

ВЫЯВЛЕНИЕ АДАПТОГЕННОГО И ЗАЩИТНОГО ДЕЙСТВИЯ ЭКСТРАКТОВ ИЗ ТЕРМОФИЛЬНЫХ ВОДОРОСЛЕЙ НА ЭНЕРГЕТИКУ ЛЕЙКОЦИТОВ В НАТИВНОЙ КРОВИ ПО ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ПОТЕНЦИАЛ - ЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ЗОНДА ДСМ

Акшинцев А.А.¹ Морозова Г.И.², Козлова М.А.¹ **Баренбойм Г.М.¹**

¹ Институт водных проблем РАН

ул. Губкина, 3, г. Москва, 119333, РФ; e-mail: mblshok@mail.ru mblshok@mail.ru

² Российский университет дружбы народов

ул. Миклухо-Маклая, 6, г. Москва, 117198, РФ; e-mail: gimorozova@mail.ru

Поступила в редакцию: 18.07.2020

Аннотация. Актуален поиск природных адаптогенов, способных стабилизировать энергетический баланс клеток на фоне низких доз препаратов, загрязняющих воды. Целью работы является выявление адаптогенного и защитного действия экстрактов из термофильных сине-зеленых водорослей (ТВ1 и ТВ2), добытых из двух гидротерм Камчатки, на клетки в нативной крови. С помощью микроскопа- микрофлуориметра в нативных мазках донорской венозной крови распознавали лимфоциты (Л) и нейтрофилы (НФ) и оценивали суммарный трансмембранный потенциал на их внешней и митохондриальных мембранах (ТМП) по интенсивности и цвету флуоресценции полихроматического катионного зонда 4-(*n*-диметиламиностирила)-1-метилпиридиния (ДСМ) в клетках. Отношение между клеточными пулами с низкими и высокими ТМП-ми в популяциях Л или НФ использовали в качестве показателя энергетической активности клеточных популяций (ЭАП). В ходе испытаний ТВ *in vitro* на контрольных образцах крови обнаружен рост митохондриальной активности и ТМП в Л, но при этом снижение ТМП в НФ. Анализ опытных данных выявил достоверное снижение ЭАП после прединкубации крови с циклофосфамидом (Ц) (0,002 мг/л) при 37°C. Установлено, что ТВ1 (в отличие от ТВ2) частично восстанавливает ЭАП лимфоцитов и снижает токсичное действие Ц на митохондрии. Из сравнения полученных данных следует, что эти ТВ проявляют адаптогенную активность в крови, поскольку их эффекты зависят от разной исходной энергетической активности иммунных клеток в свежих и суточных образцах крови.

Ключевые слова: термофильные водоросли, адаптация, флуоресцентный зонд ДСМ, нативная кровь, лимфоциты, нейтрофилы, трансмембранные потенциалы, активность митохондрий, циклофосфамид.

Проблема адаптации и защиты клеток и организмов от низких доз лекарств, токсинов становится всё более актуальна в связи с резким ухудшением экологии водных ресурсов - загрязнением их биологически активными веществами [1]. В водах Канала им. Москвы и реки Истра нами был обнаружен противоопухолевый препарат циклофосфамид (Ц) в низких концентрациях 2-16 нг/л [1]. Как известно из клинической практики, иммунодепрессивное действие Ц проявляется в подавлении пролиферации лимфоцитарных клонов (преимущественно В-лимфоцитов), участвующих в иммунном ответе [13], что может быть опасным для нормальных иммунных клеток даже при малых дозах Ц. Сегодня популярны адаптогены, обладающие антиоксидантной активностью и тем самым позитивно влияющих на клеточные мембраны, на энергетический статус и ионный гомеостаз клеток [2]. В связи с этим в последние годы опять возрастает интерес к сине-зеленым термофильным водорослям (ТВ)- цианобактериям, которые живут в горячих источниках и поэтому генетически обладают необычными адаптогенными свойствами [2-4]. В ходе экспедиций 2012-2013 гг. на Камчатку нами были обследованы пробы из 16 видов гидротерм. Установлено, что наиболее распространенным и приспособленным является вид ТВ *Mastigocladus laminosus*, на втором месте находится вид *Phormidium tenue*. Биомасса ТВ разных видов характеризуется высоким содержанием белка, углеводов, невысоким - липидов, достаточно богатым комплексом витаминов, минеральных веществ (железо, магний, кальций, йод, бор, цинк, медь). Большинство ТВ способны синтезировать все органические вещества своей клетки за счет энергии света. Пигменты сине-зеленых ТВ представлены хлорофиллом *a*, *b*, также фикобилинами и каротиноидами и другими. Хлорофилл *a* составляет до 81% от количества спирторастворимых пигментов. Известно бактерицидное и антиоксидантное действие хлорофилла в отношении мембран клеток [2-4]. Клеточные тесты для испытания воздействий биологически активных веществ с помощью флуоресцентных зондов-ионов [2, 6-11] основаны на принципе эпиморфизма между аэробными клетками и целостным организмом по отношению к ключевой общебиологической системе окислительного фосфорилирования, локализованной в митохондриях [2, 5]. В ряде исследований показаны возможности полихроматического флуоресцентного зонда-катиона 4-(*n*-диметиламиностирил)-1-метилпиридиния (ДСМ) как чувствительного и информативного молекулярного инструмента для исследования изменения митохондриальной активности и трансмембранных потенциалов (ТМП) в разных клетках под воздействиями *in vitro* [6-12]. В нашей предыдущей работе [12] с помощью ДСМ был выявлен токсичный эффект цитостатика циклофосфамида – снижение энергетической активности митохондрий и ТМП в лимфоцитах, изолированных из

крови. Целью данной работы является исследование *in vitro* адаптогенных и защитных свойств экстрактов из ТВ в отношении иммунных клеток в нативной крови при различных условиях и в присутствии циклофосфида на основе применения потенциал-чувствительного зонда ДСМ.

ОБЪЕКТЫ, МЕТОДЫ И УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

В исследованиях использовали образцы донорской венозной цитратной крови (ФГУ РНЦ РР) (6 доноров). Параллельные исследования проводили на образцах свежей и суточной крови этих же доноров, последнюю в течение суток выдерживали при -2°С с целью изменения энергетического статуса клеток. Пробы каждого образца донорской крови из исходных пробирок переносили микропипетками в конусные пробирки (типа Eppendorf объёмом 1,5 мл) по 50 мкл, в которые затем последовательно добавляли испытуемые вещества и выдерживали в термостате при 37°С с экспозициями от 30-60 мин в зависимости от схемы опытов. В работе использовали образцы 40% спиртовых экстрактов из термофильных водорослей ТВ-1 и ТВ-2, полученных из двух разных гидротерм Камчатки, характеристики которых представлены в таблице 1. Экстракт из ТВ-2 исходно имеет слабую зеленую окраску, а экстракт из ТВ-1 почти бесцветный, что отражает различное содержание и (или) состояние пигментов хлорофилла в этих пробах [3,4].

В качестве токсической нагрузки на клетки крови в экспериментах использовали маточный раствор циклофосфида (Ц) в концентрации 0.02 мг/л (действующее вещество препарата «Циклофосфан»).

Для выявления защитного действия ТВ на клетки использовали следующую схему инкубаций:

$$[(10\text{мкл крови} + 1\text{мкл ТВ } (1:10^3))_{30 \text{ мин } 37^\circ \text{C}} + 1 \text{ мкл Ц } (0,02 \text{ мг/л})]_{30 \text{ мин } 37^\circ \text{C}}$$

Во все контрольные пробы крови добавляли (вместо разбавленного раствора ТВ) 40% раствор этанола, соответственно разбавленный физиологическим раствором в конечном соотношении 1:10³.

Согласно ранее разработанной методике [7] флуорохромирование клеток в нативной крови производили путем добавления физиологического раствора зонда ДСМ в пробирку с кровью до его конечных концентраций 10-25 мкМ с последующим перемешиванием и инкубацией при 37°С с экспозицией 30-60 мин. В работе использовали флуоресцентный зонд ДСМ [6], синтезированный в Институте органического синтеза АН Латвии. Опыты с каждым образцом крови проводили последовательно с интервалом в 20 мин. Для исследований нативные мазки крови приготавливали методом раздавленной капли (на стекле) [7]. Приготовленные витальные мазки крови исследовали на микроскопе-флуориметре Люмам-И2 (ЛОМО) в свете флуоресценции ДСМ. Условия возбуждения, наблюдения и регистрации флуоресценции ДСМ в клетках аналогичны, использованным в работах [6-9]. Микрофотографирование клеток осуществляли в фоторежиме с помощью фотокамеры фирмы Canon, закрепленной на специальном тубусе микроскопа. Для каждого образца исследовали массивы по 100 клеток в контроле и опыте. Статистическую обработку данных проводили по Стьюденту [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно теории снижение энергетической активности митохондрий сопряжено с падением протонного потенциала на их мембранах [5], что приводит к изменению распределения катионов ДСМ между митохондриями, цитоплазмой и ядром [6-10,12]. При этом цвет флуоресценции зонда в митохондриях может изменяться от ярко-жёлтого до бледно-зеленого [6-9]. Одновременно снижается энергозависимый положительный градиент электрического поля на ядерной мембране [10]. В итоге катионы ДСМ проникают в ядро, и появляется оранжевая флуоресценция ДСМ, которая обусловлена связыванием катионов зонда с отрицательными полимерными структурами в ядре (ДНК и РНК) [6]. Наиболее яркая флуоресценция ДСМ в ядре возникает при достижении избыточной концентрации зонда внутри митохондрий (свыше предела его растворимости в воде), что характерно для исходно гиперактивных клеток с высокой митохондриальной активностью [6, 8, 9, 12]. Эти особенности полихроматической флуоресценции ДСМ позволяют визуально распознавать различные энергетические состояния клеток и оценивать соответствующие им ТМП согласно [8, 9, 11, 12].

Таблица 1. Видовая специфичность гидротерм Камчатки, из которых добыты образцы термофильных водорослей (ТВ1 и ТВ2)

Название гидротерм	Дебит, л/с	T, °C	Величина общей минерализации	Химический состав	Кислотность
Начикинские (ТВ1)	40	27-81	Маломинерализованные	хлоридно-сульфатные натриевые, кремнистые, азотные	слабощелочные
Малкинские (ТВ2)	30	35-83	Слабоминерализованные	гидрокарбонатно-сульфатно-хлоридные натриевые, кремнистые, азотные	слабокислотные-слабощелочные

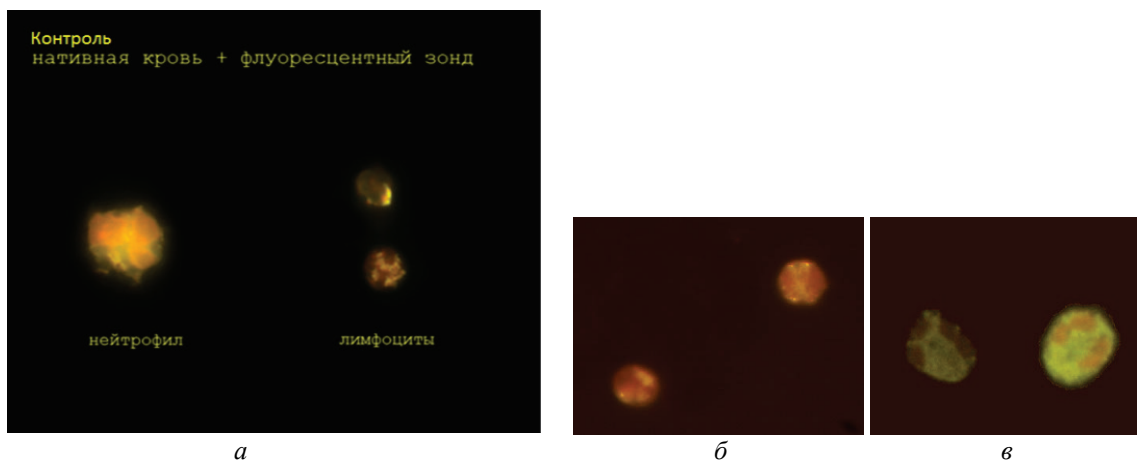


Рисунок 1. Нативная кровь в свете флуоресценции ДСМ: лимфоциты и нейтрофилы в свежей крови (а); в суточной крови после инкубации с ТВ1 (б, в). Увеличение – в 10^3 раз

В ходе люминесцентно-микроскопических исследований препаратов нативной крови установлено, что клетки в крови можно разделить по интенсивности и цвету флуоресценции ДСМ (в митохондриях и ядрах) на 4 пула соответственно диапазонам их суммарного ТМП на плазматической ($\phi_{\text{п}}$) и митохондриальной ($\phi_{\text{мх}}$) мембранах ($\phi_{\text{п}} + \phi_{\text{мх}}$), откалиброванных ранее путём прямого измерения суммы ТМП с помощью ДСМ согласно методу [8]. При этом, как показано в предыдущей работе [12], информативным и удобным показателем энергетической активности популяции (ЭАП) клеток является отношение между нормированными количествами (пулами) клеток с высокими и низкими значениями ТМП, а именно:

$$\text{ЭАП} = (n_1 + n_2) / (n_3 + n_4) = N_{\text{э}} / N_{\text{нэ}}, \quad (1)$$

где n_i – число клеток данного типа в i -м пуле, $N_{\text{э}}$ и $N_{\text{нэ}}$ – суммарные количество клеток в двух первых и двух последних пулах с энергизированными и слабоэнергизированными лимфоцитами (Л) или нейтрофилами (НФ) в крови соответственно.

На рисунке 1 представлены флуоресцентные изображения клеток с ДСМ в мазках нативной крови, которые демонстрируют различные энергетические состояния и уровни ТМП в клетках (Л и НФ): на фото а – слева активный НФ с высоким уровнем ТМП, справа лимфоциты с активными митохондриями (Мх), снизу активный Л с повышенным числом Мх и высоким ТМП, на фото б – гиперактивные лимфоциты после инкубации с ТВ1 имеют яркие ядра, энергизированные Мх, но часть Мх со сниженным ТМП, на фото в – слабоактивный и более активный нейтрофилы с усиленным гликолизом, видны слабоактивные зелёно-жёлтые Мх.

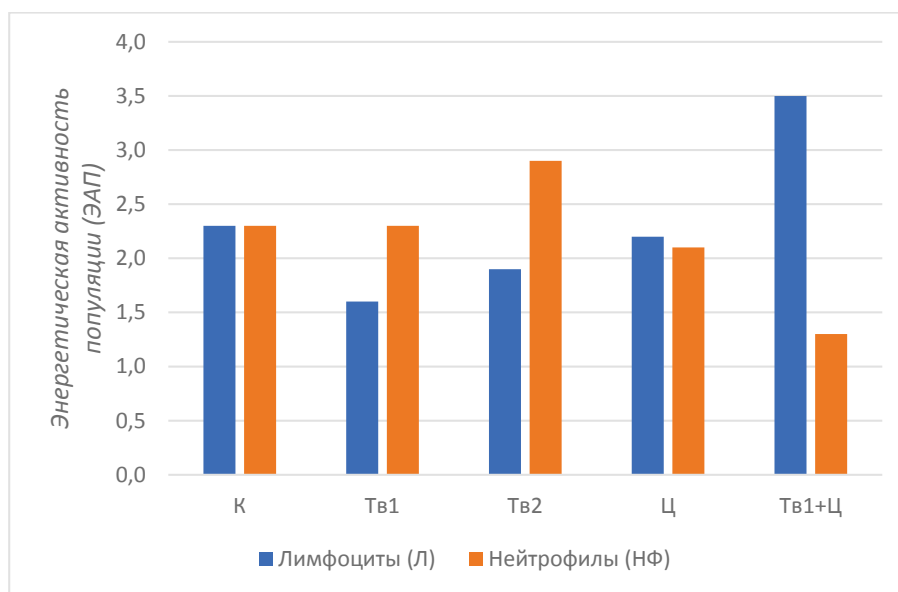


Рисунок 2. Эффекты влияния ТВ1, ТВ2 и цитостатика Ц на относительный показатель энергетической активности популяции (ЭАП) лимфоцитов и нейтрофилов в свежей донорской крови, окрашенной ДСМ. Средняя погрешность: $\pm 0,4$

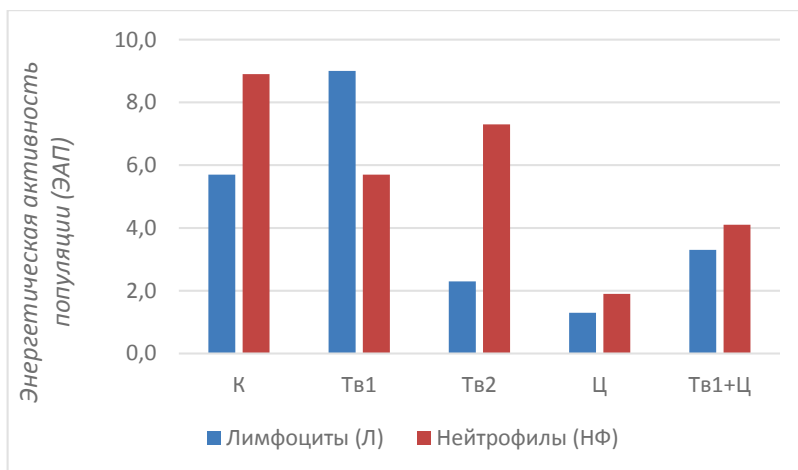


Рисунок 3. Эффекты влияния ТВ1, ТВ2 и цитостатика Ц на относительный показатель энергетической активности популяции (ЭАП) лимфоцитов и нейтрофилов в суточной крови, окрашенной ДСМ. Средняя погрешность: ± 0,6.

В таблицах 2 и 3 суммированы среднестатистические данные о распределении лимфоцитов (Л) и нейтрофилов (НФ) по диапазонам суммы ТМП в образцах суточной или свежей крови на фоне воздействий ТВ и Ц, полученные с помощью зонда ДСМ аналогично [12].

Эффекты ТВ в суточной крови. Сопоставление данных таблиц 2 и 3 показывает, что в суточной крови пул высокоактивных лимфоцитов исходно существенно меньше, чем в свежей крови, но в контрольной суточной крови (К) пул высокоактивных клеток и соответственно ЭАП возрастают в несколько раз. ТВ1 в 1,5 раза увеличивает ЭАП, а ТВ2, напротив, снижает число гиперактивных Л и соответственно их ЭАП. В отличие от эффектов в лимфоцитах ТВ1 и ТВ2 достоверно снижают ЭАП НФ, причём, ТВ2 сильнее. В присутствии цитостатика Ц в 2-4 раза снижается ЭАП Л и НФ, соответственно, из-за увеличения числа клеток с деэнергизированными митохондриями. Эти изменения ЭАП в суточной крови наглядно показаны на рисунке 3. На рисунке 4 представлены результаты параллельных прямых измерений интенсивности флуоресценции ДСМ в НФ этих же образцов крови. Изменения флуоресценции ДСМ и ЭАП в этих опытах коррелируют, но ЭАП более информативен для выявления эффектов воздействий на ТМП в разных пулах клеток.

Таблица 2. Распределение лимфоцитов по диапазонам суммарного ТМП ($\Delta\phi$) на внешней ($\Delta\phi_n$) и митохондриальной ($\Delta\phi_{mx}$) мембранах и величины энергетической активности популяции (ЭАП) в свежей (нижние строки) и в суточной (верхние строки) крови в контроле и в опытах

$\Delta\phi = \Delta\phi_n + \Delta\phi_{mx}$ mV	< 60	60 -150	160 - 220	230 - 280	ЭАП
n_i	1	2	3	4	$(n_3+n_4)/(n_1+n_2)$
Кровь+физ.раствор.	3 ± 1	51 ± 5	45 ± 4	10 ± 2	$1,1 \pm 0,3$
% клеток	2 ± 1	18 ± 1	44 ± 4	36 ± 4	$4,1 \pm 0,5$
Контроль (К): кровь +этанол (1:10 ³), % клеток	2 ± 1	13 ± 2	44 ± 4	41 ± 4	$5,7 \pm 0,7$
+ ТВ1,	2	9	41	49 ↑	↑ 9,0 ± 1,6
	6	32	45	17	↓ 1,6 ± 0,2
+ ТВ2	3	27	52	18	↓ 2,3 ± 0,3
	9	25	45	23	↓ 1,9 ± 0,2
+ Ц ,	4	42	45	9	↓ 1,3 ± 0,2
	4	27	42	27	↓ 2,2 ± 0,3
(кровь + ТВ1) + Ц,	2	22	43	36	3,2 ± 0,4
	3	19	49	29	↑ 3,5 ± 0,4

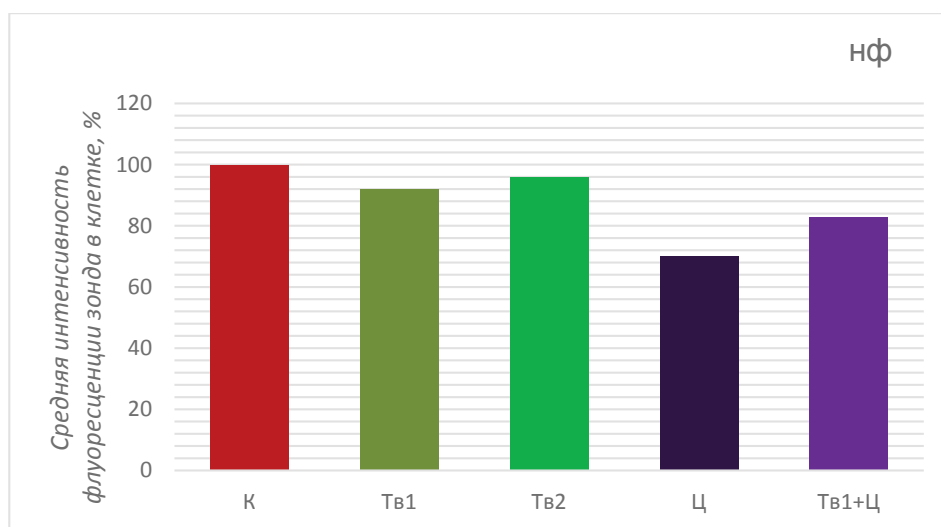


Рисунок 4. Диаграмма среднестатистических значений интенсивности флуоресценции зонда ДСМ в нейтрофилах суточной крови в контроле (К) и после инкубации крови с ТВ и цитостатиком Ц. Погрешность: $\pm 5\%$

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о противоположном характере эффектов ТВ1 и ТВ2 в лимфоцитах суточной крови. В то же время из таблиц 2 и 3 видно, что оба ТВ увеличивают 4-й пул гиперактивных НФ по сравнению с контролем, но в итоге ЭАП снижен из-за роста доли дезэнергизированных НФ в процессе переактивации.

Эффекты ТВ в свежей крови. Из данных в таблицах 2, 3 и на рисунках 2, 3 можно заключить, что в свежей крови по сравнению с суточной имеет место инверсия эффектов: ТВ1 снижает ЭАП лимфоцитов, а ТВ2 увеличивает ЭАП нейтрофилов. Анализ этих данных указывает в пользу адаптивного влияния ТВ на клетки в свежей крови: гиперактивные клетки частично переходят в пул 3 с нормальным уровнем ТМП. В опытах с цитостатиком Ц на свежей крови выявлен слабый эффект снижения энергетики митохондрий. Но при этом обнаружен эффект синергетического усиления ЭАП Л при совместном действии ТВ1 и Ц. Аналогичного эффекта на ЭАП НФ в этих пробах крови не обнаружено.

Сравнивая эффекты в опытах на разных пробах крови, можно заключить, что для серии проб суточной крови исходный показатель ЭАП НФ (кровь + ф.р.) оказывается существенно выше, чем для ЭАП НФ в свежей крови этой серии, а для ЭАП Л наоборот. Возможно, предварительная инкубация крови 24 ч при низкой температуре

Таблица 3. Распределение нейтрофилов по диапазонам ТМП ($\Delta\phi$) на внешней ($\Delta\phi_n$) и митохондриальной ($\Delta\phi_{mx}$) мембранах и величины энергетической активности популяции (ЭАП) в свежей (нижние строки) и суточной крови (верхние строки) в контроле и в опытах

$\Delta\phi = \Delta\phi_n + \Delta\phi_{mx}$ mV	60 - 180	190 - 220	230 - 260	270 - 320	ЭАП
n_i	1	2	3	4	$(n_3+n_4)/(n_1+n_2)$
Кровь + физ. раствор, % клеток	2 ± 1	9 ± 2	32 ± 3	57 ± 5	$8,1 \pm 1,5$
	4 ± 1	22 ± 2	53 ± 5	21 ± 2	$2,8 \pm 0,5$
Контроль (К): кровь + этанол ($1:10^3$), % клеток	2 ± 1	9 ± 1	34 ± 3	55 ± 5	$8,9 \pm 1,5$
	6 ± 1	24 ± 3	33 ± 3	37 ± 4	$2,3 \pm 0,3$
+ ТВ1	6	9	21	64	$\downarrow 5,7 \pm 0,9$
	6	27	45	22	$2,3 \pm 0,3$
+ ТВ2	3	9	19	69	$\downarrow 7,3 \pm 1,4$
	5	21	53	21	$\uparrow 2,9 \pm 0,3$
+ Ц	15	19	52	14	$\downarrow 1,9 \pm 0,2$
	5	27	27	41	$\downarrow 2,1 \pm 0,3$
(кровь + ТВ1) + Ц	6	14	35	45	$\uparrow 4,1 \pm 0,5$
	12	32	38	18	$\downarrow 1,3 \pm 0,2$

приводит к усилению гликолитической активности НФ и к росту их внешнего ТМП [11,15], что соответствует стрессовому состоянию этих клеток. Напротив, митохондрии в лимфоцитах лучше сохраняются на холоду и восстанавливают протонный потенциал после инкубации при физиологической температуре. Важно также отметить, что во всех контрольных пробах с добавлением микродозы этанола, наблюдается инверсия исходного энергетического статуса клеток, что фактически отражает регуляторный эффект этанола, по-видимому, через механизм изменения проницаемости мембран для ионов в клетках [15]. Тем не менее на этом фоне (К) выявлены достоверные эффекты влияния Ц и разбавленных спиртовых экстрактов из ТВ на иммунные клетки.

Сопоставление наших данных указывает в пользу того, что защитное действие ТВ1 на энергетику клеток в крови в присутствии Ц может быть обусловлено не столько хлорофиллом, сколько другими компонентами (например, повышенным содержанием пигментов каротиноидов). Низкое содержание хлорофилла в ТВ1 по сравнению с ТВ2 – следствие особенностью слабощелочной среды Начикинских гидротерм, откуда добыты образцы ТВ1 [3.4]. Хлорофилл *a* в ТВ2 может быть основным фактором, модулирующим энергетический баланс митохондрий, например, на фоне усиления гликолиза в НФ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о способности экстракта из ТВ1 снижать токсическое воздействие низкой дозы (0.02 мг/л) циклофосамида на энергетику лимфоцитов и нейтрофилов в крови. Онаруженная инверсия эффектов ТВ в наших опытах указывает на проявление адаптогенных свойств экстрактов ТВ1 и ТВ2 в отношении иммунных клеток в крови, поскольку эти эффекты зависят от их исходного энергетического статуса. Избыточная стимуляция исходно активных лимфоцитов в крови под влиянием ТВ может приводить к снижению ЭАП клеток и наоборот. В то же время нельзя исключить, что эти эффекты ТВ связаны с влиянием и на процессы взаимодействия между субпопуляциями лимфоцитов и нейтрофилов через лимфокины, интерлейкины и другие медиаторы в такой сложной системе как кровь, а также возможное влияние ТВ на мембраны эритроцитов и белки плазмы, сопряженные с оксигенацией крови [7]. Для уточнения механизмов адаптогенной и защитной активностей экстрактов из ТВ на клетки в нативной крови необходимы дальнейшие специальные исследования взаимодействия пигментов, выделенных из ТВ, с разными форменными элементами крови и с изолированными иммунными клетками.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №14-17-0067).

Список литературы / References:

1. Barenboym G.M., Kozlova M.A. Pollution of Sources of Drinking Water Supply of Large Cities with Pharmaceuticals (the Example of Moscow, Russia). *Water Resources*, 2018, vol. 45, no. 6, pp. 925-936.
2. Баренбойм Г.М., Маленков А.Г. Биологически активные вещества. Новые принципы поиска. М.: «ACADEMIA», 2012, т. 6, с. 77-386. [Barenboym G.M., Malenkov A.G. *Biologically active substances. New principles of search*. М.: Publishing House "ACADEMIA", 2012, vol. 6, pp. 77-368. (In Russ.)]
3. Акшинцев А.А. Некоторые особенности обитания биоты в гидротермах Камчатки. *Актуальные проблемы экологии и природопользования*. М.: РУДН, 2013, вып. 15, с. 39-44. [Akshintsev A.A. Some features of biota habitat in Kamchatka hydrotherms. *Aktualnye problemy ekologii i prirodopolzovaniya*. Moscow: RUDN, 2013, iss. 15, pp. 39-44. (In Russ.)]
4. Акшинцев А.А., Баренбойм Г.М., Кириченко В.Е., Никитина В.Н., Чернягина О.А. Об адаптогенных свойствах экстрактов и индивидуальных веществ, выделенных из термофильных гидробионтов Камчатки. *Сохранение биоразнообразия Камчатки и прилегающих морей, Петропавловск-Камчатский*. Изд.: «Камчатпресс», 2014, с. 13-25. [Akshintsev A.A., Barenboym G.M., Kirichenko V.E., Nikitina V.N., Chernyagina O.A. Adaptogenic properties of extracts and individual substances isolated from Kamchatkathermohylic hydrobionts. *Sokhraneniye bioraznoobraziya Kamchatki i prilegayushih morej, Petropavlovsk-Kamchatskij*. Ed. Kamchatpress, 2014, pp. 13-25. (In Russ.)]
5. Скулачев В.П. *Энергетика биологических мембран*. М: Наука, 1989, 123 с. [Skulachev V.P. *Energy of biological membranes*. М.: Science, 1989, 123 p. (In Russ.)]
6. Морозова Г.И., Добрецов Г.Е., Дубуре Р.Р., Дубур Г.Я., Голицын В.М., Владимиров Ю.А. Флуоресценция зонда 4-(*n*-диметиламиностирил)-1-метилпиридиния в живой клетке. *Цитология*, 1981, т. 23, № 8, с. 916-923. [Morozova G.I., Dobretsov G.E., Dubur R.R., Dubur G.Ya., Golitsyn V.M., Vladimirov Yu.A. Fluorescence of 4-(*n*-dimethylaminostyryl) -1-methylpyridinium probe in a living cell. *Cytology*, 1981, vol. 23, no. 8, pp. 916-923. (In Russ.)]
7. Морозова Г.И., Онищенко Н.А., Оржеховская И.Г., Коробкова Е. Н., Полосина О.В., Базиева Ф.Х., Баукина О.В. Микрофлуориметрический метод идентификации и оценки физиологического состояния лимфоцитов и нейтрофилов в цельной нативной крови с помощью флуоресцентного зонда-катиона ДСМ: клиника и эксперимент. *Гематология и трансфузиология*, 1997, т. 42, № 3, стр. 43-47. [Morozova G.I., Onishchenko N.A., Orzechowska I.G., Korobkova E.N., Polosin V.O., Bazyeva F.H., Baukina O.V. Microfluorimetric identification and assessment of the physiological state of lymphocytes and neutrophils in whole native blood by means of fluorescent probe-cation DSM: clinical and experimental data. *Gematal. Transfuziol.*, 1997, vol. 42, no. 3, pp. 43-47. (In Russ.)]
8. Добрецов Г.Е., Косников В.В., Морозова Г.И., Лихачева Л.М., Айдыралиев Р.К., Владимиров Ю.А. Измерение градиента концентрации флуоресцентного зонда - катиона ДСМ на цитоплазматической и

митохондриальной мембраны. *Биологические мембраны*, 1986, т. 3, № 3, с. 266-273. [Dobretsov G.E., Kosnikov V.V., Morozova G.I., Likhacheva L.M., Aidaraliev R.K., Vladimirov Yu.A. Measurement of the concentration gradient of the fluorescent probe - cation DSM on the cytoplasmic and mitochondrial membranes. *Biological membranes*, 1986, vol. 3, no. 3, pp. 266-273. (In Russ.)]

9. Morozova G.I., Parkhomenko T.V., Klitsenko O.A., Tomson V.V. Stimulating effect of erythropoietin on thy timocyte energetics established in vitro with a potential-sensitive fluorescent probe in the mitochondria. *Biochem. Suppl. Series A: Membrane and Cell Biology*, 2007, vol. 1, no. 4, pp. 325-330.

10. Морозова Г.И., Полетаев А.И., Борщевская Т.А. Инвертированный электрохимический потенциал на ядерной мембране клеток и его связь с клеточной энергетикой. *Сборник докладов 2-го съезда биофизиков России*. М.: 1999, с. 256-257. [Morozova G.I., Poletaev A.I., Borschevskaya T.A. Inverted electrochemical potential on the nuclear membrane of cells and its relationship with cellular energy. *Reports of the 2nd Russia biophysicists Congress*. М.: 1999, pp. 256-257. (In Russ.)]

11. Toshakov V.G., Morozova G.I., Onishchenko N.A. Energy metabolism of cryoprevved rad hehatocytes. *Cryo-letters*, 1991, no. 12, pp. 259-272.

12. Морозова Г.И., Козлова М.А., Акшинцев А.А. Оценка экологической токсичности водных растворов ксенобиотиков в малых дозах на клетках донорской крови с помощью потенциал-чувствительного флуоресцентного зонда. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2019, т. 4, № 3, с. 428-424. [Morozova G.I., Kozlova M.A., Akshintsev A.A. Evaluation of the ecological toxicity of aqueous solutions with low xenobiotics doses on donor blood cells using a potential-sensitive fluorescent probe. *Aktualnye voprosy biologicheskoy fiziki i himii*, 2019, vol. 4, no. 3, pp. 428-424. (In Russ.)]

13. Забродский П.Ф., Теректук Т.С., Плахута И.А., Серов В.В. Особенности фармакологической регуляции нарушений иммунного ответа, обусловленных применением циклофосфамида. *Вестник Волгоградского ГМУ*, т. 21, № 1, с. 39-41. [Zabrodskii P.F., Terentyuk T.S., Plakhuta I.A., Serov V.V. Peculiarities of pharmacological regulation of the immune response violations resulting from the application of cyclophosphamide. *Vestnik Volgograd. GMU*, vol. 21, no. 1, pp. 39-41. (In Russ.)]

14. Бейли И.Н. *Статистические методы в биологии*. М.: Наука, 1963, 277 с. [Bailey I.N. *Statistical methods in biology*. М.: Science, 1963, 277 p. (In Russ.)]

15. Твердислов В.А., Тихонов А.Н., Яковенко Л.В. *Физические механизмы функционирования биологических мембран*. М: МГУ, 1987, 187 с. [Tverdislov V.A., Tikhonov A.N., Yakovenko L.V. *Physical mechanisms of biological membranes functioning*. М: Moscow State University, 1987, 187 p. (In Russ.)]

DETECTION OF ADAPTOGENIC AND PROTECTIVE OF THERMOPHILIC ALGAE EXTRACTS EFFECTS ON LEUKOCYTE ENERGY STATUS IN NATIVE BLOOD USING A POTENTIAL-SENSITIVE FLUORESCENT PROBE DSM

Akshintsev A.A.¹, Morozova G.I.², Kozlova M.A.¹, Barenboym G.M.¹

¹Russian Peoples' Friendship University,
st. Miklukho-Maklay, 6, Moscow, 117198, Russia; e-mail: gimorozova@mail.ru

²Water Problems Institute of RAS,
st. Gubkina, 3, Moscow, 19991, Russia; e-mail: mblshok@mail.ru

Abstract. The search for natural adaptogens that can stabilize the energy balance of cells against the background of drugs low doses which pollute water is relevant. The aim of the work is to identify the protective effect of thermophilic blue-green algae (TA1 and TA2) extracted from two of Kamchatka's hydrothermal waters on native blood cells. By use of the microscope-microfluorimeter, lymphocytes (L) and neutrophils (N) were detected in donor venous native blood smears. Then the sum of the transmembrane potentials (TMP) on the outer and mitochondrial membranes was estimated from the fluorescence intensity and color of the polychromatic cationic probe 4- (n- dimethylaminostyryl) - 1-methylpyridinium (DSM). The ratio between cell pools with low and high TMPs in L or N populations were used as an indicator of the cell population energy activity (EAP). During in vitro tests of TA on control blood samples, an increase in mitochondrial activity in L was detected, but a decrease in TMP in N was observed. The analysis of the experimental data revealed a significant decrease in the EAP after the blood pre-incubation with the Cyclophosphamide (C) (0.002 mg / l) at 37°C. It is established that the TA1 (unlike TA2) causes a partial EAP restoration for L and reduces the C toxic effect on the mitochondria. From a comparison of the data obtained, it follows that these TBs exhibit adaptogenic activity in the blood, since their effects depend on the initial immune cells activity in fresh and daily blood samples.

Key words: thermophilic algae, adaptation, fluorescent probe DSM, native blood, lymphocytes, neutrophils, transmembrane potential, mitochondrial activity, cyclophosphamide.