

**СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О МЕХАНИЗМАХ
ДЕЙСТВИЯ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА
ЛИМФОЦИТЫ ЧЕЛОВЕКА****О.В. Башарина^{1*}, В.Г. Артюхов¹, О.В. Земченкова², М.А. Наквасина¹**¹ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»²ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет»

Поступила в редакцию 12.01.2023 г.

Аннотация. В статье представлен анализ работ, проведенных на кафедре биофизики и биотехнологии ВГУ, посвященных изучению действия УФ-света на лимфоциты человека. Рассматривается влияние УФ-облучения на клеточный метаболизм и синтез белков, на концентрацию в клетке ионов кальция и кальций-зависимые регуляторные пути, на рецепторный профиль и запуск различных путей гибели.

В настоящее время нет единой схемы, описывающей все возможные УФ-индуцированные процессы в различных типах иммунных клеток. Нами предложена схема, описывающая наиболее вероятные процессы, протекающие в УФ-модифицированных лимфоцитах. При одинаковых условиях и дозе облучения в зависимости от состояния клеток и условий инкубации (наличие или отсутствие в среде аутологичной плазмы крови) могут реализовываться разные пути клеточного ответа: гибель путем апоптоза или некроза или же возрастание функциональной активности лимфоцитов. Мы показали, что УФ-облучение (151 и 755 Дж/м²) суспензии клеток приводит к изменению как энергетического обмена, так и синтеза белков в лимфоцитах. В облученных клетках активируется аэробный путь окисления глюкозы, благодаря чему при инкубации лимфоцитов в присутствии аутологичной плазмы крови в них поддерживается на постоянном уровне концентрация АТФ. При этом повышение активности митохондриальных ферментов (сукцинатдегидрогеназы и цитохромоксидазы), а так же глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы обусловлено активацией их синтеза *de novo*. Кроме того, в УФ-облученных лимфоцитах усиливается синтез других белков, в частности, супероксиддисмутазы и некоторых интерлейкинов (ИЛ-1 β и ИЛ-2).

При инкубации фотомодифицированных клеток в среде без плазмы крови происходит разобщение дыхания и фосфорилирования, в лимфоцитах снижается содержание АТФ. УФ-свет в исследуемом диапазоне доз приводит к повышению концентрации в клетке ионов кальция, это изменяет передачу сигнала в клетке и активность ряда белков.

В ходе суточной инкубации лимфоцитов, облученных УФ-светом (151 и 755 Дж/м²), выявлено изменение их рецепторного профиля. С помощью метода лазерной проточной цитофлуориметрии показано, что происходит повышение уровня экспрессии CD3, CD19, CD8, CD16, CD25 и CD95 комплексов, причем выявленный эффект обусловлен, главным образом, синтезом указанных белков *de novo*.

С помощью методов электрофореза и ДНК-комет обнаружены одно- и двунитевые разрывы ДНК, возникающие непосредственно после облучения клеток, причем в ходе инкубации клеток степень повреждения ДНК значительно возрастает.

Анализ цитограмм распределения лимфоцитов с использованием маркеров апоптоза и некроза показывает, что в ходе суточной инкубации (без плазмы крови) фотомодифицированных лимфоцитов (151 и 755 Дж/м²) клетки погибают в основном путем рецепторопосредованного апоптоза. Использование более высоких доз УФ-света приводит к гибели иммунных клеток преимущественно путем некроза. Присутствие аутологичной плазмы в среде инкубации лимфоцитов позволяет уменьшить гибель клеток путем апоптоза или некроза.

Ключевые слова: УФ-излучение, лимфоциты, фотоиндуцированные внутриклеточные процессы, сигнальные внутриклеточные пути, апоптоз, некроз.

При УФ-облучении различных типов клеток в них изменяется ряд процессов (энергетический обмен, синтез белков, структура ДНК, рецепторный профиль и др.). Результат действия УФ-света зависит от энергии кванта света, от типа и от их исходного состояния клетки (в частности, от активности компонентов антиоксидантной системы). В медицине широко используются различные методы фототерапии, в том числе и УФ-терапия [1-4]. Известно, что излучение УФ-диапазона (в основном, УФА и УФВ области) обладает противовоспалительным и иммуномодулирующим действием, улучшает реологические свойства крови [5, 6]. Относительно распространенным методом фототерапии является аутотрансфузия УФ-облученной крови (АУФОК)[7, 8]. АУФОК с успехом применялась в 1930-1940-х годах для лечения различных заболеваний. Несмотря на успех, из-за отсутствия понимания детальных механизмов действия УФ-света на субклеточном и клеточном уровнях, а также из-за начавшегося тогда широкого применения антибиотиков, использование АУФОК было практически прекращено с 1950-х годов. Появление новых опасных вирусных инфекций вновь привлекает внимание к этой терапии. Понимание механизмов действия УФ-облучения на клетки иммунной системы, в частности, на лимфоциты, могут помочь в разработке методов фототерапии, направленной против вирусов, устойчивых к известным противовирусным препаратам или вакцинам, а также антибиотикорезистентных штаммов бактерий.

Воздействие на иммунциты человека УФ-света вызывает не только нарушения структуры ДНК, приводящие к мутациям или к гибели клеток, но и запускает специфические сигнальные пути, включая активацию ряда транскрипционных факторов. Более полное понимание механизмов УФ-индуцированной сигнальной трансдукции может способствовать расширению применения АУФОК-терапии и фотодинамической терапии, сделает для пациента эти методы более безопасными с точки зрения побочных эффектов. Однако большие дозы УФ-излучения могут приводить к негативным последствиям [9, 10], в том числе, повышать риск канцерогенеза. [11]. В связи с этим в клинической медицине очень важно контролировать и количественно оценивать дозу облучения, получаемую пациентом: она должна быть одновременно биологически эффективной и оказывать минимально возможное побочное воздействие на окружающие клетки. Необходимость изучения механизмов реализации клеточного ответа в

УФ-модифицированных клетках, в частности, в лейкоцитах, обусловлена как повышением интенсивности УФ-излучения в атмосфере, так и перспективами развития фотомедицины.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Кровь доноров и больных (обезличенные данные) получали в Воронежской городской клинической больнице скорой медицинской помощи № 1 (ВГКБСМП № 1).

Лимфоциты выделяли из периферической крови доноров путем ее центрифугирования в градиенте плотности фиколл-урографина (1,077 г/см³). Суспензию исследуемых клеток (1 мл, 1·10⁶ клеток/мл) облучали УФ-светом при их непрерывном перемешивании магнитной мешалкой в термостатируемой кювете (20 ± 1 °С) полусферической формы. Источником УФ-излучения являлась ртутно-кварцевая лампа ДРТ-400; использовали светофильтр УФС-1 с полосой пропускания 240–390 нм. Расстояние от оси лампы до кюветы с суспензией клеток составляло 23 см, интенсивность излучения лампы – 151 Дж/(м²·мин).

Нативные и облученные лимфоциты инкубировали в питательной среде RPMI-1640 в отсутствие и в присутствии 18 % аутологичной плазмы крови, блокатора синтеза белка – циклогексимида (10⁻⁴ моль/л) при температуре 37 °С в атмосфере 5 %-ного СО₂ в течение 24 ч.

Для определения активности ферментов клетки лизировали путем гипосмотического шока и с помощью дифференциального центрифугирования разделяли митохондрии и плазматические мембраны. В митохондриях определяли активность митохондриальных ферментов – сукцинатдегидрогеназы (СДГ) и цитохромоксидазы с (ЦО), надосадочную жидкость (клеточный экстракт) использовали для определения активности цитоплазматического фермента – лактатдегидрогеназы (ЛДГ) [12]. Активность Са²⁺-АТФазы плазматических мембран определяли по методу [13]. Об активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (ГФДГ) судили по скорости восстановления НАДФ. Активность СОД в лимфоцитах оценивали по степени снижения хемилюминесценции в системе генерации анион-радикалов кислорода. Активность гексокиназы - одного из ключевых ферментов гликолиза - определяли энзиматическим методом, в качестве сопрягающего фермента добавляли ГФДГ и НАДФ; оценивали возрастание оптической плотности при 340 нм. Все измерения проводили на спектрофотометре Shimadzu RF-5301 PC (Япония).

Содержание ИЛ-1 β и ИЛ-2 определяли методом иммуноферментного анализа на коммерческих тест-системах (ООО «Протеиновый контур», СПб) на основе моноклональных антител.

Концентрацию АТФ определяли с помощью люциферазной биOLUMИнесцентной реакции с использованием стандартного набора реагентов («Люмтек», Россия). Регистрацию интенсивности люминесценции проводили на спектрофлуориметре Shimadzu RF-1501 (Япония).

Определение уровня экспрессии рецепторов и количества клеток с изучаемым маркером на поверхности мембран нативных и фотомодифицированных лимфоцитов осуществляли методом проточной цитофлуориметрии (цитофлуориметр CyFlow space, Partec). Окрашивание клеток проводили с использованием моноклональных антител: CD95-FITC и соответствующего изотипического контроля. Двойное окрашивание клеток проводили с использованием моноклональных антител: CD5-FITC – CD19-PE, CD5-FITC – CD20-PE и соответствующего изотипического контроля (все Beckman Coulter, США). Количество анализируемых клеток было не ниже 10⁴ клеток/мл и не изменялось в ходе эксперимента. Двойное окрашивание клеток посредством меченного FITC аннексина V (для обнаружения фосфатидилсерина на внешней стороне клеточной мембраны) и йодистого пропидия (PI) (для регистрации целостности клеток) позволило с помощью проточной цитометрии отличить апоптоз исследуемых клеток от некроза.

ДНК из лимфоцитов выделяли фенольным методом. Изменения структуры ДНК оценивали методом электрофореза в агарозном геле с помощью ДНК-маркеров.

Метод ДНК-комет основан на оценке электрофоретической подвижности ДНК клеток, иммобилизованных в агарозном геле. ДНК индивидуальной клетки способна мигрировать в постоянном электрическом поле благодаря нарастающей деградации генома. Образцы исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа AxioLab HBO50/AC (Zeiss, Германия, фильтр возбуждения 450–490 нм). Об уровне повреждений ДНК судили по изменению доли ДНК (T, %) в хвосте кометы.

Содержание цитохрома c в цитозоле лимфоцитов определяли методом иммуноферментного анализа с использованием тест-набора компании Bender MedSystems (Австрия). Активность каспаз-8 и -12 в клетках определяли с помощью люминесцентного метода, использовали флуоресцентные субстраты acetyl-isoleucyl-glutamyl-threonyl-aspartyl-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin (Ac-IETD-AFC) и acetyl-alanyl-threonyl-alanyl-aspartyl-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin (Ac-ATAD-AFC) соответственно («Biovision», США).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ Statgraphics plus 3.0. Отличия величин тестируемых показателей в контрольных и опытных сериях экспериментов оценивали с помощью метода попарной статистики, используя t-критерий Стьюдента. Различия считали достоверными при $P \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние УФ-излучения на метаболизм лимфоцитов

Непосредственно после облучения (151 и 755 ж/м²) лимфоцитов донорской крови в них про-

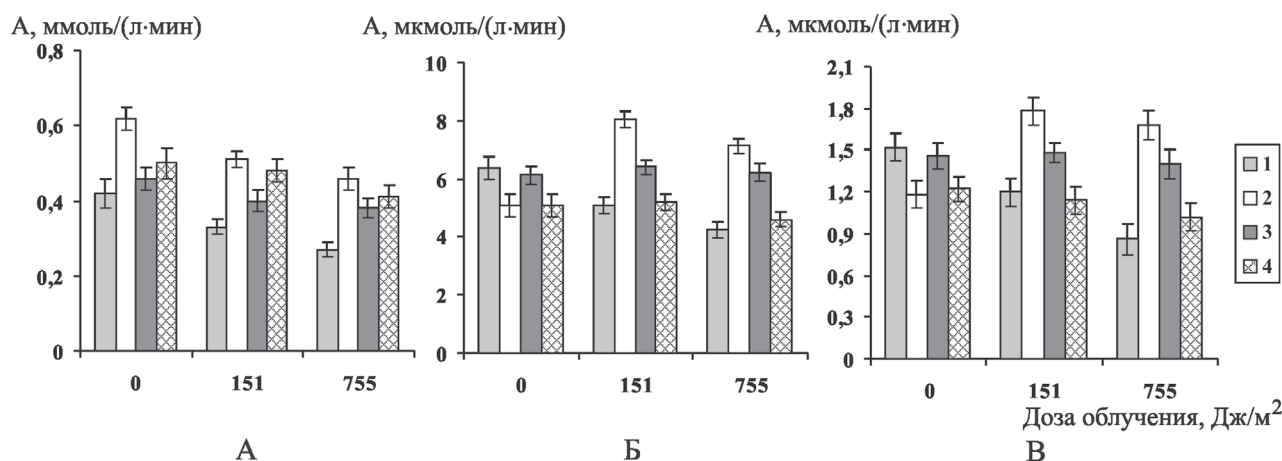


Рис. 1. Изменение активности ЛДГ (А), СДГ (Б) и ЦО (В) фотомодифицированных лимфоцитов в ходе суточной инкубации (1 – клетки после выделения; 2, 3 – клетки после суточной инкубации в отсутствие и присутствии плазмы соответственно; 4 – клетки, инкубированные в присутствии циклогексимида)

исходит фотоинактивация важнейших ферментов энергетического обмена: ЛДГ, СДГ и цитохромоксидазы, что приводит к снижению концентрации АТФ в лимфоцитах. Затем, в ходе суточной инкубации лимфоцитов, выявлено повышение активности исследуемых ферментов (рис. 1) [14].

Динамика изменения активности основных ферментов энергетического обмена и уровня АТФ в клетке (рис. 2) в ходе инкубации УФ-облученных лимфоцитов имеет сходный характер [15, 16]. Поскольку концентрация АТФ в лимфоцитах после инкубации в присутствии плазмы крови не отличается от исходных значений, можно говорить об энергетическом благополучии клетки, а это дает возможность усиления процессов синтеза ряда белков.

При инкубации УФ-модифицированных лимфоцитов уровень активности СДГ и ЦО в присут-

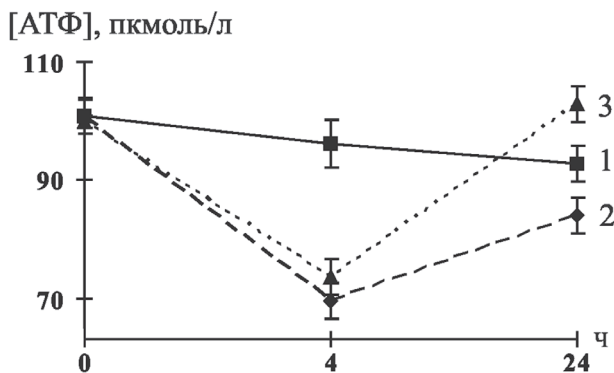


Рис. 2. Изменение концентрации АТФ в ходе инкубации лимфоцитов (1 – нативные клетки; 2, 3 – фотомодифицированные в дозе 755 Дж/м² клетки, инкубированные в отсутствие и присутствии аутологичной плазмы соответственно)

ствии циклогексемида ниже, чем в клетках, инкубированных без блокатора синтеза белка (рис. 1), следовательно, УФ-облучение активирует синтез СДГ и ЦО.

Через 24 часа после выделения из крови и инкубации в питательной среде лимфоцитарных клеток в них повышается активность гексокиназы, причем в фотомодифицированных лимфоцитах этот эффект более выражен. Добавление циклогексемида не влияет на исследуемый параметр, следовательно, повышение активности гексокиназы не связано с активацией ее синтеза в клетке (рис. 3А). В облученных лимфоцитах также наблюдается активация ГФДГ (рис. 3Б). ГФДГ является одним из ключевых ферментов пентозофосфатного цикла, образование НАДФН в реакциях окислительного этапа данного пути дает возможность для активации белкового синтеза и для поддержания нормальной работы глутатионового звена антиоксидантной системы. В присутствии циклогексемида отмечено снижение активности фермента после суточной инкубации клеток, следовательно, повышение активности обусловлено синтезом данного фермента [17].

При изучении особенностей энергетического обмена лимфоцитов больных в ходе острого воспалительного процесса (острый панкреатит) выявлено, что у больных активность СДГ и ЦО увеличена в разной степени: активность СДГ повышена незначительно, в то же время активность ЦО значительно (более чем в два раза) превышает нормальные показатели. Такое изменение активности ферментов свидетельствует о разобщении работы компонентов цепи переноса электронов, и, следовательно, о воз-

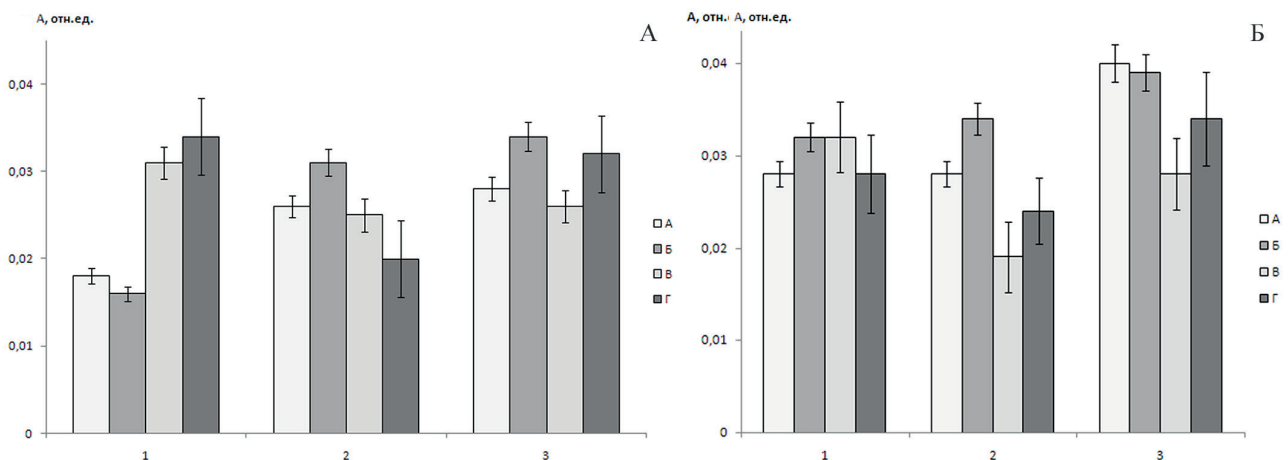


Рис. 3. Влияние УФ-света на активность гексокиназы (А) и Г6ФДГ (Б) лимфоцитов. Обозначения: 1 – лимфоциты без инкубации; 2 – клетки через 24 часа инкубации; 3 – инкубация в присутствии плазмы крови; А и В – необлученные, Б и Г – фотомодифицированные (755 Дж/м²) лимфоциты; первые два столбца (А и Б) в каждой группе – лимфоциты здоровых доноров, два последних (В и Г) – больных острым панкреатитом

можном повышении уровня АФК в митохондриях. После суточной инкубации облученных клеток (151 и 755 Дж/м²) наблюдается активация СДГ и снижение активности ЦО; возможно, кислородное дыхание в облученных лимфоцитах в ходе их инкубации нормализуется [18]. Активность гексокиназы в лимфоцитах больных повышена, активность Г6ФДГ находится в пределах нормальных значений (см. рис. 3), что может свидетельствовать об активации гликолиза. Динамика изменения активности данных ферментов после суточной инкубации суспензии УФ-облученных клеток без плазмы крови имеет разнонаправленный характер, в то время как инкубация лимфоцитов в питательной среде в присутствии плазмы крови приводит к повышению активности исследуемых параметров.

Вероятно, одна из возможных причин повышения активности исследуемых ферментов при инкубации с аутологичной плазмой состоит в том, что снижается интенсивность перекисидного окисления липидов (ПОЛ), это защищает иммуноциты от окислительного стресса.

Рецепторный профиль УФ-модифицированных клеток

Сигнализация, индуцированная УФ-излучением в клетках, включает в себя два основных пути: один инициируется через генерацию фотопродуктов ДНК в ядре, второй осуществляется путем активации мембранных рецепторов [19].

Исследование мембранных маркеров, характеризующих активацию лимфоцитов, используют для оценки функциональных изменений иммунной системы при острых и хронических заболеваниях, для диагностики и мониторинга течения заболевания и проводимой терапии. УФ-облучение значительно изменяет рецепторный профиль плазматической мембраны клетки. Так, при облучении (280 – 320 нм) лимфоцитов периферической крови (PBLs) здоровых доноров, а также лимфоцитов линии Jurkat (E6-1) наблюдается быстрое и значительное увеличение экспрессии Fas-рецепторов (CD95) при воздействии УФ-света в небольших дозах (до 5 Дж/м²). Увеличение экспрессии CD95 не обусловлено синтезом белка, так как в лимфоцитах, инкубированных в присутствии циклогексида, тоже наблюдается повышение экспрессии данных рецепторов после УФВ-облучения данных клеток [20].

Нами показано, что в ходе инкубации УФ-облученных лимфоцитов (151 и 755 Дж/м²) изменяется их рецепторный профиль. Выявлено повышение уровня экспрессии CD3, CD19, CD8, CD16,

CD25 и CD95 комплексов. При добавлении к суспензии клеток циклогексида уровень экспрессии данных рецепторов значительно снижается [21] (рис. 4), следовательно, активируется синтез данных белков *de novo*. Наблюдается активация лимфоцитов, об этом можно судить по увеличению количества CD25+ и CD95+ клеток. Индуцированная УФ-светом экспрессия CD95 может также служить для удаления стресс-поврежденных лимфоцитов клетками, несущими лиганд к CD95.

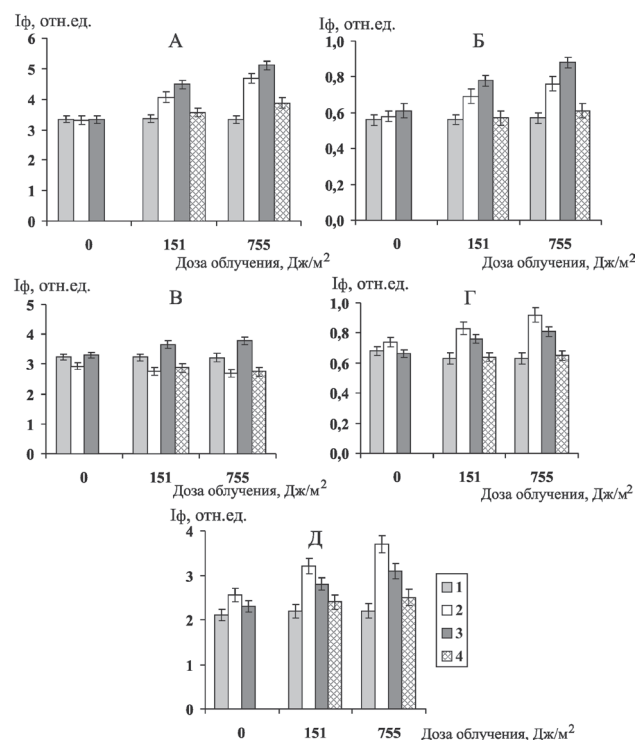


Рис. 4. Изменение уровня экспрессии CD3(А), CD19 (Б), CD4 (В), CD8 (Г), CD25 (Д) маркеров УФ-облученных лимфоцитов в ходе суточной инкубации (1 – клетки после выделения; 2, 3 – клетки после суточной инкубации в отсутствие и присутствии плазмы соответственно; 4 – клетки, инкубированные в присутствии циклогексида)

Запуск пролиферативного ответа Т-лимфоцитов – сложный каскадный процесс, важную роль в котором выполняет интерлейкин 2 (ИЛ-2 - Т-клеточный ростовой фактор) и его рецептор - CD25. Экспрессия CD25 является важнейшим маркером активации покоящихся Т-лимфоцитов и указывает на их вступление в клеточный цикл. В то же время количество CD3+, CD4+ и CD19+-клеток уменьшается, через 24 часа инкубации в питательной среде без аутологичной плазмы увеличивается количество CD8+-клеток.

В работах [22, 23] показано, что в УФ-облученных (151-906 Дж/м²) лимфоцитах не изме-

няется уровень экспрессии CD2- и CD11a-молекул межклеточной адгезии. Повышение дозы облучения до 1359 Дж/м² индуцирует снижение экспрессии CD2-, CD11a- и CD3-маркеров и повышение уровня экспрессии корецепторных CD4- и CD8-молекул Т-лимфоцитами. Методами лазерной проточной цитофлуориметрии, непрямой иммунофлуоресценции и флуоресцентных зондов для CD3-, CD4-, CD8-маркеров [24] и CD2-маркеров [25] выявлен УФ-индуцированный кэппинг-эффект, т.е. перераспределение молекул на поверхности иммунокомпетентных клеток с образованием рецепторных кластеров различных типов.

УФ-индуцированная активация транскрипции

Воздействие УФ-излучения разных диапазонов длин волн (УФ-А, УФ-В и УФ-С) активирует транскрипцию ряда генов, например, генов, кодирующих специфические транскрипционные факторы, протеазы, вирусные белки и др [26]. Облучение клеток млекопитающих УФ-светом может запускать специфические клеточные реакции, такие как активация некоторых факторов транскрипции, например, активатора белка 1 (AP-1) и NF-κB [27].

Нами показано, что в УФ-облученных лимфоцитах происходит повышение СОД-активности, и это обусловлено усилением процесса ее синтеза, так как в клетках, обработанных циклогексимидом, эффект активации СОД не наблюдается.

Выявлена также активация синтеза интерлейкинов – ИЛ-1β и ИЛ-2 (рис. 5) [28]. В гене α-субъединицы ИЛ-2 имеются до 6 регуляторных элементов, и в регуляции его экспрессии участвуют такие специфические транскрипционные факторы, как AP-1, NF-κB, ядерный фактор активированных Т-клеток (NFAT) [29].

Как было указано ранее, в УФ-модифицированных клетках активируется синтез СДГ и ЦО (см. рис. 1), а также ГФДГ.

Усиление синтеза ряда белков под действием УФ-света связывают с повышением экспрессии соответствующих генов. Механизм фотоактивации транскрипционных факторов может быть опосредован АФК, уровень которых повышается при облучении УФ-светом биосистем. АФК, особенно супероксидный радикал кислорода и пероксид водорода, являются важными сигнальными молекулами, это вторичные мессенджеры, регулирующие транскрипцию (через специфические транскрипционные факторы) генов ряда внутриклеточных белков, включая рецептор эпидермального фактора роста, Src-киназу, митогенактивируемую протеинкиназу p38, Ras и другие сигнальные белки [30,

31]. Элиминацию АФК в клетках осуществляют компоненты антиоксидантной системы - СОД, каталаза и глутатионпероксидаза.

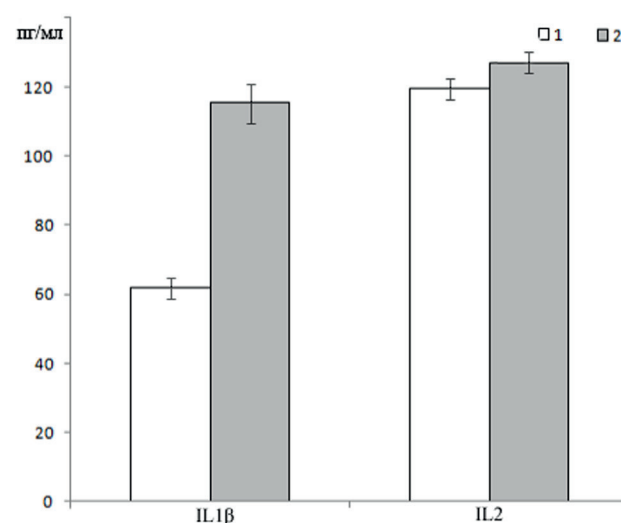


Рис. 5. Влияние УФ-облучения на содержание ИЛ-1β и ИЛ-2 в лимфоцитах человека: нативные клетки (1); фотомодифицированные в дозе 151 Дж/м² клетки, инкубированные в присутствии аутологичной плазмы (2)

Семейство транскрипционных факторов NF-κB играет важную роль в пролиферации и функционировании лимфоцитов; в развитии злокачественных новообразований; при некоторых аутоиммунных заболеваниях зарегистрирована постоянная активность NF-κB в лимфоцитах [32]. NF-κB активируется в ответ на поступление сигнала от различных рецепторов, таких как рецепторы фактора некроза опухоли (TNF), интерлейкина-1 (IL-1) и Toll-подобные рецепторы (TLR) [33].

УФ-облучение приводит к усилению образования АФК, кроме того, они могут являться побочными продуктами ряда метаболических путей в клетке, но существует специальный механизм их образования мембранным НАДФН-оксидазным комплексом. Этот комплекс имеется в лимфоцитах (помимо моноцитов, нейтрофилов и макрофагов). Мы обнаружили эффект активации НАДФН-оксидазы в УФ-модифицированных (151 Дж/м²) нейтрофильных лейкоцитах [34]. Предполагается, что УФ-свет может активировать НАДФН-оксидазный комплекс как в результате прямого действия, так и за счет изменения в клетке концентрации Ca²⁺ или же влияя на скорость сборки комплекса через изменение состава мембранных липидов.

В работе [35] показано, что УФА-облучение (320-400 нм) в низких дозах активирует НАДФН-оксидазу (путем активации каталитической субъ-

единицы Nox1), и именно этот процесс является главным источником АФК в фотомодифицированных кератиноцитах. Использование малых интерферирующих РНК (siRNA) для блокада синтеза Nox1 предотвращала повышение уровня АФК, индуцированное УФА-светом. Показано также, что механизм активации НАДФН-оксидазы опосредован увеличением концентрации внутриклеточного кальция.

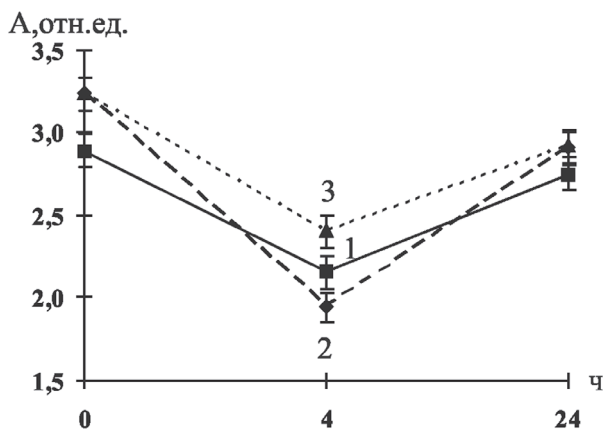


Рис. 6. Изменение активности Ca²⁺-АТФазы в ходе инкубации лимфоцитов (1 – нативные клетки; 2, 3 – фотомодифицированные в дозе 755 Дж/м² клетки, инкубированные в отсутствие и присутствии аутологичной плазмы соответственно)

Таким образом, можно сделать вывод, что ряд эффектов действия УФ-света опосредован АФК (косвенное действие УФ-облучения), а так же изменением концентрации Ca²⁺ в клетке.

Молекулярно-клеточные эффекты УФ-облучения, опосредованные изменением уровня кальция в клетке

Ионы Ca²⁺ являются важнейшим вторичным мессенджером, регулируя самые разные внутриклеточные процессы, в том числе транскрипцию ряда генов, метаболизм и активацию клеток, экспрессию некоторых мембранных рецепторов.

После УФ-облучения лимфоцитов в них происходит снижение активности Ca²⁺-АТФазы, а это, в свою очередь, приводит к повышению внутриклеточной концентрации ионов кальция после облучения лимфоцитов (151 и 755 Дж/м²) [15]. Через сутки после УФ-облучения клеток наблюдается активация Ca²⁺-АТФазы в фотомодифицированных лимфоцитах, это обусловлено, главным образом, синтезом данного белка de novo (рис. 7) и направлено на нормализацию внутриклеточного уровня кальция.

Нами показано, что воздействие H₂O₂ (10⁻⁶ моль/л), ¹O₂ и OH⁻ на лимфоциты приводит к повышению в них концентрации ионов кальция

[36]. Увеличение концентрации Ca²⁺ в клетке регулирует активность целого ряда метаболических ферментов и транскрипционных факторов. В то же время значительное повышение концентрации внутриклеточного кальция может приводить к запуску апоптоза [37, 38]. Обнаружено снижение ферментативной активности ЛДГ, СДГ и глутатионредуктазы лимфоцитов в условиях как дефицита, так и избытка ионов кальция в среде инкубации лимфоцитов. Повышенная концентрация ионов кальция в среде инкубации лимфоцитов приводит к увеличению количества апоптотических клеток (на разных стадиях апоптоза) через 6 ч после воздействия H₂O₂ и ¹O₂ по сравнению с лимфоцитами, обработанными АФК в среде без добавления ионов кальция.

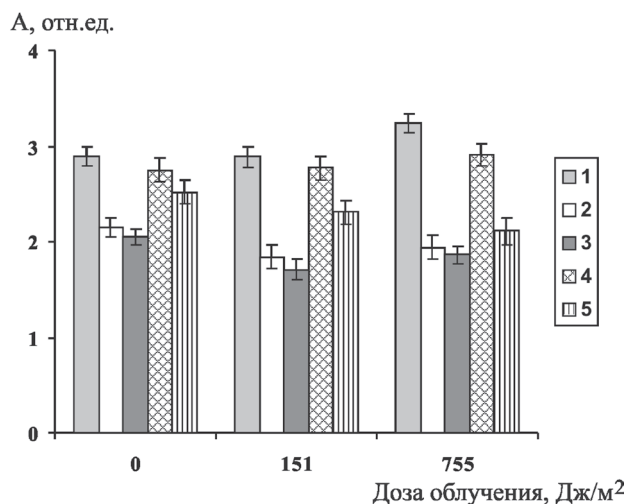


Рис. 7. Изменение активности Ca²⁺-АТФазы лимфоцитов в присутствии циклогексимида (1 – клетки после выделения; 2, 3 – клетки, инкубированные в течение 4 часов без циклогексимида и в его присутствии соответственно; 4, 5 - клетки, инкубированные в течение 24 часов без циклогексимида и в его присутствии соответственно)

Повреждения ДНК при УФ-модификации клеток

Нарушения структуры ДНК активируют ее репарацию, могут изменять регуляцию клеточного цикла и запускать апоптоз. В ответ на повреждение ДНК изменяется регуляция синтеза белка на транскрипционном, посттранскрипционном (с участием микроРНК) и трансляционном уровнях.

Поглощение квантов УФ-света молекулой ДНК приводит к димеризации пиримидиновых оснований и образованию циклобутанпиримидиновых димеров и пиримидин-(6-4)-пиримидиновых фотопродуктов, это два основных класса цитотоксических фотопродуктов ДНК [39, 40].

Степень и тип УФ-индуцированного повреждения ДНК сильно зависят от длины волны УФ-излучения и от типа клеток. Например, Т-лимфоциты, облученные широким спектром УФВ-света, в 20 раз более чувствительны, чем фибробласты здоровых доноров [41], причем фотоиндуцированная гибель фибробластов, по видимому, объясняется образованием дипиридинового фотопродукта, а гибель лимфоцитов опосредована повреждением ДНК, не связанным с образованием димеров – происходит разрыв нитей после УФВ-облучения. Важную роль в клеточном ответе на действие УФ-света играет состояние систем репарации ДНК, причем важно помнить, что белки этих систем также подвержены действию УФ-излучения.

Нами была исследована степень повреждения ДНК в УФ-облученных лимфоцитах [42, 43]. С помощью метода электрофореза показано, что непосредственно после УФ-облучения (1510 и 3020 Дж/м²) иммуноцитов в ядре происходит фрагментация ДНК, в результате в эксперименте наблюдается так ДНК-лестница, характерная для апоптоза и возникающая из-за деградации ДНК каспазоактивируемой ДНКазой.

Используя метод ДНК-комет, мы обнаружили одонитевые разрывы ДНК непосредственно после УФ-облучения (1510 и 3020 Дж/м²) клеток, наибольшее количество таких разрывов наблюдалось через 6 ч после фотомодификации (рис. 8), что указывает на повреждение систем репарации ДНК в УФ-модифицированных лимфоцитах.

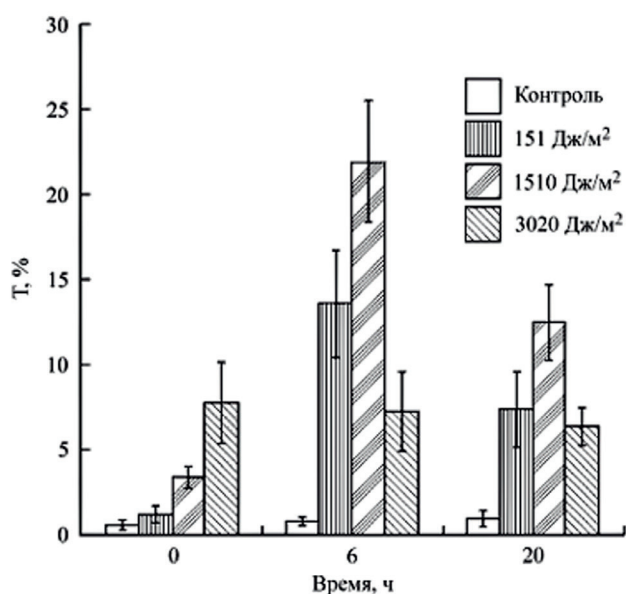


Рис. 8. Изменение содержания ДНК (Т, %) в хвосте комет лимфоцитов после УФ-облучения клеток в разных дозах

Максимальная степень поврежденности ДНК по сравнению с нативными клетками выявлена через 6 ч после воздействия на лимфоциты УФ-света в дозе 1510 Дж/м². Метод ДНК-комет подтвердил наличие повреждений ДНК, характерных для клеток, вступающих в апоптоз.

УФ-индуцированная гибель клеток

Для изучения действия УФ-света (151 - 3020 Дж/м²) на способ гибели лимфоцитов крови доноров мы использовали маркеры апоптотической и некротической гибели клеток [44]. Показано, что через сутки после облучения (151 и 755 Дж/м²) УФ-модифицированных лимфоцитов, инкубированных в питательной среде без аутологичной плазмы, часть иммуноцитов гибнет путем рецепторопосредованного апоптоза (рис. 9). При использовании более высоких доз УФ-света (1510 и 3020 Дж/м²) наблюдается массовая гибель клеток путем некроза. Присутствие аутологичной плазмы крови в инкубационной среде позволяет снизить количество лимфоцитов, вступивших на путь как апоптоза, так и некроза, то есть проявляется защитный эффект компонентов плазмы.

Как правило, при апоптозе происходит активация каспаз, это возможно двумя путями - внешним и внутренним. Внешний путь запуска апоптоза – это путь, опосредованный так называемыми рецепторами смерти, инициируется связыванием различных лигандов смерти, и, таким образом, приводящий к активации каспаз (главным образом каспазы 8) [45]. Увеличение экспрессии таких рецепторов на клеточной мембране является маркером готовности клеток к запуску апоптоза. Так называемый внутренний апоптотический путь чаще всего связан с нарушением целостности митохондриальной мембраны, он инициируется широким спектром внутриклеточных стрессовых событий, таких как, например, повреждение ДНК и дисфункция эндоплазматического ретикулума, он приводит к высвобождению цитохрома *c* из внутренней мембраны митохондрий в цитоплазму и через образование апоптосомы который активирует каспазный каскад, приводящий к гибели клеток. Для выявления возможности запуска митохондриального пути апоптоза мы исследовали влияние УФ-света на содержание цитохрома *c* в цитоплазме лимфоцитов. В УФ-облученных клетках не выявлено изменения концентрации цитохрома *c* [46]. Следовательно, в фотомодифицированных лимфоцитах митохондриальный путь запуска апоптоза, связанный с активацией каспазы 9, не играет существенной роли.

Мы исследовали роль каспаз в осуществлении рецепторопосредованного апоптоза (каспаза-8) и

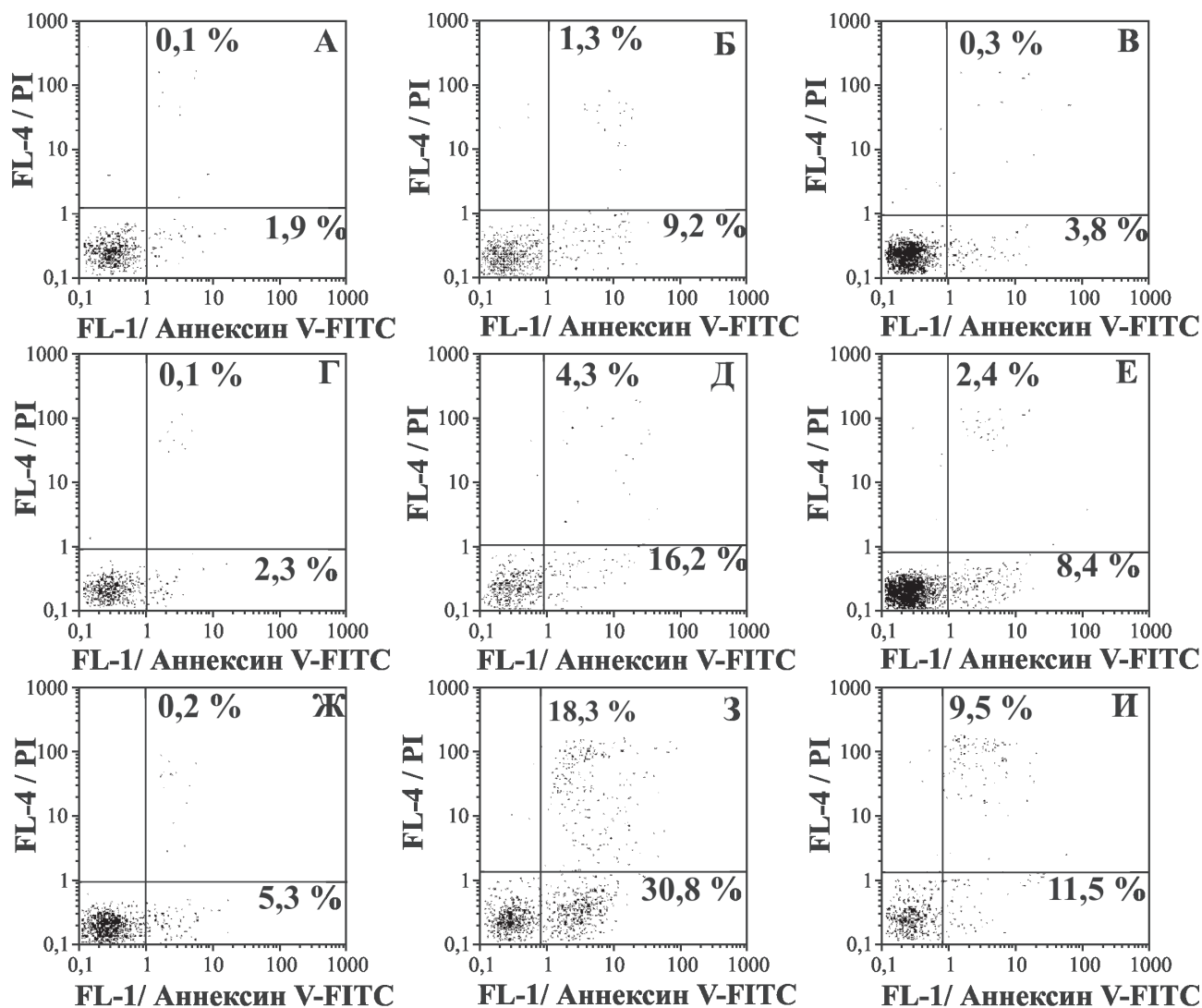


Рис. 9. Цитограммы распределения лимфоцитов при окрашивании аннексином V-FITC и пропидиум иодидом (А, Г, Ж – нативные и фотомодифицированные клетки через час инкубации; Б, В – нативные клетки, инкубируемые 24 часа в отсутствие и в присутствии плазмы; Д, Е – фотомодифицированные в дозе 151 Дж/м² клетки после суточной инкубации в отсутствие и в присутствии плазмы крови соответственно; З, И – фотомодифицированные в дозе 755 Дж/м² клетки после суточной инкубации в отсутствие и в присутствии плазмы крови соответственно)

сигнальных путей, связанных с нарушением кальциевого гомеостаза (каспаза-12) в лимфоцитах человека после облучения клеточной суспензии УФ-светом в дозе 1510 Дж/м² [46]. Показана возможность участия инициирующих каспаз-8 и -12 в реализации рецепторного каспазного пути (каспаза-8) и сигнальных путей, связанных с изменением концентрации ионов кальция в цитоплазме клетки (каспаза-12).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эффекты, вызываемые воздействием УФ-излучения на клетки, определяются не только энергией квантов света (длиной волны) и дозой

облучения, но и типом клетки. Развитие УФ-индуцированного стресса и защита от него зависят как от внутриклеточных, так и от межклеточных молекулярных взаимодействий.

На рис. 10 представлены схемы наиболее вероятных событий в УФ-облученных лимфоцитах через сутки их инкубации в питательной среде без плазмы крови (рис. 10А) и в ее присутствии (рис. 10Б) [18]. После УФ-облучения суспензии клеток возможны разные типы ответной реакции: гибель клеток путем апоптоза или некроза или же сохранение (и даже возрастание) функциональной активности иммунцитов. Какой из путей будет реализован в лимфоците, зависит от его исходного состояния, в

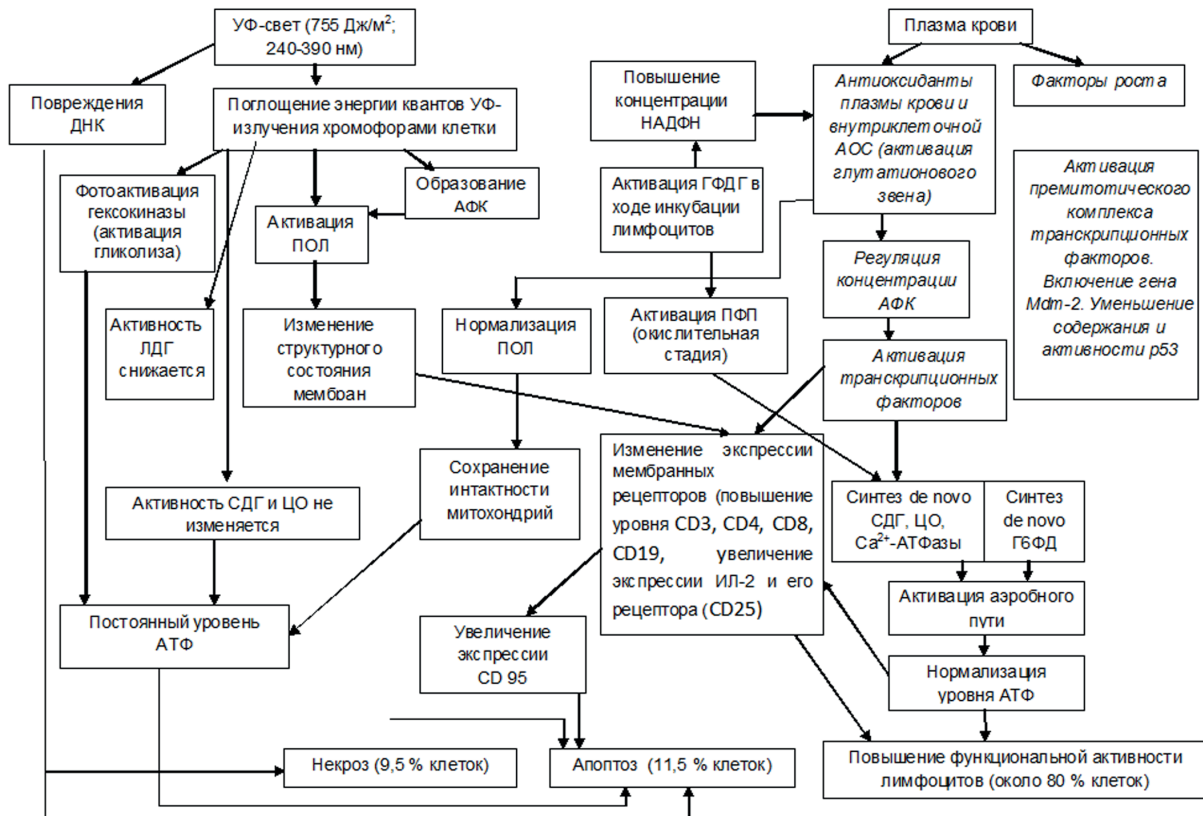
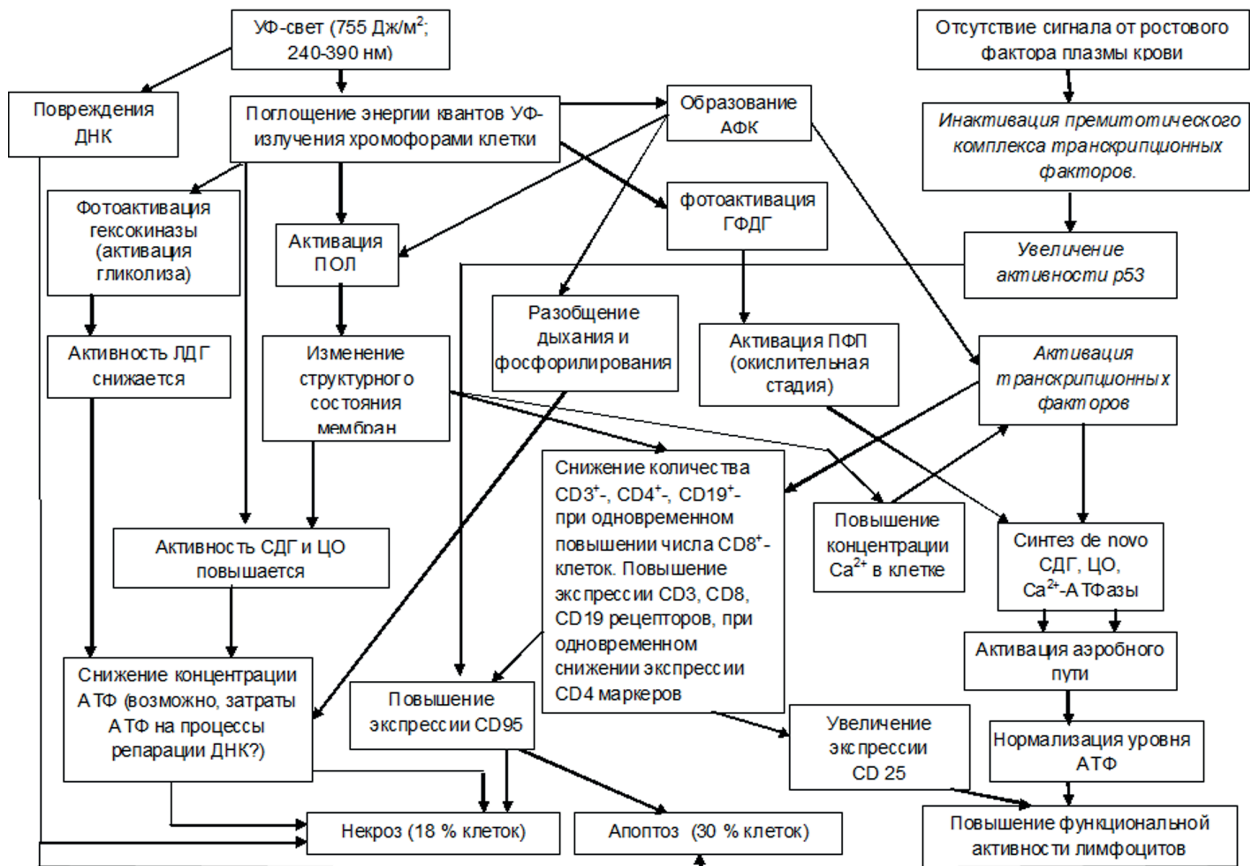


Рис. 10. Схема возможных внутриклеточных процессов, протекающих в лимфоцитах в ходе их УФ-облучения (755 Дж/м²) и суточной инкубации в отсутствие (сверху) и в присутствии (снизу) плазмы крови. Курсивом выделены выводы, сделанные на основе анализа литературных данных

частности, от состояния антиоксидантной системы в клетке и в среде инкубации, а также от присутствия ростовых факторов (при инкубации с аутологичной плазмой), так как известно, что данные факторы предотвращают запуск апоптоза по p53-зависимому пути [47]. АФК и ионы Ca²⁺, активируя факторы транскрипции, играют роль в усилении синтеза ряда белков; в наших экспериментах было показано, что активируется синтез СОД, СДГ, ЦО, ГФДГ, ИЛ-1β, ИЛ-2, CD3, CD4, CD8 и CD25.

УФА-индуцированные изменения структурно-функционального состояния биомолекул могут быть обусловлены поглощением квантов света хромофорами белков и нуклеиновых кислот или опосредованы накоплением АФК и влиянием на структуру белков фотохимических продуктов (в том числе продуктов ПОЛ). В зависимости от того, какие именно компоненты модифицированы в той или иной клетке, запускаются различные сигнальные пути, которые и приводят к реализации клеточного ответа.

Кванты УФ-света поглощаются несколькими разными молекулами-мишенями, важными для клеточной сигнализации, в результате активируются многочисленные пути передачи сигнала. Совместное действие этих путей реализует генетическую программу, определяющую судьбу УФ-облученных клеток.

Энергетические показатели являются высокоинформативными для характеристики функционального состояния иммуноцитов, поэтому исследование энергетического обмена лимфоцитов позволяет выявить, наряду с характерными чертами внутриклеточного обмена веществ, особенности реагирования на УФ-облучение иммунной системы здоровых людей и больных с деструктивно-воспалительными заболеваниями.

Более полное понимание, детализация и систематизация рассматриваемых в статье фотоиндуцированных внутриклеточных процессов, зависимости клеточного ответа от параметров УФ-облучения, от типа клетки, от состояния ее антиоксидантной системы даст возможность регуляции этих процессов. Последнее особенно важно для предотвращения канцерогенеза и фотостарения кожи, а также для более широкого и эффективного применения УФ-терапии в клинической практике.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Карандашов В.И., Петухов Е.Б., Зродников В.С. Фототерапия. М.: Медицина, 2001. 392 с.
2. Wollenberg A., Barbarot S., Bieber T., S Christen-Zaech, M Deleuran, A Fink-Wagner, U

Gieler, G Girolomoni // J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 2018. V. 32. № 5. P.657-682. doi: 10.1111/jdv.14891.

3. Jarrett P., Scragg R. A short history of phototherapy, vitamin D and skin disease // Photochem. Photobiol. Sci. 2017. V. 16. № 3. P. 283-290. doi: 10.1039/c6pp00406g.

4. Бякин С.П., Пиксин И.Н., Федосейкин И.В., Фомин С.Н. Трансфузиологические операции в клинической медицине. М.: Наука, 2006. 268 с.

5. Маркевич П.С., Алехнович А.В., Кисленко А.М., Есипов А.А. // Военно-медицинский журнал. 2019. Т. 340. №. С. 30-36.

6. Власов А.П., Заривчацкий М.Ф., Куданкин Р.М. Кочеткова Т. А., Волкова М. В., Ярусова В. В. // Пермский медицинский журнал. 2015. Т. 32. № 1. С. 6-11.

7. Grimes D.R., Robbins C., O'Hare N.J. // Med. Phys. 2010. V. 37. № 10. P. 5251-5257.

8. Boretti A, Banik B, Castelletto S. // Clin Rev Allergy Immunol. 2020 Oct 7. P. 1-12. doi: 10.1007/s12016-020-08811-8.

9. Bornman J. F., Nigel P., Min Sh., Solomon K.R. // Photochem. Photobiol. Sci. 2019. V. 18. P. 601. doi:10.1039/C8PP90066C.

10. Bais A.F., Bernhard G., McKenzie R.L., Aucamp P.J, Young P.J., Ilyas M., Jöckel P., Deushi M. // Photochem. Photobiol. Sci. 2019. V. 18. № 3. P. 602-640. doi: 10.1039/c8pp90059k.

11. El Ghissassi F., Baan R., Straif K., Grosse Y., Secretan B., Bouvard V., Benbrahim-Tallaa L., Guha N., Freeman C., Galichet L., Coglianò V. // Lancet Oncol. 2009. V. 10. № 8. P.751-752. doi:10.1016/s1470-2045(09)70213-x.

12. Лабораторные методы исследования в клинике. Под ред. Меньшикова В.В. – М.: Медицина, 1987. 197 с.

13. Muszbeck L., Szalo T., Fesus L. // Anal. Biochem. 1977. V. 77. P. 286-288.

14. Артюхов В.Г., Земченкова О.В., Башарина О.В., Ким Я.В. // Радиационная биология. Радиоэкология. 2011. Т. 51. № 2. С. 252-257.

15. Земченкова О.В., Артюхов В.Г., Башарина О.В., Позднякова С.И., Ким Я.В. // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2011. № 2. С. 92-96.

16. Земченкова О.В., Артюхов В.Г., Башарина О.В., Ким Я.В., Наливкина М.А. // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2011. № 1. С. 80-84.

17. Башарина О.В., Земченкова О.В., Артюхов В.Г., Помясова М.Г. // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2018. № 4. С. 59-65.

18. Башарина О.В., Артюхов В.Г., Коробкина

- И.А., Спахова Я.Г. // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2018. № 2. С. 75-80.
19. Hamblin M.R. // *Adv Exp Med Biol*. 2017; 996. P. 295-309. doi: 10.1007/978-3-319-56017-5_25
20. Caricchio R., Reap E.A., Cohen P.L. // *The Journal of Immunology*. 1998. V. 161(1). P. 241-251.
21. Артюхов В.Г., Башарина О.В., Земченкова О.В., Рязанцев С.В. // *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2016. Т. 56. № 1. С. 73-80.
22. Артюхов В.Г., Путинцева О.В., Дубова С.М., Брагина В.А. // *Медицинская иммунология*. 2013. Т. 15. № 4. С. 361-368.
23. Артюхов В.Г., Путинцева О.В., Дубова С.М. // *Медицинская иммунология*. 2009. Т. 11. № 1. С. 79-84.
24. Артюхов В.Г., Путинцева О.В., Брагина В.А., Пашков М.В., Василенко Д.В. // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2012. Т. 153. № 6. С. 891-895.
25. Артюхов В.Г., Путинцева О.В., Дубова С.М., Костенко С.М. // *Иммунология*. 2012. Т. 33. № 1. С. 6-10.
26. Bender K., Blattner C., Knebel A., Iordanov M., Herrlich P., Rahmsdorf H.J. // *J. Photochem. Photobiol*. 1997. V. 37. № 1-2. P. 1-17. doi: 10.1016/s1011-1344(96)07459-3.
27. Korashy H.M., El-Kadi A.O. // *Free Radic. Biol. Med*. 2008. V. 44. № 5. P. 795-806. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.11.003.
28. Башарина О.В., Артюхов В.Г., Савостина И.Е. // *Иммунология*. 2009. Т. 30. № 3. С. 152-154.
29. Kim H.P., Leonard W.J. // *EMBO J*. 2002. V. 21. № 12. P. 3051-3059. doi: 10.1093/emboj/cdf321.
30. Griendling K.K., Sorescu D., Lassegue V., Ushio-Fukai M. // *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 2000. V. 20. № 10. P. 2175-2185, doi: 10.1161/01.atv.20.10.2175.
31. Reth M. // *Nature Immunol*. 2002. V. 3. № 12. P. 1129-1134. doi: 10.1038/ni1202-1129.
32. Grondona P., Bucher P., Schulze-Osthoff J., Hailfinger S., Schmitt A. // *Biomedicines*. 2018. V. 6. № 2. pii: E38. doi: 10.3390/biomedicines6020038.
33. Kaileh M., Sen R. // *Immunol. Rev*. 2012. V. 246. P. 254-271. doi: 10.1111/j.1600-065X.2012.01106.x.
34. Артюхов В.Г., Искусных А.Ю., Башарина О.В., Константинова Т.С. // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2005. Т. 139. № 3. С. 291-293.
35. Valencia A., Kochevar I.E. // *Journal of Investigative Dermatology*. 2008. V. 128. P. 214-222. doi: 10.1038/sj.jid.5700960.
36. Наквасина М.А., Попова Л.И., Лидохова О.В., Артюхов В.Г. // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2018. Т. 166. № 10. С. 475-481.
37. Hajnoczky G., Davies E., Madesh M. // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2003. V. 304. № 3. P. 445-454.
38. Наквасина М.А., Гюппенен М.А., Колтаков И.А., Хотина В.А., Артюхов В.Г. // *Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2016. № 4. С. 67-72.
39. Khoe C.V., Chung L.H., Murray V. // *Journal of Photochem. and Photobiol. B: Biology*. 2018. V. 183. P. 88-100. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2018.04.023.
40. Chung L.H., Murray V. // *Journal of Photochem. and Photobiol. B: Biology*. 2018. V. 178. P. 133-142. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2017.10.034.
41. Arlett C.F., Lowe J.E., Harcourt S.A., Waugh A.P., Cole J., Roza L., Diffey D.L., Mori T., Nikaido O., Green M.H. // *Cancer Res*. 1993. V. 53. № 3. P. 609-614.
42. Артюхов В.Г., Трубицына М.С., Наквасина М.А., Соловьева Е.В. // *Цитология*. 2011. Т. 53. № 1. С. 61-67.
43. Наквасина М.А., Трубицына М.С., Соловьева Е.В., Артюхов В.Г. // *Биофизика*. 2012. Т. 57. № 4. С. 631-640.
44. Артюхов В.Г., Земченкова О.В., Башарина О.В., Рязанцев С.В., Пашков М.В. // *Цитология*. 2014. Т. 56. № 1. С. 77-83.
45. Taylor R, Cullen S, Martin S. // *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [Internet]. 2008. V. 9. № 3. P. 231-241. <https://doi.org/10.1038/nrm2312>
46. Наквасина М.А., Токмакова Е.В., Ефремова Д.С., Артюхов В.Г. // *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2018. Т. 58. № 5. С. 511-516.
47. Schuler M., Green D.R. // *Biochem Soc Trans*. 2001. V. 29, № 6. P.684-688. doi: 10.1042/0300-5127:0290684.

Воронежский Государственный Университет
Башарина О. В., кандидат биол. наук, доцент
кафедры биофизики и биотехнологии
E-mail: bov-bio@yandex.ru

Voronezh State University
Basharina O. V., PhD, Associate Professor, dept.
of Biophysics and Biotechnology,
E-mail: bov-bio@yandex.ru

Башарина О.В., Артюхов В.Г., Земченкова О.В., Наквасина М.А.

Артюхов В. Г., доктор биол. наук, профессор,
зав. кафедрой биофизики и биотехнологии

Artyukhov V. G., PhD., Dsci, Full professor,
Head of the Biophysics and Biotechnology dept.

Наквасина М. А., доктор биол. наук, профес-
сор кафедры биофизики и биотехнологии

Nakvasina M. A., PhD., Dsci, Full professor,
Professor, Dept. of Biophysics and Biotechnology

Воронежский медицинский университет им.
Н. Н. Бурденко

Voronezh Medical University named after N. N.
Burdenko

Земченкова О. В., кандидат биол. наук, до-
цент, кафедра клинической и лабораторной диа-
гностики

Zemchenkova O. V., PhD (Biology), Associate
Professor, Dept. of Clinical and Laboratory
Diagnostics

MODERN IDEAS ABOUT THE MECHANISMS OF ACTION OF ULTRAVIOLET RADIATION ON HUMAN LYMPHOCYTES

O. V. Basharina*, V. G. Artyukhov, O. V. Zemchenkova, M. A. Nakvasina

*Voronezh State University
Voronezh Medical University named after N. N. Burdenko*

Abstract. The article presents an analysis of the work carried out at the Department of Biophysics and Biotechnology of VSU, devoted to the study of the effect of UV light on human lymphocytes. The effect of UV irradiation on cell metabolism, on the synthesis of a number of proteins, on the concentration of calcium in the cell and on calcium-dependent regulatory pathways, on the receptor profile, DNA structure and on the launch of various cell death pathways is considered.

Currently, there is no single scheme describing possible UV-induced processes in various types of immunocytes. We have proposed a scheme describing the most probable processes occurring in UV-modified lymphocytes. Under the same conditions and radiation dose, depending on the state of cells and incubation conditions (presence or absence of autologous blood plasma in the medium), different ways of cellular response can be realized: death by apoptosis or necrosis, or an increase in the functional activity of cells. We have shown that UV irradiation (151 and 755 J/m²) induces changes in both energy metabolism and protein synthesis in lymphocytes. In irradiated cells, activation of the aerobic glucose oxidation pathway is observed, due to this, during incubation in the presence of blood plasma, lymphocytes maintain the level of intracellular ATP necessary for their functioning. At the same time, an increase in the activity of mitochondrial enzymes (succinate dehydrogenase and cytochrome oxidase), as well as glucose-6-phosphate dehydrogenase, is due to their de novo synthesis. In addition, the synthesis of superoxide dismutase and some interleukins (IL-1 β and IL-2) increases in photomodified lymphocytes.

Incubation of UV-irradiated lymphocytes in an environment without blood plasma leads to the separation of respiration and phosphorylation, the content of ATP decreases in cells. UV light in the studied dose range leads to an increase in the concentration of calcium ions in the cell, this changes the signal transmission in the cell and the activity of a number of proteins.

During incubation of UV-irradiated lymphocytes (151 and 755 J/m²), their population and subpopulation composition changes. Using the method of laser flow cytofluorometry, an increase in the expression level of CD3, CD19, CD8, CD16, CD25 and CD95 complexes was revealed, mainly due to their de novo synthesis.

Electrophoresis and DNA comet methods have been used to detect single- and double-strand DNA breaks that occur immediately after irradiation of cells, and during cell incubation, the degree of DNA damage increases significantly.

Analysis of cytograms of lymphocyte distribution during staining with annexin V-FITC and propidium iodide shows that during daily incubation (without blood plasma) of photomodified lymphocytes (151 and 755 J/m²), cell death occurs mainly by receptor-mediated apoptosis. Higher doses of UV light induce necrosis of immunocytes. The use of autologous plasma during incubation of lymphocytes makes it possible

to reduce cell death by apoptosis or necrosis.

Keywords: UV radiation, lymphocytes, photoinduced intracellular processes, signaling intracellular pathways, apoptosis, necrosis.

REFERENCES

1. Karandashov V.I., Petuhov E.B., Zrodnikov V.S. Fototerapiya. M.: Medicina; 2001. 392 s.
2. Wollenberg A., Barbarot S., Bieber T., S Christen-Zaech, M. Deleuran, Fink-Wagner A., Gieler U., Girolomoni G. J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol., 2018, V. 32, № 5, pp.657-682. doi: 10.1111/jdv.14891.
3. Jarrett P., Scragg R. Photochem. Photobiol. Sci., 2017, V. 16, № 3, pp. 283-290.
4. Byakin S.P., Piksin I.N., Fedosejkin I.V., Fomin S.N. Transfuziologicheskie operacii v klinicheskoy medicine. M.: Nauka; 2006, 268 s.
5. Markevich P.S., Alekhnovich A.V., Kislenco A.M., Esipov A.A. Voenno-medicinskij zhurnal, 2019, V. 340, № 3, pp. 30-36.
6. Vlasov A.P., Zarivchackij M.F., Kudankin R.M., Kochetkova T. A., Volkova M. V., Yarusova V. V. Permskij medicinskij zhurnal, 2015, V. 32, № 1. pp. 6-11.
7. Grimes D.R., Robbins C., O'Hare N.J. Med. Phys., 2010, V. 37, № 10, pp. 5251-5257.
8. Boretti A., Banik B., Castelletto S. Clin Rev Allergy Immunol., 2020 Oct 7, V.1, № 12, doi: 10.1007/s12016-020-08811-8.
9. Bornman J. F., Nigel P., Min Sh., Solomon K.R. Photochem. Photobiol. Sci., 2019, V. 18, pp. 601. doi:10.1039/C8PP90066C.
10. Bais A.F., Bernhard G., McKenzie R.L., Aucamp P.J., Young P.J., Ilyas M., Jöckel P., Deushi M. Photochem. Photobiol. Sci., 2019, V. 18, № 3, pp. 602-640.
11. El Ghissassi F., Baan R., Straif K., Grosse Y., Secretan B., Bouvard V., Benbrahim-Tallaa L., Guha N., Freeman C., Galichet L., Cogliano V. Lancet Oncol., 2009, V. 10, № 8, pp.751-752. doi:10.1016/s1470-2045(09)70213-x.
12. Laboratornye metody issledovaniya v klinike. Pod red. Men'shikova V.V. M.: Medicina, 1987, 197 s.
13. Muszbeck L., Szalo T., Fesus L. Anal. Biochem., 1977, V. 77, pp. 286-288.
14. Artyukhov V.G., Zemchenkova O.V., Basharina O.V., Kim YA.V. Radiacionnaya biologiya. Radioekologiya, 2011, V. 51, № 2, pp. 252-257.
15. Zemchenkova O.V., Artyukhov V.G., Basharina O.V., Pozdnyakova S. I., Kim YA.V. Vestnik VGU. Seriya: Himiya. Biologiya. Farmaciya, 2011, № 2, pp. 92-96.
16. Zemchenkova O.V., Artyukhov V.G., Basharina O.V., Kim YA.V., Nalivkina M.A. Vestnik VGU. Seriya: Himiya. Biologiya. Farmaciya, 2011, № 1, pp. 80-84.
17. Basharina O.V., Zemchenkova O.V., Artyukhov V.G., Pomyasova M.G. Vestnik VGU. Seriya: Himiya. Biologiya. Farmaciya, 2018, № 4, pp. 59-65.
18. Basharina O.V., Artyukhov V.G., Korobkina I.A., Spahova YA.G. Vestnik VGU. Seriya: Himiya. Biologiya. Farmaciya, 2018, № 2, pp. 75-80.
19. Hamblin M.R. Adv Exp Med Biol., 2017; V. 996, pp.295-309. doi: 10.1007/978-3-319-56017-5_25
20. Caricchio R., Reap E.A., Cohen P.L. The Journal of Immunology, 1998, V.161 (1), pp. 241-251.
21. Artyukhov V.G., Basharina O.V., Zemchenkova O.V., Ryazancev S.V. Radiacionnaya biologiya. Radioekologiya, 2016, V.56, № 1, pp. 73-80.
22. Artyukhov V.G., Putintseva O.V., Dubova S.M., Bragina V.A. Medicinskaya immunologiya, 2013, V. 15, № 4, pp. 361-368.
23. Artyukhov V.G., Putintseva O.V., Dubova S.M. Medicinskaya immunologiya, 2009, V. 11, № 1, pp. 79-84.
24. Artyukhov V.G., Putintseva O.V., Bragina V.A., Pashkov M.V., Vasilenko D.V. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 2012, V. 153, № 6, pp. 908-912.
25. Artyukhov V.G., Putintseva O.V., Dubova S.M., Kostenko S.M. Immunologiya, 2012, V. 33, № 1, pp. 6-10.
26. Bender K., Blattner C., Knebel A., Iordanov M., Herrlich P., Rahmsdorf H.J. J. Photochem. Photobiol., 1997, V. 37, № 1-2, pp. 1-17. doi: 10.1016/s1011-1344(96)07459-3.
27. Korashy H.M., El-Kadi A.O. Free Radic. Biol. Med., 2008, V. 44, № 5, pp. 795-806. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.11.003.
28. Basharina O.V., Artyukhov V.G., Savostina I.E. Immunologiya, 2009, V. 30, № 3, pp. 152-154.
29. Kim H.P., Leonard W.J. EMBO J., 2002, V. 21, № 12, pp. 3051-3059. doi: 10.1093/emboj/cdf321.
30. Griendling K.K., Sorescu D., Lassegue B., Ushio-Fukai M. Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology, 2000, V. 20, № 10, pp. 2175-2185, doi: 10.1161/01.atv.20.10.2175.

31. Reth M. *Nature Immunol.*, 2002, V. 3, № 12, pp. 1129-1134. doi: 10.1038/ni1202-1129.
32. Grondona P., Bucher P., Schulze-Osthoff .K., Hailfinger S., Schmitt A. *Biomedicines*, 2018, V. 6, № 2, pii: E38. doi: 10.3390/biomedicines6020038.
33. Kaileh M., Sen R. *Immunol. Rev.*, 2012, V. 246, pp. 254–271. doi: 10.1111/j.1600-065X.2012.01106.x.
34. Artyukhov V.G., Iskusnykh A.Yu., Basharina O.V., Konstantinova T.S. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2005, V. 139, № 3, pp. 313-315.
35. Valencia A., Kochevar I.E. *Journal of Investigative Dermatology*, 2008, V. 128, pp. 214-222, doi: 10.1038/sj.jid.5700960.
36. Nakvasina M.A., Popova L.I., Lidohova O.V., Artyukhov V.G. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2018, V. 166, № 10, pp. 445-454.
37. Hajnoczky G., Davies E., Madesh M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003, V. 304, № 3. pp. 445–454.
38. Nakvasina M.A., Gyuppenen M.A., Koltakov I.A., Hotina V. A., Artyukhov V.G. *Vestnik VGU. Seriya: Himiya. Biologiya. Farmaciya*, 2016, № 4, pp. 67-72.
39. Khoe C.V., Chung L.H., Murray V. *Journal of Photochem. and Photobiol. B: Biology*, 2018, V. 183, pp. 88-100. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2018.04.023.
40. Chung L.H., Murray V. *Journal of Photochem. and Photobiol. B: Biology*, 2018, V. 178, pp. 133-142. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2017.10.034.
41. Arlett C.F., Lowe J.E., Harcourt S.A., Waugh A.P., Cole J., Roza L., Diffey D.L., Mori T., Nikaido O., Green M.H. *Cancer Res.*, 1993, V. 53, № 3, pp. 609-614.
42. Artyukhov V.G., Trubitsyna M.S., Nakvasina M.A., Solovieva E.V. *Cell and Tissue Biology*, 2011, V. 5, № 2, pp. 127-135.
43. Nakvasina M.A., Trubicina M.S., Solovieva E.V., Artyukhov V.G. *Biophysics*, 2012, V. 57, № 4, pp. 477-484.
44. Artyukhov V.G., Basharina O.V., Zemchenkova O.V., Ryazancev S.V., Pashkov M.V. *Cell and Tissue Biology*, 2014, V. 8, № 3, pp. 213-219.
45. Taylor R., Cullen S., Martin S. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2008, V. 9, № 3. pp. 231-241. <https://doi.org/10.1038/nrm2312>
46. Nakvasina M.A., Tokmakova E.V., Efremova D.S., Artyukhov V.G. *Radiacionnaya biologiya. Radioekologiya*, 2018, V. 58, № 5, pp. 511-516.
47. Schuler M., Green D. R. *Biochem Soc Trans.*, 2001, V. 29, № 6, pp. 684-688. doi: 10.1042/0300-5127:0290684.