

ОЦЕНКА ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ ТОКСИЧНОСТИ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ КСЕНОБИОТИКОВ В МАЛЫХ ДОЗАХ НА КЛЕТКАХ ДОНОРСКОЙ КРОВИ С ПОМОЩЬЮ ПОТЕНЦИАЛ-ЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ЗОНДА

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

¹ Российский университет дружбы народов

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

² Институт водных проблем РАН

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

Поступила в редакцию: 29.07.2019

Аннотация. С целью оценки опасности для живых организмов вод, загрязнённых ксенобиотиками (КБ), исследовали влияние малых доз водорастворимых веществ: противоопухолевого циклофосамида (Ц), гормона дексаметазона (Д) и сульфата цинка (Zn) на сумму трансмембранных потенциалов на внешней и митохондриальной мембранах (ТМП) мононуклеарных (МН) клеток, выделенных из донорской крови, и на энергетическую активность популяций (ЭАП) клеток. Доза-зависимые эффекты в МН клетках оценивали по изменению интенсивности и цвета флуоресценции зонда-катиона 4-(*n*-диметиламиностирил)-1-метилпиридиния (ДСМ) в митохондриях и ядрах клеток с помощью микроскопа-микрофлуориметра или на проточном цитометре. Экспериментально установлены пороговые дозы исследуемых веществ. Выявлена сравнительная безопасность Д в дозах (10^{-4} - 10^{-6}) мг/л, но в дозе $2 \cdot 10^{-3}$ мг/л обнаружен модулирующий эффект Д на показатель ЭАП. Установлено снижение ЭАП в активных МН клетках во всём диапазоне выбранных концентраций Ц. В сравнительных опытах с исходно низкими ТМП в МН клетках, обнаружен стимулирующий эффект малой дозы Ц (10^{-5} мг/л) на митохондрии некоторых клеток. В соответствие с электродиффузной теорией при длительном воздействии на организм малые дозы катионных лекарств могут быть токсичны для энергетического статуса иммунных клеток.

Ключевые слова: экологическая токсичность, дексаметазон, циклофосамид, сульфат цинка, флуоресцентный зонд ДСМ, мононуклеарные клетки крови, энергетическая активность, митохондрии, трансмембранный потенциал.

Большинство химических соединений, используемых в человеческой жизнедеятельности, являются ксенобиотиками (КБ), т.е. веществами чуждыми организму [1-3]. Существенно, что на живые объекты одновременно могут воздействовать лекарственные вещества (ЛВ), примесные металлы и металлоиды окружающей водной среды, что может выражаться через синергические эффекты этих компонентов [1]. Проблема лекарственного и техногенного загрязнения водоёмов затрагивает не только аспекты обнаружения примесей в воде, но и оценку их опасности для гидробиоты и человека в микроконцентрациях.

Все аэробные клетки в норме содержат митохондрии, генерирующие протонный потенциал на мембранах [4]. Клеточные тесты с применением флуоресцентных зондов-ионов [5-8] основаны на принципе эпиморфизма между аэробными изолированными клетками и целостным организмом по отношению к ключевой общебиологической системе окислительного фосфорилирования, локализованной в митохондриях, и поэтому наиболее адекватны для выявления различных воздействий на энергетику живых организмов в целом. Прогнозирование эффектов действия малых доз водорастворимых ЛВ на клетки возможно в рамках электродиффузной модели распределения потенциал-чувствительного зонда-катиона 4-(*n*-диметиламиностирил)-1-метилпиридиния (ДСМ) между цитоплазмой, митохондриями и ядром в живых лимфоцитах [3, 4]. Ранее установлено, что эффекты изменения интенсивности и цвета флуоресценции ДСМ в этих мембранных отсеках при воздействиях отражают изменение отрицательных трансмембранных потенциалов (ТМП) на плазматической, митохондриальной мембранах и положительного ТМП на ядерной мембране клеток [3, 5-10].

В ряде экспериментов показано, что гетерогенность клеток по энергетическому статусу можно представить в виде гистограмм распределения клеток по уровням ТМП, откалиброванных на основе результатов прямого измерения суммы ТМП в клетках с помощью ДСМ согласно методу [5]. При этом информативным и удобным индикатором энергетической активности популяции (ЭАП) клеток является отношение клеток в двух суммарных пулах гистограммы (с высокими и низкими значениями ТМП-ов) [7, 8]. В данной работе аналогичный методический подход использован для выявления токсического влияния малых доз некоторых водорастворимых веществ на энергетический статус мононуклеарных (МН) клеток, выделенных из донорской крови.

ОБЪЕКТЫ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

С целью оценки экологической токсичности вод, загрязнённых ЛВ и тяжёлыми металлами, выбраны следующие водорастворимые вещества:

1) противоопухолевый препарат циклофосфамид (Ц) с цитостатическим, иммунодепрессивным действием [11]. Этот цитостатик был обнаружен в воде Ивановского водохранилища, Канала им. Москвы и реки Истра в концентрациях 2-16 нг/л [1]. Иммунодепрессивное действие Ц проявляется в подавлении пролиферации лимфоцитарных клонов, участвующих в иммунном ответе [11, 12];

2) гормональный препарат глюкокортикоид дексаметазон (Д) с противовоспалительным, противоаллергическим, иммунодепрессивным действием[16]. Выбор этого вещества обусловлен его хорошей растворимостью в воде и повсеместным использованием. Гормон Д взаимодействует со специфическими цитоплазматическими рецепторами и образует комплекс, проникающий в ядро клетки; угнетает высвобождение цитокинов из лимфоцитов и макрофагов;

3) сульфат Цинка (Zn) при конечных его концентрациях в суспензиях клеток: 0,01 мг/л (Zn2); 0,001 мг/л (Zn3) и 0,0001 мг/л (Zn4) соответственно; установлено, что для зоопланктона токсичны 0,08 мг Zn/л и выше [1].

Используемые концентрации Ц или Д в суспензиях клеток из крови указаны в таблице 1.

Для тестирования проб воды, загрязненных малыми концентрациями выбранных ЛВ и Zn, использовали витальную тест-систему «Мононуклеарные клетки крови + ДСМ».

Исследования проводили на образцах суспензированных мононуклеарных (МН) клеток, выделенных из донорской венозной цитратной крови (10 доноров) (ФГУ РНЦ РР) по стандартной методике [13] путём центрифугирования образцов крови в градиенте плотности с последующим разбавлением полученных суспензий клеток культуральной средой в центрифужных пробирках до концентрации клеток $5 \cdot 10^6$ кл/мл (для микрофлуориметрии) и до $0,6 \cdot 10^6$ кл/мл (для проточной цитометрии). Жизнеспособность клеток оценивали стандартным методом по окрашиванию клеток трипановым синим [13].

В экспериментах использовали микроскопа-микрофлуориметр Люмам И-2 с фотометрической насадкой ФЭУ (ЛОМО) и проточный цитометр (ПЦ) (Beckman Coulter Cytomics FC 500) с аргоновым лазером. Для исследования полученные клетки суспензировали в конусные пробирки (Eppendorf) объёмом 1,5 мл по 0,2 мл (для микроскопии) или по 0,7мл (для ПЦ), в которые с интервалом 7 мин (для ПЦ) или 15 мин (для микроскопии) добавляли растворы выбранных веществ до конечных концентраций, указанных в таблице 1, или физиологический раствор в контрольные клетки в равных малых объёмах (1: 100). Пробирки с клетками после добавок последовательно инкубировали в термостате при 37°С с экспозицией 1ч. В работе использовали потенциал-чувствительный флуоресцентный зонд 4-(п-диметиламиностирил)-1-метилпиридиний (ДСМ) [6, 8], синтезированный в Институте органического синтеза АН Латвии. Витальное флуорохромирование клеток осуществляли путем добавления физиологического раствора ДСМ к суспензии клеток до конечных его концентраций 2мкМ (в опытах с Ц) или 0,2-1 мкМ (в опытах с Д) с последующим перемешиванием суспензии клеток и инкубацией их при 37°С с экспозицией 20 мин.

В экспериментах на микрофлуориметре нативные препараты клеток приготавливали методом раздавленной капли (на стекле) [4, 8], каждый препарат исследовали в течение 15 мин. Условия возбуждения, наблюдения и регистрации флуоресценции ДСМ в индивидуальных клетках аналогичны указанным в работах [4, 7, 8]. Распределение клеток по уровням суммы их ТМП на внешней и митохондриальной мембранах получали путём регистрации флуоресценции ДСМ в митохондриях этих клеток при разных концентрациях ДСМ аналогично [4, 10]. Для каждого образца исследовали по 100 клеток в контроле и опыте. В каждом опыте исследовали клетки из двух клеточных образцов каждого донора при одинаковых экспериментальных условиях и суммировали данные измерений для массива не менее 200 клеток. Статистическую обработку данных проводили по Стьюденту [14].

Таблица 1. Концентрации циклофосфамида (Ц) и дексаметазона (Д), используемых в опытах

№	Обозначение концентраций циклофосфамида (Ц), дексаметазона (Д)	Конечные концентрации лекарств в суспензиях МН клеток, мг/л
1	Ц1 или Д2	0,2
2	Ц2 Д2	$2 \cdot 10^{-2}$
3	Ц3 Д3	$2 \cdot 10^{-3}$
4	Ц4 Д4	$2 \cdot 10^{-4}$
5	Ц5 Д5	$2 \cdot 10^{-5}$
6	Ц6 Д6	$2 \cdot 10^{-6}$

В экспериментах на ПЦ данные получали в виде гистограмм распределения клеток одновременно по интенсивностям трех типов флуоресценции зонда ДСМ в последовательные моменты времени после добавления ДСМ к суспензии клеток (с интервалом 7 мин). Возбуждение флуоресценции в протоке осуществляли длиной волны 488 нм излучения аргонового лазера, при этом разные спектральные области флуоресценции в клетках (зелёную - FL1 в мембранах, жёлтую - FL2 в митохондриях, красную - FL3 в ядрах) выделяли одновременно с помощью разных интерференционных фильтров с максимумами пропускания 525, 560 и 620 (нм) соответственно. В каждой гистограмме измеряли массив порядка 5000 клеток. В качестве показателей эффектов действия тестируемого лекарства на МН клетки использовали значения интенсивностей флуоресценции ДСМ в области пиков гистограмм (основных максимумов F1 для пула лимфоцитов и пула моноцитов) и количество (%) клеток в областях вблизи этих пиков в соответствии с методиками [15, 16]. На основе обобщения данных этих измерений строили график доза-зависимости эффектов действия лекарства на МН клетки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Экспериментально установлено, что время достижения квазистационарного распределения катионов ДСМ в рабочих концентрациях между средой, цитоплазмой, митохондрием и ядром в МН клетках находится в пределах 15-30 мин. при 37 °С. Люминесцентная микроскопия показала, что в контрольных препаратах МН клеток с ДСМ (1-2 мкМ), распознаются активные лимфоциты и моноциты с жёлтой флуоресценцией митохондрий и слабой красной флуоресценцией в ядрах. В результате анализа клеток в препаратах по интенсивности и цвету флуоресценции ДСМ в их митохондриях и ядрах установлено, что массивы МН клеток, можно оптимально разделить на 4 пула. Эти пулы соответствуют откалиброванным диапазонам суммы ТМП ($\phi_{\text{п}} + \phi_{\text{мх}}$) на плазматической ($\phi_{\text{п}}$) и митохондриальной ($\phi_{\text{мх}}$) мембранах клеток согласно методикам в [4,7, 8]. Как отмечалось выше, для оценки изменения энергетического статуса клеток информативен показатель энергетической активности популяции клеток (ЭАП), заданный следующим образом:

$$\text{ЭАП} = N_3/N_{\text{сз}} = (n_3 + n_4) / (n_1 + n_2), \quad (1)$$

где n_i – число клеток в i -м пуле, N_3 и $N_{\text{сз}}$ – количество клеток в пулах с энергизированными (N_3) и слабо-энергизированными клетками ($N_{\text{сз}}$) соответственно. Изменение характера этой гетерогенности до и после воздействия отражает изменение суммарного ТМП, сопряжённого прежде всего с энергетикой митохондрий МН клеток данного пула. Сравнительные люминесцентно-микроскопические исследования и микрофлуориметрия МН клеток с ДСМ показали, что в диапазоне концентраций (Ц1- Ц4), как правило, уменьшается пул клеток с ярко-жёлтыми митохондриями и с высоким ТМП, а пул неярких клеток увеличивается. В последних снижается интенсивность флуоресценции ДСМ внутри митохондрий, а цвет изменяется от ярко-жёлтого до зелёного, появляется ярко-красная флуоресценция ДСМ в ядрах, утративших положительный ТМП на ядерной мембране [9].

Таблица 2. Распределение МН клеток крови по уровням их ТМП ($\Delta\phi$) в контрольных (К) и опытных (+.) образцах после их инкубации с разными концентрациями циклофосфида (Ц), сульфата цинка (Zn3) или дексаметазона (Д1)

$\Delta\phi = \Delta\phi_{\text{п}} + \Delta\phi_{\text{мх}}$ mV	<60	60 – 150	160 – 220	230 – 280	ЭАП
n	1	2	3	4	$(n_3 + n_4)/(n_1 + n_2)$
К, % клеток	2 ± 1	18 ± 2	45 ± 4	35 ± 3	4.1 ± 0.5
+Ц1	6	24	44	26	2.3
+Ц2	6	32	45	17	1.6 ↓
+Ц3	9	25	43	23	1.9
+Ц4	4	27	42	27	2.2
+Ц5	3	19	49	29	3.5
+Ц6	4	24	53	19	2.5
+Zn3	2	40↑	54	4↓	1.4↓
+(Zn3 + Ц2)	10↑	38↑	45	7↓	1.1↓
+Д1	1	19	42	38 ↑	4.0

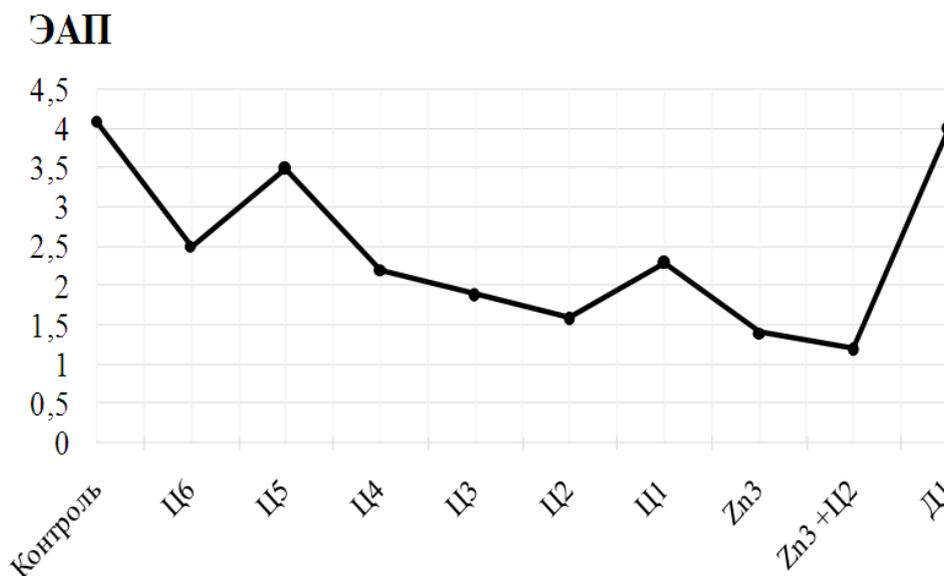


Рисунок 1 Доза-зависимость эффектов циклофосфамида (Ц) в МН клетках по индексу энергетической активности популяции клеток (ЭАП). Погрешность: ± 0,5

Среднестатистические данные влияния циклофосфамида (Ц) в диапазоне концентраций Ц1 – Ц6, а также Zn3 или дексаметазона (Д1) на показатель ЭАП МН клеток представлены и в таблице 2 и на рисунке 1. Наибольший эффект достигается при дозах Ц, близких к физиологическим (Ц1, Ц2), а также после инкубации клеток с Zn3; при совместном действии Zn3 и Ц2 выявляется синэргическое усиление этого эффекта. В то же время в экспериментах обнаружена заметная тенденция к стимуляции части клеток в опыте с дозой Ц5. Эта особенность отражается в нелинейном характере доза-зависимости эффектов Ц в МН клетках по показателю ЭАП.

С целью обнаружения взаимосвязи между исходным состоянием клеток по ЭАП и характером их реакции на цитостатик Ц, исследовали его эффекты на МН клетки из суспензий, которые предварительно выдерживали сутки при температуре 20°C. Результаты этих опытов представлены в таблице 3. Показатель ЭАП в контроле суточных клеток (МНс) оказался в 1,5 ниже по сравнению с контрольными свежими клетками при тех же условиях инкубации. Важно отметить, что в опытах на МНс, где много клеток с низкими ТМП, обнаружен эффект стимуляции ЭАП малыми дозами Ц, достоверный для дозы Ц5. При этом во всех контролях жизнеспособность свежих и суточных клеток (по тесту с трипановым синим) изменяется незначительно (на 3-5 %).

Сопоставление полученных данных указывает, в основном, на однонаправленный характер действия Ц в свежих и суточных клетках, отражающий снижение доли (%) клеток с более высокими ТМП за исключением эффекта дозы Ц5. В последнем случае частичная дезэнергизация наиболее активных митохондрий, накопивших катионы Ц, возможно, способствует активации «спящих митохондрий», для повреждения которых уже недостаточно микроконцентрации Ц5 [14].

Из представленных выше данных следует, что гормон даже в наибольшей дозе Д1 не оказывает достоверного влияния на МН клетки. Поэтому для выявления возможного действия малых доз Д на энергетику МН клеток использовали метод проточной флуориметрии, более чувствительный и позволяющий измерить в каждом опыте большой массив клеток.

Таблица 3. Влияние циклофосфамида (Ц) на ТМП (Δφ) и ЭАП суточных клеток (МНс)

$\Delta\phi = \Delta\phi_n + \Delta\phi_{mx}$ mV	< 60	60 -150	160 - 220	230 - 280	ЭАП
n_i	1	2	3	4	$(n_3+n_4)/(n_1+n_2)$
Контроль, % МНс	5 ± 2	22 ± 3	55 ± 4	21 ± 3	2,8 ± 0,4
+ Ц3	8	25	44	23	2,0 ↓
+ Ц4	6	24	46	24	2,3
+ Ц5	3	20↓	53	24	3,3 ↑

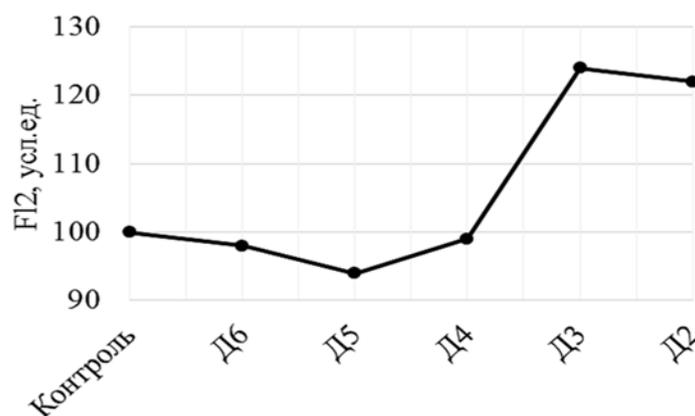


Рисунок 2. Обобщенные данные флуориметрии МН клеток из крови в протоке: нормированные значения (по линейной шкале) положений пика для гистограмм распределения клеток по интенсивности желтой (560 нм) флуоресценции (F12) зонда ДСМ (0,5мкМ) до (контроль) и после прединкубации клеток с гормоном дексаметазоном (Д) в дозах, указанных по оси абсцисс (обозначения согласно таблице 1). Погрешность измерений: $\pm 2\%$

На рисунке 2 представлен обобщенный результат анализа эффектов разных доз Д в МН клетках, полученных на проточном цитометре. Эффекты малых доз Д на энергетику клеток здесь выявляли по изменению количества клеток на уровне медианной линии в области пиков гистограмм распределения клеток по интенсивности митохондриальной (560 нм) флуоресценции ДСМ (F12). Полученные данные свидетельствуют о весьма слабом эффекте снижения ТМП в клетках в присутствии малых доз гормона (Д5-Д4). Но в дозах Д2, Д3 гормон вызывает достоверный роста F12 в некотором пуле МН клеток. Из сопоставления полученных данных можно предполагать, что эффекты малых доз Д зависят от исходного состояния иммунных клеток крови. Гормон в дозе Д5, по-видимому, может снижать ТМП в пуле наиболее активных клеток, связываясь с внешней мембраной и вызывая через рецепторную сигнализацию изменения в соотношении внутриклеточных регуляторов метаболизма [11]. Таким образом может проявляться его иммунодепрессивное действие на исходно гиперактивные лимфоциты и моноциты. Обнаруженные разнонаправленные эффекты влияния Д на ТМП в МН клетках указывают на возможное модулирующее действие малых доз Д в отношении активности иммунных клеток. Подобное неспецифическое модулирующее действие на митохондрии наблюдался в опытах с гидрофильным гормоном эритропоэтином в лимфоцитах [8].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исходя из анализа полученных результатов и на основании электродиффузной теории [17], можно заключить, что длительное употребление человеком водных растворов, содержащих микроконцентрации катион-образующих цитостатиков в сочетании с ионами тяжелых металлов, опасно для энергетики МН клеток крови. В результате этих воздействий могут повреждаться митохондрии, а катионные молекулы Ц будут накапливаться в ядрах клеток, связываясь с ДНК, и оказывая торможение на пролиферативную активность клеток. В итоге возможно пролонгированное негативное влияние Ц на клеточный иммунитет, что согласуется с экспериментальными данными других исследователей о наличии побочного эффекта при длительном воздействии цитостатиков на организм [12]. Таким образом, в свете проблемы экологической безопасности загрязнение водных ресурсов даже микроконцентрациями катионных цитостатиков и других КБ может быть токсично для клеток крови и иммунной системы человека в целом. В принципе высока опасность повреждения такими веществами и других клеточных тканей с исходно высокими ТМП, например, клеток эпителия почек, эмбриональных клеток. При очень длительном употреблении воды, загрязненной микроконцентрациями дексаметазона, нельзя исключить развитие иммунодепрессии вследствие постепенного снижения энергетики митохондрий и специфического угнетения этим гормоном синтеза цитокинов в иммунных клетках [18].

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №14-17-00672).

Список литературы / References:

1. Barenboim 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. Santos L., Araujo A., Fachini A. et al. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, vol. 175(1-3), pp. 45-95.
3. Добрецов Г.Е. *Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов*. М.: Наука, 1989, 277 с. [Dobretsov G. E. *Fluorescent probes in the study of cells, membranes and lipoproteins*. М.: Science, 1989, 277 p. (In Russ.)]
4. 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.)]

5. 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 мембранах. *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.)]
6. 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, с. 43-47. [Morozova G.I., Onishchenko N.A., Orzechowska I.G., Korobkova E.N., Polosin V.O., Baziyeva 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.)]
7. Морозова Г.И., Корнилаева Г.В., Подчерняева Р.Я., Куленич Т.М., Боженко В.К. Исследование влияния КВЧ-излучения миллиметрового диапазона на мембранные структуры в культуре Т-лимфобластоидных клеток с помощью флуоресцентного зонда-катиона ДСМ. *Биомедицинская радиоэлектроника*, 2014, № 11, с. 31-38. [Morozova G.I., Kornilaeva G.V., Podchernyaeva R.Ya., Kulenich T.M., Bozhenko V.K. Study of influence millimeter-wave EHF-irradiation on membrane structures of the T-lymphoblastoid cells culture using a fluorescent probe-cation DSM. *Biomedicine Radioengineering*, 2014, no. 11, pp. 31-38. (In Russ.)]
8. 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.
9. Морозова Г.И., Поletaев 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*, 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*, 1999, pp. 256-257. (In Russ.)]
10. Toshakov V.G., Morozova G.I., Onishchenko N.A. Energy metabolism of cryoprevved rad hehatocytes. *Cryo-letters*, 1991, no. 12, pp. 259-272
11. Долматова Л.С., Уланова О.А., Долматов И.Ю. Сравнительное исследование действия дексаметазона и нового экстракта из голотурий на уровень цитокиноподобных веществ в отдельных типах иммуноцитов голотурии Eupentacta fraudatrix. *Тихоокеанский медицинский журнал*, 2014, № 1, с. 34-38. [Dolmatova L.S., Ivanov O.A., Dolmatov I.Yu. A comparative study of the dexamethasone and a new extract from holothuria effect on the level of cytokine-like substances in certain types of immunocytes of holothuria Eupentacta fraudatrix. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal*, 2014, no.1, pp. 34 -38. (In Russ.)]
12. Телегин Л.Ю. *Фармакогенетика циклофосфамида*. М.: НИЦ ИНФРА-М, 2017, 78 с. [Telegin L.Yu. *Pharmacogenetics of cyclophosphamide*. М.: Research Center INFRA-M, 2017, 78 p. (In Russ.)]
13. Ковальчук Л.В. [и др.] *Иммунология: практикум: учебное пособие*. ГЭОТАР-Медиа, 2010, 176 с. [Kovalchuk L. V. [et al.] *Immunology: practicum: textbook*. GEOTAR-Media: 2010, 176 p. (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. Rink T.J., Montcucco C., Hesketh T.R., Tsien R.V. Lumphocyte membrane potential assessed with fluorescent probes. *Biochim. and biophys. Acta*, 1980, vol. 595, no.1, pp. 15-30.
16. Хайдуков С.В., Зурочка А.В. *Проточная цитометрия как современный анализа в биологии и медицине*, 2007, т. 9, № 5, с. 373-378 [Khaydukov S.V., Zurotchka A.V. *Flow cytometry as a modern analysis in biology and medicine*, 2007, vol. 9, no. 5, pp. 373-378. (In Russ.)]
17. 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.)]
18. 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 of Volgograd GMU*, vol. 21, no.1, pp. 39-41. (In Russ.)]

EVALUATION OF THE ENVIRONMENTAL TOXICITY OF AQUEOUS SOLUTIONS
WITH LOW XENOBIOTICS DOSES ON BLOOD DONOR CELLS USING A POTENTIAL-SENSITIVE
FLUORESCENT PROBE

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

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. In order to evaluate the danger of waters contaminated with xenobiotics for the living organisms, the effect of low doses of water-soluble substances was investigated. In particular, we used the following substances: antitumor drug Cyclophosphamide (C), hormone Dexamethasone (D), and Zinc sulfate (Zn). All they acted on the total transmembrane potential of the plasma and mitochondrial membranes (TMP) and on energy activity of the population (EAP) of mononuclear (MN) cells isolated from donor blood. Dose-dependent effects of substances were evaluated by the changes in the fluorescence intensity and color of cationic probe 4-(n-dimethylaminostyryl)-1-methylpyridinium(DSM) in the cell mitochondria and nuclei using microfluorometer and flow cytometer. Experimentally threshold doses of test substances were established. A relative safety of small D doses (10^{-4} - 10^{-6}) mg/l was revealed. But at the dose $2 \cdot 10^{-3}$ mg /l a modulating D-effect concerning the indicator of EAP was found. Some decrease in EAP of the active MN cells was detected in almost whole range of C concentrations. However, in comparative experiments on MN with low TMP levels, the mitochondria stimulating C-effect ($2 \cdot 10^{-5}$ mg/l) was found. The presence of Zn and C (10^{-3} mg/l) in cell suspensions decrease in TMP and EAP. According to electrodiffusion theory, with long-term exposure to the body, small doses of cationic drugs can be toxic to the energy status of immune cells.

Key words: environmental toxicity, dexamethasone, cyclophosphamide, zinc sulfate, fluorescent probe DSM, mononuclear blood cells, energy activity, mitochondria, transmembrane potential.