесценции в лимфоцитах человека при воздействии на клетки амилоидных структур из лизоцима до (А) и после (В) воздействия 1 мМ t-ВНР. За 100% принято среднее значение соответствующего параметра для контрольного образца.

1.– контрольные лимфоциты;

2 – лимфоциты в PBS-буфере, рН 7,4, содержащем амилоидные фибриллы из лизоцима в конечной концентрации 20 мкг/мл

3 – лимфоциты в PBS-буфере, рН 7,4, содержащем 1 мМ t-ВНР;

4 – лимфоциты в PBS-буфере, рН 7,4, содержащем амилоидные фибриллы из лизоцима в конечной концентрации 20 мкг/мл и 1 мМ t-ВНР

Изменение состояния липидного бислоя на уровне гидрофильно-гидрофобных участков можно изучать с использованием параметра генерализованной поляризации (GP) лаурдана, встроенного в мембрану клеток в области фосфолипидных цепей. Лаурдан является высокочувствительным к наличию и подвижности растворенных диполей, что определяется степенью упорядоченности фосфолипидных цепей [6]. Было обнаружено, что инкубация лимфоцитов в течение 60 мин в среде, содержащей амилоидные фибриллы из лизоцима (концентрация белка 5 мкг/мл), а также t-ВНР (1 мМ) приводит к снижению генерализованной поляризации лаурдана. Наиболее выражено данный эффект наблюдался в клетках, проинкубированных с амилоидными фибриллами совместно с t-ВНР, и достигал в среднем 15-20 % по сравнению с контрольными значениями (рисунок 3, А).

Липофильную часть липидного бислоя мембран лимфоцитов исследовали с помощью неполярного флуоресцентного зонда пирена, который встраивается в мембрану в гидрофобной области и чувствителен к полярности микроокружения [3]. Коэффициент эксимеризации пирена (отношение интенсивности флуоресценции эксимеров пирена к интенсивности флуоресценции мономеров) зависит от микровязкости мембраны, следовательно, по изменению данного параметра можно судить об изменении микровязкости мембран. Наружный (гидрофобный) слой мембран изучали с использованием зонда ТМА-ДФГ, который содержит заряженные группы, благодаря которым может равномерно распределяться в мембране и закориваться на её поверхности [8].

Текучесть мембраны в области расположения молекул зонда отражает такой параметр, как поляризация флуоресценции ТМА-ДФГ. В наших экспериментах коэффициент эксимеризации пирена, встроенного в мембраны лимфоцитов, снижался при воздействии на них амилоидных фибрилл и t-ВНР на 10-13 % (рисунок 3, Б). С помощью флуоресцентного зонда ТМА-ДФГ мы оценивали изменение микровязкости наружной области липидного бислоя мембран лимфоцитов, подвергшихся воздействию амилоидных фибрилл и t-ВНР. Показано, что в присутствии амилоидных фибрилл поляризация флуоресценции ТМА-ДФГ, встроенного в мембраны лимфоцитов, незначительно снижалась, при воздействии t-ВНР – повышалась на 8-10%, а при сочетанном воздействии амилоидных фибрилл и t-ВНР данный показатель повышался в среднем на 20-25% по сравнению с контрольными клетками (рисунок 3, В).

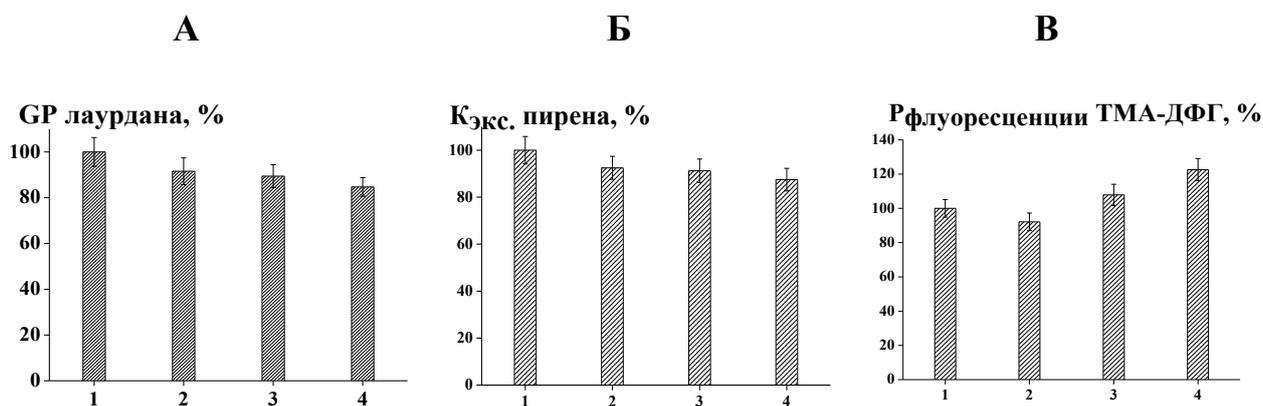


Рис. 3. А - генерализованная поляризация флуоресценции лаурдана; Б – коэффициент эксимеризации пирена; В – поляризация флуоресценции ТМА-ДФГ. За 100% принято среднее значение соответствующего параметра для контрольного образца.

1. – контрольные лимфоциты;
- 2 – суспензия лимфоцитов предварительно выдержаны в PBS-буфере, рН 7,4, содержащем амилоидные фибриллы из лизоцима;
- 3 – суспензия лимфоцитов предварительно выдержана в PBS-буфере, рН 7,4, содержащем 1 мМ t-ВНР;
- 4 –суспензия лимфоцитов предварительно выдержана в PBS-буфере, рН 7,4, содержащем амилоидные фибриллы и 1 мМ t-ВНР

Поскольку при сочетанном воздействии амилоидов и t-ВНР на лимфоциты человека происходит усиление генерации АФК в них и известно, что окислительные процессы оказывают влияние на стабильность ДНК в клетках, нами исследована степень повреждения генетического материала в лимфоцитах методом ДНК-комет.

Метод ДНК-комет основан на проведении гель-электрофореза единичных лизированных клеток, из которых под воздействием электрического поля выходят молекулы ДНК и распределяются в геле. Если произошло повреждение ДНК, то формируются фрагменты, которые также выходят из клеток и вытягиваются по направлению к аноду, что и придает наблюдаемым объектам вид «комет» [9]. При этом, чем больше поврежденных фрагментов, тем больше будет «хвост» кометы. Для характеристики полученных комет и анализа данных используется ряд параметров, которые автоматически рассчитываются программой CASP (версия 1.2.3b.2). Из литературы известно, что при повреждении ДНК происходит уменьшение размера «головы кометы» (LHead) с одновременным увеличением общей длины кометы и длины «хвоста» (Lcomet, LTail). В таблице 2 представлены параметры комет лимфоцитов, предварительно проинкубированных в PBS-буфере, содержащем амилоидные фибриллы из лизоцима и t-ВНР. Данные о жизнеспособности клеток представлены в таблице 1.

Табл. 2. Параметры ДНК-комет лимфоцитов после воздействия на них амилоидных фибрилл, t-ВНР и сочетанном воздействии амилоидов и t-ВНР.

Исследованные параметры	Контроль	Амилоиды	t-ВНР	Амилоиды + t-ВНР
LComet	124,67 ± 20,48	123,13 ± 17,65	134,28 ± 17,81	133,42 ± 21,02
LHead	121,65 ± 18,33	118,23 ± 17,80	118,82 ± 17,56	116,08 ± 20,34
LTail	4,50 ± 1,98	4,99 ± 2,38	15,56 ± 4,18	17,35 ± 6,53
Tail Moment	0,52 ± 0,21	0,47 ± 0,19	1,46 ± 0,83	1,91 ± 1,50
Tail DNA	1.28 ± 0.84	1.30 ± 0.98	2.83 ± 1.59	2.60 ± 1.71

Авторами оценена общая длину кометы (LComet); длина «головы» и хвоста кометы (LHead, LTail), а также степень повреждения ДНК, которую отражает параметр ТМ (Tail Moment) – момент хвоста кометы, или индекс повреждения ДНК, в котором учитывается длина хвоста и содержание ДНК в нем. Так как длина «хвоста» кометы не увеличивается в клетках, проинкубированных с амилоидами, по сравнению с контрольными, можно сделать вывод, что амилоидные фибриллы на основе лизоцима куриного яйца не оказывают влияния на стабильность генетического материала в лимфоцитах. В то время как при воздействии на лимфоциты t-ВНР и сочетанном воздействии

амилоидов и t-ВНР мы наблюдаем увеличение длины «хвоста» кометы по сравнению с контрольными клетками и клетками, подвергшимися воздействию только амилоидов, что указывает на произошедшее повреждение ДНК. При этом при сочетанном воздействии на лимфоциты амилоидов и t-ВНР мы наблюдали тенденцию к увеличению степени повреждения ДНК по сравнению с клетками, подвергшимися воздействию t-ВНР.

Степень повреждения ДНК отражает такая характеристика, как процент ДНК в «хвосте» кометы. Чем больше поврежденных фрагментов ДНК выходит из клетки – тем выше процент ДНК в «хвосте». В наших экспериментах мы наблюдали тенденцию к увеличению содержания ДНК в «хвостах» комет, полученных из лимфоцитов, подвергшихся воздействию t-ВНР, а также амилоидов и t-ВНР, в то время как сами амилоидные фибриллы не оказывали влияния на процент ДНК в «хвосте» кометы. При воздействии на клетки амилоидов в условиях окислительного стресса происходит рост длины хвоста и увеличивается содержание ДНК в нем (рисунок 4), что указывает на повреждение генетического материала в клетках.

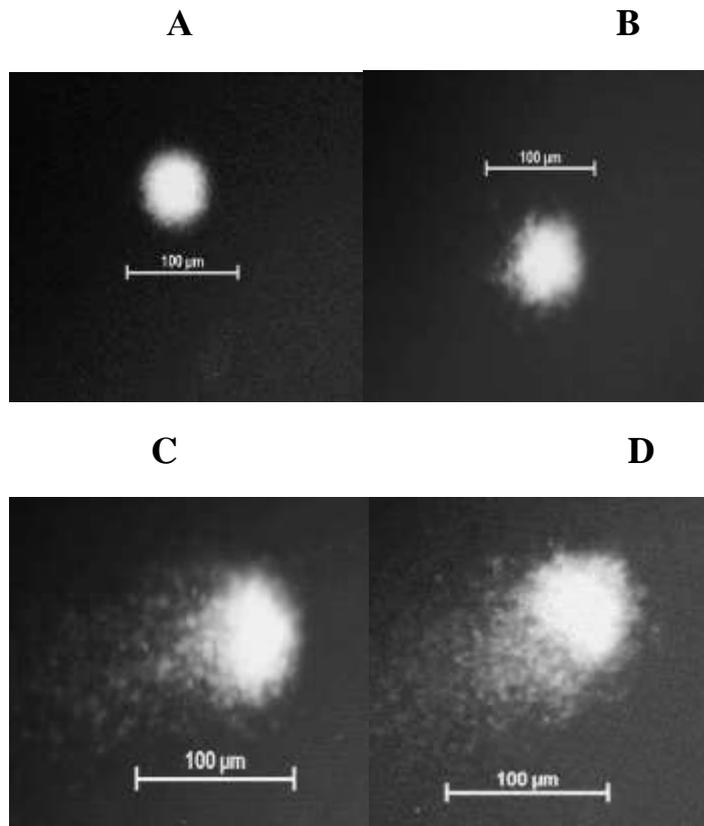


Рис. 4. Изображение ДНК-комет в контрольных лимфоцитах (А); лимфоцитах, подвергшихся воздействию амилоидных фибрилл (В); t-ВНР (С) и сочетанному воздействию амилоидных фибрилл и t-ВНР (D) (после гель-электрофореза и окрашивания этидиумбромидом)

Таким образом, установлено, что сами по себе амилоидные фибриллы из лизоцима, при воздействии на лимфоциты человека *in vitro*, не оказывают влияния на стабильность генетического материала в клетках. Однако, при сочетанном воздействии на лимфоциты человека амилоидных фибрилл и t-ВНР наблюдали тенденцию к увеличению степени повреждения ДНК в клетках при воздействии на них амилоидных фибрилл по сравнению с контрольными клетками и клетками, подвергшимися влиянию только амилоидов или только t-ВНР при тех же условиях.

Заключение. Таким образом, при воздействии амилоидных фибрилл на лимфоциты человека не изменяется уровень АФК. Но в условиях окислительного стресса, вызванного t-ВНР, токсические эффекты амилоидов проявляются: в усилении генерации АФК, изменении микровязкости липидного бислоя и увеличении генотоксического эффекта в лимфоцитах человека.

Литература:

- [1] Chaudhary N., Nagaraj R. Hen lysozyme amyloid fibrils induce aggregation of erythrocytes and lipid vesicles. *Mol Cell Biochem.* 2009. Vol. 328. P. 209-215.
- [2] Chiti F., Dobson C. Protein misfolding, amyloid formation, and human disease: a summary of progress over the last decade // *Annu. Rev. Biochem.* 2017. Vol. 86. P. 27-68.
- [3] Galla H.J., Sackmann E. Lateral diffusion in the hydrophobic region of membranes: use of pyrene excimers as optical probes. *Biochim Biophys Acta.* 1974. Vol. 339. P.103–115.
- [4] Gharibyan A.L., Zamotin V., Yanamandra K. [et al.]. Lysozyme amyloid oligomers and fibrils induce cellular death via different apoptotic/necrotic pathways. *J Mol Biol.* 2007. Vol. 365. P. 1337-1349.
- [5] Han B.H., Zhou M-L., Johnson A.W. [et al.] Contribution of reactive oxygen species to cerebral amyloid angiopathy, vasomotor dysfunction, and microhemorrhage in aged Tg2576 mice // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015. Vol. 112. P. 881-90.
- [6] Harris F.M., Best K.B, Bell J.D. Use of laurdan fluorescence intensity and polarization to distinguish between changes in membrane fluidity and phospholipid order. *Biochim. Biophys. Acta.* 2002. Vol. 1565. P. 123–128.
- [7] Kavalenka A.I., Semenкова G.N., Cherenkevich S.N. Effects of hydrogen peroxide on neutrophil ability to generate reactive oxygen and chlorine species and to secrete myeloperoxidase in vitro. *Cell and Tissue Biology.* 2007. Vol. 1. P. 551-559.
- [8] Kuhry J.G. Plasma membrane fluidity measurements on whole living cells by fluorescence anisotropy of trimethylammoniumdiphenylhexatriene. *Biochim. Biophys. Acta.* 1985. Vol. 845. P. 60–67.
- [9] Kumaravel T.S. Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals. *Mutation Research.* 2006. Vol. 605. P. 7–16.
- [10] Lim Y-A., Rhein V., Baysang G. [et al.] Abeta and human amylin share a common toxicity pathway via mitochondrial dysfunction // *Proteomics.* 2010. Vol. 10. P. 1621-33.
- [11] Oparka M., Walczak J., Malinska D. [et al.]. Quantifying ROS levels using CM-H 2 DCFDA and HyPer. *Methods.* 2016. Vol. 109. P. 3-11.
- [12] Perez-Garmendia R., Rodriguez A., Ramos-Martinez I. [et al.] Interplay between Oxidative Stress, Inflammation, and Amyloidosis in the Anterior Segment of the Eye; Its Pathological Implications // *Oxid Med Cell Longev.* 2020. 6286105.
- [13] Remington L.A. Aqueous and vitreous humors // *Clinical Anatomy and Physiology of the Visual System.* Butterworth-Heinemann. 2012. P. 109–122.
- [14] Smith M.A., Casadesus G., Joseph J.A., Perry G. Amyloid-beta and tau serve antioxidant functions in the aging and Alzheimer brain // *Free Radic. Biol Med.* 2002. Vol. 33. P. 1194-1199.
- [15] Smith M.A, Joseph J.A, Perry G. Arson. Tracking the culprit in Alzheimer's disease // *Ann N Y Acad. Sci.* 2000. 924:35-38.
- [16] Xu J., Li D., Zheng T., Lu Y. β -amyloid expression in age-related cataract lens epithelia and the effect of β -amyloid on oxidative damage in human lens epithelial cells // *Molecular vision.* 2017. Vol. 23. P. 1015-1028.
- [17] Zhou X., Li Y., Shi X. An overview on therapeutics attenuating amyloid β level in Alzheimer's disease: targeting neurotransmission, inflammation, oxidative stress and enhanced cholesterol levels // *American Journal of Translational Research.* 2016. Vol. 8. P. 246–269.
- [18] Венская Е.И., Лукьяненко Л.М. Зубрицкая Г.П. и др. // Эффекты сочетанного воздействия ионов свинца и амилоидов на эритроциты человека *in vitro* // сб. материалов Международной научной конференции «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем». Минск. 2020. С. 109.
- [19] Венская Е.И., Скоробогатова А.С., Зубрицкая Г.П. и др. // Изменение структурно-функционального состояния мембран эритроцитов человека при воздействии комплексов амилоидов на основе лизоцима с ионами алюминия *in vitro* // сб. материалов VII Всероссийской конференции с международным участием «Медико-физиологические проблемы экологии человека». Ульяновск. 2018. С. 53-55.
- [20] Дубинина Е.Е., Щедрина Л.В., Незнанов Н.Г., Залуцкая Н.М., Захарченко Д.В. Окислительный стресс и его влияние на функциональную активность клеток при болезни Альцгеймера // *Биомедицинская химия.* 2015. Т. 61. С. 57-69.
- [21] Зубрицкая Г.П., Лукьяненко Л.М., Скоробогатова А.С. и др. // Модификация мембран эритроцитов при воздействии на них ионов алюминия и амилоидных структур // сб. материалов VIII Международной биогеохимической школы «Биогеохимия и биохимия микроэлементов в условиях техногенеза биосферы. Гродно. 2013. С. 199 – 201.
- [22] Лукьяненко Л.М., Зубрицкая Г.П., Венская Е.И. и др. // Эффекты совместного воздействия ионов свинца и амилоидных структур лизоцима на структурно-функциональное состояние мембран эритроцитов человека *in vitro* // сб. материалов Международной научной конференции «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем». Минск. 2014. С. 212 – 214.

E.I. VENSKAYA, L.M. LUKYANENKO, A.S. SKARABAHATAVA, E.I. SLOBOZHANINA

THE COMBINED EFFECT OF AMYLOIDS AND TRET-BUTYL HYDROPEROXIDE ON THE HUMAN LYMPHOCYTES

Institute of Biophysics and Cell Engineering of NAS of Belarus, Minsk, Belarus

Summary

The aim of this work is the investigation of the combined effect of amyloid fibrils and tert-butyl hydroperoxide (t-BHP) on the human lymphocytes. Changes of lipid bilayer were studied using lipophilic fluorescent probes (TMA-DPH, laurdan, pyrene) which incorporated into the membrane lipid bilayer at different depths. ROS generation was measured with the help of the fluorescent probe CM-H₂DCFDA. DNA damage was studied by comet-assay. Obtained results indicate that amyloid fibrils do not affect the process of ROS generation and DNA damage in human lymphocytes. However, we observed that combined exposure lymphocytes with amyloid fibrils and t-BHP lead to a more changes in the microviscosity of the lipid bilayer of lymphocyte membranes and an increase in ROS generation in cells compared to control cells and cells exposed to amyloids or t-BHP alone.

Key words: human lymphocytes, lysozyme, amyloids, oxidative stress, ROS, DNA, microviscosity of the lipid bilayer.