

## МЕХАНИЗМЫ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА И ИХ РЕГУЛИРОВАНИЕ БИОГЕННЫМИ АГЕНТАМИ

*В.Г. Артюхов, М.А. Наквасина, И.А. Колтаков*

*ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», Воронеж, Россия*

Выяснение закономерностей гибели клеток как фундаментального общебиологического явления – важная современная проблема биологии и медицины. Изучение механизмов гибели клеток, выявление маркеров (показателей) ее типов, поиск способов их регулирования – ключ к пониманию закономерностей процессов морфо- и эмбриогенеза, поддержания клеточного гомеостаза, биологического действия физико-химических агентов, патогенеза различных заболеваний человека и разработке эффективных методов их лечения. Нами исследованы механизмы и последовательность развития и реализации этапов программированной клеточной гибели лимфоцитов периферической крови доноров в условиях воздействия УФ-света (240–390 нм) в дозах 151, 1510 и 3020 Дж/м<sup>2</sup> и активных форм кислорода (супероксидного анион-радикала, гидроксильного радикала, пероксида водорода, синглетного кислорода) [1–5]. Выявлено, что программированная клеточная гибель лимфоцитов крови человека, индуцированная УФ-светом в дозе 1510 Дж/м<sup>2</sup>, реализуется с участием р53-зависимого пути ядерного механизма, а также рецепторопосредованного каспазного, митохондриального и связанного с нарушением кальциевого гомеостаза механизмов. Инициация апоптоза лимфоцитов в условиях воздействия УФ-излучения обусловлена процессами, индуцируемыми преимущественно фотохимическими превращениями компонентов биомембран и ДНК клеток. Медиаторами УФ-индуцированного апоптоза лимфоцитов являются активные формы кислорода (АФК) и ионы кальция, уровень которых существенно нарастает сразу после облучения.

Структурно-функциональные модификации лимфоцитов под влиянием АФК вносят значительный вклад в реализацию последовательности внутриклеточных событий, приводящих к программированной клеточной смерти иммуноцитов в условиях воздействия УФ-света. Установлено, что в условиях воздействия пероксида водорода в концентрации 10<sup>-6</sup> моль/л на лимфоциты человека реализуются рецепторный каспазный и р53-зависимый пути апоптоза. В то же время необходимо уточнить представления о роли митохондриального механизма в процессах осуществления программированной клеточной смерти лимфоцитов.

В этой связи нами были исследованы изменения уровня функциональной активности иницирующих каспаз-8, -9, мембранных рецепторов смерти Fas, внутриклеточных активных форм кислорода, цитозольного кальция, митохондриального потенциала лимфоцитов периферической крови доноров, индуцированные воздействием пероксида водорода (10<sup>-5</sup> моль/л). В качестве регуляторов программированной клеточной смерти могут быть использованы соединения, способные изменять в клетках уровень АФК, свободного ионизированного кальция и влиять на функционирование отдельных компонентов сигналтрансдукторных систем, взаимодействующих с собственными сигнальными путями апоптоза. Представлялось необходимым исследовать влияние ряда биогенных соединений – кофеина, генистеина, верапамила и ресвератрола – на процессы реализации апоптоза лимфоцитов человека, индуцированные воздействием УФ-света в диапазоне длин волн 240–390 нм в дозе 1510 Дж/м<sup>2</sup> и пероксида водорода (10<sup>-5</sup> моль/л).

В качестве объекта исследования использовали лимфоциты периферической крови доноров, которые получали путем центрифугирования гепаринизированной крови в градиенте плотности фиколл-урографина ( $\rho=1,077$  г/см<sup>3</sup>). Число жизнеспособных лимфоцитов в пробах определяли методом эксклюзии трипанового синего. УФ-облучение лимфоцитов, суспендированных в растворе Хенкса (рН 7,4), проводили при их непрерывном перемешивании в термостатируемой открытой стеклянной кювете при температуре  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  с помощью ртутно-кварцевой лампы типа ДРТ-400. УФ-облучение клеток проводили через светофильтр УФС-1 с полосой пропускания 240–390 нм (со спектральными линиями: 253.7, 265.2, 280, 296.7, 302.2, 312.6, 365 нм). Интенсивность излучения лампы – 151 Дж/м<sup>2</sup> за 1 мин. Доза облучения лимфоцитов составляла 1510 Дж/м<sup>2</sup>. Лимфоциты модифицировали раствором пероксида водорода в конечной концентрации 10<sup>-5</sup> моль/л. Для определения количества апоптотических клеток в суспензии лимфоцитов использовали тест-систему для детекции апоптоза FITC Annexin V / Dead Cell Apoptosis Kit («Invitrogen», США).

Исследования проводили на проточном цитометре Guavaeasy Cyte (Merk Millipore, США). Полученные данные обрабатывали при помощи программы In Cyte. Функциональную активность каспаз-8 и -9 в нативных и модифицированных пероксидом водорода лимфоцитах определяли с помощью люминесцентного метода на спектрофлуориметре Shimadzu RF-1501 в соответствии с протоколами фирм-производителей используемых флуоресцентных субстратов: для каспазы-8 – acetyl-isoleucyl-glutamyl-threonyl-aspartyl-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin (Ac-IETD-AFC, «Biovision», США), для каспазы-9 – acetyl-leucine-glutamic acid-histidine-aspartic acid-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin (Ac-LEHD-AFC, Abcam, США). Уровень экспрессии CD95 на поверхности лимфоцитов определяли с помощью набора FITC Mouse Anti-Human CD95 («BD Pharmingen™», США) на проточном цитометре Guava Easy Cyte 8HT (Merck Millipore), обработку данных проводили при помощи программы In Cyte. Концентрацию свободного цитоплазматического кальция в лимфоцитах измеряли с использованием флуоресцентного зонда Fura-2AM на спектрофлуорофотометре Shimadzu RF-1501. Регистрацию уровня мембранного потенциала митохондрий осуществляли с помощью флуоресцентного зонда – родамина 123 («Fluka», Германия) на спектрофлуорофотометре Shimadzu RF-1501. Внутриклеточный уровень АФК исследовали с помощью флуоресцентного зонда 2', 7'-дихлорфлуоресцеин диацетата (DCFH-DA) на спектрофлуориметре Shimadzu RF-1501. Суспензии интактных и модифицированных лимфоцитов в растворе Хенкса инкубировали в микропробирках при 37° С в течение 1–4 ч в присутствии CO<sub>2</sub>. Антирадикальную активность исследуемых модификаторов (верапамила, кофеина и генистеина) регистрировали по изменению интенсивности хемилюминесценции люминола на биохемилюминиметре БХЛ-07. Гидроксильные радикалы генерировали по механизму Фентона.

Нами обнаружена активация инициирующей каспазы-8, ассоциированной с мембранными рецепторами смерти Fas, после воздействия на лимфоциты пероксида водорода в концентрации 10<sup>-6</sup> моль/л. Выявлено значительное повышение функциональной активности инициирующей каспазы-9, уровня Fas-рецепторов и внутриклеточных активных форм кислорода, а также снижение концентрации цитозольного кальция и величины мембранного потенциала митохондрий через 1 и 2 ч после модификации клеток пероксидом водорода в концентрации 10<sup>-5</sup> моль/л по сравнению с таковыми для интактных иммуноцитов. Установлено, что апоптоз лимфоцитов в условиях воздействия экзогенного пероксида водорода реализуется с участием рецепторопосредованного каспазного, митохондриального (с активацией каспазы-9) и p53-зависимого механизмов.

Вероятно, «узловые» точки быстрого регулирования УФ- и АФК-индуцированного апоптоза – это системы генерации активных форм кислорода и перераспределения ионов кальция между клеточными компартментами.

Установлено, что добавление кофеина (10<sup>-4</sup> моль/л) и генистеина (10<sup>-6</sup> моль/л) к УФ-облученным лимфоцитам индуцирует снижение по сравнению с контролем количества клеток, находящихся на ранней стадии апоптоза. Кофеин – блокатор фосфодиэстеразы, разрушающей цАМФ, способный влиять на клеточный цикл и активность ключевых регуляторных белков, выступать в роли антиоксиданта и индуцировать апоптоз – соответственно в низких и высоких концентрациях. Изофлавоноид генистеин – ингибитор протеинтирозинкиназы и топоизомеразы II, способный проявлять антиоксидантное, антиангиогенное, противоопухолевое и иммуносупрессивное действие. Антиапоптотические эффекты кофеина и генистеина по отношению к фотомодифицированным лимфоцитам связаны с их способностью снижать уровень активных форм кислорода в интактных и УФ-облученных клетках и дезактивировать пероксид водорода, а также с ингибированием модификаторами c-Jun-сигнального пути, запускающего программированную клеточную гибель.

Верапамил – блокатор потенциалзависимых кальциевых каналов, модулятор фосфоинозитидного пути передачи информации в клетку. Верапамил (10<sup>-4</sup> моль/л) снижает уровень активных кислородных метаболитов в облученных лимфоцитах и взаимодействует с пероксидом водорода в примененной концентрации, но не вызывает уменьшения количества клеток на ранней стадии УФ-индуцированного апоптоза.

Ресвератрол – соединение фенольной природы, обладающее антиканцерогенными, гепатопротекторными, противовоспалительными, антиоксидантными и активирующими теломеразу свойствами. Нами выявлен защитный эффект транс-ресвератрола в концентрации 10<sup>-6</sup> моль/л на лимфоциты после воздействия пероксида водорода (10<sup>-5</sup> моль/л), обусловленный его способностью снижать уровень активных форм кислорода в интактных и модифицированных пероксидом водорода иммуноцитах, а также дезактивировать пероксид водорода.

Следовательно, кофеин, генистеин, ресвератрол и верапамил могут быть использованы в качестве агентов, регулирующих (ослабляющих) процессы УФ- и H<sub>2</sub> O<sub>2</sub>-индуцированной гибели лимфоцитов человека, связанной с интенсификацией образования активных кислородных метаболитов и перераспределением свободных ионов кальция между клеточными компартментами.

*Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2020–2022 годы, проект № FZGU-2020–0044.*

### **Литература**

1. Artyukhov V.G., et al. DNA Fragmentation of human lymphocytes in dynamics of development of apoptosis induced by action of UV radiation and reactive oxygen species // Cell and Tissue Biology. 2011. Т. 5, № 2. С. 61–67.
2. Артюхов В.Г. и др. Пути реализации апоптоза лимфоцитов человека, индуцированного УФ-светом и активными формами кислорода // Радиационная биология. Радиоэкология. Т. 51, № 4. М., 2011. С. 425–443.
3. Nakvasina M.A., Trubicina M.S., Solovieva E.V., Artyukhov V.G. Ways of apoptosis development in human lymphocytes, induced by UV-irradiation // Biophysics. 2012. V. 57, № 4. P. 477–484.
4. Nakvasina M.A., Popova L.I., Artyukhov V.G., Lidokhova O.V. Modulation of structural and functional properties of human lymphocytes by reactive oxygen species // Bull. Exp. Biol. Med. 2019. Vol. 166, № 4. P. 481–486.
5. Nakvasina M.A., Tokmakova E.V., Koltakov I.A., Artyukhov V.G. Antiapoptotic effects of caffeine, genistein, and verapamil in relation to UV-irradiated lymphocyte cells // Biology Bulletin. 2020. Vol. 47, № 11. P. 1547–1551.